B型肝炎ウイルス由来中空ナノ粒子（バイオナノカプセル）の革新的応用研究

大阪大学産業科学研究所　黒　田　俊　一

はじめに

重篤な肝疾患を引き起こすB型肝炎ウイルス（HBV）は，世界中で約2億5千万人が慢性的に感染しているが，未だに根治療法は開発されていない．最も効果的な予防策はワクチン接種しかない．私共は，現行の第1世代HBワクチン（S抗原）よりも高い感染予防効果を持つ第2世代ワクチン（M抗原）の酵母生産系を開発し，第1相臨床試験まで行った．さらに高い効果が期待できる第3世代ワクチン（L抗原，バイオナノカプセル（BNC））の生産にも世界で初めて成功した．また，BNCはHBV類似の表面構造を持つ中空ナノ粒子であるので，HBV由来ヒト肝臓特異的感染機構を持つDDS（薬物送達システム）用ナノキャリアとして開発した．これはウイルスを模倣した世界初のDDSであった．さらに，BNCはLタンパク質を放射状に提示する構造を持つので，バイオセンサーのセンシング分子のクラスター化と精密整列化を行う足場となり，各種バイオセンサーの飛躍的な高感度化に成功した．以下に詳細を記す．

1.　新規B型肝炎ワクチン開発からDDS開発へ（1986～）

1–1.　第2世代HBワクチン

1980年代に，HBVの外皮に存在するSタンパク質を酵母で発現させたS抗原が第1世代HBワクチンとして実用化されたが，抗S抗体が感染防御レベルに達するまでに6カ月かかり，接種者の5～10%に非応答者が出現する課題があった．私共は，SタンパクのN末端側に位置するpre-S2領域が強力な感染防御抗体を誘導することに着目し，酵母でM抗原を作製した（図1）．この第2世代HBワクチンは，チンパンジーでの実験で第1世代より高い感染予防効果を示し，健常者では1か月で感染防御レベル以上の抗pre-S2抗体が出現し，非応答者の割合も大幅に減少した．

1–2.　第3世代HBワクチン

MタンパクのN末端側にあるpre-S1領域がウイルス感染に重要であるという報告を基に，世界中でL抗原の発現が試みられたが，pre-S1領域がタンパク質合成を阻害し，全て失敗に終わっていた．私共は酵母プロモーターを改良し，pre-S1領域のN末端に分泌シグナルを付加することで，世界で初めてL抗原の過剰生産に成功した（図1）．精製したL抗原は，マウスで抗S抗体や抗pre-S2抗体に加え，抗pre-S1抗体も早期に誘導し，高い感染防御能が期待された．その後，L抗原が直径100 nmの中空ナノ粒子で，外周にHBVのヒト肝臓特異的感染機構を持つと考えられ，また，HBワクチン実用化により抗原自身の安全性がヒトで確認されているので，L抗原を用いたDDSナノキャリア（BNC）を開発した．

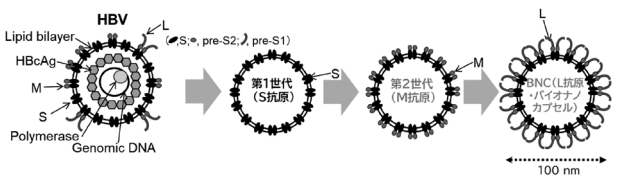

図1.　HBVからHBワクチン・BNCへの展開

2.　HBV初期感染機構を有するDDS開発（2000～）

2–1.　BNCのDDSへの展開

当初，BNCとGFP発現遺伝子や蛍光物質を混合して電気穿孔を行い，培養細胞に添加したところ，ヒト肝臓由来細胞でのみGFP発現や蛍光物質導入が観察された．次に，ヒト正常肝臓組織を腎臓皮下に移植したマウスに蛍光標識BNCを静注すると，ヒト肝臓組織にのみ蛍光が観察された．以上から，BNCのHBV初期感染機構由来の「ステルス能」（生体内の免疫系回避），「能動的標的化能」（ヒト肝臓特異的細胞吸着とエンドサイトーシス誘導），「エンドソーム脱出能」（内包物を細胞質内に放出）が明らかとなり，BNCは世界初のウイルス模倣DDSであることが判明した．

2–2.　送達物封入法と再標的化法

BNC量を削減しつつ送達物量を増加させるため，リポソームに送達物を封入しBNCと混合して得た複合体は，BNC同様DDSとして使用可能であった．さらに，高温・低pH処理で完全融合したVirosomeは，BNC量を全重量の5%以下にしても同等の送達能力を発揮した．また，抗癌剤シスプラチン封入BNC-リポソーム複合体をヒト肝癌移植マウスに投与し，放射線照射すると，癌部位特異的にラジカルが発生して抗腫瘍効果が向上した．

次に，BNC表層に抗体提示して再標的化するために，Protein A由来のIgG Fc領域結合Zドメイン2量体をBNCのpre-S1＋pre-S2領域と置換したZZ-BNCを作製した．蛍光標識抗EGFR抗体提示ZZ-BNCはマウスでEGFR陽性癌細胞への集積に成功した．この技術は様々な抗体に展開され，①抗CD11c抗体

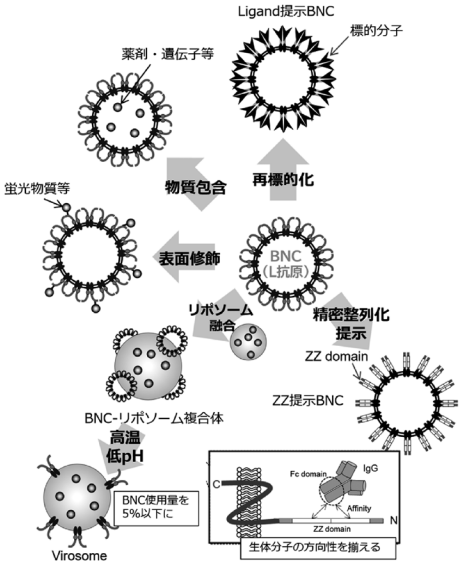

図2.　BNCの送達物封入法と再標的化法

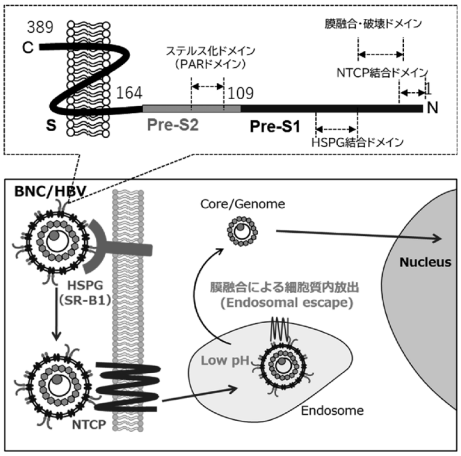

図3. HBV の初期感染機構

提示ZZ-BNC（樹状細胞標的化高効率ワクチン用），②E-セレクチン提示ZZ-BNC（悪性腫瘍特異的糖鎖標的用），③癌特異的酸化チタン粒子送達ZZ-BNC（超音波照射でラジカル発生させ抗腫瘍効果増強用），④マクロファージ特異的レキシモド送達ZZ-BNC（腫瘍微小環境内の腫瘍憎悪M2マクロファージを腫瘍抑制M1に再教育する癌増殖抑制用）などを開発した．これまでに私共は *In Vitro* で26例，*In Vivo* で10例の再標的化に成功している（図2）．また，BNC技術により物質導入された細胞を1細胞単位で解析・分離できる全自動装置や，細胞質内に導入された物質の定量法も開発した．現在，BNCを用いたDDS技術は，日本特許申請34件，特許成立（世界全体）24件となり，実用化に向けて研究開発を進めている．

3. BNCを用いたHBV初期感染機構の解明（2010～）

HBVは1965年に発見された古いウイルスだが，ヒト肝細胞への初期感染機構は長らく不明だった．2012年にNTCPがHBV pre-S1領域と結合することが感染の第一段階とされたが，他の分子の関与は排除されていなかった．私共は，NTCPが発現しないヒト肝細胞にもBNCがHBVと同じ効率で感染することを発見し，pre-S1(30–42) 部位がヘパリン依存性受容体HSPG，特にSR-B1と結合することを見出した．以上から，BNCとHBVの「能動的標的化能」はHSPG(SR-B1) とNTCPの協調作用に基づくことが判明した．また，BNC/HBVはエンドサイトーシスで取り込まれた後，pre-S1(9–24) 部位の低pH依存性膜融合活性により，BNC/HBVの膜とエンドソーム膜の融合が促進され，「エンドソーム脱出能」を示していた．さらに，HBVが血中でマクロファージが集まる細網内皮系などから回避し肝臓に到達する「ステルス能」も，pre-S2(7–24) 部位がアルブミンと結合することで実現していた．以上から，HBV初期感染機構が明らかになり，現在，AMEDのB型肝炎創薬実用化等研究事業でHBV感染阻害薬の開発を進めている（図3）．

4. センシング分子精密整列化足場としての開発（2010～）

ZZ-BNCは，IgG分子をFc領域を固定し，Fv領域を放射状に提示すると考えられ，高速AFMで観察した結果，BNC表面でIgGが最大迎角44度で回転ブラウン運動を行うことが判明した（図4）．次に，従来，複数抗原の同時検出は異なる動物・サブタイプの検出用抗体が必要で煩雑であったが，私共は4種の蛍光標識ZZ-BNCに，それぞれマウスIgG2a/bの検出用抗体を混合して，各抗原の同時検出を簡便にした．固相抗原を検出するELISAではZZ-BNC添加によりシグナル強度を15倍に上昇

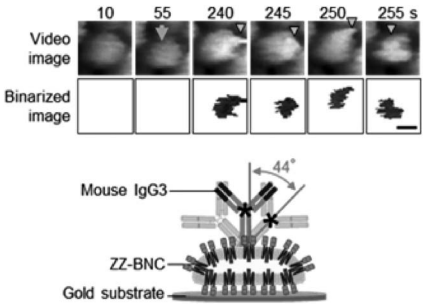

図4. ZZ-BNC上に固定化されたIgGの高速AFM観察像

させた．また，ZZ-BNCはサンドウィッチELISAにおいて同じ動物・サブタイプの抗体を固相と液相で同時使用可能にした．QCMのセンサー基盤にZZ-BNCを介して抗体を固定すると，抗原の検出感度が60倍に上昇した．この時，抗体1分子あたりの抗原結合数は0.1分子未満から1.2分子に上昇した．これは，ZZ-BNC表層に約60個のIgG Fv領域が放射状に精密整列化して，立体障害が解消し，抗原と効率よく結合するためと考えられた．IgGの替りにVEGF受容体やE-SelectinのC末端側にFc領域を融合した分子でも，QCMでのそれぞれの検出感度がVEGFに対して160倍，Sialyl-X糖鎖に対して20倍に上昇した．また，抗腫瘍抗体医薬トラスツマブとZZ-BNCの複合体は，腫瘍移植マウスで，抗腫瘍効果を単剤より少ない抗体量で発揮し，今後の他の抗体医薬への展開が期待された．次に，λファージの特定DNA配列に結合するCroタンパク質をBNC表層に提示するscCro-BNCを作製し，同配列を有するDNAアプタマーをQCMセンサー基盤に固定したところ，DNAアプタマー単独の検出感度がscCro-BNC添加により100倍以上に上昇した．最近では，ZZ-BNCは粒子のためセンサー基盤全体を覆わないことを解決するために，ZZ-BNCを高温下で界面活性剤処理してZZ-Lタンパク質を得た．これはQCMセンサー基盤上で均一に展開し，同量のZZ-BNCの10倍の検出感度を達成した．

このBNC技術は，バイオセンシング分子のクラスター化と精密整列化を実現する新しいタイプの足場タンパク質として各方面で注目されており，今後，幅広いバイオセンサー分野での活用が期待される．

おわりに

以上，「HBワクチン開発」を起点とした，「ウイルス模倣DDS開発」，「バイオセンサー用足場開発」は，農芸化学分野のみならず，医療分野や分析分野においてブレークスルーとなり，社会的・学術的に大きな影響を与えると期待される．

謝　辞　1986年大学院修了後入社した武田薬品工業(株)生物工学研究所においてHBワクチン開発では藤澤幸夫博士の御指導に特に感謝致します．DDS開発では阪大産研の谷澤克之名誉教授，山田忠範博士，鄭周姫教授（徳政女子大），粕谷武史博士，李昊博士，(株)ビークルの故・上田政和准教授（慶応医），妹尾昌治名誉教授（岡大工），近藤昭彦教授（神大工），名大生命農の松尾英典博士，HBV初期感染機構の解明では阪大産研の日沼州司特任教授，曽宮正晴准教授，劉秋実博士，バイオセンサー用足場開発では名大生命農の中野秀雄教授，東京農大の飯嶋益巳教授に感謝致します．上記の方以外にも，武田薬品工業(株)，阪大産研，名大生命農において，一緒に研究開発を行ってくれたスタッフ・卒業生・関係者・学生諸氏に感謝致します．