

長寿医療研究開発費 平成29年度 総括研究報告

認知症治療用高分子薬剤における血液脳関門の透過性向上を目的とした基盤研究
(28-23)

主任研究者 中西 章 国立長寿医療研究センター
ラジオアイソトープ管理室、老化制御研究部・遺伝子治療研究室(併) (室長)

研究要旨

有効な認知症治療法開発のためには、脳実質への効率的な薬剤デリバリーが必要である。しかし脳実質への輸送を制御する血液脳関門(BBB)は浸透性が極めて低く、特に高分子医薬の開発における最も大きなハードルとなっている。本研究では、認知症に対する高分子治療薬、特に治療用抗体の効果的な脳実質内導入を可能にするための基盤研究を行い、その治療法開発に貢献することを目的とする。具体的には、抗体など生体高分子を脳実質に効果的に導入できるペプチドモチーフをスクリーニングするため、(1)ランダムペプチドライブラリーの提示プラットフォームとして強固な環状構造をとりうる Knottin タンパク質を採用、(2) トランスサイトosis標的として実証されているトランスフェリン受容体(TfR)をペプチドモチーフの具体的な結合標的として設定し、(3) 独自に開発した *in vitro* BBB モデルを用いて TfR 結合モチーフの透過性を評価する。可能であれば候補モチーフを結合させた抗体の BBB 通過を *in vivo* で検証し、脳実質への抗体導入を目的とした新規デリバリー担体の創製を目的とする。本年度は、前年度に引き続き *in vitro* BBB モデルを利用して抗 TfR 抗体に代わるトランスサイトosis様活性をもつ抗体の検索を行った。また、これまでの T7 フェージディスプレイライブラリーからのスクリーニングより得られたモチーフについて、TfR 結合性及び *in vitro* BBB モデルでの吸収性を検討したが、有効な活性を示すモチーフは見つからなかった。最後に、これまでの TfR 結合モチーフ候補を選別に使用していたフェージディスプレイ系でのスクリーニングに換えて、より高速で簡便なスクリーニングが可能なりボソームディスプレイ系を構築した。今後は、リボソームディスプレイ系を利用して有効な BBB 透過モチーフ候補の迅速な選別を進める。

主任研究者

中西 章 国立長寿医療研究センター
ラジオアイソトープ管理室、老化制御研究部・遺伝子治療研究室(併) (室長)

A. 研究目的

人口高齢化に伴ってアルツハイマー病などの認知症は増加しており、その治療法の開発は急務である。しかしながら、現在臨床で使用できる薬剤は限られており、その効果も限定的である。認知症治療用薬剤の開発が難しい理由のひとつに、血液脳関門 (Blood Brain Barrier :BBB) の存在がある。脳実質への輸送を制御する BBB は浸透性が極めて低く、特にアルツハイマー型認知症の治療薬候補として様々なものが開発されている抗体医薬にとって BBB 透過性の獲得は必要不可欠である。

本研究では、認知症に対する高分子治療薬の効果的な脳実質内導入を可能にするため、脳実質に抗体を導入できる新規デリバリー担体の探索を行う。脳実質への効率的な導入が早急に求められている認知症用治療抗体の早期利用が最終的な目的である。

B. 研究方法

I. In vitro BBB モデルによる高分子透過性の評価

a) 細胞培養

ヒト iPS 細胞より血管内皮細胞に分化させた iCell Endothelial cells (iCell EC、Cellular Dynamics)は、Fibronectin 100 μ g/ml+ Collagen IV 400 μ g/ml でコートした培養ディッシュあるいはトランスウェルに、Vasculife (Kanebo)を基本としたメディウムで培養した。不活化マウス血管内皮細胞 bEnd.3 は、Dolbecco's Minimum Essential Medium+10% Fetal Bovine Serum (FBS)で培養した。

b) トランスウェル培養とトランスサイトーシスアッセイ

各細胞は、12 ウェル トランスウェルプレート(Corning Catalogue No. 3401) に対して、約 5×10^4 cells/well の濃度で播種した後 3-7 日培養し細胞シートを形成させた。また、24 ウェル トランスウェルプレート(Corning Catalogue No. 3460)を用いる場合は、約 1×10^4 cells/well の濃度で播種した。物理的関門性の形成は、経内皮電気抵抗 (TEER)を EBOM-2 (ESM)で計測して評価した。

