

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14年度～平成18年度 総合研究報告書

主任研究者

山 本 健 二

平成19（2007）年3月

目次

I. 主任研究者総合報告

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. 分担研究者総合報告

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)・・・17

2) ヒト血液細胞などに対する分子導入や抗体ナノテクノロジーに関する研究

湯尾 明(国立国際医療センター・血液疾患研究部・部長)・・・23

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)・・・25

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)・・・31

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)・・・37

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・室長)・・・45

7) 量子ドットを利用したガラス体可視化の試み

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)・・・55

8) ピンポイント DDS

近藤昭彦 (神戸大学工学部教授)・・・59

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)・・・63

3. ナノミセルによる DDS

1)循環器疾患に対する遺伝子治療用ベクターの開発

斯波 真理子(国立循環器病センター研究所・室長)・・・71

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)・・・81

III. 研究成果の刊行に関する業績一覧・・・93

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）
主任者総合研究報告書

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）

近藤昭彦（神戸大学・工学部・教授）

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の開発を行った。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ゾゾーム、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 をデリバリーしうることから、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、肝臓特異的の表面加工

法)を開発している。一方、細胞レベルではライゾソーム、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剤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

5年間の研究機関において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

(8) ピンポイント DDS

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

(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・製造することを行った。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、最終年度に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。今後の研究として、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ことが期待される。

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 月に発表された。

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療に役立ち、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図ることが期待される。さらに本研究は、破骨細胞による骨融解についても解析を始めた。好中球による急性糸球体腎炎 (RPGN) の解析を行った。特に好中球の持つミエロパーオキシダーゼを検出するため、その抗体に対して半導体ナノ粒子を結合し利用した、その結果、定常状態では細胞質に存在する MPO は、活性化した好中球ではその細胞膜に存在することが判明した。これにより早期に RPGN の診断が可能であり、治療の指針を明確化できる。γ グロブリンなどの治療が成功すると同時に転移した MPO は、認められなくなる。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・治療への応用を敏感に検査することが可能となった。

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：

HVJ エンベロープベクターは、遺伝子の導入のみならず蛋白の導入にも応用できることが確認された。マウス血液細胞株を用いた検討においては、HVJ エンベロープベクターは量子ドットの導入効率を著明に改善し、細胞質に直接導入されていると考えられた。

量子ドットもしくは PerCP で蛍光ラベルした抗ヒト CD4 モノクローナル抗体を用いて、ヒト末梢血単核球の CD4 抗原の膜発現について検討を行った。ヒト末梢血単核球を FSC と SSC によって 2 次元に展開すると 3 つの領域に分画することができた。FSC と SSC が何れも低値の領域には血小板などが、FSC 中等度高値で SSC 低値の領域にはリンパ球が、FSC と SSC の何れも高値の領域には単球が存在した。次に、CD4 発現量に関して、量子ドットラベル抗体を FL4 で、PerCP ラベル抗体を FL3 で、それぞれ定量した。その結果、何れの場合も血小板分画では CD4 が低発現、リンパ球分画では CD4 は高発現と低発現の 2 相性、単球分画では中等度発現となった。全体的に見て、量子ドットラベルの蛍光強度が強い傾向にあった。

EMR1cDNA をヒト単球細胞株 Mono Mac 6 より RT-PCR にて取得した後に、免疫原としてマウスに投与して、合計 5 回免疫して脾細胞を得てマウスミエローマ細胞との細胞融合を行った。最終的に二つのハイブリドーマクローン 3H2、4A7 を取得した。二つのクローン 3H2、4A7 の産生するモノクローナル抗体は共にマウス IgG1 で、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 (ARH77, 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。マウスにおいて、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：

① マウス腹腔及び骨髄由来マクロファージの腸炎における細胞の分布

骨髄由来マクロファージは投与ルートに関わらず大腸粘膜固有層の管腔側に達していたのに対して、腹腔内マクロファージは炎症部漿膜と穿孔部に集積し、壁内への浸潤はみられなかった。結果を表1にまとめた。また、腹腔内の細胞構成も非炎症時とは大きく異なり、CD11b^{hi}の細胞が減少し、CD11b^{lo} Gr-1⁺の骨髄由来細胞と思われる分画が増加していた。

