

200912011A

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21年度 総括研究報告書

主任研究者 南野 哲男

平成22(2010)年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
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 抗体結合リポソームの細胞内取り込みの検討-----	6
浅井 知浩	
2. 糖鎖提示型バイオナノカプセル (BNC) の開発-----	10
黒田 俊一	
3. 抗 HB-EGF 抗体結合リポソームの開発-----	17
目加田 英輔	
4. HB-EGF を標的とした心不全に対する新規 DDS の開発-----	19
朝野 仁裕	
5. HB-EGF を標的とした心不全に対する新規 DDS の開発-----	21
高島 成二	
6. 急性心筋梗塞後致死的不整脈治療を目標としたリポソーム製剤の効果評価-----	23
浅沼 博司	
7. 急性心筋梗塞後致死的不整脈治療を目標としたリポソーム製剤の効果評価-----	25
朝倉 正紀	
8. 急性心筋梗塞後致死的不整脈治療を目標としたリポソーム製剤の効果評価-----	27
北風 政史	
9. 急性心筋梗塞後致死的不整脈治療を目標としたリポソーム製剤の効果評価-----	30
堀 正二	
10. 急性心筋梗塞後致死的不整脈治療を目標としたリポソーム製剤の開発-----	32
蜂須 麗	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	34

(別添 3)

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

ナノサイズリポ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・講師

研究要旨 本研究では、1) 抗不整脈薬アミオダロンのリポ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・副作用軽減効果を見出し、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・婦人科系疾患に対する新規 DDS の開発をおこなった。麻酔下ラット心筋梗塞モデルを用いて、蛍光標識リポソームや RI 標識リポ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、致死的不整脈に対する薬剤アミオダロンのリポソーム化に成功し、ラット心筋虚血・再灌流時モデルにおいて、再灌流時リポソーム化アンカロン投与より、心室頻拍・心室細動発症を抑制した。

これまで、心筋梗塞部位自体への標的化にはセレクトイン認識抗体提示型バイオナノカプセル（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 が適していることを示した。標的化及び細胞内侵入活性を有する BNC と薬剤や遺伝子を包含するリポソームの複合体形成効率を飛躍的に高め、また発現遺伝子を転写段階の不要な RNA で供給することにより、今までとは異なり短時間で強力な遺伝子発現が得られるように改良した。

さらに、本研究にて、膜結合型 HB-EGF が婦人科系がんのみならず不全心・梗塞後心臓にてその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 抗体修飾リポソーム（抗 HB-EGF 抗体結合リポソーム）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 抗体修飾リポソームを用いると、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 抗体修飾リポ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。また、HB-EGF 高発現ペロ細胞では、siRNA を封入した HB-EGF 結合リポソームにより標的遺伝子がノックダウンされた。ヒト乳がん細胞移植マウスでは、ドキソルピシン封入 HB-EGF 結合リポソームはその腫瘍体積を縮小させた。以上より、HB-EGF 結合リポソームが HB-EGF 高発現疾患に対する革新的な薬物送達技術になりうる（国際特許出願済）。

【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
朝野 仁裕	大阪大学 循環器内科学 助教
堀 正二	大阪府立成人病センター 総長
北風 政史	国立循環器病研究センター 臨床研究開発部 部長
朝倉 正紀	国立循環器病研究センター 臨床研究開発部 医長
浅沼 博司	近畿大学医学部付属病院 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 リポソーム学 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) 心臓保護薬剤アミオダロンのリポ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) パイオナノカプセル (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・婦人科系がんに対する新規 DDS の開発である。

B. 研究方法

1. 抗不整脈薬アミオダロ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) リポ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。5分後、結紮を開放し再灌流を行う。蛍光標識リポソームは再灌流 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ポ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。

1-2) リポソーム化アミオダロンの血行動態へおよび影響の検討

ラットを用いて、アミオダロンとリポソーム化アミオダロンの血圧、脈拍に及ぼす影響を用量依存的に検討した。

1-3) リポソーム化アミオダロンの致死的不整脈軽減効果の検討

上記のラット虚血・再灌流モデルを用いて、ア

ミオダロン、リポソーム化アミオダロン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、アミオダロン、リポソーム化アミオダロンの心室細動抑制効果を検討した。

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の開発

2-1) BNC :

ヒト肝臓特異的 BNC (オリジナル BNC) は、HBV 表面抗原 L タンパク質粒子を大量発現する出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* AH22R-/pGLD LIIP39-RcT: 黒田ら、JBC 1992) から山田ら (Vaccine 2001) の方法に従って精製した。エッペン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。BNC 外周には HBV 由来ヒト肝臓特異的レセプター部位 (Pre-S 領域) が提示されており、BNC/Lp 複合体は、既に試験管内 (*in vitro*) 及びマウス体内 (*in vivo*) においてヒト肝癌由来細胞及び組織に遺伝子及び薬剤を特異的かつ効率的に送達することが判明している (山田ら、Nature Biotech 2003; 鄭ら、JCR 2008)。

2-2) HB-EGF 発現部位の観察

ラット心筋虚血再灌流モデルにおいて、再還流 12 時間および 24 時間後に心臓を摘出し、ホルマリン固定後 OCT コンパウンドにて凍結封埋した。クライオスタット CM3050S (Leica) を用いて心臓の水平断面に 6 μ m の厚さで凍結切片を作成し、抗 HB-EGF 抗体 (M-18, SantaCruz) を用いて免疫染色を行なった。二次抗体には Alexa594 標識抗体 (Invitrogen) または HRP 標識抗体 (Dako) を用い、蛍光抗体染色では Hoechst33342 による核染色を、酵素抗体染色では DAB (3, 3'-diaminobenzidine) による発色後ヘマトキシリンによる対比染色を行なった。全ての染色法で、二次抗体のみ (一次抗体なし) の染色を陰性対照

として用いた。蛍光抗体染色サンプルは共焦点レーザー顕微鏡 LSM5 PASCAL (Zeiss) を、酵素抗体染色サンプルはデジタルカラー CCD カメラ DP70 (オリンパス) を接続した倒立顕微鏡 IX70 (オリンパス) を用いて観察し、梗塞部位、非梗塞部位のそれぞれの代表的な染色像の画像を取得した。

3. HB-EGF を標的とした心不全・婦人科系がんに対する新規 DDS の開発

【抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームの開発】

3-1) 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) にリン酸緩衝液を加えて水和し、リポソームを調製した (蛍光標識リポソームを調製する際には、上記脂質に加え DiI-C₁₈ を混合した脂質フィルムを作成した)。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。(ドキシソルビシン (DOX) 内封リポソームを調製する際には、この時点でリモートローディング法により封入した。) 次に 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°C で 20 時間反応した。Fab' 化抗 HB-EGF 抗体の 10 倍モル量の 0.1 M 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、Ab-PEG-L あるいは DOX を内封した Ab-PEG-L (以下 Ab-PEG-DOX と略) を精製した。

3-2) 取り込み試験

MDA-MB-231 ヒト乳がん細胞を 24-well プレートに播種し、前培養した。培養液を取り除き、DiI 標識 Ab-PEG-L あるいは対照の PEG リポソーム (以下 PEG-L と略) を含む非必須アミノ酸含有 MEM 培地を添加した。 37°C にて 4 時間インキュベートした後、PBS を用いて 3 回細胞を洗浄した。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、その強度をタンパク質量で補正した。