トランスサイトーシスアッセイ (PLoSOne 2014 9:e96340.; Neuron 2014 81:49–60.)では、十分な関門性を持つ細胞シートを形成したトランスウェルに対して、培養液を血清無しのものに交換し、1 時間培養した。その後、血清入りの培養液に戻して目的のリガンド等を加え 1 時間培養後、血清無しの培養液で 4 回洗い、再び血清入りの培養液に換え、3 時間培養した。この間、1 時間毎にトランスウェル上部、下部より培養液をサンプリングし、トランスサイトーシス活性の評価を行った。

c) Sandwich ELISA による抗体の検出

トランスサイトーシスアッセイで採取した抗体サンプルは、Sandwich ELISA でその抗

体量を定量した。Luminescence 検出用の Maxisorp 96well plate に対し、サンプルの抗体がマウス由来であれば、1 μ g/ml の抗マウス IgG Fc γ 抗体を 0.1ml 加え吸着させた後、サンプルを添加・培養の後、ビオチン標識抗マウス F(a,b)抗体で反応後、Streptavidin-PolyHRP40 で処理した。ラット、ヒト抗体を検出する場合は、各々の抗 IgG Fc γ 抗体、ビオチン標識抗 F(a,b)抗体を使用した。Streptavidin-PolyHRP40 反応後、BM Chemiluminescence ELISA Substrate(Roche)での発光反応により、サンプル内の抗体量を定量した。

II. T7 フェージディスプレイで取得された BBB 透過モチーフ候補の解析

a) Knottin-NanLuc 融合蛋白質の作成

T7 フェージライブラリーより TfR 結合モチーフとしてスクリーニングされた 15 クローンは、10mM EDTA で希釈、65 $^{\circ}$ C 10 分処理にて DNA を粗抽出した後、PCR により TfR 結合モチーフを含む Knottin コード部分を PCR で増幅した。この DNA 断片と、NanoLuc 配列をコードする下記リボソームディスプレイ作成用人工遺伝子を鋳型にして、Knottin-Nanoluc 融合蛋白質コード配列断片を PCR で作成した。更に、これら断片の 5' 末端側と 3'末端側にそれぞれ T7 プロモーター配列、T3 ターミネーター配列を PCR により導入し、試験管内翻訳用鋳型 DNA を作成した。これら DNA は PUREflex2.0 及び DS supplement(ジーンフロンティア)により、試験管内転写・翻訳による Knottin-NanoLuc 融合蛋白質作成に用いた。

b) TfR 結合アッセイ

試験管内翻訳により作成された、各 TfR 結合モチーフを提示する 15 種の Knottin-NanoLuc 融合蛋白質は、予め組換え hTfR でコートされた Luminescence 検出用の Maxisorp 96well plate に供され、4 度 overnight で培養、洗浄の後、Nano-Glo $^{\circ}$ Luciferase Assay System (Promega)で NanoLuc 活性を測定した。

c) iCell EC 吸収アッセイ

上記 15 種の Knottin-NanoLuc 融合蛋白質は、96well plate に播種培養された iCell EC の培養液中に一定量添加の後、1 時間培養、洗浄ののち、細胞内に残存する NanoLuc 活性を Nano-Glo $^{\circ}$ Luciferase Assay System にて測定した。

III. リボソームディスプレイ法の開発

a) リボソームディスプレイプラットフォームの作成

Myc-tag – Linker – MCoTI-II – Linker – NanoLuc – 3xFLAG – SecM をコードする配列は人工遺伝子合成(Genscript)で作成した。MCoTI-II は Knottin タンパク質であり *Momordica cochinchinensis* (ナンバンカラスウリ) からの Trypsin inhibitor II、NanoLuc は *Oplophorus gracilirostris*(トゲオキヒオドシエビ)由来の発光タンパク質である。MCoTI-II のループコード領域に、人工遺伝子合成時において予め導入した制限酵素サ

