

20020756

厚生労働省科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

「バイオナノ粒子による治療用生体高分子デリバリーシステムの開発

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小谷 均

平成15（2003）年3月

# 目次

## I. 総括研究報告書

- バイオナノ粒子による治療用生体高分子デリバリーシステムの開発 . . . 1  
小谷 均 (アンジェス エムジー株式会社)

## II. 分担研究報告書

1. ウイルスフリーのバイオナノ粒子生産技術の開発 . . . 7  
福村正之、金森俊英 (アンジェス エムジー株式会社)
2. 生体高分子封入技術の開発 . . . 16  
福村正之、河野博和 (アンジェス エムジー株式会社)
3. バイオナノ粒子精製技術の開発 . . . 20  
中島俊洋、長澤鉄二、矢野高広、天満昭子、宮地和恵、鈴木七保  
(アンジェス エムジー株式会社)
4. ベクターの修飾による標的化技術の開発 . . . 28  
金田安史 (大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学)

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

総括研究報告書

## 「バイオナノ粒子による治療用生体高分子デリバリーシステムの開発」

主任研究者 小谷均 アンジェス MG 株式会社

**研究要旨** 本研究では、遺伝子医薬、核酸医薬、抗体医薬など治療用生体高分子を生体臓器へ高効率にデリバリーするためのバイオナノ粒子（HVJ-E 非ウイルスベクター）の実用化に向けた研究開発として、膜融合に関与する組換え蛋白質発現による空粒子生産方法の確立、新規治療技術確立を目指した機能性蛋白質（抗体医薬）の封入技術確立、医用材料としての実用化に必要な精製法確立、生体内での標的化技術の開発を行ない、安全性向上、汎用性拡大、臓器特異性の確立を実現すると共に、最終的に臨床応用を行うために必要となる医薬品としての安全性や、製剤としての安定性を確保するための研究開発を並行して行う。

### A. 研究目的

現在、他の先進国と同様に日本においても高齢化に伴う医療費の増加が社会問題となりつつある。特に成人病に対しては、有効性の高い治療薬が少ないことから、それらの予防と治療を有効に行うための画期的な治療技術や医薬品の開発が切望されている。一方、ゲノムプロジェクトによるヒト遺伝子配列の完全解読に続くゲノミクス解析やプロテオミクス解析により、成人病の発症と進行に関与する遺伝子、治療に有効な遺伝子や蛋白質が明らかにされつつある。そのようなアプローチにより得られた遺伝子や蛋白質の情報を利用して、新規医薬品を開発する戦略としては従来のように同定された標的分子に作用する医薬品を低分子化合物ライブラリーからスクリーニングする方法と、病因に関与する遺伝子や蛋白質などの生体高分子を細胞内に直接投与して細胞の機能制御を行う方法がある。後

者の方法では、従来主流となっている低分子有機化合物に依存した創薬とは異なる医薬品（生体高分子を成分とする医薬品）開発法となるため、まったく新しいタイプの医薬品が産み出される可能性がある。また、そのような新規先端医薬品を従来型の医薬品と組み合わせることにより、より有効性の高い治療法が開発できると期待される。

現在開発されつつある新規先端医薬品には遺伝子医薬、核酸医薬、蛋白質製剤のように高分子量の生体高分子を成分とするものが多く、標的細胞への取り込みの効率が低いことが問題となっている。実際、現在製品化されている抗体医薬の標的分子は、細胞外蛋白質である。しかし、シグナル伝達因子や転写因子など細胞の機能を制御する蛋白質の多くは細胞内に局在している事、遺伝子機能に関してもすべて細胞内で制御されていることから、細胞機能を制御する生体高分子を直接細胞内へ

導入できるシステムが開発できれば、疾患の治療に非常に有用であると考えられる。そのためには、治療用生体高分子を安全かつ高効率に目的の生体臓器や細胞へ導入するためのベクターシステム（物質を運ぶためのデリバリーシステム）の開発が必要である。

本プロジェクトで研究開発を行うバイオナノ粒子（HVJ-E 非ウイルスベクターシステム）は、直径100ナノメートルから300ナノメートルの膜融合活性を持つ微小粒子であり、内部に封入された高分子（遺伝子医薬）を直接標的細胞内に導入する性能を持つ。従来の合成ナノ粒子等と同様に、このバイオナノ粒子は非ウイルス系のベクターシステムであるが、生体高分子を高効率に生体臓器や細胞へ導入することが出来る事が明らかとなっている。そこで、本研究では大阪大学とアンジェスMGが産学共同で、純国産技術であるバイオナノ粒子を、世界に通用する汎用性が高い医用材料として実用化するための開発研究を行う。最終的には、医薬品としての安全性や製剤としての安定性を確認した上で、ヒトへの臨床応用を行うことを目標とする。

## B. 研究方法

開発中のバイオナノ粒子の臨床応用を開始するためには、医薬品としての安全性や、製剤としての安定性を確保するための研究開発に先立って、品質の安定したバイオナノ粒子を製造するための生産方法開発、抗体蛋白質などの生体高分子をバイオナノ粒子へ封入するための技術開発、医薬品としての開発に必要な精製方法の開発、バイオナノ粒子の修飾に

よる標的化技術の開発が必要である。そこで本年度はそれらの研究を中心として開発を行った。以下に具体的な研究方法を示す。

### (1) ウイルスフリーのバイオナノ粒子生産技術の開発

現在のバイオナノ粒子の製造では、培養細胞にウイルス（HVJ）を感染させて培養液中に産生されるウイルス粒子を原料としている。しかし、生産用細胞にウイルスの構成タンパクを組換えタパクとして発現させることで、高効率にバイオナノ粒子を得ることが出来れば、従来法と比較して安全性の向上と製造工程の簡略化が出来ることが期待できる。そこで、HVJを構成する膜蛋白質であるF蛋白質、M蛋白質、HN蛋白質の遺伝子クローニングを行ない、塩基配列確認後に、蛋白質発現用ベクターへの組み込みを行った。また、クローニングしたウイルス遺伝子が機能を持つことを確認するため、作製した発現ベクターを用いて遺伝子発現と蛋白質発現を、無細胞の転写・翻訳系と、培養細胞への導入のそれぞれで確認を行った。

### (2) 生体高分子封入技術の開発

抗体医薬やサイトカイン製剤など蛋白質を成分とする医薬品が先端医薬品として開発されているが、それらの医薬品の標的分子は受容体など細胞外分子に限定されている。抗体医薬やドミナントネガティブ変異体蛋白質を細胞内へ直接投与することが出来るようになれば、病因に関与する細胞内蛋白質の機能を制御することが出来るため、新規治療用生体

