

を担体とするゲルろ過カラムクロマトグラフィに負荷して、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（下図 矢印）。本方法によれば、培養菌体（1L 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。

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を終えたところで、濃縮を行い、タンパク質量 300 μ g 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 1ml あたり 10pg 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。

5) 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。

6) 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

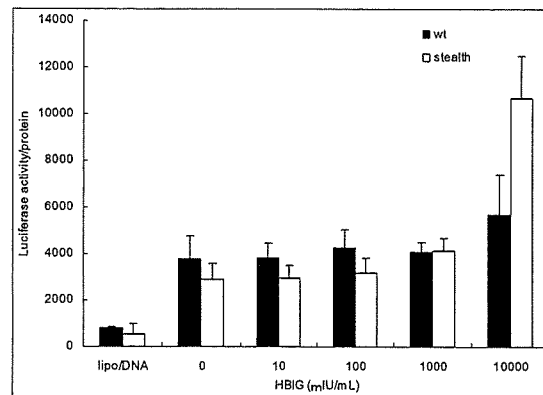
同じ精製度の野生型中空バイオナノ粒子及び低抗原性中空バイオナノ粒子を用意し、PBS に懸濁し、タンパク質量で 4、2、1、0.5、0.125 μ g を Balb/c マウス（7 週齢メス、LISA 1 群 5 匹）の腹腔内に投与した。1 カ月飼育した後、粗血清を単離し、臨床検査に用いる市販 HBs 抗体測定用 E (anti-HBs イムニス EIA キット) で含有 HBs 抗体を測定した。その結果、野生型中空バイオナノ粒子を接種されたマウスにおいて、50%のマウスが抗体産生（陽転）する最小薬量は 3.36 μ g であることが判明した。次に、低抗原性中空バイオナノ粒子の場合は、いずれのマ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

7) 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 μg)または低抗原性中空バイオナノ粒子(Q129R/G145R 変異体)(6 μg)内部に、平成17年度研究報告記載のリポソーム法によりルシフェラーゼ発現プラスミド (6 μg) 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度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度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

B型肝炎ワクチンにも用いられるHBV外皮タンパク質粒子の抗体誘導能は、一般に受け入れられているレベルよりも低いと思われる。というのも、ワクチン接種においては、アラムアジュバントと複合体を形成させ、免疫効果が充分得られる体内滞留性の高い筋肉内及び皮下接種を行い、さらに0, 4, 12週間の3回接種が行われ、その結果、何とか9割の接種者に抗体を誘導できる。しかし、接種後、通常2年で折角誘導した抗体は体内より消えてしまう。他の臨床応用されているワクチンは、1回接種で十分なものが多く、しかも免疫効果が何年も続くものも少なくない。今回我々は、B型肝炎ワクチンと同等量のL粒子を、アジュバントなしで、抗体誘導されにくい静脈中に

投与することを計画している。この条件であれば、強力に L 粒子に対する抗体が誘導されることはないのではと考えていた。そして、実際に野生型 L 粒子を 10 倍量連続投与したところ、2-4 回の連続投与に充分対応できることが実際に証明された。

しかし、今後 L 粒子を臨床応用するためには抗原性を徹底的に押さえ込むことが大事と考えられる。そこで、今回 HBV エスケープ変異体を mimic することにより低抗原性 L 粒子を創出することに成功した。特に 2 種類の変異を併せ持つ変異型 L 粒子は、10 倍量の L 粒子を 2 週間おきに 12 週間（6 回接種）接種しても抗体産生が認められないので、臨床においても十分な低抗原性であると考えられる。

ただ今回の検討は、マウス抗体産生系に対する効果であり、ヒト抗体産生系と完全に同じとはいえない。この種の問題は今後の検討課題である。また、今回は L 粒子の抗体誘導能のみに関して行っており、細胞免疫誘導能に関しては全く検討していない。特に Pre-S 領域に T 細胞エピトープが存在することが分かっており、今後は Pre-S 領域の欠失変異体を得て検討すべきと考える。さらに、欧米などでは B 型肝炎ワクチン接種が普及しており、ほとんどの成人の体内

には抗 HBV 抗体（中和抗体）が著量存在する。今回得られたステルス型 L 粒子が大量の中和抗体内でも機能するか否かは今後の検討課題である。

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 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が必要である。

(6)タンパク質封入中空バイオナノ粒子の創製

A. 研究目的

バイオナノキャリア内に物質を封入する際に用いるエレクトロポレーション法も、発熱や電氣的酸化還元を制御できないことからタンパク質を封入する場合には変性や失活を伴いやすいため、異なる方法で封入することが必要と考えられた。そこで、バイオナノキャリアにタンパク質を封入する場合には変性や失活を伴いやすいと予想されるため、L-タンパク質のC末端に外来タンパク質を遺伝子的に融合する形で封入する方法を考案した。GFPやLucを融合したバイオナノキャリアは、*in vivo*で投与した場合、その局在を知る事ができるレポーターとして有用であり、分子標的によるバイオイメージングを視野に入れた形の癌の分子標的は標的マーカーに到達する制がん剤の濃度をコントロールできる可能性があり、分子標的をさらに確実な技術にすると考えられた。

B. 研究方法

1) バイオナノキャリアへのタンパク質封入方法

L-タンパク質のカルボキシル末端側は特に重要な機能を持たないと考えられるので、この末端に外来タンパク質を遺伝的に融合してL-タンパクとの融合を行い、組換え発現で粒子を形成させた場合に、この外来タンパク質部分が粒子内に封入されることにより、エレクトロポレーションのような条件に依らず100%の効率でタンパク質を封入したバイオナノキャリアの作成を試みた。実際には、カルボキシル末端が膜貫通領域として存在するには長さが長過ぎるの

で、これを最適化して緑色蛍光タンパク質GFPの発現の結果を調べた。発現はCOS7細胞により行った。

発現の量は、抗原量とEGFPの蛍光強度により解析した。さらに、プロテアーゼK処理と抗体の抗GFP抗体に対する反応性によりGFP部分が内封されているかどうかを解析した。また、この融合タンパク質粒子を培養細胞の培地中に添加することにより、ヒト肝臓細胞の標的能力を評価した。

2) ルシフェラーゼ融合バイオナノキャリアの作製

GFPの融合を行ったのと同様に、組換え発現でホタル(*Photinus pyralis*)由来ルシフェラーゼ(Luc)を融合して粒子を形成させた。L-Luc融合タンパク質発現を最適化する為にL-タンパク質のカルボキシル末端の長さをGFPの場合と同様に最適化して遺伝子発現の効率化を図った。発現はCOS7細胞により行った。

発現の量は、抗原量とLucの発光強度をルミノメーターで確認した。また、この融合タンパク質粒子を酵母細胞で発現させるためにベクターの構築を行っている。また、Lucを用いた生体のイメージングを行うためにプロテインAのZモチーフ2個を融合させてZZ-Lucを調製して、イメージングの検討を先行している。

3) 抗体分子親和性ルシフェラーゼの構築

スタフィロコッカスの表面タンパク質プロテインAは抗体分子IgGに高い親和性を持つが、これはZ領域と呼ばれる α -ヘリックスの繰り返し構造に依存している。そこで、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。

4) *in vivo* イメージング

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。

5) ルシフェラーゼ-緑色蛍光タンパク質 (LUC-GFP) 融合遺伝子発現ベクターの構築

細胞を *in vivo* イメージングで可視化するために、CMV プロモーターの支配下に Luc と GFP を融合した Luc-GFP タンパク質を発現するベクターを構築した。これを発現する細胞は、蛍光顕微鏡下で観察できるとともに、*in vivo* においてはルシフェリン存在下で局在を観察することができるメリットがある。

6) Luc-GFP 融合タンパク質発現細胞株の樹立

少ない細胞数でも *in vitro* および *in vivo* の両方での イメージングによる観察が可能な細胞を作製することを目的として、ヒト前立腺癌細胞株 LNCap に Luc-GFP 融合タンパク質発現プラスミドを導入後、G418 存在下で形質転換細胞をスクリーニングし、Luc-GFP 融合タンパク質を安定発現する細胞株を樹立した。

