

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

# 半導体などナノ粒子による DDS

(H14-ナノ-004)

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

山 本 健 二

平成19（2007）年3月

# 目 次

## I. 総括報告

半導体などナノ粒子による DDS

主任研究者

山本 健二 (国立国際医療センター研究所・

国際臨床研究センター・センター長) . . . . . 1

## II. 分担研究者報告

### 1. 半導体などナノ粒子による DDS 研究班

#### 1) 半導体などナノ粒子による生物・医療応用

山本 健二(国立国際医療センター研究所・

国際臨床研究センター・センター長) . . . . . 13

#### 2) ヒト血液細胞に対する新規モノクローナル抗体ナノテクノロジーの基礎検討

湯尾 明(国立国際医療センター・血液疾患研究部・部長) . . . . . 18

#### 3) QD を用いた *in vivo* 細胞トラフィックの解析

土肥 多恵子(国立国際医療センター研究所・消化器疾患研究部・部長) . . . 20

#### 4) マラリアワクチン DDS に向けての基礎研究

狩野 繁之(国立国際医療センター研究所適正技術開発移転研究部・部長) . 23

#### 5) 腎疾患治療に向けた DDS

名取 泰博(国立国際医療センター研究所・臨床薬理研究部・部長) . . . . . 25

#### 6) QD 標識 MPO 抗体による血管炎の解析

鈴木 和男(国立感染症研究所・生物活性物質部・室長) . . . . . 27

#### 7) 量子ドットを利用した硝子体可視化の試み

山本 悟(国家公務員共済組合連合会横浜栄共済病院眼科・医長) . . . . . 36

### 2. アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS 研究班

アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS

落谷 孝広(国立がんセンター研究所・室長) . . . . . 39

### 3. ナノミセルによる DDS

#### 1) 肺動脈性高血圧症モデル動物に対する PEG-PAsp(DET)を用いたアドレノメデュリン遺伝子導入の効果

斯波 真理子(国立循環器病センター研究所・室長) . . . . . 43

#### 2) 高分子ナノテクノロジーに基づく薬物・遺伝子デリバリー

片岡 一則(東京大学大学院工学系研究科・材料学・教授) . . . . . 49

Ⅲ.	研究班会議	59
Ⅳ.	シンポジウム「Biomarker と DDS:ナノ技術の多元と諸相」(財団法人・医療機器センター共催)	71
Ⅴ.	研究成果の刊行に関する業績一覧	81
Ⅵ.	研究成果の刊行物・別刷	87

平成18年度厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
主任者総括研究報告書

半導体などナノ粒子による DDS

主任研究者

山本健二 国立国際医療センター研究所・国際臨床研究センター・センター長

分担研究者

1. 半導体ナノ粒子による DDS 研究班

湯尾明（国立国際医療センター研究所・血液疾患研究部・部長）

土肥多恵子（医療センター研究所・消化器疾患研究部・部長）

狩野繁之（国立国際医療センター研究所・適正技術開発移転研究部・部長）

名取泰博（国立国際医療センター研究所・臨床薬理研究部・部長）

鈴木和男（国立感染症研究所・生体防御研究室・室長）

山本 悟（国家公務員共済組合栄病院・眼科・医長）

2. アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS 研究班

落谷孝広（国立がんセンター研究所・腫瘍転移・室長）

3. ナノミセルによる DDS 研究班

斯波真理子（国立循環器病センター研究所・バイオサイエンス部・室長）

片岡一則（東京大学大学院工学系研究科・材料学・教授）

研究概要

現在様々な薬物が開発されている。本来想定していた作用とは、異なる作用を有するものもある。その予期しなかった作用は、人体に危害を加える場合も多々有る。また、薬物の性状を変えるために添加剤を用いることがある。その一つ一つが特に大きな危害を持たなくても、複合すると大きな副作用があるものも出ている。このような予期せぬ副作用が、人体のどこで起こっているものなのかという問いに答えるだけの評価技術、計測技術は、未だ十分開発されていない。

一方近年様々な新規機能材料が開発され、産業に利用されようとしている。これらの新規材料は、エネルギー、IT、生物・医療等様々な分野で従来の効率を遥かに上回る可能性のあるものばかりである。その新規機能材料の一つに量子ドットがある。本研究は、この量子ドットを用いてタグ付き薬物による治療システムを開発した。これにより、人体の臓器局在性、細胞内局在性も解析することが可能と成る。

この半導体ナノ粒子をはじめ、下記に示しているように本研究では、アテロコラーゲンナノ粒子、ブロック共重合体を用いた薬剤伝達システムの開発を行っている。

1) 半導体ナノ粒子を用いた薬剤伝達システムの開発

一桁ナノメートルサイズの半導体ナノ粒子（量子ドット）を用いて、生物・医療分野に利用できるように、表面加工および表面修飾し、薬物の伝達システムの開発及び遺伝子伝達システムの開発を目的としている。またそれに伴い、半導体などナノ粒子の細胞毒性などの安全性について検討すると同時に一桁ナノ粒子の持つ量子サイズ効果などによる、蛍光プローブとしての生物・医療応用を展開することを含めて検討することを目的としている。薬剤伝達システムは、副作用の軽減、治療効果の向上、疾病治療にあたって QOL の向上を目指す。また医療応用可能な安全で安心な量子ドットの開発を行う。本年度は、このためシリコンを

材料とするシリコン量子ドットを開発した。またその応用として消化器潰瘍の治癒のメカニズムの解析と手術後癒着の原因の解明と治療法を開発を行った。さらに急速進行性糸球体腎炎（ARDS）の病期の指標となる検査法を開発し、また高齢者に多発する眼科硝子体変性の検査法を開発した。

## 2) アテロコラーゲンナノ粒子を用いた薬剤伝達システムの開発

我々はバイオマテリアルの一種であるアテロコラーゲンがDNAや核酸医薬と静電的な相互作用して複合体を形成し、効率よく細胞に取り込まれた後、遺伝子の発現や制御に有効であることを明らかにしてきた。このアテロコラーゲンと小さな二重鎖RNA(siRNA)とのナノサイズの複合体は生体に投与した場合、血清や体液中のヌクレアーゼからsiRNAを保護し、さらに腫瘍部位に集積する傾向があることを見出した。これらの性質は、アテロコラーゲン・ナノ粒子によるDDSがsiRNAを全身性にデリバリーし、転移性の腫瘍に対する治療戦略として有用であることを示唆するものである。

## 3) ブロック共重合体を用いた遺伝子伝達システムの研究開発

ブロック共重合体から形成される高分子ミセル型遺伝子ベクターの機能評価と細胞に対する作用メカニズムの解析を通して、ベクター設計の最適化を行うことである。本年度は、高分子ミセル型遺伝子ベクターの組織浸透性を評価するために、細胞スフェロイドに対する遺伝子導入実験を行った。さらに、前年度までに確立した環状RGDペプチドリガンド導入高分子ミセルの内核にジスルフィド架橋を導入したところ、リガンドを介した遺伝子導入効率が顕著に高まることを確認した。

また動物実験においては、PEG-PAsp(DET)を用いたアドレノメデュリン遺伝子の気管内投与による肺への遺伝子導入を行い、肺動脈性肺高血圧症のモデル動物の治療実験を行った。PEG-PAsp(DET)により、アドレノメデュリン遺伝子の導入が可能であり、治療効果として、右室圧の有意な低下を認めた。PEG-PAsp(DET)を用いた気管内への遺伝子導入により、肺の組織に異常を認めず、ポリエチレンイミン(PEI)によって、激しい炎症を認めたこととは対照的であった。これらのことから、PEG-PAsp(DET)は、*in vivo*で治療効果を得るのに十分な治療遺伝子の導入が可能であること、炎症などを引き起こさず、安全な治療法であることが示唆された。これらのことは、臨床試験にむけて、大きな進歩であると考えられる

## A. 研究目的

### 1) 研究の背景

これまでに我々は、現在飛躍的な進歩を遂げているナノテクノロジーを利用し、薬剤を効率良く患部に運び、極少量の薬物量でも局所的に高濃度となり、ターゲットに対して有効性を示す薬剤伝達システムの開発を行っている。副作用を軽減し、安全で効率の良い治療が可能となるよう、研究開発を続けている。またこれまで摂取した薬剤が必要な部位以外にの臓器にも到達しそこで副作用の引き金となる反応が起こるため、安全な薬剤として利用する事が不可能であったものも、薬剤として利用可能となるよう、特定部位には、薬剤伝達しないアンチドラッグデリバリーシステムを提唱し考えている。このため安全で有効な

