

gene	gi No.	HuH6	HB611
hox transcript antisense RNA	10939596	235.7	0.7
EST*	5863388	1128.8	1.4
plastin 3	7549808	1398.5	2.1
transmembrane channel like 5	13417048	3166.5	4.8
kelch-like	9511250	1970.7	9.2
Wntless homolog	2835015	10967.0	55.9

**Table 1. Genes extremely highly expressed in HuH6.**

\* is a transcript identified as an expression sequence tag (EST). Gene name and its gi number are shown on the left two columns. The values represent signal intensity detected in this analysis.

gene	gi No.	HuH6	HB611
CD24	180167	77.5	7083.8
gremlin-1	10863087	2.0	1136.2
steroid sulfatase (micro-somal) isozyme S	3538520	3.7	4229.7
steroid sulfatase (micro-somal) isozyme S*	13162281	7.7	1179.1
microsomal triglyceride transfer protein	4648246	6.3	1855.5
fatty acid binding protein	4557584	41.4	22460.8
lysyl oxidase	4505008	7.3	1696.3
PDGFR- $\alpha$	5453869	7.7	1297.9
myc (N-myc related)	12803748	6.8	1495.5

Table 2. Genes extremely highly expressed in HB611.

\* is another gene of steroid sulfatase (microsomal) isozyme S. Gene name and its gi number are shown on the left two columns. The values represent signal intensity detected in this analysis.

# HB611 system

the integrated HBV genome

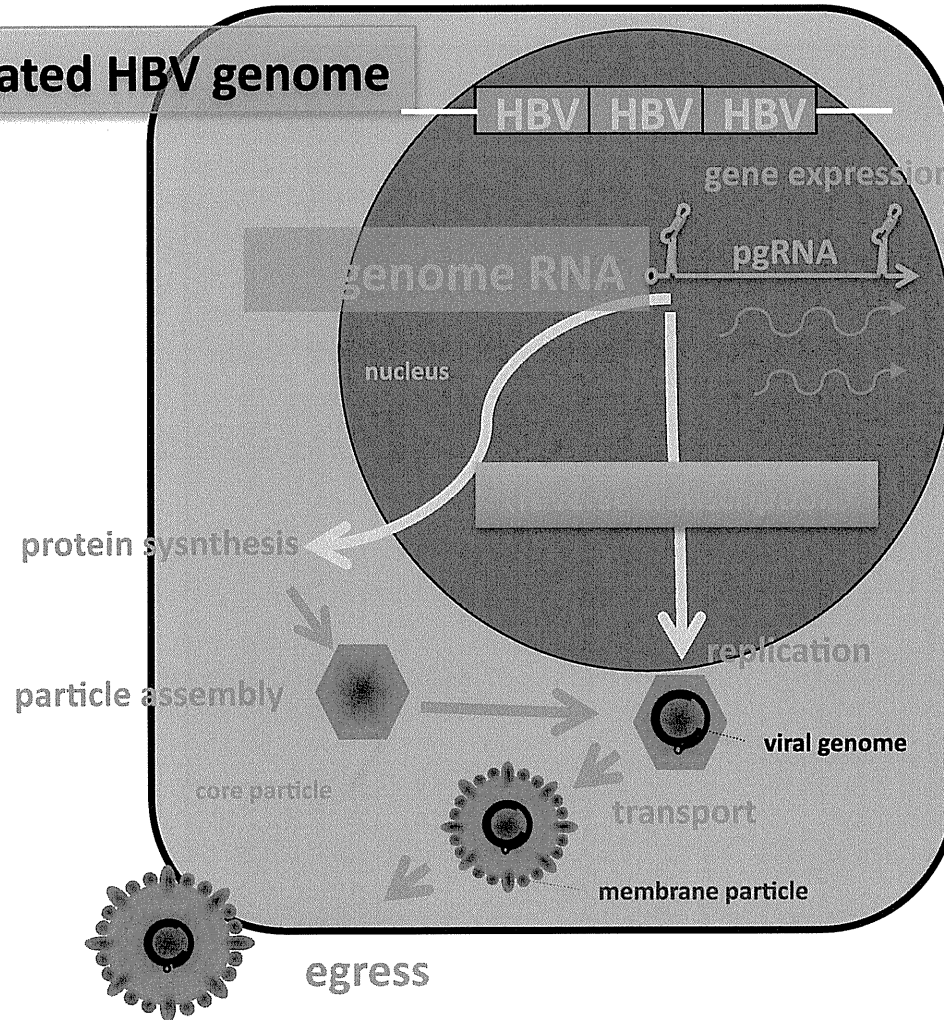


Fig. 1. HB611 system. In HB611 cells three tandemly arranged HBV genomes are integrated in the host chromosome. Viral genes including pregenome RNA (pgRNA) are transcribed from the genome. The viral genome is synthesized through reverse transcription pathway while packaging into core particle.

# HBV life cycle

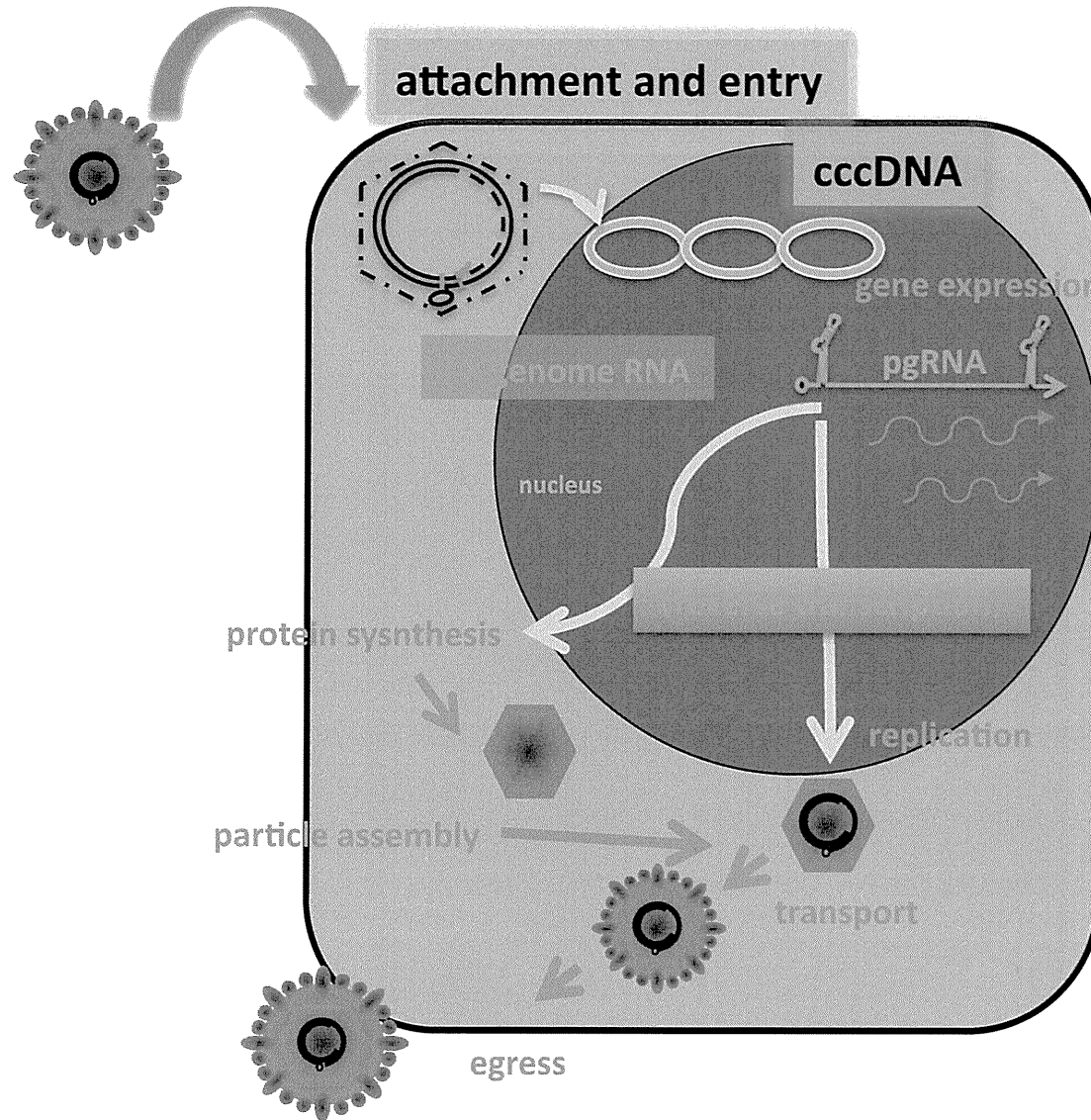
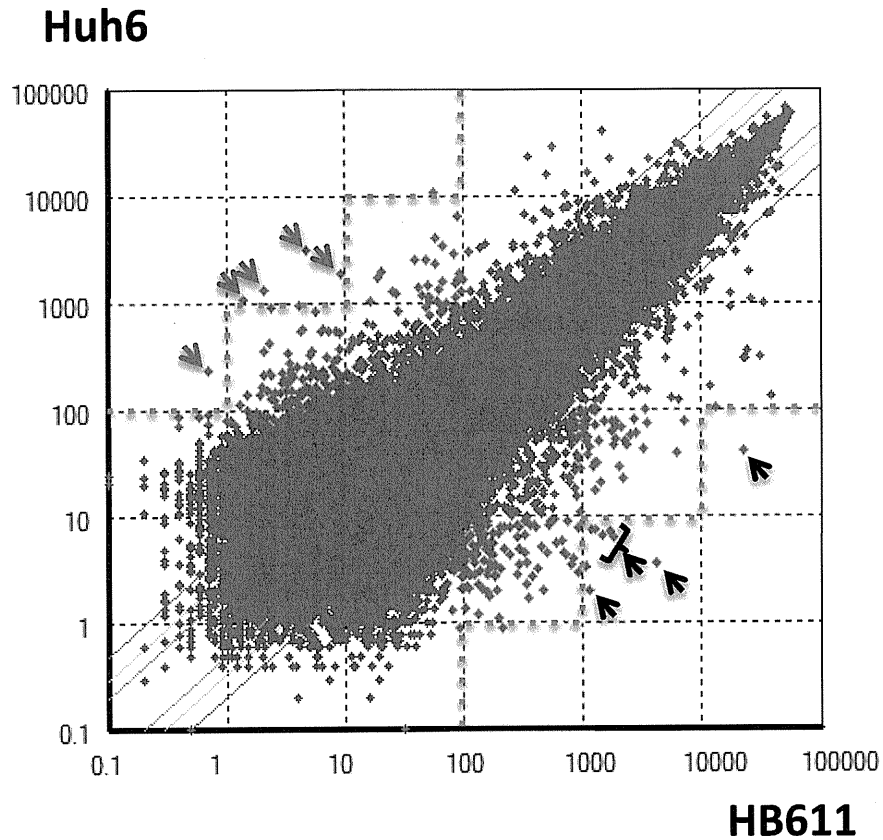
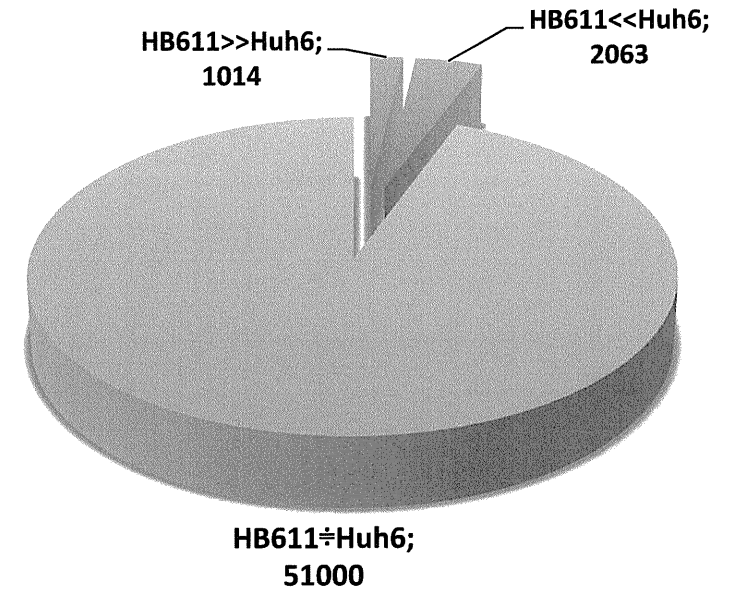


