

長寿医療研究開発費 平成26年度 総括研究報告

認知症治療用薬剤の血液脳関門通過促進を目的とした基盤研究（25-17）

主任研究者 中西 章 国立長寿医療研究センター
老化制御研究部・遺伝子治療研究室（室長）

研究要旨

アルツハイマー型認知症の治療薬候補として報告されている種々の抗体医薬にとって、血液脳関門（Blood Brain Barrier :BBB）に対する透過性の獲得は必要不可欠である。本研究は脳実質に抗体を導入できる新規デリバリー担体の探索そして導入法の構築を試み、認知症用治療抗体の早期利用を最終的な目的とする。

十分な関門性をもつ信頼性の高いスクリーニング系を作成するため、ヒト iPS 由来の血管内皮細胞、iCell Endothelial Cells(iCell EC)、を用いトランスウェル培養系にて、in vitro BBB モデルの構築を試みた。特定の培養条件下の iCell EC では脳微小血管内皮細胞(Brain Microvascular Endothelial Cell: BMVEC) に特徴的な遺伝子発現を確認できたが、ヒト不死化 BMVEC である hCMEC/D3 細胞では、BMVEC に特徴的な遺伝子数種の発現レベルが低かった。関門性の指標となる経内皮電気抵抗 (TEER) について、hCMEC/D3 細胞で約 120 Ω/cm^2 前後の値を達成できたが 42 日間の培養を必要とするのに対し、iCell EC は 3 日間の培養で同様の TEER 値を達成できた。

BBB 通過モチーフのスクリーニングに用いるランダムペプチドライブラリーとして、本年度は、高い構造安定性で知られる Knottin モチーフを提示プラットフォームに用い、8 アミノ酸長のランダムペプチドを提示した T7 フェージライブラリーを作成した。また、具体的な結合ターゲットとしてトランスフェリンレセプターを想定し、既存のフェージライブラリーを試用して結合モチーフの単離が可能であることを確かめた。

主任研究者

中西 章 国立長寿医療研究センター 老化制御研究部・遺伝子治療研究室（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 モデル構築の試み

a) 血管内皮細胞、Astrocyte、Pericyte の培養

不死化したヒト脳微小血管内皮細胞 (Brain Microvascular Endothelial Cell: BMVEC) 培養株である hCMEC/D3 は、Collagen I コートした培養ディッシュあるいはトランスウェルに、EBM-2 (Lonza) を基本とした培養液で行った。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) あるいは Endo-SFM (EndSFM; Lifetechnologies) を基本としたメディアウムで培養した。Human astrocyte (Normal human primary astrocyte、Lonza)、Rat astrocyte (Rat primary astrocyte、コスモバイオ)、Pericyte (Brain vascular pericyte、ScienCell) は、それぞれ AGM blue kit (Lonza)、Rat astrocyte medium(コスモバイオ)、Pericyte medium(ScienCell) で培養した。Pericyte あるいは Astrocyte を iCell EC との共培養に供する際には 12well を用い、各細胞用の培養液で 2 日間培養の後、共培養に供した。共培養の際には、iCell EC 細胞用の培養液を用いた。

b) 遺伝子発現解析

BMVEC で特徴的な遺伝子発現が報告されている計 31 種の遺伝子、ABCB1, ABCC1、ABCC2、ABCC4、ABCC5、ABCG2、AGER、APCDD1、BCAM1、CDH5、Cdn12、Cldn3、Cldn5、INSR、LDLR、LEPR、LRP1、MARVELD2、PECAM1、PLVAP、SLC1A1、SLC16A1、SLC2A1、SLC21A14、SLC38A5、SLC7A5、STRA6、TFRC、VCAM1、vWF について、各培養条件による遺伝子発現変化を Real-time RT-PCR により検証した。各細胞から Isogen II (和光純薬) により RNA を抽出し、Superscript III kit (Invitrogen) により oligo-dT プライマーを用いてそれぞれの cDNA を作成した。この cDNA より先の 31 種の遺伝子及び GAPDH 遺伝子に対するプライマーおよび Thunderbird SYBR Green(Toyobo) 試薬で、Real-time PCR を行って CFX96 (BioRad) を使用してシグナルの検出・定量を行った。この際、GAPDH の発現量を指標にして、各培養条件の RNA を各遺伝子発現量の相対値を

産出した。

培養条件による各遺伝子の発現について免疫染色で確認した。Fibronectin 100 μ g/ml+ Collagen IV 400 μ g/ml でコートしたカバースリップ上に播いた iCell EC は各培養液で培養の後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、P-glycoprotein(Millipore, mouse monoclonal IgG1), CDH5(VECadherin; Millipore, mouse monoclonal IgG2a)について、対応する二次抗体、AlexaFluor555 抗マウス IgG1, AlexaFluor 抗マウス 488IgG2a を用いて免疫蛍光染色を行った。

c)BMVEC としての関門性の検証

TEER (経内皮電気抵抗)は EBOM-2 (ESM) で測定した。hCMEC/D3 のトランスウェルでの培養は、12 well プレートの各ウェルそれぞれに Transwell insert (Corning, 0.4 μ m pore size, transparent)をセットし、Collagen I でコート後、10mM LiCl を含むメディウムで培養した。同じメディウムでの交換を繰り返しながら 14-42 日間培養した。iCell EC は Fibronectin 100 μ g/ml+ Collagen IV400 μ g/ml でコートしたトランスウェルに播種した後、Vasculife 培養条件で 3~13 日間培養した。また、培養 3 日目から Pericyte, Human astrocyte, Rat astrocyte との共培養を開始した。2 日間共培養の後、Pericyte, Human astrocyte, Rat astrocyte は新しい細胞と交換した。

MDCK (Madin Darby Canine Kidney) 細胞は、Minimum Essential Medium with Earle's salts (Sigma-Aldrich)、10% FBS で培養した。

II. 脳実質への抗体導入をめざした新規デリバリー担体の探索

a)Knottin モチーフをもつ T7 ディスプレイによるランダムペプチドライブラリーの作成

BBB 通過機能をもつタンパク質モチーフをスクリーニングするため、環状 Knottin モチーフタンパク質と Protein L のヒト抗体結合性タンパク質ドメインのコンセンサス配列との融合タンパク質をディスプレイプラットフォームとした組換え T7 ファージの作成については昨年度報告した。本年度は、これらの組換え T7 ファージ DNA に対して Knottin タンパク質のループコード領域に 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。その際、ランダムペプチドコード配列には、各アミノ酸をコードするコドントリプレットを 1 単位とし、Stop コドンを除いたアミノ酸のコドンランダムな組み合わせで合成したオリゴヌクレオチド (Ella Biotech.) を利用した。組換えた T7 ファージ DNA は T7 packaging extract (Novagen)で、in vitro packaging を行った後、大腸菌に感染させ、組換え T7 ファージを増殖させた。

b)組換えヒトトランスフェリンレセプター (TfR) の発現と精製

ヒトトランスフェリンレセプター遺伝子(TFRC)にコードされる、タンパク質配列(NCBI NP_003225.2, NP_001121620.1) の内、extracellular domain をコードする領域を人工合

成し、pCold II 発現ベクターに挿入した pCold TFRC-His を作成した。ベクターは E.coli BL21pLysDE3 株に導入し、LB 中 37 度で培養の後、組換えタンパク質の低温発現誘導を行い、遠沈して E.coli を回収し、8M Urea で融解したのち、組換えタンパク質の C 末端領域に付加した His タグを利用し、Talon (Clontech) ビーズを使用して精製した。

c)M13 ファージライブラリーによる TfR 結合モチーフの単離

精製した組換え TfR を用い、既存のファージライブラリー、Ph.D.TM-C7C Phage Display Peptide Library Kit (New England Biolab.) を使用し、通常のパニングにより TfR 結合モチーフをもつファージをスクリーニングした。宿主大腸菌 (E. coli K12 ER2738) によるファージの増幅、パニング法は、Library Kit に付属するマニュアルに沿って行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験、実験動物使用実験については、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 モデル構築の試み

