

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～平成18年度 総合研究報告書

主任研究者 近藤 昭彦

平成19(2007)年3月

目 次

I. 総合研究報告

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)

- (1) 中空バイオナノ粒子大量生産方法の確立
- (2) 中空バイオナノ粒子の安定性の向上
- (3) 中空バイオナノ粒子への効率的な薬剤、遺伝子等の封入の効率化
- (4) 任意の臓器・細胞に特異性を持つ粒子の開発
- (5) 低抗原性の中空バイオナノ粒子の創製
- (6) タンパク質封入中空バイオナノ粒子の創製
- (7) 肝細胞がん治療法の検討
- (8) 脳内デリバリー可能な中空バイオナノ粒子の創製
—膜透過ペプチド (PTD) を用いた L 粒子の修飾—
- (9) ピンポイント DDS 用バイオナノキャリアの機能評価のための
蛍光半導体ナノ粒子の開発にむけて

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 43

III. 研究成果の刊行物・別刷 44

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

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ジ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）

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)の外殻タンパク質(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。

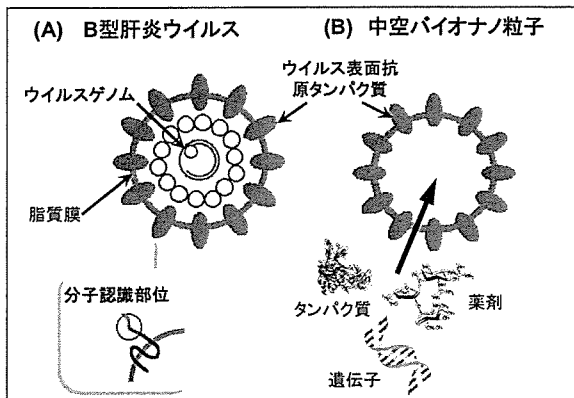


図1 バイオナノ粒子の概念

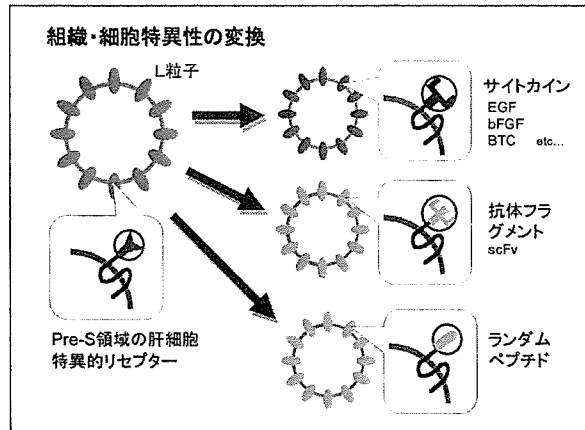


図2 バイオナノ粒子の組織・特異性変換

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、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. 研究内容

本研究には具体的には、以下の検討項目について検討を行ったが、各項目に関する研究方法・研究結果・考察などの詳細は次ページ以降に項目別に記述する。

- (1) 中空バイオナノ粒子大量生産法の開発
- (2) 中空バイオナノ粒子の安定性の向上
- (3) 中空バイオナノ粒子への効率的な薬剤、遺伝子導入法の開発
- (4) 任意の細胞・組織に特異性を示す中空バイオナノ粒子の創製
- (5) 低免疫原性の中空バイオナノ粒子の創製
- (6) タンパク質封入バイオナノ粒子の創製
- (7) 肝細胞がん治療法の検討
-可溶性 VEGF 受容体遺伝子封入、FGF 挿入 RNase 遺伝子封入中空バイオナノ粒子の抗腫瘍性効果の検討-
- (8) 脳内デリバリー可能な中空バイオナノ粒子の創製-膜透過ペプチド (PTD) を用いた L 粒子の修飾-
- (9) ピンポイント DDS 用バイオナノキャリアの機能評価のための蛍光半導体ナノ粒子の開発にむけて

C. 評価

1) 達成度について

本研究では、ほぼ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た。また、細胞肝がん治療等への応用についても、基礎的な知見が集積したと言える。

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、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。本研究では、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

本研究で得られた研究成果を基に、バイオナノ粒子を用いた多様ながん遺伝子治療に関して、より本格的な検討を進めることができると考えられる。

D. 結論

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、低免疫原性化などに関して、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、肝細胞がん等についても、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有望な成果が得られた。

(1) 中空バイオナノ粒子大量生産法の確立

A. 研究目的

タンパク質の性質として中空粒子を形成するものは一般的な概念ではない。本研究で用いる B 型肝炎ウイルスの表面抗原が形成するナノサイズの粒子はその特徴を備える数少ないタンパク質の一つである。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、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行った。

B. 研究方法および結果

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 °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 (図 1) 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)。

