

201109010A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

次世代インテリジェント型ナノカプセルによる

診断・治療システムに関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 橋爪 誠

平成24（2012）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

次世代インテリジェント型ナノカプセルによる  
診断・治療システム

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 橋爪 誠

平成24（2012）年 3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 次世代インテリジェント型ナノカプセルによる診断・治療システムに関する研究 ..... 1  
九州大学 先端医療イノベーションセンター センター長 橋爪 誠

## II. 分担研究報告

1. 肝特異的ナノカプセルの分子設計と発現・精製法の検討 ..... 7  
九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点准教授 村田正治
2. 肝癌特異的ナノカプセルの分子設計と機能評価に関する研究 ..... 12  
九州大学大学院工学研究院教授 片山佳樹
3. 肝特異的ナノカプセルの細胞選択性とその機序に関する研究 ..... 18  
九州大学病院先端医工学診療部准教授 富川盛雅
4. Gemcitabine 耐性膵癌細胞株の網羅的発現解析による新規治療標的の探索 ..... 25  
九州大学大学院医学研究院助教 大内田研宙
5. ナノカプセルへの封入を目指した MRI 造影剤および遺伝子診断プローブの開発 ..... 28  
熊本大学大学院自然科学研究科教授 井原敏博

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 35

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 36

# Ⅰ. 総括研究報告

# 次世代インテリジェント型ナノカプセルによる 診断・治療システム

研究代表者 橋爪 誠 九州大学 先端医療イノベーションセンター・センター長

## 研究要旨

天然のタンパク質ナノカプセルをプラットフォームとして、薬物送達システム（DDS）や分子イメージングへの応用に向けた要素技術を開発した。DDSキャリアとして鍵となる標的化については、遺伝子組み換え技術および化学的なコンジュゲート技術によって特定の臓器や癌細胞の標的化を実施した。また薬物の内包についても抗癌剤や造影剤などの封入法について検討した。

## 分担研究者

村田正治（九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点）  
片山佳樹（九州大学大学院工学研究院）  
富川盛雅（九州大学病院先端医工学診療部）  
大内田研宙（九州大学大学院医学研究院）  
井原敏博（熊本大学大学院自然科学研究科）

## A. 研究目的

腫瘍化に伴う遺伝子レベル、あるいは分子レベルでの変化が解き明かされることによって新しい治療戦略と治療薬が開発されてきた。しかしながら、これら新規薬物の治療効果を最大限に引き出すためには、同時に病変部位への薬物輸送システム（DDS）の開発が必要不可欠である。これまでに水溶性高分子やリポソームなどを用いた様々なDDSキャリアが開発されてきたが、その標的細胞、病変組織特異性については依然問題が残されている。本研究では、これら従来のドラッグキャリアとは一線を画するナノDDSの構築を目指す。

この新しいドラッグキャリアのモデルとするの

がウイルスである。ウイルスは非常にシンプルな構造でありながら極めて効果的な感染機構を有する。この感染機序の重要な鍵となっているのが、天然のナノ構造体であるウイルスカプシドである。本研究ではこのカプシドを模したタンパク質ナノカプセルを構築し、これを細胞内シグナルによって崩壊させるシステムを創製する。

我々は既にタンパク質ナノカプセル（ヒト由来または古細菌由来）の遺伝子クローニングと大腸菌を使った大量発現に成功している。この直径12nmのナノ構造体は非常に安定であり、しかもその内側に抗癌剤やsiRNAを含む多くの薬物を内包することが可能である。本研究では、このナノカプセルを分子生物学あるいは有機合成化学を用いて様々な機能化し、①分子標的による組織・細胞への侵入、②能動的なカプセル崩壊、さらに③内包薬物の放出を実現する。

本年度は実施計画書にしたがって、①ナノカプセルの標的化（肝実質細胞、肝癌細胞、膵細胞）、②ナノカプセルへの抗癌剤の内包条件の検討、さらに③ナノカプセル型MRI造影剤の開発、の三つのテーマに重点をおいて研究を実施した。

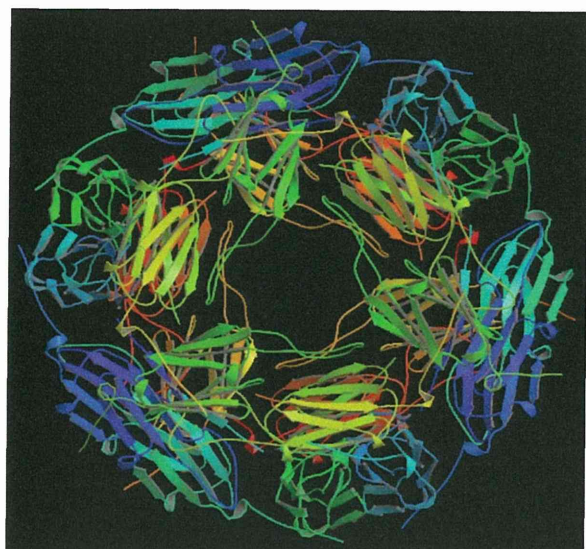


図1 タンパク質ナノカプセルの構造

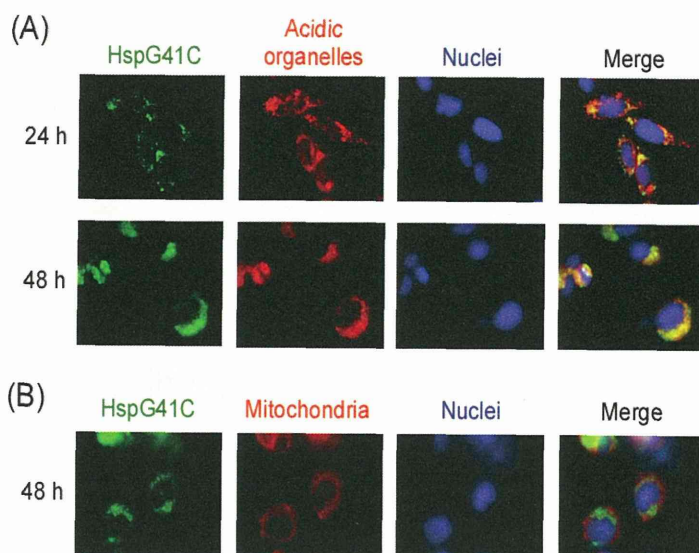


図2 Suit-2細胞におけるナノカプセルの局在

## B. 研究方法

ナノカプセルの標的化については、タンパク質のC末端にアンテナ分子を遺伝子として組み込む方法と、あらかじめ化学合成したアンテナ分子を水溶性のリンカーを介して化学的にコンジュゲートする方法で、それぞれナノカプセルの外表面に呈示させた。ナノカプセルは質量分析や動的光散乱法などによる物性解析、または蛍光顕微鏡による観察、あるいはプレートリーダー等によってその機能解析を実施した。

また内包する薬物に関しては市販の抗癌剤、あるいはガドリニウム錯体等のMRI造影剤の封入法について検討した。

(倫理面への配慮)

すべての実験は厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針、組み換えDNA実験指針に基づいて実施した。また動物実験は九州大学動物実験施設の定めた実験指針、倫理指針を遵守して行った。

## C. 研究結果

### 肝特異的なナノカプセルのクローニングと評価

ヒトB型肝炎ウイルスが肝細胞への侵入の際に利

用しているペプチド、PreS1をナノカプセル表面に呈示することに成功した。この直径19nmのPreS1ナノカプセルはヒト肝由来細胞にのみ特異的に親和性を示し、投与後約3時間で細胞質に集積し始めることが分かった。また合成ペプチド ( PLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNP 、あるいはChlorpromazine (CPZ)、Amiloride (Amil)、そしてFilipin III (Filip) などの各種エンドサイトーシス阻害剤を用いた阻害実験の結果から、ナノカプセルの肝細胞特異性はPreS1ペプチドに起因するエンドサイトーシスによって肝由来細胞に取り込まれることが示唆された。対照的に、乳癌や子宮頸癌に由来する培養細胞にはほとんど取り込まれなかった。

### 肝癌特異的なナノカプセルの開発

肝癌集積性のペプチドSP94 (SFSIIHTPILPL) をナノカプセルの表面に化学的にコンジュゲートさせた肝癌特異的なナノカプセルを作製した。SP94の修飾法を種々検討した結果、比較的長いPEG (ポリエチレングリコール) リンカーを介し、SP94ペプチドのN末端を使って修飾したナノカプセル24N-N(1) が肝癌細胞に対して最も高い特異性を示すことが分かった。