Fig. 2. Natural HBV life cycle. In the natural infection course of HBV, the viral genome is not integrated into the host genome. The partially double stranded DNA genome is converted to covalently closed circular DNA, which is maintained in the infected cell nucleus and produces viral related transcripts including pgRNA. The pathway after this is the same as shown in Fig. 1.

A



B



**Fig. 3.** Gene expression profile of HB611 and its parental HuH6 cells. A. Scatter plot analysis of expressed genes in HB611 and HuH6 cells. Orange dotted lines shows the boundary of extreme difference in expression level more than one hundred. Arrows represent picked-up genes that show extreme difference in expression. B. Pie chart of the gene expression profile. The light blue zone represents highly expressed genes in HB611 more than eight times and light red section represents highly expressed genes in HuH6 more than eight times.

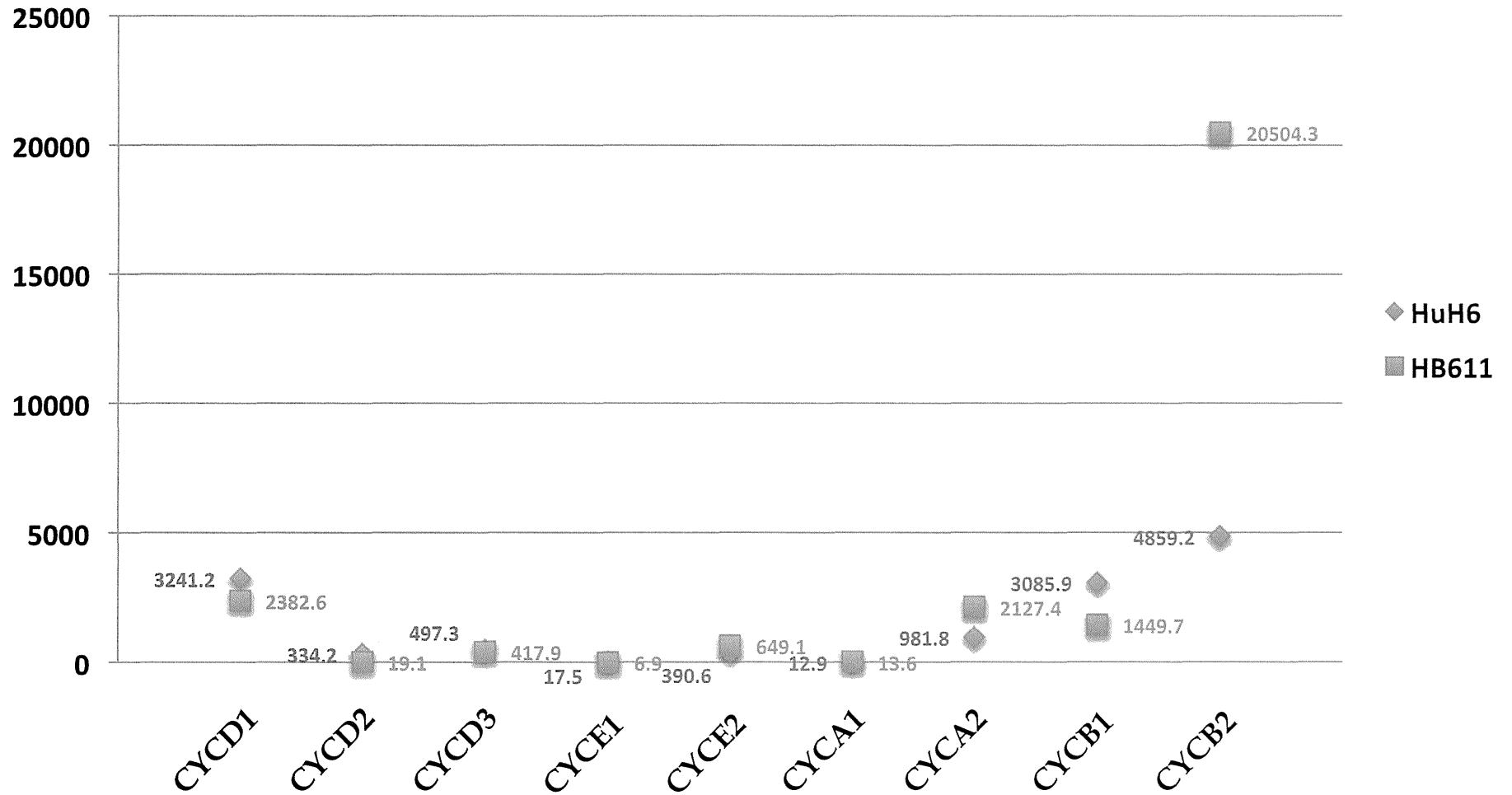


Fig. 4. Expression level of cell cycle control genes. The values represent signal strength in the DNA microarray analysis. Orange figures shown on the right of the marker represent the value for HB611 cells and the blue ones on the left for HuH6.

