

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 近藤 昭彦

平成19(2007)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  
治療への応用 . . . . . 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確立 . . . . . 7  
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. バイオナノキャリアを利用する *in vivo* イメージングに関する研究  
. . . . . 21  
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・助教授)
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- . . . . . 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)

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 40

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . . 43

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、任意の組織・細胞に特異性を示す粒子の開発、低免疫原性を示すステルス型の中空バイオナノ粒子の創製とその効率的な生産法の開発等、バイオナノキャリアを確立する研究開発を進めた。また、バイオナノキャリアのバイオイメーキング法への展開に関する検討を進めるとともに、がん遺伝子治療への適用を目指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）

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起こり、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

### A. 研究目的

現在、実験的に行われている遺伝子治

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

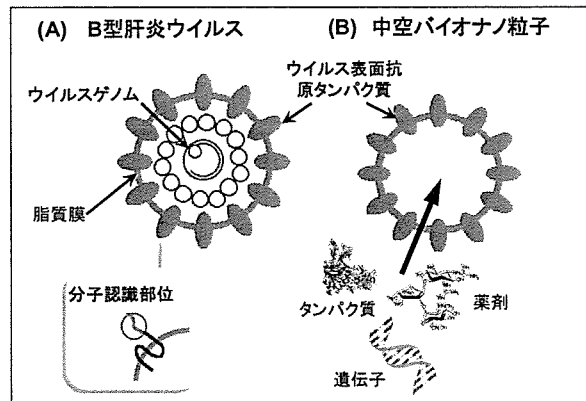


図1 バイオナノ粒子の概念

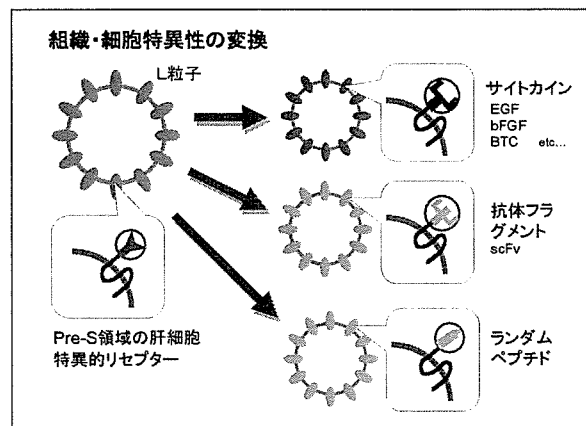


図2 バイオナノ粒子の組織・特異性変換

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と、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。

### ・ 昆虫細胞による特性改変粒子 (EGF 提示粒子) 生産の検討

酵母の発現系では、生産しにくい中空バイオナノ粒子の生産を行うための昆虫細胞による発現系を構築した。昆虫細胞による分泌生産においては、分泌シグナルとして honeybee 由来 Melittin signal sequence を用いるプラスミドを創製した。このプラスミドを遺伝子導入試薬 FuGENE6 (Roche) を用いて昆虫細胞 BTI-TN-5B1-4 (High Five) に形質転換した。

### ・ 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

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、膜透過ペプチド (アルギニン 8 残基: R<sub>8</sub>)、ストレプトタグ、EGF について検討した。

膜透過ペプチドおよびストレプトタグ提示粒子は、従来から検討を進めてきた酵母により、生産し、従来法に従って精製粒子を得た。一方 EGF 提示粒子の場合は、昆虫細胞による生産を行った。発現プラスミドを導入した High Five の培養上清を回収し、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。薬剤モデル系として低分子蛍光物質 calcein (Mw:622.53) を用いた。calcein および EGF 提示粒子をリン酸緩衝液中で混合し、エレクトロポレーション法により粒子内部に calcein を封入した。

### ・ 融合タンパク質を用いての *in vivo* イメージングの基盤検討

IgG に依存して抗原を標的して可視化するタンパク質分子デザインとして、この Z 領域を二つ持つ ZZ-タグ遺伝子とホタルルシフェラーゼ遺伝子を融合し、ZZ-LUC 融合タンパク質を大腸菌で発現させ、これを精製した。

抗体と結合したルシフェラーゼが抗原特異的に送達された場合、その局在を *in vivo* で観察することを目的として、ルシフェラーゼに特異的な基質であるルシフェリンを腹腔内に注射することにより、ルシフェラーゼの局在を高感度 *in vivo* イメージング CCD カメラにより撮影する方法を検討した。

### ・ 低免疫原性化した中空バイオナノ粒子の創製

低抗原性中空バイオナノ粒子 (Q129R/G145R 変異体) を発現する酵母細胞は、*Saccharomyces cerevisiae* AH22R-株でプラスミド pGLDLIIP39-RcT を保持するものを用いた。この発現株は、通常の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。酵母破砕物から熱処理とクロマトグラフィーを組み合わせた方法で低抗原

性中空バイオナノ粒子の精製を行った。精製低抗原性中空バイオナノ粒子 (Q129R/G145R 変異体) について、酵母由来のタンパク質や DNA 量、抗体産生能力、中和抗体存在下での挙動、等について検討した。

- ・ L 粒子の肝細胞がん治療への応用に関する検討

MPC ポリマーに、エステル結合により HBs 抗原を結合させた。この HBs 抗原結合 MPC ポリマーにエタノールに溶解したパクリタクセルと混合させ、その後エタノールを蒸発させることによりパクリタクセルを封入した。ヒト肝細胞癌である HepG2 とヒト扁平上皮癌である A431 を 96 穴のプレートに撒いて、培養液中に HBs 抗原結合パクリタクセル封入 MPC ポリマーを添加して、MTT assay 法でその殺細胞効果を対照であるパクリタクセル封入 MPC ポリマーと比較検討した。HBs 抗原結合 MPC ポリマーに GFP および Flt-1cDNA を組み込んだ plasmid をイオニックに吸着させたものを、ヒト肝細胞癌株である HepG2 とヒト大腸癌 WiDr を 96 穴のプレートに撒き、生着させてから遺伝子結合 MPC ポリマーを培養液中に添加して、培養液中の Flt-1 タンパク濃度を ELISA 法で測定した。

