

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390443

研究課題名（和文） バイオナノカプセルの眼疾患への応用

研究課題名（英文） Application of bionanocapsule on eye disease

研究代表者

大黒 伸行（OGURO NOBUYUKI）

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00303967

研究成果の概要（和文）：バイオナノカプセル（BNC）に抗E-セレクトリン抗体あるいは抗Thy1抗体を修飾し、分子標的ドラッグデリバリーシステム開発を試みた。今回の研究結果は、それらの分子を発現している細胞に遺伝子を送達することが可能であることが示された。しかしながら、遺伝子蛋白発現効率が低いため、BNCと遺伝子複合体作成方法に改良を加えた。その結果、*in vitro* では発現効率の優位な上昇を認めた。今後 *in vivo* での検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：We attempted to develop a new drug delivery system (DDS) targeting specific molecules, such as E-selectin or Thy1, with using anti-E-selectin or anti-Thy1 antibody conjugated bionanocapsule (BNC). The results in this study clearly demonstrated that this nano-device could be a gene deliver system targeting cells expressed these molecules. However, since level of protein expression by transferred Vector-gene was poor, we had to improve the method in the fusion process of BNC and DNA vector. This improvement made it possible to increase protein expression level significantly *in vitro*. Further *in vivo* study should be done to achieve clinical application of this DDS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：バイオナノカプセル、ドラッグデリバリーシステム、実験的ぶどう膜炎、視神経切断モデル、血管内皮細胞、網膜神経節細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 共同研究者の黒田らは、ヒト肝臓に対し極めて高い特異性及び感染性を有するB

型肝炎ウイルス（HBV）の感染機構を担う外皮タンパク質を、組換え酵母で「バイオナノカプセル（BNC）」として大量生産し、

BNC内部に遺伝子や薬剤を封入して、ヒト肝臓特異的で高効率な遺伝子・薬剤導入用ベクターとすることに成功した。

(2)我々は産業総合研究所で開発された糖鎖(シアリルルイスX)結合型リボソームを用いて、効率の極めて高い眼炎症部位特異的ドラッグデリバリーシステム(DDS)が可能であることを示していた。

## 2. 研究の目的

(1)炎症部位の血管内皮細胞標的  
炎症部位における血管内皮細胞にはE、P-セレクトインが発現している。これらに対する抗体をBNCに標識し、炎症部位を標的としたDDSが可能か否かを検討する。また、BNC内部に遺伝子を導入し、標的細胞に遺伝子を組み込ませることが可能か否かについて検討する。

(2)網膜神経節細胞標的  
眼科領域で、他に疾患と関連した細胞で、細胞膜表面に特異的な蛋白を発現しているものとして、網膜神経節細胞(発現蛋白:Thy1)が挙げられる。緑内障はわが国における主たる失明原因のひとつであり、その本態は網膜神経節細胞のアポトーシスといわれている。それゆえ、網膜神経節細胞を標的化した治療の開発は緑内障治療の本質であるといえる。BNCにThy1分子に対する抗体を標識し、網膜神経節細胞標的化を試みる。

## 3. 研究の方法

(1)炎症部位の血管内皮細胞標的  
①既報に従い実験的ぶどう膜炎マウスを作成したのち、尾静脈から抗E-セレクトイン抗体で修飾したBNC(green fluorescein protein:GFP遺伝子付帯)を投与した。投与後5日目にマウス眼球を摘出し、フラットマウント法にて網膜血管におけるGFP発現を検討した。コントロールとして抗体の修飾されていないBNCを用いた。

②①で血管内皮細胞に導入したGFPの定量化を試みた。具体的には、吸光度測定とGFP遺伝子のRT-PCRを施行した。

(2)網膜神経節細胞標的  
①まずThy1分子標的が可能か否かを検討するために、Thy1分子を発現している副腎髄質腫瘍細胞(PC12)を用いて*in vitro*での検討を行った。ローダミン標識BNCに抗Thy1抗体を修飾させたものをPC12の培養液中に投与し、細胞表面のローダミン蛍光発現を経時的に観察した。

②GFP遺伝子付帯BNCに抗Thy1抗体を修

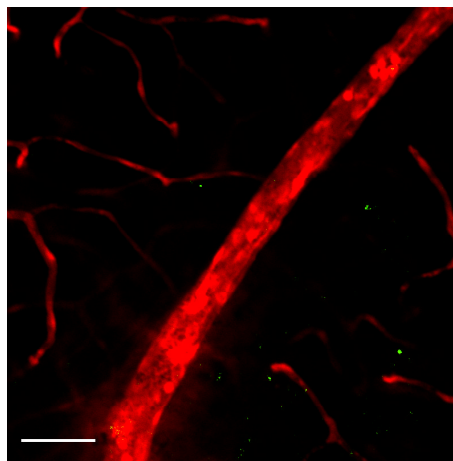
飾させ、①と同じ実験を行いGFP発現について経時的に観察した。

(3)BNC-lipoplex複合体作成方法の改良  
①標的化した血管内皮細胞における遺伝子発現効率を高めるためにBNCにDNAを付帯させる過程を再検討した。BNCにDNAを付帯させる場合、まずDNAにリボソームを吸着させ(lipoplex)、その複合体にBNCを融合させる(BNC-lipoplex複合体)。融合時のpH条件を振って*in vitro*での最適条件の検索を行った。検討にはHela細胞とHuh7細胞を用いた。また、DNAとしてルシフェラーゼ遺伝子を用い、細胞への導入効率および遺伝子発現効率をルシフェラーゼ活性で評価した。

