

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、 $63.0 \pm 6.1$  vs. Lipo-PSL/3 群、 $28.8 \pm 11.1$ ,  $p < 0.05$ ）。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 はボーマン嚢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嚢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、ボーマン嚢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、ボーマン嚢上皮細胞の増殖や、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グ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グ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グ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。メサング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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  まで検出可能であることがわかった。

そこで次に、100  $\mu\text{M}$  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、DHLa-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、

DHLA-QD 投与群ではその濃度が遙かに低かった。一方、尿中には DHLA-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、DHLA-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、DHLA-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。DHLA-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、DHLA-緑色 QD は平均粒子径が約 10 nm であったのに対し、DHLA-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。

#### D. 考察

ステロイド剤は抗炎症作用、免疫抑制作用が強い反面、易感染性などの副作用も強いためにその多用には問題が多い。本研究は糸球体に指向性を有すると考えられるリポソームにステロイド剤を内封させることにより、副作用を抑えて効果的に糸球体障害を抑制することを試みた。その結果同製剤が、糸球体毛細血管壁の障害に起因し上皮細胞の増殖と白血球浸潤が顕著な半月体性糸球体腎炎において糸球体指向性を示し、フリーのステロイド剤に比べて有意に良好な治療効果を示すことが明らかとなった。

近年、生体内で安定なリポソームを製造する技術が開発されたことにより、リポソームの実用化への道が開かれた。特に、この過程で開発された PEG 修飾リポソームは、その長期循環型の性質と、適当な粒径によ

り、結果的に標的組織にかなりの量が集積する、パッシブターゲットング製剤となった。このような標的組織集積性は、必要な場所に、必要な時間、必要な量だけ、薬物を作用させるという DDS の理想に明らかに一歩近づいた成果である。さらに本研究では、カチオン化脂質 TRX を導入したリポソームを用いた。この TRX 含有 PEG 修飾リポソームは *in vitro* 及び *in vivo* において糸球体メサンギウム細胞に対して指向性を示す。本研究に用いた半月体性糸球体腎炎モデルではメサンギウム細胞の障害が起きている可能性は低い、糸球体毛細血管壁の障害が起き、半月体ができていることからその血管透過性が亢進していることは確実であり、リポソームがメサンギウム細胞に接触する確率が上昇していることも十分に考えられる。

糸球体内の炎症反応が糸球体毛細血管壁の破壊を伴わなければ、炎症が血管内のみにとどまり、管外増殖性変化（すなわち半月体形成）には至らない。このような炎症であれば、不可逆的な糸球体の破壊はまぬがれることが期待される。半月体形成の分子機序には未だに不明な点が多く、リポソーム封入ステロイド剤の具体的な標的細胞や標的分子が何かは明らかではないが、同製剤で局所的に高濃度になったステロイド剤は、糸球体毛細血管壁の破壊の過程を抑制、あるいは一度壊れた毛細血管壁の修復に寄与して、疾患の進展を阻止することが示唆された。

本研究の結果から、腎炎の重症度が高いほど FKN の発現が亢進し、その発現は主に尿細管上皮細胞であることがわかった。また FKN の発現が高い症例ほど白血球浸潤の程度も高く、さらにヒト及び動物モデルにおいて FKN を発現する尿細管上皮細胞の周囲には FKN 受容体発現細胞や単球/マクロファージなどが集積していることが示され、FKN がこれらの白血球浸潤に関与することが示唆された。

臨床サンプルを用いた本研究の結果で興味深い点の一つは、微小変化型腎症の患者腎組織には FKN の発現が 1 例も見られなかったことである。これらの症例のうち蛋白尿が 3.5 g/日以上を示した（すなわち微小変化型ネフローゼ）のは 2 例のみであるが、いずれも FKN の発現はなく、一方、同程度の蛋白尿を示した他の疾患患者 9 例中 8 例

には FKN の発現が見られた。この結果から、微小変化型腎症では尿細管上皮細胞における FKN の発現誘導がかからないことが示唆され、同疾患が予後が良いこととの関連が考えられる。

以上の結果から、尿細管上皮における FKN の発現は白血球浸潤などの病変に深く関与することが示唆され、FKN を標的とした尿細管上皮細胞への DDS は、このような病変部位に選択的に作用する系として有用となる可能性が考えられた。

同様に動物モデルを用いた研究の結果から、cFN と OPN の尿細管上皮やポーマン囊上皮における発現も、半月体性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、微小変化型ネフローゼにおいて広範な陽性所見が得られたことから、両者を組み合わせることで様々な時期の尿細管間質病変抑制の治療のための DDS に用いられると考えられた。

QD を用いた動物実験の結果から、100  $\mu$ M という高濃度の緑色 QD 溶液を 1 mL ラットに尾静脈投与すると、投与直後にラットが死亡することが示された。投与から死亡までの時間が極めて短いこと、ラットは苦しむ様子を全く示さずに死亡したこと、死亡したラットではいずれも肺の毛細血管に多量の QD が観察されたことから、死因は肺塞栓と推測された。

本研究で用いた QD は絶対量、濃度ともに、これまで本研究班における他の研究で DDS として用いるよりも遙かに高い。従って、これまでマウスを用いた DDS 実験で動物が死ななかったのに対して、本研究でラットが死亡したことは、マウスとラットの違いというより、投与量の違いが原因と考えられた。

