

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750194

研究課題名(和文) ナノ医薬品の安全性予測/評価システムの構築を目指した安全性評価マーカーの探索

研究課題名(英文) Identification of biomarkers for development of the efficacy and safety of nanomaterials

研究代表者

東阪 和馬 (Higashisaka, Kazuma)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20646757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：組織浸透性や薬剤保持・徐放性などに優れたナノマテリアルを、医薬品の送達デバイスとして活用しようとするナノ医薬品は、近年、急速に研究開発とその実用化が進んでいる。一方で、開発されたナノマテリアルの安全性評価や安全性の確保、安全なものへと仕立て上げるための研究は立ち後れている。本観点から当該研究では、ナノ医薬品の有効性・安全性を確保するための評価マーカーの探索・同定を試みた。将来的に、本知見を活用することで、ナノマテリアルの有効性・安全性を研究開発段階で簡便かつ迅速に評価する「予測・評価創薬」システムの確立に資する基盤情報の集積を目指す。

研究成果の概要(英文)：Nanomaterials with diameter of less than 100 nm have unique physicochemical properties and innovative functions compared with conventional materials of submicron size. However, safety concerns regarding the use of nanomaterials have extended worldwide. Thus, to develop a safe and effective form of a nanomaterial, we attempted to develop potential biomarkers of nanomaterials. In the future, it is possible to take advantage of this knowledge, with the aim of accumulation of foundation information that will contribute to the establishment of system to easily and quickly evaluated in the research and development stage of the efficacy and safety of nanomaterials.

研究分野：ナノ安全科学、毒性学

キーワード：ナノマテリアル バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ナノテクノロジーの発展に伴い、ナノ酸化チタンやフラーレンといったナノマテリアルの開発と実用化が世界的に進展している。1次元が100 nm以下の素材であるナノマテリアルは、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材と比較して、医薬品素材として革新的機能を発揮する。従って、工学・薬学・医学分野において、融合的・複合的に、21世紀産業の根幹を担う素材として期待され、ナノ医薬品とも言うべき新たな治療戦略への展開が図られている。しかしながら、医薬品開発においては、製剤の品質と安全性の担保が必要不可欠であることは言うまでもない。この点、ナノ医薬の根幹をなすナノマテリアルの定義すら未だ曖昧であると共に、物性・品質と有効性・安全性の連関評価も殆ど進展していない。そのため、ナノマテリアルの安全性評価研究は、世界的に見ても不十分であり、欧米ではナノマテリアルの危険性(ナノ毒性)ばかりが先行し、ナノ医薬品の開発が遅れてしまっている。本観点から研究代表者らは、ナノマテリアル投与により誘発される生体影響とナノマテリアルの物性の連関を解析し、体系化することで、ナノ医薬品の品質の担保等、ナノ医薬産業の発展に資する基盤情報の収集を図っている。

言うまでも無く、ナノ医薬品の開発に向けては、有効性は当然ながら、いかにその安全性を高度に確保するかが最大の焦点であり、医薬品の有効性・安全性を研究開発段階で簡便かつ迅速に評価する「予測創薬」の確立が、国内外を問わず、緊急性と社会的ニーズの高い取組みと位置づけられている。ナノ医薬品として応用し得る候補ナノマテリアルは未だ少ないのが現状であるが、既に数多くのナノマテリアルが実用化されつつあり、今後は、莫大な種類の新規ナノマテリアルがナノ医薬品へ応用されるものと考えられる。そのため、有効かつ安全なナノ医薬品の設計に向けて、ナノマテリアル投与により誘発される様々な生体影響を評価すると共に、ナノ医薬品の安全性を事前に予測・評価し得るシステムの確立が特に待望されている。

## 2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、ナノ医薬品の根幹をなすナノマテリアルの安全性を開発段

階において、早期に予測・診断できる安全性評価マーカーの探索を推進してきた。この検討により、既に医薬品添加剤などに汎用され、遺伝子などのナノDDS担体としての応用も期待されている非晶質ナノシリカを対象とし、非晶質ナノシリカ投与後のマウス血液を用いたプロテオミクスによる発現変動蛋白質の網羅的な解析を実施することで、急性期蛋白質が非晶質ナノシリカ投与により誘発される負の生体影響を予測する安全性評価マーカーとなり得ることを先駆けて明らかとした。本知見を応用することで、ナノマテリアルの安全性を動物実験による安全性評価の段階で、事前に予測・評価できる可能性を提唱してきた。しかしながら、ナノマテリアルの安全性が世界的に危惧されているように、ナノマテリアルが誘発し得る負の生体影響は多岐にわたるため、それら生体影響をわずか数種の蛋白質で網羅的に予測・評価するのは困難である。そこで本研究では、有効かつ安全なナノ医薬品の開発とその支援に資する基盤情報の収集を最終目標に、研究代表者独自のナノマテリアルの安全性評価マーカーの探索に関する研究成果を発展させることで、ナノ医薬品の安全性を事前にかつ網羅的に予測・評価し得るシステムの確立に資する基盤情報の収集を図った。

## 3. 研究の方法

### 非晶質シリカ

各粒子は、Micromod Partikeltechnologie (Rostock/Warnemünde, Germany) より購入した。粒子径70 nm、300 nm、1000 nmの非晶質シリカをそれぞれnSP70、nSP300、mSP1000と表記した。また、nSP70の表面をカルボキシル基修飾したものをnSP70-C、アミノ基で修飾したものをnSP70-Nとそれぞれ表記した。これらは5分間のソニケーションと1分間のボルテックスをした後、実験に供した。

### 実験動物

BALB/c マウス(雌性、6-8週齢)は日本SLC (Shizuoka, Japan) から購入した。本研究における動物の飼育および実験は医薬基盤研究所の実験動物施設にて行い、大阪大学動物実験規定に準じて行った。

## 血液サンプルの回収

BALB/c マウスに、生理食塩水 (saline) (株式会社大塚製薬工場; Tokushima, Japan) で 8 mg/mL に調整した非晶質シリカ分散液 (nSP70、nSP300、mSP1000、nSP70-C、nSP70-N) をそれぞれ 100  $\mu$ l ずつ (0.8 mg/mouse) 投与し、投与 24 時間後に心臓採血により血液を回収した。

## 4. 研究成果

### 4.1. 非晶質シリカ投与による末梢血好中球画分の割合変動の解析

これまでに、非晶質ナノシリカ投与に対する安全性評価マーカーの候補蛋白質として同定した急性期蛋白質である SAA は、末梢血好中球の増加といった血液毒性の発現に寄与する可能性が報告されている。そこで本研究では、急性期蛋白質である SAA の増加と血液毒性発現との関連解析を試みた。

まず、非晶質シリカ投与後の末梢血好中球画分の割合を、粒子径、表面電荷が異なる非晶質シリカを用い解析した。BALB/c マウスに非晶質シリカ (nSP70、nSP300、mSP1000、nSP70-C、nSP70-N) をそれぞれ 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間において血液を回収した後、フローサイトメトリーにより末梢血好中球画分の割合を解析した。その結果、nSP300、mSP1000 投与群においては、末梢血好中球画分の割合は saline 投与群と比較しほとんど変化は認められなかった。一方で、nSP70 投与群では、saline 投与群と比較し末梢血好中球画分が増加傾向にあることが明らかとなった (Figure 1A)。また、表面修飾を施すことで、末梢血好中球画分の割合は未修飾の nSP70 投与群と比較し減少する傾向が認められ、nSP70-C 投与群では nSP70 投与群と比較し有意に減少することが明らかとなった (Figure 1B)。このことから、未修飾の非晶質ナノシリカ投与により、末梢血好中球画分の割合が増加することが示された。

### 4.2. 非晶質シリカ投与後の血中 G-CSF 量の発現変動

そこで次に、好中球前駆細胞の増殖・分化に関与していることが知られている G-CSF の発現量を評価した。BALB/c マウスに nSP70、nSP300、mSP1000 をそれぞれ 0.8

mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 G-CSF 量を ELISA により測定した。その結果、血中 G-CSF 量は nSP70 投与群で saline 投与群と比較して有意に増加することが明らかとなった。一方で、nSP300、mSP1000 投与群においては、血中 G-CSF 量は saline 投与群と比較しほとんど変化は認められなかった (Figure 2A)。このことから、血中 G-CSF 量は非晶質シリカの粒子径の減少に伴い増加することが示唆された。この時、G-CSF の中和抗体である抗 G-CSF 抗体を前処置することで、nSP70 投与による好中球画分の増加が有意に抑制されることを確認しており、nSP70 投与により誘発される好中球画分の増加が、G-CSF の増加を介して引き起こされることが示唆された (Figure 2B)。さらに、表面修飾を施した非晶質ナノシリカを用い、非晶質ナノシリカ投与後の血中 G-CSF 量の発現変動を解析することで、G-CSF が非晶質ナノシリカ投与による負の生体影響を予測する安全性評価マーカーになり得るかを評価した。BALB/c マウスに nSP70、nSP70-C、nSP70-N をそれぞれ 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 G-CSF 量を ELISA により測定した。その結果、表面修飾を施すことで、血中 G-CSF 量は未修飾の nSP70 投与群と比較し有意に減少し、saline 投与群とほぼ同程度にまで減少することが明らかとなった (Figure 2C)。以上の結果から、急性期蛋白質と同様に、造血因子として知られているサイトカイン G-CSF が、非晶質ナノシリカ投与により誘発される負の生体影響の指標となる安全性評価マーカーになる可能性を見出した。即ち、プロテオミクスを用いた安全性評価マーカーの探索・同定の過程で得られた情報、研究成果を発展させることで、ナノマテリアルの安全性を事前に予測・評価し得るシステムの確立に向けて、新たなマーカー候補分子を同定することにつながったと考えられる。

現在、非晶質ナノシリカ投与による各種生体影響の発現機序の解明に向けて、非晶質ナノシリカ投与による好中球の増加・活性化の観点から解析を試みている。将来的に、これら検討により、ナノマテリアル投与により誘発される生体影響を特異的に評価し得る安

全性評価マーカーの同定につながると共に、これら情報を集積することで、有効かつ安全なナノ医薬品開発を支援し得る、ナノ医薬品の安全性を事前に、かつ網羅的に予測・評価し得るシステムの確立が可能になると期待している。

#### 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 1 件)

1. Higashisaka K., Kunieda A., Iwahara Y., Tanaka K., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Neutrophilia due to silica nanoparticles induces release of double-stranded DNA., Journal of Nanomedicine & Nanotechnology., 5(5):1000236, 2014., doi: 10.4172/2157-7439.1000236., 査読有.

[学会発表] (計 5 件)

1. 國枝章義, 東阪和馬, 永野貴士, 岩原有希, 田中康太, 畑 勝友, 角田慎一, 吉岡靖雄, 堤 康央: 非晶質ナノシリカ曝露が宿主生体防御システムにおよぼす影響解析., 第 40 回日本毒性学会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
2. 東阪和馬, 國枝章義, 岩原有希, 田中康太, 畑 勝友, 角田慎一, 吉岡靖雄, 堤康央: 薬学新素材としてのナノマテリアルの生体防御機構に及ぼす影響解析., 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 京田辺 (京都), 2013 年 10 月.
3. Higashisaka K., Kunieda A., Iwahara Y., Tanaka K., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Evaluation of nanomaterial-induced biological responses by toxico-proteomics analysis., HUPO 12th Annual World Congress, Yokohama (Japan), 14-18 September, 2013.
4. Higashisaka K., Kunieda A., Iwahara Y., Tanaka K., Namba Y., Nishikawa Y., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Biological assessment

of silica nanoparticles focused on neutrophil for ensuring safety of nanomaterials., 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC) , Melbourne (Australia), 13-16 April, 2014.

