

room temperature for 20 min. After 3 washes with D-PBS, cells were observed under FV1000D.

In 100 μL of D-PBS, 1 μM NHS-conjugated lipid derivatives were mixed with 2 μM CF488A amine (fluorescent dye; Biotium, Inc., Hayward, CA) and incubated at room temperature for 1 h. The mixture was added to HyLDH-YK-1 cell pellet (about 1.0×10^6 cells) and incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 10 min. After 3 washes with D-PBS, cells were mixed with 4% paraformaldehyde in D-PBS at room temperature for 20 min. After 2 washes with D-PBS, cells were analyzed by the FACS Canto II machine (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ).

Cell Surface-Fluorescence Immunosorbent Assay.

HyLDH-YK-1 cells (about 3.0×10^5 cells) grown in 100 μL of serum-free RPMI1640 were incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 10 min with oleyl-PEG4000-labeled antimouse IgG Fc antibodies (capture molecule; final concentration, 100 nM). After washes with serum-free RPMI1640, cells were incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 30 min with 500 μL of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled goat-derived antimouse IgG F(ab')₂ F(ab')₂ antibody (detection molecule; 1 mg/mL; 1:250; Rockland Immunochemicals, Inc., Gilbertsville, PA). Following 3 washes with phenol red- and serum-free RPMI1640, the cells were subjected to FACS Aria II machine (Becton, Dickinson and Company) for isolating single cells and obtaining fluorescent intensity of each cell. Isolated single cells were propagated to about 1.0×10^5 cells in 50% (v/v) conditioned medium (about 2 weeks).

ELISA for Secreted Antibodies. HyLDH-YK-1 cells (about 1.0×10^6 cells) were cultured for 24 h in a 6 cm dish containing 3 mL of RPMI-1640 supplemented with 10% FBS, 100 μM nonessential amino acids, and 50 μM 2-mercaptoethanol. Media were collected and diluted (1:500) with 20% (v/v) D-PBS, and the amounts of secreted antibodies were determined by ELISA as follows. Each well of MaxiSorp flat-bottom 96-well plates (Nunc, Thermo) was loaded with 30 μL of antimouse IgG Fc antibodies (2.4 mg/mL; 1:200), and plates were incubated at 4 $^\circ\text{C}$ overnight. After 5 washes with PBS containing 0.5% (v/v) Tween 20 (PBST), samples (100 μL of diluted media) were loaded into each well and incubated at room temperature for 1 h, followed by 5 washes with PBST. Each well was subsequently incubated with 200 μL of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated sheep-derived polyclonal antimouse IgG antibodies (1.0 mg/mL; 1:1000; GE Healthcare, Piscataway, NJ) at 4 $^\circ\text{C}$ for 1 h in the dark and washed 5 times with PBST. HRP activities were then detected by incubating with 100 μL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate solution (Thermo) at room temperature for 3 min, and the color development was terminated by adding 100 μL of 2 M H₂SO₄. Absorbance of each well at 450 nm was determined by Varioskan.

RESULTS

Preparation of Lipid-Labeled Antibodies. It has been demonstrated that antibodies labeled with an oleyl chain could be spontaneously anchored to the plasma membrane of mammalian cells.¹⁰ We herein examined the ability of various lipid derivatives (DSPE, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG3400, oleyl-PEG2000, oleyl-PEG4000, and DOPE-PEG2000) to display antibodies on hybridoma cell surface. First, we incubated 1 mol of antibodies (antimouse IgG goat polyclonal antibody) with 1.5–1500 mol of NHS-conjugated DSPE-PEG2000 at room temperature for 10 min to obtain lipid-labeled antibody (Figure 1a,b). When HyLDH-YK-1 cells were incubated with these lipid-labeled antibodies at 37 $^\circ\text{C}$ for 10 min (see Cell Surface Display Assay

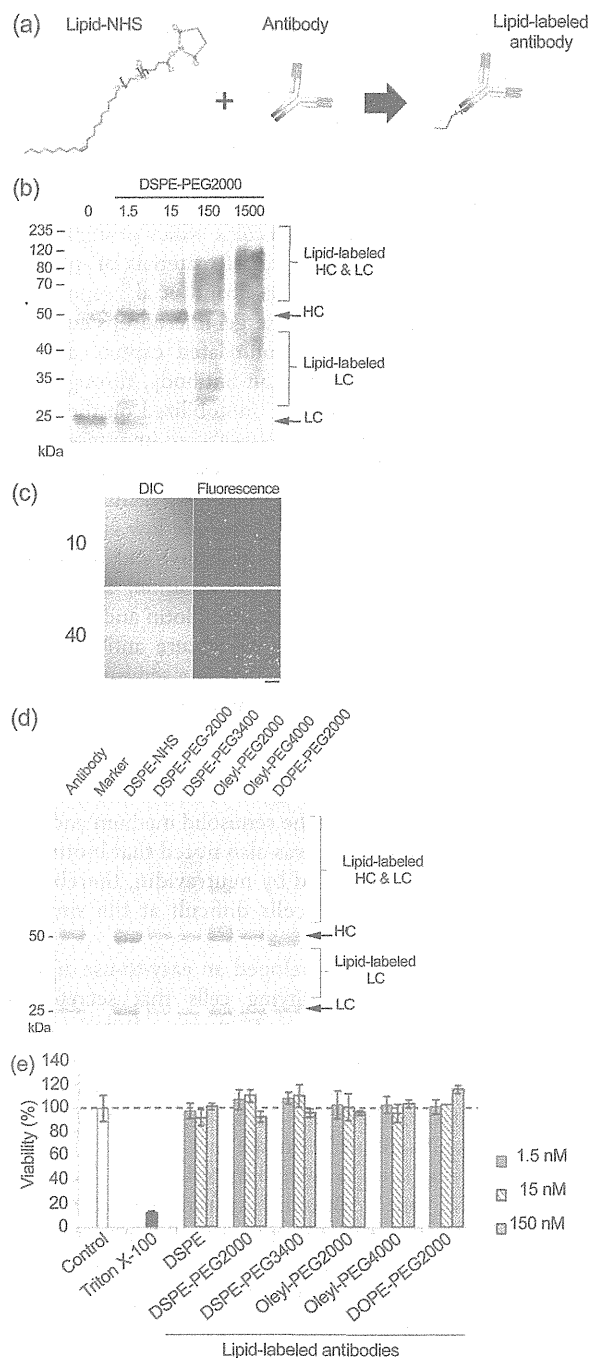


Figure 1. Lipid-labeled antibodies as capture molecules. (a) Preparation of lipid-labeled antibodies. (b) Western blot analysis using HRP-labeled antigoat IgG antibody of lipid-labeled antibodies prepared with various amounts of NHS-conjugated DSPE-PEG2000. (c) Cell surface display assay of lipid-labeled antibodies prepared with 10 and 40 mol of NHS-conjugated DSPE-PEG2000. Bar, 100 μm . (d) Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining of lipid-labeled antibodies. (e) The WST-8 assay of lipid-labeled antibodies. HC and LC, IgG heavy and light chain, respectively.

in Experimental Section), not all cells were found to be labeled with the lipid-labeled antibody prepared with 1.5 mol of NHS-conjugated DSPE-PEG2000. Meanwhile, labeling with more than 150 mol of NHS-conjugated DSPE-PEG2000 was considered to impair the function of antibody. Thus, we compared 10 mol with 40 mol of NHS-conjugated DSPE-PEG2000 similarly (Figure 1c). Finally, the lipid-labeled antibody prepared with

40 mol of NHS-conjugated DSPE-PEG2000 was enough for labeling cells thoroughly, which agreed well with the results by Kato et al.¹⁰ The QCM analysis demonstrated that about 38.1 and 38.9 ng of mouse IgG on the solid phase interacted with about 51.9 ng of antimouse IgG antibodies and 65.3 ng of oleyl-PEG4000-labeled antimouse IgG antibodies, respectively, indicating that 1 mol of antimouse IgG antibodies was labeled with 6.95 mol of oleyl-PEG4000 ($n = 3$). Under the same conditions, antibodies were allowed to react with various NHS-conjugated lipid derivatives, subjected to SDS-PAGE, and stained with CBB R-250 (Figure 1d). The presence of higher molecular weight bands of antibody heavy and light chains confirmed that nearly all antibodies were successfully labeled with each lipid derivative.

Cytotoxicity of Lipid-Labeled Antibodies. HyLDH-YK-1 cells secreting antirabbit lactate dehydrogenase IgG1 were cultured in the presence of various lipid-labeled antibodies (1.5, 15, or 150 nM). After 24 h, the cell viability was determined by the WST-8 assay (Figure 1e). Our results show that none of the lipid-labeled antibodies were toxic to hybridomas at any of the concentrations examined.

Cell Adhesion Activity of Lipid Derivatives. BSA-coated glass bottom chambers treated with individual lipid derivatives (100 μ M) at room temperature for 20 min were allowed to contact with HyLDH-YK-1 cells (about 2.5×10^5 cells/cm²) at 37 °C for 5 min. After washes with D-PBS, the remaining cells were examined by microscopy (Figure 2a). The average number of adhered cells was calculated from the cell numbers in 4 independent visual fields (Figure 2b). All lipid derivatives showed cell adhesion activity that was at least 2-fold higher than that of BSA; oleyl-PEG2000 and oleyl-PEG4000, especially, showed about 150- and 250-fold increases, respectively. According to a previous report,¹⁰ the higher activity of oleyl chains might be attributed to the affinity of unsaturated lipid chains to the lipid rafts of cell membrane, and the addition of amphiphilic PEG chains to oleyl chains is also expected to increase both water solubility and membrane retention time of lipid-labeled antibodies. However, DOPE-PEG2000 possessing 2 oleyl chains did not show strong cell adhesion activity or long retention time in our system, which may be due to a longer period of time required for the double oleyl chains to label cells than a single oleyl chain. On the basis of these data, oleyl-PEG4000 was selected for rapid and efficient antibody display on the hybridoma surface in our subsequent experiments. It is noteworthy that since the lipid composition of cell membranes varies depending on cell types, other lipid derivatives could be useful for displaying antibodies on other cells.

