

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。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。

#### 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・生体レベルで非侵襲あるいは低侵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侵襲解析は、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

本研究では降圧剤、抗リウマチ剤の2種類の薬物に半導体ナノ粒子を結合しDDSとして利用した。今後様々な分野の薬剤について半導体ナノ粒子を結合させ効率のよい安全なDDSを開発する。またさらにその蛍光強度を測定し、その値から薬物体内動態を計測するシステムを予定である。

#### E. 結論

半導体ナノ粒子を生物・医療に応用するため更に安全性を様々な面で計量するシステムを開発した。また材料となる半導体ナノ粒子を大量に合成できる技術を開発した。Cd/Se半導体ナノ粒子以外に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。

腹腔マクロファージを細胞染色し、大腸潰瘍の治療、手術後癒着の解析を行い、疾病の原因を解明し、その治療法を開発した。同様な方法を用い、最終年度に骨髄免疫前駆細胞からは破骨細胞を誘導すること

に成功した。また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その他に利用できると考える。今後様々なまくりフェージ系細胞に適応できる手法であると考えられる。

#### 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.” 35<sup>th</sup> 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).

10) Futamura Y, Yamamoto K.

Hydrothermal Synthesis of Olygoglysis with Adiabatic Expansion Cooling.

*Viva Origino* 2005; 33(4): 269-274.

11) Warner JH, Hoshino A, Yamamoto K, Tilley RD. Water-Soluble Photo luminescent Silicon Quantum Dots.

*Angew Chem Int Ed Engl.* 2005; 44(29): 4550-4554.

12) Hoshino A, Fujioka K, Manabe N, Yamaya S, Goto Y, Yasuhara M, Yamamoto K. Simultaneous Multicolor Detection System of the Single- Molecular Microbial Antigen with Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Microbiol Immunol* 2005; 49(5): 461-470

13) Goto T, Futamura Y, Yamaguchi Y, Yamamoto K. Condensation Reactions of Amino Acids under Hydrothermal Conditions with Adiabatic Expansion Cooling. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 2005; 38(4): 295-299.

14) Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Nakamura S, Suga M, Yamaguchi Y, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K.

Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells.

*Microbiol Immunol* 2004; 48(12): 985-994

15) Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Suga M, Sasaki YF, Ohta T, Yasuhara M, Suzuki K, Yamamoto K. Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on their Surface Modification.

*Nano Letters* 2004; 4(10): 2163-2169

15) Shiohara A, Hoshino A, Hanaki K, Suzuki K, Yamamoto K. On the cyto-toxicity caused by quantum dots. *Microbiol Immunol* 2004; 48(9): 669-675.

16) Hanaki K, Ohka S, Yamamoto K, Nomoto A, Yoshikura H. Oligo(dA-dT)-dependent signal amplification for the detection of proteins in cells. *Biotechniques* (2004) 36:856-860, 862-863.

17) Hoshino A, Hanaki K, Suzuki K, Yamamoto K. Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body. *Biochem Biophys Res Commun.* (2004) 314:46-53.

18) Aringazin AK, Dahnovsky Y, Krevchik VD, Semenov MB, Ovchinnikov AA, Yamamoto K. Two- dimension tunnel correlations with dissipation *Phys Rev B* (2003) 68,155426-38.

19) Komoto A, Hanaki K, Maesono S, Wakano JY, Yamaguchi Y, Yamamoto K. Growth dynamics of *Bacillus circulans* colony *J Theor Biol.* (2003) 225:91-97.

20) Kitagawa J, Futamura Y, Yamamoto K. Analysis of the conformational energy landscape of human snRNA with a metric based on tree representation of RNA structures *Nucleic Acids Res.* (2003) 31:2006-13.

21) Hanaki K, Momo A, Oku T, Komoto A, Maenosono S, Yamaguchi Y, Yamamoto K. Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker. *Biochem Biophys Res Commun.* (2003) 302:496-501.

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

(1) 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2006-17360 (平成18年1月23日) 山本悟、山本健二、星野昭芳、真鍋法義

(2) 蛋白質の検出法

特願2003-200778、山本健二、花木健一、桃あさみ

(3) 発光素子

特願2002-181764、山本健二、花木賢一、山口由紀夫

(4) 分子認識蛍光体とそれを用いた標識物質の測定方法

特願2002-198726 山本健二、花木賢一

## 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

分担研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長  
協力研究者 佐伯久美子 国立国際医療センター研究所室長  
協力研究者 小柳 真 国立国際医療センター研究所研究生

### 研究要旨

まず、我々は遺伝子や蛋白などの分子導入が困難なヒト血液細胞株を用いて、遺伝子（オリゴヌクレオチド、プラスミド）の導入効率改善を試みた。蛍光指標としては、FITC と量子ドットを用いた。又、一部の実験においてはマウス細胞株での検討も行った。その結果 HVJ エンベロープベクターが遺伝子と蛋白の導入において有効であった。次に、ヒト白血球の表面抗原に対するモノクローナル抗体を量子ドットで蛍光ラベルしてフローサイトメトリーが可能かどうか、従来の蛍光色素に比べて優れているかなどに関して検討した。ヒト末梢血単核球を用いて検討を行った結果、量子ドット標識 2 次抗体は PerCP ラベル 2 次抗体と同等以上の性能を有しており、蛍光標識物質としての高い有用性が示された。最後に、ナノメディスン分野において重要な受容体ナノテクノロジー研究を行った。マクロファージ特異的表面抗原 F4/80（細胞外領域が EGF 繰り返し配列を有する 7 回膜貫通型受容体）のヒトでの相当分子である EMR1 の遺伝子単離、抗原蛋白合成、モノクローナル抗体作成を行い、この分子のヒトでの機能や細胞分布を明らかにした。その結果、厳密なマクロファージ特異的発現を示すマウス F4/80 とは大きく異なり、ヒト EMR1 は幅広く種々の細胞に発現し、その機能も、マウスの場合よりはるかに多彩である事が示唆された。

### A. 研究目的

ヒト血液細胞への分子導入は極めて困難であることは良く知られている。この状況は、正常血球であっても白血病細胞であってもほぼ同様であり、また、導入分子がプラスミドであっても、低分子オリゴであっても、同様である。このような状況は、様々の疾患に対する新しい分子標的療法を行う際の、効果的な薬物送達システム（Drug Delivery System, DDS）の開発の大きな妨げとなっている。このような状況を打破するためにヒト血液細胞への効率の良い遺伝子導入法の開発を試みた。また、血液細胞以外の系として、ES 細胞の分化の系を検討した。

量子ドットは、その強力かつ持続的な蛍光を発することで、様々の蛍光ラベルが必要な場面において有用と考えられている。次に我々は、ヒト白血球の表面抗原に対するモノクローナル抗体を量子ドットで蛍光ラベルしてフローサイトメトリーが可能かどうか、従来の蛍光色素に比べて優れているか否か検討した。

受容体ナノテクノロジーは、ナノメディスン分野における重要な研究分野である。マウスのマクロファージマーカーとして広く用いられている膜蛋白 F4/80 は、細胞外領域に EGF 繰り返し配列を有する特異な 7 回膜貫通型受容体で、感染防御において NK 細胞と相互作用を有することが知られている。ヒトでの相当分子は EMR1 と呼ばれているが、その分布や役割は不明で、モノクローナル抗体もなく、研究対象として極めて重要である。我々は、この分子を単離してモノクローナル抗体を作成した。

### B. 研究方法

遺伝子導入実験に際しては、細胞は主にヒト白血病細胞株（U937, HL-60）とマウス血液細胞株（P388D1, J744.1）を検討対象とした。プラスミドの導入効率を検討するために、GFP 蛋白をコードする発現プラスミドを用いた。FITC 以外の蛍光マーカーとして、量子ドットを用いた。量子ドットは、カドミウムセレンを骨格としたものを用いた。試みた遺伝子導入促進法は、HVJ エンベロープベクターであった。

