

200400187A

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に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小谷 均

平成 17(2005)年 3月

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に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小谷 均

平成 17(2005)年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

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に関する研究----- 1
小谷 均 (ジェノメディア株式会社)

II. 分担研究報告

1. 磁性高分子による遺伝子・細胞治療制御のための技術開発----- 7
金田 安史 (大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学・教授)
2. バイオナノ粒子の安全性・有効性向上に関する研究----- 11
中島俊洋、長澤鉄二、矢野高広、井岡進一、天満昭子、鈴木七保、宮地和恵
加藤麻矢子、山内利栄、山崎継子 (ジェノメディア株式会社)
3. バイオナノ粒子による新規癌免疫療法の開発----- 22
福村正之、河野博和 (ジェノメディア株式会社)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 32

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 33

「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 ジェノメディア株式会社

研究要旨 本研究では、大阪大学とジェノメディア株式会社が共同開発しているバイオナノ粒子（HVJ-エンベロープベクター）の臨床応用を目指して研究を行なった。本年度の研究では磁性体粒子を利用した物理的標的化技術の開発、バイオ医薬としての確認申請に必要な製造用材料（マスターバンク）の開発、作製した治験薬製造用マスターバンクにより製造したバイオナノ粒子の安全性・有効性に関する基礎データの取得、癌への臨床応用を目指して進めている新規癌免疫療法の開発について研究を行ない、臨床応用の開始に必要なデータの取得を進めることが出来た。また、今後数年以内に臨床応用を開始することを想定して、治療対象となる疾患領域の選定についても進め、膀胱癌など癌免疫療法に適した癌について、本バイオナノ粒子と抗癌剤との併用による治療の有効性について検討を行った。

分担研究者

金田 安史

（大阪大学大学院 遺伝子治療学・教授）

中島 俊洋

（ジェノメディア株式会社・取締役 CTO）

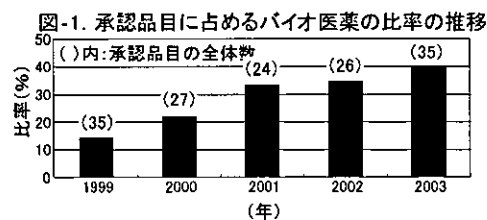
福村 正之

（ジェノメディア株式会社 応用研究部・マネージャー）

ためには、従来のような低分子化合物を中心とした医薬品ではなく、バイオ医薬や細胞治療のような新しい概念に基づく先端医薬品や先端治療技術を開発する必要があると考えられる。実際、世界各国の製薬メーカーが進出している米国市場において、新規に製品化される医薬品に占める、バイオ医薬品の割合は年々増加傾向にあり、2003年には40%に達している状況である（図-1）。

A. 研究目的

現在国民医療費の高騰が問題となっており、高齢化社会に向けて、どのように対応していくのが活発に議論されている。特に、医療費削減のために、死因の上位を占める癌、心筋梗塞、脳虚血や慢性病など難治性疾患に対して安全で有効性の高い治療薬を開発する事が切望されている。そのような治療薬開発の



また、新規医薬品として遺伝子医薬や核酸医薬などゲノム解析の成果を利用した治療薬の開発も注目されている。しかし、現状では

先端バイオ医薬や治療技術の開発は、国外の製薬企業やベンチャーに依存しており、そのライセンス料・ロイヤリティの負担が医療費高騰の一因となっている。そこで、本研究開発においては有効性と安全性が高い治療薬・治療技術の開発により、国民医療費の削減に貢献する事を目的として、純国産技術による新規治療技術開発のために研究を行なった。

ジェノメディアが、大阪大学と産学共同で開発中のバイオナノ粒子（HVJ-エンベロープベクター）は、遺伝子医薬や核酸医薬など、次世代のバイオ医薬品のデリバリーシステムとして有用である上に、既存医薬品との併用による新規治療技術の開発にも有用である事が示唆されている。昨年度までの研究で、安全性に関する基礎データの取得、癌治療に対する有効性の基礎データの取得、製造用材料（マスター細胞バンク：MCB）の整備を行なった。そこで、本年度はマスター細胞バンクと同様に、確認申請において重要である HVJ のマスターウイルスバンク（MVB）を整備し、MCB と MVB を使用して製造したバイオナノ粒子の安全性・有効性について検討を行った。また、実際の臨床応用の対象疾患を想定して、癌に対する治療効果のメカニズムの解析、種々の抗癌剤との併用効果についても検討した。更に、全身投与時を可能にして治療薬としての汎用性を拡大する目的で、磁性体粒子を利用した標的化技術についても検討を行った。

B. 研究方法

(1) 磁性体粒子による標的化技術の開発
バイオナノ粒子である HVJ-E の標的化のため

めに、昨年度までの研究では化学的な修飾による手法を検討した。そこで、本年度は磁性粒子を用いて、磁場制御による物理的な方法で標的化を試みた。直径 20-50 nm の正に帯電した（Zeta Potential 14mV）酸化鉄の磁性粒子を、硫酸プロタミンで修飾する事で作製した磁性高分子を、プラスミド DNA を封入した HVJ-E ベクターと混合して培養細胞に添加し、磁場を利用して遺伝子導入効率が増強されるかを検討した。また生体組織への標的化の効率を検討するため、ヘパリンで修飾した磁性粒子を、GFP 発現プラスミドを封入した HVJ-E ベクターと混合してマウス肝臓に導入し、遺伝子発現の増強を検討した。

(2) 治験薬製造用バンク（MVB）の作製

治験薬製造用に使用する HVJ のマスターウイルスバンクの作製のために、ATCC より購入した HVJ の 2 株を用いて、ヒト培養細胞株を使用したプラーク形成法により 2 サイクルのクローニングを行った。そして、バイオナノ粒子の産生能を指標にしてクローン選択を行なった後に、シードストックを 2 種類作製した。作製したストックのそれぞれに対して必要な検査を行なった後に、GMP パイロットプラント内でマスター細胞バンクを使用して、マスターウイルスバンクを 2 ロット作製した。整備したマスターウイルスバンクは、マイナス 80 度の超低温冷凍庫で保存し、一部のサンプルを使用して、無菌性、種々の病原ウイルスの混入等の項目に関して、GLP 基準での（Good Laboratory Practice、医薬品安全性試験実施基準）検査を実施した。

