学会賞受賞論文

Bio-nanocapsule (BNC) を用いた子宮局所への新しい drug delivery system の構築

A new local drug delivery system for the uterus using bio-nanocapsule (BNC)

小泉 花織^{a)}、中村 仁美^{a)*}、松崎 高志^{b), c)}、黒田 俊一^{b)}、瀧内 剛^{a)}、熊澤 恵一^{a)}、
木村 正^{a)}

Kaori Koizumi, Hitomi Nakamura, Takashi Matsuzaki, Shun'ichi Kuroda,
Tsuyoshi Takiuchi, Keiichi Kumasawa and Tadashi Kimura

a) 大阪大学大学院医学系研究科産婦人科

Department of Obstetrics and Gynaecology, Osaka University Graduate School of Medicine
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2

b) 大阪大学大学院 医学系研究科 循環器内科

Department of Cardiovascular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2

c) 大阪大学 産業科学研究所

The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University
〒567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘 8-1

キーワード:

Bio-nanocapsule (BNC)、B型肝炎ワクチン、子宮、Drug Delivery System (DDS)

*Corresponding author:

中村 仁美

Tel: 06-6879-3351

E-mail: hitomi@gyne.med.osaka-u.ac.jp

要 旨

Bio-nanocapsule (BNC) は約 100nm の中空の粒子から構成され、30 年以上臨床で使用されてきた B 型肝炎ワクチンと同様の構造である。表面に肝臓に特異的な結合部位をもつ pre-S1 ペプチドがあるために全身投与したとしても肝臓に特異的に送達される。本研究ではこの肝臓に特異的な結合部位である pre-S1 領域の N 末端を HIV-1 領域由来の 14 量体である細胞接着性のあるトランス活性化転写因子 (TAT) ペプチドに置換し、BNC を子宮局所への新しい drug delivery system (DDS) として至適化、再構築を行った。Cy7 にて標識した BNC をマウスの子宮腔内に注入し、BNC 粒子の分布を in-vivo 画像システムと免疫組織化学にて観察した。また、リポソーム (coastomeEL-01-D) を用いて、Luciferase 強制発現プラスミド DNA を BNC 内に封入し、子宮腔内に遺伝子導入を行った。遺伝子導入の効率は Luciferase assay を用いて解析した。TAT 標識した BNC (TAT-BNC) が一過性に子宮に滞留する条件を設定し、BNC が子宮腔内に停留することを確認した。組織学的な検討において、子宮内膜上皮において BNC 粒子の局在が確認された。しかしながら、間質細胞および筋層には BNC 粒子が拡散しない事が

確認された。TAT-BNC を用いた方法では、リポフェクション法に比べて有意に高い遺伝子導入効率が認められた。今回の結果から、BNC が子宮局所への新しい DDS として提案できる事が示唆された。

緒 言

近年、薬物の過剰投与および副作用を抑制して、より安全に、効果的に薬物投与を行う手段として、“必要最小限の薬物を、必要な場所に、必要なときに供給する” Drug delivery system (DDS) の研究が活発に行われている。薬物を含む粒子径を小さくすることによる最適化や抗原抗体反応により細胞に標的化した DDS や徐放製剤として新たな DDS の研究がおこなわれてきた。子宮は腹腔外臓器であり、経腔的に直接アプローチが可能であり、薬剤の局所投与に適した臓器と言える。現在子宮局所への DDS としては子宮内避妊器具であるレボノルゲストレル徐放型子宮内避妊システム (LNG-IUS) が存在する。しかし、その他には子宮を標的とした子宮局所への DDS は開発されていない (Fig. 1)。その理由の 1 つとして、子宮内膜上皮は、ムチンなどの粘液成分が多く存在しているために、細胞内への効果的な送達が困難である事があげられる。

Bio-nanocapsule (BNC) は、B 型肝炎ウイルス (HBV) の外殻タンパク質 (HBV surface antigen: HBsAg) で形成された直径約 100 nm

