

科学技術振興調整費 「科学技術連携施策群の効果的・効率的な推進」
平成 17～19 年度実施「超臨界ハイブリ QD イメージングと治療法」成果の概要

研究代表者 国立感染症研究所 科学技術特別研究員 鈴木 和男

1) 研究目的

DDS 研究の課題には、局所限定の薬剤作動、リアルタイム薬剤運搬モニタリングがあるが、それを達成するためには、高輝度・高安定なナノキャリアーとナノマーカを用いる必要がある。本研究では、1) ハイブリッド量子ドット(ハイブリ QD)の創生：これまでにない、生体無害で生体環境で完全分散するハイブリ QD を、研究参加者が開発した超臨界法を用いて作成し、2) 薬剤タギング：そのハイブリ QD に組織標的分子・ペプチド・蛋白質をタギングさせ、3) 薬剤デリバリー：肺、腎など疾患臓器に特異性をもったハイブリ QD に薬剤を結合させた薬剤提示 QD を各臓器に集約させる特異的薬剤を運搬し、4) 臓器・細胞局所にて有効作動：肺・腎臓など標的臓器・細胞局所のみで有効に作動する薬剤提示 QD を臓器にいる炎症細胞の好中球マクロファージから分泌されるライソゾーム酵素により薬剤の遊離・活性化させるシステムを開発する。また、5) 薬剤の体内動態の非侵襲イメージングモニタリング：同時にイメージングによる非侵襲モニタリングを可能にし、定量的なリアルタイムイメージング評価法を確立することにより、イメージング診断及び薬効評価法の開発を目指す(図1)。

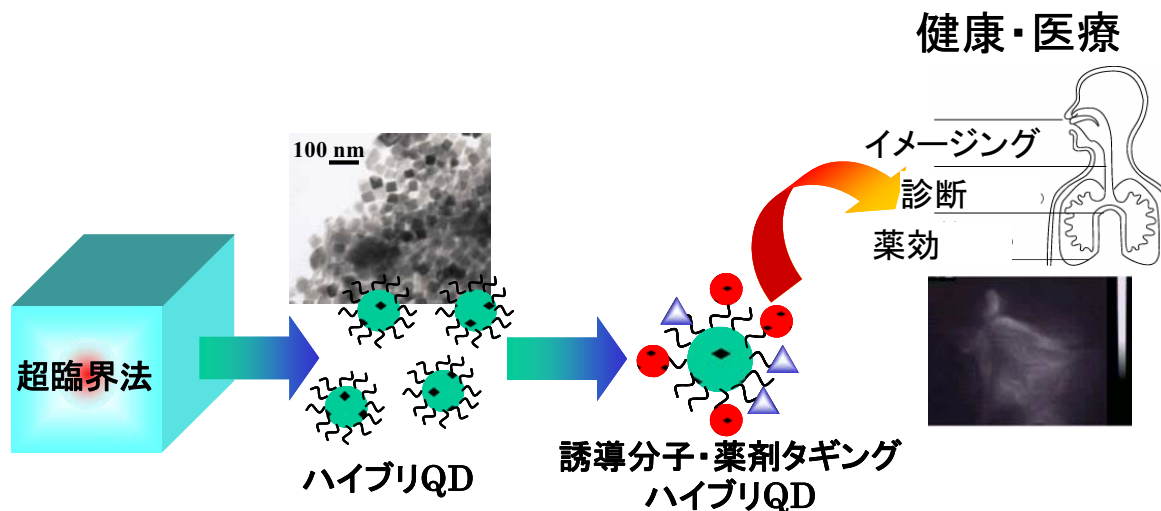


図1. プロジェクトの目的とゴール

薬剤を病巣のみに運搬することは、必要最小限の薬剤使用による効率的治療だけでなく、薬剤副作用等の身体の負担を軽減させるために重要である。そのため、DDS 研究が現在盛んに行われているが、薬剤運搬をモニタリングする技法が現在欠けており、実際のデリバリー状況が把握できないことが DDS 研究の大きな障害となっている。そのため、イメージング技術による薬剤モニタリングの開発は急務である。