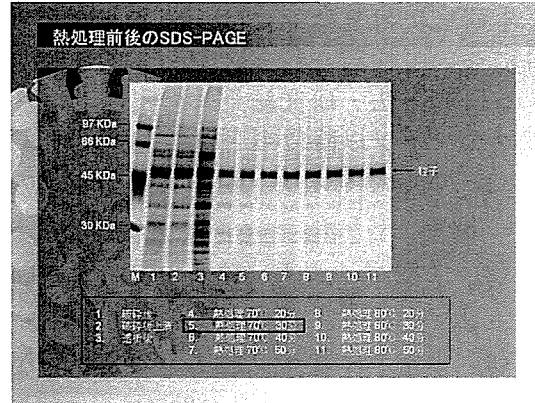


図 1 熱処理による精製

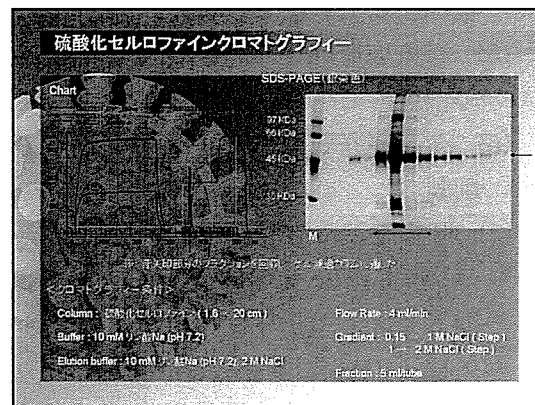


図 2 硫酸化セルロファインによる精製

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。

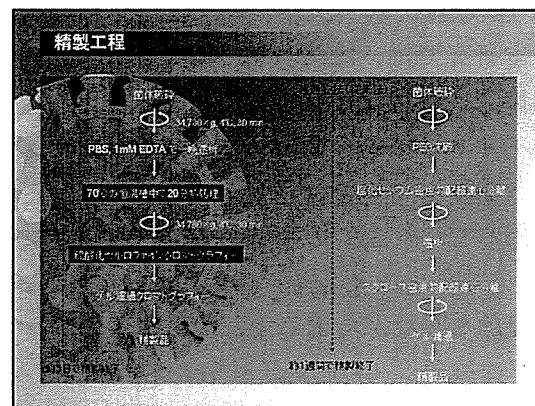


図 3 最終的な精製工程

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℃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）。

C. 考察

ウイルスのL遺伝子を酵母細胞で発現させると、Lタンパク質が細胞内に顕著に蓄積する。従来法では、この酵母細胞を破碎して、超遠心分離を繰り返すことで、Lタンパク質を得ていた。本研究では、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に成功したといえる。この手法により、精製は非常に簡略化され、また、粒子の収率は大幅にアップした。

さらに得られたLタンパク質を、原子間力顕微鏡で観察すると、と平均直径100-200 nmの粒子像が確認できる。溶液中での粒子径をレーザー散乱などで測定すると50-500 nmである。興味深いことに、この粒子構造は熱処理に対して比較的安定であり、B型肝炎ウイルスが熱処理に対して耐性であることと相関しているように見える。この粒子はLタンパク質1種類で構成され、

脂質成分や糖質は20%以下である。精製粒子に含まれる酵母由来の不純物等の分析に関しては、低免疫原性の中空バイオナノ粒子の創製の項で述べるが、極めて微量であった。

従って、当初に問題となったことは全てクリアすることに成功したと言える。

(2) 中空バイオナノ粒子の安定性の向上

A. 研究目的

L粒子は、優れたバイオナノキャリアであるが、ジチオスレイトールのような還元剤に対しても不安定であることから必須のジスルフィド結合が存在すると考えられた。さらに、この粒子を構成するLタンパク質は保存中にジスルフィド結合の架橋によりポリマー形成を起こし、同時に感染効率を低下させることが経験的にわかってきた。そこで、システイン残基の置換によるL粒子の安定化を試みた。

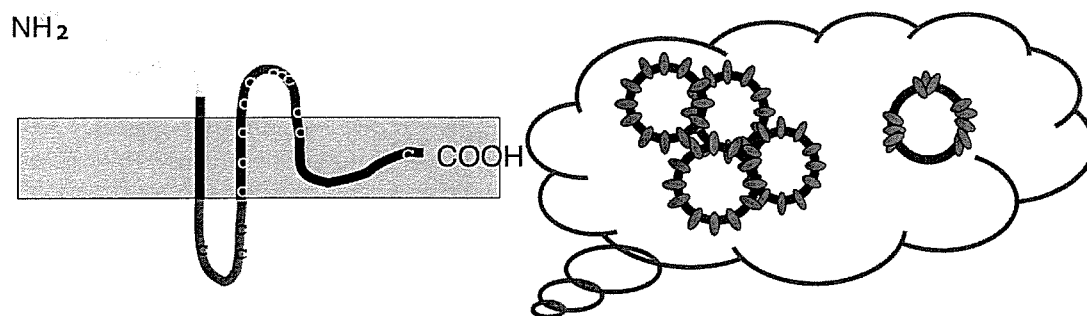
B. 研究方法

1) システイン残基置換によるバイオナノキャリアの安定化

バイオナノキャリアを構成するLタンパ

ク質の1次構造は、まずアミノ末端にニワトリリゾチーム由来の分泌シグナルを付加して、酵母細胞中での分泌発現を可能としている。そのシグナルにLタンパク質のPreS1,PreS2領域とS領域が続く(図1)。システイン残基は分泌シグナルを除きS領域にのみ合計14残基存在する。

