

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 近藤 昭彦

平成18(2006)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 8
近藤 昭彦 (神戸大学工学部・教授)
2. バイオナノキャリアの大量精製および物質導入法の改良に関する研究
. 14
黒田 俊一 (大阪大学産業科学研究所・助教授)
3. 外来タンパク質を融合したバイオナノキャリアに関する研究 . . 20
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 29
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の創生
-膜透過ペプチド (PTD) を用いた L 粒子の修飾- 36
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)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 44

IV. 研究成果の刊行物・別刷 52

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や安定な保存法の確立、バイオナノ粒子への効率的な薬剤や遺伝子封入法の開発、バイオナノ粒子の肝細胞認識領域のZZやストレプトタグ等アフィニティ分子への変換とこれらの特異性改変型粒子を活用しての抗体依存的な薬剤や遺伝子の導入、タンパク質デリバリーを目指してのC-末融合法の開発など、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抗がん剤や遺伝子の肝臓へのピンポイントデリバリーに関して検討した。

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

いる。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が可能で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

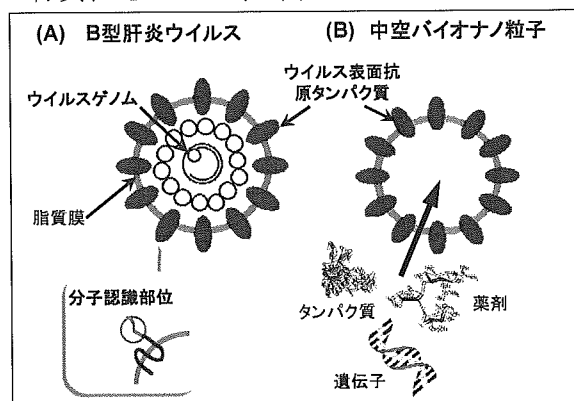


図1 バイオナノ粒子の概念

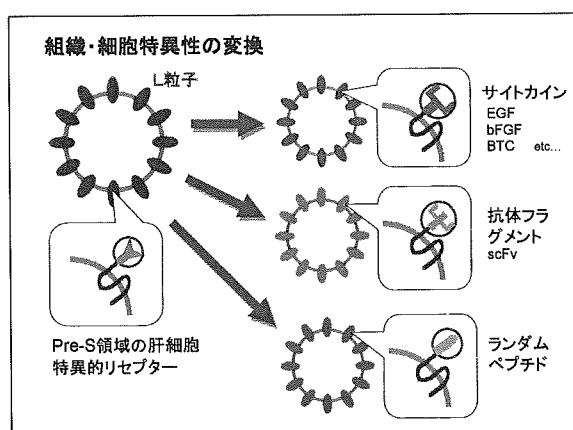


図2 バイオナノ粒子の組織・特異性変換

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とがん遺伝子療法への展開を目指して、以下の点に関して研究を進めた。

・L粒子の効率的な精製法の検討

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、熱処理とクロマトグラフィー法を組み合わせた効率的な精製法を開発することを試みた。

・L粒子の長期保存法の検討

L粒子を治療に用いるためには、長期保存法の開発が必須である。そこで、凍結乾燥による長期保存を行うための条件の最適化を行った。

・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

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、およびアビジンを結合する分子ストレプトタグへの交換を試みた。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、抗体を結合できる。またストレプトタグは

アビジンを結合できるため、ビオチン化抗体を結合できる。従って、これらの粒子を用いることで、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変わる新しい封入法としてリポソーム法を開発を行った。

・遺伝子融合によるタンパク質封入L粒子の開発

Lタンパク質遺伝子と外来タンパク質遺伝子的を融合させたバイオナノキャリアの作成を試みた。実験では表面抗原L-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（GFP）とホタル由来のルシフェラーゼ（Luc）を融合させることを試みた。これらのタンパク質は蛍光や発光により、その局在を知る事ができるレポータータンパク質として有用であるので、分子標的によるバイオイメーキングを視野に入れた形の癌の標的を考える事ができる。L-タンパク質のC末端の長さを調整して融合タンパク質粒子の発現量を上げる工夫を行い、GFP融合バイオナノキャリアを作成して *in vivo* で投与し、ヌードマウスに移植したヒト肝臓がん由来細胞の標的を検討した。

・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を目的タンパク質と融合して、そのデリバリー能の検証を詳細に行い、

中空バイオナノ粒子に付加すべき PTD の候補を最終的に決定するための検討を行った。

・L 粒子の肝細胞がん治療への応用に関する検討

バイオナノ粒子として、L 粒子と優れた生体および血液適合性を有する水溶性共重合体ポリマーである PMB30W を用いた。PMB30W はエステル結合により HBs 抗原や増殖因子などを結合させ、特定の組織や細胞に特異性や指向性を持たせることができる。本年度は HBs 抗原 L 粒子についてはアドリマイシンを封入し、ヒト肝細胞癌などに対する殺細胞効果を、PMB30W については HBs 抗原結合ポリマーが緑色蛍光タンパク遺伝子 cDNA をヒト肝細胞癌にピンポイントにデリバリーして緑色蛍光タンパクを発現できるかを検討した。さらに、血管新生を阻害して抗腫瘍効果を示す物質を明らかにするためヒト RNase タンパクを挿入した繊維芽細胞増殖因子 (FGF) をヒト癌移植モデルに投与してその抗腫瘍効果を検討した。