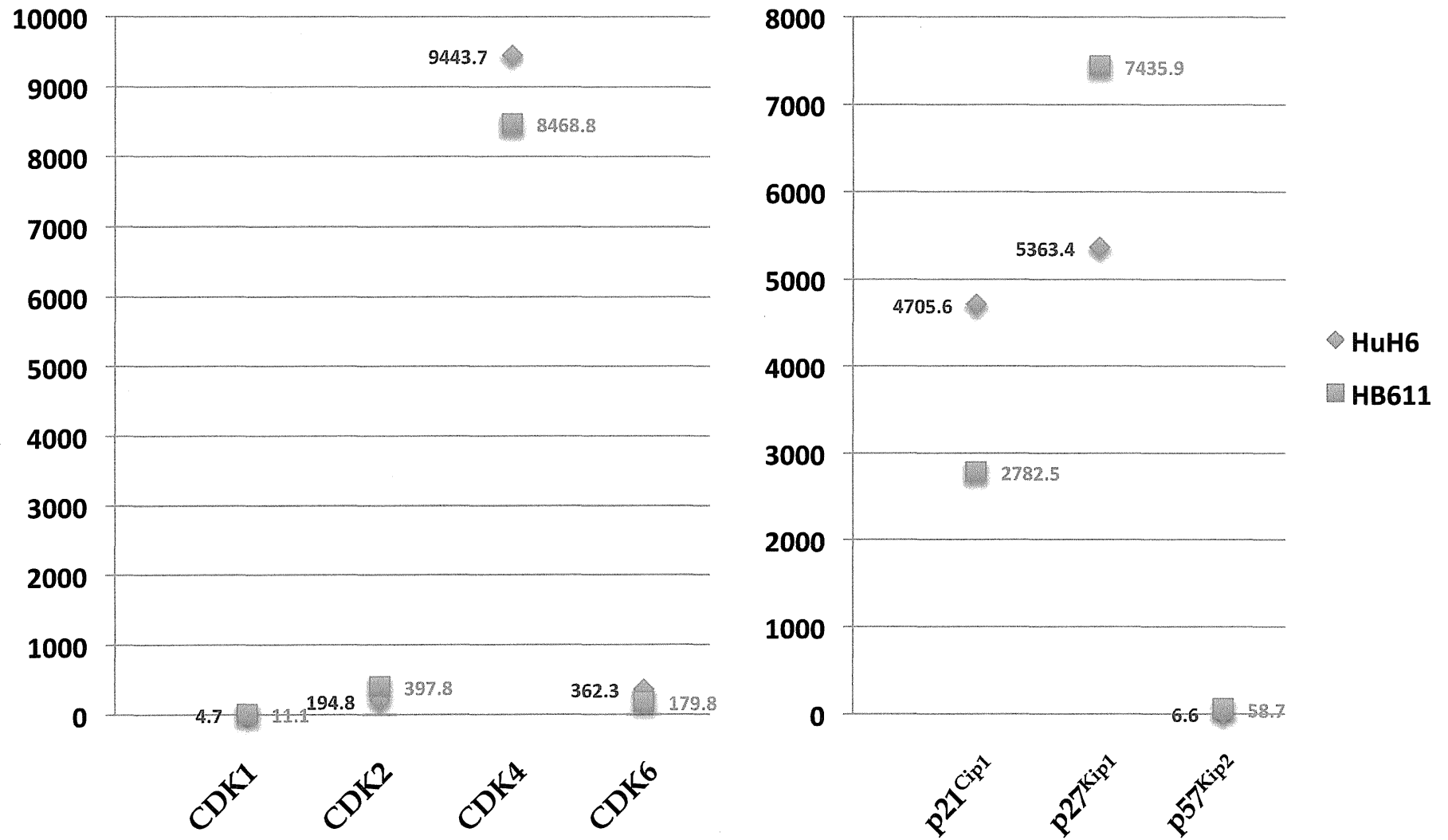


Fig. 5. Expression level of cyclin dependent kinases (CDKs) (left) and cyclin dependent kinase inhibitors (CKIs) (right). Orange figures shown on the right of the marker represent the value for HB611 cells and the blue ones on the left for HuH6.

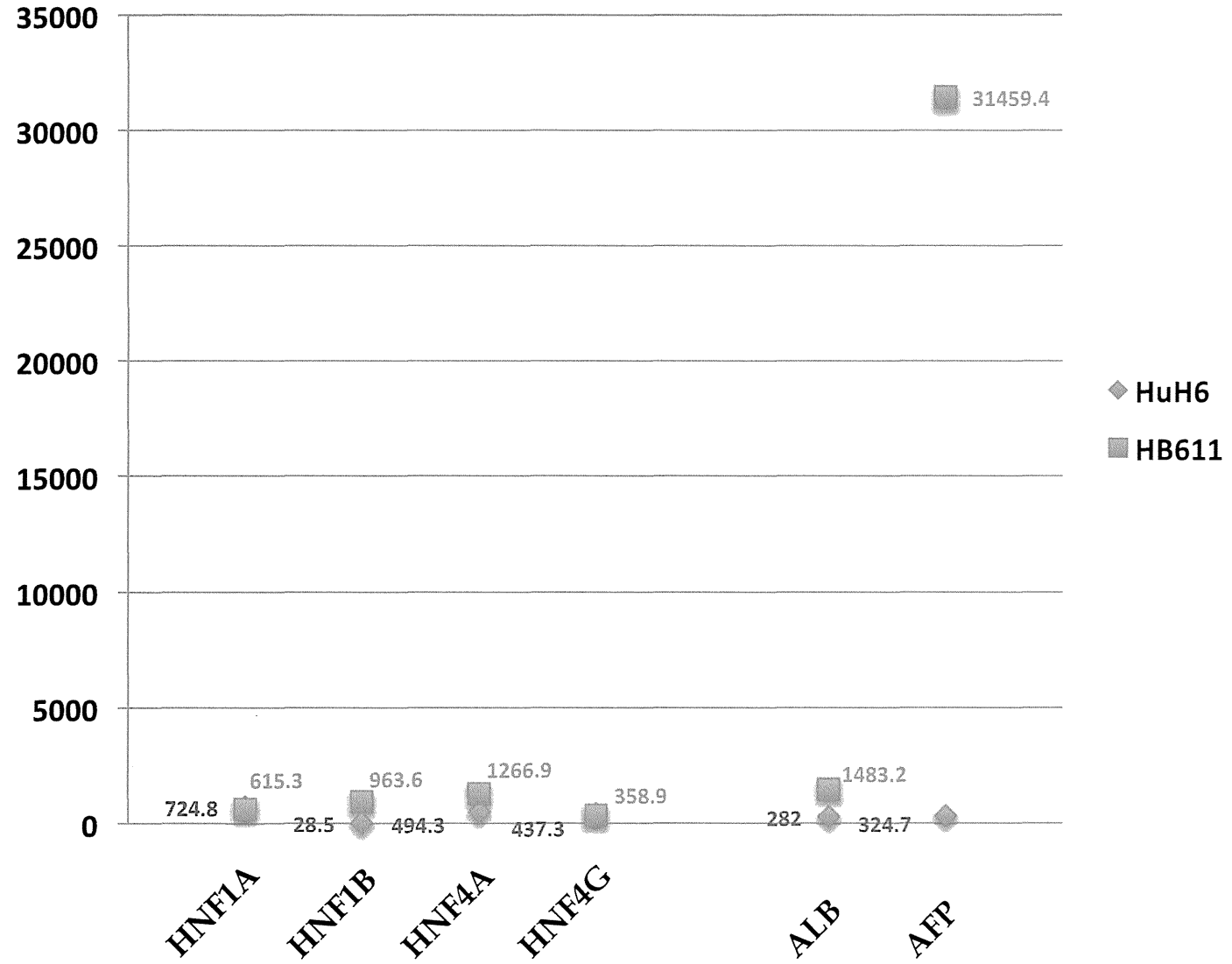


Fig. 6. Expression level of liver specific genes. Orange figures shown on the right of the marker represent the value for HB611 cells and the blue ones on the left for HuH6.