の中空ナノ粒子である。BNC はすでに全世界で 30 年以上も臨床で使用されてきた B 型肝炎ワクチンと同様の構造であり、HBV の表面抗原である L タンパク質を遺伝子組換え酵母で過剰発現させることで精製される^[1, 2]。そのため、HBV そのもののようにウイルスのゲノムや遺伝子複製に必要な酵素は含まれていない。HBsAg タンパク質には S タンパク質の N 末端側に pre-S1 領域が付加している^[3-5] (Fig. 2)。pre-S1 領域の N 末端側がヒト肝臓特異的なレセプターであり、この部位で肝細胞を認識する。そのため HBV は全身投与したとしても肝臓に特異的に感染する特性を持っており、BNC も同様の特性を持っている^[6-8]。BNC はリポソームに一旦物質を封入した後に、BNC と融合させることでそのナノ粒子内に遺伝子、薬剤、タンパク質、siRNA などの物質を封入でき、これらの送達に使用できる^[9]。BNC の pre-S1 領域は、肝臓を特異的に認識するが、この領域を様々な生体認識分子に置換することで肝臓以外の他の細胞や組織を標的にすることが可能である^[2]。肝臓特異的な Pre-S1 領域を Staphylococcus aureus の Protein A 由来の IgG Fc 結合ドメインである Z ドメインを 2 量体にし

Fig. 1. 子宮への薬剤投与経路

Fig. 2. Hepatitis-B virus (HBV) と bio-nanocapsule (BNC)

たZZドメインと置換した、ZZ提示型BNC (ZZ-BNC) を用いて様々な抗体をBNCに提示させる事により細胞に対して標的化する事が可能である^[10]。ZZ-BNCは遺伝子組み換え酵母を用いて作成し、現在は大量生産が可能となっている。

BNCのヒトへの臨床使用の報告はまだ無いが、研究レベルではin-vitroだけでなくin-vivoにおいても既に様々な報告が行われている。ヌードマウスの背部にヒト肝臓癌由来細胞株を移植して固形癌を形成したxenograftモデルマウスにBNCを経静脈投与したところ、ヒト肝臓癌細胞由来組織にのみ遺伝子や薬剤が送達されたことが確認されている^[2]。肝臓だけでなく、上皮成長因子受容体 (EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor) を過剰発現したグリオーマ細胞をマウスの線条体に移植して固形癌を形成した同所性モデルマウスにおいて、ZZ-BNCを用いて、pre-S1領域のN末端をEGFR抗体で置換したBNCを頭蓋内投与したところ、BNCは腫瘍にのみ集積したことが報告されている^[10, 11]。

本研究では、マウスを用いて、ZZ-BNCを子宮に対するDDSとして最適化を行った。これまで子宮内膜細胞特異的な細胞マーカーの報告はない。そのため、マウス子宮腔内局所へ直接投与する系において、BNCが接触した細胞へできるだけ接着できるような戦略を考えた。そこで、ZZ-BNCにHIV-1領域由来の14量体である細胞接着性のあるトランス活性化転写因子 (TAT) ペプチドを提示させ、BNCの子宮局所に対する至適化、再構築を行った。

材料および方法

1. 動物

マウスはSPFグレードのJcl:ICRマウスをSLC (Shizuoka, Japan) より購入した。マウスは室温 $23 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 、湿度 $45 \pm 15\%$ 、1時間あたり12回の換気が行われ、アンモニア濃度が最大20ppmの環境下で飼育した。部屋の照明は20時に消灯、8時に点灯した。照明の種類は150-300Luxの蛍光灯で40-85cmの高さに配置してあった。マウスは繁殖の1週間前から環境に順応するように飼育した。8-10週齢の雌のICRマウスをICR雄マウスと1対1の割合で繁殖させた。膣栓が観察された朝を交配後0.5日と定義した。すべての動物実験は大坂大学大学院医学系研

究科の倫理委員会の審査・承認の下、大阪大学大学院医学系研究科の動物実験規定に従って施行した。

2. DNAの作成

Luciferase cDNAまたは β -galactosidase cDNAをpcDNA3 (cytomegalovirus promoter driven; Invitrogen, Grand Island NY) のそれぞれ適切な制限酵素切断部位に導入して、Luciferase 強制発現プラスミドDNA (pcDNA3-LUC-GL3) とLacZ強制発現プラスミドDNA (pcDNA3-LacZ) を作成した。プラスミドDNAはQiagenのカラム (Tokyo, Japan) を用いて精製した。

3. TAT-BNCの調整

Human Tubal Mediumで溶解したプラスミドDNA ($250 \mu\text{g}/300 \mu\text{l}$) をカチオン性リポソームであるCoatsome®-EL-01-D (NOF, Tokyo, Japan) と室温にて15分間反応させ、その後、 $250 \mu\text{g}$ のZZ-BNC (Beacle Inc., Kyoto, Japan) を添加し室温で10分間反応させる事によりDNAをZZ-BNCに封入した。マウス子宮腔内への導入直前に $250 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ のNeutr Avidinと $25 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ のTATペプチドと混和し、BNCにTATを付加した。

