

を認めず、5 mg/dl 存在下に発現は抑制された。

コンドロイチン硫酸の濃度と、遺伝子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との関係を図 14 に示す。

コンドロイチン硫酸存在下に、炎症性サイトカインの IL-6 mRNA 発現量が著明に抑制されることがわかった。

コンドロイチン硫酸の濃度と、遺伝子導入後のマウスの生存率との関係を図 15 に示す。コンドロイチン硫酸存在下に遺伝子導入後のマウスの生存率が増加することがわかった。

C. まとめ

我々の研究は、その当初の目的である半導体などナノ粒子による薬剤伝達システムの開発と、マクロファージなど薬物投与副作用に関連する免疫細胞の動態を調べ、薬物副作用の機所を見る、その2つのテーマを課題に行ってきた。シリコンナノ粒子による薬剤伝達は、安全でかつまた薬効高まるという特徴を得た。またその安全性は、もとの薬物よりも安全であると言う特徴を有するものが完成された。我々研究者および患者さんにとって一日も早く臨床試験を行いたいと説に希望している。

また一方マクロファージ研究では、破骨細胞の発生に CCR 5 が非常に重要で、その KO マウスでは様々な骨の異常を起こすことを発見した。また最新の HIV 治療薬、CCR 5 阻害薬は、マウスのシステムあるいは、ヒト抹消血を用いた検査により骨代謝マーカーを異常値に変化させてしまうことを発見し、健康危険情報として報告した。これについては現在 AIDS 患者さんによる臨床研究を開始した。

D. 健康危険情報

2009 年 11 月 16 日

CCR5 阻害剤による HIV の治療が骨代謝の異常を誘導く可能性があることを報告した。

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

それぞれの分担者の項参照。

Ⅱ．分担研究者総合報告

(平成 19 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）
分担研究報告書

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 CCR 5 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。

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。

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、容易に診断がとな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た。

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。

D. 考察

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

2010

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 Vol 41, No 1; *in press*

Shiohara A, Hanada S, Prabakar S, Fujioka K,

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

2009

Fujioka K, Arakawa E, Kita J, Aoyama Y,
Okuda T, Manome Y, **Yamamoto. K.**

Combination of Real-Value Smell and
Metaphor Expression Aids Yeast Detection.
PLoS ONE 4 (11), e7939, 2009.

Shiohara. A, Hanada. S, Prabakar. 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. *in press*.

Prabakar. 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, Manabe N,
Yamamoto K

Nanocrystalline diamond particles dispersed by
solutions *Trans Mater Res Soc Jpn* . 2009,
34(2)313-316

Fujioka K, Futamura Y, Shiohara T, Hoshino A,
Kanaya F, Manome Y, **Yamamoto K.**

Amino Acid Synthesis in Supercritical Carbon
Dioxide with Water System.

International Journal of Molecular Sciences .
2008, 9(6),
2722-2732.doi:10.3390/ijms10062722 *Epub
ahead of print, 15 June 2009.*

Hoshino A, Hanada S, Manabe N, Nakayama T,

Yamamoto K.

Immune Response Induced by Fluorescent
Nanocrystal Quantum Dots *in vitro* and *in vivo*.
IEEE Transactions on NanoBioscience . 2009;
Mar;8(1):51-57. *Epub ahead of print, Mar 16,*
2009.

2008

Yamamoto S, Manabe N, **Yamamoto K.**
High-Definition Slit Lamp Video Camera
System.

Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging 2008;
in press

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

GFP expression by intracellular gene delivery
of GFP-coding fragments using nanocrystal
quantum dots *Nanotechnology* 2008 Dec 10;
19(49):pp1-12. *Epub ahead of print, 18
November 2008*

Fujioka K, Hiruoka M, Sato K, Manabe N,
Miyasaka R, Hanada S, Hoshino A, Tilley RD,
Manome Y, Hirakuri K, **Yamamoto K.**
Luminescent passive-oxidized silicon quantum
dots as biological staining labels and their
cytotoxicity effects at high concentration.
Nanotechnology 2008 Oct 15;19(41):415102.

Epub ahead of print, Sep 3, 2008

Osinski M, Jovin TM, **Yamamoto K.**
Biomedical applications of colloidal
nanocrystals..

J Biomed Biotechnol. 2008; 2008:82752.
Published online 2008 June 4.
doi:10.1155/2007/82752.

Yamamoto M, Futamura Y, Fujioka K,
Yamamoto K.

Novel production method for plant polyphenol from livestock excrement using subcritical water.

International Journal of Chemical Engineering 2008;*in press*.

Hoshino A, Nagao T, Nagi-Muira N, Ohno N, Yasuhara M, **Yamamoto K**, Nakayama T, Suzuki K.

MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via classical complement pathway-dependent manner.

Journal of Autoimmunity 2008;31(1):79-89.

Epub ahead of print, Apr 21, 2008

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

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

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

Yasuda H, Yoshizawa N, Kimura M, Shigematsu M, Kawachi S, Oshima M, **Yamamoto K**, Suzuki K. Preparedness for the Spread of Influenza: Prohibition of Traffic, School Closure, and Vaccination of Children in the Commuter Towns of Tokyo.

