

生体内ピンポイント投与を可能にするバイオナノカプセル

鄭 周姫,^{a,b} 粕谷武史,^a 谷澤克行,^{a,b,c} 黒田俊一^{*,a,b,c}Bio-nanocapsules for *In vivo* Pinpoint Drug DeliveryJoohee JUNG,^{a,b} Takeshi KASUYA,^a Katsuyuki TANIZAWA,^{a,b,c} and Shun'ichi KURODA^{*,a,b,c}

^aThe Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, 8-1 Mihogaoka, Ibaraki City 567-0047, Japan, ^bThe Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency (JST), 4-1-8 Honmachi, Kawaguchi City 332-0012, Japan, and ^cBeacle, Inc., 5303 Haga, Okayama City 701-1221, Japan

(Received January 5, 2007)

To maximize the beneficial effects and minimize the side effect of drugs, DDS (drug delivery system) has been attracted many researchers in the recent drug development. Especially, the *in vivo* pinpoint delivery system for drugs is very important and key technology for developing the next generations of anti-cancer drugs and gene therapies. Bio-nanocapsule (BNC) is recombinant yeast-derived hepatitis B virus surface antigen particle, which has been used as a recombinant hepatitis B vaccine for the last 20 years in the world. BNC can incorporate various materials (chemical compounds, proteins, genes, siRNA, etc) by the fusion with liposome, and deliver them to the organs and tissues *in vivo* specifically by the action of bio-recognition molecules on the BNC's surface. The transfection efficiency is significantly higher than that of liposome, because BNC harbors the complete set of hepatitis B virus infection machinery. Recently, we succeeded in the *in vivo* retargeting of BNC by displaying either antibody or homing peptide, less than 10 amino acid residues for *in vivo* targeting. BNC is a hybrid of liposome and virus, and very flexible system for *in vivo* retargeting. BNC might be very promising carriers in the next generation of DDS.

Key words—bio-nanocapsule; drug delivery system; *in vivo* pinpoint delivery; gene therapy

1. はじめに

新薬の開発研究において、培養細胞やタンパク質を用いる *in vitro* スクリーニング系により選抜されてきた候補薬物が、*in vivo* 系において期待通りの薬効を示すかどうかは、実験動物に実際に投与するまで分からないことが多い。特に、候補薬物の生体内での動態解析、つまり ADME (吸収・分布・代謝・排泄過程) の解析は、その薬効を有効に引き出すために重要である。具体的には、薬物が速やかに体内に吸収され、作動可能な状態で体内に存在し、適切な濃度が一定期間保たれ、その後、薬効が現れて不要になると速やかに体外へ排泄されることが必要である。*In vitro* 系における成績が優秀な候補薬

物であっても、いずれかの段階が不適切であれば、人体において無効であったり副作用を生じたりする。そのために、従来の製剤学では、候補薬物の水溶性、生体膜透過性、生体内での安定性を改良したり、プロドラッグ化したり、投与方法を変更したりして、人体において薬効を示すように薬物の最適化を行い (広義の drug delivery system: DDS), これまでに数多くの医薬品を生み出してきた。しかしながら、抗癌剤、サイトカイン、治療用遺伝子などの著効が期待されながらも重篤な副作用を示す薬物や、ペプチドや RNA などの生体内安定性が極めて低い薬物などが、製剤学上の課題として依然として残っていた。そこで最近では、これらの薬物を医薬品にするために、「薬物を必要な量だけ必要な時期に必要な場所に送達する」という生体内における薬物の時空間的制御 (狭義の DDS) について数多くの研究がなされている。本稿では、薬物の時空間的制御に関する研究の中でも、特に研究が盛んな「生体内における細胞及び組織への薬剤標的化技術 (*In*

^a大阪大学産業科学研究所 (〒567-0047 茨木市美穂ヶ丘 8-1), ^bCREST, 科学振興機構 (〒332-0012 川口市本町 4-1-8), ^c(株)ピークル (〒701-1221 岡山市芳賀 5303)

*e-mail: skuroda@sanken.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S2 で発表したものを中心に記述したものである。

vivo Targeting)」を概説するとともに、筆者らが開発したウイルス法とリポソーム法のハイブリッド型である「バイオナノカプセル法 (Bio-nanocapsule: BNC)」を紹介する。BNC 法は、低分子化合物、遺伝子、タンパク質などの様々な薬物を包含することができる全く新しいキャリアー(運搬体)であり、今後の医薬品を革新的に変えてゆくと期待されている *In vivo Pinpoint Drug/Gene Delivery System* (薬剤及び遺伝子の生体内ピンポイント投与システム)のプラットフォーム技術であり、*The Lancet* 誌¹⁾や *Nature Materials* 誌²⁾などにも紹介された。本技術が実用化されれば、画期的な新薬が生まれるだけでなく、既存の薬剤に新たな価値を比較的容易に付与することができるので、医薬品開発全体に掛かるコストを下げることが期待される。

2. *In Vivo Targeting* を達成する技術

2-1. EPR 効果 *In vivo targeting* の実現には、2段階の技術的問題をクリアしないと行けない。

1) 生体内に投与された薬剤(遺伝子を含む)を、血流により目的の臓器及び組織に到達させる技術(マクロレベルの標的化技術)と、2) 臓器及び組織内部で正常細胞と目的細胞(Target cells)を見分けて、目的細胞だけに薬剤を導入、若しくは作動させる技術(ミクロレベルの標的化技術)が必要である。

