

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21240052

研究課題名（和文）バイオナノカプセルの細胞内侵入機構及び生体内ステルス性の解析

研究課題名（英文）Analysis of Cell Invasion System and *In Vivo* Stealth Activity of Bio-nanocapsules

研究代表者

黒田 俊一（KURODA SHUNICHI）

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：60263406

研究成果の概要（和文）：我々はB型肝炎ウイルス（HBV）表面抗原Lタンパク質粒子が中空ナノ粒子であり、ヒト肝臓特異的に感染できる性質を有することを利用して、非ウイルス性DDS ナノキャリア「バイオナノカプセル（BNC）」を開発した。マウス静脈内に投与されたBNCは細網内皮系（RES）に富む臓器を避けつつ、標的組織まで効率よく到達することができた。本研究では、ナノ医薬品の表面をアルブミンでコートすることにより血中半減期を延長することができることから、我々はBNC表層にある重合血清アルブミンレセプター（PAR）がマウス肝臓のRESを回避するのに有効であることを証明した。その結果は、BNCのみならずHBVが、本来RES回避機構を有することを強く示唆していた。そこで、PARペプチドの表面修飾は、次世代ナノ医薬品の薬物動態および薬物力学の改善に貢献する新しい方法であるのかもしれない。

研究成果の概要（英文）：We previously developed a hepatitis B virus (HBV) surface antigen L protein particle [bio-nanocapsule (BNC)] as a nonviral DDS nanocarrier. Intravenously injected BNCs were shown to avoid clearance by RES (reticuloendothelial system)-rich organs and accumulate in target tissues. In this study, since the surface modification with albumins is known to prolong the circulating half-life of nanomedicines, we demonstrated that the polymerized albumin receptor (PAR) of BNCs contributes to RES evasion in mouse liver, strongly suggesting that BNCs, as well as HBV, harbor an innate RES evasion mechanism. Therefore, the surface modification with PAR peptides could be an alternative strategy for improving pharmacodynamics and pharmacokinetics of forthcoming nanomedicines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	15,400,000	4,620,000	20,020,000
2010年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
2011年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
総計	36,400,000	10,920,000	47,320,000

研究分野：ナノバイオテクノロジー

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：ナノメディシン・DDS・ナノキャリア・ウイルス

1. 研究開始当初の背景

近年、ナノテクノロジーを応用した医薬品（ナノメディシン）の開発が国内外で活発に行われている。特に、生体内を自由に循環し目的部位（細胞）を見出して、表面に吸着し、内部に侵入するナノサイズのキャリアの開発は DDS 及び GDS（薬剤及び遺伝子送達技術）の分野で大変注目されている。現在までの研究を大別すると3種類に分類され、リポソーム（脂質膜に覆われた中空カプセル）、ナノミセル（疎水性コアを有するポリマー粒子）、ウイルスがある。前者2つはナノサイズの器なので様々な物質を包含するが、癌組織及び炎症部位の血管壁が粗くなる EPR（Enhanced Permeability and Retention）効果による受動的標的化（Passive Targeting）しかなく、細胞内部に積極的に送出する機構を有さない。後者は、広範囲な細胞に高率で感染し細胞内部に積極的に送出するが、遺伝子しか包含できず、標的化能は低い。また、ウイルスゲノムによる臨床での事故例も報告されている。

以上の様な状況の中、私はウイルス並みの感染性を有しつつ、ウイルスゲノムは含まず、遺伝子以外の物質も包含でき、生体内の任意の部位に能動的標的化（Active Targeting）できるキャリアとして、約30年間B型肝炎ワクチンとして使用されてきた遺伝子組換え酵母由来B型肝炎ウイルス（HBV）表面抗原粒子（実際に臨床応用されていたのはS及びMタンパク質粒子であり、我々はさらにN末端側にpre-S1領域が伸長したLタンパク質粒子を使用した）がヒト肝臓特異的なナノサイズのカプセルであることに注目して、2003年に新しい概念の遺伝子及び薬物送達法である「バイオナノカプセル（BNC; Bio-nanocapsule）」を開発した。

2. 研究の目的

その後、本BNC技術は、大量生産法、簡易精製法、長期保存法、リポソームを介した高効率物質封入法、実験動物における抗癌剤および治療用遺伝子による癌治療法、様々な再標的化法等の開発成功により、臨床応用が近いDDS用ナノキャリアに育ってきた。しかしながら、癌などの末期医療だけではなく通常疾患の治療に使用するためには、BNCの作用機序を明らかにするとともに、さらに確実に目的部位に送達させる必要がある。具体的には、次の3課題の解決が求められる。

