minus of EGFP in pEGFP-N1. The *Not*I site after the termination codon of EGFP was changed to the *Xho*I site. The resultant ORF of the L-FLAG–EGFP fusion protein was excised with *Xho*I and inserted at the *Xho*I site downstream of the SRα promoter in the plasmid of pBO477, which is a derivative of pTB1455 [27], to construct the plasmid pBO572. We constructed three other expression vectors pBO638, pBO637 and pBO822 for L proteins with truncation by 32, 45 and 54 amino acid residues at the C-terminus, respectively. The resulting three types of L fusion particles were designated L(Δ32)-FLAG–EGFP, L(Δ45)-FLAG–EGFP and L(Δ54)-FLAG–EGFP (Fig. 1).

Preparation of L fusion particles

Five micrograms of expression plasmid DNA were transfected into 5×10^6 of Cos7 cells by electroporation at 300 V/950 μF. Transfected cells were first cultured for 14–16 h in 8 mL of DMEM containing 5% (v/v) FBS in a 100 mm dish. The medium was replaced with 8 mL of CHO-S-SFM II (Invitrogen, Carlsbad, CA) and the cells were cultured for a further 72 h. The conditioned medium was collected and condensed in a Vivaspin concentrator tube (molecular mass cut-off at 100 kDa; Vivaspin, Sartorius, Hannover, Germany) according to the manufacturer's instructions. Cells were harvested by a cell scraper and suspended in 100 μL of NaCl/P_i in DMEM per dish and then sonicated for 30 s. The supernatant from the cell extracts was collected by centrifugation. The concentration of L fusion particles in the conditioned medium and in the cell extracts was independently determined by IMx HBsAg (Abbott Laboratories, Sligo, Ireland). The fluorescence of EGFP from the particles was simultaneously measured by an F-2000 fluorescence spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan).

Sucrose gradient ultracentrifugation

L fusion particles were analyzed by sucrose gradient ultracentrifugation with himac CP70MX (Hitachi) as described previously [3]. Briefly, transfected cells were harvested by a cell scraper in the NaCl/P_i containing EDTA. The wet cells were suspended in buffer A [0.1 M sodium phosphate, pH 6.8, 15 mM EDTA, 2 mM PMSF, 0.85% (w/v) NaCl and 1% (v/v) Triton X-100], and then sonicated for 30 s on ice. Cell extracts in the supernatant were subjected to sucrose gradient ultracentrifugation at 103 600 *g* for 14 h at 4 °C in 27 mL of sucrose gradient of 10–50% (w/v) in buffer A without Triton X-100. Fractions containing L fusion particle were collected and dialyzed against buffer A without Triton X-100. The dialyzed solution was again subjected to sucrose gradient ultracentrifugation under the same conditions. The conditioned medium was also subjected to sucrose gradient ultracentrifugation after condensation with Vivaspin. Each 1 mL, fractionated from the top of the centrifugation tube, was analyzed for density, immunoreactivity (IMx) and fluorescence. L fusion particle fractions were collected and dialyzed against NaCl/P_i for 16 h at 4 °C. The dialyzed solution was filtered through a membrane filter (0.22 μm, MILLEX-HV, Millipore, Cork, Ireland) and stored at 4 °C.

Protease protection assay

The L fusion particles were immunoprecipitated with monoclonal anti-(S mouse epitope) IgG conjugated to microbeads contained in the IMx kit or with monoclonal anti-(GFP mouse epitope) IgG (Sigma, St Louis, MO) and protein G agarose (Invitrogen). The immunoprecipitates were washed five times with NaCl/P_i, and resuspended in 10 μL of NaCl/P_i. Proteinase K (New England Biolabs, Beverly, MA) was then added to achieve a concentration of 100 $\mu g{\cdot}mL^{-1}$. The suspension was incubated at 37 °C for 1 h. PMSF was added to 5 mM to stop the digestion.

Transfection of L fusion particle

About 5×10^4 cells of HepG2, NuE, WiDr and A431 were seeded in each well of a Laboratory-Tek chamber slide (Nunc, Naperville, IL) and cultured at 37 °C in 5% (v/v) CO_2. After 12 h, the culture media were replaced with 300 μL of CHO-S-SFM II containing 5 ng of L(Δ45)-FLAG–EGFP particles, and the cells were cultured for a further 9 h. The chambers were subsequently detached and the glass slide was washed with NaCl/P_i. The cells were covered with glass in the presence of NaCl/P_i containing 10% (v/v) glycerol, and the specific EGFP fluorescence was observed under a confocal microscope LSM 510 META (Zeiss, Jena, Germany).

Acknowledgements

The authors thank Mrs Kumiko Soga for her excellent technical assistance, and Mr Masayuki Kita for his continuous encouragement. This project was supported in part by Grants-in-Aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan, and the Japan Science and Technology Corporation (Research Fund for Patenting).

References

1 Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H & Gerlich WH (1984) Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J Virol* **52**, 396–402.

2 Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G & Hall BD (1982) Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* **298**, 347–350.

3 Kuroda S, Otaka S, Miyazaki T, Nakao M & Fujisawa Y (1992) Hepatitis B virus envelope L protein particles, synthesis and assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, purification and characterization. *J Biol Chem* **267**, 1953–1961.

4 Fujisawa Y, Kuroda S, Van Eerd PM, Schellekens H & Kakinuma A (1990) Protective efficacy of a novel hepatitis B vaccine consisting of M (pre-S2 + S) protein particles (a third generation vaccine). *Vaccine* **8**, 192–198.

5 Yamada T, Iwabuki H, Kanno T, Tanaka H, Kawai T, Fukuda H, Kondo A, Seno M, Tanizawa K & Kuroda S (2001) Physicochemical and immunological characterization of hepatitis B virus envelope particles exclusively consisting of the entire L (pre-S1 + pre-S2 + S) protein. *Vaccine* **19**, 3154–3163.

6 Yamada T, Iwasaki Y, Tada H, Iwabuki H, Chuah MK, VandenDriessche T, Fukuda H, Kondo A, Ueda M, Seno M *et al.* (2003) Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nat Biotechnol* **21**, 885–890.

7 Marion PL, Salazar FH, Alexander JJ & Robinson WS (1979) Polypeptides of hepatitis B virus surface antigen produced by a hepatoma cell line. *J Virol* **32**, 796–802.

8 Neurath AR, Kent SB, Strick N & Parker K (1986) Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* **46**, 429–436.

9 Neurath AR & Kent SB (1988) The pre-S region of hepadnavirus envelope proteins. *Adv Virus Res* **34**, 65–142.

10 Guerrero E, Gavilanes F & Peterson DL (1988) *Model for the Protein Arrangement in Hbsag Particles Based on Physical and Chemical Studies, in Viral Hepatitis and Liver Disease* (Zuckerman AJ, ed.), pp. 606–613. Alan R. Liss, New York.

11 Strik HJ, Thornton JM & Howard CR (1992) A topological model for hepatitis B surface antigen. *Intervirology* **33**, 148–158.

12 Eble BE, MacRae DR, Lingappa VR & Ganem D (1987) Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol Cell Biol* **7**, 3591–3601.

13 Bruss V & Ganem D (1991) Mutational analysis of hepatitis B surface antigen particle assembly and secretion. *J Virol* **65**, 3813–3820.

14 Prange R, Nagel R & Streeck RE (1992) Deletions in the hepatitis B virus small envelope protein: effect on assembly and secretion of surface antigen particles. *J Virol* **66**, 5832–5841.

15 Bruss V, Gerhardt E, Vieluf K & Wunderlich G (1996) Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphagenesis. *Intervirology* **39**, 23–31.

16 Eble BE, Lingappa VR & Ganem D (1990) The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences. *J Virol* **64**, 1414–1419.

17 Sureau C, Fournier-Wirth C & Maurel P (2003) Role of N glycosylation of hepatitis B virus envelope proteins in morphogenesis and infectivity of hepatitis delta virus. *J Virol* **77**, 5519–5523.

18 Berting A, Hahnen J, Kroger M & Gerlich WH (1995) Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein. *Intervirology* **38**, 8–15.

19 Yang F, Moss LG & Phillips GN Jr (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **14**, 1246–1251.

20 Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY & Remington SJ (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392–1395.

21 Kennedy RC, Ionescu-Matiu I, Adler-Storthz K, Henkel RD, Sanchez Y & Dreesman GR (1983) Characterization of anti-hepatitis B surface antigen monoclonal antibodies. *Intervirology* **19**, 176–180.

22 Zuckerman JN & Zuckerman AJ (2003) Mutations of the surface protein of hepatitis B virus. *Antiviral Res* **60**, 75–78.

23 Paulij WP, de Wit PL, Sunnen CM, van Roosmalen MH, Petersen-van Ettekoven A, Cooreman MP & Heijtink RA (1999) Localization of a unique hepatitis B virus epitope sheds new light on the structure of hepatitis B virus surface antigen. *J Gen Virol* **80**, 2121–2126.

24 Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C & Gripon P (1999) Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J Virol* **73**, 2052–2057.

25 Waters JA, Kennedy M, Voet P, Hauser P, Petre J, Carman W & Thomas HC (1992) Loss of the common 'A' determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. *J Clin Invest* **90**, 2543–2547.

26 Cooreman MP, van Roosmalen MH, te Morsche R, Sunnen CM, de Ven EM, Jansen JB, Tytgat GN, de Wit PL & Paulij WP (1999) Characterization of the reactivity pattern of murine monoclonal antibodies against wild-type hepatitis B surface antigen to G145R and other naturally occurring 'a' loop escape mutations. *Hepatology* **30**, 1287–1292.

27 Tada H, Kurokawa T, Seita T, Watanabe T & Iwasa S (1994) Expression and characterization of a chimeric bispecific antibody against fibrin and against urokinase-type plasminogen activator. *J Biotechnol* **33**, 157–174.