Cell Surface Antibody Display with Oleyl-PEG4000. NHS-conjugated oleyl-PEG4000 was labeled with the CF488A fluorescent dye and added to HyLDH-YK-1 cell suspension. The cells were washed, fixed, and then subjected to the FACS analysis (Figure 3a). Oleyl-PEG4000 was found to efficiently and uniformly label the cells at a level comparable to PKH26, a membrane dye used as a positive control (Sigma-Aldrich).¹¹ In contrast, other lipid derivatives showed lower cell surface-labeling efficiency than oleyl-PEG4000 and PKH26 (Figure 2). After capture antibodies (goat-derived polyclonal antimouse IgG antibodies) were conjugated with oleyl-PEG4000-NHS, the oleyl-PEG4000-capture antibodies were incubated with HyLDH-YK-1 cell suspension at 37 °C for 10 min. The cells were allowed to react with Alexa 488-labeled donkey-derived antigoat IgG at room temperature for 20 min, washed, fixed, and then examined by confocal laser scanning microscopy (Figure 3b). All cells were found to

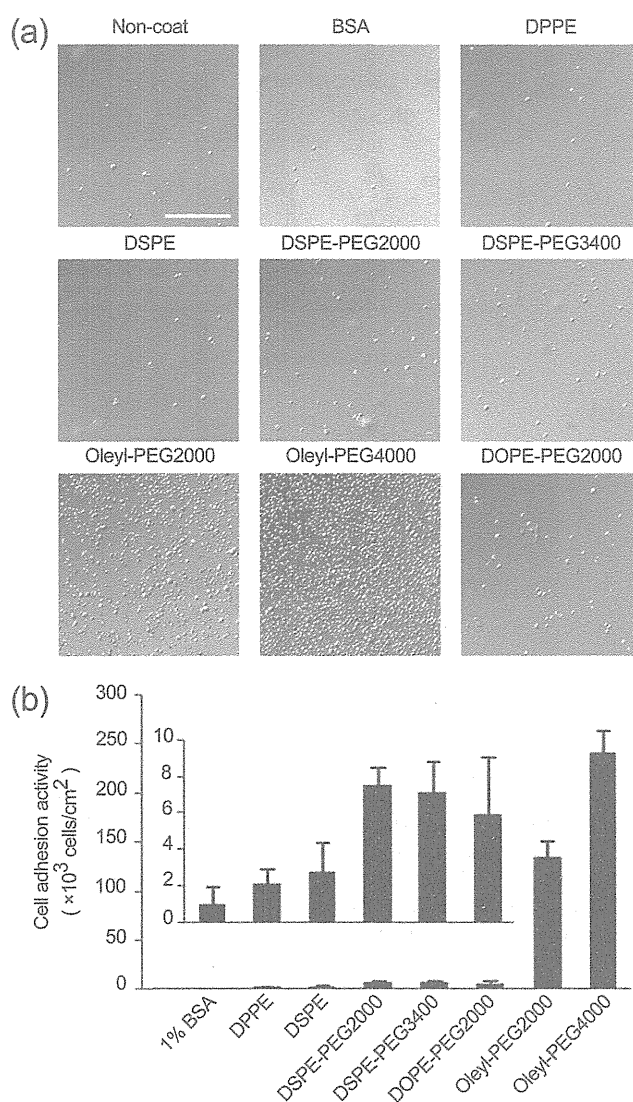


Figure 2. Cell adhesion activity of lipid derivatives. (a) Microscopic observation. Bar, 200 μ m. (b) The number of cells adhered to lipid derivative-coated plates. Data represent mean \pm SD ($n = 4$).

exhibit fluorescent dots on their plasma membrane, strongly suggesting that capture antibodies were successfully displayed on the hybridoma cell membrane (presumably via lipid rafts).

Cell Surface-Fluorescence Immunosorbent Assay. CHO cells (approximately 2×10^5 cells), which secrete no antibodies, were incubated with the oleyl-PEG4000-capture antibodies (antimouse IgG Fc antibodies) at 37 °C for 10 min and then washed with serum-free medium. The cells were subsequently incubated with FITC-labeled detection antibodies (antimouse IgG F(ab')₂ F(ab')₂) and various amounts of mouse IgG (9.8×10^{-2} fg/cell to 6.4 pg/cell) at 37 °C for 30 min to allow the formation of tripartite complexes on the cell surface (Figure 4a). After washes with D-PBS, the cells were subjected to the FACS analysis to obtain the geometric mean of fluorescence intensity (Figure 4b). The fluorescence derived from each sample was found to correlate well with the amount of mouse IgG (correlation coefficient, $R = 0.998$). This method, hereafter designated as a cell surface-fluorescence immunosorbent assay (CS-FIA), exhibited extraordinarily high sensitivity within a wide dynamic range from 6.25 fg/cell to 6.40 pg/cell. Moreover, the limit of detection (LOD; 0 ± 3 SD)

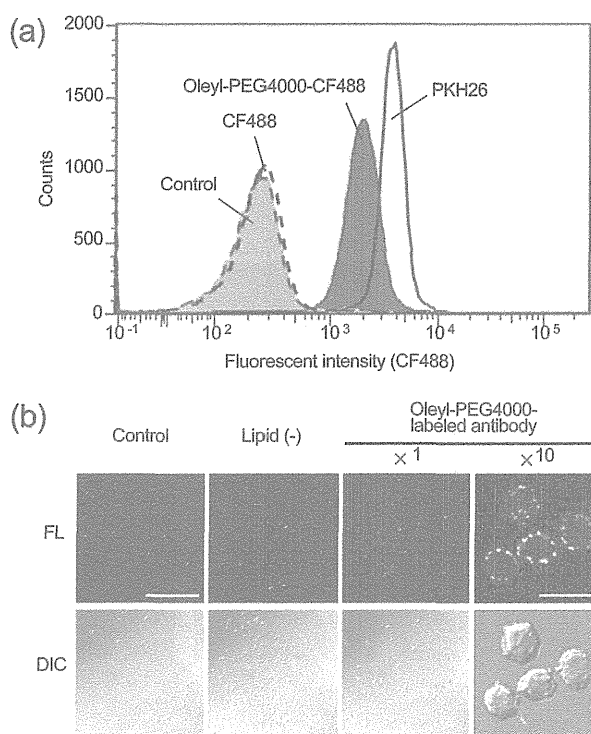


Figure 3. Cell surface antibody display with oleyl-PEG4000. (a) The FACS analysis of hybridomas labeled with oleyl-PEG4000-CF488A. PKH26, PKH26-labeled cells (positive control); CF488, cells mixed with CF488A; Control, cells only (negative control). (b) The fluorescent images of hybridomas labeled with oleyl-PEG4000-labeled antibodies. The displayed antibodies were visualized with Alexa488-conjugated secondary antibodies. FL, fluorescent images; DIC, differential interference contrast images; bars, 200 μm ($\times 1$) and 20 μm ($\times 10$).

and limit of quantitation (LOQ; 0 ± 10 SD) were calculated as 11.7 and 192 fg/cell, respectively, further corroborating that CS-FIA is a reliable system for determining the amount of IgG in the vicinity of cells.

Screening of Hybridomas that Secrete Antibodies Most Efficiently. We next applied the CS-FIA system to determine the amount of nascent antibodies secreted from hybridomas in the vicinity of cells. HyLDH-YK-1 cells secreting antirabbit lactate dehydrogenase IgG1 were incubated with the oleyl-PEG4000-capture antibodies (antimouse IgG Fc antibodies) at 37 °C for 10 min, washed, and then mixed with FITC-labeled detection antibodies (antimouse IgG F(ab')₂ F(ab')₂). The cells were allowed to secrete antibodies at 37 °C for 30 min, enabling the formation of tripartite complexes on the cell surface (Figure 4a). After 3 washes with phenol red- and serum-free medium, the cells were subjected to single-cell isolation by FACS. From about 4×10^3 cells (secretion rate, 2.9 ± 0.6 pg/cell/day; $n = 24$), a total of 28 single cells showing the highest fluorescence intensity were isolated in a day. After propagating these individual cells to about 10^5 cells, which usually took about 2 weeks from single-cell isolation, the media were subjected to conventional sandwich ELISA (see Experimental Section) to determine the amount of secreted antibodies. After these processes, 20 hybridoma cells were found to secrete higher amounts of antibodies (up to 7-fold) than parental hybridomas (Figure 5a). Moreover, the colonies derived from the 28 single cells were treated with a protein transport inhibitor, brefeldin A¹² (GolgiPlug; Becton, Dickinson and Company),

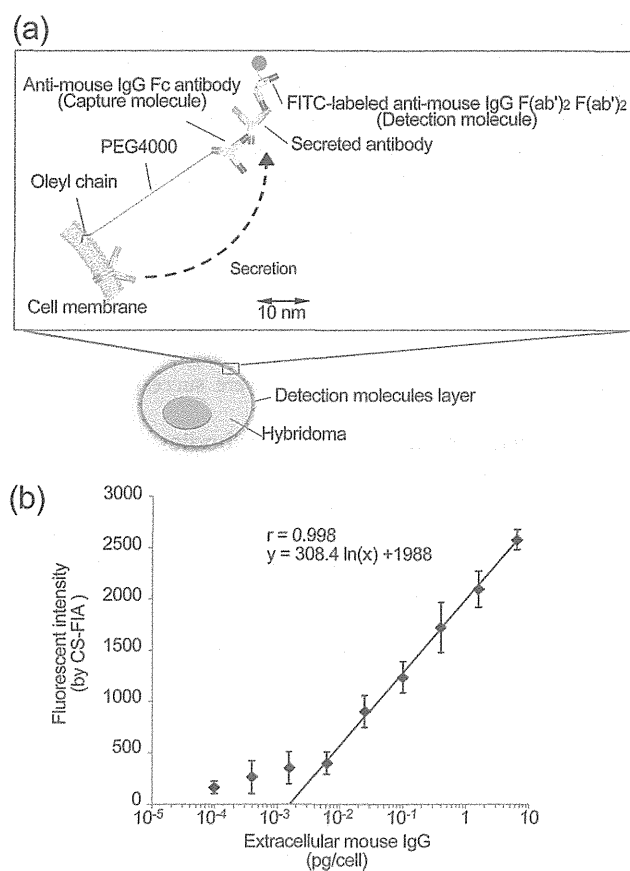


Figure 4. Cell surface-fluorescence immunosorbent assay (CS-FIA). (a) The molecules involved in CS-FIA. (b) The calibration curve of CS-FIA. Data represent mean \pm SD ($n = 6$).

at 37 °C for 5 h, permeabilized with 0.015% (v/v) Triton X-100, and then subjected to the fluorescence immunocytochemical analysis using FITC-labeled antimouse IgG F(ab')₂ F(ab')₂ for visualizing the intracellular nascent IgGs. Only 9 hybridomas were found to synthesize both intracellular and extracellular antibodies more efficiently than parental hybridomas, whereas 11 hybridomas synthesized lower amounts of intracellular antibodies but higher amounts of extracellular antibodies than parental hybridomas (Figure 5b). These results suggest that CS-FIA is more reliable and rapid than the immunocytochemical method using GolgiPlug for screening hybridomas that secrete antibodies most efficiently. In addition, unlike GolgiPlug, CS-FIA facilitates the screening of promising single cells under culture conditions without impairing the cell viability.