(3) マスターバンクで製造したバイオナノ粒子の安全性・有効性評価

バイオナノ粒子の原料として、作製した MCB、MVB を使用して、バイオリクターシステムにより製造を行った。製造用には、MCB 由来の浮遊化したヒト培養細胞株 (293 細胞) と、完全無血清培地を使用した。HVJ を含む培養上清をアルキル化剤 (ベータプロピオラクトン) により処理を行ない、ウイルスゲノムの不活性化を行った後に、原理の異なる 3 種類のカラムクロマトグラフィー法により精製して不純物の除去を行った。安全性の確認には空ベクター粒子を、有効性の検討には NF κ B デコイ核酸封入粒子を使用した。

(4) 新規癌免疫療法技術の開発と薬効メカニズムの解析

癌免疫誘導について検討には、マウスの同系癌細胞を用いた腫瘍モデルを使用した。基本的には Balb/c マウス由来の皮内に大腸癌細胞株 (CT-26) 細胞を移植するモデル系を用い、アドリアマイシンとの併用効果の検討では、B6 マウスの皮内に膀胱癌細胞株 (MB49) 細胞を移植するモデル系を用いた。薬効メカニズムの解析は、CTL の活性化、サイトカイン産生、樹状細胞の分化・成熟の誘導を指標にして検討を行った。また、癌免疫の持続性は、原発巣の腫瘍消失後 25 週目に、皮内または腹腔内へ癌細胞を再移植して生着の阻害を指標にして検討を行った。

(5) 抗癌剤との併用効果の検討

シスプラチンと HVJ-E の併用効果の検討では、Balb/c マウスと大腸癌細胞株 (CT-26) による腫瘍モデルを使用し、アドリアマイシンと HVJ-E との併用効果の検討については B6 マウスと膀胱癌細胞株 (MB49) を用いて検討した。HVJ-E ベクターは、3 日~4 日間隔で 3 回腫瘍内に連続投与を行い、シスプラチンについては 1mg/kg または 3mg/kg の用量でベクターを投与する前日に単回腹腔内へ、アドリアマイシンについては、1 回の投与あたり 100ug を 3 日~4 日間隔で 3 回連続腫瘍内へ、それぞれ投与した。それぞれの併用効果については、投与開始後の腫瘍径を指標として検討を行った。

(6) 倫理上の配慮

本研究を実施するにあたり、ジェノメディア株式会社は、研究所の所在地である独立法人産業技術総合研究所の規定に従い、国で定められた組換え DNA 実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業技術総合研究所で開かれる各委員会の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は、産業技術総合研究所の規定に従い、年に 1 回行われる安全講習に参加し、健康診断を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。

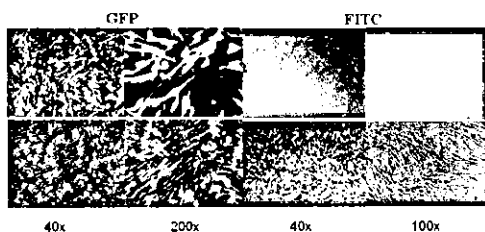
C. 研究結果と考察

(1) 磁性高分子による遺伝子・細胞治療制御のための技術開発

本研究では、バイオナノ粒子である HVJ-E

ンベロープベクター (HVJ-E) の汎用性を向上するために、全身投与を行った場合でも標的化出来る技術の開発を行った。昨年度までは、主に化学的修飾による標的化を行って評価していたが、本年度の研究では新規原理に基づく方法として、磁性粒子を利用した方法での標的化技術の確立を試みた。磁性体粒子を硫酸プロタミンやヘパリンで修飾し、遺伝子封入 HVJ-E を混合して培養細胞や、生体臓器への遺伝子導入効率を検討した結果、磁性体粒子による標的化により、HVJ-E による遺伝子導入効率が増強する事が明らかとなった (図-2)。

図-2. 磁性体粒子による標的化
Evaluation of Transfection Efficiency
by GFP or FITC-ODN



今後、生体組織用の磁気制御装置が完成すれば、さらに特定組織へのベクター誘導やベクターの停留が可能になり、高効率の標的導入を実現できると考えられる。なお安全性に関しては、酸化鉄自体は貧血の治療として既に臨床で使用されており、今後磁性コロイドを GMP 基準下で製造すれば十分に医療に使える素材と考えられる。

(2) 治験薬製造用バンク (MVB) の作製

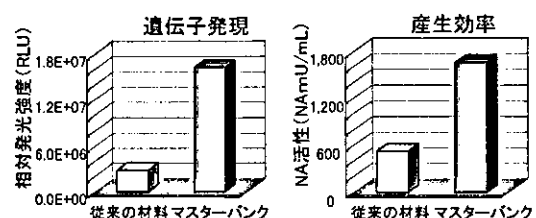
本研究で開発しているバイオナノ粒子を治療薬として臨床応用するためには、ヒトに対する安全性と医薬品としての有効性が確認さ

れている必要がある。昨年度までの研究で、製造用材料としてマスター細胞バンクの整備を行ったため、本年度はバイオナノ粒子の原料となる HVJ についてマスターバンクの作製を行なった。ATCC より購入した HVJ の Z 株をクローニングして、高産生クローンを選択し、マスター細胞バンクを使用して GMP パイロットプラント内で 150 バイアルの凍結ストックを作製した。作製したウイルスバンクの一部を使用して、確認申請に必要と考えられる項目について GLP 試験を行い、マスターウイルスバンクとした (図-3)。また、バンキングしたウイルスを使用して、バイオナノ粒子の生産を行ったところ、従来の HVJ を使用した場合と比較して、HVJ の生産量で 3.2 倍、遺伝子導入を指標とした性能面で 5.7 倍以上の生産効率の向上が認められた (図-4)。

図-3. マスターウイルスバンク (HVJ-Z株)



図-4. 作製したマスターバンクによる粒子生産効率



(3) 空ベクター粒子の安全性・有効性確認

臨床応用のために整備したマスターバンク

(細胞+ウイルス) を使用して製造したバイオナノ粒子について、安全性と有効性を検討した。その結果、従来使用していた材料で製造した場合と比較して、致死量を指標とした安全性が向上する事が明らかとなった(図-5)。

図-5. 作製したバンクで製造したバイオナノ粒子の安全性

サンプル	従来材料		マスターバンク	
	雄	雌	雄	雌
TBS	0/5	0/5	0/5	0/5
HVJ-E (低用量)	0/5	0/5	0/5	0/5
HVJ-E (中用量)	0/5	0/5	0/5	0/5
HVJ-E (高用量)	2/5	3/5	0/5	0/5

(致死動物数/投与動物数)