3-3) がん治療実験

雌性 BALB/c ノードマウスの左腹側部に MDA-MB-231 細胞を皮下移植し、固形がん担がんマウスを作製した。がん移植から 14, 21, 28 日後に Ab-PEG-DOX、対照として DOX を封入した PEG-L (以下 PEG-DOX と略) を尾静脈内投与した。腫瘍体積と体重変化をモニターし、がん治療効果の評価を行った。

C. 研究結果

1-1) リポソームの短時間虚血再灌流後心筋への集積の検討

In vivo イメージング法を用いた観察の結果、リポソームが心筋虚血再灌流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集積が確認できた。

1-2) リポソーム化アミオダロンの血行動態へおよび影響の検討

アミオダロン投与により、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。アミオダロンと比較して、リポソームアミオダロンの血圧低下効果ならびに徐脈化は著しく軽減した。

2-1) リポソーム化アミオダロンの致死的不整脈軽減効果の検討

アミオダロン単独投与と比較して、リポソーム化アミオダロンは致死的不整脈である心室頻拍・心室細動の発生頻度を有意に抑制した。

2-1) 新しい BNC/Lp 複合体の遺伝子導入能：

得られた BNC/Lp 複合体を DNA 量 (50 ng) で揃えて、2 種類の約 5×10^4 個の培養細胞 (ヒト子宮頸部がん由来 HeLa 細胞 (BNC の非標的細胞)、ヒト肝がん由来 Huh7 細胞 (BNC の標的細胞)) の培地に添加し、48 時間後の細胞から細胞抽出液

を作製し、Luciferase アッセイを行った。なお対照群として、従来法で作製した BNC/Lp 複合体とリポプレックスを使用した。その結果、第 9 図に示すように、全ての BNC/Lp 複合体は BNC の本来の標的細胞である Huh7 細胞において対照群と比べて 10~110 倍の遺伝子導入活性が観察された。特に、pH3 及び pH9 で作製した複合体の導入効率は際立って高かった。

次に、BNC の標的細胞と非標的細胞における遺伝子導入効率を比較した場合、第 10 図に示すように、従来法だと 4 倍前後のヒト肝臓特異性しか示さなかったのが、28~191 倍の特異性を示すようになった。

2-2) HB-EGF 発現部位

酵素抗体染色法によって、再灌流 24 時間後の梗塞部位に HB-EGF の陽性シグナルが検出された。梗塞部位を拡大し観察したところ、未同定ではあるが、心筋細胞と予想される細胞群が HB-EGF の陽性シグナルを有していることが明らかとなった。一方、再灌流 12 時間後の梗塞部位には、非梗塞部位や二次抗体のみの染色に比べ有意なシグナルは検出されなかった。蛍光免疫染色法では、心筋組織自体の自家蛍光が高く、再灌流 24 時間後の梗塞部位に HB-EGF の陽性シグナルを検出することは出来なかった。

3-1) DiI 標識 Ab-PEG-L を用いた取り込み試験

MDA-MB-231 細胞に対する Ab-PEG-L の細胞内導入について対照の PEG-L と比較検討を行った。その結果、Ab-PEG-L は濃度依存的に MDA-MB-231 細胞内に取り込まれ、また対照の PEG-L と比較して有意に多く取り込まれることが明らかとなった。

3-2) がん治療実験

MDA-MB-231 細胞を移植したノードマウスにおいて Ab-PEG-DOX の治療効果を検討した。その結果、Ab-PEG-DOX は顕著な腫瘍退縮効果を示すことが明らかとなり、PEG-DOX と比較して有意に高い治療効果を示した。副作用の一指標とし

てモニターした体重変化には顕著な影響が認められなかった。

D. 考察

リポソーム化アミオダロンの致死的不整脈軽減効果が確認できた。また、アミオダロンによる血圧低下・徐脈化作用などの副作用も軽減された。以上より、リポソーム化アミオダロ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、前臨床試験を準備中である。

抗HB-EGF抗体リポソームはヒトのHB-EGFを特異的に認識してHB-EGFが高発現している心筋細胞・婦人科系がん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・婦人系がんでは、抗HB-EGF抗体リポソームを用いての薬剤やsiRNAのデリバリーが期待できるものと考えられる。ヒトHB-EGF過剰発現マウスを用いて、in vivoにおいて抗HB-EGF抗体リポ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。

E. 結論

本研究では、アミオダロ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進めていく。さらに、HB-EGF結合リポソームの開発により、1) 不全心筋への特異的送達が可能になり、心不全に対する治療法が根本的に変化すること、2) 婦人科系がんでは、他の送達技術では認められない“二重効果”（特異的送達とHB-EGFの細胞内取り込みによる増殖抑制）が期待できる。この革新的な薬物送達基盤技術は、日本発の画期的医薬品の創出や重症心不全・婦人科系がんに対する新しい治療法の確立に貢献することが期待できる。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. Sasaki H, Minamino T, (14名省略、10番目) .Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. *Circulation*. 2009;119(19):2568-77.

2. Tsukamoto O, Minamino T, (15名省略、12番目) .Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure.

J Am Coll Cardiol. 2009;53(22):2070-7.

3. Sawada T, Minamino T[#], (以下、14名省略) . X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel AP1/CRE-like element in cardiomyocytes.

J Mol Cell Cardiol. 2010 Feb 17.

4. Nakano A, Minamino T (13名省略、11番目). AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration via CLIP-170 phosphorylation. *Nature Cell Biology*. in press, 2010

2. 学会発表

第25回日本DDS学会(2009年7月 東京)

シンポジウム3 DDSの臨床応用<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>

XX World Congress ISHR (2010年5月 京都)

シンポジウム Protein processing and quality control. <Role of CHOP in Cardiac Hypertrophy and Failure>

H. 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称：HB-EGF結合性タンパク質複合体

発明者：南野哲男ら、他4名；出願番号：

PCT/JP2010/51515；特許出願日 2010年2月3日

研究要旨 本研究では、不全心筋および婦人科系がん（卵巣がん、子宮がん、乳がん）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ポ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ポソームはこれら疾患に対する有効な DDS キャリアとなりうる可能性が高い。昨年度までに、抗 HB-EGF 抗体修飾リポソーム（以下 Ab-PEG-L と略）を作製し、遺伝子導入により HB-EGF を恒常的に高発現させた Vero 細胞（Vero-H 細胞）を利用してその有用性を証明してきた。本年度は、Vero 細胞、Vero-H 細胞に加え、ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC、ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 細胞を用いて検討を行った。まず、HB-EGF の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により比較検討した結果、Vero-H 細胞は Vero 細胞の約 100 倍、HUVEC および MDA-MB-231 細胞は 5 倍から 10 倍ほど HB-EGF の mRNA 発現量が高いことが明らかとなった。同様に、Western blotting 法によって HB-EGF のタンパク質発現量を検討した結果、Vero-H 細胞における発現が顕著に高く、HUVEC ならびに MDA-MB-231 細胞も Vero 細胞と比較して高い発現を示した。そこで、MDA-MB-231 細胞における Ab-PEG-L の細胞内移行量を対照の PEG リポソーム（以下 PEG-L と略）と比較検討した結果、MDA-MB-231 細胞において、Ab-PEG-L は細胞内に有意に取り込まれることが明らかとなった。次に、ドキソルビシン（doxorubicin; DOX）を内封した Ab-PEG-L（以下 Ab-PEG-DOX と略）のがん治療効果を MDA-MB-231 細胞を移植したヌードマウスにおいて評価した。その結果、Ab-PEG-DOX は、DOX を内封した PEG-L と比較し、優れた腫瘍退縮効果を示した。以上より、本研究で開発した抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームは、婦人科系がんに対する画期的な薬物送達法になりうることを示唆された。

