

201227016B

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 22～24 年度 総合研究報告書

研究代表者 吉岡 靖雄

平成 25 (2013) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
III. 研究成果の刊行物・別刷	35

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 大阪大学大学院薬学研究科 准教授

研究要旨

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“致命的な病”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、siRNA やプラスミドを用いた核酸医薬が、上記問題点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 やプラスミドなどの核酸医薬の肝臓送達システムの新規開発』を図り、HCV に対する核酸医薬の開発に資する基盤情報の収集を試みた。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共に、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。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などを実施した。平成 24 年度には、これまでの知見をもとに、in vivo において、肝臓への遺伝子導入効率の評価を実施した。以上の結果を総合的に判断すると、詳細なメカニズム解明が必要ではあるものの、非晶質ナノシリカは in vivo において、肝臓での高い遺伝子発現を可能とする優れた遺伝子導入キャリアーであることが判明した。今後、本研究成果を発展させることで、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

形山 和史・大阪大学大学院薬学研究科・分子

平成 22 年度

生物学分野・助教

吉川 友章・大阪大学大学院薬学研究科・毒性

学分野・助教

平成 23 年度

吉川 友章・大阪大学大学院薬学研究科・毒理学分野・助教

平成 24 年度

無し

形山和史、吉川友章は、平成 22 年・23 年に分担研究者であったものの、それぞれ、他の研究機関への転出により、研究実施が困難となったため、研究分担者ではなくなった。

A. 研究目的

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、上記問題点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 に対する核酸医薬の開発に資する基盤情報の収集を試みた。

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

HR-1 マウス (6 週齢、雄性) を日本 SLC より購入した。各種 Q ドット (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。

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。

血液の血液学的評価

BALB/c マウス (6 週齢、雄性) を日本 SLC より購入した。励起波長 565 nm、蛍光波長 405–665 nm の PEG 修飾 Q ドットを PBS で 90 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、ネンブター麻酔下で心臓より採血した。採血は、抗凝固剤として 3.8%のクエン酸ナトリウム溶液を用いた。3.8%クエン酸ナトリウムと血液の比が 1 : 9 (v/v) となるように、3.8%クエン酸ナトリウムを混合した血液の一部を血球検査に用いた。また、11,500 g で 15 分間遠心分離して血漿を回収し、生化学検査に供した。マウスの血球検査は、電気抵抗法を用いて実施した。採取した血液（全血）を多項目自動血球計測装置 VetScan HM2 を用いて血小板数を測定した。

血液生化学試験

血漿中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アルブミン (ALB)、総ビリルビン (TBIL)、血中尿素窒素 (BUN) を比色法にて測定した。AST 活性は、基質である L-アスパラギン酸と α -ケトグルタル酸のアミノ転位反応によって生じたピルビン酸が、ピルビン酸オキシダーゼと反応することで生じる過酸化水素とジアリールイミダゾールロイコ色素の反応によって生成した青色色素を測定した。ALB は、ブロムクレゾールグリーンとの反応により生じた青色色素を測定した。TBIL は、2,4-ジクロロベンゼンジアゾニウム塩によってジアゾ化反応を受けて生成したジアゾ色素を測定した。BUN は、ウレアーゼの作用によって生成したアンモニアとブロムクレゾールグリーンとの反応によって生じた緑色色素を測定した。測定には、生化学分析装置 FUJI DRICHEM 7000 を用いた。

蛍光顕微鏡による in vitro 動態解析

Q ドット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 2×10^4 cells/200 μ L/well で HepG2 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%、CO₂ 存在下で 1 時間、または 24 時間培養を行った後、10% FBS-DMEM で希釈した各種 Q ドット (QD1、QD2、QD3、QD4) を 100 μ L 加えた。24 時間後、PBS で 2 回洗浄し、核染色ならびに

Q ドット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を作製し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

in vitro 細胞傷害性評価

96 穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 μ L/well で HepG2 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%、CO₂ 存在下で 24 時間培養を行った後、10% FBS-DMEM で希釈した各種 Q ドット (QD1、QD2、QD3、QD4) を 100 μ L 加えた。24 時間後、25% グルタルアルデヒド 20 μ L にて 15 分間細胞を固定し、水で 3 回洗浄後、0.05%メチレンブルー溶液 100 μ L で 15 分間細胞を染色した。染色した細胞を洗浄した後、0.33 N HCl 200 μ L により色素を溶解した。続いて吸光度 (655-415 nm) を測定し、メディウムコントロールを 100%として細胞生存率を算出した。

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 1×10^5 cells/200 μ L/well で細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%、CO₂ 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 μ 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 μ 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 μ 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を作製し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

遺伝子導入効率

Micromod 社から購入した、粒子径がそれぞれ、1000、300、70、30 nm の非晶質ナノシリカ (mSP1000、nSP300、nSP70、nSP30) と、nSP70 と nSP30 をカルボキシル基もしくはアミノ基で修飾した非晶質ナノシリカ (nSP70-C、nSP70-N、nSP30-C、nSP30-N) を用いた。また、Sigma-Aldrich Japan 社から購入した、粒子径 0.5-10 μ m のシリカ (sigma-mSP)、粒子径 10-20 nm のシリカ (sigma-nSP)、粒子径 5-15 nm の多孔質シリカ (sigma-mesoSP) を用いた。終濃度 16.7nM の siRNA (invitrogen, Stealth RNAi Reporter Control Duplexes Luciferase Reporter Control) と、Sigma-Aldrich Japan 社のシリカ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、48 時間後のルシフェラーゼ活性と細胞傷害性を検討することにより、シリカ粒子の siRNA キャリアーとしての有用性を評価した。また、ルシフェラーゼ遺伝子を導入するプラスミド (promega, E174A pGL3-Control vector) 0.1 μ g と、micromod 社の各シリカ粒子との混合液を HepG2 細胞に作用させ、24 時間後のルシフェラーゼ活性と細胞傷害性を検討することにより、シリカ粒子のプラスミドキャリアーとしての有用性を評価した。

in vitro における遺伝子導入効率の検討 (プラスミドを用いた検討)