DISCUSSION

Using the combination of lipid-labeled antibodies (as capture molecule) and fluorescence-labeled antibodies (as the detection molecule), we established CS-FIA for rapid identification of hybridomas that efficiently secrete antibodies at the single-cell level. All lipid-labeled antibodies examined were nontoxic, confirming that our CS-FIA assay is essentially nondestructive to the cells. Interestingly, among these lipid derivatives, oleyl-PEG4000 was revealed to possess the highest activities of cell adhesion and membrane anchoring. Therefore, we conjugated antimouse IgG Fc antibodies with oleyl-PEG4000, both of which were displayed uniformly on the hybridoma surface and allowed to capture secreted nascent antibodies. Next, fluorescence-labeled antimouse IgG F(ab')₂ F(ab')₂ antibodies were added

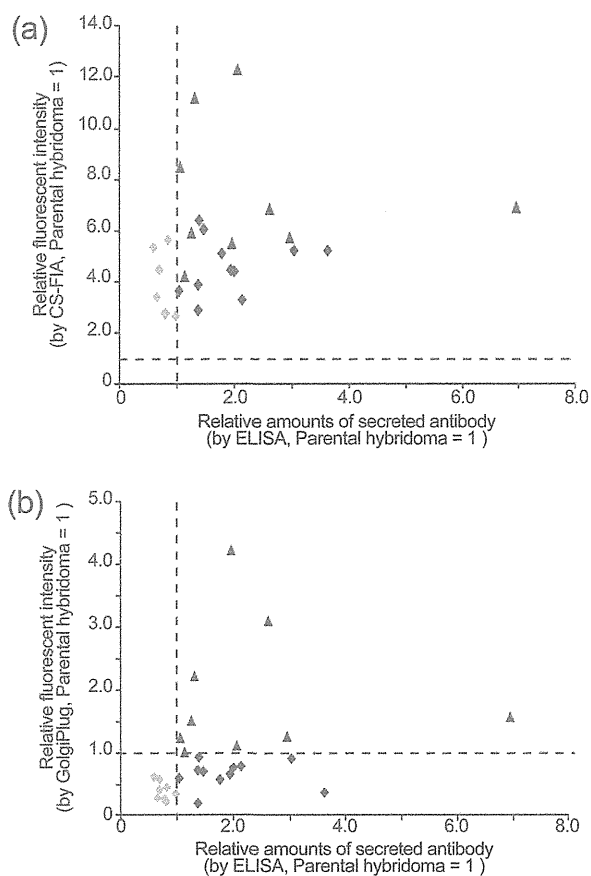


Figure 5. Screening of hybridomas that secrete antibodies most efficiently by CS-FIA. (a) Comparison of CS-FIA with conventional ELISA using 28 hybridomas isolated by CS-FIA. (b) Comparison of conventional ELISA with the FACS analysis (using GolgiPlug staining) using 28 hybridomas isolated by CS-FIA. Dashed lines indicate the secretion level of parental hybridomas. Black triangles, hybridomas synthesizing both extracellular and intracellular antibodies more than parental hybridomas; black diamonds, hybridomas synthesizing extracellular but not intracellular antibodies more than parental hybridomas; and gray diamonds, hybridomas synthesizing both extracellular and intracellular antibodies less than parental hybridomas.

to detect the immunocomplexes on the hybridoma surface. To reduce the background derived from the cross-reactivity between capture molecules (recognizing the Fc region) and detection molecules, we used the $F(ab')_2$ region, recognizing $F(ab')_2$ as a part of the detection molecules. To maximize the sensitivity, capture and detection molecules were designed to recognize distinct regions of secreted antibodies (the Fc region and $F(ab')_2$ region, respectively). Because of these improvements described above, CS-FIA could rapidly determine the IgG concentrations in the vicinity of hybridomas with high sensitivity and high specificity. The detection range for mouse IgG was between 6.25 fg/cell and 6.40 pg/cell, which correspond to 300 fg/cell/day and 300 pg/cell/day, respectively. Since established hybridomas secrete antibodies generally about 40 pg/cell/day¹³ and maximally about 80 pg/cell/day,¹⁴ our CS-FIA system could capture nearly all antibodies secreted from most preexisting hybridomas within 30 min. Moreover, it has been reported that the diffusion coefficient of monomeric IgG is about 4×10^{-7} cm²/s, implying that 1 IgG molecule can undergo Brownian motion at 240 nm/min.¹⁵ Since the distance between capture molecules and the cell membrane (approximately

38 nm; equal to the length of PEG4000) is so close, secreted nascent antibodies would be promptly captured onto the hybridoma surface.

Unlike conventional methods (see introduction), CS-FIA allows the identification of single cells secreting higher amounts of antibodies by FACS in a real-time manner (within a day), which cannot be accomplished by limiting dilution and conventional ELISA methods (usually 1–2 months). Namely, long-term cultures of a large number of cells become unnecessary for evaluating the secretion rate of each cell. Moreover, since CS-FIA is performed using nontoxic lipid derivatives and conventional culture medium, the cells suffer less from chemical and physical stresses than those in the gel microdrop technology and matrix-based secretion assay. Most importantly, CS-FIA could be applied to cells secreting various biomolecules (e.g., cytokines, antigens, and metabolites) by replacing the antibody moieties of capture and detection molecules with the probe molecules possessing higher affinity to materials of interest. Comparing with ELISPOT assay, which utilizes solid phase-immobilized primary antibody and enzyme-labeled secondary antibody to detect biomolecules secreted from single cells, CS-FIA could directly tag each cell with the productivity of biomolecules as fluorescent intensity in a nondestructive manner, facilitating the single-cell-based establishment of cells that secrete biomolecules most efficiently. Moreover, high sensitivity of CS-FIA (LOD, 11.7 fg/cell) could shorten the incubation time, allowing cells to secrete biomolecules.

In this current study, we isolated 28 mouse hybridomas, showing higher fluorescence intensity from about 4×10^3 cells by CS-FIA within 1 day. After cell propagation by 2 weeks of culture, 20 hybridomas were found to exhibit higher secretion rates than parental hybridomas by conventional ELISA, whereas the rates of the other 8 were unexpectedly decreased. Although they were derived from same hybridoma clone (parental hybridoma), they consequently showed cell-to-cell phenotypic diversity. Similar spontaneous divergence in cell functions were sometimes observed in the antibody-secreting cells during long-term culture.^{16,17} These phenomena have recently been considered to result from perturbations of the gene expression by stochastic fluctuation,^{18,19} of which the underlying mechanism is unsettled but presumably involves large chromosomal changes (e.g., chromosomal instability, gene copy number, and epigenetic change). Interestingly, the cells used for the commercial production of biomolecules are typically established from those showing higher productivity, which appears abiogenetically during the screening process. This fact strongly suggests that some parts of single cells could maintain their favorable phenotypes after long-term culture, regardless of any stochastic fluctuation. Therefore, it is important to establish the most promising cells by single-cell-based screening to minimize the effect of stochastic fluctuation on apparent expression instability. In addition, the genetic analyses of 20 hybridomas showing higher secretion rates (Figure 5a) may further shed light on the molecular basis of expression instability. Nevertheless, the CS-FIA system described herein would be a powerful tool for developing solutions for stochastic fluctuation-related issues and thereby contribute to the progress of biomolecule-producing systems via the single-cell-based screening.

CONCLUSIONS

In this study, we report a CS-FIA for determining the secretion rate of hybridomas at the single-cell level. Our assay utilizes

lipid-labeled antibodies to display capture molecules on the cell surface, as well as fluorescence-labeled antibodies (detection molecules). We show that this CS-FIA assay exhibits extremely high sensitivity within a wide dynamic range. We also succeeded in rapid isolation of hybridomas that secrete antibodies most efficiently in a high-throughput and non-destructive manner. This CS-FIA system would be applicable for establishing various biomolecule-secreting cells by changing the capture/detection molecules from antibodies to other bio-recognition molecules.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel.: +81-52-789-5015 (N.Y.); +81-52-789-5227 (S.K.). Fax: +81-52-789-5237 (N.Y.); +81-52-789-5227 (S.K.). E-mail: n-yosi44@agr.nagoya-u.ac.jp (N.Y.); skuroda@agr.nagoya-u.ac.jp (S.K.).

Notes

Conflict of Interest. The authors declare no competing financial interest.

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Jin Kobayashi for his technical assistance. This work was supported in part by the Adaptable and Seamless Technology Transfer Program through Target-driven R&D (A-STEP) from the Japan Science and Technology Agency (JST) (AS231Z04687F to NY and AS2311699F to SK), KAKENHI (the Grant-in-Aid for Scientific Research (A) (21240052 to SK), the Program for Promotion of Basic and Applied Researchers for Innovations in Bio-Oriented Industry (BRAIN) (to SK), and the Health Labor Sciences Research Grant from the Ministry of Health Labor and Welfare (to SK).

REFERENCES

- (1) Wurm, F. M. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22* (11), 1393–1398.
- (2) Kelly, B. *mAbs* **2009**, *1* (5), 443–452.
- (3) Li, F.; Vijayasankaran, N.; Shen, A.; Kiss, R.; Amanullah, A. *mAbs* **2010**, *2* (5), 466–477.
- (4) Lietzke, R.; Unsicker, K. *J. Immunol. Methods* **1985**, *76*, 223–228.
- (5) DeMaria, C. T.; Cairns, V.; Schwarz, C.; Zhang, J.; Guerin, M.; Zuena, E.; Estes, S.; Karey, K. P. *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 465–472.
- (6) Meng, Y. G.; Liang, J.; Wong, W. L.; Chisholm, V. *Gene* **2000**, *242*, 201–207.
- (7) Yoshikawa, T.; Nakanishi, F.; Ogura, Y.; Oi, D.; Omasa, T.; Katakura, Y.; Kishimoto, M.; Suga, K. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *74*, 435–442.
- (8) Akselband, Y.; Moen, P. T., Jr.; McGrath, P. *Assay Drug Dev. Technol.* **2003**, *1* (5), 619–626.
- (9) Manz, R.; Assenmacher, M.; Pflüger, E.; Miltenyi, S.; Radbruch, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 1921–1925.
- (10) Kato, K.; Itoh, C.; Yasukouchi, T.; Nagamune, T. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20* (3), 897–904.
- (11) Wallace, P. K.; Tario, J. D., Jr.; Fisher, J. L.; Wallace, S. S.; Ernstoff, M. S.; Muirhead, K. A. *Cytometry, Part A* **2008**, *73A*, 1019–1034.
- (12) Misumi, Y.; Misumi, Y.; Miki, K.; Takatsuki, A.; Tamura, G.; Ikehara, Y. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261* (24), 11398–11403.
- (13) McKinney, K. L.; Dilwith, R.; Belfort, G. *Biotechnol. Prog.* **1991**, *7*, 445–454.
- (14) Robinson, D. K.; Memmert, K. W. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *38*, 972–976.
- (15) Jøssang, T.; Feder, J.; Rosenqvist, E. *J. Protein Chem.* **1988**, *7* (2), 165–171.

(16) Kromenaker, S. J.; Srienc, F. *Biotechnol. Prog.* **1994**, *10*, 299–307.

(17) Bailey, L. A.; Hatton, D.; Field, R.; Dickson, A. J. *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109* (8), 2093–2103.

(18) Pilbrough, W.; Munro, T. P.; Gray, P. *PLoS One* **2009**, *4* (12), No. e8432.

(19) Davies, S. L.; Lovelady, C. S.; Grainger, R. K.; Racher, A. J.; Young, R. J.; James, D. C. *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, DOI: 10.1002/bit.24621.

