

広範囲な生体内部位にウイルス並に感染する汎用型ネオ・
バイオナノカプセルの創製

Development of Neo-Bionanocapsules: Drug and Gene
Delivery System to Wide Range Tissues with
Virus-derived Functional Domains

課題番号：16H06314

黒田 俊一 (KURODA, SHUN'ICHI)

大阪大学・産業科学研究所・教授



研究の概要

精密な標的化能、高度なステルス能、効率的な細胞質内侵入能を併せ持つウイルスは、天然のDDS（薬物送達）ナノキャリアと言える。本研究では、ヒト肝臓特異的に感染するB型肝炎ウイルスの外皮Lタンパク質に含まれる各機能ドメインを分子レベルで解明し、GMP製造に適した化成品DDSナノキャリア表面に上記3機能ドメインを再構成することを目的としている。

研究分野：薬物送達学

キーワード：ナノメディシン、ウイルス、全自動1細胞解析単離装置

1. 研究開始当初の背景

現在の薬物送達ナノキャリア（化成品）の中で、①標的化能、②ステルス能、③細胞質内侵入能の3機能を併せ持つものは少ない。我々は、天然ナノキャリアであるB型肝炎ウイルス（HBV）に着目し、外皮Lタンパク質粒子（バイオナノカプセル；BNC）の外周に上記3機能ドメインがコンパクトに存在して協調し、HBVの高度なヒト肝臓特異的感染を実現することを示した。一方、BNCの臨床応用を考えた場合、BNCが生物製剤と化成品のハイブリッドであるためGMP基準で製造するのは、国内外の大手製薬会社でも手間とコストの面で困難であった。そこで、「BNCと同等の上記3機能を有する化成品のナノキャリア（Neo-BNC）の創製」が望まれた。

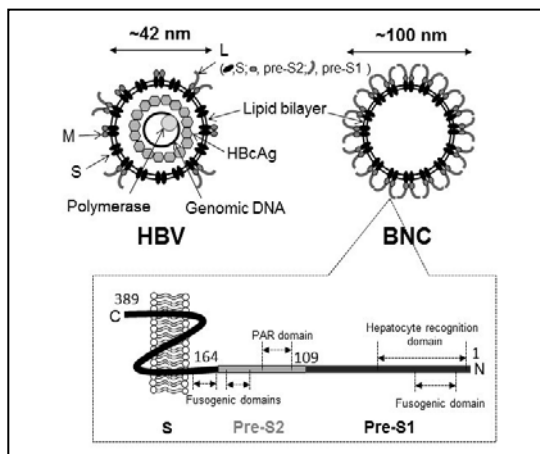


図1 HBVとBNCに含まれる機能ドメイン

2. 研究の目的

HBV外皮Lタンパク質内に含まれる3機能ドメインを正確に同定する。次に、様々な組織を標的化するaffibodyを全自動1細胞解析単離装置（独自開発）で創出し、②と③の機能ドメインの作動機構を解明してペプチドで再構成し、生体分子整列提示技術（独自開発）により既存ナノキャリア表層に提示して、「In vivo投与可能な能動的標的化能を有する高効率な汎用型細胞質内送達Neo-BNC」を創製する。

3. 研究の方法

初年度はステルス化及び細胞質内侵入ドメインをペプチド化してリポソーム表面に再構築し、確立済のin vitro及びin vivoアッセイにより機能発現に必要な十分な領域を決定し最適化する。また同時に、全自動1細胞解析単離装置により種々組織（ガン組織含む）に対するaffibodyをハイスループット選抜する。2年度以降は、ステルス化及び細胞質内侵入機能ドメインの作動機構を解明する。また、超高速AFMで観察しながら、ナノ粒子表面での精密整列化提示技術により、各分子を既存ナノキャリア上に提示して、上記3機能をBNC以上に発現させ、in vivo投与可能な極めて高い能動的標的化能、高分子を用いないステルス能、強力な細胞質内送達能を兼ね備えた汎用型Neo-BNC」を創製する。

4. これまでの成果

①標的化能：広汎な抗体を提示するために

Protein G/L の IgG 結合ドメインを提示する新規 BNC を創製した (論文 1)。次に、マクロファージや樹状細胞への再標的化に成功した (論文 2、3)。さらに、Neo-BNC 表層に提示する Affibody 2 種類の選抜が終了した。

②ステルス能：HBV (BNC) は Pre-S2 領域に存在する重合アルブミン結合領域 (PAR ドメイン) によりアルブミンを表層にリクルートし、肝臓細胞表層の nFcR と相互作用することで、速やかに血液中に再放出されることを見出した (投稿中)。また、B 型肝炎接種者にも感染可能な HBV エスケープ変異体と同じ変異を導入した BNC は免疫系に認識されにくくなることが判明した (論文 4)。

③細胞質内侵入能：従来の HBV 受容体である NTCP は肝臓細胞表層では機能せず、エンドソーム内で機能し、代わりに HSPG が表層で機能することを見出した (論文 5)。また、HSPG との結合ドメインを Pre-S1 領域内に同定した (論文 6)。次に、Pre-S1 領域内の低 pH 依存性膜融合ドメインは、その疎水性が重要であることを見出した (論文 7)。

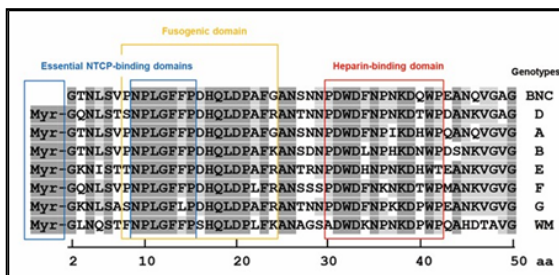


図 2 HBV と BNC の Pre-S1 領域 N 末端付近に同定された機能ドメイン

④リポソーム上での 3 機能ペプチドの再構成：リポソーム表層に化学修飾したペプチドは配向性が揃わず、標的への相互作用効果が低減する。そこで、HBV の S 領域の欠失変異解析を行い、膜透過セグメント 2 個が足場タンパク質として、ペプチドの精密整列提示に有効であると判明した (論文 8)。

5. 今後の計画

得られた 3 機能ペプチドをリポソーム表層に提示し、in vitro (培養細胞) 及び in vivo (実験動物) を使用して、HBV (BNC) と同等の①標的化能、②ステルス能、③細胞質内侵入能を示すように、各ペプチドの配列、提示方法、足場分子、提示密度、粒子径、ゼータ電位等の最適化を行う。次に、EPR 効果を示さないガン組織や通常臓器の標的化のため、組織浸透性の高い直径 50 nm 前後のナノキャリア (LNP (Lipid nanoparticle)、ナノミセル) の表層にも同様の修飾を行い in vitro 及び in vivo で最適化を行う。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

論文 1 : Tatematsu K, Iijima M,

Yoshimoto N, Nakai T, Okajima T, Kuroda S. Bio-nanocapsules displaying various immunoglobulins as an active targeting-based drug delivery system. *Acta Biomater* **35**, 238-247 (2016)

論文 2 : Li H, Tatematsu K, Somiya M, Iijima M, Kuroda S. Development of a macrophage-targeting and phagocytosis-inducing bio-nanocapsule-based nanocarrier for drug delivery. *Acta Biomater* **73**, 412-423 (2018)

論文 3 : Matsuo H, Somiya M, Iijima M, Arakawa T, Kuroda S. CD11c-specific bio-nanocapsule enhances vaccine immunogenicity by targeting immune cells. *J Nanobiotechnol* **16**, 59-70 (2018)

論文 4 : Jung J, Somiya M, Jeong SY, Choi EK, Kuroda S. Low immunogenic bio-nanocapsule based on hepatitis B virus escape mutants. *Nanomedicine* **14**, 595-600 (2018)

論文 5 : Somiya M, Liu Q, Yoshimoto N, Iijima M, Tatematsu K, Nakai T, Okajima T, Kuroki K, Ueda K, Kuroda S. Cellular uptake of hepatitis B virus envelope L particles is independent of sodium taurocholate cotransporting polypeptide, but dependent on heparan sulfate proteoglycan. *Virology* **497**, 23-32 (2016)

論文 6 : Liu Q, Somiya M, Iijima M, Tatematsu K, Kuroda S. A hepatitis B virus-derived human hepatic cell-specific heparin-binding peptide: identification and application to a drug delivery system. *Biomaterial Sci* **7**, 322-335 (2018)

論文 7 : Liu Q, Somiya M, Shimada N, Sakamoto W, Yoshimoto N, Iijima M, Tatematsu K, Nakai T, Okajima T, Maruyama A, Kuroda S. Mutational analysis of hepatitis B virus pre-S1 (9-24) fusogenic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* **474**, 406-412 (2016)

論文 8 : Li H, Onbe K, Liu Q, Iijima M, Tatematsu K, Seno M, Tada H, Kuroda S. Synthesis and assembly of hepatitis B virus envelope protein-derived particles in *Escherichia coli* *Biochem Biophys Res Commun* **490**, 155-160 (2017)

コンセプト紹介 (総説) : Somiya M, Liu Q, Kuroda S. Current progress of virus-mimicking nanocarriers for drug delivery. *Nanotheranostics* **1**, 415-429 (2017)

7. ホームページ等

<https://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/smb/>