現在、耐久性・感度ともに有機マーカに対して格段に利点のある無機材質の量子ドット(QD)が開発され、単分子蛍光計測等に用いられ始めている。現在は、水溶性 QD を作成する技術が確立されていないため、薬剤運搬に QD を応用する動きはない。しかし、本研究の参加者は、超臨界法と in-situ 表面修飾技術を組み合わせて、水中で完全分散

する無機ナノ粒子を合成することに成功しており、水溶性無機ナノ粒子の開発については、世界を大きくリードしている。早急にイメージング技術とドッキングさせて、薬剤モニタリングの技術開発をすることは日本発の技術創出だけでなく、DDS 研究においても世界をリードする立場を取れる。

水溶性ハイブリッド QD は、東北大・多元研、神戸大院工（文科省）、マグネットビーズはマグナビート株式会社（企業）が開発する。その医用応用開発は、国立感染研、国立衛研（厚労省）および千葉大・院医・免疫（文科省）の産官学が連携して担当する。このように、それぞれ化学工学、バイオイメージング、医療分野の連携がされており、これまで個々の分野で高い業績をあげてきた分担者が連携して開発する。また、産総研（経産省）、東京大学院農、東京大学院薬、大阪大学、昭和大学薬学部、浜松医科大学、広島大学大学院（文科省）などの強力な一線研究者が協力者として加わっている。その背景には、日本化学工学会および日本バイオイメージング学会が数年にわたる連携協議による綿密な準備を行って来たことがあり、本提案は学会のバックアップを備えた社会性の高いものである。

2) 研究成果の概要

本プロジェクトでは、DDS の最重要課題を解決するハイブリッド QD を開発することができた。特に、課題となっていた「薬剤の生体内運搬」、「運搬状況のリアルタイムトレース」、「局所に特化した有効的な薬効」に向けた開発に焦点を絞って、新たなハイブリッド QD の創生することができた。本研究は、日本バイオイメージング学会と日本化学工学会との融合学理に基づいて、主たるメンバーにより推進し、DDS 用のハイブリッド QD の創生に関する多くの成果をあげた。

本プロジェクトでの当初の目標は、「DDS 研究の課題には、局所限定の薬剤作動、リアルタイム薬剤運搬モニタリングがあるが、それを達成するためには、高輝度・高安定なナノキャリアーとナノマーカーを用いる必要がある。本研究では、1) ハイブリッド量子ドット(ハイブリッド QD)の創生：これまでにない、生体無害で生体環境で完全分散するハイブリッド QD を、研究参加者が開発した超臨界法を用いて作成し、2) 薬剤タギング：そのハイブリッド QD に組織標的分子・ペプチド・蛋白質をタギングさせ、3) 薬剤デリバリー：肺、腎など疾患臓器に特異性をもったハイブリッド QD に薬剤を結合させた薬剤提示 QD を各臓器に集約させる特異的薬剤を運搬し、4) 臓器・細胞局所にて有効作動：肺・腎臓など標的臓器・細胞局所のみで有効に作動する薬剤提示 QD を臓器にいる炎症細胞の好中球マクロファージから分泌されるライソゾーム酵素により薬剤の遊離・活性化させるシステムを開発する。また、5) 薬剤の体内動態の非侵襲イメージングモニタリング：同時にイメージングによる非侵襲モニタリングを可能にし、定量的なリアルタイムイメージング評価法を確立する。

各項目の成果は、

(1) ハイブリッド量子ドット(ハイブリッド QD)の創生

超臨界水を反応場として、有機分子を単層表面修飾した高性能・高結晶無機ナノ粒子の合成に成功し、医療用水溶性有機化合物の表面修飾法として、高強度蛍光体酸化物の母体となる $Gd(OH)_3$ 粒子形成温度および有機物分解温度を考慮した流通式装置による連続 2 段階修飾法を確立し、この方法にて実際に表面修飾ナノ粒子を合成し、水中分散粒

径を評価することで未修飾粒子と比べて凝集抑制能が遥かに高いことを明らかにした。また、修飾反応時の pH を調節することで、グルコン酸修飾量の最適化し、pH がグルコン酸 pKa (3.64) と粒子等電点 (7.3) の間で修飾量が最大 (2.5 分子/nm²) となることが明らかとなった。これにより、官能基提示手法の最適化ができるようにした。