一方、本研究では心筋梗塞や脳梗塞における虚血再灌流障害の新規治療法開発を目的とし、細胞保護効果を有する asialo-erythropoietin (AEPO) のリポソーム化を試みた。AEPO は、受容体への親和性が高く、強い抗アポトーシス作用を示すが、血中半減期が極めて短いことが主たる問題点として挙げられる。そこで RI 標識した AEPO をリポソーム化し、マウスにおいて体内動態試験を実施したところ、リポソーム化によって血中滞留性が大幅に延長することが明らかとなった。さらに transient-middle cerebral artery occlusion (t-MCAO) 病態モデルラットを用いて治療実験を行った結果、AEPO 修飾リポソーム投与群は、AEPO 投与群と比較して有意に脳細胞死を抑制した。以上より、リポソームの Enhanced Permeability and Retention 効果によって脳虚血側半球への AEPO 集積量が上昇し、病態モデルにおける治療成績が向上したことが示唆された。今回、リポソーム DDS 技術の虚血再灌流障害への有用性が示唆されたことにより、今後リポソームを含むナノ製剤を用いた治療戦略が、心筋梗塞や脳梗塞における虚血再灌流障害の治療薬開発に大きく寄与することが期待される。

A. 研究目的

【抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームの開発】

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ポ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となりうる可能性が高い。本研究では、不全心筋および婦人科腫瘍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、HB-EGF を高発現するヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 細胞を用い、抗 HB-EGF 抗体修飾リポソーム (以下 Ab-PEG-L と略) の有用性を評価した。具体的には、インビトロにおける細胞への取り込み試験やインビボにおけるがん治療実験などを実施した。

【AEPO リポソームの開発】

心筋梗塞や脳梗塞における虚血再灌流障害の新規治療法開発を目的とし、細胞保護効果を有する asialo-erythropoietin (AEPO) のリポソーム化を試みた。AEPO は生体内タンパク質である erythropoietin の代謝体であり、抗アポトーシス作用により高い神経細胞保護効果を有することが知られている。虚血再灌流障害により誘導される細胞死は主にアポトーシスが関与するため、AEPO を含む抗アポトーシス作用を示す薬剤は、当該疾患の治療に有効であると考えられる。しかし、AEPO はその極端に短い血中半減期が問題点となっている。そこで本年度は、AEPO をリポソーム化し、虚血再灌流障害治療への応用を検討した。まず、神経様細胞での細胞保護効果を検討し、リポソーム化による薬理活性の有無を確認した。次に AEPO リポソームの体内動態試験を実施し、さらに transient-middle cerebral artery occlusion (t-MCAO) 病態モデルラットにおける AEPO リポソームの再灌流障害抑制効果を検討した。

B. 研究方法

【抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームの開発】

(1) 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) にリン酸緩衝液を加えて水和し、リポソームを調製した (蛍光標識リポソームを調製する際には、上記脂質に加え DiI-C₁₈ を混合した脂質フィルムを作成した)。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。(ドキシソルビシン (DOX) 内封リポソームを調製する際には、この時点でリモートローディング法により封入した。) 次に 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 0.1 M 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、Ab-PEG-L あるいは DOX を内封した Ab-PEG-L (以下 Ab-PEG-DOX と略) を精製した。

(2) 取り込み試験

MDA-MB-231 ヒト乳がん細胞を 24-well プレートに播種し、前培養した。培養液を取り除き、DiI 標識 Ab-PEG-L あるいは対照の PEG リポソーム (以下 PEG-L と略) を含む非必須アミノ酸含有 MEM 培地を添加した。37℃にて 4 時間インキュベートした後、PBS を用いて 3 回細胞を洗浄した。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、その強度をタンパク質量で補正した。

(3) がん治療実験

雌性 BALB/c ノードマウスの左腹側部に MDA-MB-231 細胞を皮下移植し、固形がん担がんマウスを作製した。がん移植から 14, 21, 28 日後に

Ab-PEG-DOX、対照として DOX を封入した PEG-L (以下 PEG-DOX と略) を尾静脈内投与した。腫瘍体積と体重変化をモニターし、がん治療効果の評価を行った。

【AEPO リポソームの開発】

(4) AEPO 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 (DSPC/cholesterol/MPEG-DSPE) 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。一方で AEPO と DSPE-PEG-NHS を室温で一晩インキュベートし、DSPE-PEG-AEPO を調製した。リポソーム溶液に DSPE-PEG-AEPO を加え、65°C で 15 分間加温し、AEPO リポソームを調製した。

(5) AEPO リポソームの細胞保護効果

ラット副腎髄質由来親クロム性細胞腫 PC12 細胞を 24-well plate に播種し、前培養した。PC12 細胞を神経様細胞へ分化させるために nerve growth factor (NGF) を添加し、5 日間培養した。培地交換後、NGF 非存在下で AEPO リポソームを添加し、さらに 5 日間培養した。MTT 法により生細胞数を測定し、細胞保護効果を評価した。

(6) AEPO リポソームの再灌流障害抑制効果

栓子法により t-MCAO モデルラットを作製した。再灌流直後、PBS (-)、PEG リポソーム、AEPO、あるいは AEPO リポソームを尾静脈内投与し、24 時間後に運動能をスコア化して評価した。次に脳を摘出し、ラット用ブレインスライサーで中大脳動脈起支部を中心とし 2 mm にスライスした。2% TTC 溶液に脳スライスを浸して生細胞を染色し、OLYMPUS E-300 で撮影、ImageJ にて画像解析を行った。

C. 研究結果

【抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームの開発】

(1) DiI 標識 Ab-PEG-L を用いた取り込み試験

MDA-MB-231 細胞に対する Ab-PEG-L の細胞内

導入について対照の PEG-L と比較検討を行った。その結果、Ab-PEG-L は濃度依存的に MDA-MB-231 細胞内に取り込まれ、また対照の PEG-L と比較して有意に多く取り込まれることが明らかとなった。

(2) がん治療実験

MDA-MB-231 細胞を移植したヌードマウスにおいて Ab-PEG-DOX の治療効果を検討した。その結果、Ab-PEG-DOX は顕著な腫瘍退縮効果を示すことが明らかとなり、PEG-DOX と比較して有意に高い治療効果を示した。副作用の一指標としてモニターした体重変化には顕著な影響が認められなかった。

【AEPO リポソームの開発】

(3) AEPO リポソームの細胞保護効果

NGF によって神経様細胞に分化した PC12 細胞を用い、AEPO の抗アポトーシス活性を評価した。その結果、AEPO リポソームは対照の PEG リポソームや PBS と比較して有意に細胞死を抑制した。AEPO リポソームの細胞保護効果には濃度依存性が観察され、遊離の AEPO と比較して同等以上の効果があった。したがって、リポソーム表面に保持されている AEPO が PC12 細胞膜外の EPO 受容体に結合し、抗アポトーシス作用を誘導することが示唆された。