RAS-緑色 QD は DHLA-緑色 QD と比較して粒子径が大きく、DHLA-赤色 QD や RAS-赤色 QD に近い。腎において DHLA-緑色 QD のみが尿中に速やかに排泄されるのに対し、その他の QD は排泄されにくいのは、これらの QD のサイズを反映していると考えられた。一方、腎及び肺の毛細血管における挙動は、必ずしも QD のサイズと対応しなかった。腎の毛細血管における各 QD の挙動はそれぞれ異なったのに対し、肺においては 4 種の QD 全てが毛細血管と思われる部位に観察された。この理由は不明であるが、体内における QD を明らかにする上

で重要な知見と考えられた。

QD を DDS のキャリアーとして用いる場合には、本研究の場合より遙かに少ない量を投与すると思われることから、今回の結果が直ちに QD のキャリアーとしての危険性を示唆するものではない。しかし、本研究で示した大量の QD の致死活性が血管をつまらせたことによる肺塞栓が原因であるならば、たとえ少量投与でも血管の障害となる可能性も推測され、今後の詳細な検討が必要と考えられた。

#### E. 結論

疾患糸球体に選択的に集積する塩基性脂質含有リポソームによる DDS は半月体性糸球体腎炎の動物モデルにおけるステロイド剤治療に有効であり、その作用機序はフリーのステロイド剤の場合と異なる可能性が示された。尿細管上皮に対する指向性のある DDS には、フラクタルカイン、細胞性フィブロネクチン、オステオポンチンなどの疾患関連抗原を標的分子とした DDS が有効となる可能性がある。量子ドットを DDS に用いるには、より安全な QD の開発が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

Altered expression of NDST-1 messenger RNA in puromycin aminonucleoside nephrosis. Nakayama K, Natori Yu, Sato T, Kimura T, Sugiura A, Sato H, Saito T, Ito S, Natori Y: J Lab Clin Med, 143:106-114, 2004

Role of mast cells in the development of renal fibrosis: Use of mast cell-deficient rats. Miyazawa S, Hotta O, Doi N, Natori Yu, Nishikawa K, Natori Y: Kidney Int 65:2228-2237, 2004

Shiga toxin-1 causes direct renal injury in rats. Yamamoto EC, Mizuno M, Nishikawa K, Miyazawa S, Zhang L, Matsuo S, Natori Y: Infect Immun 73:7099-7106, 2005

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

## QD 標識 MPO 抗体による血管炎の解析

分担研究者 鈴木和男 国立感染症研究所生物活性物質 室長

研究協力者 星野昭芳 国立国際医療センター研究所 流動研究員  
山本健二 国立国際医療センター・治療センター センター長

**研究要旨** 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 抗体(MPO-ANCA)の作用を検討した。QD は、FMLP、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  および IL-8 の刺激によって好中球表面に存在する MPO を高感度かつ迅速に検出し、好中球活性化を判定する指標としての有益性を示した。また、QD 標識 MPO 抗体は、内皮細胞に特異的に結合し、内皮細胞の ICAM-1 の発現が上昇した。血中のサイトカイン・ケモカインの上昇も認められた。これらの結果から、MPO-ANCA は、サイトカインと連動して局所で活性化好中球の表面に出る MPO と反応し、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、内皮細胞障害を引き起こし、血管炎の誘発を惹起すると考えられる。

### A. 研究目的

これまで、われわれは活性化した好中球が関与する myeloperoxidase 自己抗体 (MPO-ANCA) 動態の解析と血管炎の DDS の治療法開発に不可欠であった量子ドット (Qdot) 標識抗 MPO 抗体の作製に成功し報告してきた。

活性化した好中球は、血管炎の発症の要因となっていることが報告されており (Arimura, Y., et al. *Clinical Nephrology* 40, 256-264, 1993, L. Harper, et al. *Arthritis Rheumatism* 44:921-930, 2001)、特に、急速進行性糸球体腎炎の発症には、活性化好中球とともに好中球自己抗体 (MPO-ANCA) が関与している。MPO-ANCA 抗体は、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ためと考えられている。しかし、

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。

一方、血管炎の発症には、血液力学的因子も関与していることから、*in vivo* のイメージング技術も含めた総合的な検討が欠かせない。われわれが提唱した *in vivo imaging* は、バイオイメージングによる生体内の動態を解析することに利用され、常套手段として行われるようになってきている。本法は、種々の生体機能に欠かせない方法として急速に定着しつつある。この *in vivo imaging* には、ナノプローブの利用が必須である。

そこで、これまで、QDot を用いた血管

炎の発症要因の解析と DDS 治療への応用について検討してきた。具体的には、われわれが開発した血管炎モデルマウスに、MPO 抗体を投与して血管炎発症過程をしらべ、糸球体から単離したプライマリー培養の糸球体血管内皮細胞に QD で標識した MPO 抗体を(QD-antiMPO)を加え、*in vitro* での QD-antiMPO の糸球体血管内皮細胞への結合と作用について解析したてきた。

本年度は、QDot を用いた血管炎の発症要因の解析と DDS 治療への応用についてさらに生体動態も含めて検討した。

本結果より、組織に侵入した活性化好中球を標的とするイメージングによる抗体の動態の解析が可能となり、MPO 抗体の病因的側面を解析し、糸球体血管内皮細胞への作用も明らかにすることができた。

