

IV. 研究成果の刊行物・別刷

1 HBV 遺伝子と関連抗原

要点

- HBV は 3.2kb 程の環状不完全 2 本鎖 DNA ゲノムをもつ、逆転写を複製過程にもつウイルスである。
- 脂質二重膜と内殻のコア粒子で構成された粒子 (Dane 粒子) が感染性 HBV 粒子である。
- 転写産物には 3.5kb, 2.4kb, 2.1~2.2kb, 0.8kb の mRNA がある。
- 3.5kb mRNA のうち、プレコア (preC) 翻訳開始コドンを含まないプレゲノム RNA は HBV 逆転写複製の鋳型になるとともにコア (C) および pol 遺伝子産物の発現に関わる。
- preC-C 遺伝子は preC 翻訳開始コドンを含む 3.5kb の mRNA から翻訳された全長 preC-C (p25) と、翻訳後修飾を受けた分泌性 HBe 抗原 (p17) および p22 を発現する。
- C 粒子を形成する C 遺伝子産物は p21 である。
- S 遺伝子は、2.4kb mRNA から翻訳される preS1-preS2 領域を含む large S (LS), 2.2kb mRNA から翻訳され、preS2 領域を含む middle S (MS), small S (SS) 翻訳開始コドン (もしくは単に HBs) から翻訳される 3 つの膜蛋白を発現し、HBs 抗原として検出される。

はじめに

B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus : HBV) は、1965 年に Blumberg らによって発見された¹⁾。当初は白血病の発症との関わりが注目されたが、その後間もなく輸血後血清肝炎との関わりが確立された。急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝癌などの発症に起因する。HBs 抗原陽性者の地理的分布と肝がん発生率と疫学的関連は密接である。つまり、HBV 感染と関連病態発症との因果関係は比較的よく理解されているが、HBV 生活環や病態発症機構には不明な点が少なくない。一つには、HBV には簡便な *in vitro* あるいは個体レベルでの感染系が存在しないことがその理由に挙げられる。基本的な生活環は、付着・侵入→cccDNA (covalently closed circular DNA) 形成→転写→パッケージング/逆転写・複製→粒子形成/成熟→放出であるが (図 1)、それぞれのステップにおいてその詳細は不明である。特に付着・侵入→cccDNA 形成、粒子形成/成熟→放出の過程は治療法開発の格好の標的になると思われるので今後の解明が待たれる。HBV ポリメラーゼのアクセシ系も確立されていない。

HBV 慢性肝炎に対する治療として、近年ほとんど耐性変異の出ない核酸アナログ製剤 (エンテカビル、テノホビル) が開発され臨床応用されている。しかし、長期的展望に立つと、human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) の逆転写酵素阻害薬としての開発ではなく HBV ポリメラーゼ

の特性に基づいた開発が必要と思われる。HBV は余りにコンパクトすぎて、逆に抗ウイルス分子標的を定めることが困難ということもあり、HBV ポリメラーゼが今後も治療標的の中心になるとと思われる。

本稿では、HBV 感染と病態発症機構の理解を深めるべく、また今後の研究の進展により浮かび上がってくるかもしれない新たな抗 HBV 分子標的の理解を踏まえて、3.2kb というきわめてコンパクトに組織された HBV ゲノム・遺伝子とその遺伝子発現機構、その産物(抗原)、機能を中心に概説する。

HBV 粒子・ゲノム

HBV はヘパドナウイルス属に属するきわめて特徴的なウイルスである。ヘパドナウイルスは鳥類、哺乳類の限定的な種に発見されている。鳥類では duck hepatitis B virus (DHBV), heron hepatitis B virus (HHBV) がよく知られているが、ツルやガチョウでも報告されている。哺乳類では本稿で解説する HBV はもちろんであるが、霊長類ではチンパンジー (chimpanzee hepatitis B virus), オランウータン (orangutan hepatitis B virus), テナガザル (gibbon ape hepatitis B virus) など報告されている。げっ歯類ではウッドチャック (woodchuck hepatitis virus; WHV), 地リス (grand squirrel hepatitis virus; GSHV) のヘパドナウイルスが古くから研究されている²⁾。霊長類を除く動物モデルは HBV 自然生活環を研究するには格好のモデルであるが、飼育が面倒なことや遺伝的均一性に問題があり、HBV 研究者の間で広く用いられるに至らなかった。

HBV は約 3.2kb の環状不完全 2 本鎖 DNA をゲノムとする(図 2)が、複製過程に逆転写過程をもつ異例のウイルスである³⁾。⊖鎖 DNA には末端蛋白 (HBVpol の機能ドメインの一つ) がゲノム核酸と共有結合している。⊕鎖 DNA の 5' は、⊕鎖 DNA 合成開始にプライマーとして使われた RNA が付着している。

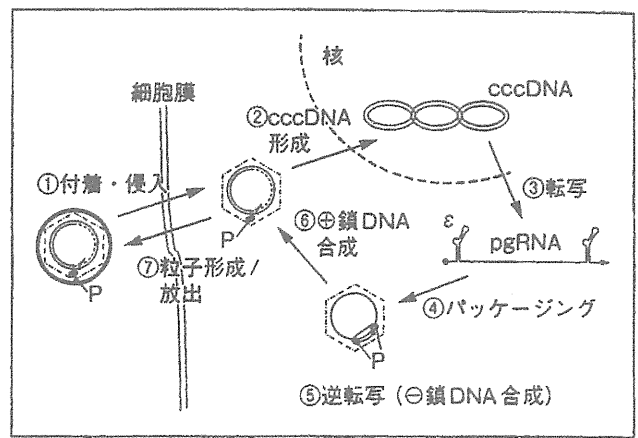


図 1 HBV の基本的な生活環
 ①付着・侵入→② cccDNA 形成→③転写(遺伝子発現)→④コア粒子へのパッケージング→⑤逆転写(⊖鎖 DNA 合成)→⑥⊕鎖 DNA 合成→⑦粒子形成(HBV 膜粒子への内包)と放出が HBV の一般的な生活環と考えられている。HBV 複製活性が高いとき、②→③→④→⑤→⑥→⑦のサイクルが回るという報告もある。この活性は DHBV の初代培養肝細胞への感染系(効率が低い)では確認されているが、HBV では一般的にはこの活性は低いと考えられる。

HBV ゲノムの機能単位は、複製過程に関わる direct repeat 1 および 2 (DR1 および DR2), mRNA 発現に関わる core, preS-S, S, X それぞれのプロモーター(Cp, preSp, Sp, Xp), 組織特異性の弱いエンハンサー I (EnI), 肝細胞特異性の高いエンハンサー II (EnII) などである(図 2)。また HBs ORF 内にグルココルチコイド反応配列 (glucocorticoid responsive element; GRE) が存在する(図 2)。さらに precore ORF 内~core 翻訳開始コドンにかけて、プレゲノム RNA (pgRNA, 後述) のパッケージングシグナルとしてはたらく ε 配列がある(図 2)。ε 配列がとる 2 次~3 次構造が HBVpol に認識され、pgRNA のパッケージング、逆転写の開始反応に重要であると考えられている。

HBV のヒト末梢血単核球への取込みは、HBV に対する免疫機序を考察するうえでは重要であると考えられるが、HBV 感染・増殖はほぼ特異的に肝実質細胞で行われる。受容体(レセプター)の特性と遺伝子発現に関わる宿主因子が肝実質細胞で発現されることによると思われる。

HBV 膜蛋白粒子で内包されたコア粒子をもつ

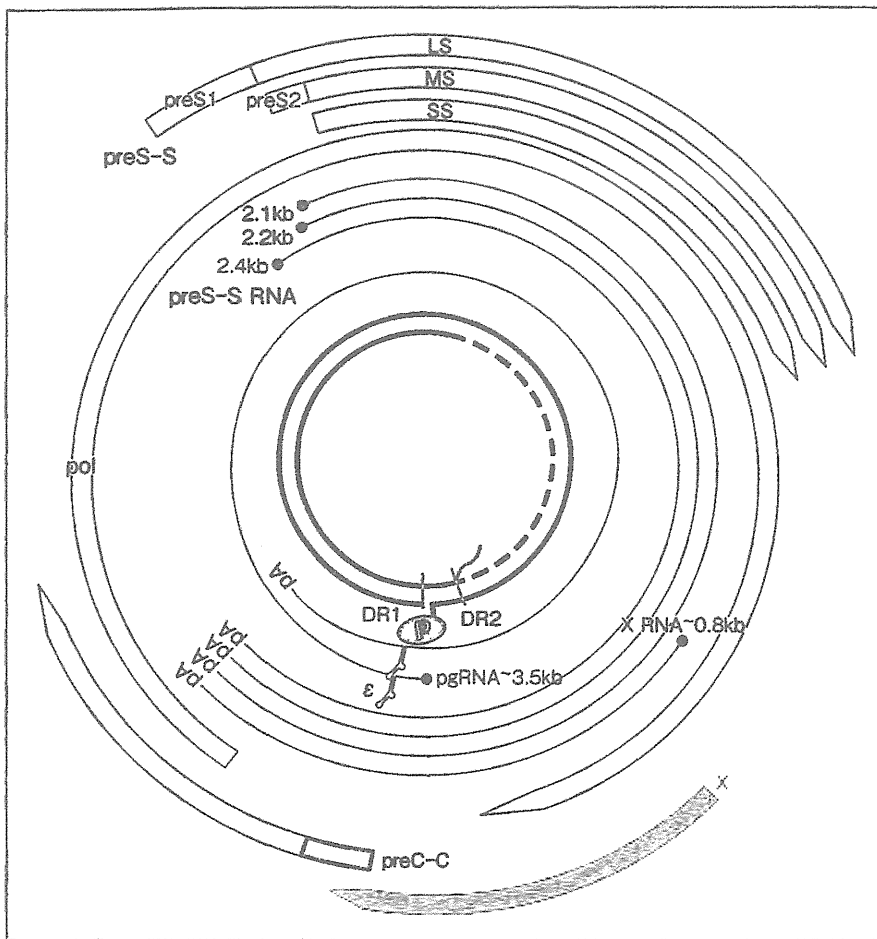


図2 HBVのゲノム構造と関連転写産物、遺伝子産物

最も内側にHBVのゲノム構造、その外側に転写産物 (splice mRNA は示していない)、遺伝子産物を示した。HBVゲノムは Θ 鎖DNA5'にHBVpolが共有結合したオーバーラップした領域である。