(4) AEPO リポソームの再灌流障害抑制効果

t-MCAO モデルラットにおいて、AEPO リポソーム投与群は、AEPO 投与群に比べ、有意に高い細胞保護効果ならびに脳浮腫抑制効果を示した。対照の PEG リポソーム投与群にはまったく効果が認められなかった。神経病理学的評価の指標としてラットの運動能を評価したところ、AEPO リポソーム投与群は、他の投与群と比較して有意に高い治療効果を示した。

D. 結論

【抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームの開発】

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。

【AEPO リポソームの開発】

AEPO リポソームのデータが示すように、リポソーム DDS 技術の虚血再灌流障害への有用性が示唆された。今後、リポソームを含むナノ製剤を用いた治療戦略が、心筋梗塞や脳梗塞における虚血再灌流障害の新規治療薬開発に繋がることが期待される。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishii, T., Asai, T., Urakami, T., Oku, N.: Accumulation of macromolecules in brain parenchyma in acute phase of cerebral infarction/reperfusion. *Brain Res.* (2010) *in press*
- 2) Murase, Y., Asai, T., Katanasaka, Y., Sugiyama, T., Shimizu, K., Maeda, N., Oku, N.: A novel DDS strategy, "dual-targeting", and its application for antineovascular therapy. *Cancer Lett.*, **287**, 165-171 (2010)
- 3) Urakami, T., Kawaguchi, A.T., Akai, S., Hatanaka, K., Koide, H., Shimizu, K., Asai, T., Fukumoto, D., Harada, N., Tsukada, H., Oku, N.: In vivo distribution of liposome-encapsulated hemoglobin determined by positron emission tomography. *Artif. Organs*, 33, 164-168. (2009)
- 4) 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**, 709-717. (2009)

2. 学会発表

- 1) 重松宏和、浅井知浩、南野哲男、浅野仁裕、高島成二、目加田英輔、奥直人：HB-EGF 標的化リポソームによる新規ターゲティング DDS の開発. 第 25 回日本 DDS 学会（東京）、プログラム予稿集、p.316、2009 年 7 月 3 日
- 2) Takayuki Ishii, Takeo Urakami, Tomohiro Asai, Naoto Oku: Permeability increase in BBB before appearance of reperfusion injury in acute cerebral stroke. 36th Annual Meeting & Exposition of Controlled Release Society (Copenhagen, Denmark) TRANSACTIONS, 4696-1、2009 年 7 月 21 日
- 3) Hirokazu Shigematsu, Tomohiro Asai, Tetsuo Minamino, Yoshihiro Asano, Seiji Takashima, Eisuke Mekada, Naoto Oku: Development of immunoliposomes targeting HB-EGF. 4th International Liposome Society Conference (London, UK) Abstracts, p.87、2009 年 12 月 14 日

F. 知的財産権の出願・登録状況

【出願番号】 PCT/JP2010/51515

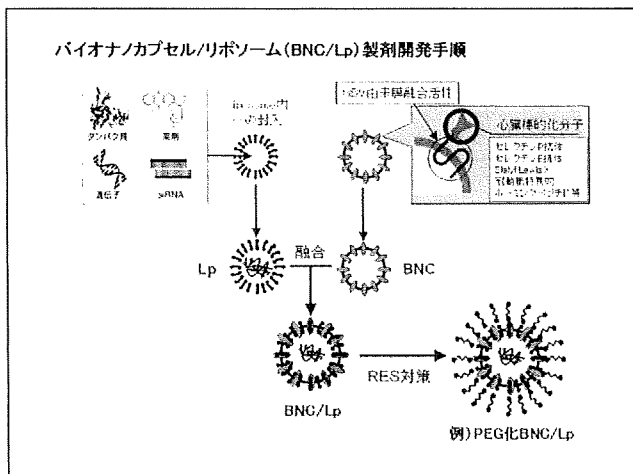
【発明者】南野哲男、目加田英輔、浅井知浩、奥直人、高島成二、朝野仁裕.

【出願人】大阪大学、静岡県立大学.

【発明の名称】HB-EGF 結合性タンパク質複合体.

【出願日】2010 年 2 月 3 日

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 ら, 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（第二世代 BNC 製剤）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。一昨年度は、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 で BNC/Lp 複合体を作製し、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、EPR（Enhanced Permeability and Retention）効果により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。しかし、抗体による標的化効果は微弱であり、心筋梗塞下の心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た（非梗塞部位の数倍の遺伝子発現）。次に、昨年度は、EPR 効果に加えて強い膜透過活性を期待して TAT 膜透過ペプチドを提示する BNC で BNC/Lp 複合体を作製し、同様に検討したところ、セレクチン分子抗体提示型 BNC よりも高効率で患部の炎症部位周辺に BNC が到達し、有意に高い遺伝子発現を観察することができた（TAT 依存的に非梗塞部位の 5～10 倍の遺伝子発現）。しかしながら、ウイルス由来感染機構を搭載したキャリア（運搬体）としては不十分な遺伝子導入効率と考えられたので、今年度は BNC/Lp 複合体の製造方法を改良し、また心筋梗塞部位に適した治療

用遺伝子として RNA を採用することで、飛躍的に BNC/Lp 複合体の遺伝子導入効率を高め、発現までの所要時間を短縮することを目的とした。また、新しい心筋梗塞部位標的化分子として HB-EGF に注目し、その患部における発現を検討した。

B. 研究方法

①BNC：

ヒト肝臓特異的 BNC（オリジナル BNC）は、HBV 表面抗原 L タンパク質粒子を大量発現する出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae* AH22R-/pGLD LIIP39-RcT: 黒田ら, JBC 1992）から山田ら（Vaccine 2001）の方法に従って精製した。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。BNC 外周には HBV 由来ヒト肝臓特異的レセプター部位（Pre-S 領域）が提示されており、BNC/Lp 複合体は、既に試験管内（*in vitro*）及びマウス体内（*in vivo*）においてヒト肝癌由来細胞及び組織に遺伝子及び薬剤を特異的かつ効率的に送達することが判明している（山田ら, Nature Biotech 2003; 鄭ら, JCR 2008）。

②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 ら Basic Res Cardiol. (2005)の方法に従って作製した。具体的には、6 週齢の Wister 系ラット（ $n = 2$ ）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。左前側方開胸した後、心嚢膜を除去後、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。

③HB-EGF mRNA 発現量の測定：

ラット心筋虚血再灌流モデルにおいて、再灌流 12 時間後に心臓を摘出し、左心室壁の梗塞領域およびその周辺部領域の心筋組織を摘出した。コントロールには未処理ラットを用い、心臓の左室壁より心筋組織を等量摘出した。各組織より全 RNA を抽出後、2 μ g の全 RNA よりランダムプライマーを用いた逆転写反応によって cDNA を合成した。合成した cDNA を 10 倍に段階希釈を行ない、定量的 PCR のテンプレ