まず、マクロレベルの標的化技術としては、EPR 効果(enhanced permeation and retention effect)がある。これは、癌組織に含まれる新生血管の血管壁細胞間隙が正常組織とは異なり 100 nm より大きいことから、血流中を循環する直径約 100 nm の物質が癌組織内の血管壁外に浸潤して、次第に癌組織に蓄積する現象である。既にリポソームや高分子ミセルからなる直径 100 nm のキャリアーが開発されており、内部に抗癌剤を包含させ、EPR 効果により癌組織特異的な抗癌剤の送達に成功している。ただ、キャリアーのサイズと濃度差に依存した受動的標的化(passive targeting)であり、血液中のキャリアー濃度を比較的高めに保つ必要があるのと、癌以外の組織に対する標的化には使用できない欠点がある。特に通常組織を標的化する場合には、直径を数 nm 単位で調節した 100 nm より小さいキャリアーが必要であると考えられている。次に、ミクロレベルの標的化技術としては、薬剤(遺伝子を含む)を目的細胞のみならず正常細胞にも導入するが、正

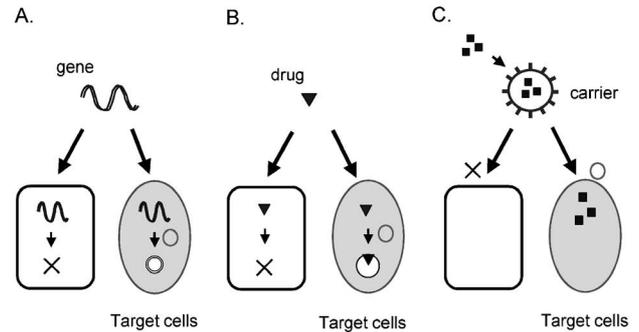


Fig. 1. Strategy for *In vivo Targeting*

A: Cell-specific expression of genes, B: Cell-specific activation of drugs, C: Cell-specific delivery of materials with carrier.

常細胞では作動させず、目的細胞のみで作動させる技術(Figs. 1(A), (B)や、正常細胞と目的細胞の表層状態の差を見分けて、目的細胞のみに薬剤(遺伝子を含む)を導入する技術(能動的標的化(active targeting); Fig. 1(C))などがある。なお、後述する BNC 技術は、EPR 効果以外に様々な生体認識分子をキャリアー表面に提示することで能動的標的化を実現している。

2-2. 目的細胞特異的な遺伝子発現技術

欧米で行われている遺伝子治療の現場において使用されている治療用遺伝子のキャリアーは、広範な細胞に感染することができるアデノウイルス、レトロウイルス、HIV ウイルス、アデノ随伴ウイルスなどがある。これらは、生体内において高い感染性を有するので、患部以外の部位に対して望まれない遺伝子導入を行うことがある。そのために、たとえ目的細胞以外に治療用遺伝子が導入されても作動しないようにするフェイルセーフの機構が必要である。具体的には、治療用遺伝子の発現ベクターに含まれるプロモーター(promoter)やエンハンサー(enhancer)を目的細胞特異的に作動するように工夫されている



黒田俊一

大阪大学産業科学研究所生体触媒科学研究分野助教授。1961年大分県生まれ。1984年京都大学農学部卒業。1986年京都大学大学院農学研究科修了。武田薬品工業(株)勤務。神戸大学バイオシグナル研究センターを経て1998年より現職。大学発ベンチャーである(株)ピークルと(株)ジェノラック BL の取締役を兼任。現在、細胞内シグナル伝達機構の解析から難治性疾患の治療法の開発、及び自ら開発したバイオナノカプセル技術による生体内ピンポイント薬物・遺伝子送達技術の完成を目指している。

(Fig. 1(A)). 具体的には, albumin promoter 及び α -1-antitrypsin promoter などが肝臓特異的プロモーターとして *in vivo* 系でも使用可能なことが示されている.³⁾ また, α -fetoprotein enhancer と albumin promoter の組合せで, 肝臓特異的な遺伝子発現が可能なることも *in vivo* 系で判明している.⁴⁾ さらに, osteocalcin promoter が骨肉腫と骨芽細胞特異的に発現することも分かっている.⁵⁾ 他にも様々な細胞及び組織特異的な promoter 及び enhancer が報告されているが, 概して発現制御の緩いものが多いことから, 現実的にはウイルスベクターと本技術のみで *In vivo* Pinpoint Gene Therapy (生体内の任意の組織及び細胞を対象とするピンポイント遺伝子治療) を達成するのは困難と考えられている。