ストレプトアヴィジン付加量子ドット、ビオチン付加抗マウス IgG 抗体、所定のマウスモノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーを行った。モノクローナル抗体は抗ヒト CD4 抗体を用い、フローサイトメトリーを行った。他の蛍光物質としては、PerCP を用いて、上記と同様に抗体をラベルして、量子ドットと比較した。フローサイトメトリーの対象としては、ヒト末梢血単核球を用いた。

ヒト細胞は、末梢血血球、臍帯静脈内皮細胞 HUVEC、正常線維芽細胞 HDFa、CD34 陽性造血幹細胞、様々の白血病細胞株などを用いた。EMR1cDNA はヒト白血病細胞株より RT-PCR にて取得した。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。免疫は 6 週齢雌性の Balb/c マウスに GERBU アジュバントと共に施行した。モノクローナル抗体の作成は、マウスミエローマ細胞との細胞融合、スクリーニング、選択し限界希釈法でのクローニング、など、標準的な手法により行った。

### C. 研究結果

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)、骨髓腫細胞株 (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。

### D. 考察

HVJ エンベロープベクターを用いた手法によって、ヒトおよびマウス血液細胞株への良好な分子導入が可能であった。これらの手法はいずれも、エンドゾーム形成によって遺伝子の細胞質への移行が阻まれるという欠点無く、他の手法に比べても極めて有用と考えられた。また、量子ドットは蛍光の減衰が少なく、極めて優れた蛍光マーカーであった。

また、量子ドットラベル抗体によるフローサイトメトリーが問題なく行えること、しかも、従来の優れた蛍光物質よりも更に蛍光強度が強いことが証明された。今後は、様々の蛍光を指標とする測定系において量子ドットの有用性が

確認されて、その用途が広がってゆくものと期待される。

我々が作成した抗 EMR1 モノクローナル抗体を用いてヒト EMR1 のヒト各種細胞における発現分布を検討したところ、予想に反して正常血液細胞、白血病細胞株、骨髓腫細胞株、血管内皮細胞、線維芽細胞等に幅広く発現していることが判明した。マウスでの状況とは大きく異なり、今後はリガンドを同定して、リガンド刺激による受容体発現細胞の生物学的な変化を詳細に検討する必要がある。

### E. 結論

HVJ エンベロープベクターを用いた手法により、遺伝子や蛋白を血液細胞株へ効率よく導入することに成功した。その際の導入の確認の蛍光標識に量子ドットが有用であった。また、量子ドットラベル 2 次抗体と抗ヒト CD4 モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーを、ヒト末梢血単核球分画を用いて行い、PerCP ラベル 2 次抗体と同等以上の測定結果を得ることに成功した。最後に、細胞外構造が特異な 7 回膜貫通型受容体であるヒト EMR1 に対するモノクローナル抗体を作成して検討し、この受容体がヒトにおいてはマクロファージ特異的発現を示さず、幅広い細胞に検出される事を明らかにした。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

1. Saeki K, Yasugi E, Okuma E, Breit SN, Nakamura M, Toda T, Kaburagi Y, Yuo A: Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E419-E428,2005.
2. Yasugi E, Horiuchi A, Uemura I, Okuma E, Nakatsu M, Saeki K, Kamisaka Y, Kagechika H, Yasuda K, Yuo A: Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenesis in the human leukemia NB4 cells. *Dev Growth Differ* 48:177-188,2006.

### H. 知的財産権の出願・登録状況

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

発明者: 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

出願人: 国立国際医療センター、田辺製薬株式会社

特願 2006-303929

## 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・研究部長  
協力研究者 星野 昭芳 国立国際医療センター研究所・流動研究員  
協力研究者 河村 由紀 国立国際医療センター研究所・協力研究員  
協力研究者 川島 麗 国立国際医療センター研究所・流動研究員  
協力研究者 水谷紀子 国立国際医療センター研究所・流動研究員

### 研究要旨

本研究の目的は、半導体ナノ粒子(QD)を用いて、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し、診断・治療のターゲットを探索することである。我々は腹腔由来マクロファージが炎症後及び外科侵襲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、腹腔マクロファージ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。これに基づき、大腸炎に伴う腹膜癒着マウスモデル、外科ストレスによる腹膜癒着のマウスモデルを用いて、CCL1 作用の阻害及び CCR8 分子欠損マウスでの解析を行ったところ、CCL1/CCR8 相互作用が腹膜癒着のトリガーとして中心的役割を果たしていること、CCL1/CCR8 相互作用の阻害により、腹膜癒着を防止できることが明らかになった。

#### A. 研究目的

生体防御の第一線である消化管粘膜局所においては、物理的および機能的バリアーの形成とともに、病原体と常在菌の認識、抗原に対する免疫応答と免疫寛容の緻密な調節がごくあたりまえに行われている。しかしその調節機構はいわゆる全身免疫とは作用する細胞もその作用機構も異なっていることが解明されつつある。消化管疾患における腹腔内の免疫応答の研究はほとんど行われていないが、消化管の漿膜病変は、全層性潰瘍や外科的侵襲による癒着等、QOL には大きな影響をもたらす。本研究では腸管免疫の特徴に加えて消化管炎症時の腹腔内の免疫応答を解明し、局所の漿膜側の免疫応答を明らかにすることを目的として、消化管と腹腔内との細胞交通を解析した。ラベルに用いる半導体ナノ粒子(QD)は蛍光が明るく、褪色が少ないという特色があり、これを利用して腹腔内及び骨髄マクロファージをラベルし腸を含む腹腔内臓器との交通を解析する。昨年度までに、炎症後及び外科手術後の臓器癒着部位の漿膜側細胞塊

を形成するのは腹腔由来マクロファージであり、この部位には特異なケモカイン受容体 CCR8 を発現していることを見いだした。さらに CCL1 の添加のみで、中皮細胞とマクロファージの細胞凝集を *in vitro* で再現することに成功した。このため本年度は、*in vivo* モデルでの腹膜癒着阻害を試みた。

#### B. 研究方法

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  
C57BL/6マウスより腹腔細胞を採取し、培養プレートに付着する細胞を腹腔内マクロファージとして用いた。また、骨髄細胞から M-CSF により誘導したマクロファージを用いた。QD655 を取り込ませて細胞をラベルし、1x10<sup>6</sup> 個を腹腔内または経静脈投与した。同時に 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 100µg/g weight として注腸投与し、急性大腸炎を誘導した。24 時間後、腹腔内細胞を回収するとともに組織の凍結切片状でラベルした細胞を検出した。QD ラベル

後 24 時間では生細胞率に変化はなく、LPS などの炎症刺激に対するサイトカイン応答などもラベルを行わない細胞と同等であることを *in vitro* で確認した。

#### 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

TNBS 腸炎誘導後 24 時間では、穿孔性潰瘍が頻発し、その潰瘍底及び病変部炎症部漿膜には細胞塊が形成される。またこの部分を中心として、しばしば周辺臓器との漿膜性癒着も認められる。連続切片の免疫染色によりこの部分の細胞塊が CD11b 陽性細胞の集積であることを確認し、その部分からマイクロダイセクションにより mRNA を抽出して、種々のケモカイン受容体の発現を定量 RT-PCR により解析した。

#### 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

腹腔マクロファージまたは、骨髄細胞から M-CSF により誘導したマクロファージを用い、リポポリサッカライド (LPS)、ペプチドグリカン (PGN)、CpG スクレオチド (CpG), TNF- $\alpha$ , IL-1b, 及び CCR8 のリガンドである CCL1 で刺激した後 2 時間・4 時間後の CCR8 及び CCL1 の mRNA 発現を定量 RT-PCR により測定した。また、細胞表面での CCR8 発現を蛍光顕微鏡で観察した。