5. Higashisaka K., Kunieda A., Iwahara Y., Tanaka K., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Nano-Safety Science for ensuring safety of nanomaterials ~Biological assessment of silica nanoparticles focused on neutrophil~, Nanotech2014., Washington DC (USA), 15-19 June, 2014.

[図書] (計 0 件)

該当無し

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当無し

○取得状況 (計 0 件)

該当無し

[その他]

ホームページ等

該当無し

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

東阪 和馬 (Higashisaka Kazuma)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号 : 20646757

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し

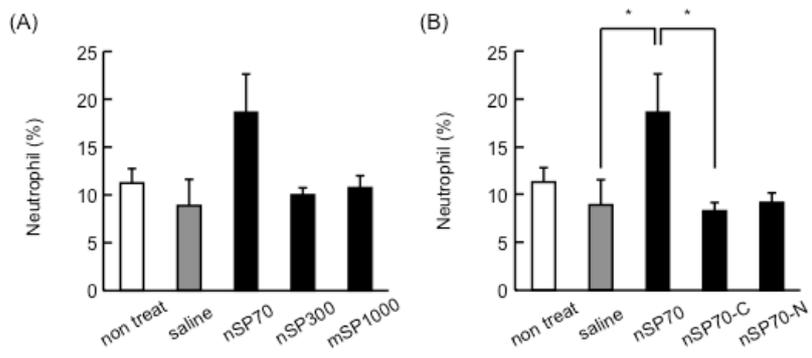


Figure 1. 非晶質シリカ投与による末梢血好中球画分の割合変動の解析

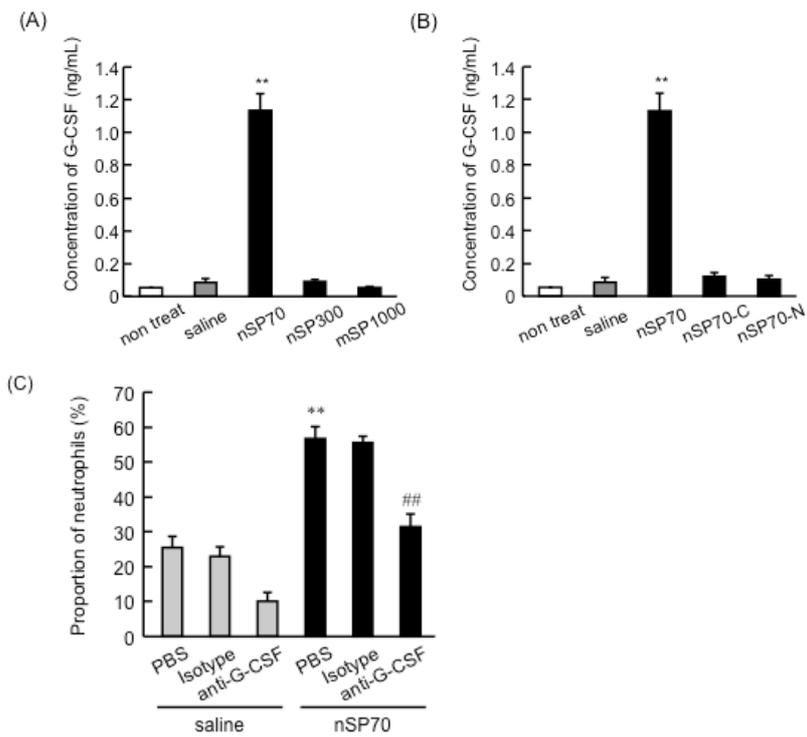


Figure 2. 非晶質シリカ投与後の血中 G-CSF 量の発現変動