## B. 研究方法

### 1) QD-antiMPO の作製

QD-antiMPO は、QD で蛍光標識した抗 MPO 抗体を作製した。抗 MPO 抗体の QD 標識は、セレン化カドミウム QD の表面にチオプロピオン酸を配位させ、システインで被覆した。次いで、QD 表面に抗 MPO 抗体をアミノ酸カップリングにより結合させた(A. Hoshino, *et al.* Nanolett. 4:2163-2169, 2004)。

### 2) MPO 抗体の内皮細胞への結合

内皮細胞障害は、MPO-ANCA の結合により誘導されると想定されることから、MPO 抗体の血管内皮細胞への結合を可視化した。

### 3) QD-antiMPO の生体内動態解析

CAWS (*Candida albicans* water soluble fraction, 100 µg/ml) および anti-rmMPO 抗体を C57BL/6 に iv 投与した。5 日後に、再度 CAWS と QD-antiMPO を iv 投与し、腎、肺、脾、肝の各組織標本の QDots の蛍光により MPO 抗体の動態を解析した。

### 4) antiMPO 抗体投与による血中サイトカインの動態解析

18 種サイトカインの同時定量した。マウスから採血して得られた 50 µL の血漿を用い、Bio-Plex (BioRad 社)により、個々の血漿中の 18 種サイトカインを同時に定量した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、国立感染症実験動物計画委員会の動物愛護の指針にもとづいて行った。

## C. 研究結果

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 (図1)。

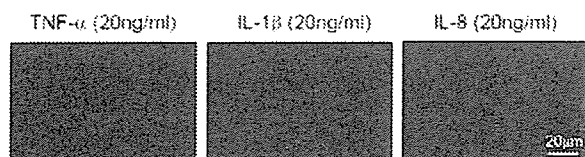


図1. TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  および IL-8 刺激による好中球細胞膜への MPO 表出。

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、尿タンパクの一過的上昇が見られた。

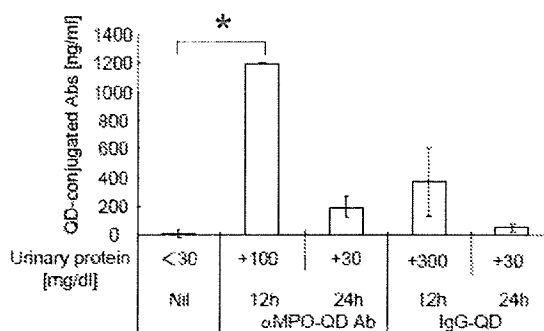


図2. antiMPO-QD 抗体投与による尿タンパクの排泄。





する指標としての有益性が示された。MPO は、ANCA の抗原となる好中球細胞質顆粒内分子で、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ることで、治療法などの検討に役立つ。サイトカイン刺激によっても同様に MPO の表出が確認されたことは、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。

一方、MPO 抗体投与が糸球体の機能の影響することについて、QD 標識 MPO 抗体を投与して、尿タンパクを検出した。QD 標識 MPO 抗体投与 12 時間後には、尿タンパクの一過的上昇が見られ、糸球体の機能の変化が確認された。さらに、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。これらの事象と MPO 抗体と CAWS 投与による糸球体への好中球浸潤には、炎症性サイトカイン・ケモカインの変動が関わっていることが判明し、これらサイトカイン・ケモカインが、ICAM-1 の発現上昇を伴う内皮細胞の障害にかかわり、かつ、好中球浸潤および好中球活性化に深く関与していることが示唆された。

以上、本研究で開発した QD 抗体を使うことにより MPO など関連分子や細胞の生体で

の機能を明らかにでき、血管炎の発症機構と治療法の開発に有用であることが示された。

## E. 結論

QD 用いて、好中球および腎糸球体内皮細胞への MPO-ANCA の作用を検討した。FMLP、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ および IL-8 の刺激によって好中球表面に存在する MPO を高感度かつ迅速に検出し、好中球活性化を判定する指標としての有益性を示した。これら、炎症性サイトカイン刺激によって MPO の表出が確認されたことは、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。このことから、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が十分考えられる。その根拠として、QD 標識 MPO 抗体を投与することで、尿タンパクを検出された。さらに、糸球体への好中球の浸潤は、MPO 抗体と CAWS の投与で有意に増加した。これらの事象と MPO 抗体と CAWS 投与による糸球体への好中球浸潤には、炎症性サイトカイン・ケモカインの変動が関わっていることが強く示唆され、これらサイトカイン・ケモカインが、ICAM-1 の発現が上昇を伴う内皮細胞の障害にかかわり、かつ、好中球浸潤および好中球活性化に深く関与していると推定される。このように、QD 抗体は、生体での機能を明らかにする上で重要でありかつ有用なものであると思われる。