HepG2 細胞を 1.5×10^4 cells/well となるように、96 穴プレートに播種し、24 時間培養した。24 時

間後、PBS で洗浄後、DMEM、1%抗生物質 (FCS フリー) のアッセイ用培地 80 μ L/well に入れ替えた。遺伝子導入には、プラスミド導入試薬 FuGENE (FuGENE HD Transfection Reagent : Roche)、ルシフェラーゼ発現プラスミド (pGL3-Control Vector) を用いた。プラスミドを終濃度 100 ng/well、及び nSP70、nSP70-C、nSP70-N を終濃度 100 μ g/mL になるよう opti-MEM にそれぞれ混和し、15 分間室温にて、インキュベートした。15 分のインキュベート後に、FuGENE を終濃度 250、50、10、0 nL/well となるように添加して、さらに 15 分間インキュベートした。インキュベート後に、20 μ L ずつ、各 well に添加した。添加 24 時間後に、ルシフェラーゼ発現効率からプラスミド導入効率を評価した。各 well に 100 μ L のルシフェラーゼ測定試薬 (One-Glo Luciferase Assay System : Promega) を加え、3 分間静置した後、1 秒の露光で発光量を測定して、ルシフェラーゼ発現強度を比較した。細胞傷害性は WST-8 アッセイにより評価した。

in vitro における遺伝子導入効率の検討 (siRNA を用いた検討)

ルシフェラーゼを発現する肝細胞株を 1.5×10^4 cells/well となるように、96 穴プレートに播種し、24 時間インキュベートした。PBS で洗浄後に、DMEM、1%抗生物質、1%G418 (FCS-) のアッセイ用培地 80 μ L/well に入れ替えた。siRNA の導入には、siRNA 導入試薬 (Lipofectamine RNASiMAX ; invitrogen)、ルシフェラーゼ control siRNA (Stealth RNAi Receptor control Duplex Luciferase control : invitrogen) を用いた。siRNA を終濃度 1.67 nM、及び nSP70、nSP70-C、nSP70-N を終濃度 20 μ g/mL になるよう opti-MEM にそれぞれ混和し、15 分間室温にて、インキュベートした。15 分のインキュベート後に Lipofectamine を終濃度 100、50、25、0 nL/well となるように添加して、さらに 15 分間インキュベートした。インキュベート後に、20 μ L ずつ、各 well に添加した。添加 24 時間後に、ルシフェ

ラーゼ発現効率から siRNA 導入効率を評価した。各 well に 100 μ L のルシフェラーゼ測定試薬 (One-Glo Luciferase Assay System: Promega) を加え、3 分間静置した後、1 秒の露光で発光量を測定して、ルシフェラーゼ発現強度を比較した。ルシフェラーゼアッセイの Non specific-siRNA とルシフェラーゼ-siRNA のノックダウン効率を比較し、siRNA の導入効率を比較した。細胞傷害性は WST-8 アッセイにより評価した。

in vivoにおける遺伝子導入効率の検討

プラスミド溶液を 100、20 μ g/mL となるように希釈し、各シリカ溶液 (nSP70、nSP70-C、nSP70-N) を 10、2 μ g/mL に希釈した。上記の溶液を混和して、プラスミド-ナノシリカの混合溶液 (プラスミド:ナノシリカ=50:5、10:1 μ g/mL の溶液) を作成して、30 分間インキュベートした。本溶液 0.2、1mL を、マウスの尾静脈から 5 秒以内に投与した (ハイドロインジェクション)。添加 8 時間後にマウスを解剖し、肝臓中のルシフェラーゼ活性を測定した。

プラスミド構築

様々な細胞で外来遺伝子を安定的に発現可能なヒト EF-1 α プロモーターを有するレンチウイルスベクタープラスミドを選択した。使用する各遺伝子が含まれるプラスミドを鋳型に目的の配列を PCR で増幅した後、レンチウイルスベクタープラスミドの適切な位置にクローニングし、そのシーケンスを確認した。IRES (internal ribosome entry site) を用いて 1 つのベクターから 2 つのタンパクを産生させるレンチウイルスベクター (Luc-IRES-Venus) は、CSII-EF-MCS-IRES-Venus のマルチクローニングサイトに Firefly luciferase 遺伝子を挿入することで作製した。自己開裂ペプチド (T2A ペプチド配列) を用いて 1 つのベクターから 2 つのタンパクを同時に発現するタイプのレンチウイルスベクター (Venus-T2A-Luc) は、2A ペプチドをコードする配列を含む合成オリゴプライマーを使用

した Overlapping PCR 法により作製した。なお、レンチウイルスベクターは三好浩之先生 (理研バイオリソースセンター) よりご供与頂いた。

レンチウイルスベクターの作製

293T 細胞を poly-L-lysine でコートした 100 mm dish へ 5×10^6 cells ずつ播種した。一晚培養後、各遺伝子を搭載したレンチウイルスベクタープラスミドを HIVgp 発現プラスミド、VSV-G/Rev 発現プラスミドと共に Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションした。翌日、Forskolin を含む培地に交換し、トランスフェクションから 2~3 日培養後上清を回収し、0.45 μ m のフィルターで濾過してレンチウイルス溶液とした。レンチウイルス溶液は、-80 $^{\circ}$ C で保存した。本研究で用いたレンチウイルスベクターは緑色蛍光タンパク Venus を発現するため、その発現を指標に感染力価 (TU/ml) を算出した。