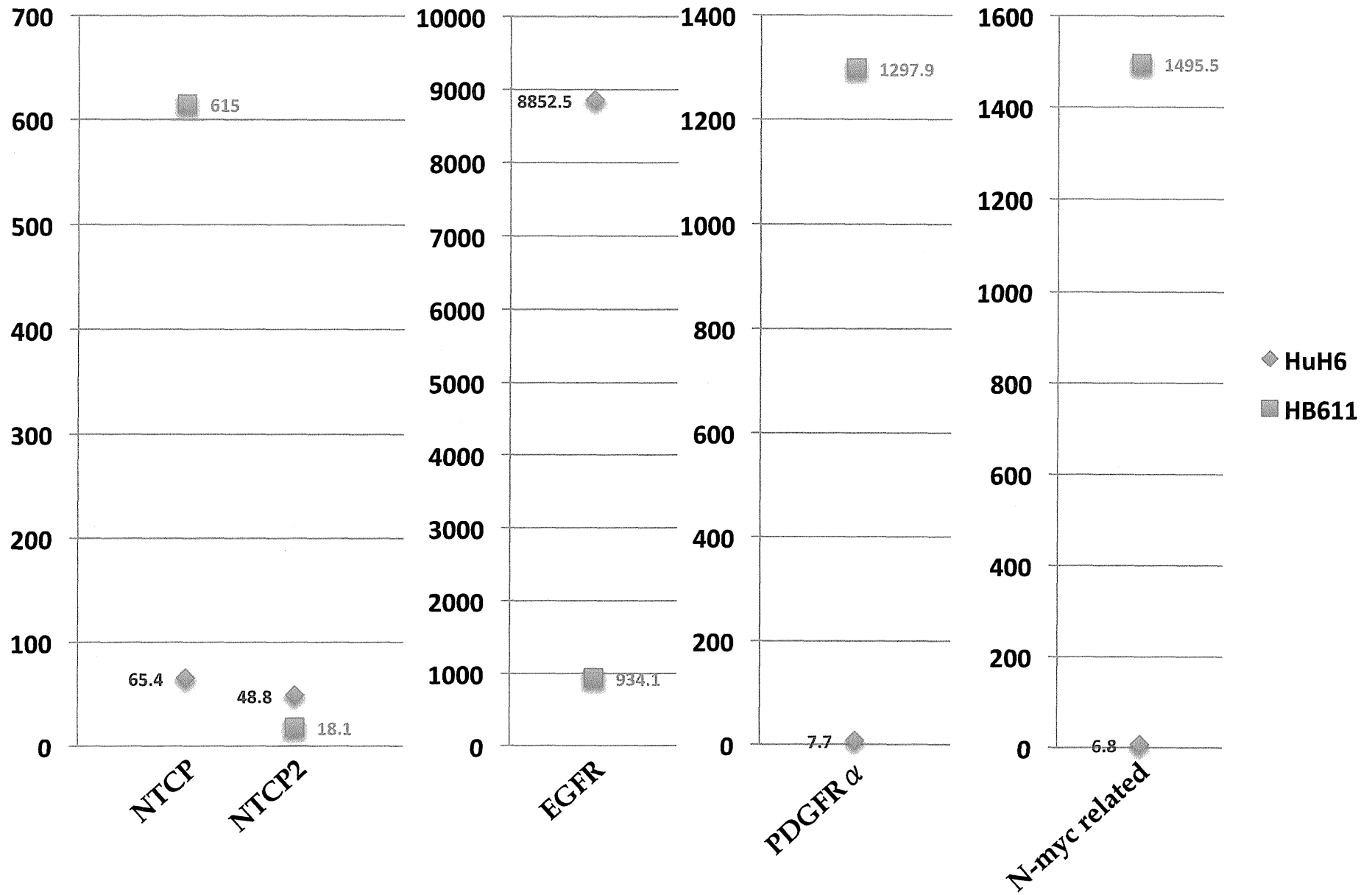
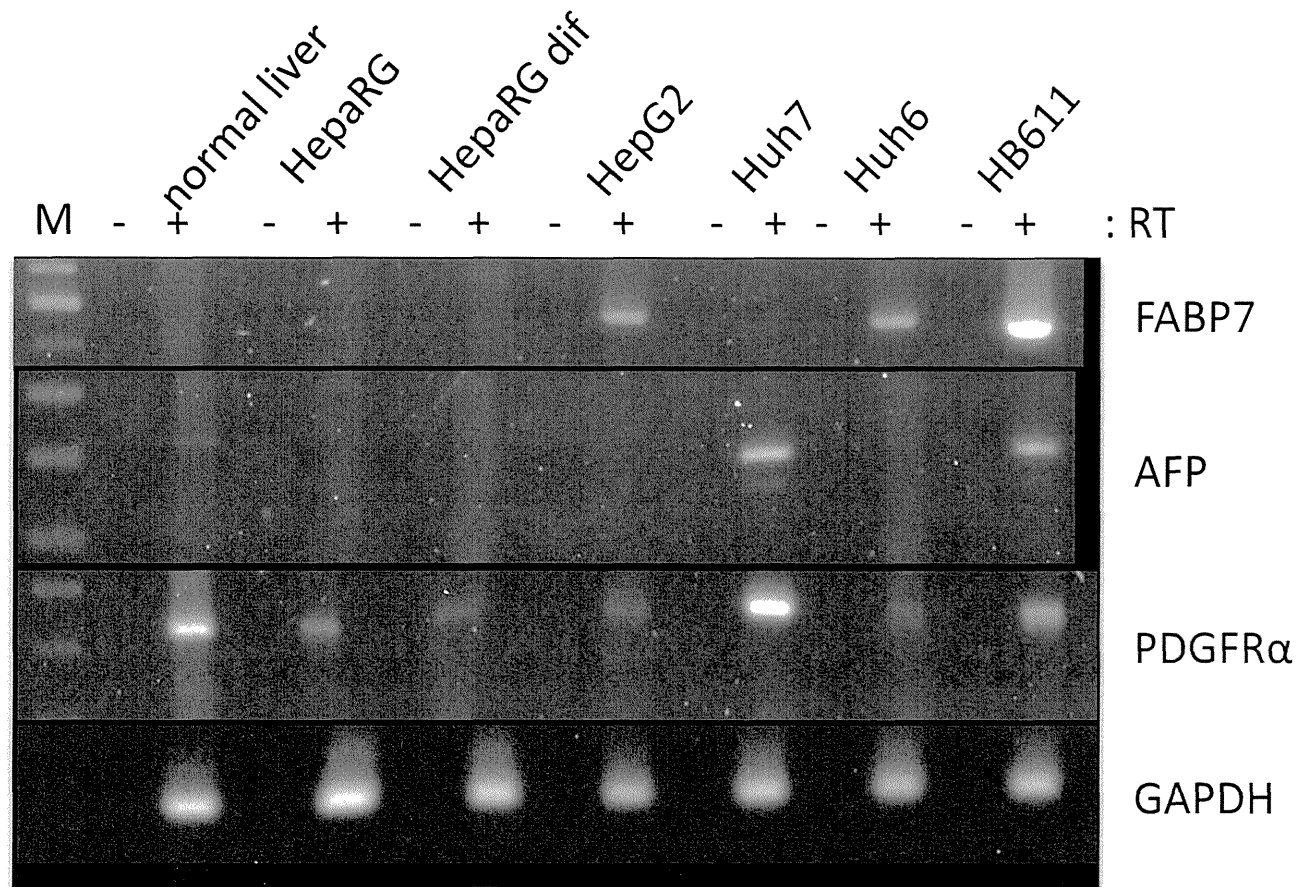


Fig. 7. Expression level of NTCPs and typical growth related genes. Orange figures shown on the right of the marker represent the value for HB611 cells and the blue ones on the left for HuH6.



**Fig. 8.** RT-PCR of RNA extracted from several hepatocellular carcinoma cells. Typical genes which showed much difference in the expression level were tested with RT-PCR, including GAPDH as a control for RNA preparation and expression.

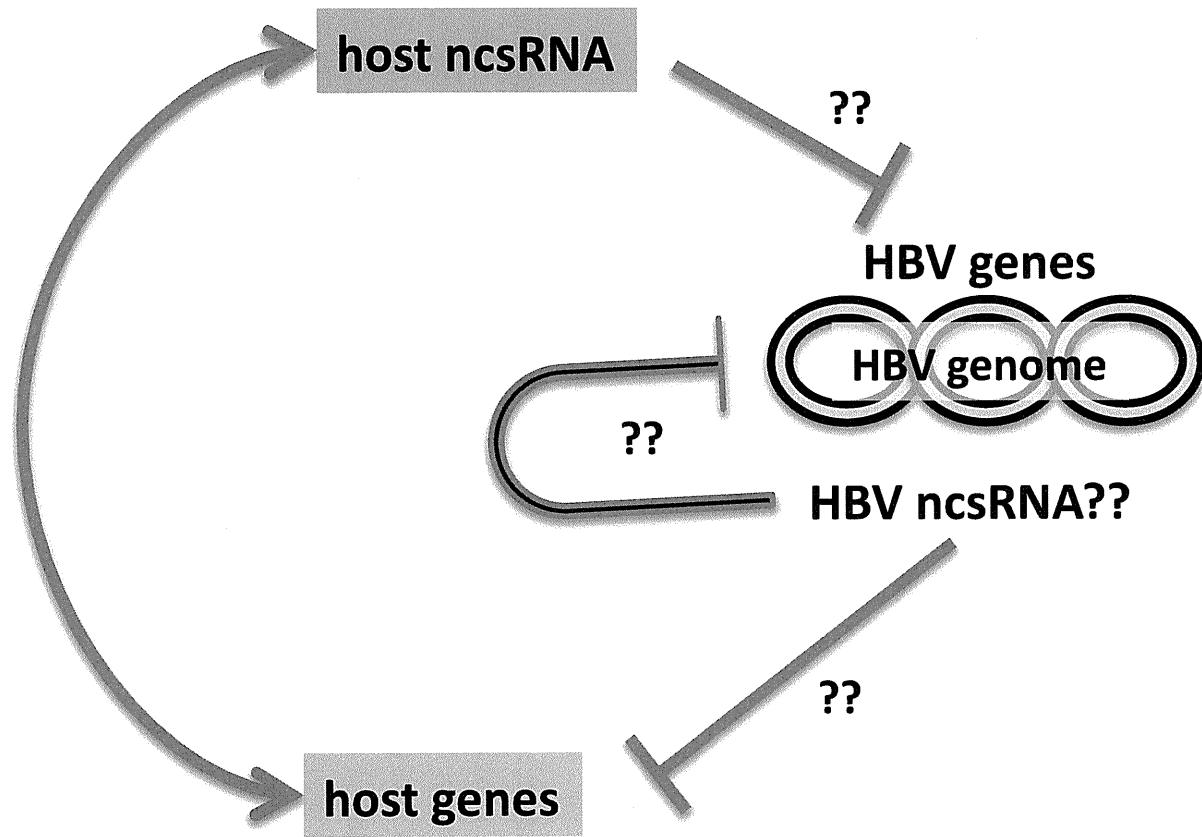


Fig. 9. Non-coding viral RNA could be expressed from the HBV genome and affects cellular gene expression program as well as the viral one.

