

201125033A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

画期的C型肝炎ウイルス阻害療法の確立を目指した  
核酸医薬送達ナノシステムの開発

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉岡 靖雄

平成 24 (2012) 年 5 月

## 目 次

I. 総括研究報告	
画期的C型肝炎ウイルス阻害療法の確立を目指した核酸医薬送達ナノシステムの開発	1
吉岡 靖雄	
II. 分担研究報告	
ナノマテリアルの体内・細胞内動態解析	16
吉川 友章	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	22
IV. 研究成果の刊行物・別刷	23

## 画期的 C 型肝炎ウイルス阻害療法の確立を目指した 核酸医薬送達ナノシステムの開発

研究代表者 吉岡 靖雄 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 特任准教授（常勤）

### 研究要旨

当該研究は、申請者独自の知見を基盤とし、ナノマテリアルによる『siRNA・アンチセンスなど核酸医薬の肝臓送達システムの新規開発』を図り、HCV に対する次世代治療戦略を提示するものである。研究代表者はこれまでに、直径 70 nm の非晶質ナノシリカ（nSP70）が、100 nm 以上の素材とは異なる体内動態を有し、静脈内投与後 80-90%が肝実質細胞などの肝臓組織に移行することを明らかとしている。そこで平成 22 年度には、非晶質ナノシリカ以外のナノマテリアルを用いて、肝臓移行能に優れたナノマテリアルのスクリーニングを試みた。Q ドットは、体内画像診断用試薬としてマウスレベルで汎用されるナノマテリアルであり、表面修飾など種々物性のものが存在している。そこで、4 種類の Q ドット（①表面がカルボキシル基で修飾されたもの、②表面が細胞内移行ペプチドで修飾されたもの、③表面がポリエチレングリコール（PEG）で修飾されたもの、④表面が PEG で修飾され、かつ、PEG 先端がアミノ基修飾されたもの）を用い、in vitro での細胞内移行能とマウスでの体内動態を評価した。その結果、in vitro では、上記②が最も細胞内移行に優れ、他の 3 種類の Q ドットは全く細胞内に移行しなかった。一方で、マウスに静脈内投与後の体内動態を検討した結果、上記④の PEG 修飾 Q ドットが肝臓に選択的に移行することが明らかとなった。平成 22 年度の成果をうけ、平成 23 年度には、Q ドットを用い、siRNA 導入キャリアーとしての有用性を in vitro で評価した。その結果、表面が細胞内移行ペプチドやアミノ基で修飾された Q ドットは、未だ不十分ではあるものの、siRNA による遺伝子発現抑制効果が認められ、siRNA の細胞内導入キャリアーになり得る可能性が示された。また、非晶質シリカの、核酸医薬の細胞内導入効率の低さの原因を追及するために、細胞内動態を精査した。さらに、HCV 感染肝細胞へ特異的に siRNA を導入する方法論の欠如が HCV に対する核酸医薬の開発において大きな問題であることから、T 細胞受容体を用いた新規ターゲティング分子の構築に向け基礎検討を試みた。本研究成果は、HCV に対する核酸医薬開発の最大の問題点を克服可能であり、HCV 治療に多大に貢献し得ると期待される。

### 分担研究者

吉川 友章・大阪大学大学院薬学研究科・毒性学  
分野・助教

インターフェロン（IFN）療法の確立は、C 型肝炎ウイルス（HCV）感染者の劇的な死亡率低下をもたらし、C 型肝炎は“致死的な病”から“制御可能な慢性感染症”へと変化した。一方で、重篤な副作用による IFN 療法の中断、薬剤耐性ウイルスの頻

### A. 研究目的

発、高額費用などの解決すべき問題が多数残されており、新たな観点からの治療薬開発が世界的に望まれている。本観点から、HCV ゲノム複製に関わる転写・翻訳を、siRNA やアンチセンス等を用いて核酸レベルで抑制する核酸医薬が、上記問題を克服し得る可能性を秘めていることから、次世代型画期的医薬品として注目されている。しかし核酸医薬は一般に、①血中で速やかに分解される（血中半減期は数十秒）、②肝指向性に極めて乏しい、③細胞外から作用発揮の場である細胞内への移行性が全くない、などの致命的欠点から十分な治療効果を発揮できず、これらを克服し得る薬物送達戦略の開発が待望されている。申請者はこれまでに、『粒子径 100 nm 以下のナノマテリアルが全身投与後、選択的かつ効率良く肝臓に送達され、かつナノマテリアルの粒子表面性状により種々細胞内局在性や細胞選択性を任意に制御できる』という知見を世界に先駆けて明らかとしている。本知見は、ナノマテリアルが核酸医薬を安定かつ効率的に肝臓さらには肝実質細胞内に送達することで、核酸医薬の優れた送達キャリアになり得る可能性を強く示唆するものである。そこで当該研究では、申請者独自の知見を基盤とし、ナノマテリアルによる『siRNA・アンチセンスなど核酸医薬の肝臓送達システムの新規開発』を図り、HCV に対する次世代治療戦略を提示するものである。平成 22 年度には、①肝臓移行性に優れたナノマテリアルのスクリーニングを実施するとともに、②核酸医薬の細胞内移行能に関する検討、③ナノマテリアルの核酸医薬送達能を簡便に定量する為の細胞評価系の構築を推進した。具体的には、4 種類の Q ドット（①表面がカルボキシル基で修飾されたもの、②表面が細胞内移行ペプチドで修飾されたもの、③表面がポリエチレングリコール（PEG）で修飾されたもの、④表面が PEG で修飾され、かつ、PEG 先端がアミノ基修飾されたもの）を用い、in vitro での細胞内移行能とマウスでの体内動態を評価した。その結果、in vitro では、上記②が最も細胞内移行に優れ、他の 3 種類の Q ドットは全く細胞内に移行しなかった。

一方で、マウスに静脈内投与後の体内動態を検討した結果、上記④の PEG 修飾 Q ドットが肝臓に選択的に移行することが明らかとなった。また、様々な粒子径や表面電荷の非晶質シリカを用い、核酸医薬の細胞内導入効率を in vitro で検討した。しかし、高い遺伝子導入効率を得ることはできなかった。

平成 22 年度の成果をうけ、平成 23 年度には、Q ドットを用い、siRNA 導入キャリアーとしての有用性を in vitro で評価した。その結果、表面が細胞内移行ペプチドやアミノ基で修飾された Q ドットは、未だ不十分ではあるものの、siRNA による遺伝子発現抑制効果が認められ、siRNA の細胞内導入キャリアーになり得る可能性が示された。また、非晶質シリカの、核酸医薬の細胞内導入効率の低さの原因を追及するために、細胞内動態を精査した。本研究成果は、HCV に対する核酸医薬開発の最大の問題点を克服可能であり、HCV 治療に多大に貢献し得ると期待される。

## B. 研究方法

### 粒径分布およびゼータ電位の測定

リン酸緩衝生理食塩水（PBS）または 10% FBS-DMEM で 10 nM に調整した励起波長 705 nm、蛍光波長 405–665 nm の各種表面修飾を施した Quantum Dot (Q ドット) [ポリエチレングリコール (PEG) 修飾：QD1、細胞内移行ペプチド修飾：QD2、カルボキシル基修飾：QD3、PEG で修飾され、かつ、PEG 先端がアミノ基修飾されたもの：QD4]を、Size & Zeta キャピラリーセルに 1 mL 注入し、Zetasizer Nano-ZS で、粒子サイズおよびゼータ電位を測定した。粒子サイズは動的光散乱法で、ゼータ電位はレーザードップラー法で測定した。

### in vivo imaging

妊娠した BALB/c マウスを日本 SLC より購入した。各種 QD (QD1、QD2、QD3、QD4) を PBS で 400 nM に調整し、マウス尾静脈より 0.1 mL 投与した。投与 24 時間後に、イソフルランで吸入麻