イトを利用して、8アミノ酸のランダムペプチドをコードする断片を挿入した。ランダムペプチドコード配列には、Cys/Stop codonを除いたアミノ酸のコドントリプレット、trimer phosphoramidite、をランダムな組み合わせで合成したオリゴヌクレオチド

(Trimer-technology, Ella Biotech.) を利用した。更に、5'末端側と3'末端側にそれぞれT7プロモーター配列、T3ターミネーター配列をPCRにより導入し、試験管内翻訳用鋳型DNAを作成した。mRNA-リボソーム-新生タンパク質の3者複合体形成条件、及びMCoTI-II Foldingの最適化条件を検索するため、T3ターミネーターに換えてStopコドンを導入したもの、あるいはMCoTI-II野生型配列に換えてTrypsin結合阻害変異であるK6A変異を導入した変異体もPCRにより作成した。これらPCRで作成されたDNA断片は、PUREflex2.0及びDS supplementによる試験管内転写・翻訳に供された。

b)複合体形成条件の検討

mRNA-リボソーム-新生タンパク質の3者複合体形成の効率を確認するため、試験管内転写・翻訳反応について、抗Myc-tag抗体処理後ProteinG magnetic beadsによる免疫沈降あるいはTrypsin-magnetic beadsへの結合確認を行った。両者ともビーズへの結合は、Nano-Glo® Luciferase Assay SystemによるNanoLuc活性の測定、またはQIAamp viral RNA miniキット(Qiagen)によるRNA抽出後、One Step SYBR® PrimeScript® PLUS RT-PCR Kit(Takara)による定量RT-PCRでRNAの定量を行った。RNA定量の際には、StandardとしてMCoTI-IIの野生型をコードする人工遺伝子断片を基に作成した鋳型を用いT7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System(Promega)により試験管内転写を行い、MEGAclear Transcription Clean-Up Kit(ThermoScientific)により精製したRNAを用いた。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験は、機関内委員会の承認を経て実験を行った。倫理規定に該当する研究部分はない。

C. 研究結果

I. In vitro BBBモデルによる高分子透過性の評価

生体高分子のBBB透過性を評価するため、iCell ECによるin vitro BBBモデルを利用したトランスサイトーシスアッセイの開発については前年度報告した(長寿医療研究開発費 課題番号28-23 H28年度報告書を参照)。この方法は、トランスウェルで培養したiCell ECに対して、生体高分子(例えば抗体など)を一旦取り込ませ、その後の培養により、apical(頂端)側、basolateral(基底膜あるいは側底)側に排出された抗体をSandwich ELISAにより検出するものである。これまでの結果では、iCell EC(ヒト血管

内皮細胞株)を用いた場合、ヒトTfRを認識する抗TfR抗体においては、側底・頂端側共に投与量の約1%にあたる抗体が検出され、iCell ECでのトランスサイトーシス様移動が示された。またこの移行はBafilomycin A1 (200nM)、Tannic acid (0.125%)で阻害がみられ、エンドサイトーシス関連の移行に関わることがわかっている。一方iCell ECを用いてのアッセイでは齧歯類のTfRより作成された他3種の抗体は頂端側あるいは側底側への透過性は見られなかったが(Fig.1)、bEnd3細胞(マウス血管内皮細胞)ではこれら3種のうちマウスTfRを認識する抗体は頂端側あるいは側底側への透過性がみられ、逆にヒトTfRを認識する抗体は透過性がみられなかった。

iCell ECによるトランスサイトーシスアッセイについて、抗 β 抗体、そして血管内皮細胞に発現するとされている種々の生体分子に対する抗体を対象にして検討した。抗 β 抗体(Fig.1)、抗P-glycoprotein(MDR1)抗体、抗VE-Cadherin抗体などは、いずれも透過性を観察することができなかった。従って、トランスサイトーシスアッセイで観察される透過性は抗体一般的な性質では無く、また脳微小血管内皮細胞に良く発現する表面抗原に対する抗体ではみられない、抗TfR抗体による特異なものであることが確認された。