・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 粒子の効率的な生成法の検討

L 粒子のタンパク質粒子としての構造は高温 (70°C 以上) において 30 分以上安定であること (山田ら、Vaccine, 2001) と、酵母

由来タンパク質のほとんどは 60°C で変性することから、L 粒子の酵母菌体から菌体抽出液を得た後で熱処理を加えることにした。種々の温度を検討した結果、70°C 30 分が最適であることが判明した。また効率的な精製法においてチッソ社の硫酸化セルロファインを用いて精製を行ったところ、非常に良好な精製結果を得た。

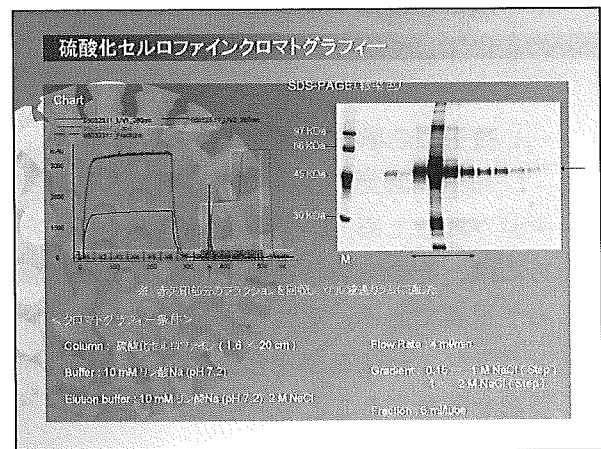


図3 硫酸化セルロファインクロマトグラフィー

以上の結果をもとに、熱処理→硫酸化セルロファイン精製→ゲルろ過精製、という簡便な精製法を確立できた。

・L 粒子の長期保存法の検討

L 粒子は直径 100 nm の中空状カプセルなので内部に水分を包含しており、凍結すると水分の凍結により粒子構造を著しく損傷していた。その為、L 粒子の保存方法は 4°C 冷蔵であり、微量に混入した宿主由来プロテアーゼにより分解を受ける事がしばしばあった。そこで、現在臨床応用されている B 型肝炎ワクチンの製剤法を参考にして、糖質を共存させて凍結乾燥を行ってみた。その結果、2.5% 蔗糖を含む PBS で溶解した L 粒子を凍結乾燥すると、半年以上、その性質を失わずに安定に保存できる事が判明した。

・ 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、50-159aa 欠失型 L 粒子 (d50-159)は、肝細胞への特異性を失ってはいるが、発現量が多く有効であることが明らかとなっている。そこで、この d50-153 に ZZ ドメイン(抗体のFcドメインに結合)を挿入した粒子、およびストレプトタグ (ストレプトアビジンに結合)を挿入した粒子を、酵母により生産したところ、高生産株の取得に成功した。そこで、これらの株から粒子の精製を行い、その特性評価および抗体依存的な遺伝子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、原子間力顕微鏡による評価から、ZZ ドメイン提示粒子およびストレプトタグ提示粒子は、いずれも L 粒子と同様に粒子径約 100 nm の球形状であることが示された。一例として図4にストレプトタグ提示粒子の AFM 像を示す。

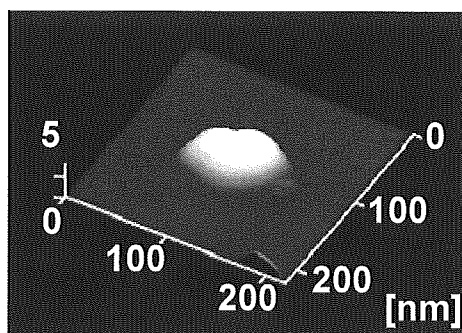


図4 ストレプトタグ提示粒子の AFM 像

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 EGFP 発現プラスミドを封入して、抗体依存的な導入を検討した。その結果、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 ErbB2 抗体を提示した粒子を用いた場合では、ヒト乳がん細胞 SK-BR-3 のみに蛍光が観察された(図5)。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EGFP 遺伝子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、容易に遺伝子を導入し、治療できる可能性が示唆された。

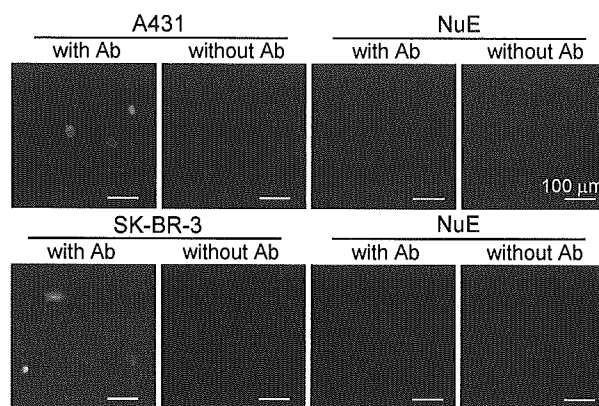


図5 抗体依存的遺伝子導入の結果

・遺伝子融合によるタンパク質封入L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、L タンパク質と遺伝子的に融合させた融合タンパク質の作成を試

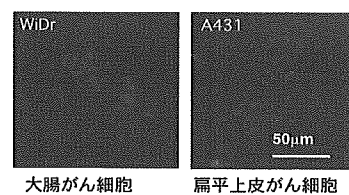
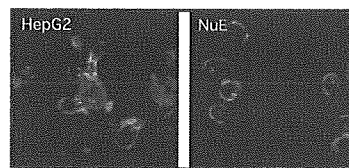
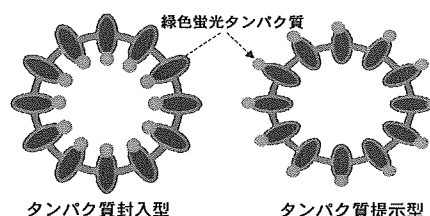


図6 L-GFP の導入実験

みた。ここでは、Lタンパク質に GFP と Luc を融合させることを試みた。

Lタンパク質の C 末端を 45 アミノ酸残基欠損させた T2 型の融合タンパク質が最も高い発現量を示したため、この T2 型融合 GFP (L-GFP) が粒子を形成していることを確認 (GFP 内包型と提示型がある) の後、これを培養細胞の培地中に添加して 9 時間後に、細胞を蛍光顕微鏡で観察した (図 6)。

その結果、L-GFP 融合粒子はヒト肝臓由来の細胞のみを特異的に認識し、細胞に集積されることが明らかとなった。こうした標的細胞特異的な融合粒子の取り込みは、*in vivo* でも見られたことから、遺伝子融合によるタンパク質封入 L 粒子は、タンパク質の標的細胞への送達に有効であると言える。

・L 粒子への遺伝子等の封入の効率化

L 粒子への遺伝子導入の効率を上げるため、新たにリポソーム融合法の開発を行った。これは、L 粒子自身に膜融合活性があることと、リポソームと近接させると L 粒子が自発的に融合することを利用した手法である。既にリポソーム内部に薬剤や遺伝子を封入する方法は、過去 20 年間位に各方面の研究者が最適化してきているので、これらの方法を用いてリポソーム内部に遺伝子 (GFP 発現遺伝子)、蛍光物質 (直径 100 nm の蛍光ポリスチレンビーズ) 及び抗癌剤 (アドリアマイシン) を封入し、L 粒子と混合し、リポソームと L 粒子を自発的に融合させ、リポソーム内部の物質を L 粒子内部に移行させた。このリポソーム融合法を利用することで、L 粒子への遺伝子や薬剤の封入効率が、飛躍的に向上することが明らかとなった。

・脳内デリバリー可能な中空バイオナノ粒子の

創製

脳内デリバリー可能な、PTD の設計とモデルタンパク質の脳内への送達に関する検討を行った。まず、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 (EGFP との融合) を構築した。続いて構築した PTD3-EGFP について、培養細胞を用いて取り込み実験を行ったところ、極めて高効率に細胞内に PTD3-EGFP を導入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を行ったところ、構築した PTD3-EGFP 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、脳内に効率よくデリバリーされることがわかった。

・L 粒子の肝細胞がん治療への応用に関する検討

アドリアマイシン封入 L 粒子によるヒト肝細胞癌に対する殺細胞効果について検討をした。コートソームにアドリアマイシンを添加し、混合してアドリアマイシン封入コートソームを超遠心にてコートソームやアドリアマイシンと分離して、さらに L 粒子を添加し反応させた後に、もう一度超遠心を行い、アドリアマイシン封入 L 粒子を作製・精製した。その結果、リポソームであるコートソームを利用することによりアドリアマイシンを L 粒子に封入することが可能であることや、アドリアマイシン封入 L 粒子には肝細胞癌株に対する殺細胞効果が認められることが判明した。まだ、*in vitro* の結果であるので *in vivo* での成績や特異性など証明すべき事項は多いが、今後肝細胞癌に特異的な効果が強く副作用の少ない優れた抗癌剤が開発される可能性が生まれてきた。

さらに PMB30W については HBs 抗原結合ポリマーが緑色蛍光タンパク遺伝子 cDNA をヒト肝細胞癌にピンポイントにデ

リバリーして緑色蛍光タンパクを発現することを証明した。さらに、血管新生を阻害して抗腫瘍効果を示す物質を明らかにするためヒトRNaseタンパクを挿入した繊維芽細胞増殖因子（FGF）をヒト癌移植モデルに投与してその抗腫瘍効果を明らかにした。

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17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。また、細胞肝がん治療や脳腫瘍治療への応用についても、基礎的な知見が集積しつつあると言える。

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、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・精製、効率的な遺伝子、薬剤、タンパク質の封入、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、肝がんの薬剤や遺伝子のピンポイントデリバリーによる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確立

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(バイオナノカプセル)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、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、静脈注射といった低侵襲的な方法により、高い導入効率で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 ドメインニ量体(ZZ ドメイン)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特異的に遺伝子導入できることを確認した。また、新規の粒子として、ストレプトタグ提示粒子の開発を行った。

A. 研究目的

近年、癌や遺伝病などの治療法として遺伝子治療が注目を浴びている。しかしながら、キャリアーとして用いられているウイルスベクターに起因する副作用や非ウイルスベクターにおける遺伝子導入効率の低さなどが問題となっている。そこで、本研究グループでは、副作用の低減、導入効率の向上を目指し、細胞特異的な遺伝子導入を可能とする新規キャリアーの開発を行った。新規キャリアーとしては、B 型肝炎ウイルス由来の表面抗原(HBsAg)粒子(バイオナノカプセル)(図 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。

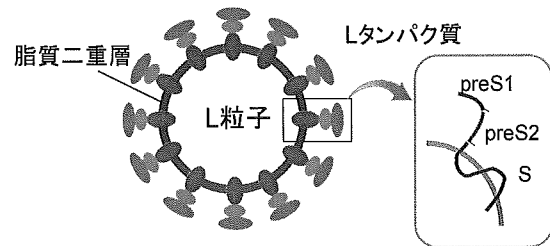


図 1 バイオナノ粒子

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(図 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、各種細胞への遺伝子導入を試みた。さらに、新規の粒子として、ストレプトタグ提示粒子の作製も試みた(図 3)。この粒子では、アビジンと親和性のあるストレプトタグ(WSHPQFEK)を粒子表面に提示することにより、アビジンを介して、ビオチン化抗体等の様々な生体認識タンパク質を粒子表面に提示できる。

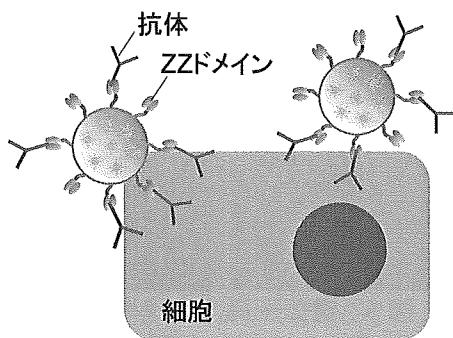


図 2 ZZ ドメイン提示粒子

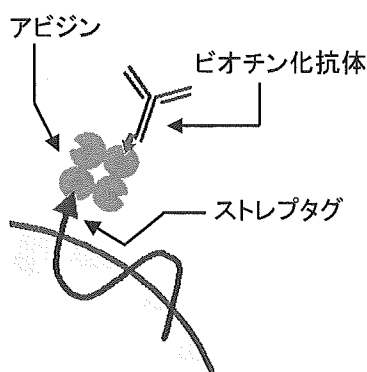


図 3 ストレプトタグ提示粒子

B. 研究方法

1) 欠失変異導入並びに ZZ ドメイン提示粒子・ストレプトタグ提示粒子の構築

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(図 4)。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 ドメイン及び、ストレプトタグを挿入した。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。

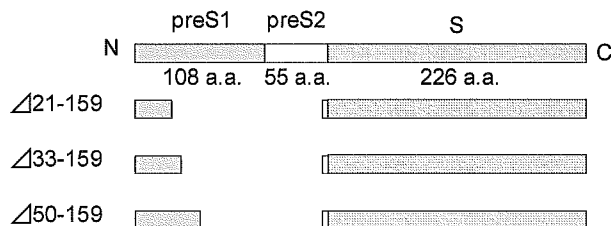


図 4 欠失変異体

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、d50-159 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 日間大量培養を行い、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。精製した粒子は遺伝子導入実験に用いた。

3) ZZ ドメイン提示粒子による遺伝子導入実験

緑色蛍光タンパク質(GFP)の発現プラスミド pGFP をモデル遺伝子としてエレクトロポレーション法により ZZ 提示粒子に封入した。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、ErbB2 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 並びにヒト乳癌細胞 SK-BR-3 に添加し、3 日間培養後、共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss)により蛍光観察を行った。

4) ストレプトタグ提示粒子の生産及び精製

各ストレプトタグ提示粒子の生産量の比較より、d50-159 株を用いて研究を行った。得られた高生産株より、ZZ 提示粒子の場合と同様にストレプトタグ提示粒子を精製した。精製した粒子はウエスタンブロット解析や粒子形態の解析に用いた。

5) ストレプトタグ提示粒子の形態評価

ストレプトタグ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。

C. 研究結果

前年度は、ZZ ドメイン提示粒子を用いた細胞特異的薬剤導入法の開発を行ったが、今年度はそれに引き続き、遺伝子の細胞特異的導入を試みた。また、新規のキャリアーとして、ストレプトタグ提示粒子の開発を行った。

1) ZZ ドメイン提示粒子による遺伝子導入実験

共焦点レーザー顕微鏡による蛍光観察の結果(図 5)、抗 EGFR 抗体を提示した粒子を用いた場合には、ヒト上皮細胞 A431 のみに、抗 ErbB2 抗体を提示した粒子を用いた場合には、ヒト乳癌細胞 SK-BR-3 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には、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て遺伝子導入に成功し、GFP が発現したと言える。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、容易に遺伝子を細胞内に導入し、遺伝子治療できる可能性が示唆された。

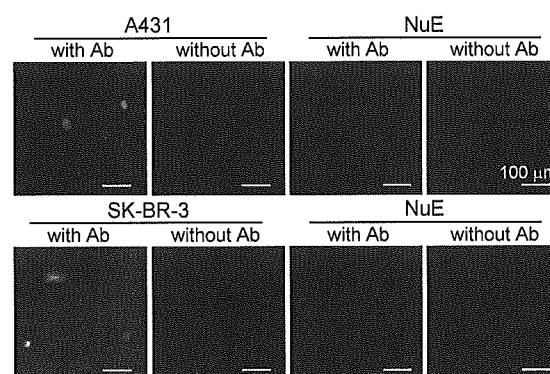


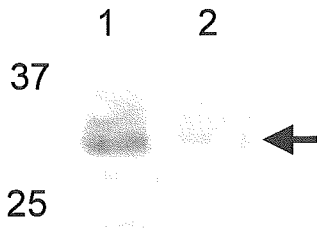
図 5 遺伝子導入実験の結果

2) ストレプトタグ提示粒子の生産及び精製

3 種類の欠失変異体にストレプトタグ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、d50-159 株において高生産株の取得に成功した。