#### ④ 腹膜癒着 *in vitro* モデルの作成

マウス大網をコラゲナーゼ消化して培養し、中皮細胞を分離した。これを単層培養し、その上に QD ラベルした腹腔マクロファージを加え、共培養を行った。CCL1 をはじめとする種々の刺激物質を加えて、2-12 時間後、蛍光顕微鏡で細胞凝集を観察した。凝集は画像解析により定量化した。

#### ⑤ ケモカイン及び炎症刺激による中皮細胞の CCL1 発現

培養中皮細胞に種々の炎症刺激を加え、CCL1, CCR8 の mRNA 発現を定量した。

#### ⑥ 大腸炎に伴う腹膜癒着マウスモデルの作成

マウスに、TNBS 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。0, no adhesion; 1, one thin filmy adhesion; 2, more than one thin adhesions; 3, thin adhesion with focal point; 4, thick adhesion with plantar attachment or more than one thick adhesion with focal point; 5, very thick vascularized adhesions of more than one plantar adhesion. 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、大腸への集積を経ロ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。

#### ⑦ 外科ストレスによる術後癒着マウスモデルの作成

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 への臓器癒着を観察し、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。

### C. 研究結果

#### 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<sup>hi</sup> の細胞が減少し、CD11b<sup>lo</sup> Gr-1<sup>+</sup> 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- $\alpha$ , 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  $\mu\text{m}$  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。

#### D. 考察

##### 1. 達成度について

炎症時の腹腔内細胞交通の解析により、CCL1/CCR8 の意義について *in vitro*, *in vivo* レベルでの実験でも証明することができた。

##### 2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究成果は、外科手術後や、炎症による侵襲に伴って起こる腹膜癒着の新しいメカニズムを明らかにしたものである。特に *in vivo* でも CCL1/CCR8 が重要な働きをしていることが明らかになった。潰瘍の穿孔面を漿膜側から塞ぐ機構としてのマクロファージ凝集は、自然免疫応答の発見という意味でも学術的意義が高い。更に、この成果をもとに CCR8 をターゲットとした腹膜癒着の予防が可能である。腹膜癒着防止剤のマーケットは非常に大きく、医療サービス面からのニーズも高い。また、腹膜癒着の防止により再手術が減少し、術後の症状が緩和されれば、医療経済的な貢献も期待される。

##### 3) 今後の展望について

ヒトで術中の洗浄液の細胞成分、可溶性成分を用いて検証を行うとともに、CCL1/CCR8 阻害剤のスクリーニングを行い、腹膜癒着の防止法を開発する。

#### E. 結論

QD を用いた *in vivo*, *in vitro* 細胞トラフィックの研究から癒着性腹膜炎のメカニズムを明らかにし、治療法開発につながる成果を得た。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 1) (欧文)

1. A Hoshino, Y-I Kawamura, M Yasuhara, N Toyama-Sorimachi, K Yamamoto, A Matsukawa, S A. Lira, T Dohi. Inhibition of CCL1-CCR8 interaction prevents aggregation of macrophages and development of peritoneal adhesions. *J. Immunol.* 2007 In press.

2. Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Nakagama H, Dohi T. Predominant T

- Helper Type 2-Inflammatory Responses Promote Murine Colon Cancers. *Int J Cancer*, 118:2232-2236, 2006
3. Kanai T, Kawamura T, Dohi T, Makita S, Nemoto Y, Totsuka T, Watanabe M. TH1/TH2-Mediated Colitis Induced by Adoptive Transfer of CD4+CD45RBhigh T Lymphocytes Into Nude Mice. *Inflamm Bowel Dis*, 12: 89, 2006.
  4. Dohi T, Ejima C, Kato R, Kawamura YI, Kawashima R, Mizutani N, Tabuchi Y, Kojima I. Therapeutic potential of follistatin for colonic inflammation in mice. *Gastroenterology*, 128: 411, 2005.
  5. Dohi T, Ejima C, Kato R, Kawamura YI, Kawashima R, Mizutani N, Tabuchi Y, Kojima I. Therapeutic potential of follistatin for colonic inflammation in mice. *Gastroenterology* in press, in press:
  6. Toyama-Sorimachi N, Omatsu Y, Onoda A, Iyoda T, Kikuchi-Maki A, Sorimachi H, Dohi T, Inaba K, Karasuyama H: Inhibitory NK receptor Ly49Q is expressed on subsets of dendritic cells in a cellular maturation- and cytokine stimulation-dependent manner. *J Immunol* in press,
  7. Shirasawa S, Sugiyama S, Baba I, Inokuchi J, Sekine S, Ogino K, Kawamura YI, Dohi T, Fujimoto M, Sasazuki T: Epiregulin-deficiency results in dermatitis and critical role of epiregulin in immune-related responses of keratinocyte and macrophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101:13921-13926
  8. Shirai Y, Hashimoto M, Kato R, Kawamura YI, Kirikae T, Yano H, Takashima J, Kirihara Y, Saito Y, Fujino MA, Dohi T: Lipopolysaccharide induces CD25-positive, IL-10-producing lymphocytes without secretion of proinflammatory cytokines in the human colon: Low MD-2 mRNA expression in the colonic macrophages. *J Clin Immunol* 2004, 24:42-52
  9. Kawamura T, Kanai T, Dohi T, Uraushihara K, Totsuka T, Iiyama R, Taneda C, Yamazaki M, Okamoto R, Nakamura T, Higuchi T, Aiba Y, Tsubata T, Watanabe M: Expansion of ectopic CD40 ligand-expressing B cells and development of chronic colitis in mice. *J Immunol* 2004, 172:6388-6397
  10. Dohi T, Fujihashi K, Koga T, Etani Y, Yoshino N, Kawamura YI, McGhee JR: CD4+CD45RBHi interleukin-4 defective T cells elicit antral gastritis and duodenitis. *Am J Pathol* 2004, 165:1257-1268
- 総説
- 1) 欧文
    1. Dohi T, Fujihashi K: Type 1 and 2 T helper cell-mediated colitis. *Corrent Opinion in Gastroenterology* 22: 651-657, 2006
  - 2) 和文
    1. 土肥多恵子: 粘膜再生誘導による IBD 治療の可能性. *分子消化器病* 3: 32-37, 2006
    2. 土肥多恵子: 消化管における粘膜免疫システム-最近の話題. *炎症と免疫* 14: 451-457, 2006
- 学会発表  
(国内学会)
1. 土肥多恵子: Aggregation of peritoneal macrophages via a chemokine triggers innate immunity and adhesion in the peritoneal cavity, 第 92 回日本消化器病学会総会シンポジウム 7「消化器と自然免疫」, 小倉, 2006, 4 月 22 日
  2. Hoshino A, Kawamura YI, Yasuhara M, Noriko T-S, Dohi T. Aggregation of peritoneal macrophages via CCL1/CCR8 triggeres inflammatory and postoperative adhesion, The 18th Naito Conference, Kanagawa, 2005 Oct. 27.
  3. 土肥多恵子. 消化管疾患の病理と粘膜免疫異常, 日本食品免疫学会, 東京, 2005 年 11 月 10 日.
  4. Hoshino A, Kawamura Y, , T Dohi. Aggregation of peritoneal macrophages via CCL1/CCR8 triggers inflammatory and postoperative adhesion, 第 35 回日本免疫学会学術集会, 横浜, 2005 Dec 14.
  - 3 Hoshino A, Toyama-Sorimachi N, Dohi T: Specific recruitment of peritoneal macrophages into perforating ulcers in murine trinitrobenzen sulfonic acid (TNBS)-induced colitis. Presented at the 第34回日本免疫学会総会、, 札幌, 2004年12月1日、
  - 4 土肥多恵子: Neutralization of activins by follistatin ameliorates colonic inflammation in murine colitis. Presented at the 第90回日本消化器病学会総会, 仙台, 2004年 4月23日

5 川島 麗, 河村由紀, 水谷紀子, 反町典子, 土肥多恵子: マウス放射線照射後の小腸粘膜固有層細胞の変化. Presented at the 第34回日本免疫学会総会, 札幌, 2004年12月1日

1.

