

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

半導体などナノ粒子による 薬剤・細胞伝達システムの開発

(H19-ナノ-一般-01)

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

山 本 健 二

平成20（2008）年3月

目次

I. 総括報告

半導体などナノ粒子による薬剤・細胞伝達システムの開発

主任研究者

山本 健二 (国立国際医療センター研究所・国際臨床研究センター・

センター長) 1

II. 分担研究者報告

1. 半導体などナノ粒子による薬剤・細胞伝達システムの開発研究班

1) 半導体などナノ粒子による薬剤・細胞伝達システムの開発

山本 健二(国立国際医療センター研究所・国際臨床研究センター・

センター長) 13

2) 蛍光ナノ粒子による高感度組織染色法を用いた T 細胞の分化機構の解明

鈴木 春巳(国立国際医療センター・臨床病理研究部・部長) 21

3) 腹腔内炎症応答制御法の開発と応用

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) . 26

4) マラリアワクチン開発に向けてのナノメディシン研究

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) 破骨細胞形成および活性化過程における細胞動態のバイオイメージング

骨破壊病態モデル動物を用いて

鈴木 恵子(昭和大学歯学部歯科薬理学教室・講師) 33

6) 量子ドットを利用した硝子体可視化の試み

山本 悟(国家公務員共済組合連合会横浜栄共済病院眼科・

部長代行) 39

2. アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS 研究班

1) ナノデリバリーシステム構築による核酸医薬の選択的輸送

落谷 孝広(国立がんセンター研究所・室長) 42

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) 47

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) 53

Ⅲ.	研究班会議	63
Ⅳ.	研究成果の刊行に関する業績一覧	75
Ⅴ.	研究成果の刊行物・別刷	85

平成19年度厚生労働科学研究費補助金
(医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究)

主任者総括研究報告書

半導体などナノ粒子による薬剤・細胞伝達システムの開発

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. 半導体などナノ粒子による薬剤・細胞伝達システムの開発研究班

大田 敏博 (東京薬科大学・准教授)

近藤 昭彦 (神戸大学工学部応用化学科・教授)

鈴木 和男 (国立感染症研究所・生体防御研究室・室長)

鈴木 春巳 (国立国際医療センター研究所臨床病理研究部・部長)

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)

鈴木 恵子 (昭和大学歯学部歯科薬理学教室・講師)

山本 悟 (国家公務員共済組合連合会横浜栄共済病院眼科・部長代行)

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

レセプターなどをターゲットに様々な薬物が現在開発されているが、動物までは副作用は見られないが、ヒトを対象に臨床試験を行なうと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、人体に肝障害など危害を加える場合も多々有る。また、薬物の性状を変えてコンプライアンスを良くしたりあるいは作用を増強するため複合剤や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、人体のどの臓器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。また特殊な細胞を染色しその生体内動態を観測することを可能とした。これにより、興味ある薬物や細胞の人体臓器局在性をもコントロールすることにより安全な薬物治療を行なうことを可能ならしめる。

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。

また、

1) 半導体ナノ粒子を用いた薬剤・細胞伝達システムの開発

本研究は、半導体などナノ粒子を用いて薬剤の伝達システムの開発研究および遺伝子伝達システムの開発、ならびに疾患関連の非リンパ系免疫細胞などの伝達システムによるこれまでの成果を基にし臨床に役立つ治療法の開発を目的にしている。またそれに伴いナノ粒子の臨床応用に関する安全性を検討し、動物実験におけるデータを人体に適応するために必要な更に安全で安心なナノ粒子を開発することにより副作用軽減、治療効果向上、疾病治療における QOL 向上を実現する。

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

本研究の目的は、ナノテクノロジーを用いて、種々の機能を搭載した遺伝子導入ベクターを開発し、*in vitro* および *in vivo* において、安全で効率の良い遺伝子導入ベクターを開発すること、さらに、循環器疾患モデル動物を用いて治療実験を行い、遺伝子治療の臨床応用の基礎とすることである。我々は、ポリカチオンとポリエチレングリコール (PEG) のブロック共重合体を用いて、DNA と会合させると、DNA を内包して PEG が外殻を覆う core-shell 構造を形成し、DNA を外部環境より守ることを見出していた。本研究において、我々は、ブロック共重合体を改良し、*in vivo* において著明な遺伝子発現が可能で、安全性が高い遺伝子導入ベクターの開発に成功した。

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および人体の持つ細胞の臓器特異的伝達システムを解析し疾病のメカニズムの解明と治

療法の開発を目的にして行なっている。またそれに伴い、半導体などナノ粒子の細胞毒性などの安全性について検討し、人体に所用できる安全なナノ粒子の開発を行ない、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。また半導体ナノ粒子により特定の細胞を生きたまま染色し動物個体に戻すことにより、その細胞の生体内に於ける動態を経時的に追跡する事が可能である。それによりその細胞の生理的役割を検討することによりその細胞の機能が不調になった場合の変化を観察することにより疾病に関する新しい知見を得ると同時にその対策も考えることが可能となる。

我々は、このような研究を行うため人体にも使用できる安全なナノ粒子の開発と新規な表面加工によるナノ粒子の安全性を高める研究を行う。そのためこれまで使用していた2族6族の半導体から、新たに4族を用いた半導体の開発を行ないその細胞毒性についての検討を行う。またそれに伴い半導体ナノ粒子の製造過程に於ける作業従事者の労働安全性の向上を目的に従来では認識不可能であったナノ粒子のヒトによる感知する事が可能なる表面加工を開発することにより今後利用されるナノ粒子の被曝をできる限り少なくすることが可能とする。