## 第9節 DDS ナノキャリア・バイオナノカプセルによるバイオイメーjing

はじめに

疾患部位を正しく標的化できる分子プローブは、生体内で非侵襲的にリアルタイムでプローブ分子の挙動を追うことができるので、疾患部位の状況を患者負担少なく精密に把握できるツールである。このような分子プローブの一つにウイルスを模倣した中空ナノ粒子 (virosome) がある<sup>1)</sup>。Virosome はウイルスエンベロープタンパク質がリポソームに埋め込まれた構造をとり、生体内で標的臓器を細胞レベルで検出でき、かつウイルスゲノムを含まない安全な薬剤送達システム (drug delivery system; DDS) ナノキャリアの原型として提唱された。我々の開発する非ウイルス性 DDS ナノキャリア、バイオナノカプセル (BNC: bio-nanocapsule) は<sup>2)</sup>、ヒト B 型肝炎ウイルス (HBV: hepatitis B virus) から着想を得た virosome の一種であり、生体内異物排除システムを巧妙にすり抜け、標的組織に能動的に到達でき、さらに自身の有する膜融合活性により積極的に細胞内へ侵入できる次世代のナノ医療技術を支える DDS ナノキャリアになる可能性が高まってきている。本稿では、BNC を用いる DDS 実験を通じて、生体内および細胞内イメージングの実際を紹介し、今後の医療・研究のバイオイメーjing領域に与えるインパクトについて考察する。

### 1. HBV と BNC

我々が開発する BNC の外観は HBV ビリオンと酷似しているが、BNC 内部は中空であることから様々な薬剤や核酸を封入できる。本段落では HBV と BNC の構造と機能について述べる。

#### 1.1 構造

HBV は外殻 (脂質 2 重膜エンベロープと膜タンパク質) と内殻 (コアタンパク質) を有し、部分的二本鎖 DNA をゲノムとしてもつ直径 42 nm 程のヘパドナウイルス科の球状ウイルスである (図 1)。その膜タンパク質 (HBV surface antigen: HBsAg) は、N アミノ末端側から pre-S1 領域 (108 aa (血清型 y)), pre-S2 領域 (55 aa), および S 領域 (226 aa) 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<sup>3)</sup>。BNC は、鶏リゾチーム由来分泌シグナルを N アミノ末端側に付加した L タンパク質を出芽酵母で発現して得られるコアタンパク質およびウイルスゲノムフリーの直径 70 nm 程の中空ナノ粒子であり、出芽酵母由来プロテアーゼによる分解を抑制するためプロテアーゼの標的アミノ酸である L タンパク質 156 残基目のアルギニンを遺伝子工学的的手法により欠失してある<sup>4)</sup>。BNC 1 粒子は約 110 個の L タンパク質と酵母小胞体膜由来リポソームから構成される。当初 BNC は免疫賦活化能の高い B 型肝炎ワクチンとして開発されたが<sup>5,6)</sup>、その内部に薬剤や治療遺伝子を封入できることから、効果的なヒト肝特異的 DDS ナノキャリアとして極めて高い有用性が見出された<sup>2)</sup>。このように BNC の研究開発を進める中、DDS ナノキャリアとしての BNC は粒子自体のもつ免疫原性を低くする必要があった。一方、これまでに同定された HBV の中にはヒト免疫系を掻い潜り、B 型肝炎ワクチンの効果が出ない免疫エスケープ

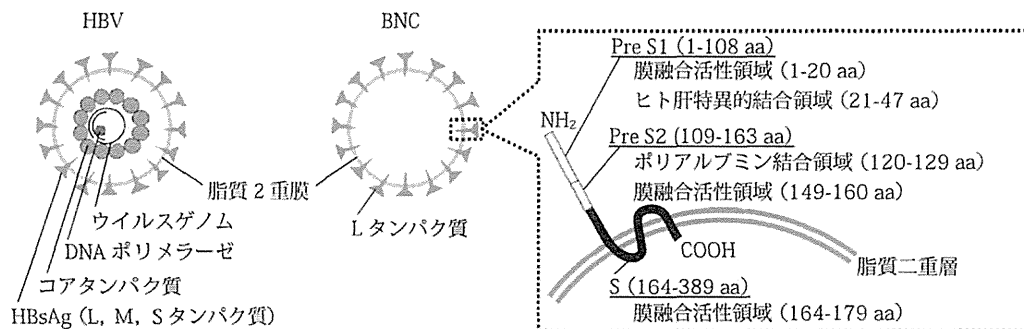


図 1 HBV と BNC

変異体があることに注目し、これら遺伝子配列のアラインメントから見出される共通変異アミノ酸部位2カ所に同変異を導入した低免疫原性BNC (stealth BNC) を現在では主に活用している<sup>7)</sup>。

## 1.2 機能

HBVは血液あるいは体液を介してヒトに感染し、生体内において極微量(10ゲノムコピー以下)でも肝臓へ辿り着き、肝実質細胞内部に侵入後、長期間同細胞内に潜伏してB型肝炎を惹き起こす。このウイルスは、1) 外来分子を濾過して除去する生体内の異物排除系(細網内皮系, reticuloendothelial system: RES)<sup>8)</sup> 回避する能力, 2) 免疫系を回避する能力, 3) 特定臓器・組織・細胞に対する能動的な標的化能力, 4) 細胞内への積極的な侵入能力, 5) 細胞内異物排除系であるエンドソームからの脱出する能力, 6) さらに核内へ積極的に移行する能力を有しており、これらの能力はDDSナノキャリアに必須である。現状、BNCは6) 核内移行を除く全ての能力を有しており<sup>9)</sup>、それらを支えるBNCの分子機構に関する解析も進んでいる。具体的には、BNCの肝標的化能は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<sup>10)</sup>(図1)、まず肝細胞表面の低親和性受容体と相互作用し、高親和性受容体へリレーされて発揮されると予測されている<sup>11,12)</sup>。この結合を経て同領域(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<sup>13,14)</sup>。さらにpre-S2領域は、ポリアルブミンと結合する部位(poly-albumin receptor; PAR)を有し<sup>15)</sup>、血液中でアル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)。

## 2. BNCの生産

Lタンパク質を出芽酵母内で発現すると、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。このように酵母内で生合成されるBNCは、承認済み遺伝子組み換え酵母由来B型肝炎ワクチンと基本的に同じ構造をもち、GMP(good manufacturing practice)準拠の医薬品として大量生産できる<sup>6,16)</sup>。我々はお出芽酵母を用いてBNCを発現してカラム精製を行っているが、酵母の全可溶性タンパク質の40%以上がLタンパク質であり、酵母培養液1Lから精製BNCを再現性良く10mg以上取得できている。BNCは熱と乾燥に対して非常に安定であり、70°Cで1時間加熱しても機能は損なわれず、凍結乾燥により4°Cで14ヶ月以上保管でき、滅菌水を添加することにより容易に水和して元の性状へと復帰できる。BNCの精製後および凍結乾燥からの復帰後の平均的な粒子特性は、いずれの場合も粒子径約70nm、 $\zeta$ 電位約-20mV、PDI(polydispersity index, 分散体の粒径分布を定義する指数で0に近い程均一な粒子であることを示す)0.1~0.2を維持し、粒子径と負の表面電荷は共にRESを回避する要件を満たし、その均一性からもDDSキャリアとしてまた分子プローブとして素直な物性と考えられる。BNC表層に提示されたLタンパク質には3箇所のリジン残基が含まれており、いずれも粒子の外側に存在すると予測される。従ってBNCの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、蛍光色素分子等を容易に標識することができる。

## 3. BNCを用いる能動的薬剤送達と生体内イメージング

生体内分子プローブとしてナノキャリアを活用するための必須条件として、1) 時間を要せず簡便に高い収率で生産でき、2) 強いシグナルを発し、3) 血中滞留性が長く長時間観察でき、4) 標的臓器に特異的に到達でき、5) 標的部以外には行かず、6) 安全性が高いこと等が挙げられる。BNCは上述の通り、これらの条件の内、1および3~6を既に満たしており、また2についても、NHS架橋を利用すればBNC1粒子には理論的に少なくとも100分子以上(1粒子あたりLタンパク質110分子、Lタンパク質1分子あたり3つのリジン残基)の蛍光色素分子等を付加できることから、強いシグナル強度が得られると考えられる。従ってBNCは分子プローブおよびDDSナノキャリアに求められる要件をほぼ満足する稀有なナノ粒子と考えられる。

