

200400187 B

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 14 年度～16 年度 総合研究報告書

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 14 年度～16 年度 総合研究報告書

主任研究者 小谷 均

平成 17 (2005) 年 3 月

目 次

| | |
|---|----|
| I. 総合研究報告 | |
| 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----- | 1 |
| 小谷 均 (ジェノメディア株式会社) | |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表----- | 20 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷----- | 22 |

「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、バイオナノ粒子である HVJ-エンベロープベクター (HVJ-E) を利用して、主に癌を対象とした安全で有効性の高い新規治療薬の開発を行なった。3 年間の研究により、HVJ-E と抗癌剤との併用による新規癌免疫療法を開発し、その臨床応用に必要な基礎データ（薬効、安全性）と製造用材料の整備を完了すると共に、基本的な標的化技術についても確立する事が出来た。本研究の成果である新規癌免疫療法は、持続性があるだけでなく種々の癌の治療に対して有効である事が明らかとなり、癌の新しい治療法として期待できる。また、HVJ-E ベクターは遺伝子医薬や核酸医薬など次世代バイオ医薬の吸収促進にも有効であることから、今後それらの新規医薬品との組み合わせにより、治療効果を増強出来ると期待される。

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・マネージャー）

医療費高騰の原因となっており、それらの疾患を制圧するために画期的な先端医薬品や先端治療技術を開発する事が切望されている。

また、高騰する医療費の削減のためには、医薬品の開発費用や製造費用のコストダウンが必要となっている。特に、先端バイオ医薬や治療技術の開発は、国外の巨大製薬企業や欧米のベンチャー企業の開発力に依存しており、バイオ医薬の場合の試算結果では製品価格の約 15% から 25% を占めるとされている。

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高騰が社会問題となっている。医療費負担の問題は、少子化の問題とも関連しており、今後国民の健康維持と QOL の向上のためにどのような対応策をとるべきかについて、活発な議論が行なわれている。

特に死因の上位を占める癌、心筋梗塞、脳虚血の 3 大疾患や、難治性の慢性疾患に対しては、有効性の高い治療薬が少ない事から、

図-1. バイオ医薬品のコスト構造のイメージ

| | | | | |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|
| ロイヤルティ 売り上げの15~25% | 設備 投資 | 品質 管理 | 製造 経費 | 原材 料費 |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|

品質管理=(合成品の1.3~1.8倍)、設備投資=(合成品の3~10倍)

(平成 15 年 11 月 12 日付、日本製薬団体連合会の「薬価制度改革に対する意見」) の図より改変)

そのコストは、国外企業へのライセンス料・ロイヤルティの支払い負担となっており、国内の医薬品価格高騰の一因となっている（図-1）。

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の成果を活用して、ゲノミクス解析やプロテオミクス解析を行う事で、疾患の発症や進行に関与する遺伝子が同定されている。また、疾患遺伝子の同定と並行して、治療用遺伝子や治療用蛋白質についても、先進国が中心となって単離・同定が進められている。

そのようなアプローチにより同定された疾患遺伝子や治療用遺伝子の情報を利用して、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をバイオ医薬品として投与して、治療効果を行う方法がある。特に、後者の方法では、従来主流となっている低分子化合物に依存した創薬とは全く異なるアプローチとなるため、従来の医薬品よりも有効性が高い新しいタイプの医薬品が産み出される可能性が高い。また、そのようなアプローチで開発された新規先端医薬品を、従来型の医薬品と組み合わせる事により、より有効性の高い治療法が開発できると期待される。

このような背景のもと、病因となる遺伝子を直接標的として新規治療薬を行なう「ゲノム創薬」により、これまで治療が困難であった疾患に対し、有効性・安全性が高い新規医薬品を開発する動きが国内外で活発化してい

る。病因分子に対して直接作用する分子標的医薬は、従来の医薬品と比較して治療効果が高く、副作用軽減の面でも優れている事から、今後の医薬品開発の中心になると考えられる。現在分子標的医薬として期待されているのは、病因蛋白質に作用する抗体医薬であるが、遺伝子医薬や核酸医薬など病因遺伝子を標的とする医薬品も、次世代先端医薬として期待されている。それらの新規バイオ医薬の標的は、細胞内の遺伝子であるが、分子サイズが大きいため疾患細胞への吸収効率が低く、治療用分子として開発するのは困難とされていた。

ジェノメディアが、大阪大学と産学共同で研究開発を行っている新規バイオナノ粒子（HVJ-E 非ウイルスベクターシステム：以下HVJ-E）は、直径約200~300ナノメートルの膜融合活性を持つ微小粒子であり、内部に封入された先端治療薬を疾患組織や疾患臓器に対して高効率に導入する事が出来る。従来の合成リポソーム等と同様に、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、導入効率が高い事が特徴となっている。

そこで、本研究では純国産技術であるバイオナノ粒子（HVJ-E）を利用して、有効性と安全性が高い新規治療薬を開発することを目的として研究開発を行った。また、従来の医薬品では治療が困難であった疾患に対して、純国産技術による治療薬の開発を成功させることで、国民医療費の削減に貢献する事を目標とした。

B. 研究方法

(1) バイオナノ粒子の標的化技術の開発

バイオナノ粒子である HVJ-E を標的化のために、化学的な手法と物理的な手法の 2 つのアプローチで検討を行った。

化学的な手法としては、硫酸プロタミン修飾による粒子表面電荷の調節を試みた。バイオナノ粒子である HVJ-E ベクター 10,000 HAU 分を 200 マイクログラムのリポーター遺伝子発現用プラスミド (pCMV Luciferase)、或いは 400 マイクログラムの FITC 標識したデオイオリゴ核酸を混合して粒子内に封入した。標的化には粒子表面の電荷を調節するために、1,000 HAU のベクター粒子あたり 500 マイクログラムの硫酸プロタミン と混合後、1000 HAU 分のベクター粒子をマウスの尾静脈より注入した。