本研究は、ナノ粒子を用いた薬物や遺伝子の伝達システムの開発を目的にしている。具体的には、生体親和性物質であるアテロコラーゲンや人工ウイルス粒子等のナノ粒子をモチーフに、がん細胞だけを攻撃するがん治療用アクテ

ィブ・ターゲティング（能動的標的指向性）機能を有するナノ粒子による核酸医薬デリバリーシステムの構築を検討することである。

従来のアテロコラーゲンナノ粒子に特定のアミノ基や糖鎖を付加した形態の核酸医薬複合体を作製し、がん細胞への指向性を検討する。さらにウイルスの細胞内侵入機能を巧みに利用したキャリアベクターとして、ポリオーマウイルス属のSV40をベースにしたデリバリーシステムの開発を行っており、ヒトの悪性腫瘍の85%以上で活性を示すテロメラーゼのプロモーターを組み入れる等の工夫をして、がん細胞にアクティブ・ターゲティング可能なナノ粒子の開発を試みることを目的とする。

一方、遺伝子治療における最も重要な課題の一つはベクターの開発であり、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。

我々は、これまでに、高分子ミセル型遺伝子ベクターが、血液細胞や血漿蛋白質などの生体成分と相互作用することなく、動脈壁などに効率的な遺伝子発現活性を示すことを明らかにしてきた。しかしながら、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は、ポリカチオンホモポリ

マーと比較して、比較的高い遺伝子導入効率を得るためには、過剰量のブロック共重合体を DNA に作用させる必要があり、PEG の導入による遺伝子発現活性の低下が示唆されてきた。さらに、ガン細胞スフェロイドを用いた研究によって、高分子ミセル型ベクターが、ポリカチオンからなるポリプレックスと比較して、比較的遅い遺伝子発現挙動を示すことが確認されており、これらの特性は PEG の導入による負の効果 (PEG ジレンマ) が存在することを示唆している。そこで本年度は、PEG とポリカチオンが細胞質内の還元的環境下や細胞膜表面に存在する酵素 (plasma membrane-associated protein disulfide isomerase や NADH-oxidase) によって切断される SS 結合で PEG とポリカチオンが連結されたブロック共重合体を合成し、生体内で PEG が脱離する高分子ミセル型ベクターを構築し、PEG ジレンマの克服を目指した。さらに、この PEG 脱離型の高分子ミセル型ベクターの設計の有用性を明らかにするために、物性ならびに培養細胞に対する遺伝子導入効率、細胞内動態を解析した。

3) ゴール

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

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を目指している。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な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/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、従来製造していたカドミウム/セレン半導体結晶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・シェル型ナノ粒子に加え、新たにシリコン結晶 (シリコンドット) を低分子有機化合物で被覆したハイブリッドナノ粒子である。

従来用いていたカドミウム/セレン半導体の製造方法については従来と同じ方法であるのでこれまでの報告書 (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/半導体等ナノ粒子による生物医療応用平成14年度から平成18年度主任研究者/山本健二) を参照されたい。

シリコンドットは、現在我々の研究グループでは2つの異なる方法を用いている。その一つは東京電機大学平栗教授の行なっている方法であり、この方法は、レーザーエッチング法によるものである。この方法は、周波数の一定なレーザー光を材料とするシリコン結晶に照射しそのレーザー光とほぼ等しい大きさの均一なナノ粒子を製造し、次にフッ酸による化学エッチングによりより均一な粒子径の

シリコンドットを得る事ができる。もう一つの方法は、ニュージーランドの Richard Tilley 教授による方法であり、この方法では有機溶媒を用いて高速攪拌器によってミセルを造り、強力な還元剤で還元することによりそのミセルにてシリコン結晶を製造することによって得ようとした。

それぞれの方法にそれぞれ一長一短があり。前者の方法は、非常に大量に製造できるため毒性の少ないシリコンドットの細胞毒性を測定するには好適では有るが、製造されたシリコンドットの表面は-Si-OH と成っておりこれ以上の表面加工には手間がかかる。一方後者の方法では本年の研究開始した当初 1 μ g/人日であったため前者に比べ生産量が3桁程劣っていたがシリコンドット側の表面に存在するSi元素と断端にC=C二重結合のある有機化合物の間で-Si-C-共有結合を構成することに成功したため比較的容易に表面加工できることが判明した。またそれと同時に後者の様に表面加工したシリコンドットは、表面が高分子を工夫すれば、非常に長く酸化等されずに安定に存在することが可能であることを示す。

これら二つの加工法は、その用途によって使い分けられている。シリコンドットはもとより細胞毒性の少ないナノ粒子であるため、細胞毒性を試験するには大量のシリコンドットを必要とする為前者の方法により製造したものを使用している。またシリコンドットの安全性の為の認識可能な様々な匂いを付けるためには、表面加工の簡単な後者の方法を用いて行なう。

またナノ粒子の安全性に関する検討は、様々な研究グループにおいて検討されている (産業総合研究所あるいは、科学技術振興調整費によるナノ粒子の安全性に関する研究など)。これまでにMTT法によりミトコンドリアの呼吸能力の計測 (Shiohara A et al., *Microbiol. Immunol.* 2004) を、またナノ粒子による遺伝子毒性の定量的評価法としてコメント法による判定を導入し (Hoshino A et al., *Nano Letters.* 2004) いる。

