

図3 中空バイオナノ粒子の生産および精製法

いることから、薬剤、遺伝子、蛋白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、蛋白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。

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図3に示す。HBVのL蛋白質遺伝子を酵母細胞で発現させると、L蛋白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⁸⁾。このように、中空バイオナノ粒子は、蛋白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碎し、細胞破碎物などを遠心分離で除去したあとに、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繰り返すと、高純度のL粒子を精製できる。取量としては、酵母の培養液1L当たり約20mg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蛋白質から構成される⁹⁾。また、L粒子の組成は80%(重量比)が蛋白質、10%が糖質、残り10%がリン脂質(酵母小胞体膜由来)である。

L粒子は、昆虫細胞を用いて、適当な分泌シグナルとプロモーターを組み合わせることで、粒子の形で効率よく細胞外に分泌生産することも可能である¹⁰⁾。どのような生産法が最適かは、利用方法により異なるため、選択することが可能である。

中空バイオナノ粒子を用いた遺伝子のピンポイントデリバリー¹¹⁻¹³⁾

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、封入は二つの方法で行われている。すなわち、エレクトロポレーションによる方法とリボソームを用いた方法である。

エレクトロポレーションでは、高電圧パルスが付加することで、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¹¹⁾。リボソームを用いた方法では、まずリボソームに遺伝子を取り込ませ