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

Pinpoint DDS using A Novel Nano-Carrier : Hollow Bionano-Particles

近藤昭彦[*1]　黒田俊一[*2]
谷澤克行[*3]　妹尾昌治[*4]　上田政和[*5]

B型肝炎ウイルスの持つ高い感染性と特異性に着目し，表面抗原タンパク質（Lタンパク質）から作られる中空のバイオナノ粒子を，薬剤や遺伝子などを細胞や組織特異的に送達（ピンポイントDDS）する革新的なナノキャリアとし利用することを考案した。Lタンパク質を改変することで，任意の組織・臓器に再標的化された粒子も構築されており，広範な応用が期待されている。

1. はじめに

近年のライフサイエンスの進展により，創薬分野では，ゲノム情報を活用した研究成果から，分子レベルでの発症機構の解明に基づく創薬が活発に繰り広げられている。しかしながら，依然として薬物は低分子化合物であり，全身投与が主流であるため，高い治療効果を持ちながら，副作用のためにドロップアウトする医薬品候補が多い。また，医薬品としての開発に成功しても，副作用を抑える上で投薬量を下げるため，限定的な効果になる場合もある。

分子レベルでの発症機構の解明は，新しい治療法としての遺伝子治療も可能にしつつあり，大きな期待が寄せられている。ただし遺伝子治療では，目的臓器以外に遺伝子が導入されると思わぬ副作用が生じる可能性があるため，目的臓器のみへの遺伝子の送達が不可欠である。ところが現在，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するため[1)]，組織・細胞に対して非特異的に感染してしまう。また，ウイルスを利用すると，その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。

この様な現状から，薬剤や遺伝子などの安全かつ効果的な投与を行う技術として，ドラッグデリバリーシステム（DDS）への関心が高まっている。DDSの中核技術として，標的化（ターゲッティング）が上げられる。これは生体内において薬物や遺伝子を運搬体（キャリア）を用いて細胞や組織特異的に送達すること（ピンポイント

*1 Akihiko Kondo　神戸大学　工学部　応用化学科　教授
*2 Shun-ichi Kuroda　大阪大学　産業科学研究所　助教授
*3 Katsuyuki Tanizawa　大阪大学　産業科学研究所　教授
*4 Shoji Senoo　岡山大学　大学院自然科学研究科　助教授
*5 Masakazu Ueda　慶応義塾大学　医学部　講師

DDS）で，副作用を最小限に抑えて本来の効能を発揮させようとする試みである。特に血液中には低濃度でも，積極的に患部に薬剤や遺伝子を集中できる能動的なピンポイントDDS法が開発できれば，理想的である。

筆者らは，全く新しいタイプの薬剤や遺伝子等のDDS用ナノキャリアとして，ウイルス由来のタンパク質を利用した中空バイオナノ粒子を考案した。ウイルスの中でも，B型肝炎ウイルス（hapatitis B virus，以下HBV）が肝臓のみに特異的かつ効率よく感染する能力を有することに着目し，B型肝炎ウイルス表面抗原からなるタンパク質のナノ粒子（「中空バイオナノ粒子」と呼ぶ）を目的臓器への能動的なピンポイントDDSを可能とするナノキャリアとして利用しようというものである。本稿では，中空バイオナノ粒子の概念，その製造や物性と遺伝子治療をはじめとするDDSへの応用について紹介する。

2. 中空バイオナノ粒子とは

まず中空バイオナノ粒子の基になるHBVの構造について述べる。**図1**(A)に示す様に，HBVは，そのゲノムが，ウイルス表面抗原タンパク質（Lタンパク質という：図では楕円形で示す）と脂質からできた外殻（タンパク質間を宿主由来の脂質の膜が埋める形で形成されたカプセル）で包まれた構造をとっている。HBVは，Lタンパク質の標的細胞への結合と，引き続いての標的細胞との膜融合によって感染する。HBVは，微量のB型肝炎患者血液を指に刺しただけでも感染することでもわかる様に，極少量のウイルス粒子でもヒト肝臓に到達して選択的に感染して複製する優れた能力を持つ。外殻を作るLタンパク質は，226アミノ酸残基のSタンパク質のN末端側にpre-S領域（55アミノ酸残基のpre-S2領域と108または119アミノ酸残基のpre-S1領域からなる）が付加した形になっており，分子量約52kDaの糖タンパク質である。pre-S1については，肝細胞と特異的に結合する部位を含んでおり，HBVが感染する際に中心的な役割を担っていることが明

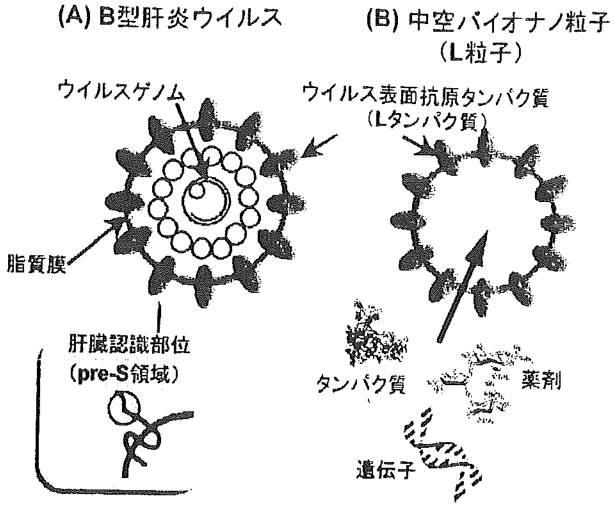

図1　B型肝炎ウイルス(A)と中空バイオナノ粒子(B)

らかになっている[2,3]。ウイルスは，その構造や感染から複製といった機能を見るとき，タンパク質，脂質，DNAといったバイオ分子群のパーツから組み上げられた極めて精巧なナノマシンを連想させる。

中空バイオナノ粒子とは，HBVのLタンパク質と脂質からなる外殻のみを，人工的かつ安全なかたちで生産したナノカプセルである（図1(B)：L粒子と呼ばれる）。Lタンパク質は肝臓を分子認識するpre-S1領域を持つため，この粒子はウイルスが本来持つ肝臓への高い感染力を保持すると考えられる。また，HBVの表面抗原タンパク質が形成する中空バイオナノ粒子は，脂質膜と糖タンパク質からなる柔軟な構造を有していることから，薬剤，遺伝子，タンパク質などを包含させることで，これら広範囲な物質のピンポイントDDSに利用できると期待される。中空バイオナノ粒子は，タンパク質と脂質からなる最もシンプルで安全なバイオナノマシンともいえる。

図2は，酵母における中空バイオナノ粒子形成および形成された粒子の精製について示す。HBVのLタンパク質遺伝子を酵母細胞で発現させると，Lタンパク質は互いに分子認識を行い，小胞体膜に集積し，出芽形式で小胞体ルーメン側に粒子として放出される。形成されたL粒子は，酵母内のトランスゴルジネットワーク上の膜状器官内に顕著に蓄積する[4]。この様に，中空バイオ

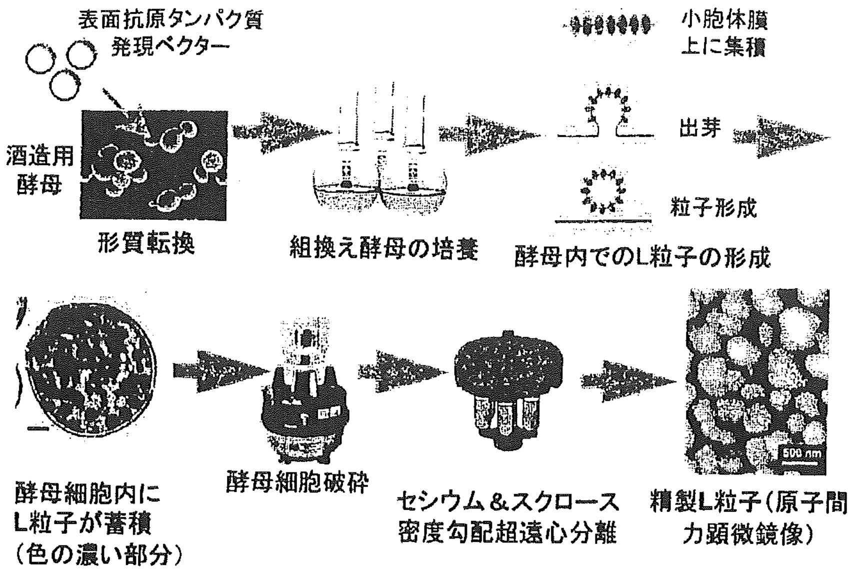

図2　中空バイオナノ粒子の生産法

ナノ粒子は，タンパク質と脂質が自己組織化して形成される機能性バイオ粒子である。このＬ粒子を蓄積した酵母細胞を破砕し，細胞破砕物等を遠心分離で除去した後に，セシウムおよびスクロースを利用した密度勾配超遠心分離をくり返すと，高純度のＬ粒子を精製できる。収量としては，酵母の培養液１リットル当たり約 20 mg 程度である。Ｌ粒子は球状であり，50～500nm 程度の粒径を持ち，中空であることが確認されている。この粒子の平均的な粒径は 80nm であり，約 110 個のＬタンパク質から構成される[5]。また，Ｌ粒子の組成は 80%（重量比）がタンパク質，10% が糖質，残り 10%がリン脂質（酵母小胞体膜由来）である。

3. 中空バイオナノ粒子を用いた遺伝子のピンポイトデリバリー[6~8]

中空バイオナノ粒子を遺伝子のピンポイントデリバリーに用いるには，まず粒子内に遺伝子を封入する必要がある。現在のところ封入はエレクトロポレーションで行っている。エレクトロポレーションでは，高電圧パルスを付加することで，粒子膜の構造を瞬間乱して遺伝子を粒子内に取り込ませる。遺伝子封入Ｌ粒子による特異的な遺伝子導入について，まずモデル系としてクラゲの緑色蛍光タンパク質（GFP：遺伝子導入によりタンパク質が生産されると緑色蛍光が観察できるため，判定がしやすい）の遺伝子を用いて検討した。遺伝子封入Ｌ粒子を各種の培養細胞に血清存在下で添加して導入実験を行ったところ，**図3**に示す様に，ヒト肝細胞培養株およびヒト肝がん由来細胞株（HepG2 や NuE）でのみ GFP の発現による緑色蛍光が観察された。この際の HepG2 や NuE へのＬ粒子による遺伝子導入効率は，従来の遺伝子導入試薬であるカチオン性リン脂質（商標名：FuGene6）に比べて，単位 DNA 量あたりで 100 倍以上であった。この様にＬ粒子は，肝細胞特異的かつ高効率な遺伝子導入を行えることが明らかとなった。

そこで，次のステップとして，生体内でＬ粒子による遺伝子のピンポイントデリバリーが可能か，実験動物を用いて検討した。すなわち，１匹のヌードマウス背部皮下にヒト肝細胞がん由来の細胞株（NuE：標的）とヒト大腸がん由来細胞株（WiDr：対照）を１つずつ移植し，GFP 遺伝子封入Ｌ粒子を尾静脈より注射して（局注でなく経静脈的な投与を行うことで，遺伝子封入Ｌ粒子の標的化能力を明らかにするため），Ｌ粒子が移植ヒト肝細胞がんに特異的に遺伝子導入できるかを蛍光観察により判定した。投与２週間後に，