② 炎症刺激によるマクロファージによるケモカイン受容体の発現

炎症のない定常時の腹腔マクロファージにおいては、検索したすべてのケモカイン受容体の mRNA が発現していた。これに対し、穿孔部に集積して凝集塊を形成するマクロファージにおけるケモカイン受容体の発現は大きく異なり、mRNA 発現の認められる受容体は CCR8, CCR9, CCR10 に限定されていた。特に CCR8 の発現はナイーブマクロファージに比して強く亢進していた。興味深い事に、CCR1, CCR2 を含むこの他の多くの炎症性ケモカイン受容体発現には低下が認められた。

③ ケモカイン及び炎症刺激によるマクロファージの CCR8/CCL1 発現

LPS などの炎症刺激をナイーブ腹腔マクロファージに加えると CCR8 のリガンドである CCL1 の発現上昇が見られた。この事から自己分泌したケモカインに対する受容体を高発現する事により、腹腔内マクロファージは傷害の起こった一点に凝集すると考えられた。

マウス腹腔マクロファージに上記の炎症性刺激を加えるとどの刺激物質によっても CCR8 mRNA の発現が亢進した。この中で CCL1 の添加によって、2時間後の CCR8 mRNA 量が1.2倍以上に上昇した。これに対して、骨髄由来マクロファージではどの刺激物質によっても有意な CCR8 mRNA 発現の上昇は見られなかった。腹腔マクロファージでは、LPS, PGN, TNF- α , 及び CCL1 により有意な CCL1 mRNA の発現上昇が見られた。LPS 及び CCL1 刺激による腹腔マクロファージ表面の CCR8 発現

は蛍光抗体法によっても確認され、その機能を保っていることはケモタキシスアッセイでも明らかであった。

④ 腹膜癒着 *in vitro* モデルの作成

中皮細胞単層培養上では、腹腔マクロファージは緩く接着して細胞の伸展は見られず球形の細胞形態を保っていた。この共培養系に CCL1 を加えると、3時間以降で、中皮細胞層の剥離を伴った径 100 μ m 以上の細胞凝集塊が形成された。細胞塊は LPS, PGN, CpG を加えることによっても形成されたが、CCL1 が最も効率良い刺激であり、抗 CCL1 抗体を加えることによって、細胞塊形成はほぼコントロールレベルまで阻害された。さらに、この細胞塊を回収して凍結切片を作製し、免疫染色したところ、サイトケラチン陽性 QD 陰性の中皮細胞を巻き込んでいることが明らかとなった。

⑤ ケモカイン及び炎症刺激による中皮細胞の CCL1 発現

マウス中皮細胞は、炎症刺激及び CCL1 刺激によって CCL1 を産生することが明らかとなった。CCR8 は定常的に発現していた。

以上より、腹腔の侵襲による中皮細胞の傷害がトリガーとなって、中皮細胞と腹腔マクロファージによる CCL/CCR8 によるポジティブフィードバックが働き、傷害局所に腹膜を巻き込みながら、マクロファージ凝集が起こることが明らかになった。

⑥ 大腸炎及び外科ストレスに伴う腹膜癒着マウスモデルにおける CCL1 疎外効果

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。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。これにより、CCL/CCR8 相互作用の阻害によって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：

1. エノラーゼの立体構造はホモロジーモデリングにより構築した。アミノ酸配列は Read ら (Eur J Biochem, 1994) および河津ら (GenBank AB026051) の報告をもとに、立体構造は 64% 相同な配列を持つ