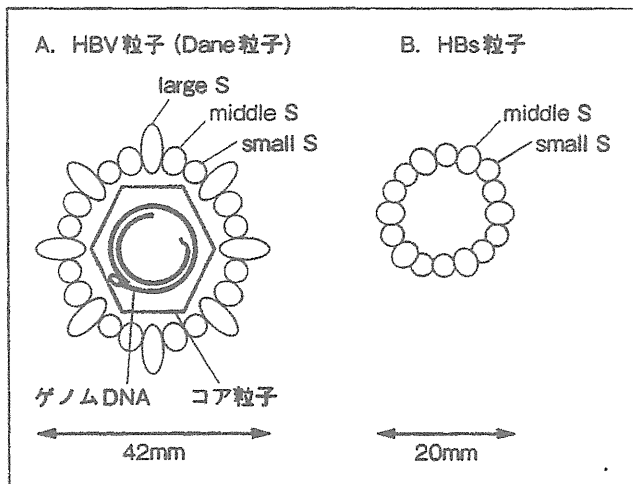


図3 HBVの粒子構造

A. 感染性粒子 (Dane 粒子) の構造の模式図。コア粒子を内包するHBV膜粒子で覆われる。本粒子の生産には程よいLS, MS, HBs (SS) のバランスが必要と考えられている。
B. HBs 粒子の構造。MS+SS もしくは SS のみから構成される小粒子。

ウイルスが径約42nm程の感染性HBV粒子 (Dane 粒子) (図3A) が、肝実質細胞膜上の受容体と結合することから一連の感染過程が始まると考えられる (HBV 受容体は本ウイルスの発見から半世紀の間未知であったが、2012年11月に突然ある候補因子が発表された⁴⁾)。肝細胞内へ放出されたコア粒子内では、末端蛋白を外し不完全2本鎖の修復しつつ核内へ移行して、最終的には、2本鎖閉鎖環状DNA (cccDNA) が構築される。

cccDNAは被転写活性が高く、HBV遺伝子関連の種々のmRNAが産生されると考えられている。HBVの肝実質細胞特異性は、内在するエンハンサーやプロモーターが高分化肝実質細胞で特異的に発現している転写因子による影響も大きいと思われる⁵⁾。

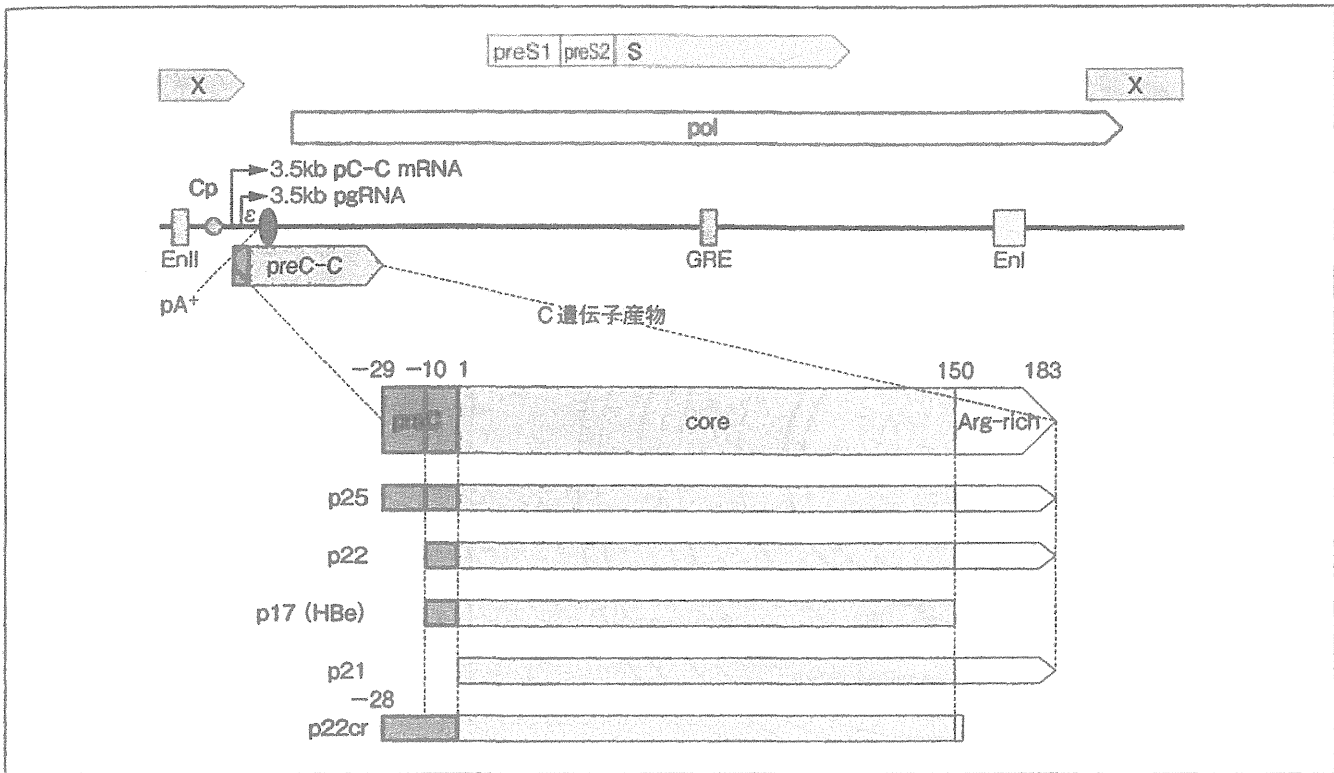


図24 プレコア-コア遺伝子関連産物
 プレコア-コア ORF のゲノム上の位置関係と本遺伝子関連転写開始点を示した。
 Cp: コアプロモーター, EnI; エンハンサー-I, EnII; エンハンサー-II, pA⁺; polyA 付加シグナル, GRE; glucocorticoid responsive element. ε; パッケージングシグナル配列。

HBV 転写産物と遺伝子

ウイルスの転写機構は複雑なことが多く、特に HBV の転写産物 (転写単位もしくは遺伝子) は全長をカバーするものやオーバーラップしていて、常識的な遺伝子として記載することは難しい—いわば、ゲノム全長が遺伝子である。そこで特に HBV の遺伝子について語るとき、多くはその産物について記載することが多い。その HBV がコードする蛋白は大まかに precore-core, pol, preS-S, X の4つである。

ゲノム全長をカバーする転写産物として 3.5 kb mRNA がある。この転写産物は、precore-core 蛋白の ATG 付近から転写され、5' と 3' がオーバーラップしている (図2)。プレコア ATG を含むものと含まないものがあり、前者はプレコア-コアの翻訳に寄与されると考えられている。一方、プレコア ATG を含まないものは core, pol の発

現に関わると同時に、pgRNA として逆転写の鋳型として機能するという重要な機能をもっている。pol の翻訳機構は不明な点も多いが、レトロウイルスにみられる終止コドンの抑止ではなく、一般的にはコア ATG の read-through (leaky scanning) 機構により翻訳されると考えられ、したがって、レトロウイルスの gag-pol 融合蛋白ではなく独立した pol として翻訳される。

subgenomic な転写産物としては、S 関連遺伝子の翻訳に関わる 2.4kb, 2.1~2.1kb の mRNA, X 遺伝子固有の 0.8kb の mRNA がある。また全長をカバーする 3.5kb の mRNA のうち、コア ORF の終止コドン手前から、HBs ORF の中程までスプライシングを受けた機能不明の 2.2kb の mRNA として産生されるものがある。

すべての HBV 関連転写産物は同一方向 (この方向を現時点での ⊕ 鎖と定義する) であり、⊖ 鎖をコードする遺伝子は今のところ同定されていない。また、転写はコア ATG の直下流にある poly A⁺ シグナル

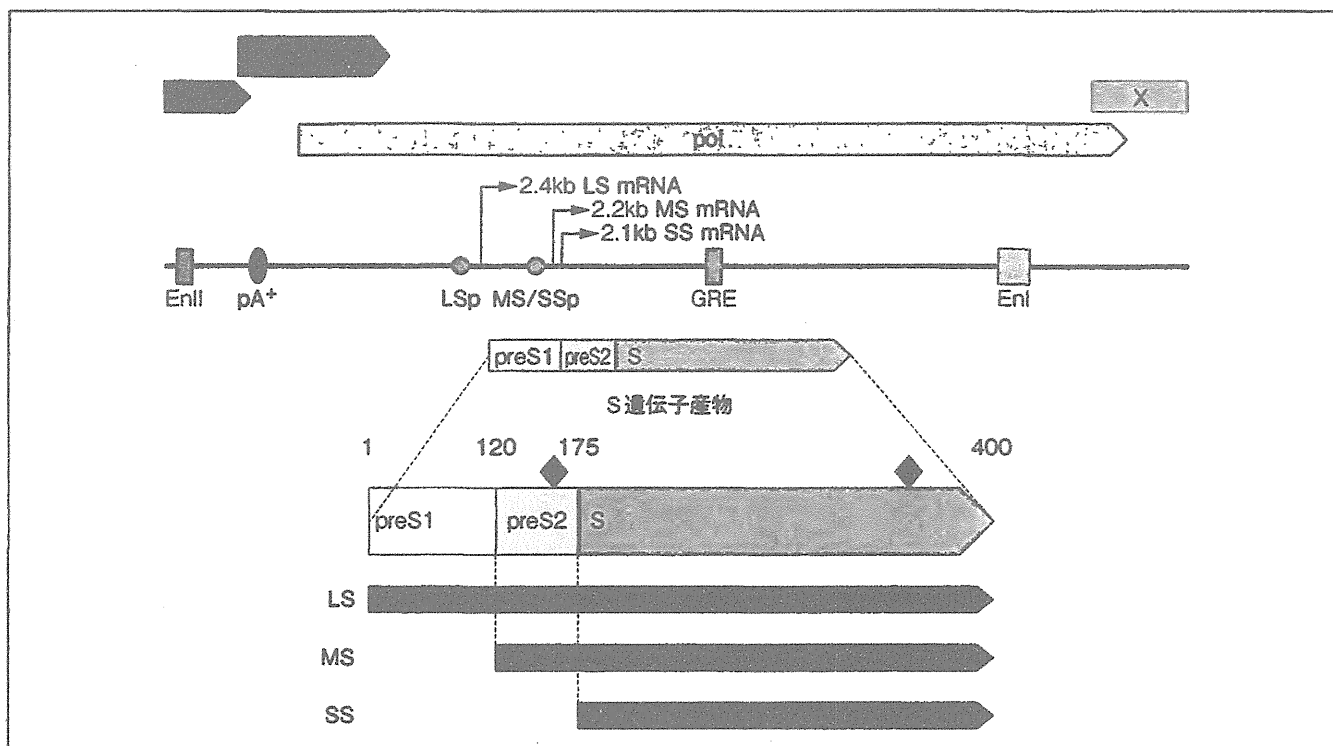


図5 preS-S 遺伝子関連産物

preS-S ORF のゲノム上の位置関係と本遺伝子関連転写開始点を示した。

LSp: LS プロモーター。MS/SSp: MS/SS プロモーター。EnI: エンハンサー-I。EnII: エンハンサー-II。pA⁺: polyA 付加シグナル。GRE: glucocorticoid responsive element。ε: パッケージングシグナル配列。