その後カドミウム/セレン半導体に

については、紫外線照射により蛍光を出している間に半導体ナノ粒子が崩壊しカドミウムイオンが溶出し細胞毒性を表す様になることを示唆する論文が出されている。そのため我々は、シリコンナノ粒子の製造に力を入れ安全なナノ粒子作りに成功した。その細胞毒性評価に付いては上記 MTT アッセイ以外に細胞膜の障害を測定する乳酸脱水素酵素濃度の試験を導入しシリコンナノ粒子の細胞毒性の検討を行なう。

(b) アテロコラーゲンナノ粒子

本研究は、ナノ粒子を用いた薬物や遺伝子の伝達システムの開発を目的としている。具体的には、生体親和性物質であるアテロコラーゲンや人工ウイルス粒子等のナノ粒子をモチーフに、がん細胞だけを攻撃するがん治療用アクティブ・ターゲティング（能動的標的指向性）機能を有するナノ粒子による核酸医薬デリバリーシステムの構築を検討する。

従来のアテロコラーゲンナノ粒子に特定のアミノ基や糖鎖を付加した形態の核酸医薬複合体を作製し、がん細胞への指向性を検討する。さらにウイルスの細胞内侵入機能を巧みに利用したキャリアベクターとして、ポリオーマウイルス属の SV40 をベースにしたデリバリーシステムの開発を行っており、ヒトの悪性腫瘍の 85% 以上で活性を示すテロメラーゼのプロモーターを組み入れる等の工夫をして、がん細胞にアクティブ・ターゲティング可能なナノ粒子の開発を試みる計画である。

(c) ブロック共重合体

遺伝子治療における最も重要な課題の一つはベクターの開発であり、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。

我々は、これまでに、高分子ミセル型遺伝子ベクターが、血液細胞や血漿蛋白質などの生体成分と相互作用することなく、動脈壁などに効率的な遺伝子発現活性を示すことを明らかにしてきた。しかしながら、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は、ポリカチオンホモポリマーと比較して、比較的高い遺伝子導入効率を得るためには、過剰量のブロック共重合体を DNA に作用させる必要があり、PEG の導入による遺伝子発現活性の低下が示唆されてきた。さらに、がん細胞スフェロイドを用いた研究によって、高分子ミセル型ベクターが、ポリカチオンからなるポリプレックスと比較して、比較的遅い遺伝子発現挙動を示すことが確認されており、これらの特性は PEG の導入による負の効果（PEG ジレンマ）が存在することを示唆している。そこで本年度は、PEG とポリカチオンが細胞質内の還元的環境下や細胞膜表面に存在する酵素（plasma membrane-associated protein disulfide isomerase や NADH-oxidase）によって切断される SS 結合で PEG とポリカチオンが連結されたブロック共重合体を合成し、生体内で PEG が脱離する高分子ミセル型ベクターを構築し、PEG ジレンマの克服を目指した。さらに、この PEG 脱離型の高分子ミセル型ベクターの設計の有用性を明らかにするために、物性ならびに培養細胞に対する遺伝子導入効率、細胞内動態を解析する。

B. 研究結果

本年度は以下の成果が得られた

- 1) 半導体ナノ粒子による薬剤・伝達機構の開発

(1) 半導体ナノ粒子による薬剤・細胞伝達システム

(2) 蛍光ナノ粒子による高感度組織染色法を用いたT細胞の分化機構の解明

(3) 腹腔内炎症応答制御法の開発と応用

(4) マラリアワクチン DDS に向けての基礎研究

(5) 破骨細胞形成および活性化過程における細胞動態のバイオイメージング

(6) 量子ドットを利用した硝子体可視化の試み

2) ナノデリバリーシステム構築による核酸医薬選択輸送

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) 循環器疾患に対する遺伝子治療用ベクターの開発

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) 半導体ナノ粒子の薬剤・細胞伝達機構の開発班：

(1) 半導体ナノ粒子の薬剤・伝達機構の開発半導体などのナノ粒子を用いて薬物の伝達システムの開発及び遺伝子伝達システムの開発を目的に研究を行っている。また半導体ナノ粒子を用い生きたままの細胞を染色しその生体内動態を解析し生体内の細胞トラフィック情報を利用し特定の場所に特定の細胞を伝達するシステムを開発している。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。

現在我々の製造するシリコンドットは直径2nmで表面加工として-OH基、レモン、オイゲノール、アルミノプロフェンによる5種類の新規な基を用いることに成功した。ここで-OH基のものはシリコンドットの安全性についての検討に用いられシリコンドットが非常に安全であること

が判明した。レモン、オイゲノールは匂い分子による表面加工でありナノ粒子に匂いを付けることに応用され存在を感知することが可能となり感知することが可能である。アミノプロフェンは、抗炎症薬であり薬剤伝達に応用することが可能であり本研究のテーマである。シリコンとアミノプロフェンはSi-Cの共有結合でありこれまでのCd/Se半導体担体と薬物が遷移結合より遥かに優れたものが得られた。

また細胞伝達システムの開発研究に付いては破骨細胞が2つのケモカインがその生理的状态に於いて重要であることが変研究で解明され、その各々のノックアウトマウスの解析により一方では骨異常を示すことが本研究で初めて判明した。またこの両ノックアウトマウスに共通して骨粗鬆を起こしていることから骨代謝にとって極めて重要であることが示された。