イースト由来酵素の結晶構造をもとに、アミノ酸を置換・挿入・削除した後、構造最適化を行うことで作製した。また、ヒトのエノラーゼとは配列の大きく異なるところの4カ所を人工抗原の候補(AD22, GL16, AA13及びGG14)を選出した。なお、AD22はエノラーゼの基質結合部位の一部であり、立体構造を保つ上でも重要と考えられる部分である。GG14はその相同性が植物に見られる部位でもあるが、熱帯熱マラリア原虫が進化の過程で藻類の二次共生を受けた際に藻類との遺伝子交換が行われたものと考えられる。

AA13に関するNMRによるペプチド骨格のコンフォーメーション解析した。
2. タイ人熱帯熱マラリア患者30名の血清を使用し、原虫粗抗原に対する反応性を調べたところ、それらの反応性は極めて高かった。しかしながらrPfEno、AD22に対して高い反応性を示す血清は非常に少ないことが明らかとなった。一方、AD22と部位は異なるが同じ熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの一部であるGG14に対しては、すべての患者血清と、それぞれか対照群である健常人血清とも高い反応性を示した。rPfEno、AD22に対して高い反応性を示したいくつかの血清の患者の末梢血中の原虫血症を調べてみると、寄生率は極めて低いことも明らかとなった。

作製することができたペプチドのシエマティック構造は以下の5種で、(1)H-NL7-OH、(2)H-NL7-GG-OH、(3)-GlyGly-リンカー構造をもつdi-epitope、(4)Lys枝を持つtetra-epitope MAPs、(5)Glu枝を持つtetra-epitope MAPsである。

上記(1)で作製したH-NL7-OHに関して、まずCD spectroscopyを行ったところ、 α -helix構造を短いシークエンスでありながら巻いていることが判明した。(2)の-Gly-Gly-linkerがついている方がより α -helix構造が著明であった(下記Figure(b)に示す点線および---線)。

5. 生成した微粒子の電子顕微鏡写真を下図に示した。最も小さな微粒子で数百nm、大きな微粒子で20 μ m程度になった。基材そのものが低融点のため(100°C以下)、電子線走査では観察中に膨らんだり、割れたりした。

6. 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) 腎疾患治療に向けたDDS班:

1) 糸球体指向性リポソームを用いた実験

半月体性糸球体腎炎は管外増殖性糸球体腎炎とも呼ばれるように、糸球体毛細血管外(ボーマン腔内)への炎症細胞の集積と上皮細胞の増殖が見られる腎炎である。Wistar Kyoto系ラットに抗糸球体基底膜抗血清を投与して作製する動物モデルでは腎炎惹起後7日目までに細胞性半月体腎炎の形態像が形成され、尿蛋白が増加した後、蛋白尿は維持され、次第に腎機能の低下が起きて血清クレアチニン値やBUNが上昇し、60-100日目には腎不全に陥り死亡する。

3 mg/kgのリポソーム内封リン酸プレドニゾロンナトリウムを投与したLipo-PSL/3群は治療を開始した翌週、すなわち腎炎惹起後2週目から尿蛋白の増加が有意に抑制されたのに対し、空リポソーム群、リン酸プレドニゾロンナトリウム生食溶液投与群、及び1 mg/kgリポソーム内封リン酸プレドニゾロンナトリウム投与群では全く抑制されず、疾患コントロール群と同程度であった。この傾向は実験を終了した6週目まで続き、Lipo-PSL/3群では2週目以降の尿蛋白の増加がほぼ完全に抑制された。一方、他の群では、6週目に空リポソーム群と1 mg/kgリポソーム内封リン酸プレドニゾロンナトリウム投与群

で若干低い値を示したのを除き、最後まで全く抑制が見られなかった。

また BUN を指標とした腎機能低下に対する効果においてもリポソーム製剤は有効性を示した。すなわち、Lipo-PSL/1 群及び Lipo-PSL/3 群では3週目から6週目まで BUN の上昇が有意に抑制され、特に Lipo-PSL/3 群ではほぼ正常値で推移した。Free-PSL/3 群も3週目及び6週目の時点で有意な抑制が見られたが、その程度は弱かった。また6週目の血清クレアチニン値については Lipo-PSL/3 群でのみ有意な抑制が見られたが、他の群では疾患コントロール群と差はなかった。以上の結果から、臨床的パラメータに対する効果はリポソーム内封ステロイド剤が有意に優れていることが明らかとなった。