②BNCの物質輸送は細胞質内までが限度であるため、付帯させる核酸としてDNAベクターを用いたのでは蛋白発現効率が弱いことが危惧される。そこで、ルシフェラーゼをコードするmRNAを作成してBNC-lipoplex複合体に包含してHela細胞とHuh7細胞の培養液中に添加し、ルシフェラーゼの発現を検討した。コントロールにはルシフェラーゼDNAを用いた。

## 4. 研究成果

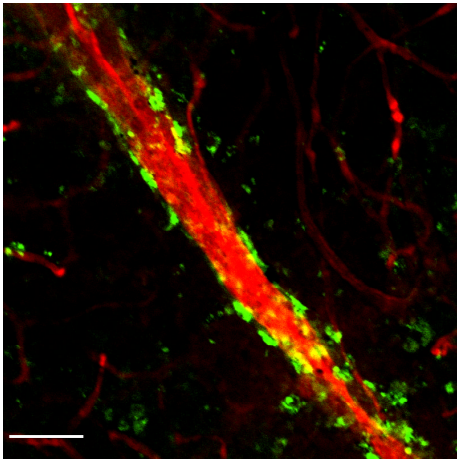
(1)炎症部位の血管内皮細胞標的  
①の結果



コントロール(上図)ではGFPの発現を認めないが、抗E-セレクトイン抗体で修飾したBNCを投与したマウス(次ページ左上図)では、GFPを発現している細胞が多数認められる。(BNC投与前にアクリジンオレンジを投与しているため、血管内空が赤く染色されている。)

尾静脈から投与した遺伝子が遠隔臓器である眼の炎症血管部位に集積し発現したというこの結果は、単に標的細胞に対するDDSを可能にしたというだけでなく、遺伝子治療や再生医療にも応用できる可能性を秘め

ているといえる。



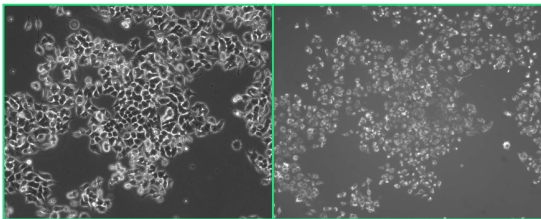
## ②の結果

しかしながら、①における GFP の定量は吸光度測定、RT-PCRともに困難であり、遺伝子導入効率が極めて低いことが示唆された。これを改善するため、実験(3)において BNC-lipoplex 複合体作成方法に改良を加えたので後述する。

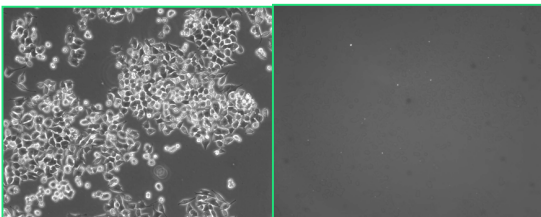
### (2) 網膜神経節細胞標的

#### ①の結果

ローダミン標識 BNC に抗 Thy1 抗体を修飾させたものを PC12 の培養液中に投与したところ、ほとんどの細胞でローダミン蛍光色素の発現を認めた。下図左は通常の光学顕微鏡で撮影したもので、右が同じものの蛍光顕微鏡写真である。存在しているほとんどの細胞が蛍光色素を発しているのがわかる。



一方、コントロールを投与したものでは、すべての細胞が蛍光色素を発していない(下図)。



この結果から、*in vitro* においては BNC を用いて Thy1 分子を標的とした DDS が可能であることを示唆しており、緑内障における網膜神経節細胞保護治療への道が開けたものといえる。今後 *in vivo* での検討を行っていく必要がある。