これらのうち、疎水性領域に存在するものはアラニン残基、親水性領域に存在するものはセリン残基に置換して、そのミュータントをサル腎臓由来COS7細胞において一過発現させ、その培養上清に分泌されるバイオナノキャリアアナログの性状をウェスタンブロットティングおよび抗原性により解析した。さらに、複数の置換の組み合わせの可能性を調べ、ランダムなジスルフィド結合が起こらないようシステイン残基を最小限の数になるようなバイオナノキャ



<i>mrsllilvlc flplaalgkv</i>	<i>ROGMGTNLSV</i>	<i>PNPLGFFFDH</i>	<i>QLDPAFGANS</i>	<i>NNPDWDFNPN</i>	60
secretion signal		PreS1			
<i>KDOWPEANOV</i>	<i>GAGAFGPCFT</i>	<i>PPHGGLLGS</i>	<i>POAGILTTV</i>	<i>PAAPFPASTN</i>	120
<i>SPPLRDSHPQ</i>	<i>AMOWNSTTFH</i>	<i>QALLDPRVRG</i>	<i>LYFPAGGSSS</i>	<i>GTVNPVPTTA</i>	180
		PreS2			
<i>MENTTSGFLG</i>	<i>PLLVLQAGFF</i>	<i>LLTRILTIPO</i>	<i>SLDSWWTSLN</i>	<i>FLGGAPTCPG</i>	240
<i>SPTSCPPICP</i>	<i>GYRWMCLRRF</i>	<i>IIFLFILLLC</i>	<i>LIFLLVLLDY</i>	<i>QGMLPVCPLL</i>	300
<i>CKTCTIPAQG</i>	<i>TSMFSPCCCT</i>	<i>KPSDGNCTCI</i>	<i>PIPSSWAFAR</i>	<i>FLWEWASVRF</i>	360
<i>QWFVGLSPTV</i>	<i>WLSVIWMWY</i>	<i>WGPSLYNLS</i>	<i>PFLPLLPIFF</i>	<i>CLWVVI</i>	406

図1 Lタンパク質の模式図とランダムなジスルフィド結合の架橋による粒子構造変性のモデル。Lタンパク質の1次構造中にはシステイン残基(*印)が15個存在するがジスルフィド結合に必要な残基は特定されていない。PreS2領域のC末端側はS領域で、この部分は2つの膜貫通ドメインとC末端側の疎水性領域(黒字部分)が管腔2重層に埋められていると考えられている。

リアを作製した。また、このミュータント粒子と野生型粒子を用いて、トリプシンに対する感受性や、緑色蛍光タンパク質遺伝子や蛍光物質カルセインの肝臓細胞への送達能力を比較して、安定性を評価した。

C. 研究結果

1) システイン残基置換によるバイオナノキャリアの安定化

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 (図2)。さらに、

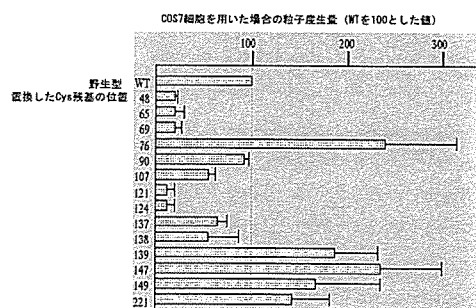


図2 Lタンパク質中のシステイン残基置換を行ったミュータントを Cos7 細胞で発現させ、培地中に分泌される抗原量の測定結果。アミノ酸の番号はS領域での位置を表す。

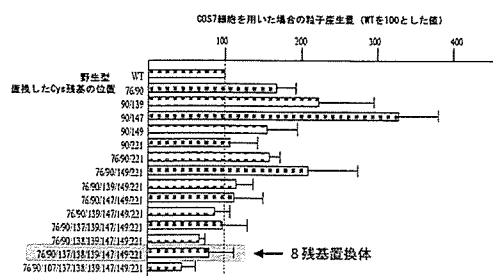


図3 Lタンパク質中のシステイン残基置換を複数組み合わせたミュータントを Cos7 細胞で発現させ、培地中に分泌される抗原量の測定結果。

これらの置換を組み合わせても、8個のシステインは置換可能であった (図3)。そこ

で、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4)。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。

遺伝子の代わりに蛍光物質カルセイン (分子量660) をエレクトロポレーションにより封入して、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

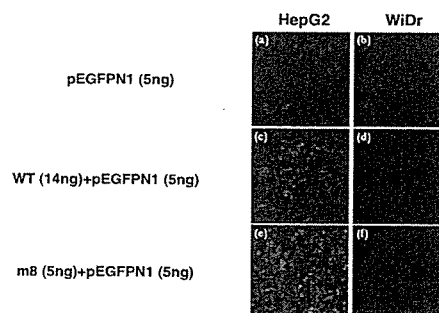


図4 GFP 遺伝子発現ベクター-pEGFPN1 を封入したバイオナノキャリアを用いた細胞への遺伝子の導入実験。

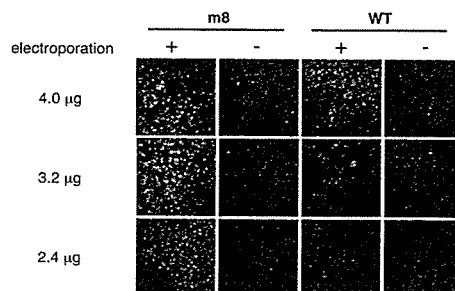


図5 バイオナノキャリアの野生型と m8 にカルセインを封入して、HepG2 細胞へ導入した時の共焦点蛍光顕微鏡による観察像。

した (図5)。この場合も遺伝子の場合と同様に m8 を用いる場合では野生型を用いた

場合に比べて効率よくカルセインを細胞へ導入することが可能であった。

バイオナノキャリアの安定性をトリプシン消化により評価した。その結果、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。