The Journal of urban Health 2008 Jul;85(4):619-35. *Epub ahead of print, May 1, 2008*

2007

.Hoshino A, Nagao T, Nakasuga A, Ishida-Okawara A, Suzuki K, Yasuhara M, **Yamamoto K**, Nanocrystal Quantum Dot-Conjugated Anti-Myeloperoxidase

Antibody as the Detector of Activated Neutrophils. *IEEE Transactions on NanoBioscience* 2007;6(4):341-345.

Hoshino A, Ohnishi N, Yasuhara M, **Yamamoto K**, Kondo A.

Separation of Murine Neutrophils and Macrophages by Thermoresponsive Magnetic Nanoparticles.

Biotechnology Progress. 2007;23(6):1513-1516

Hoshino A, Omata K, Takami S, Adschiri T, Terada N, Funatsu T, Yasuhara M, **Yamamoto K**.

Fluorescence Millisecond Oscillation in Polar Solvents regulates Fluorescence Intensity of Colloidal Quantum Dots' solution. *Journal of Nanophotonics* 2007; (1) 013516(pp1-9), doi:10.1117/1.2767608 (E-pub only journal). *Published online; 10 July 2007*

Hoshino A, Manabe N, Fujioka K, Suzuki K, Yasuhara M, **Yamamoto K**.

Use of fluorescent quantum dot bioconjugates for cellular imaging of immune cells, cell organelle labeling, and nanomedicine -surface modification regulates biological function, including cytotoxicity- *The Journal of Artificial Organs*. 2007;10 (3) :149-157

Krevchik VD, Novikov TV, Dahnovsky YI, Semenov MB, Shcherbakova EV, **Yamamoto K**.

Nonlinear Dynamics of Infectious Diseases Transfer with Possible Applications for Tubercular Infection. *Arxiv Medical Physics* 2007; 6 :1434. 11Jun 2007 arXiv:0706.1434v1(E-pub only journal).

Hoshino A, Nagao T, Ito-Ihara T, Ishida-Okawara A, Uno K, Muso E,

Nagi-Miura N, Ohno N, Tokunaka K, Naoe S, Hashimoto H, Yasuhara M, **Yamamoto K**, Suzuki K.

Trafficking of QD-conjugated MPO-ANCA in Murine Systemic Vasculitis and Glomerulonephritis model mice. *Microbiology and Immunology*. 2007;51(5):551-566

Futamura Y, Yahara K, **Yamamoto K**.

Evidence for the production of fluorescent pyridine derivatives using supercritical water.

The Journal of Supercritical Fluids 2007;41(2):279-284

doi:10.1016/j.supflu.2006.10.008 Available online: 4 December 2006

Hoshino A, Kawamura YI, Yasuhara M, Toyama-Sorimachi N, **Yamamoto K**, Matsukawa A, Lira SA, Dohi T. Inhibition of CCL1-CCR8 Interaction Prevents Aggregation of Macrophages and Development of Peritoneal Adhesions. *The Journal of Immunology* 2007;178(8):5296-5304

Yamamoto S, Manabe N, Fujioka K, Hoshino A, **Yamamoto K**. Visualizing Vitreous using Quantum Dots as Imaging Agents.

IEEE Transactions on NanoBioscience 2007;6(1):94-98

H. 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
(H19-ナノ一般-012)

マラリアワクチン開発に向けてのナノメディシン研究

分担研究者：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

協力研究者：奥 浩之・群馬大学大学院工学研究科応用化学生物化学専攻・准教授

研究要旨：平成19～21年度の3年間にかけて、ナノ技術によってマラリア感染に対する予防効果を持つと期待されるマラリアワクチンのDDS化研究を行い、次の9点について成果を得た。

(1) ワクチン微粒子に適した高分子材料の化学合成。(2) 生分解性高分子を用いた人工抗原微粒子について作成法の比較と改良。(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。(4) 人工抗原ペプチドの化学合成、(5) 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、(6) 人工抗原ナノ微粒子の生分解と抗原放出挙動。(7) 二重蛍光標識人工抗原ナノ微粒子の作成 (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 (9) 生分解性人工抗原ナノ微粒子の抗原性、についてである。

A：研究目的

熱帯熱マラリア原虫の解糖系の酵素であるエノラーゼをマラリアワクチン候補抗原と想定し、その人工抗原ペプチドの化学合成法とワクチン化に関連したナノデバイス開発を目的とする研究を、国立国際医療センター研究所と群馬大学大学院工学研究科との共同研究として行った。

B：研究方法

ナノ技術の研究手法として、高分子化学、ペプチド化学、有機合成化学、免疫化学の融合した方法を用い、人工抗原ペプチドの化学合成法とワクチン化を行った。具体的には次の9点について成果を得た。(1) ワクチン微粒子に適した高分子材料の化学合成、(2) 生分解性高分子を用いた人工抗原微粒子について作成法の比較と改良、(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、(4) 人工抗原ペプチドの化学合成、(5) 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、(6) 人工

抗原ナノ微粒子の生分解と抗原放出挙動、(7) 二重蛍光標識人工抗原ナノ微粒子の作成、(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、(9) 生分解性人工抗原ナノ微粒子の抗原性、についてである。

C, D：研究結果と考察

(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22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。

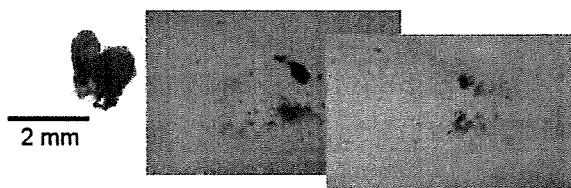


Figure 1. 人工抗原ペプチドを内包したナノ微粒子の水中への分散の様子。速やかに分散する点で優れている。

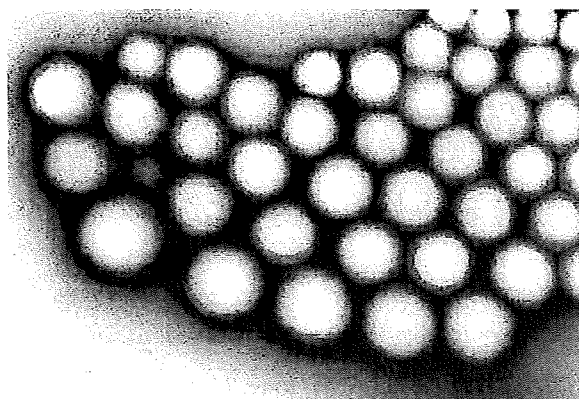


Figure 2. 人工抗原ペプチドを内包したナノ微粒子の透過電子顕微鏡写真。

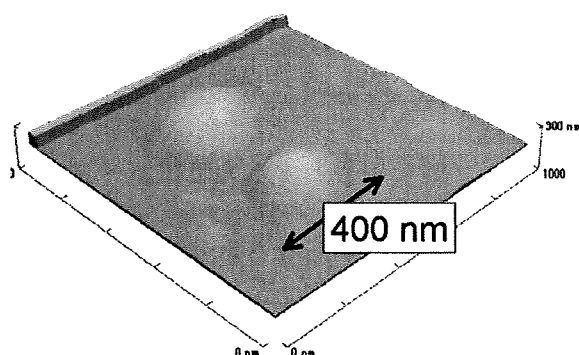


Figure 3. 人工抗原ペプチドを内包したナノ微粒子の AFM 写真。

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 (Figure 4) で矛盾のない人工抗原を得ることに成功した。

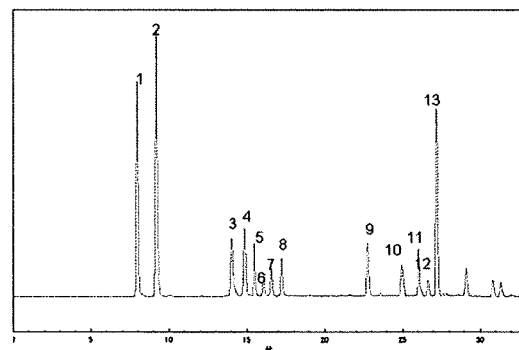


Figure 4. PTC 誘導体を用いた人工抗原ペプチドのアミノ酸分析。分析結果: Asp and Asn, 28.8 (28); Glu, 33.1 (32); Ser 7.9 (8); Thr, 7.7 (8); β -Ala, 1.9 (1); Ala,

3.9 (4); Pro, 4.2 (4); Tyr, 7.8 (8); Leu, 4.0 (4); Phe, 8.0 (8); Trp 1.4 (1); Lys 23.6 (22)。

(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 (Figures 4, 5)。

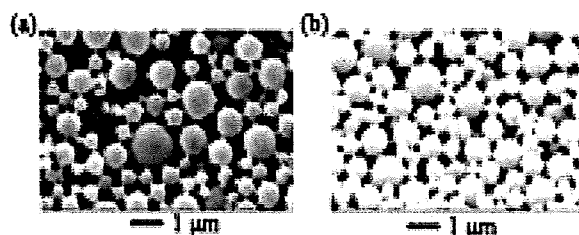


Figure 4. (a) 抗原を含まない微粒子(平均粒径 0.75 μm)、および (b) 抗原を内包させた微粒子(平均粒径 0.65 μm)の SEM 写真(倍率 15000 倍)。

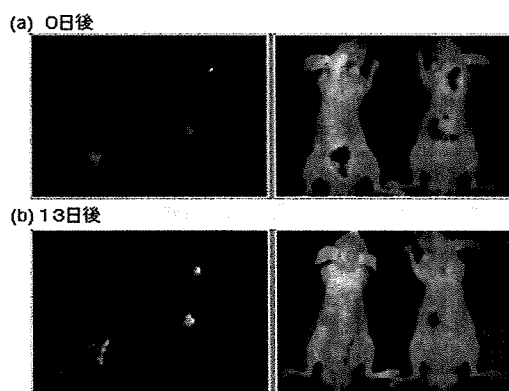


Figure 5. ヌードマウス皮下への投与における、微粒子からの人工抗原ペプチドの *in vivo* 放出。(蛍光標識人工抗原ペプチド 8.0 μg を封入した微粒子 2.0 mg を、0.20 mL の生理食塩水に分散させて皮下に投与し経過を観察した。動物実験に際しては群馬大

学の倫理規定に基づいて実施した。)

