

識 MPO 抗体を用いた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、好中球表面に存在する MPO を高感度かつ迅速に検出する好中球活性化を判定する指標を示してきた(Hohino et al, Microbiol Immunol, 2007)。また、サイトカイン刺激により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考えられる。一方、QD標識MPO抗体の投与により、MPO抗体のトレースから、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、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。本研究で開発したQD抗体を使うことにより、分子のトレースとデリバリーを可能とし、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。

このように、DDSのトレースに利用可

能なQD-antiMPOが、血管内皮細胞にも直接結合して血管内皮細胞障害を誘導することを確認できている(Hohino et al, Microbiol Immunol, 2007)。また、antiMPOによる好中球活性化機構を、自己免疫に関与するサイトカインIL-17発現への関与について解析し、MPO抗体によって、活性化された好中球は、IL-17の発現を誘導した。炎症性サイトカイン・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ることが推定される。

本年度は、QD-antiMPOおよびQD-TNF- α を使って、MPO抗体とTNF- α の細胞への結合を解析するとともに、これら分子の血管内皮細胞の活性化とその抑制について解析した。1) QD-antiMPOの好中球、マクロファージへの結合を観察できた。また、2) TNF- α あるいはH₂O₂刺激によって血管内皮細胞の表面へのICAM-1の発現が有意に上昇した。また、3) TNF- α あるいはH₂O₂刺激によるadhesion moleculesのE-selectin, VCAM-1,

ICAM-1 の mRNA 発現が上昇した。そして、その時に、4) TNF- α に刺激により血管内皮細胞からの培養上清中に産生された 23 種類のサイトカイン・ケモカインを網羅的に定量から、ケモカイン KC の産生が有意に上昇し、IgG 添加により抑制され、5) QD-TNF- α による血管内皮細胞への結合も確認できた。

このように、QD 標識抗体や QD-標識分子は、生体での機能を明らかにする上で重要でありかつ有用であることを示した。今後は、DDS のトレースとして QD-antiMPO や QD-TNF- α を利用して血管炎の発症機構をさぐる。

E. 結論

DDS 開発を目標として、QD 標識 MPO 抗体を用いた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、好中球表面に存在する MPO を高感度かつ迅速に検出する好中球活性化を判定する指標を示してきた。炎症性サイトカイン・ケモカイン

の変動は、血管内皮細胞の障害と好中球浸潤および好中球活性化に深く関与している。そこで、本年度は、QD-antiMPO および QD-TNF- α を使って、MPO 抗体とサイトカイン TNF- α の細胞への結合を解析するとともに、これら分子の血管内皮細胞の活性化とその抑制について解析した。1) QD-antiMPO の好中球、マクロファージへの結合の観察、2) TNF- α あるいは H₂O₂ 刺激による血管内皮細胞の表面への ICAM-1 発現の上昇と、3) adhesion molecules(E-selectin, VCAM-1, ICAM-1) の mRNA 発現の上昇、加えて、4) ケモカイン KC の産生の上昇と IgG による抑制が明らかになった。そして、5) QD-TNF- α による血管内皮細胞への結合解析も確認できた。

このように、QD 標識の分子を利用して生体での機能を明らかにする具体例を示した。今後は、QD-antiMPO や QD-TNF- α を利用した生体での血管炎の発症機構をさぐる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Y. Yasuda, T. Shimoda, K. Unoa, N. Tateishi, S. Furuya, K. Yagi, **K. Suzuki**, S. Fujita. The effects of MPTP on the activation of microglia/astrocytes and cytokine/chemokine levels in different mice strains. *J. Neuroimmunology*. in press.
2. T. Ito-Ihara, E. Muso, S. Kobayashi, K. Uno, N. Tamura, Y. Yamanishi, A. Fukatsu, R. A. Watts, D.G.I. Scott, D. R.W. Jayne, **K. Suzuki**, H. Hashimoto. A comparative study of the diagnostic accuracy of ELISA systems for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies available in Japan and Europe. *Clin. Exp. Rheumatol.* in press.
3. R. A. Watts, D.G.I. Scott, D.R.W. Jayne, T. Ito-Ihara, E. Muso, S. Fujimoto, Y. Harabuchi, S. Kobayashi, **K. Suzuki**, H. Hashimoto. Renal Vasculitis in Japan and UK – are there differences in epidemiology? *Nephrol. Dialysis Transplant.* 23(12):3928-3931, 2008.
4. S. Kobayashi, A. Ito, D. Okuzaki, H. Onda, N. Yabuta, I. Nagamori, **K. Suzuki**, H. Hashimoto and H. Nojima. Expression profiling of PBMC-based diagnostic gene markers isolated from vasculitis patients. *DNA Research* 15(4):253-265, 2008(Aug).
5. A. Mabuchi, T. Nagao, O. Koshio, T. Ishiwata, A. Yano, **K. Suzuki**, K. Yokomuro, A.M. Wheatley. Role of F4/80+Mac-1^{high} adherent non-parenchymal liver cells in concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology Res.* 38:1040-1049, 2008(Oct).
6. A. Hoshino, T. Nagao, N. Nagi-Miura, N. Ohno, M. Yasuhara, K. Yamamoto, T. Nakayama, **K. Suzuki**. MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via classical complement pathway-dependent manner. *J. Autoimmunity* 31:79-89, 2008.
7. Yasuda H, Yoshizawa N, Kimura M, Shigematsu M, Matsumoto M, Kawachi S, Oshima M, Yamamoto K, **Suzuki K**. Preparedness for the spread of influenza: prohibition of traffic, school closure, and vaccination of children in the commuter towns of Tokyo. *J Urban Health* 85(4):619-635, 2008.
8. Nguyen T. L., N. Nakajima, Phuc P., Y. Sato, Hoang N. T., Pham V.H., Luong T.S., H. Katano, T. Kumasaka, T. Oka, S. Kawachi, T. Matsushita, T. Sata, K. Kudo, **K. Suzuki**. H5N1-infected cells in lung with diffuse alveolar damage in exudative phase from a fatal case in Vietnam. *Jpn. J. of Infectious Dis.* 61: 157-160, 2008.
9. Y. Ogasawara, H. Kaya, G. Hiraoka, F. Yumoto, S. Kimura, Y. Kadota, H. Hishinuma, E. Senzaki, S. Yamagoe, K. Nagata, M. Nara, **K. Suzuki**, M. Tanokura, K. Kuchitsu. Synergistic Activation of Arabidopsis NADPH Oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 283:8885-8891, 2008.
10. Xiao G, Miyazato A, Inden K, Nakamura K, Shiratori K, Nakagawa K, Miyazawa T, **Suzuki K**, Kaku M, Kawakami K. *Cryptococcus neoformans* inhibits nitric oxide synthesis caused by CpG-oligodeoxynucleotide-stimulated macrophages in a fashion independent of capsular polysaccharides. *Microbiol Immunol.* 52:171-179, 2008.
11. Nakamura K, Miyazato A, Xiao G, Hatta M, Inden K, Aoyagi T, Shiratori K, Takeda K, Akira S, Saijo S, Iwakura Y, Adachi Y, Ohno N, **Suzuki K**, Fujita J, Kaku M, Kawakami K. Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *J Immunol.*

15:4067-1074, 2008..

書籍

1. 鈴木和男 人工ガンマグロブリン製剤の開発の現状 ファルマシア 45: 17-22, 2009年1月
2. 鈴木和男 特集—感染症防御・慢性疾患の初期機構—総論「好中球の機能」[細胞] 41: 48-50, 2009年2月
3. 長尾朋和、鈴木和男 特集—感染症防御・慢性疾患の初期機構—「好中球機能異常による血管炎・腎炎」[細胞]41: 60-63, 2009年2月
4. 鈴木和男 感染症を抑え込め：大規模予測モデル「感染症の脅威：パンデミックへの備えは万全か」日経サイエンス別冊 163, pp38-46, 2008年11月
5. 鈴木和男 シミュレーションによる感染症の対策支援「感染症の脅威：パンデミックへの備えは万全か」日経サイエンス別冊 163, pp38-46, 2008年11月
6. 長尾朋和、鈴木和男 ANCAをめぐり基礎的研究の進歩 呼吸器科 14 巻 pp348-354, 2008Oct.

2. 学会発表

【国内学会】

1. 鈴木和男 感染と血管炎を結ぶ機序 第32回日本腎臓学会東部学術集会 2008年10月11-12日 東京
2. 鄒軍、志賀由佳、鈴木和男、ARDS病態モデルの肺組織傷害に連動するサイトカインストーム開始時のTNF- α の役割 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
3. 常賀、鈴木和男、In VitroにおけるIVIg治療の作用機序解析 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
4. 宇野賀津子、鈴木和男、MPO-ANCA腎炎、IgA腎症患者、健康人の血漿中サイトカイン・ケモカインとIFN- α 産生能の比較 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
5. 亀岡洋祐、鈴木和男 MPOリーダーペプチドは活性制御に関与するかII 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
6. 長尾朋和、鈴木和男、MPO-ANCAによる糸球体血管内皮細胞の好中球走化性因子の発現 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
7. 富澤一夫、鈴木和男、SCG/KjマウスにおけるMPO-ANCAリスクエピトープとCD24+CD41+の発現について 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
8. 楠怜奈、鈴木和男、SCG/Kj miceに対する15-deoxyspergualin治療によるCD3+B220+CD69+細胞の減少 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
9. 鈴木和男 好中球 Myeloperoxidaset ホモログと川崎病 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
10. 常賀、鈴木和男 QD標識TNF- α を使った免疫グロブリン治療の作用解析 第17回バイオイメージング学会 2008年10月30-11月1日 千葉
11. 鈴木和男 わたしたちの体の中を見るバイオイメージングと新技術—からだの中をみるバイオイメージング 第17回バイオイメージング学会 2008年10月30-11月1日 千葉
12. 鈴木和男 バイオイメージングと「化学工学」の融合学理：2002年から未来への橋渡し—めざしてきたもの 第17回バイオイメージング学会 2008年10月30-11月1日 千葉
13. 常賀、長尾朋和、鄒軍、中山俊憲 鈴木和男 In vitroにおけるIVIg治療の作用機序解析と判定法の確立 第38回日本免疫学会 2008年12月1-3日 京都
14. Tomizawa Kazuo, Nagao Tmokazu, Ohshima Maamichi, Kobayashi Kazuo, Suzuki Kazuo MPO-ANCA specific IgG2b subclass decrease by treatment with 15-Deoxyspergualin in SCG/Kj mice 第38回日本免疫学会 2008年12月1-3日 京都
15. 楠怜奈、長尾朋和、中山俊憲、鈴木和男 Reduction of CD3+B220+CD69+ cell population by treatment with

- 15-deoxyspergualin SCG/Kj mice 第38回
日本免疫学会 2008年12月1-3日 京都
16. 長尾朋和, 荒谷康昭, 中山俊憲, 鈴木和男
Secretion of oxidase antibody of neutrophil
chemotactic factors from glomerular
endothelial cells by anti-myeloperoxidase
第38回日本免疫学会 2008年12月1-3日 京都

【国際学会】

1. K. Suzuki Xiamen University Medical School Xiamen University Medical School Meeting (アモイ大学会議) 2008/11/19-20 Xiamen, China
2. K. Suzuki Imaging of Vasculitis 2nd International Symposium for Bioimaging in Queenstown (第二回国際バイオイメージング学会) 2008/11/26-28 Queenstown, New Zealand
3. K. Suzuki Steering Meeting on EUVAS/EULAR Steering Meeting on EUVAS/EULAR 2008/12/1-2 Zurich, Switzerland
4. K. Suzuki Immunomodulatory therapy for vasculitis with synthetic IVIG International Forum on inflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009, 人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)
5. Chang He, K. Suzuki et al Modulation of endothelial cell functions by intravenous immunoglobulin in vitro International Forum on inflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009, 人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)
6. K. Tomizawa, K. Suzuki et al Decreased of Risk Eitpies of MPO-ANCA with Remission: Preliminary Analysis International Forum on inflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009, 人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)
7. S. Kawachi, K. Suzuki, et al. Treatment of severe ARDS (including H5N1-FARDS) with IVIg -From the Cases of NHP-Hanoi- International Forum on nflammation-2009, 'IVIg treatmen and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009, 人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)
8. S. Kobayashi, K. Suzuki, et al. New consensus, definition, classification and system for diagnosis of vasculitis from EULAR and ACR meeting held in Zurich International Forum on nflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009, 人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)
9. M. Furutani, K. Suzuki, et al. Synthetic polyclonal immunoglobulin International Forum on nflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009, 人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)
10. K. Uno, K. Suzuki, et al. Comparison of plasma cytokine/chemokine levels and IFN- α production capacity amongst healthy subjects, MPO-ANCA nephritis patients, and IgA nephritis patients International Forum on nflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009, 人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)
11. Y. Aratani, K. Suzuki Phagocyte NADPH-oxidase deficiency promotes zymosan-induced acute lung inflammation International Forum on nflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009, 人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)
12. J. Hirahashi, K. Suzuki et al. Dietary enrichment with eicosapentanoic acid (EPA) prevents antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis International Forum on nflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009, 人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)

Tokyo

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

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—

分担研究者 鈴木恵子 昭和大学歯学部歯科薬理学教室・講師

研究要旨

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。

A. 研究目的

本研究は、病的骨吸収疾患の効果的な治療法の開発という最終目的を達成するために、ナノ粒子などによるバイオイメージングを中心とした最新手法を用いて病態を解明するために行った。

ヒトを含む動物は、成長を停止した後も骨吸収と骨形成がカップルした骨代謝を継続的に行い、常に骨改造を行うことにより身体支持・運動という動物にとって不可欠な機能を維持している。適切な部位および時期に適量な量の骨を供給するために、これら両反応は厳密に制御される必要がある。ところが関節リウマチ、歯周病、骨転移腫瘍などでは骨代謝バランスの崩壊（骨吸収異常亢進）により、重篤な骨破壊が起

こる。その結果、歩行困難・歯槽骨吸収による歯の喪失・耐え難い骨痛などが生じ、患者のQOLは著しく損なわれる。これら成因の異なる複数の疾患において骨破壊を起こす唯一の細胞である破骨細胞は造血幹細胞に由来するが、多くの調節因子およびそれらの受容体を免疫・炎症に関与する細胞と共有するため、炎症性骨破壊の病態は極めて複雑である。たとえば関節リウマチでは増殖した滑膜細胞と免疫系の過剰な活性化により骨代謝バランスの崩壊が誘導されると考えられている。したがって、効果的な治療法の開発という最終目的を果すためには、まず、このように複数の細胞種が相互に関連する病的骨破壊機構の解明をめざす必要がある。本研究計画の初年度にあ

たる昨年の成果から、バイオイメージング手法を用いた *in vitro*, *in vivo* 両面からの研究の準備を十分整えることができたので、2年目である本年度は現段階で実用可能であり最適な病態モデルを独自に開発・導入し、以下に示すような研究手法を確立することを目的とした。

1) 半導体ナノ粒子を用いたバイオイメージング手法の確立

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。この物理現象は理論的には古くから証明されていたが、近年、レーザー共焦点顕微鏡など蛍光観察技術の進歩と相まって、医療・生物学への応用が確立され急速に進展している。半導体ナノ粒子は、蛍光強度が高いことに加えて、単一励起波長照射でも粒子サイズの差により異なる波長をもつ蛍光を発すること、また長時間の励起光照射によっても蛍光強度が減衰しないという特徴を持つ。そのため、蛍光減衰曲線を読みとることにより他の蛍光分子と区別することもできる。すなわち複数の蛍光特性をもつ分子と併用し、標的分子の細胞内および生体内での動態を追跡することで、時空間的な相互作用を解明することが可能である。このような可視化技術は非侵襲の状態でも体外からの観察が可能であることから、麻酔下で生きたままの動物、すなわち同一動物体内の変化を詳細に検討できるという極めて有用な手法である。これに発光が検察できる *Luciferase transgenic* ラットおよび蛍光タンパク質 *EGFP transgenic* ラット由来の破骨前駆細胞を併用することにより、更に詳細な破骨細胞の体内動態の解析を可能にする。

2) 炎症性骨破壊の病態モデル動物作製と骨破壊評価法の確立

転移部位において骨破壊を起こす T 細胞リンパ腫由来細胞 (BW5147) から、我々がクローニングした新規骨吸収因子 γ -GTP (GGT) はリウマチ関節炎の患者、関節炎モデル動物で血中濃度上昇が認められたことから、病的骨破壊の原因物質のひとつであると考えられる。さらに歯周病菌由来 GGT をラット歯肉溝に投与することにより歯槽骨破壊が惹起された。このときの

組織レベルでの検討の結果、破骨細胞の局在は GGT 投与後の時間経過にもなって 2 相性の変化をすることが示された。すなわち、早期の破骨細胞集積はすでに近傍に存在していた成熟破骨細胞の遊走を示し、その後の変化は破骨細胞への分化能を有する前駆細胞が未知の全身を制御する情報伝達手段により活性発現部位 (骨破壊誘導局所) に送達されていることを示すものである。このことから、腫瘍骨転移と骨破壊部位への破骨前駆細胞の移動は共通因子により制御される類似のメカニズムによる可能性もあることが示唆された。これに加えて、昨年度の本研究において、RANKL および TNF α 非依存性の骨吸収促進因子を見出し、これを頭蓋皮下に投与することにより炎症性骨破壊を惹起する病態モデルを新たに確立する予定である。作用メカニズムの異なる 2 種の骨破壊誘導因子を用いる実験により、現在解明されていない問題に新たな解決ルートを提案できる可能性がある。

従来、炎症性骨破壊は炎症反応により産生されたサイトカインなどにより、はからず破骨細胞が活性化されてしまう望ましくない生体反応であると考えられていた。しかし、最近、破骨細胞による組織破壊は、炎症局所への細胞の速やかなリクルートに必要な反応であるという説も提唱されている。これを解明するために複数の細胞種がインタクトな状態で相互作用する *in vivo* の解析手法の確立をめざす。

B. 研究方法

1) 培養破骨細胞形成系を用いる研究

本研究で使用する破骨前駆細胞は継代培養が不可能であるため、ラット骨髄由来細胞を M-CSF, RANKL 共存下で培養することにより、成熟破骨細胞を誘導する。また、実験によっては遺伝子欠損マウス由来の骨髄細胞を使用し、野生型と比較することにより破骨細胞分化や活性化に対する標的分子の必要性についても検討する。現在、所有している遺伝子欠損マウスは細胞遊走性に関与することが知られている細胞接着因子としてオステオポンチン (OPN) および CD44、歯周病菌の菌体成分およびその産生

物がリガンドとして作用するために必須である Toll-like receptor (TLR)-2, TLR4 を標的としたものであり、いずれも骨破壊担当細胞である破骨細胞の分化や機能発現に重要な役割を果たす分子であることが知られている。

上記方法で形成された破骨細胞(異なる分化段階の細胞を取得する)について、real time RT-PCR, Western blot により、生化学的に検討する。また、細胞を固定したのちに免疫蛍光染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡により画像取得し、画像解析することにより標的分子の細胞内局在について検討する。

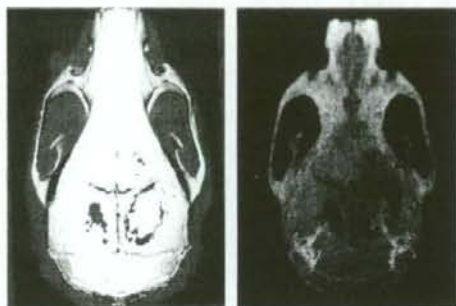
2) 炎症性骨破壊の病態モデル動物を用いる研究

我々はすでに歯周病菌由来 GGT をラット歯肉溝に局所投与して歯槽骨破壊を起こす病態モデルを確立している。本研究ではこの方法を用いて、グラム陽性菌の産物を用いた歯槽骨破壊モデルを作製する。また、小動物において口腔内に投与するという手技の難しさが難点であるため、さらに効率よく安定して作製できるよう改善点を見つけている。

C. 研究結果

1) 高輝度の蛍光を発するナノ粒子を負荷した破骨前駆細胞から成熟破骨細胞を誘導することができた。また、Luciferase transgenic (Luc Tg) ラットの継続的な繁殖に成功し、このラット由来の骨髄細胞から野生型と同様の破骨細胞を誘導することができた。Luc Tgラット由来骨髄細胞を免疫反応を示さないSCIDマウスに adoptive transfer により導入し、その生体内動態について in vivo imaging を行った。その結果、炎症による骨破壊部位にLuc由来の発光を観察することができた。骨破壊部位における細胞についてさらに詳細に検討するために、EGFP transgenic (GFP Tg)ラット由来の骨髄細胞を用いて、同様の in vivo imaging を行い、炎症を惹起したマウスのみで、頭蓋骨に蛍光をもつ細胞が分布することが示された。この細胞が成熟破骨細胞であるかどうかについては、現在、凍結切片を作製して検討中である。ま

た、in vivo imagingに用いたものと同一の個体を小動物用X線CTスキャン装置で撮影・画像構築することにより、炎症部位での骨破壊の程度を知る方法も確立した(下図参照)



2) 歯周病にみられる歯根吸収や歯槽骨破壊はグラム陰性菌由来のリポポリサッカライドが原因であると考えられているが、本研究において、口腔内に存在するグラム陽性菌 (*Streptococcus mutans* 109c, *gordonii* *challis*) 菌体およびその培養上清が強い破骨細胞誘導活性をもつことをあらたに見出した。また、グラム陽性菌産物に加えてGGTも、破骨細胞形成に必須の因子として知られるRANKL非存在下で破骨細胞を誘導することが示され、炎症局所では生理的骨吸収とは少なくとも一部異なる機構で骨破壊が起こる可能性が示唆された(論文執筆中)。現在、菌体成分をラット歯肉溝に局所投与することにより、炎症性骨破壊病態モデルを作製中である。

3) 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、細胞遊走性に関するOPN, CD44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。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。さらに、口腔細菌菌体およびその産物による破骨細胞形成について、その受容体依存性を Toll-like receptor 2 および Toll-like receptor 4 それぞれの遺伝子欠損マウス由来の骨芽細胞・脾臓を用いることにより確認することができた。

D. 考察

1) 達成度について

本年度の2つの目的、すなわち、①半導体ナノ粒子を用いたバイオイメージング手法の確立、②炎症性骨破壊の病態モデル動物作製およびその評価法の検討について順調に成果をあげることができた。とりわけ、イメージングに使用するナノ粒子負荷およびルシフェラーゼ遺伝子を発現させた破骨前駆細胞からも通常通り成熟破骨細胞が形成されることが確認されたこと、さらに生きたままの麻酔動物のエックス線 CT 画像取得および骨形態計測法を確立することもでき、今後、本研究を継続することで一定の成果が得られると考えられる。

また、以上の結果にもとづいて現在論文作成中である。

2) 成果の学術的・国際的・社会的意義について

生きたままの動物を使用した *In vivo* imaging は国際的にみてもまだ例が少なく先進的な研究である。これに培養細胞系を用いた生化学・分子生物学・細胞生物学的な研究成果を加えることにより、トランスレーショナル・リサーチとして当該分野の学術的発展に多大な影響を与えることが予想される。また病態モデル動物での実験は、麻酔下で同一動物での時空間変化が検討できるため、得られる結果は、実際に生体内で起きている事象を忠実に反映することから非常に信頼性が高く、動物数削減の観点からも有用な手法である。すなわち、最低限の動物使用により、ヒトでの疾患治療薬開発に貢献する重要な示唆を与える可能性が高い。現在の高齢社会において、人々がより健康かつ明るい人間的な生活を送るためには、自分の体重を支え、自由に移動するのに十分な強度をもつ骨格を保ち、会

話や食事の楽しみを享受できるよう、健全な菌を維持することにつながる本研究の成果は社会的に非常に大きな意味をもつと考えられる。

3) 今後の展望について

In vivo imaging 手法を用いた研究により種々の標的分子および細胞の体内動態の追跡ができるようにする。また炎症性骨破壊の病態を解明するとともに、現在開発中の治療薬（本年度、骨形成薬として東北大と共同で特許出願）を適用してその有効性について同時に解析可能にする予定である。

E. 結論

本研究計画の2年目にあたる本年度の研究では以下の結果が得られた。

- 1) 高輝度の蛍光を発するナノ粒子を負荷した破骨前駆細胞から誘導した多核の破骨細胞が Osteologic DiscTM のミネラル吸収活性をもつことが確認できた。
- 2) Luciferase transgenic ラットおよび EGFP transgenic ラット由来の骨髄細胞を SCID マウスに adoptive transfer することにより、*in vivo* imaging を行い、破骨前駆細胞の体内動態について検討することができた。
- 3) 新たに RANKL-および TNF α -非依存性の骨吸収因子を見出し、炎症性骨破壊の病態モデルを作製した。
- 4) 口腔内に存在するグラム陽性菌 (*Streptococcus mutans* 109c, *gordonii* challis) 菌体およびその培養上清が強い破骨細胞誘導活性および培養頭蓋冠の骨吸収活性をもつことを見出した。現在、菌体成分をマウス頭蓋皮下に局所投与することにより、骨破壊が惹起されることを小動物用 X 線 CT スキャンにより確認した。
- 5) 上記のグラム陽性菌産物に加え GGT でも破骨細胞形成に必須の因子として知られる RANKL 非存在下で破骨細胞を誘導することが示され、炎症局所では生理的骨吸収とは一部異なる機構で骨破壊が起こる可能性が示唆された。

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 (英文)

Hisashi Shinoda, Sadaaki Takeyama, Keiko Suzuki, Shinobu Murakami and Shoji Yamada: Pharmacological topics of bone metabolism: A novel bisphosphonate for the treatment of periodontitis, *J Pharmacol. Sci.*, 106: 555-558, 2008.

2. 総説 なし

3. 著書 なし

4. 学会発表

(国際学会)

Keiko Suzuki, Susan R. Rittling, David T. Denhardt, Shoji Yamada and Jaro Sodek: Immunocytochemical Analysis of Osteopontin Function in Osteoclast Formation and Activation (CIHR Group in Matrix Dynamics Symposium, Toronto, May 2008)

(国内学会)

1) 鈴木恵子、山田庄司: 骨吸収メカニズムの解明とそれに基づいた創薬の試み、(ハイテクリサーチセンター整備事業成果報告会、Tokyo, March 2008)

2) Keiko Suzuki, Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto and Shoji Yamada: Pam₃CSK₄, a TLR2 agonist, induces osteoclastogenesis RANKL-independently. (The 81st Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Yokohama, March 2008)

3) 村上忍、竹山禎章、鈴木恵子、山田庄司、篠田壽: 歯周病治療薬としての

[4-methylthio] phenylthio]

methanebisphosphonate の妥当性 (日本薬理学会北部会、Sendai, September 2008)

4) 篠田壽、村上忍、竹山禎章、鈴木恵子、山田庄司: ワークショップ「歯周疾患による骨量減少の薬物療法」骨形成作用をもつ新規ビスフォスフォネートに関する知見 (第50回歯科基礎医学会学術大会、Tokyo, September 2008)

5) 森脇佐和子、鈴木恵子、宮内睦美、高田隆、新飯田俊平: 細菌由来の gamma-グルタミルトランスベプチダーゼは骨破壊因子か (第50回歯科基礎医学会学術大会、Tokyo, September 2008)

6) 鈴木恵子、新飯田俊平、山田庄司: Toll-like receptor 2 アゴニストによる

RANKL-および TNFalpha-非依存的な破骨細胞誘導 (第26回日本骨代謝学会、Osaka, October 2008)

7) 川添祐亮、宮内睦美、田口明、田妻進、鈴木恵子、新飯田俊平、高田隆: 胆汁うっ滞性肝疾患に伴う gamma-glutamyl transpeptidase 血症が骨破壊に及ぼす影響について (第26回日本骨代謝学会、Osaka, October 2008)

8) Keiko Suzuki, Fumitaka Takeshita, Takahiro Ochiya, Kenji Yamamoto and Shoji Yamada: Visualization of preosteoclast movement in a murine model of inflammatory osteolysis induced by lipopolysaccharide. (The 82nd Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Yokohama, March 2009)

9) 鈴木恵子、山田庄司: 「炎症・免疫システムの新たな paradigm による病態の解明と治療法の開発」—炎症性骨破壊における破骨細胞の動態—バイオイメージング手法による解析— (平成20年度昭和大学共同研究成果発表会、Tokyo, March 2009)

H. 知的所有権の出願・取得状況 特許

[4-(メチルチオ)フェニルチオ]メタンビスホスホン酸又は薬学的に許容され得るその塩を有効成分とする骨形成促進剤 (特願2008-225484)

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)
分担研究報告

半導体などナノ粒子による生物・医療応用

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・部長代行

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得る

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

High-Definition Slit Lamp Video Camera System Satoru Yamamoto, Noriyoshi Manabe, Kenji Yamamoto Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging (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.).
- 2) N. Manabe, S. Yamamoto, Kouki, Fujioka, A. Hoshino, K. Yamamoto, Imaging Transparent Vitreous of The Eye Using Nano Particles. Particle 2008 (May 2008, Orlando, Florida, 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ジング
 学会学術集会
 岩手医科大学60周年記念館
 平成18年11月1日

- 3) 「硝子体病変の可視化～水溶性量子ド
 ヲットを用いて～」
 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127回日本薬学会
 富山
 平成17年3月15日

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

総括

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。

分担研究報告

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

分担研究者	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
協力研究者	渡辺 美智子	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・講師
協力研究者	藤岡 宏樹	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・ポスト ドクトラルフェローシップ

研究要旨

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的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。

A. 研究目的

本研究の目的は甲状腺癌の非侵襲的な確定診断システムを構築するための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である。

研究の重要な要素はシステム構築の基本となる癌抗原検出抗体の特異性である。本研究でナノ粒子標識のターゲットとしたJT95モノクロナル抗体は免疫原としてヒト甲状腺乳頭癌の膜分画を用いている。作製過程で2400以上の抗体産生ハイブリドマから最終的に選択されたハイブリドマが産生するJT95抗体は正常組織とは反応せず、甲状腺癌を特異的に認識する。甲状腺癌の90%以上を占める甲状腺乳頭癌患者の免疫組織染色法では158例のうち151例に陽性

を示し陽性率は95%以上を示す。この特異性は抗体樹立当初より甲状腺癌の診断に適していると考えられており、選択的な分子標的治療を行なえる可能性が示唆されてきた (Takeyama H, et al *Cancer Research*, 56, 1817-1822, 1996)。

JT95が認識する癌特異抗原は250 kDの糖鎖修飾型フィブロネクチンであり、この抗原は患者血清中にも105 kDの分泌型として存在し、甲状腺癌患者血清を試料としたELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) 法では転移・再発甲状腺癌で80%、初発甲状腺癌では51%に陽性という検出結果を得ている(図1)。しかし良性の甲状腺腫 (Adenomatous goiter) に反応してしまう。現在の方法では組織での判定が必要となる

ため、血清診断に向けた更なる条件検討の必要性が示されている。

(図1)

Serodiagnosis of thyroid cancer using JT-95			
Histological type	No of patients	positive number	positive %
Thyroid cancer (primary)	41	21	51
Thyroid cancer	15	12	
80(relapsed or metastasized)			
Adenoma	10	0	0
Adenomatous goiter	29	8	28
Hyperplasia	7	0	0

一方、確定診断システムと同様の重要性を持つ、がん治療抗体としての可能性に関してヒト甲状腺癌担癌マウスに対する¹³¹I-JT95集積実験では標識抗体が腫瘍部のみに集積し、腎臓・肝臓には全く集積しないことから、JT95抗体は診断のみならず治療にも有用な抗体であることが示唆されている(武山浩、癌の臨床、50(10):825-830, 2004)。

B. 研究方法

1. 抗体へのナノ粒子の標識方法について.

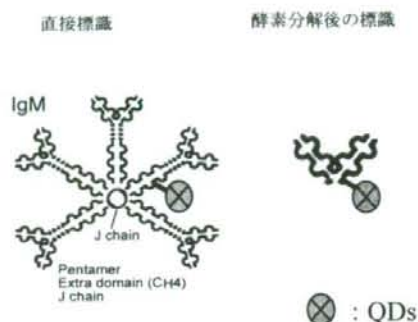
JT95抗体は5量体のIgMであり定常域がJ鎖で結合されている。このため蛍光色素やマイクロビーズなど通常の分子イメージングや診断に用いられる担体とは結合が難しく、実際の臨床応用を図るには、確実な担体修飾の条件検討が必要とされている。このことから、まず、安定した修飾法確立のため標識ナノ粒子として、カドミウム・セレン量子ドット(Quantum Dots:QDs)を選び抗体・量子ドット結合体の作製を行なった(量子ドットはインビトロジェン社の6551TK™Carboxyl Quantum Dotsを用いた。

量子ドットは、数百~数千の半導体物質をコアとした蛍光特性を有するナノクリスタルで、従来の蛍光物質の欠点とされていた退色を限りなく少なくし、微弱反応の増強・安定した蛍光強度の持続などの利点を有する。ナノ粒子による標識はBorate bufferを用いて、架橋試薬にはEDC、NHSあるいはsulfo-NHS (Pierce Biotechnology)を用いて結合を行なった。標的抗体JT95には抗体本体(IgMタンパク)への直接標識、および抗体を酵素分解した後のフラグメント(モノマー、あるいはFab, F(ab)²)への標識を行う事とし

た(図2)。

上記試薬による結合抗体は脱塩カラム(Microspin column)により残存試薬除去の後、限外ろ過フィルター(Microcon Ultra-cell YM100)による精製を行なった。濃度は無修飾量子ドットの蛍光を基に算定した。タンパク量はポリアクリルアミドゲル電気泳動後の銀染色によるスタンダードタンパクとの比較での算出を試みた。標識に際し、十分な量子ドット結合能が得られなかった場合には反応官能基を酸性のカルボキシル基から塩基性のアミノ基に換えて結合を試み、最も有効な標識抗体の作製方法を試みた。

(図2)



2. 標的抗体の精製

JT95モノクロナル抗体産生ハイブリドーマは無血清培地・COSMEDIUM001(コスモバイオ社)で5日間培養した後、遠心し上清中に産生された抗体をスタートサンプルとした。培養上清(抗体含有)は遠心フィルターデバイス(ミリポア社セントリコン・プラス-70)を用いて濃縮後、HiTrap-IgYアフィニティカラム(GEヘルスクエア社)による精製またはSephacryl S-300カラムによって分画し最終精製を行なった。

精製JT95抗体(IgM)は量子ドット標識条件検討のためのモノマー化を図り、0.05M Cysteine および Iodoacetamide を用いてモノマー(Monomer)とした。さらに精製後のJT95抗体活性は、①培養上清、②アフィニティカラム精製後、③Sephacryl S-300カラム精製後、および④モノマー化JT95抗体についてELISA法で評価した。ELISA抗原としてはヒト甲状腺癌細胞SW1736と膵臓癌細胞M1PaCaのタンパク(cell lysate)、およびSW1736培養上清タンパクを10μgよりダブルディリュションを行って固相化抗原とし、これに対する各精製JT95の吸光度を測定して特異性と活性の判定を行なった。非免疫

BALB/c(メス)マウスからのイムノグロブリン(IgM)を同様の方法で精製しナノ粒子標識用対照および活性測定用対照とした。

2. 量子ドット標識抗体の特異性評価

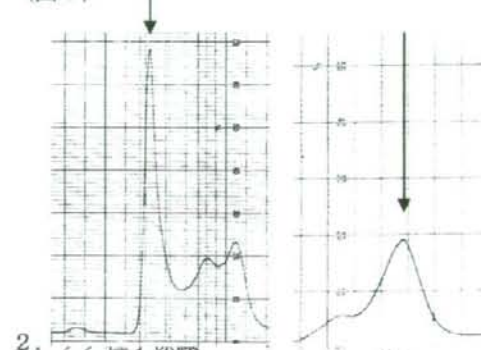
標識された量子ドットはELISA法により、抗原として固相化したヒト甲状腺癌細胞SW1736と膵臓癌細胞MIA PaCaのタンパク(cellysate)、およびSW1736培養上清タンパクに対する吸光度を測定し特異性を評価した。また、ウエスタンブロット法で甲状腺癌抗原に対する反応特異性を評価した。さら、35mm glass bottom dishに培養したSW1736細胞に対し、共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss: LSM 510)、および3Dライブセル光学顕微鏡・Delta Vision (Applied Precision)を用い比較染色としてHoechst 33342, Pallodin-Alexa 488を置いて量子ドット655nm標識JT95抗体の反応性を確認した。

C. 研究結果

1. ナノ粒子標識用JT95抗体の作製と活性評価

精製JT95、対照IgMは上記方法で精製を行い、精製後のJT95抗体活性をELISA法で評価した。抗原としてヒト甲状腺癌細胞SW1736と膵臓癌細胞MIA PaCaのタンパク(cellysate)、およびSW1736培養上清タンパクをELISAプレートに固相化し4℃/一晩反応させた。その後ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG₁Mを60分作用させた後、基質のTMB(3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine)を反応させて450nmの吸光度を測定した。結果を対照タンパクと比較したところ、モノマー化したJT95は抗甲状腺癌に対する特異活性が4分の一以下に減少してしまったため、ナノ粒子標識に適さないことが判明した。このため、精製JT95(IgM)および対照IgMに対して量子ドット標識を行なった。

(図3)

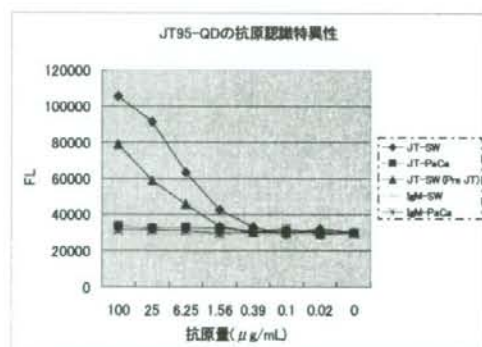


量子ドット(655ITK™ Carboxyl Quantum Dots)による標識結合体作製はJT95抗体、および対照としての非免疫マウス由来・精製IgMに対し合計5回行われた。いずれもアフィニティカラム精製JT95抗体: 0.1mg~1mgをスタートサンプルとした。

量子ドットはCarboxyl Quantum Dotsを用いた。最終的な標識結合体濃度はNormal IgM-QDが平均45nM、JT95-QDは12~30nMであった。

各回のJT95-QDおよび対照Normal IgM-QD試料についてELISA法、ウエスタンブロット法および免疫組織染色法による抗体活性の測定を行なった。その結果、図4に示したように、甲状腺癌抗原に対し特異活性を有する量子ドット結合体の作製を行う事が出来た。

(図4)



同時に行なったウエスタンブロット法による活性測定でも目的とする甲状腺癌特異的な250kDおよび105kDのタンパク位置にQDの蛍光を確認することが出来た。

また、共焦点レーザー顕微鏡による解析では対照Normal IgM-QDの非蛍光確認と同条件でJT95-QDが甲状腺癌を特異的な蛍光を検出が確認できた。

D. 考察

1. 達成度について

2008年度より開始された本研究は本年度の目的とされた、カドミウム・セレン量子ドットの甲状腺癌特異的抗体JT95・IgM抗体への修飾という課題を達成することができた。量子ドット修飾方法の繰り返し行なわれた結合実験による条件改善により、当初修飾担体の直接標識は難しいとされていたIgM抗体へ結合を成功させることが出来た。これによ

り、さらに *in vitro* での有効性の検討、今後の動物実験への使用が可能と成った。

2 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

2008年のU. S. National Cancer Institute (NCI)の発表によれば、アメリカでは女性における甲状腺がんの発生率が1973年から2002年の間に約2.4倍の上昇を示した(L. Davies, *JAMA*. 2006;295: 2164-2167)。

韓国でも Korea Central Cancer Registry (KCCR)は甲状腺がん発生率が男女を合わせた部位別全がん発生順位で肝臓がんを抜いて全体の第4位となったことを報じている。同様に日本でも甲状腺がんの発生率は女性の全がん発生順位・上位10には含まれなかったが、1975より上昇を続け1980～1990年の10年で2.8倍という高い値を示し数値は下がることなくそのまま現在も続いている。急激な発生率増加の原因として1970年以降の診断機器の進歩や診断基準の変化が言われている。しかし、NCIの癌疫学・遺伝学研究部門のDr. Susan Devesaによれば、発生した甲状腺癌の87%は2cmより小さい微小な乳頭癌だが、4-5cm以上もある腫瘍も検出され単に物理的/病理学的な原因とは限定しにくく他の要因(例えばCTスキャンにおける大量の放射線が潜在的なリスクとなるか)も考慮し研究を進めるべきとされている。このように甲状腺がんの早期診断、確定診断システムの開発が早急に求められている状況にあり、本研究は早期診断、確定診断に加え、非侵襲的な方法を目指していることから、システム開発の成功は国際的にも評価されるものと思われる。

3 今後の展望について

J T95モノクロナル抗体の認識する抗原が糖鎖修飾型ファイブロネクチンであることはヒト甲状腺癌細胞株:SW1736培養上清より行われた抗原解析より明らかにされている(Kimura N. *Biochem Biophys Res Com.* 251(2), 449-453, 1998)。また、2007年に申請者らのグループはJT95が確定診断・予後診断にも応用できる可能性について報告した。FNA法で甲状腺癌と診断され10-12年のフォローアップを行った57症例のうち再検査後-良性と診断された10症例について、FNA法による診断と平行して行ったJT95による免疫染色結果では、10症例のうち9症例で当初より陰性(癌抗原が存在しない)としており、また、フォローアップ期間内に再発した6症例に

についてもJT95は当初より6症例全例が陽性(癌抗原存在)であるという結果を示していた。これらの症例について、再検査でも6症例中5症例のみを悪性と診断したFNA法に比べ、JT95は信頼性が高いことが明らかとなり、この抗体による今後の診断・治療への応用展開が有望であることが示されている(Takeyama H, et al. *Pathol Res Pract.* 203(7):507-15, 2007)。

E. 結論

以上のように、本研究では半導体ナノ粒子を結合させた抗体が、その活性を失うことなく有効に患者血清中に存在する癌抗原を検出できることを証明した。特に本抗体はこれまでカドミウム・セレン半導体ナノ粒子の有効な結合が報告されていないIgMタイプのモノクロナル抗体であり、IgGタイプ以外の抗体に対しても安定した修飾が行えること証明できた。本研究結果は次年度の考慮は予定されている表面加工技術を応用した、より安全性を有する量子ドット(シリコンナノ粒子など)を用いることにより安全性も確立できれば、動物に投与することが可能と成り、がん診断領域において、これまでより簡便・確実・非侵襲的な診断・治療を可能とした。このことは急激な患者の増加が問題となっている本疾患に対し大きな福音となり臨床応用が期待は更に高まると思われる。

次年度以降は、本年度得られたカドミウム・セレン量子ドットによる修飾抗体は抗体活性を失わず有効に作用したという結果を踏まえ、ヒトへの応用をも視野に入れて本研究の進展を図る。そのためには、(1)安全性についても十分検討する、(2)結合可能な抗体の有効な精製法を更に検討する、同時にまた対象と成る試料の選択、試料中の抗原存在量、および存在形態についての詳細な検討を行う事が必要となる。

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. 学会発表

(国内学会)

- 1) 藤岡宏樹; 医療応用を目指した半導体ナノ粒子の開発. 第7回 Cell Biology Summer Meeting 2008: オープニング講演, 2008年7月5-6日(千葉県 鴨川市).

(国際学会)

1) MichikoWatanabe, Hiroshi Takeyama,
Yoshinobu Manome - DEVELOPMENT AND
APPLICATION OF A THYROID CANCER SPECIFIC
MONOCLONAL ANTIBODY. 8th International
Conference of Anticancer Research. 17-22,
October 2008., Kos, Greece.

(知的所有権の出願・取得状況)

1) 特許、その他 なし

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

分担研究者 Jonathan Heddle, Assistant Professor, Global Edge Institute,
Tokyo Institute of Technology

研究要旨

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.

A. 研究目的

Our aims during this project are as follows:

1. Design a suitable QD imaging system for delivery to mitochondria.
2. Test incorporation of the QD system into a mitochondria delivery system.
3. Construct the QD system including modification of the QD surface and attachment of a fluorescent dye.
4. Test the ability of quantum dot system to give signal in response to presence of preferred ligand (initially calcium).
5. Test the ability of the delivery system to deliver QDs to target mitochondria in cell culture.

6. Test the toxicity of both the QD system alone and after incorporation into the mitochondrial delivery system, on cultures of eukaryotic cells.

B. 研究方法

1. Design of mitochondria targeting system:
The system will be designed by Designed by collaborators in the group of Hideyoshi Harashima, (Hokkaido University) based on their MITO-porter lipid-based system. QDs are incorporated into MITO-porter based on proprietary methods.
2. Design of Quantum Dot: Silicon quantum dots are designed to include a surface covered with carboxy or amine groups which can act as