D. 考察

本研究ではバイオナノキャリアの安定性をシステイン残基置換により、ランダムなジスルフィド結合の形成を阻止することにより向上させることができた。

(3) 中空バイオナノ粒子への効率的な薬剤、遺伝子等の封入の効率化

A. 研究目的

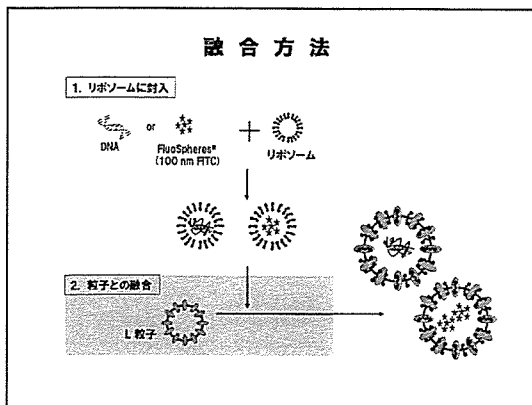
Nature Biotechnology に本方法を報告した時のL粒子内部への物質導入法はエレクトロポレーション法であった(山田ら、Nature Biotechnology, 2003)。この方法は、簡便ではあるが、①L粒子のロットによるバラツキが大きく、②一度に少量しか処理できず、③L粒子同士の融合を惹き起こす様でL粒子の直径が最大で1000 nm 程度になり、*in vivo*での使用に問題があった。

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ので、このリポソームとの融合を利用したより効率的なL粒子への封入法の開発を行った。

B. 研究方法

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

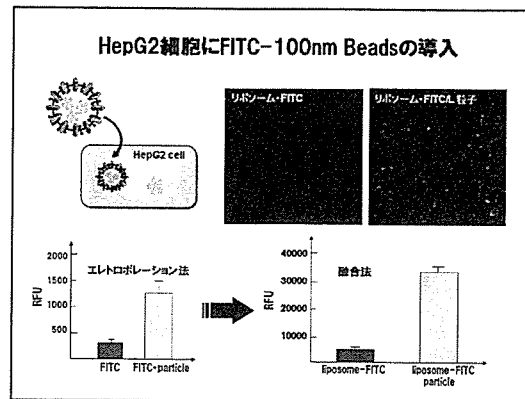
(GFP発現遺伝子)、蛍光物質(直径100nmの蛍光ポリスチレンビーズ)及び抗癌剤(アドリアマイシン)を封入した。続いて、このリポソームをL粒子と混合することで、リポソームとL粒子を自発的に融合させ、



リポソーム内部の物質をL粒子に封入した上図)。

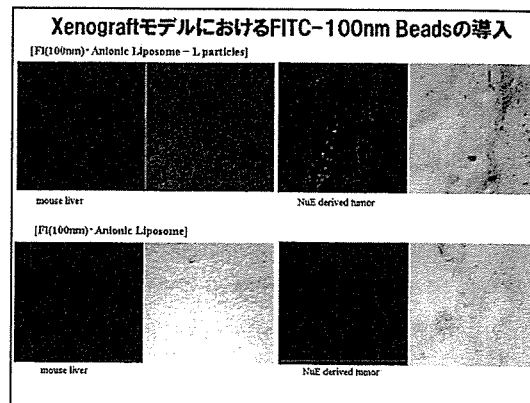
C. 研究結果および考察

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(下図)。



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(下図)。



(4) 任意の臓器・細胞に特異性を持つ粒子の創製

A. 研究目的

肝臓以外の臓器へも導入可能中空バイオナノ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、中空バイオナノ粒子の pre-S (pre-S1+preS2) 領域にある肝臓特異的な部位 (図 1) 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。

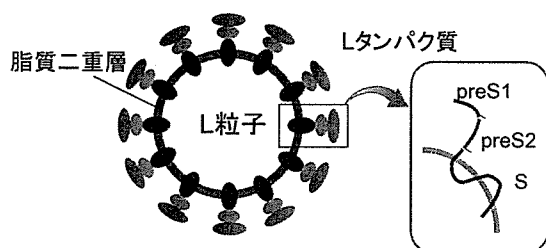


図 1 バイオナノカプセル

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 Protein A 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、各種細胞への薬剤・遺伝子導入を試みた。さらに、新規の粒子として、ストレプ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、新規生産系として昆虫細胞を用いて、EGF 提示粒子 (図 4) の生産も検討した。ある種の改変型粒子は、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。そのため、昆虫細胞を用いて粒子を分泌発現させることで、正確にフォールディングされ

