

- pathogenesis of ANCA related systemic vasculitis: lessons from SCG/Kj mouse model. 第15回MPO研究会、2009年11月7-8日、栃木
13. 藤元昭一、小林茂人、鈴木和男、布井博幸. 宮崎県におけるANCA関連血管炎の疫学調査—発症率と欧米との差異を明らかにするために—第15回MPO研究会、2009年11月7-8日、栃木
 14. 小林茂人、藤元昭一、鈴木和男. 抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎など疫学調査の種類と考え方—欧米と日本の差異: 発症率と罹病率: population-based study と hospital-based study—第15回MPO研究会、2009年11月7-8日、栃木
 15. 武曾恵理、宇野賀津子、岩崎由加子、立石悠、古宮俊幸、猪原登志子、鈴木和男. MPO-ANCA陽性MPAへのIVIg療法の急性期の血中サイトカインケモカインに対する抑制効果. 第15回MPO研究会、2009年11月7-8日、栃木
 16. 村上央、三浦典子、安達禎之、石橋健一、埴晴雄、相澤義房、鈴木和男、大野尚仁. GM-CSF遺伝子導入マウスのCAWS反応性. 第15回MPO研究会、2009年11月7-8日、栃木
 17. 鈴木和男. 好中球研究の新たな展開. 第15回MPO研究会、2009年11月7-8日、栃木
 18. 宇野賀津子、武曾恵理、猪原登志子、鈴木和男. MPO-ANCA腎炎患者のインターフェロンシステムの特性: 健常人、IgA腎症との比較から. 第15回MPO研究会、2009年11月7-8日、栃木
 19. 鈴木和男. ANCA陽性の間質性肺炎: 最近の話題 ANCA陽性の間質性肺炎 第27回呼吸器・免疫シンポジウム 2009年11月21日、東京
 20. Miyuki Omori-Miyake, Kazuyoshi Ando, Hidehiro Ueshiba, Yutaka Arimura, Satoshi Yamagoe, Kazuo Suzuki and Junji Yagi. A role of LECT2, leukocyte cell-derived chemotaxin 2, in experimental sepsis. 39回日本免疫学会, 12月2-4日、大阪
 21. Reina Kusunoki Tomokazu Nagao, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki. Involvement of Interleukin-6 in RPGN of SCG/Kj mice. 39回日本免疫学会, 12月2-4日、大阪
 22. 志賀由佳, 富澤一夫, 長尾朋和, シュグン, 前原康宏, 河内正治, 中山俊憲, 鈴木和男. マウスモデルにおけるVILIとTNF α , IL6, KCの先行投与によるびまん性肺障害(DAD)の初期段階の誘導/Early phase of diffuse alveolar damage induced by VILI plus TNF α , IL6, KC in mice. 39回日本免疫学会, 12月2-4日、大阪
 23. Tomokazu Nagao, Koya Suzuki, Toshinori Nakayama, and Kazuo Suzuki. A mouse model of pauci-immune glomerulonephritis induced by monoclonal anti-LAMP-2 antibody.. 39回日本免疫学会, 12月2-4日、大阪
- 【国際学会】
1. Kazuo Suzuki Discussion Leader 'Myeloperoxidase and the heart' 6th International Human Peroxidase Meeting April 19-22, 2009, Chapel Hill, North Carolina, USA.
 2. Kazuo Suzuki, Yoshitomo Hamano. Role of the 'Man-1' cluster gene region on chromosome-1 in response in MPO-ANCA vasculitis genetic dissection of vasculitis, MPO-ANCA production, and related traits in scg/kj mice. 6th International Human Peroxidase Meeting April 19-22, 2009, Chapel Hill, North Carolina, USA.
 3. Kazuo Tomizawa, Tomokazu Nagao, Kan Saiga, Masamichi Oshima, Kazuo Kobayashi, Toshinori Nakayama, Masaru Tanokura, Kazuo Suzuki. Association of risk epitopes of MPO-ANCA with renal failure in SCG/Kj mice showing crescentic glomerulonephritis. 6th International Human Peroxidase Meeting April 19-22, 2009, Chapel Hill, North Carolina, USA.
 4. Yasuaki Aratani, Fumiaki Kura, Haruo Watanabe, Hisayoshi Akagawa, Nobuyo Maeda, Hideki Koyama, and Kazuo Suzuki. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense against fungi. ISHAM-, Tokyo, May 29.
 5. Kazuo Suzuki. Lecture on Epitope of MPO-ANCA in Workshop-I: Epitope

- specificity. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
6. Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Shigeto Kobayashi, Kazuko Uno, Naoto Tamura, Yuji Yamanishi, Atsushi Fukatsu, Richard A. Watts, David G.I. Scott, David R.W. Jayne, Kazuo Suzuki, Hiroshi Hashimoto. A comparative study of the diagnostic accuracy of ELISA systems for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies available in Japan and Europe. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
 7. Eri Muso, Kensuke Joh, Toshiko Ihara, Yukako Iwasaki, Toshiyuki Komiya, Kazuo Suzuki. Specific cytokines and chemokines as the predictor of clinical and pathological activity and chronicity in patients with ANCA-ANCA-positive MPA. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
 8. Toshiaki Oharaseki, Yuki Yokouchi, Megumi Wakayama, Fumie Ihara, Hitomi Yamada, Kazuo Suzuki, Shiro Naoe, Kei Takahashi. Histopathology of late-stage arteritis in murine systemic vasculitis induced by polysaccharide of *Candida albicans*, as animal model of Kawasaki disease. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark.
 9. Kazuo Suzuki, Kazuo Tomizawa, Tomokazu Nagao, Shigeto Kobayashi, Eri Muso, Wako Yumura, Takeshi Sasaki, Osamu Hotta, Yasuaki Harabuchi, Sakae Homma, Yuji Yamanishi, Manabu Nishii, David Jayne, Niels Rasmussen, Toshinori Nakayama, Hashimoto Hashimoto, Japan-UK-EU Project Members. Risk Epitopes of MPO-ANCA in Patients with MPA in Japan. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
 10. Kei Takahashi, Toshiaki Oharaseki, Yuki Yokouchi, Hitomi Yamada, Hiroshi Mamada, Shiro Naoe, Tsutomu Saji, Naohito Ohno, Kazuo Suzuki. Effect of anti-TNF-alpha medicaments in mice vasculitis model caused by *Candida albicans* water soluble fraction. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
 11. Kazuo Tomizawa, Tomokazu Nagao, Kan Saiga, Masamichi Oshima, Kazuo Kobayashi, Toshinori Nakayama, Masaru Tanokura and Kazuo Suzuki. Risk Epitopes of MPO-ANCA in SCG/Kj mice. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
 12. Kazuko Uno, Eri Muso, Toshiko Ito-Ihara, Katsumi Yagi, Setusya Fujita, Kazuo Suzuki. Comparison of plasma cytokine/chemokine levels and IFN-alpha production capacity amongst healthy subjects, patients with MPO-ANCA positive MPA, and IgA nephritis. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
 13. Shouichi Fujimoto, Shigeto Kobayashi, Kazuo Suzuki. Incidence and clinical phenotype of ANCA-associated renal vasculitis: comparison between Japan and the UK. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
 14. Junichi Hirahashi, Kimito Kwahara, Makoto Arita, Tomokazu Nagao, Kazuo Suzuki, Keiichi Hishikawa, Toshiro Fujita. Dietary enrichment with eicosapentanoic acid (EPA) prevents anti-neutrophils cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
 15. Yoshitomo Hamano, Wako Yumura, Eiji Kusano, Kazuo Suzuki. Genetic

- dissection of leukocytosis related to spontaneously occurring crescentic glomerulonephritis in a model of SCG/Kj mice. The American Society of Nephrology The 42nd Annual Meeting and Scientific Exposition October 27 to November 1, 2009. San Diego, USA
16. Kazuo Suzuki. Contribution of neutrophils to host-defense and chronic diseases. Lecture in Peking University 1st Hospital. 2009年10月6日, Beijing, China
 17. Kazuo Suzuki. Role of Neutrophils and Myeloperoxidase in Severe Lung Injury in Mice with influenza infection, Seminar in NIAID-NIH, Oct 15, 2009, Bethesda, USA
 18. Hamano et al. Genetic Dissection of Leukocytosis Related to Spontaneously Occurring Crescentic Glomerulonephritis in a Model of SCG/Kj Mice. ASN Meeting, Oct. October 29, 2009, USA.
 19. Eri Muso, Kazuko Uno, Yukako Iwasaki, Yu Tateishi, Toshiyuki Komiya, Toshiko Ihara, Kazuo Suzuki. IVIg therapy for acute phase MPO-ANCA positive systemic vasculitis—New horizon of therapy with evidence of Suppressive effect on acute cytokine and chemokine storm--Inflammation Program (炎症制御学セミナー), 2010年1月15日-15日, 千葉
 20. K. Takahashi, T. Oharaseki, Y. Yokouchi, H. Yamada, H. Mamada, N. N. Miura, N. Ohno, H. Murata, S. Naoe and K. Suzuki CAWS-induced murine vasculitis and Kawasaki disease Inflammation Program (炎症制御学セミナー), 2010年1月15日-15日, 千葉
 21. Tomokazu Nagao, Yasuaki Aratani, Toshinori Nakayama, and Kazuo Suzuki. Development of murine crescentic glomerulonephritis model using anti-MPO and anti-LAMP-2 antibodies Inflammation Program (炎症制御学セミナー), 2010年1月15日-15日, 千葉
 22. Yoshitomo Hamano, Wako Yumura, Eiji Kusano, Tomokazu Nagao and Kazuo Suzuki Genetic dissection of aberrant T cell activation related to the pathogenesis of ANCA related systemic vasculitis in a model of SCG/Kj mice. Inflammation Program (炎症制御学セミナー), 2010年1月15日-15日, 千葉
 23. Kazuo Suzuki. Role of Neutrophils and Myeloperoxidase in Severe Lung Injury in Mice with A/H1N1 (PR-8) and Patients with Avian Flu (H5N1) Phagocyte Imaging joint with 3th International Symposium for Bioimaging. 3rd International Symposium on Bioimaging Jan. 18-21, 2010, Okazaki
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
4. 特許取得
なし
 5. 実用新案登録
なし
 6. 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
(H19-ナノ一般-012)

炎症性骨破壊への破骨細胞送達メカニズムの解明

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

協力研究者： 竹下 文隆・国立がんセンター研究所がん転移研究室・研究員

研究要旨

骨形成と骨吸収がカップリングした骨代謝回転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、炎症性骨破壊などの疾患では骨形成を上回る骨吸収が起こるため、患者の QOL は著しく損なわれる。骨破壊を起こす破骨細胞は炎症細胞、免疫細胞と同じ造血幹細胞に由来することから、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。本研究では生きてままのマウスにおいて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、疾患モデル動物における遺伝子解析の結果、ケモカイン(MCP-1, MIP1alpha) が破骨前駆細胞の送達に関与していることが示された。

A:研究目的

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。超高齢社会であるわが国において、これらの疾患の効果的、かつ安価な治療薬の開発は急務であると考えられる。現在使用されている生物製剤は、高価格であるうえアナフィラキシーショックを主とする重篤な副作用が問題となっており、これらの治療薬とは異なる作用機序の治療薬を開

発する必要がある。本研究では炎症性骨破壊の病態解明を主目的として、個々の過程の詳細なメカニズムを追求するために、生きている動物において *in vivo* imaging を行った。併せて、遺伝子発現パターンの変化を調べ、現在開発中の治療薬の効果について検討した。

B:研究方法

1) 炎症性骨破壊モデル動物を用いる *in vivo* imaging
前年度の研究成果から、破骨細胞形成が促進されることが示された細菌由

来成分である lipopolysaccharaide (LPS)および lipopeptide をマウス頭蓋骨骨膜下に投与して炎症性骨破壊モデル動物を作製する。このマウスに Luciferase transgenic (LucTg)または EGFP transgenic (EGFPTg) ラット由来骨髄細胞を adoptive transfer により移入し、細胞の生体内動態について IVIS™, OV110™ を用いて in vivo imaging を行う。

2) 炎症性骨破壊モデル動物についての生化学的検討

In vivo imaging 実験終了直後の動物から、頭蓋骨、頭部炎症皮膚、脾臓、骨髄を採取する。これらの組織から Lysing matrix™ を用いて total RNA を調製し、real time RT-PCR により遺伝子発現を調べる。

3) 炎症性骨破壊モデル動物についての組織化学的検討

In vivo imaging 実験終了直後の動物から、頭蓋骨、脾臓、大腿骨を採取する。凍結切片作製後、免疫蛍光染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡により標的分子の局在について検討する。

(倫理面への配慮)

本研究は昭和大学遺伝子組換え実験安全委員会 (承認番号: 0777, 0877)、昭和大学動物実験委員会 (承認番号: 19031, 19032) および国立がんセンター動物実験委員会 (承認番号: H19-A25M1) の諸規定を遵守して遂行した。

C:研究結果

5) 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。

6) 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。

7) 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、全身投与した骨髓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。

8) 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。

D: 考察

1) 達成度について

本年度の 3 つの目的、すなわち、①炎症性骨破壊の病態モデル動物作製とバイオイメージング手法の確立、②での遺伝子発現および組織化学的解析、③骨吸収疾患治療薬の作用メカニズムの解明、について順調に成果をあげることができた。とりわけ、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と、動物体外から可視化した前駆細胞の体内動態観察手法を確立できたことにより、今後継続して実験を行う基盤ができたものと確信している。

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。また本研究において確立し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、健全な歯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生体内動態の追跡ができるようにする。そのため、最終分化に至る途中段階の分化マーカー遺伝子をナノ粒子でラベルしたプローブに加え、蛍光蛋白発現ベクターをつないだプローブを導入した破骨前駆細胞をマウスに移入して in vivo imaging 手法を用いて観察する。これにより、蛍光強度の減衰曲線の差から、複数のマーカー分子が区別できるようにする。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、骨形成促進薬として東北大と共同で海外特許出願）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

生きたままの炎症性骨破壊モデルマウスにおいて、全身的に投与したラット由来の破骨前駆細胞が炎症部位に観察された。この現象は遺伝子解析および免疫組織化学的解析の結果からも確認され、全身循環血中の前駆細胞が炎症部位にリクルートされることにより、急激な骨破壊が惹起されることが示された。また、現在開発中の骨吸収疾患治療薬について、前駆細胞の炎症局所への遊走抑制が作用メカニズムのひとつであると考えられ、歯周病など、罹患率が高く、炎症好発部位である疾患での骨破壊抑制にきわめて有効であることが予想される。

F:健康危機情報

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

4. 論文発表

1 Keiko Suzuki and Shoji Yamada: Triacylated lipopeptide, a component of Gram-positive bacteria, induces osteoclastogenesis in the absence of RANKL and resorbs calvarial bone *in vivo* through Toll-like receptor 2. Oral Ther Pharmacol, in press.

2 Nobuhiro Sakai, Keiko Suzuki, Tomio Morohashi and Shoji Yamada: Na⁺/Ca²⁺ exchanger mRNA and orientation of F-actin filaments in cultured osteoblastic cells. Dent Med Res, in press.

5. 学会発表

1 鈴木恵子、山田庄司:炎症性骨破壊モデル動物における破骨細胞の体内動態(第27回日本骨代謝学会、Osaka, Sep 2009)

2 篠田 壽、鈴木恵子、村上 忍、竹山禎章、山田庄司: Anabolic な作用を持つ新規ビスホスホネート、[4-(methylthio) phenylthio] methanebisphosphonate (第27回日本骨代謝学会、Osaka, Sep 2009)

3 篠田 壽、鈴木恵子、村上 忍、

竹山禎章、山田庄司：新規ビスホスホネート、[4-(methylthio)phenylthio]

methanebisphosphonate の骨形成促進作用 (第 60 回日本薬理学会北部会、Toyama, Sep 2009)

4 Keiko Suzuki, Fumitaka Takeshita, Kenji Yamamoto, Shoji Yamada and Takahiro Ochiya: Recruitment of osteoclast precursor cells into the inflammatory site where extensive bone destruction occurs. (The 83rd Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Yokohama, March 2010)

5 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 21 年度昭和大学共同研究成果発表会, Tokyo, March 2010)

6. その他の業績

1 IN Cell Image Competition 2010, アジアチャンピオン

2 Bio Techniques, 48(3) 表紙掲載

H:知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

特許出願

[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)

半導体などナノ粒子による薬物・細胞伝達システムの開発

(H19-ナノ-一般-012)

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・国際臨床研究センター・
センター長

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 法義・国立国際医療センター研究所・協力研究員

協力研究者：藤岡 宏樹・国立国際医療センター研究所・協力研究員

研究要旨

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

A. 研究目的

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

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

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

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

B. 研究方法

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

他の染色材料も同様に注入して比較検討を行なう。

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

する。

C. 研究結果

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

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

また、眼科臨床用細隙灯顕微鏡にての記録をするために家庭用ハイビジョンビデオカメラを用いた記録システムを考案した。

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。

新たに考案した安価な細隙灯顕微鏡用観察システムは一般眼科臨床においても患者や家族への眼科疾患の説明や疾患の記録に有益であり、このシステムが広まることによる社会的意義も高いと考えられる。

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。

また、細隙灯顕微鏡用観察システムについては、今後論文発表などによって認知度を上げてゆきたいと考えている。

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) Manabe N, Yamamoto S, Fujioka K, Hoshino A, Yamamoto K. IMAGING TRANSPARENT VITREOUS OF THE EYE USING NANO PARTICLES, Particles 2008 (May. 10-13, 2008) (Orlando, Florida, U.S.A.)

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

(国際シンポジウム)

1) Hoshino A, Yamamoto S, Manabe N, , Fujioka K, , Yamamoto K., Visualizing invisible vitreous using Aqueous Colloidal Quantum Dots as Imaging Agents. AMN-3 Third International Conference on Advanced Materials and Nanotechnology (February 11-16 Wellington New Zealand)

2) 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) 「蛍光ナノ粒子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45回日本臨床分子医学会学術集

会

神戸

平成20年7月

2) 「ナノ粒子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)

粉体工学会秋期研究発表会

大阪

平成19年10月

3) 「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

4) 「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キング
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

5) 「硝子体病変の可視化～水溶性量子ドットを用いて～」

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

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）分担総合研究報告書

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

(H19-ナノ一般-012)

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

研究分担者	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
研究協力者	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
研究協力者	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・助教
研究協力者	真鍋 法義	財団法人医療機器センター 流動研究員 国立国際医療センター研究所 協力研究員
研究協力者	野村 真弓	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・技術員
研究協力者	都丸 慶子	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・技術員
研究協力者	星野 昭芳	東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 医用エンジニアリング研究室・ポストドクトラルフェロー

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抗体）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の増強を図り、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、簡便で非侵襲的な血液や尿による診断を最終目標と設定している。

本研究期間においては、最終目標に向かうための第一段階として、JT95抗体のカドミウム・セレン量子ドット（QD）による直接標識、並びに抗IgM抗体とQDを組み合わせた三段階反応について、その活性、及び応用の評価を行なった。

ELISA様システムやウェスタンブロッティングによる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染色できることが蛍光顕微鏡像により示された。

このJT95が認識するがん抗原は糖鎖ファイ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。本研究を進展させ、甲状腺癌特異的認識抗体によるがんの早期診断システムを開発することによって、現在、甲状腺癌の確定診断に用いられているFine Needle Aspiration (FNA)：穿刺吸引細胞診を補完し、より非侵襲的で患者の負担を軽減した診断が可能となる。

A:研究目的

本研究の目的は甲状腺癌の非侵襲的な診断システムを構築するためのナノ粒子直接・間接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 モノクロー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 2,400 以上の抗体産生ハイブリドーマから選択された 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%以上であった。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 Res.*, 56: 1817-1822, 1996)。

JT95 抗体が認識する癌特異抗原は 250 kDa の糖鎖修飾型ファイブロネクチンであり、この抗原は患者血清中にも 105 kDa 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。

本研究では、この JT95 抗体と蛍光ナノ粒子(QD)とを組み合わせることによって、シグナルの増強を図り、更なる高精度な診断システムを構築することを目的としている。

B:研究方法

- (a) 細胞:甲状腺癌細胞 SW1736 細胞株、及びそのタンパク抗原をサンプルとして用いた。
- (b) 検出法: 3つの生化学的手法 (1) 細胞染色、(2) ウェスタンブロッティング、(3) 96 穴プレートを用いた ELISA 様システムにて抗原への反応を検証した。細胞染色像は、35mm glass bottom dish、または、チャンバースライドに培養した SW1736 細胞に対し、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss; LSM510)、3D ライブセル光学顕微鏡 (Delta Vision; Applied Precision)、または、蛍光顕微鏡(BZ-9000; Keyence) を用いた。
- (c) 検出抗体の作製: JT95 モノクロー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-IgM アフィニティカラム (GEヘルスケア社)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。活性確認用の ELISA 抗原としてはヒト甲状腺癌細胞 SW1736 と隣臓癌細胞 MIAPaCa のタンパク (cell lysate)、および SW1736 培養上清タンパクを 10 µg よりダブルダイリューションを行って用いた。同抗原を ELISA プレートに固相化し 4°C/一晩反応させた。その後ペルオキシダーゼ標識抗マウ

ス IgG, M 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 450 nm の吸光度を測定した。

(d) 検出試薬：甲状腺癌特異的抗体 JT95 への QD の直接標識 (平成 20 年度)、並びに間接標識 (平成 21 年度：ビオチン化抗マウス IgM 抗体、及び QD-streptavidin) で検出を行なった。抗体の対照群として正常マウスから採取した IgM (Normal IgM) を用いた。

(e) 抗体へのナノ粒子の直接標識法：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、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 655ITK™ 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) へ標識を行う事とした。

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。

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。

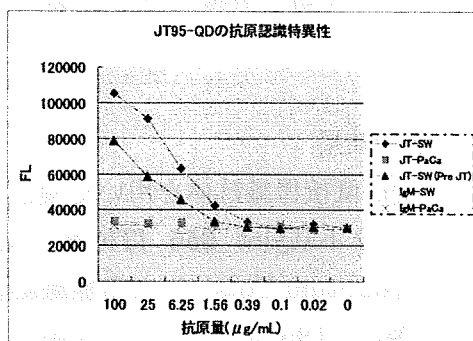
C:研究結果

1. QD 直接標識抗体を用いた検証：量子ドット (Qdot 655 ITK™ 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: 0.1 mg・1 mg をスタートサンプルとした。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 1 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 1. JT95-QD 直接標識抗体の活性 :

- (1) JT-SW; JT95-QD の SW1736 甲状腺がん細胞に対する活性
- (2) JT-SW(Pre JT); (1)に対して、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の JT95 抗体を前処理し、JT95-QD の活性を阻害したもの
- (3) JT-PaCa; JT95-QD の MIAPaCa 膵臓がん細胞に対する活性
- (4) IgM-SW; Normal IgM-QD の SW1736 甲状腺がん細胞に対する活性
- (5) IgM-PaCa; Normal IgM-QD の MIAPaCa 膵臓がん細胞に対する活性



同時に行なったウェスタンブロッティングによる活性測定でも目的とする甲状腺癌特異的な 250 kD および 105 kD のタンパク位置に QD の蛍光を確認することができた (データ未掲載)。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。3D ライブセル光学顕微鏡では、SW1736 細胞の細胞膜が染色されている像が観察された (データ未掲載)。

2. QD 間接標識を用いた検証 : 蛍光顕微鏡観察、ウェスタンブロッティング、

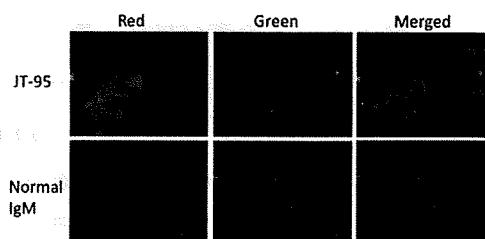
及び ELISA 様システムにおいて、抗原を特異的に検出することに成功した。

(1) 細胞染色 :

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 (図 2)。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 (データ未掲載)。

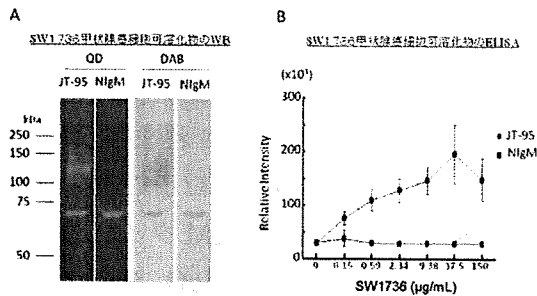
(2) ウェスタンブロッティング : QD で染色した場合、従来法の diaminobenzidine (DAB) 染色と比較して、検出されたタンパク質は同様であったが、バンドの視認性が良くなった (図 3A)。

図 2. JT95 抗体と間接標識 QD による、SW1736 細胞と GFP 発現 U937 細胞の染色。Normal IgM (対照群); 正常マウス IgM



(3) 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 (図 3B)。Normal IgM では、測定値が上昇しなかった。

図 3. JT95 抗体と QD による抗原の検出。(A) ウェスタンブロッティング法。(B) 96 穴プレートを用いた ELISA 様システム。



D: 考察

1. 達成度について:

平成 20 年度より開始された本研究は、カドミウム・セレン量子ドットを甲状腺癌特異的抗体 JT95 抗体へ直接的、または間接的に標識することに成功し、甲状腺がん抗原の検出感度を高めることに成功した。

特に、一般的に直接標識が困難とされている IgM 抗体へのナノ粒子標識を、結合条件の適正化により成功させたことは、JT95 を使った検出試験のブレイクスルーとなった。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なった。

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、米国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 et al., *JAMA*, 295: 2164-2167, 2006)。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の上位には含まれていないものの、1975 年より上昇を続け 1980 ~ 1990 年の 10 年で 2.8 倍という高い値を示し、増加傾向は現在も続いている。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 2 cm より小さい微小な乳頭癌だが、4-5 cm 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、本高感度検出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:

JT95 モノクロー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. et al., *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)。

JT95 抗体は、IgM 抗体であるため、IgG 化やフラグメント化によって、更なる抗原特異的親和性が得られる可能性もある (Fujioka K, et al., *J Nanomater.* (2010))。将来的に、最適化した抗体を用い、本研究で遂行した QD による高感度検出システムを組み入れることによって、より精度を高め、血液や尿からといった、より低侵襲な診断が可能になると考えられる。

E:結論

以上のように、本研究では半導体ナノ粒子を直接的に、または間接的に標識した JT95 抗体がその活性を失うことなく高感度に甲状腺がん癌抗原を検出できることを証明した。

特に JT95 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 タイプのモノクローナル抗体であり、IgG タイプ以外の抗体に対しても安定した標識が行えることを証明できた。

本研究成果は、より安全性を有する量子ドット(シリコンナノ粒子など)を用いることによって生体への安全性が確立されれば、動物体内に応用することも可能となり、がん診断領域において、これまでよりも簡便・確実・非侵襲的な診断・治療を可能にするであろう。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、臨床応用の期待は更に高まると考えられる。

F:健康危機情報

なし

G:研究発表

7. 論文発表

1. Kouki Fujioka, Noriyoshi Manabe, Mayumi Nomura, Michiko Watanabe, Hiroshi Takeyama, Akiyoshi Hoshino, Sanshiro Hanada, Kenji Yamamoto, and Yoshinobu Manome; Detection of thyroid carcinoma antigen with

Quantum dots and monoclonal IgM antibody (JT-95) systems, *J. Nanomater.* (2010). *Accepted.*

2. 学会発表

1. 藤岡宏樹、山本健二；半導体ナノ粒子の生物・医療応用とその安全性，第7回 Cell Biology Summer Meeting 2008: 基調講演，2008年7月5-6日(千葉県 鴨川市)

2. Michiko Watanabe, 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.

3. 藤岡宏樹、星野昭義、真鍋法義、

花田三四郎、昼岡正樹、佐藤慶介、Richard D Tilley、平栗健二、山本健二、馬目佳信；蛍光ナノ粒子 QD を使った医療応用、第8回 Cell Biology Summer Meeting 2009: 一般講演、2009年7月11-12日(茨城)

4. 藤岡宏樹、渡辺美智子、野村真弓、武山浩、馬目佳信；甲状腺癌特異的認識抗体 JT95 と蛍光ナノ粒子 QD による新規抗原検出法の開発、財団法人東京都医学研究機構 21年度研究交流フォーラム:ポスター発表(予定)、2010年3月11日(東京)

3. その他の業績

なし

H:知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

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.

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