により終結すると考えられている。

III プレコア-コア遺伝子産物

プレコアは文字通りコア ORF の前に位置するコア ORF と連続する 29 アミノ酸からなる領域で(図4)、コア ORF と連続して翻訳される(183~185 アミノ酸: p25)。p25 は翻訳後プロセスを受け、N 末と 19 アミノ酸と C 末 151 アミノ酸以降が切り取られて HBe 抗原 (p17) の産生に関わる。N 末のみがプロセスされた p22 が中間体として検出される。N 末 19 アミノ酸は疎水性が高く HBe 抗原の分泌に賦与されると考えられている。血清中の HBe 抗原量は感染性 HBV の量を反映し、HBV 複製活性と相関が高い。基本的に抗 HBe 抗体は既感染者(持続感染者を含む)には存在するが、HBV 複製活性が上がり抗 HBe 抗体量を相対的に上回ってくることで検出されなくなる。

HBV のコア粒子はコア ORF 産物となる HBc

抗原 (p21) から構成される T (triangulation number) = 4 の正 20 面体構造をとる。5' と 3' がオーバーラップした全長強の 3.5kb mRNA のうちプレコア ATG を含まない mRNA (プレゲノム RNA, pgRNA) から翻訳されると考えられている。HBc の抗原性は強く HBV 感染者では抗 HBc 抗体として検出され、やはり HBV 複製活性と相関が高い。また、プレコア-コア遺伝子産物として p22cr 抗原が報告されています。プレコア領域と C 末縮の Arg-rich の部分が切断され、HBV DNA をもたない中空粒子を形成すると考えられています⁵⁾。近年開発された HB コア関連抗原測定系では e 抗原やコア抗原とともに p22cr 抗原も検出されます。

IV preS-S 遺伝子産物

preS-S 蛋白は膜粒子を構成する HBV 膜蛋白であり、多くの分泌蛋白や膜蛋白のように糖鎖が

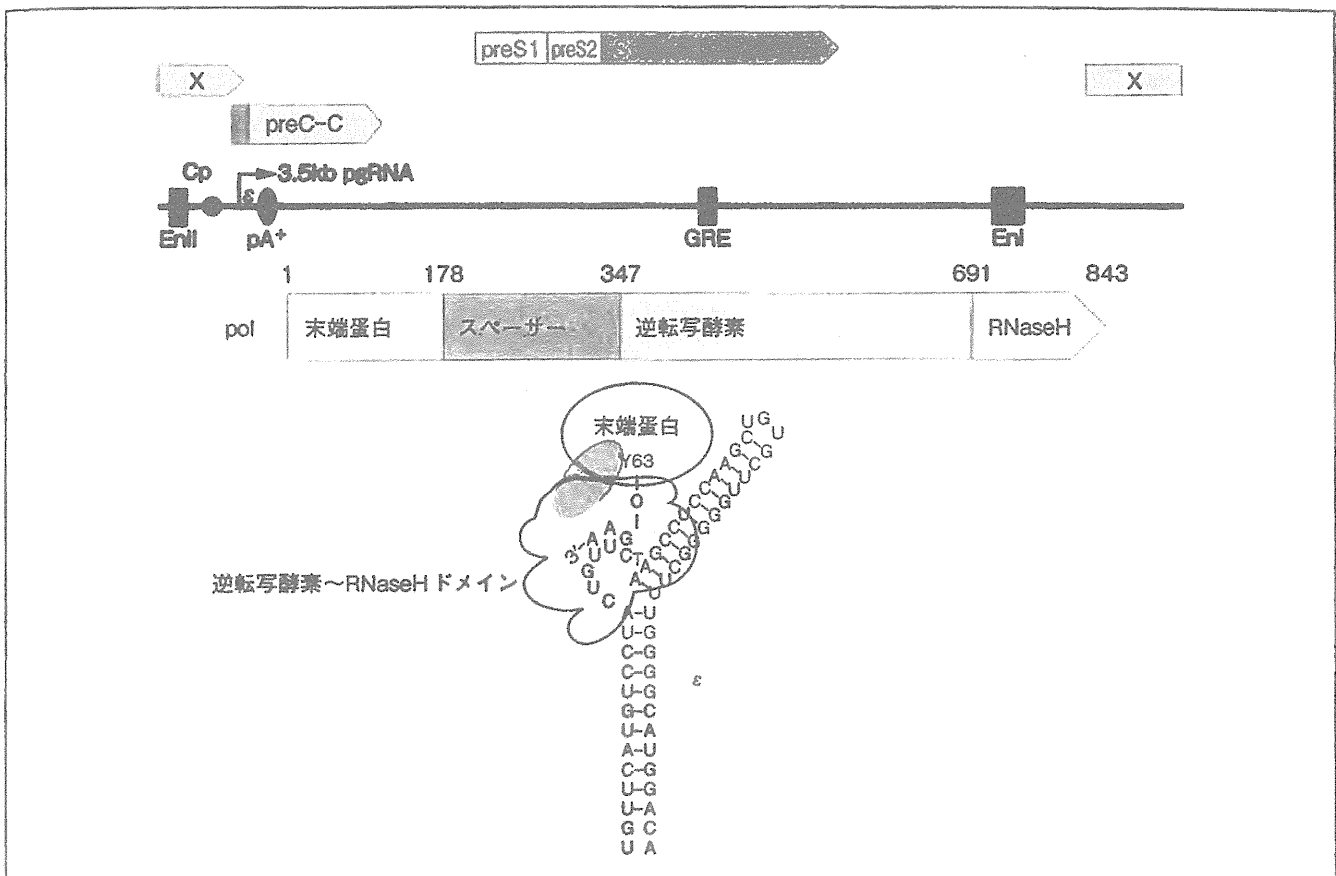


図6 HBVpol 遺伝子産物

HBVpol ORF のゲノム上の位置関係を示した。HBVpol はコア蛋白と同様に pgRNA から翻訳されると考えられている。末端蛋白の63番目のチロシン(Y)からプライミングが起こると考えられている。

Cp: コアプロモーター, EnI: エンハンサー-I, EnII: エンハンサー-II, pA+: polyA 付加シグナル, GRE: glucocorticoid responsive element, ε: パッケージングシグナル配列。

付加されている(図5)。preS1(108~119アミノ酸)-preS2(55アミノ酸)-HBs(226アミノ酸)のすべての領域を含む蛋白, large S(LS; p39, gp42)は約2.4kb, preS2-HBsを含む middle S(MS; gp33, gp36)は約2.2kb, HBs(もしくは small S[SS]; p24, gp27)の基本的に3つの蛋白がある。この蛋白の発現に関わる mRNA は 3.5kb mRNA とオーバーラップする形で発現する。LSは約2.4kb, MSは約2.2kb, HBsは2.1kbの mRNA から翻訳される。臨床的にはHBs抗原-抗体系として検出される。

HBs+/-MSはそれ自体で小粒子を形成し、HBV感染患者血中に分泌される。HBV粒子の99.9%はこの20nmの小HBs粒子であり(図3B)、感染性HBV(Dane粒子)はごくわずかである。Dane粒子の形成にはLS+MS+HBs(も

しくはLS+HBs)が必要であり、これら3つの膜蛋白がバランスよくブレンドされることでコア粒子を内包できるDane粒子が形成されると考えられている。したがって、HBV産生蛋白(抗原)のうちでは、preS1抗原量が血中のウイルス量を最も反映すると考えられる(臨床的にはHBV DNA量を測定する系が確立され汎用されている)。

肝実質細胞への付着・侵入という初期過程にpreS-Sが関わることで、HBVの肝実質細胞への特異性を第一義的に決定している。HBVの受容体はウイルス発見から半世紀足らず不明であったが、2012年11月に sodium taurocholate cotransport cotransporting peptide (NTCP)がそれであるという報告があったが、付着・侵入に関わるHBV側の因子(すなわちHBV受容体のウイルス側リガンド)はpreS1領域にあるというコンセン

サスは20年以上も前から得られていた。このことはLSがDane粒子形成に必須であることとも合致する。

V HBV ポリメラーゼ (HBVpol)

HBVが発現する最大の蛋白(832~845アミノ酸)で、HBVの複製過程(逆転写、 \oplus 鎖DNA合成)に関わる。末端蛋白領域(terminal protein: TP)、スペーサー領域(spacer, SP)、逆転写および $+$ 鎖DNA合成酵素領域(reverse transcriptase: RT)とRNaseH活性領域(RNaseH, RNH)といったドメイン構造で構成される(図6)。末端蛋白領域はHBV pgRNAのパッケージングに関わる ϵ を認識し、蛋白プライマーとして \ominus 鎖合成を開始する。 \ominus 鎖DNA合成(逆転写)と $+$ 鎖DNA合成そのものの活性はRTドメインによる。RNaseHドメインは逆転写過程が終了した鋳型RNA(RNA:DNAハイブリッドになったところ)の分解に関与する。HBV感染患者でHBVpolを認識する抗原・抗体系は確立されていないが、Dane粒子内の \oplus 鎖DNA合成活性を測定する系は存在する。ただし、操作は煩雑で検出感度が高い系とはいえない。

核酸アナログ製剤を中心とした抗HBV剤はHBVpolの活性を抑える薬物であるが、HBVpolの特性に基づいて開発された薬物は一つもない。これは本蛋白を発現・精製して活性をhigh-throughputで測定する系が確立されていないことが最も大きな理由と思われる。立体構造ももちろん解明されていない。したがって、HIVなど逆転写過程を複製過程にもつレトロウイルスの逆転写酵素に類似することを想定した活性阻害薬が抗HBVpol薬として応用されている。

