

2008/202/A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

ナノサイズリポソームを用いた急性心筋梗塞治療法の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 南野 哲男

平成21(2009)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

ナノサイズリポソームを用いた急性心筋梗塞治療法の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 南野 哲男

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
ナノサイズリボソームを用いた急性心筋梗塞治療法の開発に関する研究.....	1
南野 哲男	
II. 分担研究報告	
1. 抗 HB-EGF 抗体結合リボソームの細胞内取り込みの検討.....	9
浅井 知浩	
2. 糖鎖提示型バイオナノカプセル (BNC) の開発.....	13
黒田 俊一	
3. 抗 HB-EGF 抗体結合リボソームの開発.....	19
目加田 英輔	
4. 急性心筋梗塞後致死的不整脈治療を目標としたリボソーム製剤の効果評価.....	21
堀 正二	
5. リボソーム化アデノシンの急性心筋梗塞後生存率・慢性期心臓リモデリングに対する効果の検討	23
北風 政史	
6. HB-EGF を標的とした心不全に対する新規 DDS の開発.....	26
朝倉 正紀	
7. リボソーム化アデノシンの急性心筋梗塞後生存率・慢性期心臓リモデリングに対する効果の検討.....	28
金 智隆	
8. 急性心筋梗塞後致死的不整脈治療を目標としたリボソーム製剤の効果評価.....	30
浅沼 博司	
9. HB-EGF を標的とした心不全に対する新規 DDS の開発.....	32
高島 成二	
9. 急性心筋梗塞後致死的不整脈治療を目標としたリボソーム製剤の開発.....	34
蜂須 麗	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷	36

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

総括研究報告書

ナノサイズリボソームを用いた急性心筋梗塞治療法の開発（19-ナノ-一般-011）

主任研究者 南野哲男 大阪大学大学院医学系研究科・助教

研究要旨 本研究では、1) 心臓保護薬剤アデノシンのリボソーム化による障害心筋への選択的集積増強、心臓保護作用増強ならびに副作用軽減効果が生じることを見出し、2) バイオナノカプセル（BNC）を用いた心筋梗塞部位を標的とした新しいデリバリーシステム（DDS）の開発、3) HB-EGFを標的とした心不全に対する新規 DDS の開発をおこなった。最初に、電子顕微鏡にて心筋梗塞部位を詳細に検討した結果、血管内皮構造の破綻を認め、がん組織と同様に、ナノサイズリボソームの同部位への集積が期待された。そこで、麻酔下ラット心筋梗塞モデルを用いて、蛍光標識リボソームや RI 標識リボソームを用いた検討をおこない、虚血再灌流部位への特異的集積を確認した。さらに、リボソーム化により、アデノシンの血圧低下や脈拍数低下が軽減され、心筋梗塞サイズ縮小効果や致死的不整脈軽減作用が増強されることをラットならびに大型動物（イヌ）にて確認した。また、慢性期心臓リモデリング抑制効果ならびに長期生存率改善効果も認めた。現在、共同研究企業にて、Feasibility 試験を行なう準備を行なっている。

また、炎症部位周辺に引き起こされる EPR（Enhanced Permeability and Retention）効果と強い膜透過活性の相乗効果を期待して、TAT 膜透過ペプチドを提示した BNC を作製し、ルシフェラーゼ遺伝子（治療用遺伝子モデル）を封入して、同様にラットモデルに投与した。その結果、セレクチン認識抗体提示型 BNC よりも高い効率で患部の炎症部位周辺に BNC を送達することができ、有意な遺伝子発現を確認することができた。以上から、心筋梗塞部位自体への標的化にはセレクチン認識抗体提示型 BNC は適しているが、遺伝子治療などの心筋梗塞部位周辺への標的化には TAT 膜透過ペプチド提示型 BNC が適していることが強く示唆された。

さらに、膜結合型 HB-EGF が不全心にて発現が増加していることを見出した。そこで、私たちが開発した抗 HB-EGF 抗体を用いて、抗 HB-EGF 抗体修飾リボソーム（抗 HB-EGF 抗体結合リボソーム）を作成し、これまで困難であった心筋細胞への導入や HB-EGF 高発現がん細胞への細胞内送達を可能にするための新技術の開発をおこなった。抗 HB-EGF 抗体修飾リボソームを用いると、HB-EGF を発現する細胞に特異的に、効率よく目的物質を導入することができることを見出した。さらに、従来は心筋細胞への物質の導入が困難であったが、HB-EGF を高発現させた心筋細胞では、抗 HB-EGF 抗体修飾リボソームによる効率の良い細胞内取り込みが生じることを見出した。新しい治療薬、診断薬等の開発、及び遺伝子の構造、機能等の解析等への抗 HB-EGF 抗体修飾リボソームの応用が期待できる。

【研究分担者】

浅井 知浩 静岡県立大学 薬学部
講師

黒田 俊一 大阪大学産業化学研究所
生体応答科学研究部門
准教授

- 堀 正二 大阪府立成人病センター
総長
- 北風 政史 国立循環器病センター
臨床研究開発部 部長
- 朝倉 正紀 国立循環器病センター
臨床研究開発部 医長
- 金 智隆 国立循環器病センター
心臓血管内科 医長
- 浅沼 博司 近畿大学医学部附属病院
救急診療科 医学部講師
- 高島 成二 大阪大学 分子心血管医学
准教授
- 蜂須 麗 北海道システムサイエンス株式会社
バイオ事業本部
バイオ受託解析グループ
リボソーム学 研究員
- 目加田 英輔 大阪大学微生物研究所
生体防御研究部門
教授

A. 研究目的

本研究の目的は、1) 心臓保護薬剤アデノシンのリボソーム化による心臓保護作用増強ならびに副作用軽減効果、2) バイオナノカプセル (BNC) を用いた心筋梗塞部位を標的とした新しいデリバリーシステム (DDS) の開発、3) HB-EGF を標的とした心不全に対する新規 DDS の開発である。

B. 研究方法

1. 心臓保護薬剤アデノシンの障害心筋への選択的集積による心臓保護作用の増強ならびに副作用軽減の検討

1-1) リボソームの虚血再灌流後心筋への集積の検討

ラット心筋虚血再灌流モデルは、Bullard et al., Basic Res Cardiol. (2005)の方法に従って作製した。具体的には、9週齢の Wister 系ラットをペントバルビタール 50mg/kg 腹腔内投与で麻酔を行い、気管内挿管を行い人工呼吸開始した後、鼠径静脈にカニューレーションを行い、静脈路

を確保する。開胸した後、左冠動脈左前下行枝 (LAD) を結紮し虚血心を作製し、心電図をモニターし、心室細動発症時には心臓を直接マッサージする。30分後、結紮を開放し再灌流を行うと心筋梗塞部位が誘導される。蛍光標識リボソームは再灌流10分前から静脈内投与をおこなった。投与3時間後に、組織学的検討ならびに in vivo イメージングにて虚血再灌流領域へのリボソーム集積を評価し、TTC 染色にて心筋梗塞サイズを測定した。同時に、電子顕微鏡にて、心筋梗塞部位での血管内皮の破綻の有無を検討した。

1-2) リボソーム化アデノシンの血行動態へおよび影響の検討

ラットを用いて、アデノシンとリボソーム化アデノシンの血圧、脈拍に及ぼす影響を用量依存的 (225-900 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min} \times 10$ 分間) に検討した。

1-3) リボソーム化アデノシンの心筋梗塞サイズ縮小効果・致死的不整脈軽減効果の検討

上記のラット心筋梗塞モデルを用いて、アデノシン、リボソーム化アデノシン (450 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min} \times 10$ 分間) の心筋梗塞サイズに及ぼす影響を検討した。さらに、麻酔開胸犬を用いて、アデノシン、リボソーム化アデノシンの心室細動抑制効果を検討した。

1-4) リボソーム化アデノシンの梗塞後左室リモデリング・生存率改善効果の検討

上記のとおり、心筋梗塞モデルを作成し、大腿静脈よりリボソーム化アデノシンを持続投与した。心筋虚血再灌流モデル作製日又はモデル作製翌日を起算日とし、生存率は3ヶ月間 (14週間) 観察した。