### ナノカプセルへの抗癌剤の内包

プロテインナノカプセルを薬物輸送の担体として用いるためにはカプセルの内孔に各種の抗癌剤を内

## D. 考 察

包する必要がある。そこでナノカプセルからの能動的な薬物放出を促すため、細胞内でのpH変化に応答した薬物放出システムを設計した。具体的にはドキシソルビシンを低pHで解裂するヒドラゾン化し、さらにマレイミド基とコンジュゲートした新たな薬物(DOX-EMCH)を合成した。このDOX-EMCHをカプセル内孔にマレイミド基を介して固定化した。ナノカプセル自体はエンドサイトーシス経路で細胞内に取り込まれるため、薬物を内包したナノカプセルは酸性エンドソームに局在する(図2)。DOX-EMCHに含まれるヒドラゾン結合は、後期エンドソームのような酸性環境(pH5.0~6.5)では解離し、フリーのドキシソルビシンがリリースされることが期待される(図7)。そこでドキシソルビシン内包ナノカプセル(hspG41C-DOX)を二つの培養細胞(Suit-2、HepG2)に添加し、細胞生存率を評価した。この結果、ドキシソルビシン単剤投与もナノカプセルへの内包時も、ともに濃度依存的な抗癌活性を有することが分かった。細胞内での局在を観察したところ、ドキシソルビシン由来の赤色蛍光は時間とともに核への局在が進むことが示された。先の実験において、ナノカプセルそのものは細胞質あるいは酸性のオルガネラに分布していることから、ドキシソルビシン内包ナノカプセルはおそらくエンドソームの低pH環境においてヒドラゾン結合が解裂し、カプセルの表面と内孔をつなぐ微少な孔を通してドキシソルビシンがリリースされたものと考えられる。

### MRIナノ造影剤の合成と機能評価

PCRによる点変異導入により、カプセルの内孔に位置するGly残基をCysに変換した。ナノカプセルには他にCys残基が無いため、Cys残基のチオール基と特異的に反応するマレイミド基を使えば部位特異的に化学修飾することが可能である。そこで本年度は臨床用のMRI造影剤に多く用いられているDTPA-Gd錯体に、脱水縮合反応によってマレイミド基を導入したマレイミド化DTPA-Gd錯体を合成した。この反応は一段階で完了し、NMR測定、質量分析およびICP-MS解析により目的物と同定した。

*Methanococcus jannaschii*に由来する天然のナノカプセル(HSP16.5)を様々な手法により改変した。遺伝子組み換え技術および化学的なコンジュゲート技術によってナノカプセルの外表面にアンテナ分子を呈示することに成功した。この結果、本来特異性の無いナノカプセルにアンテナ分子に由来する特性を付与することができる。この際、ナノカプセルとアンテナ分子間の空間距離は重要な因子であり、アンテナ分子の特異性にも影響する。

我々の用いたナノカプセルは6.5nmの内孔を有し、ここに様々な薬剤を封入することができる。特に、内孔側にシステイン残基を変異導入することで、マレイミド基とのマイケル付加反応を利用した特異的な薬物の固定化ができることが分かった。

## E. 結 論

本年度は肝実質細胞、肝癌細胞、そして膵癌細胞に対して特異性を有するナノカプセルの設計・合成を行った。これらのナノカプセルはカプセル本来の構造と機能を損なうことなく、標的化という新しい機能を付与することに成功した。また一方で、カプセルの内孔には抗癌剤やMRI造影剤、あるいは蛍光プローブ等の多様な分子を内包できることが分かった。今後は標的化能の拡充を図り、実験動物での機能評価を実施する計画である。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yamaguchi S, Yoshida D, Kenmotsu H, Yasunaga T, Konishi K, Ieiri S, Nakashima H, Tanoue K, Hashizume M: Objective assessment of laparoscopic suturing skills using a motion-tracking system. *Surgical Endoscopy* 25(3): 771-775, 2011

- 2) Torisu R, Suzuki S, Masui K, Yoshimoto K, Mizoguchi M, Hashizume M, Canoll P, Goldman J, Sasaki T, Iwaki T: Persistent roles of signal transduction of platelet-derived growth factor B in genesis, growth, and anaplastic transformation of gliomas in an in-vivo serial transplantation model. *Brain Tumor pathol* 28(1): 33-42, 2011
- 3) Hashizume M, Akahoshi T, Tomikawa M: Management of gastric varices. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26(1): 102-108, 2011
- 4) Takeuchi N, Mitsuyasu H, Nakanishi T, Nishimura S, Shimoto T, Higaki H, Hashizume M, Iwamoto Y: The Orientation of Orthopaedic Metallic Devices Relative to the Frequency-Encoding Gradient Affects Susceptibility Artifacts : An Experiment Using Open MR Imaging. *Fukuoka Acta Medica* 102(5): 185-194, 2011
- 5) Ohdaira T, Tsutsumi N, Xu H, Mori M, Uemura M, Ieiri S, Hashizume M: Ultra-minimally invasive local immune cell therapy and regenerative therapy by multi-piercing surgery for abdominal solid tumor: therapeutic simulation by natural orifice transluminal endoscopic surgery-assisted needlescopic surgery using 3-mm diameter robots. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 18(4): 499-505, 2011
- 6) Tashiro Y, Uemura M, Matsuda S, Okazaki K, Kawahara S, Hashizume M, Iwamoto Y: Articular cartilage of the posterior condyle can affect rotational alignment in total knee arthroplasty. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy* (in press)
- 7) Nagata T, Takamori A, Kimura Y, Hashizume M, Nakahara S: Trauma center accessibility for road traffic injuries in Hanoi, Vietnam. *Journal of Trauma Management* : 5-11, 2011
- 8) Akira Tsuchiya, Yuki Naritomi, Satoshi Kushio, Jeong-Hun Kang, Masaharu Murata, Makoto Hashizume, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, "Improvement in the colloidal stability of protein kinase-responsive polyplexes by PEG modification", *Journal of Biomedical Materials Research A*, 100A, 1136-1141(2012)
- 9) Masaharu Murata, Sayoko Narahara, Kaori Umezaki, Riki Toita, Shigekazu Tabata, Jing Shu Piao, Kana Abe, Jeong-Hun Kang, Kenoki Oouchida, Lin Cui, Makoto Hashizume, "Liver cell specific targeting by the preS1 domain of hepatitis B virus surface antigen displayed on protein nanocages", *International Journal of Nanomedicine*, in press.
- 10) Riki Toita, Masaharu Murata, Shigekazu Tabata, Kana Abe, Sayoko Narahara, Jing Shu Piao, Jeong-Hun Kang, and Makoto Hashizume, "Development of Human Hepatocellular Carcinoma Cell-Targeted Protein Cages", *Bioconjugate Chemistry*, in press.
- 11) 赤星朋比古, 富川盛雅, 川中博文, 前原喜彦, 橋爪 誠: 門脈圧亢進症患者に対する腹腔鏡下脾臓摘出術. *日本門脈圧亢進症学会雑誌* 17(1): 56-62, 2011
- 12) 富川盛雅, 家入里志, 橋爪 誠: 低侵襲ロボット手術. *臨床と研究* 88(4): 19-23, 2011
- 13) 富川盛雅, 小西晃造, 家入里志, 田上和夫, 橋爪 誠: シュミレーションを用いた外科専門医教育. シュミレーション医学教育入門: 71-77, 編集; 日本医学教育学会教材開発, SP 委員会, 篠原出版新社, 東京, 2011
- 14) 田上和夫, 橋爪 誠: 肝硬変における脾摘と部分的脾動脈寒栓術(PSE). *脾臓 基礎と臨床*: 212-216, 編集; 沖永功太, へるす出版, 東京, 2011
- 15) 富川盛雅, 植村宗則, 堤 敬文, 家入里志, 橋爪 誠: 画像ガイド下内視鏡外科手術の現状. *映像情報メディカル* 43(6): 474-478, 2011
- 16) 橋爪 誠: 高精度低侵襲外科手術技法の新たな展開. *日本レーザー医学会誌* 32(1): 12-14, 2011
- 17) 富川盛雅, 橋爪 誠: 外科医のトレーニングシステム バーチャルリアリティシュミレータを用いた内視鏡外科手術トレーニングシステム. *日本外科学会雑誌* 112(4): 255-261, 2011
- 18) 鬼丸 学, 大内田研宙, 家入里志, 富川盛雅, 永井英司, 橋爪 誠: 新規ドーム型立体内視鏡映像提示システムの臨床例における有用性の検討. *日本臨床外科学会雑誌* 72(7): 1673-1677, 2011
- 19) 橋爪 誠: 脾臓摘出術. *日本門脈圧亢進症学会雑誌* 17(4): 169-173, 2011
- 20) 植村宗則, 田代泰隆, 洪 在成, 小西晃造, 富川盛雅, 松田秀一, 岡崎 賢, 岩本幸英, 橋爪 誠: 関節鏡手術における Augmented Reality 技術を用いた病変可視化システムのためのシステム構築. *日本コンピュータ外科学会誌* 13(4): 453-459, 2011
- 21) 江里口芳裕, 李 守永, 藤村直幸, 大川彦宏, 矢幡秀昭, 橋爪 誠: 劇症型 A 群溶連菌感染症の 1 症例. *感染症フォーラム* 2011 in 九州 臨床と研究 89(1): 111-118, 2011