・水中完全分散と安定性向上：透過電子顕微鏡観察から、その粒径は粒子合成段階で制御された 30 nm を維持していた (図 2)。グルコン酸を修飾させることで、凝集性を大きく改善することができた。

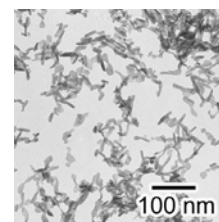


図 2. 透過顕微鏡写真

・官能基提示手法の最適化：流通式装置による連続 2 段階修飾法を用いて、修飾時の pH を変えることで修飾条件最適化を行った。グルコン酸と粒子間に働く力は、粒子等電点 (pH 7.3) より高い領域では反発力であり、低い領域では引力となる。pH が 7.3 より高い領域ではほとんど修飾されず、7.3-3.64 の間で修飾量が最大になる。3.64 より低い pH 領域では再び修飾量が減少する。このように、反応系中の pH を修飾剤の pKa と粒子等電点の間に制御することで、表面修飾量を最適化できた。独自に提案・開発してきた流通式超臨界水熱プロセスによる機能性無機ナノ粒子の合成法を発展させた有機・無機多元ナノ粒子の合成を行い、生体イメージングへ適用できるハイブリッドナノ粒子のために必須な、①有機—無機の強固な化学結合の形成、②単分散性に優れるナノ粒子



の合成、③溶媒への良分散を達成した (図 3)。

図 3. PEG 修飾された酸化鉄ナノ粒子

(2) 薬剤タギング：そのハイブリッド QD に組織標的分子・ペプチド・蛋白質を結合

細胞死を誘導するサイトカインである TNF- α と QD655 を 3 種類の方法 (リンカーを介する結合、介さない結合、抗体を用いた部位特異的な結合) で結合させ、TNF- α 結合活性有した状態で QD 標識することに成功した。これらの QD-TNF- α を細胞に適用し、蛍光顕微鏡観察を行なった結果、リンカーを介さない結合においては非特異的な結合が見られ、細胞実験のためにはリンカー等により親水性を高めることが重要であることが明らかになった。リンカーを介して QD 標識した TNF- α は速やかに TNF 受容体に結合しその後の解離は少ないこと、時間経過に伴いおそらく TNF 受容体のインターナリゼーションと共に細胞内に輸送されることを明らかにした。

(3) 薬剤デリバリー：肺、腎など疾患臓器に特異性をもったハイブリッド QD に薬剤を結合させた薬剤提示 QD を各臓器に集約と有効作動

・細胞特異的ペプチドの探索：ペプチドスポットティング方により 300 種類以上のペプチドをセルロースメンブレン上に固相合成し、繊維芽細胞と、間葉系幹細胞 (MSC) の接着を促進するペプチドの探索を実施した。フィブロネクチン上のアミノ酸配列を参考にペプチド探索を行った結果、繊維芽細胞に関しては RYYR など数種類の新規配列を、MSC については ALNGR という新規の配列を発見した。ペプチドスポットティング法により、イメージング用ナノ粒子として酸化亜鉛ナノ粒子を認識するペプチドの探索を実施し、3 残基目、6 残基目のいずれもヒスチジン残基が微粒子の認識に効果があることが判明した。また、フィブロネクチン、ラミニン由来の細胞認識ペプチドの探索から、ドメイン中のループ領域において、活性の高いペプチドが多く存在し、接着ペプチドを利用し MSC の分化誘導を制御できる可能性が示唆された。

・ナノ粒子特異的ペプチドの探索：6残基のランダムペプチド422種類をスポットティングしたランダムライブラリーで探索し、4残基目のアミノ酸の電荷が大きいとき、酸化亜鉛鉛粒子に接着しやすいという粒子認識ルールを得ることができた。得られたルールはZnOナノ微粒子の結合に重要なルールであることが明らかになった。