ートとした。定量的 PCR 反応は、7900HT Fast Real-time PCR system (ABI) を用い、検出用プローブには TaqMan probe rat HB-EGF (Rn00564076, ABI) および内在性コントロール測定用として rat glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Rn99999916, ABI) を用いた。PCR のサーマルサイクリング条件は、[95°C 15 秒, 95°C 10 秒, 60°C 1 分] × 40 サイクル]で行ない、各サイクルにおけるプローブの FAM 蛍光シグナル量を測定した。SDS Software 2.3 (ABI) を用いて蛍光シグナルの増幅曲線を解析し、全てのサンプルの指数関数的増幅領域に等しい Threshold line を定め、各サンプルの増幅曲線中の Threshold cycle (Ct) 値を求めた。テンプレート cDNA の各希釈係数 (Log 値) における Ct 値をプロットし、近似曲線を作成、傾き (Slope) および R² 値を算出した。梗塞心筋における HB-EGF の相対発現量は、GAPDH で補正した各希釈係数の Ct 値の差を平均化して得た。

④HB-EGF 発現部位の観察：

ラット心筋虚血再灌流モデルにおいて、再還流 12 時間および 24 時間後に心臓を摘出し、ホルマリン固定後 OCT コンパウンドにて凍結封埋した。クライオスタット CM3050S (Leica) を用いて心臓の水平断面に 6 μm の厚さで凍結切片を作成し、抗 HB-EGF 抗体 (M-18, SantaCruz) を用いて免疫染色を行なった。二次抗体には Alexa594 標識抗体 (Invitrogen) または HRP 標識抗体 (Dako) を用い、蛍光抗体染色では Hoechst33342 による核染色を、酵素抗体染色では DAB (3, 3'-diaminobenzidine) による発色後ヘマトキシリンによる対比染色を行なった。全ての染色法で、二次抗体のみ (一次抗体なし) の染色を陰性対照として用いた。蛍光抗体染色サンプルは共焦点レーザー顕微鏡 LSM5 PASCAL (Zeiss) を、酵素抗体染色サンプルはデジタルカラー CCD カメラ DP70 (オリンパス) を接続した倒立顕微鏡 IX70 (オリンパス) を用いて観察し、梗塞部位、非梗塞部位のそれぞれの代表的な染色像の画像を取得した。

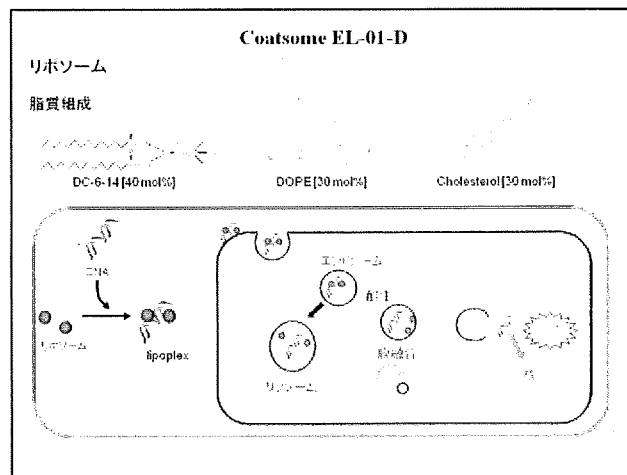
⑤ルシフェラーゼ発現遺伝子の BNC/Lp 複合体内部への封入 (従来法)：

Jung ら (JCR 2008) の方法に従って、Coatsome EL-01-D (NOF、第 3 図) 300 μg (脂質として) 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 μg 及び BNC (タンパク質量として) 100 μg を複合体化して調製した。

g を複合体化して調製した。

⑥ルシフェラーゼアッセイ：

各 BNC/Lp 複合体に含まれる DNA 量は RT-QPCR (ABI 社) を用いて定量を行った。粒子径及び表面電荷 (ζ 電位) の測定は、DLS (動的光散乱法) に基づく Malvern 社 Zetasizer を使用して行った。次に、ヒト子宮頸部がん由来細胞 HeLa 及びヒト肝がん由来細胞



胞 Huh7 を、35 mm ディッシュに播種し、約 5×10^4 細胞になったところで、各 BNC/Lp 複合体を DNA 量 30 ng に揃えて添加した。その後、48 時間培養し、細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を Luciferase Assay System (Promega) を用いて測定した。具体的には、細胞抽出液 10 μl にルシフェラーゼ基質 100 μl を加え、ルミノメーター (Thermo) を用いて 10 秒間発光量を測定した。また、各細胞抽出液のタンパク質量は 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 (Relative Luminescence Units) /mg タンパク質) で各細胞抽出液のルシフェラーゼ活性を比較した。

⑦倫理面への配慮：

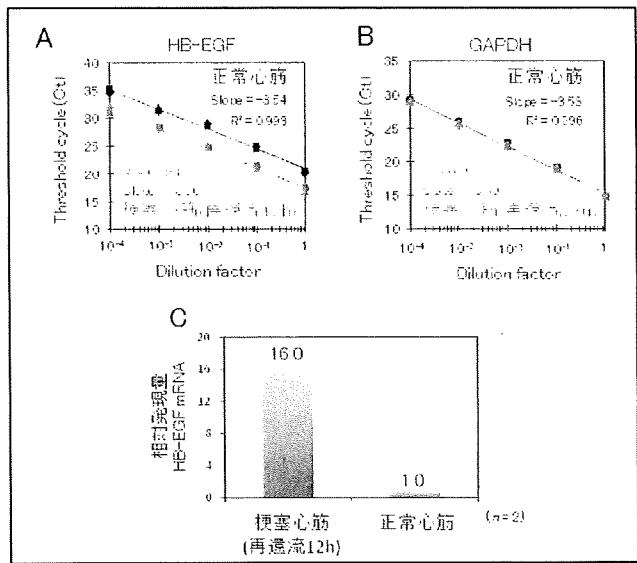
本動物実験に関しては、名古屋大学大学院生命農学研究科・動物実験委員会の承認を得た後、名古屋大学及び名古屋大学大学院生命農学研究科の定めた実験動物取扱指針に従って行った。遺伝子組換え実験に関しては、名古屋大学大学院生命農学研究科・遺伝子組換え実験委員会の承認を得ている。また、本実験はヒト由来検体を使用していないので名古屋大学倫理委員会の適用は受けていない。

C. 研究結果

①HB-EGF mRNA 発現部位：

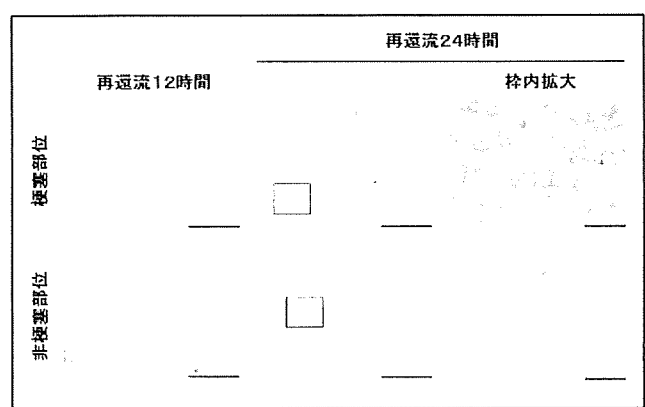
梗塞心筋における HB-EGF の Ct 値は、どの希釈係

数においても正常心筋に比べ約4サイクル(平均値: 4.003)少ないことが明らかとなった(第4図A)。一方GAPDHは、何れの希釈係数においても、梗塞心筋と正常心筋がほぼ同一のCt値をとることから、梗塞心筋と正常心筋でPCR開始時のcDNAの初期濃度に差はなかったと考えられる(第4図B)。これらの結果を基に、HB-EGFの相対発現量を算出した結果、梗塞心筋では正常心筋に比べ約16倍($2^{4.003} = 16.04$)HB-EGF遺伝子の発現量が高いことが明らかとなった(第4図C)。