酔をかけ、IVIS 100 imaging system を用いて、QD の体内動態を蛍光観察した。

#### 遺伝子導入効率

各種 QD (QD1、QD2、QD3、QD4) を Opti-MEM で終濃度 40nM となるように調節した。終濃度 1.67nM の siRNA (invitrogen, Stealth RNAi Reporter Control Duplexes Luciferase Reporter Control) と、invitrogen 社の Q ドット粒子との混合液をルシフェラーゼ発現肝細胞に作用させ、24 時間後のルシフェラーゼ活性をコントロール siRNA 作用群と検討することにより、QD の siRNA キャリアーとしての有用性を評価した。

#### 蛍光顕微鏡による in vitro 動態解析

非晶質ナノシリカの詳細な動態を解析するため、共焦点蛍光顕微鏡を用いて細胞内動態を観察した。8 穴チャンバースライドに  $1 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ L/well で細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%、CO<sub>2</sub> 存在下で 24 時間培養を行った後、RPMI 1640 (2 mM グルタミン酸入り) + 500 $\mu$ g/500ml 2-ME, 1% non-essential amino acid, 10% FCS, 1% Ab で希釈した粒子径 70nm の各種非晶質蛍光ナノシリカ (未修飾体、カルボキシル基修飾体、アミノ基修飾体) を 200 $\mu$ L 加えた。3 時間後、PBS で 3 回洗浄し、細胞を固定するため、4%パラホルムアルデヒドを 200 $\mu$ L 加えた。室温で 30 分間静置後、パラホルムアルデヒドを除去し、PBS で 3 回洗浄した。核染色ならびに非晶質蛍光ナノシリカの蛍光退色を防ぐため、Prolong Gold anti-fade reagent with DAPI を用いてマウントすることで永久組織標本作製し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

#### PVP-C<sub>60</sub> フラレーン

本検討では、ポリビニルピロリドン (PVP) で包接することで水溶化した PVP-C<sub>60</sub> フラレーンと、包接用 PVP K-30 (Ashland, Inc.; ASH, USA) を用いた。

#### 粒径分布およびゼータ電位の測定

超純水で 0.25 mg/ml に調整した PVP-C<sub>60</sub> フラレーン粒子を Size & Zeta キャピラリーセル (Malvern Instruments, UK) に 1 ml 注入し、Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments) を用いて粒径分布ならびにゼータ電位を測定した。

#### 実験動物

C57BL/6 マウス (雌性、8-9 週齢) は日本 SLC (Shizuoka, Japan) から購入した。

#### PVP-C<sub>60</sub> フラレーンの経口投与

C57BL/6 マウスに超純水で溶解した PVP-C<sub>60</sub> フラレーン溶液及び PVP 溶液をそれぞれ 400  $\mu$ l ずつ 7 日間連続ゾンデ強制経口投与した。投与期間中、毎日体重を測定した。

#### 血液回収

最終投与から 24 時間後、マウスに 64.8 mg/ml のペントバルビタール (ソムノペンチル; Schering-plough Animal Health, Netherlands) を 50  $\mu$ l 腹腔内投与することにより麻酔をした後、心臓より採血を行った。採血は、5 IU/mL のヘパリン溶液であらかじめ湿らせたシリンジおよび注射針を用いて行った。この溶液を全血として血球検査に用い、残りを 1750 g、15 分間、遠心分離して血漿を回収した。

#### 血液生化学試験

血漿中のアラニントランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、血中尿素窒素 (BUN) を比色法にて測定した。測定には、生化学分析装置 FUJI DRI-CHEM 7000 (FUJIFILM; Tokyo, Japan) を用いた。

#### 血球検査

PVP-C<sub>60</sub> フラレーンを投与したマウスから採取した全血を多項目自動血球計測装置 VetScan HM2 (Abaxis, Union City, CA) を用いて、赤血球数、総白血球数、リンパ球数、顆粒球数、単球数、血

小板数を電気抵抗法により測定した。

### リコンビナント TCR の構築

T 細胞受容体の $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖を PCR により増幅し、pET-15b (Novagen) に組み込んだ。構築した各プラスミドを大腸菌株 BL21 (DE3) (Stratagene) に形質転換し、OD 600 = 3.0 になった時点で終濃度 1 mM の Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; Sigma-Aldrich) を加え、更に 6 時間培養することで、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖のリコンビナント蛋白質をインクルージョンボディとして大量誘導した。インクルージョンボディを回収した後、可溶化・リフォールディングの後、精製した。結合力については、tyrosinase/HLA-A\*0201、MART-1/HLA-A\*0201 複合体の蛋白質を用いて、BIAcore により実施した。なお、各速度パラメーターの解析は BIAevaluation Version 4.1 program を用いて行った。

### 倫理面への配慮

本研究は、国立大学法人大阪大学の組換え DNA 実験委員会の承認を得た後に行った。なお本研究においては、公知の細胞株以外のヒト由来試料は使用していない。

## **C. 研究結果および D. 考察**

### 各種 QD の物性

QD は、体内画像診断用試薬としてマウスレベルで汎用されるナノマテリアルであり、表面修飾など種々物性のものが存在している。そこで、4 種類の Q ドット (①表面がポリエチレングリコール (PEG) で修飾されたもの：QD1、②表面が細胞内移行ペプチドで修飾されたもの：QD2、③表面がカルボキシル基で修飾されたもの：QD3、④表面が PEG で修飾され、かつ、PEG 先端がアミノ基修飾されたもの：QD4) を用いた。

平成 22 年度に、ゼータサイザーを用いて、各種 QD の粒子径と表面電荷を解析したが、本報告書にも参考データとして記載した (図 1)。いずれの QD も数十 nm の粒子径を示し、カタログ値と

同等であり、分散性に優れている。また、表面電荷もほぼ同様であったが、表面がカルボキシル基で修飾された QD3 のみ、より負電荷を帯びていることを明らかとしている。

### 各種 QD の核酸医薬送達能

次に、QD の siRNA 導入キャリアーとしての有用性を、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼに対する siRNA を用いて評価した (図 2)。各種 Q ドット (QD1、QD2、QD3、QD4) を用いて、ルシフェラーゼ発現肝細胞への siRNA 導入効率をルシフェラーゼ活性を指標に評価した。その結果、QD2、QD4 においてコントロール siRNA 作用群と比較し、20%のルシフェラーゼ活性の低下が認められた。以上の結果から、活性の低下は低いものの、siRNA の導入キャリアーになり得る可能性が示唆された。今後は濃度依存性など、より詳細に評価する予定である。

QD2 は細胞内移行ペプチド修飾されたもの、QD4 は PEG で修飾され、かつ、PEG 先端がアミノ基修飾されたものである。平成 22 年度の細胞内移行活性の結果によると、QD2 は細胞内に効率的に移行する活性を有することを明らかとしている。従って、QD2 の核酸医薬送達能は、QD2 の強い細胞内移行活性に起因すると予想された。一方で、QD4 は、細胞内移行活性に乏しいことを明らかとしていることから、核酸医薬送達能が認められた原因は不明である。しかし、QD2 の PEG 先端はアミノ基で修飾されており、負電荷の核酸医薬とは結合することが予想される。今後は、QD と核酸医薬の結合力を詳細に検討していく必要があると考えられる。

### 各種 QD の安全性評価

平成 22 年度に、QD をマウスに投与した後の生化学的検査などを実施し、単回投与の結果であるものの、顕著な副作用を誘発しないことを明らかとしている。さらに、安全性評価及び有効性評価の一環として、in vivo イメージングを用いた体内動態解析も実施した。医薬品の安全性を考える場