・細胞特異的ペプチドの探索：細胞としては肺・腎臓を標的臓器として、マウス肺・腎臓由来の内皮細胞（それぞれmLEC, mGEC）を用い、臓器特異的ターゲティングが可能なペプチドをスクリーニングし。繊維芽細胞（マウス3T3）、幹細胞（Mesenchymal stem cell）、内皮細胞（HUVEC）を使ってこれまでに探索されてきた18配列につき、スポット合成法でペプチドアレイを作製し、mLEC,

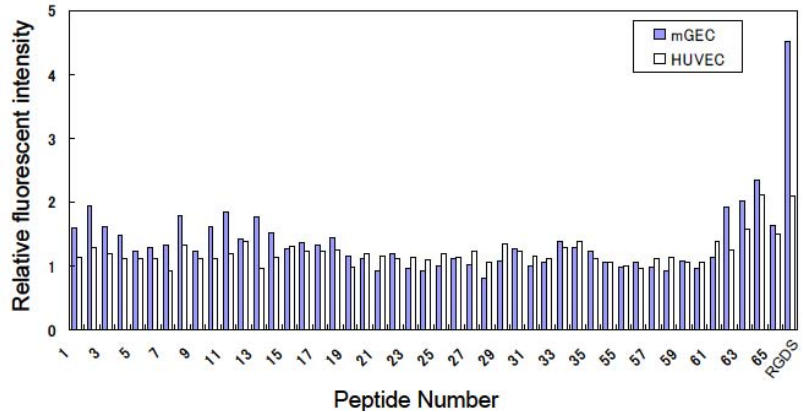


図4. 腎臓由来内皮細胞に対する認識ペプチドの探索

mGECの細胞接着を評価した結果、mLEC、mGECともにいくつかのペプチド配列で高い接着能力を示した。そこで、生体内で、肺、あるいは腎臓にターゲティングできるペプチド配列の探索を目指し、内皮細胞としてHUVECを用い、HUVECよりも細胞接着性能の高いペプチドを探索した。フィブロネクチン上のアミノ酸配列を参考にペプチド探索を行った。その結果、mGECに対しては4種類の細胞接着特異性のあるペプチド（図4）、mLECに対しても3種類を探索できた。

・ナノ微粒子特異的ペプチドの探索：ペプチドスポットティング法により、酸化亜鉛ナノ粒子を認識する短鎖ペプチドの探索を実施した。シード配列であるEAHVMHKVAPRPを用いて絞り込み、HVMHKVおよびHKVAPRPの6残基ペプチドで特異性があり、HCVAPR、HKHAPRなどのC置換およびH置換で効果があることが判明した。他の金属酸化物微粒子として、ZnO, ZrO₂, SnO₂, Al₂O₃, Fe₂O₃を用い、ZnOに対して非常に高い特異性を示した。

・組織標的分子のデザイン：タンパク質封入型バイオナノカプセルの調製及びイメージング：抗体を提示させる事で特異性を改変したバイオナノカプセルを創製した。

(4) 薬剤の体内動態の非侵襲イメージングモニタリング

・腎炎のイメージング：マウス肺臓および腎臓から成功したプライマリー血管内皮細胞の培養を用いて、DDSの最初のターゲットとなる臓器特異性のある結合分子を分子のスクリーニングにより数個のペプチドの候補が挙げられた（図5）。当初の目標からは、ペプチドの候補を絞り込めるか疑問であったが、腎臓の内皮細胞への結合 Kinetics を可能とするペプチド候補が挙げられたことは、腎臓に特化した非侵襲イメージング法により薬剤の体内動態をモニタリングする定量的リアルタイムイメージング評価法を検討することが可能になっている。肺も別のペプチドが挙げられている。本研究の