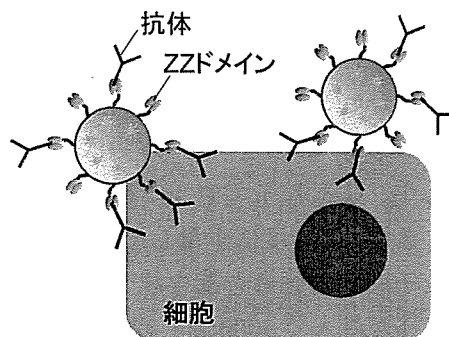


図 2 ZZ ドメイン提示粒子

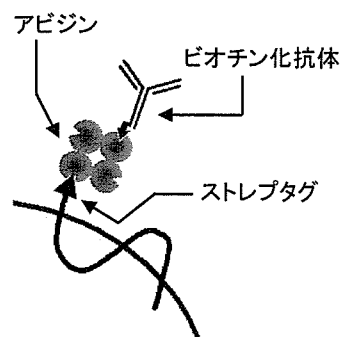


図 3 ストレプタグ提示粒子

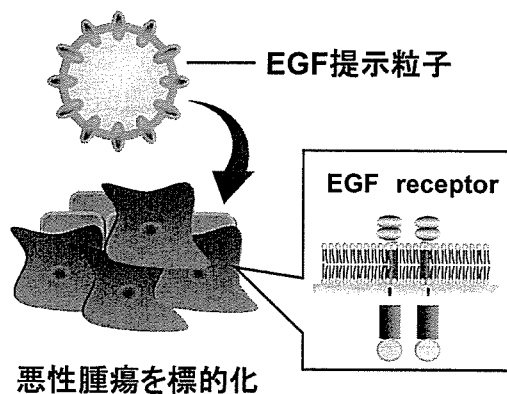


図 4 EGF 提示粒子

た粒子を生産できるとともに、その精製工程の簡略化が期待できる。

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5)。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。

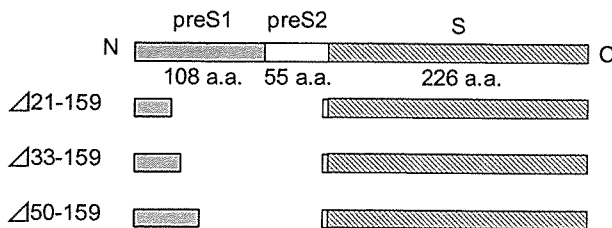


図5 欠失変異体

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。精製した粒子はウェスタンブロット解析や以下の各種実験に用いた。

3) ZZドメイン提示粒子の形態評価

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 calcein 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。

6) 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。

7) 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、先ほ

どの ZZ ドメイン提示粒子 1)~3)と同様の実験を行ない、評価を行なった。

8) EGF 提示粒子の生産及び精製

まず、欠失変異導入粒子の遺伝子 Δ 50-153 の N 末端側に分泌シグナルとして honeybee 由来 Melittin signal sequence を遺伝子工学的に融合させた。次に、これらの欠失部位に EGF を挿入し、EGF 提示粒子発現プラスミドを構築した。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。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ウエスタンブロットによる解析を行なった。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。

9) 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。

10) EGF 提示粒子による薬剤導入実験

EGF 提示粒子に低分子薬剤のモデル化合物として calcein をエレクトロポレーション法により封入した。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。

11) 膜透過ペプチド R₈ 提示粒子の生産

膜透過ペプチドである octaarginine (R₈)提示粒子に関して、先ほどの ZZ ドメイン提示粒子 1)~2)と同様の実験を行ない、粒子の生産及び精製を行なった。

12) R₈ 提示粒子による導入実験

R₈ 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。

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(図 6)。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(図 7)。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。

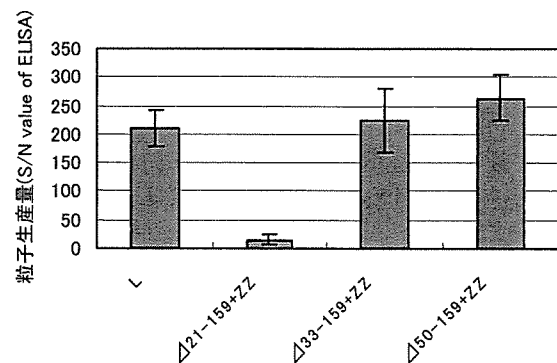


図 6 粒子生産量の比較

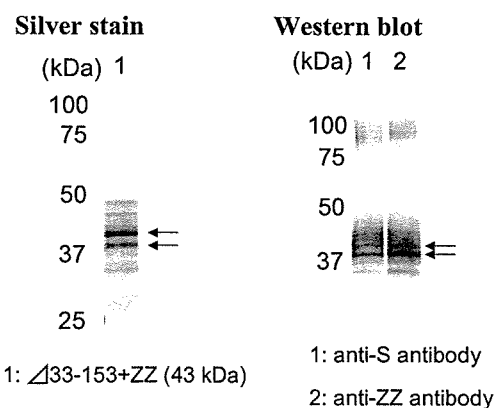


図 7 銀染色並びにウエスタンブロット

2) 粒子の形態評価

動的光散乱光度計(図 8)並びに、原子間力顕微鏡(図 9)の結果より、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。