高分子の開発を通じて難治性疾患の治療に繋がると考えられる。そこで、本研究では治療用生体高分子である抗体蛋白質をバイオナノ粒子へ封入するために、封入に用いる界面活性剤の濃度、封入時間、封入温度の条件検討を行うことで、抗体など構造や活性が失われやすい生体高分子の封入条件をスクリーニングした。また、ヒト癌細胞株を用いて封入した抗体分子を直接細胞内へ導入することが出来るかについても検討した。更に、低分子医薬品である抗癌剤と、標的細胞に対して同時に導入できるかについても検討を行った。

### (3) バイオナノ粒子精製技術の開発

バイオナノ粒子を医用材料として臨床応用するためには、安全性が確保される品質レベルまで、不純物の除去と精製を行う必要がある。従来型のウイルスベクター粒子と比較して、空粒子であるバイオナノ粒子の精製には、よりマイルドな条件の精製法の確立が必要であると考えられる。そこで、本研究では変異型センダイウイルスより産生されるバイオナノ粒子を材料として、シュークロース密度勾配遠心法、平膜型限外濾過膜法、精製用樹脂による方法のそれぞれについて、バイオナノ粒子の濃縮・精製方法として適しているかについて検討を行った。また、それぞれの精製方法が、今後臨床応用に向けて実製造する際に、工業レベルまでスケールアップが可能であるかと、医薬品製造での使用実績があるかについての検討も行った。更に、最終的に精製されたバイオナノ粒子の性状について、粒度分布計による解析と電子顕微鏡撮影により検討した。

### (4) バイオナノ粒子の修飾による標的化技術の開発

血中への投与で目的の臓器や細胞へ特異的に物質を導入することが出来れば、ベクターの簡便性、安全性を高めることが出来る。そこで本研究では、バイオナノ粒子の化学的修飾や、バイオナノ粒子のタンパクを変化させることで、特定の臓器や細胞への標的化技術の確立を行う。本年度の研究ではHVJエンベロープベクターを様々なポリマーで修飾することによりマウス尾静脈から注入したときにどのような臓器に遺伝子導入が可能かについて、各臓器でのルシフェラーゼ遺伝子発現と蛍光標識したオリゴヌクレオチドの取り込みを指標に評価した。また局所投与したときの遺伝子発現の増強効果についても検討した。

## C. 研究結果

### (1) ウイルスフリーのバイオナノ粒子生産技術の開発

本年度の研究ではセンダイウイルスの構成タンパク(F蛋白質、M蛋白質、HN蛋白質)を培養細胞で発現するために、大阪大学由来のセンダイウイルスZ株より目的とするウイルス構成蛋白質をコードする遺伝子断片をクローニングした。塩基配列確認の結果、得られたウイルス遺伝子の配列にはデータベースに登録されているセンダイウイルスZ株のゲノム配列と比較してアミノ酸の置換を含む数箇所の配列上の相違が認められたが、T7ポリメラーゼを用いた転写産物の解析、無細胞翻訳系による蛋白質産生能の解析、培養細胞を用いた遺

伝子発現解析により検討した結果、実際に目的の蛋白質が発現されることが明らかとなった。そこで、空ベクター粒子の産生量向上を目指して、HN蛋白質とM蛋白質のそれぞれをコードする遺伝子について、細胞での発現効率が高いことが知られているCAGプロモーターを持つベクターへの組換えを行なった。構築した新規発現ベクターを、ヒト胎児性腎細胞株(HEK293)に導入して、目的とするウイルスの構成タンパク(HN蛋白質、M蛋白質)が産生されるかを、ウエスタンブロット法により確認した結果、細胞内で高レベルに発現されることが明らかとなった。

## (2) 生体高分子封入技術の開発

遺伝子を組み込んだプラスミドDNAを封入する場合には、封入に用いる界面活性剤としてTriton X-100を用いているが、蛋白質を封入する場合には界面活性剤による失活や構造変化を考慮する必要があるため、種々の界面活性剤を用いてスクリーニングを行った結果、Triton X-100 以外の非イオン性界面活性剤が、抗体の封入に適していることが明らかとなった。そこで、抗体蛋白質をバイオナノ粒子へ封入した後に、細胞へ導入できるかを検討した結果、ヒト細胞株(HeLa)に対して、封入した抗体蛋白質を高効率に導入できることが明らかとなった。更に生体高分子である抗体と低分子化合物である抗癌剤をバイオナノ粒子へ封入して、培養細胞への同時導入が出来るかについても検討した結果、標的細胞であるHeLa細胞に対して、両分子を同時導入した場合には、抗体の導入と細胞増殖の阻

害が同時に認められることが明らかとなった。

## (3) バイオナノ粒子精製技術の開発

変異型センダイウイルス用いてニワトリ胚より産生されるバイオナノ粒子を材料として精製法の検討を行った結果、バイオナノ粒子の濃縮・精製には、ウイルス粒子などで一般的に使用されているシュークロース密度勾配遠心法は適しておらず、平膜型限外濾過膜を用いた方法や、精製用樹脂による方法が適していることが明らかとなった。これらの精製法はいずれも医薬品製造での実績がある事、スケールアップにも容易に対応出来ることから、バイオナノ粒子の実用化に適した方法である。また、粒度分布計と電子顕微鏡により、精製したバイオナノ粒子の性状を検討した結果、目的のバイオナノ粒子は、表面に膜融合活性に重要なセンダイウイルスのFタンパク(fusion protein)を持つ粒子径100~200ナノメートルの空粒子であることが明らかとなった。

## (4) バイオナノ粒子の修飾による標的化技術の開発

バイオナノ粒子を修飾せずに静脈内投与すると脾臓に遺伝子導入ができることが明らかとなった。また、蛍光オリゴを用いた検討により、主に脾臓の marginal zone に存在する CD11c 陽性の樹状細胞に取り込まれることが明らかとなった。更に HVJ エンベロープベクターは  $6 \times 10^9$  個までであればマウスに対して傷害性は示さずに遺伝子を導入できる事が明らかとなった。