合、胎仔を対象とした生殖発生毒性は必須の評価項目である。そこで、QD を妊娠マウスに投与し、その安全性評価を試みた。本年度は、生化学的検査・血球検査なども試みたが、サンプル調製の不備などにより正確な解析が実施できなかった。そこで、妊娠マウスにおける体内動態解析を *in vivo* イメージングにより実施した。各種 QD を妊娠 BALB/c マウスに投与し、*in vivo* imaging により体内動態を観察した (図 3)。その結果、QD1、QD2 は全体像からはほとんど検出されなかった。一方で、QD3、QD4 において、肝臓で強い蛍光が観察され、肝臓への集積が認められた。さらに、各臓器を摘出し観察した結果、全ての群で肝臓、胃に蛍光が検出されたが、QD4 が最も肝臓へ集積していることが明らかとなった。また、QD4 投与群では、脾臓でも蛍光が観察された。以上の結果は、平成 22 年度に実施した成体マウスを用いた結果と非常に類似したものである。さらに、胎盤・胎仔への移行を観察したところ、顕著な移行は観察されなかった。当然感度の問題はあるものの、他のナノマテリアルを用いた *in vivo* イメージングの検討から、胎仔や胎盤に移行し生殖発生毒性を呈するナノマテリアルも存在することを明らかとしている。今後、定量的な体内動態評価とともに、より詳細な生殖発生毒性などを追及していく予定である。

表面が PEG 修飾された QD1 は、血中滞留性が亢進し、臓器移行性が低下した可能性が考えられた。一方で、同様の PEG 修飾にも関わらず、PEG 先端がアミノ基修飾された QD4 が優れた肝移行性を有していた事実は非常に興味深い。今後は、QD4 の肝移行量を定量する必要があると考えられる。また、QD4 の PEG 先端のアミノ基を活性化することで、核酸医薬との複合体を形成可能と考えられ、核酸医薬送達能を評価していく予定である。

#### 蛍光顕微鏡による *in vitro* 動態解析

研究代表者はこれまでに、直径 70 nm の非晶質ナノシリカ (nSP70) が、100 nm 以上の素材と

は異なる体内動態を有し、静脈内投与後 80-90% が肝実質細胞などの肝臓組織に移行することを明らかとしている。一方で平成 22 年度に、非晶質ナノシリカの siRNA 導入キャリアーとしての有用性を評価したところ、核酸医薬導入効率に乏しいことが明らかとなった。本原因を追及するため、本研究では、共焦点蛍光顕微鏡を用いて蛍光修飾された各種非晶質ナノシリカの細胞内への取り込みを評価した (図 4)。粒子径 70nm の nSP70、nSP70 の表面がアミノ基修飾された nSP70-N、カルボキシル基修飾された nSP70-C を用いた。その結果、いずれの粒子においても細胞内に移行している粒子が観察された。細胞質内にドット状に蛍光が局在していることからエンドソームなどに内包された状態でシリカ粒子が存在していると考えられる。また、アミノ基修飾体でのみ、細胞核内においても蛍光が観察された。表面電荷の変化などにより相互作用する蛋白質が異なり、核内への移行性が変化したと考えられる。従って、いずれの nSP70 も細胞内移行活性は優れていることが明らかとなった。なぜ核酸医薬導入効率が乏しいかは不明であるが、細胞内での局在 (例えばエンドソーム内にとどまる等) や、核酸医薬との結合活性の乏しさに起因する可能性もあり、今後詳細な検討が必要と考えられる。

#### TCR 蛋白質の機能評価

HCV 感染肝細胞へ特異的に siRNA を導入する方法論の欠如が HCV に対する核酸医薬の開発において大きな問題であることから、T 細胞受容体 (TCR) を用いた新規ターゲティング分子の構築に向け基礎検討を試みた。TCR は、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖からなるヘテロ二量体の膜結合型蛋白質であり、T 細胞表面で安定に存在している。また、TCR は細胞内に発現する抗原蛋白質由来のペプチド断片と HLA の複合体を特異的に認識し、抗原情報を T 細胞内部にシグナルとして伝える。従って、TCR を用いることで、従来では不可能であった細胞内抗原をも標的とし得る新規ターゲティング分子が創製可能と考えられる。

しかし、TCR は可溶性蛋白質としての作製が困難とされており、既に報告されている可溶性 TCR 蛋白質の数は世界的に見てもごくわずかである。そこで本研究では、TCR のターゲティング分子への適用を目指し、可溶性 TCR 蛋白質の作製系の構築を図った。これまでに、TCR の膜貫通ドメインおよび細胞膜に近接した天然型の鎖間ジスルフィド結合が、TCR の可溶性蛋白質作製の妨げになることが明らかとされている。そこでまず、PCR を用いた遺伝子工学的手法により、天然型の鎖間ジスルフィド結合を形成するシステインコドンをストックコドンに置換することで、これら問題となる領域を欠損させた (図 5)。また、ヘテロ二量体構造を維持させるために、 $\alpha$ 鎖定常ドメイン 48 番目のスレオニンコドンと  $\beta$ 鎖定常ドメイン 57 番目のセリンコドン进行各々システインコドンに置換することで、新たな鎖間ジスルフィド結合の形成を図った。作製した  $\alpha$ 鎖と  $\beta$ 鎖の PCR 産物を、T7 プロモーター制御型の蛋白質発現用ベクターである pET-15b に各々組み換えた。作製した各プラスミドを、大腸菌株 BL21 (DE3) に形質転換し、培地中に IPTG を添加することで、両鎖をインクルージョンボディとして誘導した。回収したインクルージョンボディを、変性・可溶化した後、両鎖を等モル比で混合し、最適化されたリフォールディング操作により、ヘテロ二量体構造を有する TCR 蛋白質の作製を試みた。その後、陰イオン交換クロマトグラフィーにより粗精製し、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。その結果、二量体として溶出される分子量約 50 kDa の位置に単一の鋭い溶出ピークが認められた。次に、このピーク画分の蛋白質を回収し、還元条件下・非還元条件下で SDS-PAGE により解析した。その結果、非還元条件下では、二量体と思われる位置にバンドが観察された。一方で、還元条件下では、非還元条件下で観察されたバンドが消失し、2 本のバンドが観察された。 $\alpha$ 鎖と  $\beta$ 鎖の分子量は、それぞれ 23.1 kDa と 28.3 kDa であるため、還元条件下で観察された 2 本のバンドは、 $\alpha$ 鎖と  $\beta$ 鎖であると判断できる。これらの結果より、作製した

TCR 蛋白質は、確かに  $\alpha$ 鎖と  $\beta$ 鎖から構成されるヘテロ二量体構造を形成していることが強く示唆された。 $\alpha$ 鎖と  $\beta$ 鎖がヘテロ二量体を形成すると、非還元条件下では 51 kDa 付近の位置にバンドが観察されるはずだが、実際には約 45 kDa 付近にバンドが観察された。これは、おそらく非還元条件下では、蛋白質がコンパクトに折りたたまれているため、理論的な分子量より見かけの分子量が小さくなったからだと考えられる。

次に、作製した TCR 蛋白質の結合力および特異性を BIAcore<sup>®</sup>2000 を用いた表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance; SPR) 法により解析した。標的分子である tyrosinase/HLA-A\*0201 複合体に、作製した TCR 蛋白質を添加した際の結合のレスポンスを観察した結果、確かに TCR 蛋白質は結合性を有していることが判明した (図 5)。一方で、別の抗原である MART-1 のペプチド断片と HLA の複合体 (MART-1/HLA-A\*0201 複合体) へ添加しても、全く結合のレスポンスが観察されなかった (図 5)。このことから、作製した TCR 蛋白質は、tyrosinase/HLA-A\*0201 複合体に対して特異的に結合していることが明らかとなった。また、得られたシグナルから反応速度パラメーター (結合速度定数 (kon)、解離速度定数 (koff)) を Kinetics 解析し、解離定数 (KD = koff / kon) を算出した (図 5)。その結果、作製した TCR 蛋白質の解離定数は、既に報告されている別の TCR 蛋白質の解離定数とほぼ同程度の値を示した。以上の結果より、tyrosinase/HLA-A\*0201 複合体に対して、結合力・特異性を共に保持した可溶性 TCR 蛋白質の作製に成功した。

#### C<sub>60</sub>フラーレンの安全性評価

ナノマテリアルの一つであるフラーレンは、炭素のみから構成される球状の物質であり、グラファイト、ダイヤモンドに次ぐ第三の炭素同素体の総称である。フラーレンの中でも炭素原子 60 個が切頂二十面体構造に結合した C<sub>60</sub>フラーレン (直