### 3.1 BNC 内部への直接的な薬剤封入

BNC 内部への薬物封入は当初、電気穿孔法により行っていた (図 2)<sup>2)</sup>。GFP (green fluorescence protein) 発現遺伝子や蛍光色素分子カルセインなどを同法により BNC 内に導入し、*in vitro* および *in vivo* で肝癌細胞や組織特異的に遺伝子導入や薬剤導入ができた。これら BNC の *in vivo* における安定性は高く、1 回の投与で 1 ヶ月にわたる導入遺伝子発現が確認できた<sup>2)</sup>。また抗癌剤用 DDS ナノキャリアとしての能力も高く、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) を用いた抗癌モデル実験では、ヒト肝癌担癌マウスに予め HSV-tk 発現遺伝子を封入する BNC を尾静脈投与しておき、その後の GCV の皮下投与により顕著な抗腫瘍効果を観察した<sup>17)</sup>。

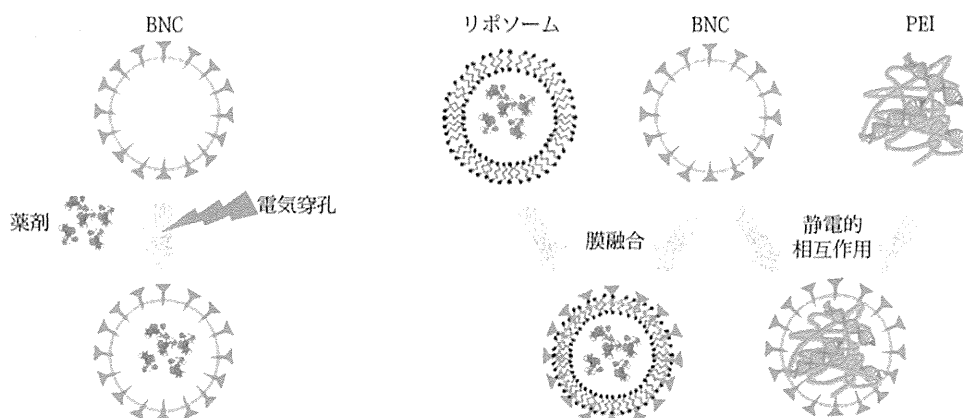


図 2 BNC 内部への薬剤・核酸封入法

### 3.2 BNC とリポソームの融合

電気穿孔法は根本的に GMP 基準での大量生産の観点から不利であり、より簡便で生産性の高い薬剤封入法が必要と考えられた。一方、薬剤封入に適したナノ粒子としてリポソームがあり、それ自体には組織特異性はないものの、薬剤や核酸を封入できて大量生産が容易である。しかしリポソームをそのまま生体内に投与すると、RES や補体因子により急速に排除される。近年ではアニオン性リポソーム表面を 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が<sup>18)</sup>、PEG 抗体による ABC (accelerated blood clearance) 効果による連続投与の困難化も指摘されている<sup>19,20)</sup>。我々は BNC のもつ膜融合活性に注目し、リポソームと BNC との融合を試みた。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ことが判明し (図 2)<sup>21)</sup>、この複合体が BNC 由来の RES 回避能力を発揮すると期待されたので、後述する薬物・遺伝子送達 (DDS/GDS) 実験を行った。

#### 3.2.1 カチオン性リポソームとの融合

遺伝子送達で汎用されるカチオン性リポソームと BNC を融合させ、BNC-リポソーム-遺伝子複合体 (BNC-Lipoplex) の大量調製を行った<sup>21)</sup>。BNC-Lipoplex は弱負電荷に帯電し、BNC の対リポソーム重量比が 5% 程度でも *in vitro* において肝細胞特異性を保持し、Lipoplex 単独に比べて飛躍的な遺伝子導入効率を示した。このように、元来細胞特異性をもたないカチオン性 Lipoplex に BNC は細胞標的化能および細胞内侵入能を付与することができた。

#### 3.2.2 アニオン性リポソームとの融合

薬剤等の封入に適したアニオン性リポソームと BNC とを融合させる方法を開発した。現在承認済みの PEG 化アニオン性リポソームとして doxorubicin を内包する Doxil<sup>TM</sup> があるが、BNC-リポソーム-doxorubicin 複合体 (BNC-Lp/Dox) を作製した比較したところ、BNC-Lp/Dox の血中滞留性は Doxil<sup>TM</sup> に匹敵し、BNC 由来の RES 回避能を発揮した。さら

に、Doxil™より高濃度かつ長時間腫瘍内に留まり、doxorubicin 単体やLp/Doxよりも低薬剤量（4 mg/kg）で高い抗腫瘍増殖抑制効果を示した<sup>22)</sup>。Doxil™は、癌組織周辺は血管形成が未熟で薬剤が透過・滞留しやすくEPR（enhanced permeation and retention）効果<sup>23)</sup>を利用した受動的標的化DDSキャリアであるが、BNCはDoxil™相当の薬剤の受動的標的化に加えて能動的標的化能および細胞内侵入能を付与すると考えられた。

### 3.3 BNCとカチオン性ポリマーとの複合体

遺伝子送達システム（GDS）にはカチオン性ポリマーも活用される（図2）。負電荷の遺伝子と複合体を形成することから、受動的標的型GDSナノキャリアとして主に用いられているが、その強い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示し、血中クリアランスが早いという欠点がある。代表的なものにPEI（poly-ethylene imine）があるが、生体内への単体投与では肺に集積する一方、細胞と非特異的に結合することからオフターゲット（標的部位以外への送達）回避は困難である<sup>24)</sup>。我々は、蛍光標識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（BNC-polyplex）を作製したところ、*in vitro*および*in vivo*においてヒト肝癌由来細胞に集積することを観察し、肝癌組織特異的な遺伝子導入活性を示すことを見出した（図3）<sup>25)</sup>。以上よりBNC-PEI複合体は、元来PEIの標的組織ではない肝癌への再標的化能を付与し、PEIの肺への集積性をある程度抑制した。

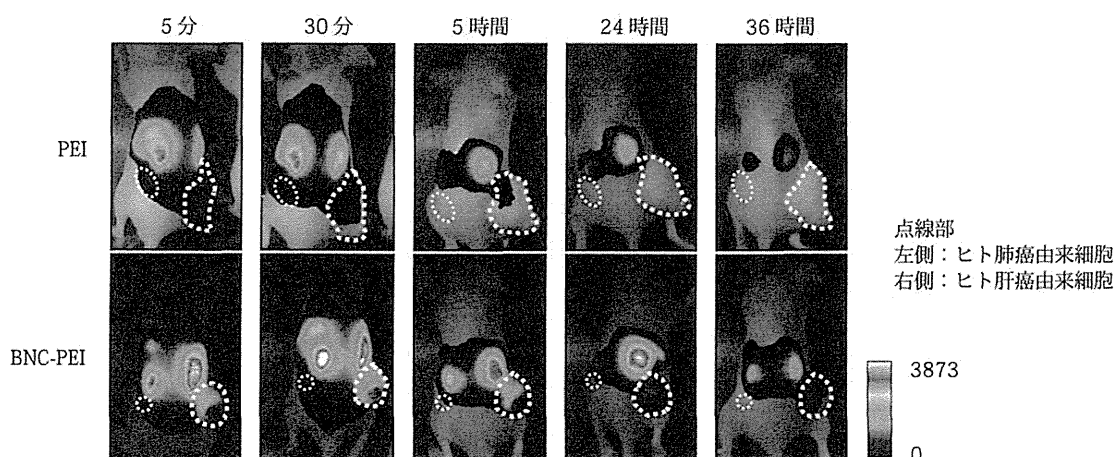


図3 BNC-Polyplexを用いたヒト肝癌組織特異的遺伝子送達

※カラーの図は巻頭ページ参照

## 4. BNCの再標的化

ヒト肝特異性を改変した再標的化BNCの開発も進めている。当初はBNCのpre-S1領域に含まれるヒト肝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）に置換するといったコンセプトに基づき、上皮成長因子（EGF）受容体を標的分子とするpre-S1とpre-S2領域をEGFに置換したEGF提示型BCNを作製した<sup>2)</sup>。EGF提示型BNCは*in vitro*においてヒト肝癌由来細胞への特異性が無くなり、EGF受容体を著量発現する扁平上皮癌由来A431細胞への特異性を示した。しかしその生産面においては、出芽酵母内でのBNC粒子の形成過程が著しく阻害されると判明し、生産性は激減するという問題が生じた。そこで、再標的化用分子として汎用性の高い抗体に特化したBNC、ZZ-BNCを作製した<sup>22)</sup>。これはBNCのpre-S1から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領域に置換した改変型BNCである（図4）。幸いな事に、ZZ-BNC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ZZ-BNCはHBVのヒト肝臓細胞内部への侵入過程で重要な役割を担うpre-S1領域の膜融合活性領域（N末端側20 aa）を保持しており、BNC同様にリポソームとの融合もできる。ZZ-BNCは抗原認識

部位 (Fv 領域) を粒子表面に整列化し、アビディティを飛躍的に高めることが証明されており<sup>26)</sup>、抗体分子を標的化分子として使用する能動的標的型 DDS ナノキャリアの中でも突出する能力を有する。

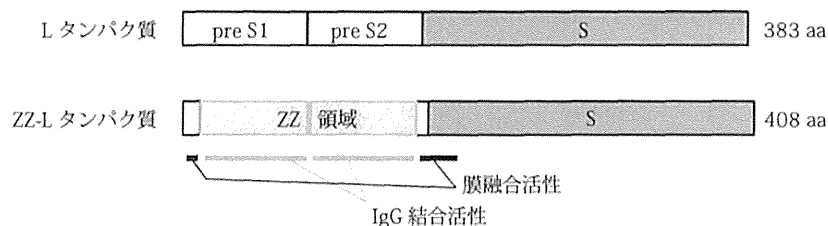


図4 ZZ-BNCのZ領域置換型Lタンパク質

#### 4.1 ZZ-BNC を用いる標的癌組織のイメージング

抗 EGFR 抗体提示型 ZZ-BNC をグリオーマの同所移植モデルマウスに脳内投与すると、グリオーマのみに ZZ-BNC の蓄積が観察された<sup>27)</sup>。また、ブドウ膜炎 (網膜)、リウマチ (足関節)、心筋梗塞 (心臓) を示す各炎症モデルマウスへ、炎症部位の血管内皮細胞に発現誘導される E セレクチンの抗体を提示する ZZ-BNC を静脈投与し、*in vivo* イメージングに供したところ、各炎症組織への ZZ-BNC の集積が観察された (鄭ら、投稿中)。さらに、ZZ-BNC 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、NHS を介して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。例えば、悪性腫瘍に高頻度で見られる糖鎖構造の  $\beta$ 1-6GlcNac を認識する PHA-L4 レクチンを提示した ZZ-BNC は、*in vitro* と *in vivo* の両方で悪性腫瘍細胞や組織へ効率よく集積し<sup>28)</sup>、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)<sup>29,30)</sup> を提示した ZZ-BNC は、ヒト乳癌細胞由来組織の担癌マウスにおいて、蛍光物質や GFP 発現遺伝子を送達した。

#### 4.2 ZZ-BNC による標的細胞のイメージング

ZZ-BNC は抗体等の標的化分子を提示することにより幅広い種類の組織を標的化できることが分かったが、さらに、生体内において細胞レベルで能動的に抗原を送達するシステムに注目した。具体的には免疫司令塔細胞である樹状細胞 (dendritic cells ; DC) への効果的な抗原送達システムの開発である。DC 細胞特異的表面抗原 CD11c を認識する抗体を提示した ZZ-BNC は *in vivo* において DC に富む脾臓へ集積し (図 5)、また 1 細胞解析により DC 特異的に結合して細胞内部に侵入すると判明した<sup>31)</sup>。また、カチオン性リポソームと日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus ;

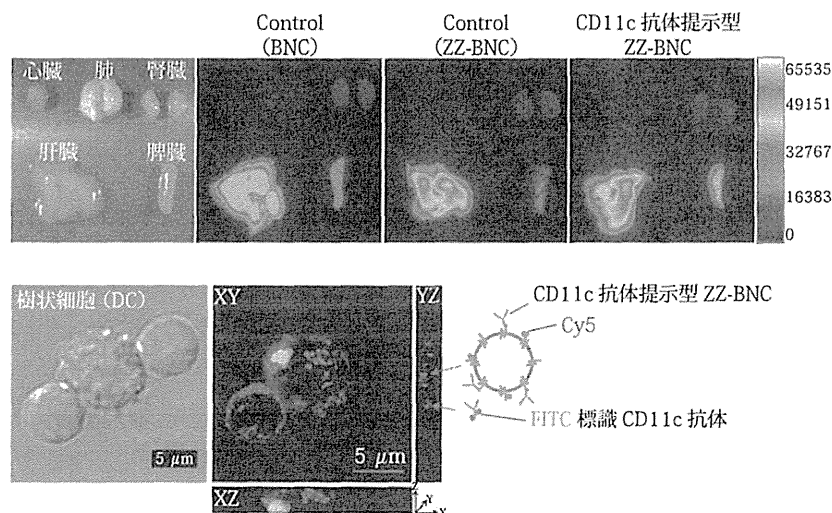


図5 CD11c 抗体提示型 ZZ-BNC の各臓器における分布と樹状細胞内局在

※カラーの図は巻頭ページ参照



JEV) の抗原の一部 (D3 抗原), ならびに抗 CD11c 抗体提示型 ZZ-BNC との複合体を静脈投与したマウスにおいて, JEV に対する IgG の著しい産生が確認できた。

おわりに

これまでの分子プローブについては, 生体組織 (マクロ) レベルで観察する技術開発が殆どであり, 最新のイメージング領域では, 発見しにくい癌, 循環器病態, 神経芽腫等を超早期に検出するべく, 疾患の兆候を細胞レベルで観察することが求められつつある。特に DDS キャリア研究の世界では, 使用する治療薬に応じて細胞外, 細胞膜, 細胞質, エンドソーム, 核へとミクロからサブミクロレベルで細胞内動態を解析する必要性も高まってきている。このようなミクロ・サブミクロレベルで生命現象を非侵襲的に, かつリアルタイムに解析する方法としては蛍光イメージングが適しているであろう。生体内を循環する蛍光分子プローブを検出するには, 光学的に組織透過性の高い波長 (700 nm 付近あるいはこれ以上) を選択する必要がある一方で, 生体内にはこの波長領域でも血液中のヘムに由来するポルフィリン環の自家蛍光がある他, 検出波長が長波長になる程, 検出器 (カメラやホトマル) の量子効率が低くなる傾向にある。従って励起・蛍光効率の高い色素の開発, 並びに長波長の蛍光に対して量子効率の高い検出器を採用する必要がある。我々が開発する BNC は生体内の標的細胞を精密に識別し, 標的細胞内へ効果的に薬剤, 遺伝子, また抗原等を導入できることから, 画期的な蛍光色素および革新的な検出装置が登場すれば, 将来的には, DDS キャリアとしての BNC が, 生体内でどのように循環するか, どのように細胞内に侵入するか非侵襲的にかつリアルタイムで観察できるかもしれない。またこのことは HBV の生体内動態の理解にも繋がり, ウイルスの感染についてより詳細な知見が得られると期待される。

## 文 献

- 1) J. D. Almeida, D. C. Edwards, C. M. Brand, T. D. Heath: *Lancet*, 2 (7941), 899 (1975)
- 2) T. Yamada, Y. Iwasaki, H Tada, H Iwabuki, M. K. Chuah, T VandenDriessche, H. Fukuda, A. Kondo, M. Ueda, M. Seno, K. Tanizawa, S. Kuroda: *Nat. Biotechnol.*, 21 (8), 885 (2003)
- 3) M. Blanchet, C. Sureau: *J. Virol.*, 81 (11), 5841 (2007)
- 4) Y. Itoh, Y. Fujisawa: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 141 (3), 942 (1986)
- 5) Y. Fujisawa, S. Kuroda, P. M. Van Eerd, H. Schellekens, A. Kakinuma : *Vaccine*, 8 (3), 192 (1990)
- 6) S. Kuroda, S. Otaka, T. Miyazaki, M. Nakao, Y. Fujisawa: *J. Biol. Chem.*, 267 (3), 1953 (1992)
- 7) 鄭周姫, 粕谷武史, 谷澤克行, 黒田俊一: *薬学雑誌*, 127 (5), 797 (2007)
- 8) S. M. Moghimi, A.C. Hunter, J. C. Murray: *Pharmacol. Rev.*, 53 (2), 283 (2001)
- 9) M. Yamada, A. Oeda, J. Jung, M. Iijima, N. Yoshimoto, T. Niimi, S. Y. Jeong, E. K. Choi, K. Tanizawa, S. Kuroda: *J. Control. Release*, 160 (2), 322 (2012)
- 10) A. R. Neurath, S. B. Kent, N. Strick, K. Parker : *Cell*, 46 (3), 429 (1986)
- 11) A. Schulze, P. Gripon, S. Urban : *Hepatology*, 46 (6), 1759 (2007)
- 12) H. Yan, G. Zhong, G. Xu, W. He, Z. Jing, Z. Gao, Y. Huang, Y. Qi, B. Peng, H. Wang, L. Fu, M. Song, P. Chen, W. Gao, B. Ren, Y. Sun, T. Cai, X. Feng, J. Sui, W. Li: *Elife*, 1, e00049 (2012)
- 13) S. Oess, E. Hildt: *Gene Ther.*, 7 (9), 750 (2000)
- 14) I. Rodriguez-Crespo, E. Nunez, J. Gomez-Gutierrez, B. Yelamos, J. P. Albar, D. L. Peterson, F. Gavilanes : *J. Gen. Virol.*, 76 (2), 301 (1995)
- 15) Y. Itoh, S. Kuroda, T. Miyazaki, S. Otaka, Y. Fujisawa : *J. Biotechnol.*, 23 (1), 71 (1992)
- 16) J. Jung, M. Iijima, N. Yoshimoto, M. Sasaki, T. Niimi, K. Tatematsu, S. Y. Jeong, E. K. Choi, K. Tanizawa, S. Kuroda : *Protein Expr. Purif.*, 78 (2), 149 (2011)

