

平成 22 年 4 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19791184  
 研究課題名 (和文) 聴覚末梢器官への新しいドラッグデリバリー ～ナノテクノロジーによる治療の可能性  
 研究課題名 (英文) New drug delivery into inner ear; possibility of the treatment with nano technology  
 研究代表者  
 山内 大輔 (YAMAUCHI DAISUKE)  
 東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
 研究者番号：70361102

研究成果の概要 (和文) : ナノ粒子が聴覚末梢器官への新しいドラッグデリバリーとなる可能性を模索した。ナノ粒子 Qdot 655 といろいろなペプチド (HRP, Galectin-1, L-Glutamin Acid, EGF) を結合させ、モルモットの内耳へ投与した。マイクロインジェクターにて蝸牛の中央階へ投与したところ、Galectin-1 と EGF においてコルチ器とライスネル膜への取り込みを認めた。内耳への診断・治療薬としての医療分野への応用が期待される。

研究成果の概要 (英文) : Nano particle was examined for the potential of drug delivery to inner ear. Qdot 655 was conjugated respectively with several peptides which are horseradish peroxidase (HRP), Galectin-1, L-Glutamin Acid and epidermal growth factor (EGF). When Qdot was injected into scala media of the cochlea in guinea pig, Qdots with Galectin 1 and EGF were introduced into organ of Corti and Reissner's membrane. Nano particle is expected as treatment for inner ear disease.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	600,000	3,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：耳鼻咽喉科学、ナノバイオ

## 1. 研究開始当初の背景

内耳性難聴や後迷路性難聴に対し、人工内耳や脳幹インプラントといった人工機械を用いた治療が開発され、臨床応用されているが、必ずしも十分な効果が得られるわけではない<sup>1</sup>。このため、より根治的な治療、または人工内耳や脳幹インプラントの効果をより上げるための治療として、再生医療と遺伝子治療の2本の柱が臨床応用化されることに期待が集まっている。再生医療では、幹細胞を内耳や spiral ganglion に挿入し神経細胞に分化させる試みがなされており<sup>2</sup>、また遺伝子治療では神崎らが人工染色体を用いたミオシン 15a 遺伝子導入により遺伝性難聴マウスの治療モデルを確立した<sup>3</sup>。更に、泉川らは Atoh1 遺伝子導入によりモルモット内耳有毛細胞の再生に成功しており、遺伝子治療による再生医療の可能性を提示した<sup>4</sup>。近年はこれらの背景に加え、より効率的な再生・遺伝子治療の臨床での確立のために新しい DDS (Drug Delivery System) の開発が注目されてきた。

「drug」という言葉の定義は“Substance taken for the effects it produces”であり、drug が病気の治療薬に限定されているわけでない。DDS = 薬物治療システムという既存の固定観念にとらわれず、DDS を広く自然科学の基盤テクノロジーとして様々な技術と方法論が開発されてきた<sup>5</sup>。すなわち、drug (物質) の (A) 徐放化、(B) 安定化、長寿命化、(C) 生体内バリアの通過促進、(D) 標的部位へのターゲティングなどがキーワードであり、聴覚末梢器官では内耳有毛細胞や蝸牛神経核などへの DDS の開発が切望されている。

近年、ナノテクノロジーが目覚しく進歩しており、その中でもナノ粒子 (Nano particle) の DDS への応用が期待されている<sup>6</sup>。ナノ粒子は半導体や金属原子約 500~1,000 個からなる直径約 3.5~6 nm 程度の超微粒子結晶であり、量子サイズ効果により蛍光を発することが知られている。また、その表面に抗体をはじめ様々な物質を同時に結合させる事ができるため、診断薬と治療薬としての医療分野への応用が期待されている。例えば、臓器標的ペプチドと治療薬成分を1粒子に同時に結合させることができれば、標的細胞への DDS につながると考えられている。

### <参考文献>

- 1) Moller AR: Cochlear and Brainstem Implants; Adv Otorhinolaryngol. 2006;64
- 2) Matsuoka AJ et al: In vivo and in

vitro characterization of bone marrow-derived stem cells in the cochlea; Laryngoscope. 2006 Aug;116(8):1363-7.

- 3) Kanzaki S: Transgene correction maintains normal cochlear structure and function in 6-month-old Myo15a mutant mice; Hear Res. 2006 Apr;214(1-2):37-44. Epub 2006 Apr 3
- 4) Izumikawa M et al: Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals; Nat Med. 2005 Mar; 11(3):271-6. Epub 2005 Feb 13.
- 5) 田畑泰彦 DDS 遺伝子導入・薬物キャリアの基盤技術 バイオテクノロジージャーナル 6(5) 550-589 2006
- 6) 宮脇敦史 医療応用を目指した蛍光ナノ粒子 バイオテクノロジージャーナル 6(5) 641-647 2006

## 2. 研究の目的

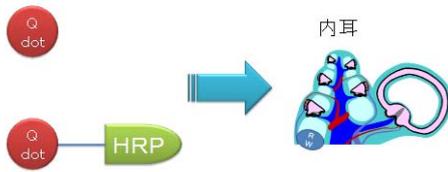
本研究は、ナノ粒子が聴覚末梢器官への新しい DDS としての可能性を模索し、臨床応用への基盤となる実験を行うことが目的である。

- (1) 実験動物にナノ粒子を投与した場合の内耳や蝸牛神経・蝸牛神経核への到達度を測定する。
- (2) 次に、ペプチドを結合したナノ粒子を投与した場合の内耳や蝸牛神経・蝸牛神経核への到達度を計測する。

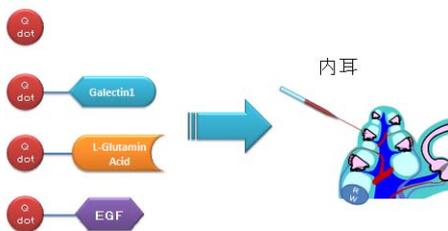
## 3. 研究の方法

- (1) ナノ粒子の内耳・蝸牛神経核への到達度の評価するために、Qdot 655 Cell Labeling Kit 及び Qdot 655 Antibody Conjugation Kit を使い、guinea pig の内耳や脳幹へのデリバリーが可能かどうか検討した。Qdot 655 Antibody Conjugation Kit には、neurotracer に用いられる horseradish peroxidase (HRP) を結合させ投与した。投与方法は正円窓に投与または正円窓から蝸牛階へ直接注入した。Qdot は -20℃ では破壊され蛍光性を失うため、パラフィン固定、または surface preparation を蝸牛に、振動マイクロームによるスライスを

脳幹に対し行った。



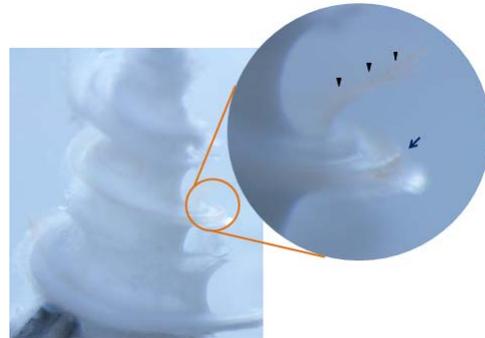
- (2) Qdot 655 Antibody Conjugation Kit に、細胞増殖や神経軸索の再生に関与する Galectin-1, 内耳神経伝達に関与する L-Glutamin Acid, 再生因子である epidermal growth factor (EGF) をそれぞれ、QIAGEN のマニュアルに従って結合させた。Control として非結合の Qdot 655 Antibody Conjugation Kit を単独で用いた。投与方法は自作の微小ガラス管に試薬を充填したマイクロインジェクターを用い、guinea pig の内耳蝸牛側壁より第 2 回転レベルで中央階へと 2~4  $\mu$  L を直接注入した。Over night で sacrifice 後、surface preparation を作成し、実体顕微鏡および蛍光顕微鏡にて観察を行った。



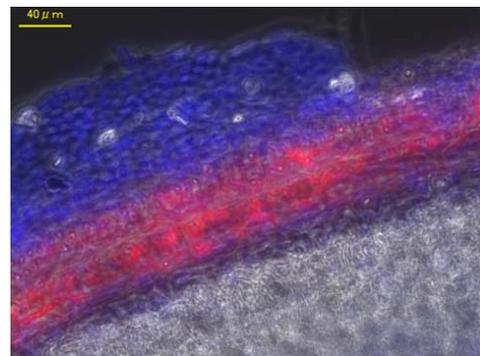
#### 4. 研究成果

- (1) Qdot 655 Cell Labeling Kit 単体では蝸牛内組織や蝸牛・前庭神経及び脳幹への明らかな取り込みは認めなかった。Qdot Antibody Conjugation Kit 単体でも蝸牛内組織や蝸牛・前庭神経及び脳幹への明らかな取り込みは認めなかった。HRP を結させた Qdot 655 を用いたが、蝸牛内組織や蝸牛・前庭神経及び脳幹への明らかな取り込みは認めなかった。正円窓の透過性や内耳開窓による蝸牛内組織へのダメージも考慮し、マウスに対して正円窓投与を行ったが、同様に明らかな取り込みを認めなかった。

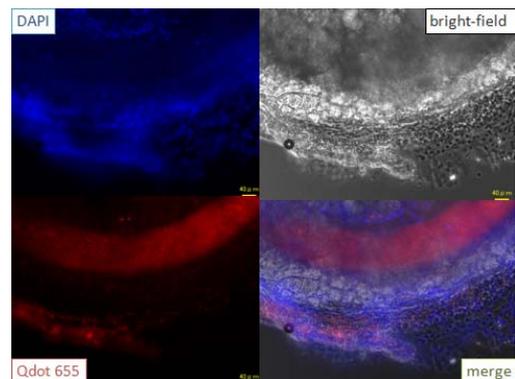
- (2) Control, L-Glutamin Acid を結合させた Qdot の取り込みは認められなかった。Galectin-1, EGF を結合させた Qdot はコルチ器周辺とライスネル膜に取り込まれているようであった。



Galectin-1 + Qdot 655 Antibody Conjugation Kit; 実体顕微鏡下に観察。ライスネル膜(矢頭)とコルチ器付近(矢印)に Qdot 655 の赤い色素を認める。



Galectin-1 + Qdot 655 Antibody Conjugation Kit; 蛍光顕微鏡下に観察。コルチ器付近に Qdot 655 の赤色を呈している。青色は DAPI。



EGF + Qdot 655 Antibody Conjugation Kit; 蛍光顕微鏡下に観察。Galectin-1 と同様に、コルチ器付近に Qdot 655 の赤色を呈している。青色は DAPI。

結合させたたんぱく質により取り込みの違いがあったことから、分子の内耳投与による取り込みの相違を評価できる

良い方法と考えられた。しかし、スライス切片などのより細やかな観察は、今回の研究では不可能であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 大輔 (YAMAUCHI DAISUKE)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤  
講師

研究者番号：70361102

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：