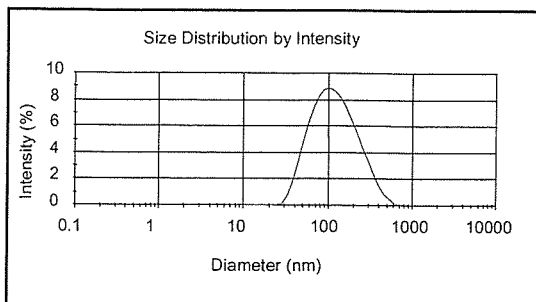


図 8 動的光散乱光度計による解析

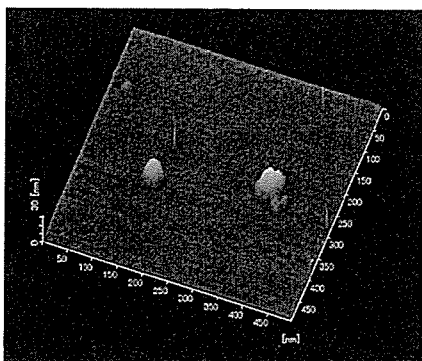


図 9 原子間力顕微鏡像

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(図 10)。

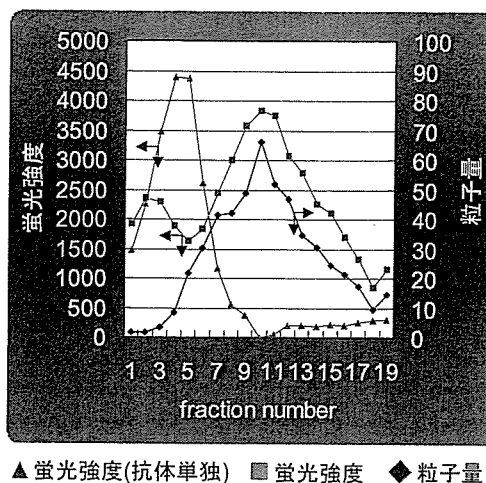


図 10 ZZ ドメイン提示粒子・抗体の結合

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(図 11)、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 NGFR 抗体を提示した粒子を用いた場合には、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たカルセイン導入に成功したと言える。これにより、任意の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。

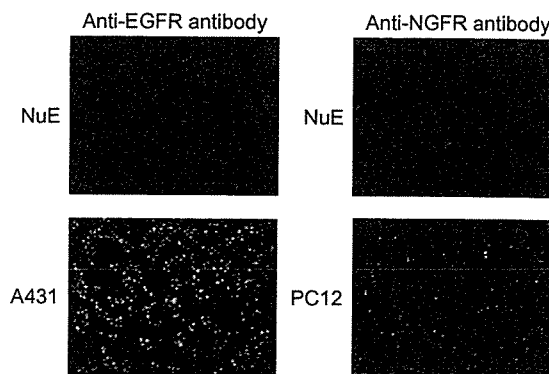


図 11 カルセイン導入実験の結果

5) 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 12)、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。

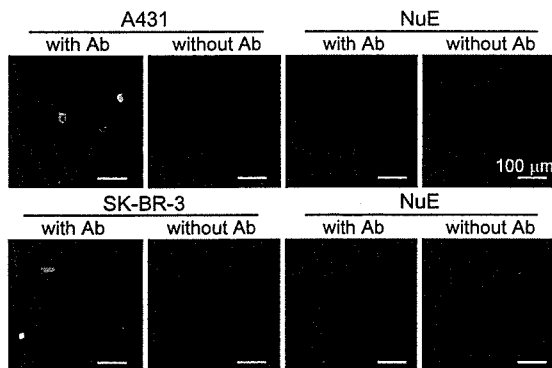


図 12 遺伝子導入実験の結果

6) 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 13)。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。

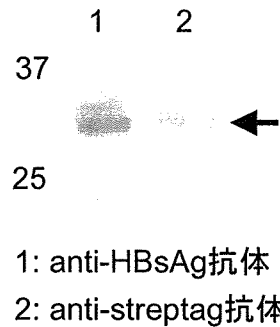


図 13 ウエスタンブロット解析

7) ストレプタグ提示粒子の形態評価

動的光散乱光度計(図 14)並びに、原子間力顕微鏡(図 15)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。

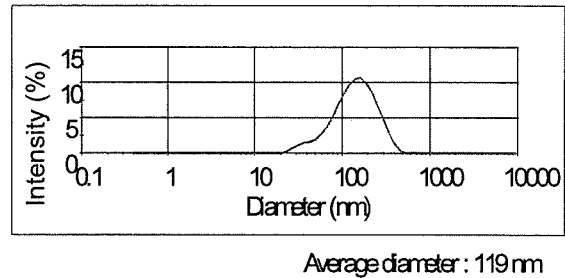


図 14 動的光散乱光度計による解析

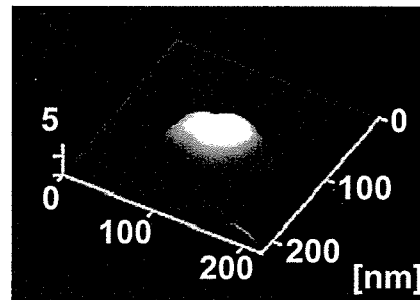


図 15 原子間力顕微鏡像

8) 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16)。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。次にウェスタンブロットにより、EGFの発現確認を行った(図17)。一次抗体にanti-HBsAg抗体を使用した場合(図17A)、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17B)、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 提示粒子が分泌発現していることが確認された。