11. (国際学会)

1. Dohi T, Hoshino A, Kawamura YI, Yamamoto K. Intestinal immunity in surgical and inflammatory stress, The 3rd Stage Surface Barrier Immunology Study Group (SBARIS) 2nd Meeting, Nago, Okinawa, 2005 Nov 5.
2. Dohi T, Hoshino A, Kawamura YI, Kawashima R, Yamamoto K: Chemokine-induced aggregation of peritoneal macrophages triggers peritoneal adhesion, Digestive Disease Week 2006, Los Angeles, 2006, May 21
3. Shirai Y, Kawamura YI, Hashimoto M, Kirikae T, Saito Y, Kawamura YJ, Konishi F, Dohi T: Characteristically Low MD-2 mRNA Expression in Human Colonic Macrophages and its Alteration in Ulcerative Colitis. Presented at the International Conference of Immunology, Motreal, 2004, July

(知的所有権の出願・取得状況)

1) 特許

出願中 1件

「CCR8阻害剤を用いる癒着の診断、予防および治療剤」2005年9月12日特願2004-345267、2005-264160、2005年11月30日 PCT/JP2005/21980

2) その他なし

## マラリアワクチンDDSに向けての基礎研究

分担研究者 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  
協力研究者 奥 浩之 群馬大学工学部材料工学科・助教授  
協力研究者 矢野和彦 国立国際医療センター研究所適正技術開発移転研究部・流動研究員

### 研究要旨

熱帯熱マラリア原虫の解糖系の酵素であるエノラーゼを標的とした薬剤・ワクチンの開発研究ならびに、同酵素をターゲットとした選択的なDDSの開発を、同分子の機能と構造をナノスケールで詳細に検討することで行った。そのために、1) 組換えタンパクおよび人口ペプチドの立体構造を、ホモロジー解析によるコンピューターグラフィックス、CD スペクトルによる解析、NMR による構造解析を行った。2) 熱帯熱マラリア患者血清のこれらのエノラーゼ分子に対する反応性を調べたところ、この酵素の機能上・構造上重要な部位に対する抗体を持つ患者は少なかった。一方、このような重要部位に対して高い反応性を示す血清を持つ患者の病状は極めて軽度であることが認められた。3) GL16 の一部のペプチドシーケンスを用いた MAPs (Multiple antigenic peptides) の作製を行い、その構造の解析を行った。CD スペクトル法により、Lys 枝を持つ tetra-epitope MAPs が、 $\alpha$  ヘリックス構造を示して抗原部位を強く提示することが判明した。4) GL16 の一部のペプチドシーケンスを合成して、炭素鎖にぶら下げて放射線重合を行ったところ、ナノスフェアを作成することが出来た。5) AD22 を材料として、ポリ乳酸グリコール酸共重合体と乳化させることでナノ粒子を生成することに成功した。6) 原虫解糖系の酵素であるエノラーゼに対する特異抗体による増殖阻害の機構を形態的、経時的に解析するために、新たな蛍光プローブである量子ドット（半導体ナノ粒子）の導入を試みた。上記材料がマラリアワクチン DDS の概念の中で、徐放性人工抗原として有用であることが示唆された。

### A. 研究目的

本研究は熱帯熱マラリア原虫の解糖系の酵素であるエノラーゼを標的とした薬剤およびワクチンの開発研究を最終の目的とするが、同酵素をターゲットとした選択的な DDS の開発を、その候補分子の機能と構造をナノスケールで詳細に検討する。本研究の成果が、マラリアの病態解明・その疫学的意味論の展開へ連続するプロダクトを提供すると考えられる。近年世界に猖獗するマラリアを克服するための具体的なツールとなることが期待される。

### B. 研究方法

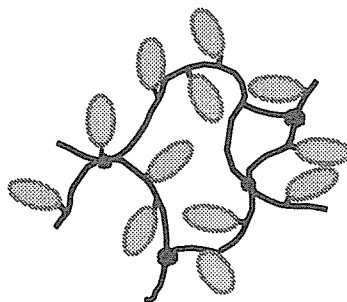
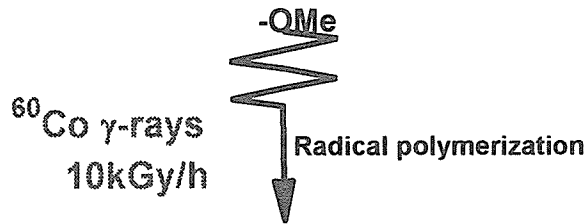
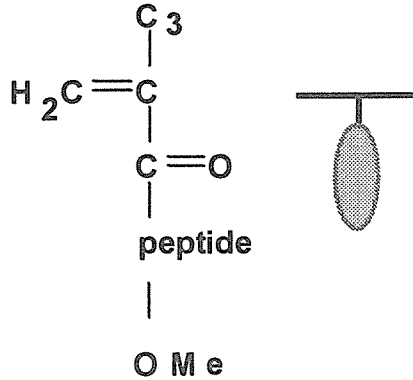
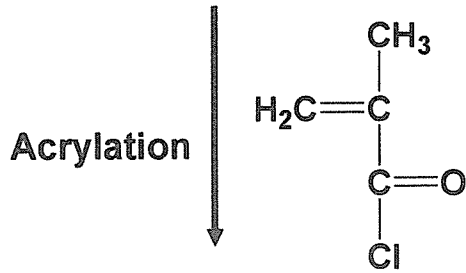
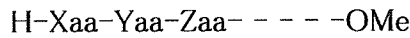
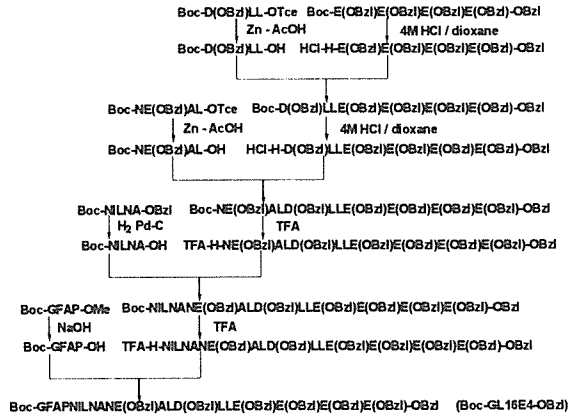
1. 大腸菌への遺伝子導入の手法により、熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの組換えタンパク (rPfEno) を作成した。また、熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの特定部分の人工合成ペプチド (AD22, GL16, AA13 及び GG14) を作製した。これらの組換えタンパクおよび人口ペプチドの立体構造を、ホモロジー解析によるコンピューターグラフィックスおよび

CD スペクトルによる解析で行った。さらには一部のペプチドは NMR による構造解析も行った。

2. 上記の組換えタンパクおよび人口ペプチドと、熱帯熱マラリア原虫全タンパクの粗抽出タンパクをそれぞれ抗原として、熱帯熱マラリア患者の血清抗体の反応性を ELISA 法測定した。

3. GL16 の一部のペプチドシーケンスを用いた MAPs (Multiple antigenic peptides) の作製を行い、その構造の解析を行った。タンパクの合成は、fragment condensation および stepwise coupling を用いた solution-phase 法で行った。MAPs 合成の過程は convergent procedure により、Lys-または Glu-を枝の core とする構造を取らせた。タンパクの合成は、fragment condensation および stepwise coupling を用いた solution-phase 法で行った。合成スキームは以下の通りである。

4. 上記で合成した GL16 を炭素鎖にぶら下げて放射線重合を行うと、マイクロスフェアを作成することが出来る。



● cross-linking point

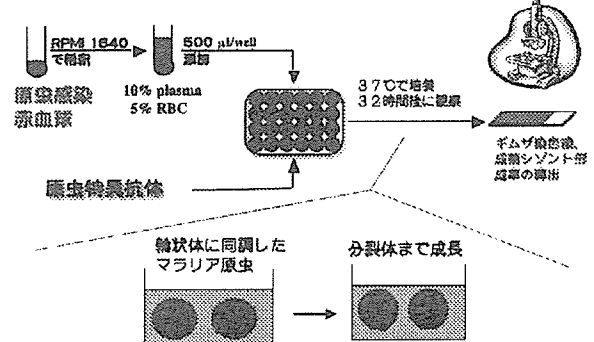
5. 蛋白抗原を徐々に放出できる材料(すなわち徐放性人工抗原)の作製にあたっては、試薬や溶液の混合比は「リュープリン」の製造方法を参考にした。即ち、微粒子の基材はポリ乳酸グリコール酸共重合体(PLGAと略称)のうち、乳酸とグリコール酸の組成比が75:25の基材を選択した。但し分子量はリュープリンの製造方法の1万より大きいものを採用した。これはリュープリンが1ヶ月ほどで消失してしまうため、より高分子量で分解速度の遅い基材とした。また人工抗原ペプチドはゼラチン水溶液として用いた。これは「リュープリン」に於いては薬物を保護するためと説明されているが、球状微粒子の安定化にも必要であった。

PLGA のジクロロメタン溶液(揮発性の高い有機溶媒)とマラリア原虫エノラーゼ部分人工抗原(AD22-MAP)のゼラチン水溶液を室温で混合し、超音波処理を行い、溶液が乳化することを確認した。この懸濁液に対し、PVA 水溶液を少しずつ加え再び超音波処理を行い、溶液が乳化することを確認した。

こうして得られたW/O/Wエマルジョンを24時間攪拌し、ナスフラスコから有機溶媒を揮発させ、微粒子を得た。粒径の大きな微粒子や不定形の固まりは沈殿し易く、粒径の小さな微粒子は分散しやすかった。沈降速度の差で生成物は3つに分画した。

6. リング期に同調させた熱帯熱マラリア原虫の培養上清に、原虫解糖系の酵素であるエノラーゼに対する特異抗体を加えて(6.3 μg/100 μl)培養を行い、培養開始後32時間後の成熟シズント形成率を顕微鏡下に観察・計算した。

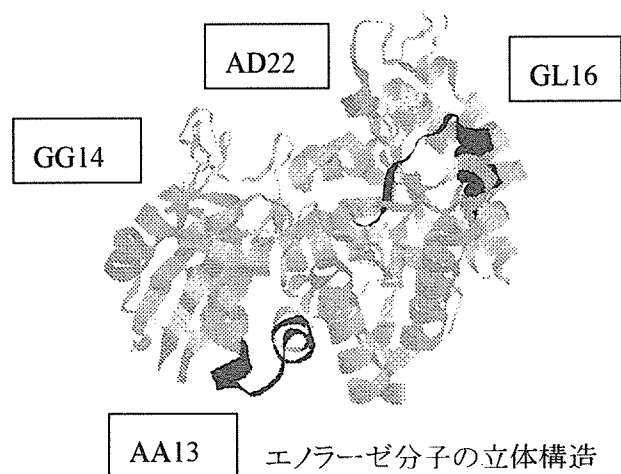
図1: マラリア原虫に対する増殖阻害



また、培養開始後経時的に赤血球を回収し、3%パラホルムアルデヒド、0.1%グルタルアルデヒドで固定後、量子ドット標識二次抗体(ヤギ、抗ラビットIgG 抗体標識 Q-dot™, Invitrogen)、Alexa568 標識二次抗体(Invitrogen)を用いて抗エノラーゼ抗体の検出を行った。対照として同量の熱帯熱マラリア原虫抗酸化酵素ペルオキシレドキシニンに対する特異抗体、並びにPBSを加えた。観察は共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて行った。(倫理面への配慮)

本研究においては、一部タイ王国マヒドン大学熱帯医学部のマラリア患者血清を用いたが、検体の採取にあたっては、同大学の倫理規定に従って行った。また、今後動物実験を予定しているが、同実験は国立国際医療センターにおいて行われる「動物実験に関する基本方針」及び同センター「動物実験施設管理運営規定」に則って行った。

### C. 研究結果



1. 上図の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 (GenBankAB026051)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)を選択した。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

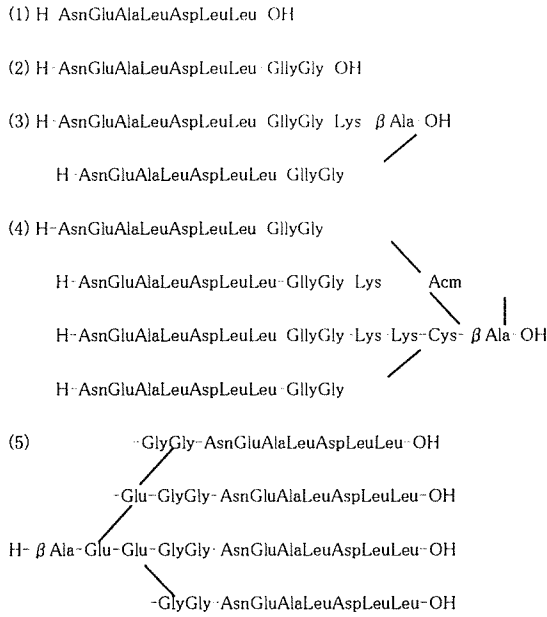
あるが、熱帯熱マラリア原虫が進化の過程で藻類の二次共生を受けた際に藻類との遺伝子交換が行われたものと考えられる。

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を行い、下図のような構造を描くことが出来た。

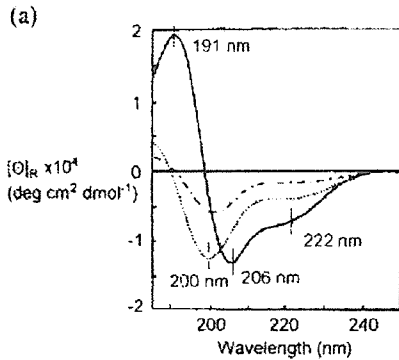


2. タイ人熱帯熱マラリア患者30名の血清を使用し、原虫粗抗原に対する反応性を調べたところ、それらの反応性は極めて高かった。しかしながらrPfEno、AD22に対して高い反応性を示す血清は非常に少ないことが明らかとなった。一方、AD22と部位は異なるが同じ熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの一部であるGG14に対しては、すべての患者血清と、それどころか対照群である健常人血清とも高い反応性を示した。rPfEno、AD22に対して高い反応性を示したいくつかの血清の患者の末梢血中の原虫血症を調べてみると、寄生率は極めて低いことも明らかとなった。

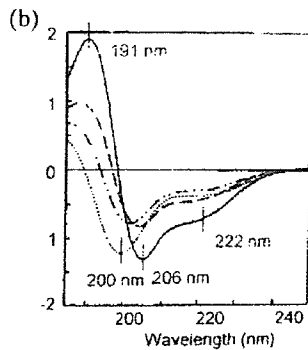
作製することができたペプチドのシマティック構造は以下の5種で、(1)H-NL7-OH、(2)H-NL7-GG-OH、(3)-GlyGly-リンカー構造をもつ di-epitope、(4)Lys 枝を持つ tetra-epitope MAPs、(5)Glu 枝を持つ tetra-epitope MAPs である。



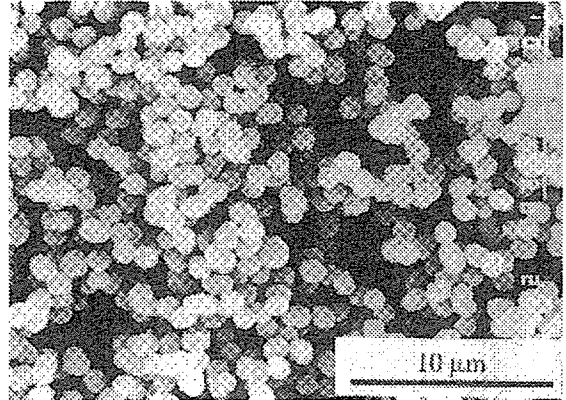
上記(1)で作製した H-NL7-OH に関して、まず CD spectroscopy を行ったところ、 $\alpha$ -helix 構造を短いシークエンスでありながら巻いていることが判明した。(2)の-Gly-Gly- linker がついている方がより $\alpha$ -helix 構造が著明であった(下記 Figure (b) に示す点線および---線)。



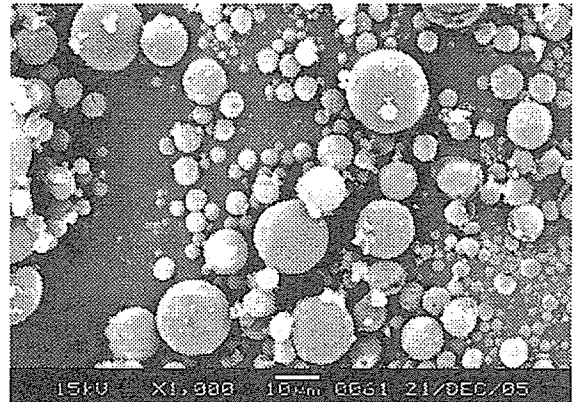
(4)および(5)の MAPs に関しては、Glu-core は安定した構造を保たないことが了解され、一方 Lys-core は Figure(a)および(b)の実線部分で示されるように、安定な $\alpha$ -helix 構造をとっていることが判明した。



4. 放射線重合した抗原粒子は、下図のように1  $\mu$  m 以下の均一な素材として得ることができた。



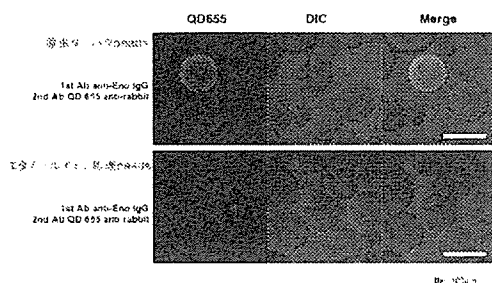
5. 生成した微粒子の電子顕微鏡写真を下図に示した。最も小さな微粒子で数百nm、大きな微粒子で20  $\mu$  m程度になった。基材そのものが低融点のため(100℃以下)、電子線走査では観察中に膨らんだり、割れたりした。



徐放性人工抗原ナノ・マイクロ微粒子

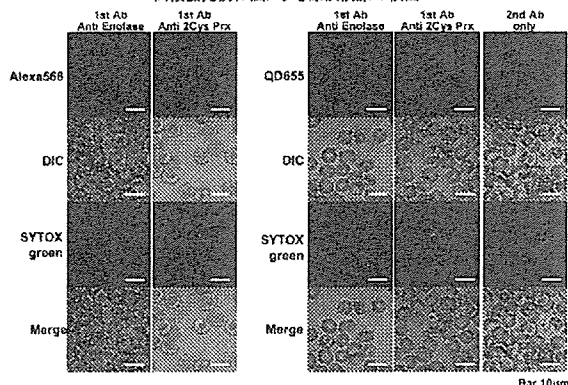
6. 加えた抗エノラーゼ抗体の感染赤血球での局在を、量子ドット標識二次抗体、Alexa568 標識二次抗体で検出を試みたが、赤血球表面、原虫内部のいずれも特異蛍光は検出されなかった。対照として原虫タンパクをカップリングさせたビーズに対する抗エノラーゼ抗体、量子ドット標識二次抗体を用いた間接蛍光抗体法では、ビーズの表面が蛍光表示された。

図2 原虫タンパクをカップリングさせたビーズとの反応(間接法)



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。

図3 感染赤血球固定後トライトン処理した材料を用いた間接蛍光抗体法による原虫抗原の検出



#### D. 考察

熱帯熱マラリア原虫の解糖系酵素エノラーゼは、原虫の生存にとって必要不可欠な酵素であるが、熱帯熱マラリア患者はマラリアの自然感染によってこの分子に一定の抗体を産生することとなる。しかしながら本研究でエノラーゼの部分ペプチドを作製し、それぞれの抗原ポリペプチドに対する患者血清の反応性を詳細に検討すると、患者はエノラーゼ分子の機能や構造上重要な部位に対して十分な抗体量を産生しない場合があることが認められた。一方、構造上あまり重要とは考えられない様な部位に対して、非常に大量の抗体が産生されることもあることが分かった。このように、原虫にとってアキレス腱ともなる部位に対して宿主が抗体を作りにくいような原虫側の仕掛けや、抗体が産生されても酵素活性に影響がない部分には大

量に宿主に抗体を作らせるような抗原を配置するなど、いわゆる免疫学的スモークスクリーンと呼ばれる戦略を原虫が獲得している可能性もある。

一方、作製した Lys 枝を持つ tetra-epitope MAPs は安定な  $\alpha$ -helix 構造をとることより、その抗原性を増すことが予想される。この MAPs を抗原にした ELISA を行い、タイのマラリア患者の血清との反応性を見たところ、他の抗原に比べて強い抗原性を示した。今後本手法を応用して、薬剤のターゲットとなるところの分子や、さらにはワクチン候補分子の MAPs を作製することで、それぞれの患者血清との反応性をナノレベルで詳細に検討してゆく必要がある。

また、放射線重合によって作製することができたナノスフェアを抗原にした ELISA を行うと、タイのマラリア患者の血清と強い抗原性を示したという結果は、同スフェアの検査用抗原としての材料という有用性と、免疫原性を持った素材としてのポテンシャルをも示唆した。今後本素材を応用して、薬剤のターゲットとなるところの分子や、さらにはワクチン候補抗原分子としての可能性を、ナノレベルで詳細に検討してゆく必要がある。

生成した徐放性抗原には、微粒子の大きさに不均一性が認められているが、マラリア原虫人工部分抗原を内包したナノオーダーの微粒子を徐放性ワクチン抗原に用いるための新規材料開発に成功したといつてよい。本オーダーの微粒子で免疫した場合、抗原としてだけでなく、一定のアジュバント効果が期待され、その効果はアラムと同程度との報告もある。今後は本材料を用いて実験動物に様々な方法で免疫するなど、その抗原性の強さ、抗原リリース持続期間等を解析し、徐放性抗原としての有用性を解析してゆく。

一般に、マラリア原虫タンパクに対する抗体は、赤血球や原虫の表面タンパクに対する抗体のみでなく、細胞質中に局在すると考えられるタンパクに対する抗体によっても原虫の増殖を阻害することが認められている。しかしながら、それらの抗体が反応する局在やその機能が不明であることが多く、適切な検出系によって原虫増殖阻害の機序が明らかにされることが望まれている。量子ドットの応用は、このマラリアワクチン DDS の開発に向けて有望なツールであると考えられるが、本研究では、おそらく原虫内の Heme の存在による量子ドットの励起波長の吸収等により QD の発光できない可能性も考えられた。今後量子ドットの種類、検出方法等、さらなる条件検討が必要と考えられ



る。

#### E. 結論

エノラーゼを候補分子とした薬剤開発を行う上では、薬剤ターゲットとなる酵素の機能上・立体構造上の重要性をナノレベルで把握する必要がある。本研究では、重要エピトープのMAPsを利用して、その分子に選択的に反応する抗体の解析を行い、また同分子の部分ペプチドを放射線重合して、ナノスフェアを作成することに成功した。これを利用して徐放性ワクチン材料としての有用性を立証してゆく基盤が出来上がった。一方、半導体ナノ粒子によって、抗マalaria原虫抗原タンパク抗体の局在を明らかにし、液性免疫を中心としたマalariaワクチン開発における DDS の基盤的研究成果を得る試みを行ったが、抗体の機能に直結する結果は得ることができなかった。しかしながら、今後量子ドットの種類、検出方法等、さらなる条件検討を整えることで、未だに世界で開発の成功を見えないマalariaワクチンの創出に、大いに貢献できると考えられる。

#### F. 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) Kokubo M, Oku H, Yamada K, Sato K, Kano S, Suzuki M and Katakai R: Synthesis of multiple-antigenic peptides having partial sequence of enolase, *In* Peptide Chemistry 2001, H. Aoyagi, ed., Protein Research Foundation, Osaka, 331-334, 2002
- 2) Noi M, Ishiguro T, Oku H, Yamada K, Sato K, Kano S, Suzuki M, Katakai R: Solution-phase synthesis and structural analysis of multiple antigenic peptides having partial sequences of *Plasmodium falciparum* enolase, *In* Peptide Science 2002, Yamada T ed., The Japanese Peptide Society, Osaka, 309-312, 2003
- 3) Omi K, Kuriyama K, Yamada K, Oku H, Kano S, Sato K, Suzuki H, Katakai R: Synthetic study of an antigenic peptide having a partial sequence from *Plasmodium falciparum* enolase. *In*: Peptide Science 2004, Y Shimohigashi, Ed.; The Japanese Peptide Society, Osaka, 637-640, 2005

##### 2. 著書 無し

##### 3. 学会発表

- 1) 奥浩之、野中敬祐、小久保美穂、石黒正、佐藤久美子、狩野繁之、山田圭一、片貝良一：熱帯熱マalaria原虫の解糖系酵素を標的としたペプチド抗原の合成と性質、日本化学会第81春季年会、早稲田大学西早稲田キャンパス、2002.3.26-29
  - 2) 清野宏、狩野繁之：新世代ワクチン・ストラテジー、第80回記念企画2“感染症学のBreak-Throughを目指して”、第80回日本感染症学会学術講演会、ホテル日航東京、2006.4.20-21.
- ##### 4. 知的所有権の出願・取得状況
- 1) 特許
    - a) 奥浩之、栗山圭祐、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：熱帯熱マalaria原虫のエノラーゼ蛋白質の部分ペプチドの製造方法、特許協力条約に基づく国際出願(PCT/JP2005/017851)、2005
    - b) 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：熱帯熱マalaria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(WO2006/035815)、2006
  - 2) その他 無し

## 腎疾患治療に向けた DDS

分担研究者 名取 泰博 国立国際医療センター・部長

本研究は慢性腎炎の治療に有用な DDS の開発を目標に、糸球体に指向性のあるリポソームを用いた DDS、尿細管上皮に対して指向性を持たせるための標的分子の探索、及び DDS の材料としての量子ドット (QD) の可能性について調べた。

まず最初に我々は、塩基性脂質 TRX-20 添加ポリエチレングリコール修飾リポソームにステロイド剤を内封させた薬剤が半月体性糸球体腎炎の動物モデルにおいて糸球体に集積し、フリーのステロイド剤よりはるかに少量で治療効果を示すことから、糸球体を標的とした治療の DDS として有用であることを報告した。さらにこのステロイド剤内封リポソーム製剤が示す治療効果のメカニズムについて調べ、フリーのステロイド剤は糸球体内への白血球浸潤や炎症性メディエーターの産生を抑制して治療効果を示すのに対し、リポソーム製剤の場合には浸潤白血球数や炎症性メディエーターの mRNA のレベルは未治療群と差がなく、ボーマン嚢上皮細胞の増殖や線維化に違いがあることを明らかにした。ステロイド剤内封リポソーム製剤はフリーのステロイド剤とは異なる機序で治療効果を示すことが示唆される。

一方、尿細管間質病変の進展も糸球体腎炎の増悪に重要な役割を果たす。尿細管上皮への選択的 DDS の標的分子の候補としてフラクタルカイン (FKN) に注目し、ヒト腎疾患及びラットモデルを用いてその発現動態を調べた結果、FKN 発現尿細管上皮細胞は腎炎における間質白血球浸潤や病態の進展に重要な役割を担うことが示唆され、尿細管上皮への DDS の標的分子となる可能性が示された。さらに種々の動物モデルを用いた検討から、細胞性フィブロネクチンとオステオポンチンも尿細管上皮及びボーマン嚢上皮の標的分子として有用である可能性を示した。

腎疾患治療用 DDS としての量子ドット (QD) の可能性を調べるために、ラット個体における Cd/Se-QD の挙動を調べたところ、高濃度の緑色 QD の投与は肺塞栓の原因となる可能性が示されたことから、DDS への応用に向けて、より安全な QD の開発が必要であると考えられた。

### A. 研究目的

現在、慢性糸球体腎炎や糖尿病性腎症の進行を確実に阻止する方法はなく、その多くは慢性腎不全へと移行し、人工透析や腎移植を必要とするようになる。維持透析の普及は慢性腎不全患者の生命を救うという点では画期的な方法であるが、患者の平均余命は依然として正常人より 10 年以上短いと言われており、また患者の QOL の点からも慢性腎不全を阻止することが重要な課題であることに変わりはない。

ステロイド剤は種々の腎炎の治療に広く用いられているが、その副作用が大きいこともあり、その使用には種々の制限がある。

また免疫抑制剤など、腎疾患の治療に用いられている他の薬剤についても、その副作用がしばしば問題となっている。これらを克服するために、本研究では腎疾患治療薬を腎の病変組織に集中する新しい手法を確立することを目的とし、標的指向型 DDS 製剤の開発を試みる。

急速進行性糸球体腎炎は病理学的には半月体性糸球体腎炎像を呈し、発症から数週間〜数ヶ月で腎不全に至る予後の悪い疾患であるが、その一部の患者にはステロイドパルス療法が有効と言われている。しかし半月体性糸球体腎炎は比較的まれな疾患であること、進行が早いことなどの理由によ

り、コントロールスタディは行われていない。我々はこれまで半月体性糸球体腎炎の動物モデルを用いて病理学的及び免疫組織化学的解析によりステロイドパルス療法の有効性を示した。一方、木村らは新規に開発した塩基性脂質 TRX-20 を添加したポリエチレングリコール修飾リポソームが培養腎糸球体メサンギウム細胞に選択的に取り込まれること、また、メサンギウム増殖性糸球体腎炎モデルのラットにおいては、同リポソームを尾静脈より投与すると糸球体に集積することを明らかにした。そこで本研究ではまず最初に、同リポソームにプレドニゾロンを内封させたリポソーム製剤を用いて、半月体性性糸球体腎炎の動物モデルに対する治療効果を通常のフリーのステロイド剤と比較した。さらに、この塩基性脂質含有リポソームという DDS 系におけるステロイド剤の治療効果発現のメカニズムについて調べた。