C. 研究結果

1) バイオナノキャリアへのタンパク質封入方法

バイオナノキャリアへタンパク質を封入するための方法論として遺伝子的融合を行

った (図 1)。これらのデザイン T0-T3 を発現系に組み込んで、Cos7 細胞で発現させ、その発現量を抗原性による定量と蛍光の強度による評価の二つの異なる方法で評価した (図 2)。この結果から、L タンパク質のカルボキシル末端に外来タンパク質を融合させるためには、最適な長さがあることがわかった。

これにより 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 型融合タンパク質が粒子を形成していることを、ショ糖密度勾配超遠心法により評価したところ、細胞の培地中に分泌されたものも細胞中に存在するものともに等しい粒子密

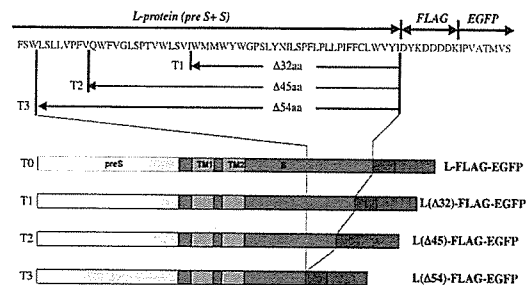


図 1 L タンパク質のカルボキシル末端へ GFP を融合するデザイン。L タンパク質をカルボキシル末端側から欠損させて EGFP を融合した。

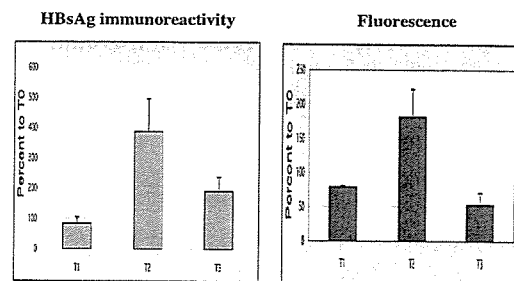


図 2 L タンパク質と GFP の融合タンパク質の Cos7 細胞での発現レベルの比較。カルボキシル末端の欠損をさせずに GFP を融合した T0 の発現レベルを 100% として T1, T2, T3 のそれぞれの発現レベルを抗原性と蛍光強度により評価した。

度を持っていることが示唆された (図 3)。

さらに、融合バイオナノキャリアの肝細胞への標的能力を *in vitro* で評価した (図4)。この結果から、細胞中のもも培地中に分

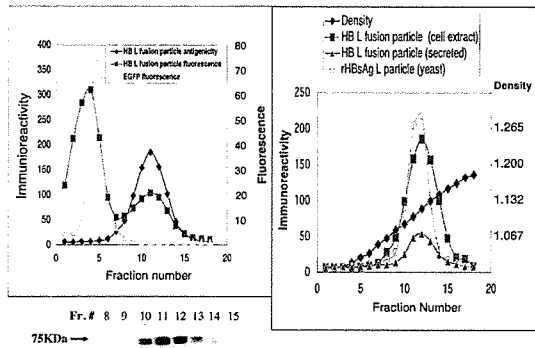


図3 ショ糖密度勾配遠心による粒子密度の比較。T2融合タンパク質をCos7細胞の培地と細胞中の両方から別々に採取して、形成される粒子の密度を評価した。左側で培地中から得られる粒子画分10~12はさらに右側での細胞中から抽出されたものとの比較を行っている。

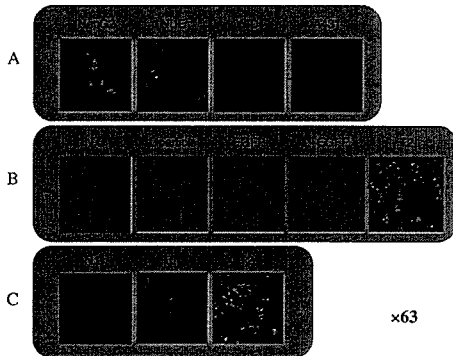


図4 融合型粒子の肝臓細胞標的能力の評価。(A) 種々の細胞への導入実験。ヒト肝臓がん由来細胞、HepG2, NuE; ヒト大腸がん由来細胞、WiDr; ヒト上皮がん由来細胞、A431、(B) HepG2細胞への感染性の評価。(C) 細胞から抽出した粒子の比較。

泌されたものも共にヒト肝細胞を標的する能力が備わっていることが示唆された。T1 および T2 型粒子に対してプロテアーゼ K による消化を試みた。GFP はプロテアーゼ K に対して耐性であり、粒子内でのトポロジーにより消化されるパターンが異なることがわかったが、これは GFP 部分のアミノ末端が L タンパク質のトポロジーに依存

しているためと考えられた。GFP に対する抗体により数回に渡って、粒子の面分を吸収し最後に HBsAg の抗体でウェスタンブロッティングを行うと、抗 GFP 抗体では吸収できない画分が存在することがわかった。これは EGFP が粒子の中に内封されている

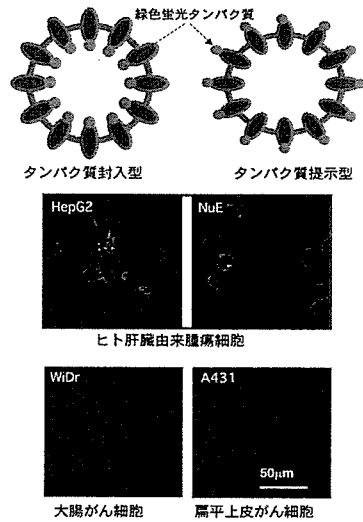


図5 GFP 融合型バイオナノキャリア。GFP の部分は粒子内部に封入されているか表層へ提示されているかのどちらかになる。肝臓細胞標的能力の *in vitro* での評価をヒト肝臓がん由来細胞、HepG2, NuE; ヒト大腸がん由来細胞、WiDr; ヒト扁平上皮がん由来細胞、A431、で比較評価した。肝臓由来細胞でのみで蛍光が観察された。

Lタンパク質 - ルシフェラーゼ融合のデザイン

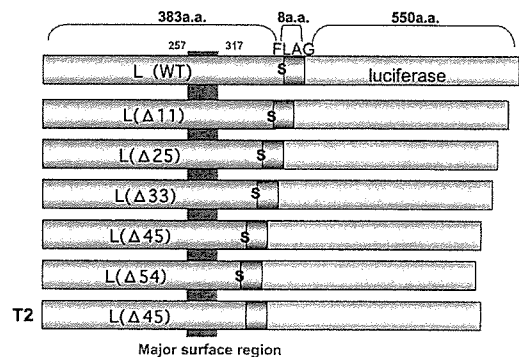


図6 Lタンパク質のカルボキシル末端へLucを融合するデザイン。C末端からの欠損残基数をΔで示している。リンカーはS(連続するセリン6残基)とFLAGタグ。GFPを融合した場合のデザインはT2タイプとして比較した。

か粒子表面に提示されているかの違いに相当し、しかもこの二つのトポロジーは一つの粒子の中では互いに混在していないことが示唆された (図 5)。

2) ルシフェラーゼ融合バイオナノキャリア

L-Luc 融合ナノキャリアも L-GFP と同様に L タンパク質の C 末端を欠損させて発現効率を検討した (図 6)。L-Luc 融合タンパク質の COS7 細胞での発現を調べるため細胞を形質転換後 3 日経過して細胞から抽出してその中に含まれるルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、L タンパク質の C 末端は 11 アミノ酸残基欠損で発現が認められたが 54 アミノ酸残基まで欠損させることで、さらに発現効率を上げる事が可能であった。これ以上のアミノ酸の欠損は粒子を形成する場合に支障がある事を L-タンパク質単独ですでに調べている。また、GFP 融合粒子として最適であった 45 アミノ酸の欠損はルシフェラーゼでは発現効率不良であったが、GFP を融合した T2 タイプでは改善された (図 7)。