(2) 蛍光ナノ粒子による高感度組織染色法を用いたT細胞の分化機構の解明：

RhoHノックアウトマウスは胎生致死にはならず、メンデルリズムに従い産まれてきた。RhoHはRacの機能を抑制するという報告があり、RacはT細胞分化に必要であることが知られているので、RhoHを欠損させるとT細胞が異常活性化することが考えられた。しかしながら、予想に反してノックアウトマウスの胸腺は小さく、細胞数も野生型の1/5~1/3程度まで減少していた。CD4CD8ダブルポジティブ(DP)細胞の数が減少しており、胸腺でのβ選択の過程が抑制されていることが示唆された。実際、胎生16、17、18日におけるDPの分化がノックアウトマウスで遅れていることから、RhoHがβ選択に重要な働きをしていることが明らかとなった。

同時に、CD4シングルポジティブ(SP)細胞、CD8-SP細胞の割合も減少しており、ノックアウトマウスにおいて正の選択が阻害されていることが予想された。末梢においても脾臓、リンパ節ではCD4-SP、CD8-SP共に細胞数が激減しており、この結果も正の選択が阻害されていることと一致した。

さらに、OT-I およびOT-II Tgマウスと

RhoHノックアウトマウスを交配した結果、OT-IにおけるCD8-SPの生成およびOT-IIにおけるCD4-SPの生成の割合は著しく減少していた。いずれのマウスもRAG2欠損バックグラウンドであり、完全に単一のTCRを発現している。以上の結果から、RhoHが正の選択に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

一方、HY TCR-Tg マウスと RhoH ノックアウトマウスを交配することにより、自己反応性クローンの除去、すなわち負の選択における RhoH の機能を検討した。HY-Tg マウスのオスでは胸腺内で自己抗原と遭遇するため、負の選択によって胸腺細胞数は激減するが、RhoH ノックアウトにおいては胸腺細胞数が増加し、自己反応性のはずの CD8-SP が出現していた。この表現型は正の選択が起こる HY メスの表現型と酷似しており、RhoH の欠損により TCR のシグナルが減衰して負の選択が正の選択へとシフトした可能性が考えられる。

さらに興味深いことに、RhoH ノックアウトマウスにおいては通常の T 細胞の分化は著しく抑制されているのに対し、アゴニスト選択を受ける制御性 T 細胞および CD8 α IEL の分化は全く抑制されていないことを見いだした。この発見は、蛍光ナノ粒子を用いた高感度組織染色法によって腸管内の IEL (CD8 α および CD8 β 分子) を高感度で可視化できた結果であり、蛍光ナノ粒子を用いたことによるところが大きい。

成熟 T 細胞のシグナル伝達に関しては、TCR 刺激による増殖はほぼ完全に阻害されていた。RhoH ノックアウト T 細胞では TCR 刺激による LAT、ERK のリン酸化が強く抑えられており、RhoH が TCR の下流でシグナル伝達に関与していることが示された。

(3) 腹腔内炎症応答制御法の開発と応用班：

マウスを用いて腹腔マクロファージ (Pmf) が炎症後及び外科手術後の臓器癒着部位の漿膜側細胞塊に特異的に集積することを見だし、そのメカニズム研究を行った。その結果、以下に示す腹腔内の新規自然免疫応答が明らかになった。すなわち、腹腔壁と臓器を包む中皮細胞が、

炎症刺激を受けるとケモカイン CCL1 を産生する。Pmf も炎症刺激及び CCL1 により 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。CCL1 のオートクリン機構には positive feedback 機構が働く。さらに Pmf の接着分子の発現も高くなる。このため Pmf は傷害中皮細胞の局所にとどまって細胞塊を形成しながら癒着を誘導する。これらの結果に基づき我々は CCL1-CCR8 作用の阻害により開腹術後の癒着を阻害できることを in vivo モデルでも示した。

本研究ではこれまでのマウスの研究成果に基づき、ヒト及びマウス腹腔内の CCL1 の検出を試み、また、その応用として、開腹術における腹腔内炎症が、癌の転移巣形成促進効果があることを検証する in vivo 実験を行った。

(4) マラリアワクチン DDS に向けての基礎研究班：本年度はナノ技術によって、マラリア感染に対する予防効果を持つと期待されるマラリアワクチンの DDS 化研究を行い、次の3点について成果を得た。

(1) DDS 化に用いる7種類の高分子材料の化学合成。(2) 生分解性高分子を用いた人工抗原微粒子について作成法の比較と改良。(3) マラリア原虫とワクチンを可視化するためのナノ蛍光プローブの化学合成。

(5) 破骨細胞形成および活性化過程における細胞動態のバイオイメージング班：

遺伝子欠損マウス由来の骨髄細胞を使用した破骨細胞形成実験の結果から、複数の単核細胞が融合して多核細胞を形成する破骨細胞分化過程において、細胞遊走性に関与する OPN、CD44、CCR1、CCR5 が重要であることが示された。また、これらの細胞を細胞骨格構成タンパク質 (actin, tubulin, paxillin)、その再構成のために必要とされているシグナリング分子 (Rac1, Cdc42, PI3K, WASP, WAVE2) に対する抗体を用いて免疫2重染色を行った結果、それらの細胞内局在が厳密に制御されていることが示された。さらに、CCR1 遺伝

子欠損マウス由来の骨髄細胞では骨形成を担当する骨芽細胞の分化が顕著に低下しており、ミネラル沈着が全く観察されなかったことから、骨吸収と骨形成間のアンカプリングが起きていることが示唆された。今後、まだ解明されていない生理的な骨代謝回転に必要なカプリングファクターを検索するうえで重要な情報を与えることが期待される。