また、有効性に関しては、炎症性疾患の動物モデルを使用して検討を行なったところ、核酸医薬を封入したバイオナノ粒子により炎症に対する治療効果が認められた。これらの研究により、整備を行ったマスターバンクで製造したバイオナノ粒子の基本的な安全性・有効性の向上を確認することが出来た。

(4) バイオナノ粒子による新規癌免疫療法の開発

本年度の研究では、バイオナノ粒子であるHVJ-エンベロープベクター (HVJ-E) による新規癌免疫療法の開発について検討を行った。癌細胞を移植した腫瘍動物モデルでの検討で、抗癌剤封入 HVJ-E を腫瘍組織に投与する事で、長期間継続性のある癌免疫を誘導できることが明らかとなった。また、そのメカニズムに関する検討で、HVJ-E により、癌細胞に対して特異的な細胞障害性Tリンパ球 (CTL) の誘導、樹状細胞 (DC) の分化・成熟の誘導、サイトカインの誘導により長期継続性の癌免疫が誘導される事が明らかとなった(図-6、7)。

図-6. HVJ-Eベクターによる癌細胞に対する免疫誘導

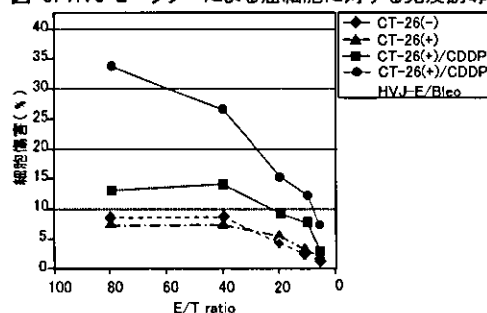
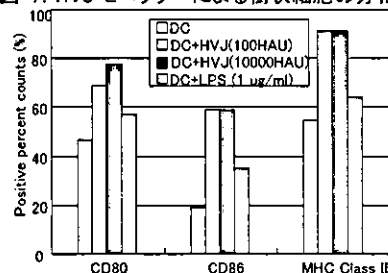


図-7. HVJ-Eベクターによる樹状細胞の分化誘導



更に、シスプラチン、アドリアマイシンなどの抗癌剤との併用でも、抗腫瘍効果の増強が認められることが明らかとなった。これらの結果から、バイオナノ粒子であるHVJ-Eを利用した治療により、従来の癌免疫療法において解決すべき課題となっていた、癌免疫の長期維持が可能になることが示唆された。

D. 結論

本年度の研究により、バイオナノ粒子であるHVJ-Eの標的化技術を磁性体粒子の利用により確立する事が出来た。また、HVJ-Eの臨床応用に必要な製造用材料の整備を完了する事が出来た。さらに、HVJ-Eを利用した新規癌免疫療法は、持続性があるだけでなく種々の抗癌剤との併用により有効性が増強される事が明らかとなった。今後、臨床応用の開始に必要な安全性、薬効薬理、GMP製造などに関するデータを取得して、数年以内に臨床応用を開始することを目指して研究を継続する。

E. 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

別添資料参照

2. 学会発表

- 「Development of HVJ-E High Throughput Gene Function Screening System: Screening of Endothelial Cell Growth Factors」, Tomoyuki Nishikawa, Hironobu Nakagami, Chiah Yian Yo, Yasufumi Kaneda、The American Society of Gene Therapy’ s 7th Annual Meeting、2004年6月2日 - 6日、米国・ミネアポリス
- 「A Novel Therapeutic Strategy To Treat Brain Ischemia:Over-Expression of Hepatocyte Growth Factor Gene Reduced Ischemic Injury without Cerebral Edema in Rat Model」 Munehisa Shimamura, Naoyuki Sato, Toshio Ogihara, Yasufumi Kaneda, Ryuichi Morishita、The American Society of Gene Therapy’ s 7th Annual Meeting、2004年6月2日 - 6日、米国・ミネアポリス
- 「Improvement of Myocardial Dysfunction by Therapeutic Angiogenesis Induced by Transfection of HGF Gene Using Left Ventricular Electromechanical Mapping in Porcine Chronic Myocardial Infarction

Model」、Junya Azuma, Yosiaki Taniyama, Motokuni Aoki, Yasuhumi Kaneda, Toshio Ogihara, Ryuichi Morisita、The American Society of Gene Therapy’ s 7th Annual Meeting、2004年6月2日 - 6日、米国・ミネアポリス

G. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

“ウイルスエンベロープからなる免疫アジュバント” 特願 2004-108599(国内出願中)

2. 実用新案

なし

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）

分担研究報告書

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 「磁性高分子による遺伝子・細胞治療制御のための技術開発」

分担研究者 金田安史 大阪大学医学系研究科 教授

研究要旨 本研究では、バイオナノ粒子である HVJ-エンベロープベクター (HVJ-E) の汎用性を向上するために、全身投与を行った場合においても標的化することが出来る技術の開発を行った。昨年度までは、主に化学的修飾による標的化を行って評価していたが、本年度の研究では新規の原理に基づく方法として、磁性粒子を利用した物理的な方法による標的化技術の確立を試みた。磁性体粒子を硫酸プロタミンやヘパリンで修飾したサンプルと、遺伝子封入 HVJ-E を混合して培養細胞や、生体臓器への遺伝子導入効率を検討した結果、磁性体粒子による標的化は HVJ-E による遺伝子導入効率の増強に対して、高い効果がある事が明らかとなった。

A. 研究目的

バイオナノ粒子である HVJ-E ベクターを汎用性の高い医用材料とするためには、特定の臓器や腫瘍などに標的化する技術の開発が非常に重要な技術的課題である。

遺伝子導入の標的化には大きく2つのアプローチが考えられる。1つはベクターに組織特性を保持させる方法で、従来開発が進められてきた。もう1つはベクター自身を人為的に体外からコントロールする方法である。後者の代表的な方法は磁性体によるベクター誘導である。我々は磁性粒子を用いて遺伝子ベクターを修飾し、それらを目的の組織にまで誘導させて治療効果を増強するための技術開発を試みた。

B. 研究方法

磁場制御が可能な装置の開発は共同研究者

である工学部の西嶋教授が開発中であるので、我々はそれに利用するベクター開発を行った。用いた磁性粒子は直径 20-50 nm の酸化鉄で正に帯電している (Zeta Potential 14mV)。我々はこの粒子で遺伝子導入ベクターである HVJ envelope (HVJ-E) vector の表面を修飾し磁場による遺伝子導入効率の増強の検討を行った。検討の結果、HVJ-E そのものを磁性粒子で修飾するのではなく、硫酸プロタミンを磁性粒子で修飾して磁性高分子を作成した。これを、プラスミドを封入した HVJ-E ベクターと混合して培養細胞に添加し、磁場を利用して遺伝子導入を行った (図-1)。