そこでまず、ストレプトタグ提示粒子のウエスタンブロット解析を行った(図 6)。その結果、HBsAg に対する抗体を用いた場合にもストレプトタグに対する抗体を用いた場合にもバンドが確認されたことから、それ

らが融合した状態で発現されていることが確認できた。



1: anti-HBsAg抗体
2: anti-streptag抗体

図6 ウエスタンブロット解析

3) ストレプタグ提示粒子の形態評価

動的光散乱光度計 (図7) 並びに、原子間力顕微鏡 (図8) の結果より、ストレプタグ提示粒子が粒子径約 120 nm の球形状であることが視覚的に示された。

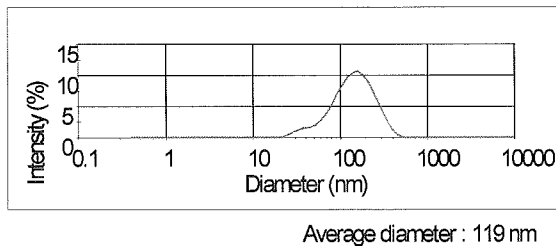


図7 動的光散乱光度計による解析

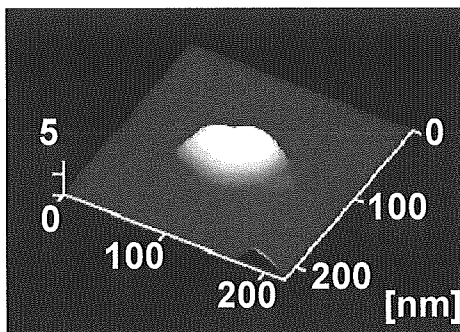


図8 原子間力顕微鏡像

D. 考察

1) 達成度について

ZZ ドメイン提示粒子を用いて細胞特異的な遺伝子導入に成功した。また、新規のキャリアーとしてストレプタグ提示粒子の作製に成功した。遺伝子治療の新規キャリアーの開発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、バイオナノ粒子を用いて様々な細胞に遺伝子を導入できたことは、遺伝子治療を進展させ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、ストレプタグを提示した粒子についても詳細に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。また、*in vivo* における、抗体結合 ZZ 提示粒子による導入実験を行う予定である。

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への特異的な遺伝子・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. The Specific Delivery of Proteins to Human Liver Cells by Engineered Bio-Nanocapsules.
Yu, D., Amano, C., Fukuda, T., Yamada, T., Kuroda, S., Tanizawa, K., Kondo, A., Ueda, M., Yamada, H., Tada, H., and Seno, M.
FEBS J. 272 (2005) 3651-3660.
2. 革新的なナノキャリア：中空バイオナノ粒子によるピンポイント DDS 近藤昭彦、黒田俊一、谷澤克行、妹尾昌治、上田政和 月刊「バイオインダストリー」22 (2005), No. 5, 22-27.
3. 中空バイオナノ粒子を用いたピンポイント DDS の開発 近藤昭彦、黒田俊一、谷澤克行、妹尾昌治、上田政和 月刊「ケミカル・エンジニアリング」50 (2005), No. 5, 23-28.
4. 細胞及び組織特異的遺伝子導入を可能にするバイオナノカプセル 山田忠範、妹尾昌治、上田政和、近藤昭彦、谷澤克行、黒田俊一 生物工学会会誌 83 (2005), No. 8, 380-383.
5. 近藤昭彦, 創薬などに期待高まる「細胞

表層工学」, 日経ナノビジネス 9, 20-23 (2005)

6. 近藤昭彦, バイオナノ粒子と産業展開, M&E 誌, 11月号, 140-143 (2005)

2) 学会発表

1. 岩田清和、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、細胞膜透過ペプチドを提示したバイオナノ粒子による各種細胞への薬剤導入、第57回日本生物工学会大会、2005年11月(筑波)
2. 宍戸卓也、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57回日本生物工学会大会、2005年11月(筑波)
3. 村岡 優、西野 年明、福田 秀樹、近藤 昭彦、DNA・タンパク質複合体粒子によるヒト肝細胞への特異的遺伝子導入、第57回日本生物工学会大会、2005年11月(筑波)
4. 尹明義、宍戸卓也、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、昆虫細胞を用いた特異性改変型バイオナノ粒子の開発、第70回化学工学会年会、2006年3月(東京)

H. 知的所有権の出願・取得状況

1) 特許取得

1. レセプター結合性物質のスクリーニング方法, 近藤昭彦、黒田俊一、植田充美、石井純、福田秀樹、立松健司、山崎智子 (出願人: バイオ・エナジー株式会社) 出願 2005-96184 (2005年3月29日)

2. 癌治療用薬剤及びその作製方法, 妹尾
昌治、多田宏子、福田隆之、黒田俊一、
谷澤克行、近藤昭彦、上田政和、浜田博
喜(出願人: (株)ビークル、(株)バイオ・タキ
ソール、国立大学法人 岡山大学) 出願
2005-84438(2005年3月23日)