(6) 量子ドットを利用した硝子体可視化の試み班：

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

2) アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS 班：

アテロコラーゲンを構成するペプチド鎖にどのアミノ酸がいくつ含まれるかを検討した。アテロコラーゲンを化学修飾する場合の標的としては、一般的にリジン、あるいはアルギニンの様にアミノ酸側鎖にアミノ基を有するアミノ酸が標的となるからである。その結果、アテロコラーゲンを構成する3本のポリペプチド内にリジン、アルギニンは複数箇所存在することがわかった。次にアミノ基指向性の試薬を用いて化学修飾を試みた場合、アテロコラーゲン1分子あたり8から10分子結合したところで反応が停止することが判明した。この結果は、アテロコラーゲン分子においては、化学修飾できるような外側に側鎖を突き出したようなアミノ酸はごくわずかであることを示した。

ポリオーマウイルス属のSV40をベースにしたデリバリーシステムの開発をめざして、ヒトの悪性腫瘍の85%以上で活性を示すテロメラーゼのプロモーターを組み込んだベクターを開発した。このベクターは、*in vitro*の培養細胞への導入実験においては、複数のヒトがん細胞株のうち、乳がん細胞(MCF7)においてのみ、高度に働くことが判明した。

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：

本研究の目的は、ブロック共重合体から形成される高分子ミセル型遺伝子ベクターの機能評価と細胞に対する作用メカニズムの解析を通して、ベクター設計の最適化を行うことである。本年度は、PEGとポリカチオンがジスルフィド結合で連結されたブロック共重合体を合成し、プラスミドDNAと混合することによって、細胞内環境でPEGが脱離する高分子ミセル型遺伝子ベクターを開発した。さらに、このPEG脱離型の高分子ミセル型遺伝子ベクターの物性ならびに培養細胞に対する遺伝子導入効率、細胞内動態を解析し、ベクター設計の有用性を明らかにした。

(2) 循環器疾患に対する遺伝子治療用ベクターの開発班：

本研究の目的は、ナノテクノロジーを用いて、種々の機能を搭載した遺伝子導入ベクターを開発し、*in vitro*および*in vivo*において、安全で効率の良い遺伝子導入ベクターを開発すること、さらに、循環器疾患モデル動物を用いて治療実験を行い、遺伝子治療の臨床応用の基礎とすることである。我々は、ポリカチオンとポリエチレングリコール(PEG)のブロック共重合体を用いて、DNAと会合させると、DNAを内包してPEGが外殻を覆うcore-shell構造を形成し、DNAを外部環境より守ることを見出していた。本研究において、我々は、ブロック共重合体を改良し、*in vivo*におい

て著明な遺伝子発現が可能で、安全性が高い遺伝子導入ベクターの開発に成功した。カチオン性ポリマー部分に、緩衝能を有するポリマーPAsp (DET) を選択し、気管内投与による肺での著明な遺伝子発現増強に成功した。また、遺伝子導入後の肺組織の病理学的所見および炎症性サイトカインの遺伝子発現が、従来のポリマーに比べて非常に低く、安全性の面でも優れていることがわかった。さらに、PEG-PAsp (DET) を用いて、肺高血圧症モデルラットにアドレノメデュリンの遺伝子を気管内投与し、右室圧の低下および生存率改善という治療効果を認めた。本研究の成果により、臨床応用への道が開けたと言える。

C. まとめ

半導体などのナノ粒子を用いて薬物の伝達システムの開発及び遺伝子伝達システムの開発を目的に研究を行っている。また半導体ナノ粒子を用いた生きたままの細胞を染色しその生体内動態を解析し生体内の細胞トラフィック情報を利用して特定の場所に特定の細胞を伝達するシステムを開発している。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。

現在我々の製造するシリコンドットは直径 2 nm で表面加工として-OH 基、レモネン、オイゲノール、アルミノプロフェンによる 5 種類の新規な基を用いることに成功した。ここで-OH 基のものはシリコンドットの安全性についての検討に用いられシリコンドットが非常に安全であることが判明した。レモネン、オイゲノールは匂い分子による表面加工でありナノ粒子に匂いを付けることに応用され存在を感知することが可能となり感知することが可能である。アミノプロフェンは、抗炎症薬であり薬剤伝達に応用することが可能であり本研究のテーマである。シリコンとアミノプロフェンは Si-C の共有結合でありこれまでの Cd/Se 半導体担体と薬物が遷移結合より遥かに優れたものが得られた。

また細胞伝達システムの開発研究に付いては破骨細胞が 2 つのケモカインがその生理的状态に於いて重要であることが変研究で解明され、その各々のノックアウ

トマウスの解析により一方では骨異常を示すことが本研究で初めて判明した。またこの両ノックアウトマウスに共通して骨粗鬆を起こしていることから骨代謝にとって極めて重要であることが示された。