バイオナノカプセル-リポソーム複合体の 生体内ピンポイント薬剤送達への応用

Application of Bionanocapsule-liposome complex for in vivo pinpoint drug delivery

曾宮正晴*¹ 良元伸男*² 黒田俊一*³

われわれが開発したバイオナノカプセル (BNC) は、中空カプセルでありながら、ウイルスと同様に生体内で特定の細胞や組織に集積し、細胞内へ侵入することのできるナノ粒子である。このBNCは、薬剤や核酸を封入したりポソームと融合させることができ、既存のリポソーム医薬品にウイルス由来の特異的な感染能を付与できる画期的なバイオマテリアルである。

1. ドラッグデリバリーシステムにおける リポソームの現状と課題

リポソームは脂質二重膜から構成される粒子であり、1960年代にその調製法が確立されて以来、生物科学における細胞のモデルとして利用される他、その内部に種々の化合物を封入できるという特徴から、医薬品を生体に投与する際の薬物運搬体として盛んに利用されている。近年、患者のQOL (生活の質) 向上が重要視されており、医薬品使用時の患者の負担・副作用を低減するためにも、体内の必要な部位に、必要な量だけ、必要なタイミングで薬剤を送達するドラッグデリバリーシステム (DDS) の技術が注目されている。そのなかでもリポソームは、DDS用ナノキャリアとして最も頻用されている素材の一つである。たとえば、抗癌剤であるドキソルビシンをリポソーム内に封入したDOXIL®のようなりポソーム製剤は、日本を含め各国で臨床応用されており、これらは薬剤単体で人体へ投与する場合よりも生

体内安定性が向上し、優れた血中滞留性を示す。特に、直径100 nm前後の粒子を静脈投与した場合、EPR効果 (Enhanced Permeation and Retention effect)¹⁾によって癌組織や炎症部位に集積するので、正常組織への副作用が軽減される。このように、リポソームは種々の薬物を包み込み、薬効を高める“カプセル”として非常に有効である。

しかしながら、リポソームに封入された薬物が簡単に体内の患部へ到達するかというと、実際はそうではない。リポソームのようなナノキャリアを人体へ投与 (本稿では主に静脈投与を想定) すると、これらは本来生体にとって異物であることから、当然、生体の防御機構が作動する。この防御機構を回避して薬物を効果的に送達することがDDS技術の使命である。まず、ナノキャリアが体内で最初に遭遇する防御機構の中心は、RES (細網内皮系, reticuloendothelial system) と呼ばれる免疫担当細胞群である。これらの細胞は生体外から侵入してきた異物を貪食し、排除する働きをもっている。RESによる捕捉をナノキャリ

*¹Masaharu Somiya *²Nobuo Yoshimoto *³Shun'ichi Kuroda

名古屋大学 大学院 生命農学研究科 *¹大学院生 *²特任助教 *³教授

アが回避する能力（ステルス性）を向上させるためには、まずリポソームの物性（粒子径、表面電荷など）を最適化することが重要である。特に RES は直径 200 nm 以上の異物に対して働き、100 nm 前後の異物に対しては比較的働きにくいことが知られているため²⁾、リポソーム製剤に関しても粒子径を 100 nm 前後にすることが重要である。次に、ナノキャリアは体内において抗体や補体が結合（オプソニン化）して免疫系細胞による認識が促進されるので、リポソーム表面にポリエチレングリコール（PEG）を修飾して水和相を形成させ、オプソニン化を低減させた PEG 化リポソームが頻用されている（前述の DOXIL も PEG 化リポソームである）。しかし、PEG 化リポソームは初回投与後に抗 PEG IgM 抗体が産生されてしまい、以降の繰り返し投与時に体内から急速に排出される ABC (accelerated blood clearance) 現象³⁾ が報告されており、PEG 化の代替法の開発が期待されている。

上述の免疫機構を回避したリポソームが次に会う防御機構は、多くの薬剤が細胞内で薬効を発揮するので細胞膜となる。従来のリポソームは、主として薬物の生体内動態や血中滞留性を改善する目的で利用されており、それ以降の効果は不十分なことが多かった。つまり、エンドサイトーシスにより細胞内に受動的に取り込まれ、酸性環境の後期エンドソームおよびライソソームに移行して、リポソームの脂質二重膜がヘキサゴナル II 相を形成してエンドソーム膜と融合して、薬剤を細胞質内に放出していた。しかし、細胞内への取り込みが受動的で、細胞質内への移行も酸性環境下であるため、薬剤の投与量に対する細胞質内への移行効率は低かった。そこで、現在では標的細胞内に能動的に侵入する標的化ペプチド、および細胞質内に自発的に侵入する細胞膜透過ペプチドを提示したりリポソームが開発されている⁴⁾。また、遺伝子発現により治療効果を得る遺伝子治療においては、上述の機能を有するリポソームに、細胞質を経て核内に遺伝子を送達できる機能の付与が必要である。

以上、現在主流の DDS 用ナノキャリアであるリポソームに関して解決すべき点について述べてきた。これらの問題点は、リポソームのみならず多くの人工の DDS 用ナノキャリアに共通している。一方で、われわれがいまだ完全に克服できていない生体内の障壁をことごとく破り、標的の組織や細胞へ到達可能な天然のナノキャリアとして、ウイルスが存在する。

2. ウイルスを模倣したキャリア、 バイオナノカプセル技術

すべてのウイルスが該当するわけではないが、多くのウイルスは、宿主免疫系をかいくぐり（ステルス能）、宿主細胞内に積極的に侵入して（細胞内侵入能）、その遺伝情報を宿主細胞で複製させて感染を成立させる。また、一部のウイルスは標的組織または標的細胞にのみ感染する指向性（組織および細胞特異性、トロピズム）を有している⁵⁾。これらの事実は、ウイルスは長い進化の過程において宿主と相互作用することにより、優れた DDS 用ナノキャリアとしての特性を獲得したと考えられる。換言すれば、ウイルスを模倣すれば優秀な DDS 用ナノキャリアが開発できる可能性が高い。しかしながら、ウイルスが直接運搬できるのはウイルスゲノムのみであり、核酸以外の薬剤の送達には不向きである。実際、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルスなどのウイルスは、リポソームなどの非ウイルス性キャリアと比較して圧倒的に高い遺伝子導入効率を示すことから、治療用遺伝子を組み込んで臨床応用もされているが、ウイルスゲノムによる宿主遺伝子攪乱による潜在的な危険性が指摘されており、死亡例も報告されている。以上から、われわれはウイルスがもつステルス能、細胞内侵入能、組織および細胞特異性にに基づく高度な物質導入能を活かしつつ、ウイルスゲノムに起因する潜在的危険性を排除して、リポソームのような非ウイルス性キャリアの安全性を有する DDS 用ナノキャリアの開発が急務であると考えた。

そこでわれわれは、ヒト生体内で肝臓にのみ感

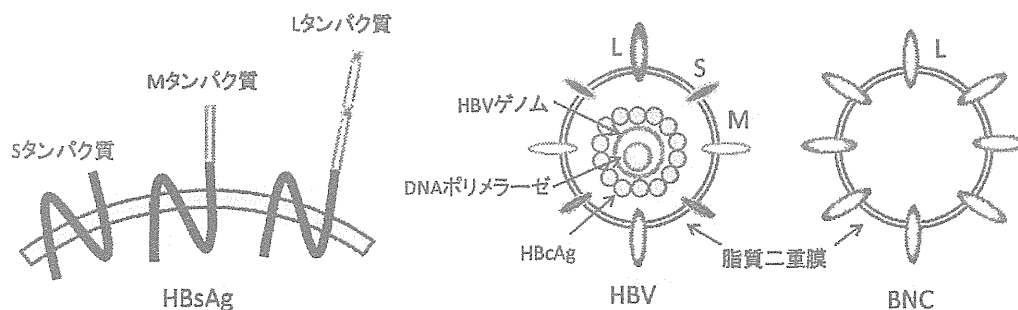


図1 HBsAg, HBV, BNCの構造

HBsAgには三種類の外皮タンパク質(S, M, L)が存在する。HBVは全種類を表面に提示しているが、BNCはLのみを提示している。両者とも脂質二重膜を有する約50 nmの構造体であるが、HBV内部にはウイルス複製に必要なHBcAg, DNAポリメラーゼ, HBVゲノムが存在し、BNC内部は中空である。

染するB型肝炎ウイルス(hepatitis B virus; HBV)に着目した。HBVは、C末端が共通な3種類のHBV表面抗原(HBsAg) S, M, Lタンパク質(図1左)が、脂質二重膜上に提示されたエンベロープ型ウイルスであり(図1中央)、なかでもLタンパク質のN末端部分(pre-S1領域)がヒト肝臓細胞への特異的感染に必須である⁶⁾。このLタンパク質を遺伝子工学的に出芽酵母で過剰発現させると、ウイルスの外殻と基本的に同じ構造を有する直径50-100 nmのナノ粒子が得られたので、HBVと同様な感染機構を有すると期待された(図1右)⁷⁾。一方、本粒子内部は中空でありウイルスゲノムを含まず、ウイルスのように宿主細胞内で増殖することもなく、すでに臨床応用されているB型肝炎ワクチン用抗原と同様な構造を有しているので、安全と考えられた。そこで、電気穿孔法により緑色蛍光タンパク質発現遺伝子を本粒子内部に封入し、HBVの標的であるヒト肝臓細胞に接触させると、きわめて高効率に緑色蛍光タンパク質の発現が確認された⁸⁾。このヒト肝臓細胞特異的な遺伝子導入能は、ヒト肝臓細胞由来腫瘍を皮下移植したヌードマウスに尾静脈から注射した場合でも確認され、本粒子がHBV由来の高い特異性と遺伝子導入能をもつDDS用ナノキャリアであることが示された。最近では、本粒子が生体内でHBVと同様に標的組織・細胞へ集積するだけでなく、HBVとほぼ

同様の侵入経路でヒト肝臓細胞に取り込まれることが明らかになった⁹⁾。そこでわれわれは、本粒子をバイオナノカプセル(BNC; Bio-nanocapsules)と命名し、さらにDDS用ナノキャリアとしての利用可能性を検証した。

まず、正常ヒト肝臓組織を腎臓皮下に移植したSCIDマウスにおいて蛍光標識BNCを尾静脈から注射した場合、BNCが移植したヒト肝臓組織にのみ集積し、他の組織への集積が観察されなかったことから¹⁰⁾、BNCにはRESに捕捉されずに標的組織に集積する十分なステルス能が備わっていることが示唆された。最近のわれわれの解析により、BNCのLタンパク質中程およびMタンパク質N末端に存在するpre-S2領域に含まれる重合アルブミンレセプター(polymerized albumin receptor; PAR)領域(図2)に、長い血中半減期を示すアルブミン(多くの血液中アルブミンは重合体)が結合して、免疫系(特にRES)による捕捉を回避していることが明らかになっている(高木ら、投稿中)。これは今後のDDS用ナノキャリア開発において、Abraxaneにより臨床応用されているアルブミン修飾に加えて、PAR領域提示がPEG化の代替法として有望であることを示している。

さらに、BNCの適用範囲を拡大するために、ヒト肝臓細胞特異性の改変を行った。まず、Lタンパク質のヒト肝臓細胞認識部位を遺伝子工学的

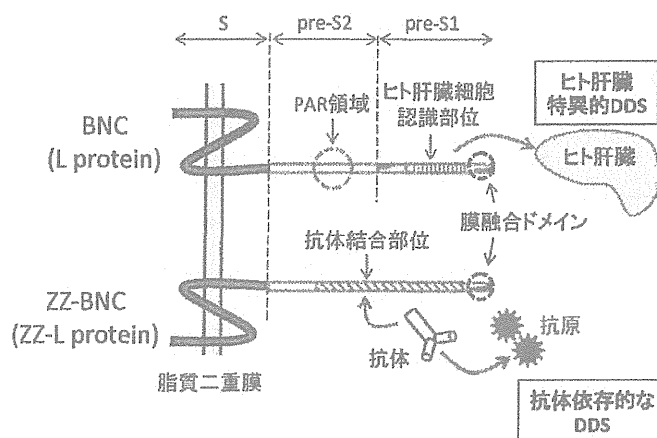


図2 BNCとZZ-BNCの構造と機能

BNCのLタンパク質とZZ-BNCのZZ-Lタンパク質は3回膜貫通ドメインを有するS領域を共有し、N末端部分を粒子表面上に提示している。BNCは、ヒト肝臓細胞認識部位（pre-S1領域内）、生体内ステルス性に関与していると考えられるPAR領域（pre-S2領域内）を有しており、ヒト肝臓特異的DDS用ナノキャリアとして機能する。一方、ZZ-BNCはpre-S1+pre-S2領域が抗体結合部位に改変されており、抗原-抗体反応を利用してさまざまな標的を狙えるDDS用ナノキャリアである。

