

# ナノメディシンの生体内ピンポイント送達を可能にするヒト由来ウイルス外皮タンパク質コーティング技術の開発

研究代表者

黒田俊一 名古屋大学大学院生命農学研究科



## 1. 研究の背景と達成目標

今世紀の中核医療技術であるナノメディシンを、生体内で適切に作動させるには、従来は表面を高分子ポリマーで修飾してヒト免疫系から逃げてきたが、既に限界がきている。本研究では、ヒト由来ウイルス外皮タンパク質が天然で有するステルス化機構を解析し、今後のナノメディシンに搭載することを目指す。達成目標は次の通り。

ヒト由来ウイルスの標的細胞及び組織と直接相互作用する外皮タンパク質を HBV 由来バイオナノカプセル (BNC) の表面に遺伝子組換えで大量に生産する技術を確立する。

近赤外蛍光色素標識 BNC の生体内動態を解析する。

ヒト由来ウイルスの細胞及び組織標的化機構を明らかにする。

ヒト由来ウイルスのステルス化機構を明らかにする。

## 2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

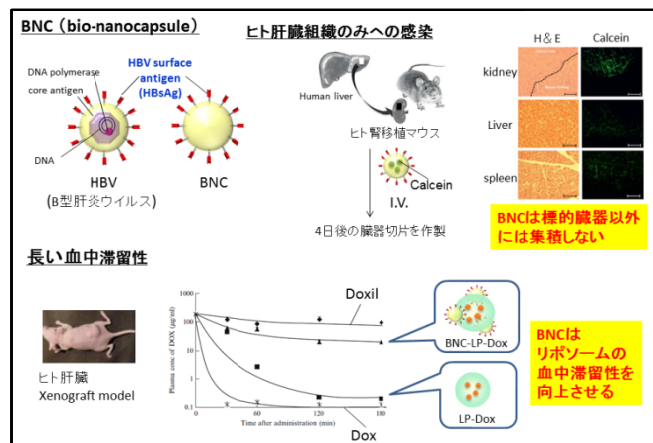
- ・B型肝炎ウイルス(HBV)が体内(血流内)を縦横無尽に駆け巡るメカニズム(ステルス化機構:細網内皮系(RES系)を回避する機構)を分子レベルで解明した。
- ・上記メカニズムを支える最少アミノ酸配列を解明し、任意のナノメディシンに移植可能であることを示した。
- ・今世紀の中核医療技術であるナノメディシン開発において体内動態を改善するほぼ唯一の方法である「高分子ポリマー(主にPEG)修飾法(米国ENZON社の強力な特許)」を回避する強力な代替法を発見した。本成果は今後のナノメディシン開発において、非常に重要な知見である。

## 3. 研究成果

ヒト由来ウイルスで細胞及び組織特異性を示すウイルスゲノムを遺伝子バンク等から取得した(約20種類)。その後、各ウイルス由来外皮タンパク質を BNC(バイオナノカプセル)として提示する発現ベクターを構築し、出芽酵母で発現させ、様々な BNC を精製して得て(約5種類)、近赤外蛍光色素標識を行い、InVivoイメージング装置を用いてマウス生体内での動態解析を行った。現在、細胞及び組織特異性を示すとともに、ステルス化機構を有するものを絞り込んでいる。

最も先行している HBV による BNC は、図1に示すようにヒト肝臓由来組織にしか集積せず、また血液滞留性も PEG 修飾リポソームと同等であった。つまり、強いステルス化機構の存在が確認された。

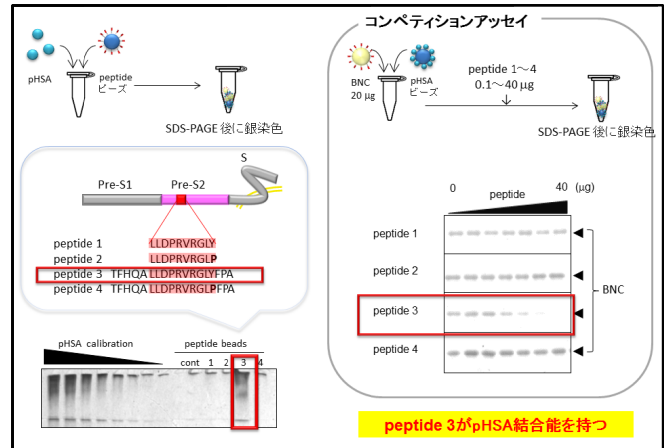
HBV 表層に相互作用する血液中タンパク質を検



討した結果、重合型ヒト血清アルブミン(pHSA)と非常に強く相互作用する領域を見出した。また、その領域をアミノ酸配列レベルで特定した(図2)。

上記 pHSA 結合ペプチドを提示する直径 100 nm の蛍光標識ポリスチレンビーズ(ナノメディシンのモデル)を作製し、マウス肝臓由来貪食細胞(クッパー細胞)と相互作用させると、有意に同細胞への取り込みが抑制された。また、マウス尾静脈に投与し、血中濃度を測定したところ、有意に血中濃度の低下が抑制された。以上の結果から、pHSA と非常に強く相互作用する領域(図2の peptide 3)は PEG と同程度で移植可能なステルス化活性を有することが判明した。

また、本研究では HBV のヒト肝臓特異的な感染を支える HBV ヒト肝臓相互作用を詳細に解析し、ヒト肝臓細胞表面には低親和性 HBV レセプターと高親和性 HBV レセプターが存在することを明らかにした。



#### 4. 今後の展開

本研究では、HBV 以外のヒト由来ウイルスについても同様な解析を進めており、今後、新規ステルス化機構と新規標的化機構が明らかになるはずである。それらの成果を取りまとめて知的財産化を行い、今後のナノメディシン開発を支える基盤技術として、日本国内のみならず世界において活用を進めてゆきたい。

#### 5. 発表実績

**原著論文 1)** 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.

**原著論文 2)** 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.

**原著論文 3)** 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.

**原著論文 4)** 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.* (2012) in press

**総説 1)** 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, in press

**書籍 1)** 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. 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」

**書籍 2)** 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-リポプレックス複合体の開発. 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