様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　29　年　　8　月　　9　日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(A)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：25242043

研究課題名（和文）ウイルス表層機能ドメイン解析に基づく新次元DDSキャリアの開発

研究課題名（英文）Development of next-gen DDS carrier by utilizing virus envelope-derived functional domains

研究代表者
黒田　俊一（KURODA, SHUN'ICHI）

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：60263406

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　38,090,000円

研究成果の概要（和文）：B型肝炎ウイルスの外皮タンパク質を解析し、能動的標的化能、ステルス能、細胞内侵入能を示す機能ドメインをそれぞれ同定した。これらのドメインを合成ペプチドとして、既存DDSキャリア表層に提示することでB型肝炎ウイルスと同等の感染能力を有する新世代DDSキャリアになることが示唆された。また、B型肝炎ウイルス以外の外皮タンパク質のも同様な機能ドメインが存在することを見出し、多様な新世代DDSキャリアが創製できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Through the analysis of hepatitis B virus envelope protein, we have identified the following novel functional domains: active targeting domain, stealth domain, and cell invasion domain. By displaying these domains as synthetic peptide, the artificial and conventional DDS carriers could function as next-gen DDS carrier that functions like hepatitis B virus. Furthermore, in other viruses, we have identified similar functional domains in their envelope proteins. These results strongly suggested that various next-gen DDS carriers could be generated by this strategy.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：DDS　ウイルス　ナノキャリア

１．研究開始当初の背景

今世紀の医薬品の基盤技術として、医薬品を、生体内の必要な部位に、必要な時に、必要な量だけ作用させる技術である DDS がある。最近ではナノテクノロジーの進歩により、生体親和性の高い直径 10〜100 nm の様々なナノ粒子が開発され、粒子内部に医薬品を封入して「ナノメディシン」とし、上記 DDS の効果を得る試みがなされている。特に、脂質２重膜によるリポソームや、両親媒性コポリマーによるナノミセルなどが DDS キャリアとして頻用されている。しかしながら、現在の DDS キャリアの多くは, RES（細網内皮系）の発達した臓器により速やかに捕捉される。そこで, ポリエチレングリコール（PEG）化等により RES による認識を弱め, かつ血液中安定性を向上させているが、最近では抗 PEG 抗体の出現と ABC（accelerated blood clearance）効果を誘導し問題となっている（石田ら JCR 115:243(2006)）。さらに、PEG を RES 回避に使用することは、強力な Enzon 社特許（US5643575）に抵触するために自由な開発が出来ない。これらの状況は、DDS キャリアを PEG 等の生体親和性の高いポリマーで表面加工する従来の方法では限界にきていることを示しており、この点をブレークスルーしなければ、今後臨床分野で長く使用されるナノメディスンの出現が期待できない。つまり、現在の DDS キャリアの多くは、②ステルス能（特に RES 回避能）が不十分であるために、仮に①能動的標的化能及び③細胞内侵入能を有していても、生体内で十分に機能を発揮することができていない。現状は、「静脈注射するだけで生体内の患部にだけ集中的に薬剤を送達できる本格的 DDS キャリア」の出現のメドが立っていない。