に欠失させ、任意の抗体が提示できるようにProtein A由来IgG Fc結合領域Zドメインを提示させたZZ-Lタンパク質から構成されるZZ-BNC（図2）を作製した¹¹⁾。ZZ-BNCにより、任意の抗体の特異性に依存した組織および細胞特異性をBNCに付与することが可能になった。また、最近では悪性度の高い腫瘍に特異的に発現している糖鎖（ β 1-6GlcNAc）を認識するレクチンL4-PHAを、アビジン・ビオチン複合体を介してZZ-BNC表層に提示した、生体内で使用可能な悪性腫瘍標的化BNCの開発にも成功した。以上のように、BNCはさまざまな生体認識分子（抗体、糖鎖、レクチン、リガンド、ペプチドなど）の提示が可能になり、任意の組織および細胞特異性の付与が原理的に可能になっている。しかしながら、BNC中心部の極小な中空部分に核酸や化合物を直接封入する電気穿孔法は、封入効率が悪くBNC同士の融合も促進したので、電気穿孔法に替わる封入法の開発が必要であった。

3. バイオナノカプセル-リポソーム複合体のDDSへの応用

われわれは、BNCとリポソームを共存させると自発的に融合することを見だし¹²⁾、詳細な解

析を行ったところ、HBVの外皮タンパク質には他の多くのウイルスと同様に、宿主細胞内に侵入する際に必要な脂質二重膜と融合する活性（膜融合活性）が存在していた。すでに、他の研究者がS領域N末端側およびpre-S2領域中程に同活性を示す領域が存在することを報告していたが、われわれはpre-S1領域のN末端側にきわめて強い膜融合活性が存在することを見いだした（太江田ら、投稿中）（図2）。また、pre-S1領域の同活性部位を抗体により抑制すると、S領域およびpre-S2領域の同活性部位が残っていてもBNCとリポソームの融合は抑制されたことから、HBVの感染機構に必須な細胞膜との融合（具体的には、エンドソーム内侵入後のエンドソーム膜融合による細胞質への脱出）にはpre-S1領域の同活性部位は中心的役割を担っていることが判明した。一方、外皮タンパク質を保持させつつ不活化したウイルスをリポソームと融合させてDDS用ナノキャリアとして応用する試みはこれまでにも行われてきた。たとえば、紫外線で不活化したセンドライウイルス（HVJ）とリポソームをHVJの膜融合能を有するFタンパク質の作用で複合体化させた“virosome”は、あらかじめリポソーム内に包含した遺伝子を細胞内に効率的に取り込

表1 各種 DDS 用ナノキャリアの比較

	リポソーム	レトロウイルス	BNC	BNC-リポソーム複合体
安全性	○	×	○	○
標的化能	×	×	○ ヒト肝臓細胞特異的 ZZ-BNC は抗体により再標的化	○ BNC と同等
細胞内侵入能	受動的	能動的	能動的	能動的
ステルス能	○ PEG 修飾	×	○	○
物質封入	各種薬物や 遺伝子など多数	遺伝子のみ	遺伝子や蛍光物質 封入効率が低い	基本的にリポソーム と同等

ませることに成功している¹³⁾。しかし、従来の virosome は組織および細胞特異性を示すウイルスを使用した例は報告されていないため、得られた virosome も組織および細胞特異性は示さなかった。また、生体内での安定性（ステルス能も含む）も脆弱であった。今回、BNC をリポソームと融合させることで、初めてリポソームに BNC の高度な組織および細胞特異性、細胞内侵入能、およびステルス能を付与することができ、従来にない virosome を創製できた。実際に、ドキソルビシンを封入したリポソームを BNC と複合体化させた後にマウス尾静脈から投与すると、リポソーム単体と比較して免疫系から捕捉されにくくなり、その効果は PEG 化リポソームと同等であった¹⁴⁾。さらに、ヒト肝臓癌細胞由来の腫瘍を皮下移植したヌードマウスにおいて、BNC に由来する標的化能によって BNC-リポソーム-ドキソルビシン複合体は、ヒト肝臓細胞由来腫瘍特異的に、ドキソルビシン単独投与よりも少ない薬剤量で腫瘍サイズを縮小させ、ドキソルビシン由来の副作用の軽減にも成功した¹⁴⁾。したがって、リポソームを BNC と複合体化させることは、免疫系を回避するステルス能を付与するだけでなく、ヒト肝臓細胞特異的な標的化能および細胞内侵入能を付与できることが明らかとなった。

最近では、BNC の膜融合活性が酸性条件下で促進されることを見いだしており、至適量比で

BNC とリポソームとを酸性条件下で混合すると、安定で均一な BNC-リポソーム複合体を得ることが可能になっている。まず、酸性条件下で作製した BNC-リポソーム複合体は、従来の中性条件下で作製した BNC-リポソーム複合体の数十倍～数百倍の遺伝子導入効率を示した（太江田ら、投稿中）。次に、酸性条件下で作製した BNC-リポソーム複合体には、リポソームと同様の方法で各種薬剤や遺伝子が封入可能で、従来のリポソームに薬剤や遺伝子を封入してから BNC と融合させる場合と比較して、より効率のよい薬剤送達および遺伝子導入能を示した（仲本・宮部ら、未発表データ）。この現象を説明するには、詳細な解析が必要であるが、おそらく BNC を構成する脂質二重膜とリポソーム膜の融合が酸性条件で促進され、脂質二重膜レベルで一体化し、後期エンドソーム内の酸性条件下でのエンドソーム膜との融合において BNC が効率よく作動し、BNC-リポソーム複合体の内包物が細胞質内に放出されたためと考えている。

従来型リポソーム、遺伝子治療で最も頻用されているレトロウイルス、BNC、そして BNC-リポソーム複合体の特性を比較すると（表1）、BNC-リポソーム複合体は、BNC に由来するヒト肝臓特異性（改変型 BNC を使用すればヒト肝臓以外にも再標的化可能）、細胞内侵入能、ステルス性と、リポソームに由来する物質封入能を兼ね備え

た、きわめて効率的で安全な virosome であると考えている。

4. おわりに

以上、BNC がリポソームと複合体化することにより、ウイルス由来のさまざまな長所をリポソームに付与できることを概説した。本稿では代表的な非ウイルス性 DDS 用ナノキャリアであるリポソームについてのみ解説したが、その他の非ウイルス性 DDS 用ナノキャリア（例：ナノミセル、ポリマー）もリポソームと同様な問題点を抱えており、BNC との複合体化で打開できる可能性がある。最近、われわれはポリマーの一種であるポリエチレンイミンと BNC の複合体化に成功し、試験管内ながらヒト肝臓特異性と細胞内侵入能を付与することに成功しており¹⁵⁾、BNC との複合体化は生体内利用に適していなかったさまざまな非ウイルス性 DDS 用ナノキャリアの実用化を推進することができるかもしれない。

謝辞：本研究は、農研機構・生物系特定産業技術研究支援センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業（技術シーズ開発型・一般枠）、日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究 A, 21240052）、厚生労働科学研究費補助金（B 型肝炎創薬実用化等研究事業）の支援による成果であり、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) Maeda, H. *et al.*, *Adv. Enzyme Regul.*, **41**, 189 (2001)
- 2) Oku, N., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **40**, 63 (1999)
- 3) Immordino, M. L. *et al.*, *Int. J. Nanomedicine*, **1**, 297 (2006)
- 4) Torchilin, V. P. *et al.*, *PNAS*, **98**, 8786 (2001)
- 5) Schneider-Schaulies, J., *J. Gen. Virol.*, **81**, 1413 (2000)
- 6) Neurath, AR *et al.*, *Cell*, **46**, 429 (1986)
- 7) Kuroda, S. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **267**, 1953 (1992)
- 8) Yamada, T. *et al.*, *Nature Biotechnol.*, **21**, 885 (2003)
- 9) Yamada, M. *et al.*, *J. Control Release*, **160**, 322 (2012)
- 10) Matsuura, Y. *et al.*, *Eur. Sur. Res.*, **46**, 65 (2011)
- 11) Iijima, M. *et al.*, *Biomaterials*, **32**, 1455 (2011)
- 12) Jung, J. *et al.*, *J. Control Release*, **126**, 255 (2008)
- 13) Kaneda, Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **43**, 197 (2000)
- 14) Kasuya, T. *et al.*, *Methods Enzymol.*, **464**, 147 (2009)
- 15) Somiya, M. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 3873 (2012)

バイオナノカプセルを用いた 生体内ピンポイント DDS 技術の開発*

松尾 英典*, 良元 伸男*, 黒田 俊一*

1. はじめに

21 世紀に入り生命科学の進歩により, 抗癌剤, サイトカイン, 治療用遺伝子, siRNA 等の優れた薬効を示す薬剤が開発されてきた。しかしそれらの多くは, 全身投与されるために副作用を示したり, 生体内安定性やバイオアベイラビリティ(生物学的利用能)が低かったりなど, 実用化に至るまでに解決しなければならない様々な問題を抱えているのが現状である。そこで, これらの問題を解決するプラットフォーム技術として, 直径 100 nm 前後の薬剤運搬体(ナノキャリア)を用いたドラッグデリバリーシステム(DDS; Drug Delivery System)が注目されている。DDS とは, 「必要量の薬剤を, 必要な時間に, 必要な場所に送達」を達成する技術であり, 薬剤に由来する副作用を回避しつつ, 薬効を最大限に発揮させる技術として, 近年多くの研究がなされている。特に,

この 20 年間で進歩してきたナノテクノロジー分野のボトムアップ技術により, ナノスケールでの物質制御が可能になり, 多彩な化学的及び物理的性質を有するナノ粒子がナノキャリアとして開発されており, 種々の薬剤と複合体化させて, より効率的な DDS を達成するナノメディシン技術として期待されている。これらのナノキャリアは, 非ウイルス性ナノキャリアおよびウイルス性ナノキャリアに大別することができ, 両方の性質を兼ね備えたハイブリッドナノキャリアも存在する。非ウイルス性ナノキャリアは, リポソーム(脂質二重膜構造を有した中空ナノ粒子), ミセル(両親媒性ポリマーから構成され, 疎水部のコアを親水部が周囲を取り巻いたナノ粒子), ポリマー, 金属ナノ粒子などが挙げられ, その粒子内外へ薬剤を搭載することで生産性, 安全性, 汎用性に優れたナノメディシンとなる。一方, ウイルス性ナノキャリアは, ウイルス本来の性質(宿主・組織・細胞に対する特異性, 細胞内侵入能, 遺伝子導入能, 生体内ステルス能等)を利用しており, 治療用遺伝子を搭載することでウイルスの感染機構を有する優れたナノメディシンとなる。これらに対してハイブリッドナノキャリアは, 後述するが非ウイルス性ナノキャリアとウイルス性ナノキャリアの互いの欠点を相補するものであり, 両者の利点を兼ね備えたナノキャリアとして期待される。本稿では, ナノキャリアを用いる DDS に関して概

* Development of In Vivo Pinpoint Drug Delivery System using 'Bio-nanocapsules'

* Hidenori MATSUO, Nobuo YOSHIMOTO and Shun'ichi KURODA 名古屋大学 大学院 生命農学研究科 生命技術科学専攻 産業生命工学研究分野