遺伝子発現を検討する場合は、24 時間後に、各臓器におけるルシフェラーゼ遺伝子の発現を、酵素活性を測定することで評価した。また、核酸医薬の導入を検討する場合には、投与後 2 時間で肺を摘出して、その凍結切片を作成して蛍光顕微鏡で観察することで評価を行なった。

化学的な修飾による手法に加えて、磁性粒子を用いた磁場制御による物理的方法についても検討を行った。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により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增强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、遺伝子発現の增强を検討した。

(2) 治験薬製造用バンクの作製 :

シード細胞ストックの調製

マスター細胞バンク作製の第一段階として、種細胞 (シード細胞) クローンの選択と凍結ストックの調製を行った。ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した 293 細胞を親細胞として、800 個以上の細胞クローン (一個の細胞から増やした均一の細胞集団) を各々独立に培養を行い、増殖性能とバイオナノ粒子の生産能力を指標として、3 クローンに絞り込みを行なった。選択した 3 クローンについては、凍結ストックを作製して無菌性、マイコプラズマによる汚染、ウイルスによる汚染について検査を行なった。

更に、長期培養時の安定性 (増殖、細胞塊形成、バイオナノ粒子の産生能力)、スケールアップ時の安定性、凍結保存後の回収率などを指標にして絞り込みを行い、最終的に 1 クローンをマスター細胞バンクの作製に使用した。

(3) 治験薬製造用バンクの作製 :

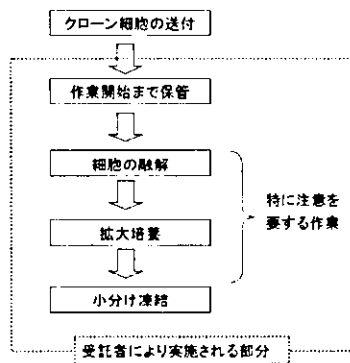
マスター細胞バンクの調製

細胞バンクを作る際には一度に多量のバイアルを凍結保存する必要があるため、これまで実験室で行っていた小型の細胞保存用の凍結器具を使用することができない。GMP 製造 (医薬品製造の基準に従った作業) では一般にプログラムフリーザー (大量のバイアルを

一度に温度制御しながら液体窒素で凍らせる機械)が使用されるため、凍結作業での一分間の温度低下と温度保持のための入力プログラムを事前に決定しておかなければならない。そこで実験用凍結器具に温度センサーを取り付けて、実験器具内部の温度変化を確認してプログラムを作成し、さらにこの凍結プログラムを用いて保存された細胞が正常に融解し再生(起眠)するかを比較した。このようにして確立した凍結法により、マスター細胞バンクの調製を行なった。

確立した大量培養法、凍結保存技術を GMP 製造と品質検査が実施可能な受託機関に技術移管して、マスター細胞バンクの調製を行なった(図-2)。

図-2. マスターセルバンクの作成手順



MCB 作成のための細胞の融解作業は受託機関により平成 15 年 10 月 22 日に行われ、その後拡大培養のために、6 回の植え継ぎの行ない、増殖した細胞を 11 月 10 日に回収して、凍結用培養液への置換とバイヤルへの小分け作業とプログラムフリーザーを用いた凍結を行なった。マスター細胞バンクは、合計 250 本作製し、融解後の細胞培養試験を行って、規定値である解凍直後の生存率と増殖性(倍

加時間)とを確認した。

(4) 治験薬製造用バンクの作製:

マスター細胞バンクの品質検査

医用材料レベルの安全性を保証するためには、マスター細胞バンクに対して適切な試験を実施してウイルスや細菌・真菌(カビ)等による汚染のないことを保証しなければならない。そこで、マスター細胞バンクの品質検査を行なった。

無菌性以外の試験項目の選定は出発時の細胞の起源(どの生物由来であるか)、バンクを作製するまでに用いた培養液の組成(動物由来の成分が含まれていた場合その内容)、どのような管理状態で培養をされてきたかという記録をもとに十分な検討を行い、シード細胞ストック作製時に検査を実施したウシに関するウイルスに対しての試験を除外して、無菌性、マイコプラズマ(生物学的に細菌に分類され、ウイルス並みに小さいありふれた病原体)、ヒトに感染するウイルスに関する試験を中心に選択した(選択した試験項目は合計 20 種類)。

試験方法のグレードは厚生労働省のガイドラインと米国ならびに欧州の規制当局の基準に準拠した試験などを含めて、すべて GLP(適性検査基準:検査を実施する上で信頼性を確保するために導入されたシステム)基準に準拠した高い信頼性の品質試験を行った。

(5) 治験薬製造用バンクの作製:

マスターウイルスバンクの調製

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ない、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。

(6) バイオナノ粒子調製用原料の製造

ヒト培養細胞に組換えタンパクを発現させてバイオナノ粒子を生産する技術を開発中であるが、本研究では、ヒト培養細胞株 (293 細胞) を用いてバイオリアクターシステムで増殖させた HVJ を原料にして、バイオナノ粒子の調製を行なった。293 細胞をバイオリアクターを用いて、無血清培地による浮遊状態で高密度培養して、HVJ を細胞へ感染させた。感染後 2~4 日間培養を継続してバイオナノ粒子の原料となる HVJ を産生させた。

培養上清中のウイルス粒子を完全に不活性化して、バイオナノ粒子を得るために、HVJ を含む培養上清をアルキル化剤であるベータ

プロピオラクトンにより処理を行った。その後、混入している細胞や脂質等の残渣を除去するために、ウイルスを完全に不活性化した後のサンプル液を 2,000×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。

(7) バイオナノ粒子の精製

HVJ の不活性化処理を行った後のサンプル溶液を、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、バイオナノ粒子の精製を行った。本精製技術により、不純物の除去と 10 倍程度の濃縮を行なう事が出来る。精製後に UV 照射とフィルターによる濾過を行って、無菌製剤化した。

このような方法により得られたバイオナノ粒子は、品質試験を行った後に、空ベクター粒子を得るためにバッファー溶液を用いて封入操作を行った。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た。空ベクター粒子を含むサンプルは、使用直前に融解操作を行なって、安全性、有効性確認に用いた。