- 17) Y. Iwasaki, M. Ueda, T. Yamada, A. Kondo, M. Seno, K. Tanizawa, S. Kuroda, M. Sakamoto, M. Kitajima : *Cancer Gene Ther.*, 14 (1), 74 (2007)
- 18) W. C. Zamboni : *Oncologist*, 13 (3), 248 (2008)
- 19) P. Laverman, A. H. Brouwers, E. T. Dams, W. J. Oyen, G. Storm, N. van Rooijen, F. H. Corstens, O. C. Boerman: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 293 (3), 996 (2000)
- 20) T. Ishida, T. Ichikawa, M. Ichihara, Y. Sadzuka, H. Kiwada : *J. Control. Release*, 95 (3), 403 (2004)
- 21) J. Jung, T. Matsuzaki, K. Tatematsu, T. Okajima, K. Tanizawa, S. Kuroda : *J. Control. Release*, 126 (3), 255 (2008)
- 22) T. Kasuya, J. Jung, R. Kinoshita, Y. Goh, T. Matsuzaki, M. Iijima, N. Yoshimoto, K. Tanizawa, S. Kuroda : *Methods Enzymol.*, 464, 147 (2009)
- 23) H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori: *J. Control. Release*, 65 (1-2), 271 (2000)
- 24) O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92 (16), 7297 (1995)
- 25) M. Somiya, N. Yoshimoto, M. Iijima, T. Niimi, T. Dewa, J. Jung, S. Kuroda: *Bioorg. Med. Chem.*, 20 (12), 3873 (2012)
- 26) M. Iijima, H. Kadoya, Hatahira S, Hiramatsu S, Jung G, Martin A, Quinn J, Jung J, Jeong SY, Choi EK, Arakawa T, Hinako F, Kusunoki M, Yoshimoto N, Niimi T, Tanizawa K, Kuroda S. : *Biomaterials*, 32 (6), p. 1455 (2011)
- 27) Y. Tsutsui, K Tomizawa, M. Nagita, H. Michiue, T. Nishiki, I. Ohmori, M. Seno, H. Matsui : *J. Control. Release*, 122 (2), 159 (2007)
- 28) T. Kasuya, J. Jung, H. Kadoya, T. Matsuzaki, K. Tatematsu, T. Okajima, E. Miyoshi, K. Tanizawa, S. Kuroda : *Hum. Gene Ther.*, 19 (9), 887 (2008)
- 29) P. Laakkonen, K. Porkka, J. A. Hoffman, E. Ruoslahti : *Nat. Med.*, 8 (7), 751 (2002)
- 30) P. P. Karmali, V. R. Kotamraju, M. Kastantin, M. Black, D. Missirlis, M. Tirrell, E. Ruoslahti: *Nanomedicine*, 5 (1), 73 (2009)
- 31) H. Matsuo, N. Yoshimoto, M. Iijima, T. Niimi, J. Jung, S. Y. Jeong, E. K. Choi, T. Sewaki, T. Arakawa, S. Kuroda: *Int. J. Nanomedicine*, 7, 3341 (2012)

# 15

---

## *Bio-nanocapsules: Nanocarriers Harboring Virus-Derived Transfection Machinery for Use as Pinpoint Drug Delivery Systems*

---

Shun'ichi Kuroda

### CONTENTS

15.1 Introduction.....	235
15.2 Attributes Required for Future Nanocarriers .....	236
15.3 Lessons from Viruses as Natural Nanocarriers .....	237
15.4 Bio-nanocapsules: Hybrids of Human Liver-Specific Hepatitis B Virus and Liposomes .....	238
15.5 Bio-nanocapsules as Candidate Nanocarriers.....	239
15.6 Retargeting of Bio-nanocapsules.....	241
15.7 Future of Bio-nanocapsules.....	242
Acknowledgments.....	242
References.....	242

---

### 15.1 Introduction

Drug delivery systems (DDSs) represent an emerging technology for targeting necessary and sufficient amounts of therapeutic materials (small molecules or genes) to specific sites in a time-controlled manner. Recent developments in nanotechnology have led to the generation of new nanoparticles that can function as nanocarriers, ranging in size from 50 to 150 nm in diameter. Composed of biocompatible materials, these nanoparticles have been formulated into nanomedicines by incorporating therapeutic materials. Conventional nanocarriers have been classified into four groups (Kasuya and Kuroda, 2009): (i) liposomes, nanocapsules consisting of a lipid bilayer; (ii) nanomicelles, nanoparticles consisting of an amphiphilic diblock copolymer; (iii) polymers; and (iv) viruses.

Liposomes and nanomicelles are approximately 100-nm hollow nanocapsules that can incorporate and carry drugs and genes. As DDS nanocarriers, they can be further categorized as “passive” or “active” targeting particles. “Passive-targeting DDS nanocarriers” accumulate spontaneously at the sites of inflammation or in angiogenic tumors where the endothelium is hyperpermeable to >100-nm nanoparticles; this has been described as the enhanced permeability and retention effect (Maeda et al., 2000). On the other hand, “active-targeting DDS nanocarriers” display tissue-specific molecules (e.g., transferrin and folic acid as tumor-specific molecules; Kolhatkar et al., 2011) and accumulate in the tissues of interest. Both passive- and active-targeting DDS nanocarriers show comparable rates of accumulation at sites of inflammation and angiogenic tumors (Torchilin, 2010). Presently,

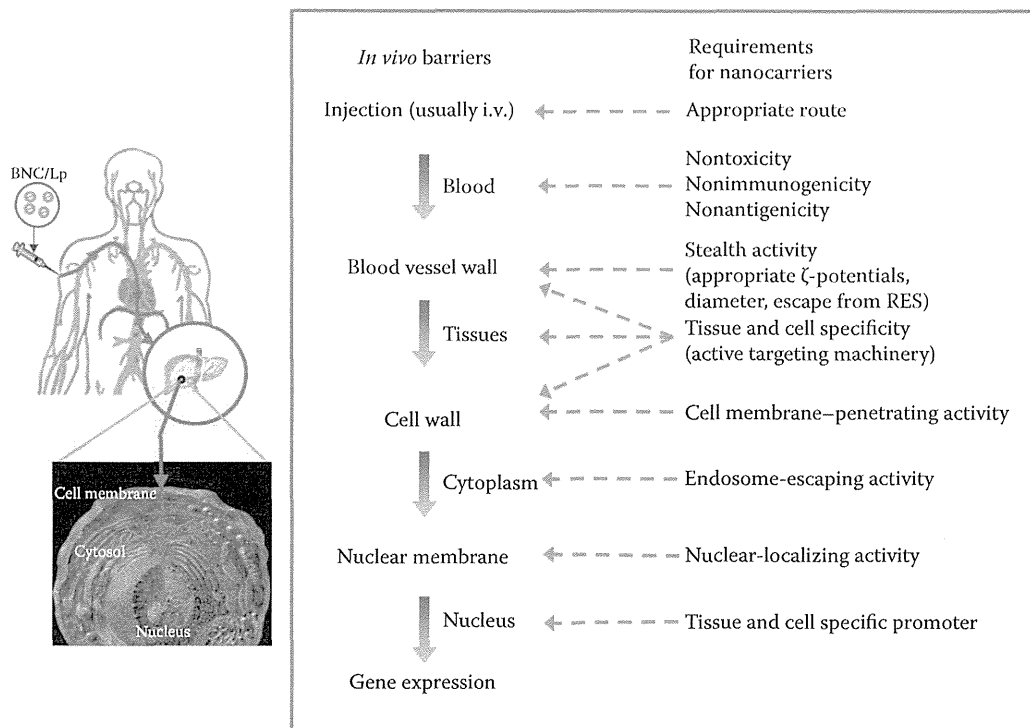
235

tumors remain the primary target of passive-targeting DDS nanocarriers, whereas non-tumor tissues are increasingly becoming the targets of active-targeting DDS nanocarriers.

Typical polymer-based DDS nanocarriers are composed of a cationic polymer that spontaneously forms a stable complex with anionic nucleic acids by ionic interactions. These complexes, called polyplexes, are net positively charged, potentially cytotoxic, and relatively large (>100 nm in diameter) (Neu et al., 2005); thus, polyplexes may not be suitable for *in vivo* delivery. Viruses can efficiently infect a wide variety of cells *in vitro* and *in vivo*; as a DDS nanocarrier, they can only deliver genes that have been incorporated along with their own genomes. The specificity of a virus for a particular target cell varies; some are highly specific, while others are less selective. However, the application of virus-mediated gene therapy in the clinic has been limited after a highly publicized case of a death associated with gene therapy (Savulescu, 2001). Thus, viruses have been used as nanocarriers in a carefully controlled way (i.e., replication-deficient viruses).

## 15.2 Attributes Required for Future Nanocarriers

Figure 15.1 lists the essential characteristics that nanocarriers are required to have to maximize their therapeutic efficacy in treating a wide variety of diseases; these are in addition



**FIGURE 15.1**

Essential characteristics required for nanocarriers to maximize their therapeutic efficacy in treating a wide variety of diseases.