バイオナノ粒子を正電荷型ポリマーである硫酸プロタミンで修飾すると、静脈より投与した場合には肺に標的化され、脾臓への遺伝子導入は認められなくなることが明らかとなった。また、蛍光オリゴを用いた検討により、主に肺胞細胞と肺の血管壁に取り込まれることが明らかとなった。バイオナノ粒子をポリエチレン修飾したカチオン化ゼラチンで修飾して、静脈より投与した場合には、全くどの臓器にも遺伝子導入は認められなかった。バイオナノ粒子をヘパリンで修飾してラットの脳脊髄液内に大漕から投与すると、延髄、小脳の細胞や脈絡叢の細胞に遺伝子導入が認められた。また、骨格筋内への投与でも、ヘパリンによる修飾が導入効率の向上に有効であることが明らかとなった。

#### D. 考察

生産法の検討では、本年度の研究で大阪大学由来のセンダイウイルスZ株より目的とするウイルス構成蛋白質(F蛋白質、HN蛋白質、M蛋白質)をコードする遺伝子断片のクローニングを行い、医薬品製造用にも使用実績のあるヒト培養細胞株で、実際に目的のウイルス蛋白質を発現出来ることを明らかにした。また、ウイルス遺伝子の発現ベクターを改良する事により、細胞に対して毒性が現れることが示唆されているウイルス蛋白質でも、目的のヒト細胞株で産生することが出来ることが明らかとなった。今後は、目的とするバイオナノ粒子の産生量と性能を高めるために、ベクター産生用に使用する遺伝子のスクリーニングや他のウイルス構成蛋白質と組み合わせた発現についても検討する必要がある。

生体高分子の封入に関しては、本年度の研究により抗体医薬等が封入できることが明らかになっただけでなく、抗癌剤などの低分子医薬との組み合わせも出来ることが明らかとなった。今後は、動物の疾患モデルを使用して、バイオナノ粒子による治療用生体高分子の導入の有効性を検討する必要がある。

精製技術に関しては、医薬品製造での実績がある上、将来臨床応用を行う場合に必要となるスケールアップにも対応出来る精製法を確立したが、本年の研究ではニワトリ胚を用いて材料となる粒子を調製したため、今後ヒト培養細胞で産生したバイオナノ粒子を使用して、濃縮法、精製法の再検討を行う必要があると考えられる。

標的化に関しては、本年度の研究により表面電荷の修飾やポリマー等による修飾により *passive targeting* が出来ることが明らかとなったが、今後は表面蛋白に抗体やペプチドリガンドなどを結合させることで、目的の臓器への標的化を可能にする *active targeting* についても検討を試みる必要があると考えられる。

#### E. 結論

本年度の研究により、バイオナノ粒子(HVJ-E非ウイルスベクター)の臨床での実用化に必要なウイルスフリーの粒子生産法、生体高分子封入法、精製技術、標的化技術に関する基礎的な知見を得た。今後は、安全性・安定性など臨床研究を開始するために必要となる試験のための基礎データの取得を行うために必要な研究・開発を行い、数年以内に臨床

応用を開始することを目指す。

#### F. 健康危険情報

特になし。HVJをアルキル化剤であるベータプロピオラクトンで不活性化して作成した第一世代のHVJエンベロープベクターでも感染性は認められず、安全性が高いことが明らかになった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

**Kaneda, Y.**, Nakajima, T., Nishikawa, T., Yamamoto, S., Ikegami, H., Suzuki, N., Nakamura, H., Morishita, R., and Kotani, H.: HVJ (hemagglutinating virus of Japan) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Molecular Therapy* 6, 219-226, 2002.

Shimamura, M., Morishita, R., Endoh, M., Oshima, K., Aoki, M., Waguri, S., Uchiyama, Y., and **Kaneda, Y.**: HVJ-envelope vector for gene transfer into central nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 300, 464-471, 2003.

##### 2. 学会発表

Kaneda, Y.: Development of HVJ envelope vector for in vitro and in vivo transfer of plasmid DNA, oligonucleotides and proteins. 5<sup>th</sup> Annual meeting of the American Society of Gene Therapy 2002年6月7日, Boston

Nakajima, T. et al.: Development and Manufacturing of HVJ (hemagglutinating virus of Japan) - Envelope Vector for Gene Therapy. 5<sup>th</sup> Annual meeting of the

American Society of Gene Therapy 2002年  
6月6日, Boston

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

“ゲノムライブラリーの迅速スクリーニングおよび高効率遺伝子機能解析方法” 特願  
2002-337545



厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

## バイオナノ粒子による治療用生体高分子デリバリーシステムの開発 「ウイルスフリーのバイオナノ粒子生産技術の開発」

分担研究者 福村 正之、金森 俊英 アンジェス MG 株式会社、応用研究部

**研究要旨** ウイルスフリーのバイオナノ粒子生産技術の開発を行うために、HVJ を構成する膜蛋白質であるF蛋白質、M蛋白質、HN蛋白質の遺伝子クローニングを行ない、塩基配列確認後に、蛋白質発現用ベクターへの組み込みを行った。作製したベクターを用いて遺伝子発現と蛋白質発現を、無細胞系と培養細胞への導入のそれぞれで確認を行ったところ、目的の遺伝子・蛋白質の発現が認められた。今後作製した細胞を用いて、バイオナノ粒子産生用細胞系の確立を行う。

### A. 研究目的

現在のバイオナノ粒子の製造では、培養細胞にウイルス（HVJ）を感染させて培養液中に産生される野生型ウイルス粒子を回収して、不活性化処理とウイルスゲノムの除去処理を行うことで、物質を封入するための空ベクターを得ている。最近ウイルスを構成する数種類のタンパクを細胞で発現すると、培養液中にウイルスゲノムを持たない空の粒子が放出されることが明らかとなった。この粒子は、物質導入に必要なタンパク質を含んでいることから、大量に得ることが出来ればベクターを製造する際に不活性化処理とウイルスゲノム除去処理を行う必要がなくなるため、従来法と比較して安全性の向上と製造工程の簡略化が出来ることが期待できる。そこで、本製造技術開発では、生産用細胞に組換えタンパクを発現させることで、高効率にバイオナノ粒子を得る研究開発を行う。

### B. 研究方法

(1) 構成蛋白質遺伝子のクローニング  
構成蛋白質(F蛋白質、M蛋白質、HN蛋白質)の遺伝子クローニングには、大阪大学で細胞融合能を指標にして樹立されたセンダイウイルスのZ株を用いた。鶏卵を用いて増殖したウイルス粒子を、遠心法により部分精製を行った後に、市販のウイルスRNA分離キット(QIAGEN社、QIAamp Viral RNA Mini Kit)を用いてゲノムRNAの精製を行った。精製したウイルスゲノムRNAを用いて SuperScript First-strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen 社) により逆転写反応を行って、RNA/DNAのハイブリッド分子を合成した後に、それを鋳型としてDNAポリメラーゼ(Vent、NEB 社)を用いたPCR法により、目的の遺伝子を含むDNA断片を調製した。それぞれの遺伝子断片を、精製後に制限酵素(Kpn I、Xho I、Bam HI)により