Laboratory of Industrial Biosciences, Department of Bioengineering Sciences, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University (〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町)

Key words : Bio-nanocapsules, Hepatitis B virus, Drug delivery system, Gene delivery system, Liposomes

説するとともに、筆者らが開発したハイブリッドナノキャリアである「バイオナノカプセル」について紹介する。バイオナノカプセルは、B型肝炎ウイルス (HBV: Hepatitis B Virus) の表面構造を模倣した中空ナノ粒子であるが、HBV 表面抗原タンパク質の遺伝子のみを有する出芽酵母により過剰生産されるため他の HBV 由来分子は完全に排除され、HBV 由来のヒト肝臓細胞特異性及び細胞内侵入能を有した安全性の高いナノキャリアとして期待される。また、封入物は治療用核酸 (DNA, RNA) に限らず、タンパク質や低分子化合物など様々な薬剤を搭載する方法が開発されており、広範な用途に対応可能な汎用性の高いナノキャリアである。また BNC にはヒト肝臓細胞のみならず、標的となる細胞および組織を変更可能な再標的化技術が開発され、生体内の様々な臓器や組織を標的化することが可能である。

る。本 BNC 技術が実用化されれば、高度な標的化能かつ高効率な送達能を有する DDS 用ナノキャリアとなるので、生体への薬剤投与量の著しく減らすことができ、副作用の低減や薬剤の生体内安定性の改善が期待され、既存の薬剤シーズの高機能化を達成することができる。

2. ナノキャリアを用いた生体内薬剤送達技術 (In vivo DDS)

2.1 ナノキャリアを用いた受動的薬剤送達技術

ナノキャリアを用いた DDS では、全身に分布するナノキャリアが標的臓器へ効率的に集積すること (第一次標的化) と、組織内に分布するナノキャリアが標的細胞内へ効率的に集積すること (第二次標的化) が重要である (図 1)。最もよく

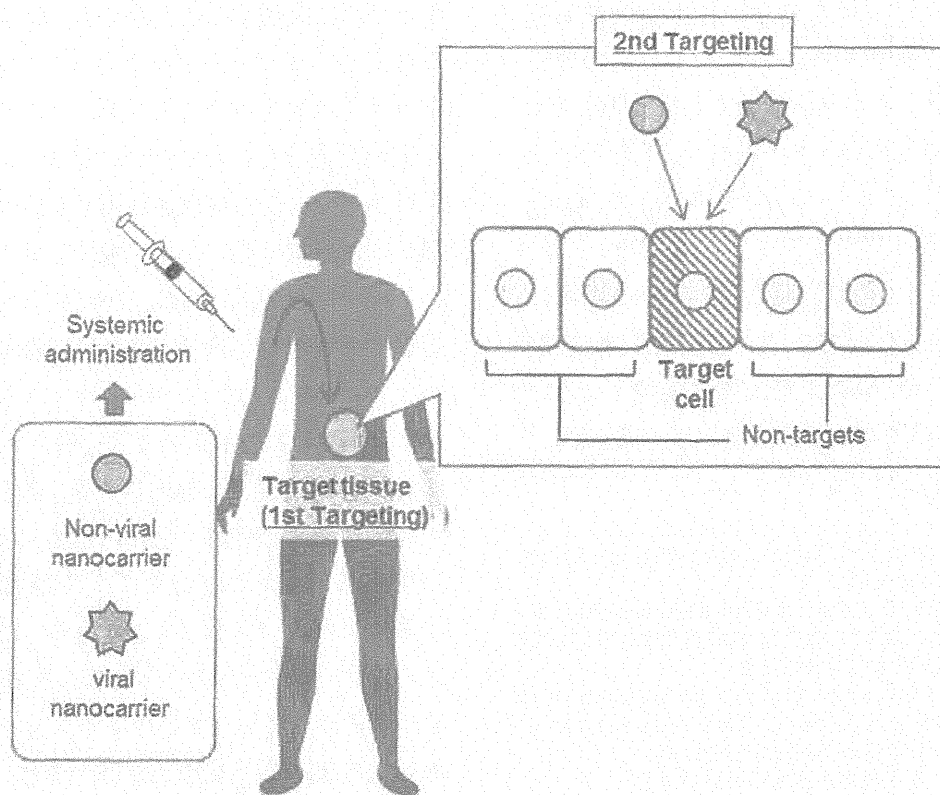


図 1 ナノキャリアを用いた生体内ピンポイント DDS の概要

用いられている DDS 技術として EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果に基づく受動的標的化 DDS 技術 (Passive Targeting DDS) がある。EPR 効果は、増殖の著しい癌組織において観察される新生血管が正常血管と異なり、血管壁細胞間隙が 100 nm 以上に広がっていることから、直径 100 nm 前後のナノキャリアがその間隙を選択的に透過することができ、経時的に癌組織内部にナノキャリアが蓄積していく現象である¹⁾。なお、この EPR 効果は炎症部位においても観察されることがあり、炎症性疾患部位への標的化にも応用できる。さらに、ナノキャリアの生体内循環効率を向上させる技術として、ナノキャリア表面をポリエチレングリコール (PEG; Polyethylene glycol) で修飾することが有効である²⁾。ナノキャリアの PEG 修飾は、その表面に水和層を形成させ、生体内異物排除系に参与するオプソニン分子 (例、抗体、補体) の吸着および貪食細胞群との接触を抑制することで、ナノキャリアの血中滞留性を向上させて EPR 効果を促進する。これら現象に基づき、抗癌剤を封入したりボソームやミセルといった直径 100 nm 前後の粒子を、癌組織特異的に送達させる DDS に成功している。例えば、PEG 修飾したりボソームに抗癌剤ドキシソルピシン (Dox; doxorubicin) を封入した Doxil は、EPR 効果に基づくナノメディシンとして、Dox 単体投与に比べて優れた薬効および毒性 (特に心毒性) の低減が報告されている。しかし、EPR 効果に基づく受動的標的化 DDS 技術では、ある程度以上の薬剤血中濃度を維持する必要があり、一生涯の投与量が制限されている Dox などにおいては、一層の低濃度化が必要である。また、癌組織及び炎症部位以外への標的化ができないといった欠点も有しており、汎用性の高い DDS 技術とは言えない。そこで、今後求められるナノキャリアを用いる DDS 技術は、生体内における標的組織への第一次標的化および組織内における標的細胞への第二次標的化を能動的に行えることが望ま

しく、能動的標的化 DDS 技術 (Active Targeting DDS) を可能にするナノキャリアの開発が求められている (注、抗癌剤を包含するナノキャリアは受動的標的化 DDS 技術で十分に薬効を示すので、能動的標的化 DDS 技術は不要と主張する研究者も一部存在する)。

2.2 非ウイルス性ナノキャリアを用いた能動的薬剤送達技術

能動的標的化 DDS 技術の確立は効果的な DDS を達成するためには不可欠である。これまで、標的部および細胞に対して特異性を元来有していない非ウイルス性ナノキャリア (リボソーム、ミセル、ポリマー、金属ナノ粒子等) に対して、標的化能を有する分子 (糖鎖、抗体、リガンド等) を導入して、標的特異的に存在するレセプターやリガンドなどの細胞表面分子と相互作用に基づく能動的薬剤送達が多数試みられている。その結果、これらのナノキャリアは標的特異的かつ能動的な薬剤送達がある程度可能にはなったが、標的部および細胞に送達した薬剤の薬効を最大限に発揮するためには、未だ達成しなければならない幾つかの課題がある。例えば、静脈内に投与したナノキャリア表面には、血中に存在するオプソニンと呼ばれる異物排除機構による認識効率を高める分子群が吸着し、肝臓、肺、脾臓などに存在する貪食細胞群 (RES; Reticuloendothelial System; 細網内皮系) に貪食・排除される。前項で述べたように、ナノキャリア表面の PEG 修飾によりオプソニン分子の吸着を避けることは可能であるが、PEG 修飾ナノキャリアの繰り返し投与は抗 PEG-IgM 抗体を誘導し、その後投与された PEG 修飾ナノキャリアの薬剤送達能が ABC (Accelerated Blood Clearance) 効果により著しく低下する³⁾。そこで現在では、PEG 修飾以外の生体内ステルス活性付与のための技術開発が必要となっている。また標的細胞に到達したナノキャリアは、細胞のエンドサイトーシス (食作用) によ

りエンドソームと呼ばれる細胞内小器官に取り込まれる。しかし、薬剤によっては間質、細胞質、核内等への送達が求められ、細胞内侵入活性、エンドソーム脱出活性、核移行活性等の機能を、ナノキャリアに搭載する必要があるが、これらの高度な機能をナノキャリアの極小空間に相互干渉なく同時搭載するのは困難である。

2.3 ウイルス性ナノキャリアを用いた能動的薬剤送達技術

筆者らは、上述のような非ウイルス性ナノキャリアの技術的な困難さに鑑み、天然のナノキャリアであるウイルスに注目している。具体的には、ウイルスは数十から数百 nm の極小な構造体ながらも、長い進化の過程で宿主と相互作用して、効果的な DDS を達成するために必要な以下の機能の全てもしくは幾つかを獲得していると考えられる。(1) RES 等の生体内異物排除系からの回避機構、(2) 免疫系からの回避機構、(3) 宿主・組織・細胞に対する厳密な特異的感染能、(4) 生体膜との融合活性に基づく細胞内侵入機構 (エンドソーム等の細胞小器官からの脱出機構も含む)、(5) 宿主細胞における遺伝子発現機構。実際、アデノウイルス、センダイウイルス等のウイルス性ナノキャリアの DDS への応用研究は盛んに行われており、優れた DDS 用ナノキャリアとしての実績を挙げている。しかし、ウイルスが本来有している毒性 (免疫原性、発癌性、病原性等) や、(最近ではほぼ完全に欠失させた変異体の創製例もあるが) ウイルスゲノムの混入による宿主遺伝子の攪乱など、安全性に関するリスク要因を未だ払拭できていない⁴⁾。そこで、より安全性に優れた高機能 DDS 用ナノキャリアを実現するためには、ウイルスの優れた機能のみを非ウイルス性ナノキャリアに移植したハイブリッドナノキャリアの開発が望まれる。

3. B 型肝炎ウイルスの感染機構を有するハイブリッドナノキャリア 'バイオナノカプセル' の開発

3.1 バイオナノカプセルの開発

既存の DDS 用ナノキャリアの問題点を解決する方策として、ウイルス由来の細胞内侵入機構や宿主・組織・細胞の認識を担う機能性分子のみを搭載したハイブリッドナノキャリアのコンセプトは有望であると述べてきた。その一例として、ウイルスの感染機構の中心的役割を担う外皮タンパク質のみを抽出し、リボソーム等の膜構造上に再構築した 'Virosome' が開発されている⁵⁾。一般的にウイルスの外皮タンパク質は、宿主・組織・細胞の認識や細胞内侵入といった初期感染機構を担うことが知られており、Virosome はウイルスと同様の初期感染機構を有した安全性の高いナノキャリアとして期待されている。実際にセンダイウイルスを紫外線で不活化し、融合 (F) タンパク質の作用で発現用遺伝子を包含したりボソームと複合体化したところ、生体内においても優れた遺伝子導入能を示した⁶⁾。しかし、Virosome 作製技術はすべてのウイルスに応用できるわけではなく、Virosome 化によりウイルス由来の感染能を失ってしまう事例もある。また、Virosome 作製には大量のウイルス粒子の確保及び確実な不活化操作が必要となるため、その生産性に課題が残る。さらに、現在 Virosome 化に成功しているウイルスは、宿主・組織・細胞に対して幅広い認識能を有するものばかりで、能動的標的化 DDS 技術を達成するのは困難であった。