(8) バイオナノ粒子の基本的安全性評価： 皮内投与による安全性の確認

8 週齢の Crj:CD-1 (ICR) 系の雄マウスを、各用量群 5 匹用いて、安全性に関する基礎データの取得を行なった。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。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匹ずつ選抜して群分けを行って、空ベクター粒子の投与に使用した。群分けされたマウスは、それぞれケタミンとキシラジンをを用いて混合麻酔を行い、背部皮内に一週間間隔で2回、予め設定した用量の空ベクター粒子を投与した(100マイクロリットル/部位)。

一般症状については、投与後に1日1回以上、14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加量を算出した。

投与後14日目に、マウスを塩酸ケタミン(ケタラール, 三共株式会社)の腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈から採血し、放血により安楽死させた後に、各動物について臓器の剖検を行なった。剖検により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て保存を行なった。また、投与部位の皮膚組織は、採取後に10%ホルマリンで固定を行い、パラフィン切片を作製し、HE染色を施した後に鏡検により観察を行なった。

(9) バイオナノ粒子の基本的安全性評価：
静脈内投与による安全性確認

7週齢のCrj:CD-1(ICR)系の雄マウスを、各用量群5匹用いて、安全性に関する予備試験を行なった。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。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匹ずつ選抜して群分けを行って、空ベクター粒子の投与に使用した。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投与(100マイクロリットル/マウス)して、安全性を確認した。

一般症状については、投与後に1日1回以上、7日間観察して記録を保存した。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加量を算出した。

投与後7日目に、マウスを塩酸ケタミン(ケタラール, 三共株式会社)の腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈から採血した後に、放血により安楽死させた後に、各動物について剖検を行なった。剖検により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て保存を行い、パラフィン切片を作製し、HE染色を施した後に鏡検した。

(10) バイオナノ粒子の基本的安全性評価：
鼻腔経由での肺組織への投与による
安全性の確認

7週齢のCrj:CD-1(ICR)系の雄マウスを、各用量群5匹用いて、安全性に関する予備試験を行なった。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。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匹ずつ選抜して群分けを行って、空ベクター粒子の投与に使用した。群分けしたマウスを、ケタミンとキシラジンの混合麻酔下で鼻腔よりピペットマンを使用して、予め設定された用量の空ベクター粒子を投与（30マイクロリットル/マウス）した。

一般症状については、投与後に1日1回以上、7日間観察して記録を保存した。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加量を算出した。

投与後7日目に、マウスを塩酸ケタミン（ケタラール、三共株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈から採血した後に、放血により安楽死させた後に、各動物について剖検を行なった。剖検により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て保存を行い、パラフィン切片を作製し、HE染色を施した後に鏡検した。

(11) バイオナノ粒子の基本的安全性評価： GLP 施設での安全性の確認

HVJ-E 非ウイルスベクターの早期臨床応用を目指して、上記の予備検討で得られたデータを参考にして、安全性に関するデータを取得した。安全性に関する信頼性確保を図るためには、GLP 基準で試験を実施する必要があるため、GLP 基準に準拠した外部施設で試験を行なった。投与経路としては、静脈内と経鼻投与を選択し、用量設定試験のデータを基

準に投与用量の設定を行った。

(12) 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は、作製した MCB、MVB によりバイオリクターシステムを使用して製造した。製造用には、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。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。

(13) 生体に生着した癌に対する有効性評価

実際に生体内の癌組織に対しても増殖抑制効果が認められるかについて、生体内に移植した癌細胞に対する増殖抑制効果を検討した。材料としては Balb/c マウス由来の大腸癌細胞株（CT-26）を用い、Balb/c マウスの背部皮内に移植・生着させて3～5mmのサイズになるまで腫瘍を増殖させた後に、腫瘍内に抗癌剤（ブレオマイシン）を封入したベクターを単回投与し、腫瘍の増殖に対する効果について腫瘍径を指標として検討した。また、他の抗癌剤との相乗効果を検討するために、抗癌剤（ブレオマイシン）を封入したベクターを投与する前日に、シスプラチンの腹腔内投

与を行い、その併用効果を検討した。

(14) 連続投与による増強効果の検討

担癌マウスに対して、抗癌剤（プレオマイシン）を封入したベクター粒子を連続投与することで、癌細胞に対する増殖抑制効果が増強されるかを検討した。

材料としては Balb/c マウス由来の大腸癌細胞株（CT-26）を用い、Balb/c マウスの背部皮内に移植・生着させて3～5mmのサイズになるまで腫瘍を増殖させた後に、腫瘍内に抗癌剤（プレオマイシン）を封入したベクターを単回投与或いは、3日～4日間隔で3回連続投与を行い、腫瘍の増殖に対する効果について腫瘍径を指標として検討した。また、単回投与の場合と同様に他の抗癌剤との相乗効果を検討するために、抗癌剤（プレオマイシン）を封入したベクターを投与する前日に、シスプラチンの腹腔内投与を行い、その効果を検討した。

(15) 癌免疫反応誘導の検討

担癌マウスに対して、抗癌剤（プレオマイシン）を封入したベクター粒子を連続投与して、癌組織を消失させた場合に、癌細胞に対する増殖抑制効果だけでなく、癌に対する免疫が誘導されるかを検討した。

材料としては Balb/c マウス由来の大腸癌細胞株（CT-26）を用い、Balb/c マウスの背部皮内に移植・生着させて3～5mmのサイズになるまで腫瘍を増殖させた後に、シスプラ

チンを腹腔内投与した。シスプラチン投与1日後に、腫瘍内に抗癌剤（プレオマイシン）を封入したベクターを3日～4日間隔で3回連続投与を行い、初回移植癌細胞による腫瘍を消失させた。その後、初回移植と反対側の皮内に、Balb/c マウス由来の大腸癌細胞株（CT-26）を再移植して、癌細胞に対する免疫誘導効果について、腫瘍径を指標として検討した。

(16) 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。薬効メカニズムの検討は、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。

(17) 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、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に、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。

(18) 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行政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. 研究結果と考察

(1) 化学的修飾によるバイオナノ粒子の標的化

バイオナノ粒子である HVJ-E ベクターを特定の臓器や腫瘍などに標的化する技術は、ベ

クターの安全性・有効性・汎用性を向上する上で、非常に重要な課題である。従来癌細胞に特異的なマーカー分子の抗体やレセプターに対するリガンドを利用した標的化が試みられているが、現在でも有効性の高い標的化技術の開発は、DDS やベクター技術を開発する上で非常に重要な課題として残されている状況である。

HVJ エンベロープベクターはバイオリクターシステムにより培養細胞で産生されるため、リポソームやナノパーティクルのように粒子径を調節して標的化を行なう事は困難である。そこで、本研究ではバイオナノ粒子の標的化技術としては、硫酸プロタミンによる表面電荷の調節、カチオン性・アニオン性ポリマーによる修飾、脂質を介したペプチドや PEG など修飾分子の埋め込み、HVJ の膜蛋白質 (F 蛋白質、HN 蛋白質) と一本鎖抗体蛋白やリガンドペプチドとのキメラ化を検討した。その結果、表面電荷の調節により、遺伝子 (図-3) や核酸医薬 (図-4) を封入したベクター粒子が肺組織へ選択的に標的化できることが明らかになった。

図-3. 化学的修飾による標的化(1):遺伝子

Luciferase expression by intravenous injection of HVJ envelope conjugated with protamine sulfate

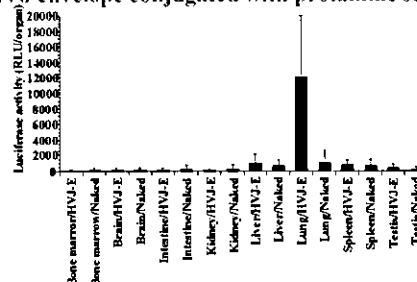
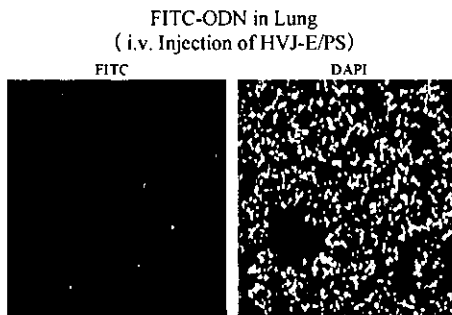


図-4. 化学的修飾による標的化(2):核酸医薬



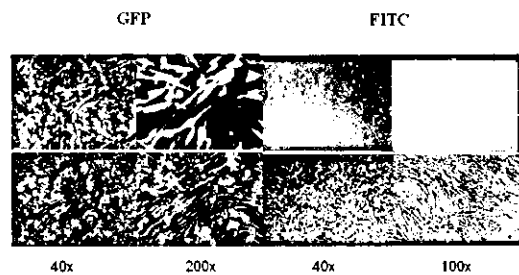
これらの結果から、表面電荷を調節するという化学的修飾により、HVJ-E を特異的な組織(肺)に標的化する事が可能となった。また、その効果は遺伝子発現と、核酸医薬のデリバリーのどちらに対しても有効である事が示唆された。

(2) 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-エンベロープベクター (HVJ-E) を全身投与を行った場合でも、体外からの制御により標的化出来る技術の開発を行った。これまでは、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-5)。

図-5. 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。

(3) 治験薬製造用バンクの整備： マスター細胞バンクの作製

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。バイオナノ粒子の生産基準は細胞由来の生物起源医薬品の品質基準に該当すると考えられるため、ウイルスや細菌などの外来性因子の汚染の可能性を否定し、細胞の性質を正しく把握し一定に維持しなければならない。そこで、本研究では生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品 / 生物起源由来医薬品) 製造用細胞において日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) の三極の合意事項に基づいて示された標準的方法をもとに

して、製造用細胞のバンク化（マスターセルバンク作製）および微生物による汚染否定試験を実施した。

ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入したヒト胎児性腎細胞株（293 細胞）を親細胞として、無血清培地への馴化、浮遊化、クローニング、増殖性・バイオナノ粒子の産生量・凍結融解時の回収率などを指標としたクローン選択、シード細胞ストックの作製、シード細胞ストックの品質検査、シード細胞の拡大培養を行なった後に、医薬品製造用（GMP 製造）施設においてバンキングを行い、250 バイアルの凍結ストックを作製した（図-6、図-7）。

図-6. マスター細胞バンク作製の概要

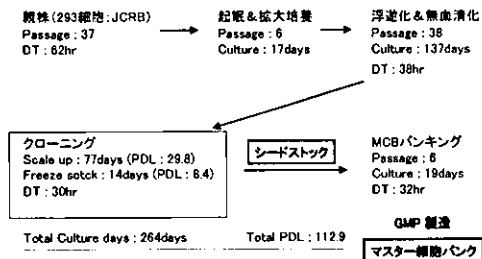
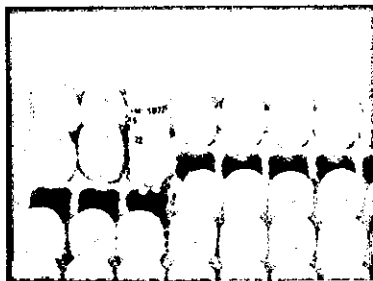


図-7. 作成したマスター細胞バンク



このようにして作製したマスター細胞バンクの一部を使用して、品質の検査を行なった。検査項目としては、厚生労働省のガイドラインと、国外での臨床開発を想定して FDA、EU の規制当局のガイドラインも考慮して選択し、無菌性、マイコプラズマ混入、ヒト・ウマ・

ウシ・ブタ由来ウイルスの混入について検査を実施した。その結果、全ての項目について陰性の判定結果を取得した（図-8）。

図-8. マスター細胞バンクの検査

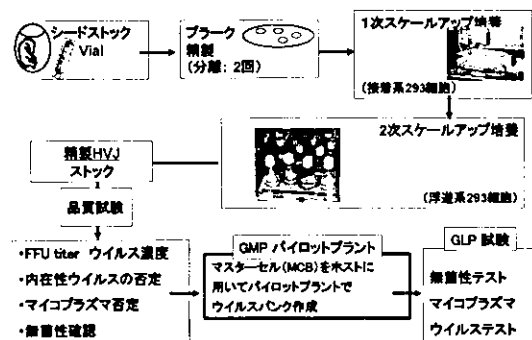
| Test | Protocol No. | Result |
|---|--------------|-------------|
| Determination of Cellular Morphology and Growth Characteristics | 30117 | As expected |
| Cell Line Specific Identity by Isoenzyme Electrophoresis | 30230 | As expected |
| Thin Section Electron Microscopy, Cell Morphology and Virus Detection/Isolation | 30610 | NEGATIVE |
| In Vitro Assay for Viral Contaminants [FDA Requirements] (GLP) | 30257 | NEGATIVE |
| In Vitro Assay for Viral Contaminants: European Addition to US FDA Test | 30158 | NEGATIVE |
| In Vitro Assay for Detection of Adenovirus Virus Contaminants: Cells | 30619 | NEGATIVE |
| PCR-based Reverse Transcriptase (RT) Assay (GLP) | 30611 | NEGATIVE |
| Sensitivity Test + RT-PCR: GFP & Hc12 (GLP) (CB sensitive) | 30248 | NEGATIVE |
| Mycoplasma Detection "Stain to Control" | 30255 | NEGATIVE |
| Detection of HIV-1 DNA by qPCR (GLP) | 3079630270 | NEGATIVE |
| Detection of HIV-1 DNA by PCR (GLP) | 30796302814 | NEGATIVE |
| Detection of HTLV I & II DNA by PCR (GLP) | 30615 | NEGATIVE |
| Detection of HBV DNA by qPCR (GLP) | 30750 | NEGATIVE |
| Detection of CMV DNA by qPCR (GLP) | 30756 | NEGATIVE |
| Detection of EBV DNA by qPCR (GLP) | 30713 | NEGATIVE |
| Detection of HCV RNA by qPCR (GLP) | 30735 | NEGATIVE |
| Detection of Parvovirus B-19 DNA by PCR (GLP) | 30796302818 | NEGATIVE |
| Human Papilloma Virus (HPV) Hybrid Capture (GLP) | 30609 | NEGATIVE |
| Detection of HIV-2 Virus: A DNA by qPCR (GLP) | 30719 | NEGATIVE |
| Detection of HIV-2 Virus: B DNA by qPCR (GLP) | 30720 | NEGATIVE |
| Detection of HIV-3 DNA by PCR (GLP) | 30778 | NEGATIVE |
| Detection of HIV-8 DNA by PCR (GLP) | 30702 | NEGATIVE |
| Quantitation of SV-40 DNA by qPCR (GLP) | 30715 | NEGATIVE |

(4) 治験薬製造用バンクの整備：
マスターウイルスバンクの作製

治験薬製造用材料としては、マスター細胞バンクとマスターウイルスバンクの2種類が必要となる。そこで、本研究で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（図-9）。

図-9. マスターウイルスバンク作製の概要

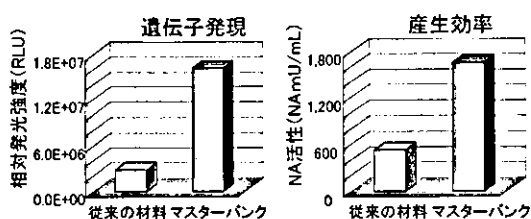


作製したウイルスバンクの一部を使用して、確認申請に必要と考えられる項目について GLP 試験を行い、マスターウイルスバンクとした (図-10)。また、バンキングしたウイルスを使用して、バイオナノ粒子の生産を行ったところ、従来の HVJ を使用した場合と比較して、HVJ の生産量で 3.2 倍、遺伝子導入を指標とした性能面で 5.7 倍以上の生産効率の向上が認められた (図-11)。

図-10. マスターウイルスバンク



図-11. マスターバンクによる製造



(5) ベクター粒子の安全性・有効性確認

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。そこで、本研究ではバイオナノ粒子であるベクター粒子を精製した後に、封入物質を含まない状態の空粒子を用いて、臨床応用の開始に必要な安全性に関する基礎データを取得した。現在のところ、膀胱癌、食道癌、脳

腫瘍など固形癌を対象とした臨床応用を想定しているため、投与経路として静脈内投与、経鼻での肺への投与、皮内投与を選択し、種々の用量の空ベクター粒子をマウスへ投与して、その影響について検討した。その結果、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 (LD10) は、概算で約 160 万 HAU/kg と想定される。現在癌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。

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-12、図-13)。

図-12. バイオナノ粒子の安全性試験結果の概略

| |
|---|
| <p>1. 単回静脈内投与毒性試験 (マウス、全身投与)</p> <p>① 10%致死量 (LD10) : 約 160 万 HAU/kg (想定最高用量は 16 万 HAU/kg)</p> <p>② 死因 : 症状、病理組織検査からは特定できず</p> <p>③ 一般症状 : 生存例では高用量群で自発運動の低下</p> <p>④ 体重変化 : コントロール群に対して著しい変動なし</p> <p>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</p> <p>⑥ 組織変化 : 尾先端部の壊死</p> |
| <p>2. 単回経鼻投与毒性試験 (マウス、肺へ局所投与)</p> <p>① 致死量 : 最高用量 (85 万 HAU/kg) でも死亡例なし</p> <p>② 一般症状 : 特になし</p> <p>③ 体重変化 : コントロール群に対して著しい変動なし</p> <p>④ 組織変化 : 軽度な炎症性細胞の浸潤</p> |
| <p>3. 2 回皮内投与毒性試験 (マウス、アナフィラキシーショックの予備試験)</p> <p>① 致死量 : 最高用量 (325 万 HAU/kg x 2 回投与) でも死亡例なし</p> <p>② 一般症状 : 特になし (アナフィラキシーショックは認められず)</p> <p>③ 体重変化 : コントロール群に対して著しい変動なし</p> <p>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</p> |