両端を分解した後に、発現ベクター (pcDNA3.1)への組み込みを行った。遺伝子を組み込んだ発現ベクターを大腸菌(DH5 $\alpha$ )へ導入して、目的の遺伝子が正方向に組み込まれた大腸菌のコロニーをスクリーニングすることで、遺伝子のクローニングを行った。

#### (2) 遺伝子配列の確認

目的の遺伝子を組み込んだ発現ベクターをもつ大腸菌をF:32クローンM:33クローンHN:93クローン増殖して、発現ベクターの大量調製を行った。調製したプラスミドDNAを鋳型として、目的の遺伝子内の配列に対して400塩基間隔でプライマーを合成して、5'側と3'側それぞれの方向から塩基配列の決定を行った。最終的に得られたクローニングした遺伝子の塩基配列情報を、データベースに登録されている配列と比較して、塩基の置換やアミノ酸配列の置換の有無を確認した。

#### (3) 無細胞系によるベクター性能の確認

ウイルスの構成蛋白遺伝子のクローニングに使用したベクターは遺伝子組み込み位置の5'側にT7ポリメラーゼのプロモーター配列を含んでいるため、目的の遺伝子の配列が確認された発現ベクターを鋳型として用いて、T7ポリメラーゼにより予測されるサイズの転写産物が合成されるかを検討した。また、T7ポリメラーゼによる反応で得られたmRNAを用いてウサギ網状赤血球(Reticulocyte)を利用した無細胞翻訳シス

テムにより、タンパクの合成を行い、SDS電気泳動により目的のサイズのタンパク質の有無を確認した。

#### (4) 培養細胞によるタンパク発現確認

T7ポリメラーゼと無細胞タンパク質合成系により、目的のタンパク質の発現が認められたベクターを用いて、実際の培養細胞内での遺伝子発現について確認を行った。細胞としては、センダイウイルスの産生に標準的に使用されているサル細胞株(LLC-MK2)と、遺伝子治療用のベクター製造に使用されているヒト細胞株(HEK293)を用いた。それぞれの細胞に、ウイルスの構成蛋白質の遺伝子を組み込んだ発現ベクターをFuGENE6非リポソーム試薬(ロシュ社)で導入して、1-5日間培養後に目的の遺伝子の発現を、免疫染色法により確認した。

#### (5) 新規発現ベクター系の開発

センダイウイルスの構造蛋白質は、細胞に毒性を持つことが示唆されているため、目的の蛋白質を高レベルに発現する細胞株を樹立するために、発現誘導型ベクターへの遺伝子組換えを行った。そのため、目的の遺伝子の断片をpcDNA3.1ベクターから制限酵素Kpn Iにより切り出しを行い、アガロースゲル電気泳動法によりベクター断片より分離して、目的のバンドに相当する部分のゲルを調製してBIO 101 Gene Clean II Kitにより精製した。精製した遺伝子断片は、SwaIで切断した新規発現ベクター

(pCALNdLw)へ組み込みを行ない、大腸菌(DH5 $\alpha$ )へ導入した。目的の遺伝子が組み込まれた発現ベクターを含む大腸菌を F:21 コロニー M:6 コロニー HN:21 コロニー miniprep し制限酵素処理により確認して選択することで、クローニングを行った。

#### (6) ベクター導入細胞株の樹立

構築を完成した発現ベクターを含む大腸菌のクローンを大量培養して、プラスミドDNAの調製を行った。培養した大腸菌からのプラスミド調製には市販のプラスミド精製キット(QIAGEN社)を用いた。調製したプラスミドを制限酵素 F:XhoI-PstI M:XhoI-HindIII HN:XhoI-SacI で切断して構築を確認した後に、培養細胞へFuGENE6 非リポソーマル試薬(ロシュ社)により導入した。発現ベクターにはネオマイシン抵抗性遺伝子が含まれるため、G418を含む培地中で培養を行うことで、目的の遺伝子発現ベクターが導入された細胞の選択を行った。最終的に、G418存在下で増殖する細胞から、染色体DNAを調製して目的の遺伝子の配列に相当するプライマーを用いたPCR法により、染色体へのベクター組み込みを確認した。

#### (7) 樹立細胞でのタンパク発現の確認

発現ベクターの組み込みが認められた細胞を用いて、目的の蛋白質の発現を確認した。組み込まれたベクターから不要な配列を除去して目的の蛋白質の発現を誘導するために、アデノウイルスベクターを導入

する事により遺伝子組換え酵素(Cre蛋白質)の供給を行った。Cre蛋白質によりベクターの組換えを行った標的細胞内でのタンパク発現は、ウエスタンブロット法により確認した。

#### (8) 倫理上の配慮

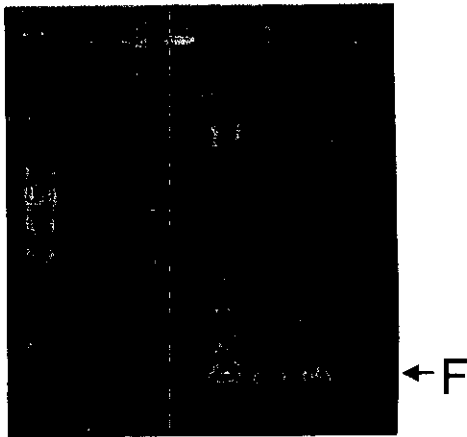
本研究を実施するにあたり、アンジェス MG 株式会社は、研究所の所在地である独立法人 産業総合技術研究所の規定に従い、国で定められている、組換え DNA 実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業総合技術研究所で開催される各委員会で実験許可を受けてから実験を行っております。また、実験に従事するものの安全確保についても、産業総合技術研究所の規定に従い、年に 1 回行われる実験の安全講習に参加し、健康診断も受けて実験従事者の健康管理も確保しております。以上のように、本研究は倫理面の配慮をしたうえで実施されております。