2. バイオナノカプセルを用いた心筋梗塞部位を標的とした新しいデリバリーシステムの開発
2-1) 抗体提示用 BNC (ZZ-BNC)

Staphylococcus aureus 由来 Protein A の IgG Fc 結合領域 (Z ドメイン) をタンデムに結合した分子 (ZZ ドメイン) を、ヒト肝臓特異的 BNC

(オリジナル BNC) の外周に提示されている HBV 由来ヒト肝臓特異的レセプター部位 (Pre-S 領域) と遺伝子工学的に置換し、遺伝子組換え酵母で大量生産させた後、BNC と同じ手法で精製して抗体提示用 BNC (ZZ-BNC) を得た (Muraoka et al., 投稿中)。本 ZZ-BNC は、直径約 80nm のカプセル状粒子で、表面には ZZ ドメインが約 130 個提示されている (Iijima et al., 投稿中)。

2-2) 抗セレクチン抗体提示型 Cy7 標識 ZZ-BNC

ZZ-BNC の外周に露出している Lys 残基 (ϵ アミノ基) に対して Cy7 (近赤外波長蛍光分子)-NHS エステルを作用させて、Cy7-標識 ZZ-BNC を作製した。その後、セレクチン P 抗体を加えて、抗体-ZZ-BNC 間を結合した。

2-3) TAT 膜透過ペプチド提示 BNC

凍結乾燥した精製 ZZ-BNC をタンパク質濃度で 1 mg/ml となるように滅菌蒸留水に溶解した。ZZ-BNC 溶液 1 mg (タンパク質として 0.02 μ mol) に対して EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (NHS-Biotin, Thermo Fisher Scientific) を 0.67 mg (1.34 μ mol) を混和して室温で 1 時間反応させた。反応液を 10 ml Sephadex G-25 Fine (GE Healthcare, Niskayuna, NY, USA) を充填した Econo-Pac Disposable Chromatography Columns (BIO-RAD, Hercules, CA) に負荷後、PBS(-)により溶出した。NHS-Biotin の ZZ-BNC 表面への結合量は、EZ Biotin Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。得られた biotin 標識 ZZ-BNC (bio 標識 BNC) はエッペンドルフチューブに 100 μ g (タンパク質量として) ずつ分注し、終濃度 5% (容量比) になるように 25% (容量比) sucrose 溶液を加えて凍結乾燥し、使用時まで -20°C にて遮光して保存した。

Neutravidin (NA, Thermo Fisher Scientific) とビオチン化 TAT 膜透過型ペプチド (biotin-YGRKKRRQRRR (bio-TAT, Invitrogen, Carlsbad, CA) を蒸留水で 1 mg/ml の濃度に溶解

した。ビオチン化標識ペプチド 1 mg に対し NA をモル比で 1 : 0.1 の割合で混和し、室温で 30 分間反応させることによりペプチド-NA 複合体を形成させた。次いで bio 標識 BNC を ZZ-HBsAg L タンパク質と NA が同じモル数になるようにペプチド-NA 複合体に添加し、室温で 30 分反応後、TAT 膜透過ペプチド提示型 BNC を調製した。

2-4) ルシフェラーゼ発現遺伝子の封入

Jung ら (J Control Release (2008)) の方法に従って、Coatsome EL-01-D (脂質として) 300 μ g とルシフェラーゼ発現ベクター pCAG-Luc3 (CAG プロモーター利用: 静岡県立大学薬学部奥先生より供与) 50 μ g 及び抗セレクチン抗体提示型/TAT 膜透過ペプチド提示型 ZZ-BNC (タンパク質量として) 100 μ g を複合体化して調製した。

2-5) 投与と観察

上記、BNC-脂質-DNA 複合体 (DNA 量 50 μ g) を生理食塩水で 1 ml とする。ラット心筋虚血再灌流モデルにおいて、30 分間の虚血の際、再灌流 5 分前から鼠径静脈のカニューレ部位よりインジェクターを用いて 100 μ l/min の速度で 10 分間 (1 ml) かけて同複合体を投与した。再灌流 48 時間後に、生理食塩水で冠動脈を灌流洗浄後、心臓摘出し、梗塞部位、梗塞境界部位、非梗塞部位を分別し、また脾臓 (陰性対照) を取り出した。

その後、各臓器を PBS で洗浄した後、組織の 3 倍量 (μ l/mg 組織タンパク質量) の Lysis Buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.8), 0.1% (v/v) Triton X-100, 2 mM EDTA) を加え、各組織を氷上で破碎し、15000 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 30 分間遠心した。各破碎上清液の luciferase の発現レベルを調べるために、Luciferase Assay System (Promega) を用いて各臓器内のルシフェラーゼ活性測定を行った。具体的には、破碎上清液 10 μ l にルシフェラーゼ基質 100 μ l を加え、ルミノメーターを用いて 10

秒間発光量を測定した。また、タンパク質量は Micro BCA Protein Assay Kit (SIGMA) を用いて測定し、単位タンパク質量あたりのルシフェラーゼ活性 (RLU/mg タンパク質) で各破碎上清液のルシフェラーゼ活性を比較した。

2-6) 倫理面への配慮

本動物実験に関しては、大阪大学動物実験委員会の承認を得た後、大阪大学の定めた実験動物取扱指針に従って行った。

3. HB-EGF を標的とした心不全に対する新規 DDS の開発

3-1) ラット心筋細胞におけるヒト HB-EGF 発現の確認

ヒト HB-EGF、マウス HB-EGF を発現するアデノウイルスを心筋細胞に感染させ、36時間または48時間後に細胞を回収し、心筋細胞においてこれらのリコンビナント蛋白質が発現しているかを、抗 HB-EGF マウスモノクローナル抗体 (クローン 3H4) を用いて非還元条件での Western Blot 法にて検討した。

3-2) ラット心筋細胞におけるヒト HB-EGF 発現の確認

引き続き、これらのアデノウイルス由来 HB-EGF が心筋細胞において細胞膜表面に発現しているかを検討した。ヒト HB-EGF、マウス HB-EGF を発現するアデノウイルスを心筋細胞に感染させ、36時間後に4%パラホルムアルデヒドで固定したのち前述のモノクローナル抗体 3H4 にて免疫染色を行った。抗体 3H4 は遊離型 HB-EGF を抗原としているため膜結合型では細胞外領域を認識する。そこで本実験では、Triton X-100 による permeabilization を行わず、細胞膜表面に発現している HB-EGF を認識できるように免疫染色を行った。

3-3) 抗 HB-EGF 抗体リポソームの心筋細胞内への取り込み

新生仔ラットより心筋細胞を単離し培養48時間後に、ヒトまたはマウス HB-EGF、LacZ アデノウイルスを感染させた。さらに36時間後、蛍光

標識された抗 HB-EGF 抗体リポソーム (HB-EGF-PEG-liposome; HSPC/Chol/DSPE-PEG /DSPE-PEG-mal/DiI=1/0.67/0.03/0.003/0.05) またはコントロールリポソーム (PEG-liposome; HSPC/Chol/DSPE-PEG/DiI=1/0.67/0.03/0.05) を無血清培地の心筋細胞に加え、37℃または4℃で4時間インキュベートした。37℃インキュベートでは細胞内へリポソームが取り込まれ、4℃ではリポソームは細胞表面に接着するが細胞内への取り込みは行われないことが知られている。PBS で細胞を洗浄し培地中のリポソームを除去したのち、細胞を溶解して蛍光強度を励起波長 549nm、発光波長 592nm で測定した。

C. 研究結果

1-1) リポソームの虚血再灌流後心筋への集積の検討

電子顕微鏡にて心筋梗塞部位を詳細に検討した結果、血管内皮構造の破綻を認め、がん組織と同様に、ナノサイズリポソームの同部位への集積が期待された。実際、in vivo イメージング法を用いた観察の結果、TTC 染色によって確認しえた梗塞部位に一致して、リポソームが心筋梗塞部位特異的に集積していることが分った。また、蛍光標識リポソームを用いた組織学的にても、心筋梗塞部位への特異的な集積が確認できた。