2-3. RNAi 薬剤の生体内投与技術 1998年, 特定の塩基配列を持つ二重鎖 RNA (dsRNA) が, 相補的な塩基配列を有する遺伝子の発現を効果的に抑制する現象 (RNAi: RNA interference) を線虫において明らかにされた。⁶⁾ その後, 様々な生物においても同様の現象が見い出された。さらに, 化学合成可能な siRNA (small interfering RNA) が同様の活性を有することが判明し, 今までの多大な労力を要する発生工学的手法による遺伝子ノックアウトよりも, 簡単かつ迅速に生体内の任意の遺伝子発現を抑制できるようになった。最近では, 各遺伝子の生理的意義の解析のみならず, 各種疾患の治療に siRNA を使用する試みがなされている (RNAi 医薬品)。しかし, siRNA は約 20 塩基の RNA であり, 生体内安定性が極めて悪く, その効果が生体内で数日間しか維持できないので, 長期間の遺伝子発現抑制効果が求められる疾患治療には適していなかった。そこで現在では, 生体内で siRNA を長期間発現するベクターの開発が行われている。また, 局所的な siRNA の導入も行われており, VEGF (血管内皮細胞成長因子) に対する siRNA をマウスの網膜下腔に直接投与して眼の血管形成を抑制する報告がある。⁷⁾ さらに, マウス尾静脈から非修飾 siRNA を hydrodynamic 法で導入すると肝細胞内で作動することも知られている。⁸⁾ 一方, siRNA をコレステロールで修飾すると, 血液中での分解が抑制され, 通常の静脈注射でも肝臓に導入することができた。⁹⁾ その他にも脂質によるナノ粒子に siRNA を包含させたものが, EPR 効果により腫瘍に集積する

ことが報告されている。¹⁰⁻¹³⁾ 現在, 各種疾患と遺伝子発現との関係が徐々に明らかにされており, 今後も RNAi 医薬品の開発は盛んになると考えられる。しかし, そのためには siRNA の疾患部位特異的な導入方法, 細胞内への効率的な導入法, 分解・排出を抑制する方法などを開発する必要がある。

2-4. 細胞内シグナル応答性ポリマー 目的細胞内のみで遺伝子発現を行うため, すべての細胞に DNA・ポリマー複合体を導入したのち, 目的細胞特異的な細胞内シグナルに反応して複合体の安定性を変化させて, DNA を作動可能な状態で目的細胞内に放出する方法が報告された。¹⁴⁾ 例えば, メラノーマや大腸癌にはプロテインキナーゼ A (PKA) の活性が, アルツハイマー病変部位や肝臓にはプロテアーゼの一種であるカスパーゼ 3 の活性が非常に強いことが知られている。PAK (polyacrylamide possessing substrates for protein kinase A) は PKA の基質ペプチドを含むポリマーであり, DNA と複合体を形成する。この複合体は細胞内で PKA シグナルにより崩壊され, DNA を遊離して遺伝子発現を促すことが確認された。¹⁵⁾ また, ポリマー CPCctat (cationic polymer possessing the cleavage site for caspase-3) も DNA と複合体を形成し, 細胞内のカスパーゼ 3 シグナルにより遺伝子発現を促すことも報告された。¹⁶⁾ これらのポリマーは Fig. 1(A) に該当し, 目的細胞特異的な遺伝子治療薬として可能性がある。そのためには DNA・ポリマー複合体を高効率で目的の臓器や組織に導入する方法の開発が課題として残っている。

3. キャリアーを用いた薬剤送達技術

3-1. ウイルスベクター法 ウイルスは宿主細胞に感染して自分自身の遺伝子を導入して増幅することから, ウイルスゲノム内に治療用遺伝子を組み込むことで遺伝子キャリアー (別名ウイルスベクター) として, 患部に遺伝子を送達させることが広く行われている。細胞内への遺伝子導入効率は, ウイルスの感染機構を利用するため他の遺伝子キャリアーに比べて通常高い。¹⁷⁾ 主なウイルスベクターとしては, アデノウイルス, アデノ随伴ウイルス, レトロウイルス, HIV, センダイウイルス¹⁸⁾ などがあリ, 細胞や組織への感染性はいずれも高いが, 宿主細胞域が極めて広範で能動的な標的化能力はほとんどない。そこで, 生体内における期待されない遺伝

子導入（副作用）を抑制するために、ウイルスベクターの能動的標的化技術の開発が進んでいる。具体的には、センダイウイルスの表面に磁性ナノ粒子を付加して、磁力の作用により組織特異的な導入効率を向上させた報告がある。¹⁹⁾ また、癌細胞を認識するペプチドをバキュロウイルスの表面に提示して、*in vitro* ながら遺伝子を癌細胞特異的に送達した報告もある。²⁰⁾ しかし、これらの改変型ウイルスベクターを臨床応用するには、相当高度な生体内標的化技術を実現しないと、依然としてウイルスベクター本来の課題が残る。まず、ウイルスベクターは概して大量生産が困難であり、生産者への感染事故を防ぐ方策も必要なので、医薬品として生産するコストが非常に高くなる。また、ヒトは様々なウイルスに感作されているので、投与時にアナフィラキシーショックを起こす可能性が高い。さらに、ウイルスゲノム由来の遺伝子を同時に投与するので、患者の正常な遺伝子情報をかく乱する可能性がある。実際に、ウイルスベクターを利用した臨床応用で白血病の発症例²¹⁾や死亡例²²⁾の報告がある。

3-2. 非ウイルスベクター法 上述したウイルス由来の副作用を回避し、飛躍的に安全性を高めるために非ウイルスベクター法が開発された。最も代表的なものはリポソームであり、安全性の向上以外にも、大量生産が容易で、遺伝子から低分子化合物まで様々な物質を導入可能なことが長所である。しかし、リポソームの細胞内への導入効率は *endocytosis* によるためウイルスと比較して極めて低く、また広範な細胞に取り込まれる。また、血液中の補体により分解されやすいため生体内で安定性が低いことが短所である。このような問題を改善するために、リポソームを強い膜融合活性を有するセンダイウイルスと融合させてハイグロマイシン B を HepG2 細胞に送達させたり、²³⁾ *in vivo* で遺伝子導