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または、分担者の項参照。

F. 知的財産権の出願・登録状況

1) 非ヒトトランスジェニック動物

出願番号：特願 2007-06445 発明者：斯

波真理子、高木敦子

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

出願日：平成 19 年 3 月 14 日

2) コレステロール低下作用を有する水溶性高分子架橋体

出願番号：特願 2007-060874

出願人：国立大学法人筑波大学

発明者：長崎幸夫、大石基、斯波真理子

出願日：平成 19 年 2 月 13 日

管理番号：P18-58-1

3) 高コレステロール血症の疾患モデルマウス

出願番号：特願 2005-243938

発明者：斯波真理子

出願人：国立循環器病センター

総長

出願日：平成 17 年 8 月 25 日

4) 染色体性劣性高コレステロール血症遺伝子における新規変異

特許第 3709438 号

出願番号：特願 2002-130779

発明者：斯波真理子

出願人：国立循環器病センター

総長

出願日：平成 14 年 5 月 2 日

公開番号:特開 2003- 319783

公開日:平成15年11月11日

- 5) 奥 浩之、俵 義宣、片貝良一、佐藤久美子、鈴木 守、狩野繁之 「熱帯熱マラリア原虫蛋白質を内包したナノ・マイクロ微粒子の製造法」 国立大学法人群馬大学、2008年3月特許出願予定

- 6) 片岡一則、ジャン ミンゼン、石井篤史、西山伸宏、松本悟: ポリエチレングリコールの結合した核酸のコンジュゲートとリン酸カルシウムの有機-無機ハイブリッド型ナノ粒子、特願 2007-280803

- 7) 片岡一則、熊谷康顕、狩野光伸、関野正樹、松浦哲也、西山伸宏、宮園浩平: 腫瘍撮像用 MRI 造影剤、特願 2007-124908

- 8) 片岡一則、原島秀吉、小暮健太郎、箕浦ありさ、ブロック共重合体ミセルの脂質被膜技術、特願 2007-085626

半導体などナノ粒子による薬剤・細胞伝達システムの開発

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	大田敏博	東京薬科大学生命科学研究部環境分子生物学・准教授
協力研究者	鈴木和夫	千葉大学大学院医学研究院免疫発生学・客員教授
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

半導体などのナノ粒子を用いて薬物の伝達システムの開発及び遺伝子伝達システムの開発を目的に研究を行っている。また半導体ナノ粒子を用い生きたままの細胞を染色しその生体内動態を解析し生体内の細胞トラフィック情報を利用し特定の場所に特定の細胞を伝達するシステムを開発している。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。

現在我々の製造するシリコンドットは直径 2 nm で表面加工として-OH 基、レモネン、オイゲノール、アルミノプロフェンによる 5 種類の新規な基を用いることに成功した。ここで-OH 基のものはシリコンドットの安全性についての検討に用いられシリコンドットが非常に安全であることが判明した。レモネン、オイゲノールは匂い分子による表面加工でありナノ粒子に匂いを付けることに応用され存在を感知することが可能となり感知することが可能である。アミノプロフェンは、抗炎症薬であり薬剤伝達に応用することが可能であり本研究のテーマである。シリコンとアミノプロフェンは Si-C の共有結合でありこれまでの Cd/Se 半導体担体と薬物が遷移結合より遥かに優れたものが得られた。

また細胞伝達システムの開発研究に付いては破骨細胞が 2 つのケモカインがその生理的状態に於いて重要であることが変研究で解明され、その各々のノックアウトマウスの解析により一方では骨異常を示すことが本研究で初めて判明した。またこの両ノックアウトマウスに共通して骨粗鬆を起こしていることから骨代謝にとって極めて重要であることが示された。

A. 研究目的

本研究は、半導体ナノ粒子を用いて薬物や遺伝子の伝達システムおよび人体の持つ細胞の臓器特異的伝達システムを解析し疾病のメカニズムの解明と治療法の開発を目的に行なっている。またそれに伴い、半導体などナノ粒子の細胞毒性などの安全

性について検討し、人体に所用できる安全なナノ粒子の開発を行ない、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。また半導体ナノ粒子により特定の細胞を生きのまま染色し動物個体に戻すことにより、その細胞の生体内に於ける動態を経時的に追跡する事が可能である。それによりその細胞の生理的役割を検討することによりその細胞の機能が不調になった場合の変化を観察することにより疾病に関する新しい知見を得ると同時にその対策も考えることが可能となる。

我々は、このような研究を行うため人体にも使用できる安全なナノ粒子の開発と新規な表面加工によるナノ粒子の安全性を高める研究を行う。そのためこれまで使用していた2族6族の半導体から、新たに4族を用いた半導体の開発を行ないその細胞毒性についての検討を行う。またそれに伴い半導体ナノ粒子の製造過程に於ける作業従事者の労働安全性の向上を目的に従来では認識不可能であったナノ粒子のヒトによる感知する事が可能なる表面加工を開発することにより今後利用されるナノ粒子の被曝をできる限り少なくすることが可能とする。

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、従来製造していたカドミウム/セレン半導

体結晶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・シェル型ナノ粒子に加え、新たにシリコン結晶（シリコンドット）を低分子有機化合物で被覆したハイブリッドナノ粒子である。

従来用いていたカドミウム/セレン半導体の製造方法については従来と同じ方法であるのでこれまでの報告書（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/半導体等ナノ粒子による生物医療応用平成14年度から平成18年度主任研究者/山本健二）を参照されたい。

シリコンドットは、現在我々の研究グループでは2つの異なる方法を用いて行なっている。その一つは東京電機大学平栗教授の行なっている方法であり、この方法は、レーザーエッチング法によるものである。この方法は、周波数の一定なレーザー光を材料とするシリコン結晶に照射しそのレーザー光とほぼ等しい大きさの均一なナノ粒子を製造し、次にフッ酸による化学エッチングによりより均一な粒子径のシリコンドットを得る事ができる。もう一つの方法は、ニュージーランドの Richard Tilley 教授による方法であり、この方法では有機溶媒を用いて高速攪拌器によってミセルを造り、強力な還元剤で還元することによりそのミセルにてシリコン結晶を製造することによって得られるものである。

