

200812022A

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-012)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

山 本 健 二

平成21（2009）年3月

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-012)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

山 本 健 二

平成21（2009）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

研究代表者

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 DDS 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) 11

2) 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) . 20

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) . . . 22

4) 蛍光ナノ粒子による高感度染色法を用いた ISC4 遺伝子の機能解析

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) 27

5) DDS 開発に向けた MPO 抗体による血管炎の解析

鈴木和男(千葉大学大学院医学研究院・特任教授) 32

6) 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) 43

7) 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) 48

8) ナノ粒子標識による癌特異抗体のシグナル増強と診断法の確立

馬目佳信(東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター

DNA医学研究所分子細胞生物学・教授) . 51

9) Developing and testing the toxicity of mitochondria-targeted Silicon Quantum Dots

ジョナサン ヘドル(Jonathan HEDDLE 東京工業大学

/グローバルエッジ研究院・特任准教授) 56

2. アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS 研究班

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・がん転移研究室・室長) 61

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)	66
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・教授)	72
III.	研究班会議	81
IV.	研究成果の刊行に関する業績一覧	93
V.	研究成果の刊行物・別刷	103

平成 20 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)

研究代表者総括研究報告書

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

研究代表者

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)

ジョナサン・ヘドル (東京工業大学先端研究所・助教)

馬目 佳信 (東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター・教授)

2. アテロコラーゲン・ナノ粒子によるDDS研究班

落谷孝広 (国立がんセンター研究所・腫瘍転移・室長)

3. ナノミセルによるDDS研究班

斯波真理子 (国立循環器病センター研究所・バイオサイエンス部・室長)

片岡一則 (東京大学大学院工学系研究科・材料学・教授)

研究概要

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する、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もある。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場合もある。このような予期せぬ副作用が、人体のいかなる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もした。これらの技術を通じ、興味ある薬物や細胞の人体臓器局在性を知ることにより、コントロールすることも可能に成り、其の結果安全な薬物治療を行なうことを可能ならしめると考える。

そのため本研究では以下に示すよう、半導体ナノ粒子、アテロコラーゲンナノ粒子、ブロック共重合体を用いた薬剤伝達システムの開発を行っている。

1) 半導体ナノ粒子を用いた薬剤・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マクロファージなど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および副作用の低減に関する研究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、人体に用い得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。

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、成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。

本研究におけるアテロコラーゲン・ナノ粒子や人工ウイルスベクターの研究結果

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ことを期待している。

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の遺伝子発現メカニズムについて検討を行い、細胞による取り込み過程やエンドソームから細胞質内への移行過程が重要であることを確認してきた。そこで本年度は、ポリプレックスを用いた遺伝子デリバリーにおけるDNAの脱凝縮過程に着目し、Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)を利用した核内でのDNAの脱凝縮過程の評価と蛍光タンパク質の遺伝子発現評価を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM)を用いて同時に行い、その関連性を明らかにした。その結果、核内におけるDNAの脱凝縮が遺伝子発現において重要であることが分かった為、PLys鎖長の異なるPEG-b-PLysブロック共重合体によってDNAの折り畳みを制御した高分子ミセル型ベクターを構築し、cell-free系での遺伝子発現を評価したところ、DNAの折り畳み構造が遺伝子発現において重要であることが明らかとなった。

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でより疾病治療、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るが、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あるが、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、表面か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よう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ついては上記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。

さらに本年偶然に2つのケモカインレセプター(CCR1 および CCR5) が骨代謝に重

要な働きをする事が明らかにされ、更に下顎骨における不整など口腔内疾患に関連する可能性が示唆された。それに伴い臨床研究を開始する予定と成っている。

(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。

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、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・細胞伝達システムの開発

(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) マラリアワクチン開発に向けてのナノメディシン研究

(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: 骨破壊病態モデル動物を用いて

(6) 量子ドットを利用した硝子体可視化の試み

(7) DDS 開発に向けた MPO 抗体による血管炎の解析

(8) Developing and testing the toxicity of mitochondria-targeted Silicon Quantum Dots

(9) ナノ粒子標識による癌特異抗体シグナル増強と診断法の確立

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、特にシリコンナノ粒子などを用い、安全で有効な薬物伝達システムの開発と遺伝子伝達システムの開発を目的に開発研究を行っている。また半導体ナノ粒子を用い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。本年は特に、破骨細胞を標的にして研究を行った。さらに、半導体シリコンナノ粒子の細胞毒性などの安全性について評価した。

我々が新規に開発した製造法により合成されたシリコン量子ドットは直径 2 nm である。即ちこのナノ粒子は、量子サイズ効果を持ち、クラスター構造の有する半導体ナノ粒子である。これを用いた細胞阻止濃度が IC50% である事を発表した (Fujioka et al, Nanotechnology, 2008)。さらに非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID) であるアルミノプロフェンの C=C 分子断端と Si-C の共有結合をしたシリコン量子ドットは、原末の薬剤よりも安全性が増すことが判明した。

遺伝子導入効率の高い遺伝子担体としても有効である事が判明し (Hoshino et al, Nanotechnology, 2008) その導入効率が 10% 以上と非常に効率が良い結果を得た。

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 CCR1 と CCR5 の 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世界で初めて解明された。またその各々のノックアウトマウスの解析により、ヒトの疾病で極めて近いタイプのケースが見つかり臨床研究を行う準備を現在開始した。さらに CCR5 は、AIDS 治療薬として開発されている事から興味深い。

(2) 蛍光ナノ粒子による高感度染色法を用いた ISC4 遺伝子の機能解析

ISC4の組織特異的発現について検討を行った。マウスの各組織、細胞を調製し、RT-PCR法によりISC4のmRNA発現量を測定したところ、データベースでの予想通り、胸腺、脾臓などのリンパ器官にのみ発現しており、他の臓器での発現はみられなかった。さらに、セルソーターを用いて胸腺細胞を分画したところ、CD4、CD8ダブルポジティブ (DP) 細胞画分に非常に強い発現がみられた。

ISC4ノックアウトマウスは胎生致死にはならず、メンデリズムに従って産まれてきた。胸腺の大きさは全く変化がなく、総細胞数も野生型と変らなかつたが、CD4シングルポジティブ (SP) 細胞およびCD8-SP細胞の数が激減しており、胸腺での正の選択が著しく阻害されていることが明らかとなった。新生児においてもCD4-SPの分化が抑制されていることから、正の選択が抑制されていることは明らかであり、ISC4が胸腺細胞の正の選択に重要な働きをしていることが初めて示された。

さらに、TCR-Tgと交配することにより、クラスI拘束性のTCRも、クラスII拘束性のTCRも、いずれの正の選択も阻害されていることが明らかとなった。また、興味深いことに胸腺におけるCD4-SP、CD8-SPの生成が強く阻害されているのに対し、末梢組織における成熟T細胞数の減少は比較的穏やかなものであった。

一方、HY TCR-TgマウスとISC4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ISC4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、ISC4ノックアウトにおいても自己反応性T細胞の除去は正常に起こっていた。したがって、ISC4は負の選択には必要ないことが明らかとなった。

ISC4分子の機能を推測することが困難であるため、このタンパク質の細胞内での局在を検討することは極めて重要である。我々は細菌に発現させたISC4タンパク質を抗原として用いて抗ISC4抗体を作製することに成功した。胸腺細胞をこの抗体と蛍光ナノ粒子 (カンタムドット) 標識した抗ウサギ抗体を用いて、高感度に染色し、蛍光観察を行った。その結果、ISC4タンパク質は細胞質内にdiffuseな状態で存在していることが明らかとなった。この抗体の染色はシグナルが弱く、蛍光ナノ粒子を用いた標識抗体を用いた結果、はじめて可視

化できるようになった。

成熟T細胞のシグナル伝達に関しては、TCR刺激による増殖およびIL-2産生は阻害されておらず、ISC4がシグナル伝達に関与しているかどうかは依然として不明である。

(3) 腹腔内炎症応答制御法の開発と応用班:

腹腔内の炎症によっておこる腹膜炎癒着は開腹術後の合併症として頻度の高いものであるが、ときに致命的となることもあり、患者の負担だけでなく医療経済的な負担も大きい。我々は開腹術時に投与することによってその後の癒着を予防する方法を開発することを目的として、マウスを用いて癒着モデルの作成を試み、低分子化合物による癒着の予防効果の評価を行った。その結果、無菌的な癒着モデルに比べて感染を伴うモデルは強い癒着を伴い、無菌的であっても消化管壁の焼灼により癒着が強くなることを見いだした。マクロファージに対するケモカイン作用を抑制する低分子化合物をこれらのモデルの手術直後に腹腔内投与したところ、マクロファージ遊走抑制効果を持つ化合物の癒着防止剤としての有効性が示された。

(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研究を行い、次の4点について成果を得た。(1) 人工抗原ペプチドの化学合成、(2) 微粒子に有用な新しい高分子材料の化学合成、(3) マラリア抗原とワクチンの可視化に有用なナノ蛍光プローブの効率的化学合成、(4) 人工抗原ナノ微粒子の生分解と抗原放出

(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キング班:

関節リウマチ、歯周病、骨転移腫瘍などでは骨代謝バランスの崩壊により、重篤な骨破壊が起こる。その結果、歩行困難・歯の喪失・耐え難い骨痛などが生じ、患者のQOLは著しく損なわれる。骨代謝カプリングは全身因子および局所因子の両方により厳密に制御されているが、骨破壊部位では骨吸収活性を有する破骨細胞のみならず、炎症・免疫細胞が深く関与するため、その病態は非常に複雑である。すなわち、病態を解明するためには複数の細胞種がインタクトな相互作用を保っている in

vivo における研究が必須であると考えられる。本研究では効果的な治療薬を開発することをめざして、ナノ粒子などを用いたバイオイメージング手法による研究を行い、炎症性骨破壊に関与する破骨細胞の体内動態について、時空間情報を得ることができた。また、本年度、主として行った病態モデルの作製に加えて、骨吸収抑制のみならず、抗炎症作用と骨形成作用を併せ持つ治療薬の開発について、実験動物において評価できる成果をあげることができた。

(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。

(7) DDS 開発に向けた MPO 抗体による血管炎の解析班：

DDS に利用する量子ドット(QD) 標識抗体を用いて、血管炎の治療法とイメージング法を開発する。これまで QD で標識した Myeloperoxidase 抗体(QD-antiMPO)が、好中球表面のMPOを高感度かつ迅速に検出可能であることを示した。本年度は、QD-antiMPO の反応に加え、好中球を活性化する TNF- α による血管内皮細胞へ作用と IgG による血管内皮細胞の傷害抑制作用を *in vitro* で解析した。血管内皮細胞を、TNF- α あるいは IgG によって刺激し、TNF- α による活性化、および IgG による抑制作用を解析した。TNF- α 刺激で炎症 cytokines は、IL-6, IFN- γ および chemokines KC, MIP-2 の発現が誘導された。TNF- α の細胞との反応は、量子ドット QD655 標識 TNF- α (QD-TNF- α) により解析した。TNF- α により活性化された血管内皮細胞の炎症 cytokines および chemokines 産生を IgG が抑制した。

(8) Developing and testing the toxicity of mitochondria-targeted Silicon Quantum Dots :

In our project we are attempting to work with collaborating partners to construct artificial delivery systems that can produce therapeutic and

diagnostic material with high specificity to the interior of mitochondria. In particular we are interested in the possibility of delivering quantum dots (QDs) as imaging and diagnostic agents. Our main proposal is to test the toxicity of such delivery systems to eukaryotic cells.

