

2004-00188A

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

ピンポイントデリバリー用バイオナノキャリアの開発
とがん遺伝子治療への応用

(H16-ナノ-004)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 近藤 昭彦

平成17(2005)年3月

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

ピンポイントデリバリー用バイオナノキャリアの開発
とがん遺伝子治療への応用

(H16-ナノ-004)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 近藤 昭彦

平成17(2005)年3月

目 次

I. 総括研究報告

- ピンポイントデリバリー用バイオナノキャリアの開発と
がん遺伝子治療に関する研究 1
近藤 昭彦 (神戸大学工学部・教授)

II. 分担研究者報告

1. 任意の臓器にデリバリー可能な中空ナノ粒子の創製 9
近藤 昭彦 (神戸大学工学部・教授)
2. 中空バイオナノ粒子のステルス化 15
黒田 俊一 (大阪大学産業科学研究所・助教授)
3. 中空バイオナノ粒子の安定化とタンパク質封入 19
妹尾 昌治 (岡山大学大学院自然科学研究科・助教授)
4. 肝細胞がん治療への応用 28
上田 政和 (慶應義塾大学医学部・講師)
5. 脳内デリバリー可能な中空バイオナノ粒子 34
平岡 真寛 (京都大学医学部・教授)
近藤 科江 (京都大学医学部・助手)
6. 量子ドットの中空ナノ粒子によるピンポイント 41
薬剤伝達システムへの応用
山本 健二 (国立国際医療センター・副所長)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 47

IV. 研究成果の刊行物・別刷 51

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）

主任総括研究報告

ピンポイントデリバリー用バイオナノキャリアの開発と がん遺伝子治療への応用

主任研究者 近藤昭彦 神戸大学工学部教授

本研究では、遺伝子・薬剤デリバリーのキャリアーとして、B型肝炎ウイルス（HBV）外皮タンパク質（Lタンパク質）粒子（バイオナノ粒子）の開発を行った。この粒子はウイルスゲノムや病原性を示すタンパク質を遺伝子レベルで除去しており、非常に安全な中空ナノ粒子である。この粒子に遺伝子や薬剤等を封入することで、低侵襲的な方法により、高い導入効率かつ、ピンポイントにヒト肝細胞に薬剤を導入できる。また、Lタンパク質の肝細胞認識部位を他のリガンドに変換することで、任意の組織・細胞に標的化できると期待される。本年度は、中空バイオナノ粒子を分子標的療法のキャリアーとして確立することを目指して、バイオナノ粒子の生産法および精製法の開発、Lタンパク質中のシステイン残基のアラニンやセリンへの置換によるバイオナノ粒子の安定化、HBV エスケープ変異体を mimic することでのバイオナノ粒子の抵抗原化、バイオナノ粒子の肝細胞認識能を変換するために他のリガンドに置換すべき Lタンパク質上の領域の確定など、バイオナノキャリアーを確立する上での基盤となる開発を進めた。また、がん遺伝子治療への適用を行うための基盤として可溶性 VEGF 受容体遺伝子の肝細胞内での発現について検討した。

分担研究者

黒田俊一（大阪大学産業科学研究所・
助教授）
妹尾昌治（岡山大学大学院自然科学研究
科・助教授）
上田政和（慶応義塾大学医学部・講師）
平岡真寛（京都大学医学部・教授）
近藤科江（京都大学医学部・COE 特任助教
授）
山本健一（国立国際医療センター研究所・
副所長）
藤野博良（片山化学・部長）

A. 研究目的

現在、実験的に行われている遺伝子治療の多くは、アデノウイルスやレトロウイルスのウイルスゲノムに目的の遺伝子を組み込んだ感染性ウイルスを利用して、この方法では、ウイルスそのものを利用するため、効率よく遺伝子導入可能であるが、組織・細胞に対して非特異的に感染するので、手術等により患部に直接投与する必要があり、患者への負担が大きい。また、ウイルスゲノムを患者の染色体に導入する可能性があり、予測

不可能な副作用の危険性がある。実際、一昨年、フランスで患者の死亡事故がおこり、ウイルスベクターの安全性に関する懸念が指摘されており、高機能で安全な非ウイルス性ベクターの開発が求められている。さらに近年、ヒトゲノムの概要が明らかにされており、遺伝子治療に利用可能な遺伝子群が多数見出されると予想され、安全な遺伝子治療法を早急に確立する必要がある。このため、①細胞や組織への高い遺伝子導入効率をもち、②目的の細胞や組織への高い特異性を示し、注射のみでピンポイントな導入が可能であり、③ウイルスゲノムを完全に排除し、高い安全性が確保できる、等の特色を持つ遺伝子導入法の確立が必須である。

B型肝炎ウイルスの表面抗原タンパク質から形成される中空バイオナノ粒子は、上記の三つの条件を満たしている。

ヒト肝臓に対し極めて特異的かつ強力な感染性を有するB型肝炎ウイルス(HBV)の外皮タンパク質(Lタンパク質)を酵母で生産させると、直径百nm前後の中空粒子を形成する(L粒子、図1)。我々は、このL粒子が表面に肝細胞特異的なレセプターを提示し、ヒト肝細胞に高い標的化能力を持つ「中空バイオナノ粒子」であることに注目し、生体内でピンポイントに遺伝子や薬物送達可能なナノキャリアーとして利用することを考えた(図1)。さらに、肝細胞特異的なレセプター部を他の特異性を持つレセプターに変換すれば、任意の臓器へのピンポイント送達も可能である(図2)。中空バイオナノ粒子は、内部にウイルスゲ

ノムを全く含まない、安全性の高いナノキャリアーである。

一方、近年のバイオ研究から、がん治療に有望な候補(サイトカイン、インターロイキン、増殖因子等)が見出されている。しかしながら、その多くは、培養細胞レベルでは、顕著な効果を示すが、個体レベルでは正常な細胞や組織にも重篤な副作用を引き起すために、実際のがん治療に使用されていないのが現状である。もしこれらタンパク質の遺伝子を目的の病変組織のみにピンポイントかつ高効率に導入でき、副作用が無視できるようになれば画期的な治療法になるものと期待される。また、その特定の細胞への特異性を生かし、原発がんに加えて転移

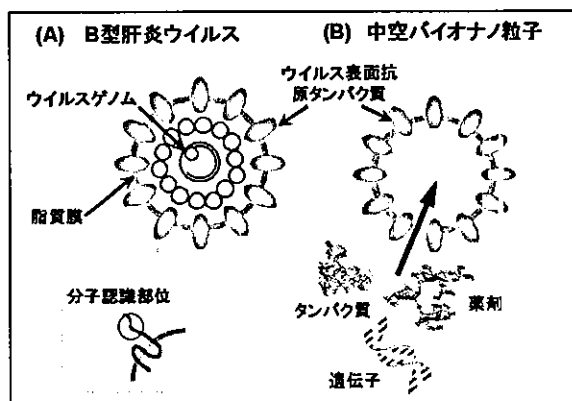


図1 バイオナノ粒子の概念

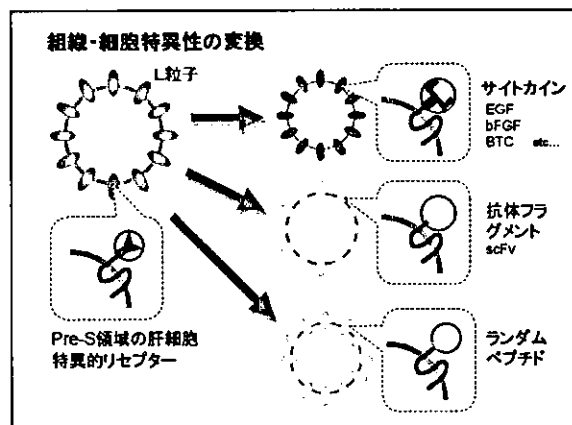


図2 バイオナノ粒子の組織・特異性変換

がんを網羅的に治療できれば、がん治療への貢献は計り知れない。

本研究では、中空バイオナノ粒子を分子標的療法のキャリアーとして確立することを目指す。中空バイオナノ粒子は、本来肝細胞に対して高い特異性、遺伝子導入能力を保持しているが、その表面にある分子認識能を任意の臓器に特性を持つ様に変換することで、任意の細胞や組織にピンポイント遺伝子導入することを目指す。さらに、具体的な治療への応用として、がんの遺伝子治療法の開発を目指す。対象とするがんとしては、改良型L粒子を直接利用可能な肝細胞がん、特異性変換が必要な脳腫瘍を選び、重点的に検討する。現在のがん治療を難しくしている点に、周辺・遠隔臓器への転移の問題がある。中空バイオナノ粒子の高い標的性を利用すれば、多臓器への転移がんを網羅的に治療できると期待される。

B. 研究方法

本年度は、中空バイオナノ粒子を分子標的療法のキャリアーとして確立することを目指して、以下の点に関して研究を進めた。

・ L 粒子の効率的な生産法の検討

L 粒子は酵母の細胞内に蓄積される形で生産されるため、L 粒子を効率よく得るためには、その精製法を効率化することが極めて重要である。そこで、従来の超遠心を用いた方法を、より簡便にすることを検討した。

・ L 粒子の安定性の向上

Lタンパク質の14個のシステイン残基を置換して不要なジスルフィド結合のシャッフリングを抑制することで、粒子構造を安定化できることを見出している。不要なジスルフィド形成を防ぐ最適なLタンパク質を創製して、さらなる安定化を進めた。

・ タンパク質封入粒子の開発

遺伝子を融合してカルボキシル末端へ任意のタンパク質を融合させ、ナノ粒子内部にタンパク質を封入するあるいは提示する技術確立することを目指した。この技術を用いて、インターフェロン α 、 γ 、HGF、チミジンキナーゼなどを融合してウイルス性肝炎、肝硬変、抗がん剤等へ発展させる。

・ 任意の組織・細胞に特異性を示す中空バイオナノ粒子の開発

ヒト肝臓特異的に物質送達する中空バイオナノ粒子の表面に、もともと提示されているヒト肝臓特異的認識部位（pre-S領域に存在する）を、別の認識分子に交換することで、任意の細胞及び組織に対して特異性を示す改変型中空バイオナノ粒子シリーズを作製することを試みた。本年度は特に、抗体のFc領域を結合する分子ZZへの交換を試みた。ZZは抗体を特異的に結合するため、ZZ提示バイオナノ粒子は、抗体を結合でき、抗体の特異性を利用した標的化が可能になる。

・ L 粒子への遺伝子等の封入の効率化

L粒子への遺伝子や薬剤の導入の効率を上げるため、エレクトロポレーションによる導入操作における条件を改善することを検討した。

・低免疫原性化 L 粒子の創製

B型肝炎(HB)ワクチン摂取者においてもヒト抗B型肝炎ウイルス(HBV)抗体に捕捉されず、T細胞の標的にもならないHBVエスケープ変異体(粒子表面の特定アミノ酸が2箇所変異している)の表面抗原タンパク質をmimicすることで、抗原性の低い粒子を開発することを試みた。そしてヒト肝細胞がん移植ヌードラットにおいて実際に移植癌に対して治療効果を示すか検討した。さらに、高い抗原性を示す粒子のN末端部分(pre-S領域)も可能な限り欠失するように改変し、粒子の特異性を損なわない範囲で粒子の低免疫原性化を試みた。

・脳内デリバリー可能な中空バイオナノ粒子の創製

膜透過性を有する10個程度のポリペプチド(PTD)を用いて、脳内にデリバリー可能な中空バイオナノ粒子を構築するための基礎的技術を確立することを目的として行うものである。本年度は、脳内にデリバリー可能なPTDの設計・構築・デリバリー能の検証を行い、中空バイオナノ粒子に付加すべきPTDの候補を決定するための研究を行った。

・可溶性 VEGF 受容体遺伝子封入 L 粒子の抗腫瘍性効果の検討

本年度は、可溶性 VEGF 遺伝子が肝細胞内で発現可能か否かを明らかにするとともに、可溶性 VEGF 遺伝子をヒト肝細胞癌にピンポイントにデリバリーして VEGF タンパクを発現させることで、抗腫瘍効果が見られるかを検討した。

・倫理面への配慮

研究代表者ならびに分担者は、それぞれの施設における生命倫理委員会規程、実験動物取り扱い規程に従って研究を進めた。現時点では使用の予定はないが、ヒト採取サンプルの場合、インフォームドコンセントを得て本研究に参加する。以上の様に、生命倫理への配慮を十分に行って研究を進めた。

C. 研究結果

・L粒子の効率的な生産法の検討

Lタンパク質を酵母で発現させた場合、可溶性タンパク質の42%程度まで生産できた。この酵母を破碎して、超遠心分離を繰り返すことで、Lタンパク質ナノ粒子を得ることができた。この精製されたL粒子をAFM等によって観察すると、粒子径は50-500nm程度であり、平均的サイズの粒子(粒径80nm)は約110個程度のLタンパク質から形成されていることが分かった。さらに、この精製工程を改善するために検討を行った。その結果、70℃程度での熱処理を初期の精製課程で行ない、酵母タンパク質の大部分を沈殿除去することが極めて有効であることが明らかになった。現在さらに精製法の最適化を行っている。

・L粒子の安定性の向上

Lタンパク質の14個のシステイン残基を置換して不要なジスルフィド結合のシャッフリングを抑制することで、粒子構造の安定化できることを見出している。不要なジスルフィド形成を防ぐ最適なLタンパク質を創製して、さらなる安定化を進めた。このジスルフィド結合に関与するシステ

イン残基は遺伝子に変異を入れアミノ酸をアラニンやセリンに置換する事で特定すると14個存在するシステイン残基の内、8個までが置換しても組換え発現が野生型の80%以上となることから、置換が可能であることが明らかになった。

次に、8個のシステイン置換体 m8 と野生型の性質と比較した。まず、緑色蛍光タ

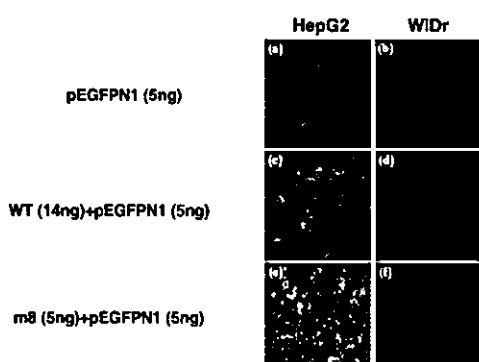


図3 EGFP 遺伝子発現ベクターpEGFPN1を封入したバイオナノ粒子を用いた細胞への遺伝子の導入実験。

ンパク質の遺伝子の発現系プラスミドをエレクトロポレーションで粒子へ封入した後、ヒト肝臓がん由来細胞株 HepG2 とヒト大腸がん由来細胞株 WiDr の培地中に添加して3日後に蛍光顕微鏡により観察した(図3)。野生型粒子では14 ngを用いて観察される蛍光はm8粒子5 ngを用いて観察される蛍光より弱く、m8粒子で導入効率が改善されていることが示唆された。

また、バイオナノ粒子の安定性をトリプシン消化により評価した結果、野生型粒子はm8粒子よりも薄い濃度のトリプシンで分解が観察され、m8の方が構造的に安定化していることが示唆された。

以上の結果から、システイン残基のアラニンまたはセリンへの置換が、L粒子の安

定化にきわめて有効であることが明らかとなった。

タンパク質封入粒子の開発

バイオナノ粒子にタンパク質を封入する方法として、表面抗原タンパク質と遺伝的に融合させた融合タンパク質の作成を試みた。実験では表面抗原タンパク質のカルボキシル末端側にクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質(EGFP)を融合させることを試みた。その結果、C末端の長さを調整して最適化することで、発現量を上げることができるとわかった。さらに、融合させたEGFPは粒子の外側に提示されるものと粒子内部に包摂されるものがあることがわかったが、これらはひとつの粒子で混在するものではなく、どちらかの形で一つの粒子を形成することが示唆された。

・任意の組織・細胞に特異性を示す中空バイオナノ粒子の開発

L粒子を任意の臓器にリターゲティングするため、まずヒト肝細胞認識部位付近を欠失した粒子を発現する4種類のプラスミドを構築した。21-153aa、33-153aa、50-153aa 欠失型(d21-153, d33-153, d50-153)はドメイン単位で削除したものであり、3-66aa 欠失型(d3-66)はヒト肝細胞認識部位近傍のみを削除したものである。いずれの欠失型L粒子も肝細胞への特異性を失っていることが明らかとなった。これらの粒子の中で、d33-153、d50-153は、発現量が多く、生産性において有利である。

次に3種類の欠失変異体にZZドメイン(抗体のFcドメインに結合)を挿入した粒

子を酵母により生産し、その生産性の比較を行った。その結果、d33-153 及び、d50-153 において高生産株の取得に成功した。抗原性の観点より、欠失領域の長い d33-153 について、粒子の精製を行い、その特性評価および抗体依存的な薬剤の細胞への導入について検討した。動的光散乱光度計並びに、原子間力顕微鏡（図 4）による評価から、ZZ ドメイン提示粒子が粒子径約 100 nm の球形状であることが視覚的に示された。

また、ZZ 提示粒子は抗体を特異的に結合することが示された。抗体を結合した粒子にモデル蛍光薬剤であるカルセインを封入して、抗体依存的な導入を検討した。その

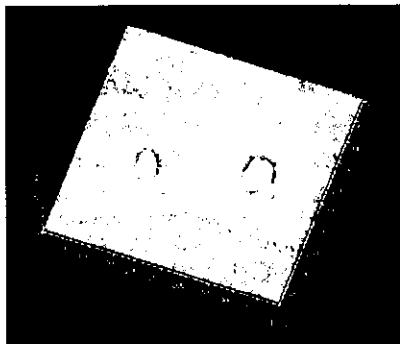


図 4 ZZ 提示粒子の原子間力顕微鏡像

結果、抗 EGFR 抗体を提示した粒子を用いた場合では、ヒト上皮細胞 A431 のみに、抗 NGFR 抗体を提示した粒子を用いた場合では、ラット副腎髄質細胞 PC12 のみに蛍光が観察された。また、抗体を提示していない粒子を用いた場合では、どの細胞においても蛍光を観察することはできなかった。つまり、粒子に提示した抗体の特異性に応じたカルセイン導入に成功したと言える。こ

れにより、疾患のある臓器を認識する抗体を粒子に提示することで、容易に薬剤を導入し、治療できる可能性が示唆された。

・L 粒子への遺伝子等の封入の効率化

L 粒子への遺伝子導入の効率を上げるため、エレクトロポレーションによる導入条件を改善することで、封入効率を上げることに成功した。現在さらなる最適化をすすめている。

・低免疫原性化L粒子の創製

抵抗原化を目指して、各種の変異体の作成を行った。具体的には、B型肝炎ワクチン摂取者においてもヒト抗HBV抗体に捕捉されず、T細胞の標的にもならないHBVエスケープ変異体（粒子表面の特定アミノ酸が2箇所変異している、Q129R/G145R）のLタンパク質をmimicしたL粒子を作製し、Balb/cマウスに接種したところ、野生型L粒子と比べて飛躍的に抗原性が低い改変型L粒子の開発に成功した。その結果、改変型L粒子は免疫系から認識されにくいステルス型L粒子として非常に有望と示唆された。現在、更なる低抗原性化を進めている。

・脳内デリバリー可能な中空バイオナノ粒子の創製

まず「PTD の設計とモデルタンパク質の構築」では、リジンとトリプトファンを組み合わせた新規 PTD 配列を持った PTD3 融合タンパク質を構築することができた。続いての「培養細胞を用いた PTD 融合タンパク質の細胞内輸送の検証」では、構築した PTD3 融合タンパク質が効率に細胞内に PTD3 融合タンパク質を導入でき、融合した

タンパク質の機能を発揮できることが分かった。さらに「動物実験での脳内輸送の検討」では、構築した PTD3 融合タンパク質をネズミの腹腔内に投与することで、血液脳関門を通過し、効率よくデリバリーされることがわかった。上記の PTD の情報を基に、PTD3 を組み込んだ L 粒子をコードした遺伝子の構築を行った。

・可溶性 VEGF 受容体遺伝子封入 L 粒子の抗腫瘍性効果の検討

可溶性 VEGF 受容体発現プラスミド Flt-1plasmid を NuE に *in vitro* で導入したところ、培養上清中に可溶性 VEGF 受容体が検出されたが、対照群では可溶性 VEGF 受容体は検出されなかった。そこで、NuE をヌードマウス皮下に移植させたモデルを用いて抗腫瘍性効果の検討を行った。その結果、対照群では腫瘍重量は経時的に増加し 14 日後には 7 倍以上になったが、Flt-1plasmid を投与して導入した群では 14 日後に腫瘍重量が 2 倍になったのみで、対照群に比して有意に抑制されていた。体重や各種臓器重量は投与群と対照群との間に有意の差を認めなかった。こうした結果から、可溶性 VEGF 受容体の標的細胞での発現は、有効な抗腫瘍性効果を示すと言える。

D. 考察

1) 達成度について

以上結果の項で示した様に、平成 16 年度の研究は、当初の研究計画どおり進捗し、有用な知見を得ていると言える。バイオナノ粒子を遺伝子や薬剤のピンポイントデリバリーを行うナノキャリアーとして利用し

ていく上での基盤が確立されつつある。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

バイオナノ粒子を用いたピンポイントの遺伝子・薬剤デリバリーは、当研究グループオリジナルで世界初の技術である。ウイルスの持つ高い導入能力と安全性を併せ持つこの手法は、学術的・国際的に見て先進的なものである。この手法により、遺伝子や薬剤を標的臓器に導入できれば、副作用の心配が少なく、低侵襲な治療が可能となり、その社会的な意義は極めて大きい。本年度は、このバイオナノ粒子を用いた遺伝子や薬剤のピンポイントデリバリーを行ううえで重要な基盤的な検討項目について多くの成果が得られた。バイオナノキャリアーとしての実用化に大きな弾みがつくものと期待される。

3) 今後の展望について

本年度得られた研究成果を基に、次年度以降も予定どおりに、遺伝子や薬剤の封入効率の向上、ステルス化、任意の組織・臓器へのターゲティング、効率的な生産など、バイオナノ粒子の基盤に関する検討をさらに進めて確立するとともに、がん遺伝子治療への応用に検討を進めることができると考えられる。

E. 結論

本年度は、中空バイオナノ粒子を分子標的療法のキャリアーとして確立する上で重要な、安定化、効率的な生産、低抗原化、特異性の変換などに関して、基盤となる重要な成果を集積することができたと言える。

また、脳腫瘍へのデリバリーや可溶性 VEGF 受容体発現による腫瘍抑制効果など、がん遺伝子治療についても有望な成果が得られた。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 究発表

論文発表および研究発表は、分担者の項を参照

H. 知的所有権の出願・取得状況

分担者の項を参照

任意の臓器にデリバリー可能な中空バイオナノ粒子の創製

主任研究者 近藤昭彦 神戸大学工学部・教授

本研究では、遺伝子・薬剤デリバリーのキャリアーとしてB型肝炎ウイルス由来の表面抗原粒子(バイオナノ粒子)に関する研究を行っている。この粒子はウイルスゲノムや病原性を示すタンパク質を遺伝子レベルで除去しており、非常に安全な中空ナノ粒子である。この粒子に薬剤等を封入することで、低侵襲的な方法により、高い導入効率かつ、ピンポイントにヒト肝細胞に薬剤を導入できる。本年度は、ウイルスが本来持っているヒト肝細胞への特異性を改変することで、肝細胞以外のさまざまな臓器へ薬剤導入可能な粒子の開発を目指した。そのために、ヒト肝細胞認識部位を削除した欠失変異導入粒子を作成し、その欠失部位に黄色ブドウ球菌由来 protein A の Z ドメイン二量体を挿入した。これにより、ZZ ドメインが粒子表面に提示される。さらに、ZZ ドメインと親和性のある抗体を ZZ ドメインを介して粒子表面に提示させることができ、粒子自体に抗体固有の特異性を付与すること可能となる。今回、この粒子を用いて、肝細胞以外の細胞にリターゲティングできることを確認した。

A. 研究目的

従来、非常に治療効果のある医薬品が開発されても、治療すべき標的部位に効率よく投与することが難しく全身性の副作用により、製品化を断念することが少なくない。そのため、低侵襲な方法(静脈投与や経口投与等)により、生体内でピンポイントに薬剤を輸送、導入できるキャリアー(運搬体)の開発が求められている。これにより、副作用を大幅に低減させることが期待されるからである。そこで、本研究グループでは、B型肝炎ウイルス由来の表面抗原粒子(バイオナノ粒子)(Fig.1)に着目した。この粒子はウイルスゲノムやコアタンパク質等を遺伝子レベルで除去した、粒径が 50~500 nm の

タンパク質中空ナノ粒子であり、粒子内に遺伝子あるいは薬剤を封入し、静脈注射によってヒト肝細胞に安全かつピンポイントに導入することが可能である。また、酵母や動物細胞を用いて簡便かつ安全に粒子を調整する手法が確立されている。

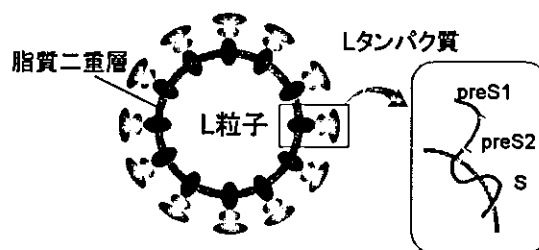


Fig.1 バイオナノ粒子

本研究では、肝臓以外の臓器へも導入可能な粒子の創生を目指し、表面抗原を改変

した粒子の作製を試みた。具体的には、肝臓特異的な部位を遺伝子工学的手法により削除し、さらに、その部位に生体認識分子(抗体やリガンド)を挿入することで、新たな特異性を粒子に付与した。今回、粒子表面に生体認識分子として抗体を提示することを目的に抗体と親和性のある ZZ ドメイン(黄色ブドウ球菌由来 ProteinA の一部)を粒子表面に提示した(Fig.2)。これにより、ZZ ドメインを介して粒子表面に抗体を提示させることができる。この抗体提示粒子を用いて、各種細胞への薬剤導入を試みた。

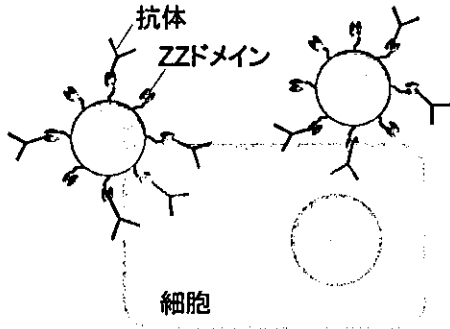


Fig.2 ZZ ドメイン提示粒子

B. 研究方法

1. 欠失変異導入・ZZ ドメイン提示粒子

ヒト肝細胞認識部位を削除した欠失変異導入粒子を作製するために、3 種類の変異体を構築した(Fig.3)。これらは、分泌シグナル配列と相互作用すると考えられる N 末端部位を残しつつ、粒子表面に提示される ZZ ドメインを可能な限り削除している。次に、これらの欠失部位に新たなリガンドとして、ZZ ドメインを挿入した。このようにして構築した発現プラスミドを酵母(*S. cerevisiae* AH22R)に形質転換し、高生産株のスクリーニングを行った。スクリーニングには、酵素免疫測定法を応用した装置 IMx(ABBOTT)を用いた粒子量測定により

行った。

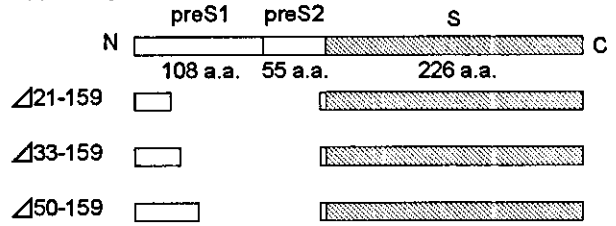


Fig.3 欠失変異体

2. ZZ ドメイン提示粒子の生産及び精製

各 ZZ 提示粒子の生産量の比較より、今回は d33 - 153 株を用いて研究を行った。得られた高生産株は、まず、工業用培地にて 7 日間培養を行い、大量に菌体を回収した。続いて、得られた菌体をガラスビーズにより破碎し、酵母細胞抽出液を得た。この抽出液は、塩化セシウム密度勾配遠心法並びにスクロース密度勾配遠心法により精製を行った。精製された粒子は SDS-PAGE やウエスタンブロット及び、以下の各種実験に用いた。

3. 粒子の形態評価

ZZ ドメイン提示粒子の形態を観察するために、動的光散乱光度計(MALVERN)並びに、原子間力顕微鏡(Seiko)を用いた。

4. ZZ ドメイン提示粒子の抗体結合能評価

ZZ ドメイン提示粒子と抗体との結合能を調べるために、スクロース密度勾配遠心法を用いた。具体的には、ZZ ドメイン粒子と蛍光(FITC)標識抗体とを反応させ、密度勾配遠心にかけることで各密度のフラクションに分けた。それぞれのフラクションに含まれる粒子量並びに、蛍光強度を測定することで、粒子と抗体の親和性の有無を確認した。

5. 細胞特異的な薬剤導入実験

ZZ 提示粒子に低分子薬剤のモデル化合物としてカルセインをエレクトロポレーション法により封入した。次に、抗体として上皮増殖因子レセプター(EGFR)に対する抗体または、神経増殖因子レセプター(NGFR)に対する抗体を結合させた。前者は、ヒト肝細胞 NuE 並びにヒト上皮細胞 A431、後者は、同じくヒト肝細胞 NuE 並びにラット副腎髄質細胞 PC12 に添加し、一晚培養後、共焦点レーザー顕微鏡(ZEISS)により観察を行った。

C. 研究結果

1. ZZ ドメイン提示粒子の生産及び精製

3種類の欠失変異体にZZドメインを挿入した粒子を酵母により生産し、その生産性の比較を行った(Fig.4)。その結果、d33 - 153株及び、d50 - 153株において高生産株の取得に成功した。このうち、今回は、抗原性の観点より、欠失領域の長いd33 - 153株を以降の実験に用いた。

まず、d33 - 153+ZZ株のSDS-PAGE(銀染色)及びウエスタンブロットを行った(Fig.5)。その結果、表面抗原タンパク質(d33 - 153)とZZドメインが融合した状態で発現されていることが確認できた。

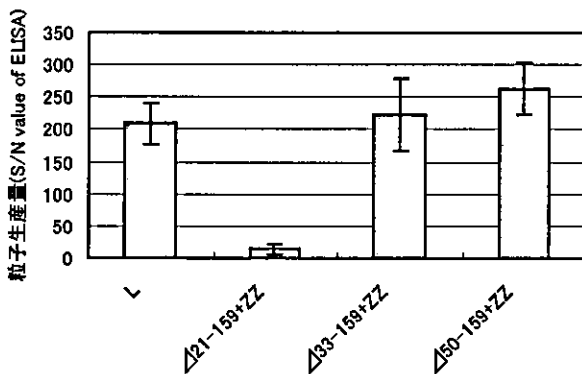


Fig.4 粒子生産量の比較

Silver stain

(kDa) 1

100
75
50
37
25

1: Δ33-153+ZZ (43 kDa)

Western blot

(kDa) 1 2

100
75
50
37

1: anti-S antibody

2: anti-ZZ antibody

Fig.5 銀染色並びにウエスタンブロット

2. 粒子の形態評価

動的光散乱光度計(Fig.6)並びに、原子間力顕微鏡(Fig.7)の結果より、ZZドメイン提示粒子が粒子径約100nmの球形状であることが視覚的に示された。

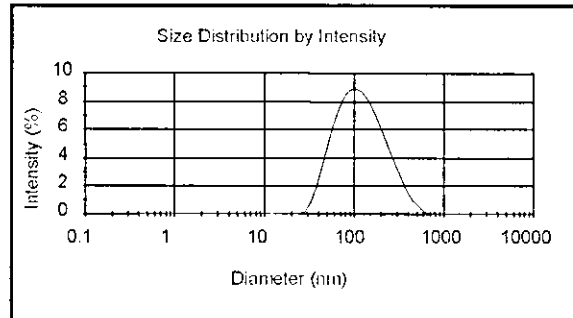


Fig.6 動的光散乱光度計による解析

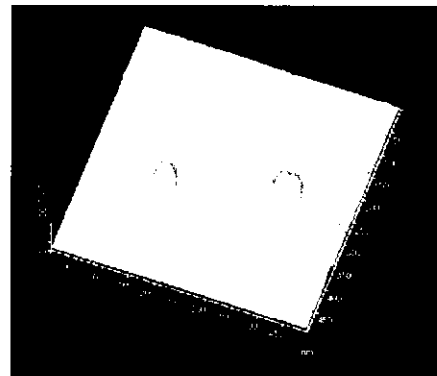


Fig.7 原子間力顕微鏡像

3. ZZ ドメイン提示粒子の抗体結合能評価
スクロース密度勾配遠心法により得られた各フラクションに関して、低密度側より各フラクションの粒子量並びに蛍光強度を測定し、その相関性を調べた。その結果、粒子量に対応して抗体の蛍光のピークがシフトしていることが観測された。つまり、粒子と抗体がその親和性により結合していることが言える。このことより、ZZ ドメインの機能性が確認された(Fig.8)。

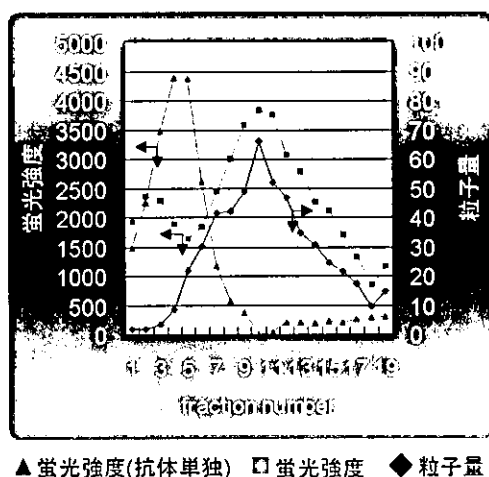


Fig.8 ZZ ドメイン提示粒子と抗体の結合

4. 細胞特異的な薬剤導入実験

共焦点レーザー顕微鏡による蛍光観察の結果(Fig.9)、抗 EGFR 抗体を提示した粒子を用いた場合は、ヒト上皮細胞 A431 のみに、抗 NGFR 抗体を提示した粒子を用いた場合は、ラット副腎髄質細胞 PC12 のみに蛍光が観察された。また、抗体を提示していない粒子を用いた場合は、どの細胞においても蛍光を観察することはできなかった。つまり、粒子に提示した抗体の特異性に応じたカルセイン導入に成功したと言える。これにより、疾患のある臓器を認識する抗体を粒子に提示することで、容易に薬

剤を導入し、治療できる可能性が示唆された。

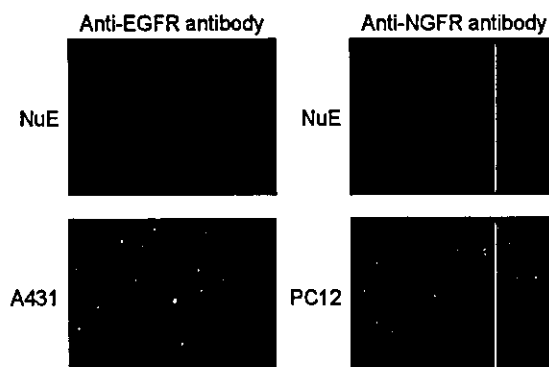


Fig.9 カルセイン導入実験の結果

D. 考察

1. 達成度について

バイオナノ粒子のヒト肝細胞への特異性を削除し、さらに、ZZ ドメインを提示した粒子の作製に成功した。これにより、様々な臓器への遺伝子・薬剤導入に必要な準備がなされたと言える。

2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

バイオナノ粒子を用いたピンポイントの遺伝子・薬剤デリバリーは、世界初の技術であり、ウイルスの持つ高い導入能力と安全性を併せ持つこの手法は、学術的・国際的に見て先進的なものである。この手法により、遺伝子や薬剤を標的臓器に導入できれば、副作用の心配が少なく、低侵襲な治療が可能となり、その社会的な意義は極めて大きい。今回、抗体の特異性をバイオナノ粒子に付与できたことは、治療の幅を広げる上でも有意義な結果である。

3. 今後の展望について

次年度以降は、今年度作製した ZZ ドメイ

ン提示粒子を用いて、*in vivo*での動態を明らかにしていくとともに、ZZドメイン以外のリガンドを提示した粒子についても検討を行う予定である。また、半導体ナノ粒子を用いたイメージングの技術を取り入れることで、バイオナノ粒子の細胞導入過程に関する挙動を明らかにする予定である。

E. 結論

以上のように、本研究を通じて、バイオナノ粒子が標的細胞に特異的な遺伝子・薬剤デリバリーに有効であることが明らかとなり、今後の医療への応用の基礎を示すことができたと言える。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanino, T., Matsumoto, T., Fukuda, H., and Kondo, A., Construction of System for Localization of Target Protein in Yeast periplasm Using Invertase., *Journal of Molecular Catalysis B*, 28(4-6), 259-264 (2004)
- 2) Matsumoto, T., Ishikawa, S., Fukuda, H., and Kondo, A., Construction of Ethanol-Tolerant Yeast Strains with Combinatorial Library-Selected Peptides., *Journal of Molecular Catalysis B*, 28(4-6), 253-257 (2004)
- 3) Lin, Y., Shiraga, S., Tsumuraya, T., Fujii, I., Matsumoto, T., Kondo, A., Ueda, M., Isolation of Novel Catalytic Antibody Clones from Combinatorial Library Displayed on Yeast-Cell Surface., *Journal of Molecular Catalysis B*, 28(4-6), 247-251 (2004)
- 4) Kondo, A., Ueda, M., Yeast Cell Surface Display-Application of Molecular Display., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 28-40 (2004)
- 5) 近藤昭彦、中空バイオナノ粒子によるピンポイント DDS、ファルマシア、40(11), 1013-1017 (2004)

