

2009/2012A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

山 本 健 二

平成22 (2010) 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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

山 本 健 二

平成22 (2010) 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) 14

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) . 19

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) 蛍光ナノ粒子を用いた高感度染色法による Gasp 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) 26

5) DDS 開発に向けた MPO 抗体による血管炎の解析

- ANCA 関連血管炎と neutrophil extracellular traps (NET)形成 -

鈴木和男(千葉大学大学院医学研究院・特任教授) 30

6) 炎症性骨破壊への破骨細胞送達メカニズムの解明

鈴木恵子(昭和大学歯学部歯科薬理学教室・講師) 40

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) 45

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) 49

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) 63

3. ナノミセルによる DDS

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)	67
	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)	73
III.	研究班会議	78
IV.	研究成果等普及啓発事業 (財団法人医療機器センター)	87

付録

V.	研究成果の刊行に関する業績一覧	
VI.	研究成果の刊行物・別刷	

平成 21 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

太田 敏博 (東京薬科大学・教授)

近藤 昭彦 (神戸大学工学部応用化学科・教授)

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 (国立国際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

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。特に近年は、特定のレセプターなどをターゲットにし、様々な薬物が開発されてきた。その過程において、動物実験までは副作用は見られなかった新規開発レセプター阻害薬が、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、異なる作用に副作用が生じることがある。またこの副作用は、上市後の起こることもある。その予期しなかった作用は、人体に間質性肺炎、肝障害など危害を加える場合も多々有る。また一つ一つの副作用は、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。

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主に用いて薬剤伝達シ

システムの開発を行っている。

1) 半導体ナノ粒子を用いて薬物や遺伝子および細胞の伝達システムの開発

我々は、半導体ナノ粒子の中でももっとも安全なシリコンナノ粒子を用いて薬剤伝達システムの開発を行っている。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、人体に安全で安心な半導体ナノ粒子の製造法の開発を行なう。またそれと同時に一桁ナノメートルサイズのナノ粒子であり、量子サイズ効果を有する半導体ナノ粒子（量子ドット）による蛍光プローブとしての生物・医療応用を展開することを含めて検討する。薬剤や遺伝子および細胞伝達システムは、副作用の軽減、治療効果の向上が期待でき、これらを実現することにより、疾病治療に於ける QOL の向上を目指す。

平成 21 年度は COX 阻害薬を活性酸素の発しないシリコンナノ粒子に結合させ、その薬効と安全性を有し有効性の高い量子ドット医薬を開発する。さらに量子ドットを遺伝子導入ベクターとしての開発を行なった。またシリコンナノ粒子の製造過程によりシリカなどの粒子の副産物が生じることから、その安全性についても検討し、その毒性メカニズムを明らかにした。

また、量子ドットによる細胞染色法を用いてマクロファージのマウス生体内動態の解析を行い、新規の AIDS 治療薬である CCR5 阻害薬が、骨代謝異常を誘導することを明らかにした。

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

A6K 合成ペプチドはアラニンが 6 残基、C 末端側にリジンが 1 残基で構成されるペプチドで、細胞膜より膜たんぱく質を分離する際、膜たんぱく質の安定化を目的とした安定化剤として開発が進められてきた。A6K は膜たんぱく質への毒性が低く、その活性を失活させないことが確認され、

また溶液中で濃度依存的にミセルやナノチューブを形成すること、また表面電荷はプラスチャージで、マイナス荷電の siRNA と静電気的な結合を考えると、siRNA 等の核酸医薬のデリバリーキャリアとしての用途に着目し、開発を進めた結果、動物個体モデルで腫瘍への有効なデリバリー効果を示した。

3) ブロック共重合体による遺伝子伝達システムの開発

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、高分子ミセルを局所静脈内投与によって骨格筋にデリバリーしたところ、プラスミド DNA (pDNA) 単独より 2 桁以上高い DNA 量と遺伝子発現が確認された。そこで治療遺伝子として可溶性 VEGF 受容体 (sFlt-1) を骨格筋に遺伝子導入し、ヒト膵臓がんの皮下移植に対する血管新生阻害治療を行った結果、有意な治療効果が確認された。さらに、組織傷害のマーカー等の定量によって、本手法の高い安全性が示唆された。

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

研究は、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し、人体に使用可能な安全で安心なナノ粒子の製造方法の開発をもまた大きな目標としている。現在、本研究で開発したシリコンナノ粒子は、非常に毒性が少ないため（少量の活性酸素の発生を除いて）、毒性試験には大量のシリコンナノ粒子が必要と成っている。そのため大量合成法の確立が重要と成り当該年度に重点的に取り組む。

また1桁ナノメートルサイズの半導体ナノ粒子（量子ドット）は量子サイズ効果を持っており、強力で安定な蛍光を有することから蛍光プローブとしての生物・医療応用を展開することを含めて検討することを目的としている。

薬剤伝達システムの開発に於いては、本研究が世界で初めて量子ドットを薬物に（降圧剤）結合させ、現在さらに動物実験にまで進んでいると言う実績を持っている。将来これをヒトへの実用化に向けて開発を行なっている。本システムが予定通りに完成することにより、薬物使用量を有効に（局

所的には高濃度かつ全体として少量の薬物で有効）行ない、それにより更にまた副作用の軽減をも可能とする。また病巣に対して高濃度の薬物療法可能とする事により治療効果の向上、疾病治療にあたってQOLの向上を目指す。

もう一つの

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、本研究の目的は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である。デリバリーキャリアとしては、これまでに検討を重ねてきたアテロコラーゲンの他に、従来、細胞膜より膜たんぱく質を分離する際、膜たんぱく質の安定化を目的とした安定化剤として開発が進められてきた A6K 合成ペプチドを用いた

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、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。

我々はこれまでの研究において DNA の折り畳み構造を制御した高分子ミセル型ベクターの調製と *in vitro* における機能評価を行ってきた。そこで本年度は、これらの高分子ミセルの *in vivo* における機能評価を行った。高分子ミセル型ベクターを局所静脈内投与し、骨格筋におけるレポーター遺伝子の発現プロファイルを評価したところ、プラスミド DNA (pDNA) 単独より顕著に高い遺伝子発現が確認された。また、骨格筋における pDNA の到達量を評価したと

ころ、2桁以上高いDNA量がミセル投与群で確認された。また、実際の治療遺伝子として可溶性 VEGF 受容体(sFlt-1)を骨格筋に遺伝子導入し、ヒト膵臓がんの皮下移植モデルに対する血管新生阻害治療を行った結果、有意な治療効果が確認された。さらに、組織傷害のマーカーである creatine phosphokinase (CPK)の血中濃度を評価したところ、CPK値の上昇は確認されず、本手法の高い安全性が示唆された。

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 の外殻を持って安定化させ全体で 4nm 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付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ッ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 amino 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、比較的に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
- (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)これまで用いてきた Cd/Se 半導体が、励起光によって場合によって毒性が出るということから更に安全な半導体ナノ粒子が必要となった。ことからシリコンによる半導体ナノ粒子の製造を初年度(2007)に開始した。当初1日生産量 10 μ g のみの生産能力であったが安全性試験は更に量が必要となり現在日産 40mg となっている。これは、昨年度の 40 倍、初年度期首に比べると 4 千倍にまで向上させることに成功した。現在これまでに用いて来た反応容器を硝子から金属に変え更に量産できるよう努力し、2009 年度には日産 1g を目指して開発している。

また現在我々が開発したシリコンナノ粒子は、Cd/Se に見られるような毒性は無く非常に安全である事を発表することができた ((Fujioka et al., 2008 年 Nanotechnology (a)). それでも僅かに残る毒性は、活性酸素が原因と成っていた事をつきとめ、2009 年度はスカベンジャーを用いた表面加工を行ない更に、更に安全な、人体に利用可能

なナノ粒子を開発した。

さらに本年度シリコンドットにレモンなど2種類のテレペン系分子を結合することに成功した。2008年度は実際に薬物であるアルミノプロフェンを結合させ、薬効や安全性などを *in vitro* で現在検討中である。2009年度には、原料薬物よりも副作用の軽減、治療効果の向上が期待できるような量子ドット・アルミノプロフェンを制作することを目指している。

一方、細胞伝達システムの開発については、現在、破骨細胞に因る顎骨破壊について半導体ナノ粒子を用いて染色された細胞の生体内動態解析による研究を進めた結果 CCR1 及び CCR5 なる2種類のサイトカインが重要な因子であることが判明した。

(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：

Gasp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GaspのmRNA発現量を測定したところ、胸腺、脾臓などのリンパ器官にのみGaspは発現しており、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。

Gasp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ったが、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た。新生児胸腺におけるT細胞初期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、Gasp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。

次にTCR-TgとGaspノックアウトマウス

を交配し、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を明らかにした。さらに興味深いことに、胸腺での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であった。

いっぽう、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、負の選択における Gasp 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、Gasp 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、Gasp は負の選択には必要ないことが明らかとなった。

ホモロジー検索から Gasp 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 Gasp タンパク質を抗原として用いて抗 Gasp 抗血清および抗 Gasp モノクローナル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 (QD) 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、Gasp タンパク質は細胞質内に均一に存在していることがわかった。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、Gasp は正の選択以外の TCR 依存性のシグナル伝達に関与していないことが明らかとなった。

(3) 腹腔内炎症応答制御法の開発と応用班：

(A) 低分子化合物の PMF における作用 R243 は 0.1-10 μM の間で濃度依存性に LPS 刺激による IL-6, TNF- α , IL-10 の産生を 20-25%にまで抑制した。

(B)胃癌腹膜播種モデル

腹腔内転移巣の incidence は対照群・抗 CCL1 抗体投与群ともに 100%(6/6)、R243 投与群で 80%(4/5)であり、転移臓器にも各群での差は見られなかった。

(C)子宮内膜症モデル

腹腔内内膜組織形成の incidence は WT マウスで 42%、CCR8KO マウスで 83%であり、統計学的有意差には達しなかったが KO マウスでより多くの病変が形成される傾向があった。しかしながら、病変の大きさ(最大径)は WT マウスのものが $4.417 \pm 2.396\text{mm}$ (mean \pm Std. deviation)に比較して CCR8KO マウスでは $1.138 \pm 0.594\text{mm}$ と有意に小さかった ($P=0.0014$)。WT マウスに見られた病変は実質組織がめだち、出血も見られたが、CCR8KO マウスではほとんどが小型の透明な cyst 状のものであった。

(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:

(1) 二重蛍光標識人工抗原ナノ微粒子の作成

人工抗原ペプチドはエノラーゼの部分ペプチドである AD22 を用いた (22 残基、ASEFYNSENKTYDLDFKTPNND)。この人工抗原ペプチドの抗原性を長期的に持続させることを目的として、抗原を生分解性高分子であるポリ乳酸グリコール酸共重合体 (PLGA) に内包させた徐放性微粒子を作製した。平成 21 年度は、微粒子の崩壊、抗原の放出の様子を観察するために、AD22 には Hylite Fluor 645、PLGA には CF (5(6)-carboxyfluorescein) で蛍光ラベルした微粒子を合わせて作製した。

(2) *in vitro* および *in vivo* における微粒子の崩壊、抗原放出の解析

様々な蛍光微粒子を用いて *in vitro* 条件での抗原放出を蛍光観察したところ、抗原放出は 4 週間にわたり持続的に維持されることがわかった。一方、ヌードマウス皮下では 3 つのフェーズで抗原の消失が見られた。すなわち、(a) 1-2 日目の急減、(b) 2-12 日目には皮下での維持、(c) 12-49 日目にかけてゆっくりとした消失が見られた。また投与箇所の皮膚組織、筋肉組織についてパラフィン切片を作製、観察したところ抗原は皮下の脂肪組織に蓄積していることが判明した (Figure 2)。なお、動物実験に際しては、国立国際医療センター研究所実験動物施設の倫理規定に基づいて実施した。

(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:

1) LucTg ラット由来骨髄細胞を MCSF, RANKL 存在下で培養して破骨前駆細胞を調製した。この細胞を LPS, Pam3CSK4 投与により炎症性骨破壊を起こした SCID マウスに adoptive transfer により移入し、細胞の生体内動態について *in vivo* imaging を行った結果、細胞移入後 3 日以内に骨破壊部位に Luc 由来の発光を観察することができた。これに対して、前駆細胞に分化していない主としてリンパ球からなる骨髄細胞画分を投与した場合には、2 次リンパ節を中心として全身的に分布していたことから、破骨細胞前駆細胞のみが、炎症部位に特異的にリクルートされることが示された。

2) 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 Tg ラット由来の骨髄細胞を用いて、同様の *in vivo* imaging を行った結果、炎症を

惹起したマウスでは頭蓋骨に蛍光をもつ多核細胞が分布することが示された。凍結切片を作製して免疫染色後、レーザー共焦点顕微鏡により観察した結果、多核でTRAP活性をもつEGFP陽性細胞が確認された。このことから、移入したラット由来前駆細胞がホストであるマウス体内で成熟破骨細胞へと分化したことが示された。

3) LucTg ラット由来の破骨前駆細胞を移入したマウスの頭蓋骨サンプルの遺伝子発現について real-time RT-PCR により解析した結果、luciferase, rat GAPDHの発現、さらにrat TRAP mRNA量の増加がみられたことから、全身投与した骨髄細胞由来の破骨前駆細胞が炎症部位まで遊走し、TRAP 活性を有する破骨細胞へと分化したことが示された。また、現在開発中の治療薬およびZoledronate 同時投与により当該遺伝子の発現は減弱したことから、治療薬により前駆細胞の炎症部位へのリクルートが抑制されると考えられた。

4) LPS および Pam3CSK4 を投与したマウスの頭蓋骨の遺伝子発現について real-time RT-PCR により解析した結果、骨吸収マーカー (TRAP, cathepsinK, MMP9)、炎症性サイトカイン(TNFalpha, IL1beta, IL6), および (MCP1, MIP1alpha) の発現上昇が認められた。また、それぞれの受容体である TLR4 および TLR2 欠損動物では骨破壊が完全に抑制され、上記の遺伝子発現も全く観察されなかったことから、細菌由来成分はそれぞれの自然免疫反応を介するメカニズムで骨破壊を起こすことが示された。

(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旨とする。

(7) DDS 開発に向けた MPO 抗体による血管炎の解析班:

好中球の NET 形成のイメージング検討

TNF- α によるプライミング効果について、NET 形成誘導に TNF- α のプライミングにより上昇していることが示された。

anti-MPO 抗体: さらに、anti-MPO 抗体により、NET 形成を誘導されたことがイメージング解析により確認された。また、anti-MPO 抗体による NET 形成誘導に、濃度依存性が見られた。

(8) Since beginning the project in 2008 we have made the following progress:

1. With collaborators (Richard Tilley School of Chemical and Physical Sciences, Victoria University of Wellington, New Zealand) we have designed QD systems that, upon delivery to mitochondria will give a dual signal, one intrinsic to the QD itself and a second due to modified Rhod-2 dye which will be attached to the QD surface (See Figure 1 for full explanation). The Silicon QDs are just 2 nm in diameter and Si rather than the more usual materials (e.g.

cadmium selenide) were chosen as Si is likely to be considerably less toxic.

2. With collaborators (Yuma Yamada, Hokkaido University) we initially carried out initial experiments to test the incorporation of the Si QDs into the MITO-Porter mitochondrial delivery system. MITO-Porter is novel lipid-based delivery system able to target mitochondria^[1]. Initial results show that the QDs can indeed be incorporated into the MITO-Porter System. *However, in the past year these collaborators have appeared to lose interest in the project and no further collaboration has been forthcoming.*
3. Working with collaborators at Victoria University of Wellington, New Zealand, who have carried out the inorganic synthesis, we have produced 2 nm QDs with modified surfaces (details currently under preparation for patent application). Modifications include amine groups which will allow attachment of Rhod-3 dye (Figure 2) Rhod-2 is a well-known dye that is responsive to calcium. Calcium concentrations within mitochondria are very important in apoptosis. Producing this Si QD-Rhod-2 hybrid will give a Mitochondria-targeted dual dye

system. Such a dye may be useful in giving the ability to detect calcium levels in mitochondria with less background noise and greater signal intensity than existing dyes. It will also allow the delivery of insoluble dyes into the mitochondria, something hitherto not possible. Finally, it will act as a start point for production of further modified QDs able to deliver more diverse and complex sensing systems and devices.

4. In the last year we have tried reacting Rhod dye with an amine-modified quantum dot. Initial reactions using standard rhodamine dye proved difficult so I moved to using NHS (N-hydroxysuccinimide)-labeled rhodamine (Figure 2)

We carried out reactions to attach the dye to the quantum dot. Samples were passed through protein desalting columns to try to remove any excess rhodamine dye that may remain. Results (Figure 3) show the emission spectra resulting from excitation at 390 nm (left) and 552 nm (excitation wavelength of rhodamine dye). QD is expected to emit at 450 nm and the rhodamine dye at approx. 575 nm. For 390 nm excitation the emission of sample is barely above background levels, however the wide base of the peak shows that QDs are present. Similarly there is a relatively weak but

clear signal for the dye. This suggests that the rhodamine successfully attached to the QD. However the amount of QD seems very low indeed. Because of this we cannot be certain that the low level of rhodamine dye signal we see is dye that is attached to QD or due simply to a very small amount of contaminating dye.

Further tests of QD alone, passing down the spin column and testing emission after recovery showed only a small fraction of the initial QDs were present. Conclusion: QD precipitates on the spin column. Another method or different column should be found to separate the QD.

(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：
蛍光顕微鏡観察、ウェスタンブロッティング、及び ELISA 様システムにおいて、抗原を特異的に検出することに成功した。細胞染色については、JT95 抗体と QD によって、甲状腺がん細胞株 SW1736 を特異的に染色することに成功した。対照群の GFP 発現 U937 細胞は染色されず、また、Normal IgM でも細胞は染色されていない。更に、従来法の一つである phycoerythrin (PE) 染色では、JT95 を示す赤い蛍光が、緑の検出範囲に漏れることがあったが、QD では漏れが見られなかった。

ELISA 様システム

これまで報告されていた 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の検出範囲 (Takeyama et al., *Cancer Res.*, 1996) よりも、検出限界が約 6.7 倍高い 0.15-37.5 ng/mL まで検出が可能であっ

た。Normal IgM では、測定値が上昇しなかった。

2) アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS 班：

まず A6K 合成ペプチドとルシフェラーゼを抑制する siRNA を混合し、動物に皮下移植した前立腺がん細胞 PC3M-luc の腫瘍に投与した結果、腫瘍のルシフェラーゼ活性は 60% 抑制された。さらに前立腺がん細胞の増殖を抑制する効果の有る EZH2siRNA を A6K ペプチドと混合し、前立腺がんの骨転移モデル動物に全身性に投与した結果、図 2 に示す結果のように、投与後 15 日目には、対照としたコントロール siRNA に比較して EZH2siRNA と A6K の複合体は全身の骨転移巣の腫瘍の増殖を顕著に抑制した。A6K ペプチドによる siRNA デリバリーの腫瘍抑制効果の解析：腫瘍の増殖はイメージングによって定量されている。

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：

1) 高分子ミセル型ベクターによる骨格筋への遺伝子導入

遺伝子導入 6 日後のルシフェラーゼ (Luc) 発現量をフォトンイメージャーによって評価した結果を図 2(A) に示す。また、PLys 重合度の異なる PEG-b-PLys からなる高分子ミセル型ベクターの Luc 発現量を経時的に定量した。これらの結果より、高分子ミセル型ベクターは naked pDNA の 2 桁以上高い遺伝子導入効率を示すことが明らかになった。また、遺伝子発現期間に関しても高分子ミセル型ベクターは 1 ヶ月以上の持続的は遺伝子発現を示した。ここで naked pDNA の局所 i.v. 投与は、既にヒトへと応用されている pDNA の筋肉内注射よりも高い遺伝子導入効率を示すことが知られており (Mol. Ther. 10:386(2004))、それらの結果よ

り、高分子ミセル型ベクターの局所 i.v. 投与は、骨格筋への新しい遺伝子導入法として期待される。一方、PLys 重合度に関しては、H20 年度に報告した cell free 系での遺伝子導入実験の結果に一致して、PLys 重合度が 88 の場合には遺伝子発現の低下が確認された。

2) 骨格筋における pDNA 到達量の評価

投与 1 日および 5 日後に筋組織に送達された intact な pDNA 量を Real-time PCR によって評価した(表 1)。その結果、高分子ミセル(組成 12-38)投与群では、naked pDNA 投与群と比較して 2-3 桁高い pDNA が検出された。

3) sFlt-1 によるヒト膵臓がんモデルの治療

pDNA および高分子ミセル投与後の相対腫瘍体積変化を図 3 に示す。その結果、naked pDNA と高分子ミセル(組成 12-38)のどちらの場合においても制がん活性が認められたが、高分子ミセルは naked pDNA よりも有意に高い制がん活性を示した。一方、Luc 発現 pDNA を搭載した高分子ミセル投与群では治療効果が認められなかった。

4) 遺伝子導入法の安全性評価

naked pDNA および高分子ミセル(組成 12-38)の i.v. 投与 1 日後および 6 日後の血中 CPK 値を表 2 に示す。その結果、naked pDNA と高分子ミセルのどちらの場合においても 1 日後に CPK 値の上昇を示したが、6 日後にはコントロールと同程度まで低下することが確認された。

C. まとめ

これまでに我々は、量子ドットに薬物を結合させ、追跡可能な量子ドット医薬として高血圧治療薬をモデルとして製造することに成功した。また眼科領域で診断することが非常に難しい硝子体変性に対して、量子ドットを眼内に注入し、バックライトとして利用することによりコントラストが十分つくことにより、容易に診断がとれるシステムを新規に開発した。実際に、ヒトに応用する場合、ヒトにも利用可能な安全で安心な量子ドットを製造することが不可欠と成る。そのため、本研究ではシリコンドットを用いてシリコン量子を合成し、薬剤

伝達システムや細胞染色技術に資するものを目指して研究開発を行なっている。しかしながら安全性の高いナノ粒子の毒性検査に対しては、大量のサンプル量が必要と成るため、量子の大量合成が必要と成ってくる。そのため本研究当初、10 μ g/1 バッチなる生産量に対し検討を続けた結果現在 30mg の量を製造可能と成った (Bio Photonics 2009 San Jose, 発表予定)。またそのシリコン粒子は、十分安全であるが僅かに残った毒性を示す原因が、活性酸素であることを発見し (Fujioka et al., IPO 2008) 現在活性酸素スカベンジャーで表面加工を行なっている。

さらにシリコンドットでは量子効率が従来の量子ドットに比べて落るので、現在、生きた組織染色にこれを利用する為には安全な貴金属を添加して製造する計画である。そのため現在量子計算法を用いてどの金属が最も良いかを検討している。

またシリコン等のナノ粒子に遺伝子を結合し細胞レベルで遺伝子を導入し発現する事を確認している (Hoshino et al. IPO 2008)。動物を用いて試験する計画を現在立てている。

現在さらにアルミノプロフェン (COX 阻害剤) をシリコンナノ粒子に共有結合させ更に活性酸素スカベンジャーにより更に安全性を増した新型量子ドット医薬のプロトタイプを製造することに成功した。現在その特性を調べている。

細胞伝達システムの開発については、マクロファージのケモカインレセプターを制御する為に、リ

ガンドを用いて行なうために量子ドットにリガンドを結合している。そのモデルとしてレモネン、オイゲノール等の匂い分子で量子ドットの表面加工に成功した。これにより破骨細胞の伝達システム解析の為の細胞染色、MIP1 などのリガンドのコントロールのための量子ドットを開発している。

D. 健康危険情報

2009 年 11 月 16 日

CCR5 阻害剤による HIV 治療による骨代謝

以上を誘導する可能性

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) 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alaria原虫蛋白質を内包したナノ・マイクロ粒子の製造法」 国立大学法人群馬大学、特許出願 2009-059789.

2) 特許出願予定：A6K 新規合成ペプチドによる核酸デリバリー

3) [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 (PCT/JP2009/003758)

4) 片岡一則、宮田完二郎、西山伸宏、石井武彦、呉寿栄、キム ヒュンジン、カチオン性のポリ(アミノ酸)およびその使用出願、特願 2009-31799

シリコンナノ粒子による薬物・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 太田敏博 東京薬科大学・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 叶谷文秀 国立国際医療センター研究所国際臨床研究センター・特任研究員
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・特任研究員
協力研究者 花田三四郎 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

研究要旨

本研究は、半導体などのナノ粒子を用いて薬物や遺伝子および細胞の伝達システムの開発を目的としている。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し、人体に安全で安心な半導体ナノ粒子の製造法の開発を行なう。またそれと同時に一桁ナノメートルサイズのナノ粒子であり、量子サイズ効果を有する半導体ナノ粒子（量子ドット）による蛍光プローブとしての生物・医療応用を展開することを含めて検討する。薬剤や遺伝子および細胞伝達システムは、副作用の軽減、治療効果の向上が期待でき、これらを実現することにより、疾病治療に於ける QOL の向上を目指す。

2009 年度は COX 阻害薬を上記活性酸素の発しないシリコンナノ粒子に結合させ、その薬効と安全性を有し有効性の高い量子ドット医薬を開発する。さらに量子ドットを遺伝子導入ベクターとしての開発を行なった。またシリコンナノ粒子の製造過程によりシリカなどの粒子の副産物が生じることから、その安全性についても検討し、その毒性メカニズムを明らかにした。

また、量子ドットによる細胞染色法を用いてマクロファージのマウス生体内動態の解析を行い、新規の AIDS 治療薬である CCR5 阻害薬が、骨代謝異常を誘導することを明らかにした

A. 研究目的

本研究は、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としている。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し、人体に使用可能な安全で安心なナノ粒子の製造方法の開発をもまた大きな目標としている。現在、本研究で開発したシリコンナノ粒子は、非常に毒性が少ないため（少量の活性酸素の発生を除いて）、毒性試験には大量のシリコンナノ粒子が必要と成っている。そのため大量合成法の確立が重要と成り当該年度に重点的に取り組む。

また 1 桁ナノメートルサイズの半導体ナノ

粒子（量子ドット）は量子サイズ効果を持っており、強力で安定な蛍光を有することから蛍光プローブとしての生物・医療応用を展開することを含めて検討することを目的としている。

薬剤伝達システムの開発に於いては、本研究が世界で初めて量子ドットを薬物に（降圧剤）結合させ、現在さらに動物実験にまで進んでいると言う実績を持っている。将来これをヒトへの実用化に向けて開発を行なっている。本システムが予定通りに完成することにより、薬物使用量を有効に（局所的には高濃度かつ全体として少量の薬物で有効）行ない、それにより更にまた副作用の軽減をも可能とする。また病巣に対して高濃度の薬物療

法可能とする事により治療効果の向上、疾病治療にあたってQOLの向上を目指す。

また半導体ナノ粒子は、量子サイズ効果によって、強力な蛍光を利用し、細胞内レベルから生体レベルまでの動態を追跡することが可能である。薬物の追跡に見ならず細胞の追跡にも役に立つことから、マクロファージの細胞伝達機構の解明に利用して来た。量子ドット蛍光プローブを用いた腹腔マクロファージの研究に於いてCCR8が重要である事を世界で初めて発表し外科手術後癒着の原因であることを解明した。現在、破骨細胞に於いて同様の研究を行いCCR1とCCR5の2つのレセプターが重要でありことを明らかにした。さらには骨細胞の発生について量子ドットを用いて検討した結果、骨代謝、骨粗鬆について多くの結果を得た(36回, 欧州石灰組織シンポジウム予定, 2009, Vienna)。2009年には量子ドットの多色染色により生理的な骨代謝を動画として解析し、骨疾患の解明と治療に迫る。する。

B. 研究方法

これまでに我々は、量子ドットに薬物を結合させ、追跡可能な量子ドット医薬として高血圧治療薬をモデルとして製造することに成功した。また眼科領域で診断することが非常に難しい硝子体変性に対して、量子ドットを眼内に注入し、バックライトとして利用することによりコントラストが十分つくことにより、容易に診断がとれるシステムを新規に開発した。実際に、ヒトに応用する場合、ヒトにも利用可能な安全で安心な量子ドットを製造することが不可欠と成る。そのため、本研究ではシリコンドットを用いてシリコン量子を合成し、薬剤伝達システムや細胞染色技術に資するものを目指して研究開発を行なっている。しかしながら安全性の高いナノ粒子の毒性検査に対しては、大量のサンプル量が必要と成るため、量子の大量合成が必要と成ってくる。そのため本研究当初、 $10\mu\text{g}/1$ バッチなる生産量に対し検討を続けた結果現在 30mg の量を製造可能と成った(Bio Photonics 2009 San Jose, 発表予定)。またそのシリコン粒子は、十分安全であるが僅かに残った毒性を示す原因が、活性酸素であることを発見し(Fujioka et al., IPO 2008) 現在活性酸素スカベンジャーで表面加工を行なっている。

さらにシリコンドットでは量子効率が従来の量子ドットに比べて落ちるので、現在、生きた組織染色にこれを利用する為には安全な貴金属を添加して製造する計画中である。そのため現在量子計算法を用いてどの金属が最も良いかを検討している。

またシリコン等のナノ粒子に遺伝子を結合し細胞レベルで遺伝子を導入し発現する事を確認している(Hoshino et al. IPO 2008)。動物を用いて試験する計画を現在立てている。

現在さらにアルミノプロフェン(COX阻害剤)をシリコンナノ粒子に共有結合させ更に活性酸素スカベンジャーにより更に安全性を増した新型量子ドット医薬のプロトタイプを製造することに成功した。現在その特性を調べている。

細胞伝達システムの開発については、マクロファージのケモカインレセプターを制御する為に、リ

ガンドを用いて行なうために量子ドットにリガンドを結合している。そのモデルとしてレモネン、オイゲノール等の匂い分子で量子ドットの表面加工に成功した。これにより破骨細胞の伝達システム解析の為に細胞染色、MIP1などのリガンドのコントロールのための量子ドットを開発している。

(倫理面への配慮)

研究代表者および分担者は、それぞれの機関における生命倫理委員会規定、実験動物取扱規定に諮るとともに、ヒト採取サンプルのインフォームドコンセントを得て本研究プロジェクトに参画するものであり、生命倫理への配慮は十分になされる。またさらに現在国立国際医療センター臨床研究倫理委員会に臨床研究計画書を提出している。各施設での承認後臨床研究倫理指針に基づいて研究を行う。

C. 研究結果

これまで用いてきたCd/Se半導体が、励起光によって場合によって毒性が出るということから更に安全な半導体ナノ粒子が必要となった。ことからシリコンによる半導体ナノ粒子の製造を初年度(2007)に開始した。当初1日生産量 $10\mu\text{g}$ のみの生産能力であったが安全性試験は更に量が必要となり現在日産 40mg となっている。これは、

昨年度の 40 倍、初年度期首に比べると 4 千倍にまで向上させることに成功した。現在これまでに用いて来た反応容器を硝子から金属に変え更に量産できるよう努力し、2009 年度には日産 1g を目指して開発している。

また現在我々が開発したシリコンナノ粒子は、Cd/Se に見られるような毒性は無く非常に安全である事を発表することができた (Fujioka et al., 2008 年 Nanotechnology (a))。それでも僅かに残る毒性は、活性酸素が原因と成っていた事をつきとめ、2009 年度はスカベンジャーを用いた表面加工を行ない更に、更に安全な、人体に利用可能なナノ粒子を開発した。

また本年度シリコンドットにレモネンなど 2 種類のテレペン系分子を結合することに成功した。2008 年度は実際に薬物であるアルミノプロフェンを結合させ、薬効や安全性などを in vitro で現在検討中である。2009 年度には、原料薬物よりも副作用の軽減、治療効果の向上が期待できるような量子ドット・アルミノプロフェンを制作することを目指している。

細胞伝達システムの開発については、現在、破骨細胞に因る顎骨破壊について半導体ナノ粒子を用いて染色された細胞の生体内動態解析による研究を進めた結果 CCR 1 及び CCR 5 なる 2 種類のサイトカインが重要な因子であることが判明した。

D. 考案

シリコンナノ粒子の大量合成をグローブボックスを用いる方法を改善し、金属性リアクターを用いて行い、製造装置を小型にし、生産力を 50 倍に拡大することに成功した。

E. 結論

シリコンナノ粒子による薬剤担体は、薬効がもとの薬物の 10 倍と成り、毒性試験においては、10 分の 1 となり極めて特徴的な性質を持っていることから今後の臨床応用に期待される。

結晶シリカは、マクロファージの TGF- β 1 の分泌を促進する効果を有する。

CCR1 ノックアウトマウス、CCR5 ノックアウトマウスは、それぞれ異なる骨代謝異常を起こし、ヒトにおいても CCR5 阻害剤は、骨代

謝異常を誘導する。また新規エイズ治療薬である CCR5 阻害薬を骨代謝異常を誘導する。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fujioka K, Manabe N, Nomura M, Watanabe M, Takeyama H, Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K., Manome Y. Detection of thyroid carcinoma antigen with Quantum dots and monoclonal IgM antibody (JT-95) systems. *J. Nanomater.* 2010; in press

Yamamoto S, Manabe N, Yamamoto K. High-Definition Slit Lamp Video Camera System. *Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging* January/February 2010;41(1): in press

Fujioka, K., Arakawa, E., Kita, J., Aoyama, Y., Okuda, T., and Yamamoto, K. Combination of Real-Value Smell and Metaphor Expression Aids Yeast Detection *PLoS ONE* 4 (11), e7939, 2009

Shiohara A., Hanada S., Fujioka K, Lim T., Yamamoto K., Northcote P., and Tilley RD Chemical Reactions On Surface Molecules Attached to Silicon Quantum Dots *J. Am. Chem. Soc.* 2010 Jan 13;132(1):248-253.

Prabacar, S., Shiohara, A., Hanada, S., Fujioka, K., Yamamoto, K., and Tilley, RD Size Controlled Synthesis of Germanium Nanocrystals with Hydride Reducing Agents and their Biological Applications *Chemistry of Materials*, in press.

Sudoh, K., Hirakuri, K., Fujioka, K.,