今後はHBVpolの特性に基づいた抗HBV薬の開発が望まれる。そのためには簡便な発現・精製系の樹立と活性測定系の開発が不可欠である。これまでの研究によると、HBVpolそのものが比較的大きな蛋白で、大腸菌などの微生物系での発現そのものが困難であったり、可溶化が難しかった

り、克服すべきいくつかの問題点がある⁷⁾。また逆転写過程が蛋白プライミングという特性や ϵ を認識する鋳型特異性など考慮すべき問題が単純な逆転写酵素に比べると多くある。立体構造解明を含め、全長の大量発現・精製、アッセイ系の確立が望ましいが、最低限RTドメインの発現・精製と活性測定系の早期確立によるhigh-throughput薬物探索システムの開発が望まれる。

VI X 遺伝子産物

X遺伝子産物は、そのORFの存在が示されてから種々のウイルスあるいは宿主の遺伝子と相同性が乏しく、機能が推定できなかったことから、X遺伝子と名付けられた。X遺伝子に固有の0.8kb mRNAから翻訳される154アミノ酸からなる16~17kdの蛋白である。定まった立体構造をとらず、そのため逆に多機能性を示すと思われる(図7)。種々の宿主細胞内シグナル伝達系へ影響を与え、HBV増殖促進にはたったり、肝発癌に関与することが報告されている⁸⁾。

まとめ

日本に約100~150万人、世界的には3.6億人の感染患者がいるHBV感染症の治療は難航をきわめており、これは主にHBVのウイルス学が実際上ほとんど解明されていないことによると思われる。最初に述べた付着・侵入→cccDNA形成→転写→パッケージング/逆転写・複製→粒子形成/成熟→放出という基本的な生活環は正しいとしても、本来の感染サイクルのなかでどのような機構でこの営みが行われているのかは未だ不明な点が多い。

新規のHBV関連遺伝子産物⁹⁾やHBVの感染サイクルを制御するmicroRNA(miRNA)に関してもいくつかの報告があるようであるが¹⁰⁾、確固とした機能性miRNAはみつからない。今後、 \ominus 鎖をコードする未知の遺伝子(産物)、HBVがコードするantisense RNA、miRNAの探索を含めた新たな発見が、HBV学を推し進め、HBV感

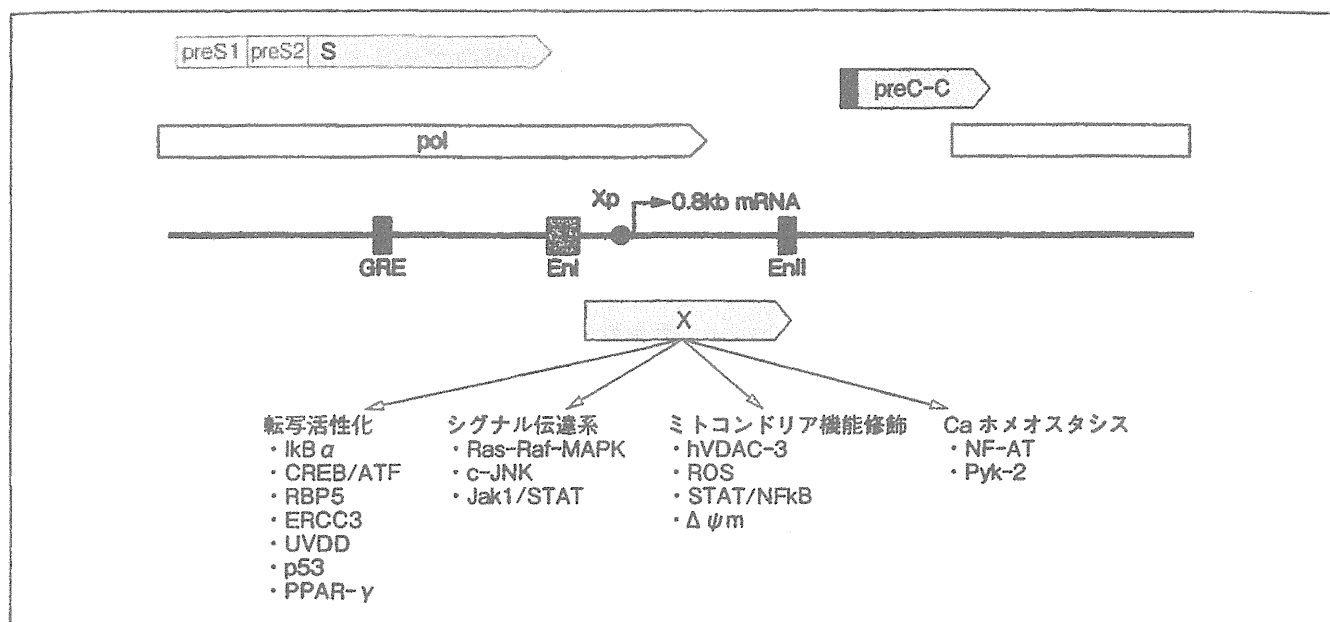


図7 X 遺伝子産物とその機能

X ORF のゲノム上の位置関係と本遺伝子関連転写開始点を示した。下段には、想定されている機能の概略と標的とされる宿主遺伝子産物を示している。

Xp ; X プロモーター。 EnI ; エンハンサーI。 EnII ; エンハンサーII。 pA⁺ ; polyA 付加シグナル。 GRE ; glucocorticoid responsive element。 ε ; パッケージングシグナル配列。

感染症治療法の開発・確立に多大な貢献を果たすものと思われる。

(上田啓次)

文献

- 1) Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. : A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 191 : 541-546, 1965
- 2) Seeger C, Zoulim F, Mason WS : Hepadnaviruses. "Fields Virology" Knipe DM and Howley PM ed. 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia, p2977-3029, 2007
- 3) Summers J, Mason W S. : Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29 : 403-415, 1982
- 4) Yan H, Zhong G, Xu G, et al. : Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *elife* 1 : e00049, 2012
- 5) Kimura T, Ohno N, Terada, N, et al : Hepatitis B virus DNA-negative Dane Particles lack core protein but contain a 22-kDa precore protein without C-terminal arginine-rich domain. *J. Biol. Chem* 280 : 21713-21719, 2005
- 6) Quasdorff M, Protzer U. : Control of hepatitis B virus at the level of transcription. *J Viral Hepat* 17 : 527-536, 2010
- 7) Yu Y, Pandeya DR, Liu ML, et al. : Expression and purification of a functional human hepatitis B virus polymerase. *World J Gastroenterol* 16 : 5752-5758, 2010
- 8) Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, et al. : Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol Biol (Paris)* 58 : 267-272, 2010
- 9) Soussan P, Tuveri R, Nalpas B, et al. : The expression of hepatitis B spliced protein (HBSP) encoded by a spliced hepatitis B virus RNA is associated with viral replication and liver fibrosis. *J Hepatol* 38 : 343-348, 2003
- 10) Liu WH, Yeh SH, Chen PJ. : Role of microRNAs in hepatitis B virus replication and pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1809 : 678-685, 2011

グルココルチコイド(副腎皮質ステロイド)感受性領域

I グルココルチコイドによる遺伝子発現修飾

グルココルチコイド (glucocorticoid : G) は生体における代謝, 免疫機能や行動などさまざまな事象に関わる。これらの事象はグルココルチコイドが細胞質に存在するグルココルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor : GR あるいは GR α) と結合し G-GR 複合体が核内へ移行し, G-GR がホモダイマーもしくは宿主転写因子 jun や GR β とヘテロダイマーを形成することによる標的遺伝子の発現調節によってもたらされると考えられている。G-GR のホモダイマーは転写活性化に, G-GR と jun や GR β などのヘテロダイマーは転写抑制/不活化に関わるとされる (図 1A)¹⁾。

II グルココルチコイド受容体の構造

GR は性ホルモン受容体やミネラルコルチコイド受容体 (MR) と基本的に同様な機能構造をとっていると考えられている。N 末の転写活性化ドメイン (transactivation domain 1 : TAD1), DNA 結合/二量体形成ドメイン (DNA binding domain/dimerization domain : DBD), リガンド (グルココルチコイドや性ホルモン, アルドステロン) 結合ドメイン (ligand binding domain : LBD) からなる。C 末の LBD には核移行シグナル (nu-

clear localization signal : NLS) や Stat5 などの付随転写因子相互作用領域があり, またグルココルチコイド依存性に転写活性化に関わる領域がある (図 1B)²⁾。

III HBV の GRE

G-GR 系による転写制御は, 遺伝子発現制御上の glucocorticoid responsive element (GRE) を介して行われるエンハンサー作用である。HBV は genotype を問わず, S 蛋白 ORF (open reading frame) 内に GRE コアコンセンサス配列 (TGTCCT) が 2 コピー近接して存在し (図 2A, B), グルココルチコイドの存在により転写が増強されると考えられている³⁾。一般に副腎皮質ステロイドはウイルスの増殖を上昇させ, 免疫機能を抑制するが, 副腎皮質ステロイドによる B 型慢性肝炎治療 (ステロイド離脱療法) はこの原理を巧みに利用したものと言える。

HBV にはエンハンサー I (EnI) とエンハンサー II (EnII) により感染細胞内での基本的な転写調節が行われていると考えられるが, グルココルチコイドの有無により, EnI, EnII, GRE が相乗的に作用して, HBV 関連転写産物の発現調節に関わると思われる。特に, HBV ゲノムは 3.2 kb で環状 DNA であり, 転写の際にはこれらのエンハンサーエレメントが密接に相互作用し合うことが想像される (図 2A)。

(上田啓次)