細胞の培養

HeLa 細胞と 293T 細胞は 10% FCS と L-glutamine を添加した High Glucose DMEM 培地を用いて 37 $^{\circ}$ C、飽和蒸気圧、5%CO₂ 存在下で培養した。

導入遺伝子発現量の評価

ウイルスベクターを作用させた細胞を 2 分割し、片方を Venus 遺伝子の発現測定に、もう片方を Firefly luciferase 遺伝子の発現測定に供した。Venus 遺伝子の測定: ウイルスベクター作用 48 時間後、細胞を回収し、フローサイトメーター (LSR II) を用いて蛍光を測定した。Firefly Luciferase 遺伝子の測定: ウイルスベクター作用 48 時間後、Pica Gene LT 2.0 を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

リコンビナント TCR の構築

T 細胞受容体の α 鎖、 β 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 β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; Sigma-Aldrich) を加え、更に 6 時間培養することで、 α 鎖と β 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

本研究は動物実験を避け得なかったが、動物愛護の精神を遵守しつつ実施した。また実験動物の取り扱い、および動物実験の手順等を含めた動物実験に関しては、「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」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（文科省の指針）」に準拠し、大阪大学および大阪大学薬学研究科、(独) 医薬基盤研究所等の各所属機関の動物実験規程に則り実施した。さらに本研究における実験動物の取り扱いおよび動物実験の手順は、所属機関の動物実験委員会等による倫理審査の承認を受けた。さらに本研究では、ナノマテリアルを活用したが、その安全性は未知であることを鑑み、平成 20 年 2 月、厚生労働省労働基準局より通達された「ナノマテリアル製造・取扱い作業現場における当面のばく露防止のための予防的対応について」（基発第 0207004 号）【その後、2009 年 3 月に厚生労働省労働基準局からの改訂版「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」（基発第 0331013 号）が通達】、2009 年 3 月に環境省から公表された工業用ナノ材料に関する環境影響防止ガイドラインに則って、研究を推進した。

C. 研究結果および D. 考察

各種 Q ドットの肝移行能評価および安全性評価

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、*in vitro* の細胞内移行能とマウスでの体内動態を評価した。

まず始めに、ゼータサイザーを用いて、各種 Q ドットの粒子径と表面電荷を解析した (図 1)。その結果、いずれの Q ドットも数十 nm の粒子径を示し、カタログ値と同等であったことから、分散性に優れていることが示された。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が示された。

各種 Q ドットを HR-1 マウスに投与し、*in vivo imaging* により体内動態を観察した (図 2)。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、QD3、QD4 投与群では、脾臓でも強い蛍光が観察された。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。

BALB/c マウスに PEG 修飾 Q ドットを投与し、24 時間後に血液組織障害マーカー (AST、ALB、TBIL、BUN) を測定した (図 3)。その結果、マウスの各マーカーの値はコントロールと比較して、有意な差は認められなかった。また、電気抵

抗法を用いて血液中の血小板数を測定したが、コントロールと比較して、有意な差は認められなかった。今後は、他の Q ドットにおいても検討を進める予定である。

各種 QD の安全性評価

上記で、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にしている。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。一方で、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、妊娠マウスにおける安全性評価の一環として、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 4)。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、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にしている。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。

各種 Q ドットの細胞内移行能評価

共焦点蛍光顕微鏡を用いて各種 Q ドットの細胞内への取り込みを評価した (図 5)。その結果、1 時間培養した群では、QD2 のみ細胞内に移行しているのが観察された。一方で 24 時間培養した

群では、細胞内に QD2 による強い蛍光が観察されるとともに、QD3 が取り込まれているのが確認された。QD1、QD4 は、細胞内に取り込まれなかった。これは PEG 修飾により生体反応性が低下し、QD1、QD4 は細胞に取り込まれにくくなったが、細胞内移行ペプチドを付与することで QD2 は早急に細胞内に取り込まれたと考えられる。

各種 Q ドットの細胞生存率を評価した (図 6)。その結果、どの群においても生存率はほとんど変化なかったことから、本実験における条件下において Q ドットは細胞毒性をほとんど示さないと考えられる。

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 7)。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にしている。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にしていることから、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。

非晶質ナノシリカの蛍光顕微鏡による 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。そこで本研究では、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。

核酸医薬送達キャリアーとしての機能性評価

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、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。sigma-mSP、sigma-nSP、sigma-mesoSP 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、いずれの粒子を用いた場合においても、1000 µg/mL 添加群で顕著なルシフェラーゼ活性の低下が認められた (図 9A)。また、メチレンブルーアッセイで細胞生存率を評価したところ、いずれの粒子添加群においても、ほとんど細胞傷害性は認められなかった (図 9B)。以上の結果から、いずれの粒子径の非晶質シリカにおいても、高濃度ではあるものの、siRNA の導入キャリアーになり得る可能性が示唆された。しかし、目視により

細胞傷害を観察したところ、接着細胞の著しい減少など、細胞傷害性が認められている。従って、細胞傷害性に起因したルシフェラーゼ活性の低下の可能性も考えられ、今後、より詳細な検討が必要と考えられた。