入させたりしている。²⁴⁾ しかし、生体内における能動的標的化を実現した非ウイルスベクター法は極めて少ないのが現状である。

リポソーム以外にも様々な材料を用いたポリマーが非ウイルスベクター法として使われている。例えば、DNA と複合体形成するカチオン性ポリマーであるキトサン、^{25,26)} ポリエチレンイミン、²⁷⁾ poly-L-lysine^{28,29)} などが DNA 導入用キャリアーとして使用されている。これらのキャリアーに生体内での安定性や細胞及び組織特異性を持たせるために、様々な工夫がされている。例えば、PEG 化ポリマーにより生体内での安定性³⁰⁾を高めたり、ガラクトシル化、^{31,32)} ガラクトースへの置換、³³⁾ ペプチドとの結合³⁴⁾などで細胞特異性（特に肝臓へ）を付与したりすることも報告されている。しかしながら、これらのカチオン性ポリマーは核酸には適しているが他の物質に不向きな場合も多く、生体内において非特異的に細胞に取り込まれる性質を有するために標的化の課題が残っている。

3-3. バイオナノカプセル技術 ウイルスベクターや非ウイルスベクターには、上述した通り (Table 1) 一長一短があり、いまだ決定的な薬剤キャリアーは開発されていない。その中で、われわれのグループが従来のキャリアーの欠点を解決した新たなキャリアー「バイオナノカプセル (BNC)」の開発に成功した。

3-3-1. バイオナノカプセルとは BNC とは、B 型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus: HBV) の外皮タンパク質 (HBV surface antigen: HBsAg) が、宿主由来の脂質二重膜上に膜タンパク質として存在し、直径約 100 nm の中空粒子を形成したものである (Fig. 2(A))。HBsAg タンパク質群は S タンパク質 (226 アミノ酸残基) の N 末端側に pre-S2 領域 (55 アミノ酸残基) と pre-S1 領域 (108 アミノ

Table 1. Properties of Various Drug Carriers

	Virus vectors		Non-virus vectors	BNC
Acceptable drugs	Gene only	Gene, siRNA, Protein, chemical compound	Gene, siRNA, Protein, chemical compound	
Transfection efficiency (<i>in vitro</i>)	○		×-△	○
Pathogenicity	×-△		○	○
Productivity	×		○	○
<i>In vivo</i> targeting	×		×-△	○

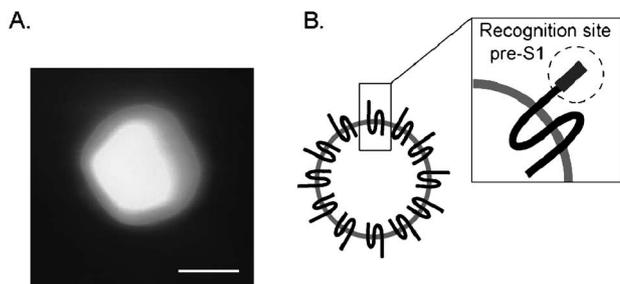


Fig. 2. Bio-nanocapsules (BNC)

A: AFM observation of BNC. BNC is about 100 nm in diameter, B: Model of BNC. The N-terminal pre-S1 region functions as a human hepatocyte-specific receptor *in vivo*.

酸残基)が付加しており、通常Lタンパク質とも呼ばれている (Fig. 2(B)).³⁵⁻³⁷⁾ そのうち、pre-S1領域のN末端側約70アミノ酸残基がヒト肝臓特異的なレセプターであり、HBVの厳格なヒト及びチンパンジー肝臓特異的な感染機構を担っている。³⁸⁻⁴⁰⁾ このような肝臓選択性は、他のキャリアーがEPR効果によって癌細胞に物質を送達する受動的標的化とは異なり、HBVが本来備えている能動的標的化機構であり、BNCも同機構を引き継いでいる (Fig. 2(B)). また最近では、pre-S2領域のC末端側とS領域に細胞膜との融合を促進する活性が見出されている (未発表データ)。つまり、HBVは、生体内ではpre-S1領域で肝細胞を認識して接近し、pre-S2領域とS領域によりビリオンを肝細胞内に取り込ませており、BNCも同様に挙動する。さらに、BNCには、HBVのようにウイルスのゲノムや遺伝子複製に必要な酵素などが含まれていないため、安全である。実際、BNCは遺伝子組換え酵母を用いて大量生産される (培養液1 lから10 mgの精製BNCが得られる)⁴¹⁾が、この粒子は既に全世界で20年以上も臨床で使用されてきたB型肝炎ワクチンと同じ構造であるので、BNCを臨床応用する際の毒性や安全性に対する懸念を著しく低減できる。

3-3-2. バイオナノカプセル内部への物質封入
実際にBNC内部に物質を封入するのは、当初はエレクトロポレーションを用いて物質をBNC内部に封入していたが、⁴²⁾ BNCを医薬品として開発する場合に大量生産に不向きであることと、封入効率が一定でないことから、現在では一度リポソーム内部に物質を封入してBNCの膜融合活性により融合す