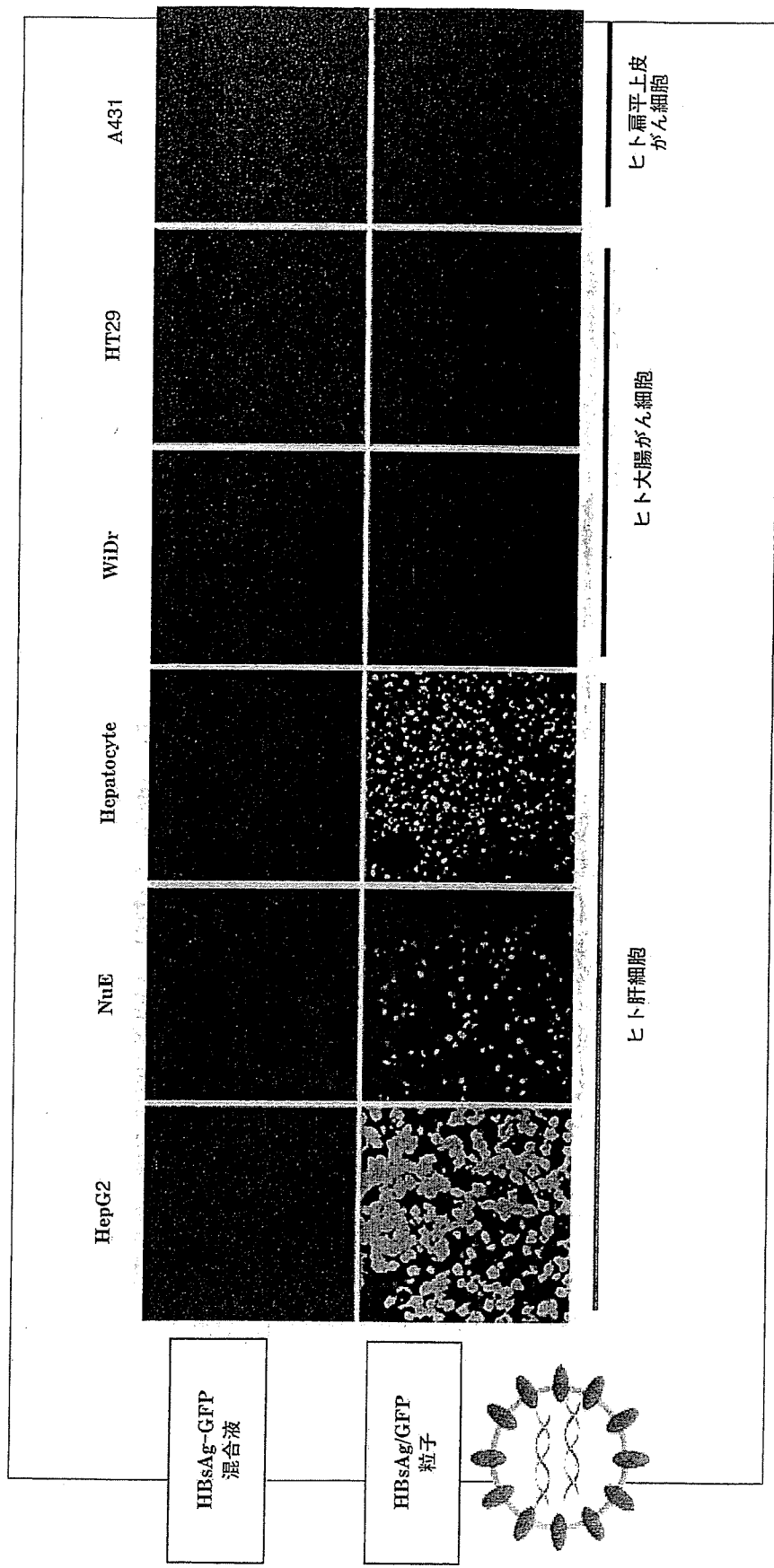


図4 培養細胞レベルでのGFP遺伝子のヒト肝細胞特異的導入

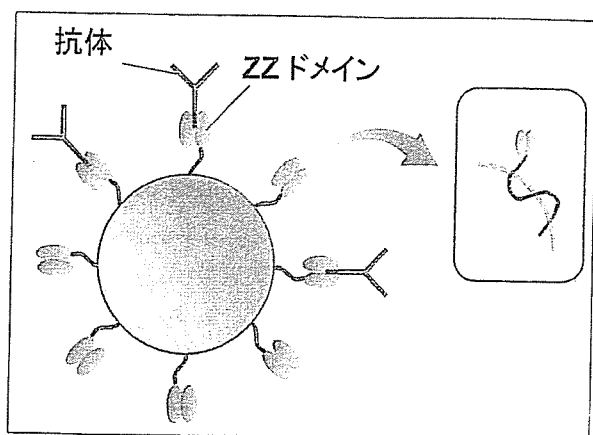


図6 ZZ提示粒子による、抗体の特異性に応じたターゲティング

いる。

抗体結合リガンドZZ(protein AのBドメインからつくられたリガンドで、分子量14,000程度)を提示した粒子の概念図を図6に示す。このZZ提示粒子は抗体を結合できるため、抗体の特異性に依りて、目的の細胞に薬剤や遺伝子を導入できることが明らかになっている。

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よばれている)ことから¹⁶⁾、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うえでは、最近大きな進展をみ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きわめて有効であろう¹⁷⁾。L粒子をリターゲ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・薬剤の送達が出来ると期待される。

産業化の試み

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(株)ビークル(本社：岡山市：www.beacle.com)を設立して進めている。当面、ビークルではつぎのような課題について、重点的な研究開発を行い、一部は数年以内に臨床試験を開始することを目標としている。

- ① L粒子内部に高濃度の抗がん剤を封入して

肝細胞特異的に投与を行うことで、肝がん治療を目指す。

- ② L粒子により、インターフェロンあるいは遺伝子を肝細胞特異的に投与することで、安全なウイルス性肝炎治療を目指す。
- ③ L粒子により、欠損蛋白質遺伝子を肝臓に導入することで、遺伝子補充療法(血友病やフェニルケトン尿症など)を目指す。
- ④ さまざまな重篤な感染症治療においては、感染細胞と非感染細胞を区別して薬物を特異的に投与することが重要である。感染細胞のみを特異的に認識する改変型L粒子を用いた安全な感染症治療を目指す。

すなわち、L粒子が持つ肝臓へのターゲティング機能を利用した治療の実用化を、最優先課題としている。さらに、各種の特異性改変型粒子を用いた、さまざまな患部へのターゲティングによる治療法を実用化することで、中空バイオナノ粒子をDDSプラットフォーム技術として産業化することを目指している。また、L粒子や改変型L粒子は、研究用試薬やイメージング用試薬としても有望であることから、さまざまな分野への波及効果の高い技術であると考えて実用化を急いでいる。

おわりに

中空バイオナノ粒子は、ウイルス表面抗原蛋白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。問題点として、中空バイオナノ粒子の免疫原性や、ウイルス感染などでB型肝炎ウイルスに対する抗体をすでに持っているヒトへの中空バイオナノ粒子の投与が難しいことがあったが、現在、HBVのエスケープミュータントを模倣する形で免疫系に認識されないステルス粒子を創生することを試み、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、基礎および産業展開の両面から研究開発を進めている。

たあと、L粒子と融合させることで封入が可能である¹⁴⁾。リポソーム法では、微粒子を含む巨大な物資の封入も可能である。

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蛋白質(GFP: 遺伝子導入により蛋白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。このように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、つぎのステップとして、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)を一つずつ移植し、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の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いっさい観察されなかった。

こうした結果は、中空バイオナノ粒子が生体内で、HBVのよう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もとに、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、単一蛋白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ⅧもしくはⅨ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Ⅸ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Ⅸ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カ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ため、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。このよう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、本来肝臓でつくられる血液凝固因子Ⅸを肝臓でつくらせたが、他の臓器由来の蛋白質でも、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に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や合成高分子ミセルと同様に安全であり、両者のよ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。

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、蛋白質と脂質からな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。たとえば、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法やリポソーム法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¹¹⁾。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。

たとえば、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上げられると期待される。また、先にも述べたように、多臓器転移がんなども網羅的に治療可能であると期待される。

中空バイオナノ粒子の蛋白質デリバリーへの利用¹⁵⁾

蛋白質をデリバリーする場合は、目的蛋白質をL蛋白質の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。この場合、融合法を適切に選ぶことで、粒子内部に目的蛋白質を封入できる。たとえば、モデル蛋白質として緑色蛍光蛋白質であるEGFPをL蛋白質の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蛋白質をL蛋白質の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。このような全身投与では副作用が出る医薬蛋白質の場合、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。

中空バイオナノ粒子のリターゲティング

中空バイオナノ粒子を構成するL蛋白質においては、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。このように、L粒子を任意の臓器に再標的化するように改造する(リターゲティング)試みも進んで

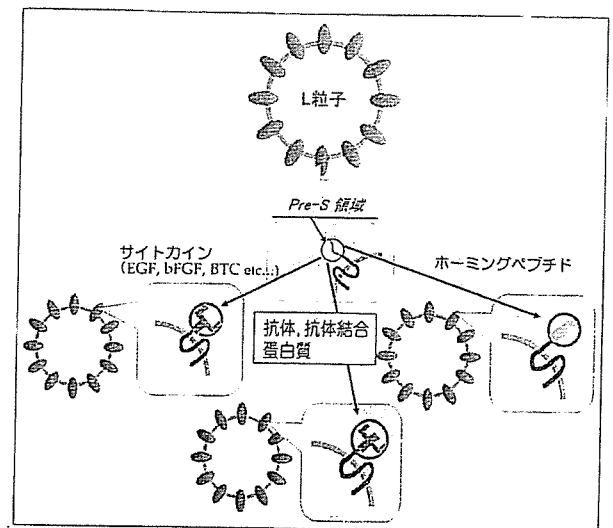


図5 中空バイオナノ粒子のリターゲティング

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蛋白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¹¹⁾。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)を用いたリターゲティングが期待されるが、これらに関しても筆者らはすでに成功して

文 献

- 1) Verma IM, Somia N : Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature* 389 : 239-242, 1997.
- 2) Marshall E : Clinical research: Gene therapy a suspect in leukemia-like disease. *Science* 298 : 34-35, 2002.
- 3) Savulescu J : Harm, ethics committees and the gene therapy death. *J Med Ethics* 27 : 148-150, 2001.
- 4) Gao X, Huang L : Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther* 2 : 710-722, 1995.
- 5) Neurath AR, Kent SB, Strick N, Parker K : Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 46 : 429-436, 1986.
- 6) Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P : 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, 1999.
- 7) De Meyer S, Gong ZJ, Suwandhi W, van Pelt J, Soumillion A, Yap SH : Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection : a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes. *J Viral Hepat* 4 : 145-153, 1997.
- 8) Kuroda S, Otaka S, Miyazaki T, Nakao M, Fujisawa Y : Hepatitis B virus envelope L protein particles. Synthesis and assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, purification and characterization. *J Biol Chem* 267 : 1953-1961, 1992.
- 9) Yamada T, Iwabuki H, Kanno T, Tanaka H, Kawai T et al. : 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, 2001.
- 10) Shishido T, Muraoka M, Ueda M, Seno M, Tanizawa K et al. : Secretory production system of bio-nanocapsules using a stably transfected insect cell line. *Appl Microbiol Biotechnol*, (in press).
- 11) Yamada T, Iwasaki Y, Tada H, Iwabuki H, Chuah M et al. : Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nature Biotechnol* 21 : 885-890, 2003.
- 12) Lawrence D : Nanotechnology takes another small step forward. *Lancet* 362 : 48, 2003.
- 13) Russel SJ : Rise of the nanomachines. *Nature Biotechnol* 21 : 872-873, 2003.
- 14) 鄭 周姫, 山田忠範, 妹尾昌治, 上田和政・他 : 化学工学会 第 37 回秋季大会. E2072, 2005.
- 15) Yu D, Amano C, Fukuda T, Yamada T, Kuroda S et al. : The specific delivery of proteins to human liver cells by engineered bio-nanocapsules. *FEBS Journal* 272 : 3651-3660, 2005.
- 16) Arap W, Kolonin MG, Trepel M : Lahdenranta J, Cardoso-Vila M et al. : Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nature Medicine* 8 : 121-127, 2002.
- 17) 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.