

《様式B》

研究テーマ 「宿主細胞へのウイルス感染を制御可能な生体適合性ナノ材料の開発」

研究責任者 岐阜薬科大学

准教授

田原 耕平 tahara@gifu-pu.ac.jp

(平成 28 年度募集) 第 29 回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000 字程度)

※産業技術として実用化の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。

<実施内容及び成果>

本研究では、リポソームを中心とする DDS ナノ材料によるウイルス感染抑制機構を明らかにすることを目指した。リポソームの表面電荷や粒子径など物理化学的性質がウイルス・宿主相互作用にどのように影響するのかを網羅的に解析し、ステアリルアミン (SA) を組み込んだ正電荷リポソームが最も効果的にウイルス感染を制御できることを見出した。本研究ではモデルとして、ヘルペスウイルスなど複数のウイルスを使用し、抗ウイルス剤としてのナノ材料の汎用性を証明することができた。

<今後予想される効果の概要>

1. ウイルスの分子生物学的な形質の多様性は著しく高い。そのため、個々ウイルスの治療薬が必要となる。抗ウイルス剤としてのナノ材料を利用する場合、ウイルスの種類に関係なく、ウイルス感染の最初のステップである細胞膜吸着を阻害できることが分かった。この特殊な機構はアシクロビルなど既存薬の最大の問題である耐性化を回避でき、さらには多種多様なウイルス感染症の治療薬として応用ことができる。また、既存の抗ウイルス薬を DDS ナノ粒子に封入すれば、抗ウイルス作用とナノ材料によるウイルス感染抑制の両方が作用し相乗的な効果が期待できる。

2. DDS ナノ粒子の医薬への応用は、キャリアへ薬物を含有させ、薬物の運び屋として利用する場合がほとんどである。薬剤を搭載しないナノ材料でウイルス感染を抑制しようとする本申請研究のコンセプトはこれまでに提唱されておらず、本研究で用いたバキュロウイルスやヘルペスウイルス以外の病原ウイルスにおいても、抗ウイルス微粒子として実

現可能であることを証明できれば、創薬の新たなパラダイムとなる可能性がある。

<産業技術として実用化の可能性や特許出願について>

申請者らは高分子ナノ粒子やナノリポソームに粘膜付着能を付与した経粘膜投与 DDS 製剤に関して多くの開発実績がある。そこで、ウイルス阻害ナノ材料の具体的な臨床応用としては、吸入による呼吸器関連ウイルスの感染治療や、腔内投与によるヒト免疫不全ウイルス（HIV）などの性感染症の治療が挙げられる。粘膜付着型ナノ材料を肺内へ吸入及び腔粘膜へ塗布することにより、粘膜上皮細胞へのウイルス感染を効果的に予防・治療することが可能である。特に、天然のリン脂質からなるナノリポソームや生分解性ポリマーから構成される高分子ナノ粒子は安価な調製が可能であるため、普及における経済的なハードルもクリアできる。

DDS ナノ粒子は既存の物質であるため、リポソーム自体を特許化することは難しい。一方、上述のようにリポソームに抗ウイルス剤を内封した場合に、薬剤の効果とリポソームの抗ウイルス効果の相乗的な薬理効果が期待できる。今後はこのようなデータを蓄積していき新規な用途特許として知財を取得し、実用化へ展開していきたいと考えている。

2. 実施内容および成果の説明

(1) 研究背景

ウイルス感染機構には、宿主特異的な分子システムのほかに共通プロセスがあり、細胞膜表面への膜吸着と膜融合という現象が深く関わっている。よって、細胞膜へのウイルス吸着を抑制し、ウイルスをトラップすることができれば、薬剤耐性に左右されず理論上多くのウイルスの細胞への感染を抑制できる。申請者等は、ドラッグデリバリーシステム (DDS) の薬物キャリアとして、生分解性の高分子ナノ粒子や脂質二重膜から構成されるナノリポソームに薬剤を封入し経粘膜投与製剤へ応用する研究を行っている。その研究過程において、偶然にも薬剤未封入のナノリポソームが RS ウイルスの宿主細胞への感染を既存の抗ウイルス剤よりも強力に抑制することを発見し特許 (特願 2014-066609 抗ウイルス剤) を出願した。その後、高分子ナノ粒子など他のナノ材料においても同様の効果を見出している。これらの知見は、薬剤を用いず人工微粒子素材を用いてウイルスの宿主細胞への感染を阻害できる可能性を示すもので、抗ウイルス微粒子として全く新しいタイプの治療コンセプトとなり得る。現状の実験データから考察すると、デコイ (おとり) として細胞に接近した DDS ナノ材料がウイルスと相互作用し、その結果宿主細胞へのウイルス感染が抑制されていると思われる。しかし、ウイルス感染抑制メカニズムについては不明な点が多く、学際的で萌芽性の高い研究であるため、抗ウイルス剤として応用するためには、その機構を明らかにする基盤研究が必要である。

そこで本申請研究では、DDS ナノ材料によるウイルス感染抑制機構を明らかにすることを目指す。ナノ材料としては、脂質二重膜のベシクルであるリポソームを用いて粒子の物理化学的性質がウイルス・宿主相互作用にどのように影響するのかを解析し、最も効果的にウイルス感染を制御できるナノ材料組成を見出すことを目的とする。また、本研究ではバキュロウイルスや単純ヘルペスウイルス (HSV-1) など複数のウイルスを使用し、抗ウイルス剤としてのナノ材料の汎用性を実証する。

(2) 実験方法

1. 表面電荷の異なるリポソームの調製

リポソームはジステアロイルフォスファチジルコリン (DSPC) 、ステアリルアミン (SA) またはジセチルフォスフェート (DCP) 、コレステロール (Chol) を任意のモル比でクロロホルム中に溶解し、薄膜水合法により調製した。リポソームの粒子径がサブミクロンサイズになるまで、エクストルーダー処理を行った。リポソームの粒子径・ゼータ電位は、ゼータサイザー ナノ ZS90 (マルバーン社製) により測定した。

2. 培養細胞を用いたウイルス感染評価

培養細胞は、ヒト肺上皮癌細胞 (A549) を用いた。また、モデルウイルスとして、遺伝子組換えバキュロウイルス (CellLight™ Nucleus-GFP, BacMam 2.0, Invitrogen) を用いた。本ウイル

スが細胞内に導入された場合、核において GFP を発現する。A549 を 12 穴プレートに播種し、24 時間培養を行った。その後、以下二種類の方法で、リポソームとウイルスの添加を行った。

Method 1: リポソームを添加した後、ウイルスを添加

リポソーム分散液を細胞に添加し、2 時間後リポソームを除去し、細胞を洗浄した。その後ウイルス分散液を添加し、22 時間培養を継続した。

Method 2: ウイルスとリポソームの同時添加

ウイルスとリポソームの混合分散液を細胞に添加し、24 時間培養を継続した。

ウイルスを感染させた後、PBS で細胞を洗浄し、フローサイトメーターにより感染細胞数を定量した。また、蛍光顕微鏡により細胞の状態を視覚的に観察した。なお、本研究におけるすべてのウイルスを用いる実験は、岐阜薬科大学バイオセイフティ委員会による遺伝子組換え実験の承認を得て行った。

3. トリパンブルー (TB) 蛍光消光法によるリポソームの細胞内取り込み量評価

24 穴プレートに培養した A549 細胞に蛍光標識 (DiI) リポソームを添加した。添加 2 時間後にリポソームを吸引除去し、PBS で 3 回洗浄した後にトリプシン処理により細胞を回収した。遠心処理により細胞を沈殿させ、ペレットへ氷冷しながら 50 μ L の TB 溶液を添加した。1 分後、PBS を加え、全量が 0.5mL となるよう調製した。この TB 処理により細胞膜表面に存在する DiI が消光する。フローサイトメーターにより細胞に残留する DiI の蛍光強度を測定した。

4. HSV-1 に対するリポソームのウイルス感染抑制効果

24 穴プレートに培養した A549 細胞にリポソーム懸濁液と HSV-1 (10^2 PFU) を添加し、48 時間インキュベーター内にて培養した。PBS にて 1 回洗浄後、3.7%ホルマリンを加え細胞を固定した。その後、0.025%クリスタルバイオレット溶液を加え 5 分室温静置した。プレートのウェルを洗浄後自然乾燥させた。

(3) 実験結果

1. リポソームの粒子物性

リポソームの表面電荷が異なる三種類のリポソーム (中性、カチオン性、アニオン性) を調製した。正電荷を付与する場合には、SA を脂質膜に組み込んだリポソームを調製した。負電荷物質として DCP を用いた。SA リポソームのゼータ電位は正の値を、DCP リポソームのゼータ電位は負の値を示した。いずれのリポソームも、サブミクロンサイズ (約 100 nm) の平均粒子径を示し、安定性の高いリポソーム分散液を調製することができた。

2. 正電荷リポソームのバキュロウイルスに対する抗ウイルス効果

三種類の異なる表面電荷を有するリポソームの、バキュロウイルスの A549 細胞への感染阻害効果を蛍光顕微鏡で評価した。リポソーム脂質組成が DSPC/Chol (コレステロール) /SA のリポソームにおいて、バキュロウイルス由来の蛍光の減少が観察されたことから、本組成のリ

ポソームはバキュロウイルスの感染を抑制すると考えられる。

ウイルス感染抑制効果のあったカチオン性リポソーム (SA リポソーム) において、脂質濃度を変化させて、その抗ウイルス作用を検討した。バキュロウイルスに感染した細胞をフローサイトメーターで定量した。リポソーム濃度依存的にウイルス感染を抑制したことから、ウイルス感染抑制効果はリポソームに由来することが分かった (Fig. 1)。またウイルスとリポソームの添加方法を変えた場合、Method 1 よりも Method 2 のほうが高い抗ウイルス感染効果を示した。Method 2 はウイルスとリポソーム同時に添加するものであることから、リポソームの抗ウイルス効果は細胞外で発揮される可能性が示唆された。

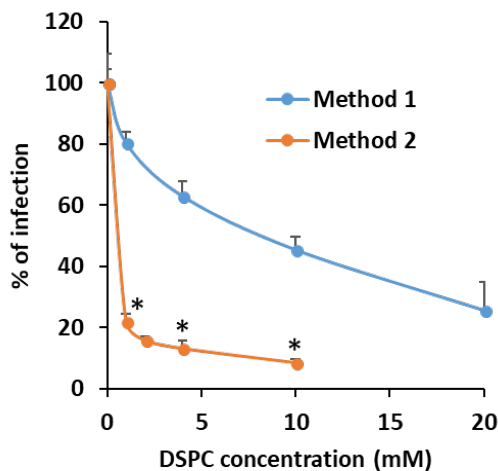


Fig.1. SA liposomes inhibited baculovirus (BV; CellLight Nucleus-GFP/RFP BacMam 2.0) infection of A549 cells. Effects of SA liposomes (DSPC/Chol/SA = 7/3/1) on viral infectivity in methods 1 and 2; Data are presented as means \pm SD (n = 3–4). *p < 0.05 compared with method 1.

また、抗ウイルス効果が知られているポリエチレンジアミン (PEI) 溶液を毒性が出ない範囲で細胞に添加し、正電荷リポソームの効果と比較した。PEI 溶液と比較し正電荷リポソームのほうが高い効果を示すことが分かった。

また、SA リポソームとウイルスを同時に添加した場合と、SA リポソームを添加した後にウイルスを感染させた場合において、リポソームのウイルス感染抑制効果を評価した。いずれの添加タイミングにおいても、SA リポソームは A549 細胞へのウイルス感染を抑制することが明らかとなった。以上のような正電荷リポソームの抗ウイルス効果は、ステアリルアミン (SA) を用いた場合だけでなく、他の正電荷脂質 (例: DOTAP [N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N, N, N-trimethylammonium methyl-sulfate]) をリポソーム脂質膜中に組み込んだ場合においても同様に観察された。また、油成分をリン脂質で乳化したリピッドエマルジョンにカチオン性物質 (SA 及び DOTAP) を組み込んだ場合においても、リポソームと同様な抗ウイルス効果が観察された。

3. 正電荷リポソームのコレステロールがウイルス感染抑制に及ぼす影響

SA リポソームの抗ウイルス作用メカニズムを明らかにするために、SA リポソームの細胞内取り込み量を評価した。リポソーム中のコレステロール含有量が異なる SA リポソームを調製し、細胞内取り込み量と細胞へのリポソーム吸着量を評価した。SA リポソーム中のコレステロールが低下するにつれて、バキュロウイルスの感染抑制効果が高いことが分かった。この感染抑制効果は、リポソームの細胞内取り込み量ではなく、細胞表面に存在し吸着するリポソーム

ム量と相関していることが分かった。このことから、細胞膜表面近傍に存在する SA リポソームが抗ウイルス効果に大きな影響を及ぼしていることが分かった。

4. 正電荷リポソームの細胞毒性評価

SA を微粒子中に組み込んだ正電荷リポソーム及びリピッドエマルジョンの A549 細胞に対する細胞毒性を MTS 法により評価した (Fig. 2)。SA 溶液を A549 細胞に添加したところ、細胞生存率が低下し、細胞毒性が観察された。一方、SA を配合したリポソームやリピッドエマルジョンでは、高濃度においても細胞生存率はほぼ 100%を示した。

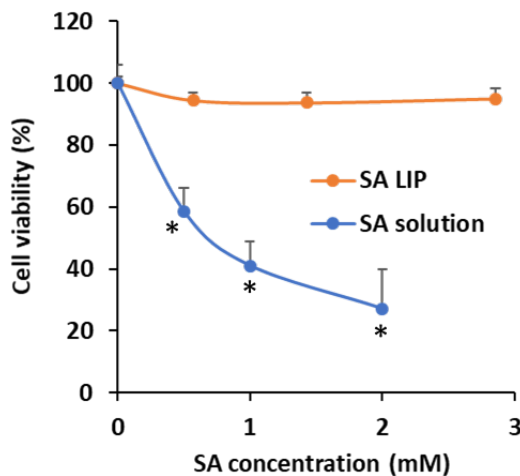


Fig. 2. Cytotoxic side effects of SA solution and SA liposomes (DSPC/Chol/SA = 7/3/1) at SA concentrations ranging from 0 to 3 mM in A549 cells at 37°C; cell viability was determined using MTS assays.

5. リポソームを用いた 1 型単純ヘルペスウイルス (HSV-1) 感染抑制効果

2 本鎖 DNA を持つ HSV-1 が宿主細胞に吸着し細胞内に取り込まれると、その核内で複製され増殖していく。治療薬としてはアシクロビル (ACV) などが一般的に用いられる。ACV はウイルス感染細胞に取り込まれると、最終的にウイルス DNA 鎖の伸長を停止させウイルス DNA の合成を阻害するが、薬剤耐性ウイルスの出現が確認されており問題となっている。一方、SA リポソームは細胞表面付近でウイルスの侵入を阻害している可能性があるため、薬剤耐性の問題を克服できる。

A549 細胞に正電荷、中性、負電荷リポソームと HSV-1 を同時に添加することで、ウイルス感染抑制効果を評価した (Fig. 3)。正細胞はクリスタルバイオレットにより染色した。ウェル中の色素の濃淡で A549 細胞の生存率、すなわちウイルス感染を評価できる。バキュロウイルスの場合と同様に、SA リポソームを添加した系の細胞生存率が最も高く、その効果は既存薬である ACV 以上であった。

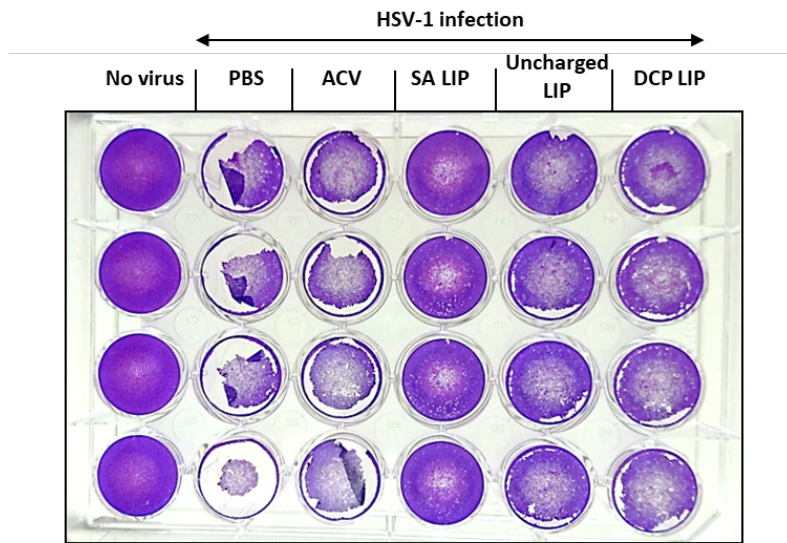


Fig. 3. Antiviral activities of liposomes against HSV-1 in plaque reduction assays of A549 cells; cells were stained with crystal violet post-infection. Clear portions in wells indicate cell death following virus infection.

(4) 結論

リポソームに適切なカチオン特性を付与することによりウイルス感染を抑制できることを見出し、微粒子による宿主細胞へのウイルス感染阻害効果を確認した。微粒子の表面電荷が抗ウイルス作用に特に重要なファクターであることを見出した。DDS ナノ粒子の医薬への応用は、キャリアへ薬物を含有させ、薬物の運び屋として利用する場合はほとんどである。薬剤を搭載しないリポソームでウイルス感染を抑制しようとする本申請研究のコンセプトはこれまでに提唱されておらず、抗ウイルス効果をより多くの病原ウイルスで実証できれば、創薬の新たなパラダイムとなる可能性がある。

(5) 論文発表

Tahara K, Kobayashi M, Yoshida S, Onodera R, Inoue N, Takeuchi H. Effects of cationic liposomes with stearylamine against virus infection. *Int J Pharm.* 543: 311-317. 2018