そこで筆者らは、Virosome のコンセプトに基づき、生産性に優れたウイルス様の外殻構造を有するナノキャリアの開発を目的として、血液を介してヒト肝臓特異的に感染する HBV に着目し、同様の外殻構造を有するバイオナノカプセル (BNC; Bio-nanocapsule) を開発した (図 2-A)。BNC は、分泌促進を図るシグナルペプチドを付

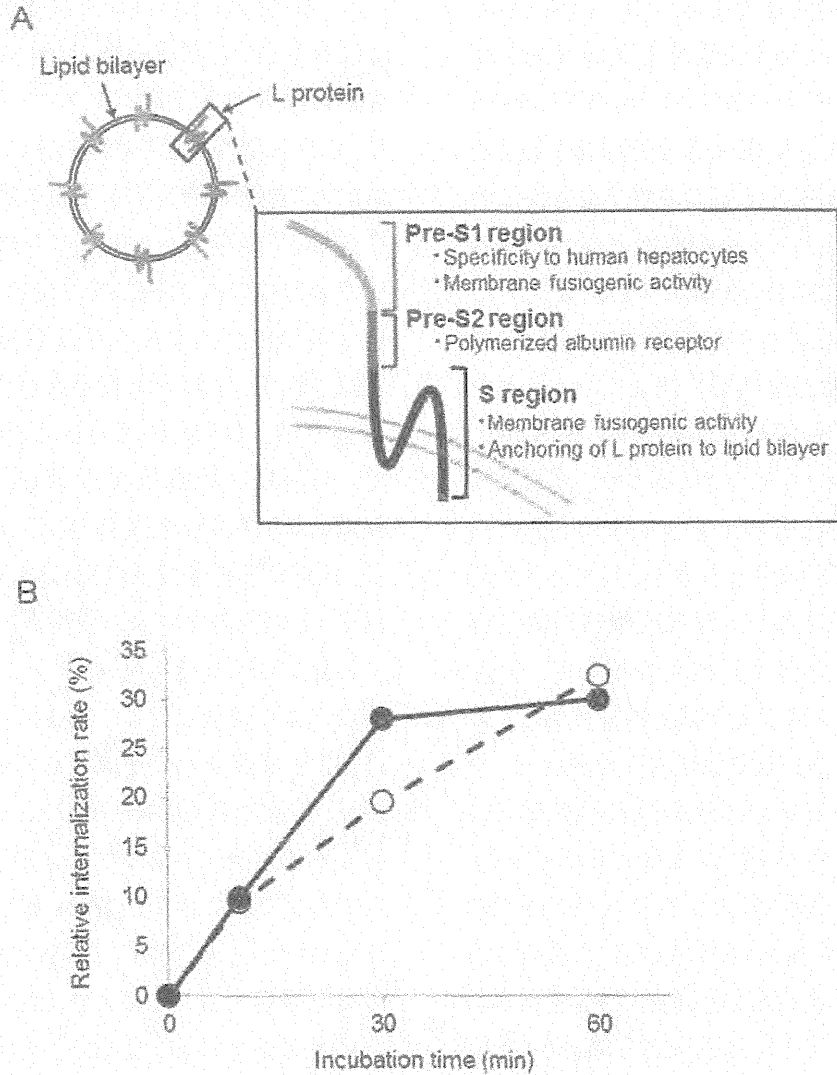


図2 バイオナノカプセルの構造 (A) とヒト肝臓細胞への侵入効率 (B)。バイオナノカプセルの粒子構造と表面に提示された機能ドメインに関する模式図 (A)。および、0℃で細胞表層に固定したバイオナノカプセル (●) と B 型肝炎ウイルス表面抗原 (HBV の代用; ○) のうち、37℃にシフト後にヒト肝癌由来細胞 Huh7 内部に侵入した経時的な割合 (B)。

加した HBV 表面抗原 L タンパク質 (N 末端側から pre-S1 領域, pre-S2 領域, S 領域) をコードする遺伝子を出芽酵母等の真核生物において過剰発現させて得る。具体的には、まず小胞体内で pre-S1 及び pre-S2 領域をルーメン側に提示しつつ S 領域が小胞体膜に 3 回膜貫通して、小胞体膜上に整列化した後、約 110 分子の L タンパク質が自己会合化してルーメン側に出芽形式で直

径 30~40 nm の中空ナノ粒子 (すなわち BNC) が放出される⁷⁾。BNC は、遺伝子組換え酵母において可溶性タンパク質の約 40% まで過剰発現され⁷⁾、熱処理を併用した簡便な精製法により培養液 1 L あたりタンパク質量約 5 mg の BNC が生産可能と非常に優れた生産系が確立できている⁸⁾。また 30 年以上臨床で使用されてきた遺伝子組換え酵母由来 HB ワクチンと BNC は、ほぼ

同じ構造で同様な産生法であるので、生体投与に伴う毒性や安全性に対する懸念もほぼ解決されている。さて、BNC と HBV は pre-S1+pre-S2 領域を外周に提示し、S 領域で粒子形成することから、外周構造が類似しているのが予想されていたが、実際に BNC のヒト肝臓細胞表層への吸着速度及び効率および同細胞内部への侵入速度が HBV と同等であることが最近示され、BNC は HBV と同様な初期感染機構を備えていることが示された(図 2-B)⁹⁾。HBV は発見から 40 年以上経過している古いウイルスではあるが、未だにヒト肝細胞表面に存在すると予想される HBV 受容体が同定されていない。しかし、Lタンパク質 pre-S1 領域に存在するヒト肝臓細胞特異的受容体が、仮想 HBV 受容体と相互作用して、HBV がエンドサイトーシスにより細胞内に侵入し、エンドソーム内の低 pH 環境依存的に膜融合し、ウイルスゲノムを含むコア部分を宿主細胞質内に放出する(エンドソーム脱出)と考えられている。現在までに、他の研究者により Lタンパク質内の S 領域の N 末端側、pre-S2 領域の C 末端側に膜融合活性化する領域(膜透過領域)が存在すると報告されているが^{10), 11)}、最近筆者らは pre-S1 領域 N 末端部分に新たな膜透過領域を発見し、少なくとも BNC の細胞膜融合活性の中心を担うことを示した(太江田ら、投稿中)。おそらく、同領域は BNC や HBV のヒト肝臓細胞内部でのエンドソーム脱出において他の 2 領域よりも優先して作動すると考えられた。また、pre-S2 領域にはヒト肝臓特異的な感染機構に間接的に作用すると考えられている重合ヒトアルブミン受容体が存在する。

以上のように、BNC は HBV の感染機構を有する中空ナノ粒子であり、強力な細胞内侵入活性に加えて、従来の Virosome にはない高度な細胞特異性を有していた。そこで、BNC を DDS 用ナノキャリアとして実用化するには、BNC の主要抗原である Lタンパク質が生体内免疫系を感作

して、積極的に生体内から排除されることを避けねばならない。筆者らは、HB ワクチン接種者でも感染成立する HBV エスケープ変異体に着目し、これら変異体Lタンパク質に共通する 2 ヶ所のアミノ酸変異を見出した。本変異 Lタンパク質を有する BNC を、マウスに 4 週間隔で 7 回接種して血清中の抗 BNC 抗体価を解析したところ、過半数のマウスにおいて抗 BNC 抗体の産生が確認されず、生体内免疫系を感作しにくいステルス型 BNC の開発に成功した(鄭ら、投稿中)。また、正常ヒト肝臓組織を腎臓皮下に移植した SCID マウスに蛍光標識 BNC を静脈内投与すると、正常ヒト肝臓組織内部にのみ顕著に集積しており、その他のマウス主要臓器にはほぼ集積しないことが明らかとなった¹²⁾。これは、従来 PEG 修飾により回避してきた RES による捕捉を、BNC は PEG 修飾なしで達成できていることを示しており、最近の筆者らの解析により、pre-S2 領域に存在する重合ヒトアルブミン受容体が、重合マウスアルブミンに対して 10% 程度しか親和性を示さないながらも、BNC 外周に重合マウスアルブミンを提示することにより RES を回避しているためと考えている(高木ら、投稿中)。実際、抗癌剤タキソール包含するヒトアルブミンから構成される直径約 130 nm のナノ粒子であるアブラキサンは、表面に提示されたアルブミンの作用により生体内でのステルス活性を高めている。また、最近筆者らは、pre-S2 領域の重合ヒトアルブミン受容体をコードするペプチドを提示した直径 100 nm のポリスチレンビーズは、尾静脈投与を受けたマウスにおいて、未修飾ポリスチレンビーズよりも RES による肝臓への集積が軽減され、高い血中濃度を維持していた事からも、BNC のステルス化機構において pre-S2 領域の重合ヒトアルブミン受容体が中心的役割を担うと考えている(高木ら、投稿中)。

3.2 バイオナノカプセルを用いた能動的薬剤送達技術

BNC 内部への薬剤封入法として、エレクトロポレーション法（電気穿孔法）とリポソーム融合法を開発している（図 3）。BNC 開発当初は、前者の方法により BNC 内部へ蛍光物質や緑色蛍光タンパク質発現ベクターを封入して、HBV の標的細胞であるヒト肝臓細胞特異的な薬剤及び遺伝子の導入に成功した（図 4-A）¹³⁾。例えば、ヒト肝臓由来腫瘍を背部皮下に有するヌードマウスに、血液凝固因子 IX 遺伝子発現ベクターを封入した BNC を静脈内投与すると、血漿中の血液凝固 IX 因子の濃度が中程度の血友病 B が治療可能なレベルで発現し、その状態を 1 カ月間継続することが示された¹³⁾。また、同マウスに HSV-tk（単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ）遺伝子発現ベクターを封入した BNC を静脈内投与し、その後、同酵素活性阻害剤ガンシクロビルを皮内に設置した浸透圧ポンプにより継続的に

投与すると、ヒト肝臓由来腫瘍特異的に腫瘍の増殖が抑制された¹⁴⁾。しかし本方法は、大量生産には不向きであり、また BNC 同士の融合が観察されたため、新たな方法を種々検討していた。その中で、前項で紹介した BNC が有する HBV 由来膜融合活性に注目し、薬剤を常法により封入したリポソームと BNC を混在させたところ、BNC がリポソーム膜構造と融合して直径約 100 nm の BNC-リポソーム複合体を形成することを見出した（図 3）¹⁵⁾。これは、まさに HBV の Virosome に相当する構造体であり、ホタル由来ルシフェラーゼ発現ベクターを封入した BNC-リポソーム複合体は BNC 単独と同様にヒト肝臓細胞に対する特異性を試験管内及び生体内において示し、試験管内での遺伝子導入能も既存の遺伝子導入用リポソーム（FuGENE6）などを遙かに凌いでいた（図 4-B; 宮部ら, 投稿中）¹⁵⁾。さらに、ヒト肝臓細胞内への取り込み速度も BNC 及び HBV と同程度であることが判明した（曾宮ら, 投稿中）。また、静脈内投与されたリポソーム等のナノキャリ

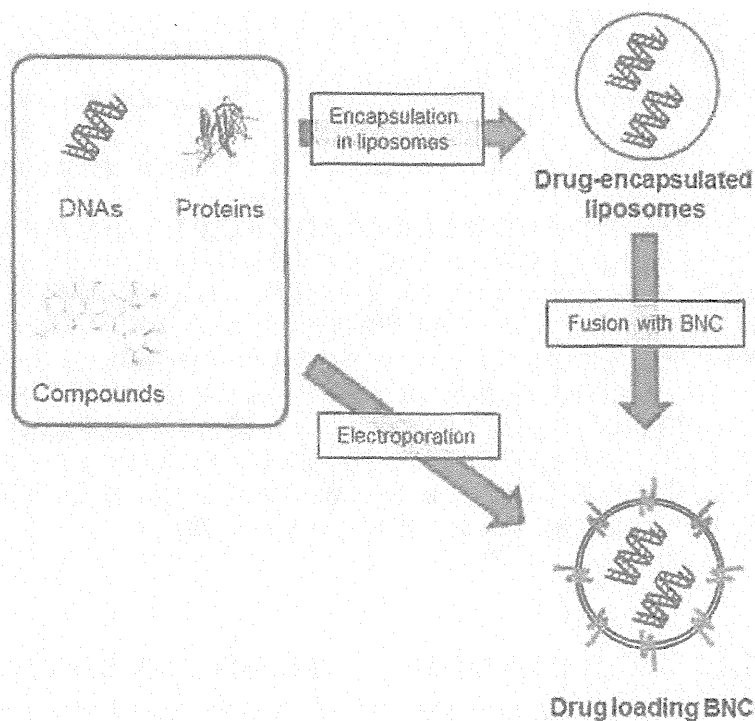


図 3 バイオナノカプセル内部への薬剤搭載法

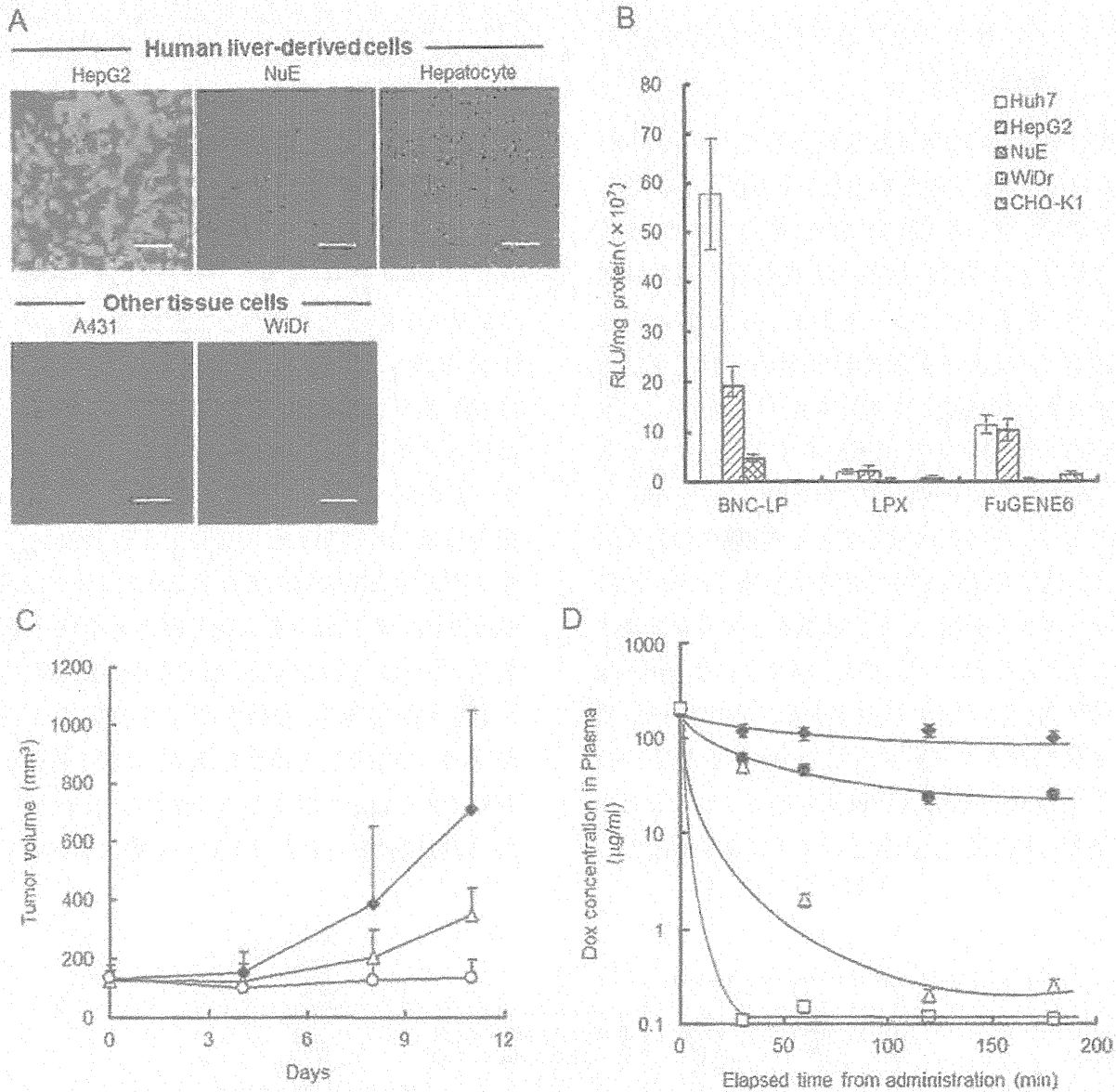


図4 バイオナノカプセルを用いたヒト肝臓細胞特異的な遺伝子及び薬剤の送達。(A) エレクトロポレーション法で緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入した BNC のヒト肝臓細胞特異的な遺伝子導入活性。HepG2, NuE はヒト肝臓由来細胞, Hepatocyte はヒト正常肝臓由来細胞, A431 はヒト扁平上皮癌由来細胞, WiDr はヒト大腸癌由来細胞。(B) ルシフェラーゼ遺伝子を搭載した BNC-リボソーム複合体によるヒト肝臓細胞特異的な遺伝子導入活性。CHO-K1 はチャイニーズハムスター卵母細胞。(C) Dox 封入 BNC-リボソーム複合体によるヌードマウス背部皮下に移植したヒト肝臓由来細胞 (Huh7) 腫瘍の増殖抑制効果。投与量は Dox, 4 mg/kg。Dox 単剤 (△), Dox 封入 BNC-リボソーム (●), 未投与 (◆)。(D) Dox 封入 BNC-リボソーム複合体を投与したヒト肝臓由来細胞 (Huh7) 腫瘍を配布皮下に保持するヌードマウスにおける血漿中 Dox 濃度の経時的推移。投与量は Dox, 4 mg/kg。Dox 単剤 (□), Dox 封入リボソーム (△), Doxil (市販 Dox 封入 PEG 化リボソーム) (◆), Dox 封入 BNC-リボソーム (■)。

アは、血中に存在するオプソニン分子が非特異的に吸着し、主に肝臓内 RES に存在する貪食細胞群に捕捉されるので、通常ナノキャリア表面を

PEG 修飾して生体内ステルス活性を高める。今回、抗癌剤ドキシソルビシン (Dox) を包含したリボソームと BNC の複合体を作製し、ヒト肝臓由来

腫瘍を背部皮下に有するヌードマウスに静脈内投与したところ、同複合体は Dox 単剤や Dox 含有 PEG 化リボソーム製剤 (仲本ら, 投稿中) よりも効果的にヒト肝癌由来腫瘍の増殖を抑制したが (図 4-C)¹⁶⁾。さらに驚くことに、BNC-リボソーム複合体は PEG 修飾を行っていないにもかかわらず、PEG 化リボソーム製剤とほぼ同等の血液中 Dox 濃度を維持する能力が見出された (図 4-D)¹⁶⁾。本結果は、前述した BNC の pre-S2 領域に存在する重合ヒトアルブミン受容体によるステルス活性が複合体全体の体内動態を改善したためと推察された。以上から、BNC-リボソーム複合体は、従来の Virosome とは大きく異なり、HBV 由来の (1) RES 等の生体内異物排除系からの回避機構、(2) 免疫系からの回避機構、(3) 宿主・組織・細胞に対する厳密な特異的感染能、(4) 生体膜との融合活性に基づく細胞内侵入機構 (エンドソーム等の細胞小器官からの脱出機構も含む) を、非ウイルス性ナノキャリアであるリボソームに付与したと考えている。

3.3 バイオナノカプセルの再標的化技術

ここまでは BNC 及び BNC-リボソーム複合体を用いたヒト肝臓特異的な能動的標的化 DDS 技

術を紹介してきたが、肝臓以外の臓器および細胞を標的とする DDS 技術への応用は、BNC というハイブリッドナノキャリアの可能性を広げ、今後の DDS 発展に大きく寄与するものである。そこで、筆者らは L タンパク質の pre-S1 領域に存在するヒト肝臓細胞特異的受容体を、他の臓器や細胞と親和性を有する分子に置換することで、新たな標的的特異性を付与できると考えた。

まず、非ウイルス性ナノキャリアに標的的特異性を付与するために、生体内で優れた分子認識能を示す抗体を搭載する方法が広く用いられており、優れた実績を挙げていることから、筆者らも同様に BNC 表面へ抗体を搭載した。具体的には、ヒト肝臓細胞特異的受容体を含む pre-S1 領域の一部を黄色ブドウ球菌 Protein A 由来 IgG Fc 領域結合ドメイン (Z ドメイン) の二量体で置換した BNC (ZZ-BNC; ZZ ドメイン提示型 BNC) を作製した (図 5)。この時、BNC の細胞内侵入に必要と考えられる pre-S1 領域の N 末端部分に存在する膜透過領域は残存させた。ZZ-BNC は、様々な動物種に由来する IgG に結合性を示し、最も高い親和性を示すマウス IgG3 の場合 ZZ-BNC 1 粒子あたり約 56 分子の提示が可能であった¹⁷⁾。本 ZZ-BNC は、IgG Fc 領域を確実に固定するた

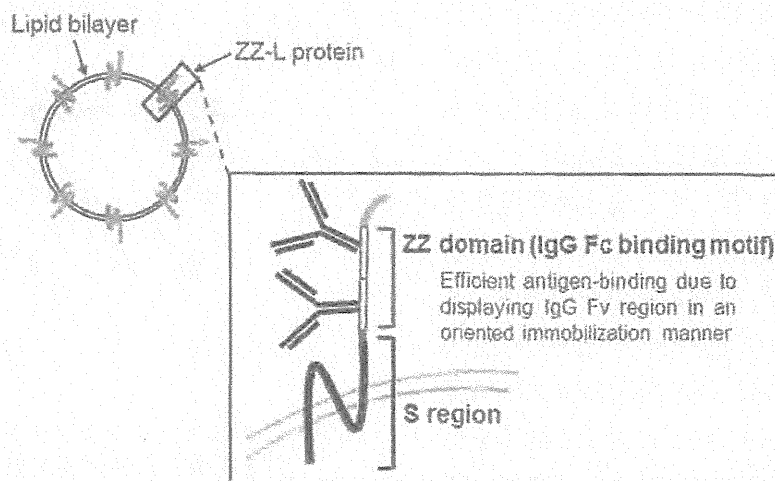


図 5 標的化のためのバイオナノカプセル (ZZ-BNC) の粒子構造