る。

本研究は、大川原明子、松村実美子、野津朋子、太刀川仁、小林美登利（国立感染研・生物活性物質）、長尾朋和（国立感染研・生物活性物質、現コーネル大・医[ニューヨーク]）、三浦典子、大野尚仁（以上東京薬大・薬）、南谷晴之（慶應大・院理工）の先生方の協力によった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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
2. Akiko Ishida-Okawara, Noriko Nagi-Miura, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Akinori Okumura, Hitoshi Tachikawa, Shin-ichiro Kashiwamura, Haruki Okamura, Naohito Ohno, Hidechika Okada, Peter. A. Ward, **Kazuo Suzuki**. Neutrophil activation and induced by *C. albicans* water-soluble mannoprotein- $\beta$ -glucan complex (CAWS). *Exp. Mol. Pathol.* in press.
3. Tomokazu Nagao, Mimiko Matsumura, Ayako Mabuchi, Akiko Ishida-Okawara, Osamu Koshio, Haruyuki Minamitani, and **Kazuo Suzuki**. Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody. *Neprol. Dialysis Transplant.* 22: 77-87, 2007.
4. Shinohara Hiroyasu Nagai-Miura Noriko Ishibashi Ken-ichi, Adachi Yoshiyuki Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Shiro Naoe, **Kazuo Suzuki**, and Naohito Ohno. Beta-mannosyl linkages negatively regulate anaphylaxis and vasculitis in mice, induced by CAWS, fungal PAMPs composed of mannoprotein-beta-glucan complex secreted by *Candida albicans*. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1854-1861, 2006.
5. Shouichi Fujimoto, Shigehiro Uezono, Shuichi Hisanaga, Keiichi Fukudome, Shigeto Kobayashi, **Kazuo Suzuki**, Hiroshi Hashimoto, Hiroyuki Nakao, Hiroyuki Nunoi. Incidence of ANCA-associated primary renal vasculitis in Miyazaki Prefecture: The first population-based, retrospective epidemiological survey in Japan. *Clinical Journal of American Society of Nephrology.* 1: 1016-1022, 2006.
6. Yasuaki Aratani, Fumiaki Kura, Haruo Watanabe, Hisayoshi Akagawa, Yukie Takano, Akiko Ishida-Okawara, **Kazuo Suzuki**, Nobuyo Maeda, and Hideki Koyama. Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defense against *Cryptococcus*

- neoformans. *J. Med. Microbiol.* 55: 1291-1299, 2006.
7. A. S. Persad, Y. Kameoka, S. Kanda, Y. Niho, **K. Suzuki**. Arginine to Cysteine Mutation (R499C) Found in a Japanese Patient with Complete Myeloperoxidase Deficiency. *Gene Expression* 13: 67-71, 2006.
  8. N. Nagai-Miura, T. Harada, H. Shinohara, K. Kurihara, Y. Adachi, A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S., Naoe, **K. Suzuki** and N. Ohno. Lethal and severe coronary arteritis in DBA/2 mice induced by fungal Pathogen, CAWS, *Candida albicans* water-soluble fraction. *Atherosclerosis* 186: 310-320, 2006.
  9. Y. Hamano, K. Tsukamoto, M. Abe, G.D. Sun, D. Zhang, H. Fujii, S. Matsuoka, M. Tanaka, A. Ishida-Okawara, H. Tachikawa, H. Nishimura, K. Tokunaka, O. Hino, S. Hirose, and **K. Suzuki**. Genetic Dissection of Vasculitis, Myeloperoxidase-Specific Antineutrophil Cytoplasmic Antibody Production, and Related Traits in Spontaneous Crescentic Glomerulonephritis-Forming/Kinjoh Mice. *J. Immunol.*, 176:3662-3673, 2006.
  10. W. Yumura, M. Itabashi, A. Ishida-Okawara, K. Tomizawa, J. Yamashita, Y. Kaneshiro, H. Nihei, and **K. Suzuki**. A Novel Mouse Model for MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis. *Microbiol.Immunol.* 50: 149-157, 2006.
2. 学会発表  
国際会議
  1. Nozu T, Matsumura M, Nagao T, Kobayashi M, Okawara A, Hasegawa A, Nakayama T, Nagai A, Suzuki K Function of the primary pulmonary endothelial cells associated with activated neutrophils. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
  2. Kobayashi M, Matumura M, Nagano T, Hoshino A, Okawara A, Aratani Y, Minamitani H, Suzuki K
  3. Glomerular endothelial cell activation in vasculitis Induced by anti-myeloperoxidase antibody and activated neutrophils. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
  4. Tachikawa H, Okawara O, Suzuki K. Contribution of the systemic, splenic, and renal Th2 responses to the developing glomerulonephritis in NCA-associated crescent-forming glomerulonephritis mice. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
  5. Tomizawa K, Suzuki R, Tanokura M, Suzuki K. Analysis of MPO-ANCA Binding Site of MPO Molecule Surface Regions. June 18-23, 2006
  6. Hoshino A, Nagao T, Tokunaka K, Okawara A, Ihara T, Uno K, Muso E, Miura N, Ohno N, Yasuhara M, Yamamoto K, Suzuki K Myeloperoxidase (MPO) on Activation Neutrophils and anti-MPO Antibody involve the Initiation of Glomerulonephritis and

Vasculitis induced by *Candida albicans*  
Glycoprotein. 20th Int. Cong. Biochem. and  
Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006

7. Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Okawara A, Suzuki K, Maeda N, and Koyama H. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense against fungal infection. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006