径 1 nm 程度) は、ラジカルスポンジとよばれるほどの強い抗酸化活性に起因する抗炎症作用のみならず、抗ウイルス作用や抗がん作用をも有することから、エイズ・肝炎・がんや自己免疫疾患に対する新たなナノ医薬として期待されている。さらに、C<sub>60</sub> フラーレン表面に核酸医薬を吸着させることで、優れた核酸医薬送達キャリアーになり得る可能性が報告されている。しかし、C<sub>60</sub> フラーレンは水溶性が非常に低く、生体内で十分な生理・薬理活性を示さないことが、臨床応用に向けた障壁の一つとなっている。したがって、C<sub>60</sub> フラーレンをナノ医薬品素材として使用するためには、水溶性の向上が必要不可欠とされる。本観点で、我々の共同研究者は、ポリビニルピロリドン (PVP) といった水溶性のホスト分子を用い、その疎水性相互作用を利用して C<sub>60</sub> フラーレンを分子内部に包接させて水溶化し得ることを明らかとしており、核酸医薬送達キャリアーへの応用にも期待が寄せられている。一方で近年、ナノマテリアル特有の物性に起因する革新的機能が、二面性を呈してしまい、予期しにくい、あるいは未知の毒性を発現してしまうことが世界的に危惧されている。C<sub>60</sub> フラーレンについても、安全性に関する報告が乏しいことから、本研究ではまず、その安全性評価を一般毒性学的観点から解析した。

本研究を実施するにあたり、始めに実験に供する PVP-C<sub>60</sub> フラーレンの物性に関する基礎的情報を収集した。まず、動的光散乱法により粒径分布を評価した。その結果、135 nm に単一の 2 次粒子径のピークが検出され、溶媒中での PVP-C<sub>60</sub> フラーレンの粒子径は、100 nm 程度であることが明らかとなった (図 6)。

次に、PVP-C<sub>60</sub> フラーレンを短期投与した際の一般毒性を評価するため、C57BL/6 マウスに PVP-C<sub>60</sub> フラーレン溶液及び PVP 溶液を投与し、マウスの体重を経日的に測定した (図 7)。その結果、PVP-C<sub>60</sub> フラーレン投与群は、コントロール群と同様の体重変動を示し、体重変化に影響は認められなかった。次に、マウスから回収した主要

臓器の重量を測定した (図 8)。肝臓、大腸、腎臓、脾臓の重量を比較したところ、PVP-C<sub>60</sub> フラーレン投与群はコントロール群と比較し、大きな影響は認められなかった。また、解剖時の所見からも各臓器に大きな異常は見られなかった。次に、回収した血液中の血球成分を計測するとともに、血漿を回収し、肝障害マーカーである AST、ALT や腎障害マーカーである BUN 値を測定した (図 9)。その結果、白血球、顆粒球、リンパ球、単球、赤血球や血小板などの各種血球細胞数にも異常は認められなかった。また、組織障害マーカーも同様に異常は認められなかった。以上の結果から、今後より詳細な検討が必要ではあるものの、PVP-C<sub>60</sub> フラーレンは極めて安全性に優れている可能性が示された。

## E. 結論

平成 23 年度には、①QD の核酸医薬送達キャリアーとしての有用性評価、②非晶質ナノシリカの細胞内動態解析、③TCR 蛋白質の創製、④フラーレンの安全性評価、を実施した。平成 23 年度は当初の予定通り研究が進行したと考えている。平成 24 年度も、これら基盤情報を発展させ、より加速して当該研究を推進する予定である。

## F. 健康危険情報

該当事項無し

## G. 研究発表

### ①論文発表

1. Narimatsu S, **Yoshioka Y**, Morishige T, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Nishimura MI, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Structure–activity relationship of T-cell receptors based on alanine scanning. *Biochem Biophys Res Commun.* 415: 558-62, 2011.

### ②学会発表

国外

1. **Yoshikawa T**, Nabeshi H, Yoshida T, Hirai T,

Tochigi S, Akase T, Uji M, Ichihashi K, Imazawa T, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Itoh N, Yoshioka Y, Tsunoda S, Tsutsumi Y. Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocyte. SETAC Europe 21st Annual Meeting, Milan (Italy), 15-19 May, 2011.

2. Yoshioka Y, Tsutsumi Y. The importance of systemic nanotoxicological and toxicokinetic analysis for ensuring the safety of nanomaterials., Gordon Research conference, Waterville Valley (USA), 29 May-3 June, 2011.

#### 国内

1. 潘 慧燕, 吉岡靖雄, 山下浩平, 東阪和馬, 青島央江, 北口順治, 鍋師裕美, 吉川友章, 伊藤徳夫, 堤 康央 : 有効かつ安全な経口ナノ医薬の開発に向けた C<sub>60</sub> フラーレンの安全性評価., 第27回日本DDS学会学術集会., 東京(東京), 2011年6月.
2. 吉岡靖雄, 山下浩平, 東阪和馬, 森下裕貴, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 柳原 格, 齋藤 滋, 伊藤徳夫, 吉川友章, 堤 康央 : 安全なナノマテリアルの創製

に向けた次世代影響評価 : 妊娠後期曝露の胎児影響に焦点を絞って., 第 18 回日本免疫毒性学会学術大会., 千葉(千葉), 2011年9月.

3. 青山道彦, 吉岡靖雄, 山下浩平, 潘 慧燕, 小椋健正, 平 菜由, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央 : 新規ナノ薬物送達担体の開発を目指した細胞内ナノ動態に関する基礎的検討., 日本薬学会第132年会., 札幌(北海道), 2012年3月.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### ①特許取得

該当事項無し

##### ②実用新案登録

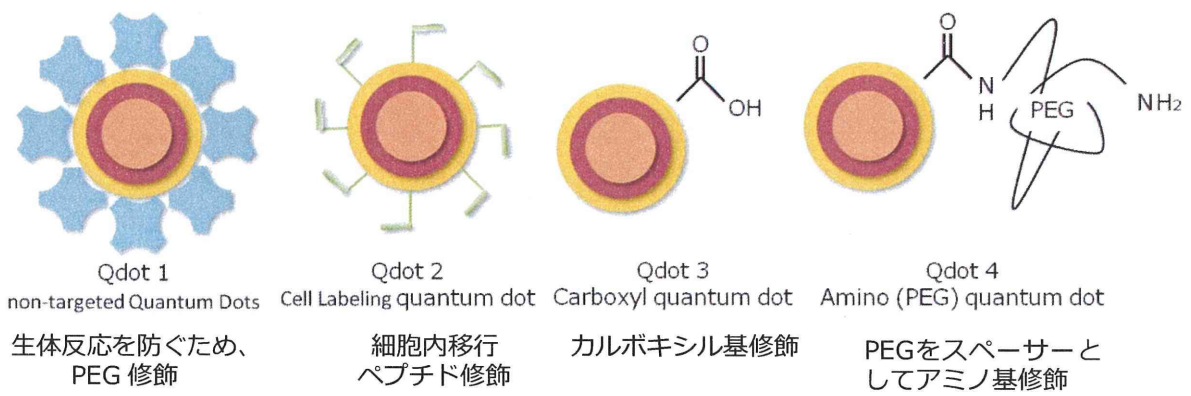
該当事項無し

##### ③その他

該当事項無し

#### I. 研究協力者

該当事項無し



	修飾	溶媒	SIZE	Z-potential
QD1	plane	PBS	32.2	-3.68
		10% FCS medium	22.7	-3.6
QD2	plane	PBS	29.4	-10
		10% FCS medium	20.5	-7.55
QD3	plane	PBS	25.8	-33.9
		10% FCS medium	32.2	-10.6
QD4	plane	PBS	20.1	-1.96
		10% FCS medium	19.6	-4.36

図 1. 各種 Q ドットの特性評価.