ることによりBNC内部に効率的に物質を封入している (リポソーム融合法)。⁴³⁾ また、リポソームに封入できるものであればすべてBNC内部に移すことができるので、遺伝子、薬剤、タンパク質、siRNAなどの送達にBNCは使用できる (Fig. 3(A)). 特に、従来不可能であった直径100 nmのポリスチレンビーズや数十 kbpの発現ベクターをBNC内部に封入して、生体内でのピンポイントデリバリーができるようになった。

3-3-3. バイオナノカプセルの使用例 緑色蛍光タンパク質 (GFP) の発現遺伝子を封入したBNCを、ヒト肝臓癌由来細胞株 (HepG2, NuE) と他組織由来細胞株 (WiDr, HT29, A431) の培養液中に添加すると、ヒト肝臓癌由来細胞株のみにGFP由来の蛍光を観察することができた (Fig. 3(B)).⁴²⁾ 従来のカチオン性リポソームを使用する遺伝子導入試薬と比較すると、単位DNA当たりのGFP発現量は100倍以上であった。これは、BNCがリポソームとは異なりendocytosisに依存して細胞内に送達されるだけでなく、HBV由来の感染機構を保持していることを示している。さらに、ヌードマウス背部に上記細胞を移植して固形癌を形成させ (xenograft model)、尾静脈からGFP発現遺伝子を封入したBNCを約50 μ g投与すると、4日後にヒト肝臓癌由来組織においてのみGFPの発現が観察された。⁴²⁾ このとき、マウスの正常組織 (含む肝臓、脾臓、肺) でもGFP由来の蛍光は観察されなかった。また、遺伝子以外にも低分子化合物であるカルセインをBNCに封入して同様の実験を行った場合でも、ヒト肝臓癌由来組織においてのみでしか蛍光がみられなかった。以上の結果から、BNCがHBV由来のヒト肝臓組織特異的な能動的標的化機構を有し、生体内でピンポイントで遺伝子や薬物をデリバリーすることが確認された。実際に、先天的に血液凝固因子 (VIII 又は IX) が正常に合成されない血友病 A 又は B の遺伝子治療のモデル実験を行った。具体的には、血液凝固因子 IX の発現ベクター (通常のCMVプロモーターで駆動する発現ベクター) をBNCに封入して、上記のxenograft modelに投与した。これは、当時ヒト肝臓を実験動物内で再現できる系がxenograft modelしかない事情から使用した (現在では、ヒト肝細胞をマウス肝細胞と置換したヒト肝臓キメラマウスが利用可能で

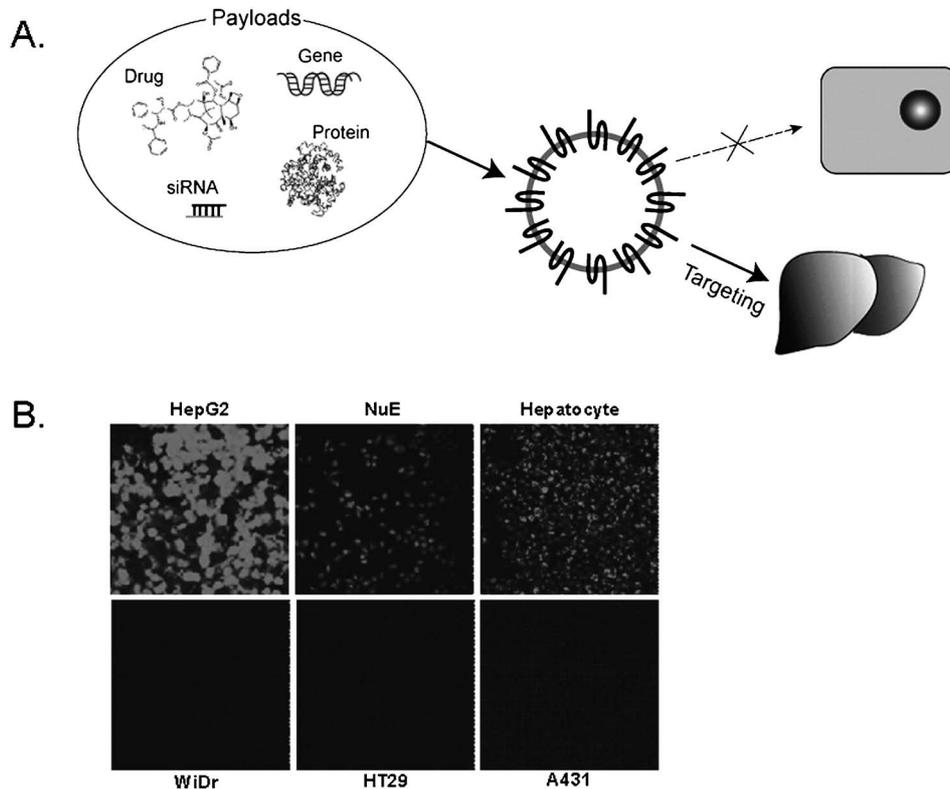


Fig. 3. Pinpoint Delivery of Drugs to Human Hepatocytes Using BNC

A: Concept of pinpoint delivery to hepatocytes using BNC, B: *Ex vivo* GFP gene delivery with BNC. Upper panels are human liver-derived cells. Lower panels are human non-liver-derived cells.

あり、最近では HBV に対して感染性を示すトランスジェニック動物の生産にも成功している（未発表データ）。その結果、単回投与のみで、中程度の血友病治療に必要な濃度の血液凝固因子 IX が血液中に 1 ヶ月以上発現された。⁴²⁾ さらに発現ベクターと実験動物を最適化すれば、単回投与のみで半年から 1 年の血液凝固因子の発現が可能になるかもしれない。特に BNC は従来のウイルスベクターとは異なり送達できる遺伝子の大きさに制限がない。そのため、血液凝固因子遺伝子やジストロフィンのように巨大な遺伝子を治療に用いるときは、BNC はウイルスベクターに替る有望な方法になると考えられる。

3-3-4. バイオナノカプセルの再標的化 BNC は pre-S1 領域によりヒト肝臓を認識する。同領域を様々な生体認識分子に置換することで、他の細胞や組織を標的にすることが可能である。生体認識分子としては、抗体、糖鎖、サイトカイン、同レセプター及びホーミングペプチド（生体内で組織特異性を持つ短鎖ペプチド）など様々なものが考えられ、その臨床応用に向けて研究が進んでいる（Fig. 4）。

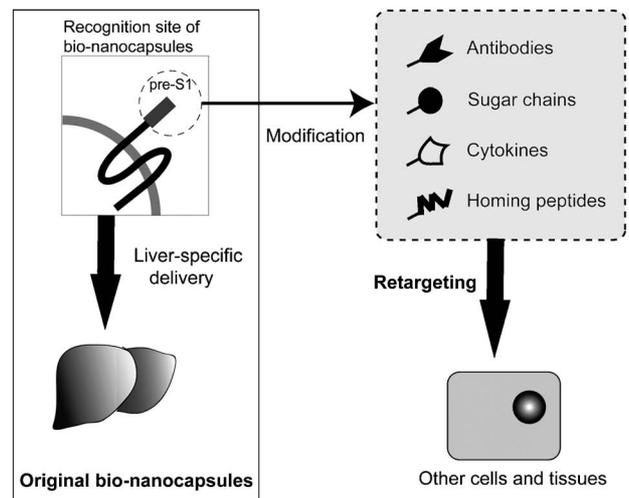


Fig. 4. Retargeting Strategy of BNC

1) サイトカイン提示 BNC われわれは上皮成長因子 (EGF, Epidermal Growth Factor) を Pre-S1 領域の替りに提示した BNC を遺伝子組換え酵母から生産することに成功した。この EGF 提示型 BNC にカルセインを導入し、各種培養細胞に添加したと

ころ、ヒト肝臓由来細胞には蛍光が観察されず、EGF 受容体を細胞表面に大量発現している細胞 (A431) のみに蛍光が観察された。⁴²⁾ また、このときの感染効率はおリジナル BNC のヒト肝臓癌由来細胞に対するものに匹敵していた。その結果、BNC の Pre-S1 領域をカセット式に生体認識分子と交換することにより標的細胞を切り替えられることが明らかになった。

2) 抗体提示 BNC 抗体は多彩な分子を認識することができるので、BNC の再標的化用の生体認識分子としては最適である。われわれは既に一本鎖抗体を提示した BNC を遺伝子組換え酵母を用いて生産することに成功しているが、生産性が著しく悪いので、その効果の検討が進んでいない。しかし、*Staphylococcus aureus* 由来の Protein A 由来の IgG Fc 結合ドメインである Z ドメインを 2 量体にした ZZ ドメインを、Pre-S1 領域と交換した ZZ ドメイン提示型 BNC の遺伝子組換え酵母による大量生産に成功した。この ZZ 提示型 BNC は、抗体と共存させると、自動的に抗体提示型 BNC となる。例えば、リソソーム融合法により蛍光物質や遺伝子を封入した ZZ 提示型 BNC と EGFR 抗体を、室温で 30 分間反応させたのち、培養細胞へ添加したり、xenograft model に尾静脈から投与すると、EGFR を発現する細胞及び組織のみに物質導入できることが確認された (近藤ら、発表準備中)。現在では、EGFR 抗体以外の抗体でも、その特異性に依存した BNC の再標的化に成功している。

3) ホーミングペプチド提示型 BNC 生体内で短いペプチド (通常 10 アミノ酸残基以下) が、郵便番号のように様々な臓器や細胞を識別できる現象が、マウス、ラット及びヒトにおいて見出されている。^{44,45)} 最近、われわれはヒト乳癌細胞 MDA-MB-435 を認識するペプチド Lyp1 を Pre-S1 領域と置き換えた BNC を作製し、実際に培養細胞及び xenograft model において、蛍光物質並びに遺伝子のピンポイントデリバリーに成功している。このとき、*in vivo* イメージングの技術により、非侵襲的に生体内の BNC の挙動を観察したところ、通常の高分子キャリアーは静脈投与後、ほとんどが肝臓にトラップされるのに対し、BNC はごく一部しか肝臓にトラップされることはなく、投与後 6 時間位で余分な BNC は体外に排出されることも判明してい