図-13. バイオナノ粒子の溶血試験

| 赤血球 | サンプル | 溶血率(%) |
|--------|---------------------------------|--------|
| | TBS | 0.0 |
| ヒト赤血球 | HVJ-E(10NA _m U/mL) | 2.5 |
| | HVJ-E(20NA _m U/mL) | 3.8 |
| | HVJ-E(40NA _m U/mL) | 5.3 |
| | HVJ-E(60NA _m U/mL) | 7.8 |
| | HVJ-E(80NA _m U/mL) | 11.0 |
| | HVJ-E(100NA _m U/mL) | 14.6 |
| マウス赤血球 | HVJ-E(130NA _m U/mL) | 29.9 |
| | HVJ-E(330NA _m U/mL) | 68.6 |
| | HVJ-E(530NA _m U/mL) | 87.3 |
| | HVJ-E(730NA _m U/mL) | 82.0 |
| | HVJ-E(930NA _m U/mL) | 90.1 |
| | HVJ-E(1130NA _m U/mL) | 96.5 |

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-14）。

図-14. 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)

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。

起炎物質である TNBS を肛門より投与して炎症を誘発した動物に対して、炎症誘導後 1 日後に、マスター細胞バンク、マスターウイルスバンクを材料として製造したバイオナノ粒子に NF κ B デコイ核酸を封入して直腸内投与を行った。その後、6 日間体重の測定を行

い、6 日目に全例を解剖して直腸の炎症の程度をスコア化して治療効果を検討した。陽性コントロールとしては、プレドニゾロン（毎日 1 回経口投与、6 回の連続投与）を、陰性コントロールとしては生理食塩水の直腸内投与を設定した。

体重の変化について、各群の比較を行ったところ、NF κ B デコイ核酸封入バイオナノ粒子を投与した場合には、コントロールと比較して体重の回復が早期になることが明らかとなった。また、プレドニゾロン投与群では、他の群と比較して体重の回復の鈍化が認められた。以上の結果から、NF κ B デコイ核酸封入バイオナノ粒子の投与により、体重の回復を指標として有効性が認められることが示唆された（図-15）。

図-15. 作製したバンクで製造したバイオナノ粒子の有効性(1)

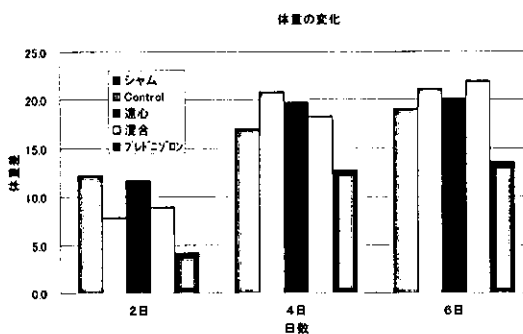
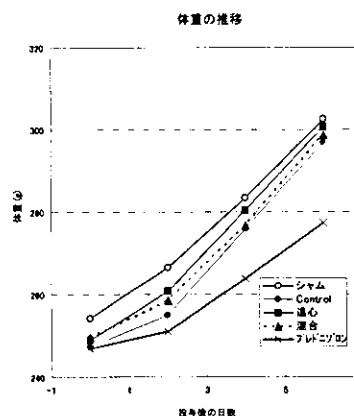


図-16. ラット炎症性消化器疾患モデルでの有効性評価(2)

| Test groups | Dose | N | Inflammatory score in the intestinum crassum |
|-------------------------------------|----------------------|----|--|
| Sham (saline) | - | 12 | 0.00 (maximum 1, minimum: 0) |
| Control (saline) | - | 12 | 3.00 (maximum: 5, minimum: 1) |
| NFκ-B decoy (centrifugal enclosure) | 25.4μg/rat | 12 | 1.00 * (maximum: 5, minimum: 0) |
| NFκ-B decoy (mixture) | 25.4μg/rat | 12 | 2.00 (maximum: 5, minimum: 1) |
| Prednisolone | 3 mg/kg ² | 12 | 1.00 ## (maximum: 3, minimum: 0) |

Saline and NFκ-B decoy were administered intrarectally at the volume of 0.75 mL/rat. Prednisolone was administered orally at the volume of 5 mL/kg for 6 days. Each value represents the median (maximum and minimum).

*: P<0.05; Significance difference between control group by Steel test
##: P<0.01; Significance difference between control group by Mann-whitney test

そこで、直腸の炎症に対する治療効果を検討した。その結果、プレドニゾロン投与群とNFκB デコイ核酸封入バイオナノ粒子投与群では、コントロールに対して炎症スコアの有意差が認められ、治療効果があることが明らかとなった(図-16)。

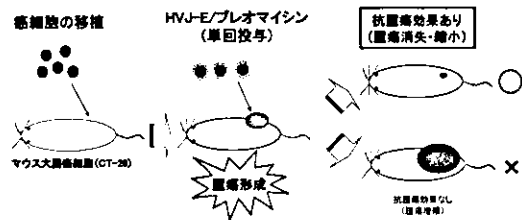
これらの研究により、整備を行ったマスターバンクで製造したバイオナノ粒子の基本的な安全性・有効性の向上を確認することが出来た。

(6) バイオナノ粒子による腫瘍縮小効果の検討

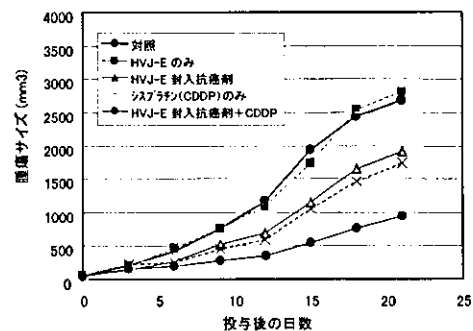
生体内に移植した癌細胞に対する増殖抑制効果を検討した。材料としてはマウス大腸癌細胞(CT-26)を用い、マウス皮下に移植・生着させて一定のサイズになるまで腫瘍を増殖させた後に、腫瘍内に抗癌剤を封入したベクターを単回投与して、腫瘍の増殖に対する効果を検討した。その結果、抗癌剤を封入したベクターを投与した場合には腫瘍の萎縮や消失が認められる事が明らかとなった(図-17)。