4. BNCの子宮への導入

cationic lipofectionはlipofectamine™ (Invitrogen, Grand Island, NY) を用いた。Hemagglutinating Virus of Japan-envelope (HVJ-E) vectorおよびHVJ-liposomeは過去の報告と同様の方法で行った^[12, 13]。交配後1.5日目のマウスを麻酔下で開腹し、control-BNCもしくはTAT-BNCを30G針を用いて両側の卵管側より $25 \mu\text{l}$ ずつ ($50 \mu\text{l}$, $160 \mu\text{g}$ DNA/mouse) 直接子宮腔内に導入した (Fig. 3)。なお、すべての方法においてマウスあたりのDNA量、導入懸濁液の量は同様にした。導入後、子宮頸管を10分間クランプし、その後閉腹した。

5. in-vivo imaging

Cy7で蛍光標識したTATを付加していないZZ-BNC (control-BNC) とTAT-BNCを麻酔下でマウス子宮へ導入した。導入24時間後に子宮を摘出し、in-vivo imaging下にZZ-BNC自体の局在を観察した。

Fig.3. マウス子宮へのBNCの導入方法

6. ZZ-BNC 染色

ZZ-BNCを導入した24時間後および48時間後に子宮を摘出し、4% PFAにて4℃で一晩前固定した後に、30% sucroseにて4℃で一晩浸漬し脱水した。脱水後、子宮をTissue-Tek O.C.T. Compound and Cryomolds (Sakura Finetechnical Co. Ltd. Tokyo Japan)で包埋し、厚さ5 μ mの切片をクリオスタットにて作成した。切片はブロッキングの後、ウサギ抗マウス抗ZZ-BNC血清(1:100)と37℃で1時間反応させた。2次抗体として、ヤギ抗ウサギAlexa555(1:1000, Invitrogen)に37℃で1時間反応させた。

7. Luciferase assay

Luciferase 強制発現プラスミドDNA (pcDNA3-LUC-GL3)をBNCにて子宮腔内に導入し、導入24時間後に子宮を摘出した。Luciferase Assay Systems (promega, Madison, WI)を用いて、luciferase assayを施行した。ルミノメーター (Lumat LB950, Berthold, Tokyo, Japan)を用いてマニュアルで生物発光強度の測定を行った。タンパク濃度はBio-Rad protein assay kit

(Bio-Rad, Tokyo Japan)を用いて測定し、タンパク濃度により相対化^[14]した後に比較検討を行った。

8. β -galactosidase 染色

LacZ 強制発現プラスミドDNA (pcDNA3-LacZ) もしくはコントロールとしてLuciferase 強制発現プラスミドDNA (pcDNA3-LUC-GL3)をZZ-BNCにより子宮腔内に導入した。導入24時間後に子宮を摘出し、2% PFA溶液(0.25%グルタルアルデヒド、2% PFA in PBS)にて4℃で一晩前固定した後に、30% sucroseにて4℃で一晩浸漬し脱水した。脱水後、子宮をTissue-Tek® O.C.T. Compound and Cryomolds® (Sakura Finetechnical)で包埋し、厚さ5 μ mの切片をクリオスタットにて作成した。切片は乾燥した後にX-Gal染色液(2mmol/1MgCl₂、5mmol/1K₃Fe(CN)₆、5mmol/1K₄Fe(CN)₆、1mg/ml X-Galを含んだPBS溶液;pH 7.4)に浸漬し37℃で一晩静置した後、HE染色を行った。

9. 統計学的評価

すべての結果はSigmaPlot® software 10.01

(Systat Software, Inc. San Jose, CA) を用いて統計学的な解析を行った。T-test および Mann-Whitney U-test により、 P -value < 0.05 をもって有意差があるとした。

結 果

1. 子宮での BNC の動態

BNC そのものの子宮腔内での動態を検討するために、Cy7 で蛍光標識した TAT を付加していない ZZ-BNC (control-BNC) と TAT-BNC を麻酔下でマウス子宮へ導入した。導入 24 時間後に子宮を摘出し、in-vivo imaging 下に観察した。control-BNC と比較して TAT-BNC では明らかに強い Cy7 の発光の集積が観察された。この結果から、TAT ペプチドの修飾により、より多くの BNC 粒子が貯留する事が示唆された (Fig. 4)。そのため、以降の実験は TAT-BNC を用いた。