る (未発表データ)。また同様に、膵臓癌 (インスリノーマ) や、癌組織ではない心臓に対するデリバリーにも成功しており、ホーミングペプチド提示型 BNC の生体内における高いポテンシャルが明らかになりつつある。

3-3-5. バイオナノカプセルの課題 ここまで BNC の DDS・GDS 技術について述べたが、臨床応用に向けて解決すべき問題も多い。特に、BNC は HBsAg L タンパク質を基本としているため、ヒト免疫系により排除される可能性がある。特に、B 型肝炎ワクチン接種者などの抗 HBV 抗体を持っているヒトにおいても、免疫反応から逃れるステルス化 BNC が必要である。われわれが既に B 型肝炎ワクチン接種者の体内で増殖する HBV エスケープ変異体の研究成果に基づき、いくつかのアミノ酸置換を加えた改変型 BNC を開発し、その低抗原性並びに高濃度の中和抗体存在下における感染性の保持を確認しており、長期的な治療における BNC の使用を可能にする研究も進めている。

4. おわりに

最近刊行された成書には、様々な DDS・GDS 技術が紹介されており、多様なキャリアーの開発が世界中で進んでいることが分かる。⁴⁶⁾ しかし、その中で *in vivo* で使用できるものは一部であり、さらに静脈注射のみでピンポイントデリバリーできるのはごく一部である。BNC のデリバリー能力は、他のキャリアーが EPR 効果を利用して正常組織と腫瘍組織を区別する受動的標的化に依存するのと異なり、生体認識分子を提示して癌組織のみならず正常組織に対しても能動的標的化を達成し、HBV 由来の感染機構で積極的に物質を細胞内に送り込む。また、他のキャリアーのように静脈注射するとほとんど肝臓、脾臓、肺にトラップされることもない。このような特長を併せ持つキャリアーは今のところ他には存在しないと考えられ、今後 BNC は、癌治療以外にも、AIDS のような感染症や難治性遺伝子疾患の治療にも適用できると期待される。

謝辞 本研究は、神戸大学工学部・近藤昭彦先生、岡山大学工学部・妹尾昌治先生、慶應義塾大学医学部・上田政和先生との共同研究の成果である。また、本研究の成果の一部は、科学技術振興機構による育成研究 (研究成果活用プラザ大阪) 及び地域

研究開発資源活用促進プログラムによるものである。

REFERENCES

- 1) Lawrence D., *Lancet*, **362**, 48 (2003).
- 2) Editorial, *Nat. Mater.*, **2**, 504 (2003).
- 3) Hafenrichter D. G., Ponder K. P., Rettinger S. D., Kennedy S. C., Wu X., Saylor R. S., Flye M. W., *J. Surg. Res.*, **56**, 510–517 (1994).
- 4) He P., Tang Z. Y., Ye S. L., Liu B. B., Liu Y. K., *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **19**, 183–187 (2000).
- 5) Pollmann A., Kabisch H., Block A., Muller J., Hellwinkel O. J., *Int. J. Mol. Med.*, **14**, 737–742 (2004).
- 6) Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., *Nature*, **391**, 806–811 (1998).
- 7) Reich S. J., Fosnot J., Kuroki A., Tang W., Yang X., Maguire A. M., Bennett J., Tolentino M. J., *Mol. Vis.*, **9**, 210–216 (2003).
- 8) Li B. J., Tang Q., Cheng D., Qin C., Xie F. Y., Wei Q., Xu J., Liu Y., Zheng B. J., Woodle M. C., Zhong N., Lu P. Y., *Nat. Med.*, **11**, 944–951 (2005).
- 9) Soutschek J., Akinc A., Bramlage B., Charisse K., Constien R., Donoghue M., Elbashir S., Geick A., Hadwiger P., Harborth J., John M., Kesavan V., Lavine G., Pandey R. K., Racie T., Rajeev K. G., Rohl I., Toudjarska I., Wang G., Wuschko S., Bumcrot D., Koteliansk V., Limmer S., Manoharan M., Vornlocher H. P., *Nature*, **432**, 173–178 (2004).
- 10) Urban-Klein B., Werth S., Abuharbeid S., Czubayko F., Aigner A., *Gene Ther.*, **12**, 461–466 (2005).
- 11) Pal A., Ahmad A., Khan S., Sakabe I., Zhang C., Kasid U. N., Ahmad I., *Int. J. Oncol.*, **26**, 1087–1091 (2005).
- 12) Morissey D. V., Lockridge J. A., Shaw L., Blanchard K., Jensen K., Breen W., Hartough K., Machemer L., Radka S., Jadhav V., Vaish I., Zinnen S., Vargeese C., Bowman K., Shaffer C. S., Jeffs L. B., Judge A., MacLachlan I., Polisky B., *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1002–1007 (2005).
- 13) Schiffelers R.M., Ansari A., Xu J., Zhou Q., Tang Q., Storm G., Molema G., Lu P. Y., Scaria P. V., Woodle M. C., *Nucleic Acids Res.*, **32**(19), e149 (2004).
- 14) Katayama Y., Sonoda T., Maeda M., *Macromolecules*, **34**, 8569–8573 (2001).
- 15) Katayama Y., Fujii K., Ito E., Sakakihara S., Sonoda T., Murata M., Maeda M., *Biomacromolecules*, **3**, 905–909 (2002).
- 16) Kawamura K., Oishi J., Kang J.-H., Kodama K., Sonoda T., Murata M., Miidome T., Katayama Y., *Biomacromolecules*, **6**, 908–913 (2005).
- 17) Hama S., Akita H., Ito R., Mizuguchi H., Harashima H., *Mol. Ther.*, **13**, 786–794 (2006).
- 18) Kaneda Y., Nakajima T., Nishikawa S., Yamamoto S., Ikegami H., Suzuki N., Nakamura H., Morishita R., Kotani H., *Mol. Ther.*, **6**, 219–226 (2002).
- 19) Morishita N., Nakagami H., Morishita R., Takeda S., Mishima F., Terazono B., Nishijima S., Kaneda Y., Tanaka N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **334**, 1121–1126 (2005).
- 20) Makela A. R., Matilainen H., White D. J., Ruoslahti E., Oker-Blom C., *J. Virol.*, **80**, 6603–6611 (2006).
- 21) Marshall E., *Science*, **298**, 34–35 (2002).
- 22) Savulescu J., *J. Med. Ethics*, **27**, 148–150 (2001).
- 23) Bagai S., Sarkar D. P., *FEBS Lett.*, **326**, 183–188 (1993).
- 24) Mizuguchi H., Nakagawa T., Nakanishi M., Imazu S., Nakagawa S., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **218**, 402–407 (1996).
- 25) MacLaughlin F. C., Mumper R. J., Wang J., Tagliaferri J. M., Gill I., Hinchcliffe M., Rolland A. P., *J. Control. Release*, **56**, 259–272 (1998).
- 26) Richardson S. C. W., Kolbe H. V. J., Duncan R., *Int. J. Pharm.*, **178**, 231–243 (1999).
- 27) Boussif O., Lezoualch F., Zanta M. A., Mergny M. D., Scherman D., Demeneix B., Behr J. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 7297–7301 (1995).
- 28) Oupicky D., Howard K. A., Konak C., Dash P. R., Ulbrich K., Seymour L. W., *Bioconjug. Chem.*, **11**, 492–501 (2000).