②HB-EGF 発現部位:

酵素抗体染色法によって、再還流24時間後の梗塞部位にHB-EGFの陽性シグナルが検出された(第5図中央)。梗塞部位を拡大し観察したところ、未同定ではあるが、心筋細胞と予想される細胞群がHB-EGFの陽性シグナルを有していることが明らかとなった(第5図右)。一方、再還流12時間後の梗塞部位には、非梗塞部位や二次抗体のみの染色に比べ有意なシグナルは検出されなかった(第5図左)。蛍光免疫染色法では、心筋組織自体の自家蛍光が高く、再還



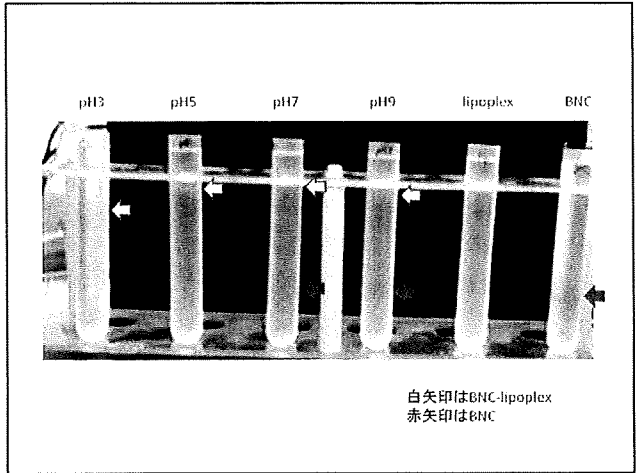
流24時間後の梗塞部位にHB-EGFの陽性シグナルを

検出することは出来なかった(data not shown)。

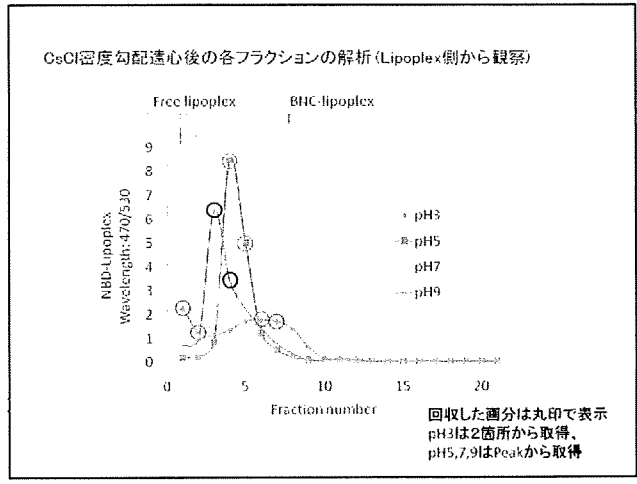
③新しいBNC/Lp複合体作製:

NBD蛍光標識したCoatsome D 200 ug及びLuciferase発現ベクター 44.4 ugを混合し、室温で15分間静置し、リポプレックス(Lipoplex)を形成させた。次に、Cy3蛍光標識したBNC 100 ug(タンパク質として)をpH 3, 5, 7, 9の緩衝液の何れかの存在下で混合し、37°Cで30分間静置した。その後、10-40%(w/v)塩化セシウムを溶解したリン酸バッファー(PBS)でスイングローターSW41(Beckmann)を使用して、4°C、24000回転で塩化セシウム密度勾配遠心を16時間行った(第6図)。その後、上層から500ulずつフラクションを単離し、NBD(第7図)及びCy3(第8図)の蛍光強度を測定した。その結果、各pHにおいて密度の異なるBNC/Lp複合体が形成されていることを確認した。

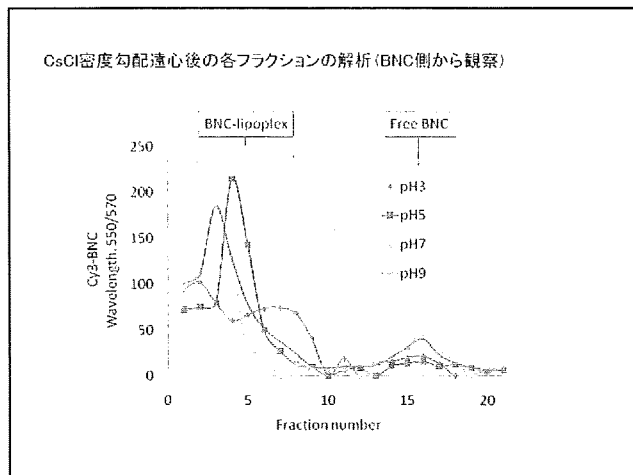
次に、各BNC/Lp複合体が含まれている画分をまとめ、RT-QPCR法によりルシフェラーゼ遺伝子部分を



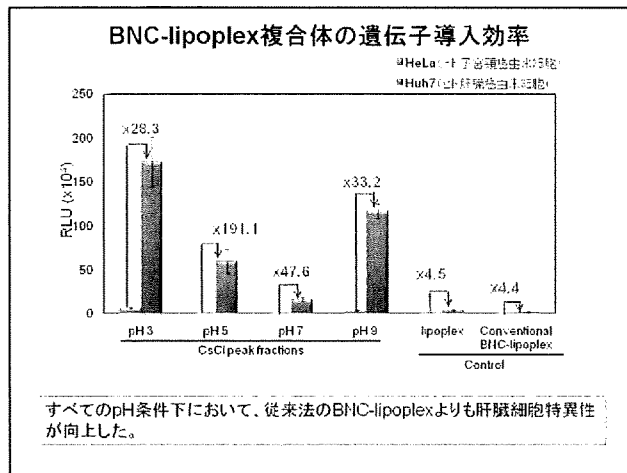
増幅して、各BNC/Lp複合体に含まれるルシフェラーゼ発現ベクターの含量を決定した(134~765 pg/ul)。また、NBD由来の蛍光値からCoatsome D由来の脂質量を決定し(7.16~32.86 ng/ul)、Cy3由来の蛍光値



から BNC 含量 (タンパク質として) を決定した (65.5 ~165 ng/μl)。また、DLS 法により各 BNC/Lp 複合体は直径 544~946 nm (PDI: 0.515~0.793) で、ζ 電位は pH 7 で作製したものは 0.05 mV で微カチオン性であったが、他の複合体は -6.64~-3.73 mV で弱アニオン性であった。



次に、BNC の標的細胞と非標的細胞における遺伝子導入効率を比較した場合、第 10 図に示すように、従来法だと 4 倍前後のヒト肝臓特異性しか示さなかったのが、28~191 倍の特異性を示すようになった。