1-2) リポソーム化アデノシンの血行動態へおよび影響の検討

アデノシン投与により、用量依存的に全身血圧ならびに脈拍数の低下が認められた。アデノシンと比較して、リポソームアデノシンの血圧低下効果ならびに徐脈化は著しく軽減した。

1-3) リポソーム化アデノシンの心筋梗塞サイズ縮小効果・致死的不整脈軽減効果の検討

アデノシン単独と比較して、リポソーム化アデノシンの心筋梗塞縮小効果は増強された。リポソーム化アデノシンによる虚血再灌流障害抑制効果は、非選択的アデノシン受容体拮抗剤の同時投与にて消失した。さらに、麻酔開胸犬を

用いた検討でも、リポソーム化アデノシン投与群では、有意に心筋梗塞サイズの縮小が認められた。さらに、興味深いことに、リポソーム化アデノシンは致死的不整脈である心室細動の発生頻度を有意に抑制した。

1-4) リポソーム化アデノシンの梗塞後左室リモデリング・生存率改善効果の検討

コントロール群 25 例、Liposomal adenosine 投与群 28 例で評価した。血圧 (SBP, DBP, MBP) はコントロール群でそれぞれ 128 ± 3 mmHg, 109 ± 3 mmHg, 115 ± 3 mmHg であった。Liposomal adenosine 投与群の血圧はそれぞれ 133 ± 3 mmHg, 111 ± 3 mmHg, 119 ± 3 mmHg を示し、コントロール群に対して変化は認められなかった。HR はコントロール群で 419 ± 7 beats/min であった。Liposomal adenosine 投与群の HR は 420 ± 7 beats/min を示し、コントロール群に対して変化は認められなかった。LVSP は Control 群で 131 ± 3 mmHg であった。Liposomal adenosine 投与群の LVSP は 136 ± 3 mmHg を示し、Control 群に対して変化は認められなかった。LVdP/dt はコントロール群で 7365 ± 258 mmHg/sec であった。Liposomal adenosine 投与群の LVdP/dt は 7773 ± 238 mmHg/sec を示し、コントロール群に対して軽度な上昇 (Control 群に対する変化率: 106%) が認められた。-LVdP/dt は Control 群で 5206 ± 217 mmHg/sec であった。Liposomal adenosine 投与群の -LVdP/dt は 5794 ± 220 mmHg/sec を示し、コントロール群に対して軽度な上昇 (コントロール群に対する変化率: 111%) が認められた。LVEDP はコントロール群で 5.7 ± 1.2 mmHg であった。Liposomal adenosine 投与群の LVEDP は 4.5 ± 1.0 mmHg を示し、Control 群に対して軽度な低下 (Control 群に対する変化率: 79%) が認められた。

14 週間の生存率は、Control 群 86% (生存数: 25/29 例)、Liposomal adenosine 投与群 100% (生存数: 28/28 例) であった。Liposomal adenosine 投

与群は Control 群に比べて生存率の有意な改善が認められた。

2-1) 抗体提示用 BNC (ZZ-BNC)

抗セレクチン抗体提示型 ZZ-BNC による BNC-脂質-DNA 複合体 (DNA 量 $50 \mu\text{g}$)、及び陰性対照として未提示 ZZ-BNC による BNC-脂質-DNA 複合体 (DNA 量 $50 \mu\text{g}$) を用いて、ラット心筋虚血再灌流モデルに静脈注射したところ、非梗塞部位でのルシフェラーゼ発現量を 100% とすると、抗セレクチン抗体提示型 BNC は梗塞部位での遺伝子発現が有意に低かった。一方、陰性対照 BNC は梗塞部位での発現は高かった。また、両 BNC とも対照臓器の脾臓においては同程度に弱く発現していた。抗セレクチン抗体提示型 BNC は、昨年度と同様な Cy7 蛍光標識 BNC による生体内イメージングの結果では、有意に心筋梗塞部位に集積していた。以上の結果は、心筋梗塞部位は極度の炎症が生じていて、当該心筋細胞は抗セレクチン抗体提示型 BNC により遺伝子を導入されても発現させる能力が既に低下していると考えられた。そこで、抗セレクチン抗体提示型 BNC は心筋梗塞部位への薬剤投与には適しているが、遺伝子導入には不向きと考えられた。次に、炎症部位を直接認識する抗セレクチン抗体を使用せず、EPR 効果と膜透過ペプチドを BNC に適用することで、心筋梗塞部位近傍に遺伝子導入を行うことを目指した。

2-1) TAT 膜透過ペプチド提示型 BNC :

TAT 膜透過ペプチド提示型 BNC による BNC-脂質-DNA 複合体 (DNA 量 $50 \mu\text{g}$)、及び陰性対照として未提示 BNC による BNC-脂質-DNA 複合体 (DNA 量 $50 \mu\text{g}$) を用いて、ラット心筋虚血再灌流モデルに静脈注射した。その結果、非梗塞部位のルシフェラーゼ活性に対して梗塞部位での同活性が TAT 膜透過ペプチド提示型 BNC 特異的に 5~10 倍上昇していた。

この結果から、TAT 膜透過ペプチド BNC が、

EPR 効果によって炎症状態の心筋梗塞部位に侵入し、TAT ペプチドの効果により心筋梗塞部位近傍の心筋細胞にまでルシフェラーゼ発現ベクターを導入させたものと推察された。

3-1) ラット心筋細胞におけるヒト HB-EGF 発現の確認

ヒトHB-EGFタンパク質は心筋細胞において感染容量依存的に発現していることが明らかとなった。さらにマウスHB-EGFアデノウイルスを感染させた心筋細胞では、マウスHB-EGFを認識せず、内因性のラットHB-EGFも認識しないことを確認した。マウスHB-EGFは、市販のポリクローナル抗体を用いたWestern Blotでは検出されたため、本実験に使用したモノクローナル抗体はヒトHB-EGFを特異的に認識していることを明らかにした。

3-2) ラット心筋細胞におけるヒト HB-EGF 発現の確認

ヒトHB-EGFを発現させた心筋細胞では、HB-EGFが細胞膜表面に感染容量依存的に発現していることが明らかとなった。Western Blotによる検討と同様に、マウスHB-EGFを発現させた心筋細胞では、細胞膜表面のマウスHB-EGFは認識されなかった。

3-3) 抗HB-EGF抗体リボソームの心筋細胞内への取り込み

ヒトHB-EGFアデノウイルスを感染させた心筋細胞を、37℃で抗HB-EGF抗体リボソームとインキュベートした場合、濃度依存的に蛍光強度の増加が認められた。コントロールリボソームではほとんど変化を認めなかった。またLacZやマウスHB-EGFアデノウイルスを感染させた心筋細胞では、抗HB-EGF抗体リボソームとインキュベートした場合でも蛍光強度の変化は見られなかった。一方4℃で抗HB-EGF抗体リボソームとインキュベートした場合、ヒトHB-EGFを発現する心筋細胞では、蛍光強度の濃度依存的な増大を認めたが、37℃のそれに比して2-3倍低い蛍光強度であった。ここでもマウスHB-EGFを発現

する心筋細胞では蛍光強度の変化を認めなかった。これらのことからヒトHB-EGFを発現する心筋細胞では、抗HB-EGF抗体リボソームが特異的にヒトHB-EGFに結合し、細胞内に取り込まれていることが明らかとなった。

D. 考察

リボソーム化アデノシンの心筋梗塞サイズ縮小効果ならびに致死的不整脈軽減効果がラットのみならず大型動物(イヌ)でも確認できた。また、アデノシンによる血圧低下・徐脈化作用などの副作用も軽減された。さらに、リボソーム化アデノシン投与にて、梗塞後生存率の改善が認められた。以上より、リボソーム化アデノシンの優れた作用が明らかになったため、企業連携を視野に入れ、前臨床試験の開始を準備する。