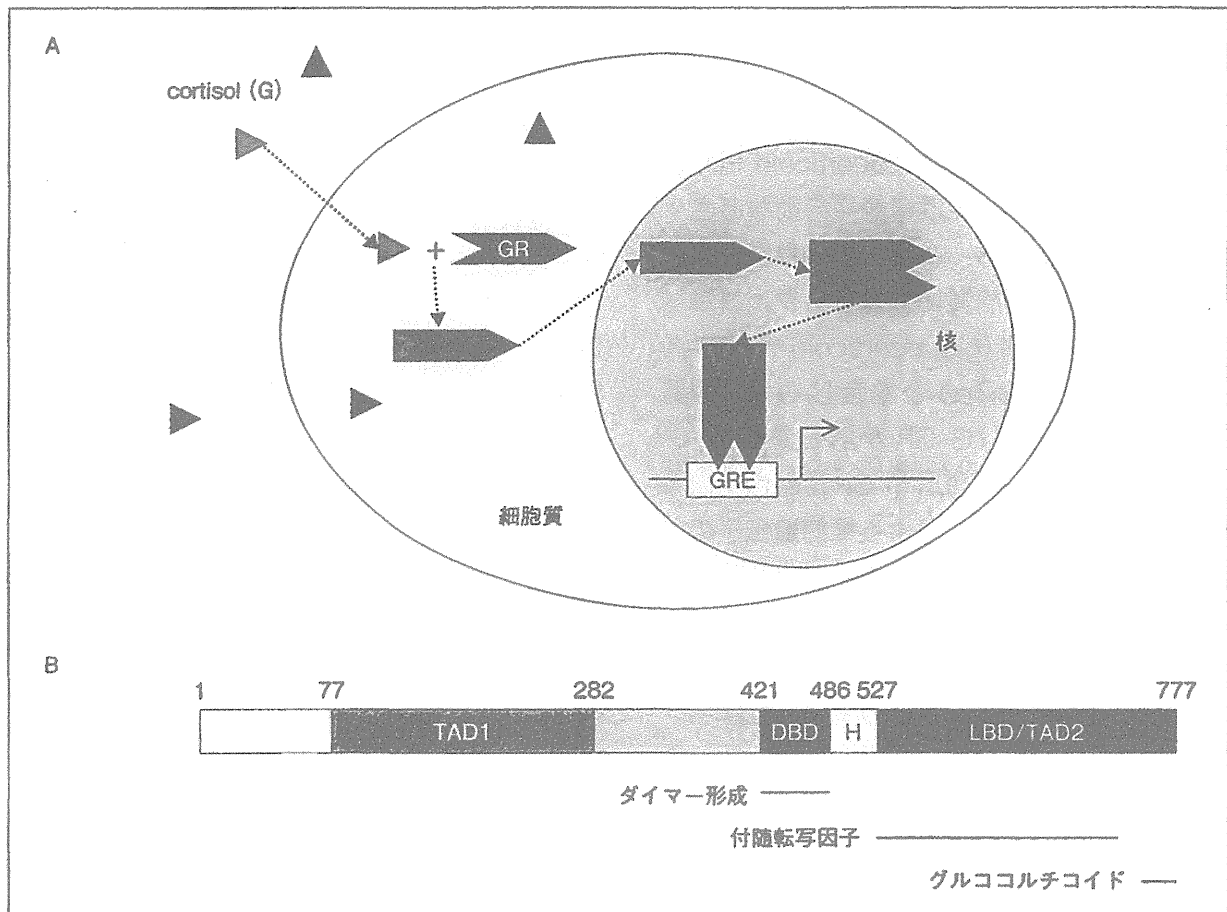


図1 グルココルチコイド(G)の作用様式とグルココルチコイド受容体(GR)

A: グルココルチコイドの作用様式。本図ではGが細胞質に入り、細胞質内に存在するGRと結合、結合したG-GR複合体が核に移行し、二量体を形成して、GREに結合、最終的に標的遺伝子発現を活性化する様子を模式的に示した。

B: GRの基本構造。詳細は本文あるいは参考文献を参照されたい。

TAD1; transactivation domain 1, 転写活性化領域。DBD; DNA binding domain, DNA結合領域。本領域は二量体形成に関わる。H; hinge領域。グルココルチコイドとの結合によりGRに構造変化をもたらすが、その構造変化に関わる領域。LBD/TAD2; ligand binding domain/transactivation domain 2, リガンド結合領域/転写活性化領域2。グルココルチコイドと結合する領域でグルココルチコイド結合に依存して転写の活性化にも関わる。付随転写因子(coactivator)との相互作用領域でもある。

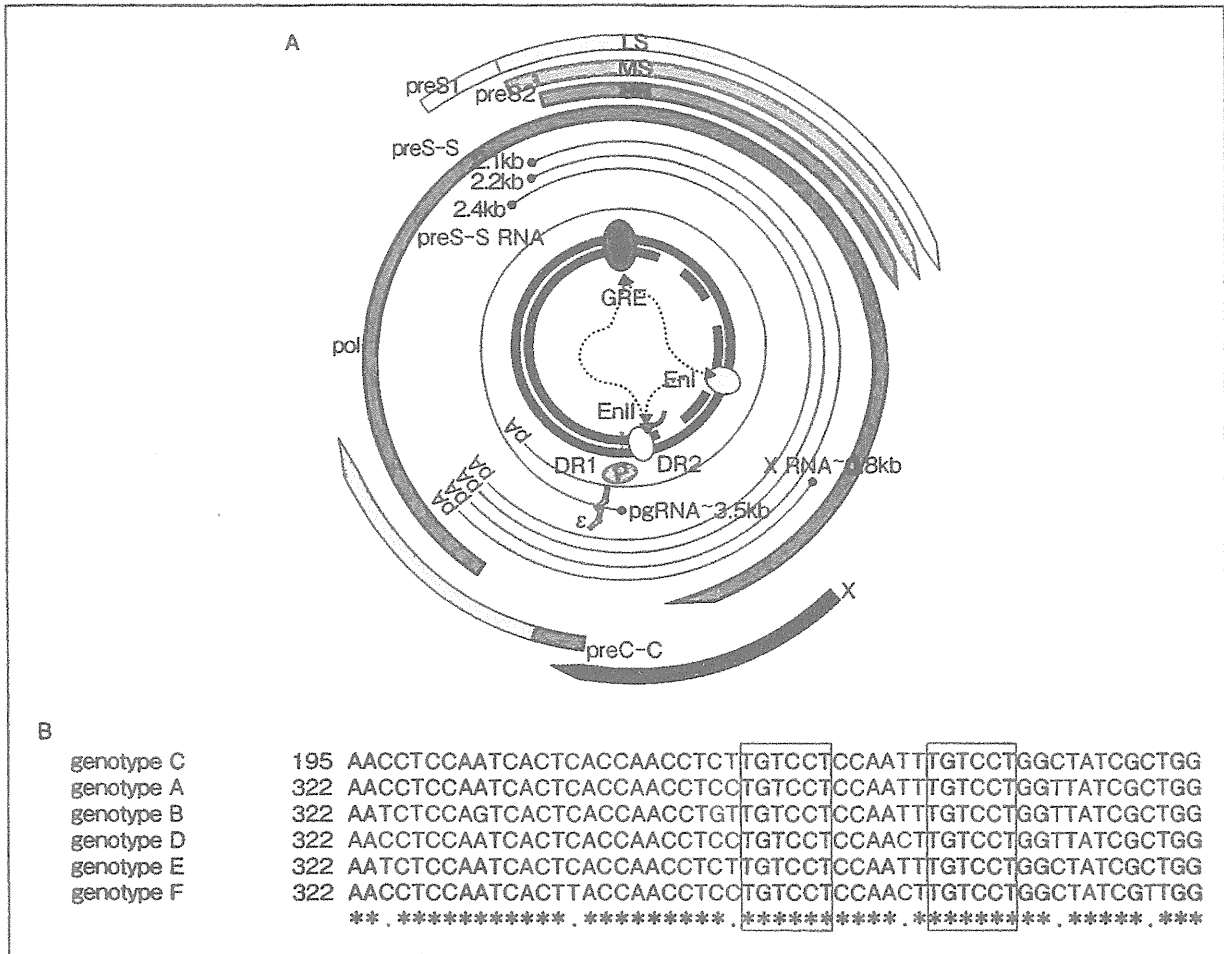


図2 HBV ゲノムの構造と転写産物、遺伝子産物(抗原)、エンハンサーエレメント
 A : HBV ゲノムの構造と転写産物、遺伝子産物(抗原)、エンハンサーエレメントの位置を示した。HBV が感染後に形成するcccDNA (covalently closed circular DNA) では EnI, EnII, GRE は近接した位置に配座すると予想され、さらに各プロモーターと相互作用することによって全体としてのHBV 転写活性が生じるものと考えられる。
 B : HBV のGRE. GR 結合コンセンサス配列 (TGTCCT) が2コピー近接して存在する。genotype 間で保存され、GRE による遺伝子発現調節はHBV で一般的に存在する調節機構と思われる。各配列は代表的な GenBank 登録配列を参照した (adr4 ; X01587, adw2 ; X02763, genotype B ; JN406371, genotype D ; JQ687531, genotype E ; JQ000008, genotype F ; AF223965)。

文献

1) Silverman MN, Sternberg EM. : Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates : from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. Ann NY Acad Sci 1261 ; 55-63, 2012

2) Moutsatsou P, Kassi E, Papavassiliou AG. : Glucocorticoid receptor signaling in bone cells. Trends Mol Med 18 ; 348-359, 2012

3) T-Kaspa R, Burk RD, Shaul Y, et al. : Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid responsive element. Proc Natl Acad Sci USA 83 ; 1627-1631, 1986

応用が広がる DDS

人体環境から農業・家電まで

別刷り

第1編 人体環境における DDS 医薬の学問的基礎と応用展開

第1章 医学・薬学を中心とした学問的基礎

第4節 DDS キャリアの最前線

2 バイオナノカプセル

名古屋大学 良元 伸男

名古屋大学 黒田 俊一

「応用が広がるDDS－人体環境から農業・家電まで－」(2013年7月8日 株式会社エヌ・ティー・エス 刊)



2 バイオナノカプセル

1. はじめに

ウイルスは、生体内のさまざまな異物排除システムを巧妙にすり抜けて、組織中の標的細胞に特異的に取りつき、自己のゲノム情報を宿主に伝播する自律構成型ナノ構造体である。一方、1975年にウイルスを模してエンベロープタンパク質をリポソームに埋め込んだ中空ナノ粒子 (virosome) が提唱されたが¹⁾、当初は生体内での標的化能や安定性が不十分であった。しかし、最近では生体内の細胞を能動的に標的化でき、かつウイルスゲノムを含まない安全で生産性の高い次世代のナノ医療技術を支える DDS キャリアになる可能性が高まっている。本稿では、ヒト B 型肝炎ウイルス (HBV: hepatitis B virus) から着想を得た virosomes の一種である非ウイルス性 DDS キャリア、バイオナノカプセル (BNC: bionanocapsule) の最新の動向を紹介する。

2. DDS キャリアに求められること

生命科学の進歩により、さまざまな疾患に対して治療効果を示す医薬品候補 (低分子化合物、ペプチド、タンパク質、DNA、RNA) が見出されるなか、それらを全身投与した場合、生体内安定性および患部以外での副作用が問題となる。そこで、必要なときに、適切な分量の薬効成分を疾患部位に徐放させる技術 (コントロールドリリース) の開発が重要とされ、その担い手である薬剤送達システム (DDS: drug delivery system) キャリアとして、さまざまなナノバイオマテリアルが開発されている。現行の DDS キャリアは、リポソーム、ミセル、ポリマー

およびウイルスの4種に大別され²⁾、いずれも直径 50~150 nm のナノ粒子である。まず1番目のリポソームは、発見から30年以上経過している脂質二重層のカプセルであり、内部に薬剤や核酸を包含できる。しかしそのままでは、血液中の補体成分による分解や、生体内の異物を排除する単球やマクロファージなどの貪食細胞群が数多く存在する肝臓や脾臓の細網内皮系 (RES: reticuloendothelial system)³⁾ による捕捉が起きるので、リポソーム表面を PEG (poly-ethylene glycol) で修飾して、補体や RES の認識を受けにくくするステルス化が行われている⁴⁾。次に2番目のミセルは、PEG などから構成される親水部とアルキル鎖などから構成される疎水部を有する高分子ポリマーが会合して形成されるナノ粒子であり、外部に親水部を露出しつつ内部に疎水性コアを形成する。同コア内にシスプラチンやタキソールなどの難溶性薬剤を包含して DDS キャリアとして応用されている⁵⁾。リポソームやミセルは血管新生の盛んな血管透過性の高い増殖性固形がんへ EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果⁶⁾ により集積する受動的標的型 DDS キャリアとして用いられており、多くの製剤が世界各国で臨床応用されている。しかし、DDS キャリア投与初期に抗 PEG IgM 抗体が誘導され、次回以降の投与において血中からのクリアランスが異常に早くなり (ABC (accelerated blood clearance) 効果)^{7), 8)}、繰り返し投与が困難となる場合もある。次に3番目のポリマーは、たとえばポリエチレンイミン (PEI) のように強い正電荷を有することが多く、静電的相互作用により種々の薬剤や核酸を包含することができる。しかし、前者2つと異なり自己組織化されにくいため形状が不均一で、残存する表面電荷により、RES により捕捉されやすく、非標的組織への

オフターゲットや正常組織での毒性が問題になっている⁹⁾。最後に4番目のウイルスは、(例外もあるが)基本的にRESを回避しつつ標的組織を細胞レベルで特異的に認識して自己のゲノム情報を宿主に導入することから、EPR効果の期待できない血管新生が低調で腫瘍内血管の少ないがん(スキルス、膵がんなど)やがん以外の疾患部位へも送達できる能動的標的型GDS (gene delivery system) キャリアになると期待されている。しかし現在の遺伝子治療で臨床応用されているアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクター¹⁰⁾の多くは、遺伝子導入効率の高さに反して組織特異性を示すものはきわめて少ない。これは疾患部位以外へのウイルスゲノムの偶発的な導入リスクの要因となり、事実、欧米では患者の死亡事例も報告されている^{11), 12)}。以上より、現行のDDSキャリアには一長一短があり、RES回避能を有し、宿主の免疫反応を惹起せず、生体内組織の任意の細胞を能動的に標的化し、多様な薬剤を安全に送達できるきわめて高度な機能を併せ持つナノ粒子の開発が待たれている(図1)。さらに、細胞内で作動させるべき薬剤(核酸)を送達する場合は、細胞内部に侵入する能力も必要である。

3. バイオナノカプセル

われわれが開発するBNCは、極微量(10ゲノムコピー以下)でもヒト肝臓を標的として感染してB型肝炎を惹き起こすHBVと共通した外観を有するウイルスゲノムフリーの中空ナノ粒子である。HBVは部分的二本鎖DNAをゲノムに持つ直径40nm程のヘパドナウイルス科の球状ウイルスである(図2)。HBVのエンベロープに埋め込まれた表面抗原タンパク質(HBsAg: HBV surface antigen)は、pre-S1領域(108aa)、pre-S2領域(55aa)、およびS領域(227aa)からなるLタンパク質、pre-S2およびS領域からなるMタンパク質、S領域のみからなるSタンパク質の3つから構成される¹³⁾。肝臓標的化能はLタンパク質のpre-S1領域のN末端側21~47アミノ酸残基にあり¹⁴⁾、肝細胞への結合をトリガーとして同領域(特にN末端側20aa、太江田ら、投稿中)、pre-S2のC末端側、およびS領域のN末端側に存在する膜融合活性を利用して標的細胞内に侵入する^{15), 16)}。さらにPre-S2領域は、ポリアルブミンと結合する部位(PAR: poly-albumin receptor)を有し¹⁷⁾、血液中でアル

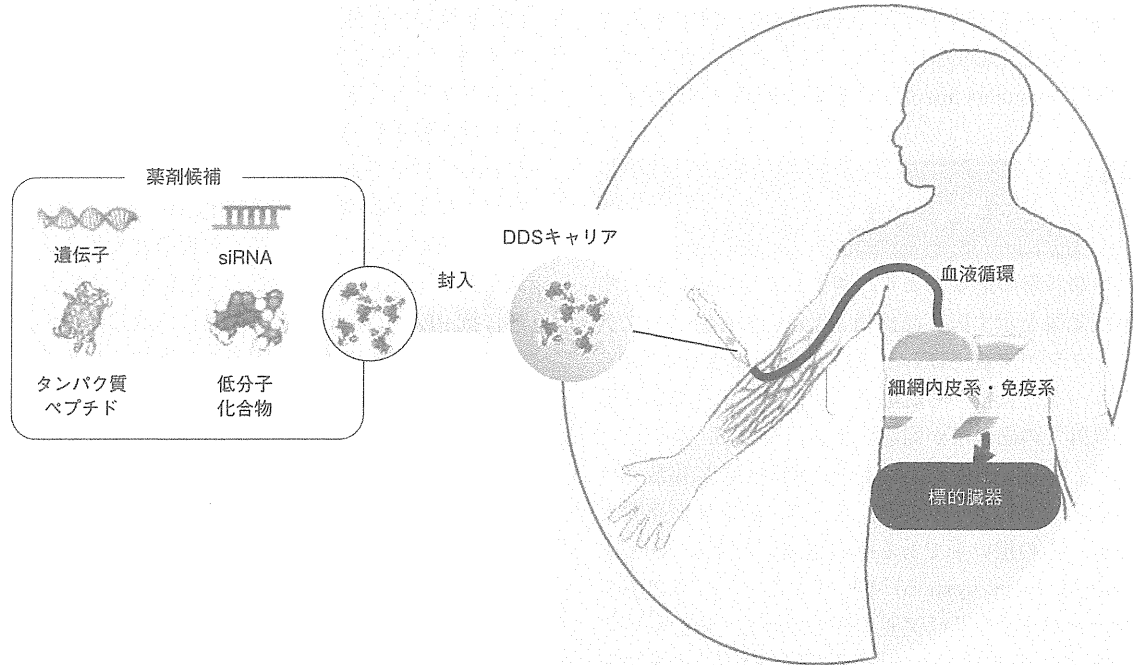


図1 DDSキャリアを介する多様な薬剤の標的臓器への送達

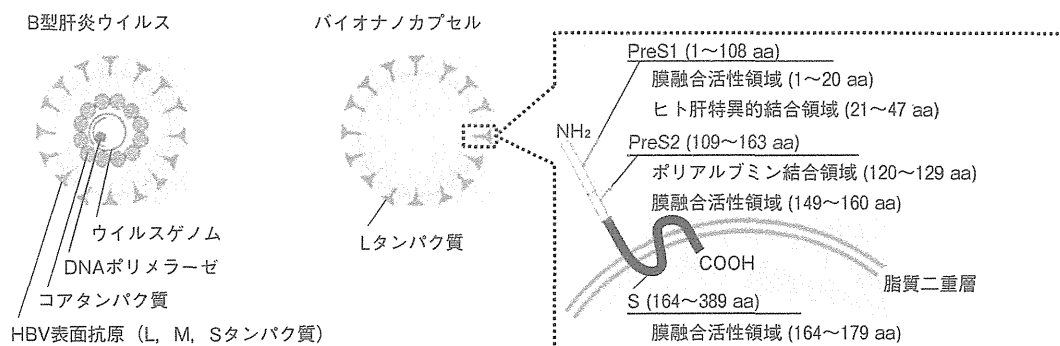


図2 B型肝炎ウイルスとバイオナノカプセル (aa, アミノ酸残基)

ブミン重合体と結合し、血中タンパク質との結合(オプソニン化)を抑制してRESを回避する役割を担うと考えられている(高木ら, 投稿中)。このように、HBVは長い進化の過程でヒト肝臓に対する能動的標的化能, RES回避能, および細胞内侵入能をすでに獲得しており, 理想のDDSキャリアに必要な機能([2]参照)の少なくとも1つを満たしている。さらにHBVの中にはB型肝炎ワクチンを接種した者でも感染発症する免疫エスケープ変異体が存在することから, ヒト免疫系から認識されにくく, かつ免疫反応を惹起しにくくする機能も有する可能性が高い。しかし, ウイルスそのままを薬剤や治療遺伝子のDDSキャリアとして用いることは事故発生リスクの問題から不可能であり, またウイルス内部がすでにタンパク質やゲノムで占められていることから薬剤等の包含能力は乏しい。そこでわれわれは virosome の概念と同様に, HBsAg をリポソームに埋め込んで HBsAg 提示型リポソームを創製できれば, HBV 由来の能動的標的化能, RES 回避能, 細胞内侵入能, 低免疫原性化能をリポソームに付与することができ, 理想的な非ウイルス性 DDS キャリアになると考えた。

具体的には, ヒト肝臓特異的結合領域, 膜融合活性領域 (pre-S1, pre-S2, S 由来の 3 ヲ所), ポリアルブミン結合領域を有する HBsAg・L タンパク質を出芽酵母で発現して得られるウイルスゲノムフリーの BNC を用いる。BNC は直径約 100 nm の中空ナノ粒子で, 内部に遺伝子と薬剤の両方を封入することができる (図 2)^{18)~21)}。BNC は製造承認済の遺伝子組換え酵母由来 B 型肝炎ワクチンと基本的に同じ構造を有することから, GMP (good manu-

facturing protocol) 準拠の医薬品として大量生産が可能である。事実, われわれは出芽酵母を用いて BNC を発現・精製しているが, 酵母の全可溶性タンパク質の 40% 以上が BNC であり, 酵母培養液 1 l から精製 BNC を再現性良く 20 mg 取得できる。また, 酵母ゲノムや酵母由来タンパク質のコンタミネーションは検出限界以下であることを qPCR 法や ELISA により確認している。出芽酵母内で L タンパク質を発現すると, 同タンパク質は小胞体膜上で S 領域間の分子間認識により自己組織化し, 小胞体ルーメン側に BNC として放出される。BNC1 粒子には約 110 個の L タンパク質が酵母小胞体膜由来リポソーム上に膜タンパク質として組み込まれ, pre-S1 および pre-S2 領域を外側に提示して存在する。BNC は非常に安定であり, 70℃で1時間加温しても機能は損なわれず, 凍結乾燥することにより 4℃で14ヵ月以上保管できる。凍結乾燥物は滅菌水を添加することにより容易に水和し, 元の性状へと復帰できる。次に, 今までに同定された HBV 免疫エスケープ変異体の HBsAg 遺伝子配列のアラインメントから, 共通して観察される変異アミノ酸部位を 2 ヲ所見出され, 該アミノ酸変異を導入したステルス BNC は, B 型肝炎患者由来血清との結合能とマウスでの免疫原性が著しく低減していることも判明している(鄭ら, 投稿中)。そこで現在では, 特に断らない限りステルス BNC を用いて研究を行っている。BNC 内部への薬物封入は当初, 電気穿孔法により行った(図 3)。緑色蛍光タンパク質 GFP (green fluorescence protein) 発現遺伝子や蛍光化合物カルセインなどを同法により BNC 内に包含させ, *in vitro* で標的細胞に接触させると,

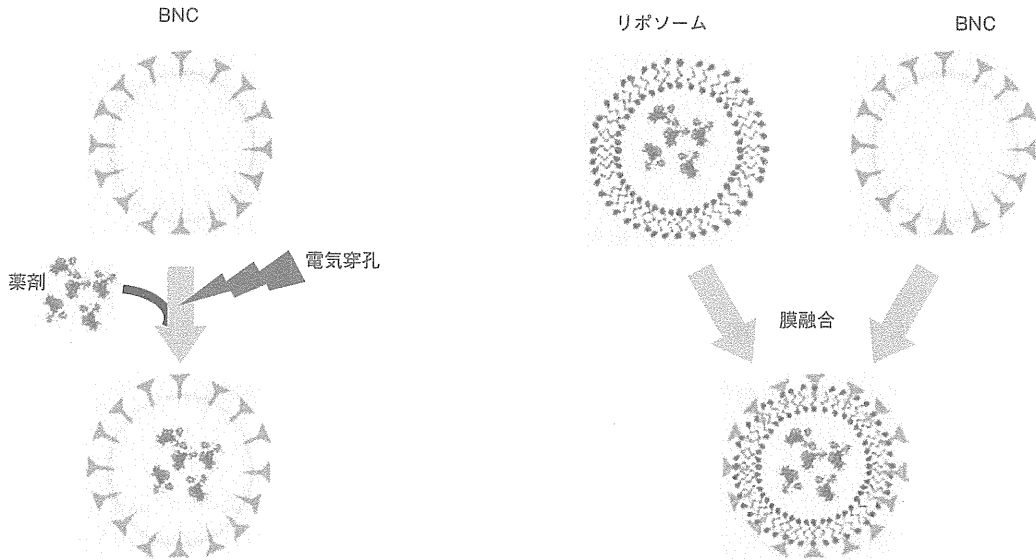
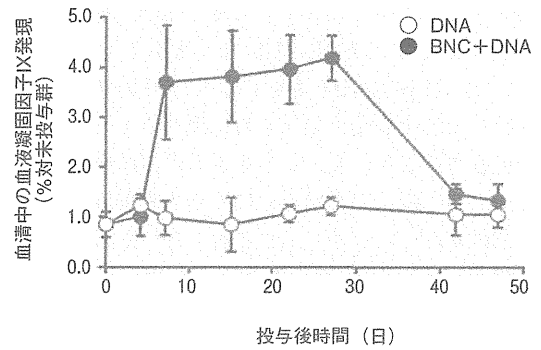


図3 バイオナノカプセルへの薬剤封入法

リポソーム法を原理とする一般的DNA導入試薬に比して、単位DNA当たり100倍以上の遺伝子導入効率を示した²¹⁾。また、ヒト肝がん細胞由来腫瘍を有する担がんマウスに同BNCを尾静脈注射すると、*in vivo*で同腫瘍にピンポイント送達することに成功した。このとき、オフターゲット対照であるヒト大腸がん細胞由来腫瘍には送達されず、またマウスの主要臓器へのオフターゲティングも認められなかった。さらに、血液凝固因子IX発現遺伝子を包含するBNCを用いてヒト肝がん細胞由来腫瘍を有する担がんマウスに尾静脈投与したところ、1回の投与で1ヵ月にわたり、中程度の血友病B治療に必要な濃度の血液凝固因子IXが血液中に認められた(図4)²¹⁾。次に、単純ヘルペスウイルス1型のチミジンキナーゼ(HSV-tk)活性依存的にDNA複製を阻害するガンシクロビル(GCV)を用いたHSV-tk-GCV併用実験では、HSV-tk発現遺伝子を包含するBNCを担がんマウスのヒト肝がん細胞由来腫瘍へ尾静脈注射によりあらかじめ送達することにより、その後のGCVの皮下投与によりヒト肝がん特異的な抗腫瘍効果が観察された²²⁾。以上から、BNCはHBV由来の能動的標的化能、RES回避能、細胞内侵入能、低免疫原性化能を有する理想的なDDSキャリアと期待された。



● ; BNCあり, ○ ; BNCなし, n = 3, mean ± s.e.m.

図4 担がんマウスにおける血液凝固因子IXの発現

ヒト肝がん組織の担がんマウスに、血液凝固因子IX発現ベクターを導入したBNCの20 μg (DNA換算)を尾静脈投与した。各時間で採血し、血漿中の血液凝固因子IXの量を市販のAsserachrom IX : Ag kitを用い測定した。

4. バイオナノカプセル複合体

薬剤・遺伝子導入効率の高いBNCであることが示されたが、電気穿孔法による薬剤封入はGMP基準での大量生産の観点から不利である。一方、BNCはリポソームの表面電荷に関係なく膜融合活性を示し、容易に直径100~150 nm程度のBNC-リポソーム複合体を形成する。そこで、遺伝子を包含

したカチオン性リポソームおよび薬剤を包含したアニオン性リポソームとBNCを接触させ、遺伝子または薬剤包含BNC-リポソーム複合体の大量調製を行った²³⁾。BNC-リポソーム複合体はBNCの対リポソーム重量比が5%程度でも *in vitro*において細胞特異性を保持しており、遺伝子包含BNC-リポソーム複合体はリポソーム単独に比べて飛躍的な遺伝子導入効率を示した。次に、抗がん剤ドキシソルピシン (DOX) 包含BNC-リポソーム複合体は、ヒト肝がん細胞由来腫瘍を有する担がんマウスにおいて、4 mg/kg という低薬剤量でDOX単体やDOX包含リポソームよりも高い抗腫瘍増殖抑制効果を示した²⁴⁾。また、DOX包含BNC-リポソーム複合体は、Doxil (市販DOX包含リポソーム製

剤)よりも腫瘍内DOX濃度を高濃度かつ長時間に維持でき、血中滞留性についても表面をPEG化しているDoxilに匹敵することが判明した。特筆すべきは、DOX包含BNC-リポソーム複合体は表面をPEG化していないことで、BNCがリポソームにPEG化と同様なRES回避能を付与したことを示している。これは、HBVにおいて想定されていたRES回避能をBNCも有していることを示唆している。

一方、BNCはリポソームだけでなく、ポリマーにも適用できる。現状、ポリマーは主に受動的標的型GDSキャリアとして用いられているが、前述したように、その強力な正電荷により基本的に負電荷の細胞に対して非特異的な遺伝子導入や細胞毒性を

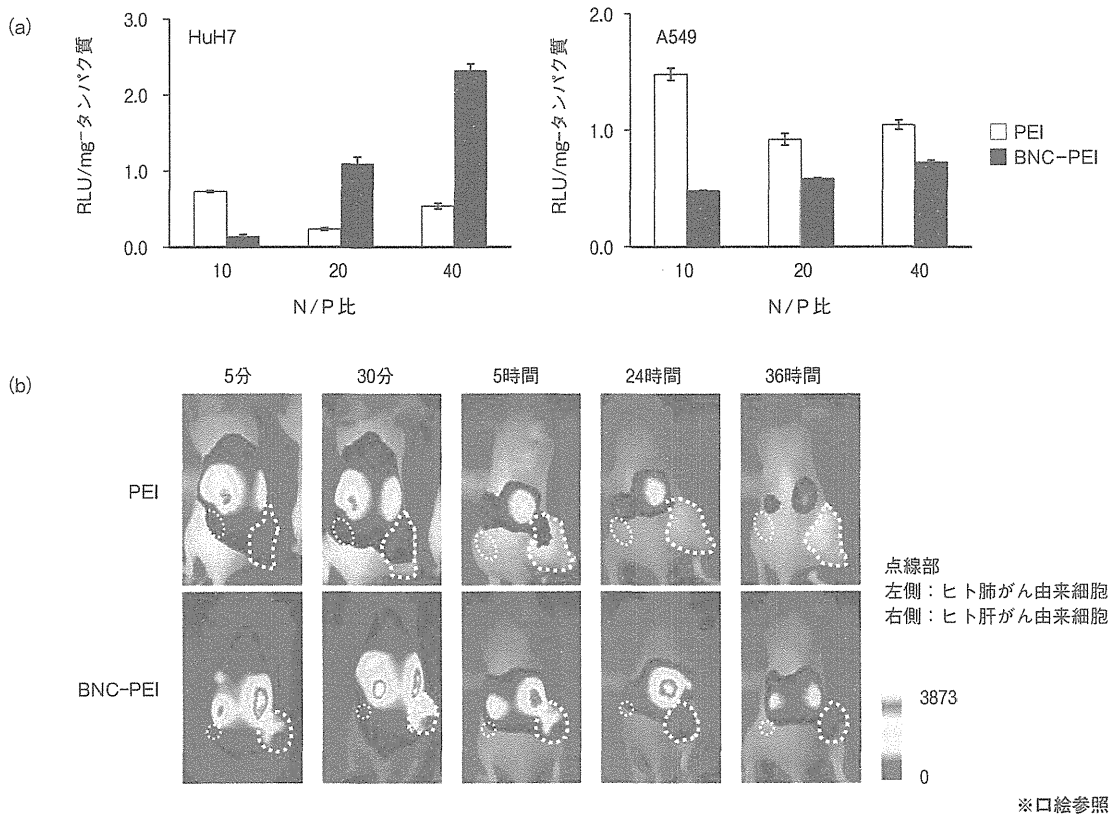


図5 バイオナノカプセル-ポリエチレンジアミン複合体を用いたヒト肝臓細胞特異的送達

肝がん由来HuH-7細胞と肺がん由来A549細胞を用い、BNC-PEI-DNA複合体の組織特異性を評価した。(a) BNC-PEI複合体を用いた *in vitro* ルシフェラーゼ発現遺伝子導入実験。異なるPEI/BNC比(10, 20, 40; 図下方の数値)の複合体を作製し、ルシフェラーゼの発現を測定した。RLU: 相対発光量, □: PEIのみ, ■: BNC-PEI複合体。(b) BNC-PEI複合体を用いた *in vivo* 動態解析。肝がん由来NuE細胞と肺がん由来A549細胞からなる腫瘍を、それぞれ右と左大腿部に担がんさせたヌードマウスに、BNC-蛍光標識PEI複合体(PEI/BNC比40)の50 μg (PEI換算)を尾静脈投与し、各時間での腫瘍への集積を観察した。