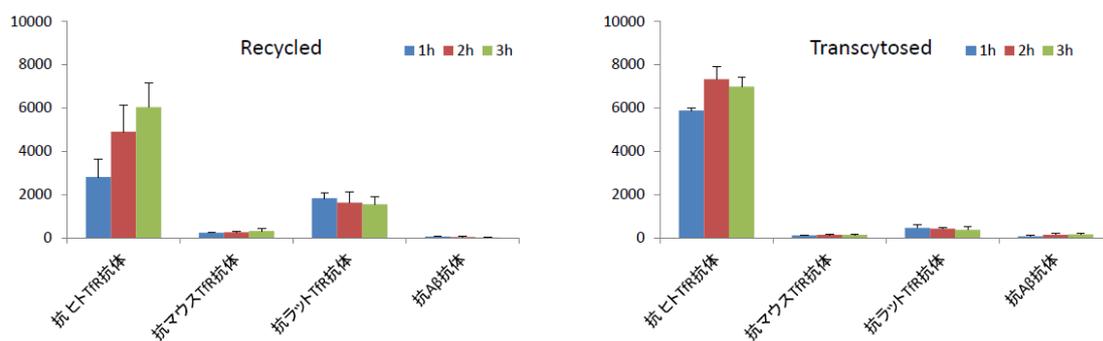


Fig.1 iCell ECを用いた各抗体のトランスサイトーシスアッセイ

各抗体をiCell ECに1時間吸収させた後、培養液中の抗体を洗浄・除去し、細胞内に吸収された抗体がその後の1, 2, 3時間の培養の後、頂端側(Recycled)、側底側(Transcytosed)へ移行した量をSandwich ELISAで定量した。

II. T7 フェージディスプレイで取得された BBB 透過モチーフ候補の解析

3 箇所のジスルフィド結合による強固かつ安定な立体構造をとる Knottin タンパク質を利用し、そのタンパク質の表面ループに 8 アミノ酸長のランダムペプチド配列を挿入した T7 フェージライブラリーより TfR 結合モチーフをスクリーニングした結果は既に報告した(長寿医療研究開発費 課題番号 28-23 H28 年度報告書を参照)。野生型 T7 フェージよりも組換え TfR タンパク質への高い結合性が見られた 10 つの T7 クローンが取得できたが、更にパニングを行い、組換え TfR タンパク質へ結合が見られたもので新たに 5 クローンを加えた。計 15 クローンについて、BBB 透過モチーフ候補配列を含む Knottin

配列部分について分子クローニングにより、発光タンパク質 NanoLuc との融合遺伝子を作成し、試験管内翻訳によりその融合蛋白質を作成した(Fig. 2A)。得られた各タンパク質について、組換え hTfR タンパク質への結合性を評価したところ、いずれのクローンでも組換え hTfR タンパク質に対して強い結合は観察されなかった(Fig.2B)。また、各融合蛋白質について iCell EC を用いた *in vitro* BBB モデルによる吸収アッセイを行ったが、いずれの融合蛋白質も特異的に吸収されているとは考えられず、透過モチーフと考えられる配列はなかった(Fig.2C)。