#### ②の結果

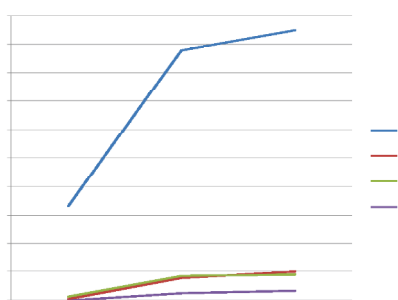
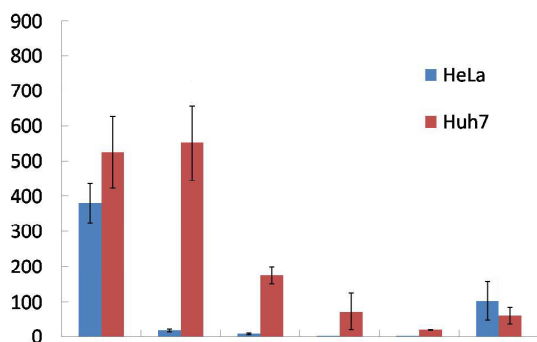
しかしながら、GFP 遺伝子付帯 BNC を用いた実験では、GFP の発現を認めることが出来なかった。この原因として、1) BNC は細胞表面に付着しており、細胞内に取り込まれていない、2) BNC は細胞内に取り込まれているが、GFP の発現効率が極めて悪い、のいずれかが考えられる。共同研究者の黒田らによる以前の研究では、BNC の物質輸送は細胞質内までが限度であるため、付帯させる核酸として DNA ベクターを用いたのでは蛋白発現効率が弱いことが示されており、恐らくは後者によるものと推測される。いずれにせよ、この点を改善する必要が今回の実験から明らかとなった。

### (3) BNC-lipoplex 複合体作成方法の改良

#### ①の結果

lipoplex に BNC を融合させるときの pH 条件を振って検討したところ、中性付近では BNC-lipoplex 複合体形成は良好ではなく、DNA の持ち込み量が著しく低いことが明らかとなった。そこで、pH を酸性側にシフトすると、pH が 3 あたりで複合体の形成が良好になることが判明した。また、pH 3 付近で作成した粒子のみが Cationic な性質を有していなかった。特に pH 3 付近について、さらに pH 3-1 と 3-2 のふたつに区分して検討した結果、pH 3-1 では逆に Anionic な性質が強く出ていた。この pH 3 付近を用いることで生体内動態が改善される可能性が示唆された。

次に、Hela 細胞と Huh7 細胞にそれぞれの pH 条件で作成した BNC-lipoplex 複合体を投与し、ルシフェラーゼアッセイを行った。下図の縦軸がアッセイにおける Relative luminescence unit を示している(従来の BNC-lipoplex 複合体による値を 1 として算出)。また、コントロールとして BNC と融合させる前の lipoplex を用いている。横軸は、左から pH 3-1, 3-2, 5, 7, 9、lipoplex である。明らかに pH 3 において luminescence unit が著しく増加しており、特に pH 3-2 で作成したものでは Huh7 細胞特異的な発現増加を認めていた(次ページ左上図)。これが何を意味するのかは今後の検討課題としたいが、複合体作成条件を pH 3 に変更することで、遺伝子導入効率が飛躍的に増大することが示された意義は大きい。



## ②の結果（上図参照）

従来型の BNC-lipoplex 複合体を用いた実験であるが、発現遺伝子を DNA から RNA に変えたところ、RNA では極めて早期からルシフェラーゼ蛋白の発現を認めた。pH を最適化した複合体での検討を急いでいるところであるが、この結果から、発現ベクターとしては DNA よりも RNA のほうが適していることが明らかである。ただし、RNA では DNA に比較して発現の持続期間が短いため、用途に合わせて使い分ける必要があると考えられる。

今回の検討から、BNC-lipoplex 複合体に抗体を修飾することで、標的とする細胞に特異的に遺伝子を導入することが可能であることが示された意義は大きい。今後、改良 BNC-lipoplex 複合体を用いて、実験(1)②、(2)②を検討していき、臨床応用への道筋をつけたいと考えている。

## 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 5 件)

1. Iijima M, ...Ohguro N (7,8 番目):  
Bionanocapsule-based enzyme-antibody conjugates for enzyme-linked immunosorbent assay. Anal Biochem. 396:257-61, 2010 査読有
2. Yamaguchi M, ...Ohguro N (7, 6 番目):  
Mucoadhesive properties of chitosan-coated ophthalmic lipid emulsion containing indomethacin in tear fluid. Biol Pharm Bull. 32:1266-71.2009 査読有
3. Arakawa Y, Hashida N, Ohguro N, (10,3 番目): Eye-concentrated distribution of dexamethasone carried by-sugar-chain modified liposome in experimental autoimmune uveoretinitis mice. Biomed Res. 28:331-4.2008 査読有
4. Hashida N, Ohguro N, (8,2 番目):  
High-efficacy site-directed drug delivery system using sialyl-Lewis X conjugated liposome. Exp Eye Res. 86:138-49.2008 査読有
5. Mashimo H, Ohguro N, (6,2 番目):  
Neutrophil chemotaxis and local expression of interleukin-10 in the tolerance of endotoxin-induced uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 49:5450-7.2008 査読有

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 炎症部位特異的物質送達用バイオナノカプセル

発明者: 黒田俊一、田野保雄、大黒伸行、日詰信吾

権利者: 国立大学法人 大阪大学、(株) ビークル

種類: 特願

番号: 2007-296136

出願年月日: 平成 19 年 11 月 14 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大黒 伸行 (OGURO NOBUYUKI)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：00303967

(2) 研究分担者

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

大鳥 安正 (OTORI YASUMASA)  
大阪大・医学系研究科・講師  
研究者番号：40303953