2. BNC 粒子の局在

子宮は妊娠の場であり、長期にわたって BNC そのものが停留する場合、その影響を考慮する必要がある。そこで、BNC 粒子そのものの局在を検討するために、抗 ZZ-BNC 抗体を作製し、これを用いて、免疫組織学的染色を行った。導入 24 時間後では、TAT-BNC の粒子は子宮内膜上皮細胞にその局在が確認された。しかしながら、導入 48 時間後になると、子宮内膜上皮においても染色性は認められなかった (Fig. 5)。TAT-BNC 粒子そのものの局在は子宮内膜上皮細胞に局限して一過性に存在するものの、導入後 48 時間で消失する事が明らかとなった。

3. BNC による子宮への遺伝子導入効率

pcDNA3-LUC-GL3 を導入し、24 時間後に Luciferase assay を行い、遺伝子導入効率を検討した。我々は以前、HVJ-E ベクターを用いた高効率の遺伝子導入を報告している^[13]。今回の TAT-BNC による遺伝子導入効率は、HVJ-E ベクターによる方法と同等の遺伝子導入効率を得る事ができた (Fig. 6)。我々が行った lipofection による遺伝子導入では luciferase assay においてほとんど遺伝子導入が認められず、TAT-BNC による遺伝子効率と比較して有意に低値であった ($P < 0.001$)。HVJ-liposome 法による遺伝子導入でも有意に低い遺伝子効率であった ($P < 0.005$)。

Fig. 4. control-BNC と TAT-BNC の子宮での in vivo imaging (BNC 導入24時間後)

Fig. 5. BNC 粒子の局在

Fig. 6. BNC による遺伝子導入効率

4. BNC による導入遺伝子の局在

TAT-BNC により、pcDNA-LacZ もしくはコントロールとして pcDNA3-LUC-GL3 を導入した。導入 24 時間後に摘出した子宮について、 β -galactosidase 染色を行い、導入遺伝子の局在を検討した。子宮内膜腺上皮細胞と子宮内膜上皮細胞に導入遺伝子の局在を認めた (Fig. 7)。

Fig. 7. BNC により導入した遺伝子の局在

考 察

子宮腔内は直接アプローチできる臓器であるのにもかかわらず、DDS だけでなく、子宮を標的とした生体内遺伝子導入方法の報告もあまりなかった。Charnock-Jones ら^[15]と Bagot ら^[16]による cationic liposome を用いた方法があるものの、遺伝子導入効率を検討した報告はなかった。

自験例では cationic liposome による遺伝子導入では十分な導入効率を得る事ができず、それに比べ HVJ-E ベクターを用いた方法では cationic liposome による方法より 120 倍以上高い導入効率を得る事ができた。現在までに、生体内子宮において同等の遺伝子導入効率を証明した報告はない。今回の BNC の pre-S1 領域の N 末端を細胞接着性のある TAT ペプチドに置換した、TAT-BNC によるマウス子宮における遺伝子導入効率では、HVJ-E ベクターによる遺伝子導入効率と同等の遺伝子導入効率を得る事ができた。TAT-BNC をマウスの子宮腔内に注入すると、TAT-

BNC そのものは子宮の内膜管腔上皮内に留まり少なくとも 24 時間は停留するが、48 時間後には消失した。そのため、TAT-BNC 自体が長期に停留する事によるリスクについて考慮する必要はないと考えられる。また、導入遺伝子は子宮内膜上皮細胞に局限しているため、子宮内膜病変を治療する DDS に適していることが示唆された。

子宮内膜病変を治療する局所 DDS としては妊孕性温存希望のある初期子宮体癌患者の治療への応用が考えられる。子宮体癌は我が国において近年増加傾向にある重要な疾患である。40 歳未満の若年者の占める割合は 2011 年度では 5.5% となっており^[17]、決して少ない割合ではない。標準治療は子宮摘出を行うが、若年者の場合には妊孕性の温存を希望する場合も多い。現在は妊孕性温存療法としては酢酸メドロキシプロゲステロン (medroxyprogesterone acetate; MPA) を用いた治療が行われている^[18]。妊孕性温存療法は基本的には IA 期の高分化型 (G1) endometrioid adenocarcinoma に行われ、完全寛解導入率は 41.7 から 100%、再発率は 18.2 から 100%、生産率は 5.3 から 41.7% と報告によりかなり差がみられる。治療後の子宮内膜への影響として、妊孕性温存療法後群と対照群では排卵日の子宮内膜厚が 8mm 未満の症例が各々 41.6%、11.4% と妊孕性温存療法後群で有意に多く、子宮内膜厚が 10mm 以上の症例が各々 0%、43.8% と妊孕性温存療法後群で有意に少なかったと報告されている^[21]。このように MPA を用いた治療後は一定の妊娠を望めるものの、再発率も高く、頻回に子宮内膜搔爬を行うため、子宮内膜の反応性が低下し子宮内膜が菲薄化するという副作用も認められる。そのため、このような妊孕性温存を希望する早期の子宮体癌患者へ再発率が低く、副作用も少ない新たな妊孕性温存療法が必要だと考えられる。