次に半月体に対する治療効果を見るために、6週目に屠殺したラットの腎の PAS 染色光顕像を調べた。その結果、疾患コントロール群では多くの糸球体に半月体の形成が見られたのに対し、Lipo-PSL/3 群では有意に抑制されていた（疾患群、 63.0 ± 6.1 vs. Lipo-PSL/3 群、 28.8 ± 11.1 , $p < 0.05$ ）。我々のこれまでの研究の結果、半月体形成は腎炎惹起後7日目までには多くの糸球体で起きていることから、今回の結果はリポソーム内封ステロイド剤は半月体形成を抑制したのではなく、既に形成された半月体を治癒させたものと考えられる。

半月体性糸球体腎炎モデルにおいて、ステロイド内封リポソームが糸球体に集積しているか否かをローダミン標識したリポソームを用いて検討した。その結果、ローダミンの蛍光が糸球体に集積している像が観察されたことから、同モデルにおいても本リポソーム製剤は糸球体指向性を示すことが確認された。

これらの結果から、半月体性糸球体腎炎のモデルにおいて、ステロイド内封リポソームは疾患糸球体に集積する性質を示し、そのために、フリーのステロイド剤に比べて臨床的及び病理学的な治療効果が高いことが明らかとなった。

次に糸球体内の炎症の程度を調べるために、糸球体内の単球やリンパ球の数を測定したところ、リポソーム封入ステロイド剤治療群と未治療群の間に差はなかった。さらに糸球体内の炎症性サイトカイン mRNA レベルにも差はなく、リポソーム封

入ステロイド剤の治療効果は、糸球体内の炎症の抑制ではないことが示唆された。

半月体の形成過程では、細胞の増加だけでなく細胞外マトリックスの増加も起き、細胞性半月体から線維性半月体へと変化していく。そこで糸球体内のフィブロネクチン及びI型コラーゲンの mRNA レベルを調べたところ、未治療群と比べて、リポソーム封入ステロイド剤治療群でどちらの mRNA も顕著な抑制が観察された。さらに線維化のメディエーターとして知られる Connective Tissue Growth Factor (CTGF) の mRNA レベルも有意に抑制されていた。これらの結果は、光顕レベルで観察された半月体形成の抑制の結果とよく一致した。

本研究で用いている動物モデルにおいて、CTGF はボーマン囊上皮細胞が産生するとの報告がある。また半月体形成における細胞成分の増加には、炎症細胞の浸潤とともにボーマン囊上皮細胞の増殖が重要であることが知られている。従って、上記の CTGF 産生抑制という結果は、ボーマン囊上皮の増殖抑制の可能性を示唆すると考えられた。そこで同細胞のマーカーである PGP 9.5 の糸球体内 mRNA レベルで調べたところ、リポソーム封入ステロイド剤治療群で顕著な抑制が観察された。さらに PGP 9.5 に対する抗体を用いた免疫染色においても同様の結果が見られた。

以上の結果から、本モデルにおけるリポソーム封入ステロイド剤の治療効果は、フリーのステロイド剤を大量に連日投与した場合とは異なり、糸球体内への炎症細胞の浸潤やそれらの細胞による炎症性メディエーターの産生は抑制しないが、ボーマン囊上皮細胞の増殖や、その後起きる細胞外マトリックスの蓄積を抑制することがわかった。

2) 尿細管上皮における分子標的探索

ヒト正常腎組織には、間質及び糸球体への白血球浸潤や FKN 及び FKN 受容体の発現はほとんど見られなかった。

腎疾患患者の腎生検組織には FKN が検出される症例が 52 例中 15 例あり、陽性例の疾患別の内訳は、IgA 腎症 5 例、膜性腎症 3 例、巣状糸球体硬化症 2 例、半月体性糸球体腎炎 2 例、巣状分節性増殖性腎炎 1 例、メサングウム増殖性腎炎 1 例、膜性増殖性腎炎 1 例であった。これらの症例で FKN は尿細管間質領域にのみ検出され、そ

の多くは尿細管上皮細胞に発現していることが確認された。一方、糸球体内に FKN の発現は見られなかった。

FKN 陽性例では陰性例に比べて、血液尿素窒素、血清クレアチニン値 ($P=0.01$)、尿蛋白 ($p=0.001$) のいずれも高値を示し、FKN の発現は臨床的に重症であるほど顕著であることが明らかとなった。

FKN 受容体の発現は FKN の発現より頻度が高く、また腎間質だけでなく、糸球体内にも見られた。腎間質での陽性例は 35 例、糸球体内陽性例は 21 例あり、そのうち両方が陽性だった例は 18 例あった。また FKN 陽性例 15 例のうち腎間質での FKN 受容体陽性例が 13 例あり、FKN が尿細管間質領域に発現すると、その受容体発現細胞が集積することが示唆された。

間質への白血球浸潤の程度は FKN 及び FKN 受容体の発現が高い症例ほど顕著であり、FKN が陽性の尿細管の周囲には多数の白血球が観察されることが多かった。FKN の発現は種々の浸潤白血球数と相関し、特に FKN の発現と CD68 陽性細胞数との相関が最も強かった ($P<0.01$)。

正常ラット腎組織において FKN の発現は見られなかったが、腎炎モデルではその初期に糸球体内に発現が認められ、蛋白尿が出始める 5 日目頃から尿細管上皮細胞に FKN の発現が観察された。この発現亢進は mRNA レベルでも確認された。また、臨床例の場合と同様、FKN 発現尿細管上皮細胞の周囲に白血球浸潤が観察された。

cFN 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 cFN 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 cFN 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 cFN の沈着とは相関しないと考えられた。

OPN 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 OPN 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 OPN の強い染色が見られ、その分布は cFN 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 OPN 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。

3) QD を用いた DDS

尿中での QD 測定が可能かどうかを調べるために、赤色、緑色の 200 mM QD 溶液をラット新鮮尿で希釈し、それぞれの検出可能濃度を調べた。その結果、いずれの QD も 1 μ M まで検出可能であることがわかった。

そこで次に、100 mM QD 溶液をラットに投与し、その動態を調べることにした。赤色、緑色の順に、数分間の間隔で、尾静脈より投与したところ、DHCLA-QD、RSA-QD のいずれの場合も、赤色 QD の投与後にラットに著変は見られなかったが、緑色 QD 投与直後に死亡した。この実験は 2 回繰り返したが、結果は全く同じであった。

死亡したラットの血清中の QD を調べた結果、RSA-QD 投与の場合には赤色、緑色ともに高濃度の QD が検出されたが、DHCLA-QD 投与群ではその濃度が遙かに低かった。一方、尿中には DHCLA-QD 投与群

で緑色 QD が検出されたのみで、RSA-QD 投与群では全く検出されなかった。これらの結果から、DHHLA-緑色 QD は速やかに尿中に排泄されるが、他の QD は排泄されにくいことがわかった。

次に死亡したラットの肺、腎における QD の分布を蛍光顕微鏡にて調べた。RSA-QD 投与ラットの腎では糸球体や傍尿細管毛細血管に赤色 QD が観察され、緑色 QD はほとんどみられなかったのに対し、同ラットの肺においては、赤色、緑色ともに毛細血管に観察された。一方、DHHLA-QD 投与ラットの腎では、赤色 QD がわずかに毛細血管に、緑色 QD が尿管と思われる部位に強く観察され、RSA-QD の場合とは分布が異なった。これに対して、同ラットの肺では RSA-QD 投与の場合とほぼ同じく、赤色、緑色ともに毛細血管に観察された。DHHLA-QD、RSA-QD のいずれの場合も緑色 QD 投与直後にラットが死亡したことと考え合わせ、肺における緑色 QD が蓄積したことが肺塞栓の原因となってラットが死亡したと考えられた。

最後に、投与した各 QD の粒子径を DLS 法により測定した。その結果、DHHLA-緑色 QD は平均粒子径が約 10 nm であったのに対し、DHHLA-赤色 QD、RSA-緑色 QD、RSA-赤色 QD はいずれも 20 nm 前後の粒子径であることがわかった。

(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ーとなっている。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- α 、IL-1 β 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 1 2 時間後に、尿タンパクの一過的上昇が見られた。

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 β 、TNF- α 、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。

(8) ピンポイント DDS の開発班：

GFP 融合タンパク質中空ナノ粒子の生産について検討を行ってきた。GFP 封入粒子発現プラスミドをそれぞれトランスフェクションした昆虫細胞および動物細胞の培養上清を酵素免疫測定装置 IMx により解析を行なった結果(Fig.2)、動物細胞と比較して昆虫細胞の方が約 5 倍の粒子を生産していることが確認された。また両者の上清を 1 次抗体に抗 GFP 抗体および抗 S (HBsAg の S 領域) 抗体を用いてウエスタンブロッティングにより解析した結果、それぞれにおいて目的の位置に明瞭なバンドが検出されたことから、HBsAg-GFP 融合タンパク質が発現していることが確認された。HBsAg-GFP ナノ粒子を HepG2 および A431 の培養液に添加して、特異的な導入の可能性について検討した結果を Fig.3 に示す。HepG2 においては HBsAg-GFP 粒子の GFP に由来する緑色蛍光が観察されたが、A431 においては全く観察されなかった。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察から、融合粒子は細胞内に取り込まれていることが示された。したがって、HBsAg-GFP ナノ粒子を用いることによってヒト肝細胞に特異的に GFP を導入することができることが確認できた。

2) アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS 班：

(1) ヒト精巣腫瘍モデルへの局所投与

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継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。

(2) 接触性皮膚炎モデルマウスへの全身性投与

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。

(3) 骨転移モデルマウスへの投与

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。

(4) アテロコラーゲン複合体のナノ粒子としての性状

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* イメージングを光子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:

1) 種々カチオン性連鎖を有する新規ブロック共重合体の合成

上述の PEG-PBLA のエステル-アミド交換反応によって異なるポリカチオン構造を有するブロック共重合体を合成し、高分子ミセルの遺伝子発現および細胞毒性をそれぞれルシフェラーゼアッセイおよび MTT アッセイにより評価した。その結果、PEG-PBLA 側鎖にジエチレントリアミン (DET) の導入により調製される PEG-PAsp(DET) が極めて効率的かつ低毒性な遺伝子導入を可能にすることが明らかとなった。PEG-PAsp(DET) は、側鎖にエチレンジアミン構造を有しており、細胞外 pH(7.4) からエンドソーム内 pH(5.5) に変化することによって、モノプロトン化状態 (gauche 構造) からジプロトン化状態 (anti 構造) にコンホメーション転移する。これに

伴って、PEG-PAsp(DET) は強力な buffer 能を発揮するとともに、anti 構造のエチレンジアミン構造がエンドソーム膜に障害を与えるものと考えられ、その結果として効率的な遺伝子発現が惹起されることが示唆された。

2) 環境応答性と標的指向性を賦与した高分子ミセル型遺伝子ベクターの構築

内核に SS 架橋を導入した高分子ミセルは、非還元的環境では pDNA を安定に保持する一方で、還元的環境では効率的に内包 pDNA を放出することを電気泳動により明らかとした。また、SS 架橋導入高分子ミセルは、賦形剤を使用せずに凍結乾燥を行うことが可能であり、製剤化においても大きな利点を有することが明らかとなった。また、SS 架橋導入高分子ミセルは、尾静脈投与において、肝実質細胞に均一に遺伝子導入できることが蛍光蛋白質 (YFP) の遺伝子発現評価により確認された。

さらに本研究では、SS 架橋導入高分子ミセルの末端に環状 RGD ペプチドを導入したところ、HeLa 細胞に対してリガンド-受容体結合を介した効率的な遺伝子発現が確認された。興味深いことに、環状 RGD ペプチドが有効に機能するためには、SS 架橋が必要であり、SS 架橋導入率が 11% の場合において、環状 RGD 導入ミセルはリガンド分子を導入していないミセルの 32 倍の遺伝子発現効率を示した。また、環状 RGD 導入ミセルの効率的な遺伝子発現は、細胞内取り込み量の増加ではなく、細胞内 Trafficking の変化によるものであることが pDNA の取り込み量の測定と細胞内局在の CLSM 観察により明らかとなった。

3) 二重蛍光標識 pDNA を用いた蛍光顕微鏡による細胞内動態評価法の確立

細胞内におけるポリプレックスからの pDNA のリリースを CLSM による FRET 観察により評価したところ、効率的な遺伝子発現を示す linear PEI によるポリプレックスでは細胞内における効率的な DNA リリースが確認され、linear PEI (LPEI) よりも低い遺伝子発現効率を示す Branch PEI (BPEI) や PLL からなるポリプレックスでは細胞内における DNA のリリースが遅いことが

明らかとなった。このように、ポリプレックスによる効率的な遺伝子発現のためには、エンドソームから細胞質への効率的な移行に加えて、細胞質および核内で速やかに内包 DNA が放出される特性が必要とされるものと思われる。そこで本研究では、項目 1) で開発した異なるカチオン構造を有するポリカチオンから形成されるポリプレックスについて、細胞内 FRET を評価したところ、最も効率的な遺伝子発現を示した PAsp(DET) が細胞内で効率的な DNA リリースを達成することが明らかとなった。このように、PAsp(DET) は、上述の優れた細胞質内移行性に加えて、細胞内での効率的な DNA 放出によって高い遺伝子発現を示すものと思われる。

4) 固形がんモデルとしてがん細胞スフェロイドを用いた遺伝子ベクター評価法の確立

がん細胞スフェロイドを用いることによって、従来の単層培養では困難であった長期における遺伝子発現評価と感度に優れた毒性評価が可能となり、その結果、(i) PAsp(DET) が低毒性と高い遺伝子発現活性を兼ね備えたポリカチオンであること、(ii) PEG-PAsp(DET) から形成される高分子ミセルは、PAsp(DET) から形成されるポリプレックスより、遅延された遺伝子発現を示すことが明らかとなった。また、400-500 μm の大きながん細胞スフェロイドを用いて、ポリプレックスおよび高分子ミセルの遺伝子発現評価を行ったところ、高分子ミセルはスフェロイド中心の Hypoxia への遺伝子導入を可能にすることが明らかとなった。このような高分子ミセルによる Hypoxia 領域への遺伝子導入は、その優れたがん組織浸透性に起因することが、200 μm のスフェロイドに対する蛍光標識 pDNA の浸透性の評価により確認された。このように、がん細胞スフェロイドを用いることによって、*in vivo* 環境を模倣した条件で人工ベクターの機能を評価することが可能であり、この評価を通じて、PEG-PAsp(DET) の *in vivo* 応用に向けた優れた特性が示唆された。

5) ハウスキーピング遺伝子の発現変動を

利用した遺伝子ベクターの安全性評価法の確立

ポリプレックスを用いた遺伝子導入過程の導入細胞のホメオスタシスに対する影響をハウスキーピング遺伝子の発現変動により評価したところ、LPEI を用いた遺伝子導入ではハウスキーピング遺伝子の発現量が顕著に減少することが確認された。この結果は、LPEI による遺伝子導入が細胞に致死的なダメージを与えないまでも、細胞のホメオスタシスに大きな影響を及ぼしていることを示唆しているものと考えられる。一方、PAsp(DET) を用いた遺伝子導入では、ハウスキーピング遺伝子の発現量はほとんど変化しないことが明らかとなった。このように、PAsp(DET) は、細胞の正常機能を阻害しないことが示唆され、これは遺伝子導入による細胞機能の人為的制御において重要な特性であると考えられる。