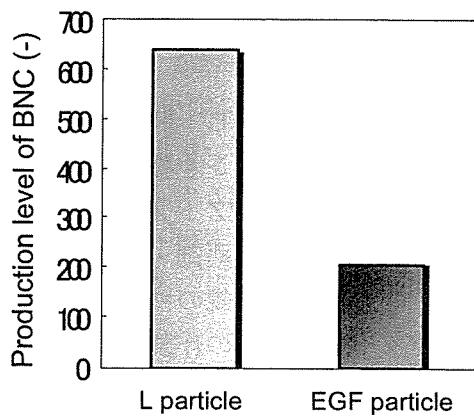


図16 酵素免疫測定法による解析

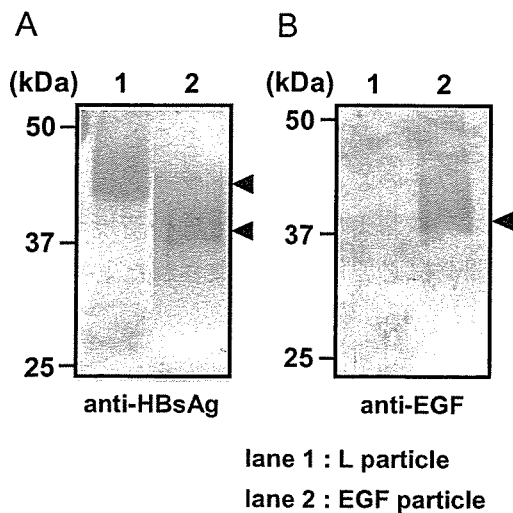


図17 ウェスタンブロット解析

9) 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18)、EGF 提示粒子は粒子径約250 nmであることが示された。

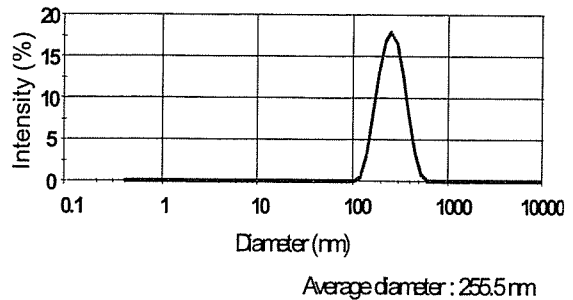


図18 動的光散乱光度計による解析

10) EGF 提示粒子による薬剤導入実験

昆虫細胞で生産した粒子を用いて導入実験を行なった結果(図19)、L粒子を用いた場合、NuEで蛍光が確認され、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、NuEでは蛍光が確認されなかったのに対し、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

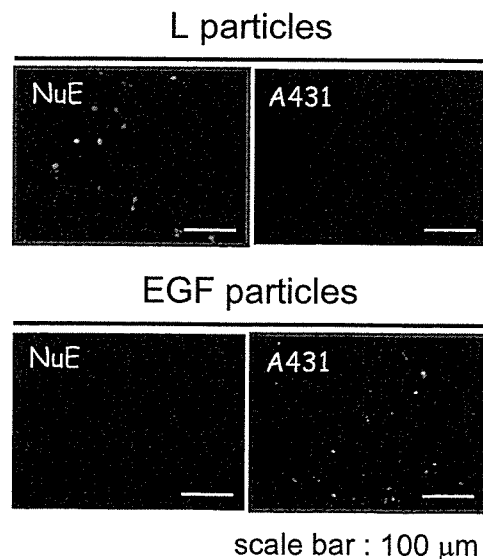


図19 薬剤導入実験の結果

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。

11) 膜透過ペプチド R₈ 提示粒子の生産及び精製

3 種類の欠失変異体に R₈ 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 ZZ ドメイン提示粒子と同様に R₈ 提示粒子の精製を行ない、SDS-PAGE 銀染色を行なった。(図 20)。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、R₈ 提示粒子の精製に成功した。

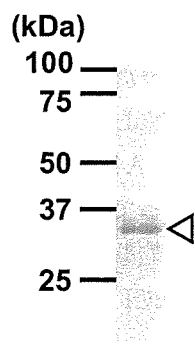


図 20 銀染色

12) R₈ 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 R₈ 提示粒子を各種細胞に添加した。その結果(図 21)、L 粒子では HepG2 にのみ導入されるのに対し、R₈ 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、R₈ 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。

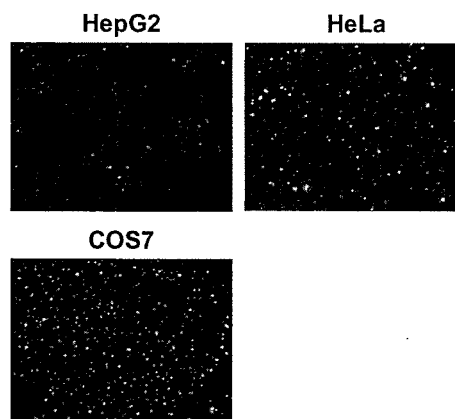


図 21 蛍光標識した R₈ 粒子の導入実験

D. 考察

バイオナノカプセルのヒト肝細胞への特異性を削除し、ZZ ドメインを提示した粒子の作製に成功した。また ZZ ドメイン提示粒子を用いて細胞特異的な薬剤・遺伝子導入に成功した。そして、新規のキャリアとしてストレプトタグ提示粒子の作製に成功した。さらに、新規生産系として昆虫細胞を用いた EGF 提示粒子の分泌生産に成功した。そしてその粒子を用いて標的細胞への特異的な薬剤導入に成功した。そのほかにも、膜透過ペプチド R₈ 提示粒子の作製に成功し、あらゆる細胞へ導入可能であることが示唆された。以上のことから、ドラッグデリバリーシステムおよび遺伝子治療の新規キャリアの開発に必要な準備がなされたと言える。

(5) 低抗原性の中空バイオナノ粒子の創製

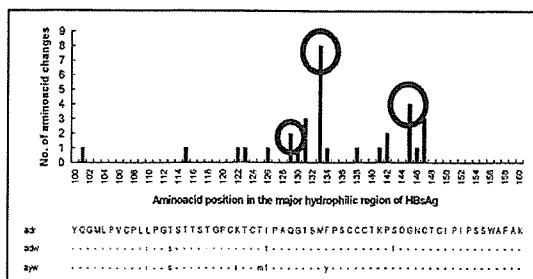
A. 研究目的

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、検討を行った。

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(下図)。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100 μ g(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。

3) L粒子の発現系

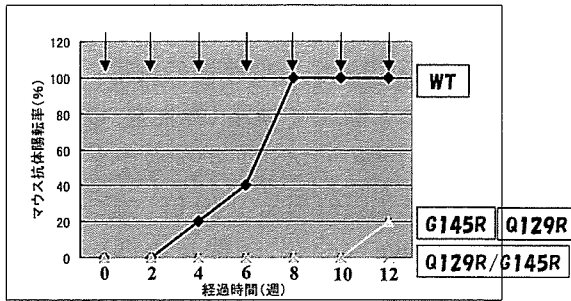
L粒子発現酵母細胞は、*Saccharomyces cerevisiae* AH22R-株でプラスミドpGLDLIIP39-RcT(黒田ら、J. Biol. Chem., 1992)を保持するものを用いた。この発現株は、中空バイオナノ粒子の工業生産に用いているものと同じである。発現株の培養及び精製のプロトコルは基本的に既報(山田ら、Vaccine, 2001)に従った。精製に使用した機材は、Amersham-Pharmacia社の液体クロマトグラフィー機器AKTA explorerを使用した。

C. 研究結果

1) マウスへの連続投与実験

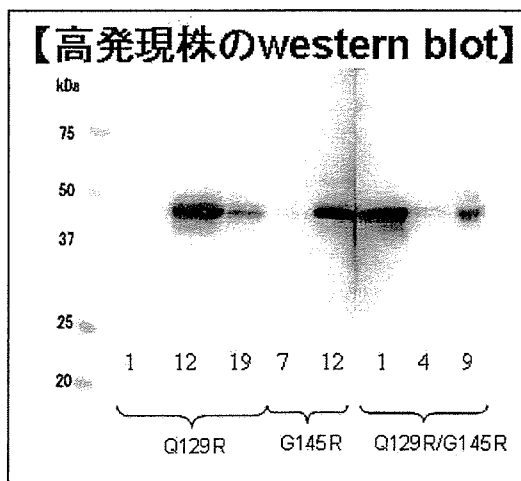
コントロールである野生型L粒子を接種されたマウスにおいては、接種開始4週目から抗体産生が認められた。8週目においては全てのマウスにおいて陽転していた。次に、変異を少なくとも1つ有する変異型L粒子においては、接種開始10週目まで抗体産生が認められなかったが、12週目において20%のマウスが陽転していた。さらに、両方の変異を有するL粒子においては、観

察期間中に抗体産生は認められなかった (下図)。

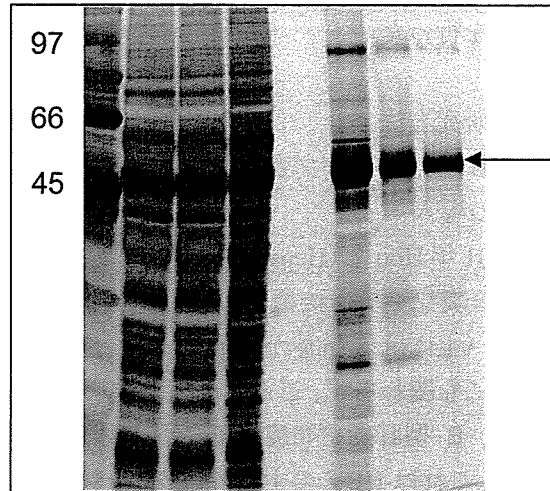


2) 低抗原性中空バイオナノ粒子 (Q129R /G145R 変異体) の高発現株の選抜

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 (下図 Q129R/G145R の 1 番)。



3) 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 10 mL で 3 昼夜 30 度で振とう培養を行い、HighPiII 培地 100 mL で 1 昼夜 30 度で更に振とう培養を行い、最後に、8S5N-P400 培地 1 L に移して、2 昼夜 30 度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 度 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