

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 *in vitro* BBB モデルを構築し、信頼性の高いスクリーニング系を作成するため、ヒト、ラット、マウス由来の脳微小血管内皮細胞（Brain Microvascular Endothelial Cell: BMVEC）を使用あるいは樹立を試みた。*In vitro* BBB モデルとして欠かせない性質である関門性の検証をトランスウェル培養系にて行い、また BMVEC として特徴的な遺伝子発現の確認を行った。その中でヒト BMVEC である hCMEC/D3 細胞は、Claudin-5, PE-cadherin などの BMVEC 特有の遺伝子発現を確認できたが、関門性の指標となる経内皮電気抵抗（TEER）、Fluorescein-Dextran による透過性では、十分な関門性を示さなかった。今後は、十分な関門性を持つ *in vitro* BBB モデルの作成をめざし、不死化 BMVEC にこだわらず、高い関門性が報告されている iPS 細胞由来 BMVEC 等の試用、アストロサイト等との共培養などのチャレンジを行っていく予定である。また、治療用抗体に対して BBB 透過性を付与するため、BBB 通過モチーフのスクリーニングを試みる。親和性の高い結合モチーフのスクリーニングには安定したコンフォメーションでの提示が必要であるため、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した T7 ファージライブラリー作成に取り組んだ。本年度は、本来難しい Knottin モチーフの T7 ファージ上への機能的な提示を実験的に証明した。作成した T7 ファージディスプレイプラットフォームには、Protein L に由来する抗体結合領域のコンセンサス配列が既に連結されており、今後は、このモチーフの表面ループアミノ酸をランダム化したファージライブラリーを作成し、適切な *in vitro* BBB モデルを用いて、その通過モチーフをスクリーニングする予定である。

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（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の基盤研究を行う。具体的には、脳実質に抗体を導入できる新規デリバリー担体の探索を試み、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を最終的な目的とする。

中枢神経系への高率な薬剤導入をめざし、様々なデリバリー担体に BBB 透過性を付与する試みは古くから行われているが、その実現が極めて難しいことは歴史が示している。本研究ではこのような困難を念頭に置き、これまでのアプローチとは異なった最新の技術革新を取り入れ、抗体医薬の BBB 透過性を促進できるデリバリー担体の開発を目指す。

B. 研究方法

I. In vitro BBB モデル構築の試み

a)脳微小血管内皮細胞（BMVEC）の培養

ヒト BMVEC 培養株である hCMEC/D3 は Couraud, J-P 博士(Cochin Institute, INSERM, France)より分与を受けた。培養は、Collagen I コートした培養ディッシュに、EBM-2 (Lonza) を基本としたメディウムで行った。ラット BMVEC 培養株 GPNT は、European Collection of Cell Cultures より入手し、Hams F10 に 10% FCS、2mM L-Glutamin、2ng/ml bFGF、80μg/ml Heparin を加えたメディウムで培養・維持した。

b)BMVEC の遺伝子発現解析

BMVEC で特徴的な遺伝子発現が報告されている計 27 種の遺伝子、ABCB1, ABCC4、ABCG2, MARVELD2、PECAM1、TFRC、ABCC1、CDH5、INSR、LDLR、LEPR、SLC16A1、SLC38A5、VCAM、PLVAP、ABCC2、AGER、APCDD1、BCAM、LRP1、SLC1A1、SLC2A1、SLC21A14、SLC7A5、STRA6、vWF、について、LiCl による分化誘導の前後での遺伝子発現変化を RT-PCR により検証した。LiCl 存在・非存在下で 3 日間培養した hCMEC/D3 細胞から Isogen II (和光純薬) により RNA を生成し、SuperscriptIII

kit (Invitrogen)により oligo-dT をプライマーとしてそれぞれの cDNA を作成した。この cDNA より 27 種の遺伝子に対するプライマーを用い、BioTaq(BIOLINE)により PCR 断片を増幅し、2%アガロースゲルでの電気泳動で PCR 断片を確認した。結果では、27 種のうち検出できた 18 種の遺伝子発現について報告する。

c)BMVEC としての関門性の検証

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 でコートし、hCMEC/D3 細胞を 1x10⁵/well の濃度で播種した後、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。Caco2 細胞は、Collagen I コートした Transwell に 1x10⁵/well の濃度で播種した後、Minimum Essential Medium with Earle's salts (Sigma-Aldrich)、1x non-essential amino acid mixture, 1mM sodium pyruvate, 10% FBS で培養し、関門性の計測は播種後 7 日目に行った。TEER (経内皮電気抵抗)は EBOM-2 (ESM) で測定した。Fluorescein-Dextran (40kDa, Sigma-Aldrich)はトランスウェル培養に対してそれぞれの培養液に 0.2mg/ml の最終濃度で添加し 4 時間培養した。Fluorescein-Dextran の透過性は、プレート側 (Basolateral 側) への Fluorescein-Dextran の移行を 0.1ml 中の蛍光強度としてマイクロプレートリーダー (Ex:485nm/Em:538; SpectroMAX, Molecular Device)で計測した。同時に、各培養液で種々の濃度で希釈した Fluorescein-Dextran の蛍光強度を測定して標準曲線をプロットし、サンプルの蛍光強度より Fluorescein-Dextran の濃度を計算した。細胞無しのトランスウェルでの透過性を対照として、Caco2、hCMEC/D3 各細胞での透過性を評価した。

d)マウス neonate よりの BMVEC 単離と不死化

C57BL/6J JmsSlc の 3-5 日齢の neonate 脳より、細切、コラゲナーゼ処理、25%BSA 遠沈の後、Collagen IV 接着性、そして Puromycin 耐性を指標に BMVEC の採取を行った (J.Vis.Exp. 2012, 66:e4022)。採取した細胞は、DMEM+10%FBS で培養した後、Murine polyomavirus middle T-antigen を MSCV ウイルスベクター (Takara)で導入し、不死化を計った。4 週間の培養の後、凍結保存した。

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

a) Knottin モチーフをもつ T7 ディスプレイの作成

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ファージディスプレイプラットフォームを作成した。親和性の高い結合モチーフのスクリーニングには安定したコンフォメーションでのディスプレイが必要であることが知られているため、本研究では、3 箇所のジスルフィド結合により安定した 3 次元構造をとりうるタンパク質モチーフ、Knottin、をディスプレイのプラットフォームとして利用した。具体的には、Ecballium elaterium (テッポウウリ)からの Trypsin inhibitor II (EETI-II)、Momordica cochinchinensis (ナンバンカラスウリ)からの Trypsin inhibitor II (MCoTI-II)を利用

した。共に天然には環状タンパク質として存在し、その活性化には3箇所のジスルフィド結合は必須であるが、環状化は必要ない。上記の Knottin モチーフと *Peptostreptococcus magnus* の抗体結合タンパク質 Protein L 配列から抽出した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としてファージディスプレイを試みた。用いる T7 ファージは、還元状態である細胞質で増殖するため、Knottin のような S-S 結合形成がその活性に必須なタンパク質の適正な折りたたみ構造形成には困難が予想された。このため、T7 ファージの Knottin ディスプレイに対しては、ジスルフィド結合イソメラーゼを細胞質に恒常的に発現する大腸菌 (Shuffle express, New England Biolabs) を使用した。EETI-II, MCoTI-II と Protein L 由来抗体結合コンセンサス配列をコードする塩基配列を人工合成し、その遺伝子断片を PCR で増幅し、T7 ファージ DNA の構造タンパク質コード領域 (Gene 10) にクローニングした。組換え T7 ファージ DNA は T7 packaging extract (Novagen) で、in vitro packaging を行った後、野生型の Gene 10 を発現する大腸菌株 (Shuffle express-5403: S5403) に感染させ、組換え T7 ファージを増殖させた。同様に野生型 T7 ファージ DNA も in vitro packaging の後、S5403 に感染させて野生型 T7 ファージを作成した。

b) Knottin モチーフ提示の確認

T7 ファージ表面に3つの S-S 結合で規定される Knottin モチーフが正しく提示されているか検証するため、正常な folding の指標となる Trypsin 結合能を検討した。約 10^{10} の野生型 T7 ファージに 10^5 の ProteinL-EETI-I (P-EETI) または ProteinL-MCoTI-II (P-MCoTI) を提示する組換え T7 ファージを混合し、トリプシン結合磁気ビーズ (Promega) と反応させた。PBS(-)+0.5%Tween 20 で、5回洗浄した後、ビーズを S5403 と混合して結合するファージを増幅し、その大腸菌培養上清から T7 ファージを採取した。この操作を5回繰り返し、それぞれの培養上清から T7 ファージ DNA のカプシドタンパク質コード領域を PCR で増幅した。各 PCR 断片は、2%アガロース電気泳動で解析した。