今回の検討では子宮局所への直接的なアプローチにより子宮に局限した投与ではあるものの TAT ペプチドは接触した細胞に接着する性質のため、TAT-BNC に抗がん剤を封入して子宮に投与する戦略では正常子宮内膜細胞に対する抗がん剤の副作用を考慮する必要がある。今回用いた TAT ペプチドの代わりに Pre-S1 領域を子宮体癌細胞に特異的な抗体で置換することにより子宮局所でがん細胞に再標的化が可能になると考える。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御協力頂いたすべての皆様に深く感謝致します。特に、BNCの調整等については、大阪大学産業科学研究所の松下葉子様、土田翔太様の御助力を頂きました。凍結切片の作製については、大阪大学産婦人科の岡本里美様、鎌田恵利子様の御助力を頂きました。

本研究の施行にあたっては日本学術振興会 (Tokyo, Japan) 科学研究費補助金 (Nos. 20659258) の援助の下、行われました。

引用文献

- 1) Kuroda S, Otaka S, Miyazaki T, Nakao M and Fujisawa Y. 1992. Hepatitis B virus envelope L protein particles. Synthesis and assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, purification and characterization. *J Biol Chem.* 267:1953-1961.
- 2) Yamada T, Iwasaki Y, Tada H, Iwabuki H, Chuah M K, VandenDriessche T, Fukuda H, Kondo A, Ueda M, Seno M, Tanizawa K and Kuroda S. 2003. Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nat Biotechnol.* 21:885-890.
- 3) Hollinger F. B L T J. 2001. Hepatitis B Virus, *Fields Virology*. 4th ed. 2971-3036. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 4) Robinson.W.S. 1995. Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus, *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th ed. B. J. E. Mandell G. L., Dolin R., ed. 1406-1439. Churchill Livingstone, New York.
- 5) Yamada T, Iwabuki H, Kanno T, Tanaka H, Kawai T, Fukuda H, Kondo A, Seno M, Tanizawa K and Kuroda S. 2001. Physicochemical and immunological characterization of hepatitis B virus envelope particles exclusively consisting of the entire L (pre-S1 + pre-S2 + S) protein. *Vaccine.* 19:3154-3163.
- 6) Heermann K H, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H and Gerlich W H. 1984. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol.* 52:396-402.
- 7) Neurath A R, Kent S B, Strick N and Parker K. 1986. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell.* 46:429-436.
- 8) De Meyer S, Gong Z J, Suwandhi W, van Pelt J, Soumillion A and Yap S H. 1997. Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection: a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes. *J Viral Hepat.* 4:145-153.
- 9) Jung J, Matsuzaki T, Tatematsu K, Okajima T, Tanizawa K and Kuroda S. 2008. Bionanocapsule conjugated with liposomes for in vivo pinpoint delivery of various materials. *J Control Release.* 126:255-264.
- 10) Tsutsui Y, Tomizawa K, Nagita M, Michiue H, Nishiki T, Ohmori I, Seno M and Matsui H. 2007. Development of bionanocapsules targeting brain tumors. *J Control Release.* 122:159-164.
- 11) Kurata N, Shishido T, Muraoka M, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H and Kondo A. 2008. Specific protein delivery to target cells by antibody-displaying bionanocapsules. *J Biochem.* 144:701-707.
- 12) Kaneda Y, Nakajima T, Nishikawa T, Yamamoto S, Ikegami H, Suzuki N, Nakamura H, Morishita R, Kotani H. Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system. 2002. *Mol Ther.* 6:219-26.
- 13) Nakamura H, Kimura T, Ikegami H, Ogita K, Koyama S, Shimoya K, Tsujie T, Koyama M, Kaneda Y and Murata Y. 2003. Highly efficient and minimally invasive in-vivo gene transfer to the mouse uterus using haemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector. *Mol Hum Reprod.* 9:603-609.
- 14) Saeki Y, Wataya-Kaneda M, Tanaka K and Kaneda Y. 1998. Sustained transgene expression in vitro and in vivo using an Epstein-Barr virus replicon vector system combined with HVJ liposomes. *Gene Ther.* 5:1031-1037.

- 15) Charnock-Jones D S, Sharkey A M, Jagers D C, Yoo H J, Heap R B and Smith S K. 1997. In-vivo gene transfer to the uterine endometrium. *Hum Reprod.* 12:17-20.
- 16) Bagot C N, Troy P J and Taylor H S. 2000. Alteration of maternal Hoxa10 expression by in vivo gene transfection affects implantation. *Gene Ther.* 7:1378-1384.
- 17) 国立がん研究センターがん情報サービス
- 18) Kelley R M and Baker W H. 1961. Progestational agents in the treatment of carcinoma of the endometrium. *N Engl J Med.* 264:216-222.
- 19) Ohyagi-Hara C, Sawada K, Aki I, Mabuchi S, Kobayashi E, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Tsutsui T, Kimura T. Efficacies and pregnant outcomes of fertility-sparing treatment with medroxyprogesterone acetate for endometrioid adenocarcinoma and complex atypical hyperplasia: our experience and a review of the literature. 2015. *Arch Gynecol Obstet.* 291: 151-7.
- 20) Elizur S E, Beiner M E, Korach J, Weiser A, Ben-Baruch G and Dor J. 2007. Outcome of in vitro fertilization treatment in infertile women conservatively treated for endometrial adenocarcinoma. *Fertil Steril.* 88:1562-1567.

A new local drug delivery system for the uterus using bio-nanocapsule (BNC)

Kaori Koizumi ^{a)}, Hitomi Nakamura ^{a)*}, Takashi Matsuzaki ^{b),c)}, Shun'ichi Kuroda ^{b)},
Tsuyoshi Takiuchi ^{a)}, Keiichi Kumasawa ^{a)} and Tadashi Kimura ^{a)}

^{a)} Department of Obstetrics and Gynaecology, Osaka University Graduate School of Medicine
(2-2 Yamadaoka, Suita-shi, Osaka, 565-0871, Japan)

^{b)} Department of Cardiovascular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine
(2-2 Yamadaoka, Suita-shi, Osaka, 565-0871, Japan)

^{c)} The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University
(8-1 Mihogaoka, Ibaraki-shi, Osaka, 567-0047, Japan)

*Corresponding author: Hitomi Nakamura

Tel: +81-06-68793351

E-mail: hitomi@gyne.med.osaka-u.ac.jp

Key words:

Bio-nanocapsule (BNC), Hepatitis B (HBV), uterus, Drug Delivery System (DDS)

Abstract:

Problem : BNC containing hepatitis B virus surface antigen consists of approximately 50-nm hollow particles displaying a human hepatocyte-recognizing molecule (pre-S1 peptide). BNC has been used as an HB vaccine for the last two decades. In this study, we optimized the BNC as a new drug delivery system (DDS) for uterus.

Method of Study : The N terminal of Pre-S1 peptide was replaced with the TAT (trans-activating transcription factor) peptide. The Cy5.5 labeled BNC was transferred into the murine uterine cavity. The distribution of BNC was observed by in-vivo imaging system and also by immunohistochemistry. The luciferase expression plasmid DNA was incorporated into BNC using liposome (Coatsome EL-01-D). The luciferase expression plasmid DNA was transferred into uterine cavity using TAT-BNC-liposome complex. The efficiency of gene transfection was analysed by luciferase assay.

Results : TAT-BNCs temporarily stayed in uterus. BNCs were observed in luminal and glandular epithelial cells, but not in stroma and myometrium. The transfection efficiency of the TAT-BNC-liposome complex was significantly higher than lipofection.

Conclusion : These results suggest that BNC could be an applicable DDS for uterus. In this study, we replaced the N terminal of Pre-S1 peptide with TAT peptide. However, it is replaceable with sugar chains and antibodies. Recently there are some reports that some of special sugar chains are expressed on uterine endometrium during pregnancy and uterine cancer. If we can find specific sugar chains or cell surface antibodies on uterine endometrium for reproductive dysfunction and uterine cancer, this DDS system can be more targetable.