



# Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes

山田, 忠範

---

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3083

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003083>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 3 1 2 】

氏 名・(本 籍) 山田 忠範 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士(工学)

学 位 記 番 号 博い第322号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成16年3月31日

【 学位論文題目 】

タンパク質中空ナノ粒子を用いる新規遺伝子導入法の開発

審 査 委 員

主 査 教 授 福田 秀樹  
教 授 大川 秀郎  
教 授 近藤 昭彦

現在、癌やAIDSなどの根治療法確立へ向け、遺伝子治療の臨床研究が盛んに行われている。遺伝子治療とは、遺伝子レベルで各種疾患の治療を行うという新しいコンセプトの治療法であり、従来法では治療が難しい疾患にも適用できるものとして期待されている。この遺伝子治療を支える中核の技術はいくつかあるが、その中で最も重要な技術の1つに遺伝子導入法があり、レトロウイルスやアデノウイルスなどの感染性ウイルスを用いた導入法(ウイルスベクター法)が主流となっている。この手法は、遺伝子の細胞への導入効率が高いものの、標的細胞のみに遺伝子を導入することが難しく、ウイルス由来の遺伝子も導入してしまうので、副作用が生じる危険性が高い。したがって、ウイルスベクターによる遺伝子導入では患部へ直接投与することが必須である。しかし、現在は外科的処置により直接投与を行う事が大半であるため、患者の肉体的・精神的負担は大きく、QOL(生活の質)の大幅な低下が指摘されている。そのような状況なので、①高い遺伝子導入効率を保ちつつ、②静脈注射投与でも特定の組織・細胞へ遺伝子を運搬できる高い標的化能をもち、③ウイルスゲノムの混入がなく高い安全性が確保できる、などの特徴を有する遺伝子導入法が現在求められている。しかしながら、これらの要件をすべて満足する従来の手法は存在しない。

B型肝炎ウイルス(HBV)がヒト肝臓に特異的にかつ強力に感染する際に中心的な役割を担うB型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)を、中空ナノ粒子として大量生産する組換え酵母が既に樹立されている。同粒子は、脂質二重膜によるリポソームにHBsAgが多数埋め込まれたもので、HBVと同等のヒト肝臓への高効率で特異的な感染能を保持しつつもHBV由来のゲノムは一切含まない。本研究では、同粒子を遺伝子導入用ベクターとして応用することを目的に研究を行った。

第2章では、HBsAg粒子の物理化学的及び免疫学的性質を明らかにした。同粒子はHBVに対するワクチンとして研究・開発されてきた経緯があるが、物理化学的性質は明らかではなかった。また、同粒子がHBVの次世代ワクチンとして有効であることから、その免疫学的性質も明らかにした。

第3章では、HBsAg粒子を用いたヒト肝臓への遺伝子導入について検討を行った。HBsAg粒子の中空部分に効率よく遺伝子を封入する方法は、本研究において中核的な技術となる。そこで、種々の方法を検討した結果、エレクトロポレーション法を用いることにより極めて効率的に粒子内部へ遺伝子を封入できることを見出した。次に、上記方法に従い、緑色蛍光タンパク質(GFP)発現遺伝子を封入したHBsAg粒子をヒト肝臓由来細胞HepG2、同NuE及び正常ヒト肝細胞の培養液に血清存在下で添加した。その結果、すべて細胞において同粒子は従来の遺伝子導入法に比べて高い効率でGFP遺伝子を導入することに成功した。一方、ヒト扁平上皮癌由来細胞A431及びヒト大腸癌由来細胞WiDrに対しても同様に導入を試みたが、GFPに由来する蛍光を観察することはできなかった。以上から、HBsAg粒子による遺伝子導入法は、ヒト肝細胞に対して極めて特異的かつ高効率であることが明らかになった。