図-17. 抗癌剤封入バイオナノ粒子による抗腫瘍効果

薬効評価のプロトコール

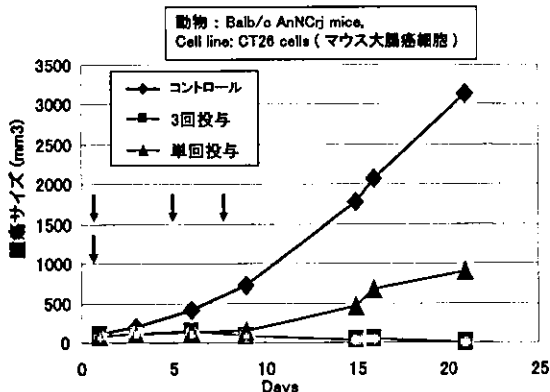


HVJ-Eに封入したブレオマイシンによる抗腫瘍効果 (投与後の腫瘍サイズの推移)



担癌マウスに対して抗癌剤を封入したベクター粒子を単回投与するだけで腫瘍の消失が認められた事、空ベクター粒子には細胞性免疫を高める作用を持つインターフェロンγを誘導する活性があることから、抗癌剤を封入したベクター粒子を投与することで、癌細胞に対する増殖抑制効果だけでなく、癌免疫が誘導される事が示唆された。そこで、抗癌剤を封入したベクター粒子を利用した癌免疫療法が可能であるかを検討した。ベクター粒子の投与による癌免疫の誘導を増強するために、担癌マウスに対して抗癌剤を封入したベクター粒子を連続投与したところ、単回投与と比較して癌の萎縮や消失などの抗腫瘍効果が増強される事が明らかとなった(図-18)。以上の結果から、抗癌剤封入バイオナノ粒子の投与により、抗腫瘍効果が認められる事が明らかとなった。

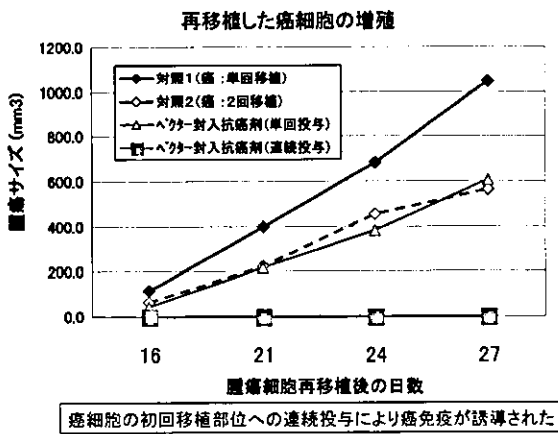
図-18. 連続投与による抗腫瘍効果の増強



(7) バイオナノ粒子による新規癌免疫療法の開発

本研究では、癌免疫の誘導を確認するために、抗癌剤を封入したベクター粒子により癌の萎縮や消失が認められたマウスに対して、癌細胞の再移植を行なった。その結果、再移植した癌細胞の生着や増殖が阻害される事が明らかとなった(図-19)。

図-19. 連続投与による癌免疫の誘導



また、バイオナノ粒子と抗癌剤との併用により治療を行なった動物の生存率と、治療効果の持続性を検討したところ、誘導された癌

免疫により生存率が改善する事、癌免疫は少なくとも約6ヶ月は持続性がある事が明らかとなった(図-20、図-21)

図-20. 連続投与による生存率の改善

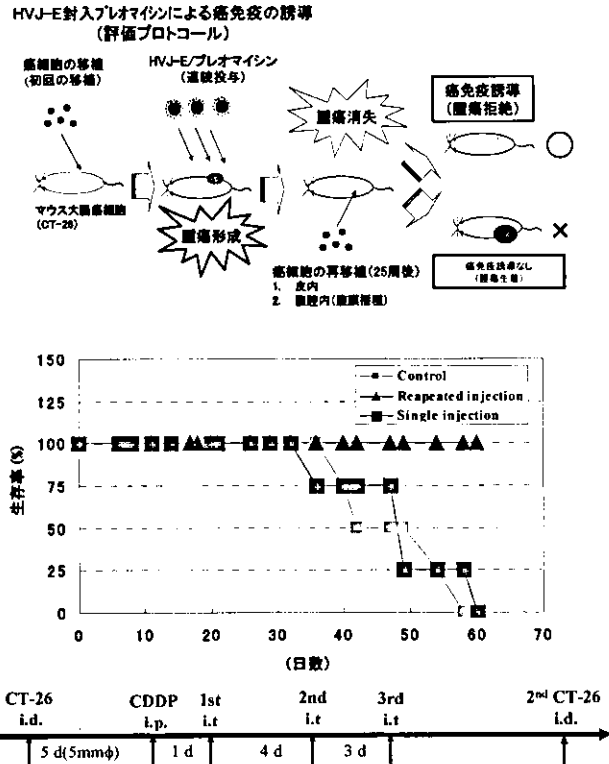
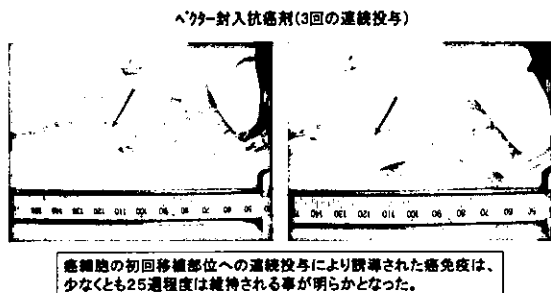


図-21. 連続投与による癌免疫の誘導



そこで、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メカニズムに関する検討を行ったところ、

HVJ-E と抗癌剤の併用により、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-22、図-23)。

図-22. バイオナノ粒子による CTL 活性化

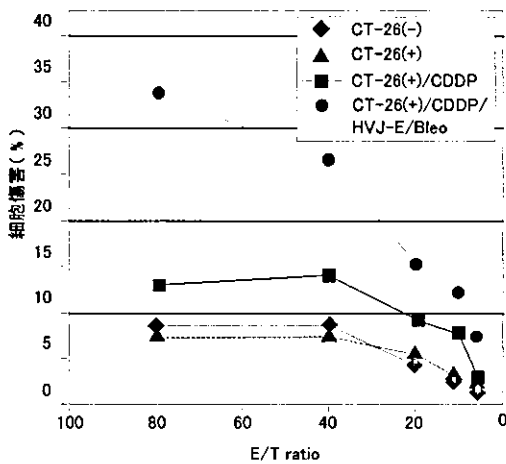
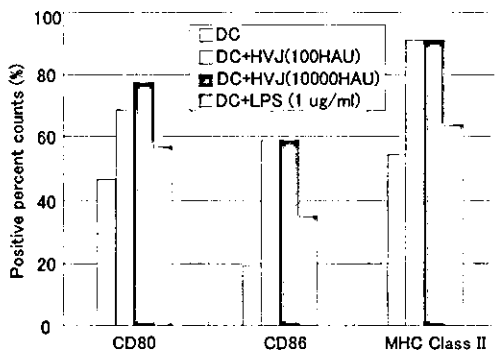


図-23. バイオナノ粒子による樹状細胞の分化・成熟



更に、ブレオマイシン以外にシスプラチン、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 (図-24、図-25)。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。

図-24. バイオナノ粒子とシスプラチンの併用効果

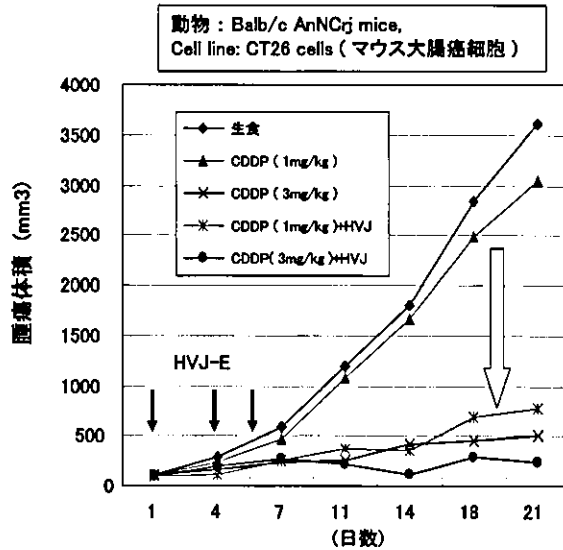
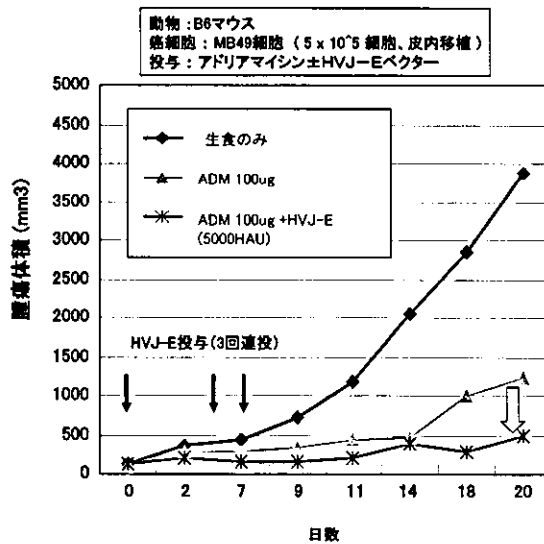


図-25. バイオナノ粒子とアドリアマイシンの併用効果



D. 結論

本研究の目的は、新規バイオナノ粒子である HVJ-E ベクターを利用して、癌など難治性疾患に対する新規治療法を開発する事である。3年間の研究により、バイオナノ粒子である

HVJ-E ベクターによる新規癌免疫療法の臨床応用に必要な基礎データ（薬効、安全性）、製造用材料の整備、標的化技術の確立を完了する事が出来た。

本研究成果である新規癌免疫療法は、持続性があるだけでなく種々の癌の治療に対して有効である事が明らかとなり、抗癌剤との併用により癌の新しい治療法となる事が期待できる。これまでに、副作用が少ないという期待から、種々の免疫療法剤が開発されてきたが、有効性の高い治療薬は少数であった。また、誘導された癌細胞に対する免疫は、短期間で消失してしまう事が明らかとなっている。そのため、持続性の高い免疫を誘導する事が、癌免疫療法の課題となっていた。

HVJ-E による癌免疫活性化は、従来の癌免疫療法の課題である持続性を解決できる可能性があり、今後癌免疫療法を成功させる上で重要な治療薬になると期待される。また、HVJ-E ベクターは遺伝子医薬や核酸医薬など次世代バイオ医薬の吸収促進にも有効であることから、今後それらの新規医薬品との組み合わせにより、更に抗癌剤の治療効果を増強出来る。

また、バイオナノ粒子である HVJ-E の標的化技術に関しては、化学的修飾による粒子表面電荷調節と、磁性体粒子を利用した磁力による制御の 2 種類の技術を確立する事が出来た。これらの技術は、本バイオナノ粒子だけでなく、他のデリバリーシステムにも応用可能であり、今後適応の拡大が期待できる。

更に、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。製造に使用

する細胞とウイルスについては、バイオ医薬として確認申請での承認を得るために、GMP 体制下で凍結ストックの整備を行ない、品質検査により安全性を保証する必要がある。本研究により、マスターバンクを整備した事は、今後臨床応用のために治験薬を製造する上で重要な成果である。

今後は、本成果をベースに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、固形癌に対する新規免疫療法剤として、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。また、厚生労働省、医薬品機構など規制当局との事前相談により、適切な臨床試験及び製造プロトコルの作成を行ない、早期に臨床応用を実現できるようにする。

新規バイオナノ粒子である HVJ-E ベクターは、純国産技術で、本研究成果である新規癌免疫療法により抗癌剤の投与量を軽減できれば、副作用・医療コスト削減に繋がる事から、社会的意義も高いと考えられる。

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