(9) ナノ粒子標識による癌特異抗体のシグナル増強と診断法の確立：

本研究は分担者らが1996年に樹立したヒト甲状腺癌に対する特異抗体:JT95 に対しナノ粒子修飾を行うことで抗体の癌特異的シグナル増強を図り、診断・治療応用に向けた最適診断条件の確立を目的としている。この特異抗体によるがんの確定診断は生体への侵襲を考慮し、簡便で非侵襲的な尿による診断を最終目標と設定している。本年度の研究では最終目標に向かうための第一段階として、カドミウム・セレン量子ドットによる JT95 抗体の標識を行いその活性・応用性の評価を行なった。ELISA 法によるナノ粒子修飾抗体の活性測定では抗体が本来の活性を失うことなく甲状腺癌抗原と特異的に反応することが確認できた。また、免疫組織染色でも甲状腺癌抗原を特異に認識し選択染色できることが共焦点顕微鏡で示された。この JT95 が認識するがん抗原は糖鎖フィブロネクチンであり、甲状腺癌組織には固有の修飾変異型で発現しがんの転移・増大に大きく関与するとされている。このマーカーを標的とした、ナノ粒子修飾甲状腺癌特異抗体によるがんの早期診断、確定システムが開発されれば、現在、甲状腺癌の確定診断に用いられている Fine Needle Aspiration (FNA) : 穿刺吸引細胞診を行うことなく、非侵襲的な確定診断が可能となる。

2) アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS 班：

アテロコラーゲンは様々な核酸物質と静電的な結合で複合体を形成し、細胞や組織へと内包した核酸類をデリバリーする。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目的として、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。このベクターとアテロコラーゲンの複合体を形成させることで、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、その動物個体レベルでのデリバリー解析の結果、この複合体は乳がんの腫瘍部位に特異的に集積し、その他の前立腺がんや大腸がんには無効であった。

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、ポリプレックスを用いた遺伝子デリバリーにおいて核内のDNA脱凝縮過程と遺伝子発現の関連性を評価したところ、核内におけるDNAの脱凝縮が遺伝子発現において重要であることが分かった。この知見に基づいて、Poly(L-lysine) (PLys) 鎖長の異なるPEG-b-PLys ブロック共重合体を用いることによって、DNAの折り畳みを制御した高分子ミセル型ベクターを構築し、cell-free系での遺伝子発現を評価したところ、DNAの折り畳み構造が遺伝子発現において重要であることが確認された。

(2) 循環器疾患に対する遺伝子治療用ベクターの開発班:

有効で安全性が高く、将来の臨床応用を目指して我々は、poly(ethylene glycol, PEG)-ポリカチオンのブロック共重合体を用いた高分子ミセル型ナノ構造デバイスの開発を行っている。ポリカチオン部分にP[Asp-(DET)]を用いてPEG-b-P[Asp-(DET)]にすることにより、in vivoでの遺伝子導入効率を飛躍的に上昇することが昨年度までの研究成果より明らかになってきた。さらに、肺高血圧症モデル動物に対してPEG-b-P[Asp-(DET)]を用いたアドレノメデュリン遺伝子を導入することにより、明らかな治療効果を得たこともすでに報告した。今回は、今後の臨床応用への展開に際して、安全性の検討を行なった。すなわち、ポリマーの精製法および重合度の相違するブロック共重合体についてin vivo実験による遺伝子導入効率測定および毒性試験を行い、経気管的遺伝子導入に最適な条件を検証し、臨床応用

へのステップとした。

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

研究代表者 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・助教授
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、特にシリコンナノ粒子などを用い、安全で有効な薬物伝達システムの開発と遺伝子伝達システムの開発を目的に開発研究を行っている。また半導体ナノ粒子を用い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。本年は特に、破骨細胞を標的にして研究を行った。さらに、半導体シリコンナノ粒子の細胞毒性などの安全性について評価した。

我々が新規に開発した製造法により合成されたシリコン量子ドットは直径 2nm である。即ちこのナノ粒子は、量子サイズ効果を持ち、クラスター構造の有する半導体ナノ粒子である。これを用い細胞阻止濃度が IC50% で有る事を発表した (Fujioka et al, Nanotechnology, 2008)。さらに非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID) であるアルミノプロフェンの C=C 分子断端と Si-C の共有結合をしたシリコン量子ドットは、原末の薬剤よりも安全性が増すことが判明した。

遺伝子導入効率の高い遺伝子担体としても有効である事が判明し (Hoshino et al., Nanotechnology, 2008) その導入効率が 10% 以上と非常に効率が良い結果を得た。

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 CCR1 と CCR5 の 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世界で初めて解明された。またその各々のノックアウトマウスの解析により、ヒトの疾病で極めて近いタイプのケースが見つかり臨床研究を行う準備を現在開始した。さらに CCR5 は、AIDS 治療薬として開発されている事から興味深い。

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) シリコン量子ドットの安全性と生産量拡大：

シリコンは、4 族元素であり周期律表において炭素の下にある。現在我々は、ダイヤ

モンドについての安全背についても検討しているが、シリコン、炭素両元素ともに非常に安全であることが判明して来た。

この方法は、ニュージーランドの Richard Tilley 教授による初めて開発された方法であり、有機溶媒を用いて高速攪拌器によってミセルを造り、シリコン塩化物を強力な還元剤で還元することに溶媒のミセルにてシリコン結晶を製造する方法である。本方法では、少量のみ製造可能であったが（1 バッチについて 1 mg 程度）容器を工夫することにより 20 倍の製造を可能にした技術開発を行なった。

2) アルミノプロフェン・シリコン量子ドット薬：

上記の様にして得られた毒性の少ないシリコン量子ドットをドラッグキャリアーとして本研究では、利用した。一つのシリコン量子ドットについて約 50 分子のアルミノプロフェンをその C=C 二重結合断端と Si クラスターのシリコン原子による Si-C 共有結合を生成することにより製造した結果得られたアルミノプロフェン・シリコン量子ドット薬を開発した。このシリコン量子ドット薬は、原木のアルミノプロフェンより細胞毒性が少ない事が認められた。またその力価は、さらに向上していると言う結果に成り現在この減少の解析を行なっている。

この 2 つの効果が一般的であるなら、或は特殊であったとして如何なる原理によることを解明することにより力価の大きい、非常に安全なシリコン量子ドット薬が開発

されることを期待している。アルミノプロフェンは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であるゆえリウマチなど多くの分野に使用されることも期待している。

3) シリコン量子ドット遺伝子導入キャリアの開発:

本研究では、薬剤のみならず、遺伝子などの高分子を細胞内に導入し安全な遺伝子治療の開発を目指して研究を行なっている。

今年度の研究成果として細胞レベルでの遺伝子導入キャリアーとしてその有用性を示した。

モデル導入遺伝子は、真核生物コドン頻度に合わせた緑色蛍光蛋白 eGFP を使い、マウス由来株化培養細胞に遺伝子導入させる事に成功した。方法は、eGFP に関わる PCR プライマーを設計、合成し一方のプライマーをビオチン化して量子ドットの表面に存在するアビジンに結合させる。そのビオチンアビジンにより結合した eGFP プライマー量子ドット複合体を、テンプレートである eGFP ともう一つの eGFP プライマーを用いてポリマーレース連鎖反応を行なった結果得られた eGFP 遺伝子量子ドット複合体を用いて実験に使用した。

4) 破骨細胞発生と量子ドット染色:

マウスから取り出した骨髄細胞を 10ng/ml の M-CSF を含む MEM 培地にて 24 時間培養した後、破骨細胞に分化させる骨髄マクロファージとして浮遊細胞分離する。さらに 10 日間 10ng/ml の M-CSF を含む MEM 培地

にて培養し、セファデックスカラム (Sephadex G-10 microspheres : Amersham biosciences 社製) を通して浮遊して通過するものを分離し 10ng/ml の M-CSF と 20 ng/ml の RANKL を含む MEM 培地で 4 日間培養し前破骨細胞を得る。その後、細胞数を 5×10^4 cells/ml に整えた条件で量子ドットを添加し細胞染色を行なう。さらに約 14 日から 21 日同じ培地で 4 日に一回培養液の液替えをして培養し続ける。

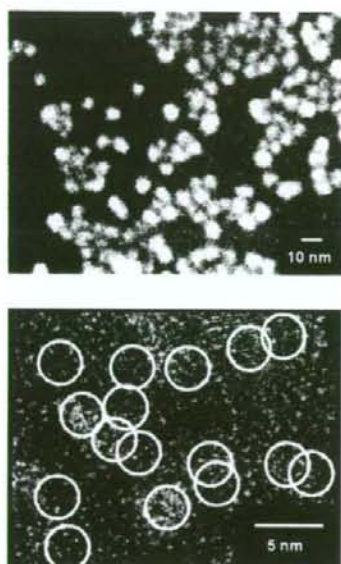
C. 研究結果

1) シリコン量子ドットの開発と安全性:

本年度は特にシリコン量子ドットに関する安全性について検討した。其の結果これまでに良く用いていたコア・シェル型ナノ粒子 (カドミウム・セレンなど) より遥かに毒性が低い事が確認された (Fujioka et al., Nanotechnology, 2008)。またこの研究によりシリコンナノ粒子にわずかに残っている毒性が活性酸素の発生である事が判りスカベンジャーを加えることにより著しく毒性が無くなった。その状態での培養細胞増殖阻止濃度 (IC50%) を計測した結果 75mg/ml であった。これは、標準的に用いられる肝細胞 Hep90 を用いて測定したときに毒性が全く計測でなかったため、非常に感受性の高い HeLa 細胞を用いてこの計測がやっと可能と成った。毒性が非常に少ない粒子の毒性試験には、大量の試料が必要であり、今回開発した大量合成法を使うことに

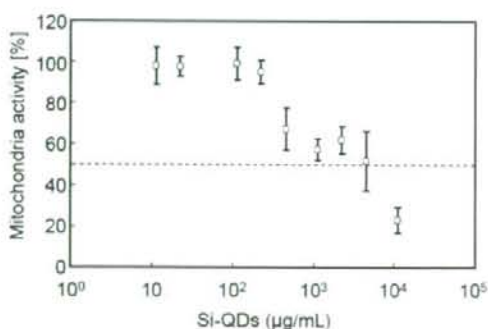
より結果が得られることに成功した。

図1 シリコンナノ粒子のSEM像（上段）とTEM像（下段）



Fujioka et al. Figure. 1

図2 培養細胞増殖阻止濃度 (IC50%)

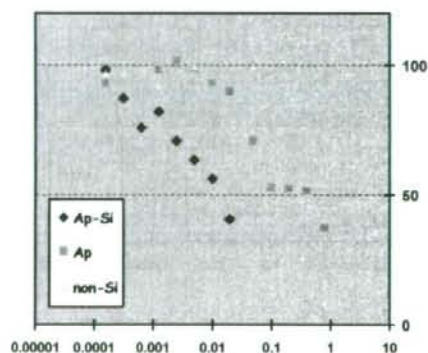


2) 抗炎症薬アルミノプロフェンの Si 医薬:

非ステロイド系抗炎症剤アルミノプロフェ

ンアルミノプロフェンは、シロニンをモデル薬物としてシリコン量子ドット医薬の製造を行い、特性を現在解析している。

アルミノプロフェンは、COX1、COX2 阻害剤で、その作用によりプロスタグランディンの産生を抑制することによる薬効がある。本研究では、シリコン量子ドットを用いて製造されるシリコン量子ドット医薬とした薬物量子ドット医薬における薬効性の変化及び副作用についての検討を行って来た。其の結果、予備実験段階ではあるが、力価が変化しているという事に矛盾が無いことを示すデータを得た。現在この確認実験を行うとともに、前ナノメデシン研究(2002年度~2006年度)におけるカプトプリルの量子ドット医薬のデータとつぎあわせて解析中である。



3) シリコン量子ドット遺伝子導入キャリアの開発:

今年度の研究成果として細胞レベルでの遺伝子導入キャリアーとしてその有用性を示した。

モデル導入遺伝子は、真核生物コドン頻度に合わせた緑色蛍光蛋白 eGFP を用い、マ

ウス由来株化培養細胞に遺伝子導入させる事に成功した。方法は、eGFPに関わるPCRプライマーを設計、合成し一方のプライマーをビオチン化して量子ドット娘ん存在するアビジンに結合させる。その際5'端のプライマーをものと3'端のものを使った場合で極端な差が開く事が、判明した。

更に得られたDNAは、自由運動を行ない仮想体積が大きく成るためプラスチャージポリマーを添加しDNAを凝集させ効率よく細胞内に導入する事を可能とした。細胞内に入るとPhが上がり再びDNAが十分散るように設計した。その他様々な工夫を行ない導入効率が10%以上に達した。

4) 破骨細胞発生と量子ドット染色：

単球から破骨細胞への発生にケモカインレセプター1 (CCR1) とケモカインレセプター5 (CCR5) が重要である事が偶然に判明した。そこでこれらケモカインレセプターのノックアウトマウスを松島博士（東京大学医学部教授）から提供していただき骨形成の状態を調べた結果、両者とも骨粗鬆を含めたそれぞれ極めて特異的な性質が有る事が判明した。またこれらのレセプター異常は、I型コラーゲンC末端テロペプチド値によって臨床検査可能で有る事も判明した。

D. 考察

1) 達成度について

当初の計画通りシリコンドット医薬のモデル粒子を抗炎症作用を持ちリウマチの治療薬であるアルミノプロフェン用いて製造し

た。シリコン量子ドットを用いて製造されるシリコン量子ドット医薬とした薬物量子ドット医薬における薬効性の変化及び副作用についての検討を行った。其の結果、予備実験段階ではあるが、力価が変化しているという事に矛盾が無いことを示すデータを得たことから当初計画を十分に達成したと考えている

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凌ぎ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

偶然発見されたCCR5とHIV感染症についての臨床研究についてネガティブデータと成る事を期待している。もしこれが重要な健康障害に成る事があれば、本研究班は全力を尽くしこれに対処することになると考えている。

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大量合成し、その細胞50%阻止濃度を世界で初めて測定しその値を75mg/mLとした。

またアルミノプロフェン・シリコン量子ドット医薬は原末より安全で力価の高いことが明らかと成った。

量子ドットは、更に遺伝子導入キャリアーとしても非常に効率よくまた安全な導入法である事を示した。

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の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。

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

論文 (欧文)

Hoshino A, Manabe N, Fujioka K, Hanada S, Yasuhara M, Kondo A, **Yamamoto K.**

GFP expression by intracellular gene delivery of GFP-coding fragments using nanocrystal quantum dots, *Nanotechnology In press*

Fujioka K, Hiruoka M, Sato K, Manabe N, Miyasaka R, Hanada S, Hoshino A, Tilley RD, Manome Y, Hirakuri K, **Yamamoto K.** Luminescent passive-oxidized silicon quantum dots as biological staining labels and their cytotoxicity effects at high concentration.

Nanotechnology 2008 Oct 15;19(41):415102. Epub ahead of print, Sep 3, 2008

Yamamoto M, Futamura Y, Fujioka K, **Yamamoto K.** Novel production method for plant polyphenol from livestock excrement using subcritical water.

International Journal of Chemical Engineering 2008;in press.

Hoshino A, Nagao T, Nagi-Muira N, Ohno N, Yasuhara M, **Yamamoto K,** Nakayama T, Suzuki K. MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via classical complement pathway-dependent manner.

Journal of Autoimmunity 2008;31(1):79-89. Epub ahead of print, Apr 21, 2008

Futamura Y, Fujioka K, **Yamamoto K.** Hydrothermal Treatment of Glycine and Adiabatic Expansion Cooling: Implications for Prebiotic Synthesis of Biopolymers.

Journal of Materials Science 2008;43(7):2442-2446

doi:10.1007/s10853-007-2040-9 *Published online: 13 November 2007*

Yasuda H, Yoshizawa N, Kimura M, Shigematsu M, Kawachi S, Oshima M, **Yamamoto K,** Suzuki K. Preparedness for the