#### 国内会議

1. 永井厚志、近藤光子、野津朋子、鈴木和男  
間質性肺炎における ANCA 陽性例の  
Prevalence と病態 第 103 回日本内科学会  
総会・年次講演会(横浜)4月14-16日
2. 太刀川仁、Mahmoud Ramadan、小玉 誠、  
大川原明子、三間 渉、伊藤正洋、柏村 健、  
広野 暁、鈴木和男、相澤義房 冠動脈疾  
患患者における MPO-ANCA の挙動 第 103  
回日本内科学会総会・年次講演会(横浜)4  
月14-16日
3. 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、高野幸枝、  
大川原明子、鈴木和男、小山秀機 クリプト  
コッカス感染防御におけるミエロペルオキシ  
ダーゼの関与 第 27 回関東医真菌懇話会  
(東京)5月27日
4. 鈴木和男 活性化好中球とMPO-ANCA  
による糸球体内皮細胞傷害 第49回日本腎  
臓学会学術総会 シンポジウム「ANCA関  
連血管炎の病理と臨床」(東京)6月14-16  
日、
5. 小林美登里、松村実美子、長尾朋和、荒谷  
康昭、星野昭芳、大川原明子、山本健二、  
南谷晴之、鈴木和男 血管炎発症に関わる

MPO-ANCA は直接糸球体内皮細胞へ作用  
する 第 17 回日本生体防御学会学術集会  
(札幌)7月27-29日

6. 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、赤川久義、  
高野幸枝、大川原明子、鈴木和男、小山秀  
機 クリプトコッカス感染防御における  
MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup>系の関与 第 12 回MPO研  
究会(大阪)9月22-23日
7. 原田敏江、三浦典子、安達禎之、Keiko  
Ozato、鈴木和男、大野尚仁 CAWS 血管炎  
における IRF-8 の役割 第 12 回MPO研究  
会(大阪)9月22-23日
8. 大川原明子、三浦 典子、大原関利章、高橋  
啓、岡田秀親、大野尚仁、鈴木和男 CAWS  
培養条件の違いによる好中球活性化への影  
響 第 12 回MPO研究会(大阪)9月22-23  
日
9. 三浦典子、安達禎之、大原関利章、高橋啓、  
大川原明子、鈴木和男、大野尚仁 各種マ  
ウス系統を用いた CAWS 血管炎発症に関わ  
る遺伝的素因の解析 第 12 回MPO研究会  
(大阪)9月22-23日
10. 駒井元彦、高野雄介、三浦典子、安達禎之、  
鈴木和男、大野尚仁 CBA/J, CBA/N マウ  
スにおけるCAWS血管炎の検討 第 12 回M  
PO研究会(大阪)9月22-23日
11. Suzuki K, Nauseef W ミエロペルオキシダー  
ゼ(MPO)の生体防御における役割 第 12 回  
MPO研究会(大阪)9月22-23日
12. 高橋啓、大原関利章、山田仁美、三浦典子、  
大野尚仁、村山研、野津朋子、松村実美子、  
大川原明子、鈴木和男、新井孝夫、荒谷康  
昭 CAWS 誘発血管炎モデルにおける合成  
免疫グロブリン(SyIG)の血管炎抑制作用 第

- 12 回MPO研究会(大阪)9月 22-23 日
13. 星野昭芳、猪原登志子、宇野賀津子、武曾  
恵理、山本健二、鈴木和男 抗MPO抗体誘  
導マウス全身血管炎モデルにおける活性化  
好中球からのサイトカイン産生 第12回MP  
O研究会(大阪) 9月 22-23 日
14. 富澤一夫、大川原明子、雑賀寛、田之倉優、  
鈴木和男 急性進行性糸球体腎炎モデル  
SCG/Kj マウスの MPO-ANCA 病因エピト  
ープは治療により減少する 第12回MPO研  
究会(大阪)9月 22-23 日
15. 星野昭芳、山本健二、鈴木和男 抗MPO自  
己抗体誘導マウス全身血管炎モデルにおけ  
る抗体の挙動を蛍光ナノ粒子標識 QD 抗  
MPO 抗体でイメージングする 第15回バイ  
オイメージング学会(盛岡)10月31—11月2  
日
16. Ishida-Okawara A., Nagi-Miura N.,  
Oharaseki T., Takahashi K., Okada H.,  
Ohno N.,and Suzuki K. Neutrophil  
Activation by CAWS in Different Cultured  
ConditionJ(CAWS 調整時の異なった菌の培  
養条件による好中球活性化の相違)第36回  
日本免疫学会総会・学術集会(大阪)12月1  
1—13日
17. Hoshino, A., Okawara, A., Yamamoto, K.,  
and Suzuki K. 星野昭芳、大川原明子、山  
本健二、鈴木和男 Activated neutrophils  
produce IL-17 and IL-23 by MPO-ANCA in  
Candida albicans-derived  
mannoprotein-induced murine systemic(カン  
ジダ由来マンノプロテイン誘導のマウス全身  
性血管炎における MPO-ANCA によって活  
性化された好中球が IL-17 と IL-23 を産生)  
第36回日本免疫学会総会・学術集会(大  
阪) 12月11—13日
18. 三浦典子、安達禎之、大原関利章、高橋啓、  
大川原明子、鈴木和男 CAWS 血管炎の発  
症と重篤かに関わる遺伝的素因の各種マウ  
ス系統を用いた解析 第36回日本免疫学会  
総会・学術集会(大阪)12月11—13日