また、生体組織への遺伝子導入のため、ヘパリンで磁性粒子をコーティングし、これを GFP 遺伝子を封入した HVJ-E ベクターと混合してマウス肝臓に導入し、遺伝子発現を調べた。

Combination with coating magnetite and HVJ-E vector

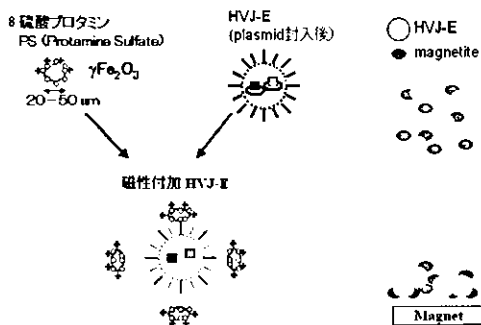


図-1

C. 研究結果

1) 硫酸プロタミンでコートした磁性粒子を用いることにより遺伝子導入効率が上昇し、中でも HVJ-E ベクターと併用すると飛躍的（硫酸プロタミンを用いない場合の20-30倍、磁性粒子を用いない場合の2-3倍）に遺伝子導入効率の増強が可能になった。また、安全性の評価として培養上清中の LDH の量を測定した。細胞上清中の LDH 濃度の検討では、細胞約1万個あたり10ugの使用までであればLDHの上昇は認めなかった(図-2)。

遺伝子導入効率(Luciferase活性)と細胞毒性(LDH)の検討

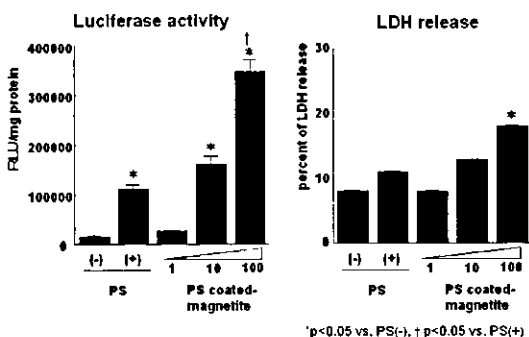


図-2

2) 上述の方法により用いる HVJ-E ベクター量を従来の 1/5 に減少させても同等以上の遺

伝子導入効率を得た (図-3, 図-4, 図-5)。

遺伝子導入効率(Luciferase活性)と細胞毒性(LDH)の検討

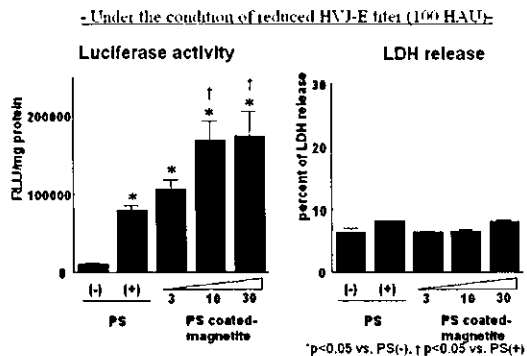


図-3

Evaluation of Transfection Efficiency by GFP or FITC-ODN

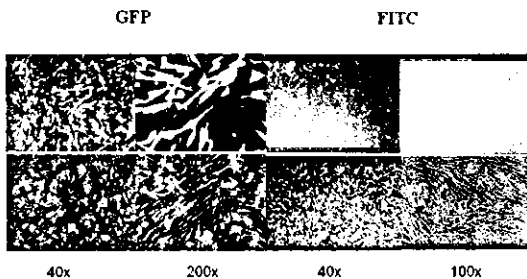


図-4

結果

Magnetite(磁性粒子)の表面を硫酸プロタミンでコーティングしたものをHVJ-Eに「加える」ことにより、遺伝子導入効率は向上した。

また、HVJ-Eのtiterを5分の1に減少した条件下で磁性粒子を用いた遺伝子導入を行うことにより、従来方法と同等以上の遺伝子導入効率を得ることができた。

次にマウスの肝臓に直接注射注入することによる遺伝子導入効率を検討した。

図-5

3) 肝臓への遺伝子導入には硫酸プロタミンでコートした磁性粒子では逆に遺伝子導入効率が低下した(図-6)。そこで負電荷をもつヘパリンでコートした磁性粒子を作成し、これを HVJ-E ベクターと混合して肝臓被膜下に導

入するとヘパリンを用いない場合の約4倍の遺伝子発現を得た(図-6, 図-7)。肝臓障害も認めなかった(図-8)。しかしヘパリンコートは培養細胞でははたらかなかつた(図-6, 図-9)。

遺伝子導入効率(Luciferase活性)の検討

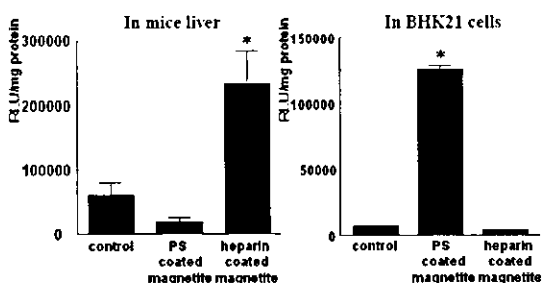


図-6

肝臓局所でのGFP遺伝子発現

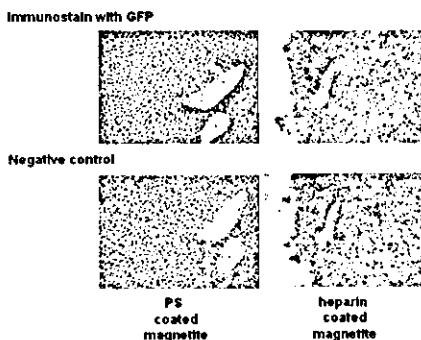


図-7

肝臓への遺伝子導入による肝細胞への影響

	GOT	GPT	LDH
HVJ-E only	266 ± 32	205 ± 43	804 ± 79
HVJ-E/PS coated magnetite	411 ± 95	147 ± 21	1113 ± 166
HVJ-E/HS coated magnetite	297 ± 45	161 ± 91	803 ± 55