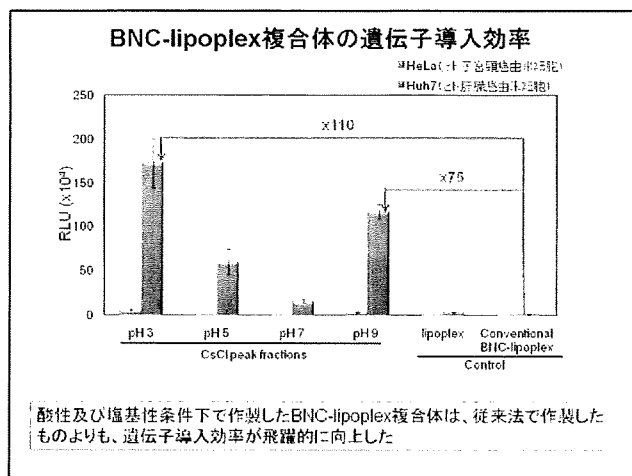
④新しい BNC/Lp 複合体の遺伝子導入能：

得られた BNC/Lp 複合体を DNA 量 (50 ng) で揃えて、2 種類の約 5×10^4 個の培養細胞 (ヒト子宮頸部がん由来 HeLa 細胞 (BNC の非標的細胞)、ヒト肝がん由来 Huh7 細胞 (BNC の標的細胞)) の培地に添加し、48 時間後の細胞から細胞抽出液を作製し、Luciferase アッセイを行った。なお対照群として、従来法で作製した BNC/Lp 複合体とリポプレックスを使用した。その結果、第 9 図に示すように、全ての BNC/Lp 複合体は BNC の本来の標的細胞である Huh7 細胞において対照群と比べて 10~110 倍の遺伝子導入活性が観察された。特に、pH3 及び pH9 で作製した複合体の導入効率は際立って高かった。

⑤RNA 封入 BNC/Lp 複合体の遺伝子導入能：

BNC/Lp 複合体はウイルスの感染機構によりヒト肝臓細胞に感染すると考えられている。しかしながら、本来のウイルスとは異なり遺伝子情報を核内に送達するコアタンパク質等を含んでいないので、封入している物質 (遺伝子を含む) が細胞質内に放出される可能性が高い。一方、心筋梗塞は非常に急性の疾患であるので、治療遺伝子を導入しても発現するまでに時間がかかるようでは、臨床的な意義が薄れる。そこで、細胞導入後、核内に移行して転写が必要な遺伝子発現ベクター (DNA) とは異なり、細胞質内で直接翻訳に供することができる遺伝子発現用 RNA を BNC/Lp 複合体に封入することを試みた。

具体的には、Luciferase 遺伝子を SP6 プロモータ下流に置き、SP6 RNA polymerase で *in vitro* transcription 反応を行い、Capping 反応を行った後、上記作製法 (pH7) で BNC/Lp 複合体を作製した。その後、前項と同様に Huh7 及び HeLa 細胞の培養上清に添加し、1, 2, 3 日後の細胞抽出液に含まれる Luciferase 活性を測定した (第 11 図)。その結果、従来法と比較して形質転換 1 日後において十分な Luciferase 活性が観察され、3 日後において従来法の約 10 倍の Luciferase 活性が観察された。本結果は、発現ベクターの替りに RNA を使用することが、心筋梗塞部位における治療遺伝子の導入方法として有効であることを示している。

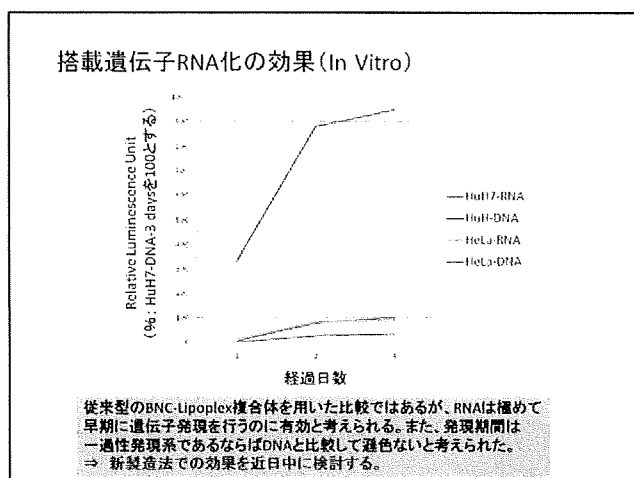


酸性及び塩基性条件下で作製した BNC-lipoplex 複合体は、従来法で作製したものよりも、遺伝子導入効率が飛躍的に向上した

D. 考察

①心筋梗塞部位における HB-EGF の誘導 :

今回の HB-EGF mRNA の定量結果は、再還流 12 時間後に梗塞およびその周辺領域で HB-EGF の遺伝子発現量が急増していることを示している。また、今回の HB-EGF タンパク質の発現は、再還流 24 時間後の梗塞部位に、HB-EGF タンパク質の発現が増加して



いることを示している。再還流 12 時間後に梗塞部位で HB-EGF の遺伝子発現が急増していること合わせて考えると、極めてリーズナブルな実験結果と考えられる。また、HB-EGF の陽性シグナルは心筋細胞に存在すると考えられたため、梗塞部位の心筋細胞において HB-EGF タンパク質の発現が増加していると考えられる。この結果は、心筋梗塞を標的とする DDS キャリアの標的因子として、HB-EGF が極めて有用となる可能性を示唆している。今後、再還流後の HB-EGF 遺伝子の発現タイムコースを詳細に解析することによって、HB-EGF を標的化する DDS キャリアの投与タイミングを最適化することが可能であると考えられる。

②新しい BNC/Lp 複合体の創製 :

次に、従来 BNC、カチオン性リポソーム、発現ベクター (DNA) を混合するのみで作製していた BNC/Lp 複合体であるが、今回、塩化セシウム密度勾配遠心法により遊離の BNC 及びリポプレックス (カチオン性リポソーム+DNA の複合体) を効果的に除くことができ、その結果、従来より強固な構造の BNC/Lp 複合体が精製されたと考えられる。その結果、第 9 & 10 図に示すような作製条件の pH に関係なく、どの BNC/Lp 複合体も従来品より遺伝子導入効率及び標的化能が向上したものと考えられた。

また、pH 依存的に遺伝子導入能が変化しているが、

これは BNC 表層に酸性環境下で膜透過活性を示すドメインを最近見出したことから、おそらく pH3 において BNC とカチオン性リポソームが脂質膜レベルで効率的に融合したものと考えられる。その結果、従来より強固な構造の BNC/Lp 複合体が生成されたと推測している。なお、pH9 における BNC/Lp 複合体生成に関しては、アルカリ性環境下で膜透過活性が増大する領域を見出していないので、なぜ遺伝子導入効率が増大したのか原因は不明なままである。

さらに、本 BNC/Lp 複合体はと電位は生体内投与に適した弱アニオン性であるが、粒子径が RES (Reticuloendothelial System; 細網内皮系) に捕捉されやすい大きさ (500 nm 以上) である。そこで、現在の技術レベルから考えると、本 BNC/Lp 複合体を生体内投与に供する場合には粒子径を整え、PEG 等の RES 回避策を講じて投与することが望まれる。

③RNA の使用 :

BNC/Lp 複合体は DNA のみならず様々な物質を送達可能なこと、BNC/Lp 複合体が細胞質までしか送達できないこと、心筋梗塞などの急性疾患において治療用遺伝子の発現を待っているのは現実的ではないこと、などを勘案すると、治療用遺伝子は従来の DNA でなく RNA である方が効率がよいと考えられる。今回、RNA は BNC/Lp 複合体において充分 DNA ベクターよりも有効な手段であることが判明した。しかし、次の点の改良が必要と考えられる。①今回の新しい BNC/Lp 複合体作製法を RNAse フリーの環境下で行う、②翻訳活性を高めるために polyA を付加した RNA を使用する、などである。