各種 Q ドットの粒子径、表面電荷をゼータサイザーを用いて評価した。

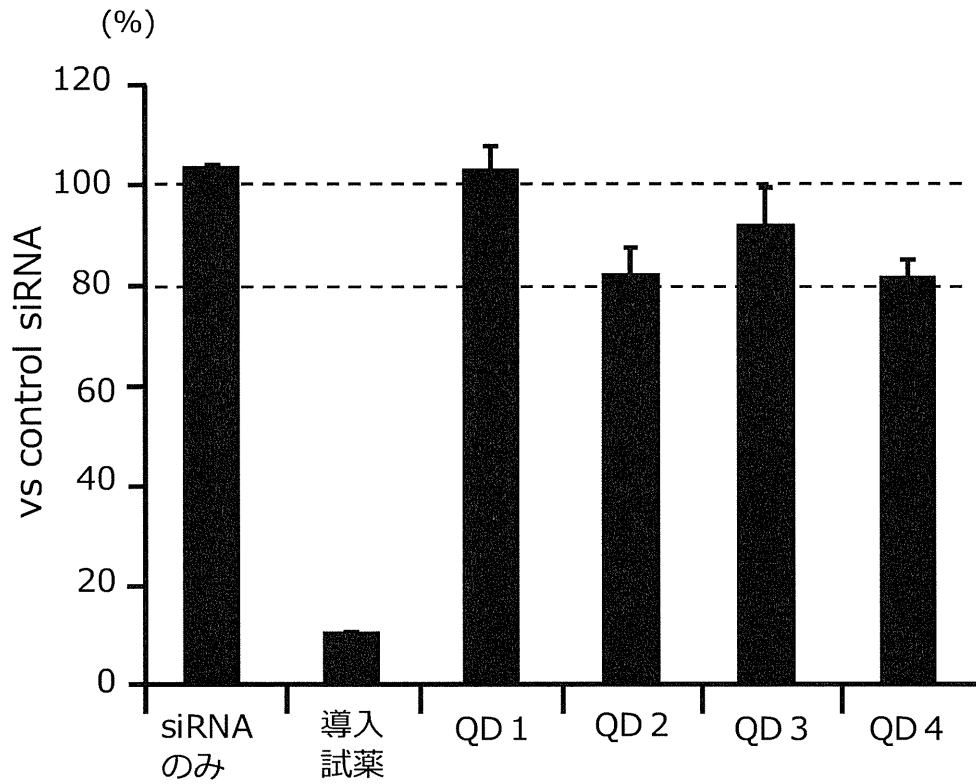


図 2. 核酸医薬導入効率の検討. 各種 QD (QD1、QD2、QD3、QD4) を、ルシフェラーゼに対する siRNA と混合した後、ルシフェラーゼ発現肝細胞に作用させた。その後、24 時間後に細胞のルシフェラーゼ活性を評価した。未処理細胞のルシフェラーゼ活性を 100% で表記した。また、ルシフェラーゼに対する siRNA のみを作用させた群を「siRNA のみ」と表記した。

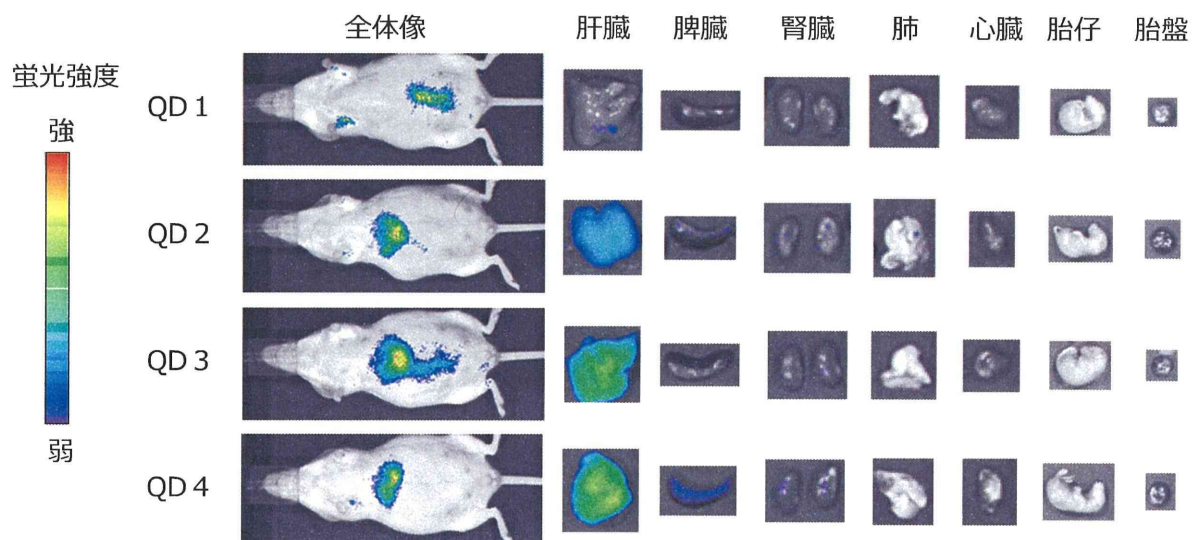


図 3. 体内動態評価. 各種 QD (QD1、QD2、QD3、QD4) を PBS で 400 nM に調整し、妊娠マウスに対して、マウス尾静脈より 0.1 mL 投与した。投与 24 時間後に、IVIS 100 imaging system を用いて、QD の体内動態を蛍光観察した。

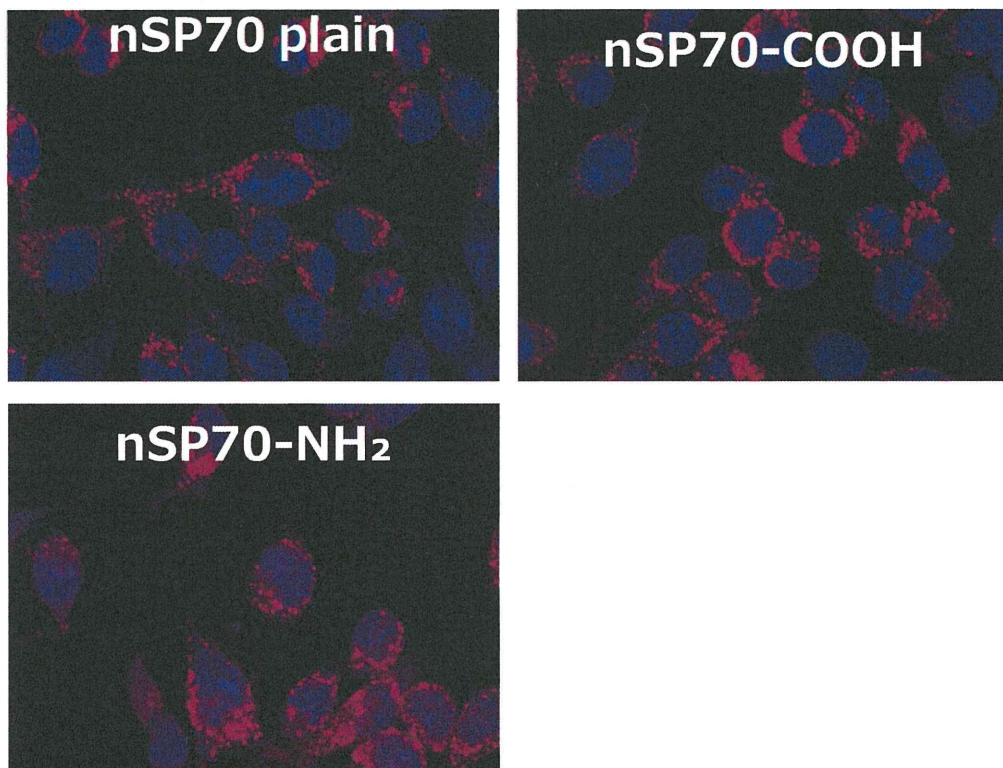
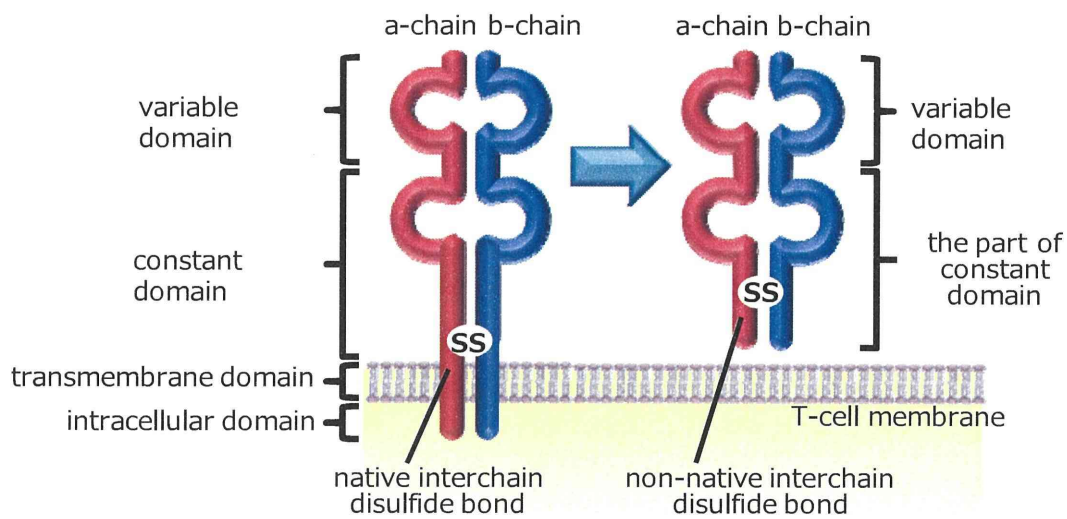
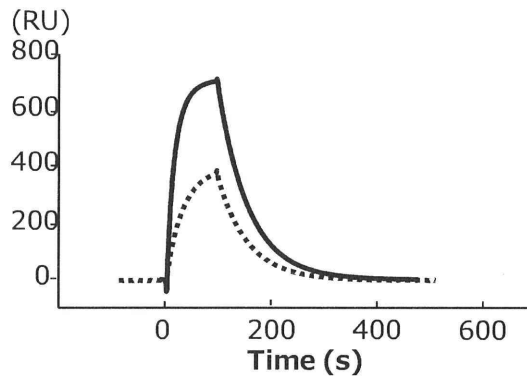