- ①HBV由来の細胞内侵入機構の解明
- ②マクロファージ等に富む網内血管系（RES）による捕捉からの完全な回避
- ③長期投与に耐える低抗原性・低免疫原性の確保

そこで、本研究では上記3課題について解析を行い、BNCを次世代DDSナノキャリア

として確固たるものにする事を目指した。

3. 研究の方法

(1) HBV由来の細胞内侵入機構の解明：
常法に従い2種類の蛍光色素（FRET効果を示す組み合わせ；NBDとRhodamine）を提示するアニオン性リポソームを作製し、BNCと未標識リポソームを混合し、BNCによる膜透過活性をFRET効果の減衰（NBD由来蛍光の増大）により測定した。

また、蛍光標識BNCを作製し、ヒト肝臓由来細胞（Huh7, HepG2, NuE）に対して感染させ、細胞内への経時的な取り込み過程を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

(2) マクロファージ等に富むRESによる捕捉からの完全な回避：

ヒト血清アルブミン（重合体）と高い親和性を有するPAR領域（pre-S2領域の中程の約20アミノ酸残基）をコードする合成ペプチドを作製し、直径100nmの近赤外波長の蛍光標識ポリスチレンビーズの表層に結合させ、Balb/cマウスの静脈内に投与し、生体内イメージング装置により体内動態を非侵襲条件で経時的に観察を行った。

(3) 長期投与に耐える低抗原性・低免疫原性の確保：

B型肝炎ワクチンの接種を受けた患者の体内で、中和抗体が惹起されているにもかかわらず増殖するHBVエスケープ変異体のデータを各種文献から抽出し、それらの共通した変異部位を統計的に割り出し、BNCに搭載したもの（BNC-ST：ステルス型BNCの意味）を創製した。

4. 研究成果

(1) HBV由来の細胞内侵入機構の解明：
前項に記載した方法でBNCはリポソーム（細胞のモデル）に対して膜融合能力を示すことが判明した。一方、BNCのヒト肝臓由来細胞への特異的感染を担う部位（ヒト肝臓特異的レセプター）は、HBVの研究からN末端側Pre-S1領域（108アミノ残基）のN末端側10-30残基付近と考えられている。そこで、BNC（及びHBV）はヒト肝臓特異的レセプターによりヒト肝臓由来細胞に近接し、BNCが細胞膜と至近距離になった際に、膜融合活性により細胞内に侵入すると想定された。

そこで、pre-S1領域のヒト肝臓特異的レセプター（10-30残基）を挟んで、1-20, 10-30, 20-40, 30-50残基をコードするペプチドを合成し、化学的にリポソームに提示し、前項と同様な方法で膜融合を検討したところ、1-20残基に強い膜融合活性が見出された。同配列は既存の膜融合配列とは異なりArg残基のよ

うな塩基性アミノ酸を含んでおらず新しいタイプであった。次に、1-20 残基を認識する抗体を BNC と混合し、リポソームに対する膜融合を検討したところ、BNC は全く膜融合活性を示さなかった。以上から、BNC (及び HBV) は pre-S1 領域 N 末端側 1-20 残基により細胞膜融合を引き起こし、細胞内に侵入すると考えられた。なお、その後の研究から、同領域の Phe 残基 2 つが同活性に必須であることも判明した。

(2) マクロファージ等に富む RES による捕捉からの完全な回避：

BNC (及び HBV) の pre-S2 領域 (55 残基) の中程に存在する PAR 領域が、重合ヒト血清アルブミン (血液中アルブミンの多くがこの形式で存在) と高い結合能を有することは 80 年代から報告されていた。そこで、我々は QCM (水晶振動子微量天秤) を用いて、重合マウス血清アルブミンとの結合を検討したところ、ヒトと比べて 10% 程度の効率で結合した。そこで、蛍光標識ポリスチレンビーズ (直径 100 nm) に PAR 領域を含む合成ペプチドを提示させたところ、マウス体内に静注しても、RES に富む肝臓には集積しなかった。また、同ビーズの血液中での半減期を測定したところ、未修飾のものに比べて長期に渡り血液中を循環していた。