抗HB-EGF抗体リボソームはヒトのHB-EGFを特異的に認識して心筋細胞内に取り込まれることから、ヒトHB-EGFの発現が亢進しているヒトの不全心筋では、抗HB-EGF抗体リボソームを用いての薬剤やsirRNAのデリバリーが期待できるものと考えられる。本年度では前述した昨年度のin vitroにおける成果に加え、さらなる臨床応用のための実験を行いたいと考える。ヒトHB-EGF過剰発現マウスを用いて、in vivoにおいて抗HB-EGF抗体リボソームが効率的に心筋細胞へ取り込まれるかを検討していく予定である。

今回の結果は、抗BNC抗体及び抗アポトーシス関連抗原抗体による心筋梗塞部位及び近傍の免疫組織化学的解析が必須であるが、心筋細胞内にルシフェラーゼ発現ベクターが導入されて初めてルシフェラーゼが発現することから、次の様に解釈される。

まず心筋梗塞部位は極めて強い炎症が起こっており、心筋細胞は正常な遺伝子発現が出来ないくらいにダメージを受けていると推察される。抗セレクチン抗体提示型ZZ-BNCは、Active Targeting機構により心筋梗塞部位に効率よく集積できるが、遺伝子発現を誘導することはでき

ない。本 BNC は心筋梗塞部位の中心に薬剤を放出するのに適しているものと考えられる。この場合、膜融合活性の高いリン脂質によるリポソームを使用すれば心筋細胞内に、同活性の低いリン脂質を用いれば間質部分に投与できると考えられる。

次に、TAT 膜透過ペプチド提示型 BNC は、心筋梗塞部位の炎症作用により EPR 効果が誘導され、Passive Targeting 機構により心筋梗塞部位に集積し、その後、TAT 膜透過ペプチドの作用により梗塞部位近傍の心筋細胞にまで伝播・浸潤し、心筋細胞内での遺伝子発現が達成できると考えられる。つまり、抗セレクチン抗体提示型 ZZ-BNC 及び TAT 膜透過ペプチド提示型 BNC は、心筋梗塞治療において、どのような治療用薬剤（遺伝子を含む）を送達したいかによって使い分ける必要があり、その結果、心筋梗塞治療法の可能性を大きく広げるものと思われた。

E. 結論

本研究では、心臓保護薬剤アデノシンのリポソーム化による障害心筋への選択的集積、心臓保護作用増強ならびに副作用軽減を明らかにした。今後、企業との連携を視野に入れながら、前臨床試験を進めていく。また、バイオナノカプセルを用いて心筋梗塞部位を標的とした新しいデリバリーシステムの開発をおこなった。さらに、抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームの細胞内取り込み促進作用は、HB-EGF 高発現が認められる不全心筋細胞や婦人科腫瘍（卵巣がん、子宮がん、乳がん細胞）への選択的デリバリーに有用である可能性が示唆された。抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームに薬物や siRNA のような核酸を封入することにより、画期的な治療薬の開発に繋がる可能性がある。本研究は、今後、循環器疾患に対するナノテクリポソームを用いた治療法開発の中心的グループとして知的財産創出・新しい医療開発に貢献したい。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asai, M., Tsukamoto, O., Minamino, T., Asanuma, H., Fujita, M., Asano, Y., Takahama, H., Sasaki, H., Higo, S., Asakura, M., et al. (2008). PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in in vivo canine hearts. *J Mol Cell Cardiol.*
- 2) Takahama H, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Asai T, Wakeno M, Sasaki H, Kikuchi H, Hashimoto K, Oku N, Asakura M, Kim J, Takashima S, Komamura K, Sugimachi M, Mochizuki N, Kitakaze M. Prolonged Targeting of Ischemic/reperfused Myocardium by Liposomal Adenosine Augments Cardioprotection in Rats *J Am Coll Cardiol.* 2008 (in press)
- 3) Fu HY, Minamino T, Tsukamoto O, Sawada T, Asai M, Kato H, Asano Y, Fujita M, Takashima S, Hori M, Kitakaze M. Overexpression of endoplasmic reticulum-resident chaperone attenuates cardiomyocyte death induced by proteasome inhibition. *Cardiovasc Res.* 2008 Sep 1;79 (4) :600-10.

2. 学会発表

- 1) 第 17 回 DDS カンファレンス (2008 年 9 月 静岡)
特別講演
ナノテクノロジーを用いた新しい心筋梗塞治療法の開発
- 2) 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会 (2009 年 大阪)
Topic 3 <Latest Development of Nanotechnology Revolutionizes Treatments of Cardiovascular Diseases>

Nano-size liposomes can specifically
target ischemic/reperfused myocardium

Minamino T, Takahama H, Asai T.

Circulation Journal Vol. 72 (Suppl. 1), Page
15, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

<出願>

特願 2009-23653 (出願日：2009年2月4日)

発明の名称：HB-EGF 結合性タンパク質複合体

発明者：南野哲男、目加田英輔、浅井知浩、高
島成二、朝野仁裕

研究要旨 本研究では、不全心筋への選択的ドラッグデリバリーシステムを構築することを目的とし、膜結合型ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子（HB-EGF）に対する抗体を結合したイムノリボソームの開発を行った。HB-EGF は不全心筋細胞や婦人科腫瘍（卵巣がん、子宮がん、乳がん）において高発現していることが知られ、HB-EGF をターゲットにしたイムノリボソームはこれら疾患に対する有効なドラッグキャリアーとなりうる可能性が高い。本年度は、イムノリボソームの評価に HB-EGF を強制発現させた Vero 細胞（Vero-H 細胞）を用いた。まずはウエスタンブロッティング法により、Vero-H 細胞における HB-EGF の高発現を確認した。次に、蛍光標識イムノリボソームを用い、細胞接着量、細胞内移行量を検討し、さらには取り込みの様子を共焦点レーザー顕微鏡により 3 次元観察した。その結果、イムノリボソームは対照リボソームと比較し、Vero-H 細胞において顕著な細胞膜接着ならびに細胞内取り込み効果を示した。以上より、抗 HB-EGF 抗体修飾リボソームは細胞膜上の HB-EGF を介し、取り込み量を著しく亢進することが示唆された。

一方、本研究では、心筋梗塞に伴う致死的不整脈の治療薬である薬物 X のリボソーム化を試みた。薬物 X は、強力な不整脈抑制効果をもつが、重篤な副作用が課題となっている。そこで本研究では、薬物 X の心筋梗塞部位への選択的集積による不整脈抑制作用の増強ならびに副作用軽減を目指し、リボソーム化薬物 X の開発を行った。薬物 X は脂溶性が高い化合物であることから、リボソーム化には脂質 2 重膜相への封入が有効であると考えた。本年度は、リボソーム脂質組成と薬物封入効率の関係、薬物添加量と薬物封入効率の関係について検討し、薬物 X のリボソーム化に適す脂質組成を決定した。調製したリボソーム化薬物 X の粒子径は約 100 nm、表面電位は中性、封入効率は 80%以上であった。心筋梗塞部位では Enhanced permeability and retention（EPR）効果による選択的デリバリーが可能であるゆえ、本研究で開発したリボソーム化薬物 X は、不整脈治療薬としては初のリボソーム DDS 製剤として期待される。

A. 研究目的

【抗 HB-EGF 抗体修飾リボソームの開発】

膜結合型ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子（HB-EGF）は不全心筋細胞や婦人科腫瘍（卵巣がん、子宮がん、乳がん）において発現が上昇

しているため、HB-EGF をターゲットにしたイムノリボソームはこれらの疾患に対する有効なドラッグキャリアーとなりうる可能性が高い。本研究では、不全心筋への選択的ドラッグデリバリーシステムを構築することを目的とし、

HB-EGF に対する抗体を結合したイムノリポソームの開発を試みた。本年度は、調製したイムノリポソームの評価に HB-EGF を強制発現させた Vero 細胞 (Vero-H 細胞) を用い、主に抗体修飾による取り込み促進効果について検討を行った。

【リポソーム化薬物 X の開発】

心筋梗塞に伴う致死的不整脈の治療薬である薬物 X のリポソーム化を試みた。薬物 X は、強力な不整脈抑制効果をもつが、重篤な副作用が課題となっている。そこで本研究では、薬物 X の心筋梗塞部位への選択的集積による不整脈抑制作用の増強ならびに副作用軽減を目的とし、リポソーム化薬物 X の開発を行った。本年度は主にリポソーム化薬物 X の構成脂質組成について検討を実施した。

B. 研究方法

(1) 蛍光標識抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームの調製

薄膜法によって作成した混合脂質フィルム (DPPC/コレステロール/PEG-DSPE/マレイミド化 PEG-DSPE/Dil) にリン酸緩衝液を加えて水和し、リポソームを調製した。凍結融解を 3 回繰り返した後、エクストルーダーを用いて粒子径を約 100 nm に調整した。Fab' 化抗 HB-EGF 抗体をマレイミド化 PEG-DSPE と等モルとなるようにリポソーム溶液に添加し、4℃で 20 時間反応した。Fab' 化抗 HB-EGF 抗体の 10 倍モル量の 0.1M N-エチルマレイミドを添加し、未反応のスルフヒドリル基を阻害した。セファロース担体を用いたゲル濾過により、蛍光標識抗 HB-EGF 抗体結合リポソームを精製した。

(2) 接着・取り込み試験

Vero 細胞あるいは Vero-H 細胞を 3×10^4 cells/well となるように 24-well プレートに播種し、前培養した。培養液を取り除き、蛍光標識抗 HB-EGF 抗体結合リポソームあるいは対照リ

ポソームを含む非必須アミノ酸含有 MEM 培地を添加した。4 (接着試験) あるいは 37℃ (取り込み試験) にて 4 時間インキュベートした後、PBS を用いて 3 回細胞を洗った。細胞溶解用緩衝溶液 [0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含むトリス-塩酸緩衝溶液] を加えることにより、細胞を溶解した。細胞溶解液は遠心チューブに回収し、1,000 g で 10 分間遠心後、その上清を回収した。サンプルの蛍光強度を蛍光光度計で測定した後、その蛍光強度をタンパク質量で補正した。

リポソームが細胞内に取り込まれていることの確認は、共焦点レーザー顕微鏡を用いた 3 次元解析によって行った。

(3) リポソーム化薬物 X の調製

薬物 X を含む様々な組成の脂質混合溶液を調製した後、薄膜法によって混合脂質フィルムを作成した。リン酸緩衝スクロース溶液を加えて水和し、リポソームを調製した。凍結融解を 3 回繰り返した後、エクストルーダーを用いて粒子径を約 100 nm に調整した。薬物 X の定量は、リポソームをトリトン X-100 で可溶化した後、240 nm における吸光度を測定することによって行った。

(4) リポソームの物性測定

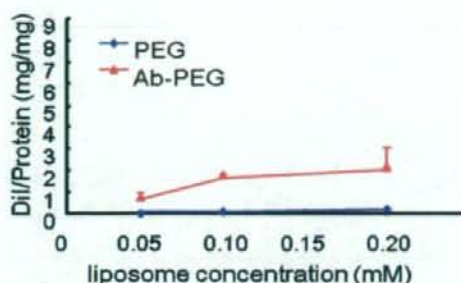
リポソームの粒子径および電位はゼータサイザーナノ ZS (MALVERN) を用いて測定した。

C. 研究結果

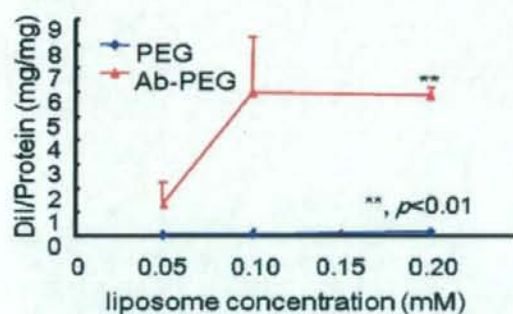
(1) 抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームを用いた接着・取り込み試験

抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームは、対照リポソームと比較し、HB-EGF 高発現細胞株において高い細胞接着性を示し (data not shown)、さらに図に示すように高い細胞内移行性を示した。リポソームが細胞内に取り込まれている様子は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて確認した (data not shown)。

Vero 細胞



Vero-H 細胞



上図：Vero 細胞（HB-EGF 低発現）では、抗 HB-EGF 抗体修飾リボソームの細胞内への取り込みは、対照のリボソームの取り込みをわずかに上回るのみである。

下図：Vero-H 細胞（HB-EGF 高発現）では、抗 HB-EGF 抗体修飾リボソームの細胞内への取り込みは、対照のリボソームの取り込みを大きく上回る。

(2) リボソーム化薬物 X の開発

薬物 X のリボソーム脂質 2 重膜相への封入効率を指標にし、薬物 X のリボソーム化に適す基本構成脂質の組成について検討した。その結果、薬物 X のリボソーム化には不飽和脂肪酸 POPC が有用であることが明らかとなった (data not shown)。また、同様に封入効率を指標にし、薬

物 X の添加量について検討したところ、薬物添加量が 20 モル%以下において安定なりボソーム化薬物 X を調製できることが明らかとなった (data not shown)。POPC/コレステロールを基本組成とし、薬物 X を 10 モル%添加して調製したリボソーム化薬物 X は、粒子径が 102 nm、表面電位が -3.7 mV であり、その際の封入効率は 80% 以上であった。このリボソーム化薬物 X を用い、実験動物において不整脈抑制効果を検討することにした。

なお、リボソーム化薬物 X の不整脈抑制効果は、本課題研究の研究代表者によって実施された。その結果、薬物 X のリボソーム化により、薬物 X と比較して不整脈の発生頻度低下効果と死亡率改善効果が得られている。

D. 結論

【抗 HB-EGF 抗体修飾リボソームの開発】

抗 HB-EGF 抗体修飾リボソームの細胞内取り込み促進作用は、HB-EGF 高発現が認められる不全心筋細胞や婦人科腫瘍（卵巣がん、子宮がん、乳がん細胞）への選択的デリバリーに有用である可能性が示唆された。抗 HB-EGF 抗体修飾リボソームに薬物や siRNA のような核酸を封入することにより、画期的な治療薬の開発に繋がる可能性がある。

【リボソーム化薬物 X の開発】

本年度の研究成果により、リボソームの物性ならびに薬物封入効率に優れるリボソーム化薬物 X の調製が可能となった。本研究で開発したリボソーム化薬物 X は、不整脈抑制作用の増強ならびに副作用軽減に繋がる不整脈治療薬としては初のリボソーム DDS 製剤になりうる可能性がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahama, H., Minamino, T., Asanuma, H., Fujita, M., Asai, T., Wakeno, M., Sasaki, H.,

- Kikuchi, H., Hashimoto, K., Oku, N., Asakura, M., Kim, J., Takashima, S., Komamura, K., Sugimachi, M., Mochizuki, N., Kitakaze, M.: Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats. *J Am Coll Cardiol.*, **53**, vessel-targeted polyethyleneglycol-shielded liposomal DPP-CNDAC. *Cancer Sci.*, **99**, 1029-1033. (2008)
- 3) Asai, T., Suzuki, Y., Matsushita, S., Yonezawa, S., Yokota, J., Katanasaka, Y., Ishida, T., Dewa, T., Kiwada, H., Nango, M., Oku, N.: Disappearance of the angiogenic potential of endothelial cells caused by Argonaute2 knockdown. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **368**, 243-248 (2008)
- 4) Koide, H., Asai, T., Hatanaka, K., Urakami, T., Ishii, T., Kenjo, E., Nishihara, M., Yokoyama, M., Ishida, T., Kiwada, H., Oku, N.: Particle size-dependent triggering of accelerated blood clearance phenomenon. *Int. J. Pharm.*, **362**, 197-200. (2008)

2. 学会発表

- 1) Asai, T., Oku, N.: Angiogenic vessel-targeted liposomes for in vivo delivery of siRNA. Japan Society of Gene Therapy The 14th Annual Meeting 2008 (Sapporo, Japan) Educational Seminar V-1. 2008年6月14日
- 2) Asai, T., Oku, N.: Angiogenic vessel-targeted liposomal DDS for cancer treatment. 11th Liposome Research Days Conference (Yokohama, Japan) Program book, p.63. 2008年7月20日

F. 知的財産権の出願・登録状況

【出願番号】 特願2009-23653

【発明者】 南野哲男、目加田英輔、浅井知浩、高島成二、朝野仁裕【発明の名称】 HB-EGF 結合性タンパク質複合

709-717.

- 2) Asai, T., Miyazawa, S., Maeda, N., Hatanaka, K., Katanasaka, Y., Shimizu, K., Shuto, S., Oku, N.: Antineovascular therapy with angiogenic

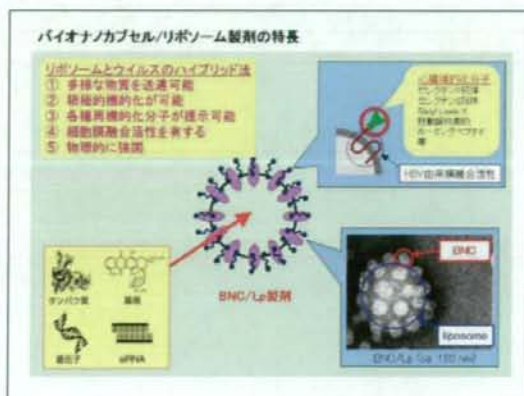
ナノサイズリボソームを用いた急性心筋梗塞治療法の開発（H19-ナノ一般-011）：
糖鎖提示型バイオナノカプセル（BNC）の開発

分担研究者 黒田 俊一 大阪大学産業科学研究所・准教授

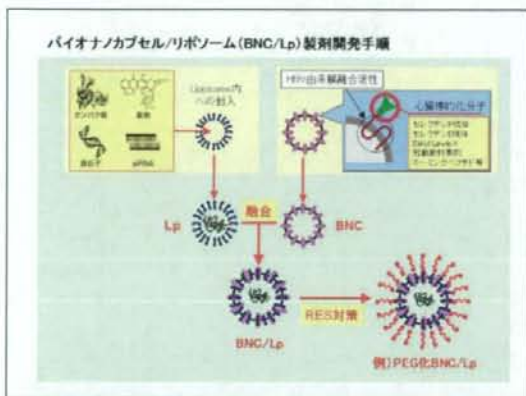
リボソームとウイルスの長所を併せ持つ生体内ピンポイント遺伝子・薬剤送達システム「バイオナノカプセル（BNC）」を用いて、心筋梗塞部位特異的に心臓保護薬剤及び治療用遺伝子を疾患部位に迅速かつピンポイントにデリバリーすることを目的としている。今年度は、昨年度開発した「炎症部位特異的に発現するセレクチン分子に対する抗体を提示するBNC」にルシフェラーゼ遺伝子（治療用遺伝子モデル）を封入して、ラット心筋虚血再灌流モデルに尾静脈投与して心臓患部での発現を検討した。BNCは心筋梗塞部位に高度に集積したが、心筋梗塞下の筋細胞は極度の炎症のために遺伝子発現を行う能力が著しく低下していることが判明した。そこで、炎症部位周辺に引き起こされるEPR（Enhanced Permeability and Retention）効果と強い膜透過活性の相乗効果を期待して、TAT膜透過ペプチドを提示したBNCを作製し、ルシフェラーゼ遺伝子（治療用遺伝子モデル）を封入して、同様にラットモデルに投与した。その結果、セレクチン認識抗体提示型BNCよりも高い効率で患部の炎症部位周辺にBNCを送達することができ、有意な遺伝子発現を確認することができた。以上から、心筋梗塞部位自体への標的化にはセレクチン認識抗体提示型BNCは適しているが、遺伝子治療などの心筋梗塞部位周辺への標的化にはTAT膜透過ペプチド提示型BNCが適していることが強く示唆された。これらの2種類のBNCを、作用させる薬剤の種類により使い分ければ、より効果的な心筋梗塞治療が可能になると考えられる。

A. 研究目的

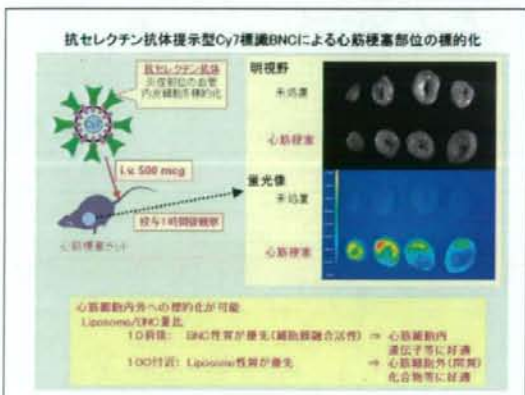
我々が開発した生体内ピンポイント遺伝子・薬剤送達システム「バイオナノカプセル（BNC; Bio-nanocapsule）」は、リボソーム（Lp; Liposome）様の構造体に、B型肝炎ウイルス（HBV; Hepatitis B Virus）の高効率な感染機構を付与したものであり、BNC外周に提示した生体認識分子の作用によるActive Targeting機構で任意の細胞や組織にBNC内包物（遺伝子、薬剤などの多様な薬効物質）をピンポイント送達することができる（第1図: Yamada



et al., Nature Biotechnol. 2003)。しかしながら、BNC 内部への物質封入効率の向上が製剤上の課題であった。そのような中、我々は BNC がリポソームと自発的に BNC/Lp 複合体を形成することを見出し (第2図)、同複合体が従来の BNC 製剤と同等の機能を有することを示した (Jung et al., JCR 2008)。そこで、上記 BNC 製剤の課題を解決するために、定法に従って一度リポソームに薬効物質を封入し、次に BNC と複合体形成させて得た BNC/Lp 製剤を、従来の BNC 製剤の改良版として使用するに至った。



本研究では、心筋梗塞部位特異的な BNC を開発し、心臓保護薬剤 (化合物または遺伝子) を包含する Lp と複合体形成させ、疾患部位に迅速かつピンポイントに薬剤をデリバリーする BNC/Lp 製剤を完成させることを目的としている。昨年度は、炎症部位特異的に発現するセレクチン分子に対する抗体を提示する BNC を作製し、ラット心筋虚血再灌流モデルに尾静脈から投与したところ、極めて短時間で心臓患部への高度に集積することが判明した (第3図)。そこで、今年度は本 BNC の物質送達能を検討した。また、別途、膜透過ペプチド提示型 BNC も同時に作製し、同様に評価した。



B. 研究方法

①抗体提示用 BNC (ZZ-BNC) :

Staphylococcus aureus 由来 Protein A の IgG Fc 結合領域 (Z ドメイン) をタンデムに結合した分子 (ZZ ドメイン) を、ヒト肝臓特異的 BNC (オリジナル BNC) の外周に提示されている HBV 由来ヒト肝臓特異的レセプター部位 (Pre-S 領域) と遺伝子工学的に置換し、遺伝子組換え酵母で大量生産させた後、BNC と同じ手法で精製して抗体提示用 BNC (ZZ-BNC) を得た (Muraoka et al., 投稿中)。本 ZZ-BNC は、直径約 80 nm のカプセル状粒子で、表面には ZZ ドメインが約 130 個提示されている (Iijima et al., 投稿中)。

②抗セレクチン抗体提示型 ZZ-BNC :

凍結乾燥 ZZ-BNC を蒸留水でタンパク質濃度 1 mg/ml とし、抗セレクチン E 抗体 (ウサギ由来: Santa Cruz 社製) を ZZ-BNC タンパク質量の 12.5 分の 1 量加えて、その後、直ちに架橋剤 BS3 を終濃度が 50 μ M になるように添加して、室温で 45 分~1 時間反応させ抗体-ZZ-BNC 間を結合した。最後に、Glycin を終濃度 100 μ M になるように添加して、架橋反応を中止した。