次に、ルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドを用いて、プラスミド導入効率を評価した。粒子径・表面修飾の異なる 8 種類 (mSP1000、nSP300、nSP70、nSP30、nSP70-C、nSP70-N、nSP30-C、nSP30-N) の非晶質シリカを、プラスミドと混合した後、肝細胞株 HepG2 細胞に作用させ、ルシフェラーゼ活性を指標に遺伝子導入効率を検討した。その結果、いずれの粒子添加群においても、遺伝子発現の上昇は認められなかった (図 10)。また、細胞傷害性は一切認められないことを確認している。以上の結果より、現在の条件では、非晶質シリカは siRNA やプラスミドなどの導入キャリアーとしての可能性は低いと考えられた。

本検討では、製剤的有用性を最重要視して、単に混合するだけの最もシンプルな実験条件を適用した。しかし、この条件では、非晶質シリカの核酸送達キャリアーとしての有用性を見出すことは出来なかった。従って、今後は、ナノマテリアルと核酸の混合比や、複合体形成を促進するための陽電荷ポリマーの添加などを考慮して、より最適な遺伝子導入技術の確立を試みる。また、非晶質ナノシリカに留まらず、Q ドット等を含めて多種のナノマテリアルの適用を試みる予定である。

in vitro における遺伝子導入効率の検討 (プラスミドを用いた検討)

我々はこれまでに、ナノシリカとプラスミドを混合し、複合体を作成した後、in vitro で細胞に添加しても、ほとんど遺伝子導入効率の上昇が観察されないことを確認している。これは、ナノシリカ・プラスミド複合体の細胞内取り込みが乏しいためではないかと考えられる。そこで、市販の遺伝子導入試薬を用いて、ナノシリカ・プラスミド

複合体を強制的に細胞内に導入した場合、遺伝子発現効率の増加が観察されるかを検討した (図 11)。本検討は、粒子径 70nm の非晶質ナノシリカ (nSP70) と、nSP70 の表面がカルボキシル基、アミノ基で修飾された nSP70-C、nSP70-N を用いた。また、プラスミドには、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼをコードするものを使用した。ナノシリカ・プラスミド複合体を作成した後、濃度を変化させた遺伝子導入試薬 (FuGENE) と混和し、細胞に添加した。その結果、これまでの検討結果と一致して、FuGENE 0 ng/mL 添加 (コントロールはプラスミド単独であり、ナノシリカ群はナノシリカ・プラスミド複合体) では、ナノシリカによる遺伝子発現の増加は観察されなかった。一方で、FuGENE 10、50 ng/mL 添加群 (とくに 50 ng/mL 添加群) では、コントロール群 (プラスミドと FuGENE の混合) では、遺伝子発現が全く認められなかったものの、nSP70、nSP70-N 添加群では、コントロール群と比べて、微弱ながら遺伝子発現の増加傾向が認められる。なお、この際に、細胞傷害性は認められなかった。しかし、FuGENE 250 ng/mL 添加において、コントロール群において非常に高い遺伝子発現が認められたものの、ナノシリカ添加群では全く遺伝子発現の増加が観察されなかった。以上の結果から、ナノシリカは過剰量添加により、FuGENE の効果を阻害する可能性が認められた。一方で、ナノシリカ-プラスミド-FuGENE を適正比率で混和することにより、プラスミド-FuGENE のみではプラスミド導入が困難であるに濃度においても、遺伝子導入が可能である可能性が考えられた。

in vitro における遺伝子導入効率の検討 (siRNA を用いた検討)

次に、ナノシリカの 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 12)。本検討においても、nSP70、nSP70-C、nSP70-N 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 (図 12)。まず、ナノシリカと siRNA の複合体を作成し、siRNA の導入効率を評価したところ、コントロールである市販の siRNA 導入試薬を用いた場合、顕著なルシフェラーゼ活性の低下が観察された一方で、ナノシリカによる遺伝子発現の低下は全く認められなかった。そこで本原因が、ナノシリカ・siRNA 複合体の細胞内取り込みが乏しいためではないかと考え、市販の siRNA 導入試薬を用いて、ナノシリカ・siRNA 複合体を強制的に細胞内に導入した場合、遺伝子発現効率の低下が観察されるかを検討した (図 13)。その結果、siRNA 導入試薬と siRNA を混和した場合、siRNA 導入試薬の濃度依存的にルシフェラーゼ活性の低下が観察された。一方で、ナノシリカ・siRNA 複合体と siRNA 導入試薬を共存させた場合、ナノシリカが siRNA 導入試薬の効果を減弱させる可能性が示された。以上の結果から、詳細は不明であるものの、in vitro において、ナノシリカを siRNA 導入試薬として用いることを非常に困難であると考えられた。

in vitro における遺伝子導入効率の検討 (siRNA を用いた検討)

これまでの検討から、ナノシリカは in vitro において、プラスミド、siRNA どちらを用いた場合においても、効率的な遺伝子導入キャリアーにはなり得ない可能性が示された。一方で、ウイルスベクターを用いた検討では、in vitro の遺伝子発現効率が極めて低い場合においても、in vivo で高い遺伝子発現を示す例が報告されている。例えば、遺伝子導入キャリアーとして汎用されるアデノウイルスベクターにおいて、血中安定性を向上させる目的で高分子ポリエチレングリコールで表面修飾した場合、アデノウイルスと感染受容体との結合が阻害されるため、in vitro においては顕著な遺伝子発現の低下が観察される。しかし、静脈内投与した場合、血中安定性の増加に伴う肝集積性の増大も相俟って、未修飾のアデノウイルスベクターと比較して、肝臓で有意に高い遺伝子発現を示すことが明らかとなっている。そこで、ナノ

シリカの遺伝子導入キャリアーとしての可能性を *in vivo* において評価した。本検討においても、nSP70、nSP70-C、nSP70-N を用いた。また、プラスミドには、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼをコードするものを使用した。まず、プラスミド単独をマウスに静脈内投与して、肝臓における遺伝子発現を評価した (図 14)。その結果、プラスミド単独では全く遺伝子発現の増加は観察されなかった。ナノシリカ・プラスミド複合体を静脈内投与した場合、nSP70 や nSP70-C ではほとんど遺伝子発現が認められなかった一方で、nSP70-N では、プラスミド単独群と比較して高い遺伝子発現が観察された。

現在、動物実験レベルにおいて、肝臓での高い遺伝子発現効果を期待する場合、ハイドロダイナミック法が汎用されている。通常、マウスに静脈内投与する場合、100~200 μ L の溶液を投与する。一方でハイドロダイナミック法では、1 mL 程度の過剰量のプラスミド溶液を約 5 秒以内に静脈内投与する方法であり、本方法では、肝臓で高い遺伝子発現を達成可能であることが多数報告されている。本方法は、過激かつ臨床では適用困難な方法であると考えられるが、投与ルートを改変した方法により、臨床応用も期待されている。そこで、プラスミドをハイドロダイナミック法により投与したところ、先ほどの結果と同様に通常の投与方法では全く遺伝子発現の上昇が観察されない一方で、ハイドロダイナミック法により肝臓で高い遺伝子発現が観察された (図 15)。次に、ナノシリカ・プラスミド複合体をハイドロダイナミック法により投与した。その結果、nSP70-C 群では、プラスミド単独群とほぼ同等の遺伝子発現であった一方で、nSP70 および nSO70-N 投与群では、プラスミド単独群の約 7 倍の遺伝子発現の増大が観察された。また、肝臓傷害の指標である ALT を評価したところ、ハイドロダイナミック法により ALT の上昇が認められたが、nSP70-N 群では大差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、ナノシリカは *in vivo* において、肝臓を標的とした遺伝子導

入キャリアーになり得る可能性が示された。

レンチウイルスベクターの構築

遺伝子の量的変化を簡便かつ鋭敏に評価できる *Firefly luciferase* と、可視化することが簡便な緑色蛍光タンパク *Venus* をモデル標的遺伝子とすることで、siRNA の細胞内送達能とその効果発現のスクリーニングに適した評価細胞を作製した。2 つの遺伝子を同時に発現させる際には IRES 配列が利用される場合が多い。しかしながら IRES 配列の前後に挿入する遺伝子の種類や組み合わせなどにより、それぞれの発現量が大きく変動してしまい、理想とする遺伝子発現が観察できない場合もある。従って本研究では、IRES 配列を利用する場合 (Luc-IRES-Venus) に加え、自己開裂ペプチドを用いて 1 つのプロモーターで 2 つのタンパクを同時に発現するタイプ (Venus-T2A-Luc) のレンチウイルスベクターを作製した。

様々な細胞種で安定的な遺伝子発現を達成する為にヒト EF-1 α プロモーターを選択し、その下流に自己開裂ペプチドをコードする遺伝子配列 (T2A) あるいは IRES 配列で連結したモデル標的遺伝子を挿入したレンチウイルスベクタープラスミドを構築した (図 16A)。これらを HIVgp 発現プラスミド、VSV-G/Rev 発現プラスミドと共に 293T 細胞に共導入し、目的とするレンチウイルスベクターを作製した。

自己開裂ペプチドで連結した場合 (Venus-T2A-Luc) には、レンチウイルスベクターの感染量、Venus 発現および luciferase 発現量に正の相関が観察された (図 16B, C)。一方、IRES 配列を用いたベクター感染細胞でも両遺伝子の発現が確認できたが、その発現量に相関が認められなかった。また、Venus-T2A-Luc を感染させたヒト肝癌由来細胞株 SK HEP-1 でも同様に、

Venus と luciferase を安定的に発現させることに成功した (data not shown)。

本研究では、Venus 及び Firefly luciferase 遺伝子を同時に発現するレンチウイルスベクターを構築した。また、IRES 配列を用いる場合に比べ、2A ペプチドを利用する方が本研究に適した遺伝子発現パターンを示す事を確認した。本ベクターは種々の細胞に効率良く感染することが可能である。また、ゲノムにインテグレーションされるタイプのベクターである為、安定発現細胞株の作製に適している。モデル標的遺伝子として選択した Venus は緑色蛍光の強度から発現量評価に利用することも可能であるが、遺伝子導入された細胞をセルソーターで単離する場合のマーカースとして有用であり、目的とする細胞株を容易に作製することが可能となる。

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、 α 鎖と β 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 17)。また、ヘテロ二量体構造を維持させるために、 α 鎖定常ドメイン 48 番目のスレオニンコドンと β 鎖定常ドメイン 57 番目のセリンコドンを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 α 鎖と β 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。 α 鎖と β 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、 α 鎖と β 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 α 鎖と β 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。 α 鎖と β 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[®]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 17)。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 17)。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 17)。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。

E. 結論

本研究では、体内動態・安全性を加味しつつ、ナノマテリアルの核酸医薬導入キャリアとしての有用性を評価した。QD やナノシリカを含む種々ナノマテリアルを検討した結果、いずれも *in vitro* においては、核酸導入効率に乏しいことが判明した。一方で、*in vivo* においては、核酸導入効率を増加させ得る可能性を見出した。今後、より詳細な検討を進めることで、*in vivo* において高い遺伝子発現を可能とするナノキャリアの創成に繋がるものと期待される。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

①論文発表

1. Higashisaka K, Yoshioka Y, Yamashita K, Morishita Y, Fujimura M, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Yoshikawa T, Itoh N, Tsutsumi Y. Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials. *Biomaterials*. 2011;32(1):3-9.
2. 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, Itoh N, Yoshioka Y, Tsutsumi Y. Amorphous nanosilica induces class I-restricted processing and presentation of exogenous antigens in murine dendritic cells. The 4th World Congress on Controversies in Urology (CURy2011). Paris (France). 27-30 January, 2011.
2. Yoshioka Y, Higashisaka K, Yamashita K, Fujimura M, Morishita Y, Huiyan P, Ogura T, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Itoh N, Yoshikawa T, Tsutsumi Y. Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and safety of nanomaterials. SOT 2011. Washington DC (USA). 6-10 March, 2011.
3. 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.

4. **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. **吉川友章**, 鍋師裕美, 赤瀬貴憲, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 近藤小百合, 長野一也, 阿部康弘, **吉岡靖雄**, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けて: 非晶質ナノシリカの細胞内局在と安全性の連関に関する基礎情報の集積. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇(沖縄), 2010年6月.
2. **吉岡靖雄**, 森重智弘, **吉川友章**, 角田慎一, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作, 堤 康央: 安全なナノマテリアルの開発に向けた非晶質ナノシリカの粒子特性と起炎性の連関評価. 第17回日本免疫毒性学会, 筑波, 2010年9月.
3. 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 C₆₀ 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.
4. **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.

5. 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.
6. 高橋秀樹, **吉岡靖雄**, 平井敏郎, 市橋宏一, 吉田徳幸, 角田慎一, 鍋師裕美, **吉川友章**, 堤康央: 抗原プロセッシングに着目した非晶質ナノシリカのハザード同定., 第39回日本毒性学会学術年会., 仙台(宮城), 2012年7月.
7. 永野貴士, **吉岡靖雄**, 東阪和馬, 國枝章義, 畑勝友, 角田慎一, 鍋師裕美, **吉川友章**, 堤 康央: 安全なナノマテリアルの創製に資する microRNA の安全性評価マーカーとしての有用性評価., 第39回日本毒性学会学術年会., 仙台(宮城), 2012年7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