一方、アルブミン (ヒト、マウス) を提示したビーズを用いた実験では、同じように血液中での半減期は伸びていたが、マウス肝臓 (クッパーではなく実質細胞) にアルブミンビーズは一時的に大量に取り込まれていた。これは、肝臓が生体内におけるアルブミンのリザーバーとして機能していることと一致する。一方、PAR ペプチド提示ビーズには、そのような現象は観察されなかった。これは、肝実質細胞表面で PAR ペプチドとアルブミンが乖離するためと考えられた。そのため、今後のナノメディシンを血液中で長期間循環させるには、特許問題及び IgM 抗体誘導問題 (ABC 効果) で使用困難になりつつある PEG (ポリエチレングリコール) 表面修飾法ではなく、PAR 領域を含むペプチドを提示することが有効であると考えられた。

さらに、PAR ペプチド提示ビーズと BNC の PAR 活性を比較したところ、BNC の方が PAR ペプチド提示数が低いにもかかわらず、高い PAR 活性を示すことが判明した。具体的には、BNC 表面の PAR ペプチドは約 10 倍の効率で重合ヒト血清アルブミンと結合した。これは、BNC 表面では HBV 表面抗原 L タンパク質が膜構造にアンカリングし、膜に対するトポロジーは極めて精密に (ナノレベルで) 制御されていることを示唆している。実際、別の我々の研究で、*Staphylococcus aureus* 由来 protein A の抗体 (Fc 領域) 結

合ドメイン (Z ドメイン) を pre-S1 領域と置換して提示させた抗体提示用 BNC (ZZ-BNC) を作製した時、Z ドメインがナノレベルで BNC 表面に整列化され、それを足場にして IgG が Fc を BNC 表面に正確に向けて固定され、Fv 領域が BNC 外側に正確に提示されることを見出している。以上から、ビーズ上に化学的に固定された PAR ペプチドは配向性がランダムで PAR としての活性を十分に発揮できておらず、BNC 上の PAR ペプチドは配向性が整列化され、十分に PAR としての活性を発揮できたと考えられた。以上から、BNC (及び HBV) は非常に効率のよい PAR ペプチドを介して、重合血清アルブミンをリクルートして、RES を回避していると考えられた。

(3) 長期投与に耐える低抗原性・低免疫原性の確保：

BNC を臨床応用する場合、先進国 (日本以外) の成人は、B 型肝炎ワクチン接種を受けているため BNC に対する抗体が既に誘導されており、体内より速やかに排除される可能性が高い。また、連続投与を行う場合、BNC に対する抗体が誘導される可能性もある。そこで本研究では、HBV の進化の過程で生み出されてきたエスケープ変異体のアミノ酸配列を模倣して BNC に搭載し、その HBV 中和抗体に対する反応性及び抗原性を検討した。まず、多数報告されている HBV エスケープ変異体のアライメントをとり、共通したアミノ酸変異として S 領域の抗原決定基付近にある 130 残基目 Gln 及び 146 残基目 Gly が、Arg に置換していることを見出した。そこで、従来の BNC の同残基を上記 2 残基に変換したステルス型 BNC (ST-BNC) を作製した。

ST-BNC は、受動免疫に使用する HBV 中和抗体に対する反応性が BNC の半分程度に低下していた。また、Balb/c マウスに 4 週間おきに 7 回連続投与 (腹腔内、静脈内) した場合、抗 BNC 抗体の平均抗体価は BNC の 10 分の 1 程度であった。さらに、ヒト肝癌由来組織を移植したヌードマウス (xenograft) に、予め感染防御レベルの 100 倍濃度の HBV 中和抗体を投与した後、蛍光標識 ST-BNC の血中滞留性および標的部集積性を検討したところ、BNC と比較して格段に改善されていた。以上から、ST-BNC は低抗原性 BNC であり、B 型肝炎ワクチン接種者に投与しても目的を達成できる DDS ナノキャリアであることが判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 15 件)

① Engineered bio-nanocapsules, hepatitis B virus surface antigen L protein particles, for in vivo active targeting to splenic dendritic cells

Matsuo, M., Yoshimoto, N., Iijima, M., Niimi, T., Jung, J., Jeong, S. Y., Choi, E. K., Sewaki, T., Arakawa, T., and Kuroda, S. Int. J. Nanomed. 7 (2012) 3341-3350.

(査読有)

② Targeting of Polyplex to Human Hepatic Cells by Bio-nanocapsules, Hepatitis B Virus Surface Antigen L Protein Particles

Somiya, M., Yoshimoto, N., Iijima, M., Niimi, T., Dewa, T., Jung, J., and Kuroda, S.

Bioorg. Med. Chem. 20 (2012) 3873-3879.