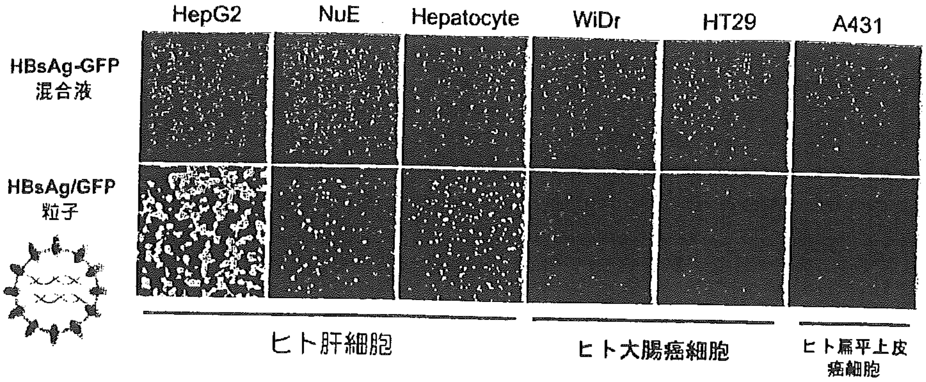

図3　培養細胞レベルでのGFP遺伝子のヒト肝細胞特異的導入

腫瘍を切除して組織内の蛍光を観察すると，ヒト肝細胞がん由来の組織内においてGFPに由来する緑色蛍光が観察された。一方，移植した大腸がん組織や，ヌードマウスの正常組織では緑色蛍光は一切観察されなかった。こうした結果は，中空バイオナノ粒子が生体内で，HBVの様にヒト肝細胞を特異的に認識していることを示す。また，移植した腫瘍は本来の肝臓の存在位置とは別の部分に存在するにもかかわらず，標的化できたことから，遠方からの能動的な標的化が可能であると考えられる。

上記の基礎的な知見を基に，具体的な遺伝子治療への適用の試みとして，遺伝性疾患を取り上げた。遺伝性疾患は，単一タンパク質発現の欠損が原因の場合が多い。今回は遺伝病である血友病を取り上げて検討した。血友病にはA型とB型があるが，それぞれ血液凝固因子8もしくは9の投与で治療できることがわかっている。そこで，血友病B型の遺伝子治療を想定して，血液凝固因子9を発現するベクターをL粒子に封入し，ヒト肝細胞がんを移植したヌードマウスに投与した。経時的に採血して血中の血液凝固因子9の濃度をELISA法で測定したところ，重度血友病Bの治療が可能なレベルの発現が1か月にわたり確認された。そもそも，血友病の治療遺伝子は巨大なものが多いので，標準的なアデノウイルスベクターに搭載することが難しい。この様な大きな遺伝子でも中空バイオナノ粒子が効率よく標的化できたことは，その有効性を強く示す成果といえる。今回は，本来肝臓で作られる血液凝固因子9を肝臓で作らせたが，他の臓器由来のタンパク質でも，血中に分泌されて機能するものであれば，肝臓に発現させて治療を行うことが可能であろう。

中空バイオナノ粒子を用いた治療を従来技術と比較すると，中空バイオナノ粒子はウイルスと同様な高い遺伝子導入効率を示すとともに，人工系であることからリポソームと同様に安全であり，両者の良い点を併せ持つといえる。量産化に関しても，すでに実績を持つ。さらに高い標的化能力を持つことから，遺伝子治療において待ち望まれていたキャリアである。

4. 中空バイオナノ粒子の薬剤デリバリーへの利用

以上，中空バイオナノ粒子の利用に関して，遺伝子治療を例に述べてきた。中空バイオナノ粒子は，先にも述べたように，タンパク質と脂質から成るナノカプセルであるため，粒子内には薬剤も封入可能である。例えば，上述した遺伝子の場合と同様に，エレクトロポレーションによって薬剤を粒子内部に簡単に封入できる。実際にモデル化合物として蛍光物質カルセインを封入したL粒子は，肝細胞にのみ選択的に取り込まれ，カルセインを細胞内に導入可能であった[6]。したがって，治療効果は高いが副作用が強い医薬品の患部へのピンポイント投与に応用できると考えられる。例えば，抗がん剤などでは，がん細胞以外の全身で副作用が出るため，投薬濃度を抑えざるをえず，

限定的な効果になっている。もし，抗がん剤を高濃度に封入した中空バイオナノ粒子でピンポイントな投薬が可能になれば，標的がん細胞における薬剤濃度のみを上げることが可能となるため，注射のみで飛躍的な治療効果をあげられると期待される。

5. 中空バイオナノ粒子のタンパク質デリバリーへの利用

タンパク質を粒子内に封入する場合には，送達したいタンパク質をLタンパク質のC末端側に遺伝子レベルで融合して発現するアプローチもとれる。例えば，モデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質であるEGFPをLタンパク質のC末端側に融合して発現させると，EGFPを粒子内部に包含する形で中空バイオナノ粒子が形成された。さらに培養細胞を用いた実験で，このEGFP融合粒子は肝細胞特異的に取り込まれることが明らかとなった。

したがって，インターフェロンをはじめとする医薬タンパク質をLタンパク質のC末端側に融合した中空バイオナノ粒子の各種疾患の治療への利用も有効であろう。通常のインターフェロンをウイルス性肝炎治療に用いた場合，その投与により重篤な全身性の副作用と中和抗体の生産などが問題となっている。この様な全身投与では副作用が出る医薬タンパク質の場合，粒子内に包含して能動的なピンポイントDDSが可能となれば，その副作用を大きく低減できると期待される。

6. 中空バイオナノ粒子のリターゲッティング

中空バイオナノ粒子を構成するLタンパク質においては，肝臓細胞を分子認識する部位がpre-S1領域にあることがわかっている。したがってこの肝細胞認識部位を削除して，そこに他の臓器を特異的に認識する分子を挿入することで，任意の臓器に遺伝子や薬剤を標的化することが可能となると期待される。この様に，L粒子を任意の臓器に再標的化するように改造する（リターゲッティングという）試みも進んでいる。このためにまず，pre-S1領域のどの部分を置き換えるかについて検討を行った。適切な部分を選択しないと粒子形成量が大幅に低下するなど問題が生じるためである。Lタンパク質において選択したpre-S1の適切な領域を，ヒトEGF（epidermal growth factor）と置き換えて酵母で発現させたところ，L粒子の場合と同程度の中空バイオナノ粒子（EGF提示粒子）が生産され，L粒子と同様な手法で精製できた。得られたEGF提示粒子にエレクトロポレーションでカルセインを封入し，ヒト肝がん由来細胞株および扁平上皮がん細胞株A431（EGFレセプターを大量に発現している）に加えたところ，A431細胞においてのみ著しい蛍光が観察された[6]。この結果は，pre-S1領域をEGFに変換したEGF提示粒子は，肝細胞への特異性を失ってA431への特異性を獲得したことを示す。したがって，分子認識部位を置換することで，中空バイオナノ粒子のターゲットを変更できる，すなわちリターゲッティングが可能であることを実証できたものといえる。

筆者らは，現在，より一般的な意味で，リターゲッティング技術の開発を精力的に進めている。**図4**に示すように，各種のサイトカイン，抗体分子，抗体結合分子（各種細胞や組織に特異的な抗体を粒子に結合できる）を用いたリターゲッティ

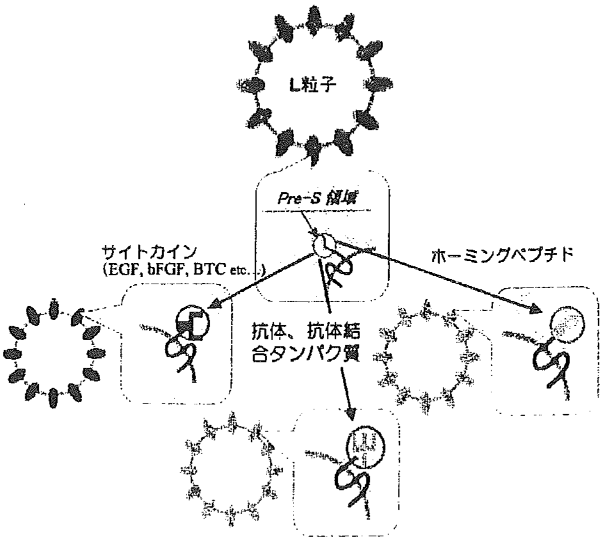

図4　中空バイオナノ粒子のリターゲッティング

ングが期待されるが，これらに関しても筆者らは既に成功している。さらに最近，短いペプチドでも細胞や組織特異性を持つことが示された（ホーミングペプチドと呼ばれている）ことから[9]，その利用も有望である。特異性を示す「荷札」となる新しいホーミングペプチドを効率よく探索する上では，最近大きな進展を見せているコンビナトリアル・バイオエンジニアリングの手法が極めて有効であろう[10]。L粒子をリターゲッティングした中空バイオナノ粒子を用いれば，望みの臓器・組織へのピンポイントな遺伝子・薬剤の送達ができると期待される。

7. おわりに

中空バイオナノ粒子は，ウイルス表面抗原タンパク質の自己組織化によって形成される中空ナノ粒子を利用する，という新しい概念による革新的なDDS用キャリアである。ただし，未解決の問題も残されている。最大の問題点は，ウイルス感染やワクチンによって，B型肝炎ウイルスに対する抗体を既に持っている人への中空バイオナノ粒子の投与が現状では難しいことである。この点を解決するため，現在，免疫系に認識されないよう，粒子をステルス化することを試みているが，有望な結果を得つつある。

この様なことから，中空バイオナノ粒子を用いたDDSは，画期的な先進医療技術に発展すると考えている。このため筆者らは，中空バイオナノ粒子に関する基礎的な研究に加えて，その実用化に向けた研究開発についても大学発ベンチャー㈱ビークル（本社：岡山市，www.beacle.com）を設立して進めている。

文献

1) Verma I. M., Somia, N., *Nature*, **389**, 239 (1997)
2) Neurath A. R. *et al.*, *Cell*, **46**, 429 (1986)
3) Le Seyec J. *et al.*, *J. Virol.*, **73**, 2052 (1999)
4) Kuroda S. *et al*, *J. Biol. Chem.*, **267**, 1953 (1992)
5) Yamada T. *et al*, *Vaccine*, **19**, 3154 (2001)
6) Yamada T. *et al*, *Nature Biotechnol.*, **21**, 885 (2003)
7) Lawrence D., *Lancet*, **362**, 48 (2003)
8) Russel S. J., *Nature Biotechnol.*, **21**, 872 (2003)
9) Arap W., *et al.*, *Nature Medicine*, **8**, 121 (2002)
10) 植田充美，近藤昭彦（編），コンビナトリアル・バイオエンジニアリング，化学同人 (2003)

☆　☆

☆　☆

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[*1]・黒田俊一[*2]・谷澤克行[*3]・妹尾昌治[*4]・上田政和[*5]