## 2. 学会発表

1) 豊田和孝, 鄭 載憲, 村田正治, 家入里志, 大平猛, 富川盛雅, 橋爪 誠: MRI 対応マスタ・スレーブ型内視鏡ロボットシステムの開発. 平成 22 年度日本生体医工学会九州支部学術講演会, 2011 年 1 月 8 日, 福岡

2) 村田正治, 檜原佐由子, 岡田夕佳里, 田畑栄一, 崔 林, 大内田研宙, 富川盛雅, 橋爪 誠: 分子標的化能を有する新規肝特異的 MR I 機能化造影剤の開発. 平成 22 年度日本生体医工学会九州支部学術講演会, 2011 年 1 月 8 日, 福岡

3) 古川勇志郎, 洪 在成, 倉爪 亮, 岩下友美, 橋爪 誠, 波多伸彦: 超音波内視鏡画像の立体表示システムのための精度検証及び in-vivo 実験. 平成 22 年度日本生体医工学会九州支部学術講演会, 2011 年 1 月 8 日, 福岡

4) 早水憲吾, 白水和宏, 野田英一郎, 谷山卓郎, 杉森 宏, 坂口嘉郎, 外 須美夫, 橋爪 誠: 術中・術後管理にフェニレフリンの高用量持続静注を要した閉鎖性肥大型心筋症 (HOCM) の 1 例. 第 38 回日本集中治療医学学会学術集会, 2011 年 2 月 26 日, 横浜

5) 赤星朋比古, 富川盛雅, 長尾吉泰, 家守雅大, 堤敬史, 橋爪 誠, 前原喜彦: 脾臓摘出による肝機能改善効果における検討. 第 47 回日本肝臓学会総会, 2011 年 6 月 3 日, 東京

6) 富川盛雅, 赤星朋比古, 堤 敬史, 長尾吉泰, 神代竜一, 家守雅大, 前原喜彦, 橋爪 誠: 胃静脈瘤に対する外科治療のエビデンス確立に向けた臨床研究の提案. 第 47 回日本肝臓学会総会, 2011 年 6 月 3 日, 東京

7) 富川盛雅, 洪 在成, 植村宗則, 小西晃造, 家入里志, 塩谷聡子, 徳永えり子, 前原喜彦, 橋爪 誠: Open MRI を応用した 3 次元バーチャル画像によるリアルタイムナビゲーション下乳腺部分切除術. 第 50 回 日本生体医工学会大会, 2011 年 5 月 1 日, 東京

8) 豊田和孝, 鄭 載憲, 村田正治, 家入里志, 大平猛, 富川盛雅, 橋爪 誠: マスタ・スレーブ型 MR 対応内視鏡ロボットの開発. 第 50 回 日本生体医工学会大会, 2011 年 5 月 1 日, 東京

9) 富川盛雅, 洪 在成, 赤星朋比古, 大内田研宙, 家入里志, 大平 猛, 橋爪 誠: 消化器・一般外科領域におけるナビゲーションサージェリーの現状と今後の展望. 第 36 回日本外科系連合学会学術集会, 2011 年 6 月 16 日, 東京

10) 家守雅大, 長尾吉泰, 橋本直隆, 堤 敬, 赤星朋比古, 富川盛雅, 橋爪 誠, 前原喜彦: 肝硬変の支援療法としての NOTES 脾摘の可能性と将来展望.

第 97 回 日本消化器病学会九州支部例会, 第 91 回 日本消化器内視鏡学会九州支部例会 2011 年 6 月 25 日, 福岡

11) 赤星朋比古, 富川盛雅, 長尾吉泰, 橋本直隆, 家守雅大, 橋爪 誠, 前原喜彦: 血小板減少を伴う C 型肝炎/肝硬変症患者における腹腔鏡下脾臓摘出後インターフェロン治療についての検討. 第 97 回 日本消化器病学会九州支部例会, 第 91 回 日本消化器内視鏡学会九州支部例会 2011 年 6 月 25 日, 福岡

12) 長尾吉泰, 赤星朋比古, 家守雅大, 上原英雄, 橋本直隆, 富川盛雅, 橋爪 誠, 前原喜彦: セロトニンを介した脾臓摘出術の硬変肝における肝再生に及ぼす影響. 第 18 回日本門脈圧亢進症学会総会, 2011 年 9 月 15 日, 福岡

13) 赤星朋比古, 富川盛雅, 橋本直隆, 長尾吉泰, 家守雅大, 橋爪 誠, 前原喜彦: 血小板減少を伴う C 型肝炎・肝硬変症患者における腹腔鏡下脾臓摘出後 PEG-I FN+RBV 療法の治療成績についての検討. 第 18 回日本門脈圧亢進症学会総会, 2011 年 9 月 16 日, 福岡

14) 富川盛雅, 川中博文, 金城 直, 赤星朋比古, 橋爪 誠: 易出血性食道胃静脈瘤に対する塩酸プロプラノロールの効果と安全性. 第 18 回日本門脈圧亢進症学会総会, 2011 年 9 月 16 日, 福岡

15) 金城 直, 川中博文, 赤星朋比古, 家守雅大, 長尾吉泰, 橋本直隆, 武富紹信, 富川盛雅, 調憲, 東秀史, 橋爪 誠, 前原喜彦: 門脈圧亢進症 (PHT) 性胃症における NO による組織修復遷延とラジカルスカベンジャーによる制御. 第 18 回日本門脈圧亢進症学会総会, 2011 年 9 月 16 日, 福岡

16) 赤星朋比古, 富川盛雅, 長尾吉泰, 家守雅大, 橋本直隆, 橋爪 誠, 前原喜彦: 血小板減少を伴う C 型肝炎・肝硬変症患者における腹腔鏡下脾臓摘出後インターフェロン治療についての検討. 第 24 回日本内視鏡外科学会総会, 2011 年 12 月 7 日, 大阪

17) 森 恩, 千葉 亨, 村田正治, 富川盛雅, 井上大輔, 迎 伸孝, 吉川雄一郎, 天野敏之, 中溝 玲, 吉本幸司, 溝口昌弘, 佐々木富男, 橋爪 誠: 脳神経外科手術におけるハイパースペクトルカメラを用いた分光解析手法. 第 20 回日本コンピュータ外科学会大会, 2011 年 11 月 22 日, 東京

18) Hashizume M: Advance in Rovotic and Telesurgery. The 11th International Liver Symposium of Yeungnam University -New Horizons of Hepatology, January 21, 2011, Gyeongsangbuk-do, Korea

19) Tomikawa M, Hong J, Akahoshi T, Tsutsumi N, Ohuchida K, Ieiri S, Ohdaira T, Hashizume M: Usefulness of a real-time virtual reality

navigation system using an open magnetic resonance imaging: tumor ablation therapy for 50 liver cancers. Computer Assisted Radiology and Surgery 25th International Congress and Exhibition, (CARS 2011) June 23, 2011, Berlin, Germany

20) Oka M, Cho B, Matsumoto N, Hong J, Komune S, Hashizume M: Pre-registered STAMP method for instant registration in image-guided temporal bone surgery. Computer Assisted Radiology and Surgery 25th International Congress and Exhibition, (CARS 2011) June 25, 2011, Berlin, Germany

21) Toyoda K, Chung J, Murata M, Ieiri S, Tomikawa M, Hashizume M: Implementation of a MR compatible laparoscope holding robot for laparoscopic hepatectomy using intraoperative MRI. Computer Assisted Radiology and Surgery 25th International Congress and Exhibition, (CARS 2011) June 22-25, 2011, Berlin, Germany

22) Nagao Y, Uemura M, Kenmotsu H, Yoshida M, Ishii H, Ieiri S, Ohuchida K, Tomikawa M, Hashizume M: Availability of 3D Monitoring System in Single Incision Laparoscopic Surgery. The 7th Asian Conference on Computer Aided Surgery 2011 (ACCAS 2011), August 26, 2011, Bangkok, Thailand

23) Tomikawa M, Akahoshi T, Kinjo N, Nagao Y, Hashimoto N, Uehara H, Maehara Y, Hashizume M: A laparoscopic rendezvous in spatium peritonealis on megasplenectomy for cirrhotic patients with slim chance: a feasibility study. International Surgical Week/ ISW 2011, August 29, 2011, Yokohama, Japan

24) Akahoshi T, Maehara Y, Tomikawa M, Hashizume M: Laparoscopic splenectomy in one hundred HCV-cirrhotic patients with hypersplenism and thrombocytopenia. International Surgical Week/ ISW 2011, August 30, 2011, Yokohama, Japan

25) Ohuchida K, Nagai E, Ieiri S, Tsutsumi T, Nakamura M, Tomikawa M, Tanaka M, Hashizume M: Clinical experience of three-dimensional dome-shaped display system in laparoscopic surgery. International Surgical Week/ ISW 2011, August 31, 2011, Yokohama, Japan

26) Tsutsumi N, Tomikawa M, Uemura M, Akahoshi T, Ieiri S, Hong J, Maehara Y, Hashizume M: Image-guided laparoscopic surgery and its environments in an open MRI operating theatre. International Surgical Week/ ISW 2011, August 31, 2011, Yokohama, Japan

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1) PCT特許「タンパク質ナノカプセルによる薬物輸送システム」を九州大学知財本部および担当弁理士と最終打ち合わせ中

2) 発明の名称 診断用造影剤  
代表発明者 村田 正治  
出願番号 特願 2009-218180  
出願日 2009-09-18

3) 発明の名称: 診断システム  
代表発明者 橋爪 誠  
出願番号: 特願 2011-072216  
出願日: 2011/3/29  
共同出願人: HOYA 株式会社

4) 発明の名称: 診断システム  
代表発明者 橋爪 誠  
出願番号: 特願 2011-186699  
出願日: 2011/8/30

5) 発明の名称: 共鳴信号増幅用プローブ及び内視鏡用高周波処置具  
代表発明者 橋爪 誠  
出願番号: 特願 2012-021708  
出願日: 2012/2/3

6) 発明の名称: 診断システム  
代表発明者 橋爪 誠  
出願番号: 特願 2010-227295  
出願日: 2010/10/7  
公開日: 2012/4/26  
公開番号: 特開 2012-080939

7) 発明の名称: 診断システム  
代表発明者 橋爪 誠  
出願番号: PCT/JP2011/070216  
出願日: 2011-09-06  
公開日: 2012-04-12  
公開番号: W02012/046530

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

## II. 分担研究報告

## 肝特異的ナノカプセルの分子設計と発現・精製法の検討

研究分担者 村田正治（九州大学 先端融合医療レドックスナビ研究拠点准教授）

### 研究要旨

ヒトB型肝炎ウイルスに由来する肝細胞特異的ペプチドPreS1をナノカプセル表面に呈示するための遺伝子クローニングを行った。大腸菌を使った発現およびクロマトグラフィーによる精製法によって、PreS1を外表面に有するナノカプセルを大量に得ることに成功した。得られたHSPG41C-preS1ナノカプセルの粒径は14.4nmであり、細胞毒性もほとんど無かった。

### B. 研究方法

#### 共同研究者

戸井田 力(九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点)  
田畑栄一(九州大学大学院医学研究院)

#### A. 研究目的

本研究では古細菌由来のシャペロンタンパク質 hsp16.5 が自己組織化によって形成するナノ構造体に着目し、その機能化を目的とする。予備実験において、マウスに投与したこのナノカプセルは急性毒性を示さず、また特定の臓器や組織に対する指向性はもちろん、細胞膜透過性も確認されなかった。X線結晶構造解析の結果、このタンパク質のC末端はカプセルの外表面に露出していることが明らかとなっており、この領域に標的細胞に対するアンテナ分子を組み込むことが可能である。そこで本研究では、B型肝炎ウイルス（HBV）が肝細胞への感染する際に使用しているペプチド、PreS1をこのカプセル表面に提示する。このPreS1は肝実質細胞が有するPreS1レセプターと特異的に結合し、HBVの感染機序において最も重要なステップとなっている。本年度は、PreS1ペプチドを組み込んだナノカプセルのクローニングと発現、そして肝細胞特異性の評価とその機序解明をおこなった。

ナノカプセルの標的化については、タンパク質のC末端にアンテナ分子を遺伝子として組み込んだ。まず5'-taatacgaactcactataggg-3' (forward primer), および 5'-cgcggaatccCTACGGGTGAAGT CCCAGTCCGGTGTAGAGTTAGCACCGAAAGCCGGTCCAGCTGGTGGTCCGGG AAGAAACCCAGCGGGCTAGCttcaatggttgattcctttcttaattg agga-3' (reverse primer)の二つのDNAを合成した。この reverse primerには *pres1* 遺伝子 (capital letters)が組み込まれており、この二つの合成DNAをプライマーとして、pET-HSPG41Cプラスミドを鋳型とするPCRを行った。得られた0.63Kbaseのフラグメントをアガロースゲル電気泳動法によって分離・精製し、制限酵素サイトを使って発現ベクターpET21aに挿入した。DNAシーケンシングで遺伝子配列を確認した後、組み換えベクターpET-HSPG41C-preS1を大腸菌株BL21gold(DE3)へ形質転換した。この菌株を100 mg/mLのアンピシリンを含む2×YT培地に接種し、37°Cで振とう培養した。OD600値が0.5に達した際に、終濃度1mMのIPTGを加えて組み換えタンパクの発現を誘導し、そのまま4時間培養を続けた。

培養終了後、培地を遠心分離し、得られたペレットにリン酸緩衝液(pH7.0)を加えて十分に懸濁させた。これをプローブ型超音波照射装置でソニケーション(200 W, 45 s)し、終濃度がそれぞれ5 および 1 mg/mLのDNase I、RNase Aを加えた。4°Cで遠心分離(20 000g, 20 min)した後、不溶性分画を除去した。

組み換えタンパク質の精製はHiLoad 26/10 Q Sepharose HP™ アニオン交換カラムでイオン交換ク

ロマトグラフィーを行った。塩濃度グラジエントによってタンパク質を溶離し、分取した各フラクションをSDS-PAGEで分析した。目的のタンパク質を含むフラクションは、TSKgel G3000SWカラムを用いてゲル濾過精製した。得られたタンパク質はMALDI-TOF質量分析計によって確認した。

(倫理面への配慮)

すべての実験は厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針、組み換えDNA実験指針に基づいて実施した。

### C. 研究結果

組み換えタンパク質はアニオン交換クロマトグラフィーによって粗精製し、最終精製はゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) によって行った (図1)。得られたHSPG41C-preS1ナノカプセルおよびHSPG41CナノカプセルをSDS-PAGEで分析したところ、ほぼシングルバンドであった。さらにそれぞれのタンパク質をシナピン酸をマトリックスとしてMALDI-TOF/MSで質量分析した結果、HSPG41C-preS1ナノカプセルの実測値は $m/z = 19676.2$  Daであり、計算値 ( $m/z = 19668.2$  Da) とおおむね一致した。一方、HSPG41Cナノカプセルの実測値 ( $m/z = 16504.5$  Da) も、計算値 ( $m/z = 16498.5$  Da) とほぼ一致した (図2)。以上の結果から、二つのナノカプセルとも純度良く発現・精製できたことが確認された。