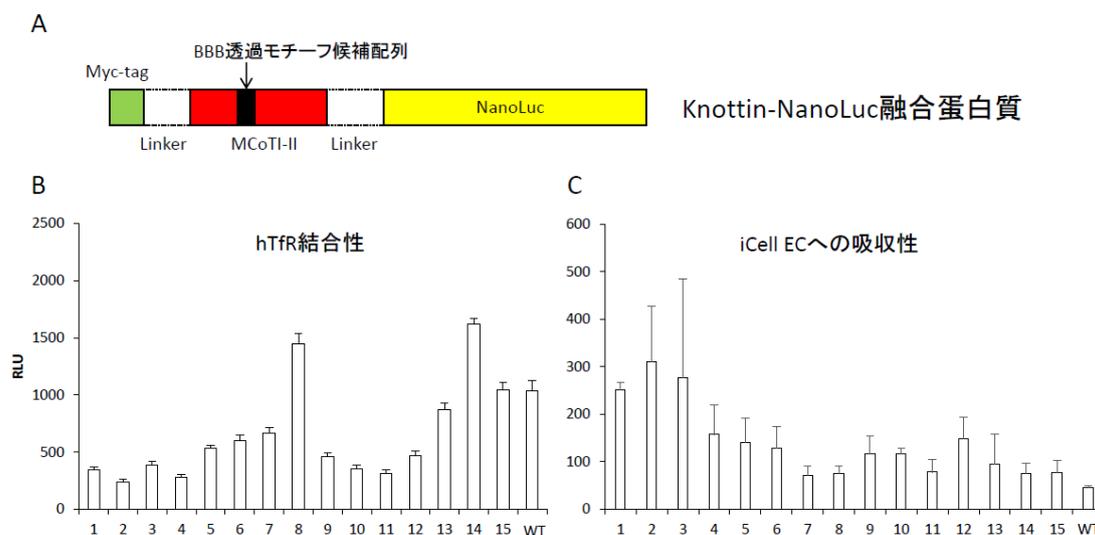


Fig.2 Knottin-NanoLuc 融合蛋白質による BBB 透過モチーフ候補配列の解析：(A), Knottin-NanLuc 融合蛋白質の模式図；(B), 各融合タンパク質について、組換え hTfR タンパク質への結合性を解析。縦軸は NanoLuc 活性を示す。；(C), 各融合タンパク質について iCell EC への吸収性を評価。それぞれ一定量を 1 時間細胞に吸収させた後、培養液の交換・細胞の洗浄を行い、細胞内に吸収されたタンパク質量について、NanoLuc 活性を指標に評価した。

III. リボソームディスプレイプラットフォームの作成

これまで行ってきた T7 フェージディスプレイでのランダムペプチドスクリーニングより、簡便かつ高速なスクリーニング法としてリボソームディスプレイ法によるスクリーニング系を作成した。リボソームディスプレイ法とは、試験管内での転写・翻訳の際、翻訳終了を阻害し mRNA とリボソームの解離をブロックすると、mRNA-リボソーム-新生タンパク質の 3 者複合体が安定形成される。翻訳されたタンパク質がランダムペプチドライブラリーを提示していれば、特定のタンパク質への結合性から結合モチーフをコードする mRNA を含む 3 者複合体を回収できる。回収した複合体から mRNA を抽出し、逆転写-PCR によりタンパク質モチーフの情報を獲得し、このサイクルを繰り返すことに

より、ランダムペプチドライブラリーから特定のタンパク質に結合するモチーフをスクリーニングするというものである。3者複合体を生成させるため、以下の遺伝子配列をコードする人工遺伝子配列を作成した。(1) 3者複合体の精製するためのタグとしてのMyc-tag配列、(2) T7ファージライブラリーの場合と同様に、8アミノ酸長ランダムペプチド配列を表面ループに提示したMCoTI-II、(3) 新生タンパク質として正しくFoldしていること及び3者複合体のモニターのためのNanoLuc配列、そして(4) 新生タンパク質の翻訳を途中で止めて3者複合体形成をはかるためにE.coliの分泌タンパク質翻訳効率を制御するSecMタンパク質の機能配列部分(SecM配列)をコードする配列など、であり、Myc-tag – Linker – MCoTI-II – Linker – NanoLuc – 3xFLAG – SecMといった順番の配列をデザインし、人工遺伝子として合成した (Fig. 3)。