(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 (Figure 6)。

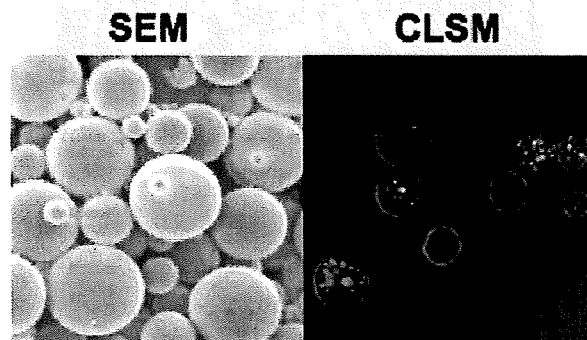


Figure 6. 生分解性高分子 PLGA を CF (5(6)-carboxyfluorescein)により、蛍光標識した微粒子の電子顕微鏡(SEM)および共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM)の写真。

(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 7)。

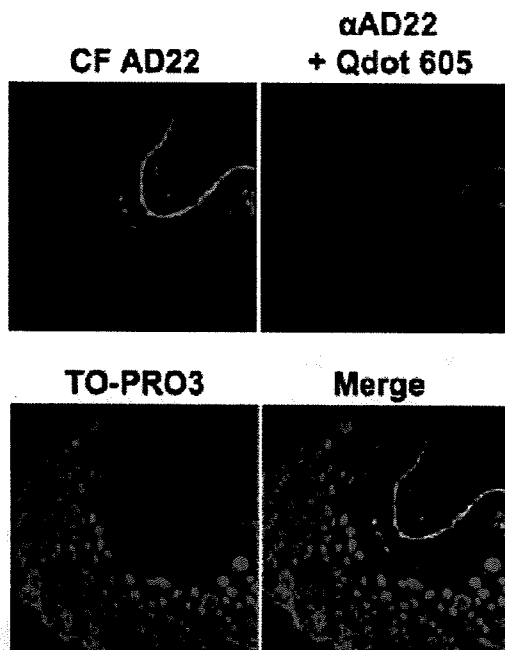


Figure 7. 蛍光標識された抗原微粒子を皮下投与した部位の皮下組織切片。

(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。

E: 結論

本研究のナノ技術を通した、熱帯熱マalaria原虫由来の人工抗原ペプチドの化学合成法とワクチン化に関連したナノデバイス開発を目的とする研究を、国立国際医療センター研究所と群馬大学大学院工学研究科との共同研究として行った。最終年度には二重標識化人工抗原ナノ微粒子を作成し、これを用いることで *in vitro* および *in vivo* における微粒子の分解を分子イメージングによって詳細に解析することができた。その結果、得られた生分解性人工

抗原ナノ微粒子は、持続的に抗原を徐放し、抗体価を長期に維持するワクチン材料となることが明らかになってきた。さらに感染実験や抗原ナノ微粒子の免疫系での局在やプロセッシングを追跡することや、感染実験を実施することで、効果的な予防ワクチンとなることが大きく期待されている。

F: 研究発表

1. 論文発表

- 1) H Oku, K Yamada, K Kobayashi, R Katakai, M Ashfaq, H Hanaoka, Y Iida, K Endo, S Hasegawa, Y Maekawa, K Yano, S Kano, M Suzuki: Nano-Particle Materials Prepared From a Synthetic Antigenic Sequence of Plasmodium falciparum Enolase. In *Peptide Science 2008*, M. Nomizu, Ed.; Protein Research Foundation: Osaka, 439-442.

2. 学会発表

- 1) 俵 義宣、奥 浩之、山田圭一、花岡宏史、遠藤啓吾、狩野繁之、片貝良一: 熱帯熱マalaria原虫由来の人工抗原を内包したナノ・マイクロ微粒子に関する研究、第88回日本化学会春期年会、東京都練馬区、2008.3.28.
- 2) 山口武志、奥 浩之、山田圭一、片貝良一、畑生俊光、嶋田淳子、川合 寛、狩野繁之: 抗マalaria原虫薬としてのアンホテリシンBの蛍光標識化研究、日本化学会第1回関東支部大会、東京都八王子市、2007.11.3.
- 3) Takeshi Yamaguchi, Hiroyuki Oku, Keiichi Yamada, Ryoichi Katakai, Toshimitsu Hatabu, Junko Shimada, Satoru Kawai, Shigeyuki Kano: Synthesis and Anti-plasmodial Properties of an Amphotericin B and Carboxyfluorescein Conjugate. The 2nd Gunma International Symposium on Chemistry, GIS2007, Pre-ISNA-12, Kiryu, Gunma, 2007.7.21.
- 4) 奥 浩之、山田圭一、片貝良一、花岡宏史、飯田靖彦、遠藤啓吾、長谷川伸、前川康成、矢野和彦、狩野繁之、鈴木 守: 熱帯熱マalaria原虫由来の人工抗原を内包した生分解性ナノ微粒子に関する研究、第3回分子イメージング学会、埼玉県さいたま市、2008.05.23.
- 5) 奥 浩之、山田圭一、片貝良一、花岡宏史、飯田靖彦、遠藤啓吾、矢野和彦、狩野繁之、鈴木 守: 熱帯熱マalaria原虫由来の人工抗原を用いた生分解性ナノ微粒子の作成と性質、第67回日本寄生虫学

- 会東日本支部大会，静岡県浜松市，2008.10.04.
- 6) 奥 浩之、山田圭一、小林京子、片貝良一、花岡宏史、飯田靖彦、遠藤啓吾、長谷川伸、前川康成、矢野和彦、狩野繁之、鈴木 守：熱帯熱マラリア原虫由来の人口抗原を用いたナノ微粒子研究、第45回ペプチド討論会，東京都江戸川区，2008.10.30.
 - 7) 奥 浩之、山田圭一、片貝良一、花岡宏史、飯田靖彦、遠藤啓吾、長谷川伸、前川康成、矢野和彦、狩野繁之、鈴木 守：熱帯熱マラリア原虫に由来する抗原ペプチドの蛍光標識化とナノ微粒子研究、第8回放射性医薬品・画像診断薬研究会，京都市，2008.12.06.
 - 8) 矢野和彦、奥 浩之、山田圭一、片貝良一、鈴木 守、狩野繁之：熱帯熱マラリアエノラーゼ由来人工抗原ペプチドを用いた生分解性ナノ微粒子の特性解析、第78回日本寄生虫学会大会，東京都千代田区，2009.3.27.
 - 9) 奥 浩之、矢野和彦、花岡宏史、長谷川伸、山田圭一、片貝良一、飯田靖彦、遠藤啓吾、前川康成、狩野繁之、鈴木 守：熱帯熱マラリア原虫に由来する抗原ペプチドのナノ微粒子化と抗原性に関する研究」日本化学会第89春期年会，千葉県船橋市，2009.03.29
 - 10) 奥浩之、山田圭一、片貝良一、鈴木守、矢野和彦、狩野繁之：熱帯熱マラリア原虫に由来する人工抗原を含んだ微粒子の作成と性質、平成21年度繊維学会年次大会研究発表会、東京都江戸川区、2009.06.10.
 - 11) 奥浩之、矢野和彦、福本恵、狩野繁之：生体分解性高分子に内包させた熱帯熱マラリア原虫に由来する人工抗原の微粒子材料の作成と性質、第17回分子寄生虫学ワークショップ、群馬県草津町、2009.08.06.
 - 12) 矢野和彦、福本恵、奥浩之、狩野繁之：熱帯熱マラリアエノラーゼ由来人工抗原ペプチドを用いた生分解性ナノ微粒子のマラリアワクチンへの応用研究、第69回日本寄生虫学会東日本大会、国立国際医療センター研究所（東京）、2009.10.03.
 - 13) 矢野和彦、福本恵、奥浩之、狩野繁之「熱帯熱マラリア原虫由来人工抗原ペプチド生分解性ナノ微粒子を用いたワクチン開発研究」、第50回日本熱帯医学会大会、沖縄コンベンションセンター、2009.10.22-23.
 - 14) Shigeyuki Kano, Kazuhiko Yano, Megumi Fukumoto, and Hiroyuki Oku: A Non-Adjuvanted Polypeptide Nanoparticle Vaccine Targeting *Plasmodium falciparum* Enolase Continues to Induce High Antibody Titers In Mice. The Adaptive and Innate Immune Responses to Neglected Tropical Diseases Conference, The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, San Diego, USA, 2010.01.10.
 - 15) Hiroyuki Oku, Kazuhiko Yano, Megumi Fukumoto, and Shigeyuki Kano: Nanosphere Materials Containing a Synthetic Antigenic Peptide Sequence of *Plasmodium falciparum* Enolase. Joint International Tropical Medicine Meeting 2009, Bangkok, Thailand, 2009.12.04.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許
 - 1) 奥 浩之、俵 義宣、片貝良一、佐藤久美子、鈴木守、狩野繁之 「熱帯熱マラリア原虫蛋白質を内包したナノ・マイクロ微粒子の製造法」 国立大学法人群馬大学、特許出願 2008-84310.
 - 2) 奥 浩之、俵 義宣、片貝良一、佐藤久美子、鈴木守、狩野繁之 「熱帯熱マラリア原虫蛋白質を内包したナノ・マイクロ微粒子の製造法」 国立大学法人群馬大学、特許出願 2009-059789.

腹腔内炎症応答制御法の開発と応用

分担研究者 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
協力研究者 河村由紀 国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 協力研究員
協力研究者 川島 麗 国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 協力研究員
協力研究者 ボンソフンソハセ 国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 流動研究員
協力研究者 岡田俊彦 国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 流動研究員
協力研究者 大塩智之 国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 協力研究員

研究要旨

腹腔内の炎症によっておこる腹膜癒着は開腹術後の合併症として頻度の高いものであるが、ときに致命的となることもあり、患者の負担だけでなく医療経済的な負担も大きい。本研究ではマウスを用いて癒着モデルの作成を試み、低分子化合物による癒着の予防効果の評価を行った。ケモカイン阻害活性のある低分子化合物を探索した結果、ヒット化合物のひとつが、マウス術後癒着の予防に有効であることがわかった。この低分子化合物はマウス腹腔マクロファージにおいて LPS 刺激による炎症性サイトカインの産生を抑制し、抗炎症剤としての性質が示された。また、子宮内膜症モデルを用いて CCL1 阻害の治療応用の可能性を検討した結果、CCL1 欠損により播種組織の増大を阻害できる可能性が示された。

A:研究目的

今日日常的に行われている開腹を伴う外科手術における腹腔内侵襲の合併症として腹膜癒着があるが、これが原因で医療に費やされる負担は実は非常に大きく、医療経済的にも大きな問題である。癒着が生じると、消化管の通過傷害、機能障害の原因となるだけでなく、時には致命的な病態に至

る場合もある。実際、開腹手術後や消化管炎症による腹膜の炎症から起こる腹腔内臓器の組織癒着は、イレウス、不妊など重篤な合併症をもたらし、再手術の原因となるだけでなく、長期にわたる深刻な後遺症を引き起こして患者の QOL を著しく損なう。癒着防止の標的として、これまでに実験的に効果の明らかなものは、低分子ヘパリ

ン・ステロイド・COX2 阻害など炎症反応の抑制であるが、出血と感染のコントロールが最優先される術後管理においては現実には受け入れがたいものも多い。結局、現在一般に使用されているのはヒアルロン酸ベースの膜を術野に留置する方法であるが、高価で、癒着防止効果が局所に限られるため必ずしも満足の行く結果が得られている訳ではない。

われわれは、マウスを用いて腹腔マクロファージ(PMF)が炎症後及び外科手術後の臓器癒着部位の漿膜側細胞塊に特異的に集積することを見だし、そのメカニズム研究を行った。その結果、腹腔壁と臓器を包む中皮細胞が、炎症刺激を受けると CCL1 ケモカインを産生し、PMF が CCL1 受容体 CCR8 を発現して刺激細胞塊を形成しながら癒着を誘導することがわかった。この結果に基づき、CCL1/CCR8 の阻害により開腹術後の癒着を予防できることを *in vivo* モデルでも示した(*J Immunol*, 178: 5296, 2007)。そこで、この CCL1 による Ca^{2+} flux 阻害剤を低分子化合物ライブラリーからスクリーニングした。本研究では、得られたヒット低分子化合物 R243 の、各種の術後癒着モデルで *in vivo* における癒着阻害効果を評価することを主な目的とした。また、術後癒着以外の腹腔内疾患への応用を目指し、胃癌腹膜播種、子宮内膜症への効果を検討した。

B:研究方法

1. マウス腹腔内 CCL1 の検出

2%トリニトロベンゼンスルホン酸溶液及びエタノールの混合液をマウスの大腸内に注入し、穿孔性潰瘍を誘導した。その1日後腹腔内洗浄液を回収し、ELISA によって

CCL1 を測定した。

2. 低分子化合物の PMF における作用

マウス PMF を LPS で刺激し、R243 を加えた時の、培養上清における TNF- α , IL-6, IL-10 を測定した。

3. 各種術後癒着モデルの検討

1) 無菌的モデル

A. 正中切開による開腹の後、側腹壁の腹膜を切子でつまみ絹糸による結紮で ischemic button を作成した。

B. 正中切開による開腹の後、電気メス(Bipolar mode)により、側腹壁の一部を凝固焼灼した。

C. Ischemic button をさらに電気メスにより焼灼した。

これらのモデルは6日後に開腹し癒着の状態を観察した。

2) Cecal ligation and puncture (CLP)モデル

正中切開による開腹の後盲腸先端を体外に出して先端を結紮し、注射針で、穿孔を作って閉腹した。6日後に開腹して観察した。感染をとまなうモデル。

3) 正中切開による開腹の後盲腸先端を体外に出して先端を電気メス凝固モードで焼灼(Cecal ablation)したのち閉腹し、6日後に観察した。

4) これらのモデルに、独自の低分子化合物スクリーニングで得られたケモカイン作用阻害分子を一回投与、あるいは複数回投与し、その腹膜癒着阻害効果を評価した。

4. 胃癌腹膜播種モデル

ヒト胃癌細胞株 KATOIII をヌードマウス腹腔内に移植した。抗マウス CCL1 抗体または R243 を移植当日及び3日めに腹腔内投与し、10週後に開腹して転移巣を観察した。

5. 子宮内膜症モデル

エストロゲン投与を行った wild type (WT)または CCR8 ノックアウトマウスより、子宮内膜を採取し細切して、同様にエストロゲン前投与したレシピエントマウスにそれぞれ腹腔内移植した。さらにエストロゲン投与を続け、移植後 2 週間目に開腹して観察した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は動物愛護に十分配慮して計画し、動物実験委員会の審査をへて承認されている。

C:研究結果

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低かった。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、肝臓などと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

腹腔内内膜組織形成の 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（最大経）は WT マウスのものが 4.417 ± 2.396mm (mean ± Std. deviation)に比較して CCR8KO マウスでは 1.138 ± 0.594mm

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、CCR8 KO 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。

D:考察

腹腔内マクロファージの炎症や手術侵襲における重要な役割は、生体深部における自然免疫応答のメカニズムとして学術的にも重要な発見である。今回の各種癒着モデルの結果から、腹腔内の感染は、癒着の形成を強く促進することが明らかとなった。以前より我々は、細菌成分が腹腔内マクロファージにおけるケモカイン産生およびその受容体発現を促進することを示しているもので、これとよく一致する結果であると思われる。また、側腹壁と腸管は同じ漿膜中皮細胞で被覆されているにもかかわらず、側腹壁の焼灼では癒着が誘導されず、盲腸の焼灼で強い癒着が誘導されるのも同様の機序によると考えられる。マクロファージ作用の阻害による腹腔内炎症応答の制御が可能となれば、これを術後癒着の予防に応用することによって、日常的に多数行われている開腹術の予後を改善することが可能であると予測される。