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

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）  
分担研究報告

量子ドットを利用した硝子体可視化の試み

分担研究者 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

協力研究者 山本 健二 国立国際医療センター 研究所・副所長

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 真鍋 義則 国立国際医療センター研究所・研究生

協力研究者 藤岡 宏樹 国立国際医療センター研究所・研究生

研究要旨

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。

A. 研究目的

近年、多くの眼疾患が硝子体の病理学的及び／又は生理学的変化と関連していることが知られてきている。たとえば、加齢による硝子体の液化融解（liquefaction）は網膜剥離や網膜裂傷（retinal tear）を誘導し、また黄斑浮腫（macular edema）は黄斑（macula）への硝子体牽引（traction）に関連し、それぞれを原因として重症例、進行例では失明をもたらす。

そのため、硝子体内の混濁状態や病変の有無を観察することは重要である。しかし、硝子体は透明なゲル上物質から構成されるため、硝子体内の観察は困難であり、日常的な臨床的状況で透明な硝子体を観察するための適切な方法はない。

更に、硝子体の手術においても透明なゲルを対象とするため視認性の高い組織の手術に較べると難しく、また、手術によるリスクも高い。

以上のことから日常的な診断及び／又は手術において、眼の硝子体を簡便に安全に観察し得る手段及び方法を提供することを目的とする。

B. 研究方法

ナノ粒子を摘出豚眼内に27Gの注射針にて注入し、日常外来で使用する細隙灯顕微鏡で観察する。

他の染色材料も同様に注入して比較検討を行なう。

また、硝子体手術を豚眼にてシュミレーションし、注入したナノ粒子で染色された豚眼と、その他の染料にて染色された豚眼における手術の簡易性・安全性を比較検討する。

## C. 研究結果

他の染料に比べ、ナノ粒子によって染色された硝子体の観察は容易であり、詳細を観察し得る。

また、硝子体手術においても、ナノ粒子で染色された硝子体の切除は簡易で、かつ安全性が高かった。

## D. 考察

### 1. 達成度について

豚眼による実験にて良好な結果を得ているが健康危険対策に更なる改良を試みてゆく方針である。

### 2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

#### 1) 学術的意義

硝子体が可視化されることによって眼科学の進歩が期待される。

#### 2) 国際的意義

国際学会にて他国の学者より関心が向けられている。

#### 3) 社会的意義

日々の臨床における診察治療から手術治療に及ぶまで適応範囲は広く、社会的意義は高いと思われる。

### 3) 今後の展望について

上記達成度にも記してあるが健康危険対策を充実させ、より早く臨床分野への普及を促進させたいと考えている。

## E. 結論

ナノ粒子は日常臨床における硝子体観察には有用な染料となり得る。

また、硝子体手術においては、ナノ粒子利用によって、より簡易で安全性の高い手術とすることが可能である。

## F. 健康危険情報

本研究で使用している QD に関して更に安全性の高いものを目指して研究中である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

### 1) 欧文

Visualizing Vitreous Using Quantum Dots as Imaging Agents Satoru Yamamoto, Noriyoshi Manabe, Kouki Fujioka, Akiyoshi Hoshino, and Kenji Yamamoto IEEE Transactions on Nanobioscience. Vol. 6, No. 1 March 2007 ( in Press )

### 2. 著書

なし

### 3. 学会発表

#### 1) 国際学会

1) S. Yamamoto, N. Manabe, A. Hoshino, K. Yamamoto, Application of colloidal quantum dots to visualization of transparent vitreous of the eye at clinical situation, Bios 2006 (Photonics West) (January, 2006, San Jose, California, U.S.A.).

(国際シンポジウム)

1) Satoru Yamamoto, An application of quantum dots in ophthalmology, International Symposium on Colloidal Quantum Dots for Biomedical Applications and Their Safety (November 2005 Kobe, Hyogo, Japan)

#### 2) 国内学会

1) 「量子ドットの一つの医療応用」

山本悟1)、星野昭義2)、真鍋法義2)、山本健二2)

1) 国家公務員共済組合連合会横浜栄共済病院、2) 国立国際医療センター ナノ学会第4回大会 京都大学百周年時計台記念館 平成18年5月19日

2) 「水溶性量子ドットを用いた

硝子体病変の視覚化」

真鍋法義, 山本悟, 藤岡宏樹,

星野昭芳, 山本健二

(国立国際医療センター研,

横浜栄共済病院, 東京医歯大院)

第15回日本バイオイメーjing学会学術集会

岩手医科大学60周年記念館

平成18年1月1日

総括

#### 4.知的所有権の出願・取得状況

##### 1) 特許出願

発明の名称 蛍光ナノ粒子を含む眼の硝子体染色剤及び染色方法

請求項1 蛍光ナノ粒子を含む眼の硝子体染色剤。

請求項2 蛍光ナノ粒子が、コア単層構造又はコア・シェル重層構造を有する、請求項1記載の染色剤。

請求項3 蛍光ナノ粒子が、半導体元素を含む、請求項1または2記載の染色剤。

請求項4 請求項1～3のいずれか1項記載の染色剤を眼の硝子体に注入することを含む、眼の硝子体の染色方法。

特許願

整理番号 P005HST-30

受付番号 50600113344

提出日 平18.1.23

出願番号通知(事件の表示)

特願2006-13760

特許庁長官よりの受領書

(平成18年1月23日付け)

識別番号 100113402

氏名(名称)前 直美

##### 2) その他なし

表面加工および表面修飾した量子ドットを豚眼の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にする実験を行ってきた。

これによりナノ粒子によって染色された硝子体の観察は容易であり、詳細を観察し得ることが判明した。

また、量子ドットを注入した豚眼を使用して硝子体手術を試みたところ、量子ドットで染色された硝子体の切除は簡易で、かつ安全性が高いことも判明した。

以上のことから日常臨床における硝子体の診断において、眼の硝子体を容易に観察し得る方法と硝子体手術に関しては簡易で安全性の高い手術法を提供することができるのではないかと考えられた。

また、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も期待される。



## ピンポイント DDS

分担研究者 近藤昭彦 神戸大学工学部教授

本研究の目的は、低侵襲な方法（注射等）により生体内で標的部位へピンポイントに薬剤、遺伝子、タンパク質等を輸送して効率よく導入することで、副作用を軽減することができるキャリアー（運搬体）を開発することである。本研究では B 型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)粒子をキャリアーとして用いることを試みた。この粒子は、ウイルスゲノムを除去したタンパク質中空ナノ粒子であるため、内部に薬剤等を封入することで、ヒト肝細胞に安全かつピンポイントに導入することができる。本年度は、このタンパク質中空ナノ粒子に外来タンパク質を封入し、ヒト肝臓に特異的に導入することを試みた。モデルタンパク質としてオワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用い、HBsAg タンパク質の C 末端側に融合させて形成した粒子が、ヒト肝臓に効率よく GFP を導入可能であることを確認した。

### A. 研究目的

近年、重篤な疾患に対して、微量でありながら強い治療効果を発揮する医薬品が数多く開発されている。しかし、標的部位に効率良く投与することが難しく、全身性の副作用が問題となっている。そのため、低侵襲な方法（注射や経口投与等）により、生体内で標的部位へピンポイントに薬剤を輸送し、副作用を軽減することができるキャリアー（運搬体）の開発が求められている。そこで、本研究グループでは、B 型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)粒子をキャリアーとして用いることに着目した。この粒子は、ウイルスゲノムを除去したタンパク質中空ナノ粒子であるため、粒子内に薬剤を封入し、静脈注射によって、ヒト肝細胞に安全かつピンポイントに導入することができる。また、酵母や昆虫細胞、動物細胞を用いて簡便かつ安全に調製する手法が確立されている。

しかし、現在のところ、タンパク質を粒子内に簡便に封入する技術は確立されていない。そこで、本研究では粒子内に外来タンパク質を封入する手法を開発することでヒト肝細胞へ特異的に導入することを目指した。具体的には、Fig. 1 に示す様に、HBsAg タンパク質の C 末端側に封入するタンパク

質 (Fig.1 ではオワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質 (GFP)) を融合して発現させることで、タンパク質封入を行うことを試みた。

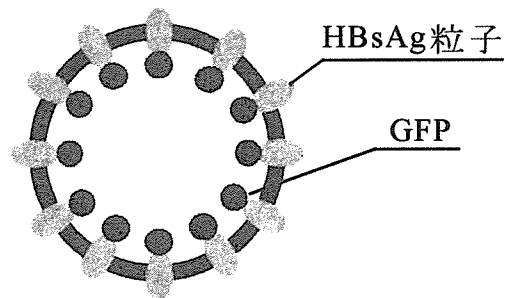


Fig.1 目的タンパク質 (GFP) 封入タンパク質中空ナノ粒子の模式図

### B. 研究方法

昆虫細胞および動物細胞において HBsAg タンパク質の C 末端部位にモデル系としてオワンクラゲ由来で緑色蛍光を発するタンパク質である GFP を融合発現させるプラスミド pXIHA:bla-HBsAgGFP および pSR $\alpha$ -HBsAgGFP を構築した。このプラスミドを *Trichoplusia ni* 由来細胞(High Five)およびサル腎臓由来細胞(COS7)へ遺

伝子導入試薬 FuGENE 6(Roche)を用いてそれぞれトランスフェクションした。High Fiveは27℃、COS7は37℃、5% CO<sub>2</sub>存在下で3日間培養を行った後、培養上清を酵素免疫測定装置 IMx(DINABOT)によって解析することで、融合タンパク質粒子の生成を確認した。

次に、得られた粒子を用いることで GFP をヒト肝細胞にのみ特異的に導入することができるか検討した。昆虫細胞により培養上清中に分泌発現した粒子を PEG 沈殿法により回収し、沈殿を PBS で溶解後、ヒト肝癌細胞(HepG2)及びヒト扁平上皮癌細胞(A431)にそれぞれ添加した。12時間培養後、導入されていない粒子を除去するために細胞を洗浄し、GFP の蛍光を蛍光顕微鏡で観察することにより、細胞内への導入効率を評価した。