それぞれの方法にそれぞれ一長一短があり。前者の方法は、非常に大量に製造できるため毒性の少ないシリコンドットの細胞毒性を測定するには好適では有るが、製造

されたシリコンドットの表面は $-Si-OH$ と成っておりこれ以上の表面加工には手間がかかる。一方後者の方法では本年の研究開始した当初 $1\mu g/人日$ であったため前者に比べ生産量が3桁程劣っていたがシリコンドット側の表面に存在するSi元素と断端に $C=C$ 二重結合のある有機化合物の間で $-Si-C$ 共有結合を構成することに成功したため比較的容易に表面加工できることが判明した。またそれと同時に後者の様に表面加工したシリコンドットは、表面に高分子を工夫すれば、非常に長く酸化等されずに安定に存在することが可能であることが示された。

これら二つの加工法は、その用途によって使い分けられている。シリコンドットはもとより細胞毒性の少ないナノ粒子であるため、細胞毒性を試験するには大量のシリコンドットを必要とする為前者の方法により製造したものを使用している。またシリコンドットの安全性の為に認識可能な様々な匂いを付けるためには、表面加工の簡単な後者の方法を用いて行なっている。

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、様々な研究グループにおいて検討されている(産業総合研究所あるいは、科学技術振興調整費によるナノ粒子の安全背に関する研究など)。これまでにMTT法によりミトコンドリアの呼吸能力の計測(Shiohara A et al., *Microbiol. Immunol.* 2004)を、またナノ粒子による遺伝子毒性の定量的評価法

としてコメント法による判定を導入し(Hoshino A et al., *Nano Letters.* 2004)いる。

その後カドミウム/セレン半導体については、紫外線照射により蛍光を出している間に半導体ナノ粒子が崩壊しカドミウムイオンが溶出し細胞毒性を表す様になることを示唆する論文が出されている。そのため我々は、シリコンナノ粒子の製造に力を入れ安全なナノ粒子作りに成功した。その細胞毒性評価に付いては上記MTTアッセイ以外に細胞膜の障害を測定する乳酸脱水素酵素濃度の試験を導入しシリコンナノ粒子の細胞毒性の検討を行なった。

C. 研究結果

1) シリコンドットの製造：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。本研究の目的は、半導体ナノ粒子を用いて薬物や細胞の伝達システム開発研究である。またそれに伴い、半導体などナノ粒子の細胞毒性などの安全性について検討すると同時に一桁ナノ粒子の持つ量子サイズ効果による発光する蛍光ナノプローブを医療用に応用し、更に安全なナノ粒子を設計・製造することを目的としている。

さらに今後の医療応用のため安全で安心な薬物キャリアーを手にする目的により、本年度は、シリコンドットを開発した。またさらにこのシリコンドットを利用し薬物となる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。

図1にその構造を示す。アミンとシリコンクラスターは、Si-Cの共有結合である

図2は、透過型電子顕微鏡像である。格子が認められる。

図1

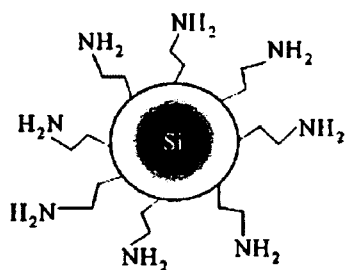


図2

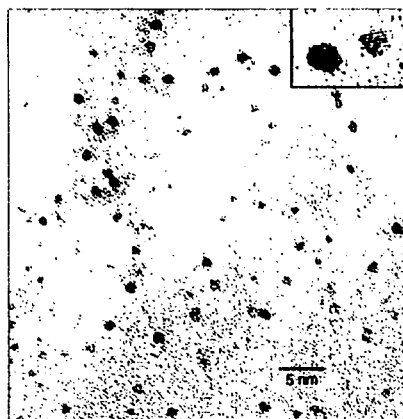


図3にシリコンドットによる細胞染色を示す。尚現在の生産能力は10mg/人日となり昨年度に比べ1000倍の量が生産できる。

図3 シリコンドットによるHella細胞染色



2) 抗炎症薬アルミノプロフェンの Si 医薬:

プロスタグランジン合成酵素シクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害剤である抗炎症薬アルミノプロフェン (ユーシービー社製) を用いてシリコンドットに共有結合で結合した。図4に走査型電子顕微鏡像を示す。

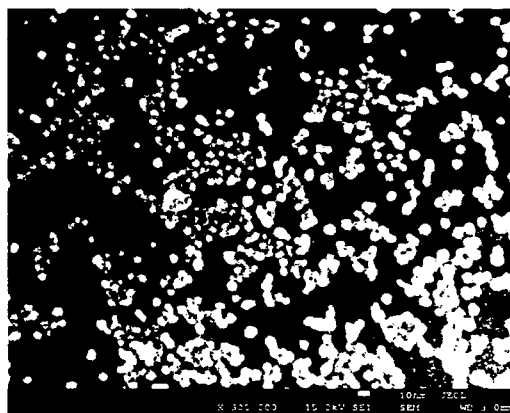


図4 抗炎症作用を有する Si 医薬

今後作用効果に付いて *in vitro* および動物を使った *in vivo* において検討する予定である

3) 匂い分子によるナノ粒子の安全性

ナノ粒子を用いた研究および実用化においてナノ粒子の安全性について十分な検討をされなければ成らない。ナノ粒子製造後パウダーで保存されることが多い。パウダー

の融点や溶融点は高温であるため室温で作業するに当たって特に問題はない様に考える研究者が多い。ところがパウダーは粉体として舞い上がる可能性がある。そこでシリコンドットに匂い分子を結合し、結合する前後で匂いが異なって認識するように工夫しておく。本研究では匂い分子として Eugenol を用いて行なった。室温において十分匂いを確認することができた。今後の安全性についての取り扱いが十分検討されなければ成らない。