本研究により評価を行った CCR8 阻害活性をもつ低分子化合物 R243 は、炎症性サイトカイン産生も抑制することがわかった。我々は既に CCR8 が腹腔マクロファージに特異的なケモカイン受容体であることを見いだしており、CCL1 がさまざまな炎症反応を正の方向に制御している可能性がある。また、R243 の作用点は CCR8 のみではない可能性も考えられ、腹腔以外のマクロファ

ージに対する作用を含めて今後も解析を継続する。

子宮内膜症では内膜組織の腹腔内への播種を阻止することはできなかったが、組織の増殖は阻止されている可能性がある。この事実は既に内膜症が形成されてしまった後での治療法として効果がある可能性を示しており、症状緩和には効果があるのではないかと考えている。

E:結論

腹膜癒着阻害活性のある低分子化合物 R243 は腹腔マクロファージに対して炎症性サイトカイン応答阻害効果があり、マウス癒着モデルで術後癒着の防止効果があった。CCL1/CCR8 作用の阻害によって、子宮内膜症の進展を抑制できる可能性がある。

F:健康危機情報

なし。

G:研究発表

1. 論文発表

1. Hoshino A, Kawamura YI, Yasuhara M, Toyama-Sorimachi N, Yamamoto K, Matsukawa A, Lira SA, Dohi T. Inhibition of CCL1-CCR8 interaction prevents aggregation of macrophages and development of peritoneal adhesions. *J Immunol* 2007;178:5296-5304.
2. Mizutani N, Sakurai T, Shibata T, Uchida K, Fujita J, Kawashima R, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Imai T, Dohi T. Dose-dependent differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine. *J Immunol* 2007;79:7478-7487.
3. Kawamura, YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Kannagi R, and Dohi T, DNA hypermethylation

- contributes to incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer *Gastroenterology* 2008;135:142-151
4. Dohi, T and Kawamura YI, Incomplete synthesis of the Sd(a)/Cad blood group carbohydrate in gastrointestinal cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1780:467-471, 2008
 5. Dohi T, Borodovsky A, Wu P, Shearstone JR, Kawashima R, Runkel L, Rajman L, Dong X, Scott ML, Michaelson JS, Jakubowski A, Burkly LC. TWEAK/Fn14 Pathway: a nonredundant role in intestinal damage in mice through a TWEAK/intestinal epithelial cell axis. *Gastroenterology* 136:912-923, 2009.
1. 学会発表
 1. 土肥多恵子: 消化管穿孔性病変における腹腔内生体防御機構, 第44回日本消化器免疫学会総会, 東京, 2007年7月8日
 2. 土肥多恵子: 消化管の免疫/炎症と組織修復, 第5回広島消化器免疫研究会, 広島, 2007年4月10日
 3. 土肥多恵子: 消化管炎症における免疫応答と組織修復, 神戸免疫アレルギー談話会, 神戸, 2007年6月14日
 4. T Dohi. TNF superfamily molecules as next therapeutic targets for inflammatory bowel diseases. 10th Symposium of Korean Association for the Study of Intestinal Diseases, Invited lecture. Seoul, Dec 13, 2008
 5. Dohi T: Dose-dependent differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine, 13th. US-Japan GI & Liver Meeting in 21st Century. Tokyo, June 13th, 2008
 6. Dohi T, Borodovsky A, Kawashima R, Wu P, Kawamura YI, Burkly LC. Tweak/Fn14 Pathway: Role in the Intestinal Inflammation and Tissue Repair. Digestive Disease Week 2008, Selected as Poster of distinction, San Diego, U. S. A., May 18th, 2008
 7. Kawashima R, Kawamura YI, Mizutani N, Toyama-Sorimachi N, Dohi T. Interleukin-13 Induces Tissue Damage with Relocation of β -Catenin and Modification of Cell-Cell Adhesion in the Epithelial Cells. Digestive Disease Week 2008, Selected as Poster of distinction, San Diego, U. S. A., May 20th, 2008
 8. Kawashima R, Kawamura YI, Phongsisay V, Okada T, Toyama-Sorimachi N, Kawamura Y, Konishi F, Dohi T. Intraperitoneal Secretion of Cytokines and Chemokines in Response to the Surgical Stress, . Digestive Disease Week 2009, Chicago, June 3, 2009
 9. 土肥多恵子、Linda C. Burkly. TWEAK/Fn14 経路による消化管自然免疫応答 パネルディスカッション 11 自然免疫と消化管 第51回日本消化器病学会大会, 京都, 2009年10月15日
 2. その他の業績
 1. Dohi T, Kawamura YI. Incomplete synthesis of the Sd(a)/Cad blood group carbohydrate in gastrointestinal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007;15:15.
 2. 土肥多恵子 腹膜癒着を引き起こす、腹腔マクロファージの特異的ケモカイン応答臨床免疫・アレルギー科 51(2):168-173, 2009
- H:知的所有権の出願・取得状況（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

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

分担研究者 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

協力研究者 小田浩代 国立国際医療センター研究所臨床病理研究部・流動研究員

協力研究者 早川国宏 国立国際医療センター研究所臨床病理研究部・流動研究員

協力研究者 マイケル・パトリック 国立国際医療センター研究所臨床病理研究部・流動研究員

研究要旨

我々は胸腺に特異的に発現する新規遺伝子として RhoH および Gasp の 2 つの遺伝子を単離同定した。量子ドット (QD) 標識した抗体を用いた高感度染色法により、Gasp 分子は細胞質に局在し、RhoH は細胞膜近傍に特異的に存在することを明らかにした。さらに、両者のノックアウトマウスを作製することによりこれらの分子の機能を解析し、RhoH は β 選択、正負の選択、末梢の活性化という全ての TCR 関連シグナル伝達に必須であることを示した。いっぽう、Gasp に関しては、正の選択にだけ必須で、負の選択を始めとするその他の TCR 関連シグナル伝達には必要ないことを明らかにした。本研究により、T 細胞の分化、シグナル伝達に重要な働きをする 2 つの新規遺伝子が発見され、さらに半導体蛍光ナノ粒子を用いた減衰の少ない高感度蛍光染色法が、微弱蛍光シグナルの検出に極めて有効であることが証明された。

A:研究目的

量子サイズ効果によって強力な蛍光を放出する半導体ナノ粒子は、連続励起による退色が少ないため、蛍光プローブとして非常に優れて利用されている。染色における蛍光色素としてだけでなく動態を追跡することも可能である。細胞の染色においては顕微鏡観察時の退色が著しく、この退色効果を克服することが蛍光観察における技術的な大きな課題であったが、蛍光強度が長時

間にわたって減衰しない蛍光ナノ粒子は細胞の染色に使用する色素として極めて優れた性質を有していると考えられ、我々はこの蛍光ナノ粒子の特徴を活かし、蛍光粒子を本研究に有効に利用した。

T 細胞は、獲得免疫の要として免疫応答において中心的な役割を果たしているリンパ球であり、胸腺において分化する際に、自己と非自己を見分ける教育を受けて成熟する（正および負の選択）。T 細胞分化にお

ける選択の分子機構を解明することは、トレランスの成立、維持のメカニズムを理解することであり、自己免疫疾患の病因、病態の解明および新たな治療法の開発に必須である。

T細胞の選択に関与する新規遺伝子を同定し、その機能を解析する目的で、我々は胸腺で特異的に発現している遺伝子を EST 発現データベース解析をもとにした *in silico* 解析により抽出した。胸腺特異的遺伝子として 5 個の未知遺伝子をピックアップしてその解析を進めており、そのうちの 2 つが RhoH および Gasp である。RhoH は Rho ファミリーに属する低分子 G タンパクであり、GTP アーゼ活性を持たない非定型 G タンパクである。Gasp はホモロジーおよび既知の機能ドメインを持たないため、機能を予測することは困難である。これらの分子の機能を解明する目的で RhoH および Gasp 遺伝子のトランスジェニックマウス/ノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析することにより、T細胞分化および活性化における RhoH, Gasp の機能を解析した。解析の際には、蛍光ナノ粒子を用いた高感度細胞内染色法を利用し、細胞内における RhoH, Gasp 蛋白の局在を可視化した。

B:研究方法

1) ノックアウトマウスの作製

常法に従い BAC クローンより長短アームをクローニングし、ターゲティングベクターを構築した。これを TT2-ES 細胞に導入し、PCR スクリーニング、その後のサザン解析によって相同組み換えを確認し、桑実胚に注入してキメラマウスを作出した。

2) ノックアウトマウスの表現型解析

それぞれのノックアウトマウスの胸腺を採取し、表面分化マーカーを染色して、フローサイトメトリーを用いてポピュレーション解析を行った。胸腺だけでなく、脾臓、リンパ節、末梢血についても同様の解析を行った。

3) 胸腺内選択の解析

T細胞受容体 (TCR) トランスジェニックマウス (Tg) を用いて、正の選択における表現型をより詳細に解析した。ノックアウトマウスと 3 種類の TCR Tg マウスをそれぞれ交配して解析を行った。クラス I 拘束性の TCR-Tg として OT-I TCR-Tg を、クラス II 拘束性として OT-II TCR-Tg を用いた。負の選択の解析にはオスの HY TCR-Tg を使用し、胸腺の CD4、CD8 発現パターンと細胞数で評価した。

4) 成熟T細胞の機能解析

末梢に存在する T細胞のシグナル伝達を解析するために、脾臓細胞よりセルソーターを用いて CD4 シングルポジティブ T細胞を単離し、抗 CD3 抗体で刺激した際の T細胞の増殖、IL-2 産生、Ca イオンの流入、LAT や ERK 等のシグナル伝達分子の活性化をリン酸化特異的抗体を用いたウェスタン解析によって検討した。

5) 細胞内蛍光染色

GST タグを付加した Gasp 全長蛋白を細菌に発現させ、精製し、これを抗原としてウサギに免疫することにより、Gasp 特異的抗体 (抗血清) を作製した。胸腺細胞を固定、透過性にし、抗 Gasp 抗体および QD 標識した抗ウサギ抗体を用いて間接蛍光抗体法によって蛍光顕微鏡観察を行った。

5) 腸管内 IEL の組織染色

RhoH ノックアウトマウスの CD8 α α 型