### C. 研究結果

#### 1) GFP 融合タンパク質中空ナノ粒子の生産

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。

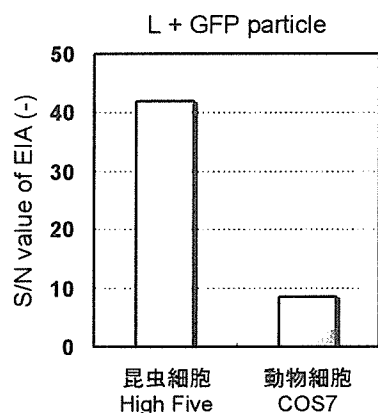


Fig.3 酵素免疫測定法による結果

#### 2) HBsAg-GFP 粒子の肝細胞特異的な導入の検討

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

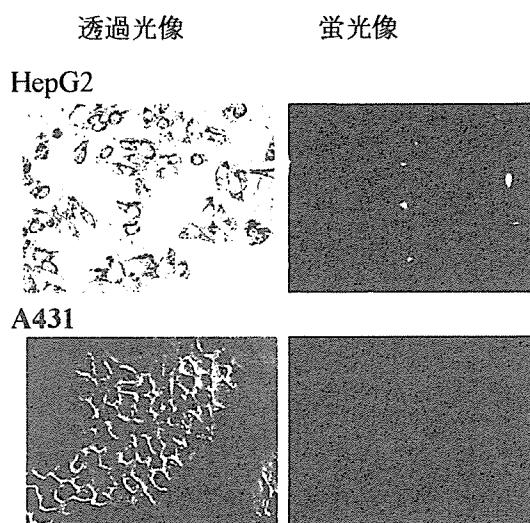


Fig. 3 HBsAg-GFP 粒子の導入実験結果

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。

### D. 考察

#### 1) 達成度について

HBsAg の C 末に目的のタンパク質を融合することで、目的タンパク質を粒子内部に包含したタンパク質中空ナノ粒子が調製でき、標的の肝細胞に特異的に導入できたことから、HBsAg タンパク質ナノ粒子が外来タンパク質の DDS に有効であることの基本データが示されたと言える。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

HBsAg タンパク質ナノ粒子を用いたピンポイント DDS は、日本初の技術であり、ウイルスの持つ高い特異的な感染能力と安全性を併せ持つ手法であり、学術的・国際的に見て、先進的なものである。この手法により、遺伝子やタンパク質をピンポイントで、標的臓器に導入できれば、副作用の心配がなく安全で、かつ低侵襲な治療が可能

となり、その社会的な意義は極めて大きい。今回、タンパク質についても、HBsAg タンパク質の C 末側に融合して発現することで、目的の細胞に特異的に導入可能なことが明らかとなったことは、治療の幅を広げる上でも大きい一歩である。

M&E 誌, 11 月号, 140-143 (2005)

H. 知的所有権の出願・取得状況  
なし

### 3) 今後の展望について

次年度以降は、今年度作成した蛍光を示す融合ナノ粒子を用いて、細胞内や生体内におけるナノ粒子の動態についての詳細を明らかにしていくとともに、特異性を変換した粒子においても、標的細胞に同様にタンパク質を導入できるかを明らかにする予定である。また、様々な可視化や薬剤の結合が可能な半導体ナノ粒子や磁性ナノ粒子等によるタギングを行い、動態の可視化について更なる検討を行う予定である。

### E. 結論

以上のように本研究を通じて、HBsAg からなるタンパク質ナノ粒子が、タンパク質の標的細胞特異的な DDS に有効であることが明らかとなり、今後の医療への応用の基礎を示すことができたと言える。

### 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) Ohnishi, N., Furukawa, H., Hata, H., J-M., Wang, C-I., An., Fukusaki, E., Kataoka, K., Ueno, K., and Kondo, A. High-Efficiency Bioaffinity Separation of Cells and Proteins Using Novel Thermoresponsive Biotinylated Magnetic Nanoparticles., *NanoBiotechnology*, (in press).
- 2) 近藤昭彦, 熱応答性磁性ナノ粒子開発とバイオ領域への展開, ナノパーティクルテクノロジーハンドブック, 日刊工業新聞社 497-502 (2006)
- 3) 近藤昭彦, 大西徳幸, 磁性ナノ複合粒子の合成とバイオテクノロジーへの応用, 粉体工学会誌 43(12), 906-911 (2006)
- 4) 近藤昭彦, バイオナノ粒子と産業展開,

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 室長  
研究協力者 竹下文隆 国立がんセンター研究所 リサーチレジデント

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。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

コラーゲンは皮膚真皮 (dermis) など結合組織を形成している繊維状蛋白質で、細胞の足場蛋白質として各組織、器官の形態保持に重要な役割を果たしている。コラーゲン分子の両末端にはコラーゲンの持つ抗原性の大部分を有するテロペプチドが付いており、ペプシンによる分解でテロペプチドだけが消化切断されたものがアテロコラーゲンである。アテロコラーゲンの医療材料としての特性は広く、コラーゲンやアテロコラーゲンは医用材料として、生分解性の縫合糸、止血剤、創傷被覆剤、皮膚陥没部修復用皮内注入剤などに汎用されている。昨年度までの研究成果によって、このアテロコラーゲンは 21mer の小さな二重鎖 RNA である siRNA と結合し、そのナノサイズの粒子が体内のヌクレアーゼによる siRNA の分解から保護し、かつ細胞内への取り込みを上げることを証明した。

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