ドラッグデリバリーシステムの開発を目指すナノ粒子の研究開発が必要となり、それを行ない、またこのシステムの評価を動物について初めて行った。

### 2) 目的

本研究は、半導体ナノ粒子を用いて薬物や遺伝子の伝達システムの開発を目的にしている。またそれに伴い、半導体などナノ粒子の細胞毒性などの安全性について検討すると同時に一桁ナノ粒子の持つ量子サイズ効果などによる、蛍光プローブとしての生物・医療応用を展開することを含めて検討することも目的としている。

半導体ナノ粒子は、量子サイズ効果によって、強力な蛍光を出すことが可能であるため、細胞内レベルから生体レベル

まで、その動体を追跡することが可能である。そのため、薬物に結合された量子ドットを体外から追跡することも可能であり、副作用や安全性について詳しく検討することが可能である。特に血中濃度や、臓器分布などが、放射性同位元素を用いないで単に蛍光を測定すれば知ることが可能という特性を持つ。個人による、濃度分布、局在性、滞留時間などの測定を簡便に行うことが可能であるため、特に個人個人特異的な副作用についてモニターすることが可能となる。

我々は、さらに疾患臓器に特異的に局在できるような表面加工を行う方法（肺特異的、肝臓特異的表面加工法）を開発することも目的にしている。これまでに我々は、細胞レベルではライソゾーム、核、ミトコンドリア、細胞質、細胞膜など細胞小器官特異的に伝達する技術を開発している。これらを統合することにより生体において、臓器特異的、細胞特異的、さらに細胞内小器官特異的に伝達可能なキャリアー粒子を開発することが可能であり、生体内において臓器から細胞小器官まで薬剤を効率良く伝達できるシステムを構築することを目的に開発する。その応用は、薬剤のみならず遺伝子のベクターとして期待することが可能であり、動態追跡とあわせて安全で安心な遺伝子伝達システムとしても期待される。

本研究のもう一つのアプローチとして我が国の死因の第一位の座を占める疾病は21世紀に入っても「がん」である。がんは働き盛りの青壮年の最大の死因でもあり、保健医療上の対策の重要性は極めて高い。がんの本態はゲノムの不安定性そのものであり、多段階発がん過程によって複数の遺伝子構造・発現異常が集積することにある。このような研究を背景に、がんの大規模なゲノム解析が、診断・治療の創薬標的を同定し、個別化された予知医療を確立するために行われてきた。その成果が新たながん関連遺伝子・治療応答性関連遺伝子やその候補領域を多数同定することにつながっている。これからの研究の焦点は、従来の研究から多数同定されつつある創薬標的候補遺伝子の絞り込みをいかに効率的に実施し、魅力的な創薬標的をひ

とつでも多く同定することである。ついで求められるのは、それらの候補をいかに効率よく新薬開発と臨床試験の推進へと導くかである。この一連の過程でいくつかのテクノロジーが急発展をみせている。そのひとつが遺伝子の機能を制御することのできるRNAiテクノロジーである。その本体であるsiRNAの核酸医薬品としての期待は大きく、がんを含めた多くの疾患や感染症に対する新規の治療法として注目されている。本研究ではそのsiRNAのデリバリー方法として注目されるアテロコラーゲンDDSによるナノ粒子のデリバリー・テクノロジーを中心に解析を進めており、本年度はヒト前立腺がんの骨点モデルマウスを用いて、siRNAの全身性デリバリーに関するアテロコラーゲン・ナノ粒子によるDDSの能力を検証した。

また本研究のもうひとつの重要な課題は、遺伝子治療におけるベクターの開発である。現在ベクターの安全性と製剤性に優れ、比較的安価な非ウイルス型遺伝子ベクターに対する期待が高まっている。これに関連して、分担研究者である片岡らは、ポリエチレングリコール-ポリカチオンブロック共重合体がDNAと静電的に相互作用することで形成される高分子ミセル型遺伝子ベクターの開発を行ってきた。高分子ミセルは、ウイルス（～50ナノメートル）と同等という微小サイズでありながら、分子認識能や環境応答能などのマルチ機能を搭載可能な超機能化システムであり、表面を生体適合化する事も可能である。本研究において、は図1に示すように、遺伝子等を内核に搭載した超機能化高分子ミセルの開発を行い、「必要な時（timing）に、必要な部位（location）で、必要な診断や治療（action）」を最小限の副作用で達成する「ナノ遺伝子治療」を創出することを目的としている。固形がんに対する遺伝子デリバリーにおいては、がん組織に対する遺伝子キャリアの浸透性が重要となるが、本研究では、高分子ミセル型遺伝子ベクターの組織浸透性を評価するために、前年度までに確立したがん細胞スフェロイドに対する遺伝子導入実験を行う。また、がん細胞に選択的かつ効率的な遺伝子導入を実

現するために、プラスミド DNA を内包した内核に細胞内還元的環境下で選択的に開裂するジスルフィド(SS)架橋を導入し、さらに、がん細胞や腫瘍血管内皮細胞に受容体の過剰発現が認められる RGD ペプチドをリガンド分子として表層に搭載したインテリジェント型高分子ミセルを開発し、その機能を解析することを目的とする

### 3) ゴール

半導体ナノ粒子開発においては、米国におけるナノテクノロジー研究の最重点課題の一つとされている量子サイズ効果 (Quantum Dots) 理論に基づき、半導体が長時間蛍光を保持し、サイズにより蛍光色が異なるという極めて特異的な性質を利用して、生体に安全でかつ様々な機能を果たす半導体ナノ粒子の開発を行なう。また、開発したナノ粒子に薬物を結合させた (Tagging) 物質の細胞 (血球細胞、血管内皮細胞等)、組織、生体における薬物動態を解析することにより、そのメカニズムを解明し、有効な薬物伝達システム (DDS) の開発を目指している。

またアテロコラーゲン・ナノ粒子については、そのキャリアーにより siRNA の全身性骨転移モデルへのデリバリーが可能になった事実は、がん等の固形腫瘍ばかりではなく、全身の恒常性の維持に働く基礎代謝などの生理現象や疼痛、倦怠、疲労、さらには精神活動に対する現象の制御目指している。我々のアテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS は、動物の全身性の臓器、組織にまで siRNA をデリバリーすることから、今後、siRNA の核酸医薬品としての利用価値が確立すれば、様々な疾患を標的にした医療への応用が期待できる。

さらに超機能高分子ミセルは、ウイルスと同等という微小なサイズでありながら、分子認識能や環境応答などのマルチ機能搭載可能な超機能高分子ミセルであり、表面を生体適合化することも可能であるため、遺伝子等を内核に搭載した超機能分子ミセルを用い、肺高血圧症、高脂血症、虚血性冠動脈疾患の再狭窄予防などを視野にいれ、臨床応用可能な治療システムの開発を目指す。

### 4) 研究の発展

界面活性剤などを利用して一桁ナノ空間を作成しその空間の中に半導体を自己組織させるものである。遷移金属やシリコンによる半導体は、一桁ナノメートルの小さな粒子 (クラスター) にまでなると量子サイズ効果により様々な特異的性質を持つようになる。金属クラスターは、蛍光を発することができ、その蛍光色は粒子の径が小さいほど小さな波長の蛍光色と成る。其の蛍光を得るための励起光は、蛍光波長より短い波長ならばよい。またこのナノ粒子は、一度励起された後、さらにもう一度励起すると光量が増すと言う量子メモリー効果を持っている。Cd/Se からなる半導体は、さらに安定化するために ZnS の外郭を持って安定化させ全体で 4 nm 程のナノ粒子を得ることができる。このナノ粒子はトルエンなどの有機溶媒には可溶であるが、水溶液にはほとんど解けないため生物・医療応用するためには水溶性表面加工を行って水溶液中でも溶解させることができる。表面加工としては、有機酸、アクリル酸、シロキ酸、アミンなどである。これら表面加工を行い、表面加工を行った官能基を用いて生体分子、例えば蛋白、オリゴペプチド、核酸などに結合 (Tagging) させることが可能である。