4) 非リンパ球免疫細胞の細胞伝達システムの開発：従来の我々の研究により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に寄与した。

本研究では今年度骨髄単球から破骨細胞を誘導しその細胞を用いて生理的骨の代謝を解析した。前述の腹腔マクロファージの時と同じ要領で解析した結果2つのケモカインが重要であることが判明した。各々のケモカインノックアウトマウスを解析することによって破骨細胞によるこれらのケモカインにおける生理的意義を解析した。其の結果、両ケモカインが骨の生理的代謝に非常に重要であることが判明した。特に一方

のケモカインは、顎骨の発育に非常に重要でありそれが機能しない時には不整咬合が起こり受け口になるという極めて特徴的な様相となり、その他の部位の骨の異常と合わせ大変興味ある結果と成った。

図5に骨髄単球から誘導した Osteoclast(破骨細胞)を示す。破骨細胞は数十個の細胞が癒合し、成熟して機能を発する。細胞周辺の光っている部分がアクチンのリモデリングにより構築されたアクチンリングである。これは破骨細胞に特徴的で骨表面にある破骨細胞が骨を溶かす時にそのフォスファターゼを空間的に閉じ込める働きがあり、其の結果高濃度にフォスファターゼを一定場所に保持することが可能である。

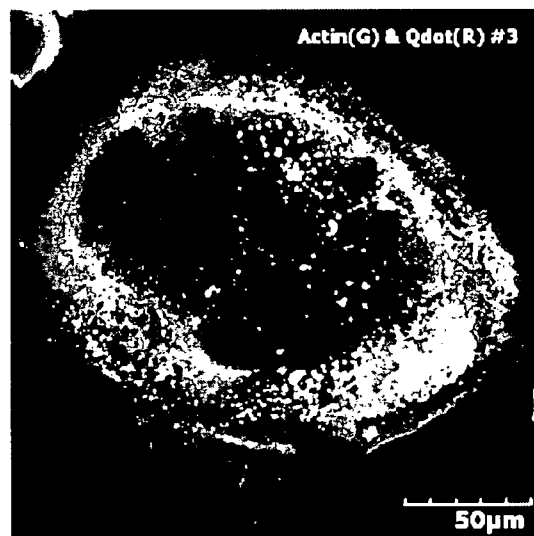


図5 アクチンリングを有する破骨細胞

D. 考察

1) 達成度について

初年度としてシリコンドットの安全性について検討しカドミウム/セレンに比べて一

桁以上の濃度でも安全であることが確認された。また3桁オーダーで合成能力を高めた。さらにモデル薬剤として抗炎症剤であるアルミノプロフェンをシリコンドットに結合しシリコンドット医薬を製造することに成功した。また破骨細胞を単球から誘導し正常破骨細胞としてその細胞動態を量子ドットを使って解析した結果2つのケモカインが生理的状态において極めて重要であることが判明した。またこれらのおおののノックアウトマウスの解析により額関節など骨異常が認められ極めて特徴的であった。初年度ではあるがこれまでの蓄積を合わせて極めて成果の多い研究期間であった。

2) 成果の学術的・国際的・社会的意義について

シリコンドットを大量に製造する技術は国際的にも競争している分野である。特に太陽電池等の効率を上げるため鎊を削っている分野である。現在ミリメートル単位のシリコンボール型結晶はkg単位に入っているが1nm単位では、1バッチ10mg付近の生産量で競い合っている。本研究も現在その近辺であるが目標を1バッチ1gを目指して開発を続けている。シリコンドットを薬剤伝達担体として用いるのは本研究が最初であり、安定性と安全性を確かめカドミウムセレン半導体よりも一桁高い安全性があることを世界に先駆けて示した。安全な薬剤伝達担体を利用して低侵襲の薬物療法が可能となり社会的意義も大きい。

3) 今後の展望について

半導体ナノ粒子は、蛍光強度が強くその寿命も永いためその生物・医療応用を始めさまざまな分野でその利用について検討されている。しかしその安全性については不透明なことが多い。本研究において我々は、シリコン結晶を利用し安全な蛍光ナノ粒子を製造しヒトに安全な薬物伝達システムを構築し新たな薬物治療法を開発することの可能性が高まった。また破骨細胞のケモカインレセプターを制御することにより特別な病気における骨粗鬆症の治療に役立つだろうと考えている。

E. 結論

本年度は、半導体ナノ粒子を生物・医療に応用するため更に安全で安心な成分からできているシリコン量子ドットを従来の倍量の生産効率にした。またこのシリコンドットに抗炎症剤、匂い分子など低分子化合物を結合させることに成功した。今後のシリコン医薬の開発に道が開けまた匂い分子の結合したシリコンドットにより粉体としてのナノ粒子の安全性について更に深い知見が今後得られると考える。

さらに今年度、骨髄免疫前駆細胞からは破骨細胞を誘導することに成功し、更に誘導された破骨細胞を生きたまま量子ドットで染色することに成功した。また2つのサイトカインが重要であることが判明した。さらにそのノックアウトマウスの解析により骨粗鬆症との関係が明らかにされた。