昨年度に引き続き、In vivo 中の BBB に近似した関門性をもつ in vitro BBB モデルの作成をめざし、BBB の本体である脳血管内皮細胞の培養系の検討を行った。ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞に分化させた iCell Endothelial cells (iCell EC)、及び不死化したヒト脳微小血管内皮細胞 hCMEC/D3 について、種々の培養条件による (1)脳微小血管内皮細胞 (BMVEC) に特徴的とされる遺伝子群の発現プロファイル、(2)経内皮電気抵抗 (TEER) を基準に解析した。iCell EC については、増殖性、細胞形態について各種の培養液を調査し、EndSFM 培養系と Vasculife 培養系の 2 種を、hCMEC/D3 については 10mM の LiCl を加えた EBM-2 培養系の、計 3 種の培養液・細胞条件での培養の後、各細胞から RNA を抽出し、BMVEC に良く発現するとされている 31 の遺伝子について、GAPDH の発現量を基準として、その発現レベルの相対値を Real-time RT-PCR で計測した。hCMEC/D3 は、iCell EC と比べ、ABCB1(P-glycoprotein/MDR1)、BCAM1(Basal cell adhesion molecule 1)、Cldn3(Claudin3)、MARVELD2 (MARVEL Domain Containing 2)、SLC38A5 (中性アミノ酸トランスポーター)などで、高い発現レベルを観察できたが、CDH5 (VE-cadherin)、PECAM1(CD31)、vWF(von Willebrand Factor)など、BMVEC 特徴的な主要遺伝子を含め 10 種で低い発現が観察され、発現レベルのばらつきが大きかった。EndSFM 培養下の iCell EC に見られる遺伝子発現は、ABCB1、PLVAP (Plasmalemma Vesicle Associated Protein)、vWF など 7 種で低い発現レベルが観察されたものの、その他の遺伝子発現では

大きな差異は見られなかった。Vasculife 培養下で iCell EC に見られる遺伝子発現は、ABCB1 と SLC38A5 以外はまんべんなく一定の発現が見られ、これら 3 種の培養条件の中では BMVEC としての特徴的な遺伝子発現プロファイルに最も近いと考えられた。

また、タンパク質の発現を免疫蛍光染色で検出した (Fig.1)。各培養条件で 3 日間培養した細胞について、VE-cadherin (Green) と P-glycoprotein (Red) を免疫染色した (DAPI、Blue) ところ、Vasculife (A) 培養条件下では、VE-cadherin が細胞境界面において明瞭に検出できるのに対し、+LiCl (C) の条件下では殆ど検出できず、Real-time RT-PCR による遺伝子発現解析の結果と一致した。EndSFM(B)の培養条件でも VE-cadherin は検出できるが、この条件では細胞増殖率が低いことが観察された。P-glycoprotein (ABCB1) の発現は、Real-time RT-PCR による遺伝子発現解析の結果では +LiCl 条件下が最も顕著に誘導されており、免疫染色像でも +LiCl (C) 条件下でも若干高いシグナルを観察できたが、他の培養条件下の細胞でも検出されていた (A,B)。

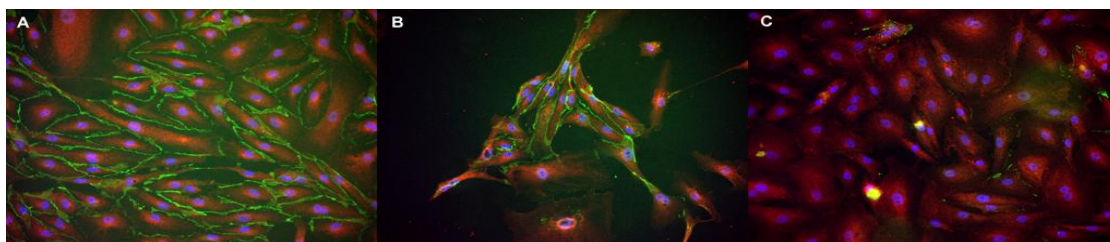


Fig.1 各培養条件下での VE-cadherin (Green) と P-glycoprotein (Red) の発現

また、Vasculife 培養下で iCell EC を 5 日間培養し十分なコンフルエントの状態を誘導すると、BMVEC として特徴的な“渦巻き状”の形態が観察された (Fig.2)。

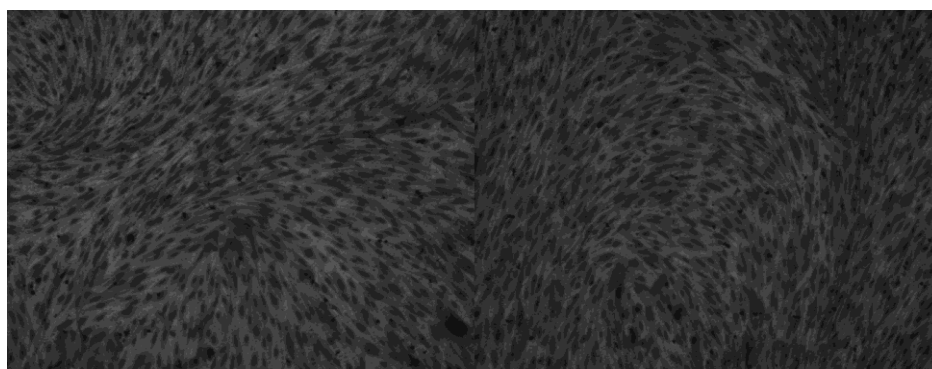


Fig. 2 Vasculife 培養条件下での iCell EC の形態(Crystal violet 染色)

以上の結果から、in vitro BBB モデル作成の試みにおいて現段階で最も BMVEC の性質に近い細胞として、Vasculife 培養下の iCell EC が考えられた。

次に Vasculife 培養下でトランスウェルを用い、iCell EC 単独あるいは Human astrocyte, Rat astrocyte, Human pericyte と iCell EC との共培養を行い、その過程での関門性形成を評価するため TEER の計測を行った。対照群として、細胞を播種しないウェル、そして比

較的良好な関門性を形成するとされる MDCK 細胞、あるいは hCMEC/D3 を播種したウェルを用意した。昨年度の研究結果では hCMEC/D3 細胞単独での TEER 値は、 $30\sim 50\Omega/\text{cm}^2$ と高くなかったが、今回培養期間を 42 日に延長すると、 $120\Omega/\text{cm}^2$ 前後の TEER 値を誘導できた (Fig.3, hCMEC/D3 cells)。また、MDCK 細胞では 5 日間の培養で $946.6\pm 17.8\Omega/\text{cm}^2$ であった。一方、iCell EC の単独培養でも $120\Omega/\text{cm}^2$ の TEER 値は、培養 3 日後から観察することが出来た (Fig. 3, iCell Endothelial Cells)。Human pericyte、Human astrocyte、Rat astrocyte との共培養では、多少 TEER 値のばらつきがみられたが、単独培養より TEER 値の上昇は観察できなかった (Data not shown)。

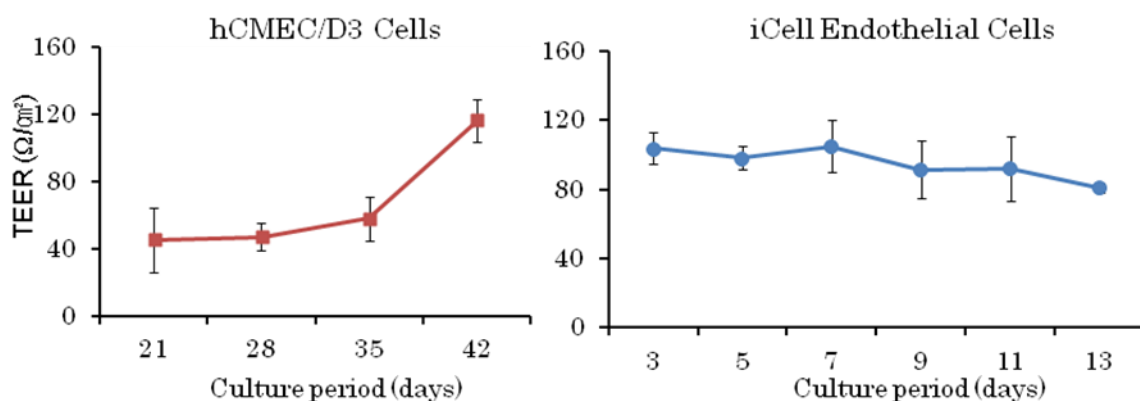


Fig. 3 経内皮抵抗値 (TEER) による関門性形成の評価

II. 脳実質に抗体を導入できる新規デリバリー担体の探索

BBB 通過モチーフをスクリーニングするため 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た T7 フェージディスプレイプラットフォームの作成は、昨年度報告した。各 Knottin タンパク質の表面ループに代えて、8 アミノ酸長のランダムペプチド配列を挿入した。ランダムペプチドをコードする塩基配列については、当初は NNK (N:A,T,G,C いずれかの任意の塩基、K:G あるいは T) を 8 回繰り返した配列を導入してランダムペプチドライブラリー作成を行ったが、個々のフェージを単離して配列決定を行うと、Stop コドンなどの挿入が意外に多いことが明らかになった。このような場合は、ライブラリーとして Stop コドンの挿入があるフェージクローンを除外するためのプレスクリーニングが必要となる。作成できたライブラリーの組み合わせも 1×10^7 と低かったため、ライブラリーを再度作成し直した。この際、Stop コドンを除いたアミノ酸のコードを各 1 種限定し、コード単位で合成できるオリゴ合成を利用して、ランダムペプチドコード配列を合成し、T7 フェージライブラリーを作成した。作成できたフェージライブラリーの組み合わせを評価したところ、 1×10^8 以上であった。

BBB 通過モチーフをスクリーニングするに当たって、具体的な結合ターゲットが想定できれば、モチーフの低分子化などの応用展開の可能性が広がる。我々は BMVEC でトランスサイトシスにより各種高分子を脳実質内へ輸送する仲立ちをすることが知られている

トランスフェリンレセプター (TfR) を結合ターゲットと想定した。TfR の extracellular domain の全てをコードするアミノ酸残基部分を、組換えタンパク質として発現・精製し、既存の M13 ファージランダムペプチドライブラリーを試用して、TfR 結合モチーフのスクリーニングを試みた。3 回のパニングの結果、TfR 結合モチーフと思われる 26 種のペプチド配列を容易に単離することができた。それぞれのファージクローンを増幅し、同じ力価のファージをとり、96 穴プレート上に固定された組換え TfR に結合するファージを、HRP 標識抗 M13 ファージ抗体で検出する ELISA を行った (Fig. 4)。その中で M,N,Q の 3 種は高い ELISA の値を示し、比較的高い結合能を持つと推測され、TfR 結合モチーフを保持していると考えられた。

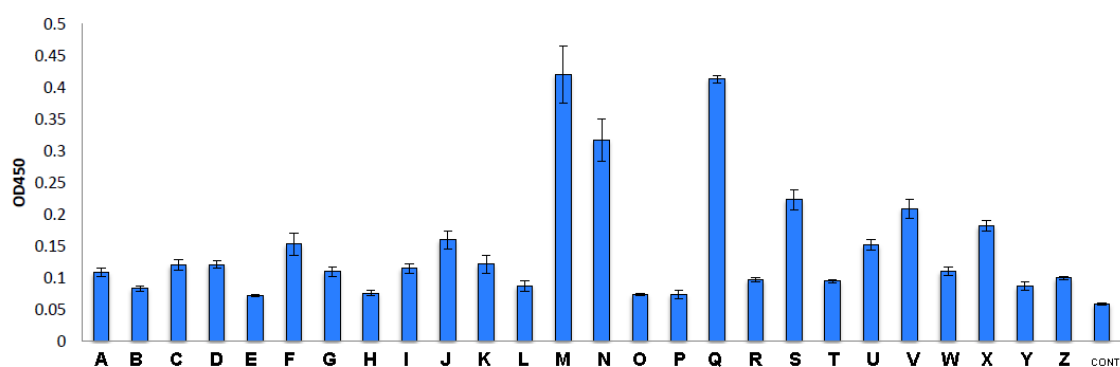


Fig. 4 M13 ファージライブラリーより単離された組換え TfR 結合モチーフの候補

D. 考察と結論

ヒト iPS から血管内皮細胞に分化させた iCell EC を用い、今回 $120\Omega/\text{cm}^2$ 前後の TEER 値を示す細胞培養系を作成できた。遺伝子発現レベルそして細胞形態上も BMVEC に近似した値あるいは形態をとっており、これまで達成出来なかったレベルの BBB モデルとして利用できると考えている。我々の実験系では Pericyte、Astrocyte との共培養での関門性の向上がみられなかったが、過去の報告では iPS/ES 細胞より分化させ、アストロサイト存在下で記録された約 $1450\Omega/\text{cm}^2$ 、そしてその変法で約 $5,000\Omega/\text{cm}^2$ という値が報告されている (Nat Biotechnol. 2012, 8:783-91; Sci Rep. 2014, 4:4160)。使用した細胞が iPS 細胞より分化させた血管内皮細胞点は共通しているが、我々が入手した細胞 (Cellular Dynamics) は BMVEC としての性質が異なることが明らかになった。

BBB 透過機能をもつペプチドモチーフを提示できるファージディスプレイプラットフォームとして、Knottin モチーフの利用を考えた。このモチーフは 3 箇所の S-S 結合で安定化された強固な折りたたみ構造を取ることが知られている。このモチーフと抗体結合領域を融合タンパク質として T7 ファージ上に提示し、Knottin モチーフの機能的な提示が可能であることは昨年度報告した。本年度は、Knottin モチーフの表面ループへ 8 アミノ酸長のラ

ンダムペプチド配列を挿入したライブラリーを作成した。このライブラリーを用いて本年度作成した *in vitro* BBB モデルに対して、トランスサイトーシスされるモチーフの選定を行うことも出来るが、具体的な結合ターゲットとしてトランスフェリンレセプター (TfR) を想定した。現在、様々なグループが TfR に結合する抗体を利用し、脳実質への高分子デリバリーの成功を報告している (Sade et al. PLoS ONE, 2014; Yu et al. Sci Transl Med, 2011; Niewoehner et al. Neuron, 2014)。TfR 自身がトランスフェリンを脳実質へトランスサイトーシスする際に、TfR に結合する分子も共に脳実質へ輸送されることが考えられている。現段階では抗体が用いられているが、これをペプチドモチーフに置き換えることが出来れば、低分子化へのアプローチなどの応用展開の可能性が広がる。実際に既存のファージライブラリーで検証したところ TfR 結合モチーフの候補を容易に単離することが出来た。今後は、本年度作成した *in vitro* BBB モデルおよび T7 ファージ-Knottin ライブラリーを用い、トランスフェリンレセプター結合性を指標にしつつ、BBB 通過モチーフのスクリーニングを行う予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA.

Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R,

Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA.111; E4043-E4052, 2014

2. 学会発表

1) American Society for Virology (2014) June 22, Fort Collins, Colorado, USA

Association of autophagic process during human astroviral infection.

Nakanishi A, Tange S, Tasaki H, Zhou Y.

2) 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 12 日 横浜

ポリオーマウイルスの細胞感染効率は Vp2/3 が関与する細胞内移行ステップに影響される

中西 章、山本真由子

3) 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 11 日 横浜

レポーター遺伝子を内包したノロウイルス感染性粒子作製の試み

戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、朴英斌、中西 章、脇田隆字、片山和彦

4) 第37回日本分子生物学会 2014年11月27日 横浜

Examination of intracellular processes that associate with formation of astroviral replication complexes

Zhou Y, Tasaki H, Nakanishi A

5) 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (2015) Jan. 29, Taipei, Taiwan

Functional complementation of VP2 in murine norovirus

Yoshida K, Zhou Y, Takai-Todaka R, Katayama K, and Nakanishi A

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