3) 抗体分子親和性ルシフェラーゼによる *in vivo* イメージング

Luc 融合バイオナノキャリアの系を確立するために、まず Luc による *in vivo* イメージングの可能性を検討開始した。ZZ-Luc 融合タンパク質を大腸菌で発現させた。細胞抽出液の可溶性画分に存在し、IgG カラムにより精製して、1 リッター培養当たり約 2 mg が得られた。この ZZ-Luc 12 μ g を BALB/c マウスの尾静脈から注射して、腹腔にルシフェリンを注射すると、CCD カメラにより発光を検出する事ができた。このことから、生体内イメージングが可能であることがわかった。この融合タンパク質 ZZ-Luc はジスルフィド結合を持たないの

で、リフォールディングの過程を経ずに活

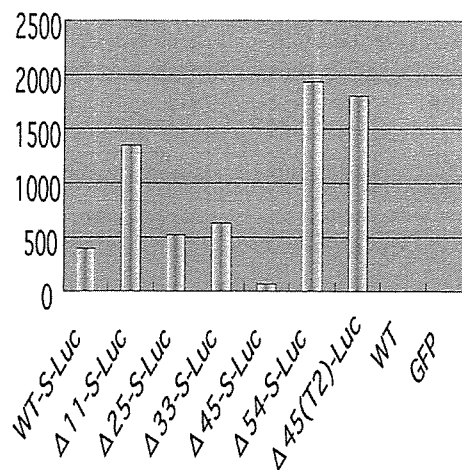


図7 L-Luc 融合タンパク質の COS7 細胞での発現。細胞を形質転換後 3 日経過して細胞から抽出してその中に含まれるルシフェラーゼ活性を測定した。WT (Luc を融合していないバイオナノキャリア) と GFP はバックグラウンドのコントロール。

性タンパク質を可溶性画分から ZZ タグを利用して IgG 吸着カラムにより調製することが可能である。また、抗体分子と結合させ抗原部位を標的するデザインとなっているので、適当な抗体を選択して局所イメージングも可能になると考えられた。事実 EGF 受容体に対する抗体と結合させた ZZ-Luc を用いて、EGF 受容体過剰発現細胞株 A431 を特異的に標的することができることを *in vitro* において確認している。この ZZ-Luc をマウスの大腿部筋肉中へ注射し、腹腔内へルシフェリンを注射して *in vivo* イメージングを試みた (図 8)。このとき、ルシフェリン単独投与では、15 分で顕著に発光が減弱するのが観察された。しかし、ルシフェリンに Mg²⁺ と Coenzyme A を加えて投与すると一時間は減弱が認められず、長時間の観察が可能であることが分かった。

このようにルシフェラーゼを局所に集積させてやることにより、*in vivo* においてイメージングが可能であることを示した例は少ない。さらに、減弱までの時間を 1 時間以上まで延長できることはルシフェラーゼ発光による *in vivo* イメージングが実用的で

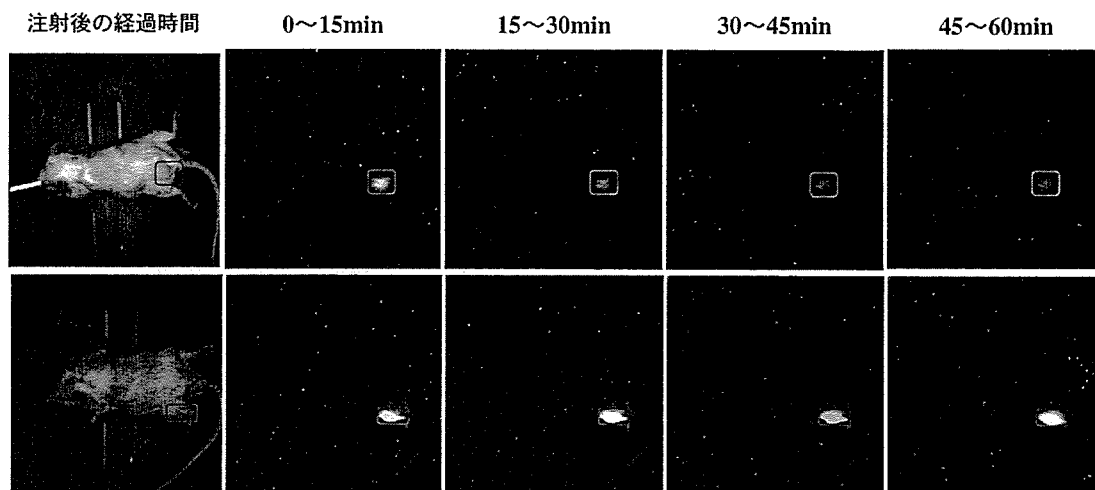


図8 ZZ-LUC融合タンパク質による *in vivo* イメージング。マウスの大腿部へZZ-LUC融合タンパク質を筋肉注射した（赤枠部分）後、ルシフェリンを腹腔内に投与し、経時的に高感度CCDカメラにより撮影した。上段はD-Luciferin (30mg/ml)のみ、下段はD-Luciferin (30mg/ml)、 Mg^{2+} (26.7mM) および Coenzyme A (2.7mM) を100 μ L腹腔内注射した場合。

あることを極めて強く示唆するものである。

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。

4) Luc-GFP 融合タンパク質を発現する細胞

ルシフェラーゼ-GFP 融合タンパク質を発現させるための遺伝子を構築し、サル腎由来細胞株 Cos7 を用いて、GFP およびルシフェラーゼの活性が同時にモニターできることを確認した上で、ヒト前立腺癌由来細胞株 LNCap に対して、この Luc-GFP 融合タンパク質発現ベクターを導入した。この結果樹立した形質転換細胞株 LNCap-Luc-GFP 細胞をヌードマウスに 1×10^7 個移植して一週間で *in vivo* イメージングを検討した。LNCap 細胞は増殖が遅く、ある程度の大きさの固形癌が生着した担癌マウスの作製には3週間から1ヶ月の時間を要する。たとえば皮下移植の場合でも移植後一週間では、移植部位を外観で視認することは不可能である（図9）。しかし、このヌードマウスの腹腔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

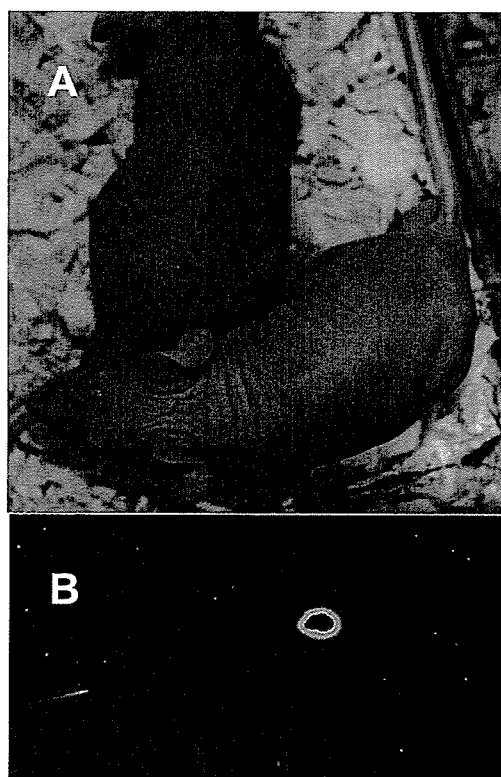


図9 LNCap-Luc-GFP細胞を移植したヌードマウス。A, 皮下移植後一週間経過時。移植部位を視認することは困難。B, ルシフェリンを投与後の *in vivo* イメージング。

D. 考察

抗体による免疫沈降のデータに基づき GFP 融合型粒子は一つの粒子内で一定のトポロジーで存在することが明らかになった。これにより融合型粒子の方法論はタンパク質内封だけにとどまらず、新たな標的部位をデザインすることも可能となった。

ZZ-Luc は抗体を提示することにより、必要な細胞や組織を *in vivo* で特異的に標的化することが可能で、発光量によって到達したタンパク質量の推定が可能となる。この延長線上で発光レポーターをもつバイオナノキャリアが実用化できれば、この発光を *in vivo* でモニターするには冷却型 CCD カメラがあれば可能である。現状では *in vivo* カメラとしてもっとも安価であり、画像解析ソフトがあれば、定量性も得られるなどのメリットがある。

大腸菌から遺伝子組み換えで調製した ZZ-Luc は、生体中で発光可能な分子である事が確認されてはいたが、発光寿命が短いのが難点であった。しかし、Coenzyme A 等を併用することによりその寿命も十分長く、観察を用意にすることができた。これにより抗体を提示した ZZ-Luc が分子標的した場合の局在を発光レポーターにより *in vivo* でイメージングする具体性が高まり、DDS

で投与される薬剤の送達量モニターリングシステムへの完成の準備が整いつつある。

さらに、LNCap-Luc-GFP 細胞の樹立は、バイオナノキャリアの可能性を *in vivo* で実証するために重要な材料となることは確実である。レポーターをモニターすることにより分子標的の効果が生体内において、しかも同一個体で時間経過を追ってモニターすることが可能になったからである。これに加えて重要なポイントは、従来の担癌マウスは細胞の移植から生着まで約1ヶ月を要していたのに対して、レポーターをモニターするシステムにすることにより、移植後1週間以内にその存在をモニターすることが可能となることである。このことは、生体内における癌細胞の動態を解剖することなく具にとらえることができるとともに、従来のような大きな腫瘍塊を標的する訳ではないので、標的に用いる制癌剤の用量を現実的なものにして実験が行えることを意味する。

(7) 肝細胞がん治療法の検討

A. 研究目的

ヒト肝細胞癌は日本の国民病とも言うべき疾患であり、日本を始めとした東南アジアに多い。この肝細胞癌は主として肝炎を母体として発生するものであり、再発・再燃が高率であることや肝機能障害を伴っていることなどが特徴であるから出来るだけ生体に侵襲の少ない治療法が望ましい。そのためには、ヒト肝細胞癌に対する特異性の高くしかも生体にとって安全性も高い治療法の開発が必要である。そこで、われわれはヒト肝細胞癌に対してピンポイントに遺伝子・薬物・タンパク・siRNAなどをデリバリーするバイオナノキャリアの開発を試みた。われわれは、2種類のバイオナノキャリアの開発を試みた。ひとつは、ヒト肝臓に対して極めて特異的かつ強力な感染性を有するB型肝炎ウイルスの外皮タンパク質であるHBs抗原L粒子である。本粒子を酵母で産生させると、直径100nm前後の中空粒子を形成する(L粒子)。このL粒子はヒト肝細胞に高い標的化能力を持ち、生体内でピンポイントに遺伝子や薬物送達出来るナノキャリアとして利用可能である。実際、L粒子内にヒト第IX因子cDNAを封入してヒト肝細胞癌を移植したマウスに尾静脈から静注しその後尾静脈から採血して血中ヒト第IX因子を測定すると30日以上にわたって治療域である2%を超える高値を示していた。さらに、肝細胞特異的なレセプターを他の特異性を持つレセプターに変換すれば、任意の細胞へのピンポイント送達も可能である。このL粒子は、ウイルスゲノムをまったく含まない、安全性と特異性に高くしかも細胞や組織への高い遺伝子導入効率を持ち、遺伝子、タンパク質、化合物、RNA等種々の物質を細胞へ送達する優れたシステムである。そこで、本

粒子を改良して分子標的療法のキャリアーとなるバイオナノ中空粒子を確立するとともに肝細胞癌の治療薬を開発することを目的とした。他の方法として、われわれはMPCポリマーを用いた。MPCポリマーは人工腎臓や人工心臓などにバイオマテリアルとして広く臨床応用され、その安全性は認められている。このMPCポリマーは側鎖にリン脂質極性基を有し、優れた血液適合性を有する2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)とn-ブチルメタクリレート(MBA)との水溶性共重合体(PMB30W)であり、水溶性でかつ疎水性物質を安定に内包することが出来る。もともと抗癌剤には難溶性のものが多く、本物質により徐放性で易水溶性となりしかも、このミセル体は大きさが平均50nmで腫瘍組織集積性も高くなりしかもセンチネルノードに集積するスズコロイドと同じ大きさであり抗癌剤を経リンパ流的に到達させることも可能になり、新たな投与方法が生まれることも予想される。また、p-ニトロフェニルカルボニルオキシエチルメタクリレート(NPMA)を加えたpoly(MPC-co-BMA-co-NPMA)(PMBN)はエステル結合により増殖因子や抗体などを結合させ、特定の組織や細胞に特異性や指向性を持たせることが可能となる。本年度の研究として、HBs抗原L粒子についてはアドリアマイシンを封入し、ヒト肝細胞癌に対する殺細胞効果を、PMB30WについてはHBs抗原結合MPCポリマーを用いて肝細胞癌で特異的に遺伝子を発現させたり、さらにはパクリタクセルを封入してヒト肝細胞癌に特異的なDDSを開発した。

B. 研究方法

1) 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：コー

トソーム

2) HBs 抗原結合 GFP c DNA 封入 MPC ポリマーに関する研究：

MPC ポリマーにHBs 抗原をエステル反応にて結合させた後、GFP c DNA を添加してHBs 抗原結合 GFP c DNA 封入 MPC ポリマーを作製する。ヒト肝細胞癌を移植したヌードマウスの腹腔内に上記のポリマーを注入し、7日後に犠死せしめヒト肝細胞癌を含めた各種組織を蛍光顕微鏡にて観察した。

3) RNase 挿入 FGF タンパクによる血管新生阻害および抗腫瘍効果：

a) *in vitro* における血管新生阻害：ヒトの血管内皮細胞由来の HUVEC を培養し、RNase 挿入 FGF タンパクを添加し、その殺細胞効果をヒト扁平上皮癌由来の A431 と MTT assay で比較検討した。

b) tube formation assay 法による血管新生阻害：type I collagen ゲル上で HUVEC を培養し、ゲルに RNase 挿入 FGF タンパクを添加し、tube formation を対照群と比較検討した。

c) *in vivo* における血管新生阻害：小さなチャンバー内でがん細胞株である A431 を培養し、培養液内に RNase 挿入 FGF を添加し、その後チャンバーをマウス背部皮下に置きその部位の血管新生を形態学的に測定し、対照群と比較検討した。

d) がん細胞移植モデルにおける抗腫瘍効果：A431 をヌードマウスに移植前日および移植後5日間 RNase 挿入 FGF タンパクを腹腔に投与して、腫瘍径を測定し推定腫瘍重量を求め、対照群と比較検討した。

4) HBs 抗原結合パクリタクセル封入 MPC ポリマーの肝細胞特異的殺細胞効：4mg の MPC ポリマーと 1 mg の HBs 抗原 (Biodesign International, Saco, Me., USA) を 4 ml の磷酸緩衝液 (pH 7.8) に溶解

して 4°C で 48 時間反応させた後、p-nitrophenol を透析により除去し、エステル結合により HBs 抗原を結合させた。反応量は p-nitrophenol を 400 nm の波長で測定することにより推測した。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。

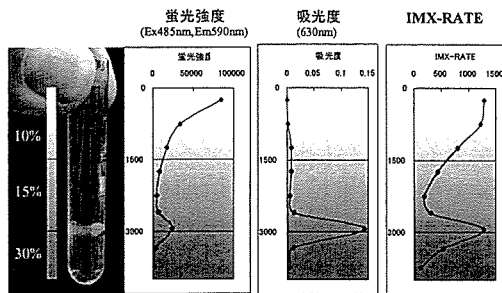
5) HBs 抗原結合 Flt-1 c DNA 組み込み plasmid 封入 MPC ポリマーに関する研究：前記と同様に MPC ポリマーにエステル結合により HBs 抗原を結合させ、GFP および Flt-1 c DNA を組み込んだ plasmid をイオンの吸着させたものを、ヒト肝細胞癌株である HepG2 とヒト大腸癌 WiDr を 96 穴のプレートに撒き、生着させてから遺伝子結合 MPC ポリマーを培養液中に添加して、培養液中の Flt-1 タンパク濃度を ELISA 法で測定した。また、GFP タンパクに関しては、蛍光顕微鏡にて蛍光を観察した。HepG2 および WiDr をヌードマウス皮下に移植し、腫瘍を形成してから尾静脈から投与して、それぞれ培養液や癌組織中および各種マウス臓器中のタンパクの発現を ELISA 法や蛍光顕微鏡を使用して検討した。