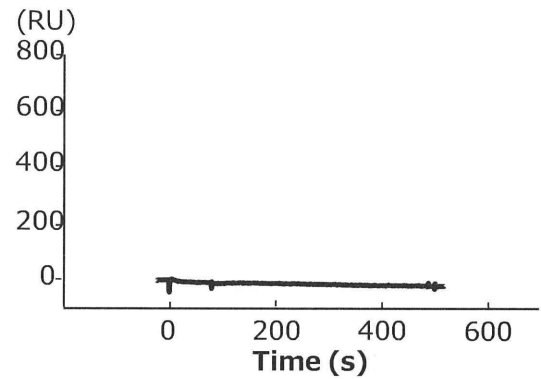
図 4. 蛍光顕微鏡による *in vitro* 動態解析. 非晶質ナノシリカの詳細な動態を解析するため、共焦点蛍光顕微鏡を用いて細胞内動態を観察した。細胞を播種した後、粒子径 70nm の蛍光修飾された各種非晶質ナノシリカ（未修飾体、カルボキシル基修飾体、アミノ基修飾体）を加えた。3 時間後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。



**tyrosinase/HLA-A\*0201 complex**

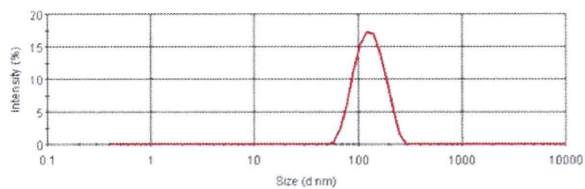


**MART-1/HLA-A\*0201 complex**

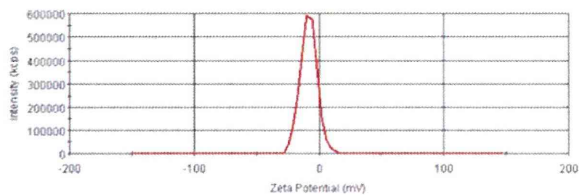


<b>kon</b>	<b>koff</b>	<b>KD</b>
( $\times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	( $\times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	( $\times 10^{-6} \text{ M}$ )
5.45	1.45	2.66

図 5. TCR 蛋白質の作成及び機能評価. TCR 蛋白質を作製した後、Biacore を用いて結合力を測定した。



粒子径：135 nm



表面電荷：-7.8 mV

図 6. PVP-C<sub>60</sub> フラーレンの物性評価. PVP-C<sub>60</sub> フラーレンの粒子径、表面電荷（ゼータ電位）を評価した。粒子径は動的光散乱法で、ゼータ電位はレーザードップラー法で測定した。

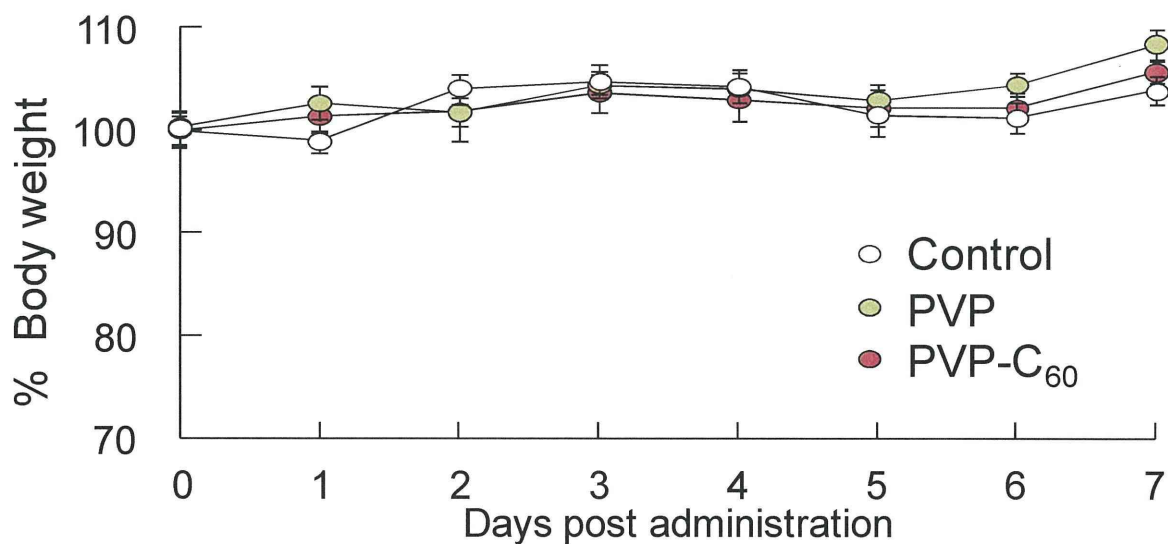


図 7. 体重変化. C57BL/6 マウスに超純水で溶解した PVP-C<sub>60</sub> フラーレン溶液及び PVP 溶液を 7 日間連続で投与し、投与期間中、毎日体重を測定した。



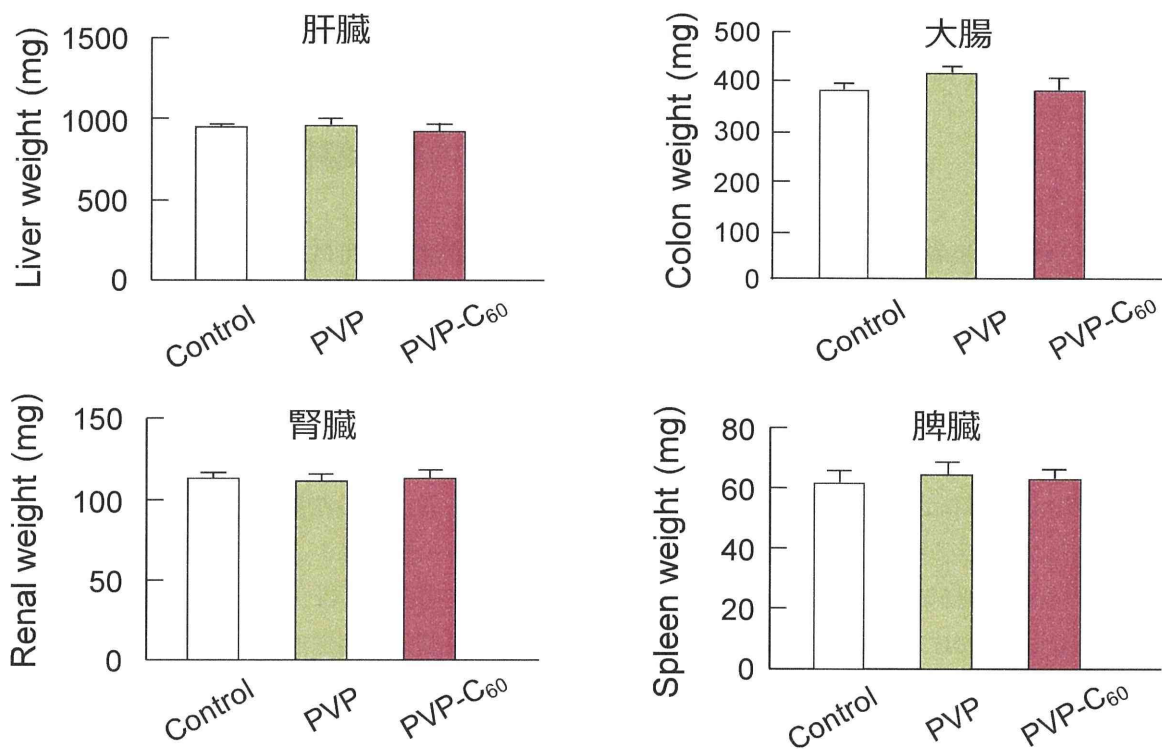


図 8. 臓器重量測定. C57BL/6 マウスに超純水で溶解した PVP-C<sub>60</sub> フラーレン溶液及び PVP 溶液を 7 日間連続で投与し、投与終了後に臓器重量を測定した。

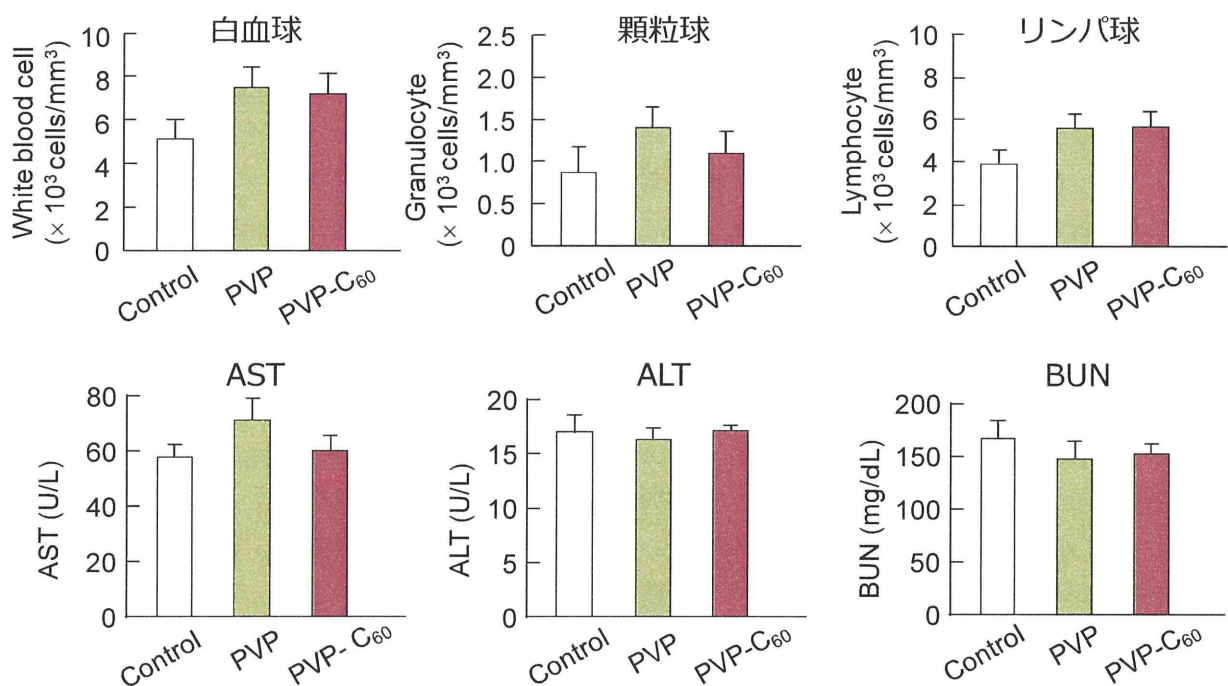


図 9. 生化学的検査. C57BL/6 マウスに超純水で溶解した PVP-C<sub>60</sub> フラーレン溶液及び PVP 溶液を 7 日間連続で投与し、投与終了後に血球数測定、生化学的検査を実施した。

## ナノマテリアルの体内・細胞内動態解析

研究分担者 吉川 友章 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野 助教

### 研究要旨

本研究では、ナノマテリアルによる『siRNA・アンチセンスなど核酸医薬の肝臓送達システムの新規開発』を図り、HCVに対する次世代治療戦略の開発を試みている。平成22年度は、各種非晶質シリカを用いて、核酸医薬送達能を *in vitro* において比較検討した。その結果、いずれの非晶質シリカにおいても、遺伝子導入効率が低い可能性が示された。即ち、異なるナノマテリアルを用いて、検討を進める必要性が示された。本観点では、本研究班の研究代表者らは、コロイド状量子ドット（QD：Quantum Dot）の安全性評価を進めるとともに、QDが核酸医薬送達キャリアーとなり得る可能性を見出している。そこで我々は、近年、核酸医薬送達活性が報告されているフラーレンに注目した。一方で、フラーレンは、安全性に関する報告が乏しいことから、本研究ではまず、その安全性評価を一般毒性学的観点から解析した。水溶化フラーレンをマウスに投与した後、体重推移、組織傷害などを評価したところ、1週間の投与において、毒性は認められなかった。今後、フラーレンの肝臓送達システムとしての有効性を評価していく予定である。

### A. 研究目的

現在世界には2億人、本邦には200万人のC型肝炎ウイルス（HCV）感染者がおり、世界では毎年300～400万人ずつ感染者が増加している。周知のように、C型肝炎治療の基本戦略かつ最も重要なことは肝細胞中のC型肝炎ウイルス（HCV）を排除することである。現在のところ、インターフェロン（IFN）療法が最も有効な治療法であり、C型肝炎の奏効率は50%にまで向上している。しかし、副作用によりIFN療法の中絶を余儀なくされる患者が多数いること、依然として高ウイルス量の患者にはIFN療法の効果が乏しいこと、IFN耐性ウイルスが出現することが課題となっている。本観点から、siRNAやアンチセンスなどの核酸医薬を用いた抗ウイルス療法の開発に期待が寄せられている。しかし、これら核酸医薬は静脈内投与後、血中で分解されかつ肝指向性にも極めて乏しいことから十分な治療効果を発揮できないという致命的欠点を有している。さらに、肝臓

に移行したとしても、治療効果を発揮するためには、肝実質細胞の細胞内に移行せねばならないが、①その多くはクッパー細胞に貪食されること、②細胞外から細胞質内に移行するのは極僅か、という現実から、より良いターゲティングキャリアーの創製が期待されている。上記観点から、本研究では、ナノマテリアルによる『siRNA・アンチセンスなど核酸医薬の肝臓送達システムの新規開発』を図り、HCVに対する次世代治療戦略の開発を試みている。特に、これまで無視されがちであった、安全性評価にも主眼を置き、有効かつ安全なキャリアー開発を試みている。昨年度は、各種非晶質ナノシリカを用いて、核酸医薬送達能を *in vitro* において比較検討した。その結果、いずれの非晶質シリカにおいても、遺伝子導入効率が低い可能性が示された。即ち、非晶質ナノシリカ以外のナノマテリアルを用いて、検討を進める必要性が示された。本観点では、本研究班の研究代表者らは、コロイド状量子ドット（QD：Quantum Dot）

の安全性評価を進めるとともに、QD が核酸医薬送達キャリアーとなり得る可能性を見出している。そこで我々は、近年、核酸医薬送達活性が報告されているフラーレンに注目した。ナノマテリアルの一つであるフラーレンは、炭素のみから構成される球状の物質であり、グラファイト、ダイヤモンドに次ぐ第三の炭素同素体の総称である。フラーレンの中でも炭素原子 60 個が切頂二十面体構造に結合した C<sub>60</sub> フラーレン（直径 1 nm 程度）は、ラジカルスポンジとよばれるほどの強い抗酸化活性に起因する抗炎症作用のみならず、抗ウイルス作用や抗がん作用をも有することから、エイズ・肝炎・がんや自己免疫疾患に対する新たなナノ医薬として期待されている。さらに、C<sub>60</sub> フラーレン表面に核酸医薬を吸着させることで、優れた核酸医薬送達キャリアーになり得る可能性が報告されている。しかし、C<sub>60</sub> フラーレンは水溶性が非常に低く、生体内で十分な生理・薬理活性を示さないことが、臨床応用に向けた障壁の一つとなっている。したがって、C<sub>60</sub> フラーレンをナノ医薬品素材として使用するためには、水溶性の向上が必要不可欠とされる。本観点で、我々の共同研究者は、ポリビニルピロリドン（PVP）といった水溶性のホスト分子を用い、その疎水性相互作用を利用して C<sub>60</sub> フラーレンを分子内部に包接させて水溶化し得ることを明らかとしており、核酸医薬送達キャリアーへの応用にも期待が寄せられている。一方で近年、ナノマテリアル特有の物性に起因する革新的機能が、二面性を呈してしまい、予期しにくい、あるいは未知の毒性を発現してしまうことが世界的に危惧されている。C<sub>60</sub> フラーレンについても、安全性に関する報告が乏しいことから、本研究ではまず、その安全性評価を一般毒性学的観点から解析した。

## B. 研究方法

### PVP-C<sub>60</sub> フラーレン

本検討では、ポリビニルピロリドン（PVP）で包接することで水溶化した PVP-C<sub>60</sub> フラーレンと、

包接用 PVP K-30 (Ashland, Inc.; ASH, USA)を用いた。

### 粒径分布およびゼータ電位の測定

超純水で 0.25 mg/ml に調整した PVP-C<sub>60</sub> フラーレン粒子を Size & Zeta キャピラリーセル（Malvern Instruments, UK）に 1 ml 注入し、Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments) を用いて粒径分布ならびにゼータ電位を測定した。

### 実験動物

C57BL/6 マウス（雌性、8-9 週齢）は日本 SLC（Shizuoka, Japan）から購入した。

### PVP-C<sub>60</sub> フラーレンの経口投与

C57BL/6 マウスに超純水で溶解した PVP-C<sub>60</sub> フラーレン溶液及び PVP 溶液をそれぞれ 400 µl ずつ 7 日間連続ゾンデ強制経口投与した。投与期間中、毎日体重を測定した。

### 血液回収

最終投与から 24 時間後、マウスに 64.8 mg/ml のペントバルビタール（ソムノペンチル；Schering-plough Animal Health, Netherlands）を 50 µl 腹腔内投与することにより麻酔をした後、心臓より採血を行った。採血は、5 IU/mL のヘパリン溶液であらかじめ湿らせたシリンジおよび注射針を用いて行った。この溶液を全血として血球検査に用い、残りを 1750 g、15 分間、遠心分離して血漿を回収した。

### 血液生化学試験

血漿中のアラニントランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、血中尿素窒素（BUN）を比色法にて測定した。測定には、生化学分析装置 FUJI DRI-CHEM 7000（FUJIFILM; Tokyo, Japan）を用いた。

## 血球検査

PVP-C<sub>60</sub> フラーレンを投与したマウスから採取した全血を多項目自動血球計測装置 VetScan HM2 (Abaxis, Union City, CA) を用いて、赤血球数、総白血球数、リンパ球数、顆粒球数、単球数、血小板数を電気抵抗法により測定した。

## C. 研究結果および D. 考察

本研究を実施するにあたり、始めに実験に供する PVP-C<sub>60</sub> フラーレンの物性に関する基礎的情報を収集した。まず、動的光散乱法により粒径分布を評価した。その結果、135 nm に単一の 2 次粒子径のピークが検出され、溶媒中での PVP-C<sub>60</sub> フラーレンの粒子径は、100 nm 程度であることが明らかとなった (図 1)。

次に、PVP-C<sub>60</sub> フラーレンを短期投与した際の一般毒性を評価するため、C57BL/6 マウスに PVP-C<sub>60</sub> フラーレン溶液及び PVP 溶液を投与し、マウスの体重を経日的に測定した (図 2)。その結果、PVP-C<sub>60</sub> フラーレン投与群は、コントロール群と同様の体重変動を示し、体重変化に影響は認められなかった。次に、マウスから回収した主要臓器の重量を測定した (図 3)。肝臓、大腸、腎臓、脾臓の重量を比較したところ、PVP-C<sub>60</sub> フラーレン投与群はコントロール群と比較し、大きな影響は認められなかった。また、解剖時の所見からも各臓器に大きな異常は見られなかった。次に、回収した血液中の血球成分を計測するとともに、血漿を回収し、肝障害マーカーである AST、ALT や腎障害マーカーである BUN 値を測定した (図 4)。その結果、白血球、顆粒球、リンパ球、単球、赤血球や血小板などの各種血球細胞数にも異常は認められなかった。また、組織障害マーカーも同様に異常は認められなかった。

## E. 結論

本検討では、PVP-C<sub>60</sub> フラーレンが水に懸濁可能な最高濃度で懸濁して投与し、PVP-C<sub>60</sub> フラーレンの安全性を検討した。その結果、PVP-C<sub>60</sub> フラーレンの投与により、マウスの体重、臓器重量、

血漿中組織障害マーカー、血球数に影響は認められなかった。したがって、短期間での検討ではあるものの、PVP-C<sub>60</sub> フラーレンは、安全性が高いことが示された。今後は、静脈内投与後の体内動態や、核酸医薬送達キャリアーとしての有効性等を詳細に検討していく予定である。

## F. 健康危険情報

該当事項無し

## G. 研究発表

### ①論文発表

該当事項無し

### ②学会発表

国外

1. Yoshikawa T, Nabeshi H, Yoshida T, Hirai T, Tochigi S, Akase T, Uji M, Ichihashi K, Imazawa T, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Itoh N, Yoshioka Y, Tsunoda S, Tsutsumi Y. Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocyte. SETAC Europe 21st Annual Meeting, Milan (Italy), 15-19 May, 2011.

国内

1. 潘 慧燕, 吉岡靖雄, 山下浩平, 東阪和馬, 青島央江, 北口順治, 鍋師裕美, 吉川友章, 伊藤徳夫, 堤 康央: 有効かつ安全な経口ナノ医薬の開発に向けた C<sub>60</sub> フラーレンの安全性評価. 第 27 回日本 DDS 学会学術集会. 東京(東京), 2011 年 6 月.
2. 吉岡靖雄, 山下浩平, 東阪和馬, 森下裕貴, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 柳原 格, 齋藤 滋, 伊藤徳夫, 吉川友章, 堤 康央: 安全なナノマテリアルの創製に向けた次世代影響評価: 妊娠後期曝露の胎仔影響に焦点を絞って. 第 18 回日本免疫毒性学会学術大会. 千葉(千葉), 2011 年 9 月.