2. 学会発表

- 1) 西野年明、村岡優、上田政和、妹尾昌治、多田宏子、谷澤克行、黒田俊一、福田秀樹、近藤昭彦、中空バイオナノ粒子を用いた外来タンパク質の肝細胞への特異的導入法の開発、第 69 回化学工学会年会、2004 年 4 月 (大阪)
- 2) 村岡優、西野年明、上田政和、妹尾昌治、多田宏子、谷澤克行、黒田俊一、福田秀樹、近藤昭彦、ピンポイントドラッグデリバリーを目指したバイオナノ粒子の開発、第 56 回日本生物工学会大会、2004 年 9 月 (名古屋)
- 3) 近藤昭彦、村岡優、黒田俊一、妹尾昌治、谷澤克行、上田政和、中空バイオナノ粒子によるピンポイント DDS、化学工学会山口下関大会、2005 年 9 月 (山口)
- 4) 近藤昭彦、中空バイオナノ粒子による遺伝子・タンパク質デリバリー、第 20 回日本 DDS 学会、2004 年 7 月 (東京)
- 5) Muraoka, M., Yamada, T., Ueda, M., Seno, M., Tada, H., Tanizawa, K., Kuroda, S., Fukuda, H., Kondo, A., Development of Pinpoint Genes and Drugs Delivery System

- with Protein Nano-Particles, The 10th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community, 2004年9月(大阪)
- 6) 近藤昭彦、村岡優、バイオナノ粒子を用いたピンポイント DDS システムの開発、第13回日本バイオイメージング学会学術集会 2004年11月(京都)
- 7) Kondo, A., New pinpoint drug delivery system using hollow nanoparticles of hepatitis B virus envelope L protein., Bios2005 January (USA)
- 8) Kondo, A., Anew Pinpoint Drug Delivery System Using Hollow Nanoparticles of Hapatitis B Virus Enverope L protein.,The 5th International Symposium on Future Medical Engineering based on Bio-nanotechnology., Feb. 15, 2005 (仙台)
- 9) 岩田清和、村岡優、山田忠範、上田政和、妹尾昌治、谷澤克行、黒田俊一、福田秀樹、近藤昭彦、Development of Pinpoint Gene Delivery System with Protein Nano-particles、第3回最先端バイオテクノロジー公開セミナー、2005年2月(神戸)
- 10) 宍戸卓矢、村岡優、上田政和、妹尾昌治、多田宏子、谷澤克行、黒田俊一、福田秀樹、近藤昭彦、昆虫細胞を用いたバイオナノ粒子の効率的生産、第70回化学工学会、2005年3月(名古屋)
- H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

中空バイオナノ粒子のステルス化

分担研究者 黒田 俊一 大阪大学産業科学研究所・助教授

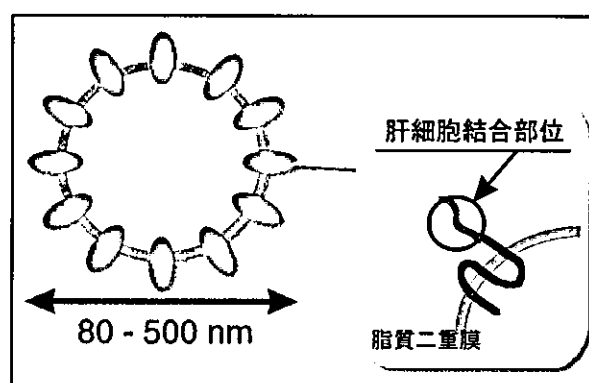
本研究は、B型肝炎ウイルス（HBV）の外皮タンパク質（Lタンパク質）を酵母により直径百 nm 前後の中空バイオナノ粒子（L粒子）として大量生産し、L粒子内部に治療用遺伝子を包含させ、L粒子表面のヒト肝細胞特異的レセプターの働きで、生体内で使用可能なヒト肝臓特異的ピンポイント遺伝子デリバリーシステムとして癌治療分野で臨床応用することを目的としている。本年度は、通常患者への長期間投与と抗HBV抗体を保有している患者への投与を可能にするために、低免疫原性化L粒子の創製を行う。具体的には、B型肝炎ワクチン摂取者においてもヒト抗HBV抗体に捕捉されず、T細胞の標的にもならないHBVエスケープ変異体（粒子表面の特定アミノ酸が2箇所変異している）のLタンパク質をMimicしたL粒子を作製し、Balb/cマウスに接種したところ、野生型L粒子と比べて飛躍的に抗原性が低い改変型L粒子の開発に成功した。その結果、改変型L粒子は免疫系から認識されにくいステルス型L粒子として非常に有望と示唆された。

A. 研究目的

遺伝子治療の主流である感染性ウイルスは、遺伝子導入効率が高いものの、狙った細胞だけに遺伝子導入することが難しいので、外科手術により患部への直接投与が行われている。そのため、患者のQOLの大幅な低下が指摘されている。さらに、ウイルスゲノムも同時に導入してしまうので、予期不能な副作用が生じる危険性が高く、実際に死亡例、発癌例、生殖細胞への感染例などがある。従って、①高い遺伝子導入効率を保ちつつ、②注射での投与であっても、特定の組織・細胞へ遺伝子を運搬できる高い特異性を持ち、③ウイルスゲノムの混入が全くないなどの高い安全性を確保で

きる、などの特徴を有する遺伝子導入法が求められている。

我々はHBVがヒト肝臓特異的かつ強力に感染するのに必須なHBV外皮Lタンパク質を、L粒子（左下図）として大量生産する



組換え酵母系を確立し、粒子内部に遺伝子

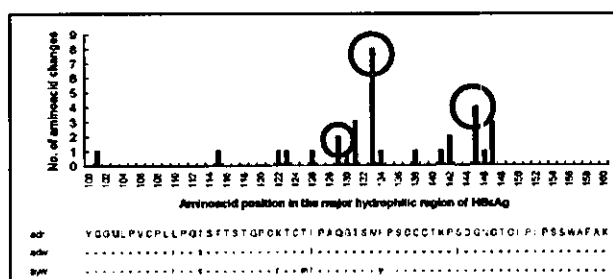
をエレクトロポレーションにより封入した後、担癌動物に静脈注射するだけで、ヒト肝臓癌由来組織のみに遺伝子を送達させることに成功した。同時に血液凝固因子9遺伝子を肝臓に送達させ血友病Bが遺伝子治療可能なことも示した。本方法は上記3要件のすべてを満たしており、全く新しいコンセプトの遺伝子導入である（「中空バイオナノ粒子」と命名）。

本研究では、この中空バイオナノ粒子が次世代の遺伝子治療用ベクターの主流になると考え、臨床応用する際に、最も大きな問題になると考えられる本粒子の免疫原性を出来る限り低減させることを目的としている。その結果、通常患者への長期間投与と、欧米に多い抗HBV抗体を保有している患者への投与を可能にするために、低免疫原性化L粒子の創製を行う。

B. 研究方法

1. HBV エスケープ変異体由来アミノ酸置換の導入

2001年Houら(Hepatology誌)のよると、B型肝炎ワクチン接種者の血液中に抗HBV抗体（主に抗S抗体が中心）が充分量存在するにも関わらず、ごくまれにHBVが増殖して、B型肝炎を発症することが知られている。これはHBVの主要外皮タンパク質であるSタンパク質（226アミノ酸基）の中程に位置する粒子外側提示部分（112-148アミノ酸残基部分：注、Lタンパク質はSタンパク質をC末端部分に含み、更にN末端側に163アミノ酸残基のPre-S領域が付加している。）に変異が入って、血液中に存在する抗HBV抗体が認識できなくなったものと考えられている（次頁上図）。そこで、特に多くの患者の中に



見出される129番目のGln残基のArg残基への置換(Q129R)、145番目のGly残基のArg残基への置換(G145R)を、それぞれ及び両方をL粒子発現系に導入して、通常通り酵母AH22R株を用いて大量発現させ、超遠心法を用いて精製した。

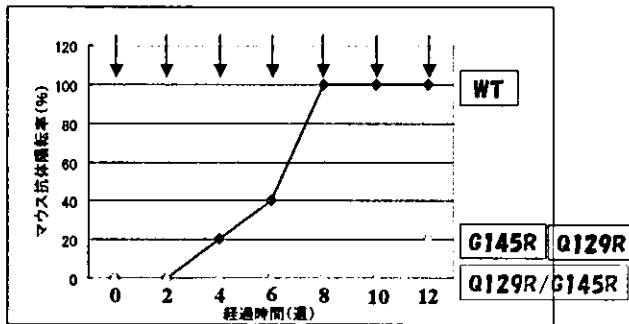
2. マウスを用いた免疫原性の測定

精製したL粒子4種類（野生型、Q129R、G145R、Q129R/G145R）の何れかを100μg（対マウス想定使用量の10倍）ずつ2週間おきにBalb/cマウス（1群♀20匹）に尾静脈より連続注射した。その後、2週間おきに採血を行い、血清を用いて、L粒子を抗原とするELISAに供した。ELISAにおいては、未接種マウス血清を用いて繰り返し測定した吸光度の99%信頼限界幅（mean+2.1SD; COV）を超える吸光度を与える血清を陽転と判断した。

C. 研究結果

コントロールである野生型L粒子を接種されたマウスにおいては、接種開始4週目から抗体産生が認められた。8週目においては全てのマウスにおいて陽転していた。次に、変異を少なくとも1つ有する変異型L粒子においては、接種開始10週目まで抗体産生が認められなかったが、12週目において20%のマウスが陽転していた。さらに、両方の変異を有するL粒子においては、観

察期間中に抗体産生は認められなかった
(下図)。



D. 考察

B型肝炎ワクチンにも用いられるHBV外皮タンパク質粒子の抗体誘導能は、一般に受け入れられているレベルよりも低いと思われる。というのも、ワクチン接種においては、アラムアジュバントと複合体を形成させ、免疫効果が充分得られる体内貯留性の高い筋肉内及び皮下接種を行い、さらに0, 4, 12週の3回接種が行われ、その結果、何とか9割の接種者に抗体を誘導できる。しかし、接種後、通常2年で折角誘導した抗体は体内より消えてしまう。他の臨床応用されているワクチンは、1回接種で十分なものが多く、しかも免疫効果が何年も続くものも少なくない。今回我々は、B型肝炎ワクチンと同等量のL粒子を、アジュバントなしで、抗体誘導されにくい静脈中に投与することを計画している。この条件であれば、強力にL粒子に対する抗体が誘導されることはないのではと考えていた。そして、実際に野生型L粒子を10倍量連続投与したところ、2-4回の連続投与に充分対応できることが実際に証明された。

しかし、今後L粒子を臨床応用するためには抗原性を徹底的に押さえ込むことが大事と考えられる。そこで、今回HBVエスケープ変異体をmimicすることにより低抗原

性L粒子を創出することに成功した。特に2種類の変異を併せ持つ変異型L粒子は、

10倍量のL粒子を2週間おきに12週間(6回接種)接種しても抗体産生が認められないので、臨床においても十分な低抗原性であると考えられる。

ただ今回の検討は、マウス抗体産生系に対する効果であり、ヒト抗体産生系と完全には同じとはいえない。この種

の問題は今後の検討課題である。また、今回はL粒子の抗体誘導能のみに行っており、細胞免疫誘導能に関しては全く検討していない。特にPre-S領域にT細胞エピトープが存在することが分かっており、今後はPre-S領域の欠失変異体を得て検討すべきと考える。さらに、欧米などではB型肝炎ワクチン接種が普及しており、ほとんどの成人の体内には抗HBV抗体(中和抗体)が著量存在する。今回得られたステルス型L粒子が大量の中和抗体内でも機能するか否かは今後の検討課題である。

E. 結論

生体内での抗体産生能の低いステルス型L粒子の創製に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada, T., Kondo, A., Ueda, M., Seno, M., Tanizawa, K., and Kuroda, S. Novel Tissue and Cell Type-specific Gene Delivery System Using Surface Engineered Hepatitis B Virus Nanoprotein Particles. *Current Drug Targets: Infectious Disorders* 4 (2004), No. 2, 163-167.
- 2) Yamada, T., Seno, M., Kondo, A., Ueda, M., Tanizawa, K., and Kuroda, S. Pinpoint Drug