図-8

結果

マウスの肝臓に直接注入して遺伝子導入効率を検討した結果、Magnetite(磁性粒子)あるいはその表面を硫酸プロタミンでコーティングしたものをHVJ-Eに加えても、遺伝子導入効率の向上はなかった。一方、その拮抗作用を有するヘパリンでコーティングした磁性粒子をHVJ-Eに加えることにより遺伝子導入効率は増加した。

一方、培養細胞でこれら2つの異なる表面修飾された磁性粒子を検討してみたが、ヘパリンでコーティングした磁性粒子をHVJ-Eに加えたものは培養細胞では遺伝子導入効率を増加させなかった。

培養細胞と生体局所では遺伝子導入に最適な磁性粒子表面修飾物質が異なる可能性が示された。

図-9

D. 考察

生体高分子で磁性粒子をコーティングし磁性高分子を作成し、これにより HVJ-E ベクターを修飾することにより培養系でも生体組織でも遺伝子導入効率を増強できることがわかった。

本研究で開発している HVJ エンベロープベクターは直径が 200~300 nm のバイオナノ粒子であり、ヒト培養細胞株により製造されるためリポソームやナノ粒子のような合成粒子のように粒子サイズの調節は困難であり、それ以外の標的化技術が必要とされている。

本年度の研究により、磁性体粒子と磁力による標的化が有効である事が明らかとなり、体外からの磁力による物理的方法での標的化が可能である事が示唆された。現在並行して制御技術についても研究が進められており、生体組織用の磁気制御装置が完成すれば、更に特定組織へのベクター誘導やベクターの停留が可能になり、高効率の標的導入を実現できると考えられる。なお安全性に関しては、酸化鉄自体は貧血の治療として既に臨床で使用されており、今後磁性コロイドを GMP 基準下で製造すれば十分に医療に使える素材と考えられる。

E. 結論

本研究により HVJ-E の標的化には、従来開発していた化学的修飾に加えて、磁性体粒子との混合による修飾で、物理的に標的化する方法も有効である事が明らかとなった。

HVJ-E は、遺伝子など次世代の医薬品のデリバリーシステムとして汎用性が高いシステムである。その応用範囲を更に拡大するためには、局所投与による治療法への適応に加えて、全身投与を行って特定の臓器や、固形癌などの疾患組織に医薬品を集積させて効果を高める治療法への適応が重要である。

今後は、これまでに確立した、化学的修飾、物理的修飾、或いはそれらの修飾の組み合わせにより HVJ-E ベクターを特定の疾患組織に集積させる事で、治療効果や安全性が向上するについて検討を行う。

結語

磁性粒子を最適な表面物質で修飾して付与することで HVJ-Eベクターの遺伝子導入効率を増加させることができることが示された。

将来的な磁性粒子を用いた局所集積能の高いベクター開発の可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし。HVJ を不活性化して作成した HVJ エンベロープベクターは全く感染性がないことが明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表

添付資料参照

2. 学会発表

➤ 「Development of HVJ-E High Throughput

Gene Function Screening System: Screening of Endothelial Cell Growth Factors」, Tomoyuki Nishikawa, Hironobu Nakagami, Chiah Yian Yo, Yasufumi Kaneda、The American Society of Gene Therapy's 7th Annual Meeting、2004年6月2日-6日、米国・ミネアポリス

➤ 「A Novel Therapeutic Strategy To Treat Brain Ischemia:Over-Expression of Hepatocyte Growth Factor Gene Reduced Ischemic Injury without Cerebral Edema in Rat Model」 Munehisa Shimamura, Naoyuki Sato, Toshio Ogihara, Yasufumi Kaneda, Ryuichi Morishita、The American Society of Gene Therapy's 7th Annual Meeting、2004年6月2日-6日、米国・ミネアポリス

➤ 「Improvement of Myocardial Dysfunction by Therapeutic Angiogenesis Induced by Transfection of HGF Gene Using Left Ventricular Electromechanical Mapping in Porcine Chronic Myocardial Infarction Model」、Junya Azuma, Yosiaki Taniyama, Motokuni Aoki, Yasuhumi Kaneda, Toshio Ogihara, Ryuichi Morisita、The American Society of Gene Therapy's 7th Annual Meeting、2004年6月2日-6日、米国・ミネアポリス

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

2. 特許取得

“ウイルスエンベロープからなる免疫アジュバント” 特願 2004-108599 (国内出願中)

2. 実用新案登録

なし

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）

分担研究報告書

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
「バイオナノ粒子の安全性・有効性向上に関する研究」

分担研究者 中島俊洋、長澤鉄二、矢野高広、井岡進一、天満昭子、鈴木七保、
宮地和恵、加藤麻矢子、山内利栄、山崎継子
ジェノミディア株式会社

研究要旨 本研究で開発しているバイオナノ粒子を治療薬として臨床応用するためには、ヒトに対する安全性と医薬品としての有効性が確認されている必要がある。昨年度までの研究で、製造用材料としてマスター細胞バンクの整備を行ったため、本年度はバイオナノ粒子の原料となるHVJについて、マスター細胞バンクを使用してGMPパイロットプラント内でマスターウイルスバンクの整備を行った。また、臨床応用のために整備したマスターバンク（細胞＋ウイルス）を使用して製造したバイオナノ粒子について、安全性と有効性を検討した。安全性に関しては、マスターバンク作製用に整備した材料で製造を行ったバイオナノ粒子を、封入物質を含まない空粒子の状態と、安全性に関する基礎データを取得した。その結果、従来使用していた材料で製造した場合と比較して安全性が向上することが明らかとなった。また、有効性に関しては、炎症性疾患の動物モデルを使用して検討を行なったところ、核酸医薬を封入したバイオナノ粒子により炎症に対する治療効果が認められた。これらの研究により、整備を行ったマスターバンクにより製造したバイオナノ粒子の基本的な安全性・有効性を確認することが出来た。

A. 研究目的

本研究で開発しているバイオナノ粒子を治療薬として臨床応用を開始するためには、ヒトに対する安全性と医薬品としての有効性が確認されている必要がある。そのためには、医用材料としての品質レベルまで、不純物の除去と精製を行った材料を使用して、安全性と有効性の確認を行う必要がある。また、本研究で開発中のベクターはヒト培養細胞を使用して製造する予定であるためバイオ医薬の

範疇に分類される事が予測されるため、臨床応用を開始するためには製造用原料についても病原ウイルスや病原微生物などの検査を行ない、ヒト病原体の混入が認められないことを確認する必要がある。昨年度までの研究により、製造用材料としてマスター細胞バンクの整備を行ったが、バイオナノ粒子の原料となるHVJについてはバンクの整備を行ってなかった。また、実際に整備したマスター細胞バンクやHVJのウイルスバンクを使用して製造したバイオナノ粒子の、安全性・有効性