### C. 研究結果

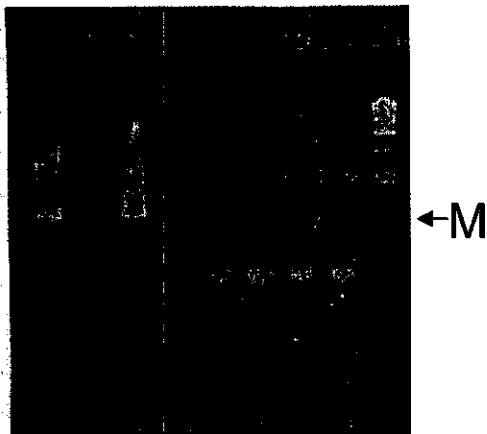
#### (1) 構成蛋白質遺伝子のクローニング

センダイウイルスの構成タンパク(F蛋白質、M蛋白質、HN蛋白質)を培養細胞で発現するために、それぞれの遺伝子をベクター産生に実績のあるZ株(大阪大学・遺伝子治療学講座由来)のゲノムRNAよりRT-PCR法で増幅した。その結果、使用したDNAポリメラーゼにより目的のサイズの遺伝子断片を得た(図1)。

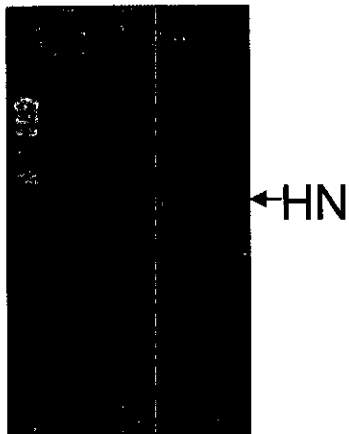
図 1



PCR ( F gene )



PCR ( M gene )

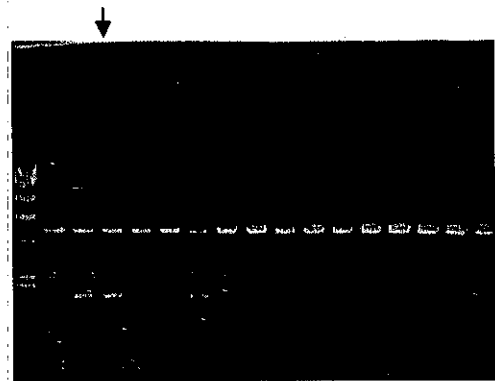


PCR ( HN gene )

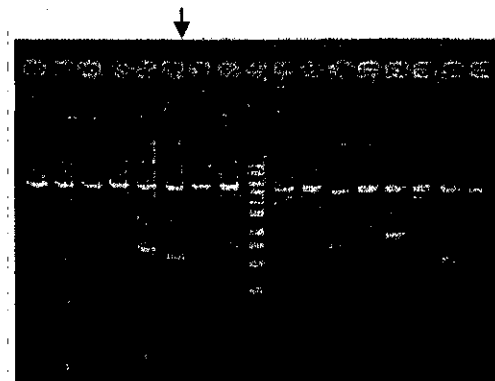
得られた遺伝子断片を用いて、細胞で目的のウイルス蛋白質を発現するためのベク

ター構築を行った。上記のようにして得た、ウイルスの構成蛋白質をコードするDNA断片を、哺乳類細胞で活性が高いことが知られているCMVプロモーターを持つベクター (pcDNA3.1、Invitrogen 社) への組み込みを行った。その結果、目的の遺伝子が正しい方向に組み込まれたプラスミドを得た (図 2)。

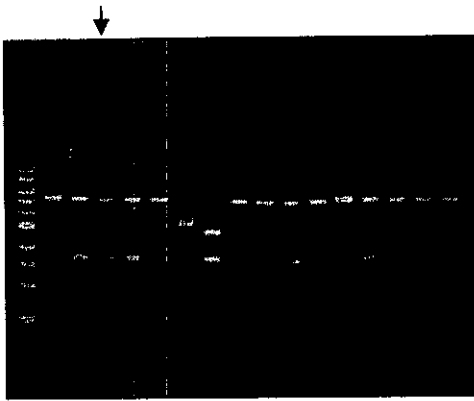
図 2



pcDNA3.1-F (miniprep)



pcDNA3.1-M (miniprep)



**pcDNA3.1-HN (miniprep)**

センダイウイルスには種々の株があることが知られており、それぞれの株によりウイルスゲノムの配列が異なることが知られている。また、同じ株でも由来によりゲノム配列に多様性が認められることが知られている。組換え蛋白質を用いて医用材料を製造する場合には、製造用細胞に組み込んだ遺伝子の配列に突然変異が認められないことを確認する必要があるため、発現ベクターの構築に使用した各遺伝子の配列を確認する必要がある。そこで、実際に大阪大学由来のZ株のウイルスゲノムを用いてクローニ

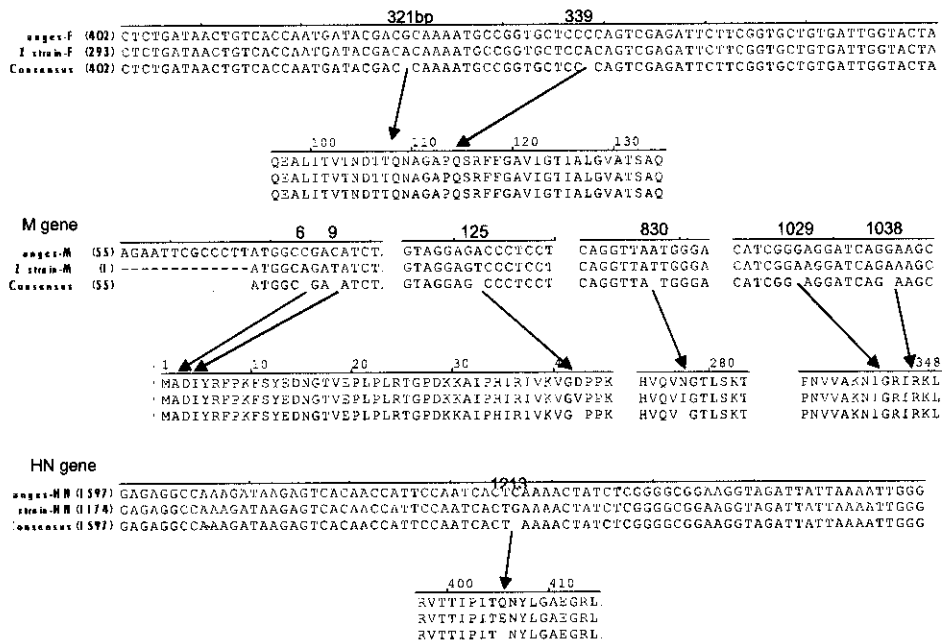
ングされた遺伝子断片の塩基配列を決定して、データベースに登録されているZ株の遺伝子配列との比較を行った(図3)。

その結果、用いた3種類のウイルス遺伝子の中でF蛋白については塩基配列とアミノ酸配列でそれぞれ2ヶ所と0箇所の置換が、M蛋白については塩基配列とアミノ酸配列でそれぞれ6ヶ所と2ヶ所の置換が、HN蛋白については塩基配列とアミノ酸配列でそれぞれ1ヶ所と1ヶ所の置換が、それぞれ認められることが明らかとなった(図3A、図3B、図3C)。それぞれの遺伝子の配列データについては、今後実製造に細胞を使用する場合の基礎データとして、社内の管理された場所に保管を行った。

(2) 発現ベクターの性能確認

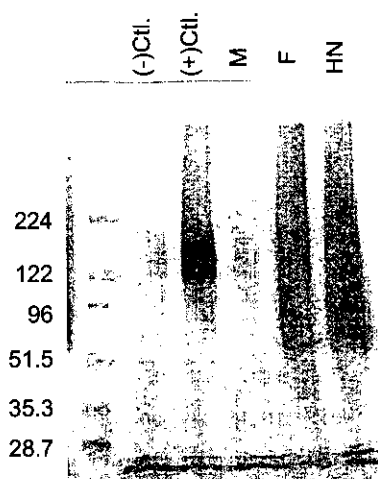
構築した発現ベクターの性能を確認するために、目的の遺伝子からの転写産物の産生と、タンパク発現の有無を検討した。構

図3.



築に用いたベクター(pcDNA3.1)には、T7ポリメラーゼのプロモーター配列が存在しているため、最初にT7ポリメラーゼによる転写を行った後に、無細胞の翻訳システムを用いて蛋白質発現の有無を検討した。その結果、構築した3種類の発現ベクター(F蛋白質、M蛋白質、HN蛋白質)から、目的のサイズの蛋白質が発現されることが明らかとなった(図4)。

図4.

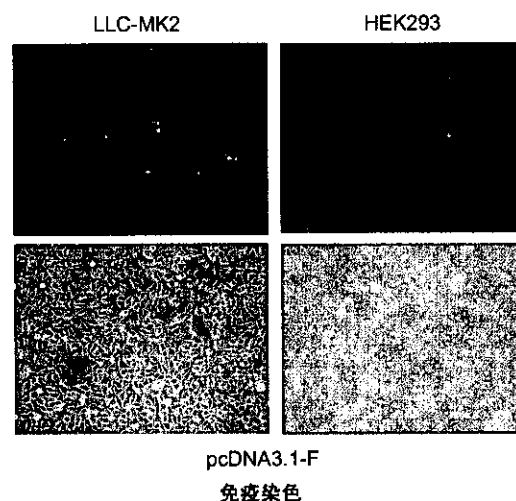


### In vitro translation

この結果から、クローニングされた遺伝子の配列にはデータベースに登録されている配列と相違点が認められたが、タンパク質産生の面で機能的な問題はなく、実際に目的の蛋白質が産生されることが明らかとなった。次に実際に培養細胞に導入した場合でも、構築したベクターからの遺伝子発現により蛋白質の産生が認められるかを検討した。標的細胞としては、センダイウイルスの産生に標準的に使用されているサル腎細胞株(LLC-MK2)と、遺伝子治療用

ベクター産生に使用されているヒト胎児性腎細胞株(HEK293)を用いた。それぞれの細胞に、構築したベクターを導入して目的の蛋白質の発現が認められるかを、免疫染色法により検討を行った結果、ベクターを導入することで目的の蛋白質が一過性に産生されることが明らかとなった(図5)。

図5.



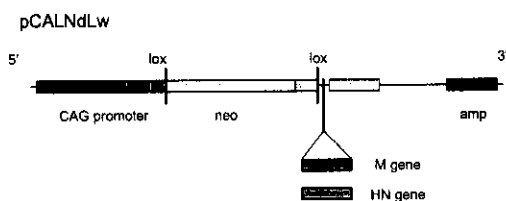
この結果から、構築したベクターに含まれる遺伝子発現用プロモーターは細胞内で機能すること、クローニングした遺伝子は実際にヒト細胞内で目的の蛋白質を産生する機能を持つことが明らかとなった。

### (3) 新規発現ベクター系の開発

上記の研究により、クローニングしたウイルス遺伝子により、細胞内で目的の蛋白質が発現されることが明らかとなったが、発現用ベクター(pcDNA3.1)に含まれるサイトメガロウイルスプロモーター(CMVプロモーター)より性能が高いプロモーター配列としてニワトリのアクチン遺伝子のプロモーターと

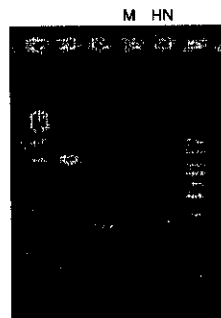
CMVプロモーターとを組み合わせた配列 (CAGプロモーター、図 6) が知られている。

図6.



また、一般にウイルス由来の蛋白質を pcDNA3.1 のようなベクターを用いて細胞内で恒常的に発現すると、細胞に対して毒性が現れるために、遺伝子の発現レベルが低い細胞しか生存できない事から、高発現クローンを得るのが困難である事が知られている。そこで、空ベクター粒子の産生量向上を目指して、HN蛋白質とM蛋白質のそれぞれをコードする遺伝子について、CAGプロモーターを持つ遺伝子発現用ベクターへの組換えを行った。そのために目的の遺伝子を、pcDNA3.1 を基本骨格とする発現ベクターより単離を行い(図 7)、CAGプロモーターを持つベクターへの組み込み新規発現ベクターの構築を行った(図 8)。

図7.



切り出し

図8.



pCALNdLw-M (miniprep)

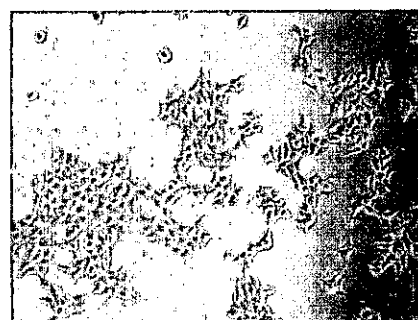


pCALNdLw-HN (miniprep)

(4) ベクター導入細胞株の樹立とタンパク発現の確認

構築した新規発現ベクターを、ヒト胎児性腎細胞株(HEK293)に導入して、発現ベクター内に含まれるネオマイシン耐性遺伝子をマーカー遺伝子として、G418存在下で培養を行うことで、目的の発現ベクターが組み込まれた細胞を選択した(図 9)。

図9.

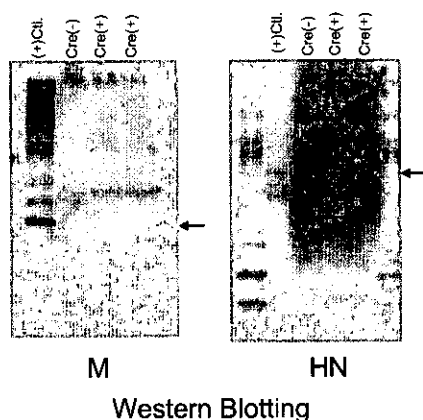


HEK293形状

標的細胞の染色体への発現ベクターの組み込みは、目的の蛋白質の安定的発現に重要であるため、ゲノムDNAを鋳型とした

PCR法により検討を行ったところ、導入されたベクターは実際に染色体へ組み込まれていることが明らかとなった。そこで、組み込まれた発現ベクターから、目的とするウイルスの構成タンパク(HN蛋白質、M蛋白質)が産生されるかを、ウェスタンブロット法により確認した。その結果、目的のウイルス蛋白質が、ベクターを導入した細胞内で高レベルに発現されることが明らかとなった(図10)。

図10.



#### D. 考察

本年度の研究では大阪大学由来のセンダイウイルスZ株より目的とするウイルス構成蛋白質(F蛋白質、HN蛋白質、M蛋白質)をコードする遺伝子断片をクローニングした。塩基配列確認の結果、得られたウイルス遺伝子の配列にはデータベースに登録されているセンダイウイルスZ株のゲノム配列と比較してアミノ酸の置換を含む数箇所の配列上の相違が認められた。そこで、クローニングした遺伝子が機能を持った遺伝子であるかについて、T7ポリメラーゼを用いた転写産物の解析、無細胞翻訳系による蛋白質産生能の解

析、培養細胞を用いた遺伝子発現解析により検討した結果、大阪大学由来のZ株から分離したウイルス遺伝子から、実際に目的の蛋白質が発現されることが明らかとなった。これらの結果から、確認された遺伝子・アミノ酸配列の置換に起因する遺伝子の機能不全はないことが示唆された。大阪大学のZ株は細胞融合能を指標に単離されていることから、ウイルスのゲノム配列内に存在するそれらの変異は、産生されるベクターの膜融合活性を増強している可能性が示唆される。今後は、目的とするベクターの産生量と性能を高めるために、ベクター産生用に使用する遺伝子について、Z株以外のウイルス株も含めてスクリーニングする事も考慮する必要がある。また、センダイウイルスが感染した細胞では増殖の抑制が認められるため、ウイルスタンパクの発現により細胞に対して毒性が現れることが示唆されていたが、今回の研究により使用するウイルス遺伝子の発現ベクターを改良する事により、ヒト細胞株でも目的のウイルス蛋白質を産生することが出来ることが明らかとなった。今後、センダイウイルスの蛋白質を高発現するヒト細胞株からの、ベクター粒子の産生量について検討を行う。

#### E. 結論

大阪大学由来のセンダイウイルス(Z株)のゲノムから、ベクター産生に必要な遺伝子をクローニングした。塩基配列を確認した結果、数箇所にデータベースに登録された配列との相違が認められたが、実際にタンパク質をコードする遺伝子配列であることが確認された。また、医用材料の生産実績のあるヒト培養細胞(HEK293細胞)で、センダイウイルスの構成タンパク質(HN蛋白質、



M蛋白質)を、高発現することが出来ることが明らかとなった。今後ベクターの産生量についても検討を行う。

#### **F. 健康危険情報**

特になし。

#### **G. 研究発表**

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

#### **H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)**

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし

## バイオナノ粒子による治療用生体高分子デリバリーシステムの開発 「生体高分子封入技術の開発」

分担研究者 福村正之、河野博和 アンジェス MG 株式会社 応用研究部

研究要旨 抗体医薬やサイトカイン製剤など蛋白質を成分とする医薬品が先端医薬品として開発されているが、それらの医薬品の標的分子は受容体など細胞外分子に限定されている。現在、ゲノム解析やプロテオーム解析などにより、疾患に関与する蛋白質の同定が精力的に進められているが、病因に関与する蛋白質には、シグナル伝達因子や転写因子など細胞内で機能する分子が多く存在している。抗体医薬やドミナントネガティブ変異体蛋白質を細胞内へ直接投与することが出来るようになれば、病因に関与する細胞内蛋白質の機能を制御することが出来るため、新規治療用生体高分子の開発を通じて難治性疾患の治療に繋がると考えられる。そこで、本研究では治療用生体高分子である抗体蛋白質をバイオナノ粒子へ封入して、直接細胞内へ導入することが出来るかについて検討した。また、同時に低分子医薬品である抗癌剤と、標的細胞に対して同時に導入できるかについても検討した。

### A. 研究目的

従来の技術では粒子内への遺伝子封入は可能であったが、*ク*パ<sub>ク</sub>質（抗体、癌抗原、転写因子、シグナル伝達因子）などが封入出来るかは不明であった。生体高分子を直接細胞内に導入することが出来れば、細胞や生体臓器の機能を制御できるため、新しい*ク*パ<sub>ク</sub>の医薬品開発につながると期待される。また、癌細胞の増殖抑制に関与する蛋白質や癌抗原を高効率に細胞に導入できれば、免疫療法などにより癌治療の有効性を向上できるため、新規治療法の開発に繋がると期待出来る。そこで本研究では新規治療技術の開発を目指して、生体高分子（抗体蛋白質）をバイオナノ粒子へ封入するための条件検討と、抗がん剤など既

存の低分子化合物を抗体蛋白質とを同時に封入するための条件についての検討を行なう。また、生体高分子と低分子化合物を封入したバイオナノ粒子により、実際に細胞の機能制御が出来るかについても検討を行う。

### B. 研究方法

#### (1) 抗体蛋白質の封入

バイオナノ粒子へ遺伝子を組み込んだプラスミドDNAを封入するには、Triton X-100 が使用されている。そこで、Triton X-100 をコントロールとして使用して、イオン性および非イオン性の界面活性剤の濃度、封入時間、封入温度の検討を行うことで、抗体蛋白質を封入する条件の検討を

行った。また、生体高分子である抗体蛋白質と低分子化合物である抗癌剤の封入についても、同様に検討を行ったが抗癌剤の失活が起こらないことを指標として界面活性剤スクリーニングを行った。バイオナノ粒子へ封入した生体高分子の導入には、ヒト細胞株であるHeLa細胞を使用した。抗体蛋白質の導入効率、蛍光標識(Alexa 標識)した抗ウサギ Ig G を用いてバイオナノ粒子への封入を行い、導入後1時間で蛍光顕微鏡下において観察することで評価した。抗癌剤の導入効率は、細胞の増殖をWST試薬で検出することで評価した。

## (2) 倫理上の配慮

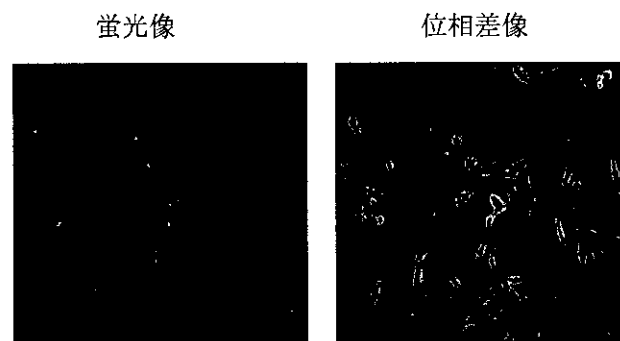
本研究を実施するにあたり、アンジェスMG 株式会社は、研究所の所在地である独立法人 産業総合技術研究所の規定に従い、国で定められている、組換えDNA実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業総合技術研究所で開催される各委員会にて実験許可を受けてから実験を行っております。また、実験に従事するものの安全確保についても、産業総合技術研究所の規定に従い、年に1回行われる実験の安全講習に参加し、健康診断も受けて実験従事者の健康管理も確保しております。以上のように、本研究は倫理面の配慮をしたうえで実施されております。

## C. 研究結果

遺伝子を組み込んだプラスミドDNAを封入する場合には、封入に用いる界面活性剤としてTrito

n X-100 を用いている。DNAをバイオナノ粒子に封入する場合には界面活性剤により失活しないが、蛋白質を封入する場合には界面活性剤による失活や構造変化を考慮する必要がある。特に抗体医薬などを封入する場合には、その構造や活性が医薬品としての有効性に重要であるため、界面活性剤を用いてスクリーニングを行った結果、Triton X-100 以外の非イオン性界面活性剤が、抗体の封入に適していることが明らかとなった。そこで、同定された界面活性剤を用いて、抗体蛋白質をバイオナノ粒子へ封入した後に、封入した抗体を細胞へ導入できるかを検討した。その結果、ヒト細胞株(HeLa)に対して、封入した抗体蛋白質を高効率に導入できることが明らかとなった(図1)。

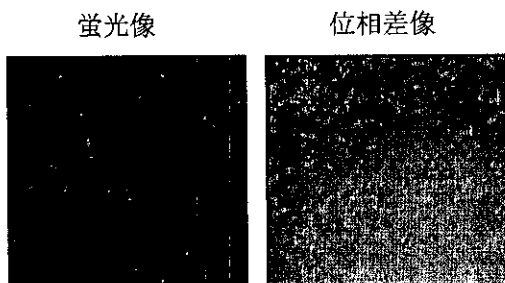
図1. 抗体蛋白質の導入(HeLa 細胞)



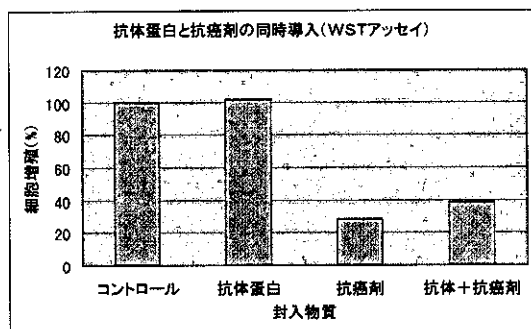
更に生体高分子である抗体と低分子化合物である抗癌剤のバイオナノ粒子への同時封入や、培養細胞への同時導入が出来るかについても検討を行った。その結果、抗体と抗癌剤を同時に封入したバイオナノ粒子を用いて細胞への導入を行った場合や、抗体と抗癌剤を別々に封入したバイオナノ粒子を混合して、標的細胞に同時導入した場合には、抗体の導入と細胞増殖の阻害が同時に認められることが明らかとなった(図2A、図2B)。

図2. 抗体蛋白と抗癌剤の同時導入(HeLa細胞)

A. 顕微鏡観察



B. 細胞増殖



これらの結果から、バイオナノ粒子により、蛋白質などの生体高分子と低分子医薬品である抗癌剤を同時封入したり、標的細胞に同時導入したりする事が可能であることが明らかとなった。

D. 考察

本研究により、バイオナノ粒子へ生体高分子であり医薬品として製品化されている抗体蛋白質を封入して、細胞内へ直接導入できることが明らかとなった。これにより、シグナル伝達因子や転写因子など細胞内の蛋白質を標的とする抗体医薬の開発が可能となるため、バイオナノ粒子を用いた新規治療技術の開発が期待される。また、本研究の結果、バイオナノ粒子を利用すれば生体高分子である抗体と低分子医薬品である抗癌剤を、分子の活性を維持した状態で細胞へ同時導

入できることが明らかとなった。現在の抗癌剤は単剤では治療効果が十分ではないため、複数の抗癌剤や放射線療法を併用する治療法が取られている。それらの治療法に加えてバイオナノ粒子により抗体医薬や細胞増殖を抑制する蛋白質を同時に癌細胞へ導入することが出来るようになれば、治療の有効性が大幅に高まることが期待される。また、バイオナノ粒子を用いて腫瘍抗原を導入することが出来れば、癌の免疫療法の有効性が大幅に高まることが期待できる。今後は、バイオナノ粒子を医薬品として実用化するために動物モデルを用いた有効性の評価を中心に検討を行なう。

E. 結論

バイオナノ粒子に、生体高分子で医薬品として実用化されている抗体分子を封入して、細胞内へ直接導入することが可能となった。また、抗体蛋白質と低分子医薬品である抗癌剤を同時にバイオナノ粒子へ封入して、標的細胞へ導入することが出来ることが明らかとなった。これらの結果、バイオナノ粒子の医薬品としての応用範囲の拡大と、抗体蛋白質など生体高分子を成分とする医薬品開発の標的分子を細胞内蛋白質とする事が可能となった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表 : なし
2. 学会発表 : なし