示すほか、血中クリアランスが早いという欠点がある。代表的な PEI の場合、生体内への単体投与では肺に集積する一方、細胞膜状に普遍的に存在するプロテオグリカンと非特異的に結合するのでオフターゲット回避は困難である。われわれは、弱い負電荷を有する BNC とルシフェラーゼ遺伝子を包含した PEI を混合し、直径約 200 nm の BNC-PEI-DNA 複合体を作製したところ、*in vitro* でヒト肝がん由来細胞特異的に対し N/P 比 (PEI の正電荷に寄与する窒素原子数/DNA の負電荷に寄与するリン原子数) 20 以上で高い遺伝子導入活性を示すことを見出した (図 5 (a))²⁵⁾。また、同複合体をヒト肺がん細胞由来組織およびヒト肝がん細胞由来組織を併せ持つ担がんマウスに静脈注射したところ、ヒト肺がん細胞由来組織よりもヒト肝がん細胞由来組織に特異的に集積していた (図 5 (b))。以上より、BNC は PEI などのポリマーとも複合体を形成し、PEI に対し HBV 由来の能動的標的化能を付与し、PEI

特有の肺への集積性を抑制 (オフターゲット回避) をある程度達成できることが判明した。これは、今後の能動的標的型ポリマーの創製に繋がると期待される。

5. バイオナノカプセルの再標的化

これまでは、「ヒト肝臓特異的な能動的標的型非ウイルス性 DDS キャリア」として BNC、BNC-リポソーム複合体、および BNC-PEI 複合体を解説してきたが、ヒト肝臓特異性を改変した再標的化 BNC の創製も重要である。具体的には、BNC の pre-S1 領域に含まれるヒト肝臓特異的結合領域を他の組織や細胞に特異性を示す生体認識分子 (抗体、タンパク質、ペプチド等) に置換する (図 6)。当初は、遺伝子工学的に pre-S1+pre-S2 領域を上皮成長因子 (EGF : epidermal growth factor) に置

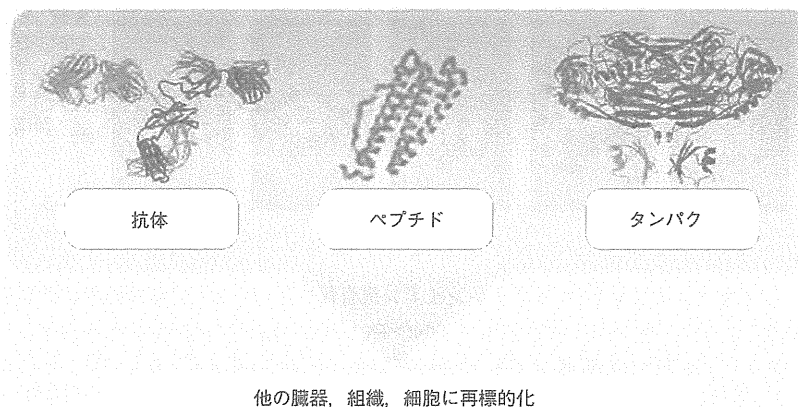
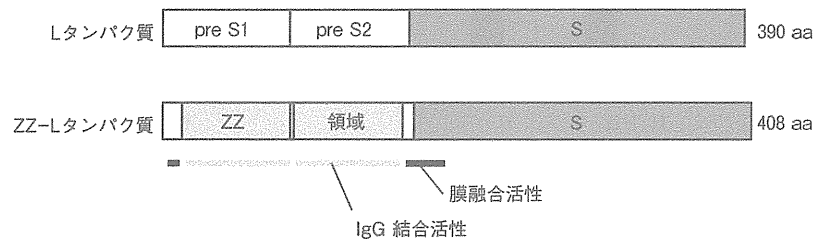


図 6 バイオナノカプセルの再標的化

換して EGF 提示型 BNC を作製し, *in vitro* においてヒト肝がん由来細胞への特異性を消失させ, EGF 受容体を著量発現する扁平上皮がん由来 A431 細胞への特異性を付与することに成功した²¹⁾。しかし本法では, 再標的化の度に改変型 BNC 発現ベクターを構築せねばならず, 置換した生体認識分子の一部が出芽酵母内での BNC の粒子形成過程を著しく阻害し, BNC の特徴である過剰発現が再現できなかった。そこで, 再標的化用分子として汎用性の高い抗体に特定することとし, BNC の pre-S1+pre-S2 領域を *Staphylococcus aureus* 由来 Protein A の IgG Fc 結合部位 (Z 領域) をタンデムに結合した ZZ 領域に遺伝子工学的に置換した ZZ-L タンパク質から構成される zzBNC を作製した (図 6)²⁴⁾。本 zzBNC は, BNC より小さい直径約 40 nm 程のナノ粒子として出芽酵母内で幸いなことに過剰発現され, BNC とほぼ同様の精製法で大量生産が可能であった。また, zzBNC は HBV のヒト肝臓細胞内部への侵入過程で最も重要な役割を担う pre-S1 領域の膜融合活性領域 (N 末端側 20aa) を保持しているため, BNC 同様にリポソームとの融合も可能である。抗 EGFR 抗体を提示した zzBNC を, グリオーマを移植したオルソグラフトマウスに脳内投与すると, グリオーマ特異的に著量の zzBNC が蓄積した²⁶⁾。また, 炎症部位の血管内皮細胞に誘導される E セレクチンに注目し, 網膜にブドウ膜炎, 足関節にリウマチを発症させたモデルマウス, また心筋梗塞モデルラットにおいて, 抗セレクチン E 抗体を提示した zzBNC を静脈投与すると, 速やかに各炎症部位に集積した (鄭ら, 投稿中)。特にぶどう膜炎部位には蛍光ビーズの導入および GFP 遺伝子の発現に成功した。

さらに, zzBNC は外周に ZZ 領域由来のリジン残基 13 個を提示していることから, 1 級アミン反応性の NHS (N-hydroxysuccinimidyl ester) 化合物を用いる架橋法により, 抗体以外の生体認識分子 (化合物, タンパク質, ホーミングペプチドなど) の提示も容易に行える。たとえば, 悪性腫瘍に高頻度で見られる糖鎖構造の β 1-6GlcNac を認識する PHA-L4 レクチンを表層提示した zzBNC は, *in vitro* のみならず *in vivo* においても β 1-6GlcNac を有する悪性腫瘍へと効率よく集積し²⁷⁾, 腫瘍内部のリンパ管壁を認識する 9 アミノ酸のホーミングペプチド (Lyp-1 ペプチド)^{28), 29)} を表層提示した

zzBNC は, ヒト乳がん細胞由来組織の担がんマウスにおいて, 蛍光物質や GFP 発現遺伝子を送達した。しかし, ホーミングペプチド提示型 zzBNC は, 概して他の再標的化 BNC よりオフターゲット率も高く, 再標的化分子としては不完全であり, 今後は短鎖ペプチドのようにインデューストフィットの起きない, タンパク質のような高次構造で認識する再標的化分子が望ましい。以上のように, BNC は *in vivo* においてがん組織を能動的標的化する DDS キャリアとして有望と思われるが, 固形がんへの薬剤集積は EPR 効果により受動的標的化する DDS キャリアが最近の主流であり, 実際に能動的標的型 DDS キャリアと受動的標的型 DDS キャリアの腫瘍組織への集積度合に大差がないことも報告されており悩ましい³⁰⁾。

そこでわれわれは, 能動的標的型 DDS キャリアの機能を十分に活かすために, ワクチンへの適用を検討している。従来のワクチンは, アジュバントとともに接種された抗原が近傍の所属リンパ節内部に受動的に移動して, 免疫の中心的役割を担う樹状細胞 (DC 細胞) に受動的に取り込まれて, DC 細胞が抗原提示を行い, 免疫系を動作させた。また, 最近のナノテクを応用したワクチンでは, 抗原を DC 細胞が好む直径数百 nm のナノ粒子化にして, DC 細胞に受動的に取り込まれやすくしている。しかし, 能動的標的型 DDS キャリアを用いて, DC 細胞を探しだし細胞内部に抗原を積極的に送達させれば, 高い免疫原性を有する「攻めのワクチン」になると考えた。具体的には, DC 細胞特異的表面抗原 (CD11c, MHC class II, DC-SIGN, ガングリオシド GM1) を認識する抗体を zzBNC に提示させてマウスに尾静脈から投与し, 脾臓内 DC 細胞への集積性を評価すると, 抗 CD11c 抗体を提示する zzBNC が脾内 DC 細胞の 8 割以上に zzBNC が集積していた³¹⁾。次に, 抗原タンパク質を包含したカチオンックリボソームと抗 CD11c 抗体提示型 zzBNC を融合してマウスに尾静脈から投与したところ, 抗原単独の対照と比べて, 抗原特異的 IgG を血清中に飛躍的に誘導した (図 7)。最近では, zzBNC は抗体分子を Fc 領域で繋ぎ止めることで, 抗原認識部位 (Fv 領域) をナノ粒子表面に整列化して, 抗原結合能力および抗体特異性を飛躍的に高めていることが証明されており³²⁾, 抗体分子を標的化分子として使用する能動的標的型 DDS キャリアの中でも