一方、糸球体腎炎の進展には尿細管上皮細胞を介した間質の病変が深く関与すると考えられており、尿細管間質病変の進展抑制も慢性糸球体疾患における腎不全阻止に

有効な手段となることが示唆されている。従って尿細管上皮を標的とした DDS は腎疾患治療に有用と考えられるが、同細胞への選択的 DDS は未だ開発されておらず、適切な標的分子も同定されていない。フラクタルカイン (FKN) は現在まで知られる唯一の膜結合型ケモカインである。一般に FKN は活性化された血管内皮細胞に発現し、血管から間質組織への白血球浸潤に関与すると言われている。一方、腸炎などにおいては FKN が上皮系細胞に発現することも報告されている。しかし腎炎における FKN の発現に関する研究は少ない。そこで我々は、ヒトの種々の腎疾患及びラット腎炎モデルにおける FKN の発現について調べ、FKN が尿細管上皮選択的 DDS の標的となり得るかどうかを検討した。同様に、腎炎において尿細管上皮での発現亢進が知られている細胞性フィブロネクチン (cFN)、オステオポンチン (OPN) についても 3 種の腎症動物モデルを用いて、尿細管上皮へ

の DDS の分子標的としての可能性を調べた。

本研究班の主テーマである量子ドット (QD) の腎疾患における DDS のキャリアーとしての可能性を調べるためには、QD が生体内、特に腎においてどのような動態をとるかを調べる必要がある。すなわち、QD は nm オーダーの粒子径であることから、その微妙なサイズの違いによって、糸球体の毛細血管壁を通り抜け、原尿中に移行する可能性も考えられる。そこで我々は、カドミウム/セレンからなる QD のうち、大きい QD として赤色 QD を、小さい QD として緑色 QD を選び、ラットにおけるそれらの体内動態を調べることにした。また QD そのものとともに、ラット血清アルブミンを結合させた QD についても合わせて検討した。

## B. 研究方法

1) 糸球体指向性リポソームを用いた実験  
カチオン化脂質 TRX を添加した PEG 修飾リポソーム (TRX リポソーム) にリン酸プレドニゾロンナトリウムを内封させた製剤を調製した。また何も内封しない空のリポソームを調整し、コントロールとした。

半月体性性糸球体腎炎モデルは Wistar Kyoto 系ラット (雄、90-110 g 体重) にウサギ抗ラット糸球体基底膜抗血清 (20  $\mu$ L/100 g 体重) を尾静脈投与して作製した。このモデルでは、腎炎惹起後 7 日目までに尿蛋白の上昇が見られ、組織学的には単球やリンパ球の糸球体への浸潤も顕著であり、多くの糸球体に細胞性半月体が形成される。そこで、同モデルに対する治療効果を調べるために、腎炎惹起後 7 日目から薬剤の投与を開始し、以降は 1 週間に一度の間隔で投与を行った。すなわち、7 日目の尿蛋白を測定した後にラットを (1) 正常ラット群、(2) 疾患コントロール無治療群、(3) 空リポソームコントロール群、(4) フリーステロイド 1 mg/kg 群 (Free-PSL/1)、(5) フリーステロイド 3 mg/kg 群 (Free-PSL/3)、(6) リポソーム内封ステロイド 1 mg/kg 群 (Lipo-PSL/1)、及び (7) リポソーム内封ステロイド 3 mg/kg 群 (Lipo-PSL/3) の計 7 群に分け、各治療を行った。

またラットにおけるリポソームの挙動は、ローダミン標識ステロイド内封リポソームを用いて行った。すなわち、上記と同様の腎炎モデルを惹起後、標識リポソームを投

与し、24 時間後に屠殺して腎を採取した。PAS 染色を行い、同一切片上にて光顕所見及びローダミンの蛍光所見を調べた。

## 2) 尿細管上皮における分子標的探索

臨床サンプルを用いた解析：上海・復旦大学医学院附属中山医院の腎臓内科に受診した糸球体疾患患者 52 名（IgA 腎症 22 名、微小変化型腎症 16 名、膜性腎症 3 名、巣状分節性増殖性腎炎 4 名、巣状糸球体硬化症 2 名、メサングウム増殖性腎炎 2 名、膜性増殖性腎炎 1 名、半月体性糸球体腎炎 2 名、病理診断名は同病院の分類に従った）を対象とし、その腎生検組織を FKN 及び FKN 受容体に対する抗体で免疫染色を行った。正常コントロールとして腎癌患者 4 名から摘出した腎組織の正常部分を用いた。これらの組織を本研究に用いることは同医院の倫理委員会にて承認されている。

巣状糸球体硬化症モデル：Wistar 系ラット（雄 6 週齢）の頸静脈より 90 mg/kg 体重のピューロマイシンアミノヌクレオシドを投与して進行性の巣状糸球体硬化症モデルを作製した。本モデルでは 5 日目頃から次第に尿タンパクが増加し、7～10 日目頃からネフローゼを呈するようになる。また間質への白血球浸潤が顕著であり、我々は既に本モデルにおいて多くのケモカイン分子の発現が亢進することを報告している。

半月体性糸球体腎炎モデル：(前述)

糖尿病性腎症モデル：2 型糖尿病を自然発症する Zucker Diabetic Fatty ラットを用いた。本モデルでは 5～6 週令から血糖値が上昇し、10 週令には 400 - 500 mg/dL に達する。その頃には尿中アルブミン値も上昇し、糖尿病性腎症を発症する。その後、数ヶ月にわたって尿蛋白が増加し、慢性の経過をとるが腎機能の低下までには至らない。炎症細胞の浸潤は軽微であり、上記のモデルに比べて進展が遅い腎症タイプの動物モデルと言える。

微小変化型ネフローゼモデル：Wistar 系ラット（雄 6 週齢）の尾静脈より 150 mg/kg 体重のピューロマイシンアミノヌクレオシドを投与して作製した。本モデルでは 5 日目頃から蛋白尿が出現し、7 日目頃からネフローゼを呈するようになる。同じ化合物を頸静脈投与して作製する巣状糸球体硬化症モデルと異なり、尾静脈投与の場合には変化は一過性であり、尿蛋白は数週間後に正常に戻る。組織学的に間質への白血球浸

潤が顕著であるが、光顕レベルでは糸球体にほとんど変化が見られない（従って微小変化型）タイプのネフローゼモデルである。

## 3) QD を用いた DDS

ジヒドロリポ酸 (DHLLA) にて表面修飾した赤色及び緑色 QD に、それぞれラット血清アルブミン (RSA) を EDC カップリング試薬を用いて結合させた。以下、RSA を結合させていない QD を DHLLA-QD、結合させた QD を RSA-QD と記す。赤色 QD は 640 nm、緑色 QD は 520 nm の波長にて測定した。QD の粒子径は DLS 法にて測定した。

同一ラットにおける赤色、緑色の QD の挙動を比較する目的で、DHLLA-QD、RSA-QD とともに赤、緑の QD を同一ラットに投与することにした。Wistar 系ラット（4 週令雄、約 100 g 体重）に 100 μM QD 溶液 1 mL を赤色、緑色の順に、数分間の間隔で、尾静脈より投与した。

ラットの血液は心臓から、尿は膀胱からそれぞれ採取し、血液は血清分離後、尿はそのままで吸光度を測定し、QD の有無を調べた。また肺、腎を採取し、薄切後、蛍光顕微鏡にて QD の分布を観察した。

## C. 研究結果

### 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（ポーマン腔内）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