- 29) Bielinska A. U., Yen A., Wu H. L., Zahos K. M., Sun R., Weiner N. D., Baker J. R., Roessler B. J., *Biomaterials*, **21**, 877–887 (2000).
- 30) Park I. K., Kim T. H., Park Y. H., Shin B. A., Choi E. S., Chowdhury E. H., Akaike T., Cho C. S., *J. Control. Release*, **76**, 349–362 (2001).
- 31) Nishikawa M., Yamauchi M., Morimoto K., Ishida E., Takakura Y., Hashida M., *Gene Ther.*, **7**, 548–555 (2000).
- 32) Hashida M., Takemura S., Nishikawa M., Takakura Y., *J. Control. Release*, **53**, 301–310 (1998).
- 33) Nishikawa M., Kamijo A., Fujita T., Takakura Y., Sezaki H., Hashida M., *Pharm. Res.*, **10**, 1253–1261 (1993).
- 34) Li Z., Zhao R., Wu X., Sun Y., Yao M., Li J., Xu Y., Gu J., *FASEB J.*, **19**, 1978–1985 (2005).
- 35) Hollinger F. B., Liang T. J., “Hepatitis B Virus, Fields Virology,” 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001, pp. 2971–3036.
- 36) Robinson W. S., “Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus, Principles and Practice of Infectious Diseases,” 4th ed., eds. by Mandell G. L., Bennett J. E., Dolin R., Churchill Livingstone, New York, 1995, pp. 1406–1439.
- 37) Yamada T., Iwabuki H., Kanno T., Tanaka H., Kawai T., Fukuda H., Kondo A., Seno M., Tanizawa K., Kuroda S., *Vaccine*, **19**, 3154–3163 (2001).
- 38) Heermann K. H., Goldmann U., Schwartz W., Seyffarth T., Baumgarten H., Gerlich W. H., *J. Virol.*, **52**, 396–402 (1984).
- 39) Neurath A. R., Kent S. B., Strick N., Parker K., *Cell*, **46**, 429–436 (1986).
- 40) De Meyer S., Gong Z. J., Suwandhi W., van Pelt J., Soumillion A., Yap S. H., *J. Viral Hepat.*, **4**, 145–153 (1997).
- 41) Kuroda S., Otaka S., Miyazaki T., Nakao M., Fujisawa Y., *J. Biol. Chem.*, **267**, 1953–1961 (1992).
- 42) Yamada T., Iwasaki Y., Tada H., Iwabuki H., Chuah M. K. L., VandenDriessche T., Fukuda H., Kondo A., Ueda M., Seno M., Tanizawa K., Kuroda S., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 885–890 (2003).
- 43) Jung J., Yamada T., Kondo A., Seno M., Ueda M., Tanizawa K., Kuroda S., Abstracts of papers, the 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Jun 2006.
- 44) Laakkonen P., Akerman M. E., Biliran H., Yang M., Ferrer F., Karpanen T., Hoffman R. M., Rouslahti E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 9381–9386 (2004).
- 45) Laakkonen P., Porkka K., Hoffman J. A., Rouslahti E., *Nat. Med.*, **8**, 751–755 (2002).
- 46) “Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA, A Laboratory Manual,” eds. by Friedmann T., Rossi J., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2006.