(倫理面への配慮)

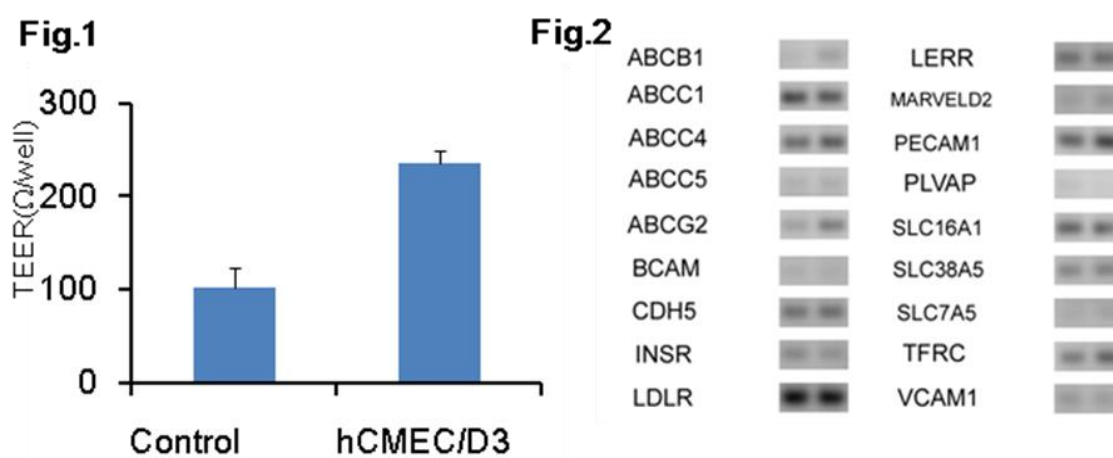
遺伝子組換え実験、実験動物使用実験については、機関内委員会の承認を経て実験を行った。倫理規定に該当する研究部分はない。

C. 研究結果

I. In vitro BBB モデル構築の試み

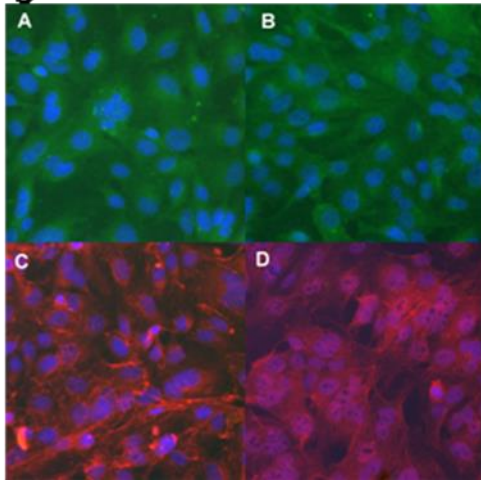
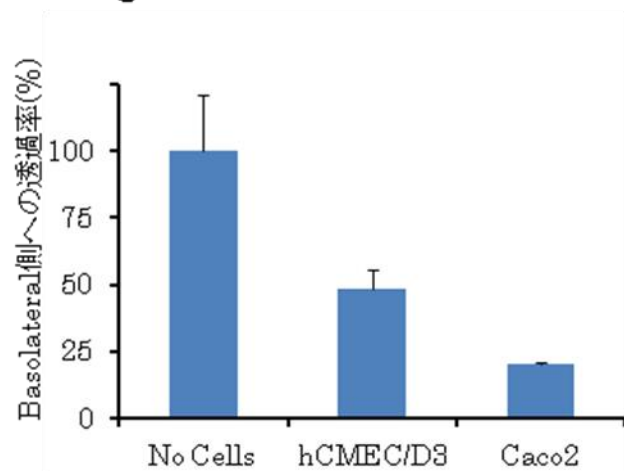
In vivo 中の BBB に近似した関門性をもつ in vitro BBB モデルの作成をめざし、BBB の本体である脳血管内皮細胞の培養系の検討を行った。ヒト(hCMEC/D3 細胞)、ラット (GPNT 細胞) の脳微小血管内皮細胞の分与を受け、これらの培養によるモデル構築の試みと検証、そしてマウス脳血管内皮細胞の neonate 脳からの単離・不死化を試みた。

GPNT 細胞はもともとラット *in vitro* BBB モデルに使用されている GP8 に由来する細胞である。常法に従ってトランスウェル培養によって関門性の形成を検証したが、TEER (経内皮電気抵抗) 値の上昇がみられなかった。また、細胞自体も関門性に必要なシート構造を形成する以前に、コンフルエントになると死滅する傾向が見られたため、モデル作成には向かないと判断した。一方、hCMEC/D3 細胞は、トランスウェルでの培養・分化によって TEER 値の上昇が観察された (Fig. 1)。最長で 42 日間、トランスウェル中で培養した際には、細胞無しの場合の TEER 値差し引いた値を平方センチメートルあたりに換算すると約 118Ω/cm² の TEER 値を示していた (Fig.1, hCMEC/D3)。hCMEC/D3 細胞での塩化リチウム添加による分化誘導での 18 種の遺伝子の発現変化を RT-PCR で確認したところ



(Fig.2)、 ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1)、 ABCC1(MRP1)、 ABCC4 (MRP4)、 ABCG2(尿酸排出トランスポーター)、 MARVELD2 (MARVEL Domain Containing 2)、 PECAM1(CD31)、 TFRC (Transferrin receptor)では発現上昇あるいは発現レベルの維持が、 CDH5 (VE-cadherin/cadherin5 type2)、 INSR (Insulin receptor)、 LDLR (LDL receptor)、 LEPR (Leptin receptor)、 SLC16A1 (単糖類トランスポーター)、 SLC38A5 (中性アミノ酸トランスポーター)、 VCAM (VCAM1)では発現レベルに明らかな差は見られなかった。また、 PLVAP (Plasmalemma Vesicle Associated Protein)では発現レベルの低下が見られた。

また、脳微小血管内皮細胞として特徴的なタンパク質の発現を免疫蛍光染色で検出した (Fig.3)。ここでは、十分な細胞分化を行っていないので、細胞界面でのタンパク質局在は明瞭では無いが、 Claudin-5 (A, Green)、 P-glycoprotein (B, Green)、 von Willebrand factor (C, Red)、そして ZO-1(D, Red)を検出できた。

Fig.3**Fig.4**

hCMEC/D3 細胞の関門性形成を評価するために、Fluorescein-Dextran (40kDa)のトランスウェルからの透過性を検討した。対照として、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ヒト結腸がん由来の腸管上皮細胞 Caco2 細胞を播種したウェルを用意した。hCMEC/D3 細胞での TEER 値は、 $30\sim 50\Omega/\text{cm}^2$ と高くなかったが、Caco2 細胞は $180\sim 219\Omega/\text{cm}^2$ と hCMEC/D3 細胞より高い値を示した。hCMEC/D3 細胞の Fluorescein-Dextran を用いた関門性の評価では、細胞なしのトランスウェルに Fluorescein-Dextran を添加した際 (Fig.4、“No Cells”) の、透過性を 100%とした場合、Caco2 細胞は約 20.6%であったが、hCMEC/D3 細胞は約 48.7%の透過性を示していた。

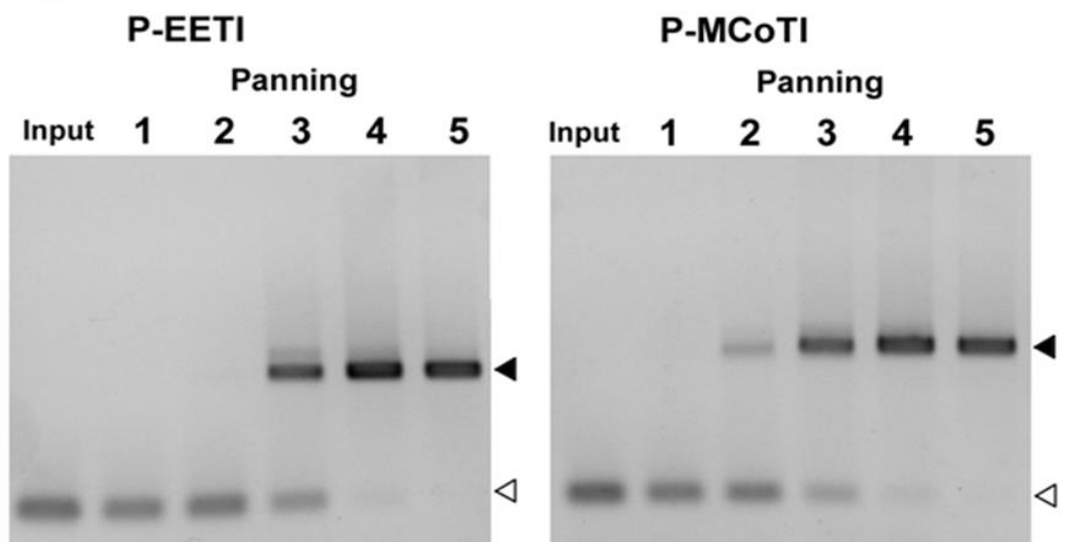
マウスの *in vitro* BBB モデルの作成の試みについては、neonate 脳より毛細血管を単離・培養し、マウスポリオーマウイルス middle T 抗原で不死化を経た細胞株樹立を行っている。現在、3回の採取を終了したところであり、今後はこれらの細胞の評価を行う。

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のファージディスプレイプラットフォームとして、3箇所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、EETI-II 及び MCoTI-II、を選択した。これらは元々環状タンパク質として存在し、その folding/環状化には多段階の酵素反応に関わるが、単純に線状のタンパク質として発現させても natural な折りたたみ構造を形成できることが知られている。これらを Protein L の IgG 結合ドメインのコンセンサス配列の C 末端側に接続する形で、T7 ファージディスプレイを導入した。まず、Knottin-Protein L ドメインが適正に T7 ファージ上に提示されているか検証した。EETI-II 及び MCoTI-II は共にトリプシンと強く結合してその作用を阻害することが知られている。Knottin タンパク質の特徴である 3箇所ジスルフィド結合による強固な立体構造が、Cys の変異などで失われると、トリプシン結合・阻害能も消失する。T7 ファージは細胞質で増殖するため、還元状態下である細胞質では Knottin モチーフの適

正は折りたたみ構造形成が期待できない。このため、ジスルフィド結合イソメラーゼを細胞質に恒常的に発現する大腸菌、S5403、を利用して EETI-II または MCoTI-II を提示する T7 ファージ、それぞれ P-EETI および P-MCoTI、を作成した。P-EETI および P-MCoTI を S5403 で 3 回継代したが、Knottin モチーフをコードする遺伝子に変化がないことはシーケンスで確かめており、Protein L-Knottin モチーフを持っていても安定に増殖出来ることが示された。Knottin モチーフが機能的に提示されていることを検証するため、P-EETI および P-MCoTI を大過剰の野生型 T7 ファージと混合し、トリプシン結合磁気ビーズを用いて、結合するファージを計 5 回選択した。各選択の結果得られたファージをプールし、その DNA から EETI-II または MCoTI-II を提示するタンパク質のコード領域を PCR で増幅、アガロースゲルでその産物を解析した (Fig. 5)。最初のプールでは殆どの PCR 産物は短く、殆どが野生型ファージであったが (Fig. 5, Open arrow)、選択を繰り返すうちに EETI-II 又は MCoTI-II をコードする長い PCR 産物が増え (Closed arrow)、5 回目の選択の後には殆どが長い PCR 産物となり、Knottin モチーフを持つファージが選択されていることが明らかになった。この結果は EETI-II、MCoTI-II は正しく folding されて T7 ファージに提示されていることを示唆している。今後は、Protein L の提示を確認した後、ランダムペプチド等を EETI-II/MCoTI-II のループに導入した T7 ファージディスプレイライブラリーを作成する。