### C) SDS-PAGE analysis

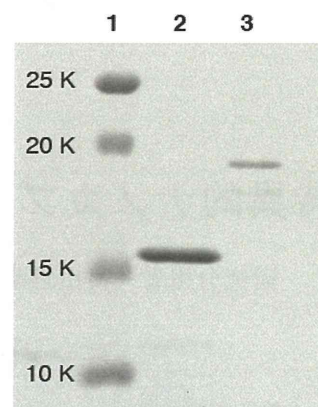
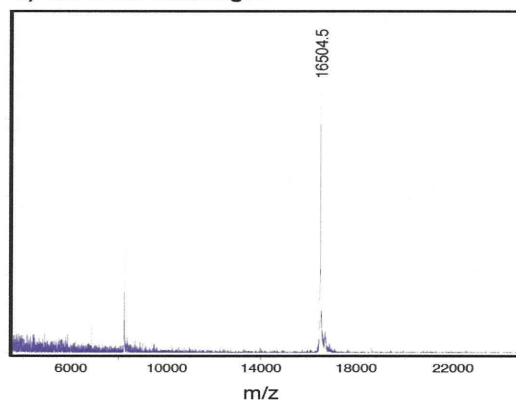


図1 GPCによる組み換えタンパク質の精製

A, HSPG41C-preS1ナノカプセルのクロマトグラム; B, HSPG41Cナノカプセルのクロマトグラム; C, ナノカプセルのSDS-PAGE分析

### A) HSPG41C nanocages



### B) HSPG41C-preS1 nanocages

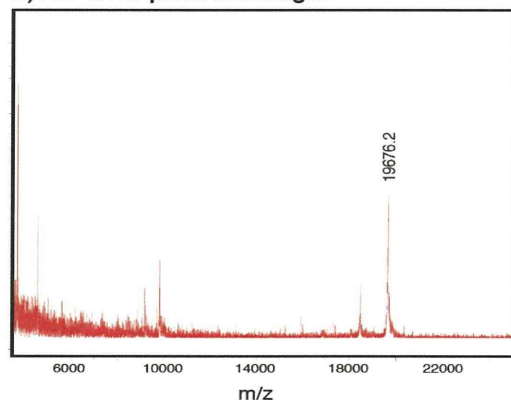
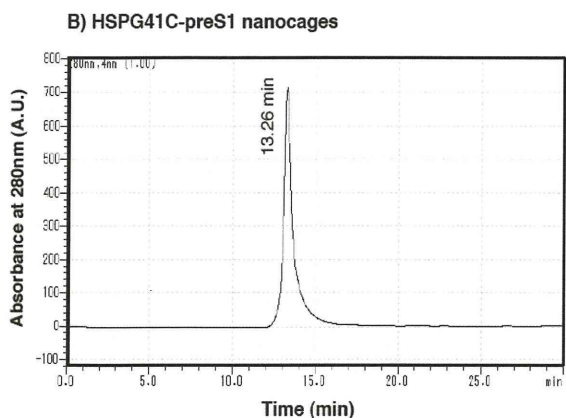
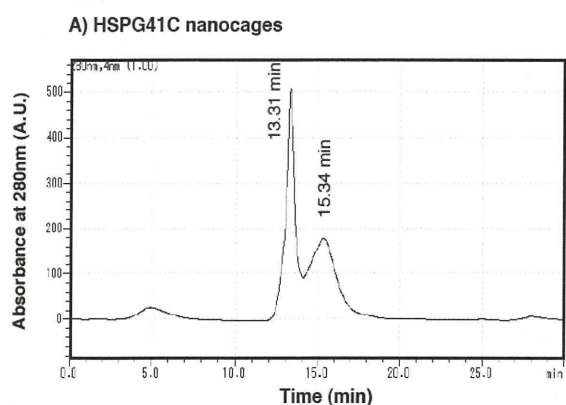


図2 MALDI-TOF/MSによる組み換えタンパク質の解析

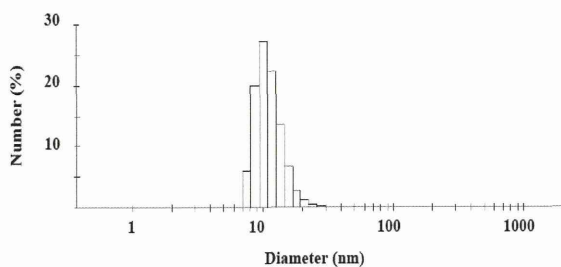
A, HSPG41Cナノカプセルの質量スペクトル; B, HSPG41C-preS1ナノカプセルの質量スペクトル

ナノカプセルの粒径を動的光散乱法 (DLS) によって評価した。この結果、HSPG41C-preS1ナノカプセルは14.4nm、一方、HSPG41Cナノカプセルの粒径は12.7nmであった。これは外表面にPreS1ペプチドが呈示されたことによって、見かけ上HSPG41C-preS1ナノ



カプセルが大きくなっていることを示唆している。またともに極めて分散度が低く、均一なナノ粒子を形成していることが示された。

A) HSPG41C nanocages



B) HSPG41C-preS1 nanocages

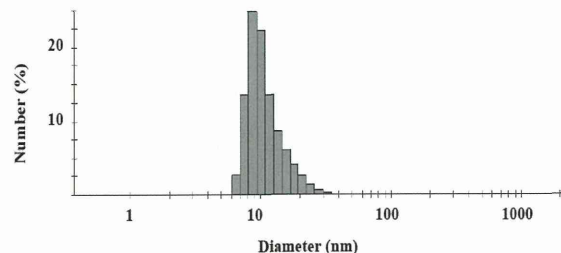
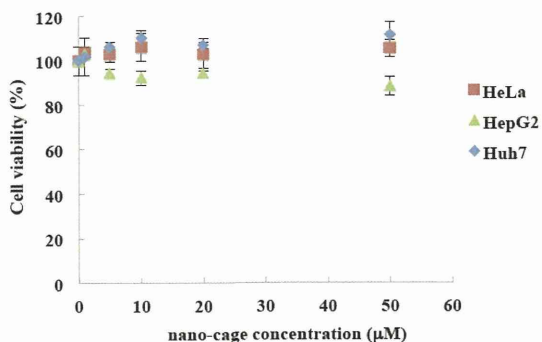


図3 DLSによる組み換えタンパク質の解析  
A, HSPG41C ナノカプセル; B, HSPG41C-preS1 ナノカプセル

A) HSPG41C nanocages



B) HSPG41C-preS1 nanocages

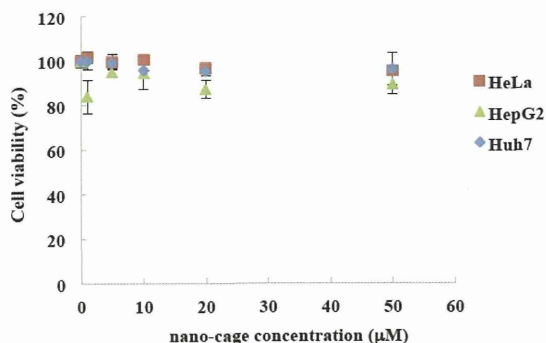


図4 培養細胞に対するナノカプセルの細胞毒性  
A, HSPG41C ナノカプセル; B, HSPG41C-preS1 ナノカプセル

次に、これらのナノカプセルの細胞毒性を評価した。二種類のヒト肝由来細胞株 (HepG2, Huh-7) とヒト子宮頸癌由来細胞株 (HeLa) を96穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/wellずつ播種した。10% (v/v) FBSと1%(v/v) antibiotic-antimycotic mixを含むDMEM培地で常法に従って培養し、所定の濃度のナノカプセルを添加した。そのまま16時間培養を続けた後、生存する細胞数をCellTiter-Glo® luminescent cell viability assayで測定した。この結果、測定した濃度領域では有意な細胞毒性は観察されなかった。

#### D. 考察

肝細胞特異的ペプチドPreS1をナノカプセル表面に呈示したHSPG41C-preS1ナノカプセルは、14.4nmの球状粒子であり、細胞毒性も低かった。ナノカプセル自身はシャペロンタンパク質の一つ、スモールヒートショックプロテインに由来しており、本来、細胞毒性が低いことが期待される。大腸菌からは培地1lあたり約3mgの精製ナノカプセルが得られ、培養細胞あるいは動物実験には十分な量であった。しかし今後の臨床応用に際してはより多量のナノカプセルが必要であり、高密度培養器などによる大量培養についても検討する必要がある。

#### E. 結論

ヒトB型肝炎ウイルスに由来する肝細胞特異的ペプチドPreS1をナノカプセル表面に呈示するための遺伝子クローニングを行い、目的のナノカプセルを大腸菌から大量発現することに成功した。本研究により、ナノカプセルの分子標的化に関する基礎的な分子設計法が確立された。

#### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Akira Tsuchiya, Yuki Naritomi, Satoshi Kushio, Jeong-Hun Kang, Masaharu Murata, Makoto Hashizume, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, "Improvement in the colloidal stability of protein kinase-responsive polyplexes by PEG modification", *Journal of Biomedical Materials Research A*, 100A, 1136-1141(2012)

2) Masaharu Murata, Sayoko Narahara, Kaori Umezaki, Riki Toita, Shigekazu Tabata, Jing Shu Piao, Kana Abe, Jeong-Hun Kang, Kenoki Oouchida, Lin Cui, Makoto Hashizume, "Liver cell specific targeting by the preS1 domain of hepatitis B virus surface antigen displayed on protein nanocages", *International Journal of Nanomedicine*, in press.