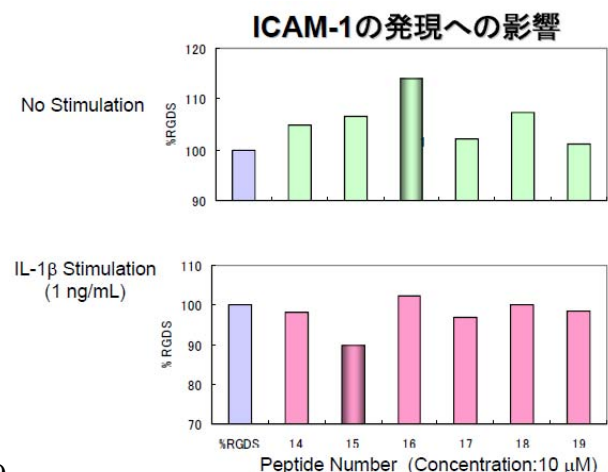


図5. 血管内皮細胞へのペプチドの作用

メイン課題の1つである臓器へデリバリー可能な分子につなげ、DDSの目標に近づいた。また、肺・肺腎臓に特化した非侵襲イメージング法により薬剤の体内動態をモニタリングする定量的リアルタイムイメージング評価法を検討することも可能になっている。

・気道炎症（喘息）病態診断イメージング：GFP 遺伝子導入マウスを OVA で免疫後、そのマウスから調整した CD4 や CD8T 細胞を正常マウスに移入し、OVA を吸入させて気道炎症（喘息）を起こした。蛍光顕微鏡を用いて、肺での移入 T 細胞のイメージングを行ったところ、喘息肺では CD4 や CD8T 細胞ともに 10-20 倍の集積が起こることが分かった。また、CD69 機能の抑制は気管支喘息の症状を改善した（図 6）

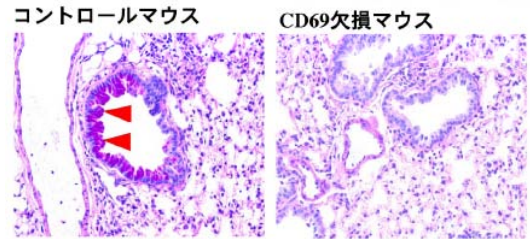


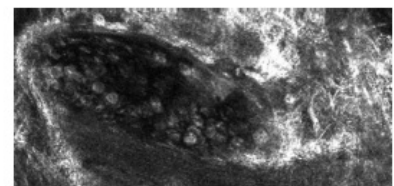
図 6. CD69 機能の抑制による気管支喘息の症状の改善

・ナノ粒子を用いた気道炎症（喘息）の発症時における肺への Th2 細胞の浸潤の可視化：Th2 細胞をナノ粒子でラベルして同系のマウスに移入し、OVA を吸入させて気道炎症（喘息）を起こし、Th2 細胞の浸潤をイメージング解析した。その結果、GFP 遺伝子導入マウスの CD4 や CD8T 細胞に比べて、ラベルした細胞が早期に肺から消失することがわかった。

・Qtracker655 標識血球によるマウス腎の表層血流イメージング：共焦点レーザー走査型顕微鏡にて連続的に観察し、ゼロタイムの蛍光像では腎組織由来の自家蛍光が比較的強く認められたが、時間経過とともに減弱する傾向を示した。血管内腔部分の平均蛍光強度を数値化したところ、1 時間まで 40% 程度の蛍光強度の低下がみられたが、以後 2 時間半まではほぼ一定であった。1 時間までの蛍光強度の低下は自家蛍光の低下を反映すると思われることから、Qtracker655 で標識された血球の蛍光強度の低下は軽度なものであった。次に、共焦点レーザー走査型顕微鏡と二光子レーザー走査型顕微鏡で同一標本の腎表層血流の in vivo イメージングを比較した。二光子レーザーで励起した場合は、自家蛍光がほとんど認められず、Qtracker 標識血球細胞の蛍光をコントラスト良く画像化することが可能であった。また、腎臓表面 90 μm の深さにおいては、二光子レーザー走査型顕微鏡でより鮮明に Qtracker 標識血球細胞の蛍光をとらえることが可能であった。

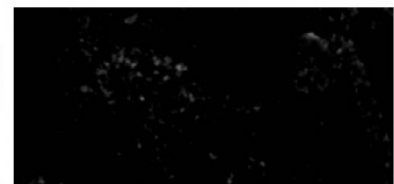
IRM image

Ex: 488 nm
Em: 410-490 nm



F/F₀ image
(Qdot605)

Ex: 488/568 nm
Em: 580-700 nm



・脳血管の血流動：中大脳動脈から分枝する脳血管の血流動態を頭蓋骨越しに共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察し、18 msec/frame のフレーム速度でマウス脳表面（100 μm 以内）の微小血管（直径数-数十 μm）の血行動態を観察することに成功し、得られた画像から血球循環速度を推定することが可能であった（図 7）。

図 7. 後大脳動脈のイメージング

・QD を用いたインビボイメージング：水溶性ハイブリッド QD を用いた高分解インビボイメージング法の確立をめざして、Qtracker605, Qtracker655 で標識した血球細胞を共焦点レーザー走査型顕微鏡及び二光子レーザー走査型顕微鏡により観察した。マウス腎及びマウス脳の表層における血流のインビボイメ

ーシング法による可視化を試み、血球循環速度を評価可能であることを明らかにした。また、既存の生細胞標識に用いられる蛍光プローブ (calcein red-orange) との比較を行い、Qtracker は既存の蛍光プローブである calcein red-orange の約 3 倍の蛍光強度を示し、二光子レーザーによる励起効率が高いことを明らかにした。このような水溶性 QD の蛍光特性は、組織深部のイメージングに有利な二光子レーザー走査型顕微鏡でのイメージングに適したものと考えられた。

・膜透過ペプチドを提示したバイオナノカプセルを用いたイメージング：膜透過ペプチドを提示させたバイオナノカプセルを創製し、そのイメージングを行い、動態を明らかにした。本粒子に EGFR 抗体を提示させ、肝細胞以外の細胞に導入可能かどうか検討を行った。抗 EGFR 抗体と粒子を混合した後、HeLa 細胞へ粒子の終濃度が 70 nM になるように添加して共焦点レーザー顕微鏡で観察した (図 8)。

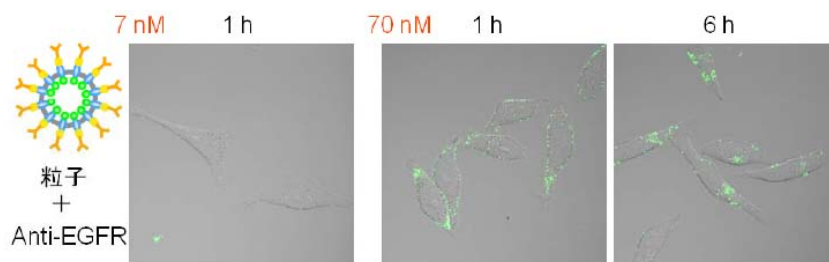


図 8. 粒子導入後の蛍光像

・膜透過ペプチドを提示したバイオナノカプセルを用いたイメージング：本研究で開発した 3 種類の CPP-BNC は動的散乱法による解析により、直径約 100 nm の粒子を形成していることが確認された。次に、蛍光標識した CPP-BNC を用いて、提示した CPP による細胞内局在の違いを観察した。ヒト肝細胞に特異性をもつ BNC は HeLa 細胞に導入されず、細胞内からの蛍光は観察されなかった。一方で CPP を提示した BNC はそれぞれ細胞内から蛍光が観察され、3 種類の CPP の中でも R8-BNC を用いた時に細胞内からの蛍光が最も強く、導入効率が高いということがわかった。

以上、本プロジェクトにて、薬剤デリバリーシステム (DDS) 研究の最重要課題であった 1) 「薬剤の生体内運搬」、2) 「運搬状況のリアルタイムトレース」、3) 「局所に特化した有効的な薬効」の解決と開発の目標について、日本バイオイメーシング学会と化学工学会との融合学理に基づき推進し、当初予定の成果にとどまらず、それ以上の成果をあげた。

このように、イメージング診断及び薬効評価法の開発を目指す。」ということであり、臓器特異性を決めるペプチド候補の絞り込みまで目標としていなかったが、臓器由来の血管内皮細胞を調整できたことからペプチドのスクリーニングに成功し、候補の絞りこみができた。また、いきのままの肺、腎、脳のイメージング (in vivo imaging) にも成功し、ハイブリッド QD の応用の基礎検討までできた。

目標達成としては、当初よりはるかに上方修正ができるものであった。