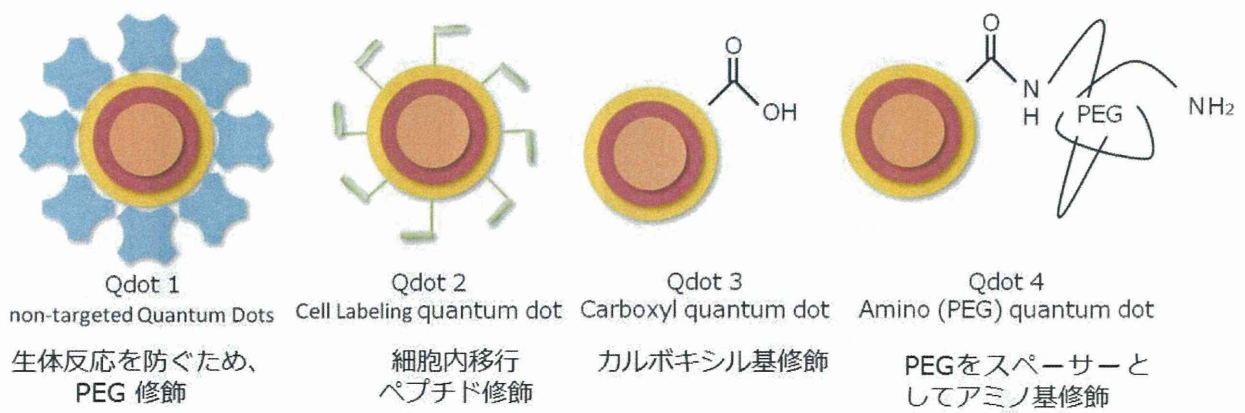
該当事項無し

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。

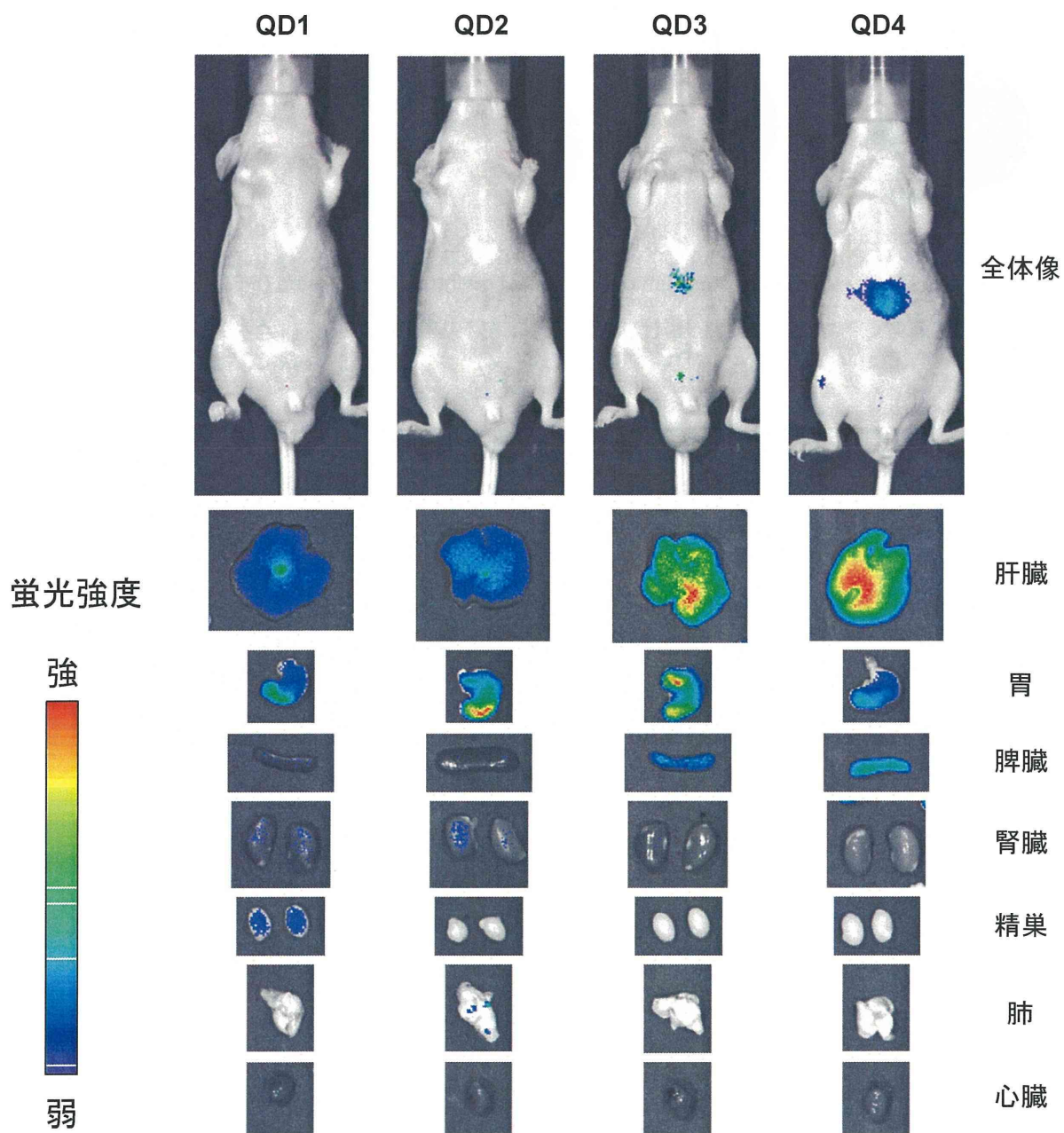


図 2. Q ドットの体内動態評価.

HR-1 マウス (6 週齢、雄性) に各種 Q ドット (QD1、QD2、QD3、QD4) を 40 pmol、マウス尾静脈より投与した。24 時間後、各臓器 (肝臓、胃、腎臓、精巣、肺、心臓) を回収し、Xenogen IVIS 200 imaging system により、Q ドットの体内動態を蛍光観察した。

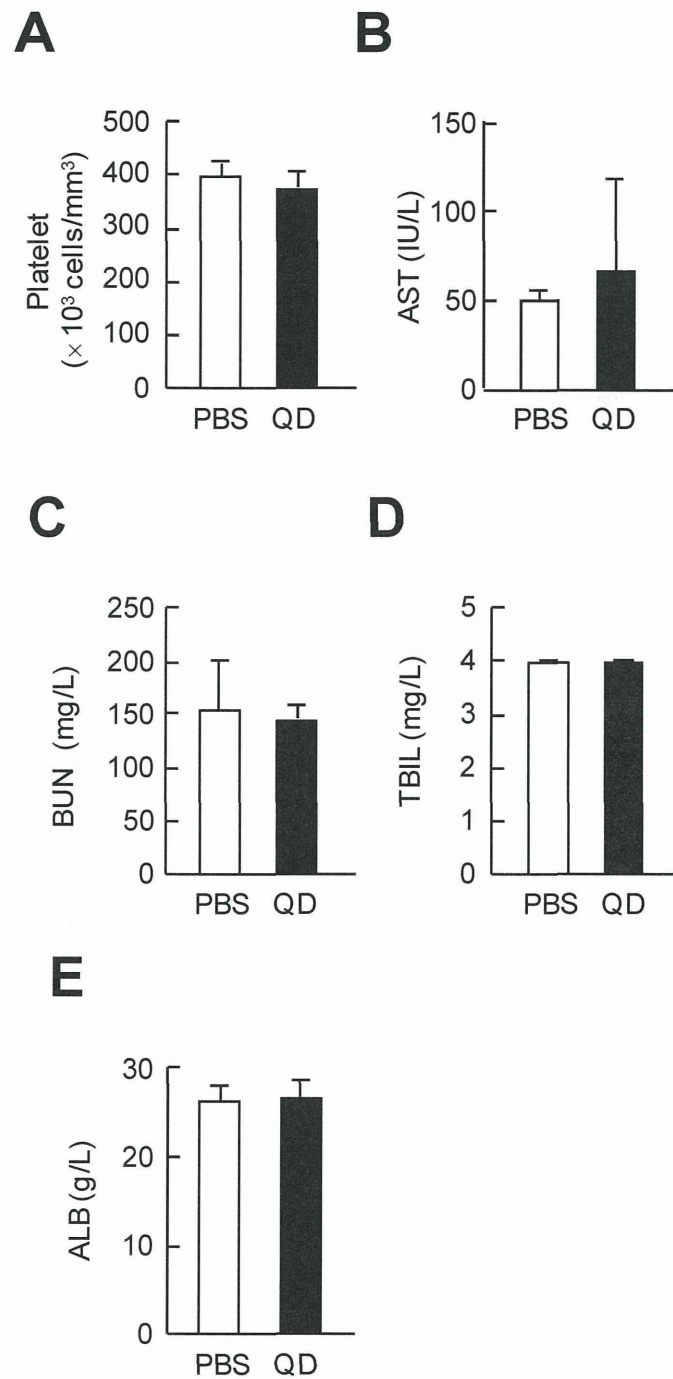


図 3. Quantum Dot 投与マウスの血液検査.