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

1) 架橋ミセルの *in vitro* 遺伝子導入

遺伝子導入ベクターとしての架橋ミセルを評価するため、種々の細胞および細胞株を用いて、*in vitro* 遺伝子導入実験を行った。Cos-1 細胞 (図 5) への遺伝子導入は、SS 結合が 13% のもので最大であった。一方、血管内皮細胞、ヒト単球由来白血病細胞株 THP-1 では、28% の SS 結合導入により、遺伝子発現が最大となった。また、いずれも 37% の架橋導入により、遺伝子発現は低下していた。以上より、SS 結合を内核に導入することにより、*in vitro* での遺伝子発現を増加させることが可能であった。細胞それぞれに、最大の遺伝子発現をみとめる至適の架橋導入%が存在していた。

(2) 架橋ミセルによる *in vivo* 遺伝子導入実験

それぞれの%の架橋を導入した架橋ミセルを用いて、マウスの気管内投与を行い、1 日後に肺での遺伝子発現を測定したところ、13% および 28% の架橋導入により、有為な遺伝子発現を認めた (図 8)。5%、37% の架橋導入、および架橋のないものでは、ほとんど遺伝子の発現を認めなかった。

(3) PEG-PAsp(DET) ポリプレックスの *in*

in vitro 遺伝子導入

遺伝子導入ベクターとしての架橋ミセルを評価するため、種々の細胞および細胞株を用いて、in vitro 遺伝子導入実験を行った。DETの重合度は68と101、N/Pは20、40、80のもので検討を行った。

Cos-1細胞への遺伝子導入は、いずれの条件でも、PEIと同等あるいはそれ以上の発現効率を得た(図9)。重合度は101のもので68よりも遺伝子発現効率は高く、また、N/P比は80のもので最大であった。

血管内皮細胞では、PEIおよび重合度101のもので毒性効果がでて多くの細胞が死んでしまい、図10のような結果となった。重合度68の中でもN/P比80のもので、良好な遺伝子導入効率を認めた。

単球由来白血病細胞株THP-1では、68、101いずれの重合度でも、N/P比80のもので高率な遺伝子発現を認めた(図11)。以上より、in vitro では、N/P比が高値、重合度が101である方が、遺伝子発現効率が高値であること、重合度が101の場合、毒性がでる細胞もあることがわかった。

(4) PEG-PAsp(DET)による in vivo 遺伝子導入実験

PEG-DETを用いてマウス気管内投与による in vivo 遺伝子導入実験を行い、Exgen(Linear PEI)および架橋ミセルによる遺伝子導入と比較した。PEG-DETを用いることにより、Exgenおよび架橋ミセルによる遺伝子導入に比し、約50倍の遺伝子発現を認めた。

(5) PEG-PAsp(DET)による in vivo 遺伝子導入による毒性効果の検討

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(図14)。

コントロールとして、アドレノメデュリン発現遺伝子と生理食塩液、アドレノメデュリン発現遺伝子とExgen、PEG-PAsp(DET)とルシフェラーゼ遺伝子を投与したが、いずれも右室圧に有意な差を認めなかった。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

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は、分担者の項参照。

F. 知的財産権の出願・登録状況

知財産権の出願ならびに登録状況は、分担者の項参照。

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のヒト体内へ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しより安全な半導体ナノ粒子の設計と製作を実現する。半導体ナノ粒子は、一桁ナノメートルの粒子直径を持つ。そのため量子サイズ効果による強力な様々な色の蛍光を持つナノ粒子を製造できる。この極めて特異的な性質を利用し、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。これらを実現することによりナノテクノロジーを医療の治療現場に応用することが可能となり、それこそが本研究の目的である。

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応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応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ッ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