C. 研究結果

1) 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：

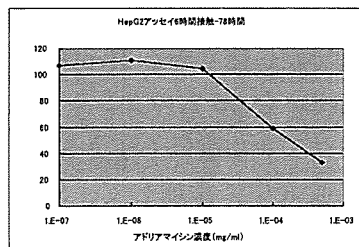
コートソームにアドリアマイシンを添加

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、アドリアマシ封入L粒子を作製・精製した。



次に、ヒト肝細胞癌株に *in vitro* で添加し、細胞数を MTT assay で測定すると、図のように濃度依存的な殺細胞効果が認められた。

HepG2へのアッセイ



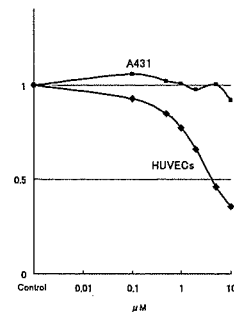
2) HBs 抗原結合 GFP cDNA 封入 MPC ポリマーに関する研究 :

cationic portion を導入した MPC ポリマーに緑色蛍光 cDNA を結合させてエステル基に HBs 抗原を反応させた HBs 抗原結合遺伝子封入 MPC ポリマーを作製して、*in vitro* および *in vivo* でヒト肝細胞癌に投与すると 7 日後にと殺して各種臓器の蛍光を蛍光顕微鏡で測定するとヒト肝細胞癌組織でのみ緑色蛍光物質の発現が認められた。

3) RNase 挿入 FGF タンパクによる血管新生阻害および抗腫瘍効果 :

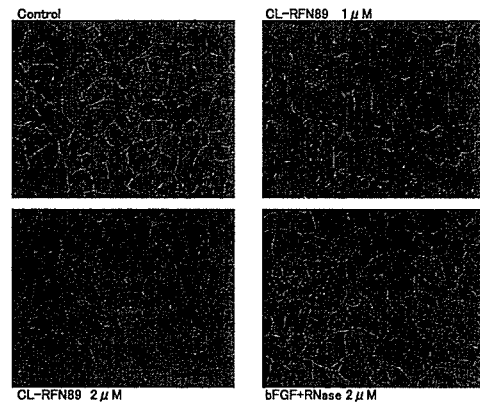
a) *in vitro* における血管新生阻害 : HUVEC および A431 に RNase 挿入 FGF タンパクを添加すると、HUVEC は濃度依存的な殺細胞効果が認められたが、A431 ではまったく殺細胞効果はみられなかった。

Cytotoxicity assay of CL-RFN89 to HUVECs and A431 cells



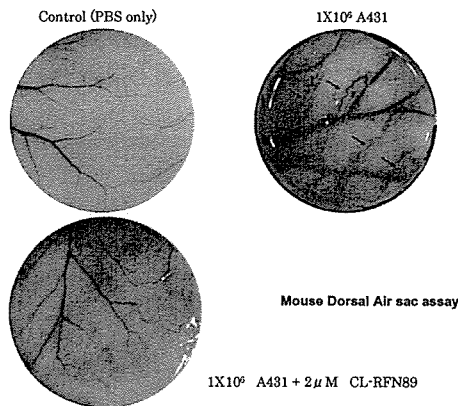
b) tube formation assay 法による血管新生阻害 :

FGF により HUVEC の tube formation は促進されたが、RNase 挿入 FGF は濃度依存的に HUVEC による tube formation を抑制した。

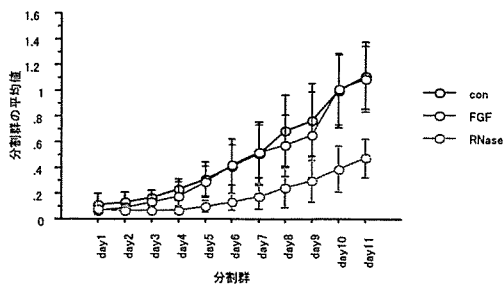


c) *in vivo* における血管新生阻害 : 小さなチャンバー内でがん細胞株である A431 を培養し、培養液内に RNase 挿入 FGF を添加し、その後チャンバーをマウス背部皮下に置きその部位の血管新生を形態学的に測定し、対照群と比較すると、腫瘍細

胞である A431 を培養しているチャンバーを皮下に植え込んだマウス背部では培養液のみの対照群より蛇行した血管新生が著明に認められたが、A431 に加えて RNase 挿入 FGF を添加したチャンバーを植え込んだマウス背部では血管新生が抑制され、対照群と有意の差を認めなかった。

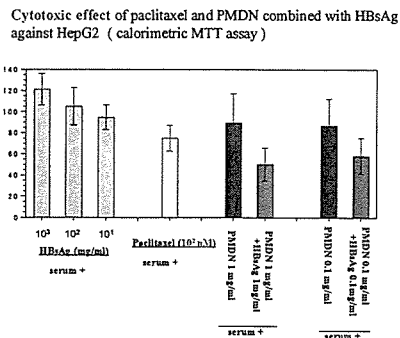
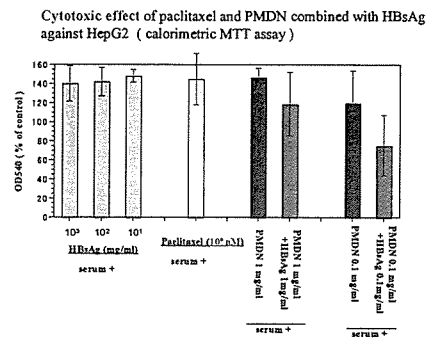


d) がん細胞移植モデルにおける抗腫瘍効果 : A431 をヌードマウス皮下に移植する前日は腹腔内に移植後 5 日間は RNase 挿入 FGF タンパク入れたアルゼミニポンプを背部皮下に埋め込んで持続的に投与したモデルで対照群と、腫瘍径を測定し推定腫瘍重量を求めると下記の図の如く、RNase 挿入 FGF を投与した群では A431 の増殖が抑制されていた。



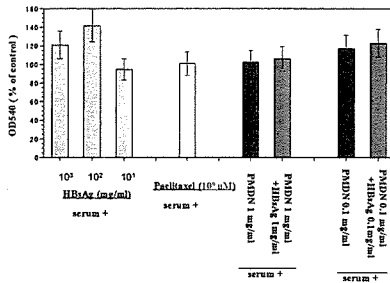
4) HBs 抗原結合パクリタクセル封入 MPC ポリマーの肝細胞特異的殺細胞効果 : HepG2 にパクリタクセル及び HBs 抗原を

添加しても、図に示すようにこの濃度では、全く殺細胞効果を示さなかった。さらに、HBs 抗原結合パクリタクセル封入 MPC ポリマーとパクリタクセル封入 MPC ポリマーとの殺細胞効果を MTT assay で測定すると有意に HBs 抗原結合パクリタクセル封入 MPC ポリマーの殺細胞効果が明らかであった。図には、パクリタクセル濃度をさらにあげた時の HepG2 に対する殺細胞効果を示しているが、図 1 と同様に、HBs 抗原結合パクリタクセル封入 MPC ポリマーの殺細胞効果が強力であった。

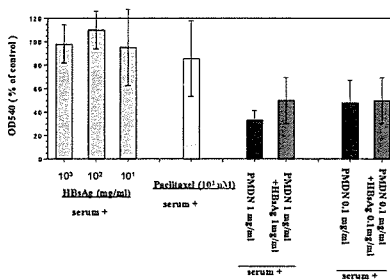


一方、ヒト扁平上皮癌細胞株である A431 にパクリタクセル封入 MPC ポリマーと HBs 抗原結合パクリタクセル封入 MPC ポリマーを培養液に添加しても、その殺細胞効果には図で示すように両者間には、有意の差を認めなかった。高濃度で比較しても図のように、やはり両者間では有意の差を認めなかった。