についての検討は行っていなかった。

そこで、本年度の研究ではベクターを臨床応用するための安全性向上を目的として、GMP 準拠のパイロットプラントで原料となる HVJ についてマスターウイルスバンクの調製を行い、GLP 基準に従って病原ウイルス等の検査を行い、臨床応用時に問題となる病原体の混入がない事を確認した。また、整備した細胞バンクやウイルスバンクを使用して製造したバイオナノ粒子の安全性・有効性の確認を実験動物を使用して実施した。安全性に関する基礎データの取得を行った。

B. 研究方法

(1) マスターウイルスバンクの調製

製造用に使用する HVJ のマスターウイルスバンクの整備は、前年度の研究で整備を行ったマスター細胞バンクを使用して、GMP パイロットプラント内で行った。まず、ATCC より購入した HVJ の Z 株を、SPF 発育鶏卵（日生研）に接種して増殖させ、凍結ストックを作製した。その後、ヒト培養細胞株（293 細胞）に感染させて、プラークの形成を行うことでクローニングを行った。クローニングを行ったプラークは、再度 SPF 発育鶏卵（日生研）に接種して増殖させ、クローニングしたウイルスの調製を行った。この手順を 2 サイクル繰り返すことで、ウイルスのクローニングを行った。

クローニングした HVJ の各クローンについて、バイオナノ粒子の産生能をヒト培養細胞株（293 細胞）で検討し、産生能の高いクロー

ンの選択を行った。高い産生能を示した HVJ クローンより、鶏卵由来成分を除去するために、更にヒト培養細胞株（293 細胞）でのプラーク形成と、プラークから回収した HVJ のヒト培養細胞株（293 細胞）での増殖を数回実施して、マスターウイルスバンク調製用の種ウイルスとした。

種ウイルスは、ウイルス力価、無菌性、ニワトリウイルスの混入などを試験した後に、GMP パイロットプラント内で、マスターウイルスバンクの整備に使用した。マスターウイルスバンクの整備には、マスター細胞バンクを使用した。種ウイルスを、完全無血清培地で浮遊培養した 293 細胞に感染させ、2 日間培養して HVJ の増殖を行うことで、ウイルスを含む培養液を調製した。細胞を遠心処理により除去した後に、HVJ を含む培養上清に 10%メチルセルロースを添加して、マイナス 80 度で凍結して、マスターウイルスバンクとした。整備したマスターウイルスバンクは、マイナス 80 度の超低温冷凍庫で保存した。

マスターウイルスバンクの検査は、無菌性、種々の病原ウイルスの混入等の項目に関して、GLP（Good Laboratory Practice、医薬品安全性試験実施基準）検査として実施した。

(2) バイオナノ粒子の調製

本年度の研究では、バイオナノ粒子の原料となる HVJ を増殖するために、バイオリアクターシステムを使用して、ヒト培養細胞株（293 細胞）を、無血清培地を用いて浮遊状態で高密度培養して使用した。293 細胞の密度が至適条件になるまで培養を行い、ATCC よ

り購入後にクローニングした HVJ を細胞へ感染させ、2～4日間培養を継続してバイオナノ粒子の原料を得た。培養上清は、混入している細胞や脂質等の残渣を除去するために、 $2,000\times g$ で20分間、4度の温度条件で遠心して、その上清を精製用原料として使用した。

培養上清中の HVJ 粒子を、ワクチン製造などで使用実績があるアルキル化剤（ベータプロピオラクトン）により処理を行ない、ウイルスゲノムの不活性化を行った。

混入したウイルスの不活性化処理を行った後のサンプル溶液は、原理の異なる3種類の精製用樹脂を用いたカラムクロマトグラフィー法により精製して不純物の除去を行った。精製後のサンプルは、活性の低下を防止するために添加剤を混合して、マイナス80度で保存した。このような方法で調製したバイオナノ粒子は、無菌性、エンドトキシン混入レベル、遺伝子導入活性など基本的な品質試験を行った後に使用した。

安先生確認のための空ベクター粒子を得るために、バッファー溶液を用いて界面活性剤による封入操作を行った。封入操作後は、使用時までマイナス80度でサンプルを保存して、使用直前に融解操作を行なって、以下の安全性確認に用いた。また、有効性の検討のために使用した核酸医薬についても、同様に界面活性剤による処理により封入を行って使用した。

(3) 静脈内投与による安全性の確認

7週齢のCrj:CD-1 (ICR) 系統の雄マウスを、各用量群あたり5匹用いて、安全性に関する

検討を行なった。検討に使用するマウスはすべて日本チャールス・リバー株式会社より購入した。各マウスは、入荷時に外貌所見により、健康状態が良好であることを確認された後に、クリーンルーム施設において7日間以上馴化を行った。馴化期間中に異常が認められなかった動物(30匹)について、馴化最終日に5匹ずつ無作為に選抜して群分けを行って、新規マスターバンク由来の材料を使用して製造した空ベクター粒子の安全性検討に使用した。

群分けしたマウスの尾静脈より、予め設定した用量の空ベクター粒子をマウス1匹あたり100マイクロリットル投与して、安全性の確認を行った。

一般症状については、投与後に1日1回以上、7日間観察してデータを取得した。体重については、投与直前と観察期間中毎日測定を行ない、各測定日ごとの体重と各測定日間の体重増減量を算出した。

投与後7日目に、マウスに塩酸ケタミン(ケタラール、三共株式会社)を腹腔内投与して麻酔を行い、腹大動脈から採血した後に放血により安楽死させた。各動物について剖検を行ない、異常が認められた臓器については、10%ホルマリンで固定した後にパラフィン切片を作製した。各切片は、HE染色を施した後に鏡検した。

(4) 炎症疾患モデルの確立

6週齢のC57BL/10、SJL/J、C3H系統の雌マウスを、各用量群5～6匹用いて、炎症性消化器疾患モデルの構築を行った。試験に使用する

るマウスはすべて日本チャールス・リバー株式会社より購入した。マウスを入荷時に外貌所見を行い、健康状態が良好であることを確認した後に7日間以上馴化を行った。馴化期間中に異常がみられなかった動物(30匹)を馴化最終日に無作為に5~6匹ずつ選抜して群分けを行って、起炎剤であるTNBSの投与に使用した。