(査読有)

③ Hepatitis B Virus Envelope L Protein-Derived Bio-Nanocapsules: Mechanisms of Cellular Attachment and Entry into Human Hepatic Cells.

Yamada, M., Oeda A., Jung J.H., Iijima M., Yoshimoto, N., Niimi, T., Jeong, S.Y., Choi, E.K., Tanizawa, K., and Kuroda, S.

J. Controlled Release 160 (2012) 322-329.

(査読有)

④ Electroporation and use of hepatitis B virus envelope L proteins as bionanocapsules.

Yamada T, Jung J, Seno M, Kondo A, Ueda M, Tanizawa K, and Kuroda S.

Cold Spring Harb Protoc. 6 (2012) 702-705.

(査読有)

⑤ バイオナノカプセル (ウイルス感染機構を備えたナノキャリア) を用いる生体内ピンポイントDDSの構築

黒田 俊一

高分子 (2012), Vol. 61. No. 8, 530-532.

(査読有)

⑥ Fluorophore-labeled nanocapsules displaying IgG Fc-binding domains for the simultaneous detection of multiple antigens.

Iijima M, Matsuzaki T, Yoshimoto N, Niimi T, Tanizawa K, and Kuroda S.

Biomaterials 32 (2011) 9011-9020.

(査読有)

⑦ Efficient and rapid purification of drug- and gene-carrying bio-nanocapsules, hepatitis B virus surface antigen L particles, from *Saccharomyces cerevisiae*

Jung J., Iijima M., Yoshimoto N., Sasaki M., Niimi T., Tatematsu K., Jeong S.Y., Choi E.K., Tanizawa K., and Kuroda S.

Protein Exp. Purif. 78 (2011) 149-155.

(査読有)

⑧ Human Liver Specific Nano-Carrier in a Novel Mouse Xenograft Model Bearing Non-Cancerous Human Liver Tissue

Matsuura Y, Yagi H, Matsuda S, Itano O, Koichi A, Kuroda S., Ueda M, and Kitagawa Y

European Surgical Research 46 (2011) 65-72.

(査読有)

⑨ Nanocapsules Incorporating IgG Fc-binding Domain Derived from *Staphylococcus aureus* Protein-A for Displaying IgGs on Immunosensor Chips

Iijima M, Kadoya H, Matsuzaki T, 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, and Kuroda S.

Biomaterials 32 (2011) 1455-1464

(査読有)

⑩ A gene delivery system specific for hepatoma cells and an intracellular kinase signal based on human liver-specific bionanocapsules and signal-responsive artificial polymer.

Oishi J, Jung J, Tsuchiya A, Toita R, Kang JH, Mori T, Niidome T, Tanizawa K, Kuroda S. and Katayama Y.

Int J Pharm. 396 (2010) 174-178.

(査読有)

⑪ Hepatoma-targeted gene delivery using a tumor cell-specific gene regulation system combined with a human liver cell-specific bionanocapsule.

Kang JH, Oishi J, Kim JH, Ijuin M, Toita R, Jun B, Asai D, Mori T, Niidome T, Tanizawa K, Kuroda S. and Katayama Y.

Nanomedicine 6 (2010) 583-589.

(査読有)

⑫ Bio-nanocapsule-based enzyme-antibody conjugates for ELISA

Iijima M, Matsuzaki T, Kadoya H, Hatahira S, Hiramatsu S, Jung G, Tanizawa K, and Kuroda S.

Anal Biochem 396 (2010) 257-261

(査読有)

⑬ Bio-nanocapsule-liposome conjugates for in vivo pinpoint drugs and gene delivery

Kasuya, T., Jung, J., Kinoshita, R., Goh, Y., Matsuzaki, T., Iijima, M., Yoshimoto, N., Tanizawa, K., and Kuroda, S.

Methods in Enzymology 464 (2009)147-166.

(査読有)

⑭ Targeted nanoparticle drug delivery systems to the human liver: in vitro and in

vivo advances

Kasuya, T., Yamada, T., and Kuroda, S.
Expert Opinion on Drug Delivery 6 (2009)
1-14.

(査読有)

⑮ぶどう膜炎治療におけるドラッグデリバリーシステムの可能性

真下 永、黒田俊一

眼科 (2009), Vol. 51. 891-899.

(査読有)

[学会発表] (計7件 (招待のみ))

①黒田俊一 バイオナノカプセル・リポソーム複合体による DNA 及び siRNA デリバリー技術 日本 DDS 学会 2009 年 7 月 3 日 東京ドームホテル (東京)

②黒田俊一 Bio-nanocapsules for the in vivo pinpoint delivery of nucleic acids and drugs

ジュネーブ大学理学部主催 International Workshop on Nanomedicine 2010.6.1 ジュネーブ大学理学部、スイス

③黒田俊一 In vivo pinpoint gene and drug delivery system using a hybrid of liposomes and HBV envelope proteins, bio-nanocapsules

2011 International Symposium on Nanotechnology, From Bench To Clinic 2011.2.25 ASAN Medical Center, ソウル、韓国

④黒田俊一 バイオナノカプセル複合体化による遺伝子キャリアの高機能化 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010) 2010.12.9 神戸国際会議場

⑤黒田俊一 Development of DDS carrier utilizing BNC (bio-nanocapsule, a liposome possessing viral infection machinery) The 65th West Lake International Symposium of Zhejiang University 2010.11.20 浙江大学、杭州、中国

⑥黒田俊一 Development of DDS carrier utilizing BNC (bio-nanocapsule, a liposome possessing viral infection machinery) The 19th DDS Conference 2010.9.4 静岡グランメッセ

⑦黒田俊一 BIO-NANOCAPSULES FOR THE IN VIVO PINPOINT DELIVERY OF NUCLEIC ACIDS AND DRUGS Particles2010 2010.5.24 Orland, FA,

USA

[図書] (計6件)

①良元伸男、黒田俊一 未来医療を支える先端バイオマテリアル～生体分子から有機・セラミック・金属まで～ (監修 石原一彦、秋吉一成、山岡哲二) (2012) (株)NTS「先端バイオマテリアル」5-3-9. 中空タンパク質ナノカプセル (バイオナノカプセル) を用いる遺伝子・薬物のピンポイント DDS

②黒田俊一 共創・協奏 産学連携成功のキーワード (独立行政法人科学技術振興機構 JST イノベーションプラザ大阪 編) (2011) p.69・p.84 生体内ピンポイント薬剤送達システム 「ウイルスとリポソームの長所を合わせ持つバイオナノカプセル」

③宮部康平、太江田綾子、山田光男、黒田俊一 DDS 研究の進歩 XX (奥直人、山田静雄、賀川義之、板井茂、並木徳之 編集) (2011) p.97 - p.102 高度な肝臓細胞標的化能及び感染能を有するバイオナノカプセルーリポプレックス複合体の開発

④Masumi Iijima and Shun'ichi Kuroda (分担) 5th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering (Akos Jobbagy Ed.) IFMBE Proceedings Volume 37 (2011); Springer (Heidelberg, Germany) pp.1000-1003 Bio-nanocapsules for Oriented Immobilization of IgGs on Immunosensor Chips

⑤黒田俊一 DDS 研究の進歩 XIX (奥直人、山田静雄、賀川義之、板井茂、並木徳之 編集) (2010) p.11 -p.16 バイオナノカプセル (ウイルス由来感染機構を有するリポソーム) を用いる DDS キャリアの開発

⑥黒田俊一 (分担) 超分子サイエンス (国武豊喜監修) (2009) (株)NTS (東京) 中空バイオナノ粒子

[産業財産権]

○出願状況 (計4件)

①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、琉球大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2013/059691
出願年月日: 2013.3.29

国内外の別：国外（PCT）

②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、琉球大学

種類：特許

番号：特願 2012-080791

出願年月日：2012. 3. 30

国内外の別：国内

③名称：ウイルス粒子様ナノカプセル

発明者：多田宏子、妹尾昌治、黒田俊一

権利者：岡山大学、名古屋大学

種類：特許

番号：特願 2011-162596

出願年月日：2011. 7. 25

国内外の別：国内

④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：特願 2010-214303

出願年月日：2010. 9. 24

国内外の別：国内

○取得状況（計4件）

①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：4936272

取得年月日：2012. 3. 2

国内外の別：国内

②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：2638884

取得年月日：2012. 1. 3

国内外の別：国外（カナダ）

③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：ビークル

種類：特許

番号：7951379

取得年月日：2011. 5. 31

国内外の別：国外（アメリカ）

④名称：タンパク質中空ナノ粒子とそれを用いた物質運搬体、ならびに細胞への物質導入方法

発明者：黒田俊一、谷澤克行、妹尾昌治、近藤昭彦、上田政和

権利者：ビークル

種類：特許

番号：7597905

取得年月日：2009. 10. 6

国内外の別：国外（アメリカ）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 俊一 (KURODA SHUNICHI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：60263406

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし