OUKA
Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | In Vivo Targeting Mechanism of Hepatitis B Virus Env Protein-Derived Bio-nanocapsule and Its Application |
| Author(s) | 粕谷, 武史 |
| Citation | 大阪大学, 2009, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/49317 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

| | |
|---|---|
| 氏名 | 粕谷武史（かすや たけし） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（工学） |
| 学位記番号 | 第２３１０６号 |
| 学位授与年月日 | 平成21年３月24日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第４条第１項該当<br>生命機能研究科生命機能専攻 |
| 学位論文名 | *In Vivo* Targeting Mechanism of Hepatitis B Virus *Env* Protein-Derived Bio-nanocapsule and Its Application<br>（B型肝炎ウイルス外皮タンパク質由来バイオナノカプセルの生体内標的化機構の解析と応用） |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教授 谷澤 克行<br>（副査）<br>教授 中川 敦史　教授 野地 博行<br>産業科学研究所准教授 黒田 俊一 |

## 論文内容の要旨

B型肝炎ウイルス（HBV）はヘパドナウイルス科に属するウイルスで、ヒトをはじめとする高等霊長類の肝臓にのみ感染する。この特異性は、HBVの外皮を構成するLタンパク質のN末端側膜外領域（pre-S領域: 163アミノ酸残基）がヒト肝細胞特異的リガンドとして機能することによると考えられている。一方、HBV感染予防用ワクチンとして開発されたバイオナノカプセル（BNC）は、B型肝炎ウイルス外皮Lタンパク質と脂質二重膜から構成される中空ナノ粒子であり、HBVと同様にLタンパク質中のpre-S領域の機能によりヒト肝臓へ特異的に集積すると考えられている。実際に、BNCは*in vitro*においてヒト肝臓由来培養細胞へ、また*in vivo*においても担癌モデルマウス中のヒト肝臓由来腫瘍組織へと特異的に集積することが明らかとなっている。このため、BNCはヒト肝臓特異的薬物および遺伝子の送達用キャリア（ドラッグデリバリーシステム（DDS）キャリア）として有用であると考えられる。そこで、BNCの臨床応用を目指して、その生体内でのヒト肝臓特異的な標的化機構を解析するとともに、DDSとしてのBNCの標的を他臓器に変換する方法を開発した。

１．BNCの生体内ヒト肝臓細胞特異的な集積におけるpre-S領域の役割

これまでの研究により、HBVのヒト肝臓由来の培養細胞への感染にはpre-S領域の21–47アミノ酸残基が必要と考えられている。そこで、BNCの*in vivo*におけるヒト肝臓特異的集積に必要な領域を特定するために、pre-S1（108アミノ酸残基）、pre-S2（55アミノ酸残基）、および全長のpre-S領域［pre-(S1+S2)］の緑色蛍光タンパク質（GFP）融合体を作製し、ヒト肝臓由来腫瘍を移植した担癌モデルマウスに静脈投与したところ、全長のpre-S領域の融合体を投与した場合にのみ緑色蛍光が腫瘍組織内で観察された。本結果は、BNCを用いるヒト肝臓特異的物質送達にはpre-S領域の全長が必要であることを示している。同時に、BNCの高度なヒト肝臓特異的集積能は、多くのLタンパク質分子のpre-S領域がBNC表面に露出していることによると考えられた。

２．特異的HBV結合分子を肝臓に発現する小動物モデルの開発

BNCを臨床応用するためには、前臨床試験における実験動物として霊長類が必要となるが、霊長類は稀少であり、またその使用に際しては倫理的な問題も多い。そこで、pre-S領域の結合分子として報告されているSquamous cell carcinoma antigen-1 (SCCA1) を肝臓で特異的に発現するトランスジェニックラットを作製し、肝臓のBNC取り込み能について評価した。まず、*in vitro*においてSCCA1分子はBNCと直接結合し、SCCA1過剰発現細胞ではBNCの取り込み能が上昇していた。次に、SCCA1発現トランスジェニックラットの肝臓におけるBNCの集積量は、野生型ラットの肝臓に比べて約20%増加していた。これらの結果は、生体内でSCCA1がHBVのレセプターとして機能することを示唆し、また樹立したトランスジェニックラットがBNC医薬の前臨床試験において小動物モデルとして有用であることを示している。

３．BNCの非肝臓細胞への標的変換

BNCのpre-S領域を他の生体認識分子に置換することにより、BNCの標的を他の細胞や組織に変換できると考えられた。そこで、高転移性腫瘍において高発現するβ1-6結合型*N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）を特異的に認識する植物由来レクチン（*Phaseolus vulgaris* Agglutinin-$L_4$: PHA）を表面に提示したBNC（PHA-BNC）を作製し、その生体内での集積能を評価した。まず、*in vitro*においてPHA-BNCは、高転移性癌細胞モデルであるβ1-6結合型GlcNAc転移酵素（GnT-V）安定発現細胞に優先的に集積した。次に、本細胞をヌードマウス背部に移植した担癌モデルを作製し、蛍光標識PHA-BNCを静脈投与して生体イメージング装置で経時的に観察したところ、PHA-BNCはGnT-V安定発現腫瘍へと有意に集積した。これらの結果は、PHA-BNCが高転移性の悪性腫瘍に集積するDDS用ナノデバイスとして有用であることを示している。また、pre-S領域を他の生体認識分子に置換することで、BNCの標的を他の細胞や組織に変換可能であることを実証するものである。

## 論文審査の結果の要旨

Ｂ型肝炎ウイルス（HBV）は，外皮Ｌタンパク質のＮ末端側膜外領域（Pre-S領域，163アミノ酸残基）に含まれるヒト肝細胞特異的認識部位の作用により，ヒトを含む高等霊長類の肝臓特異的に感染する。申請者の粕谷武史君は，緑色蛍光タンパク質を融合したPre-S領域欠失変異体を用いて，生体内における肝臓特異性発現にはPre-S領域の全領域が必要であることを示した。また，Pre-S領域に結合するタンパク質SCCA1(Squamous cell carcinoma antigen 1)を肝臓特異的に発現するトランスジェニックラットを作製し，静脈内投与されたＬタンパク質で構成されるバイオナノカプセル（BNC）が肝実質細胞に優先的に送達されることを見出し，SCCA1がPre-S領域に対する有力なレセプターであることを初めて示した。さらに， Pre-S領域をレクチンに置換したBNCを作製し，生体内で糖鎖構造依存的に標的を改変できることも見出した。これは，BNCのドラッグデリバリーシステムキャリアーとしての可能性を大きく広げるものである。よって，博士（工学）の学位に値する。