Fig. 5



D. 考察と結論

ヒト BMVEC である hCMEC/D3 を用いて、in vitro BBB モデルの作成を試みた。この細胞は BMVEC として最も汎用されており、不死化細胞株としては最も in vivo の BMVEC

に近似しているとされてきた(FASEB J. 2005, 13:1872-4.; Fluids Barriers CNS. 2013, 10:16)。しかし不死化 BMVEC にほぼ共通な性質として高い関門性の形成は容易ではなく、LiCl による Wnt シグナル伝達系活性化(PLoS ONE 2013, 8: e70233)とそれに伴う BMVEC 分化誘導によって形成されたトランスウェル上での細胞シートの TEER 値による関門性の評価は、約 30-120 Ω /cm²と発表されている値とほぼ同程度の値であった(Fig.1)。また、もともと hCMEC/D3 細胞は、BMVEC の特徴である CD31 陽性細胞として選択維持されてきた細胞であるが、他の BMVEC に特徴的な遺伝子発現のいくつかを RT-PCR または免疫蛍光染色で確認することができた(Fig.2,3)。しかし、Fluorescent Dextran (40kDa)を用いた透過性試験では、Caco2 細胞で達成できる関門性に及ばず、BMVEC としての本来の関門性を再現するためにはモデルの改良が必要であることが確認された(Fig.4)。現時点では、流水ストレス下での BMVEC の培養で約 1,000 Ω /cm²、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 Ω /cm²、そしてその変法で約 5,000 Ω /cm²という値が報告されているため(J Neurochem 2008, 107:1358-1368; Nat Biotechnol. 2012, 8:783-91; Sci Rep. 2014, 4:4160)、今後は、入手可能な幾つかのヒト BMVEC また iPS 由来 BMVEC、そして樹立を試みているマウス BMVEC を試用し、また、アストロサイト、ペリサイトなどとの共培養も試み、出来るだけ高い関門性を持つ *in vitro* BBB モデルの構築をめざす。

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を実験的に確認した(Fig.5)。今後は、Knottin モチーフの表面ループアミノ酸をランダム化したライブラリーを作成し、*in vitro* BBB モデルなどを用いた BBB 透過モチーフの探索を行う。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Formation of covalently modified folding intermediates of simian virus 40 Vp1 in large T antigen-expressing cells.

Watanabe M, Phamduong E, Huang CH, Itoh N, Bernal J, Nakanishi A, Rundell K, Gjoerup O, Kasamatsu H.

Journal of Virology 87:5053-64 (2013)

2) Initiation of human astrovirus type 1 infection was blocked by inhibitors of

phosphoinositide 3-kinase.

Tange S, Zhou Y, Nagakui-Noguchi Y, Imai T, and Nakanishi A

Virology Journal 10:153 (2013)

- 3) JC Polyomavirus (JCV) and Monoclonal Antibodies: Friends or Potential Foes?
Diotti RA, Nakanishi A, Clementi N, Mancini N, Criscuolo E, Solforosi L, and
Clementi M
Clinical and Developmental Immunology Volume 2013, ID 967581, 11 pages

2. 学会発表

- 1) 5th International Calicivirus Conference Oct. 12, (2013) Beijing, China
A plasmid based reverse genetics system can drive human and murine norovirus genome replication and produce progeny virus containing reporter tagged infectious genomic RNA
Kazuhiko Katayama, Reiko Takai-Todaka, Akira Nakanishi, Kosuke Murakami, Tomoichiro Oka, Susana Guix, Tyler M. Sharp, Robert L. Atmar, Sue E. Crawford, and Mary K. Estes
- 2) American Society for Virology (2013) July 22, State College, Pennsylvania, United States
Adaptive mutation of murine norovirus S7 strain important for growth in RAW264.7 cells.
Akira Nakanishi, Hirotaka Takagi, Kosuke Murakami, Tomoichiro Oka, Reiko Todaka, Yukinobu Tohya, and Kazuhiko Katayama
- 3) 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 12 日 神戸
アストロウイルス感染とオートファジー
中西 章、丹下正一朗、野口裕子、周妍
- 4) 第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 5 日 神戸
Association of autophagic process during human astroviral infection
Akira Nakanishi, Shoichiro Tange, Yuko Noguchi, Yan Zhou

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