

## 平成 18 年度 班会議 プログラム・抄録

厚生労働科学研究費補助金 萌芽的先端医療技術推進事業

「半導体などナノ粒子による DDS (H14-ナノ-004)」

日時：12月27日（水）国立国際医療センター研究所 大会議室 AB（地下1階）

発表 15分、5分コメント

- 11:00～12:00 研究者全員(山本健二司会) 「来年度の研究の全体像について」打ち合わせ。
- 12:00～13:00 (昼食)
- 13:00～13:05 山本 健二 挨拶 研究所 国際臨床研究センター センター長
- 13:05～13:25 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  
「ナノメディスンに応用できる霊長類胚性幹細胞（ES細胞）の培養システムの構築」
- 13:25～13:45 鈴木 春巳 国立国際医療センター研究所臨床病理研究部 部長  
「T細胞分化における低分子Gタンパクの機能」
- 13:45～14:05 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  
「QDを用いた in vivo 細胞トラフィックの解析」
- 14:05～14:25 鈴木 和男 国立感染症研究所 生物活性物質部  
「量子ドットを用いた好中球抗体 ANCA の作用解析とバイオイメージング」
- 14:25～14:45 鈴木 恵子 昭和大学歯学部歯科薬理学  
「破骨細胞分化誘導過程における細胞動態のイメージング」
- 14:45～15:05 (休憩)
- 15:05～15:25 落谷 孝広 国立がんセンター研究所がん転移研究室  
「アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS」

- 15:25～15:45 斯波真理子 国立循環器病センター研究所・室長  
「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」
- 15:45～16:05 片岡 一則 東大院工・院医・教授  
「高分子ナノテクノロジーに基づく薬物・遺伝子デリバー」
- 16:05～16:25 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  
「マラリアワクチン DDS に向けての基礎研究」
- 16:25～16:45 山本 悟 国家公務員共済組合連合会 横浜栄共済病院 眼科  
「量子ドットによる硝子体可視化への試み」
- 16:45～ 山本 健二 総括

問い合わせ 国立国際医療センター研究所・国際臨床研究センター  
伊藤和幸 電話；03-3202-7181 内線 2856  
Email; [ikazuyuki@ri.imcj.go.jp](mailto:ikazuyuki@ri.imcj.go.jp)

運営委員 星野昭芳 (研究所研究員)  
藤岡宏樹 ( " )  
真鍋法義 ( " )  
山本麻由 ( " )  
高橋由光 ( " )  
二村泰弘 ( " )

# ナノメディスンに応用できる霊長類胚性幹細胞（ES細胞）の培養システムの構築

国立国際医療センター研究所血液疾患研究部 湯尾 明

我々は、再生医学のための治療材料、もしくは、試験・研究・創薬のためのモデル細胞として、カニクイザルおよびヒトの胚性幹細胞（ES細胞）の培養技術の改善、新技術の構築を行っている。培養に際しての第1のキーポイントは、マウスフィーダー細胞など異種動物細胞との共培養を避け、牛胎児血清などの動物由来成分も排除して、動物由来成分フリーの培養を目指すことである。第2のキーポイントは、未分化維持培養に際してはすべての細胞が均一で未分化性、多能性を維持できるような培養系にすること、分化誘導培養においても、特定の細胞系列に方向性が定まった均一な分化が誘導できることである。

このようなストラテジーに従って研究を推進し、以下のような成果が達成できている。

## ①サルES細胞における無血清・無フィーダー・無サイトカイン培養

KSR (knockout serum replacement) を用いて、マトリゲル表面コート上において、noggin、FGF2等の増殖因子やサイトカインを全く添加せずに培養し、40継代以上培養可能であった。また、凍結保存後、再度融解し、安定した培養が可能であった。

## ②サルES細胞からの無フィーダー条件での造血幹細胞への分化誘導

無血清・無フィーダー・無サイトカイン培養で継代維持したサルES細胞から、無フィーダー分化誘導法を用いて造血幹細胞を分化させた。このような造血幹細胞は、100日以上持続的な増殖を示し、特定に条件において成熟好中球などの終末分化細胞へ効率良く分化し、凍結保存後に再度融解して使用可能であった。

## ③サルES細胞からの無フィーダー条件での血管内皮前駆細胞への分化誘導

無血清培養で継代維持したサルES細胞から、無フィーダー分化誘導法を用いて、100%の効率で血管内皮前駆細胞を分化誘導させた。ここから成熟血管内皮細胞が40%の効率で産生され、8回までの継代培養が可能であった。凍結融解操作が可能であった。

## ④ヒトES細胞における無血清・無フィーダー・無サイトカイン培養

KSR (knockout serum replacement) を用いて、マトリゲル表面コート上において、noggin、FGF2等の増殖因子やサイトカインを全く添加せずに培養し、25継代以上培養可能であった。未分化維持の指標は、細胞形態、SSEA4、Oct4、Nanogを用いた。凍結保存後、再度融解し、安定した培養が可能であった。

## ⑤ヒトES細胞からの無フィーダー条件での造血幹細胞への分化誘導

無血清・無フィーダー・無サイトカイン培養で継代維持したサルES細胞から、無フィーダー分化誘導法を用いて血液細胞を分化させた。

今後は、これらの細胞への分子導入に関するナノテクノロジーを駆使した人為的な操作技術の開発を行いたい。

## T細胞の分化における低分子 G タンパクの機能

分担研究者 鈴木春巳  
(国立国際医療センター研究所 臨床病理研究室)

RhoH は Rho ファミリーに属する低分子 G タンパクであり、我々が胸腺特異的遺伝子として *in silico* クローニングした遺伝子の一つである。RhoH は胸腺、脾臓および骨髄に限局して発現しており、Rac などの他の低分子 G タンパクの機能を阻害し、IFA-1 の接着能を負に調節していることが報告されている。我々はこの RhoH 分子の T 細胞分化における機能を検討する目的で、RhoH 遺伝子ノックアウトマウスを作製した。ノックアウトマウスは常法に従い、コドン部分を LacZ に置き換え、発現解析も可能とした。予想に反し、RhoH ノックアウトマウスの胸腺は著しく縮小していた。CD4CD8 ダブルポジティブ(DP)の細胞数が激減し、さらに CD4 シングルポジティブ(SP)、CD8-SP の割合も減少していた。したがって、RhoH は胸腺内での  $\beta$  セレクションおよび、正の選択に重要であることが明らかとなった。脾臓、リンパ節、末梢血においても成熟 T 細胞数は激減しており、TCR 刺激によるシグナル伝達も著しく抑制されていた。以上の結果から、RhoH はこれまで考えられていたようなシグナルを負に調節する因子ではなく、TCR シグナル伝達を正に調節している分子であることが初めて明らかとなった。

1. Fumiko Shiroki, et al. *J. Immunol.* in press 2007
2. Hiroyo Oda, et al. *J. Leuko. Biol.* in press, 2007
3. Masayuki Murata, et al. *Microbiology* in press, 2007
4. Kouhei Sakai, et al. *J. Biol. Chem.* (2006) 281: 17736-17742
5. Koji Eshima, et al. *J. Immunol.* (2006) 176: 1628-1636
6. Yoshinao Azuma, et al. *DNA Research* (2006) 13: 15-23

厚生労働科学研究萌芽的先端医療技術推進研究 分担研究

生物・医療応用  
(QD を用いた *in vivo* 細胞トラフィックの解析)

分担研究者 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

協力研究者

河村由紀 消化器疾患研究部 協力研究員

星野昭芳 医療生態学研究部 流動研究員

本研究の目的は、消化管炎症における消化管と他の臓器との細胞交通を解析することによる診断・治療のターゲットの探索である。代表研究者らはこれまでに腹腔由来マクロファージ(m<sup>φ</sup>)が炎症後及び外科手術後の臓器癒着部位の漿膜側細胞塊に特異的に集積することを見だし、そのメカニズム研究を行ってきた。その結果、腹腔 m<sup>φ</sup> は炎症刺激により局所に遊走すると同時にケモカイン CCL1 を産生し、さらにその受容体 CCR8 のみをケモカイン受容体として特異的に発現するようになるため局所にとどまって細胞塊を形成するというメカニズムが明らかになった。また、この現象を、腹膜中皮細胞と腹腔 m<sup>φ</sup> の共培養中に CCL1 を加えることによって *in vitro* で再現することができ、さらにこの凝集形成を CCL1 中和抗体により阻害することができた。この実験系は、これまでにない腹膜癒着の *in vitro* モデルであり、独自のスクリーニング系である。この系を用いて低分子化合物による、マクロファージ凝集阻害剤のスクリーニングを開始した。さらに、CCR8 ノックアウトマウスを用いて開腹手術後の癒着形成に CCL1/CCR8 相互作用が必要であることを示すことができた。現在ヒトの腹腔内洗浄液での解析の準備を行っている。

# 量子ドットを用いた好中球抗体 ANCA の作用解析とバイオイメージング

鈴木和男

国立感染症研究所 生物活性物質部

ksuzuki@nih.go.jp

量子ドット(QD)を用いて、好中球および腎系球体内皮細胞への Myeloperoxidase (MPO)抗体の作用を検討した。QD 標識の MPO 抗体を作製し、腎臓への作用を検討した。MPO は、ANCA の抗原となる好中球細胞質顆粒内分子(MPO-ANCA)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 は、好中球の活性化や血管内皮細胞の活性化および傷害性に関与しているが、MPO-ANCA が、どのように好中球を活性化し内皮細胞の傷害を誘導しているかは不明である。

そこで、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 でそれぞれ確認した(すでに報告済み)。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。これらの結果から、好中球は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。つまり好中球表面における MPO の表出は、好中球活性化を判定する指標として有益であることが示された。

一方、QD標識の MPO 抗体を利用して、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。まず、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、局所で活性化好中球の表面に出た MPO と反応して、好中球をさらに活性化して活性酸素などの放出をするとともに、内皮細胞にも直接結合して内皮細胞に作用して ICAM-1 の発現を上昇させる。活性化好中球からの活性酸素産生および内皮細胞の ICAM-1 の発現を上昇により、内皮細胞障害を引き起こすと推定され、最終的には、血管炎の誘発を惹起すると考えられる。

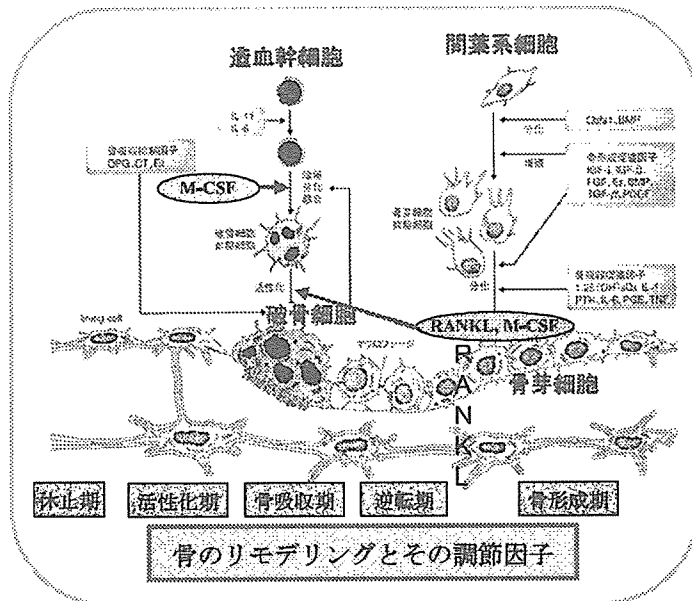
## 破骨細胞分化誘導過程における細胞動態のバイオイメージング

—骨破壊病態モデル動物を用いて—

昭和大学歯学部歯科薬理学 鈴木恵子

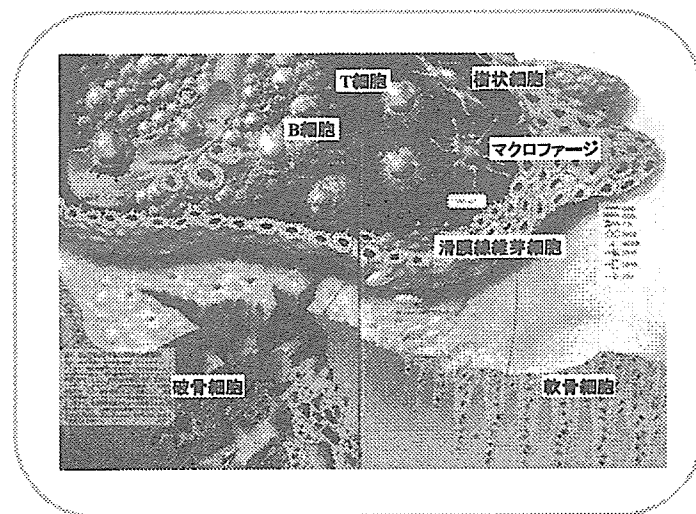
### 【生理的骨代謝】

- 骨は常にリモデリングを受けるダイナミックな組織である。
- 骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収はカップリングしている。
- 骨芽細胞は間葉系幹細胞に、破骨細胞は造血系幹細胞に由来する。
- M-CSFを産生することができない突然変異マウス(*Csf1<sup>op</sup>/Csf1<sup>op</sup>*)では破骨細胞は形成されず、大理石骨病を発症する。
- 培養破骨細胞形成系により、破骨前駆細胞の分化・活性化には骨芽細胞の存在が不可欠であることが示された。
- 骨芽細胞が産生する破骨細胞形成因子はM-CSFとRANKL(Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand)であり、その必要性はKOマウスを用いた *in vivo* の実験データからも確認された。



### 【病的骨破壊】

- リウマチ関節炎・歯周病・癌の骨転移では骨代謝のバランスがくずれて骨吸収亢進が起こる。
- 骨代謝と免疫系は、多くの制御因子を共有しており、免疫系細胞はサイトカイン産生や細胞膜上の分子を介して骨細胞の分化に関与する —— “骨免疫学”
- 歯周病では炎症や感染が骨破壊を引き起こす —— “Toll-like receptor”  
“Chemokine/Chemokine R”



## アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS

分担研究者 落谷孝広  
(国立がんセンター研究所がん転移研究室)

siRNA をベースにした核酸医薬による治療を現実のものとするためには、生体内での急速な分解と失活に耐え、生体内の目的の細胞へ的確に送り届ける DDS 技術が要求される。これまでにアテロコラーゲン・ナノ粒子による siRNA のデリバリーキャリアとして有用であることを明らかにしてきた。本年度は合成 siRNA との複合体を作製した場合のナノ粒子の大きさは100nm 以下であること、細胞へ取り込まれる際のメカニズムはエンドサイトーシスであることを明らかにした他、このナノ粒子によるデリバリー方法のがん治療への応用に関する実証的研究を目指して、がんの薬剤耐性や転移を克服するための動物治療モデルの構築を完成させた。

1. Ochiya T, et al. Expert Opinion on Drug Discovery, in press.
2. Yanagihara K, et al. Cancer Res. 66(15): 7532-7539. (2006)
3. Fujii T, et al. Int J Oncol. 29(3):541-548 (2006)
4. Takeshita F, Ochiya T. Cancer Sci. 97(8): 689-696 (2006)
5. Katsumoto T, et al. Genes Dev. 20(10): 1321-1330 (2006)
6. Kurokawa Y, et al. Int J Oncol. 28(2): 383-391 (2006)



本研究の目的は、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。そのために、ポリエチレングリコールとポリアミノ酸からなる一連のブロック共重合体を合成し、生体適合性ならびに遺伝子導入効率の両面から構造の最適化を行った。特に、細胞外では高い安定性を有する一方で、細胞内においては時間制御的に遺伝子を放出し、高い遺伝子発現に導くシステムとして環境応答型架橋をベクター内に創り込んだシステム、並びに、エンドソームからスムーズに細胞質に移行する機能を有するシステムに焦点をあてて検討を行った。その結果、(1) 全身投与によって肝実質細胞に均一に遺伝子をデリバリー可能なシステム、(2) 高い生体適合性のもとに経肺的に粘膜上皮細胞に効率良く遺伝子を導入出来るシステムを国立循環器病センターとの共同研究のもとに達成しつつある。さらに、より効率の良い遺伝子デリバリーを達成するために、作成した高分子ミセル型ベクター表層にリガンドを導入する検討を行い、環状 RGD ペプチドをリガンドとして用いることによってインテグリン受容体を有する細胞に対して遺伝子導入効率の著しい向上を達成している。このような検討を通じて、高分子ミセル型遺伝子ベクターの臨床展開に向けての基礎データを蓄積しつつある。一方、制ガン剤内包高分子ミセルについては、既に幾つかの系で臨床治験へ進んでいるが、その一般的有用性をさらに明らかとする目的で、新たに第二世代白金錯体制ガン剤であるダッハプラチン内包高分子ミセルの作成を行い、動物実験から転移ガン治療システムとしての有用性を明らかとしつつある。

カンタムドットの感染症への応用 -宿主内のウイルス受容体分布の *in vivo*  
イメージングへの応用-

国立国際医療センター（研究所）感染症制御研究部・切替照雄

ウイルスの感染成立にはウイルス粒子表面の蛋白質と宿主側受容体との相互作用が重要である。例えばインフルエンザウイルスの場合、ウイルス側の因子はヘマグルチニンであり、その宿主側受容体はシアル酸を末端に持つ糖鎖である。近年発生が頻発している高病原性鳥インフルエンザについての解析では、ヒト呼吸器において、通常のヒト型インフルエンザの受容体は上部気道に存在するにもかかわらず、高病原性鳥インフルエンザではその受容体は呼吸器深部に存在しており、これが高病原性鳥インフルエンザがヒト型へと馴化していないことの一因となっていると考えられることが報告されている。ウイルス感染に限らず、感染症において病原体の生体への侵入門戸を明らかにすることはその病態解明に重要である。

2003年に猛威をふるった重症急性呼吸器症候群(SARS)の原因ウイルスである SARS-CoV の場合、その宿主との相互作用のための因子はウイルス表面の Spike 蛋白質であり、その宿主側受容体はアンギオテンシン転換酵素 II である。SARS では重篤な呼吸器症状の他に、消化管症状も報告されており、また SARS-CoV 腸管でも増殖する可能性が指摘されているが、ウイルスが実際にどの部分に集積しているかは明らかになっていない。

カンタムドットは強い蛍光強度および蛍光の持続性という、一般的なフルオロフォアには見られない特徴を有している。そこで本研究では、これらのカンタムドットの特徴を生かし、SARS-CoV の Spike 蛋白質をモデルとして、ウイルス粒子が生体内のどの部分に集積するかを解析するための *in vivo* イメージングシステムの構築を行う。

## 量子ドットによる硝子体可視化への試み

国家公務員共済組合連合会 横浜栄共済病院 眼科

山本 悟

我々は、量子ドットを用いて眼の硝子体を染色し、硝子体の生理的・病理的变化を容易に把握できる方法を研究している。

多くの眼科的疾患は硝子体の変化に関係しているため、硝子体の状態を正確に把握することは重要である。しかし、硝子体は、本来透明であるため硝子体自体や、その変化を視認することが困難である。

そこで、我々は量子ドットを眼の毛様体扁平部にあたる強膜から27ゲージの針で硝子体腔に注入して、硝子体を染色する方法を考案した。

この方法によって、微細な硝子体構造の視認が容易にできるだけでなく、硝子体手術に応用することで、より正確で安全な手術が可能になると思われる。

これから、この方法が普及することによる眼科学の進歩も期待している  
また、更に安全性の高い量子ドットを用いての試行を行っている。

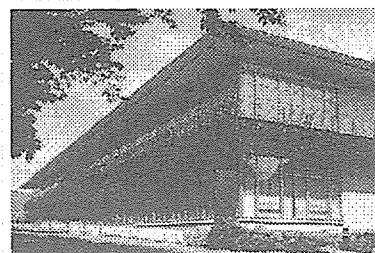
# BiomarkerとDDS:

# ナノ技術の多元と諸相

会 期：2007年2月15日(木)  
10:00~17:00

会 場：神戸大学 百年記念館

<http://www.jp-mathusers.org/workshop/kobe100.html>



## 開会の挨拶

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)

## 招待講演

「HIF-1を利用したイメージング・ターゲティング」

近藤 科江 (京都大学 医学研究科 放射線腫瘍学・画像応用治療学)

「バイオナノキャリアを用いたピンポイントDDS」

近藤 昭彦 (神戸大学 工学部 応用化学科)

「量子ドットを用いた好中球抗体 ANCA の作用解析とバイオイメージング」

鈴木 和男 (国立感染症研究所 生物活性研究部)

(昼 食)

「ナノ技術によるRNAi創薬とがん治療への応用」

落谷 孝広 (築地・国立がんセンター がん転移研究室)

「半導体ナノ粒子を用いた、腹腔内炎症における細胞交通と腹腔癒着機構の解明」

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)

「マウスのin vivo イメージング」

小島 清嗣 (オリンパス株式会社・ライフサイエンスカンパニー)

「蛍光量子ドットによるがん細胞の単一分子ナノイメージング」

樋口 秀男 (東北大学 先進医工学研究機構)

「量子ドットの生物・医療応用」

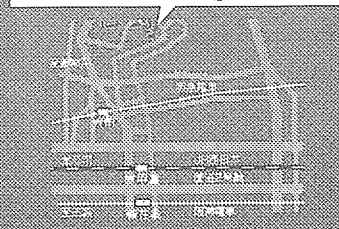
山本 健二 (国立国際医療センター研究所)

## 総 括

近藤 昭彦 (神戸大学 工学部 応用化学科)

共催：財団法人医療機器センター、日本バイオイメージング学会、  
社団法人化学工学会

お問い合わせ：山本健二 (国立国際医療センター研究所：ikazuyuki@ri.imci.go.jp)  
近藤昭彦 (神戸大学大学院自然科学研究科：@kobe-u.ac.jp)



2月15日(木) シンポジウム「BiomarkerとDDS; ナノ技術の多元と諸相」予定  
神戸大学 百年記念館

山本 健二 開会の挨拶 10:00~10:10

近藤 科江 10:10~10:40 (京都大学 医学研究科)  
「HIF-1を利用したイメージング・ターゲティング」

鈴木 和男 10:40~11:10 (国立感染症研究所)  
「量子ドットを用いた好中球抗体 ANCA の作用解析とバイオイメージング」

近藤 昭彦 11:10~11:40 (神戸大学 工学部)  
「バイオナノキャリアを用いたピンポイント DDS」

(昼食)

秋田 英万 13:30~14:00 (北海道大学大学院薬学研究科)  
「ウイルスベクターと非ウイルスベクター間の遺伝子細胞内動態及  
核移行後発現効率の定量的比較」

土肥多恵子 14:00~14:30 (国立国際医療センター研究所)  
「半導体ナノ粒子を用いた、腹腔内炎症における細胞交通と  
腹腔癒着機構の解明」

落谷 孝広 14:30~15:00 (築地・国立がんセンター研究所)  
「ナノ技術による RNAi 創薬とがん治療への応用」

樋口 秀男 15:00~15:30 (東北大学・先進医工学研究機構)  
「蛍光量子ドットによるがん細胞の単一分子イメージング」

小島 清嗣 15:30~16:00 (オリンパス株式会社)  
「マウスの in vivo イメージング」

山本 健二 16:00~16:30 (国立国際医療センター研究所)  
「量子ドットの生物・医療応用」

近藤 昭彦 閉会の挨拶 16:30~

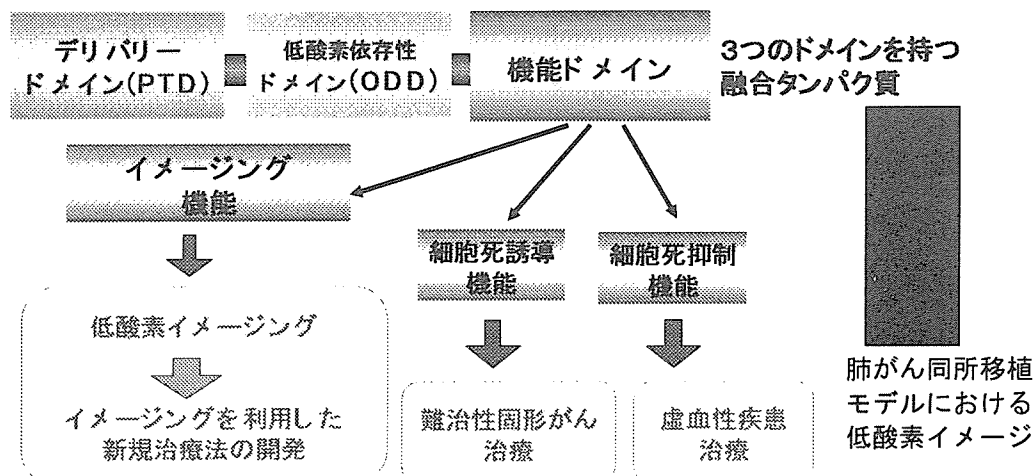
## HIF-1 を利用したイメージング・ターゲティング

近藤科江

京都大学医学研究科・放射線腫瘍学・画像応用治療学  
21世紀COE「病態解明を目指す基礎医学研究拠点」

固形腫瘍内低酸素環境は、正常組織には存在しないため、腫瘍特異的な治療標的となりうる。低酸素がん細胞は、放射線や多くの抗がん剤に抵抗性を示し、治療不良の原因となっている。更に、低酸素状態の細胞内で安定化する転写因子 HIF-1 の活性により誘導される様々な遺伝子の機能が、血管新生の亢進や転移・浸潤能の獲得など、癌の悪性化に深く関わっている。従って、腫瘍内の HIF-1 活性をモニターし、HIF-1 が発現する細胞を除去することは、がん治療において大きな意味を持つといえる。我々は、HIF-1 依存性プロモーターの下流にルシフェラーゼを繋いだレポーターベクターを安定に保持するがん細胞を樹立した。これらのがん細胞の移植腫瘍内におけるルシフェラーゼ活性を、光イメージング装置を用いて *in vivo* モニタリングすることにより、同一マウスの固形腫瘍内 HIF-1 活性を経時的に観察するシステム〔ターゲットを可視化する系〕を構築した。一方で、我々は、HIF-1 酸素依存的分解 (ODD) ドメインの一部を用いた融合タンパク質を構築している。この ODD 融合タンパク質に生体内でのデリバリー機能を有する膜透過ドメイン (PTD) を融合させることで、低酸素環境特異的融合タンパク質 PTD-ODD を構築し、下図に示したようなプロジェクトを進めている。比較的低酸素領域を多く含むとされている難治性がんをターゲットとする抗がんタンパク製剤の効果を、上記イメージングシステムで検証したところ、抗がんタンパク製剤の投与により、固形腫瘍内低酸素環境領域は有意に減少し、低酸素がん細胞を標的にしていることが支持された。また、イメージング機能を付加することにより、小動物における光プローブや、臨床応用を目指した PET プローブができつつある。これらの結果は、PTD-ODD 融合タンパク質が、低酸素環境に関与する疾患の診断薬や治療薬の開発に有用であることを示している。

### PTD-ODD プロジェクト



# 量子ドットを用いた好中球抗体 ANCA の作用解析とバイオイメージング

鈴木和男

国立感染症研究所 生物活性物質部

ksuzuki@nih.go.jp

量子ドット(QD)を用いて、好中球および腎糸球体内皮細胞への Myeloperoxidase (MPO)抗体の作用を検討した。QD 標識の MPO 抗体を作製し、腎臓への作用を検討した。MPO は、ANCA の抗原となる好中球細胞質顆粒内分子(MPO-ANCA)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 は、好中球の活性化や血管内皮細胞の活性化および傷害性に関与しているが、MPO-ANCA が、どのように好中球を活性化し内皮細胞の傷害を誘導しているかは不明である。

そこで、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 でそれぞれ確認した(すでに報告済み)。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。これらの結果から、好中球は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。つまり好中球表面における MPO の表出は、好中球活性化を判定する指標として有益であることが示された。

一方、QD標識の MPO 抗体を利用して、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、局所で活性化好中球の表面に出た MPO と反応して、好中球をさらに活性化して活性酸素などの放出をするとともに、内皮細胞にも直接結合して内皮細胞に作用して ICAM-1 の発現を上昇させる。活性化好中球からの活性酸素産生および内皮細胞の ICAM-1 の発現を上昇により、内皮細胞障害を引き起こすと推定され、最終的には、血管炎の誘発を惹起すると考えられる。

## ウイルスベクターと非ウイルスベクター間の遺伝子細胞内動態及び核移行後発現効率の定量的解析に基づいた遺伝子ベクター開発へのアプローチ

秋田 英万(北海道大学大学院薬学研究院)

遺伝子治療は、様々な先天的疾患治療に有用な治療法として注目を集めている。その中でも、人工遺伝子ベクターは安全性の高さが長所と考えられているが、遺伝子発現の低さがボトルネックとなり、適応範囲が制限されている。遺伝子発現に至るためには、細胞への取り込み、エンドソーム脱出、核移行、核内転写など多くの細胞内素過程を最適化する必要があり、これらのバリアのうちどの過程が律速段階であるかという課題点を明らかとした上での開発が極めて重要である。これまで我々は、共焦点レーザー顕微鏡を用いてエンドソーム/リソソーム、細胞質、核内の遺伝子量を同時に測定する方法論 (Confocal Image-assisted 3-Dimensionally Integrated Quantification: CIDIQ)を開発し、現在の人工ベクターが、強力な発現効率を誇るアデノウイルスベクターを比較し、「どこが」「どれだけ」劣っているかを明らかとしてきた。モデル人工ベクターとして LipofectAMINE PLUS(LFN)をもちいて比較したところ、同程度の発現を示すのに必要なコピー量は、LipofectAMINE PLUSの方が、Adよりも数千倍多く必要であり、1コピーの核到達遺伝子あたりの発現活性は7000-8000倍異なる事を明らかとした。

本情報をベクター開発にフィードバックするためには、この遺伝子発現差が「なぜ」生じるかを明らかとする必要がある。我々は、セントラルドグマの中間産物である mRNA をリアルタイム RT-PCR によって測定することにより、この7000-8000倍にも及ぶ核移行後発現効率差における転写、翻訳過程の寄与を解析した。この結果、転写効率、翻訳効率はそれぞれ400倍及び20倍、アデノウイルスで高い結果が明らかとなった。

転写効率を生み出すメカニズムについて、Ad由来のコア蛋白やゲノム構造に由来する可能性や、遺伝子の核内解離の違いを解析した。Adをプレ感染してコア蛋白を核内に導入しても、プレ感染なしのものとは比べて有意な上昇は認められなかった。また、GFPをコードするAdゲノムと、プラスミドDNAを核内インジェクションした結果、GFP発現率に有意な差は認められなかった。このことから、アデノウイルス側に転写を促進する因子があるという可能性は否定された。一方、解離型DNAのみを検出可能な *in situ hybridization* を用い、アデノウイルスとプラスミドDNAをTSA増感システムによって高感度に検出した結果、Adの方がLFNと比較して非常に効率的な染色が得られ、LFNの低い核内解離効率が、核移行後の発現効率の低さの原因となる事が示唆された。さらに、アデノウイルスにおいては、ユークロマチンへの特異的な局在が認められた。このような、核内の局在や解離の違いが、核内転写の違いに寄与することが示唆される。さらに、LipofectAMINE PLUSは、細胞内のmRNAと高い静電的相互作用を有し、これが、LFNにおいて低い翻訳効率をしめす一因であることが示唆された。

今後、核内動態制御と、mRNAとの相互作用の回避を念頭においたデバイスの設計が重要であると考えられる。

本研究を行うきっかけを与えて頂き、また、支援いただきました原島秀吉教授(北海道大学大学院薬学研究院)に深く感謝いたします。



## 半導体ナノ粒子を用いた、腹腔内炎症における細胞交通と腹膜癒着機構の解明

国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部 土肥 多恵子

腹腔には様々な重要な臓器がおさめられ、その表面は全て再外層に中皮細胞を持つ腹膜（漿膜）で覆われている。腸管の大部分は腹壁に固定されずに腸管膜でまとめられ、一定の自由度を保っている。腸管をはじめ、腹腔内の臓器に炎症が起こったり、腹膜に直接外科侵襲が加わると、腹腔内ではどのような応答が起こるのであろうか。私たちは、消化管炎症モデルにおいて、炎症局所では血中から炎症細胞が浸潤してくるだけでなく、その漿膜側にも腹膜癒着を伴った細胞浸潤がみられることに着目し、マクロファージの腹腔内における細胞交通の解析を行った。マウスより採取した腹腔マクロファージならびに骨髄から誘導したマクロファージ様細胞を蛍光ナノ粒子 QD655 で標識し、これを腹腔に戻してから大腸炎を誘導あるいは外科侵襲を加えて細胞の動きを観察したところ、腹腔由来マクロファージ(m<sup>+</sup>)が炎症後及び外科手術後の臓器癒着部位の漿膜側細胞塊に特異的に集積することを見いだした。そのメカニズムとして、腹腔 m<sup>+</sup> は炎症刺激により局所に遊走すると同時にケモカイン CCL1 を産生し、さらにその受容体 CCR8 のみをケモカイン受容体として特異的に発現するようになることを見出した。このために、マクロファージは局所にとどまって細胞凝集塊を形成するというメカニズムが明らかになった。この現象は、腹膜中皮細胞と QD655 標識腹腔 m<sup>+</sup> の共培養中に CCL1 を加えることによって *in vitro* で再現することができ、さらにこの凝集形成を CCL1 中和抗体により阻害することができた。この実験系は、これまでにない腹膜癒着の *in vitro* モデルである。さらに、CCL1 抗体は、炎症による腹膜癒着及び開腹手術後の癒着形成のいずれのモデルにおいても顕著な阻害効果が認められ、さらに CCR8 欠損マウスでは外科ストレスによる腹膜癒着が抑制されていた。このように、CCL1/CCR8 相互作用が、慢性炎症や術後の腹膜癒着防止のための標的となりうることが明らかとなった。現在、腹膜癒着阻害剤の開発に向けて研究を進めている。

## ナノ技術による RNAi 創薬とがん治療への応用

落谷孝広

(国立がんセンター研究所がん転移研究室)

RNA干渉(RNAi)法は、簡便かつ確実な遺伝子ノックダウン技術として、創薬標的の同定やバリデーションのみならず核酸医薬治療へと応用されようとしている。しかし、siRNAをベースにした核酸医薬による疾患治療を現実のものとするためには、生体内での急速な分解と失活に耐え、生体内の目的の細胞へ的確に送り届けるドラッグデリバリー技術(DDS)が要求される。これまでに成体親和性材料であるアテロコラーゲンがsiRNAと複合体を形成し、そのナノ粒子はsiRNAのデリバリーキャリアとして有用であることを明らかにしてきた。合成siRNAとの複合体を作製した場合のナノ粒子の大きさはおよそ100nm前後であり、細胞へ取り込まれる際のメカニズムはエンドサイトーシスである。このナノ粒子によるデリバリー方法のがん治療への応用に関する実証的研究を目指して、がんの薬剤耐性や転移を克服するための動物治療モデルの構築を完成させた。RNAiのがん治療への応用が期待され、世界中で様々な試みがなされているが、このような現行の治療薬剤や治療方法を増感する目的での使用方法が、ナノ技術を応用したがん領域でのRNAi創薬、治療への近道である可能性についても論じたい。

1. Ochiya T, *et al.* Expert Opin Drug Discov. (2007) review
2. Yanagihara K, *et al.* Cancer Res. (2006)
3. Takeshita F, Ochiya T. Cancer Sci. (2006) review
4. Takeshita F, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA (2005)
5. Minakuchi Y, *et al.* Nucleic Acids Res. (2004)
6. Hanai K, *et al.* Human Gene Ther. (2004)
7. Kai E, Ochiya T. Pharm Res. (2004)

## 蛍光量子ドットによるがん細胞の1分子ナノイメージング

樋口秀男, 渡辺朋信, 権田幸祐, \*多田寛, \*大内憲明 (東北大学 先進

医工学研究機構, \*東北大学医学研究科)

近年、ナノサイエンスの分野の重要な応用として医学との融合を目指したナノメディシンの研究が世界各地で産声を上げている。我々は、細胞およびマウス内のタンパク質1分子の運動を量子ドットを用いてナノイメージングを行った。

乳がんの約30%では細胞膜上のレセプターHER2を過剰発現している。このタンパク質に対する抗体(抗HER2抗体)は、乳がん患者に投与される分子標的抗がん剤である。この抗HER2抗体を蛍光性量子ドットに化学架橋させた。これを乳がん細胞KPL-4と混合したところ、量子ドットは細胞膜に結合し、次に細胞内に膜ごと小胞を形成して取り込まれた(エンドサイトーシス)。その後、量子ドットを含んだ小胞は細胞内を細胞核に向けて輸送された。モーター蛋白質によって輸送されている量子ドットの位置の経時変化を高位置分解能(2nm)かつ高時間分解能(0.3ms)で観測を行った。その結果、分子運動に由来する、10nm程度のステップ状の運動を捉えることができた。さらに、この方法をマウスに応用した。マウスの静脈に抗がん剤であるこの抗体に量子ドットを結合し、抗がん剤が運ばれる過程を明らかにした。抗がん剤ハーセプチン1分子は、血管からすり抜け(図1)、その後、動いたり止まったりを繰り返しながら、がん細胞に近づいてゆき、がん細胞に結合して、細胞内を走り細胞核付近に至る(図2)、像が動画により観察された。このように、抗がん剤1分子の挙動を観察できたことにより、抗がん剤がどのような経路でがん細胞に近づき、どの場面に最も時間を費やすかを理解することができた。この研究は将来、副作用の少なく、迅速にがん組織に到達する抗がん剤開発に役立つだろう。

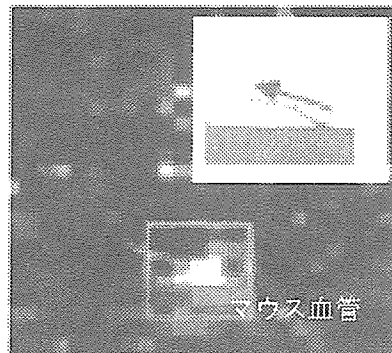


図1. 半導体ナノ粒子を目印として観察されたマウスの血管から飛び出す、抗がん剤1分子の運動とその軌跡

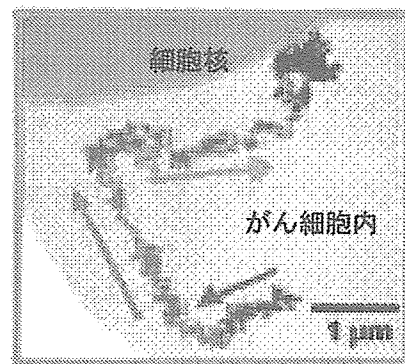


図2. マウスに埋め込んだ、ヒト乳がん細胞の中を走る抗がん剤1分子の軌跡

## 「マウスの *in vivo* imaging」

オリンパス株式会社 ライフサイエンスカンパニー  
バイオ事業推進室  
小島 清嗣

マウスの体の中にある細胞を生きたままで見るときの仕掛けはつい最近までほとんどなかった。顕微鏡を用いる場合には体を切開して対物レンズを体内に近づける必要があり、マウスにとっては大きな侵襲であった。今回お話するのは、生きたままの動物の体の中をできるだけダメージが少なく、細胞が分かる解像度で見るときの仕掛けについてである。

我々は、体の中の細胞を体の外から見るために特殊な対物レンズを開発した(図1)。このレンズは内視鏡の技術と顕微鏡の技術を駆使して開発されている。レンズの先端の外径は、最も細いレンズの場合φ1.3mmであり、少し太めのシャープペンシルといった大きさである。このレンズを小動物観察用に開発した装置の先端に取り付け、マウスなどの小動物の外側から生体内を観察し、一つ一つの細胞を認識することに成功した。細胞を識別するためには、*in vivo* imaging に適した近赤外領域の蛍光試薬や蛍光タンパク質を用いた。蛍光マルチカラーでのイメージングにより他種類の細胞を識別可能である(図2)。

もう一つのアプローチは、マウスの全体像から特定の細胞までをズームアップする顕微鏡である。特定の生命現象(病気も)が、生き物の体内のどこで起こっているかをリアルタイムで観察できれば、今まで分からなかった生命の仕組みを解明することに繋がる。これらの仕掛けによって *in vivo* での細胞生物学という新しい領域の創造が可能となるであろう。

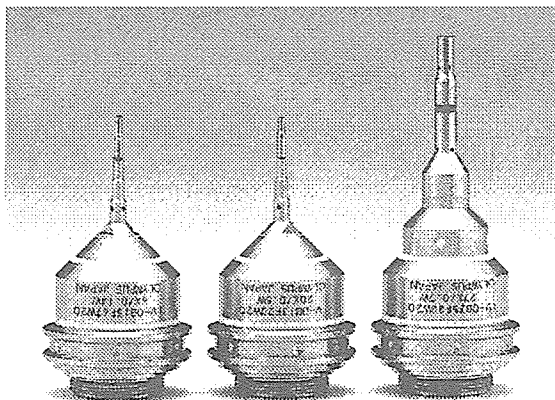


図1 マウスの体内を見る特殊な対物レンズ

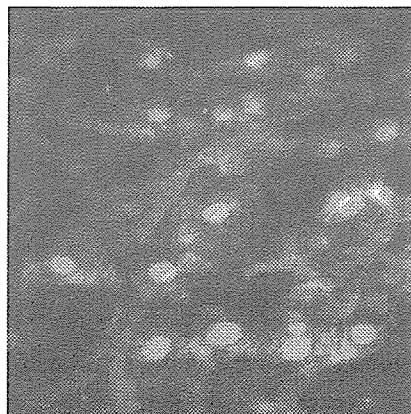


図2 マウス肝臓表面の細胞と血管の *in vivo* 画像