このナノ粒子を親水加工し、同時に薬物を結合させ、薬剤の生体内動態観察可能な量子ドットタグ付き薬物を製造することに成功した。これに関わる動物実験を行い薬物の効果を保ちながら各臓器における局所濃度の計測に極めて有効であることが判明した。安全で安心な薬物であることが生体内動態観測で評価できるシステムを創出することを可能としている。

### 5) 具体的な目標

半導体ナノ粒子、アテロコラーゲンナノ粒子、ブロックポリマーの3つに分けてその各々の目的を以下に記述する。

#### (a)半導体ナノ粒子

本研究は、半導体などナノ粒子を用いて薬剤伝達システムを開発することを目的としている。薬剤伝達システムは、副作用の軽減、治療効果の向上、疾病治療にあたって QOL の向上を目指す。ガン治療に於ける薬剤を伝達するシステムは、現在新生血管などからの浸出と貯留による効果

(EPR 効果) を用いるところが大きい。これは、ガン組織がその成長に伴う血管新生が疎な間隙を形成し、そのためこの間隙を 100 nm ほどの粒子を通過することが知られている。現在ガン治療に用いられるミセル型のキャリアーは、この効果を利用して特異的に利用されている。しかしながら、ガン治療以外の疾病にあたっては、疎な間隙を形成する新生血管の EPR 効果を利用することができないため、10 nm 以下することが不可能であるミセル型のキャリアーの応用は不可能となっている。またガン以外の疾病について実際に血管を通じて伝達できない場合もあり、その応用について様々な制限や不都合が生じる。そこで、従来の不都合な点を、解決するには更に小さなキャリアーを使用する必要性があり、現在我々は、1~8 nm の半導体を薬剤キャリアーとして用いるシステムを開発している。通常このサイズのものをナノ粒子と呼んでいる。このサイズならば、薬物を結合させても 10 nm 以下となり生体のほとんどの場所に伝達できる可能性があり、また排出も透過型電子顕微鏡を使って尿から行われることが確認されている。そのため安全性についても期待することができる。

また半導体ナノ粒子は、量子サイズ効果によって、強力な蛍光を出すことが可能であるため、細胞内レベルから生体レベルまで、その動体を追跡することが可能である。そのため、薬物に結合された量子ドットを体外から追跡することも可能であり、副作用や安全性について詳しく検討することが可能である。特に血中濃度や、臓器分布などが、放射性同位元素を用いないで単に蛍光を測定すれば知ることができるという利点がある。個人による、濃度分布の違いなど簡便に行うことが可能であるため、特に個人個人特異的な副作用についてモニターすることができるようになる。

薬物についての個人の差により、副作用が出、また健康を極めて害する場合も起こっている。本研究では、疾患臓器に特異的に局在できるような表面加工を行う方法を既に、(肺特異的、肝臓特異的表面加工法)を開発している。一方、細胞レベルではライソゾーム、核、ミトコンドリアなど細胞小器官に伝達することを実現している。これらを統合することにより生体にお

いて、臓器特異的、細胞内小器官特異的に薬物を効率良く伝達できるシステムを構築することが可能である。

またさらに安全な量子ドットの開発として現在シリコン量子ドットの開発を行っている。この量子ドットは薬物などと共有結合を作ることが可能であるため安定に体内を巡ることができるため薬物効果などの点で安全性がさらに大きくなることが期待できる。

#### (b)アテロコラーゲンナノ粒子

我が国の死因の第一位の座を占める疾病は21世紀に入っても「がん」である。がんは働き盛りの青壮年の最大の死因でもあり、保健医療上の対策の重要性は極めて高い。がんの本態はゲノムの不安定性そのものであり、多段階発がん過程によって複数の遺伝子構造・発現異常が集積することにある。このような研究を背景に、がんの大規模なゲノム解析が、診断・治療の創薬標的を同定し、個別化された予知医療を確立するために行われてきた。その成果が新たながん関連遺伝子・治療応答性関連遺伝子やその候補領域を多数同定することにつながっている。これからの研究の焦点は、従来の研究から多数同定されつつある創薬標的候補遺伝子の絞り込みをいかに効率的に実施し、魅力的な創薬標的をひとつでも多く同定することである。ついで求められるのは、それらの候補を医薬品開発のスキームにうまくのせて、産官連携による新薬開発と臨床試験の推進である。この一連の過程でいくつかのテクノロジーが急発展をみせている。そのひとつが遺伝子の機能を制御することのできる RNAi テクノロジーである。その本体である siRNA の核酸医薬品としての期待は大きく、がんを含めた多くの疾患や感染症に対する新規の治療法として注目されている。本研究ではその siRNA のデリバリー方法として注目されるアテロコラーゲン DDS によるナノ粒子のデリバリー・テクノロジーを中心に、マウスを用いたヒト精巣腫瘍モデルやヒト前立腺がん骨転移モデルにおける siRNA の核酸医薬としての能力を検討する。

#### (c) ブロック共重合体

近年のウィルスベクターによる副作



用の報告から、ウィルスベクターに対する安全性が懸念されている。合成ベクターは、安全性の面からはウィルスベクターより優れるが、特に *in vivo* での遺伝子発現効率の低さが、その臨床応用を阻んできたと言える。

我々は、遺伝子導入ベクターとして、カチオン性ポリマーとポリエチレングリコールのブロック共重合体を使用し、DNAとの会合により高分子ナノ粒子を作製し、*in vitro* および *in vivo* での遺伝子導入を行ってきた。ポリカチオンとしては、最初はポリLリジンを用い、遺伝子導入効率を上昇させることを考慮して、現在は DET (poly — amino — ethylene amino — propyl aspartamide)を用い、特に *in vivo* において良好な遺伝子導入、発現効率を示している。昨年度の研究では、PEG-DET を用いたルシフェラーゼ遺伝子の気管内投与により、従来のポリマーに比べて100倍程度の遺伝子発現を認めていた。本年度は、これらの遺伝子導入の系を用いて、疾患モデル動物の治療を行い、治療効果の評価を行った。

また化学構造が異なるポリカチオンを合成し、それらの機能について我々が独自に開発した評価法を用いて検討を行い、ベクターの化学構造-機能相関を明確にすることを目的としている。さらには、それらの合成ベクターの細胞内における挙動について様々な検討を行うことで有用な合成ベクターを開発するための基本要件を明らかにすることを目指した。

## B. 研究結果

本年度は以下の成果が得られた

### 1) 半導体ナノ粒子による DDS

(1) 半導体ナノ粒子による生物・医療応用

(2) ヒト血液細胞に対する新規モノクローナル抗体ナノテクノロジーの基礎検討

(3) QDを用いた *in vivo* 細胞トラフィックの解析

(4) マラリアワクチン DDS に向けての基礎研究

(5) 腎疾患治療に向けた DDS

(6) QD 標識 MPO 抗体による血管炎の解析

(7) 量子ドットを利用した硝子体可視化の試み

### 2) アテロコラーゲンナノ粒子による

## DDS

### 3) 機能高分子ミセルによる遺伝子導入システム

テム

(1) 高分子ナノテクノロジーに基づく薬物・遺伝子デリバリー

(2) 生物・医療応用 PEG-DET による *in vivo* 遺伝子導入の試み

以下に主任研究者および分担研究者の研究概要を記載する。詳細は、各分担の項参照。

#### 1) 半導体ナノ粒子の DDS 班 :

##### (1) 半導体ナノ粒子の生物・医療応用

半導体ナノ粒子は、量子サイズ効果によって、強力な蛍光を出すことが特性を持つため、細胞内レベルから生体レベルまで、その動体を追跡することが可能である。この特性により、薬物に結合された半導体ナノ粒子を体外からも追跡することも可能であり、副作用や安全性について個人レベルで詳しく検討することができる。本研究は、半導体ナノ粒子を用いて薬物や遺伝子の伝達システム開発研究である。またそれに伴い、半導体などナノ粒子の細胞毒性などの安全性について検討すると同時に一桁ナノ粒子の持つ量子サイズ効果による発光する蛍光ナノプローブを医療用に応用し、更に安全なナノ粒子を設計・製造することを目的としている。さらに今後の医療応用のため安全で安心な薬物キャリアーを手にする目的により、本年度は、シリコンドットを開発した。またさらにこのシリコンドットを利用し薬物などの低分子化合物に結合させることに成功した。今後、薬剤動態を観察するその手段の一つの候補として可能性を持つ。

本研究は、5年間のナノメデシン指定研究として得た知見や成果を土台に臨床の現場で利用できる薬剤キャリアーおよびその医療技術開発を目指している。これまでに我々は、特異的な表面加工を開発し、生きた細胞の核、ミトコンドリア、ライソゾーム、細胞質、細胞膜への半導体ナノキャリアー伝達に成功している。本研究では、臓器特異的、細胞特異的、更に細胞小器官特異的薬剤伝達システムを開発する。

またこれまでにモデル薬物として抗圧剤を半導体ナノ粒子に結合させ家族性高

血圧ラットを用いたモデル実験に成功した (Manabe et.al. IEEE Trans. BioNanoSci.)。今後、本研究ではモデル薬物として 20 種類の薬物を検討している様々な疾患に対する評価を行う予定である。それに伴いモデル薬物を体外から、その動態や局在性を観測する技術の開発に着手し、薬剤副作用の解析に使用可能なシステムを開発する予定である。実験成果の一部は、日本経済工業新聞に 2006 年 7 月発表された。

さらに本研究では、非リンパ球免疫細胞の細胞伝達システムの開発を行った。これまでに腹腔マクロファージがケモカインの一つである CCL1 によって活性化し、腹膜内皮細胞との凝集体を構成し、一つには消化器潰瘍の治癒に役立ち、他方では術後癒着を誘導することが、半導体ナノ粒子によって判明した (Hoshino et.al. J. of Immunology 2007)。本研究年度では、レセプター抗体などを用いさらに術後癒着を阻止する方法を開発し、疾病治療効果の向上を。さらに本研究は、破骨細胞による骨融解、好中球による急性糸球体腎炎、川崎病にも同様な現象が見られた。そこで破骨細胞による歯髄炎、骨融解、活性化好中球による腎不全や冠動脈の血管炎の診断・治療への応用を行える可能性が見えてきた。

本研究における薬剤伝達システムおよび細胞伝達システムの研究成果により、直接的に副作用の軽減、治療効果の向上、疾病治療にあたって QOL の向上を実現できると考えている。

(2) ヒト血液細胞に対する新規モノクローナル抗体ナノテクノロジーの基礎検討班：

EMR1cDNA をヒト単球細胞株 Mono Mac 6 より RT-PCR にて取得した後に、免疫原としてヒト EMR1 とヒト IgG1 定常部との遺伝子融合によりヒト EMR1 可溶性蛋白を作製した。

ヒト EMR1 分子は膜表面局在分子であり、更に細胞膜直上に GPS ドメインと呼ばれる蛋白質切断酵素の認識部位を持つため、そのままでは融合蛋白質として発現出来ないため、膜直上の cDNA 配列に PCR にてアミノ酸のアラニンに相当する配列を付与してから発現ベクター構築に用いた。

可溶性ヒト EMR1 発現ベクターをマウ

ス線維芽細胞株 Balb/3T3 へ遺伝子導入し、薬剤選択の後、安定発現細胞を取得した。無血清培地に馴化させ、大量培養した培養上清を限外濾過濃縮し、Protein G カラムで精製を行い、免疫原とした。

免疫は合計 5 回実施し、血清中の抗体価を Mono Mac 6 細胞への染色の強度で判定し、抗体価が最大であった一匹について追加免疫を行い、3 日後にポリエチレングリコールを用いてマウスミエローマ細胞との細胞融合を行った。

細胞融合してから 14 日後にスクリーニングを行い、癒合細胞の増殖があり、抗体価が高く、Mono Mac 6 細胞及び可溶性ヒト EMR1 蛋白に対して有意に反応するクローンを選択し限界希釈法でクローニングを行い、最終的に二つのクローン 3H2、4A7 を取得した。二つのクローン 3H2、4A7 は、共にマウス IgG1 であった。

これらは、ヒト末梢血単球、リンパ球、顆粒球の他に様々なヒト細胞 (株) (血管内皮細胞 HUVEC、線維芽細胞 HDFa、CD34 陽性造血幹細胞、白血病細胞株 (HL-60, U937, THP1, K562, Mono Mac 6, Jurkat)、骨髄腫細胞株 (ARH 77, Hs-Sultan)) と有意に結合した。マウスマクロファージ細胞株 (F4/80 陽性) でも、同様にこの抗体での染色が認められた。

既存のマウス EMR1 に対する抗体との比較では、エピトープの交差は見られなかった。マウスミエローマ細胞株 (F4/80 陰性) に対しては、3H2、4A7 は反応しなかった。

マウスに於いて、EMR1(F4/80)の発現はマクロファージに限定されており、その発現と 3H2、4A7 との反応性は相関しているものと思われた

(3) QD を用いた *in vivo* 細胞トラフィックの解析班：

最初に大腸炎に伴う腹膜癒着マウスモデルの作成を行った。具体的には、C57BL6 マウスに、2% トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS): エタノール = 1:1 溶液を TNBS 100  $\mu$ g/g weight として注腸投与し、急性大腸炎を誘導した。3 日後に開腹し、大腸への周辺臓器の癒着を以下のようにスコア化した。一部の実験においては QD ラベルしたマクロファージを大腸炎誘導前に腹

腔内に移植しておき、大腸への集積を経口イメージング装置により解析した。抗-CCL1 中和抗体あるいは control rat IgG (150  $\mu$ g) は大腸炎誘導 1 時間前に腹腔内投与した。

つぎに、外科ストレスによる術後癒着マウスモデルの作成をした。すなはち、Wild type (WT) または CCR8 欠損 C57BL/6 マウスを麻酔下に正中切開により開腹し、左右の壁側腹膜を止血鉗子でつまみ絹糸で結紮する“ischemic button”を作製した。6 日後、開腹してそれぞれの ischemic button への臓器癒着観察し、次のようにスコア化した: 0, no adhesion; 1, thin filmy adhesion; and 2, thick planter adhesion. 抗-CCL1 中和抗体あるいは control rat IgG (150  $\mu$ g) は手術操作の直後と 3 日後に腹腔内投与した。

抗マウス CCL-1 中和抗体の腹腔内投与により、炎症に伴う癒着及び外科ストレスに伴う腹膜癒着は顕著に阻害された(表 1)。

また、炎症誘導後の大腸漿膜面及び穿孔性潰瘍部への QD ラベルマクロファージの集積にも明らかな阻害効果が見られた。

CCL/CCR8 相互作用の阻害による腹膜癒着を防止できることが明らかになった。

(4) マラリアワクチン DDS に向けての基礎研究班:

培養開始後 3 2 時間後の成熟シズント形成率は、PBS を加えた培養系を 100% とした場合、抗エノラーゼ抗体を加えた培養系では 33% であった(増殖阻害率 67%)。このことから抗エノラーゼに対する特異抗体が原虫の増殖阻害を示すことが判った。また抗ペルオキシレドキシニン抗体を加えた培養系の成熟シズント形成率は 88%(増殖阻害率 12%)であった。

加えた抗エノラーゼ抗体の感染赤血球での局在を、量子ドット標識二次抗体、Alexa568 標識二次抗体で検出を試みたが、赤血球表面、原虫内部のいずれも特異蛍光は検出されなかった。対照として原虫タンパクをカップリングさせたビーズに対する抗エノラーゼ抗体、量子ドット標識二次抗体を用いた間接蛍光抗体法では、ビーズの表面が蛍光表示された。

さらに、非同調原虫を、通常のアセトン/パラホルムアルデヒドで固定してトライトン処理した後に、間接蛍光抗体法によ

る原虫内部のエノラーゼの検出を試みたが、Alexa568 標識二次抗体では細胞質中に蛍光を発するタンパクの局在を検出できたが、量子ドット標識二次抗体を用いた場合には発光しないことが判明した。

(5) 細胞性フィブロネクチンは正常ラットの腎皮質にはほとんど検出されなかった。半月体性腎炎モデルにおいては発症初期の 7 日目にはほとんどの糸球体のメサンギウム領域やボーマン嚢上皮に検出され、尿細管上皮細胞の周囲にも沈着が見られた。14 日目になるとメサンギウム領域にはほとんど見られなくなり、代わってボーマン嚢上皮や尿細管周囲の沈着がより強くなった。その後、間質の線維化が進むに連れ、これらの沈着も強くなった。糖尿病性腎症でも尿中アルブミンが増加し始めた時期に糸球体メサンギウム領域にわずかに細胞性フィブロネクチンの沈着が見られたが尿細管上皮の周囲にはほとんど認められなかった。尿蛋白が上昇するに連れて一部のボーマン嚢上皮及び尿細管上皮の周囲が陽性になり、病態の進行とともに強くなったが、半月体性腎炎モデルと比べるとその強度は遙かに弱かった。微小変化型ネフローゼモデルでは糸球体の病変がほとんど見られないと言われていたが、蛋白尿が顕著になる 7 日目にはボーマン嚢上皮で細胞性フィブロネクチンの強い染色があり、特に皮質の深い部分にある糸球体ではその沈着が顕著であった。メサンギウム領域にも弱い染色が見られ、またボーマン嚢上皮の染色の強い糸球体近傍の尿細管上皮の周囲にも強い反応が見られた。単球/マクロファージの糸球体や間質への浸潤は軽微であり、また皮質の浅い部分と深い部分にも差は見られなかったことから、炎症の程度と細胞性フィブロネクチンの沈着とは関連しないと考えられた。

オステオポンチンについては正常ラットのボーマン嚢上皮及び尿細管上皮の一部に弱い反応が認められた。半月体性腎炎モデルでは、尿細管上皮における発現が非常に強くなり、ほとんどの尿細管で陽性所見が見られた。また一部のボーマン嚢上皮にもオステオポンチンの染色像が観察された。微小変化型ネフローゼモデルで蛋白尿が顕著になる 7 日目に、皮質の全層にわたるほとんどの尿細管上皮にオステオポ

ンチンの強い染色が見られ、その分布は細胞性フィブロネクチンのよりも広がった。しかし尿蛋白が依然として高値を示す14日目になると一部の尿細管上皮のオステオポンチン発現は減弱し、個体によっては大半の尿細管上皮で陰性になった。

(6) QD 標識 MPO 抗体による血管炎の解析班：QD 標識の MPO 抗体を作製し、好中球および腎糸球体内皮細胞への MPO 抗体の作用を検討した。MPO は、ANCA の抗原となる好中球細胞質顆粒内分子で、急速進行性糸球体腎炎 (RPGN) 症候群の病態と相関関係を示し、RPGN などの血管炎のマーカとなっている。MPO-ANCA による好中球の活性化と内皮細胞の傷害の誘導への関与を調べた。

すでに、好中球表面あるいは顆粒内部に存在する MPO を高感度かつ迅速に検出するために、MPO に対する抗体を作成し、蛍光ナノ粒子 QD で標識した。粒子表面への抗体の結合を電子顕微鏡で、また抗体機能については蛍光抗体を用いた Western Blotting でそれぞれ確認し、報告した (Akiyoshi Hoshino, Tomokazu Nagao, Toshiko Ito-Ihara, Akiko Ishida-Okawara, Kazuko Uno, Eri Muso, Noriko Nagi-Miura, Naohito Ohno, Kazuhiro Tokunaka, Shiro Naoe, Hiroshi Hashimoto, Masato Yasuhara, Kenji Yamamoto, Kazuo Suzuki. Trafficking of QD-conjugated MPO-ANCA in Murine Systemic Vasculitis and Glomerulonephritis model mice. Microbiol. Immunol. in press)。

さらに、好中球を好中球の走化因子の FMLP ペプチドで刺激することで、MPO の細胞外へ表出が観察された。また、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  および IL-8 の刺激によっても同様に MPO の表出が確認された。

活性化好中球が細菌感染や炎症性サイトカインの産生に伴って、細胞質顆粒の MPO 分子を細胞表面へと表出することが判明した。したがって、活性化好中球の細胞表面に出た MPO と MPO 抗体が結合して糸球体の機能に影響を与えることは十分考えられた。そこで、実際 MPO 抗体投与による糸球体の機能の影響について QD 標識 MPO 抗体を投与して、尿タンパクを検出した。図2に見られるように、QD 標識 MPO 抗体12時間後に、尿タンパクの過の上昇が見られた。

糸球体の機能の変化が確認できたので、ついで、糸球体への好中球の浸潤度合いを検討した。好中球の浸潤は、MPO 抗体と CAWS の投与で有意に増加した。

一方、MPO 抗体と CAWS 投与によって糸球体に好中球が浸潤することから、炎症性サイトカイン・ケモカインの変動が予想された。そこで、MPO 抗体と CAWS 投与後の血中サイトカインの変動を解析した。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10、IL-12、IL-17、G-CSF、KC、RANTES が上昇していた。

また、これまでに引き続き、ANCA 誘導型血管炎の発症初期の機構について、血管内皮細胞への anti-MPO 抗体の「直接」作用を検討した。マウスの腎臓から糸球体を採取し、選択的に糸球体血管内皮細胞を培養し、MPO-ANCA と活性化好中球による糸球体内皮障害を検討した。QD 標識 MPO 抗体は、内皮細胞に特異的に結合した。また、MPO 抗体を内皮細胞に直接作用・刺激させることにより、内皮細胞の ICAM-1 の発現が上昇した。以上の結果から、MPO-ANCA は、局所で活性化に関与していることが示唆された。

(7) 量子ドットを利用した硝子体可視化の試み班：

本研究は、一桁ナノメートルサイズの量子ドットを用いて、生物・医療分野に利用できるように、表面加工および表面修飾したものを透明な眼球硝子体腔に入れることによって量子ドットが持つ蛍光で硝子体を染色し、硝子体の詳細を観察可能なようにするものであり、これによって安全で簡易な硝子体手術も可能となる。これらにより硝子体が引き起す眼疾患の病理の解明や治療法の進歩に貢献することを目指す。

2) アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS 班：

ヒト精巣腫瘍モデルへの局所投与については、すでに前年度の研究で明らかになった、アテロコラーゲンと siRNA を最適な濃度比率によって混合し、200ナノメートル以下のナノ粒子を形成させた。これを、ヌードマウスの精巣にヒト精巣腫瘍細胞を投与して得られた精巣腫瘍モデルの腫瘍部に局所投与した。用いた siRNA は精巣腫瘍細胞過剰発現しているヒト

FGF-4 遺伝子の発現を90%抑制することが確かめられている配列である。その結果、投与された siRNA とアテロコラーゲンのナノ粒子は腫瘍内に数日間とどまり、腫瘍の FGF-4 遺伝子の発現をタンパク質レベルでも抑制した。さらに、バイオイメージング法によって腫瘍の経日的観察を行ったところ、腫瘍の増殖が顕著に抑制された。

接触性皮膚炎モデルマウスへの全身性投与については、アテロコラーゲンと核酸との複合体であるナノ粒子の静脈内投与による全身性デリバリーが可能であるかどうかを検討するために、まずアンチセンスオリゴヌクレオチドとのナノ粒子を、接触性皮膚炎を耳に惹起させたマウスの尾静脈から投与した。アンチセンスは、ICM-I に対する合成オリゴヌクレオチドで、すでにこのアンチセンスが炎症を抑制するように働くことは確認されている。その結果、マウスの耳の部位での炎症は顕著に抑制され、目立った毒性も認められなかった。さらに骨転移モデルマウスへの投与について検討した。ヒト前立腺がん細胞を免疫不全マウスの左心室から投与すると、20日前後で、全身の骨に転移したマウスモデルを造ることができる。まず骨転移巣への siRNA のデリバリーを検討するために、ヒト前立腺がん細胞に遺伝子導入し、ルシフェラーゼを安定に発現する細胞株を取得した。この細胞の増殖は、そのルシフェラーゼをイメージングすることで、生きたマウスでの腫瘍の増殖をリアルタイムに解析することができる。このマウスに対して、ルシフェラーゼを抑制する GL3siRNA をアテロコラーゲンとのナノ粒子として投与し、バイオイメージング解析を行った結果、顎や大腿骨といった骨点移送の隅々まで siRNA がデリバリーされ、そのルシフェラーゼの発現を90%も抑制することが判明した。

またアテロコラーゲン複合体のナノ粒子としての性状次のような検討をした。すなわち、ナノ粒子による siRNA の抑制効果と腫瘍や正常の臓器へのデリバリーは、ルシフェラーゼによる *in vivo* イメージングをフォトン数で定量することにより、さらに RNase protection 法によって評価した。まず siRNA のナノ粒子は正常の組織にも到達したが、がん組織にはその1.

7から2.2倍の量がデリバリーされていることが判明推した。

さらに正常組織からは siRNA のほとんどが5-7日で消失するのに対し、腫瘍組織ではその60%が残存していた。また転移巣の腫瘍における遺伝子発現抑制効果は90%以上に達し、さらに転移腫瘍そのものの増殖も4週間以上に渡って抑制した。

siRNA(21-23 塩基)1分子に対して3から5分子のアテロコラーゲンが結合していること、またその粒子の直径のサイズは75-100ナノメートルであることが判明した。さらにこのナノサイズの複合体はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれていることも証明することが出来た。

### 3) 超機能高分子ミセルによる遺伝子導入システム開発

#### (1) 高分子ナノテクノロジーに基づく薬物・遺伝子デリバリー班:

はじめに、高分子ミセル型遺伝子ベクターによるがん細胞スフェロイドへの遺伝子導入を行った。400-500 $\mu\text{m}$  のがん細胞スフェロイドに対して、CAG プロモーターを有する YFP 発現プラスミドを PEG-PAsp(DET)との混合によって形成される高分子ミセルを用いて遺伝子導入したところ、ネクローシスにより細胞死(赤の蛍光)が顕著なスフェロイドの中心部で明らかな遺伝子発現(緑の蛍光)が認められた。この効果をさらに評価するために、5-HRE プロモーターを有する YFP 発現プラスミド DNA を、linear および branch polyethylenimine (LPEI および BPEI)、PAsp(DET)から形成されるポリプレックスならびに PEG-PAsp(DET)から形成される高分子ミセルを用いて、がん細胞スフェロイドに対し遺伝子導入を行った。その結果、PEG-PAsp(DET)から形成される高分子ミセルによってのみ顕著な遺伝子発現がスフェロイド内部に認められた。このようなスフェロイド内部での遺伝子発現は、ポリプレックスおよび高分子ミセルのスフェロイド中心への浸透性に起因するものと思われる。そこで本研究では、200 $\mu\text{m}$  のスフェロイドに対するポリプレックスの浸透性を、Cy5 で蛍光標識したプラスミドを

用いて CLSM によって観察することにより評価した。その結果、PAsp(DET)ホモポリマーから形成されたポリプレックスはスフェロイドの辺縁部にしか浸透できないが、PEG-PAsp(DET)から形成される高分子ミセルはスフェロイドの深部にまで到達できることが明らかとなった。ゼータ電位が+30mV のカチオン性ポリプレックスは、細胞との相互作用のために、スフェロイドの深部にまで到達できないが、PEG に覆われており、ゼータ電位が+6mV の高分子ミセルは、細胞と強く相互作用しないためにスフェロイドの深部にまで到達できるものと考えられる。

さらに、環状 RGD リガンドの有無、内核 SS 架橋の導入率が高分子ミセルの遺伝子発現効率に及ぼす影響を HeLa 細胞への遺伝子導入効率により評価したところ、内核 SS 架橋の導入によりリガンド分子の選択性が向上し、SS 架橋導入率が 11% の場合において、環状 RGD リガンドにより遺伝子発現効率が 32 倍に高まることが確認された。さらに、この遺伝子発現の向上が、RGD ペプチドの受容体との結合によるものであることを確認するために、培地中にフリーの環状 RGD ペプチドを競合分子として添加したところ、RGD ペプチドリガンド導入高分子ミセルの遺伝子発現の減少が確認された。

このようなリガンド分子の受容体による認識を介した遺伝子発現の上昇のメカニズムとして、(1)細胞内への取り込み効率の上昇と(2)細胞内 trafficking の変化が考えられるが、リガンドを導入していない高分子ミセルと環状 RGD ペプチド導入高分子ミセルの細胞内取り込み量を同位体標識した DNA の取り込み実験により比較したところ、有意な差異は認められず、リガンド分子は、ミセルの細胞内 trafficking を変化させることに寄与しているものと考えられた。そこで本研究では、環状 RGD ペプチドのミセルの細胞内 trafficking の違いを検討するためにペプチドを導入していないミセルおよび環状 RGD ペプチドを導入したミセルのプラスミド DNA をそれぞれ 2 種類の異なる蛍光色素(Cy5、Cy3)でラベルし、蛍光の局在の違いを観察することにより評価した。その結果、ミセルは、リガンドの有無に拘わらず、細胞の表面近傍に濃縮され、環状 RGD ペプチドを導入し

たミセルが迅速に細胞内に内在化することが確認された。これは、リガンド導入高分子ミセルの受容体介在エンドサイトーシスによる取り込みに起因するものと考えられる。細胞内 Trafficking の違いがどのように遺伝子発現効率に寄与することは今後の課題であるが、RGD ペプチド導入高分子ミセルは、受容体を介して細胞に取り込まれ、その細胞内 Trafficking が変化することにより効率的に遺伝子発現するものと思われる。

## (2) 生物・医療応用 PEG-DET による in vivo 遺伝子導入班：

ICR マウスに対して PEG-PAsp(DET)とルシフェラーゼ遺伝子とのポリプレックスミセル、および Polyethyleneimine(PEI)とルシフェラーゼ遺伝子とのポリプレックスの気管内投与による遺伝子発現について検討した。PEG-PAsp(DET)は、PEI に比べて著明な遺伝子発現を認めた。PEG-PAsp(DET)によるルシフェラーゼ遺伝子の発現の時間的変化を検討した。遺伝子導入後 3 日で最大の遺伝子発現を認め、その後低下を認めたが、2 週間目でも有意な遺伝子発現を認めた。PEG-PAsp(DET)と YFP のポリプレックスミセル、および PEI と YFP のポリプレックスによる肺での遺伝子発現を蛍光実体顕微鏡を用いて観察した。PEG-PAsp(DET)により、蛍光照射により気管支に沿って光る物質の存在が確認された。遺伝子導入による毒性を調べるため、PEG-PAsp(DET)および PEI を用いた遺伝子導入の後に、肺組織の顕微鏡写真を撮影した。PEI を用いた遺伝子導入後は、炎症性細胞浸潤、及び浸出液を認め、肺組織のダメージが大きいのに比較し、PEG-PAsp(DET)による遺伝子導入後は炎症の所見などの異常を認めなかった。これらのことから、PEG-PAsp(DET)は、毒性が低く、遺伝子導入効果が高い、非常に有用な遺伝子導入ベクターであることが示唆された。

モノクロタリン投与 4 週間後のラットに対して、PEG-PAsp(DET)を用いてアドレノメデュリン発現遺伝子の導入を行ったところ、右室圧は有意に低下を認めた。また、肺組織におけるアドレノメデュリン mRNA の量は、4 倍に増加を認めた。

### C.まとめ

半導体などのナノ粒子を用いて薬物の伝達システムの開発及び遺伝子伝達システムの開発を目的に研究を行っている。またそれに伴い、半導体などナノ粒子の細胞毒性などの安全性について検討すると同時に一桁ナノ粒子の持つ量子サイズ効果などによる、蛍光プローブとしての生物・医療応用を展開することを含めて検討することを目的としている。

現在我々の製造するCd/Se量子ドットは、当初の100倍量を一度に生産することが可能と成っている。またそれ以外のナノ粒子として今年度Si量子ドット、Ge量子ドットがあらたに開発されこれまでのCd/Se量子ドットにくらべさらに安全性が増すことが期待できる。安全性についてはMTTアッセイ法を用いてミトコンドリアの呼吸能力を計測すること(A. Shiobara et al., Microbiol. Immunol 2004)により行い、また細胞内の核の損傷を計測できる comet assay法を用いて様々な表面加工についての安定性を評価できるように成っている。本年度は、これらに加えさらに酸化還元酵素に関するアポトーシス経路について評価する方法を開発した。この方法は、comet assayより簡便で汎用性が広く半導体ナノ粒子以外の微粒子についても安全性についての評価を行うことが可能である。今後、ヒトの体内にデバイスとして多くの医療機器が装着されることが予想される。それらのデバイスの部品としてマイクロ粒子やナノ粒子が利用されることになるだろう。これらの部品としてナノ粒子などの微粒子が利用されるのは、必定であるため、その安全性において特に検討していく必要がある。本研究で得られた安全性試験は、その用途に十分対応することが可能であると考えられる。

この研究では、臨床応用する可能性が極めて大きいいくつかのシーズが開発された。半導体ナノ粒子を用いたDDS、眼科領域に於ける硝子体の病変を検出する染色法、タキサン系抗癌剤による乳がん治療抵抗性がん患者に対するiRNAのアテロコラーゲンによるDDS、ブロックポリマーによる遺伝子治療などがあげられる。今後これら内、幾つかのものは、すぐにでも

臨床研究に移行することが可能なものもある。今後の更なる研究により本研究により得られた成果がわが国における医療の向上に寄与することができると考えている。

D. 健康危険情報  
特になし。

E. 研究発表  
論文発表一覧および学会発表または、分担者の項参照。

### F. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 熱帯熱マラリア原虫エノラーゼ蛋白質の部分ペプチドの製造方法 国際特許公開W02006/035815(平成18年4月6日) 奥浩之、小見和人、栗山佳祐、山本隼也、山田圭一、片貝良一、佐藤久美子、鈴木守、河津信一郎、狩野繁之；

(2) 蛍光ナノ粒子を含む眼の硝子体染色剤及び染色方法

特願2006-13760(平成18年1月23日) 山本悟、山本健二、星野昭芳、真鍋法義

(3) 霊長類動物胚性幹細胞の培養及び継代方法、並びにその分化誘導方法 湯尾明、佐伯久美子、佐伯晃一、中原正子、中村直子、過足芳子、松山さと子、米田麻子 特願2006-303929

(4) 片岡一則、山崎裕一、高江誓司、核酸内包高分子ミセル複合体、特願2006-54332

(5) 片岡一則、山崎裕一、アルニダ アンワール、張祐銅、西山伸宏、核酸内包高分子ミセル複合体、特願2006-54327

(6) 片岡一則、宮園浩平、狩野光伸、平川弘聖、八代正和、野出學、TGF- $\beta$ シグナル阻害剤と抗腫瘍剤の組み合わせ使用、特願2006-24845

(7) 片岡一則、宮園浩平、狩野光伸、Bae Younsoo、西山伸宏、TGF- $\beta$ シグナル阻害剤と抗腫瘍剤の組み合わせ使用、特願2006-24843

## 半導体などナノ粒子による生物・医療応用

主任研究者	山本健二	国立国際医療センター研究所国際臨床研究センター・センター長
協力研究者	星野昭芳	国立国際医療センター研究所国際臨床研究センター・流動研究員
協力研究者	藤岡宏樹	国立国際医療センター研究所国際臨床研究センター・流動研究員
協力研究者	真鍋法義	国立国際医療センター研究所国際臨床研究センター・協力研究員
協力研究者	二村泰弘	国立国際医療センター研究所国際臨床研究センター・協力研究員

### 研究要旨

#### A. 研究目的

本研究は、半導体ナノ粒子を用いて薬物や遺伝子の伝達システムの開発を目的にしている。またそれに伴い、半導体などナノ粒子の細胞毒性などの安全性について検討すると同時に一桁ナノ粒子の持つ量子サイズ効果などによる、蛍光プローブとしての生物・医療応用を展開することを含めて検討することも目的としている。

半導体ナノ粒子は、量子サイズ効果によって、強力な蛍光を出すことが可能であるため、細胞内レベルから生体レベルまで、その動体を追跡することが可能である。そのため、薬物に結合された量子ドットを体外から追跡することも可能であり、副作用や安全性について詳しく検討することが可能である。特に血中濃度や、臓器分布などが、放射性同位元素を用いなくて単に蛍光を測定すれば知ることが可能という特性を持つ。個人による、濃度分布、局在性、滞留時間などの測定を簡便に行うことが可能

であるため、特に個人個人特異的な副作用についてモニターすることが可能となる。

我々は、さらに疾患臓器に特異的に局在できるような表面加工を行う方法（肺特異的、肝臓特異的の表面加工法）を開発することも目的にしている。これまでに我々は、細胞レベルではライソゾーム、核、ミトコンドリア、細胞質、細胞膜など細胞小器官特異的に伝達する技術を開発している。これらを統合することにより生体において、臓器特異的、細胞特異的、さらに細胞内小器官特異的に伝達可能なキャリアー粒子を開発することが可能であり、生体内において臓器から細胞小器官まで薬剤を効率良く伝達できるシステムを構築することを目的に開発する。その応用は、薬剤のみならず遺伝子のベクターとして期待することが可能であり、動態追跡とあわせて安全で安心な遺伝子伝達システムとしても期待される。

#### B. 研究方法



### 1) 蛍光半導体ナノ粒子の表面加工

本研究に利用している半導体ナノ粒子はセレン化カドミウムを核としその外殻に硫化亜鉛を被覆した二重構造により構成されるコア・シェル型ナノ粒子である。この粒子はボトムアップ法と呼ばれる特殊なナノ粒子結晶成長によって合成される。逆ミセル物質 trioctylphosphine oxide (TOPO) を加熱し酸化カドミウムを溶解させた状態で、有機セレン化合物を同時に注入して結晶成長させる。分散した時に溶媒の温度が 270°C 程度の一旦低下するが、さらに加熱し 300°C にて一定に保つと、TOPO 溶媒内で半導体ナノ粒子が自己組織化する事により生成され、その結晶成長は反応温度と時間に依存する。

上記方法で合成された蛍光ナノ粒子は、その表面が TOPO など疎水性化合物でコートされた状態である。これを化学分野に適應するためには親水性物質により表面を交換し水溶性のナノ粒子を得る必要がある。すでに数種類の化合物が報告されており、なかでも 11-メルカプトウンデカン酸を用いて粒子表面にカルボキシル基を保持させることで親水性粒子とする方法は広く支持されている。まず 11-メルカプトウンデカン酸を 80°C に加熱し恒温に保つと溶解しており、この溶解した 11-メルカプトウンデカン酸に前述のナノ粒子を溶かしこみ数時間加熱し付加することで粒子表面の物性を親水性に転換でき、さらにナトリウム塩又はカリウム塩とすることで水溶性ナノ粒子を得られる。しかしながらこの粒子は pH の変化や

生理食塩水などの生物分野における実験条件では容易に凝集がみられる。これを回避するために市販品のナノ粒子では両親媒性ポリマーで粒子を被覆することでこの問題を回避しているが粒子が粗大となることが判明しており、本研究ようにナノ粒子内に封入する目的には適さない。そこで、両親媒性の低分子化合物であるオリゴペプチド、特にシステインを有する様々なジペプチドを用いてナノ粒子の表面に付加させる加工を行い、それら粒子の物理化学的あるいは生物適應特性をそれぞれ検討した。

### 2) ナノ粒子の生物的安全性の検討

ナノ粒子の安全性に関する検討は、我が研究グループにおいてこれまでに MTT 法によりミトコンドリアの呼吸能力の計測 (Shiohara A et al., *Microbiol. Immunol.* 2004) を、またナノ粒子による遺伝子毒性の定量的評価法としてコメント法による判定を導入し (Hoshino A et al., *Nano Letters.* 2004) 世界的に評価されている。これら方法を踏襲しナノ粒子の安全性評価を実施した。

## C. 研究結果

半導体ナノ粒子は、量子サイズ効果によって、強力な蛍光を出すことが特性を持つため、細胞内レベルから生体レベルまで、その動体を追跡することが可能である。この特性により、薬物に結合された半導体ナノ粒子を体外からも追跡することも可能であり、副作用や安全性について個人レベルで詳しく検討することができる。本研究は、半導体ナノ粒子を用いて薬物や遺

伝子の伝達システム開発研究である。またそれに伴い、半導体などナノ粒子の細胞毒性などの安全性について検討すると同時に一桁ナノ粒子の持つ量子サイズ効果による発光する蛍光ナノプローブを医療用に応用し、更に安全なナノ粒子を設計・製造することを目的としている。さらに今後の医療応用のため安全で安心な薬物キャリアーを手にする目的により、本年度は、シリコンドットを開発した。またさらにこのシリコンドットを利用し薬物などの低分子化合物に結合させることに成功した。今後、薬剤動態を観察するその手段の一つの候補として可能性を持つ。

本研究は、5年間のナノメデシン指定研究として得た知見や成果を土台に臨床の現場で利用できる薬剤キャリアーおよびその医療技術開発を目指している。これまでに我々は、特異的な表面加工を開発し、生きた細胞の核、ミトコンドリア、ライソゾーム、細胞質、細胞膜への半導体ナノキャリアー伝達に成功している。本研究では、臓器特異的、細胞特異的、更に細胞小器官特異的薬剤伝達システムを開発する。

またこれまでにモデル薬物として抗圧剤を半導体ナノ粒子に結合させ家族性高血圧ラットを用いたモデル実験に成功した (Manabe et.al. IEEE Trans. BioNanoSci.)。今後、本研究ではモデル薬物として20種類の薬物を検討している様々な疾患に対する評価を行う予定である。それに伴いモデル薬物を体外から、その動態や局在性を観測する技術の開発に着手し、薬剤副作用の解析

に使用可能なシステムを開発する予定である。実験成果の一部は、日本経済工業新聞に2006年7月発表された。

さらに本研究では、非リンパ球免疫細胞の細胞伝達システムの開発を行った。これまでに腹腔マクロファージがケモカインの一つである CCL1 によって活性化し、腹膜内皮細胞との凝集体を構成し、一つには消化器潰瘍の治癒に役立ち、他方では術後癒着を誘導することが、半導体ナノ粒子によって判明した (Hoshino et.al. J. of Immunology 2007)。本研究年度では、レセプター抗体などを用いさらに術後癒着を阻止する方法を開発し、疾病治療効果の向上を。さらに本研究は、破骨細胞による骨融解、好中球による急性糸球体腎炎、川崎病にも同様な現象が見られた。そこで破骨細胞による歯髄炎、骨融解、活性化好中球による腎不全や冠動脈の血管炎の診断・治療への応用を行える可能性が見えてきた。

本研究における薬剤伝達システムおよび細胞伝達システムの研究成果により、直接的に副作用の軽減、治療効果の向上、疾病治療にあたってQOLの向上を実現できると考えている。

#### D. 考察

##### 1) 達成度について

半導体ナノ粒子を用いて生物実験を行う基礎的条件ともいえる細胞に対する安全性あるいは毒性を定量的に観測することが可能となった。同様の手段にて今後さまざまなナノ材料の解析に有効であると考えられる

## 2) 成果の学術的・国際的・社会的意義について

半導体ナノ粒子は、表面加工により様々な機能を賦与することが可能である。たとえば薬剤を結合させ、薬物動態を半導体ナノ粒子の可視光観察によって細胞・組織・臓器・生体レベルで非浸襲あるいは低浸襲で解析する事は極めて重要である。これは近年における動物実験の実施に対する国際的に非常に厳しくなっているため、生体レベルにおける非浸襲解析は、実験動物の個体数ならびにその苦痛軽減という必要性が論じられるなか、次世代の解析ツールを提供できることは国際的あるいは社会的にその意義はきわめて大きいものであると確信している。またナノ粒子により特定細胞に標識しその標識された細胞を正常マウスに導入する事によりその生体内動態を明らかにし宿主との相互作用について解析する事も有用な解析手段となりうる(Hoshino A et al., *J Immunol.* 2007)。

## 3) 今後の展望について

細胞内動態解析のために必要な表面加工法を開発するとともに、実際開発された方法を利用して、細胞内分布や生体分布について実際応用し新しいナノプローブの性能を評価する予定である。

## E. 結論

本年度は、半導体ナノ粒子を生物・医療に応用するため更に安全で安心な成分からできているシリコン量子ドットを製造した

。またこのシリコン量子ドットに低分子化合物を結合させることに成功した。今後薬物の動態観察に非常に役立つ可能性があり現在行われているラジオアイソトープによる方法に取って代わりうる可能性が期待される。

さらに今年度、骨髄免疫前駆細胞からは破骨細胞を誘導することに成功し、更に誘導された破骨細胞を生きたまま量子ドットで染色することに成功した。今後は骨細胞による歯肉炎の研究に利用できると考える。

## 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Manabe N, Hoshino A, Liang YQ, Goto T, Kato N, Yamamoto K. “Quantum dot conjugated with medicine as the drug tracer in vitro and in vivo.” *IEEE Transactions on NanoBioscience* 2006; 5(4) 263-267
- 2) Shiohara A, Manabe N, Omata K, Yamamoto K. “Novel Surface Processing with Sulfonic Acid for Quantum Dot and Its Characteristics.” *Journal of Chemical Engineering of Japan* 2006;39(1)52-56.
- 3) Yamamoto S, Manabe N, Fujioka K, Hoshino A, Yamamoto K. “Visualizing Vitreous Using Quantum Dots as Imaging Agent” *IEEE Transactions on NanoBioscience* 2007 (*in press*)
- 4) Futamura Y, Yahara K, Yamamoto K. “Evidence for the production of fluorescent pyrazine derivatives using supercritical water, *The Journal of Supercritical Fluids*” 2007 (*in press*).
- 5) Hoshino A, Kawamura YI, Yasuhara M,

Toyama-Sorimachi N, Yamamoto K, Matsukawa A, Lira SA, Dohi T. "Inhibition of CCL1-CCR8 Interaction Prevents Aggregation of Macrophages and Development of Peritoneal Adhesions" *J Immunol.* 2007; 178(8)

## 2. 学会発表

1) Hoshino A, Fujioka K, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Yasuhara M, Dohi T, Yamamoto K. "Nanocrystal quantum dots for Biomedical Applications" SPIE Photonics West 2006 Biomedical Optics Meeting. (Jan. 22-25, 2006 San Jose, CA, USA.)

2) Yamamoto K. "The design of the quantum dot and the application on the drug." First International Conference of Nanobiomedical Technology and Structural Biology. (Jun. 25-28, 2007. Changdu, Sichuan, China.)

3) Hoshino A, Nagao T, Ishida-Okawara A, Ito-Ihara T, Uno K, Muso E, Nagi-Miura N, Ohno N, Yasuhara M, Yamamoto K, Suzuki K. "Myeloperoxidase on Activated Neutrophils and anti-MPO antibody involve in the Initiation of Glomerulonephritis and Vasculitis induced by *Candida albicans* Glycoprotein." 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress 79<sup>th</sup> Japanese Biochemistry Society and 29<sup>th</sup> Molecular Biology Society of Japan Conference (Jun. 18-23, 2006, Kyoto, Japan)

4) Hoshino A, Nagao T, Ishida-Okawara A, Ito-Ihara T, Uno K, Muso E, Nagi-Miura N, Ohno N, Naoe S, Tokunaka K, Yasuhara M, Yamamoto K, Suzuki K. "Activated neutrophils produce IL-17 and IL-23 by MPO-ANCA in *Candida albicans*-derived mannoprotein-induced murine systemic vasculitis" Gordon Research Conference (Oct. 15-20, 2006, Les Diablerets, Switzerland)

7) Manabe N, Yamamoto S, Fujioka K, Hoshino A, Yamamoto K. "Visualizing eye disorder by aqueous quantum dot solution" 15<sup>th</sup> conference of Japanese Society for Bio Imaging (Nov. 1-3, 2006, Morioka, Japan).

8) Hoshino A, Nagao T, Ishida-Okawara A, Uno K, Nagi-Miura N, Ohno N, Saiga K, Yamamoto K, Suzuki K. "*Candida albicans* secreted CAWS mannoprotein triggers murine systemic glomerulonephritis and vasculitis via

IL-6, IL-17 and IL-23 in concert with MPO-ANCA." 35th Japanese Society for Immunology Research Conference (Dec. 11-13, 2006, Osaka, Japan)

9) Fujioka K, Hoshino A, Manabe N, Futamura Y, Tilley RD, Yamamoto K. "Synthesis of novel silicon nanocrystals in inverse micelles" SPIE Photonics West 2007 Biomedical Optics Meeting. (Jan. 20-25, 2007 San Jose, CA, USA).

## H. 知的所有権の出願・取得状況

なし