E. 結論

昨年度の結果から、心筋梗塞部位は極度の炎症が生じていて、当該心筋細胞は遺伝子 (DNA) を導入されても核内へ移行させ、転写し、発現させる能力が既に低下していると考えられた。今回見出した心筋梗塞部位における HB-EGF の一過性発現部位を狙った Active Targeting 能力を有する新しい BNC/Lp 複合体に、治療用遺伝子をコードする mRNA を封入すれば、昨年度まで開発していた BNC/Lp 製剤のみならず、既存の非ウイルス系及びウイルス系ベクター以上の、投与後 24 時間以内の強力な遺伝子発現が期待出来る。今後は、*in vivo* 実験を進めると共に、本技術を遺伝子導入のみならず薬剤送達にも活かす予定である。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Bio-nanocapsule-based enzyme-antibody conjugates for ELISA.
Anal. Biochem. 396 巻 (2010) 257 頁 Iijima M, Matsuzaki T, Kadoya H, Hatahira S, Hiramatsu S, Jung G, Tanizawa K, and Kuroda S.
- ② Hepatoma-targeted gene delivery using a tumor cell-specific gene regulation system combined with a human liver cell-specific bionanocapsule.
Nanomedicine Feb 3 号 (2010) 印刷中
Kang JH, Oishi J, Kim JH, Ijuin M, Toita R, Jun B, Asai D, Mori T, Niidome T, Tanizawa K, Kuroda S, Katayama Y.
- ③ ぶどう膜炎治療におけるドラッグデリバリーシステムの可能性
眼科 51 巻 (2009) 891-899 頁
真下 永、黒田俊一
- ④ Bio-nanocapsule-liposome conjugates for in vivo pinpoint drugs and gene delivery.
Methods in Enzymology 464 巻(2009)147 頁
Kasuya, T., Jung, J., Kinoshita, R., Goh, Y., Matsuzaki, T., Iijima, M., Yoshimoto, N., Tanizawa, K., and Kuroda, S.
- ⑤ 黒田俊一 (分担) 中空バイオナノ粒子：超分子サイエンス (国武豊喜監修) (2009) 株NTS (東京)

2. 学会発表

① バイオナノカプセル・リポソーム複合体による DNA 及び siRNA デリバリー技術 (招待講演)：黒田俊一 (名古屋大学・院生命農学) 第 25 回日本 DDS 学会

② Bio-nanocapsules for in vivo pinpoint drug and gene delivery system (招待講演)：黒田俊一 (名古屋大学・院生命農学) The 13th SANKEN International Symposium 2009 / The 8th SANKEN Nanotechnology Symposium / The 3rd SANKEN MSTEC Symposium / The 2nd SANKEN Alliance Symposium

③ 遺伝子及び薬剤の生体内ピンポイント投与を達成するバイオナノカプセル技術の開発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 (招待講演)：黒田俊一 (名古屋大学・院生命農学) 長岡技術科学大学 GCOE シンポジウム

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

① タンパク質中空ナノ粒子とそれを用いた物質運搬体、ならびに細胞への物質導入方法: 黒田俊一、谷澤克行、妹尾昌治、近藤昭彦、上田政和 (出願人: 株ビークル) 米国特許登録 7597905 (2009 年 10 月 6 日)

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

分担研究報告書

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

研究分担者 目加田 英輔 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨

本研究は、ナノサイズリポソームを心筋特異的に集積し、心筋特異的な薬物送達システム（DDS）を開発し、その様なりポソームを用いた新しい心筋梗塞治療薬を創薬しようとするものである。研究分担者は、心不全で発現上昇する細胞増殖因子 HB-EGF について、その生理的、病理的意義、作用機構について研究を進めてきた。また、HB-EGF に対するモノクローナル抗体を多数分離し、そのキャラクタリゼーションを行ってきた。研究分担者は自らの研究背景をもとに、研究代表者がすすめつつある心筋特異的 DDS において、その分子標的として考えられる HB-EGF について、実験として用いる HB-EGF 発現細胞の選択、ポジティブコントロールとして使用する HB-EGF 高発現細胞の作製、in vivo 実験のための抗体結合性の検討を行った。

A. 研究目的

今年度は、抗 HB-EGF 抗体結合リポソームを用いた DDS 実験を行うにあたり、種々の細胞について HB-EGF の発現量、細胞表面量を調べ、実験に適した細胞株を選別する。またマウス HB-EGF に対する抗体の反応性を明らかにする。

B. 研究方法

HB-EGF 遺伝子の各種細胞での発現量は real-time PCR によって決定した。細胞表面における proHB-EGF 量は、¹²⁵I 標識ジフテリア毒素を用いた結合試験によって測定した。また抗体のマウス HB-EGF に対する結合性は、マウス HB-EGF を過剰発現した L 細胞に対する抗体の結合実験によって求めた。

C. 研究結果

HB-EGF を分子標的とした DDS 実験を行うにあたり、実験に適した候補細胞としてサル腎由来の Vero 細胞、ヒト卵巣がん由来の SKOV3 細胞、RMG1 細胞を選択した。また、これらに HB-EGF を過剰発現した Vero-H 細胞、SKOV-H 細胞、RMG-H

細胞を作成した。

実験に使用している抗 HB-EGF 抗体がマウス HB-EGF に対して結合性を示すかどうかを検討した。その結果、現在使用中のモノクローナル抗体はマウス HB-EGF には結合性を示さないことが明らかとなった。

培養細胞での invitro モデル実験の後には、実際に小動物を用いたモデル実験が必要となる。現在使用中のモノクローナル抗体はマウス HB-EGF に結合しないことが明らかとなったので、この問題をクリアするためマウス HB-EGF 遺伝子をヒト型 HB-EGF に置換したノックインマウスの作製に着手した。

D. 考察

現在使用中のモノクローナル抗体はマウス HB-EGF に結合しないことから、動物を用いた in vivo DDS モデル実験には、マウス HB-EGF に結合するモノクローナル抗体を新たに準備する必要性が示された。しかし、作製を開始したヒト型 HB-EGF 発現マウスを用いると、現在 DDS に使用している抗体をそのまま用いて in vivo 実験が

可能となるばかりでなく、本法による生体毒性を同時に調べることができるので、よりモデル系としては優れていると考えられる。今後は、ヒト型 HB-EGF ノックインマウスの作製を進め、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に使用したいと考えている。

E. 結論

HB-EGFを分子標的とするDDSの開発に使用する細胞の選別、ポジティブコントロール細胞の作製、in vivo実験のための準備を行った。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Mizushima, H., Wang, X., Miyamoto, S., and Mekada, E. Integrin signal masks growth-promotion activity of HB-EGF in monolayer cell cultures. (2009) *J. Cell Sci.* 122: 4277-4286.

Mekada, E. and Iwamoto, R. HB-EGF. *UCSD-Nature Molecule Pages*. □ *Published online: 13 Nov 2008 / doi:10.1038/mp.a002932.01*

237, 247-258.

2. 学会発表

1. 日本細胞生物学会総会

2009. 6. 2. 名古屋市

ポスター発表

1. 知念いち乃、他、新規抗ヒト HB-EGF モノクローナル抗体の作製とその応用

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許出願

1 件

PCT/JP2010/51515 (出願日: 2010年2月3日)

(基礎出願: 特願2009-23653)

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

2. 実用新案登録

現在のところなし

3. その他

特記すべき事項なし。