<次項へ続く>

<前項より続き>

続いて、GFP発現遺伝子を封入したHBsAg粒子を、ヒト肝臓由来細胞NuE、対照としてヒト大腸癌由来細胞WiDrをそれぞれ固形癌として移植したヌードマウスへ尾静脈より投与した。1週間後、各種ヌードマウスより腫瘍組織及び各種臓器を摘出し、組織切片を作成、蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、NuE由来組織にGFPの蛍光を認めることができたが、WiDr由来組織並びにマウス各臓器にはGFPの蛍光を観察することはできなかった。以上から、同粒子による遺伝子導入法は、*in vivo*においてもヒト肝細胞に極めて特異的かつ高効率な導入法であることが判明した。

GFP発現遺伝子を用いた遺伝子導入において、*in vitro*、*in vivo*問わずHBsAg粒子はヒト肝臓特異的な遺伝子導入が可能であることを示した。そこで、現在利用されている治療用遺伝子とHBsAg粒子を組み合わせた遺伝子治療プロトコルの確立を目指し、血友病Bを治療モデルとして検討を行った。血友病Bは、体内の血液凝固因子のうち第9因子が欠乏することにより発症する疾患である。現在、血友病Bの治療には、第9因子タンパク質を含む血漿製剤を投与する止血療法を中心とした対症療法しかない。これら血漿製剤は短期間での繰り返し投与が必須であるため、患者の経済的、心理的負担は大きく、遺伝子治療による根本治療が望まれている。加えて、第9因子は肝臓で産生されるタンパク質であるため、その発現遺伝子をHBsAg粒子にてヒト肝臓へ導入する系は最適なモデルであると考えられる。GFP発現遺伝子の場合と同様に、第9因子発現遺伝子をエレクトロポレーション法にてHBsAg粒子内部へ封入し、ヒト肝臓細胞を固形癌として移植したヌードマウスの尾静脈より投与した。その後、経時的にヌードマウスより採血し、ELISA法によりマウスの血中に分泌されるヒト第9因子タンパク質を定量した。その結果、HBsAg粒子による第9因子発現遺伝子の導入により、血中濃度が最大4%に達し、その発現はおよそ30日間にわたって確認された。ここで達成された血中濃度は、中程度血友病B患者の治療を行うのに十分であり、また、重症血友病B患者の治療にもその効果が認められる濃度である。

HBsAg粒子は中空状であるため、遺伝子の他にも、薬剤をその内部へ封入することが可能である。第3章では、遺伝子と同様にエレクトロポレーション法にて、HBsAg粒子内部に水溶性蛍光物質であるカルセインを封入し、これをヒト肝臓由来細胞HepG2並びにNuEの培養液に血清存在下で添加した。その結果、HBsAg粒子により両細胞へカルセインを導入することに成功した。一方、ヒト大腸癌由来細胞WiDrに対しても同様に導入を試みたが、カルセインに由来する蛍光を観察することはできなかった。以上から、HBsAg粒子による薬剤導入は、同粒子による遺伝子導入法と同様に、ヒト肝細胞に対して極めて特異的かつ高効率であることが明らかになった。

続いて、同様にカルセインを封入したHBsAg粒子を、ヒト肝臓由来細胞NuE、対照としてヒト大腸癌由来細胞WiDrをそれぞれ固形癌として移植したヌードマウスへ尾静脈より投与した。

<次項へ続く>

(氏名: 山田 忠範 NO. 3)

&lt;前項より続き&gt;

2日後、各種ヌードマウスより腫瘍組織及び各種臓器を摘出し、組織切片を作成、蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、NuEにはカルセインに由来する蛍光を認めることができたが、WiDr並びにマウス各臓器には蛍光を観察することはできなかった。以上から、同粒子による薬剤導入法は、*in vivo*においてもヒト肝細胞に極めて特異的かつ高効率な導入法であることが判明した。

最近、種々の研究結果からHBsAg粒子表面に露出している肝細胞結合部位が特定された。また、同部位にはヒト肝臓を認識・特異的に結合する性質があることが明らかになっている。そこで、当該部位を種々の生体認識分子に遺伝子工学的に置換することで、挿入した認識分子に応じた細胞及び組織に対して標的化できることが期待できる。そこで、肝細胞結合部位を上皮成長因子(EGF)分子へ置換したEGF分子提示型粒子を改変型粒子のモデルとし、その創製を試みた。その結果、EGF提示型粒子はHBsAg粒子と同様の組換え酵母を用いた大量生産系にて生産が可能であった。また、HBsAg粒子と同様に電圧ポレーション法にて、改変型粒子内部に水溶性蛍光物質であるカルセインを封入し、EGFレセプターを細胞表面に多量に発現しているヒト扁平上皮癌由来細胞A431並びにヒト肝臓由来細胞NuEの培養液に血清存在下で添加した。その結果、改変型粒子によりA431細胞へのみカルセインを導入することに成功した。これは、EGF分子を挿入することにより、元来あったヒト肝臓への特異性が消失し、EGFレセプターを持つ細胞への親和性が付与されたものと考えられる。以上から、EGF提示型粒子と同様に、他の認識分子へ置換することにより、HBsAg粒子はさまざまな細胞・組織への再標的化を行うことが可能であることが明らかになった。

第4章では改変型粒子の生産効率の向上に関する検討を行った。HBVにはコア抗原と呼ばれるタンパク質があり、コア抗原と表面抗原(HBsAg)との相互作用によりHBVのウイルス粒子形成が促進されるという知見が得られている。そこで、コア抗原との共発現により改変型粒子の生産性向上を試みた。この際、抗真菌抗生物質 Aureobasidin Aを用いたタンパク質発現系を利用した。その結果、コア抗原との共発現は生産性向上の効果を示さなかった。その一方で、この際利用したタンパク質発現系において、薬剤選抜の際に用いたAureobasidin A耐性遺伝子であるIPC synthesisase 遺伝子が生産性向上に寄与することを発見した。

これらの結果より、HBsAg粒子は*in vitro*及び*in vivo*を問わず、ヒト肝臓特異的に遺伝子及び薬剤をピンポイントに運搬できるベクターであることが示された。加えて、任意の生体認識部位の挿入によりヒト肝臓に限らず、さまざまな細胞・組織へ標的化することが可能であることも明らかになった。さらに、HBsAg粒子はウイルスベクター法が抱えている諸問題を解決しうる特徴を持っており、従来の遺伝子導入技術に変わる新技術のプラットフォームになるものと期待できる。

氏名	山田 忠範		
論文題目	タンパク質中空ナノ粒子を用いる新規遺伝子導入法の開発		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	福田 秀樹
	副査	教授	大川 秀郎
	副査	教授	近藤 昭彦*
	副査		
副査			

## 要旨

現在、癌やAIDSなどの根治療法確立へ向け、遺伝子治療の臨床研究が盛んに行われている。遺伝子治療とは、遺伝子レベルで各種疾患の治療を行うという新しいコンセプトの治療法であり、従来法では治療が難しい疾患にも適用できるものとして期待されている。この遺伝子治療を支える中核の技術として遺伝子導入法がある。臨床応用へ向けた研究が進む中、①高い遺伝子導入効率を保ちつつ、②静脈注射投与でも特定の組織・細胞へ遺伝子を運搬できる高い標的化能をもち、③ウイルスゲノムの混入がなく高い安全性が確保できる、などの特徴を有する遺伝子導入法が求められている。

本研究では、上記特徴を有すると期待される、B型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)を応用した新規遺伝子導入法の開発に関する検討を行った。

第2章では、HBsAg粒子の物理化学的及び免疫学的性質を明らかにした。同粒子はHBVに対するワクチンとして研究・開発されてきた経緯があるが、物理化学的性質は明らかではなかった。また、同粒子がHBVの次世代ワクチンとして有効であることから、その免疫学的性質も明らかにした。