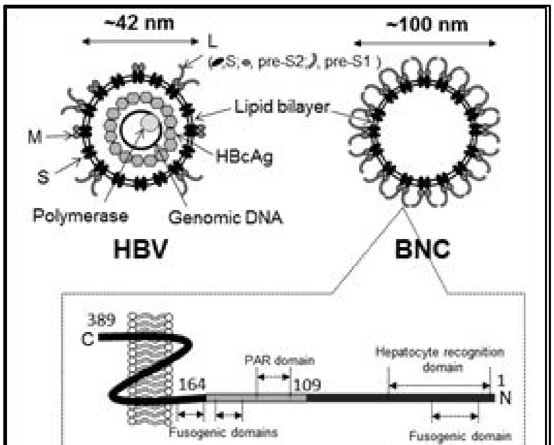
２．研究の目的

ナノサイズの構造体でありながら、ヒト体内を縦横無尽に駆け巡り、細胞及び組織特異的に到達感染することができる各種ヒト由来ウイルスが数多く存在する事も知られている。例えば、B 型肝炎ウイルス（HBV）等のウイルスは、DDS キャリアと同等の大きさであるにも関わらず、血液中に放出されたのち、RES の捕捉から逃げて、生体内で標的臓器及び細胞に到達し高効率で感染することができる。これはウイルスの外周に、①能動的標的化能及び③細胞内侵入能に加えて、未知の RES 回避機構（②ステルス能の一つ）が普遍的に存在する可能性を示しており、これらの能力が、生体内の各局面（血管内、血管壁、細胞表層、細胞内）において、巧みに切り替わって作動することを強く示唆している。しかしながら、各ウイルスにおける上記①〜③の活性を支える機能ドメインの詳細な解析はほとんど行われていないのが現状であり、これらの機能ドメインを DDS キャリア上に再現出来れば、全く新しい DDS キャリアが出現すると考えて、本研究を実施した。

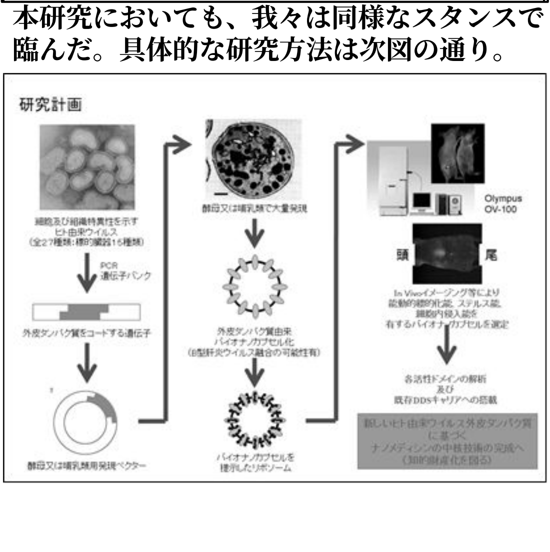
３．研究の方法

我々は、「天然ナノキャリア」とも言えるヒト感染性ウイルスに着目した。特に、B 型肝炎ウイルス（HBV）は微量でも血流を介して確実にヒト肝臓に特異的に感染するので、HBV 外皮 L タンパク質を出芽酵母で中空ナノ粒子（Bio-nanocapsule; BNC）として発現させ、蛍光色素や遺伝子を電気穿孔法で包含させたところ、ヒト肝臓由来細胞に in vitro または in vivo で包含物を高効率で送達できた。また、The Lancet 誌や Nature Materials 誌等において、「ウイルスとリポソームのハイブリッドで画期的な生体内物質送達法」として高い評価を受けた。その後、BNC に関して以下の関連技術を確立した。

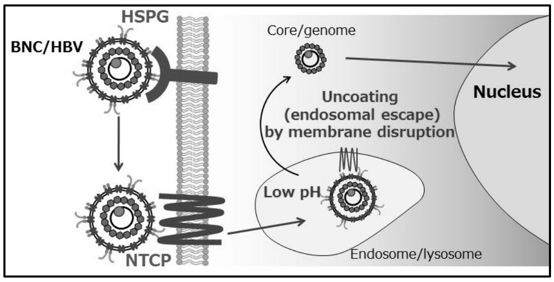
- 大量生産法
- リポソームによる薬剤包含法
- L タンパク質含量を５%以下に著しく低減させた Virosome 薬剤包含法
- ヒト肝臓以外への再標的化法
- 種々薬剤との組合せ
- 疾患モデル動物の治療を含む In vivo 送達
- ヒト肝臓特異的な能動的標的化能の同定
- ステルス能の同定
- 細胞質内侵入能の同定



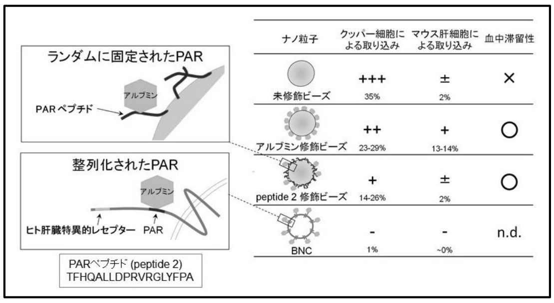
本研究においても、我々は同様なスタンスで臨んだ。具体的な研究方法は次図の通り。



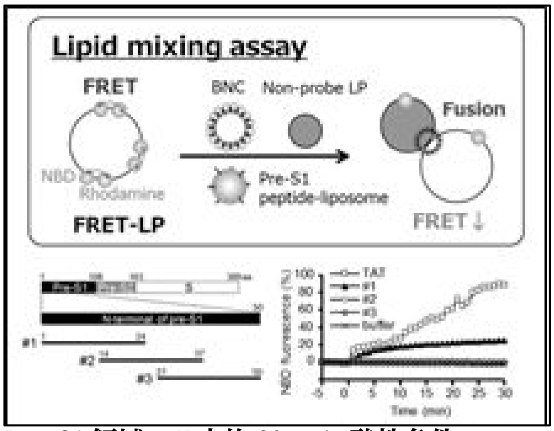
４．研究成果
能動的標的化能：Pre-S1 領域の N 末 47aa 付近がヒト肝臓細胞上の低親和性 HBV 受容体 HSPG と高親和性 HBV 受容体 NTCP と相互作用することが判明した。



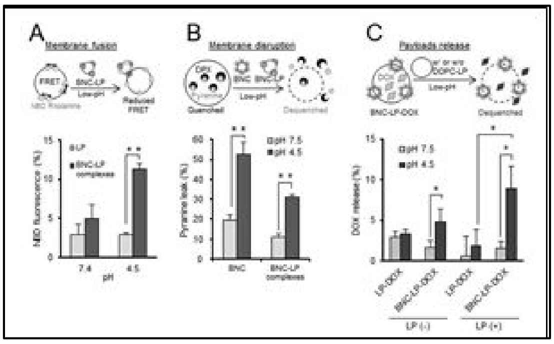
ステルス能： Pre-S2 領域中頃の PAR(重合アルブミン受容体)領域が血中アルブミンと結合してオプソニン分子の吸着を防ぐことを見出した。HBV（BNC）は、Pre-S2 領域中央の PAR(重合アルブミン受容体)領域（peptide 2；TFHQALLDPRVRGLFPA（18 aa））に血中アルブミンが結合しオプソニン分子結合を抑制して RES 回避能を発揮すると考えられている。しかし、RES を構成するマクロファージ（特に肝臓内クッパー細胞）に対する挙動は不明である。



細胞質内侵入能：HBV はエンベロープ型ウイルスであるので、感染初期に脱殻して遺伝子を細胞質に放出するはずだが、その脱殻機構は未解明であった。最近、我々は FRET を示す２重蛍光リポソームを用いて、Pre-S1 領域 N 末端付近（9-24 残基（NPLGFFPDHQLDPAFG））に強力な膜融合活性を見出した。



Pre-S1 領域の N 末約 20 aa に酸性条件でエンドソーム膜と HBV(BNC)エンベロープ膜を同時破壊する膜透過活性を見出し、同活性は双方膜同士が近接する場合のみに作動する稀有な特性を有していた。



本研究により BNC（HBV）に見出された DDS キャリアに適した機能ドメインを再構成させれば、目的とする「静脈注射するだけで生体内の患部にだけ集中的に薬剤を送達できる本格的 DDS キャリア」を出現させることができると考えられる。

５．主な発表論文等
〔雑誌論文〕（計６件）

① Somiya M, Yamaguchi K, Liu Q, Niimi T, Maturana AD, Iijima M, Yoshimoto N, and Kuroda S. One-step scalable preparation method for non-cationic liposomes with high siRNA content. Int J Pharm. 490 (2015) 316-23. 査読有
DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.05.072
② Liu Q, Jung J, Somiya M, Iijima M, Yoshimoto N, Niimi T, Maturana AD, Shin SH, Jeong SY, Choi EK, and Kuroda S. Virosomes of hepatitis B virus envelope L proteins containing doxorubicin: synergistic enhancement of human liver-specific antitumor growth activity by radiotherapy. Int J Nanomed. 10 (2015) 4159-4172. 査読有
DOI: 10.2147/IJN.S84295
③ Somiya M, Sasaki Y, Matsuzaki T, Liu Q, Iijima M, Yoshimoto N, Niimi T, Maturana AD, and Kuroda S. Intracellular trafficking of bio-nanocapsule-liposome complex: Identification of fusogenic activity in the pre-S1 region of hepatitis B virus surface antigen L protein. J Control Rel. 212 (2015) 10-18. 査読有
DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.06.012
④ Ito J, Iijima M, Yoshimoto N, Niimi T, Kuroda S, and Maturana AD. Scaffold protein enigma homolog activates CREB whereas a short splice variant prevents CREB activation in cardiomyocytes. Cell Signal. 27 (2015) 2425-2433. 査読有
DOI: 10.1002/1873-3468.12251

⑤ Somiya M., and Kuroda, S. Development of a Virus-mimicking Nanocarrier for Drug Delivery Systems: The bio-nanocapsule. Adv. Drug Delivery Rev. 95 (2015) 77-89. 査読有
DOI: 10.1016/j.addr.2015.10.003

⑥ 飯嶋益巳・黒田俊一 バイオナノカプセルを用いたセンシング分子整列化技術によるバイオセンシングの高感度化 生物工学会誌 (2015), Vol. 93 248-258 査読有

〔図書〕(計１件)

① 良元伸男、黒田俊一 ㈱NTS DDS の人体・環境・ものづくりへの適用技術(監修 中川晋作) 2013 118-126

〔産業財産権〕
○出願状況(計１件)

名称：核酸を内封してなる中性又はアニオン性リポソーム及びその製造方法
発明者：黒田俊一、曽宮正晴
権利者：名古屋大学(現在、片山化学工業)
種類：特許
番号：特許願 2014-170680
出願年月日：26 年 8 月 25 日
国内外の別： 国内

○取得状況(計 6 件)

名称：バイオナノカプセル及びリポソームを含む複合体
発明者：黒田俊一、松尾英典、良元伸男、飯嶋益巳、新川武
権利者：名古屋大学(現在、大阪大学)、琉球大学
種類：特許
番号：特許第 5458286 号
取得年月日：25 年 11 月 26 日
国内外の別： 国内

名称：リポソーム複合体、その製造方法、及びその使用
発明者：黒田俊一、太江田綾子
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特許第 5713311 号
取得年月日：27 年 3 月 20 日
国内外の別： 国内

名称：薬物送達システム
発明者：青木浩樹、吉村耕一、堤 宏守、照山智恵、松崎益徳、黒田俊一
権利者：山口大学、大阪大学
種類：特許
番号：特許第 8529929 号
取得年月日：25 年 9 月 10 日
国内外の別： 米国

名称：薬物送達システム
発明者：青木浩樹、吉村耕一、堤 宏守、照山智恵、松崎益徳、黒田俊一
権利者：山口大学、大阪大学
種類：特許
番号：特許第 ZL2008 8 0127484.9 号
取得年月日：26 年 11 月 12 日
国内外の別： 中国

名称：バイオナノカプセルの効率的な精製方法
発明者：黒田俊一、前川圭美、名木田真奈
権利者：JST、大阪大学、㈱ビークル
種類：特許
番号：特許第 1985711 号
取得年月日：25 年 4 月 10 日
国内外の別： 欧州

名称：抗体を提示するタンパク質中空ナノ粒子を用いる治療薬剤およびタンパク質中空ナノ粒子
発明者：黒田俊一、谷澤克行、近藤昭彦、上田政和、妹尾昌治、岡島俊英
権利者：JST
種類：特許
番号：特許第 1491210 号
取得年月日：25 年 6 月 19 日
国内外の別： 欧州

〔その他〕
ホームページ等
http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/smb/kuroda/index.html

６．研究組織
(1)研究代表者
黒田 俊一(KURODA Shun’ichi)
大阪大学・産業科学研究所・教授
研究者番号：60263406