群分けしたマウスを、ハロセン麻酔下で肛門より50%エタノールに溶解したTNBSを、マウス経口用カテーテルを使用して、予め設定された用量のTNBSを投与した(マウス1匹あたり100マイクロリットルの用量)。TNBS投与後5日目に、マウスをハロセン投与による麻酔下で、放血により安楽死させた後に、各動物の大腸の炎症状態について剖検を行なった。

核酸医薬であるNF κ Bデコイオリゴ核酸を封入したバイオナノ粒子を投与して、その有効性を検討する場合には、TNBSの投与を行った後4時間目に、TNBS投与と同様に経口用ゾンデを用いた方法により投与を行った(マウス1匹あたり100マイクロリットルの用量)。

(5) 炎症疾患モデルでの有効性確認

7週齢のCrj;CD(SD)系統の雄ラットを用いて、炎症性消化器疾患モデルでの有効性確認を行った。試験に使用するマウスはすべて日本チャールス・リバー株式会社より購入した。ラットの入荷時に一般状態及び外観の観察を行い、健康状態が良好であることを確認した後に5日間以上馴化を行った。この間に健康と判断した動物を用いて大腸炎モデルを作製し

た。

大腸炎モデルの作製はペントバルビタールナトリウムにより麻酔下においたラットにフレキシブルの経口カテーテルを使用して、3.125mL/kgのTNBSあるいは33%エタノール/生理食塩水を直腸内(肛門から約8cm)に投与して行った。TNBS投与後2日目の被験物質投与初日に潜血便検査のスコアを測定し、大腸炎モデルとして薬物評価に適したラットを選定し、スコア及び体重が各群で均一になるよう1群12匹に群分けした。

NF κ Bデコイオリゴ核酸を封入したバイオナノ粒子の有効性を評価する場合は投与容量を0.75mL/ratとし、ラットをペントバルビタールナトリウム麻酔下においてフレキシブル胃ゾンデにより直腸内(肛門より約8cm)に投与した。また、陽性対象物質はフレキシブル胃ゾンデを用いて経口投与した。対照群には同容量の生理食塩水を投与した。

被験物質投与後6日目に肛門部から約15cmまでの大腸を採取し、腸管の充血、出血、潰瘍や腸壁の肥厚などの判定基準から大腸炎の状態を評価した。

(6) 倫理上の配慮

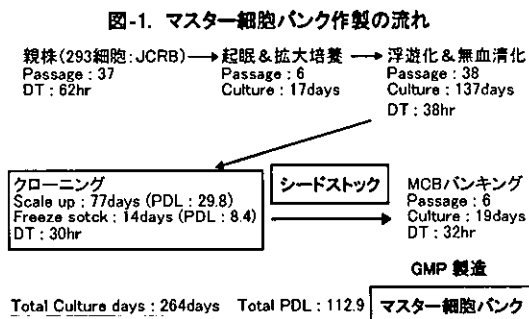
本研究を実施するにあたり、ジェノメディア株式会社は、研究所の所在地である独立法人産業技術総合研究所関西センターの規定に従い、国で定められている、組換えDNA実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業技術総合研究所で開催される各委員会で実験許可を受けてから実験を行っております。また、実験に従事するものの安全確保について

も、産業技術総合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. 研究結果および考察

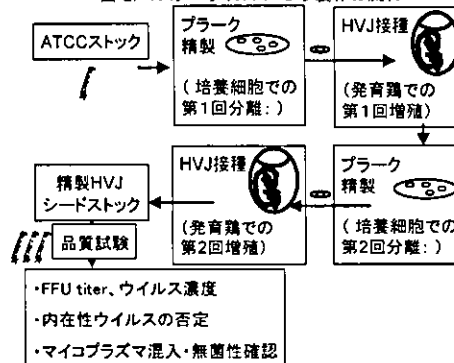
(1) マスターウイルスバンクの整備

昨年度の研究では、治験薬グレードのバイオナノ粒子製造のためにマスター細胞バンクを整備したことを報告した。その過程を図-1に示す。



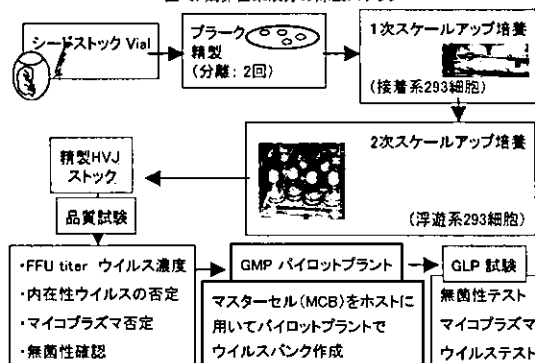
マスターバンク調製に必要な基本的な工程としては、クローニング、各クローンの性能確認とクローン選択、種細胞ストックの作製、マスターバンクの作製、マスターバンクの検査の5ステップとなる。製造用細胞の他にバイオナノ粒子製造のために整備が必要な原料は、細胞にバイオナノ粒子の原料を産生させるためのHVJである。そこで、細胞と同様のステップで、マスターウイルスバンクの作製を行った(図-2)。

図-2. マスターウイルスバンク製作の流れ



ウイルスのクローニングは、ヒト培養細胞293細胞を使用したブランク精製法により行い、得られたブランクを発育鶏卵で増殖したものを使用して、各クローンの性能確認を行った。バイオナノ粒子の産生量と、得られたバイオナノ粒子の遺伝子導入活性を指標にしてHVJクローンの評価を行い、2つのクローンを選択した。クローニングしたHVJを使用したバイオナノ粒子の生産効率は、従来のHVJを使用した場合と比較して3倍程度の向上が認められた(図-3)。

図-3. 鶏卵由来成分の除去ステップ



その後、鶏卵由来の不純物を除去する目的で、ヒト培養細胞293細胞を使用したブランク精製によるクローニングと、ヒト培養細胞293細胞による増殖を繰り返し行うことで、種ウイルスの調製を行った(図-4)。

図-4. クローニングしたHVJによる粒子生産効率

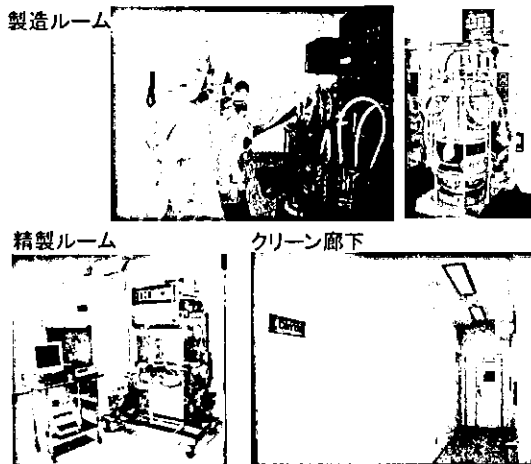
JP Lot	Seed Virus (Lot)	Final Vol (mL)	Final Product		
			NA (mu/mL)	HAU (HAU/mL)	Total HAU (HAU)
JP66	MGBI-40	307	626	4,096	1,257,472
JP67	MGBI-40	307	650	5,120	1,438,720
JP76	JPAN658	600	2,066	8,192	4,915,200
JP77	JPAN658	650	1,380	5,120	3,328,000

↓

HVJ生産量が3倍向上

種ウイルスストックは、マイコプラズマの混入、無菌性、ウイルス力価、鶏卵由来の不純物の混入について検査を行った後に、GMPパイロットプラント内で、マスターウイルスバンクの作製に使用した（図-5）。

図-5. GMP製造用パイロットプラント



マスターウイルスバンクの作製は、昨年度製作を行ったマスター細胞バンクの293細胞を用いて行った。BSE対策のためにヒトやウシ由来蛋白質を含まない完全無血清培地で293細胞を培養して（図-6）、種ウイルスストックを使用してHVJの産生を行ない、1ロットあたり250本～300本バイアルより構成されるウイルスバンクを2ロット作製して、超低温冷凍庫中で凍結保存を行った（図-7）。

図-6. 完全無血清培地での高密度浮遊培養

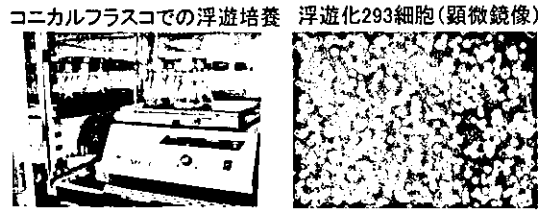
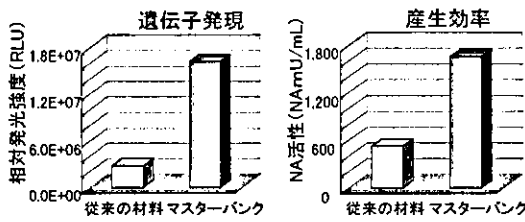


図-7. 作製したマスターウイルスバンクの保存



作製したウイルスバンクの一部を使用して病原ウイルスの混入、マイコプラズマの混入、無菌性など、バイオ医薬としての確認申請に必要なと考えられる項目についてGLP試験を行い、マスターウイルスバンクとした。バンキングしたウイルスを使用して、バイオナノ粒子の生産を行ったところ、従来のHVJを使用した場合と比較して、HVJの生産量で3.2倍、遺伝子導入を指標とした性能面で5.7倍以上の生産効率の向上が認められた（図-8）。

図-8. 作製したマスターバンクによる粒子生産効率



以上のように、昨年度のマスター細胞バンクに加えて、マスターウイルスバンクについても作製を完了し、バイオ医薬としての確認申請で承認を得るための製造用材料の整備と、書類の整備を行う事が出来た。

(2) 静脈内投与による安全性の確認

HVJ-E 非ウイルスベクターは赤血球凝集反応を惹起することが報告されているが、一般毒性学的な評価は実施されていなかったため、昨年度の研究で全身投与における一般毒性学的な検討をマウスで実施し、臨床応用に必要となる一般毒性に関するデータ取得を開始した。その結果についての概況を図-9に示す。

図-9. バイオナノ粒子の安全性試験の概況

1.単回静脈内投与毒性試験(マウス、全身投与)	
①10%致死量(LD10)：約160万HAU/kg	(想定最高用量≒16万HAU/kg)
②死因：症状、病理組織検査からは特定できず	
③一般症状：生存例では高用量群で自発運動の低下	
④体重変化：コントロール群に対して著しい変動なし	
⑤血液生化学検査：コントロール群に対して著しい変動なし	
⑥組織変化：尾先端部の壊死	
2.単回腹腔内投与毒性試験(マウス、肺へ局所投与)	
①致死量：最高用量(85万HAU/kg)でも死亡例なし	
②一般症状：特に無し	
③体重変化：コントロール群に対して著しい変動なし	
④組織変化：軽度な炎症性細胞の浸潤	
3.2回皮下投与毒性試験(マウス、アナフィラキシーショックの予備試験)	
①致死量：最高用量(325万HAU/kg x 2回投与)でも死亡例なし	
②一般症状：特に無し(アナフィラキシーショックは認められず)	
③体重変化：コントロール群に対して著しい変動なし	
④組織変化：軽度な炎症性細胞の浸潤	高用量群で限局的な腫瘍形成

全身投与経路である静脈内投与では、高用量群において溶血が原因と思われる影響や、体重の一時的減少が認められた。10%致死量(L

D10)は概算で約160万HAU/kgと想定される。現在、ガン免疫療法で想定している想定最高用量は16万HAU/kg程度であり、LD10の10%程度であることから、安全性に関する基礎データを取得できたと考えられる。また、死因については症状や病理組織検査からは特定できず、更に検討が必要であると考えられた。生存例での一般症状としては、高用量群で自発運動の低下が認められた。体重変化と血液生化学についての検討では、コントロール群に対して著しい変動は認められなかった。さらに、組織変化としては尾先端部の壊死が認められた。また、安全性に関する基礎検討として実施した溶血試験では、マウスとヒトの赤血球を使用して検討を行った結果、いずれの赤血球に対しても溶血活性が認められた(図-10)。

図-10. バイオナノ粒子による赤血球凝結・溶血試験

赤血球	サンプル	溶血率(%)
	TBS	0.0
ヒト赤血球	HVJ-E(10NAAmU/mL)	2.5
	HVJ-E(20NAAmU/mL)	3.6
	HVJ-E(40NAAmU/mL)	5.3
	HVJ-E(60NAAmU/mL)	7.8
	HVJ-E(80NAAmU/mL)	11.0
	HVJ-E(100NAAmU/mL)	14.6
マウス赤血球	HVJ-E(130NAAmU/mL)	29.9
	HVJ-E(330NAAmU/mL)	68.6
	HVJ-E(530NAAmU/mL)	87.3
	HVJ-E(730NAAmU/mL)	82.0
	HVJ-E(930NAAmU/mL)	90.1
	HVJ-E(1130NAAmU/mL)	96.5

更に、本年整備したウイルスバンクと同様にATCC由来のHVJのZ株を使用して製造した