3) Riki Toita, Masaharu Murata, Shigekazu Tabata, Kana Abe, Sayoko Narahara, Jing Shu Piao, Jeong-Hun Kang, and Makoto Hashizume, "Development of Human Hepatocellular Carcinoma Cell-Targeted Protein Cages", *Bioconjugate Chemistry*, in press.

### 2. 学会発表

1) Cho B, Murata M, Ohuchida K, Shin J, Hashizume M: Method for electrical detection of cancer cell(SUIT-2) using FET-based biosensor. 平成22年度日本生体医工学会九州支部学術講演会, 2011年1月8日, 福岡

2) 豊田和孝, 鄭 載憲, 村田正治, 家入里志, 大平猛, 富川盛雅, 橋爪 誠: マスタ・スレーブ型 MR 対応内視鏡ロボットの開発. 第50回日本生体医工学会大会, 2011年5月1日, 東京

3) 村田正治, 檜原佐由子, 岡田夕佳里, 田畑栄一, 崔 林, 大内田研宙, 富川盛雅, 橋爪 誠: 分子標的化能を有する新規肝特異的MR I機能化造影剤の開発. 平成22年度日本生体医工学会九州支部学術講演会, 2011年1月8日, 福岡

4) 豊田和孝, 鄭 載憲, 村田正治, 家入里志, 大平猛, 富川盛雅, 橋爪 誠: MRI対応マスタ・スレーブ型内視鏡ロボットシステムの開発. 平成22年度日本生体医工学会九州支部学術講演会, 2011年1月8日, 福岡

5) 豊田和孝, 鄭 載憲, 村田正治, 大内田研宙, 家入里志, 富川盛雅, 橋爪 誠: MR画像撮影時のMRI対応内視鏡ロボットのマスタ・スレーブ操作. 第20回日本コンピュータ外科学会大会, 2011年11月24日, 東京

6) 森 恩, 千葉 亨, 村田正治, 富川盛雅, 井上大輔, 迎 伸孝, 吉川雄一郎, 天野敏之, 中溝 玲, 吉本幸司, 溝口昌弘, 佐々木富男, 橋爪 誠: 脳神経外科手術におけるハイパースペクトルカメラを用いた分光解析手法. 第20回日本コンピュータ外科学会大会, 2011年11月22日, 東京

7) Toyoda K, Chung J, Murata M, Ieiri S, Tomikawa M, Hashizume M: Implementation of a MR compatible laparoscope holding robot for laparoscopic hepatectomy using intraoperative MRI. Computer Assisted Radiology and Surgery 25th International Congress and Exhibition, (CARS 2011) June 22-25, 2011, Berlin, Germany

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1) PCT特許「タンパク質ナノカプセルによる薬物輸送システム」を九州大学知財本部および担当弁理士と最終打ち合わせ中

2) 発明の名称 診断用造影剤  
代表発明者 村田 正治  
出願番号 特願 2009-218180  
出願日 2009-09-18

3) 発明の名称: 診断システム  
代表発明者 橋爪 誠  
出願番号: 特願 2011-072216  
出願日: 2011/3/29  
共同出願人: HOYA 株式会社

4) 発明の名称: 診断システム  
代表発明者 橋爪 誠  
出願番号: 特願 2011-186699  
出願日: 2011/8/30

5) 発明の名称: 共鳴信号増幅用プローブ及び内視鏡用高周波処置具  
代表発明者 橋爪 誠  
出願番号: 特願 2012-021708  
出願日: 2012/2/3

6) 発明の名称: 診断システム  
代表発明者 橋爪 誠  
出願番号: 特願 2010-227295  
出願日: 2010/10/7

公開日：2012/4/26  
公開番号：特開 2012-080939

7) 発明の名称： 診断システム  
代表発明者 橋爪 誠  
出願番号： PCT/JP2011/070216  
出願日：2011-09-06  
公開日：2012-04-12  
公開番号：W02012/046530

## 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

なし



## 肝癌特異的ナノカプセルの分子設計と機能評価に関する研究

研究分担者 片山佳樹（九州大学大学院工学研究院教授）

### 研究要旨

ファージディスプレイ法により発見された肝癌細胞に対して特異的に結合する合成ペプチドSP94(SFSIIHTPIPL)をナノカプセル表面に化学的にコンジュゲートすることを試みた。ナノカプセルとペプチドをつなぐリンカー長や結合の方向性を種々検討した結果、それらを最適化することによりナノカプセルに肝癌細胞特異性を付加した。

### 共同研究者

村田 正治（九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点）

戸井田 力（九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点）

新留琢郎（九州大学大学院工学研究院）

森 健（九州大学大学院工学研究院）

### A. 研究目的

全世界において毎年 70 万人を越える肝癌患者が生まれており、その内の 80%がアジアとサハラ以南のアフリカ地域に偏在している。我が国では年間約 3 万人が新たに肝臓癌と診断を受けており、癌死亡者数の 3 位を占めている。また総罹患者数の中の 90%はウイルス感染症が原因であり、肝炎ウイルスの感染から、慢性肝炎、さらに肝硬変に進み、ここから肝臓癌となる場合がほとんどである。したがってこれら原発性肝臓癌の内、手術適用はわずかに 30%とされており、抗癌剤による化学療法が重要な治療法となっている。世界的にみても肝臓癌の予後（米国における 5 年生存率 8.9%）は膵癌（4.4%）に次

いで悪く、新たな抗癌剤や治療法の開発が続けられている。

しかしながらほとんどの抗癌剤は癌部への特異性は無く、実際には正常組織の 5-10%弱の量しか癌部へ到達していないと考えられている。この結果、癌治療においては抗癌剤のもたらす副作用の影響が大きなジレンマとなって立ちはだかる。この問題に対する一つの解決法が薬物送達システム (DDS) である。薬物を患部に対して効果的かつ集中的に送り込むこの技術を確認することができれば、より強力な抗癌剤を使用することも可能となる。本研究は DDS 技術の鍵となる革新的薬物キャリアの開発を進めている。このタンパク質ベースのナノカプセルは配列制御された厳密な立体制御が可能であり、熱的に極めて安定な複合体を形成する。しかもその内部には 6.5nm の空間が有り、各種の薬物を内包することが可能である。しかし一方で、このナノカプセルには指向性・特異性が無いため何らかの方法でその機能を付加する必要がある。本研究では肝癌特異的な SP94 ペプチドを化学合成し、これをナノカプセル表面に固定化することを試みる。

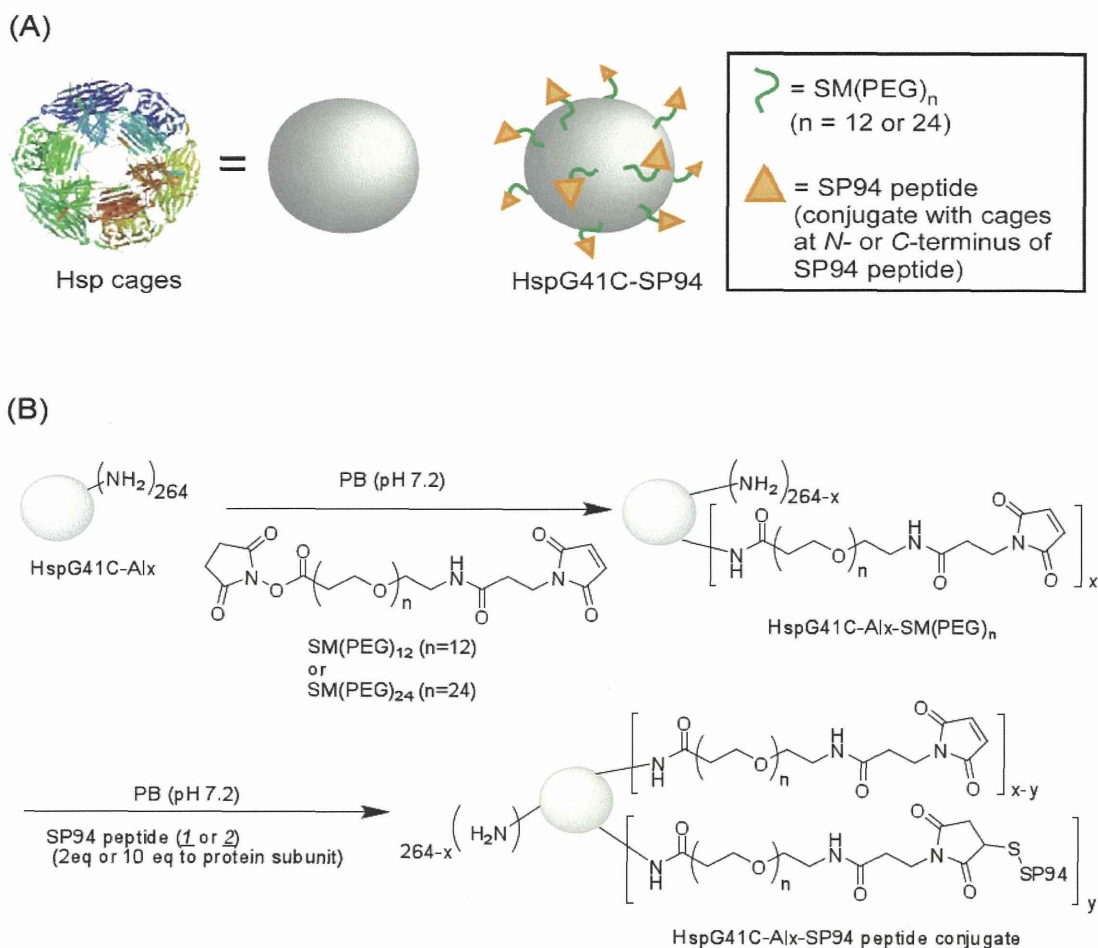


図1 ナノカプセルと肝癌特異的ペプチド SP94 とのコンジュゲーション

## B. 研究方法

*Methanococcus jannaschii* に由来するナノカプセル (HSP16.5) をコードするプラスミド pET-HSPG41C を大腸菌株 BL21gold(DE3) へ形質転換した。この菌株を 100 mg/mL のアンピシリンを含む 2×YT 培地に接種し、37°C で振とう培養した。OD600 値が 0.5 に達した際に、終濃度 1mM の IPTG を加えて組み換えタンパクの発現を誘導し、そのまま 4 時間培養を続けた。

培養終了後、培地を遠心分離し、得られたペレットにリン酸緩衝液 (pH7.0) を加えて十分に懸濁させた。これをプローブ型超音波照射装置でソニケーション (200 W, 45 s) し、終濃度がそれぞれ 5 および 1 mg/mL の DNase I、RNase A を加えた。4°C で遠心分離 (20 000g, 20 min) した後、不溶性分画を除去した。

組み換えタンパク質の精製は HiLoad 26/10 Q Sepharose HP™ アニオン交換カラムでイオン交換ク

ロマトグラフィーを行った。塩濃度グラジエントによってタンパク質を溶離し、分取した各フラクションを SDS-PAGE で分析した。目的のタンパク質を含むフラクションは、TSKgel G3000SW カラムを用いてゲル濾過精製した。得られたタンパク質は MALDI-TOF 質量分析計によって確認した。

ナノカプセルと SP94 ペプチドとのコンジュゲーションには、二官能性の架橋剤を用いて行った (図 1)。この二官能性試薬 SM(PEG)<sub>n</sub> (n = 12 or 24) は二つの官能基、マレイミド基とスクシンイミド基を水溶性かつフレキシブルなポリエチレングリコール (PEG) リンカーで結合した化学構造を有する。今回は PEG リンカー長が 12 あるいは 24 の二つの差長を持つものを使用した。

ナノカプセル一つには 264 個のリジン残基が存在する。このリジン残基が有するアミノ基とスクシン

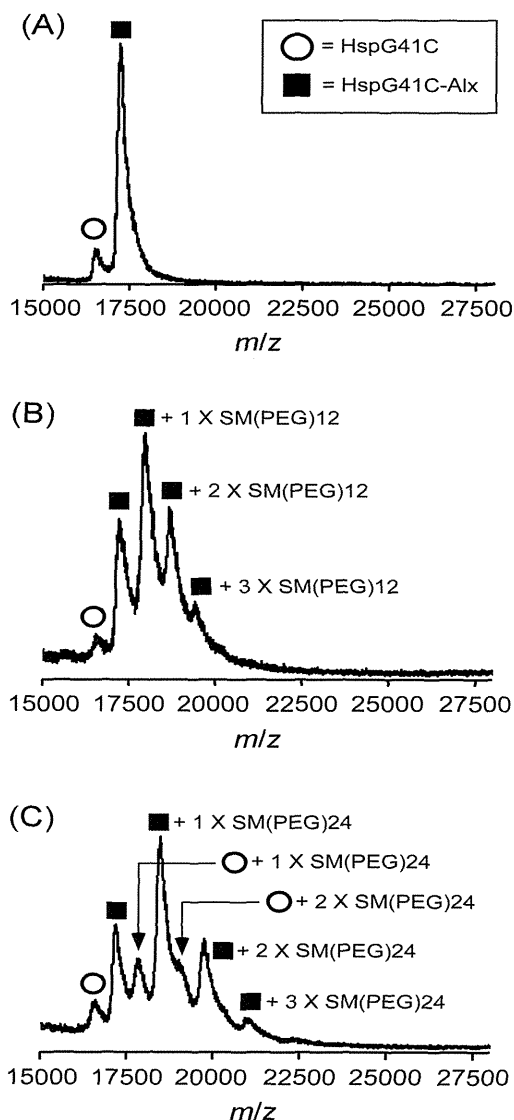


図2 質量分析法によるナノカプセルと SM(PEG)<sub>n</sub> とのコンジュゲーションの解析

ミド基との特異的な反応を利用して、まず SM(PEG)<sub>n</sub> をナノカプセル表面に固定化した。具体的には、リン酸緩衝液中 (PH7.2) においてタンパク質モノマーに対して 50 等量の SM(PEG)<sub>n</sub> を加え、室温で 2 時間反応した。

次にあらかじめ固相合成した二つのタイプの SP94 ペプチドをそれぞれの N 末端あるいは C 末端

Ac-CGGSF<sub>1</sub>IHTPILPL-NH<sub>2</sub> (pep1)

Ac-SFS<sub>1</sub>IHTPILPLGGC-NH<sub>2</sub> (pep2)

に配置したシステイン残基中のチオール基を使って SM(PEG)<sub>n</sub> とコンジュゲートした。実際の反応は、リン酸緩衝液中 (PH7.2) においてタンパク質モノマーに対して 2 等量あるいは 10 等量の各ペプチドを加え、室温で 6 時間反応した。精製は限外濾過により行った。なお、これらの反応の進行は MALDI-TOF MS や SDS-PAGE で確認した。