- ・ 光イメージングによる可視化

プロモーターの下流にルシフェラーゼを繋いだプラズミドを組み込んだヒトがん細胞を樹立した。これをヌードマウスに移植すると、形成した腫瘍内でルシフェラーゼタンパク質が発現され基質であるルシフェリンを投与後一定期間、発光反応を起こす。この化学発光を、冷却高感度 CCD カメラを搭載したイメージング機器 *in vivo* imaging system (IVIS) を用いて可視化した。

- ・ 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

- ・ 酵母細胞による特異性変換粒子 ( $R_8$ 、ストレプトタグ提示粒子) の生産

$R_8$  およびストレプトタグ提示粒子は、従来から検討を進めてきた酵母による発現系を用いることで効率よく生産でき、また従来法に従って精製粒子を得ることができることが明らかとなった。

- ・ 昆虫細胞による特異性変換粒子 (EGF 提示粒子) の生産の検討

昆虫細胞を用いた生産系により、EGF 提示粒子は、従来の L 粒子と比較して約 30 % 程度の生産レベルを達成していることが確認された。次に Western blotting により、EGF の発現確認を行なった。一次抗体に anti-HBsAg 抗体を使用した場合、両者とも目的の分子量の位置にバンドを検出したことから表面抗原タンパク質が分泌発現していることが確認された。anti-EGF 抗体を用いた場合、目的のバンドを検出し、EGF が発現していることが確認された。以上より、EGF が表面抗原と融合タンパク質として発現し、かつ粒子を形成していることが確認された。

- ・ 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

肝細胞特異性を示す L 粒子を用いた場合、

ヒト肝癌細胞 NuE で蛍光が確認され、ヒト上皮癌細胞 A431 では蛍光が確認されなかった。一方 EGF 提示粒子を用いた場合、ヒト肝癌細胞 NuE では蛍光が確認されなかったのに対し、ヒト上皮癌細胞 A431 においてのみ蛍光が観察された。従って EGF 提示粒子は、肝細胞特異性が消失し、上皮細胞特異性が付与されていることが示唆された。

- ・ 融合タンパク質を用いての *in vivo* イメージングの基盤検討

緑色蛍光タンパク質 GFP とホタルルシフェラーゼを融合したタンパク質を調製し、*in vitro* および *in vivo* で投与し、イメージングの可能性を検討した。融合タンパク質は *in vitro* では簡便に蛍光でモニター可能であるのに対し、*in vivo* ではルシフェリンを投与することにより強い発光を検出して、その局在を知ることができることを確認した。また、 $Mg^{2+}$  と Coenzyme A を同時に注射して、発光時間を 1 時間まで持続させることができた。

- ・ 低免疫原性化した中空バイオナノ粒子の創製

B 型肝炎ウイルス表面抗原粒子(HBsAg 粒子)検出用 ELISA (IMx) および、抗 S 抗体を使用する Western Blotting を行い、最も中空バイオナノ粒子発現量が高い酵母株を選んだ。最終的に選抜した Q129R /G145R 変異体発現株は、工業生産に使用している野生型粒子発現株と同等の発現量であった。

1L の培養液から精製度 99%の粒子を 2 日・2 ステップの精製工程で得ることに成功した。本粒子に含まれる酵母由来染色体 DNA の含量は 0.001%未満で、酵母由来タンパク質の含量は 0.1%未満であり、既に臨床応用されている酵母由来 B 型肝炎ワクチンの製造基準に匹敵していた。また、本低

抗原性中空バイオナノ粒子を Balb/c マウスを用いて 50%以上のマウスが抗体陽転する最少抗原量を測定したところ、抗 S 抗体に関しては ED50 値が 30 分の 1 以下になっていた。さらに、受動免疫用イムノグロブリン製剤を抗 HB 抗体として使用した *in vitro* での本粒子のヒト肝細胞に対する感染能力は、野生型粒子と比べて遥かに高濃度 (1,000mIU/ml) の抗体存在下でも保持していた。これはワクチン接種者の平均的抗体濃度 (100mIU/ml 以下) よりも遥かに高く、本低抗原性中空バイオナノ粒子はワクチン接種者体内においても標的細胞に対してピンポイント投与可能であることが示唆された。

- ・ L 粒子の肝細胞がん治療への応用に関する検討

HBs 抗原結合パクリタクセル封入 MPC ポリマーでは、ヒト肝細胞癌である HepG2 では、対照であるパクリタクセル封入 MPC ポリマーよりも *in vitro* でのほぼ 2 倍の殺細胞効果が認められたが、ヒト扁平上皮癌である A431 ではこのような差異はまったく認められなかった。

一方、HBs 抗原結合 Flt-1 発現プラスミド封入 MPC ポリマーでは、HepG2 の培養液中には ELISA 法により Flt-1 タンパクの発現が認められたが、A431 ではまったく認められなかった。また、それぞれの細胞株をヌードマウス皮下に移植したモデルに、各々のプラスミドを静注して、ラット各種臓器および移植腫瘍組織を採取し、各組織中 Flt-1 濃度を ELISA 法で測定すると HepG2 腫瘍組織中でのみ Flt-1 タンパクが検出され、WiDr やラットの肝臓、脾臓、筋肉、腎臓などには全く検出されなかった。以上の結果から、ヒト肝細胞を特異的に標的とし、肝細胞癌を選択的に死滅させることが可能なナノカプセルが、MPC ポリマーに

HBs 抗原をエステル結合させ、抗癌剤や抗腫瘍性を示すタンパク質発現プラスミドを封入することで、調製可能であると言える。

#### ・ 光イメージングによる可視化

プロモーターの下流にルシフェラーゼを繋いだプラスミドを組み込んだヒトがん細胞を樹立し、ヌードマウスに移植した。このヌードマウスにルシフェリンを注射して、高感度 CCD カメラにより撮影を行うと、移植細胞の局在が鮮明に観察された。これを利用すれば、時間経過ごとの細胞の局在を知ることができるので、転移の様子をモニターしたり、制癌剤の効果を把握したりすることが可能と考えられ、より現実的に即した薬剤のスクリーニング系になると期待できる。

#### 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 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. 研究発表

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、その欠失部位にアルギニン 8 残基 R<sub>8</sub>、ストレプトタグ、ヒト上皮増殖因子(epidermal growth factor; EGF)を挿入した。これにより、総ての細胞への効率的な導入、アビジン-ビオチン相互作用を利用しての多様なタンパク質の粒子への結合による任意の細胞への標的化、EGF 受容体を過剰発現している細胞、特に悪性腫瘍や上皮癌細胞を標的化することが可能となる。R<sub>8</sub>、ストレプトタグ提示粒子については、酵母を用いた従来からの発現系で効率よく生産できることを明らかにした。一方、EGF 提示粒子は昆虫細胞を用いることにより、効率的に生産されることを確認した。また、これらの粒子を用いて肝細胞以外の細胞に提示したペプチドの特性に応じて低分子化合物の導入に成功した。

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)からなる中空バイオナノカプセル(L 粒子)(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

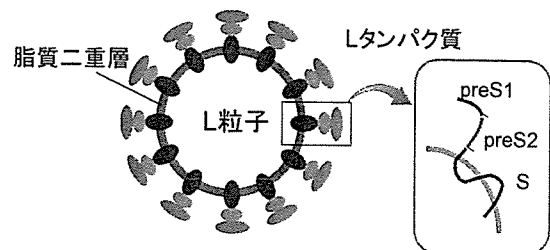


図 1 バイオナノカプセル

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。

一方、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、肝臓以外の臓器へも導入可能な粒子の作製も行ってきた。今回は、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2)。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。また、近年、アルギニンが8残基つながったペプチドR<sub>8</sub>が細胞へのタンパク質や遺伝子の導入に極めて効果的であることが明らかとなっている。そこでR<sub>8</sub>提示粒子の作製も試みた。

改変型粒子の中には、従来の酵母生産系において、その発現自体が困難であったり、また発現に成功しても、その精製過程において粒子が凝集してしまうといった難点を示す場合があった。酵母は粒子を菌体内に蓄積するため、提示した分子のフォールディングや、改変型粒子の粒子形成が正確に行なわれないからではないかと考えられる。そこで、新規発現系として昆虫細胞に着目した。昆虫細胞を用いた場合、粒子は培養上清中に分泌発現される。よって、正確にフォールディングされた粒子を生産できるとともに、その精製工程の簡略化が見込まれる。今回、粒子表面に生体認識分子としてヒト上皮増殖因子(epidermal growth factor; EGF)を提示した(図3)。これにより、EGF受容体を過剰発現している細胞、つまり悪性腫瘍や上皮癌細胞などを標的化可能となる。このEGF提示粒子を昆虫細胞を用いて、効率的分泌生産を検討した。またこの粒子を用いて、上皮癌細胞への特異的薬剤導入を試みた。

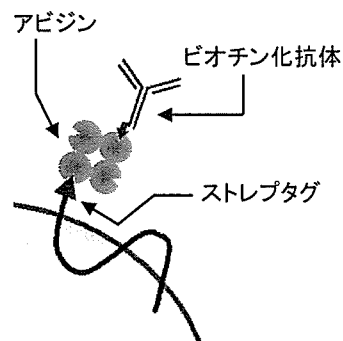


図2 ストレプトタグ提示粒子

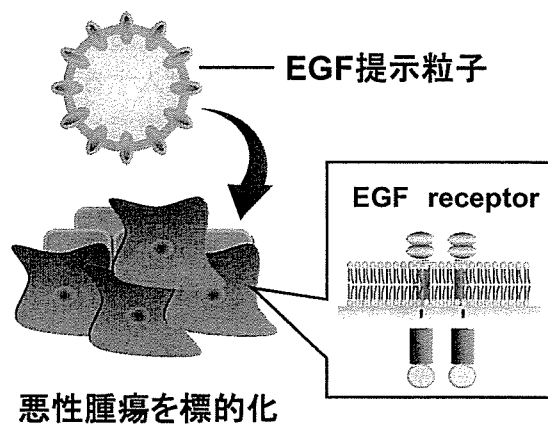


図3 EGF提示粒子

## B. 研究方法

### 1) 膜透過ペプチドR<sub>8</sub>提示粒子の生産

膜透過ペプチドである octaarginine (R<sub>8</sub>) 提示粒子に関して、平成17年度に報告したL粒子と同様のプラスミドで生産を行うとともに、熱処理とクロマトグラフィーを組み合わせた方法により、精製を行なった。

### 2) R<sub>8</sub>提示粒子による導入実験

R<sub>8</sub>提示粒子に Alexa Fluor 488 (Invitrogen) を標識し、ヒト肝癌細胞 HepG2、ヒト子宮頸癌細胞 HeLa およびサル腎臓細胞 COS7 へ添加し、6時間後に蛍光顕微鏡を用いて観察を行なった。

### 3) ストレプトタグ提示粒子の生産及び形態評価

ストレプトタグ提示粒子に関しては、上述の R<sub>8</sub> 提示粒子と同様に発現、精製を行った。

#### 4) EGF 提示粒子発現プラスミドの構築

昆虫細胞での発現系を確立するため、まず、ヒト肝細胞認識部位を削除した欠失変異導入粒子の遺伝子 Δ50-153 を作製した。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。また分泌シグナルとして honeybee 由来 Melittin signal sequence を用いた。次に、これらの欠失部位にリガンドとして EGF を挿入し、EGF 提示粒子発現プラスミドを構築した(図 4)。このプラスミドを遺伝子導入試薬 FuGENE6(Roche)を用いて昆虫細胞 BTI-TN-5B1-4 (High Five)に形質転換した。72 時間培養後、その培養上清を回収し、酵素免疫測定法および Western blotting により解析を行なった。

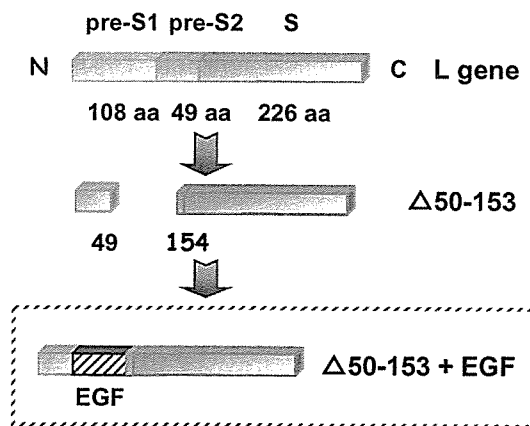


図 4 EGF 提示粒子の遺伝子

#### 5) EGF 提示粒子の精製

先ほどと同様に、発現プラスミドを High Five へ導入し、72 時間後に培養上清を回収した。次に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。精製した粒子は各種形態解析および薬剤導入実験に用いた。

#### 6) EGF 提示粒子の形態評価

精製 EGF 提示粒子の平均粒子径を測定するために、動的光散乱光度計(Malvern)を用いた。

#### 7) EGF 提示粒子による薬剤導入実験

薬剤モデル系として低分子蛍光物質 calcein(Mw:622.53)を用いた。calcein および EGF 提示粒子をリン酸緩衝液中で混合し、エレクトロポレーション法により粒子内部に calcein を封入した。そしてヒト肝癌細胞 NuE およびヒト上皮癌細胞 A431 にそれぞれ添加し、6 時間培養後に蛍光顕微鏡を用いて観察を行なった。

### C. 研究結果

#### 1) 膜透過ペプチド R<sub>8</sub> 提示粒子の生産及び精製

3 種類の欠失変異体に R<sub>8</sub> 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、d50-153 株において高生産株の取得に成功した。

そこで ZZ ドメイン提示粒子と同様に R<sub>8</sub> 提示粒子の精製を行ない、SDS-PAGE 銀染色を行なった。(図 5)。その結果、目的の位置に単一のバンドが確認できたことから、R<sub>8</sub> 提示粒子の精製に成功した。

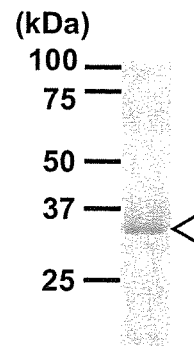


図 5 銀染色

#### 2) R<sub>8</sub> 提示粒子による導入実験

得られた粒子が細胞へ導入されるか確認

するために、Alexa Fluor 488 を標識した R<sub>8</sub> 提示粒子を各種細胞に添加した。その結果 (図 6)、L 粒子では HepG2 にのみ導入されるのに対し、R<sub>8</sub> 提示粒子はヒト肝癌細胞でない、ほかの二つの細胞においても蛍光が観察された。よって、R<sub>8</sub> の働きにより様々な細胞に導入可能であることが示された。以上より、膜透過ペプチド提示粒子を用いることであらゆる細胞へ薬剤や遺伝子を導入できることが示唆された。これは *ex vivo* での遺伝子治療において効力を発揮する可能性がある。

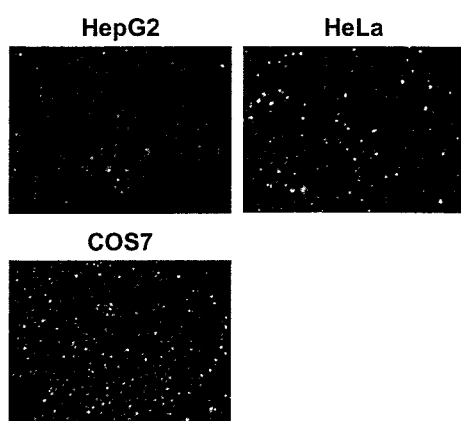


図 6 蛍光標識した R<sub>8</sub> 粒子の導入実験

### 3) ストレプ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、ストレプタグ提示粒子のウエスタンブロット解析を行った (図 7)。その結果、HBsAg に対する抗体を用いた場合にもストレプ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。

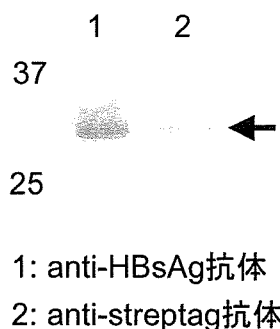


図 7 ウエスタンブロット解析

### 4) ストレプタグ提示粒子の形態評価

動的光散乱光度計 (Fig.14) 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。

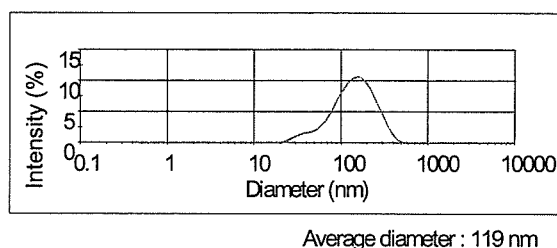


図 7 動的光散乱光度計による解析

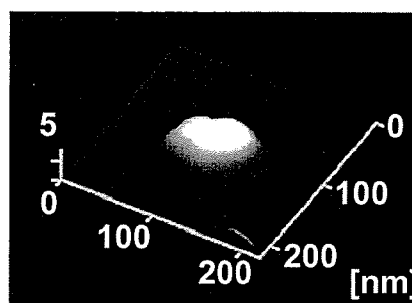


図 8 原子間力顕微鏡像

### 5) 一過性発現による EGF 提示粒子の生産レベルの解析

まず酵素免疫測定法を応用した装置 IMx (Abbott) を用いて、培養上清中に分泌された粒子の生産レベルの確認を行った (図 9)。その結果、EGF 提示粒子は従来の L 粒子と比較して、約 30 % 程の生産レベルを達

成していることが確認された。次に Western blotting により、EGF の発現確認を行なった (図 10)。lane 1 は L 粒子を発現している昆虫細胞の培養上清、lane 2 は EGF 提示粒子発現プラスミドを導入した昆虫細胞の培養上清を示す。一次抗体に anti-HBsAg 抗体を使用した場合 (図 10A)、両者とも目的の分子量の位置にバンドを検出したことから表面抗原タンパク質が分泌発現していることが確認された。anti-EGF 抗体を用いた場合 (図 10B)、lane 2 にのみ目的のバンドを検出し、EGF が発現していることが確認された。以上より、EGF が表面抗原と融合タンパク質として発現し、かつ粒子を形成していることが確認された。

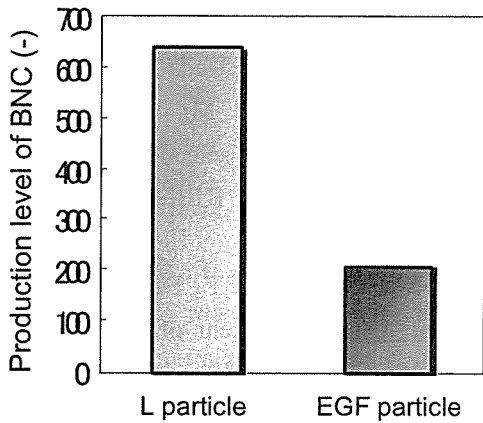


図 9 酵素免疫測定法による解析

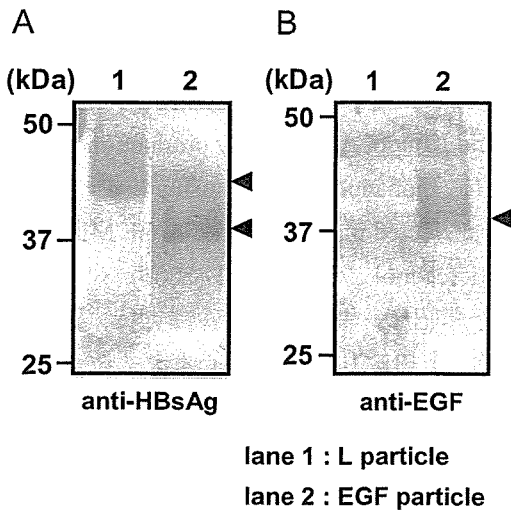


図 10 Western blotting による解析

### 6) EGF 提示粒子の形態評価

動的光散乱光度計を用いて解析した結果 (図 11)、EGF 提示粒子は粒子径約 250 nm であることが示された。

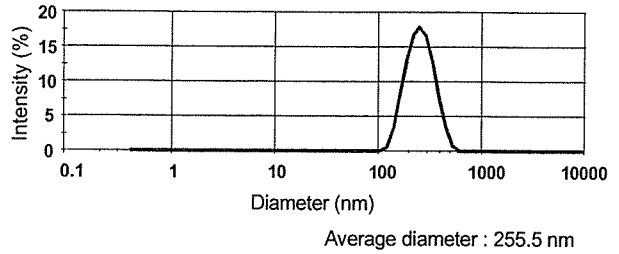


図 11 動的光散乱光度計による解析

### 7) EGF 提示粒子による薬剤導入実験

得られた粒子を用いて標的細胞への導入実験を行った (図 12)。肝細胞特異性を示す L 粒子を用いた場合、ヒト肝癌細胞 NuE で蛍光が確認され、ヒト上皮癌細胞 A431 では蛍光が確認されなかった。一方、EGF 提示粒子を用いた場合、ヒト肝癌細胞 NuE では蛍光が確認されなかったのに対し、ヒト上皮癌細胞 A431 においてのみ蛍光が観察された。よってこの粒子を用いた上皮癌細胞への特異的薬剤導入に成功した。以上のことから、EGF 提示粒子は、肝細胞特異性が消

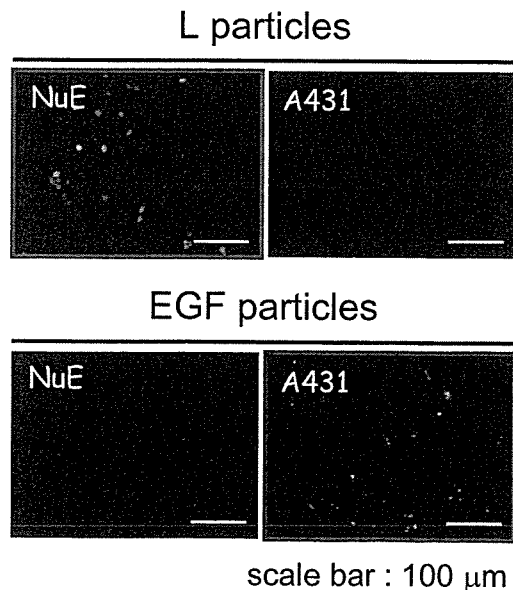


図 12 薬剤導入実験の結果

失し、上皮細胞特異性が付与されていることが示唆された。

#### D. 考察

##### 1) 達成度について

昆虫細胞を用いることにより、EGF 提示粒子の効率的分泌生産に成功した。またその粒子を用いて細胞特異的な低分子化合物導入に成功した。一方、R<sub>8</sub> 提示粒子については、酵母による生産が有効であり、多様な細胞に効率よく導入可能であることが明らかとなった。

以上のように、提示するリガンドに応じて、生産系を選択することで、多様な特異性を持った中空バイオナノ粒子の調製が可能であることが明らかとなった。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

バイオナノカプセル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、バイオナノカプセルを用いて標的細胞に薬剤を導入できたことは、ドラッグデリバリーシステムを発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 EGF 提示粒子や R<sub>8</sub> 提示粒子、ストレプトタグ提示粒子について、*in vivo* での動態を明らかにしていく予定である。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 やストレプトタグ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. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yu D, Fukuda T, Tuoya, Kuroda S, Tanizawa K, Kondo A, Ueda M, Yamada T, Tada H, Seno M., Engineered bio-nanocapsules, the selective vector for drug delivery system., IUBMB Life 58(1) 1-6 (2006)
- 2) Furukawa, H., Tanino, T., Fukuda, H. and Kondo, A., Development of Novel Yeast Cell Surface Display System for Homo-oligomeric Protein by Coexpression of Native and Anchored Subunits., Biotechnology Progress, 22, 994-997 (2006)
- 3) Shishido, T., Muraoka, M., Ueda, M., Seno, M., Tanizawa, K., Kuroda, S., Fukuda, H., and Kondo, A. Secretory production system of bionanocapsules using a stably transfected insect cell line. Appl. Microbiol. Biotechnol., 73, 505-511 (2006)
- 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 DDS の開発とその産業化, Drug Delivery system, 4, 435-443 (2006)
- 5) 近藤昭彦, 大西徳幸, 熱応答性磁性ナノ粒子による高速磁気分離, 臨床検査,

- 1375-1384 (2006)
- 6) Iwasaki Y, Ueda M, Yamada T, Kondo A, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S, Sakamoto M, Kitajima M., Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles., *Cancer Gene Ther.*, 14(1), 74-81 (2007)
- 7) 近藤昭彦, 黒田俊一, 谷澤克行, 妹尾昌治, 上田政和, バイオナノキャリアの開発とがん遺伝子治療への応用, *バイオテクノロジージャーナル*, 41-47 (2007)
- 8) Shishido, T., Muraoka, M., Yamaji, H., Kondo, A., and Fukuda, H., Production of bionanocapsules in immobilized insect cell culture using porous biomass support particles *J. Biosci. Bioeng.*, in press
2. 学会発表
- 1) Shishido, T., Muraoka, Fukda, H., and Kondo, A.: Production of Novel Bio-nanocapsules for Pinpoint Delivery of Gene and Drugs. *NanoBio-Tokyo 2006*
- 2) 宍戸卓矢、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、昆虫細胞を用いた外来タンパク質封入型バイオナノカプセルの効率的生産、第 51 回日本農芸化学会、2007 年 3 月(東京)
- 3) 尹明義、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カプセルの開発、第 51 回日本農芸化学会、2007 年 3 月(東京)
- G. 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

中空バイオナノ粒子のステルス化に関する研究

分担研究者 黒田 俊一 大阪大学産業科学研究所・助教授

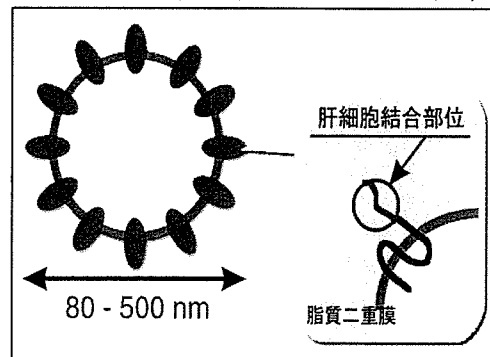
昨年度までにHBVエスケープ変異体の解析から、S抗原内部に2アミノ置換を施した低抗原性中空バイオナノ粒子候補（Q129R /G145R）を構築した。また、酵母を用いた大量発現系と簡易生産法を確立した。今年度は、1Lの培養液から精製度99%の粒子を2日・2ステップの精製工程で得ることに成功した。本粒子に含まれる酵母由来染色体DNAの含量は0.001%未満で、酵母由来タンパク質の含量は0.1%未満であり、既に臨床応用されている酵母由来B型肝炎ワクチンの製造基準に匹敵していた。また、本低抗原性中空バイオナノ粒子をBalb/cマウスを用いて50%以上のマウスが抗体陽転する最少抗原量を測定したところ、抗S抗体に関してはED50値が30分の1以下になっていた。さらに、受動免疫用イムノグロブリン製剤を抗HB抗体として使用した*in vitro*での本粒子のヒト肝細胞に対する感染能力は、野生型粒子と比べて遥かに高濃度（1,000mIU/ml）の抗体存在下でも保持していた。これはワクチン接種者の平均的抗体濃度（100mIU/ml以下）よりも遥かに高く、本低抗原性中空バイオナノ粒子はワクチン接種者体内においても標的細胞に対してピンポイント投与可能であることが示唆された。現在は、*in vivo*レベルでの中和抗体存在下での感染能の検討と、抗Pre-S抗体に対する対策並びに細胞性免疫に対する対策を行っている。

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（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本低抗原性中空バイオナノ粒子（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 年度では、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、酵母よりの大量精製法、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。平成 18 年度では、今まで開発してきた方法により生産した低抗原性中空バイオナノ粒子が、酵母由来染色体 DNA 含量及び酵母由来タンパク質含量において、既に臨床応用されている B 型肝炎ワクチンと同等の精製度であるか検討した。さらに、低抗原性中空バイオナノ粒子（Q129R/G145R 変異体）の、マウスにおける抗体陽転最少抗原量の変化を検討し、通常の B 型肝炎ワクチン接種者における血液中抗体量において、肝細胞に対する十分な感染力を保持しているか検討した。

## B. 研究方法

中空バイオナノ粒子を発現する酵母細胞は、*Saccharomyces cerevisiae* AH22R-株で

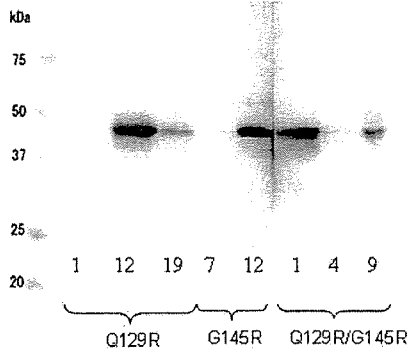
プラスミド pGLDLIIP39-RcT（黒田ら、*J. Biol. Chem.*, 1992）を保持するものを用いた。この発現株は、中空バイオナノ粒子の工業生産に用いているものと同じである。低抗原性中空バイオナノ粒子（Q129R /G145R 変異体）の発現ベクターは平成 16 年度研究報告に記載したものを使用した。発現株の培養、粒子の精製、および粒子の長期保存のプロトコル、また、粒子内部への物質封入のプロトコルは、平成 17 年度の研究報告に記載したとおりである。

## C. 研究結果

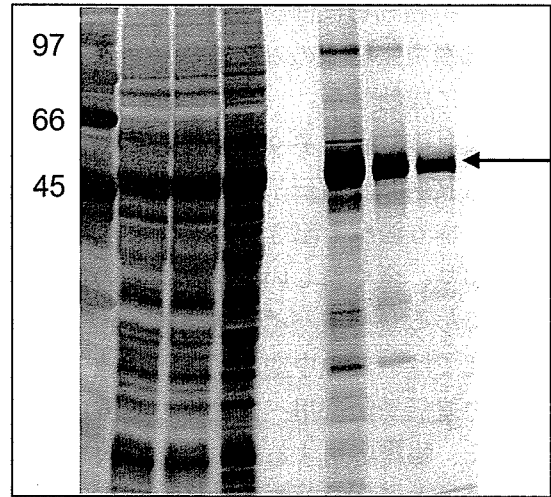
### 1. 低抗原性中空バイオナノ粒子（Q129R /G145R 変異体）の高発現株の選抜

低抗原性中空バイオナノ粒子遺伝子（3 種類）をプラスミド pGLDLIIP39-RcT の中空バイオナノ粒子遺伝子（野生型）部分と交換し、*Saccharomyces cerevisiae* AH22R-株に導入して、それぞれ 30～50 株の形質転換体を単離し、従来方法に従ってミニスケールで培養し、1 週間後に菌体を回収し、菌体抽出液を得た。B 型肝炎ウイルス表面抗原粒子（HBsAg 粒子）検出用 ELISA（IMx）を用いて、中空バイオナノ粒子発現量の高い株を 3～5 株選出した。次に、抗 S 抗体を使用する Western Blotting を行い、最も中空バイオナノ粒子発現量が高い酵母株を選んだ。この際、理由は不明であるが、抗生物質オーレオバシジンに対する耐性遺伝子を同時に導入すると著しく中空バイオナノ粒子の発現が促進することを見出した。最終的に選抜した Q129R /G145R 変異体発現株は、工業生産に使用している野生型粒子発現株と同等の発現量であった（次頁図 Q129R/G145R の 1 番）。

## 【高発現株のwestern blot】



2. 低抗原性中空バイオナノ粒子 (Q129R/G145R 変異体) の精製  
 上記の手法により選抜した Q129R/G145R 変異体高発現株 (株番号 1) を、HighPiII 培地 10mL を用いて、3 昼夜 30°C で振とう培養を行った後、HighPiII 培地 100mL で 1 昼夜 30°C で更に振とう培養を行い、最後に、8S5N-P400 培地 1L に移して、2 昼夜 30°C で振とう培養を行った。その後、8M 尿素を含む抽出液に懸濁して、ガラスビーズで破碎を行い、上清液を回収し、70°C、20 分間熱処理を行い、更に上清液を回収した。この結果、酵母由来プロテアーゼを含む酵母由来不要タンパク質が失活・沈殿し、耐熱性の高い粒子が優先的に上清液に残った。さらに、硫酸セルロファインを担体とするアフィニティカラムクロマトグラフィーに負荷し、カラム結合画分を濃縮して、Sephacryl S-400 を担体とするゲルろ過カラムクロマトグラフィーに負荷して、中空バイオナノ粒子画分を回収した。本サンプルを SDS-PAGE を用いて展開し、銀染色を行ったところ、少なくとも 95% 以上の純度を有することが判明した (右上図 矢印)。



本方法によれば、培養菌体 (1 L 約 20 g 湿重量) から 2 日間で 2 ステップのカラム操作により高純度な中空バイオナノ粒子を約 10 mg 得られることが判明した。

## 3. 精製低抗原性中空バイオナノ粒子 (Q129R/G145R 変異体) の宿主酵母由来タンパク質含量の測定

中空バイオナノ粒子遺伝子を保持しない発現プラスミド (pGLD906-1) を *Saccharomyces cerevisiae* AH22R-株に形質転換し、上記精製プロトコルに従って、中空バイオナノ粒子が存在するべき画分のモック精製を行った。硫酸セルロファインを担体とするアフィニティカラムクロマトグラフィーを終えたところで、濃縮を行い、タンパク質量 300 μg 分を、フロイント完全アジュバントを用いて、日本白色種ウサギ (約 3 kg) の背部皮下に 2 週間おきに接種し、初回接種後 7 週目に定法に従い粗血清を単離した。本血清を使用して、酵母由来タンパク質を 1 ml あたり 10 pg の感度で検出する ELISA を構築した。本 ELISA により、今回精製した低抗原性中空バイオナノ粒子 (Q129R/G145R 変異体) に含まれる宿主酵母由来タンパク質 (yP, yeast-derived protein) の混入量は、0.1% 未満であることが判明した。これは、現在臨床応用されている組換え酵母由来 B 型肝炎ワクチンに含まれてい

る宿主酵母由来タンパク質と同等以下であった。

#### 4. 精製低抗原性中空バイオナノ粒子 (Q129R /G145R 変異体) の宿主酵母由来 DNA 含量の測定

中空バイオナノ粒子遺伝子及び酵母由来リボソーム遺伝子から Real-Time PCR 用プライマーをそれぞれ設計した。次に、精製低抗原性中空バイオナノ粒子 (Q129R /G145R 変異体) を 1 mg から、フェノール・クロロフォルムを用いて核酸画分を抽出し、グリコーゲンをキャリアーとするエタノール沈殿を行って、核酸画分を濃縮した。次に、上記プライマーセットの何れかを加えて、SYBR グリーン法により、Stratagene 社製 Real-Time PCR を用いて定量的 PCR を行った。その結果、中空バイオナノ粒子 1 mg 中には、プラスミド DNA 及びリボソーム遺伝子が、それぞれ 10 pg より多く含まれていないことが判明した。これは、現在臨床応用されている組換え酵母由来 B 型肝炎ワクチンに含まれている宿主酵母由来 DNA と同等以下であった。

#### 5. 精製低抗原性中空バイオナノ粒子 (Q129R /G145R 変異体) の抗体産生能力

同じ精製度の野生型中空バイオナノ粒子及び低抗原性中空バイオナノ粒子を用意し、PBS に懸濁し、タンパク質量で 4、2、1、0.5、0.25、0.125  $\mu$ g を Balb/c マウス (7 週齢メス、1 群 5 匹) の腹腔内に投与した。1 カ月飼育した後、粗血清を単離し、臨床検査に用いる市販 HBs 抗体測定用 ELISA (anti-HBs イムニス EIA キット) で含有 HBs 抗体を測定した。その結果、野生型中空バイオナノ粒子を接種されたマウスにおいて、50% のマウスが抗体産生 (陽転) する最小薬量は 3.36  $\mu$ g であることが判明した。次に、低抗原性中空バイオナノ粒子の場合は、いずれのマウスも抗体を産生しなかったの

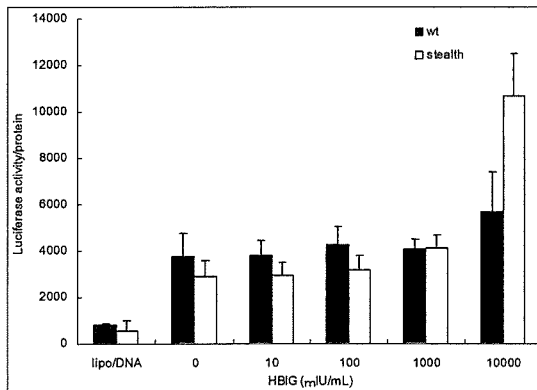
で、計算不能 (0.125  $\mu$ g 未満) であった。以上から、低抗原性中空バイオナノ粒子のマウスにおける抗体産生能力は、野生型中空バイオナノ粒子の約 30 分の 1 であり、所期の目的を達成しているものと考えられた (下表)。

粒子	投与量 ( $\mu$ g)	陽転率	陽性の平均値	ED <sub>50</sub>
WT	4	2/5	0.33	3.36
	2	3/5	0.41	
	1	0/5	—	
	0.5	0/5	—	
	0.25	0/5	—	
	0.125	0/5	—	
ステルス	4	0/5	—	/
	2	1/5	0.18	
	1	0/5	—	
	0.5	0/5	—	
	0.25	0/5	—	
	0.125	0/5	—	

#### 6. 精製低抗原性中空バイオナノ粒子 (Q129R /G145R 変異体) の中和抗体存在下での挙動

欧米では成人の多くが B 型肝炎ワクチンを接種しているため、血中に抗 HBs 抗体が存在する。このような患者に中空バイオナノ粒子を臨床応用する場合には、折角投与した中空バイオナノ粒子が、抗体により中和・排除される可能性が指摘されていた。そこで、今回得られた精製低抗原性中空バイオナノ粒子 (Q129R /G145R 変異体) が、ヒト由来抗 HBs 抗体により、どれだけ認識されなくなったかを *in vitro* の感染系で検討した。具体的には、野生型中空バイオナノ粒子 (6  $\mu$ g) または低抗原性中空バイオナノ粒子 (Q129R /G145R 変異体) (6  $\mu$ g) 内部に、平成 17 年度研究報告記載のリボソーム法によりルシフェラーゼ発現プラスミド (6  $\mu$ g) を封入し、受動免疫用 HBIg (商品名ヘブスブリン) を 10 から 10,000 mIU/ml の抗 HBs 抗体濃度に希釈し混合し、37°C、30 分間静置した後、ヒト肝ガン由来細胞 HepG2 の培養液に添加した。5% 二酸化炭素存在下で 37°C、3 時間静置し、培地交換を行って、さらに 48 時間培養した。定法により細胞内に発現したルシフェラーゼの活性

を測定し、中空バイオナノ粒子によるルシフェラーゼ遺伝子の送達を評価した(下図)。



その結果、通常B型肝炎ワクチン接種者の抗体価は10~100 mIU/mlであるが、1,000 mIU/mlの抗HBs抗体存在下でも、野生型及び低抗原性中空バイオナノ粒子共に遺伝子送達を阻害されないことが判明した。なお、10,000 mIU/mlの抗体存在下において、著しく遺伝子導入効率が上昇しているが、これは動的レーザー散乱法による解析から、大量の抗体で著しくサンプルの直径が増大し(100 nm付近から1,000 nm付近へ)、細胞の非特異的なエンドサイトーシスが亢進したためと考えられた。

#### D. 考察

今年度は、平成16年度に開発した低抗原性中空バイオナノ粒子を医薬品として開発するのに必要な技術を開発した。具体的には、高発現株の選抜を行い、平成17年度に開発した方法(熱処理と2種類のカラムクロマトグラフィーの組合せ)により大量に低抗原性中空バイオナノ粒子を得た。また、遺伝子組換え医薬品特有の懸念案件である宿主酵母由来タンパク質及びDNAの高感度な定量法を確立し、実際に臨床応用されている組換え酵母由来B型肝炎ワクチンと同等以上の純度を確保している事を確認した。また、低抗原性中空バイオナノ粒子の

抗体産生能を、B型肝炎ワクチンを開発する際のプロトコルにより評価し、抗体産生能を約30分の1に減少させたことを確認した。以上の結果は、本低抗原性中空バイオナノ粒子が、野生型中空バイオナノ粒子よりも、はるかに長期連続投与に適していることを示している。さらに、B型肝炎ウイルス感染患者に生じる抗体を実施に用いて、低抗原性中空バイオナノ粒子はもちろんのこと、何と野生型中空バイオナノ粒子でもB型肝炎ウイルス関連抗体を有する患者において十分に使用可能であることが判明した。今後は、*in vitro*レベルでの中和抗体存在下での感染能の検討と、抗Pre-S抗体に対する対策並びに細胞性免疫に対する対策が必要である。

#### E. 結論

今年度の成果により、低抗原性中空バイオナノ粒子は医薬品に匹敵する純度で大量に得ることができるようになった。また、低抗原性中空バイオナノ粒子は、高濃度の抗HBs抗体が存在するB型肝炎ウイルス感染者もしくはワクチン接種者においてもヒト肝臓特異的遺伝子導入法として利用可能なことが判明した。以上により、中空バイオナノ粒子の低抗原性化(ステルス化)は成功したと考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Secretory production system of bionanocapsules using a stably transfected insect cell line. Shishido, T., Muraoka, M., Ueda, M., Seno, M., Tanizawa, K., Kuroda, S., Fukuda, H., and Kondo, A. Appl. Microbial. Biotechnol. 73 (2006) 505-511.
- 2) Engineered Bio-nanocapsules, the Selective Vector for Drug Delivery System