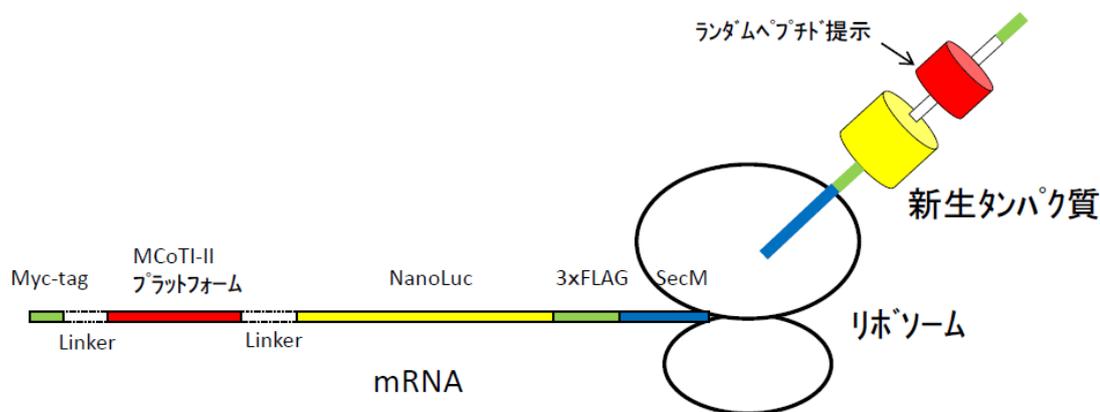


Fig. 3 リボソームディスプレイの模式図

mRNA-リボソーム-新生タンパク質の3者複合体を模式的に表す。Myc-tag、MCoTI-II、NanoLuc、3xFlag、SecMのmRNA・タンパク質部分はそれぞれ緑、赤、黄、緑、青で示す。

最終的な鋳型DNAは上記の人工遺伝子配列の5'末端側と3'末端側にそれぞれT7プロモーター配列、T3ターミネーター配列が導入されており、これを鋳型にして試験管内転写・翻訳により3者複合体を作成した。ランダムペプチド配列はKnottin(MCoTI-II)のループ上に導入してあるため、ランダムペプチド配列の安定した提示のためにはMCoTI-IIの正しいFoldingが必要である。それを確かめるため、Trypsin結合性を指標に野生型MCoTI-II及びTrypsin結合阻害変異を導入したK6A MCoTI-IIについてそのTrypsin-beadsへの結合性を共沈できるNanoLuc活性およびRNA量で比較したところ、結合阻害変異では野生型に比べTrypsin-beadへの結合性が約50%阻害されており、確かにMCoTI-IIとしての機能ドメインが形成されていた。また3対のS-S結合をもつKnottinタンパク質のFoldingを促進する目的で、S-S結合のtrans-isomerization反応を行うDbsC等の添加条件を検討した。野生型MCoTI-IIのTrypsin結合性を指標にしたところ、

trans-isomerization反応を追加することで、3者複合体のTrypsin- beads への結合性は促進された(Data not shown)。また、3者複合体を超遠心分離で採取し、EDTAの添加によりリボソームcomplexの解離を誘導したところ、3者複合体部分にあたる超遠心ペレット分画にはmRNAはEDTA無添加の場合に比べ約1/100となっており、mRNAが3者複合体として取り込まれていることを確認した。最後に、SecMの翻訳阻害による3者複合体の形成効率を、共沈できるRNA量で比較したところ、Myc-tagでの共沈ではStopコドン有無は変わらなかったが、Trypsin-beadsによる共沈では、Stopコドン無しの場合には有に比べ約10倍高かった。この結果は、新生タンパク質がSecM配列により翻訳途中で止まってしまった場合、Stopコドン無しの方がより効率にFoldできることを示している。以上の予備実験の後、MCoTI-IIの表面ループ部分に8アミノ酸のランダムペプチド配列を導入し、約 2×10^{11} のバリエーションをもつと考えられるランダムペプチドライブラリーを構築した。