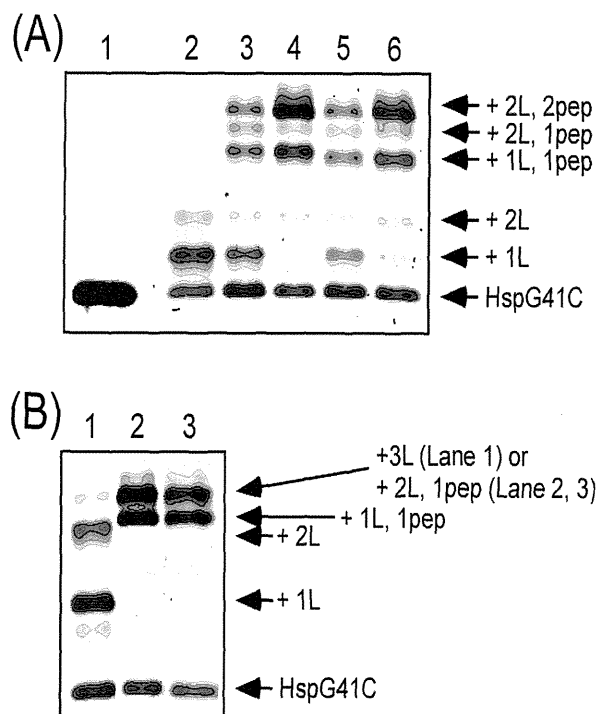


図3 SDS-PAGEによるナノカプセル-SM(PEG)<sub>n</sub>とSP94ペプチドの反応解析

(A) HspG41C-Alx-SM(PEG)<sub>12</sub>-SP94 ペプチドコンジュゲート. Lane 1, HspG41C-Alx; lane 2, HspG41C-Alx-SM(PEG)<sub>12</sub>; lane 3, 12-N(1); lane 4, 12-N(2); lane 5, 12-C(1); and lane 6, 12-C(2). (B) HspG41C-Alx-SM(PEG)<sub>24</sub>-SP94 ペプチドコンジュゲート. Lane 1, HspG41C-Alx-SM(PEG)<sub>24</sub>; lane 2, 24-N(1); and lane 3: 24-C(1).

(倫理面への配慮)

すべての実験は厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針、組み換え DNA 実験指針に基づいて実施した。

### C. 研究結果

ナノカプセルへと二官能性試薬 SM(PEG)<sub>n</sub> との反応は MALDI-TOF MS により確認した (図2)。この結果、タンパク質1個あたりに1-3分子の SM(PEG)<sub>n</sub> が結合していることが分かった。ナノカプセル1個あたりに換算すると SM(PEG)<sub>12</sub> では 23 ± 2 個、SM(PEG)<sub>24</sub> では 23 ± 3 個の架橋剤が結合していることとなった。このナノカプセル-SM(PEG)<sub>n</sub> 複合体に対して、さらに SP94 ペプチドをマイケル付加反応によってコンジュゲートしたところ、タンパク質1分

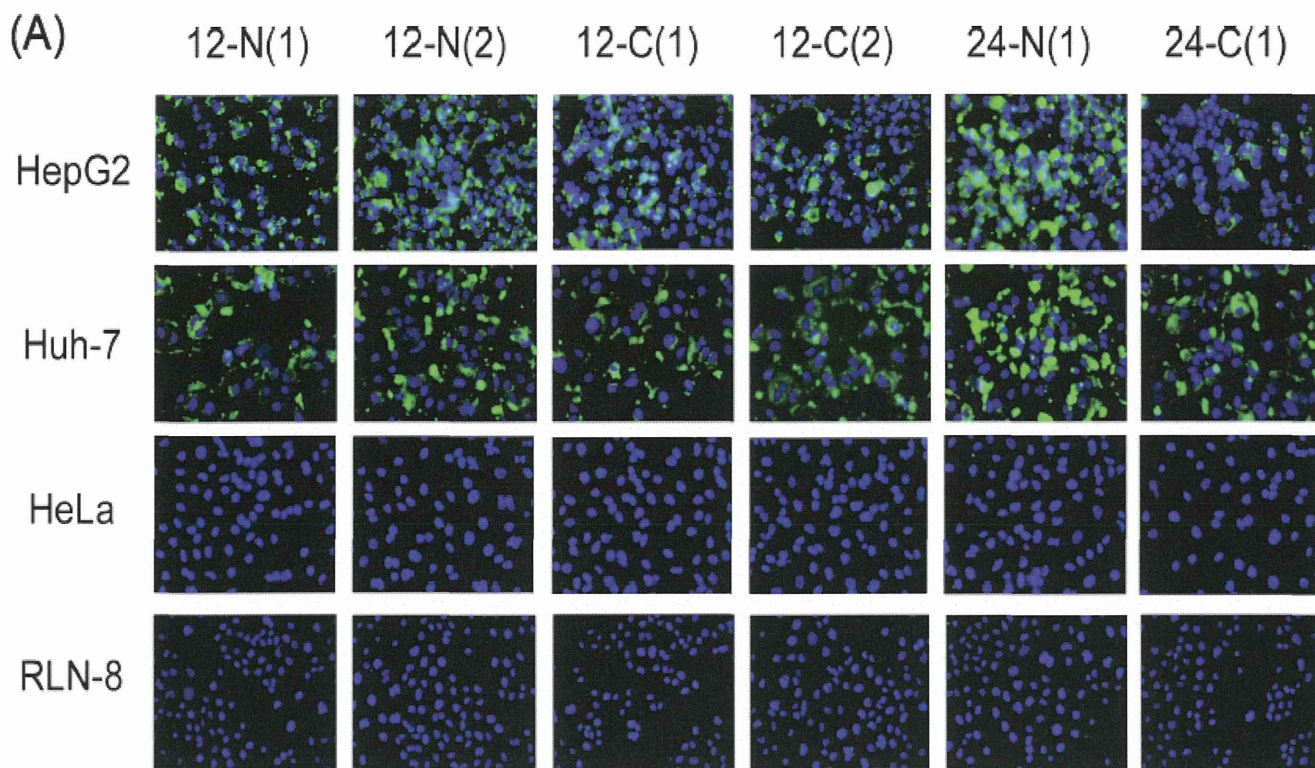


図4 SP94 修飾ナノカプセルの細胞選択性  
SP94-ナノカプセルを Alexa488 (緑) で蛍光ラベル化、核は Hoechst 33342 (青) で染色

子あたり 1~3 分子のペプチドが結合していることが分かった(図 3)。これらのデータを元に、ナノカプセル 1 個あたりのペプチド結合量を SM(PEG)<sub>n</sub> の PEG 鎖長、およびペプチドの種類ごとに要約した(表 1)。

表 1 SP94-ナノカプセルコンジュゲートの組成

Sample	Peptide number/cage <sup>a</sup>	Conjugated peptide <sup>b</sup>
12-N(1) <sup>c</sup>	12 ± 2	<u>1</u>
12-N(2) <sup>c</sup>	23 ± 2	<u>1</u>
12-C(1) <sup>c</sup>	13 ± 2	<u>2</u>
12-C(2) <sup>c</sup>	22 ± 3	<u>2</u>
24-N(1) <sup>d</sup>	15 ± 2	<u>1</u>
24-C(1) <sup>d</sup>	16 ± 1	<u>2</u>

得られたSP94修飾ナノカプセルの細胞特異性を培養細胞系で調べた。用いた細胞株はヒト肝癌由来細胞株 (HepG2, Huh-7)、ヒト子宮頸癌由来細胞株 (HeLa)、そしてラット正常肝細胞 (RLN-8) である。をそれぞれ

れ  $1 \times 10^4$  cells/well ずつ 96 穴プレートに播種し、10% (v/v) FBS と 1% (v/v) antibiotic-antimycotic mix を含む適当な培地 (カラーレス) で常法に従って一晚培養した。これにあらかじめ蛍光色素 Alexa488 をその内孔に固定化した SP94-ナノカプセルを、終濃度 1 μM となるようにそれぞれ添加した。24 時間後、培地を交換し、蛍光顕微鏡 (Keyence BZ-9000) で観察した。なお蛍光画像はすべて同一条件下 (接眼レンズ, 強度, ゲイン, イメージサイズ) で取得した。この結果、SP94 ペプチドを修飾した全てのナノカプセルが使用した二つのヒト肝癌由来細胞 (HepG2 と Huh-7) に対してトランスフェクションされたことが示された(図4)。一方で、正常肝細胞 (RLN-8) や子宮頸癌細胞 (HeLa) に対してはほとんどトランスフェクションされないことが分かった。この肝癌特異性はコンジュゲート野際に用いた架橋剤のリンカー長と、SP94 ペプチドとの結合の方向性により有意な影響を受けた。すなわち比較的長い PEG (ポリエチレングリコール) リンカーを介し、SP94 ペプチドの N 末端を使って修飾したナノカプセル 24N-N(1) が肝癌細胞に対して最も高い特異性を示した。