③TAT 膜透過ペプチド提示 BNC :

凍結乾燥した精製 ZZ-BNC をタンパク質濃度で 1 mg/ml となるように滅菌蒸留水に溶解した。ZZ-BNC 溶液 1 mg (タンパク質として 0.02 μ mol) に対して EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (NHS-Biotin, Thermo Fisher Scientific) を 0.67 mg (1.34 μ mol) を混和して室温で 1 時間反応させた。反応液を 10 ml Sephadex G-25 Fine (GE Healthcare, Niskayuna, NY, USA) を充填した Econo-Pac Disposable Chromatography Columns (BIO-RAD, Hercules, CA) に負荷後、PBS(-)により溶出した。NHS-Biotin の ZZ-BNC 表面への結合量は、EZ Biotin Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。得られた biotin 標識 ZZ-BNC (bio 標識 BNC) はエッペンドルフチューブに 100 μ g (タンパク質量として) ずつ分注し、終濃度 5% (容量比) になるように 25% (容量比) sucrose 溶液を加えて凍結乾燥し、使用時まで -20 $^{\circ}$ C にて遮光して保存した。

Neutravidin (NA, Thermo Fisher Scientific) とビオチン化 TAT 膜透過型ペプチド (biotin-YGRKKRRQRRR (bio-TAT, Invitrogen,

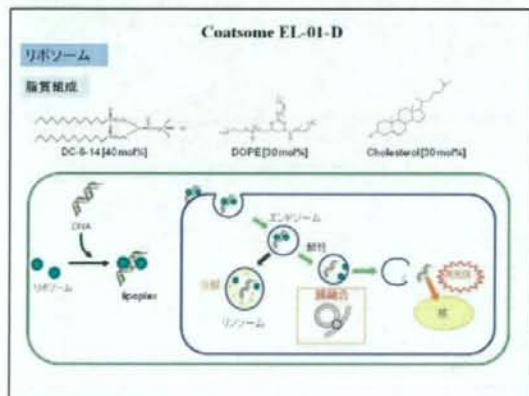
Carlsbad, CA)を蒸留水で1 mg/ml の濃度に溶解した。バイオチン化標識ペプチド1 mg に対しNAをモル比で1 : 0.1 の割合で混和し、室温で30 分間反応させることによりペプチド-NA 複合体を形成させた。次いでbio 標識BNCをZZ-HBsAg Lタンパク質とNA が同じモル数になるようにペプチド-NA 複合体に添加し、室温で30 分反応後、TAT 膜透過ペプチド提示型BNCを調製した。

④ラット心筋虚血再灌流モデル：

ラット心筋虚血再灌流モデルは、Bullard et al., Basic Res Cardiol. (2005)の方法に従って作製した。具体的には、9週齢のWister系ラットをペントバルビタール50mg/kg 腹腔内投与で麻酔を行い、気管内挿管を行い人工呼吸開始した後、鼠径静脈にカニューレーションを行い、静脈路を確保する。開胸した後、左冠動脈左前下行枝(LAD)を結紮し虚血心を作製し、心電図をモニターし、心室細動発症時には心臓を直接マッサージする。30分後、結紮を開放し再灌流を行うと心筋梗塞部位が誘導される。

⑤ルシフェラーゼ発現遺伝子の封入：

Jung et al., J Control Release (2008)の方法に従って、Coatsome EL-01-D (NOF：第4図) (脂質として) 300 μ g とルシフェラーゼ発現ベクターpCAG-Luc3 (CAGプロモーター利用：静岡県立大学薬学部 奥先生より供与) 50 μ g 及び抗セレクチン抗体提示型/TAT 膜透過ペプチド提示型ZZ-BNC (タンパク質量として) 100 μ g を複合体化して調製した。



⑥投与と観察：

上記、BNC-脂質-DNA複合体(DNA量50 μ g)を生理食塩水で1 ml とする。ラット心筋虚血再灌流モデルにおいて、30 分間の虚血の際、再灌流5

分前から鼠径静脈のカニューレ部位よりインジェクターを用いて100 μ l/min の速度で10 分間(1 ml)かけて同複合体を投与した。再灌流48 時間後に、生理食塩水で冠動脈を灌流洗浄後、心臓摘出し、梗塞部位、梗塞境界部位、非梗塞部位を分別し、また脾臓(陰性対照)を取り出した。

その後、各臓器をPBSで洗浄した後、組織の3倍量(μ l/mg 組織タンパク質量)のLysis Buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.8), 0.1% (v/v) Triton X-100, 2 mM EDTA)を加え、各組織を氷上で破碎し、15000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 30 分間遠心した。各破碎上清液のluciferaseの発現レベルを調べるために、Luciferase Assay System (Promega)を用いて各臓器内のルシフェラーゼ活性測定を行った。具体的には、破碎上清液10 μ lにルシフェラーゼ基質100 μ lを加え、ルミノメーターを用いて10秒間発光量を測定した。また、タンパク質量はMicro BCA Protein Assay Kit (SIGMA)を用いて測定し、単位タンパク質量あたりのルシフェラーゼ活性(RLU/mg タンパク質)で各破碎上清液のルシフェラーゼ活性を比較した。

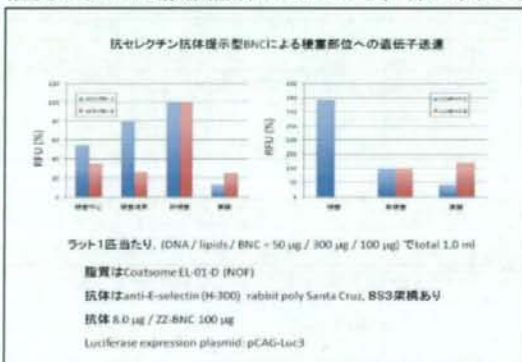
⑦倫理面への配慮：

本動物実験に関しては、大阪大学産業科学研究所・動物実験委員会の承認を得た後、大阪大学及び大阪大学産業科学研究所の定めた実験動物取扱指針に従って行った。遺伝子組換え実験に関しては、大阪大学産業科学研究所・遺伝子組換え実験委員会の承認を得ている。また、本実験はヒト由来検体を使用していないので大阪大学倫理委員会の適用は受けていない。

C. 研究結果

①抗セレクチン抗体提示型ZZ-BNCの結果：

抗セレクチン抗体提示型ZZ-BNCによるBNC-脂質-DNA複合体(DNA量50 μ g)、及び陰性対照として未提示ZZ-BNCによるBNC-脂質-DNA複合体(DNA量50 μ g)を用いて、ラット心筋虚血再灌流モデルに静脈注射したところ、第5図に示す

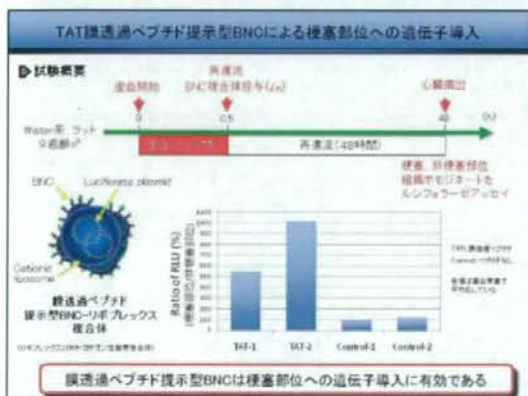


ように、非梗塞部位でのルシフェラーゼ発現量を100%とすると、抗セレクチン抗体提示型BNCは梗塞部位での遺伝子発現が有意に低かった。一方、陰性対照BNCは梗塞部位での発現は高かった。また、両BNCとも対照臓器の脾臓においては同程度に弱く発現していた。抗セレクチン抗体提示型BNCは、昨年度と同様なCy7蛍光標識BNCによる生体内イメージングの結果では、有意に心筋梗塞部位に集積していた（データ示さず：基本的に第3図と同じ）。