D. 考察と結論

ヒト iPS 細胞より分化させたヒト血管内皮細胞である iCell EC を利用したトランスサイトーシスアッセイについてこれまでは抗 TfR 抗体のみを対象に検討してきた。しかし最近の研究により、Solute Carrier Transporter に属する SLC3A2(CD98hc)に対する抗体がトランスサイトーシス活性を持って BBB を通過できることが報告されている(Joy Yu Zuchero et al. Neuron 2016, 89:70-82)。TfR はエンドサイトーシスで取り込まれることがわかっているが、SLC3A2 については詳細が不明である。これまではエンドサイトーシスで取り込まれることがわかっている種々のレセプター分子に対する抗体を対象にしてトランスサイトーシス活性を調査してきたが、SLC3A2 を例とするような、頻りにエンドサイトーシスでリサイクリングがおこらないとされているトランスポーターについても、調査の手を広げていく必要があるかもしれない。本年度は、BBB 形成に必須で有り主要な Solute Carrier Transporter である MDR1 に対する種々の抗体そして対照として抗 A β 抗体についてトランスサイトーシス様移行について iCell EC による実験系で検討した。今回は種々の抗 MDR1 抗体、抗 A β 抗体について、抗 TfR 抗体とは異なり、頭頂側、基底側への移行がほぼ見られなかったが、今後もトランスサイトーシス様活性をもつ新たな抗体を検索する試みを続ける。

一方、T7 フェージディスプレイでスクリーニングされた 15 種の TfR 結合候補モチーフについて、NanoLuc 融合蛋白質として作成し、TfR 結合性、iCell EC での吸収活性の検討を行った。T7 フェージカプシド上での融合蛋白質としては TfR 結合性があるように見えたこれらのモチーフも NanoLuc との融合蛋白質として作成し、組換え TfR との結合に供した際には明らかに結合しているというモチーフは見られなかった。同様に iCell EC を用いた吸収アッセイでも有意に細胞に吸収されているクローンは見つからなかった。実際、抗 TfR

抗体の場合は、全体の約1%が、T7クローンの場合は全体の0.1~0.01%が側底側に排出されており、細胞内に吸収されていた量はそれ以上と考えられるが、各融合蛋白質の吸収量は0.01%前後で有り、特異的に吸収されているとは考えられなかった。T7ファージ上に提示されている場合は数十分子が一つのファージ上に存在するため、affinityより validity による見かけ上の結合が主であった可能性もある。1対1の結合にした場合には検出できないほど弱いモチーフを選別していたとも考えられる。

以上の実験結果をうけて、スクリーニング系自体を再構築する必要を感じたため、T7ファージライブラリーより高速でより簡便にスクリーニングが可能であるリボソームディスプレイ法を作成した。この方法は以前、技術的に困難な工程が幾つかあったが、近年の改良により取扱が可能になったため今回採用した。本年度は、その実験系の確立とライブラリーの作成を行った。今後は、計画自体の遅れを取り戻すべく、高速スクリーニングの利点を生かして、モチーフ単離を進める。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Viral Population Changes during Murine Norovirus Propagation in RAW 264.7Cells.
Kitamoto T, Takai-Todaka R, Kato A, Kanamori K, Takagi H, Yoshida K, Katayama K, Nakanishi A.

Front. Microbiol. 8:1091. doi: 10.3389/fmicb.2017.01091

2) 血液脳関門の薬物透過性の評価法

小関弘恵知、中西 章

DDS 先端技術の製材への応用開発 技術情報協会、p477-483、2017

3) ノロウイルス研究の最近の知見

片山和彦、芳賀慧、藤本陽、戸高玲子、村上耕介、村田和義、中西 章
感染制御と予防衛生

メディカルレビュー社、p4-11、2017

4) ウイルス学会関連研究集会紹介 第36回アメリカウイルス学会

中西 章

ウイルス

日本ウイルス学会 第67巻、第2号、p173-176、2017

2. 学会発表

1) Viral Population Changes during Adaptation of Murine Norovirus to RAW 264.7 Cell-Culture Conditions.

Nakanishi A, Takai-Todaka R, Kato A, Katayama K, Kanamori K, Kitamoto T

36th Annual Meeting of American Society for Virology (2017) June 25, Madison, WI, USA

2) ヒトアストロウイルス感染時のストレス顆粒様構造体の形成

磯部智康、田崎秀尚、金森久美子、中西 章

第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017 年 10 月 25 日 大阪

3) 血液脳関門透過モチーフに関する探索研究

小関 弘恵知、北本卓也、吉田 和央、中西 章

第 38 回日本分子生物学会 2017 年 12 月 6 日 神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし