

200912012B

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19年度～平成21年度 総合研究報告書

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19年度～平成21年度 総合研究報告書

研究代表者

山 本 健 二

平成22（2010）年3月

目次

I. 研究代表者総合報告（平成 19 年度～平成 21 年度）

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. 分担研究者総合報告（平成 19 年度～平成 21 年度）

1. 半導体などナノ粒子による DDS 研究班

1) シリコン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)・・・1

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)・・・7

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)・・・12

4) 蛍光ナノ粒子を用いた高感度染色法による胸腺特異的発現遺伝子の機能解析

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)・・・17

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)・・・24

6) 炎症性骨破壊における破骨細胞前駆細胞送達メカニズムの解明

バイオイメージング手法を用いて

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)・・・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)・・・52

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・・・59

/グローバルエッジ研究院・特任准教授)・・・

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)・・・66

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) 72

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) 80

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する業績一覧 88

I. 研究代表者総合報告

(平成 19 年度～平成 21 年度)

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・がん転移・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

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った。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 の向上を目指した。

我々が開発したシリコンナノ粒子は、現在、世界で最も安全な粒子であり、その大量合成法を開発した(1 バッチ 1 日にて 200mg/L)。また 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した。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い有効な方法であることを確認した。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、健康危険情報報告し（21年11月報告）、現在臨床研究を開始した。

またこのような臨床研究を行うために資する技術の開発を行っている。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ステムの開発を行って来た。

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 CCR 5 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

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

1) 研究の背景

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、それを行なった。

2) 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んだ。

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した。

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した。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発見した。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。

また本研究のもうひとつ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て行う。

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

これらの研究は、すべて臨床に使用されることを目標としている。実際にアルミノプロフェンは、シリコンナノ粒子化することにより薬効が、元末より 10 倍となり、副作用は 10 分の 1 に減少した。この法則が利用できるすべての薬物に対してシリコンナノ粒子によって、複合体を作ることが可能となる。アルミノプロフェンは、消炎鎮痛剤であり、リュウマチなど多くの人々に利用されている。しかしながら、この薬物は、消化器に副作用を起こし潰瘍などが形成されることが知られている。この研究は、通常量で 100 倍量服用するのと同じ効果が期待される。リュウマチで痛みを訴えている方々に福音となると期待されている。

本研究では、上記シリコンナノ粒子とアルミノプロフェンを例に出して示しているが、ブロックポリマーやアテロコラーゲンなどおおよそ 10 種類の薬剤伝達キャリアーとそれらのキャリアーによって伝達される薬剤伝達システムの開発を行ってきた。今後実際の出番を待っている。

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。

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) 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

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。

本研究では、上記の研究目的を達成するために、H19-21年の3年間において、(1)非ウイルス型遺伝子ベクターの核内でのDNA脱凝縮過程と遺伝子発現の解析、(2)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構築と機能評価、(3)細胞内環境応答型高分子ミセル型ベクターの構築、の主に3つの研究テーマを推進した。

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

以下に研究代表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:

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い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。

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。

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。現在日産 400mg/L に達している。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、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。この知見から CCR5 阻害新規 HIV 治療薬に関して健康危険情報を報告した。

(2) 蛍光ナノ粒子による高感度染色法を

用いた ISCA 遺伝子の機能解析:

1) RhoH に関する研究結果

RhoH mRNA の発現を RT-PCR 法にて確認したところ、血球系細胞、とくにリンパ球に強く発現していた。

RhoH ノックアウトマウスの胸腺は非常に小さく、CD4CD8 ダブルポジティブ (DP) 細胞の分化が抑制されるとともに、正の選択も阻害されていた。正の選択の阻害は TCR-Tg マウスを用いても確認され、 β 選択のみならず、正の選択において RhoH が重要であることが明らかとなった。HY-TCR Tg マウスを用いた負の選択についても、RhoH 欠損により阻害されることがわかり、RhoH は負の選択にも必要であることが示された。さらに、末梢に少数存在している成熟 T 細胞の機能を検討したところ、TCR 刺激による活性化が全く起こらないことがあきらかとなった。これは RhoH が ZAP70 に結合してアダプターとして作用しているためであると考えられた。

RhoH ノックアウトマウスにおいては、末梢の TCR $\alpha\beta$ 型のコンベンショナルな T 細胞は激減しているが、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の分化は変わっていない。そこで、アゴニスト選択を受ける Treg、NKT 細胞、CD8 $\alpha\alpha$ 型 IEL の分化について検討を行った結果、驚いたことに、CD8 $\alpha\alpha$ 型 IEL の分化だけは全く影響を受けていなかった。従って、RhoH はコンベンショナルな T 細胞の分化には必須であるが、CD8 $\alpha\alpha$ 型 IEL の分化には必要ないことが初めて明らかとなった。

さらに、CD8 $\alpha\alpha$ 型 IEL 機能についても検討したが、TCR 刺激による IFN γ の産生も全く正常であり、IEL に関しては分化にも機能にも RhoH は必要ないことがわかった。

2) Gasp に関する研究結果

Gasp の組織特異的発現について RT-PCR 法により 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発現しており、他の臓器での発現はみられなかった。T 細胞のなかでも、CD4CD8 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：

1. マウス腹腔内 CCL1 の検出
癒着を起こしているマウスでは腹腔内 CCL1 濃度が優位に上昇していた。

2. 低分子化合物の PMF における作用

R243 は 0.1-10 mM 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。

3. 癒着モデルの作成とその評価

Ischemic button 作成による癒着モデルは飼育環境の変化により、発生頻度およびその程度がかなり変動することが明らかとなった。この方法では大網および fat pad の癒着が主体であり、肝臓や腸管の癒着の頻度は比較的lowであった。結紮にかえて電気メスでの側腹壁の焼灼は、さらに癒着の発生頻度が低かった。また、結紮による ischemic button の頂点をさらに焼灼したが、発生頻度や癒着の程度が高くなることはなかった。これに対して cecal ligation and puncture は穿刺部位を中心に、腹壁および腸管、肝臓などの非常に強い癒着がおこり、膿瘍を形成する個体や死亡個体もあった。そこで、盲腸先端の焼灼のみを行う cecal ablation を試みたところ、C57BL/6 マウスで比較的安定して盲腸への癒着がみられた。癒着の数をカウントし、それぞれの癒着点 (臓器) について癒着の強さを 2 段階に評価したうえで、総計を個体の癒着スコアとして評価した。

各モデルについて、低分子化合物の効果の評価した。CCR8 受容体発現細胞における CCL1 誘導性の Ca²⁺ flux の阻害効果を指標としたスクリーニングによって得られた低分子化合物 R243 を DMSO で溶解した後 0.2% normal mouse serum を含む endotoxin free PBS で希釈し 0.2 mg/kg body weight の用量で手術施行直後に腹腔内投与した。Control として化合物のみを含まない同じ溶液を投与した。その結果、ischemic button, cecal ablation のいずれにおいても有意な癒着防止効果がみられた。また術直後投与のみだけでなく、2 日後、4 日後の 3 回投与を行うとさらに癒着スコアが低下し有効性が明確になった。

4. 胃癌腹膜播種モデル

腹腔内転移巣の incidence は対照群、抗 CCL1 抗体投与群で 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。

4. 子宮内膜症モデル

腹腔内内臓組織形成の incidence は WT マウスで 42% (3/7)、CCR8KO マウスで 83% (10/12) であり、統計学的有意差はないが KO マウスでより多くの病変が形成されていた。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 ($P=0.0014$, 下図)。WT マウスに見られた病変は実質組織になっており、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) ワクチン微粒子に適した高分子材料の化学合成

アミノ酸を原料とする人工抗原ペプチドと強い相互作用の予想される、アミノ酸とヒドロキシカルボン酸からなるポリデプシペプチドの合成研究を行っている。今年度は 4 残基または 5 残基の繰り返し配列からなる高分子材料を 2 種類合成し、微粒子化の検討を行った。

(2) 生分解性高分子を用いた人工抗原微粒子

熱帯熱マラリア原虫の解糖系の酵素であるエノラーゼのアミノ酸配列をもとにしたワクチン候補抗原と、生分解性高分子を用いて、微粒子化に成功した。

微粒子の基材には (a) 研究室で開発中のポリデプシペプチド、および (b) 市販の高分子材料を選択した。また人工抗原ペプチドは水系溶液として用いた。得られた W/O/W エマルジョンを攪拌後、有機溶媒を揮発させ、微粒子を得た。電子顕微鏡観察と AFM (= 原子間力顕微鏡) により、微粒子は球状で、その大きさは主に数百 nm で分布することがわかった。

微粒子の大きさを制御するために、水系溶液の条件を様々に検討した。これによって、マラリア原虫人工部分抗原を内包したナノオーダー微粒子の作成に成功した。本研究で開発された微粒子で免疫した場合、抗原としてだけでなく、一定のアジュバント効果も期待される。今後は本材料を用いて実験動物に様々な方法で免疫するなど、その抗原性の強さ、抗原リリース持続期間等を解析し、微粒子抗原としての有用性を解析してゆく。微粒子化技術に関し、2 回の特許出願を行った。

(3) マラリア原虫とワクチンを可視化するためのナノ蛍光プローブの化学合成

マラリア原虫やワクチンを分子プローブで可視化することを目的に、カルボキシフルオレセイン (CF) で蛍光標識化した、アンホテリシン B (AmB) と人工抗原ペプチドを合成した。AmB が酸に弱くポリエンを保持していることから保護基として Fmoc 基を選択した。また AmB と CF を結ぶリンカーには、6-アミノヘキサン酸からアミド化およびホフマン転移反応から合成したペンタメチレンジアミンを用いた。また、ワクチン用の人工抗原ペプチドは活性エステル法で CF 蛍光標識を行った。

(4) 人工抗原ペプチドの化学合成

微粒子中に用いる人工抗原ペプチド (AD22 = -Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-) について、昨年度は臨床展開を見据えた液相化学合成法による大規模製造法について研究を行った。

今回は引き続き固相法を援用した同様の研究展開と共に、最も簡便で一般的な Fmoc 固相法についても合成研究を行った。その結果、アミノ酸分析で矛盾のない人工抗原を得ることに成功した。

(6) マラリア原虫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

マラリア原虫やワクチンの研究に際して赤血球や脾臓を可視化することが求められている。そこで赤外領域で検出の可能なナノプローブとして知られている標識

用 ICG (Ito ら *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5, 2689 (1995)) の高効率・高純度な化学合成法を開発し、¹H および ¹³C-NMR の帰属を確立した。

(7) 人工抗原ナノ微粒子の生分解挙動

昨年度は生分解性高分子としてポリ乳酸-グリコール酸共重合体を用いた人工抗原ナノ微粒子の作成と特許出願 (特願 2008-84310) を行った。今回は引き続き *in vitro* と *in vivo* における微粒子分解と抗原放出を観察した。

(7) 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ている。平成 21 年度はは微粒子の崩壊、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)-carboxy fluorescein) で蛍光ラベルした微粒子を合わせて作製した。

(8) *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 of 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。

(9) 生分解性人工抗原ナノ微粒子の抗原性

微粒子の抗原性について、Balb/c マウスに皮下投与により検討を行った。投与後 3 週目頃より人工抗原に対する特異抗体の上昇が観察された。その後も抗体価は序々に上昇し続け、40 週経った現在でも抗体価を維持している事が判明した。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) 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 ラットの繁殖に成功し、このラットおよび EGFP transgenic 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。

2) *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 (Lucus eXplore; GE healthcare) 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数値化する方法を確立した。

3) 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。

4) 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。

5) 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部分的に減弱したことから、治療薬により前駆細胞のリクルートが抑制されると考えられた。

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 (TNF α , IL1 β , IL6), および (MCP1, MIP1 α) の発現上昇が認められた。

(6) 量子ドットを利用した硝子体可視化の試み班：

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。

(7) DDS 開発に向けた MPO 抗体による血管炎の解析班：

1) QD-antiMPO の好中球、マクロファージへの結合

anti-MPO Antibody を投与したマウス腹腔から得た好中球、マクロファージに QD-antiMPO を反応させた。anti-MPO Antibody を投与した好中球には、QD-antiMPO が結合した。対照の IgG 投与のマウス由来好中球にはほとんど QD-antiMPO が結合しなかった。その好中球は Triton X-100 処理して細胞内分子と抗体が反応できる状態により QD-antiMPO の

反応性は確認できた。

2) 抗 MPO 抗体、TNF \cdot あるいは H₂O₂ 刺激による E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の細胞表面への発現

抗 MPO 抗体 (aMPO)、TNF \cdot あるいは H₂O₂ で血管内皮細胞を刺激して、24 時間後の adhesion molecules ICAM-1 の細胞表面への蛋白質の発現を、Cell ELISA により解析した。aMPO 刺激では、血管内皮細胞表面への発現は認められなかったが、TNF \cdot あるいは H₂O₂ での刺激により、血管内皮細胞の表面への ICAM-1 の発現が有意に上昇した。

3) TNF \cdot あるいは H₂O₂ 刺激による E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の mRNA の発現