PEG 修飾 QD を BALB/c マウスの尾静脈より投与し、24 時間後に血液を回収した。回収した血液を用いて血小板数 (A) を測定し、血液生化学検査 (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) (B)、血中尿素窒素 (BUN) (C)、総ビリルビン (TBIL) (D)、アルブミン (ALB) (E)) を実施した。

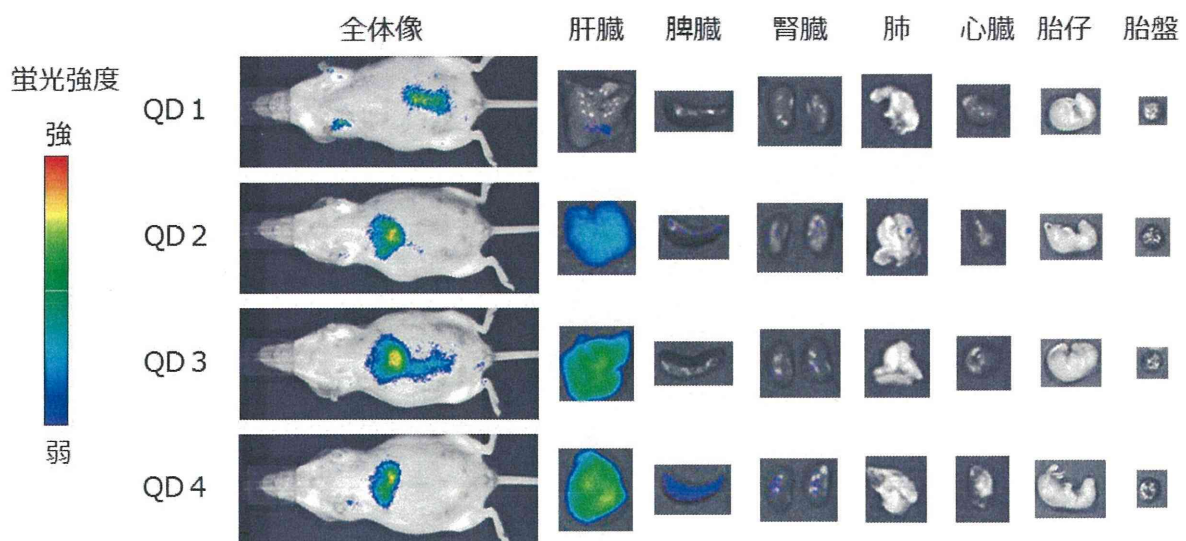


図 4. 妊娠マウスにおける体内動態評価。

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。

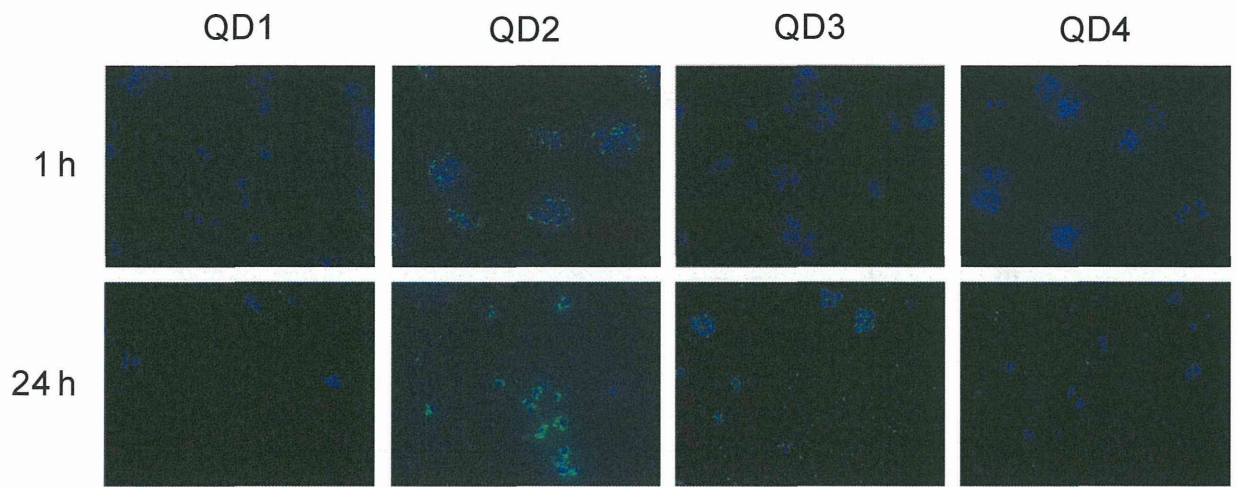


図 5. Q ドットの *in vitro* 動態解析.

HepG2 細胞を 10 nM の各種 Q ドットと共培養した。1 時間後、または 24 時間後に細胞核を DAPI 染色し、共焦点レーザー顕微鏡で、Q ドットの局在を観察した。