2) 実用新案登録
なし

3) その他
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

バイオナノキャリアの大量精製および物質導入法の改良に関する研究

分担研究者 黒田 俊一 大阪大学産業科学研究所・助教授

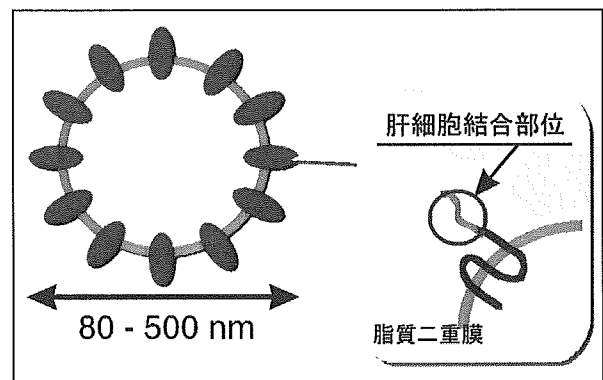
本研究は、B型肝炎ウイルス（HBV）の外皮タンパク質（Lタンパク質）を酵母により直径百 nm 前後の中空バイオナノ粒子（L粒子）として大量生産し、L粒子内部に治療用遺伝子を包含させ、L粒子表面のヒト肝細胞特異的レセプターの働きで、生体内で使用可能なヒト肝臓特異的ピンポイント遺伝子デリバリーシステムとして癌治療分野で臨床応用することを目的としている。昨年度、我々は低免疫原性化 L 粒子（ステルス化 L 粒子；Q129R、G145R、Q129R /G145R）を開発した。その機能を *in vivo*（実験動物）において集中的に検討するために、1 精製ロット当りの L 粒子生産量を飛躍的増加させ、長期保存可能にする必要があった。また、粒子内部への物質封入法を、エレクトロポレーションの様なバラツキが大きく大量生産に不向きな方法から変更する必要があった。今年度は、L 粒子の大量精製法及び長期保存法の確立を行い、及び L 粒子内部への物質導入法を改善すると共に大量生産向きに変更した。

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。平成16年度では、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、HBV エスケープ変異体を模倣した低免疫原性化L粒子（ステルス化L粒子；Q129R、G145R、Q129R/G145R）の創製を行い、マウスにおいて低抗原性であることを示した。平成17年度の初めに、その機能を *in vivo*（実験動物）において集中的に検討するために、1精製ロット当りのL粒子生産量を飛躍的増加させたところ、得られたL粒子が精製過程において酵母宿主由来のプロテアーゼにより分解を受けることが頻発した。カラムクロマトグラフィーを用いて精製度を向上させたが、L粒子の最終精製量が著しく減少した。そこで、平成17年度では大量精製法と長期保存法の確立を目指した。また、粒子内部への物質封入法を、エレクトロポレーションの様なバラツキが大きく大量生産に不向きな方法から、安定かつ効率的に、しかも大量生産向きの物質封入法に変更した。

B. 研究方法

L粒子発現酵母細胞は、*Saccharomyces cerevisiae* AH22R株でプラスミドpGLDLIP39-RcT（黒田ら、J. Biol. Chem., 1992）を保持するものを用いた。この発現株は、中空バイオナノ粒子の工業生産に用いているものと同じである。発現株の培養及び精製のプロトコルは基本的に既報（山田ら、Vaccine, 2001）に従った。精製に使用した機材は、Amersham-Pharmacia社の液体クロマトグラフィー機器 AKTA explorerを使用した。

C. 研究結果

1. 効率的な精製方法

L粒子のタンパク質粒子としての構造は高温（70℃以上）において30分以上安定であること（山田ら、Vaccine, 2001）と、酵母由来タンパク質のほとんどは60℃で変性することから、L粒子の酵母菌体から菌体抽出液を得た後で熱処理を加えることにした。種々の温度を検討した結果（図1）、70℃30分が最適であることが判明した。

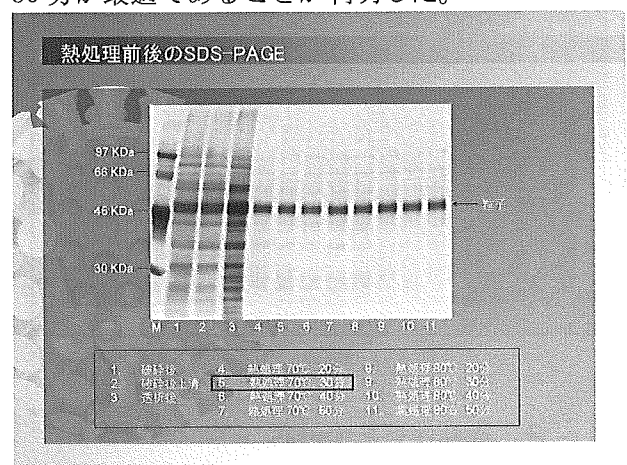


図1

また効率的な精製法においてアフィニティクロマトグラフィーが多用されるので、

種々検討を行った結果、L 粒子が硫酸化糖質に親和性を有するという報告があったので、チッソ社の硫酸化セルロファインを用いて精製を行ったところ、非常に良好な精製結果を得た（図2）。

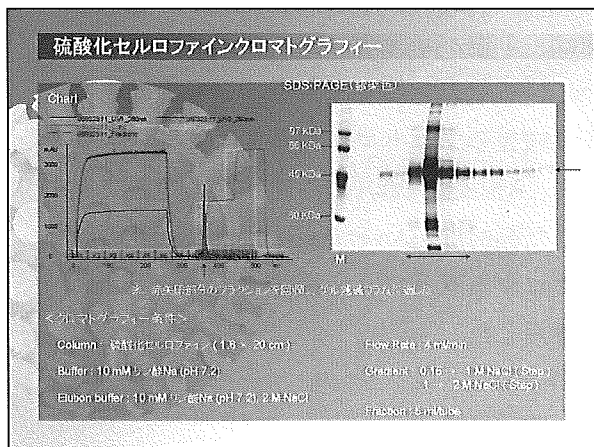


図2

最終的には、L 粒子の精製スケジュールは図3のとおりになった。その結果、同量の菌体からの精製日数が7日から3日になり、さらに精製効率（収率）が2-3%から15%まで向上した。

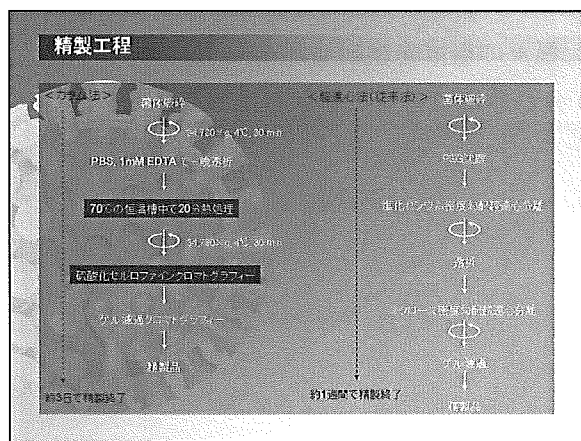


図3

2. 長期保存法の検討

L 粒子は直径 100 nm の中空状カプセルなので内部に水分を包含しており、凍結すると水分の凍結により粒子構造を著しく損傷していた。その為、L 粒子の保存方法は4°C

冷蔵であり、微量に混入した宿主由来プロテアーゼにより分解を受ける事がしばしばあった。この状況は、L 粒子の効果を *in vivo* で評価する際に、同じロットのL 粒子を安定かつ大量に供給できず、*in vivo* データの精度に問題が生じていた。そこで、現在臨床応用されている B 型肝炎ワクチンの製剤法を参考にして、糖質を共存させて凍結乾燥を行ってみた。その結果、2-5%蔗糖を含む PBS で溶解した L 粒子を凍結乾燥すると、半年以上、その性質を失わずに安定に保存できる事が判明した（データ示さず）。

3. 効率的な物質導入法

Nature Biotechnology に本方法を報告した時の L 粒子内部への物質導入法はエレクトロポレーション法であった（山田ら、Nature Biotechnology, 2003）。この方法は、簡便ではあるが、①L 粒子のロットによるバラツキが大きく、②一度に少量しか処理できず、③L 粒子同士の融合を惹き起こす様で L 粒子の直径が最大で 1000 nm 程度になり、*in vivo* での使用に問題があった。

そこで、種々検討を行った結果、L 粒子自身に膜融合活性があることと、リポソームと近接させると L 粒子が自発的に融合することを見出した。既にリポソーム内部に薬剤や遺伝子を封入する方法は、過去 20 年間位に各方面の研究者が最適化してきているので、これらの方法を用いてリポソーム内部に遺伝子 (GFP 発現遺伝子)、蛍光物質（直径 100 nm の蛍光ポリスチレンビーズ）及び抗癌剤（アドリアマイシン）を封入し、L 粒子と混合したところ、リポソームと L 粒子の自発的な融合が起こり、リポソーム内部の物質が L 粒子内部に移行する事が確認された（図4）。

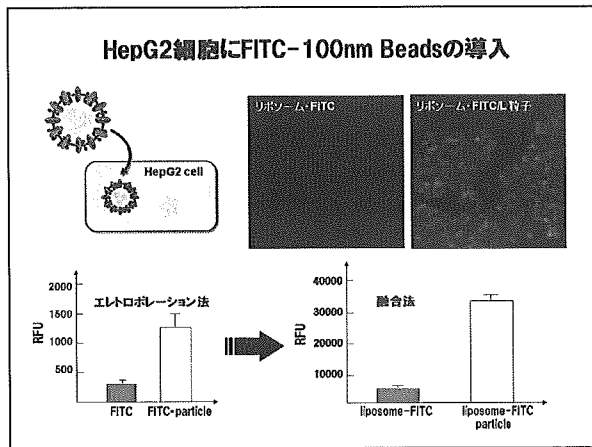


図 4

このリポソーム融合L粒子（100 nm 蛍光ポリスチレンビーズ封入）を、ヒト肝癌由来細胞 HepG2 の培養液に加えたところ、エレクトロポレーションによるL粒子よりも遥かに高い効率で蛍光を細胞が発していた（図5）。

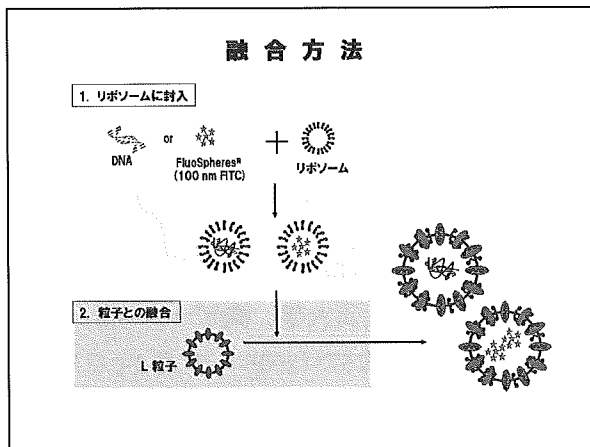


図 5

さらに、リポソーム融合L粒子（GFP 発現プラスミド封入）を、ヒト肝癌由来細胞 HepG2 に加えたところ GFP 由来の蛍光が高効率で発現していた（データ示さず）。

また、上記蛍光ポリスチレンビーズ封入L粒子をヒト肝癌由来組織を有するヌードマウスの尾静脈に投与したところ、数時間で移植組織特異的に蛍光の集積が観察され

た（図6）。

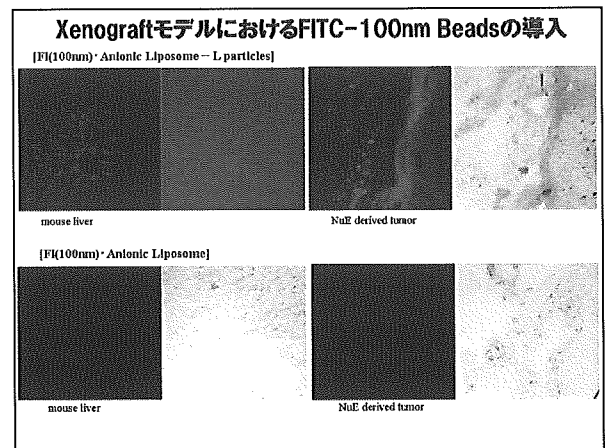


図 6

D. 考察

昨年度にステルス化L粒子を創製し、マウスを用いた小実験において低抗原性であることを証明した。しかし、本粒子を臨床応用まで持ってゆくには、同一精製ロットで大量のL粒子（g単位）を調製し、単回毒性試験、繰返し投与による毒性試験、抗原性試験、B型肝炎ワクチン接種者由来血液存在下におけるヒト肝細胞への感染実験、大型動物による物質送達実験等を実施し、安全活充分な機能を有する事を示さなければならない。そこで、一見、ステルス化L粒子の開発から外れた研究項目に捕らえられるかもしれないが、大量精製法、長期保存法、安定かつ高効率な物質封入法の開発を今年度行った。

その結果、平成17年度初めに問題となったことは全てクリアすることに成功し、平成18年度においてステルス化L粒子の機能を様々な方法で検討できる様になった。

E. 結論

昨年度創製した生体内での抗体産生能の低いステルス型L粒子の機能を幅広く検討する為に必要な大量精製法、長期保存法、

安定かつ高効率な物質封入法の開発に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yu, D., Amano, C., Fukuda, T., Yamada, T., Kuroda, S., Tanizawa, K., Kondo, A., Ueda, M., Yamada, H., Tada, H., and Seno, M., The Specific Delivery of Proteins to Human Liver Cells by Engineered Bio-Nanocapsules., FEBS J. 272 (2005) 3651-3660.
- 2) 鄭周姫、黒田俊一 ナノテクが導く「効果的な遺伝子治療」月刊「化学」 60 (2005), No. 1, 23-25.
- 3) 近藤昭彦、黒田俊一、谷澤克行、妹尾昌治、上田政和 革新的なナノキャリア：中空バイオナノ粒子によるピンポイント DDS 月刊「バイオインダストリー」 22 (2005), No. 5, 22-27.
- 4) 近藤昭彦、黒田俊一、谷澤克行、妹尾昌治、上田政和 中空バイオナノ粒子を用いたピンポイント DDS の開発 月刊「ケミカル・エンジニアリング」 50 (2005), No. 5, 23-28.
- 5) 山田忠範、妹尾昌治、上田政和、近藤昭彦、谷澤克行、黒田俊一 細胞及び組織特異的遺伝子導入を可能にするバイオナノカプセル 生物工学会会誌 83 (2005), No. 8, 380-383.
- 6) 黒田俊一 バイオナノカプセルが拓く新しい医療技術 バイオサイエンスとインダストリー 63 (2005), No. 9, 589-590.
- 7) 黒田俊一 バイオナノカプセルの開発と化粧品への応用 Fragrance Journal (2005), No. 11, 22-28.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

- 1) レセプター結合性物質のスクリーニング方法
近藤昭彦、黒田俊一、植田充美、石井純、福田秀樹、立松健司、山崎智子
(出願人：バイオ・エナジー株式会社)
出願 2005-96184 (2005年3月29日)
- 2) 癌治療用薬剤及びその作製方法
妹尾昌治、多田宏子、福田隆之、黒田俊一、谷澤克行、近藤昭彦、上田政和、浜田博喜
(出願人：㈱ビークル、㈱バイオ・タキソール、国立大学法人 岡山大学)
出願 2005-84438 (2005年3月23日)
- 3) バイオナノカプセル内部への効率的な物質封入方法
黒田俊一、植田淳子、名木田真奈
(出願人：科学技術振興事業機構、国立大学法人 大阪大学、㈱ビークル)
出願 2005-267573 (2005年9月14日)
国際出願予定

2. 実用新案登録

なし

3. その他

- 1) バイオベンチャー起業物語「ビークル」
黒田俊一
月刊「バイオインダストリー」 22 (2005), No. 4, 88-95.
- 2) 産学官連携によるバイオベンチャー設立まで---大学教官とバイオベンチャー