IgG、TNF \cdot あるいは H₂O₂ で血管内皮細胞を刺激し、2 時間後の E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の mRNA 発現を PCR により半定量的に解析した。E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の mRNA 発現は、TNF \cdot 、H₂O₂ ともに上昇した。

4) TNF \cdot によるケモカイン KC の産生への IgG の抑制作用

TNF \cdot で血管内皮細胞を刺激し、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した。その結果、特に、ケモカイン KC の産生に大きな変動があり、有意差が確認された。また、KC 産生は、IgG (10, 25 mg/mL) によって有意に抑制された。

5) QD-TNF \cdot による血管内皮細胞への結合解析

量子ドット QD 標識 TNF \cdot (QD-TNF \cdot) により TNF \cdot の血管内皮細胞への反応を解析した。QD-TNF \cdot α を血管内皮細胞に反応させ反応性像が認められた。以上の結果から、TNF \cdot や H₂O₂ で血管内皮細胞を刺激することで、血管内皮細胞の活性化やサイトカイン・ケモカインの産生が誘発された。また、IgG によるその抑制作用も認められた。さらに、QD-antiMPO や QD-TNF \cdot によりこれらの反応の解析ができる可能性が示された。このように、サイトカイ

ン、活性化好中球が血管内皮細胞作用して血管炎の誘発を惹起する反応の解析に量子ドット QD 標識分子が有用であることが示された。

6) 好中球の NET 形成のイメージング解析
TNF- α によるプライミング効果: 図 1 に見られるように、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。

7) Catalase による NET 形成抑制

NET 形成経路の上流には、NADPH-oxidase による ROS 産生が関与していることが報告されている。anti-MPO 抗体によって誘導される NET 形成に ROS の経路が関与しているかを確かめるために catalase を用いて阻害効果を検討した。PMA 処理による NET 形成は catalase で阻害され ROS 依存的であることが確認できた。しかし、anti-MPO 抗体による NET 形成には catalase による阻害がほとんど確認できなかった。

(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:

< 1 > QD 直接標識抗体を用いた検証:

量子ドット (Qdot 655 ITKTM 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、ウェ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。

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。

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)。

(1) 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。

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:

1) ポリオーマウイルス属の SV40 をベースにしたデリバリーシステムの開発をめざして、ヒトの悪性腫瘍の 85% 以上で活性を示すテロメラーゼのプロモーターを組み込んだベクターを開発した。このベクターは、in vitro の培養細胞への導入実験に

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(東京工業大学・半田宏教授との共同研究の一部)。このベクター(ルシフェラーゼ siRNA 搭載)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た。イメージング解析の結果、本新規ベクター複合体はヒト乳がんの腫瘍に特異的に作用し、ルシフェラーゼの発現を顕著に抑制したが、それ以外の腫瘍に対しては無効であった。

2) 初年度、次年度の成果で、アテロコラーゲン分子の修飾可能な側鎖はある程度限られていることがわかっている。最終年度はこれらの側鎖に肝がんを高発現するトランスフェリン受容体に対する抗体を修飾した。その結果、培養細胞を用いた検討では、このトランスフェリン受容体特異的アテロコラーゲンと siRNA との複合体は、肝がん細胞株に取り込まれることが判明した。しかし、対照とした乳がん細胞株に比べて、その効率は 1.6 倍ほどであり、顕著な特異性とは言いがたい結果であった。またこれを動物に投与したが、肝臓への特異的な集積は認められなかった。

3) 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 EZH2 siRNA 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 EZH2 siRNA 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。

3) 超機能高分子ミセルによる遺伝子導入システム開発

(3-1) 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) 非ウイルス型遺伝子ベクターの核内での DNA 脱凝縮過程と遺伝子発現の解析

2 種類の蛍光色素で標識した pDNA は、

LPEI と混合した場合、fluorescence resonance energy transfer (FRET) を示したことから、DNA の凝縮が示唆された。一方、Lipofectamine2000 と混合した場合は、FRET は観察されなかったが、細胞と incubation することによって、FRET が観察された。これは、Lipofectamine2000 単独では、DNA は凝縮されないが、血清タンパク質等が共存することによって、aggregate が形成され、DNA が凝縮されるためであると考えられる。

次に、上記のポリプレックスおよびリポプレックスを Huh-7 細胞と 6 時間培養し、核内における FRET および Keima-Red の遺伝子発現を CLSM 観察によって評価したところ、核内 FRET と Keima-Red 遺伝子発現に関連性が見られた。LPEI ポリプレックスにおいては、解析した 110 個の細胞に対して 44 個の細胞に Keima-Red 遺伝子の発現が認められ、その 36 個 (81.8%) で FRET が観察された。遺伝子発現が認められなかった 66 個の細胞に関しては、53 個 (80.3%) で FRET が観察されなかった。一方、リポプレックスの場合も、Keima-Red 遺伝子の発現が認められた細胞の 81.3% で FRET が観察され、遺伝子発現が認められなかった細胞の 96.2% で FRET が観察されなかった。以上の結果より、ポリプレックスとリポプレックスのどちらの場合においても、遺伝子発現のためには、核内における DNA の脱凝縮が重要であることが示唆された。

(2) 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構築と機能評価

PLys 重合度が異なる PEG-b-PLys ブロック共重合体と pDNA を混合したところ、PLys 鎖長と N/P 比に依存して、ロッド/トロイド状と球状の形態を取ることが AFM より観察された。PLys 鎖長が短く、N/P 比が低い条件においては、ロッド/トロイド状のポリプレックスが形成され、PLys 鎖長が長く、N/P 比が高い条件においては、DNA が collapse して球状になることが分かった。そこで、それぞれのポリプレックスについて cell free 系でのルシフェラーゼ遺伝子の発現量を評価したところ、ロッド/トロイド状に DNA が折り畳まれたポリプレック

スではフリーのpDNAよりも高い遺伝子発現効率が得られ、球状にcollapseされることによってポリプレックスの遺伝子発現効率が著しく低下することが明らかとなった。

次に、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局所 i. v. 投与による骨格筋へのルシフェラーゼ遺伝子の導入効率をフォトイメージャーによって評価したところ、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ヶ月以上の持続的遺伝子発現を示した。PLys 重合度に関しては、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70以上の場合には遺伝子発現の低下が確認された。

このような結果に基づいて、sFlt-1の遺伝子導入によるヒト膵臓がんBxPC3細胞の皮下移植モデルの血管新生阻害治療を行ったところ、naked pDNAと高分子ミセル(PLys 重合度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。

(3) 細胞内環境応答型高分子ミセル型ベクターの構築

PEG-SS-P[Asp(DET)]とpDNAを異なるN/P比で混合したところ、N/P>1において80-90nmの会合体を形成することが確認された。次に、N/P=2で形成させたPEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルの還元環境応答性を確認するために、10mM dithiothreitol (DTT) (50倍等量)存在下で粒径およびゼータ電位測定を行ったところ、粒径とゼータ電位の増加が確認された。一方、SS結合を持たないPEG-P[Asp(DET)]は、10mM DTT存在下においても、そのような変化を示さなかったことから、PEG-SS-P[Asp(DET)]から形成された高分子ミセルは、還元環境に応答することによって、ミセルからPEGが脱離することが示唆された。

次に合成ベクターのHeLa細胞による取り込み量を³²Pで標識されたpDNAを用いて評価したところ、P[Asp(DET)]からなるポリプレックスはカチオン性の表面を有するためにPEG-P[Asp(DET)]ミセルよりも4-8倍高い細胞内取り込み量を示したが、PEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルの取り込み量は、PEG-P[Asp(DET)]ミセルと同等であり、PEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルのPEG鎖は細胞外においてある程度安定であることが示唆された。さらに、HeLa細胞に対するルシフェラーゼ遺伝子(Luc)の導入効率を評価したところ、PEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルは、N/P=16においてPEG-P[Asp(DET)]ミセルよりも100-1,000倍高い遺伝子発現効率を示した。また、PEG-SS-P[Asp(DET)]は、N/P比に関係なく細胞毒性を示さないことが確認された。また、遺伝子発現の時間依存性を評価したところ、P[Asp(DET)]ポリプレックスは培地交換後に速やかな遺伝子発現の上昇を示したが、PEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルの遺伝子発現は11時間後に上昇し始め、16時間後に顕著に増加することが明らかになった。一方、PEG-P[Asp(DET)]ミセルは、非常に遅い遺伝子発現挙動を示したことから、PEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルは、細胞内でPEG鎖が脱離することによってエンドソームを脱出し、高い遺伝子発現活性を示すことが示唆された。そこで、遺伝子ベクターの細胞内局在をCLSM観察によって評価したところ、PEG-P[Asp(DET)]ミセルは、あまり細胞質へと移行しなかったが、PEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルはP[Asp(DET)]ポリプレックスよりも遅れて細胞質内に移行することが明らかとなった。この結果は、上記の遺伝子発現評価の結果とも良く対応しており、後期エンドソーム内においてPEGの脱離が起り、それによるP[Asp(DET)]のカチオン性表面の露出によってエンドソーム脱出が促進されるものと思われた。

(3-2) 循環器疾患に対する遺伝子治療用ベクターの開発:

PEG-b-P[Asp-(DET)]の精製法を従来

法、Et2O 法(エーテルによる再沈で回収)、AcOH 法(酢酸を用いてクエンチ)を用いて精製した後、ルシフェラーゼ遺伝子発現を定量した。

精製法を変更してホモポリマーの混入をなくすことによって、特に N/P 比 40 および 60 において遺伝子発現量を高率にすることができた。ポリマー投与後 1 日目の炎症性サイトカインの発現量を同定した。

炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6 の遺伝子発現量は、エーテルおよび酢酸による精製で、低く抑制することができた。これらの結果から、精製過程を加えてホモポリマーを出来るだけ減少させることにより、DNA コンプレックスを投与後の肺における遺伝子発現量を増加し、なおかつ炎症を抑えることができることがわかった。次に、それぞれの方法を用いて精製後のポリマーを投与後のマウスの生存率を算出した。

エーテルによる再沈、あるいは酢酸によるクエンチによってポリマーを精製する過程を加えることにより、投与後のマウスの生存率を改善することができた。

次に、重合度の違いによる *in vivo* 遺伝子発現量および炎症の惹起への影響について検討した。実験には酢酸クエンチによる精製後のポリマーを用いて、ルシフェラーゼ遺伝子の発現量、および投与後の肺における炎症性サイトカイン遺伝子の発現量を検討した。PEG-b-P[Asp-(DET)]の鎖長、N/P 比別 *in vivo* 遺伝子発現量作成した。*in vitro* においては、ポリマーの鎖長の長いほうが遺伝子発現量は高いことは以前に報告したが、*in vivo* においては、98 マーよりは 68 マーの方が発現量が高いことがわかった。ポリマーの鎖長による炎症性サイトカイン遺伝子の発現を図 6、7 に示す。

68 マーに比べて 96 マーのポリマー投与により、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6 の mRNA 発現量は、極めて低値であることがわかった。次に、それぞれの重合度のポリマーを投与後のマウスの生存率を調べた。

ポリマーの重合度を 96 マーから 68 マーに

短くすることによって、投与後のマウスの生存率を改善することができた。

従来のルシフェラーゼ発現ベクターと、ルシフェラーゼをコードする部位の CpG を無くした pORF- Δ Luc とを用いて、PEG-b-P[Asp-(DET)]を用いてそれぞれの complex を作製し、経肺投与後、一定期間後に両肺を採取してホモゲナイズし、ルミノメーターを用いてルシフェラーゼ活性の測定を行なった。

における遺伝子発現量は、いずれの N/P 比においても pORF- Δ luc のほうが高値であり、*in vivo* における遺伝子発現において、CpG 量が影響することが示唆された。遺伝子発現の時間的変化に対する CpG 量の影響を調べたものを図 10 に示す。

pORF- Δ luc による遺伝子発現は、pGL3-Cont に比べて極めて初期から発現量が高値であり、投与後 14 日目まで、その傾向は持続していた。

次に、pORF- Δ luc および pGL3-Cont とを用いて、PEG-b-P[Asp-(DET)]を用いてそれぞれの complex を作製し、経肺投与後、一定期間後に両肺を採取してホモゲナイズし、RNA を精製し、reverse transcriptase により cDNA に逆転写を行い、real time RT-PCR を用いて炎症性サイトカイン mRNA (TNF- α および IL-6) 発現量を調べた。

(TNF- α) mRNA 発現量の時間経過
炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6 の遺伝子発現量は、投与後 1 日目で pGL3-Cont に比べて pORF- Δ Luc が高値を示した。

TNF- α は pORF- Δ Luc が 3 日後には低値をとり、IL-6 は 3 日後には同等の値を示し、いずれも 7 日後には低値を示した。

次に、コンドロイチン硫酸存在下の PEG-b-P[Asp-(DET)]による遺伝子導入効率、炎症性サイトカイン mRNA 発現量、生存率への影響を調べた。

コンドロイチン硫酸の濃度とルシフェラーゼ遺伝子発現量との関係を図 13 に示す。ルシフェラーゼ遺伝子の発現量は、コンドロイチン硫酸 0~0.5 mg/ml 存在下に変化