Akihiko Kondo · Shun'ichi Kuroda · Katsuyuki Tanizawa · Masaharu Seno · Masakazu Ueda

■ *1 神戸大学工学部応用化学科　教授　工学博士　*2 大阪大学産業科学研究所　助教授　博士(農学) ■
■ *3 大阪大学産業科学研究所　教授　農学博士　*4 岡山大学大学院自然科学研究科　助教授　工学博士 ■
■ *5 慶応義塾大学医学部　講師　医学博士 ■

1．はじめに

近年，薬剤の安全かつ効果的な投与を行うためにドラッグデリバリーシステム(DDS)の研究開発が活性化されている．DDSの中核をなす技術として，標的化(ターゲッティング)が上げられる．これは医薬品を適当な運搬体(キャリア)に包含させることで，体内での行く先(体内動態)を積極的にコントロールし，薬物本来の効能を発揮させようとする試みである．医薬品の多くは全身投与であるため，高い治療効果を持ちながら，副作用のためにドロップアウトする医薬品候補が多い．また，医薬品としての開発に成功しても，副作用を抑える上で投薬量を下げるため，限定的な効果になる場合もある．したがって，ターゲッティング技術が極めて重要になる．特に血液中には低濃度でも，積極的に患部に薬剤や遺伝子を集中できる能動的なピンポイントDDS法が開発できれば，副作用を最小限に抑えて本来の効能を発揮させることができる．

新しい医療技術として大きな期待が寄せられている遺伝子治療においても，ピンポイントな標的化が不可欠である．遺伝子治療では，特定の臓器や組織で欠損した遺伝子や機能しなくなった遺伝子を正常な遺伝子に置き換えるたり，治療効果を持つタンパク質の遺伝子を患部に送り込む．遺伝子治療では，目的臓器以外に遺伝子が導入されると思わぬ副作用が生じる可能性があるため，目的臓器のみへの遺伝子の送達が不可欠である．ところが現在，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するため[1]，組織・細胞に対して非特異的に感染してしまう．また，ウイルスを利用すると，その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．

DDS技術における標的化を行うための薬物や遺伝子のキャリアとしては，リポソームやナノミセル等，各種のものが開発されつつあるが，特定の臓器や組織に効率よく標的化することは未だに難しい．筆者らは，全く新しいタイプの薬剤や遺伝子等のDDS用ナノキャリアとして，ウイルス由来のタンパク質を利用した中空バイオナノ粒子を考案した．ウイルスの中でも，B型肝炎ウイルス(hapatitis B virus，以下HBV)が肝臓のみに特異的かつ効率よく感染する能力を有することに着目し，B型肝炎ウイルス表面抗原からなるタンパク質のナノ粒子(「中空バイオナノ粒子」と呼ぶ)を目的臓器への能動的なピンポイントDDSを可能とするナノキャリアとして利用しようというものである．本稿では，中空バイオナノ粒子の概念，その製造や物性と遺伝子治療をはじめとするDDSへの応用について紹介する．

2．中空バイオナノ粒子の性質

図1(A)にHBVの構造を示すが，HBVは，そのゲノムが，タンパク質(ウイルス表面抗原タン

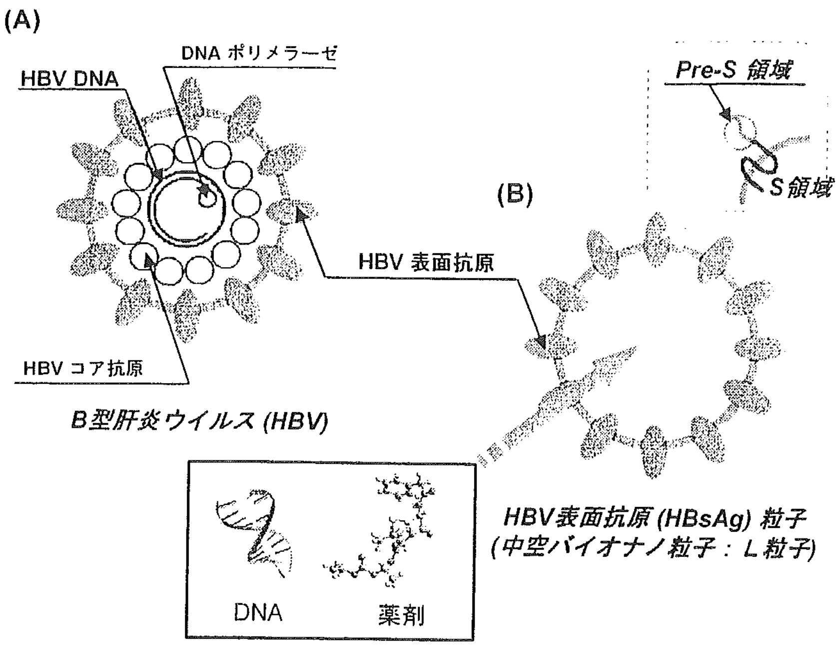

図1　B型肝炎ウイルス(A)と中空バイオナノ粒子(B)

パク質という：図では楕円形で示す)と脂質からできた外殻(タンパク質間を宿主由来の脂質の膜が埋める形で形成されたカプセル)で包まれた構造をとっている．HBVは，Lタンパク質の標的細胞への結合と，引き続いての標的細胞との膜融合によって感染する．外殻を作るLタンパク質は，226アミノ酸残基のSタンパク質のN末端側にpre-S領域(55アミノ酸残基のpre-S2領域と108または119アミノ酸残基のpre-S1領域からなる)が付加した形になっており，分子量約52 kDaの糖タンパク質である．pre-S1については，肝細胞(ヒトとチンパンジーのみ)と特異的に結合する部位を含んでおり，HBVが感染する際に中心的な役割を担っていることが明らかになっている[2,3]．HBVウイルスは，その構造や感染から複製といった機能を見るとき，タンパク質，脂質，DNAといったバイオ分子群のパーツから組み上げられた極めて精巧なナノマシンを連想させる．しかもHBVは，微量のB型肝炎患者血液を指に刺しただけでも感染する事でもわかるように，極少量のウイルスでもヒト肝臓に到達して選択的に感染して複製するという，優れた能力を持つ．

中空バイオナノ粒子とは，HBVのLタンパク質と脂質からなる外殻のみを，人工的かつ安全なかたちで生産したナノカプセルである(図1(B)：L粒子と呼ばれる)．Lタンパク質は肝臓を分子認識するpre-S1領域を持つため，この粒子はウイルスが本来持つ肝臓への高い感染力を保持すると考えられる．また，この粒子はHBVのようにウイルス本体の遺伝子や遺伝子を複製するのに必要な酵素を含む核となるタンパク質を一切持たないため，まったく安全なものである．

図2は，酵母における中空バイオナノ粒子形成および形成された粒子の精製について示す．HBVのLタンパク質遺伝子を酵母細胞で発現させると，Lタンパク質は小胞体膜に集積し，出芽形式で小胞体ルーメン側に粒子として放出される[4]．中空バイオナノ粒子は，タンパク質と脂質が自己組織化して形成される機能性バイオ粒子である．このL粒子を蓄積した酵母細胞を破砕し，細胞破砕物等を遠心分離で除去した後に，セシウムおよびスクロースを利用した密度勾配超遠心分離をくり返すと，高純度のL粒子を精製できる．収量としては，酵母の培養液1ℓ当たり約20mg程度である．現在，クロマトグラフィー法の導入など，より大量生産に向いた精製法の確立を目指している．

L粒子は球状であり，50～500nm程度の粒径を持ち，中空であることが確認されている．この粒子の平均的な粒径は80nmであり，約110個のLタンパク質から構成される5)．また，L粒子の組成は80%(重量比)がタンパク質，10%が糖

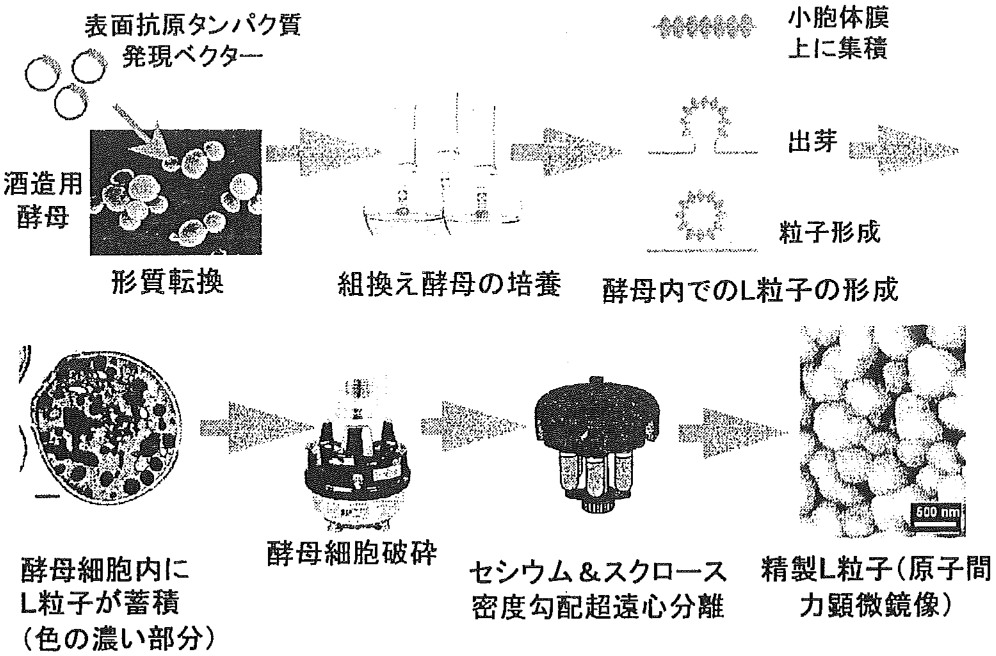

図2　中空バイオナノ粒子の生産法

質，残り10%がリン脂質(酵母小胞体膜由来)である．L粒子は，物理化学的には極めて安定である(例えば80℃で30分間加熱しても，粒子の形態に影響を与えない)．ただし粒子の構造自体は，脂質膜と糖タンパク質からなる柔軟なものであり，薬剤，遺伝子，タンパク質などを包含させることで，これら広範囲な物質のピンポイントDDSに利用できると期待される．中空バイオナノ粒子は，タンパク質と脂質からなる最もシンプルで安全なバイオナノマシンともいえる．

3．中空バイオナノ粒子を用いた遺伝子治療[6~8]

図3に中空バイオナノ粒子を用いた遺伝子や薬剤のDDS開発の研究概要を示す．中空バイオナノ粒子を遺伝子治療に用いるには，まず，粒子内に比較的大きな分子である治療用遺伝子を封入する必要がある．現在のところ封入はエレクトロポ

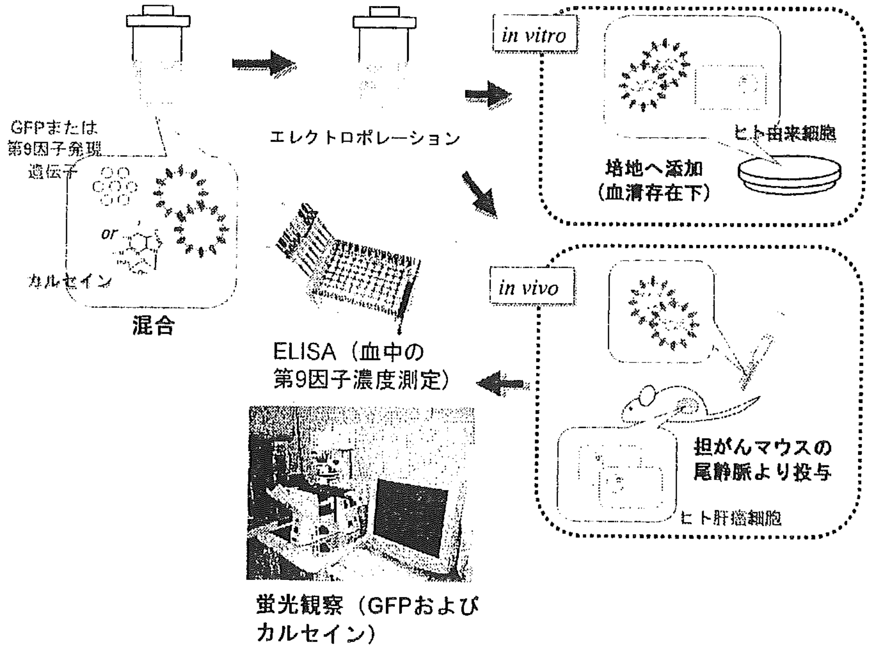

図3　中空バイオナノ粒子を用いたDDS開発における研究の概要

レーションで行っているが，臨床応用を行うために高効率で大量調製に向いた遺伝子封入法について開発を行っている．エレクトロポレーションでは，適切な高電圧パルスを付加することで，粒子膜の構造を瞬間乱して遺伝子を粒子内に取り込ませる．遺伝子封入L粒子による特異的な遺伝子導入について，まずモデル系としてクラゲの緑色蛍光タンパク質(GFP：遺伝子導入によりタンパク質が生産されると緑色蛍光が観察できるため，判定がしやすい)の遺伝子を用いて検討した．遺伝子封入L粒子を各種の培養細胞に血清存在下で添加して導入実験を行ったところ，図4に示すように，ヒト肝細胞培養株およびヒト肝癌由来細胞株(HepG2やNuE)のみで，GFPの発現による緑色蛍光が観察された．この際のHepG2やNuEへのL粒子による遺伝子導入効率は，従来の遺伝子導入試薬であるカチオン性リン脂質(商標名：FuGene6)に比べて，単位DNA量あたりで100倍以上であった．これは，L子がHBVと同様に積極的に細胞内侵入する機構を保持しているためと考えられる．以上のように，L粒子を用いることで，肝細胞特異的かつ高効率な遺伝子導入ができることが明らかとなった．

そこで，次のステップとして，生体内でL粒子による遺伝子のピンポイントデリバリーが可能か，実験動物を用いて検討した．すなわち，ヌードマウス背部皮下にヒト肝細胞がん由来の細胞株(NuE：標的)とヒト大腸がん由来細胞株(WiDr：対照)を1つずつ移植し，GFP遺伝子封入L粒子を尾静脈より注射して(局注でなく経静脈的な投与を行うことで，遺伝子封入L粒子の標的化能力を明らかにするため)，L粒子が移植ヒト肝細胞がんに特異的に遺伝子導入できるかを蛍光観察により判定した．投与2週間後に，腫瘍を切除して組織内の蛍光を観察すると，ヒト肝細胞がん由来の組織内においてGFPに由来する緑色蛍光が観察された．一方，移植した大腸がん組織や，ヌードマウスの正常組織では緑色蛍光は一切観察されなかった．こうした結果は，中空バイオナノ粒子が生体内で，安定に遺伝子を保持し，HBVのようにヒト肝細胞を特異的に認識して，遺伝子送達を行っていることを示す．また，移植した腫瘍は本来の肝臓の存在位置とは別の部分に存在するにもかかわらず，標的化できたことから，遠方からの能動的な標的化が可能であると考えられる．

上記の基礎的な知見を基に，具体的な遺伝子治療への適用の試みとして，遺伝性疾患を取り上げた．遺伝性疾患は，単一タンパク質発現の欠損や機能喪失が原因の場合が多い．今回は遺伝病として血友病B型を取り上げて遺伝子治療を検討した．血友病B型では血液凝固因子9の投与で治療できることから，血液凝固因子9を発現するベクターをL粒子に封入し，ヒト肝細胞がんを移植したヌードマウスに投与した．経時的に採血して血中の血液凝固因子9の濃度をELISA法で測定したところ，重度血友病Bの治療が可能なレベルの発現が一ヶ月間にわたり確認された．今回は，本来肝臓で作られる血液凝固因子9を肝臓で

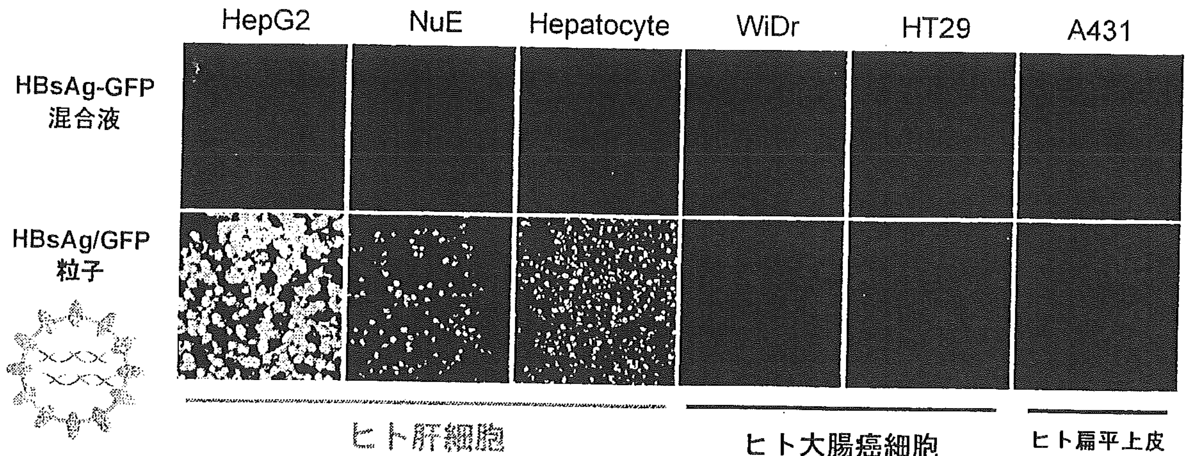

図4　培養細胞レベルでのGFP遺伝子のヒト肝細胞特異的導入

作らせたが，他の臓器由来のタンパク質でも，血中に分泌されて機能するものであれば，肝臓に発現させて治療を行うことが可能であろう．

中空バイオナノ粒子を用いた治療を従来技術と比較すると，中空バイオナノ粒子はウイルスと同様な高い遺伝子導入効率を示すとともに，人工系であることからリポソームと同様に安全であり，両者の良い点を併せ持つと言える．量産化に関しても，すでに実績を持つ．さらに高い標的化能力を持つことから，遺伝子治療において待ち望まれていたキャリアである．

4．中空バイオナノ粒子による薬剤デリバリー

中空バイオナノ粒子は，先にも述べたように，タンパク質と脂質からなる柔軟なナノカプセルであるため，粒子内には薬剤も封入できる．例えば，上述した遺伝子の場合と同様に，エレクトロポレーションによって薬剤を粒子内部に簡単に封入できる．実際にモデル化合物として蛍光物質カルセインを封入したL粒子を用い，遺伝子導入の実験と同じように培養細胞および担がんマウスを用いて導入実験を行ったところ(図3)，肝細胞に選択的にカルセインを導入できた[6]．したがって，治療効果は高いが副作用が強い医薬品の患部へのピンポイント投与に，L粒子を利用できると考えられる．例えば，抗がん剤などでは，がん細胞以外の全身で副作用がでるため，投薬濃度を抑えざるをえず，限定的な効果になっている．もし，抗がん剤を高濃度に封入した中空バイオナノ粒子でピンポイントな投薬が可能になれば，標的がん細胞における薬剤濃度のみを上げることが可能となるため，飛躍的な治療効果をあげられると期待される．

5．中空バイオナノ粒子によるタンパク質デリバリー

タンパク質を粒子内に封入する場合には，送達したいタンパク質をLタンパク質のC末端側に遺伝子レベルで融合して，融合タンパク質として発現するアプローチも有効であると考えられる．そこで，モデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質であるEGFPをLタンパク質のC末端側に融合して発現させたところ，EGFPを粒子内部に包含する形で中空バイオナノ粒子が形成できることが明らかになった．さらに培養細胞を用いた実験で，このEGFP融合粒子は肝細胞に特異的に取り込まれることが明らかとなった．

こうしたことからインターフェロンをはじめとする医薬タンパク質をLタンパク質のC末端側に融合した中空バイオナノ粒子の各種疾患の治療への利用が期待される．通常のインターフェロンをウイルス性肝炎治療に用いた場合，その投与により重篤な全身性の副作用と中和抗体の生産などが問題となっている．このような全身投与では副作用が出る医薬タンパク質の場合，粒子内に包含して能動的なピンポイントDDSが可能となれば，投与量を減らしてその副作用を著しく低減できるであろう．

6．中空バイオナノ粒子のリターゲッティング

中空バイオナノ粒子を構成するLタンパク質のpre-S1にある肝細胞認識部位の適当な領域を削除して，そこに他の臓器を特異的に認識する分子を挿入することで，任意の臓器に遺伝子や薬剤を標的化することが可能となると期待される．筆者らは，L粒子を任意の臓器に再標的化するように改造する(リターゲッティングという)ことも，重点的に検討している．まず，pre-S1領域のどの部分を置き換えるかについて詳細に検討を行った．適切な部分を選択しないと粒子形成量が大幅に低下するなど問題が生じるためだ．Lタンパク質において選択したpre-S1の適切な領域を，ヒトEGF(epidermal growth factor)と置き換えて酵母で発現させたところ，L粒子の場合と同程度の中空バイオナノ粒子(EGF提示粒子)が生産され，L粒子と同様な手法で精製できた．得られたEGF提示粒子にエレクトロポレーションでカルセインを封入し，ヒト肝癌由来細胞株および扁平上皮がん細胞株A431(EGFレセプターを大量に発現している)に加えたところ，A431細胞においてのみ著しい蛍光が観察された[6]．この結果は，EGF提示粒子は，肝細胞への特異性を失って，A431への特異性を獲得したことを示す．したがって，分子認識に関与するpre-S1の適当な

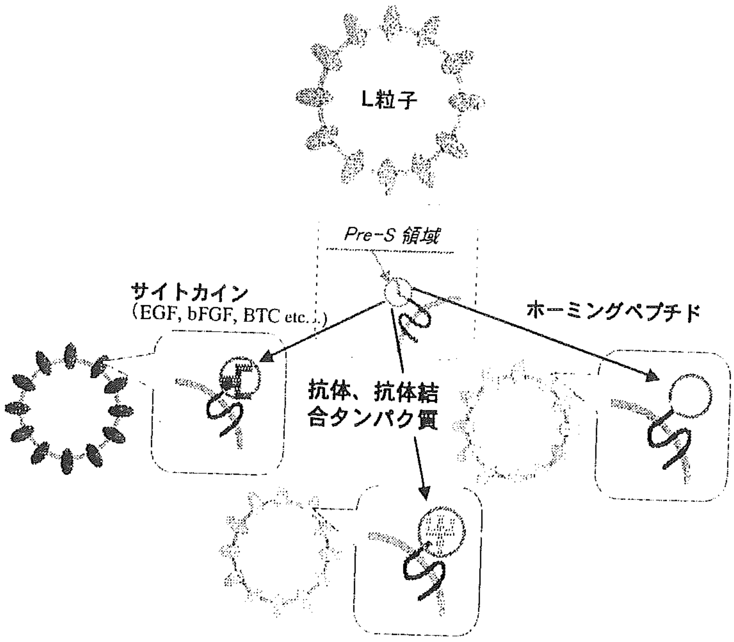

図5　中空バイオナノ粒子のリターゲッティング

領域を置換することで，中空バイオナノ粒子のターゲットを変更できる，すなわちリターゲッティングが可能であることを実証できたといえる．

筆者らは，現在，より一般的な意味で，リターゲッティング技術の開発を精力的に進めている．図5に示すように，各種のサイトカイン，抗体分子，抗体結合分子(各種細胞や組織に特異的な抗体を粒子に結合できる)を用いたリターゲッティングが期待されるが，これらに関しても筆者らは既に成功している．さらに最近，短いペプチドでも細胞や組織特異性を持つことが示された(ホーミングペプチドと呼ばれている)ことから[9]，その利用も有望である．特異性を示す「荷札」となる新しいホーミングペプチドを効率よく探索する上では，最近大きな進展を見せているコンビナトリアル・バイオエンジニアリングの手法が極めて有効であろう[10]．L粒子をリターゲッティングした中空バイオナノ粒子を用いれば，望みの臓器・組織へのピンポイントな遺伝子・薬剤の送達ができると期待される．

7．おわりに

中空バイオナノ粒子は，ウイルス表面抗原タンパク質の自己組織化によって形成される中空ナノ粒子を利用する，という新しい概念による革新的なDDS用キャリアである．この粒子は，安全な人工系でありながら，ウイルスのように積極的に細胞内に進入する機構を保持する理想的なものといえる．ただし，例えば粒子の免疫原性の問題など，未解決の点も残されている．現在，免疫系に認識されないよう，粒子をステルス化することを試みているが，有望な結果を得つつある．このようなことから，中空バイオナノ粒子を用いたDDSは，画期的な先進医療技術に発展すると考えている．このため筆者らは，中空バイオナノ粒子に関する基礎的な研究に加えて，その実用化に向けた研究開発についても大学発ベンチャー㈱ビークル(本社：岡山市 www.beacle.com)を設立して進めている．

引用文献

1) Verma I.M., Somia, N., *Nature*, 389, 239 (1997)
2) Neurath A.R. *et al.*, *Cell*, 46, 429 (1986)
3) Seyec J. Le *et al.*, *J. Virol.*, 73, 2052 (1999)
4) Kuroda S. *et al*, *J. Biol. Chem.*, 267, 1953 (1992)
5) Yamada T. *et al*, *Vaccine*, 19, 3154 (2001)
6) Yamada T. *et al*, *Nature Biotechnol.*, 21, 885 (2003)
7) Lawrence D., *Lancet*, 362, 48 (2003)
8) Russel S.J., *Nature Biotechnol.*, 21, 872 (2003)
9) Arap W., *et al.*, *Nature Medicine*, 8, 121 (2002)
10) 植田充美，近藤昭彦(編)，コンビナトリアル・バイオエンジニアリング，化学同人(2003)

細胞およ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[1,2]・妹尾 昌治[2,3]・上田 政和[2,4]
近藤 昭彦[2,5]・谷澤 克行[1,2]・黒田 俊一[1,2*]

バイオナノカプセルは，生体分子（バイオ）から成るナノサイズの中空状粒子（カプセル）というユニークな素材で，独創的な遺伝子治療用および薬物送達システム（Drug delivery system; DDS）用素材として現在注目されている．本カプセルの最初の例として，従来，B型肝炎ウイルス（hepatitis B virus; HBV）のワクチン用抗原として利用されてきたHBV表面抗原（HBV surface antigen; HBsAg）粒子が利用されている．具体的には，HBsAgタンパク質群（S, M, L）の中で，N末端側にヒト肝細胞特異的に結合するリガンドであるpre-S1領域を有するLタンパク質による粒子（L粒子）が，直径100 nm前後の中空状粒子であることに着目して，我々のグループが物質送達用キャリア（運搬体）として約5年間かけて開発した.[1] このカプセルは，Nature Biotechnology誌,[2] The Lancet誌,[3] Nature Materials誌[4] などに「強い感染力と高い細胞特異性を持つウイルスゲノムフリーな画期的な生体内物質送達法」として紹介された．

遺伝子導入用ベクターの現状

近年の生命科学の発展によりPCR，ウイルスベクター，RNA干渉法，遺伝子組換えマウスなどの革新的な技術が開発され，細胞や個体に対する遺伝子レベルからのアプローチが可能になった．また，医療分野においても遺伝子治療に関する成功事例もいくつか報告され,[5,6] より一層，基礎から臨床応用にかけて遺伝子を用いた研究が活発になっている．しかしながら，研究が進むにしたがって解決すべき課題が明らかになってきた．特に，生体内（*in vivo*）における遺伝子導入に大きな問題点が見いだされ，解決に向けてこれまでにさまざまなキャリアが開発されている．現在利用されている*in vivo*遺伝子導入方法には、感染性ウイルスを基としたウイルスベクター法とウイルスを用いない非ウイルス導入法がある（表1）．

ウイルスベクター法　ウイルスは自分自身を増殖させるため，宿主に感染して自身の遺伝子を導入し，感染細胞内で増幅させる機構を持っている．この機構を外来遺伝子の導入に応用したものがウイルスベクターであり，現在では生命科学研究を行ううえで不可欠な基盤技術になっている．

レトロウイルスは，最も古くから利用されているベクターで，外来遺伝子を導入細胞の染色体ゲノムへ効率よく組み込むことができるため，長期間にわたる遺伝子発現が必要な場合によく用いられる．しかし，非分裂細胞への遺伝子導入がほとんど起こらないため，数多くの臓器は非分裂性細胞からなるので，*in vivo*での遺伝子導入は非常に難しい．この問題を解決するために，ヒト免疫不全ウイルス（human immunodeficiency virus type 1; HIV-1）を基としたレンチウイルスベクターの開発が行われている．

レンチウイルスベクターはレトロウイルスベクターの特長をもちながらも，非分裂細胞への外来遺伝子の導入ができ，長期的な遺伝子発現も可能である．しかし，こ

表1．各種ベクターの特徴の比較

ベクター	レトロウイルスベクター	アデノウイルスベクター	AAVベクター	リポソーム	naked DNA（局所投与）
病原性	+	+	−	−	−
細胞毒性	−	+	−	+/−	−
非分裂細胞への導入	−	+	+	+	+
染色体への組み込み	+	−	+	−	−
標的特異性	−	−	−	−	+
ベクターの生産性	低	中	低	高	高
DDSキャリアへの応用	不可	不可	不可	可	不可

*著者紹介　大阪大学産業科学研究所生体触媒科学研究分野（助教授）〒567-0047 茨木市美穂ケ丘8-1
TEL/FAX. 06-6879-8462　E-mail: skuroda@sanken.osaka-u.ac.jp
[1] 大阪大学産業科学研究所，[2] ㈱ビークル，[3] 岡山大学大学院自然科学研究科，[4] 慶應義塾大学医学部，[5] 神戸大学工学部

れらのベクターによる外来遺伝子の宿主染色体への挿入はランダムであることから，正常遺伝子の機能を低下させたり，休眠している癌遺伝子を活性化させたりする危険性が常に存在する．

アデノウイルスベクターは，レトロウイルスベクターと並んでよく利用されるベクターで，分裂・非分裂細胞の区別なく広範囲のさまざまな細胞に効率よく外来遺伝子を導入することが可能であるが，導入された外来遺伝子は染色体に組み込まれないので，発現は一過性である．そのため，長期間の遺伝子発現を実現するには繰返し投与することが必要であるが，ベクター自身に強い細胞毒性や抗原性があり，ヒトの多くはアデノウイルスに一度は罹患していることから免疫応答が無視できないレベルなので，繰返し投与を行うことは難しい．

これらに代わるウイルスベクターとしてアデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus; AAV）ベクターの研究が行われている．AAVベクターは分裂細胞だけでなく非分裂細胞にも外来遺伝子を導入でき，ヒト第19番染色体の特定の位置への組込みが可能である．また，元来ヒトへの病原性がないので安全性は高いと考えられている．しかし，標的細胞への遺伝子導入効率が非常に低いこと，ベクターの大量生産の技術が確立していないこと，ベクターの導入できる外来遺伝子の大きさが4.5 kbまでと小さいことが課題である．

非ウイルス導入法　非ウイルス導入法では，外来遺伝子としてプラスミドDNAを利用する．上記ウイルスベクターと異なり，ウイルスに起因する遺伝子を導入しなくてよいのが長所である．特に，プラスミドDNAを標的組織内へ局所注射する方法が多く行われている．プラスミドDNAの局所注射は簡便な投与法であるが，体内の特定組織への投与は非常に難しく，その効果も局所的である．

リポソーム法は，非ウイルス導入法の代表的な導入法であり，古くからDDSキャリアとしても利用されている．これまでの使用実績から，リポソームは，人体への安全性が高く，キャリアの作製が容易であることなど，ウイルスベクターと異なる特長を持っている．しかし，生体内では血液中で補体成分による破壊を受けやすく，積極的に細胞内へ感染侵入する機構がないために導入効率がきわめて低い．近年，リポソームを構成する脂質を工夫することで，細胞への遺伝子導入効率を向上させようとする試みがなされているが，未だウイルスベクターに匹敵する効率は得られていないのが現状である．

遺伝子導入ベクターが研究だけではなく，実際の医療現場にまで浸透していくには，①標的細胞・患部に特異的に導入できること，②安全性が高いこと，③生体における導入効率が高いこと，などが求められており，今あるベクターの更なる改良あるいは新規ベクターの開発が待たれている．

バイオナノカプセルの特長

バイオナノカプセルの性質　バイオナノカプセルの骨格となるHBsAg粒子は，HBVの外殻に相当するもので，外被タンパク質（HBsAgタンパク質）と宿主由来の脂質二重膜から成る中空状粒子である．[7] HBsAg粒子には，HBVゲノムやウイルス複製に関与するタンパク質群など一切含まれないことと（図1），実際に健常者に接種するB型肝炎ワクチンと同様な構造を有していることから，HBVに由来する副作用の問題はほぼ完全に回避されている．HBsAgタンパク質は，翻訳開始位置の違いによって3種類あり，それぞれS（small），M（middle），L（large）と呼ばれる．Sタンパク質は226アミノ酸からなり，HBsAg粒子の構造を支える．Mタンパク質はSタンパク質のN末端側に55アミノ酸から成るpre-S2領域が付加している．また，Lタンパク質はMタンパク質のN末端側に108または119アミノ酸から成るpre-S1領域がさらに付加している．このpre-S1領域にはヒト肝細胞と直接結合する領域を含んでおり，ヒト肝細胞特異的な感染機構の中心的な役割を担っている．[8,9]

HBsAg粒子はHBVの抗原として免疫原性をもち，HBVに対する抗体を誘導することから，HBVに対するワクチンとして有効であることが早期から知られていた．B型肝炎感染者は世界的に多いことから，生物工学者の間では，1980年代後半から遺伝子組換え技術を用いてさまざまな宿主細胞を用いた大量生産法の開発が精力

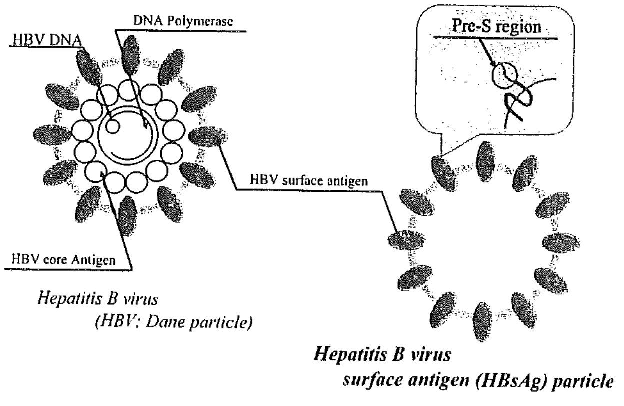

図1．HBVとHBsAg粒子の概略図．HBsAg粒子には，HBVの病原性などに関与する因子は含まれない．

的に行われてきた．しかし，細胞内ではpre-S1領域がLタンパク質の生合成を阻害する作用を示すため，その多くがSタンパク質あるいはMタンパク質から成るS粒子，M粒子であった．1992年，黒田ら[10]は，pre-S1領域のN末端側にシグナルペプチドを付加することにより，組換え酵母を用いたL粒子の大量生産系を確立することに世界で初めて成功した（全可溶性タンパク質の約40%がLタンパク質であった）．この組換えL粒子はS粒子あるいはM粒子に比べ，HBVに対する抗体の誘導能がすぐれていることも判った．組換えL粒子の物理的性質を調べたところ，1つの粒子（平均直径100 nm）は約110のLタンパク質から成り，すべてのLタンパク質が外部へpre-S1領域を提示するという材料工学的に注目すべき特徴を持つことが判明している．

遺伝子導入用ベクターとしてのバイオナノカプセル

バイオナノカプセルによる遺伝子導入は，オワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質（green fluorescence protein; GFP）の発現遺伝子を用いて検証した．カプセル内部への遺伝子封入法には，エレクトロポレーション法を用いることにした．エレクトロポレーション法は，大腸菌，酵母，哺乳類動物細胞などの各種細胞に対して簡便に遺伝子を封入できる手法である．GFP発現遺伝子封入カプセルは，*in vitro*ではヒト肝臓由来培養細胞株（ヒト由来初代培養肝細胞も含む）に対してのみGFP発現遺伝子を導入し，GFPに由来する蛍光を観察した．一方，数種の非ヒト肝臓由来培養細胞株ではGFPに由来する蛍光はまったく観察されなかった．また，*in vivo*での検証のために，ヒト肝癌由来細胞株とヒト大腸癌由来細胞株を固形癌として同じヌードマウスの背部へ移植した担癌マウスを作製した．GFP発現遺伝子封入カプセルを*in vitro*の検証と同様に調製し，尾静脈より投与すると，移植したヒト肝癌由来固形癌のみに到達し，その結果，組織内にてGFPの発現を観察することができた．また，対照組織ならびにマウス各主要臓器においてはGFPに由来する蛍光は観察されなかった．特に，マウス肝臓のクッパー細胞にも取り込まれなかったのは特筆に価する．このことより，バイオナノカプセルは内包する遺伝子をヒト肝臓特異的に生体内で送達することが可能であることが示された．[1]

DDSキャリアとしてのバイオナノカプセル

HBsAgタンパク質が脂質膜に埋め込まれている形状のバイオナノカプセルはプロテオリポソームそのものであり（HBsAg粒子の組成はタンパク質約80%，糖質約10%，脂質約10%であり，リポソームなどと比べて物理的に頑丈である），一般に使われているリポソームと同様に，薬剤などの生理活性物質も内部に包含し，標的細胞へ送達させることが可能である．蛍光物質カルセイン，FITC（蛍光物質の一種）標識デキストランなどをモデル化合物として用い，薬剤送達の検証を試みた．これら化合物の場合でもエレクトロポレーション法を用いることでカプセル内部に封入できる．カルセインならびにFITC標識デキストランをそれぞれ封入したカプセルを*in vitro*にてヒト肝臓由来培養細胞株および数種の非ヒト肝臓由来培養細胞株に対して導入を試みると，蛍光はヒト肝臓由来培養細胞株にのみ観察された．また，ヒト肝癌由来固形癌とヒト大腸癌由来固形癌を移植した担癌マウスに投与すると，移植したヒト肝癌由来固形癌の組織内にのみ蛍光が観察でき，対照組織，マウスの主要臓器においては遺伝子の場合と同様に蛍光を観察することができなかった．したがって，低分子化合物の場合でもバイオナノカプセルは生体内でヒト肝臓特異的に送達することが可能であることが示された．[1]

今後に向けた取り組み

バイオナノカプセルの再標的化　バイオナノカプセルはHBsAg粒子をベースにしていることから，ヒト肝臓には非常に特異性が高いが，その用途はヒト肝臓への遺伝子・薬剤送達に限られていた．そこで，バイオナノカプセル表面に提示されているヒト肝細胞結合部位を抗体やサイトカインなどの生体認識分子へ置換することで，置換した分子に応じた特異性を新たに付与させることが期待できる．我々のグループでは，すでに上皮成長因子（epidermal growth factor; EGF）をモデル生体認識分子として選択し，肝細胞結合部位と置換したEGF提示型カプセルを創製した．EGF提示型カプセルの生産は，バイオナノカプセルと同様に，組換え酵母を用いて大量生産することが可能である．このEGF提示型カプセルは，ヒト肝細胞株ではなく，EGF受容体を細胞表面に発現している細胞にのみその特異性を示し，バイオナノカプセルの特異性が表面に提示された生体認識分子に支配されることが判明した．[1]我々のグループでは，EGF提示型カプセルの経験を踏まえて，生体認識分子を提示した数種のカプセルの開発を進めており，さまざまな細胞種に対して遺伝子・薬剤導入が可能なDDSキャリアを世に送り出していきたい．

バイオナノカプセルによる遺伝子治療実証実験　我々

のグループでは，バイオナノカプセルを実用化するために，さまざまな遺伝子，薬剤の送達を試み，それぞれの物質に適したプロトコルの作成を目指している．一例として，血液凝固第9因子（blood clotting factor IX; FIX）発現遺伝子を用いた血友病Bの遺伝子治療モデルの検証実験の結果について述べる．GFP発現遺伝子の場合と同様に，エレクトロポレーション法にて封入を行ったFIX発現遺伝子含有カプセルを担癌マウスの尾静脈より投与した後，経時的に採血を行い，ELISA法にてマウス血中のFIXタンパク質量を求めた．その結果，投与後4日目からFIXタンパク質の発現が確認され，以降3週間にわたり血友病Bの重症患者に対する治療効果が期待できる発現レベルを維持した.[1] 現在，流通している血友病治療薬剤は主に組換えタンパク質製剤であるが，その効果が継続する期間は2～3日程度（薬剤の種類による）と非常に短く，症状が重い患者ほど頻回投与が余儀なくされる．また，抗体（インヒビター）産生も見られるので長期連続投与に適さない．したがって，FIX発現遺伝子封入カプセルが医薬品化されれば，少なくともこれら患者の経済的および精神的負担を軽減することが期待できる．このような手法は遺伝子補充療法と呼ばれ，生存に必須な遺伝子が先天的に欠損，あるいはその機能が脆弱になっている患者が治療対象である．治療用遺伝子の種類を代えることで，血友病B以外にも適応が可能になると期待している．

また，遺伝子だけではなく，薬剤を用いた実用化試験も進めている．たとえば，抗癌剤をバイオナノカプセルに封入することで，患部以外にも作用して副作用を引き起こしていた抗癌剤を患部に集中的に送達することが可能になり，医師も患者も安心して行える癌のミサイル治療の実現を目指している．この方法が実用化されれば，可視化が難しい転移癌に対してもバイオナノカプセルを注射するだけで治療でき，多くの予後の悪い癌治療も改善されるという夢のような話も現実化する．

この他にも，バイオナノカプセルが肝臓特異的であることから，ウイルス性肝炎治療への適用も目指している．ウイルス性肝炎治療ではインターフェロンの投与がよく行われているが、全身性の副作用（高熱，脱毛，鬱状態など）が非常に重く，またインターフェロンを中和する抗体が高頻度に産生されることがあり，長期投与や根治療を阻む問題となっている．しかし，バイオナノカプセルにより患部の肝臓にのみインターフェロンを少量ながら確実に投与できれば，薬効を維持しながら全身性の副作用の生じない量まで減らすことが可能になることが期待される．

表2．バイオナノカプセルの特長

(1) 生体内での高いピンポイントデリバリー効果
(2) 遺伝子，薬剤，タンパク質などを運搬可能
(3) ウイルスゲノムフリー
(4) 酵母による大量生産可能
(5) 任意の細胞および組織への再標的可能

以上のように，表2にあるような特長を持ち，さまざまな可能性を秘めるバイオナノカプセルではあるが，本技術のプラットホームが完成したばかりであるので，実用化に至るまでには解決すべき課題も多い．たとえば，従来ワクチンとして使用されているHBsAg粒子を骨格としているため，免疫原性ならびに抗原性を下げて連続投与を可能にしなければならない．HBVの中には，ヒトの免疫システムに認識されにくい変異を持つエスケープ変異体の存在が知られている．我々のグループでは，この変異体に倣ったステルス型カプセルの開発を進めているところである．この他にも，エレクトロポレーションでは10～20%程度であるカプセルへの物質封入効率を，効率の良い別の方法を採用することにより，必要投与量を低く抑えること，バイオナノカプセルとさまざまな生体認識分子の組み合わせを試みることで，バイオナノカプセルの適用範囲を拡大することが当面の課題と考えている．

また，バイオナノカプセルの実用化に向けては，2002年に我々のグループが設立した大学発ベンチャー・(株)ビークル（本社　岡山市：http://www.beacle.com）が中心な役割を担っており，産学で協調しながら開発を進めているところである．

文　献

1) Yamada, T. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **21**, 885 (2003).
2) Russell, S. J.: *Nat. Biotechnol.*, **21**, 872 (2003).
3) David, L.: *The Lancet*, **362**, 48 (2003).
4) Research News: *Nat. Materials*, **2**, 504 (2003).
5) Kay, M. A. *et al.*: *Nat. Genet.*, **24**, 257 (2000).
6) Kapadia, S. B. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2014 (2003).
7) Tiollais, P. *et al.*: *Nature*, **317**, 489 (1985).
8) Heermann, K. H. *et al.*: *J. Virol.*, **52**, 396 (1984).
9) Neurath, A. R. *et al.*: *Cell*, **46**, 429 (1986).
10) Kuroda, S. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **267**, 1953 (1992).

創薬などに期待高まる「細胞表層工学」

微生物・細菌の表面にたんぱく質人工集積
バイオセンサーやワクチン開発の動きも

神戸大学工学部教授
近藤　昭彦

微生物や細菌の表層に機能性分子を人工的に集積して、化学原料の生産や有用たんぱく質の選択などに応用する「細胞表層工学」の研究が活発になってきた。酵母や大腸菌を利用してバイオセンサーやワクチンを開発する動きも出ている。遺伝情報に基づく新薬開発や、環境調和型の化学工場つくりなどに役立つと期待される。この分野で大学発ベンチャー企業の設立にかかわり、様々な新技術を開発している神戸大学の近藤昭彦教授に最新動向などを解説してもらった。

"千手観音"微生物を活用

厚さ数百nmの細胞の表層（細胞壁や細胞膜）は、細胞の構造や形態を維持するだけでなく、物質の認識やシグナルの伝達、酵素反応などの場として、極めて重要な役割を果たしている。大きさがミクロンオーダーの細胞から見ると、地球の表面を覆う薄い地殻のようであるが、そこに機能性分子を集積（ディスプレー）することで、新たに細胞に大きな機能を付与することができる。

様々な微生物の細胞表層に種々の機能性たんぱく質やペプチドをディスプレーして新しい機能をもった細胞を創製すること（こうした微生物は、千手観音＝アーミングにちなみ「アーミング微生物」と呼ばれる）が活発に行われ、細胞表層工学として展開してきた。酵母や細菌細胞表層ディスプレー法では、細胞の表層に局在するたんぱく質に、ディスプレーしたいたんぱく質を遺伝子レベルで融合し、融合たんぱく質として表層にターゲッティングしてディスプレーする。多彩な機能性たんぱく質（抗原、抗体、酵素、レセプター、各種リガンド、ペプチドなどの多彩な分子）を細胞表層ディスプレーすること（Fig 1の上側）で、細胞に多彩な機能を付与してバイオテクノロジーの広範な領域に応用していくことができる（Fig 1の下側）。

一方、細胞表層にcDNA（相補型デオキシリボ核酸）ライブラリーや標的たんぱく質の変異体ライブラリーをディスプレーし、細胞表層たんぱく質ライブラリーを構築して機能未知たんぱく質の機能を迅速に評価することや、新機能性バイオ素子を創製することも活発に研究されている。この様に細胞表層ディスプレーは広範囲な応用が期待されるが、以下に紹介するように多様な酵母および細菌ディスプレー系の開発が進んでおり、目的に応じて選択して利用することが可能となってきている。

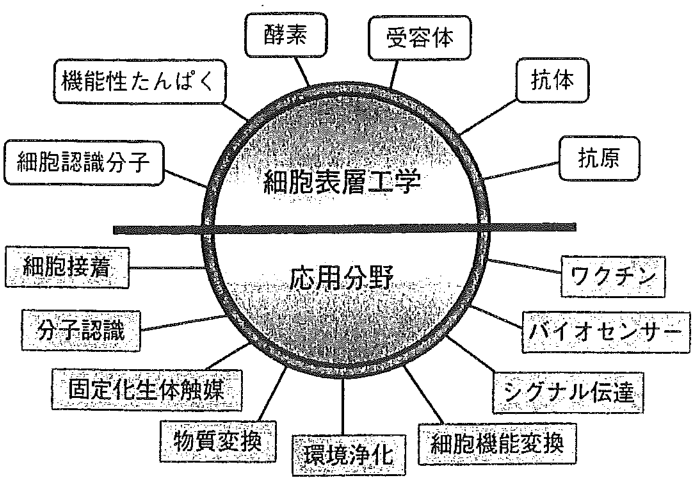

Fig 1　細胞表層工学が対象とする機能分子と主な応用分野

近藤　昭彦氏　1988年、京都大学大学院工学研究科博士課程単位取得満期退学、九州工業大学講師に。同助教授を経て95年神戸大学工学部助教授。2003年より現職。バイオマス資源からの燃料・原料生産や、コンビナトリアル・バイオエンジニアリングなど化学工学、生物工学が専門。経済産業省の地域新生コンソーシアム研究開発事業（2003～2004年度）でプロジェクトリーダーを務め、神戸大発のベンチャー企業であるバイオエナジー（兵庫県尼崎市）の取締役を兼務する。

社　名	事業概要	売上高(万ドル)	純損失(万ドル)	株式公開月	公開株価(ドル)	2005年3月3日現在の株価(ドル)
イミュニコン Immunicon	がん診断技術	157	2793	4月	8	6.53
ルメーラ Lumera	ポリマー材料	99	892	7月	6.95	5.5
ケンブリッジ・ディスプレー・テクノロジー Cambridge Display Technology	有機ELディスプレー	1329	3479	12月	12	8.04

注）売上高と純損失はいずれも2004年

Fig 5　2004年に新規株式公開を果たしたナノテクベンチャーの概要

なかった理由だろう。

ナノシス社のIPO取り下げは「株式市場全体にとってはよかった」と言うのは投資銀行、アダムズ・ハークネスでナノテク関連案件を担当するブレント・ブラウン氏だ（前ページFig 4）。投資銀行は企業のIPOや合併・買収（M＆A）業務を取り扱うが、アダムズ社は2004年に株式公開を果たした3社のナノテク関連企業のうち、2社のIPOに携わった（Fig 5）。知名度のあるナノシス社の株を多くの一般投資家が買い込んで、もし同社が期待通りの業績を達成できずに株価が急落するようなことになったら、後に続こうとするナノテク関連企業全体に悪影響を及ぼすことになるからだ。

過去6年間の研究成果に集まる期待

ネット・バブル崩壊後、低迷していたIPO市場はこのところ活気付いており、「今後18カ月以内に再びナノテク分野に対する関心が高まり、IPOを実現する企業が出てくるだろう」とブラウン氏は予測する。「米政府は過去6年間に膨大な資金をナノテク研究に投じており、（1年半後くらいをメドに）いよいよその成果が出てくるから」（同氏）だ。

大手投資銀行メリルリンチのアナリスト、スティーブン・ミルノビッチ氏も「2005年中に特筆すべき（ナノテク関連の）IPOがあるかもしれない」と考える。昨年、IPOを果たした3社はいずれもナノテクをある特定製品に活用する「アプリケーション型企業」だったが、今年はナノシスのように幅広い分野にある種のナノ技術を提供しようという“生え抜き”の「『プラットホーム型企業』がIPOを実現する可能性もある」（同氏）。

2月初旬にナノテク投資に関する主要会議がカリフォルニア州で開かれたが、同氏がそこで受けた印象では、ナノテクベンチャーが株式公開を果たすには商品による売り上げを計上していることが不可欠で、最低でも1000万～4000万ドルの売上高は必要との見方が有力だったという。同氏によると、ナノ・テックス（Nano-Tex）、モレキュラー・インプリンツ（Molecular Imprints）、ナノダイナミクス（NanoDynamics）、ナノオプト（NanoOpto）といったナノテク関連ベンチャーが今年、売り上げを達成する計画だ。

優良ベンチャー買収で新技術獲得狙う

ベンチャーキャピタリストたちにとっては、IPOだけが投資リターンを得る道ではない。アダムズ社のブラウン氏によると「ナノテクベンチャーはむしろ、デュポンやゼネラル・エレクトリック（GE）、ハネウエルといった大企業にとって、M＆Aの対象となる有力候補だ」。これは一般的に、大企業が優良ベンチャーを買収することによって新技術を獲得する傾向が強まっているためだ。

同氏は「2005年はナノテク分野におけるM＆Aが活発になる見通しで、当社も現在、複数の案件にかかわっている」と語る。米VCにとっては、高い価格で大企業に投資先を売却できれば、IPOと同様、ないしはそれ以上のリターンを得られ、M＆Aの活発化はナノテク分野におけるVC投資を促す大きな要因となる。

ネット・バブルのころは、「ネット企業」と銘を打つだけで株式公開を果たし、株価が急騰する場面があった。しかし、ナノテクに関してはある特定の分野が急に注目を集めてそれに携わるベンチャーがこぞって株式公開を果たすというのではなく、個別に収益性のある有望企業が公開を実現するというのが多くの専門家の見方だ。

ナノテクベンチャーにとってIPOの「窓が開く」時期に関しては、見方によって半年から1年くらいのずれはあるものの、「必ず起きるのは間違いないので、無理強いしないほうが良い」とハリス社のアンドリーブ氏は強調していた。