以上の結果は、心筋梗塞部位は極度の炎症が生じていて、当該心筋細胞は抗セレクチン抗体提示型BNCにより遺伝子を導入されても発現させる能力が既に低下していると考えられた。そこで、抗セレクチン抗体提示型BNCは心筋梗塞部位への薬剤投与には適しているが、遺伝子導入には不向きと考えられた。次に、炎症部位を直接認識する抗セレクチン抗体を使用せず、EPR効果と膜透過ペプチドをBNCに適用することで、心筋梗塞部位近傍に遺伝子導入を行うことを目指した。

②TAT膜透過ペプチド提示型BNC：

TAT膜透過ペプチド提示型BNCによるBNC-脂質-DNA複合体（DNA量50 μ g）、及び陰性対照として未提示BNCによるBNC-脂質-DNA複合体（DNA量50 μ g）を用いて、ラット心筋虚血再灌流モデルに静脈注射した（第6図）。その結果、非梗塞部位のルシフェラーゼ活性に対して梗塞部位での同活性がTAT膜透過ペプチド提示型BNC特異



的に5~10倍上昇していた。

この結果から、TAT膜透過ペプチドBNCが、EPR効果によって炎症状態の心筋梗塞部位に侵入し、TATペプチドの効果により心筋梗塞部位近傍の心筋細胞にまでルシフェラーゼ発現ベクターを導入させたものと推察された。

D. 考察

今回の結果は、抗BNC抗体及び抗アポトーシス関連抗原抗体による心筋梗塞部位及び近傍の免疫組織化学的解析が必須であるが、心筋細胞内にルシフェラーゼ発現ベクターが導入されて初めてルシフェラーゼが発現することから、次の様に解釈される。

まず心筋梗塞部位は極めて強い炎症が起こっており、心筋細胞は正常な遺伝子発現が出来ないくらいにダメージを受けていると推察される。抗セレクチン抗体提示型ZZ-BNCは、Active Targeting機構により心筋梗塞部位に効率よく集積できるが、遺伝子発現を誘導することはできない。本BNCは心筋梗塞部位の中心に薬剤を放出するのに適しているものと考えられる。この場合、膜融合活性の高いリン脂質によるリボソームを使用すれば心筋細胞内に、同活性の低いリン脂質を用いれば間質部分に投与できると考えられる。

次に、TAT膜透過ペプチド提示型BNCは、心筋梗塞部位の炎症作用によりEPR効果が誘導され、Passive Targeting機構により心筋梗塞部位に集積し、その後、TAT膜透過ペプチド的作用により梗塞部位近傍の心筋細胞にまで伝播・浸潤し、心筋細胞内での遺伝子発現が達成できると考えられる。つまり、抗セレクチン抗体提示型ZZ-BNC及びTAT膜透過ペプチド提示型BNCは、心筋梗塞治療において、どのような治療用薬剤（遺伝子を含む）を送達したいかによって使い分けの必要があり、その結果、心筋梗塞治療法の可能性を大きく広げるものと思われた。

現在、①ZZ-BNC表層に提示する抗体種類の最適化、②同抗体量の最適化、③BNC表層に提示するTAT膜透過ペプチドの最適化、④同ペプチド量の最適化、⑤送達する薬剤（遺伝子）に対するリボソームの最適化、⑥BNC投与量の削減、⑦BNC/Lp表面の高生体親和性の高分子で修飾による血液中安定性の調節、⑧BNC/Lpの混合比率を可変することによる細胞内投与か間質内投与かの選択などを行っている。

今後は、冠血流量増大および心筋代謝改善に作用するアデノシン内包Lpと該BNCを複合体化して心筋梗塞部位へ送達することを考えている。実際に、アデノシン内包リボソーム単独（Passive TargetingであるEPR効果により送達）でも梗塞部位の壊死領域が縮小することが認められており、Active Targeting可能なBNC/Lp製剤化すれば、一層

低薬量で十分な効果が得られると考えている。

E. 結論

心筋梗塞治療用の DDS キャリアーとして、心筋梗塞部位中心に送達する抗セレクチン抗体提示型 ZZ-BNC と、心筋梗塞部位近傍に送達する TAT 膜透過ペプチド提示型 BNC を開発することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

① Kasuya, T., Yamada, T., Uyeda, A., Matsuzaki, T., Okajima, T., Tatematsu, K., Tanizawa, K., and Kuroda, S.: In Vivo Protein Delivery to Human Liver-derived Cells Using Hepatitis B Virus Envelope Pre-S Region. *J Biosci Bioeng.* 106 (2008) 99-102.

② Kasuya, T., Jung, J.H., Kadoya, H., Matsuzaki, T., Tatematsu, K., Okajima, T., Miyoshi, E., Tanizawa, K., and Kuroda, S.: In Vivo Delivery of Bio-nanocapsules Displaying L4-PHA Isolectin to Malignant Tumors Overexpressing N-Acetylglucosaminyltransferase V. *Human Gene Therapy* 19 (2008) 887-895.

③ Kasuya, T., Nomura, S., Matsuzaki, T., Jung, J., Yamada, T., Tatematsu, K., Okajima, T., Tanizawa, K., and Kuroda, S.: Expression of Squamous Cancer Cell Carcinoma Antigen-1 in Liver Enhances the Uptake of HBV Envelope-derived Bio-nanocapsules in Transgenic Rats. *FEBS J* 275 (2008) 5714-5725.

④ Kasuya, T. and Kuroda, S.: Nanoparticles for Human Liver-specific Drug and Gene Delivery Systems: In Vitro and In Vivo Advances. *Expert Opinion Drug Delivery* (2009), Vol. 6, 1-14.

⑤ 黒田俊一 (分担) : バイオナノカプセル: 機能性 DDS キャリアの製剤設計 (岡田弘晃編集) (2008) 株CMC 出版 (東京)

2. 学会発表

① B型肝炎ウイルス表面抗原Lタンパク質由来バイオナノカプセルの細胞内侵入機構の解析: 山田光男, 粕谷武史, 松崎高志, 谷澤克行, 黒田俊一 (阪大・産研, JST・地域資源活用プ

ログラム) 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB 2008)

② 膜透過ペプチド提示型バイオナノカプセルの細胞内侵入能の評価: 中川乃梨子, 松崎高志, 谷澤克行, 黒田俊一 (阪大・産研, JST・地域資源活用プログラム) 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB 2008)

③ 高転移性腫瘍を標的とする L4-PHA レクチン提示型バイオナノカプセルの開発: 粕谷武史, 松崎高志, 三善英知, 谷澤克行, 黒田俊一 (大阪大学・産業科学研究所, JST・地域研究開発資源活用促進プログラム, 大阪大学大学院・医学系研究科) 第24回日本DDS学会

④ 抗体提示型バイオナノカプセル (ZZ-BNC) の性状解析: 飯嶋益巳, 松崎高志, 谷澤克行, 黒田俊一 (大阪大学・産業科学研究所, JST・地域研究開発資源活用促進プログラム) 第24回日本DDS学会

⑤ 長期投与を可能にするステルス型バイオナノカプセルの開発: 松下葉子, 松崎高志, 谷澤克行, 黒田俊一 (大阪大学・産業科学研究所・生体触媒科学研究分野, JST・地域資源活用プログラム) 第24回日本DDS学会

⑥ バイオナノカプセル・リポプレックス複合体の最適化: 松井ゆかり, 松崎高志, 谷澤克行, 黒田俊一 (大阪大学・産業科学研究所, JST・地域資源活用プログラム) 第24回日本DDS学会

⑦ バイオナノカプセルの膜融合能の評価: 松崎高志, 佐々木康雄, 粕谷武史, 谷澤克行, 黒田俊一 (大阪大学・産業科学研究所, JST・地域研究開発資源活用促進プログラム) 第24回日本DDS学会

⑧ DIRECT OBSERVATION OF CELL ENTRY OF HEPATITIS B VIRUS ENVELOPE L-DERIVED BIO-NANOCAPSULES: Mitsuo Yamada, Takeshi Kasuya, Takashi Matsuzaki, Katsuyuki Tanizawa,