第3章では、HBsAg粒子を用いたヒト肝臓への遺伝子導入について検討を行った。緑色蛍光タンパク質(GFP)発現遺伝子を電圧ポレーション法にて封入したHBsAg粒子を、ヒト肝由来細胞の培養液へ添加したところ、GFPに由来する蛍光が観察された。また、ヒト肝臓由来細胞を移植した実験動物へ同粒子を投与したところ、移植した組織にのみGFPに由来する蛍光が観察された。以上から、HBsAg粒子による遺伝子導入法は、*in vitro*、*in vivo*を問わずヒト肝細胞に対して極めて特異的かつ高効率であることが明らかになった。

続いて、現在利用されている治療用遺伝子とHBsAg粒子を組み合わせた遺伝子治療プロトコルの確立を目指し、血友病Bを治療モデルとして検討を行った。GFP発現遺伝子の場合と同様に、第9因子発現遺伝子を電圧ポレーション法にてHBsAg粒子内部へ封入し、ヒト肝由来細胞を移植した実験動物へ投与した。その後、経時的にヌードマウスより採血し、ELISA法によりマウスの血中に分泌されるヒト第9因子タンパク質を定量した。その結果、HBsAg粒子による第9因子発現遺伝子の導入により、血中濃度が最大4%に達し、その発現はおよそ30日間にわたって確認された。ここで達成された血中濃度は、中程度血友病B患者の治療を行うのに十分であり、また、重症血友病B患者の治療にもその効果が認められる濃度である。以上より同粒子を用いた本プロトコルは有効である可能性を裏証した。

さらに、HBsAg粒子を用いた低分子化合物の導入の検討を行った。緑色蛍光物質 calcein を電圧ポレーション法にて同粒子内に封入し、GFP発現遺伝子を封入した場合と同様に *in vitro* 及び *in vivo* における calcein の導入を試みた。その結果、GFP発現遺伝子の場合と同様、*in vitro*、*in vivo* を問わずヒト肝細胞に対して極めて特異的かつ高効率であることが明らかになった。

加えて、HBsAg粒子の表面にはヒト肝臓を特異的に認識・結合する部位が露出していることが近年の研究で明らかになっている。そこで同部位を上皮成長因子(EGF)分子へ遺伝子工学的に置換することで、ヒト肝臓以外の細胞・組織へ特異的に遺伝子・薬剤を導入できる改変型粒子の創製を試みた。その結果、組み換え酵母を用いた発現系にて改変型粒子が生産できることを示した。EGFはEGFレセプターと相互作用することが明らかであることから、EGFレセプターを発現しているA431細胞を標的細胞に用いた。A431細胞及び対照としたヒト肝臓由来細胞に対する calcein の導入を試みたところ、A431細胞にのみ特異的に導入できることが明らかになった。以上より、改変型粒子は肝臓とはことなる細胞・組織に対して

特異的導入が可能であることが示された。

第4章では改変型粒子の生産効率の向上に関する検討を行った。HBVにはコア抗原と呼ばれるタンパク質があり、コア抗原と表面抗原(HBsAg)との相互作用によりHBVのウイルス粒子形成が促進されるという知見が得られている。そこで、コア抗原との共発現により改変型粒子の生産性向上を試みた。この際、抗真菌抗生物質 Aureobasidin A を用いたタンパク質発現系を利用した。その結果、コア抗原との共発現は生産性向上の効果を示さなかった。その一方で、この際利用したタンパク質発現系において、薬剤選抜の際に用いた Aureobasidin A 耐性遺伝子である IPC synthesisase 遺伝子が生産性向上に寄与することを発見した。

以上の通り、本研究はB型肝炎ウイルス表面抗原粒子を基とした、細胞・組織特異的に導入が可能な新規遺伝子導入法に関する開発について、基礎的な研究をしたものであり、遺伝子治療用のベクターについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって学位申請者山田 忠範は、博士(工学)の学位を得る資格があると認める。