Cytotoxic effect of paclitaxel and PMDN combined with HBsAg against A431 (calorimetric MTT assay)



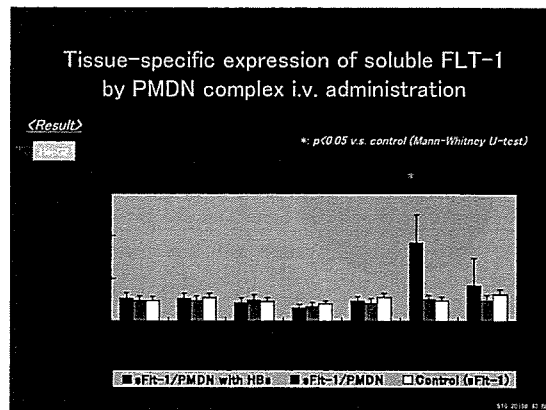
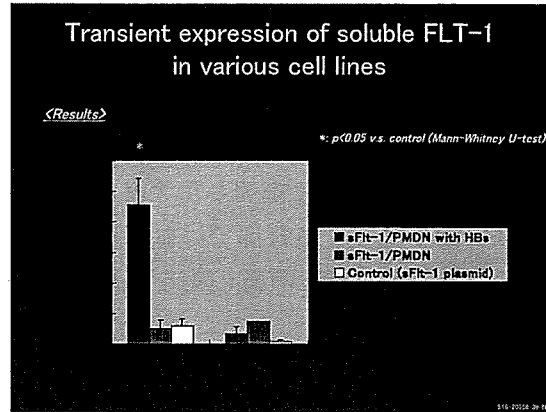
Cytotoxic effect of paclitaxel and PMDN combined with HBsAg against A431 (calorimetric MTT assay)



5) HBs 抗原結合 Flt-1 c DNA 組み込み plasmid 封入 MPC ポリマーに関する研究

HBs 抗原結合 Flt-1cDNA (可溶性 VEGF 受容体遺伝子) 封入 MPC ポリマーを HepG-2 と WiDr に *in vitro* で投与してその培養液中の Flt-1 タンパク濃度を ELISA 法で測定すると、図のように HepG-2 に HBs 抗原結合 Flt-1cDNA 封入 MPC ポリマーを添加したものでタンパクの発現が認められたが、他の条件ではいずれにおいてもその発現は認められなかった。

ヌードマウス皮下にヒト肝細胞癌 HepG-2 とヒト大腸癌 WiDr 移植し、上記各種 MPC-ポリマーを尾静脈から注入して、7日後にと殺して各種臓器の Flt-1 濃度を ELISA 法で測定すると図のように、ヒト肝細胞癌である HepG-2 の腫瘍組織内にも Flt-1 が発現しており、他のヒト癌組織やマウス各臓器では発現が認められなかった。



D. 考察

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。

また、可溶性 VEGF 受容体遺伝子による悪性腫瘍に対する遺伝子治療の可能性が示されるとともに、RNase 挿入 FGF による血管新生阻害や抗腫瘍効果が証明され可溶性 VEGF 受容体遺伝子以外にも RNase 挿入 FGF 遺伝子による遺伝子治療の可能性も生まれてきた。

さらに、HBs 抗原を用いてナノサイズでしかも生体適合性が高い肝細胞に特異的な Drug delivery system や Gene delivery system が構築可能であることが我々の研究により明らかとなった。このような、手法を用い

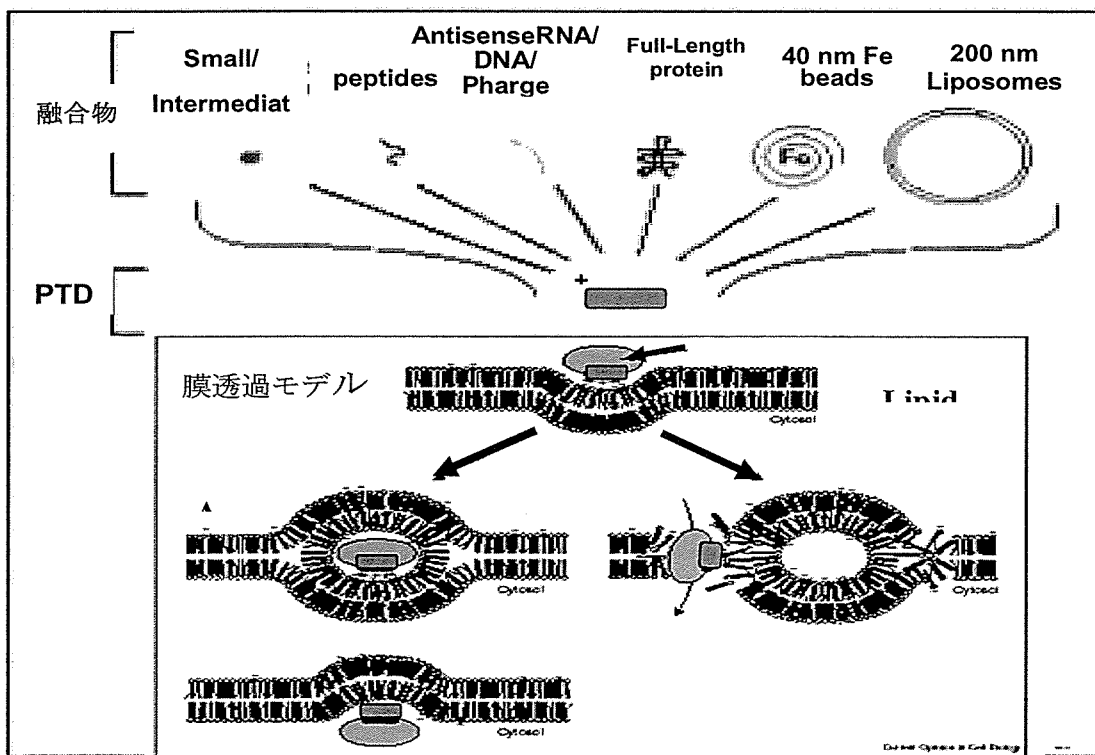
れば、日本における国民病とも言える肝細胞癌に対するより作用が強く、副作用の少ない治療法が確立されるものと期待される。

(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-

A. 研究目的

1999年に、Dowdyらは、TAT蛋白質の11アミノ酸を融合した巨大なβ-galactosidaseタンパク質(160kDa以上)をマウスの腹腔に注射することで、脳を含めた全身の組織細胞にβ-galactosidaseタンパク質を活性を保ったままデリバリー出来ることを報告(Science)し、TAT融合タンパク質は、*in vivo*デリバリー手法の一つとして一躍脚光を浴び始めた。このTATタンパク質の11アミノ酸は、塩基性のアミノ酸が多く含まれていることから、塩基性アミノ酸を連ねた poly-Lys, Poly-Arg の融合タンパク質も研究が進み、これら膜透過性を有する短い polypeptide を PTD(protein transduction domain)と総称し、様々な研究に利用されている。これまでの研究でPTDは、化合物、antisense RNA、DNA といった核酸、

ファージ、短いペプチド、大きなタンパク質や40 nmの鉄ビーズに至るまで融合させた物を細胞内に輸送することが報告されている(図1)。最近では、200 nmのリポゾームも細胞膜を通過して細胞内に導入することが出来たという報告があり、かなり大きなものまで輸送できること考えられているが、その細胞膜通過の機構は未だ解明されていない。しかし、200 nmのリポゾームも輸送できるということで、*in vivo*でのドラッグデリバリーシステム(DDS)に利用できるのではないかとして関心が高まってきている。本研究は、中空バイオナノ粒子にPTDを導入することで、中空バイオナノ粒子に*in vivo*デリバリー能を付加することで、脳にまで中空バイオナノ粒子を輸送することが出来るのではないかとする仮説の基に、PTDを中空バイオナノ粒子に導入し、そのデリバリー能を検証することを目的とし、最終的に脳内に治療薬をデリバリーする事ができるDDSを開発しようとするものである。



腫瘍内の血管は、構造が未熟であるために、正常組織の血管からは漏れでないような大きなものも、腫瘍血管から出て行くことができる。また、腫瘍内ではリンパ管からの排出効率も低下しているため、ある一定の大きさのものを腫瘍内にとどめておくことができる。この EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention) を利用してバイオナノ粒子を 100 nm 程度の大きさに調整できれば、腫瘍特異的に分布させることができる (図 2)。

DDS 研究は、イメージング技術の進歩に伴い、生体内動態の評価が比較的簡単にできるようになった。したがって、バイオナノ粒子の体内動態も実験動物を用いて観察することにより、デリバリーの効率や、分布、クリアランスの速さ等の評価が必要であると考えられるため、イメージングによる評価系を構築する。

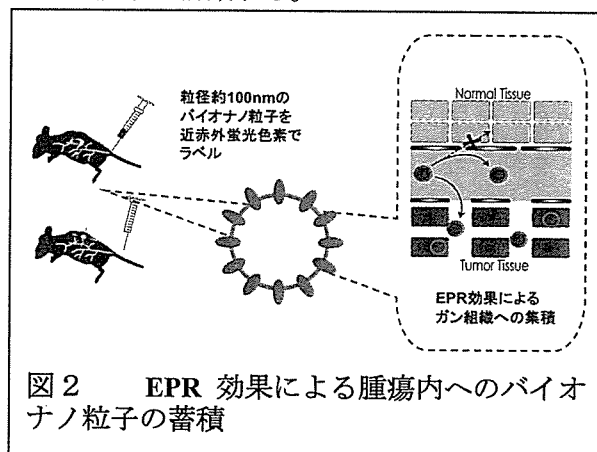


図 2 EPR 効果による腫瘍内へのバイオナノ粒子の蓄積

B. 研究方法

1) PTD の設計とモデルタンパク質の構築

PTD は基本的には塩基性のタンパク質を配置することで膜透過性を付与するペプチドを作成することが可能である。これまでもかなりの数の既存のタンパク質や人工ペプチド PTD 配列が報告されている。しかしながら、塩基性の配列を融合することでタンパク質全体の極性が著しく偏り、融合

タンパク質として合成する際に不都合が生じ、作成が困難になる場合がある。したがって、配列を工夫し、融合タンパク質全体を確実に合成する必要が出てくる。また、融合したタンパク質により、膜透過性の効率が異なってくるため、いくつかの PTD を設計しモデルタンパク質により膜透過性の検証を行う必要が出てくる。そこで、いくつかの PTD 配列を設計し、Myc タグをつけて細胞への導入効率をけんしょうしたところ、PTD 3 と命名した配列が細胞内への導入効率が良いことがわかった。この PTD 配列はトリプトファンをリジン、アルギニンと組み合わせた物で、これまで報告されている物とは異なるが、融合タンパク質の安定性の面でもかなり有用であることがわかった。

2) 培養細胞を用いた PTD 融合タンパク質の細胞内輸送の検証

上記の様にいくつかの PTD 配列を持った融合タンパク質が細胞内で有効に機能するかどうかを検証する目的で、PTD を融合させた GFP たんぱく質を細胞培養液に添加し、30 分後に細胞をトリプシン処理で回収して FACS 解析したところ、PTD1 配列よりも PTD3 配列と融合した GFP の方が細胞に多く取り込まれていることがわかった (図 3)。更に、同様の処理をした細胞の溶解液をウェスタンブロット法でたんぱく質の解析を行ったところ、やはり PTD1 配列よりも PTD3 配列を融合した GFP の方が多く細胞内に取り込まれているという結果を得た (図 4)。したがって、*in vitro* では、PTD3 配列の方が PTD1 よりも膜透過性が良いことが示された。

次に、PTD1 と PTD3 に、ODD ドメインと低酸素によるアポトーシスを抑える機能をもつタンパク質と融合させた融合タンパク質を構築し、培養細胞の培地に添加して、

低酸素条件下で細胞死をどれくらい抑制できるかという検証を FACS 解析法を用いて行った。

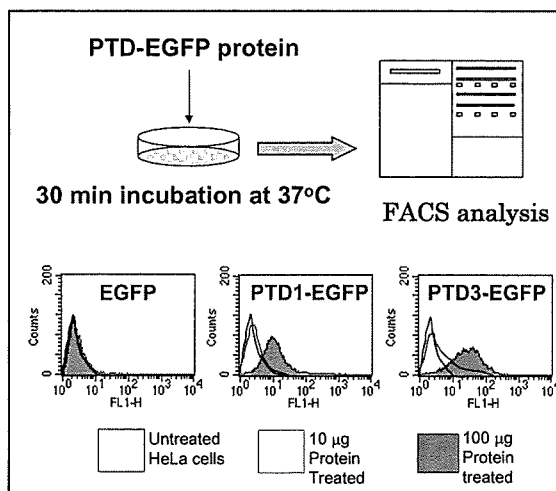


図3 PTD-EGFPを用いた膜透過性の検討 (FACS 解析法)

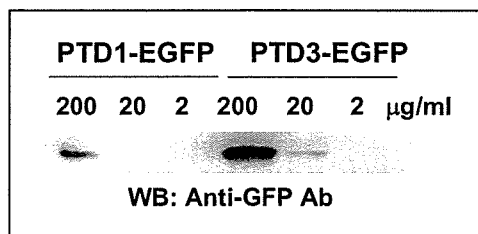


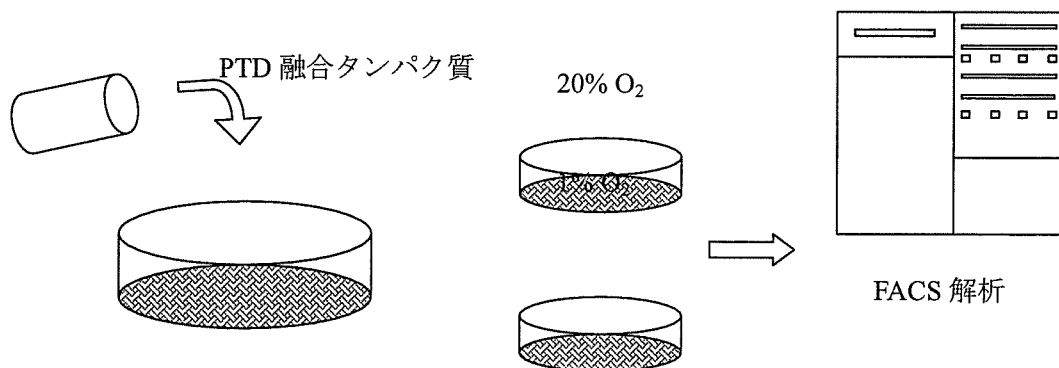
図4 PTD-EGFPを用いた膜透過性の検討 (ウエスタンブロット法)

すなわち、様々な濃度の PTD 融合タンパク

質を細胞の培養液に添加後、通常培養 (20%O₂)と低酸素状態 (1%) で培養し、低酸素培養で引き起こされるアポトーシスがどの程度抑えられるかを調べた。

2) 培養細胞を用いた PTD 融合タンパク質の細胞内輸送の検証

上記の様にいくつかの PTD 配列を持った融合タンパク質が細胞内で有効に機能するか否かを検証する目的で、低酸素によるアポトーシスを抑える機能をもつタンパク質と融合させた融合タンパク質を培養細胞の培地に添加して、低酸素条件下で細胞死をどれくらい抑制できるかという検証を FACS 解析法を用いて行った。すなわち、様々な濃度の PTD 融合タンパク質を細胞の培養液に添加後、通常培養(20% O₂)と低酸素状態 (1%) で培養し、低酸素培養で引き起こされるアポトーシスがどの程度抑えられるかを調べた。その結果、融合しているタンパク質は同じであるにもかかわらず、PTD 1 はほとんど低酸素によるアポトーシスを抑えなかったが、PTD 3 は極めて低濃度で有効に低酸素によるアポトーシスを抑制することが分かった (図5)。このことから、中空バイオナノ粒子に導入する PTD には PTD 3 を用いることが有効であると考えられた。



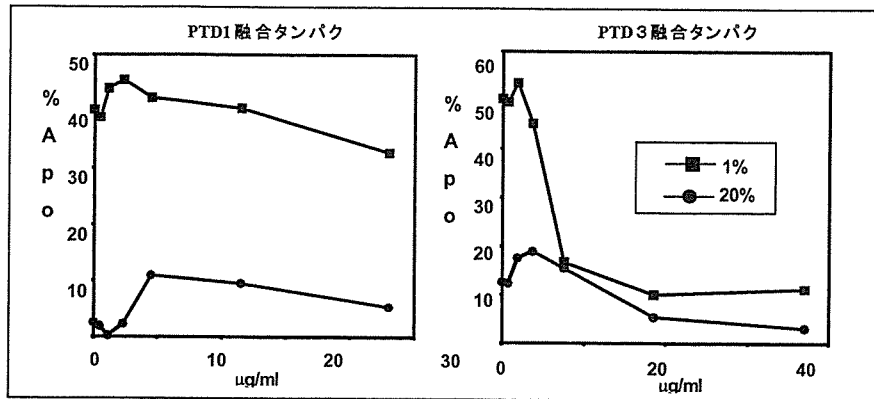
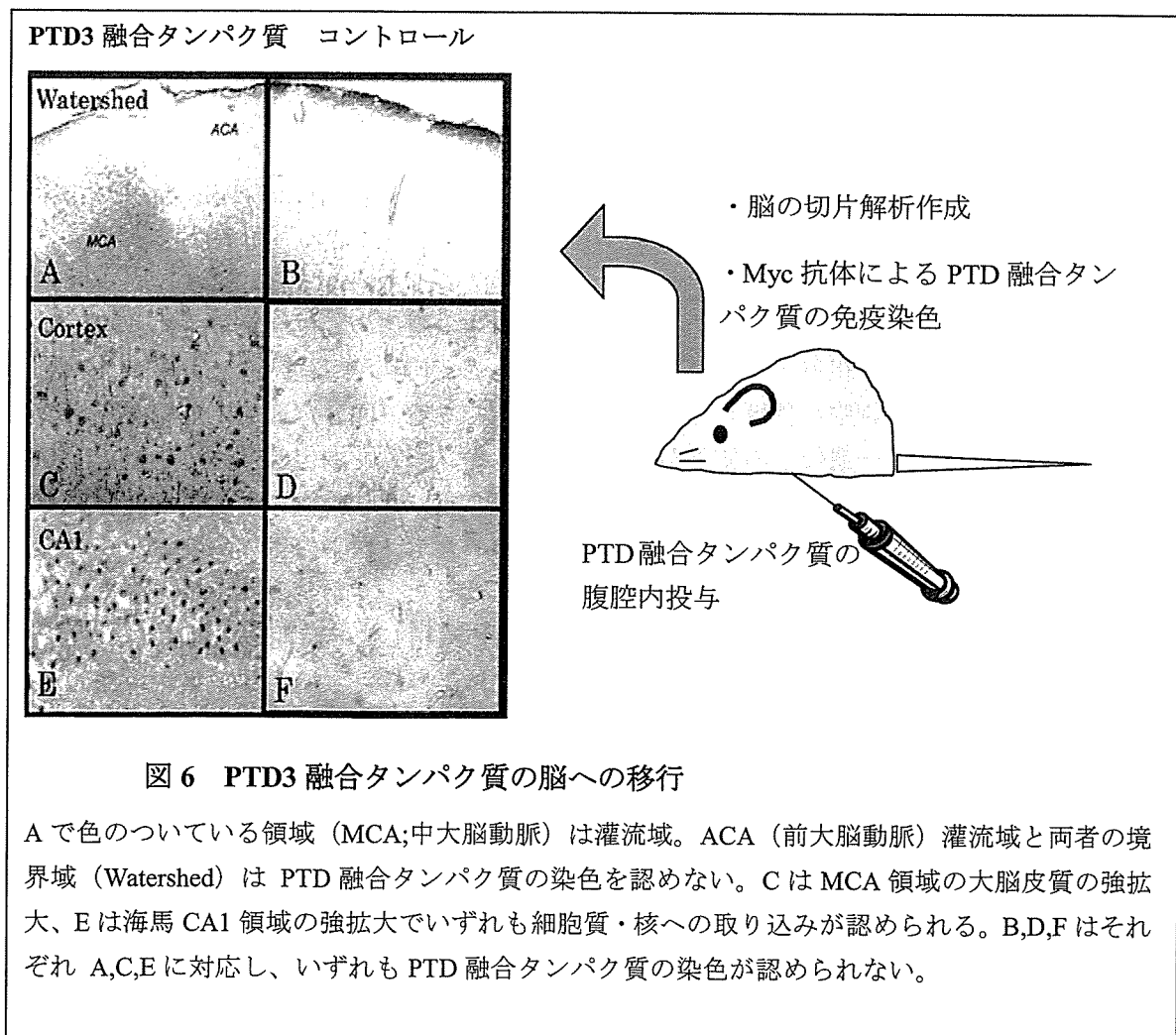


図5 PTD 融合タンパク質のアポトーシス抑制能の比較



3) 動物実験での脳内輸送の検討

PTD3 融合タンパク質 (Myc タグ付加) をマウスに腹腔内投与して脳までの輸送状態を調べた。具体的には 50mg/Kg の PTD3-Myc タンパク質を腹腔内に投与して投与後 12 時間までに脳を灌流固定し myc タグに対する抗体を用いて免疫染色を行い組織での PTD3 融合タンパク質の脳内分布を調べた。図 6 において、血管床末梢辺縁部 (A, B)、皮質 (C, D)、CAI (E, F) のいずれにおいても PTD3 融合タンパク質を投与したネズミでは融合タンパク質 (濃茶色) が確認された。これらの結果は、腹腔内投与された PTD3 融合タンパク質が血液脳関門を通過し、脳にまでデリバリーされたことを示している。

4) 光イメージングによる可視化

蛍光や化学発光を観察する方法は、細胞レベルから個体レベルに適応範囲が広がりつつある。プロモーターの制御下に蛍光タンパク質 GFP や、化学発光酵素ルシフェラーゼの遺伝子を繋いだレポーターベクターを構築し、これを安定に組み込んだがん細胞株を樹立する。この細胞を移植して形成した腫瘍内でレポーター遺伝子の発現が誘導され、レポータータンパク質の蓄積が起こる。我々は、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

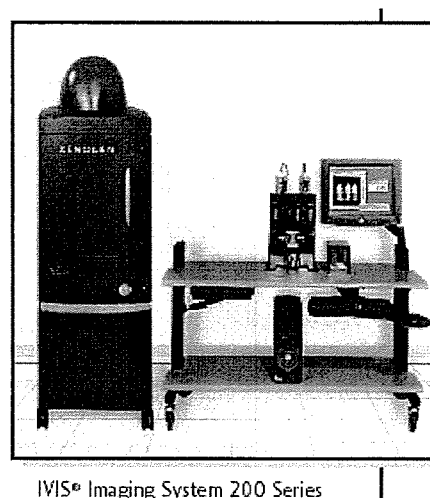


図7 Xenogen 社 IVIS200
生体イメージング装置

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) を用いて可視化することができる (図 7)。つまり、このシステムを用いることにより、同一担がんマウスの腫瘍の変化を定量的に、リアルタイムで、何度でも経時的に観察することが可能である (図 8) 近赤外蛍光標識をつけたリポソームを内包したバイオナノ粒子を構築して、実験動物に投与することにより、バイオナノ粒子の生体内動態を調べる準備を行った。リポソームは、投与後速やかに肝臓に集積し、8 時間後には腸に、24 時間後には、ほぼ完全にクリアランスされて体外に排泄されることがわかった (図 9)。