

## 長寿医療研究開発費 平成27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

#### 年間全体

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。

具体的には、トランスサイトosisなどで BBB の脳微小血管内皮細胞を透過して抗体導入が可能なタンパク質モチーフ、BBB 透過モチーフをスクリーニングすることを目的とし、2つの研究目標を設定した。一つは、十分な関門性を持ち、BBB 透過モチーフの *in vitro* での検証に使用可能な実験系の確立である。今回の研究で、ヒト iPS 細胞より分化させた iCell Endothelial Cells (iCell EC) を用いた *in vitro* BBB モデルが現在最も有望と考えられた。もう一つは、BBB 透過モチーフをスクリーニングするための新規ファージライブラリーの作製と、スクリーニングである。本研究では、3箇所 S-S 結合により安定な構造を取る環状ペプチド Knottin モチーフタンパク質、MCoTI-II、を利用した新規ディスプレイ系を用い、そのループ領域に8つのランダムペプチドを挿入した T7 ファージライブラリーを作製した。具体的な標的として、近年トランスサイトosis受容体として注目されているトランスフェリンレセプター (TfR) を想定し、組換えタンパク質を作製、その結合モチーフをスクリーニングすることで、BBB 透過モチーフの選定をめざした。実際のスクリーニングでは選択される配列を次世代シーケンスで解析し、10以上の TfR 結合モチーフ候補を単離した。同時に iCell EC による *in vitro* BBB モデルを直接利用した透過モチーフの単離も行い、この場合は11のモチーフの分離を行った。今後は、これらモチーフの生化学的な解析を進めると共に、*in vitro* BBB モデル等を利用した透過モチーフ候補の透過係数解析などで、当該モチーフの選定および最適化を行う。

#### 平成25年度

##### I. *In vitro* BBB モデル構築の試み

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。そして各 *in vitro* BBB モデルの物理的な関門性、透過性、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。

## 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 通過モチーフのスクリーニング系の作製に際し、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 ファージディスプレイ系の作成に取り組んだ。当年度では本来難しい 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。

### 平成 26 年度

#### I. *In vitro* BBB モデル構築の試み

*In vitro* BBB 実験系を作成するため、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の構築を試みた。特定の培養条件下の iCell EC では 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 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 TEER については、hCMEC/D3 細胞で約  $120 \Omega/\text{cm}^2$  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。しかしながら、Pericyte、Astrocyte との共培養では、関門性の改善が見られなかった。

#### 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

昨年度作製した Knottin モチーフを提示プラットフォームに用いた T7 ファージディスプレイ系に対し、8 アミノ酸長のランダムペプチドを提示した T7 ファージライブラリーを作製した。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 (TfR) を結合ターゲットと想定し、その 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・精製した。このタンパク質を用い既存の M13 ファ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。

### 平成 27 年度

#### I. *In vitro* BBB モデル構築の試み

iCell EC の関門性について更に検討するため、Caffein, 5,5-Diphenylhydantoin, Digoxin, Hydrocortison, Prazosin, Antipyrin、といった BBB 透過性の指標となる放射性同位元素標識した 6 種の低分子化合物を用意し、Caco2 細胞、MDCK 細胞と比較しながら、

透過係数 (Pe) を算定し *in vitro* BBB システムとしての評価を行った。

## 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

先に作製した T7 フェージライブラリーを用い、組換え TfR に結合するモチーフを 5 回のパニングでスクリーニングを行った。各パニング後に取得できたライブラリー全体の力価には上昇が見られ、TfR 結合能は、ELISA による検討で増加したことを観察できた。また、各パニング後のライブラリーよりフェージ DNA を抽出し、PCR による増幅の後ライブラリー毎に約 30000~60000 の配列を次世代シーケンスで解析し、スクリーニングの進行に従って増加したクローンを同定した。

一方、iCell EC の *in vitro* BBB 系を用いて、iCell EC の細胞シートを透過できるモチーフのスクリーニングを行った。8 回連続して iCell EC の細胞シートを通過させて選択されたモチーフ配列は 11 種であり、今後これらのモチーフの iCell EC シートの通過 Pe 値を測定し、透過能を評価する。

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）

研究期間 平成25年4月1日～平成28年3月31日

## 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) 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。

本研究が継続できた場合は Knottin モチーフを提示プラットフォームに用いた T7 フェージライブラリーと *in vitro* BBB システムの利用による BMVEC 通過モチーフのスクリーニング、そして抗体分子の BMVEC 通過促進の *in vitro* での検証を行い、脳実質への抗体医薬デリバリー担体候補としてのタンパク質モチーフの単離を行う。この候補モチーフを元に抗体分子を脳実質に有効に導入できるデリバリー担体の開発の是非を検証できると考えている。

BBB 通過促進効果のあるデリバリー担体の開発は、ドラッグデリバリー研究としては最も重要と考えられている。その成果は認知症以外の中枢神経系疾患に対する治療薬開発活性化も期待でき新規治療薬・方法開発の点からその波及効果は計り知れない。本研究は抗体医薬の BBB 通過性の向上を目指した基盤研究であり、アルツハイマー病等の認知症治療に対する選択肢として抗体医薬を可能にすることが最終的な目的である。

## B. 研究方法

**年間全体**

### I. *In vitro* BBB モデル構築の試み

#### a) 細胞培養

ヒト脳微小血管内皮細胞(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。

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 $\mu$ g/ml+ Collagen IV 400 $\mu$ 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、成長因子、血清等を補った Vasculife (Kanebo)あるいは Endo-SFM (EndSFM; Lifetechnologies) を基本としたメEDIUMで培養した。

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、80 $\mu$ g/ml Heparin を加えたメEDIUMで培養・維持した。

Caco2 細胞は、Collagen I コートしたコートした培養ディッシュあるいはトランスウェルに Minimum Essential Medium with Earle's salts (EMEM, Sigma-Aldrich)、1x non-essential amino acid mixture, 1mM sodium pyruvate, 10% FBS で培養した。

MDCK (Madin Darby Canine Kidney) 細胞は EMEM + 10% FBS で培養した。

#### b) トランスウェル培養

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 $\mu$ m pore size, transparent)、あるいはをセットし、Collagen I でコートし、hCMEC/D3 細胞を 1x10<sup>5</sup>/well の濃度で播種した後、10mM LiCl を含むメEDIUMで培養した。同じメEDIUM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 $\mu$ g/ml+ Collagen IV400 $\mu$ g/ml でコートしたトランスウェルに播種した後、Vasculife 培養条件で培養した。トランスウェルに播種 24 時間後に BMVEC への分化・維持の目的で、上記培養液に 10 $\mu$ M Retinoic acid を加えたメEDIUMに換えた。

MDCK は EMEM+ 10% FBS で Corning 100mm TC-coated culture dish を用い、Caco2 は EMEM + 1x non-essential amino acid + 1x Na Pyruvate + 10% FBS で IWAKI 100mm Collagen I-coated dish で培養・維持し、トランスウェルに播種する際には Collagen I コートした Transwell に 1x10<sup>5</sup>/well の濃度で播種し、閉鎖性の計測は播種後 7 日目に行った。

TEER (経内皮電気抵抗)は EBOM-2 (ESM) で測定した。

## 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) T7 ファージの増幅

ホスト大腸菌としては、T7 ファージの Gene 10 を発現する大腸菌株 (Shuffle express-5403: S5403) を用いた。アンピシリン 100 $\mu$ g/ml を含む LB Agar Plate (直径約 10cm) に対し、対数増殖期の S5403 0.3ml と~40 度ほどの 3ml のトップ Agar(LB+0.6% Agar)を混合したものを上層し、室温で静置した後、ファージを含む試料を spread し、37 $^{\circ}$ C 3 時間培養した。その後、2ml のファージ溶出液(20mM Tris-HCl, pH8.0, 100mM NaCl, 6mM MgSO<sub>4</sub>)を加え、4 $^{\circ}$ Cで2時間から overnight 静置して、増幅したファージを溶出した。

### b) パニングによるファージライブラリーからのスクリーニング

組換えヒトトランスフェリン受容体タンパク質 (TfR, CusaBio より購入、または作製 :

下記 H26 年度報告を参照) を約 25 $\mu$ g/ml の濃度で 8M Urea, 100mM Tris-HCl pH 8.0 で希釈し、50 $\mu$ l を NUNC Immuno Plate F96 Maxisorp の各ウェルに加え、一晚 4 度で静置した。TBS(-)+0.5%Tween 20 (TBS-T) で洗浄した後、各ファージサンプルを加え室温 0.5 時間静置した。TBS-T で 20 回洗浄した後、80 $\mu$ l/well の 1%SDS を加え、20min 室温で静置した後、16ml の S5403 培養に加え、3 時間 37 $^{\circ}$ C で震とう培養し、8000g、10 分の遠沈の後の上清をファージ液として次のパニングあるいは ELISA に用いた。

## 平成 25 年度

### I. In vitro BBB モデル構築の試み

#### a) 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に対して Fluorescein-Dextran (40kDa, Sigma-Aldrich) を 0.2mg/ml の最終濃度でトランスウェルへ添加し 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。

#### 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。

#### c) 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

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 Knottin タンパク質、*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)、をディスプレイプラットフォームとして利用した。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 T7 ファージカプシドタンパク質(Gene 10)の一部として発現させた。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 のカプシド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、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。

### 平成 26 年度

#### I. In vitro BBB モデル構築の試み

##### a) Astrocyte、Pericyte の培養

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 を行い CFX96 (BioRad) にてシグナルの検出・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 $\mu$ g/ml + Collagen IV 400 $\mu$ 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

iCell EC は 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。

## 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

T7 ディスプレイによるランダムペプチドライブラリーを作成するため、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、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。組換え 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大腸菌

での発現用にコドンを最適化した配列を人工合成し、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°C 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、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.<sup>TM</sup>-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。

### 平成 27 年度

#### I. In vitro BBB モデル構築の試み

##### a) トランスウェルでの培養と、細胞シートの低分子透過性解析

透過係数を測定する際には、トランスウェルに各細胞を播種の後、iCell EC では 3~5 日、MDCK は一週間、Caco2 は 2 週間培養し、iCell EC は 10 $\mu$ M Retinoic acid を加えたメディウムで 1~2 回、その他の細胞は 2 日ごとにメディウム交換を行った。低分子透過性解析には BBB 透過性検定に汎用される放射性ラベルした計 6 種の以下の化合物を用いた： [1-Methyl-<sup>14</sup>C]- Caffeine (Caffeine), [4-<sup>14</sup>C]- 5,5-Diphenyl -hydantoin (Phenytoin), [<sup>3</sup>H(G)]-Digoxin (Digoxin), [1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)]- Hydrocortison(Cortizol), [7-Methoxy-<sup>3</sup>H]- Prazosin (Prazosin), [N-Methyl-<sup>14</sup>C]- Antipyrin(Antipyrine) 。Caffeine, Phenytoin, Antipyrine は 0.5 $\mu$ Ci/ml の濃度で、Digoxin, Cortizol は 5 $\mu$ Ci/ml の濃度で、Prazosin は 3 $\mu$ Ci/ml の濃度で、成長因子、血清を添加しないメディウム、MDCK, Caco2 では EMEM、iCell EC では Vasculife (Krabo) に希釈した。12 well プレーートの各ウェルにセットしたトランスウェルで培養する各細胞に対して、それぞれの放射性ラベルした化合物を含む 0.5ml のメディウムを加え、下層側に 1ml の成長因子、血清を添加しないメディウムを入れ、この 12 well プレーートを 1.5h 培養した。0.5 時間事にトランスウェルを新しいメディウムを入れた 12 well プレーートに移した。0.5 時間の培養で下層のメディウムに移行した放射性ラベル化合物の量を計測するため、下層のメディウム 0.5ml を、また、3 回の培養終了後のトランスウェル内に残る放射性ラベル化合物の量についても上層メディウムの 0.3ml を、それぞれ採取し 5ml の Insta-Gel Plus(Perkin-Elmer)に混合し、液体シンチレーションカウンター(LSC 4000) で計測を行った。iCell EC, Caco2, MDCK 各細胞での透過性の対照として細胞無しのトランスウェルでの透過性も上記と同様に評価した。

#### 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) Tfr を結合ターゲットとしたスクリーニング

各パニング後に取得できた T7 フェージ群の Tfr 結合能を ELISA で検討した。約 1 $\mu$ g/50 $\mu$ l の組換え Tfr を NUNC Immuno Plate F96 Maxisorp の各ウェルに加え、一晚 4 度で静置後、PBS(-)で洗浄し、各フェージサンプル等を加え室温 2 時間静置した。0.5% Tween 20 を含む PBS(-)(PBS-T)で洗浄の後、Blocking buffer(StartingBlock Blocking Buffer in TBS with Tween-20, Thermo Scientific)で希釈したウサギ抗 T7-tag 抗体(MBL)で一晩 4 度静置後、0.5% Tween 20 を含む TBS(-)(TBS-T)で洗浄、TBS-T で希釈した HRP-conjugated 抗ウサギ IgG 抗体で室温 2 時間反応させ、TBS-T で洗浄後、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) を基質とした ELISA 発色キット (KPL) を用い、OD450 の吸収量を指標に Tfr に結合する T7 フェージ量を評価した。

また、各パニング後のライブラリーよりフェージ DNA を抽出し、PCR による増幅の後 Bioanalyzer 2100(Agilent)で、PCR 産物のサイズ評価と定量を行った後、各 PCR 産物を等量混合しさらに標準配列として PhiX control Ver.3 (Illumina)を加えたサンプルに対して、MiSeq Reagent Kit Ver.2 (Illumina) を使用し、MiSeq (Illumina)によって、Deep sequencing を行った。

#### b) iCell EC の in vitro BBB 系を利用したスクリーニング

トランスウェル培養の iCell EC に対し、上層のトランスウェルの培養液(Vasculife+growth factors, FBS,etc + 10 $\mu$ M retinoic acid) 400 $\mu$ l に 100 $\mu$ l のフェージ液を加え、1 時間後、下層の約 300 $\mu$ l の培養液を回収し、200 $\mu$ l の培養液を加え 500 $\mu$ l として、新しいトランスウェル培養の iCell EC に加えた。1.5 時間後、下層の約 300 $\mu$ l の培養液を回収し、フェージをプレート増幅した。この操作を 4 回繰り返し、計 8 回の iCell EC 細胞シート透過の後のクローンをプレート増幅、単離し、DNA を抽出した。各クローンの配列は、T7 UP/T7 DOWN プライマー(Novagen)を用いて、ライブラリーの挿入配列約 300bp を増幅し、T7 UP プライマーを用いて Fluorescent-probed dideoxynucleotide sequencing により配列決定した。

(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

### 年間全体

#### I. In vitro BBB モデル構築の試み

In vivo に近似した BBB モデルの作製を目指し、不死化ヒト脳微小血管内皮細胞 (hCMEC/D3)、ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞(iCell EC)、ラット血管内皮細胞(GPNT)、等の培養検討、そして不死化マウス脳微小血管内皮細胞(BMVEC)を作製し、これらの中で本

実験の目的に沿った *in vitro* BBB モデルを検討した。特にヒト細胞を中心に検討した結果、hCMEC/D3 は扱いが比較的簡便であるが、経内皮電気抵抗 (TEER) で評価される関門性の形成、そして RT-PCR で簡易的に解析した遺伝子発現プロファイルで、BMVEC の特徴を幾つか欠いていた。一方、iCell EC では関門性の形成、遺伝子発現プロファイルでは、BMVEC に比較的近似した特徴をしめした。当細胞での低分子の透過性は、BMVEC の特徴を反映していなかったが、本実験で目的とする高分子生体物質の移送を行うトランスフェリンレセプター等の発現は特に hCMEC/D3 より高かったことから、現時点では iCell EC を用いた *in vitro* BBB モデルでの解析を進めることが適切と判断した。

## 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

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、MCoTI-II、を選択し、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に導入した。そして、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、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を利用して作製したランダムペプチドコード配列を挿入し、T7 ファージライブラリーを作成した。

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、これに結合するモチーフを上記の T7 ファージライブラリーよりパニングによってスクリーニングした。5 回のスクリーニングの結果について、ファージ DNA を次世代シーケンスで解析し、選択された配列を網羅的に調べることにより、上位 10 クローンの同定を行った。

このスクリーニングと同時に、本研究で作製した iCell EC を利用した *in vitro* BBB を用いて、T7 ファージライブラリーから透過性のあるクローンの分離を試み、11 種のクローンを得た。

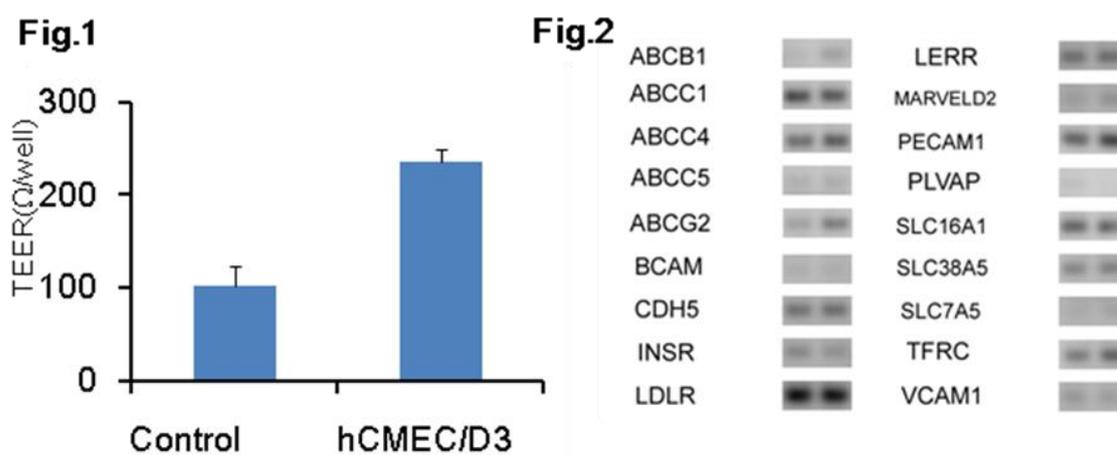
## 平成 25 年度

### 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 の本体である脳微小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。

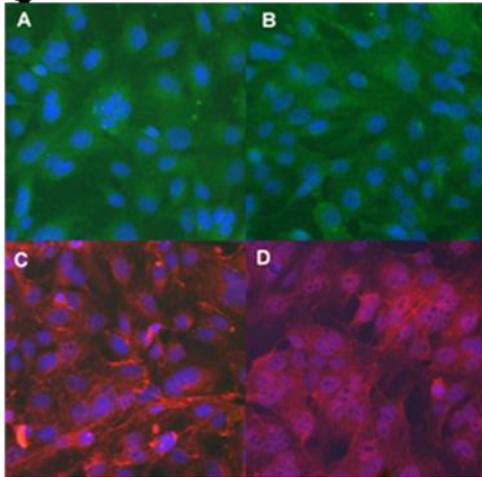
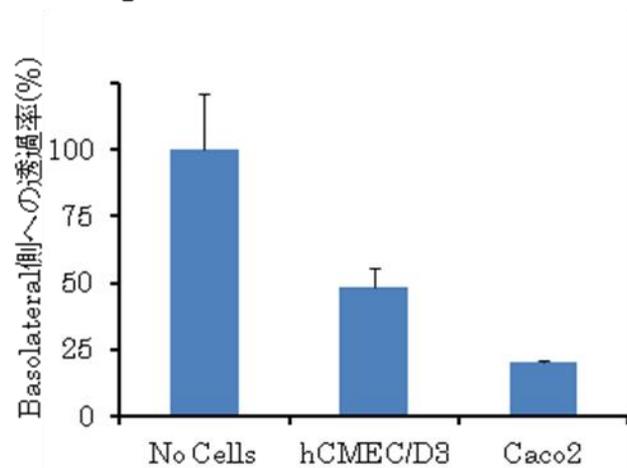
GPNT 細胞はもともとラット *in vitro* BBB モデルに使用されている GP8 に由来する細

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 118  $\Omega/\text{cm}^2$  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。TEER 値を比較すると Caco2 細胞は  $180\text{-}219 \Omega / \text{cm}^2$ であったが hCMEC/D3 細胞で  $30\text{-}50 \Omega / \text{cm}^2$ と低い値を示した。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。

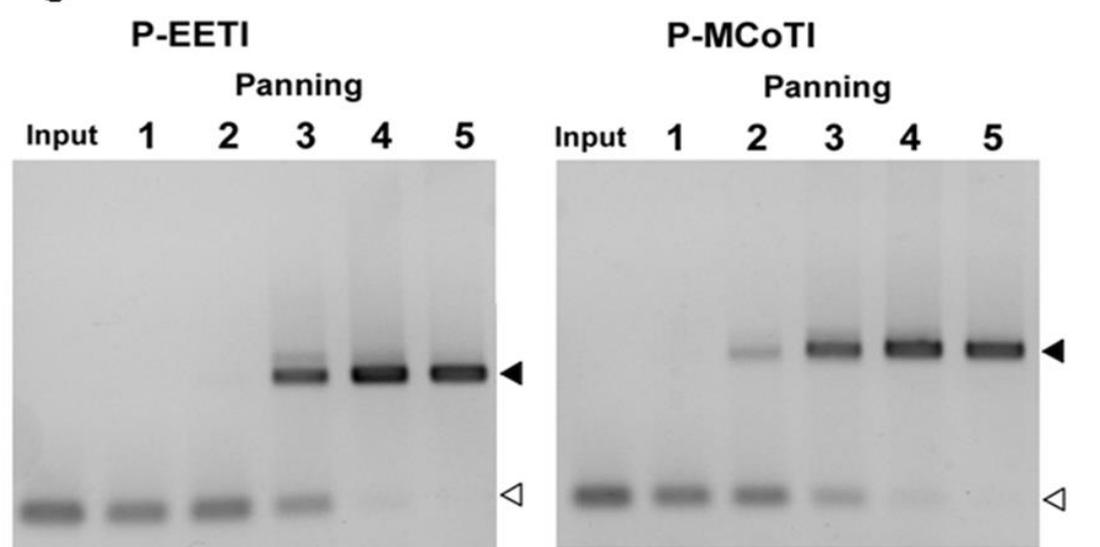
マウスの *in vitro* BBB モデルの作成の試みについては、neonate 脳より毛細血管を単離・培養し、マウスポリオーマウイルス middle T 抗原で不死化を経た細胞株樹立を行っている。現在、3 回の採取を終了したところであり、今後はこれらの細胞の評価を行う。

## 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に導入した。まず、Knottin 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 箇所の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、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。

**Fig. 5**



平成 26 年度

#### 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.6)。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、この条件では著しく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低いながら検出はされた (A,B)。

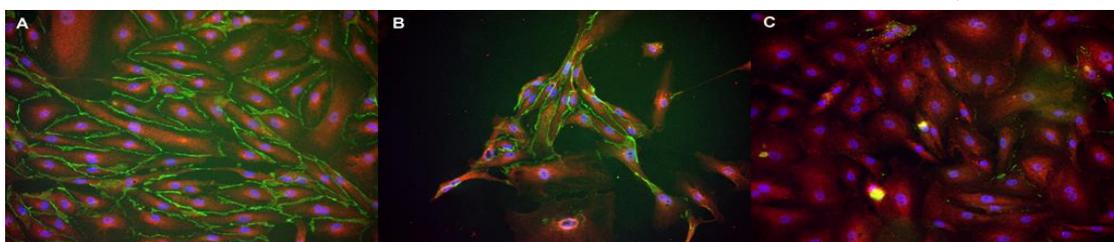


Fig.6 各培養条件下での VE-cadherin (Green) と P-glycoprotein (Red) の発現

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.7)。

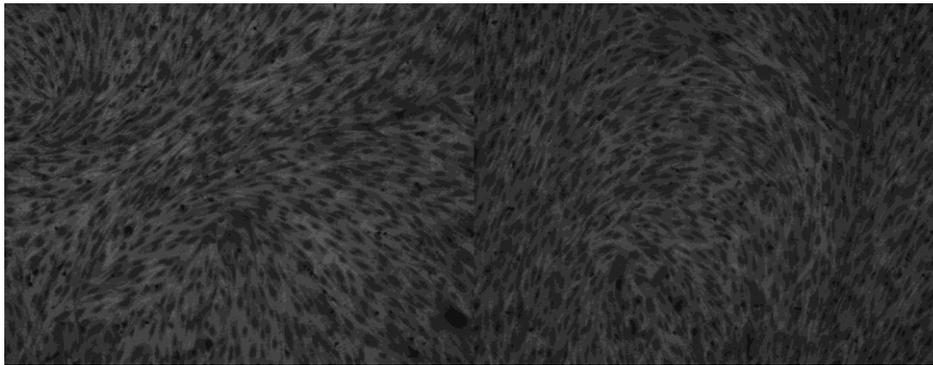


Fig. 7 Vasculife 培養条件下での iCell EC の形態(Crystal violet 染色)

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、そして比較的良い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. 8, 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)。

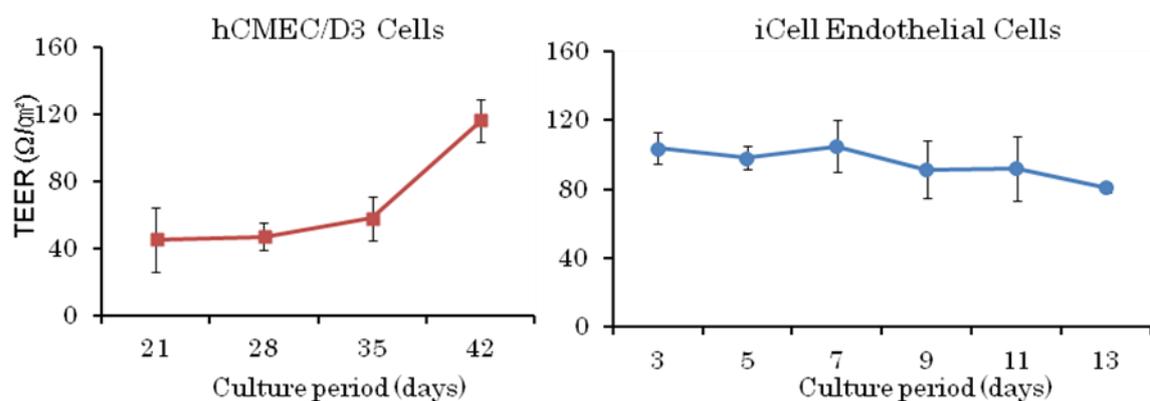


Fig. 8 経内皮抵抗値 (TEER) による関門性形成の評価

## 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

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、個々のファ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ァ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  $1 \times 10^7$  と低かったため、ライブラリーを再度作成し直した。その際、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を利用して、ランダムペプチドコード配列を合成し、T7 ファージライブラリーを作成した。作成できたファージライブラリーの組み合わせを評価したところ、 $1 \times 10^8$  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. 9)。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。

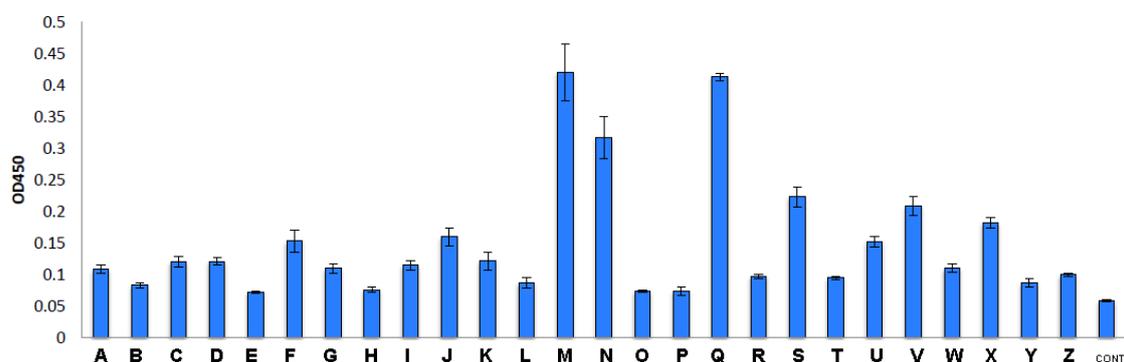


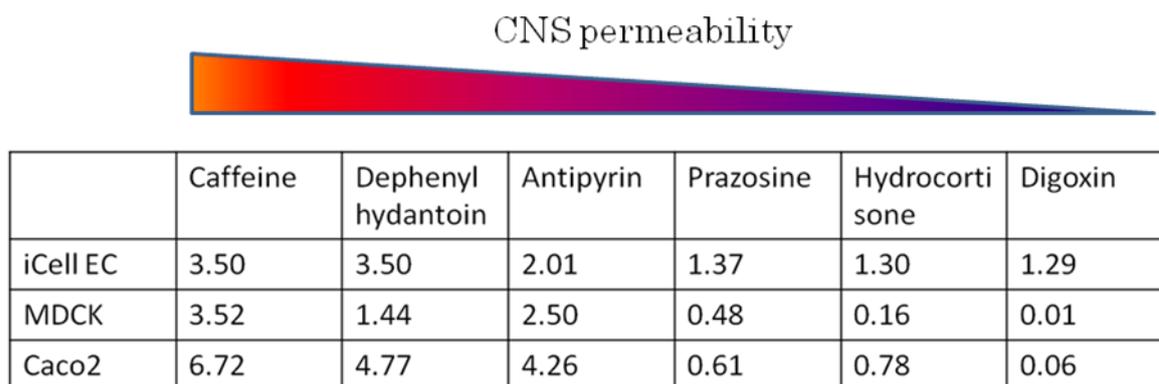
Fig. 9 M13 ファージライブラリーより単離された組換え TfR 結合モチーフの候補

平成 27 年度

#### I. In vitro BBB モデル構築の試み

iCell ECの関門性について更に検討するため、Caffein, Phenytoin (Dephenylhydantoin), Digoxin, Cortison(Hydrocortison), Prazosin, Antipyrin といったBBB透過性の指標となる放射性同位元素標識した6種の低分子化合物を用意し、Caco2細胞, MDCK細胞と比較しながら、透過係数(Pe)を算定しin vitro BBBシステムとしての評価を行った(Fig. 10)。

Fig.10 BBB透過性を評価するための標準低分子化合物についての各細胞での透過係数



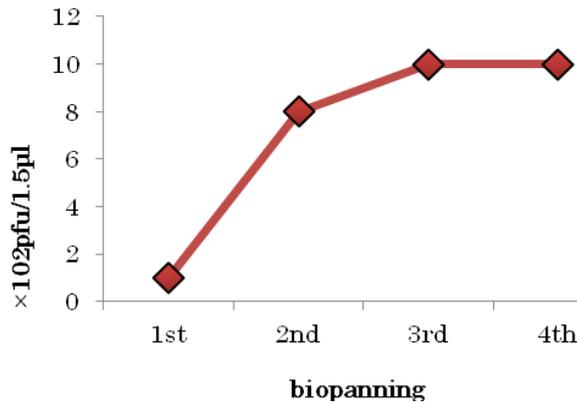
MDCK, Caco2など比較的高い関門性を形成できた細胞については、CNS permeability(脳内浸透性)が低いとされている、Digoxin, Hydrocortison (Cortison)などについて、低い値が算出でき、浸透性が低いことが示された。しかしiCell ECはこれらの物質について、高いPe値(~1.3)を示し、浸透性の制御が十分ではないことが示唆された。

## 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) 組換え TfR への結合性を基にしたスクリーニング

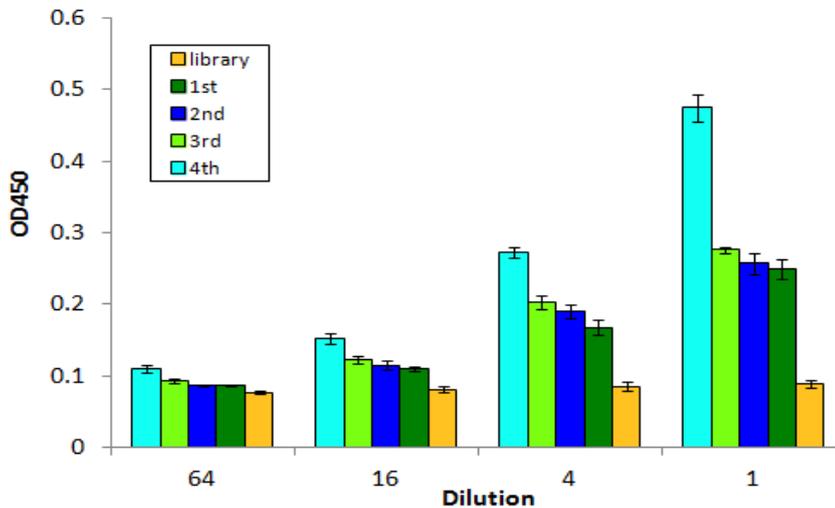
先に作製したKnottinモチーフ上にランダムペプチドを提示するT7ファージライブラリーを用い、組換えTfRに結合するモチーフを4回のパニングでスクリーニングを行った。各パニング後にT7ファージの力価をプラークアッセイにより調べた(Fig. 11)。スクリーニングが進行するにつれ1回目(1st)~ $1 \times 10^2$  pfu/1.5 $\mu$ l、2回目(2nd) ~ $8 \times 10^2$  pfu/1.5 $\mu$ l、それ以降は微増、といったように力価の上昇がみられ、特定の性質を持ったファージが選択されていることが示唆された。

Fig. 11 各パニング後のT7ファージの力価



取得できたライブラリー全体の Tfr 結合能を ELISA で調べた(Fig. 12)。各パニング後のライブラリーを一度 S5403 に感染して増幅させ、力価を合わせてから、1, 4, 16, 32 と希釈(Dilution)したライブラリーが immunoplate に吸着させた組換え Tfr と反応させ、結合した T7 フェージを抗 T7tag 抗体で検出した。確かに 4 回目のパニング後のライブラリーは最も多く結合しており、スクリーニングが Tfr 結合性の良いものを選択していることを示唆した。

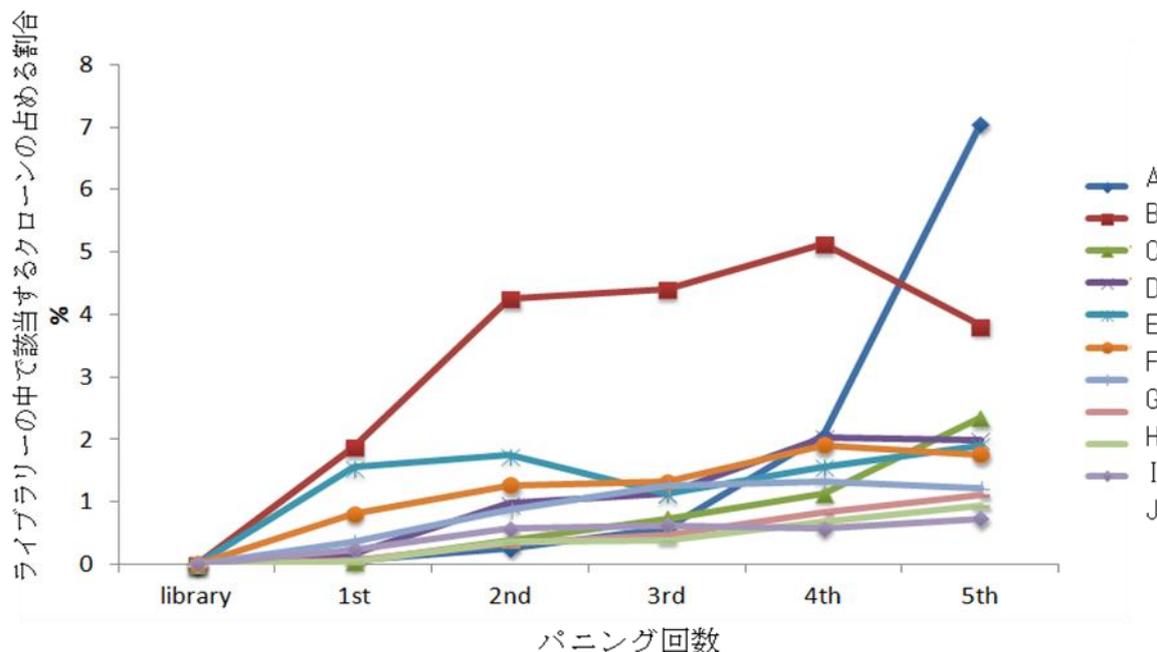
Fig. 12 各パニング後のライブラリーにおける Tfr に対する結合性を ELISA で計測



さらにもう一回 Tfr 結合性でスクリーニングをかけ、計 5 回のパニングを行ったライブラリーを用意し、各ライブラリーより DNA を抽出し、MiSeq による次世代シーケンスで各ライブラリーの DNA 配列分布を網羅的に解析した。各パニング後のライブラリー DNA から解析できたリード数は 30,000 から 60,000 であり、その中で 5 回目のパニング後の配列で最も頻度が高いものを 10 クローン選び、その全体に占める割合をグラフにしたのが Fig.13 である。5 番目のパニング時では順位が入れ替わっているが、主に選択されている配列、A, B, を含め Tfr との結合性が高いと予想される 10 種のクローンが同定できた (特許

の可能性があるので配列は非表示)。

Fig.13 TfR 結合性でスクリーニングの過程で見られるクローン割合の変化



#### b) In vitro BBB 系に対する透過性を基にした試験的なスクリーニング

先に作製した Knottin モチーフ上にランダムペプチドを提示する T7 フェージライブラリーから、iCell EC を用いた in vitro BBB モデルに対して透過性を示すクローンの単離を目指したスクリーニングを行った。トランスウェルを用いた in vitro BBB モデル系に対し、T7 フェージライブラリーを添加し、透過できるクローンの選択を試みた。培養 1 時間、1 回の透過では、数多くの T7 フェージが iCell EC トランスウェル培養で通過できるようであり、選択の効率が悪いと考えられたため、2 回連続の透過で選択できるクローンの分離を試みた。計 8 回の透過による選択で得られたモチーフ配列は 11 種であった。

#### D. 考察と結論

##### 年間全体

In vivo に近似した BBB モデルの作製を目指し、ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞(iCell EC)を用いた in vitro BBB モデルを中心に、TEER で評価される関門性の形成、RT-PCR で簡易的に解析した遺伝子発現プロファイルより、現状で最適と考えられる培養・モデル作成条件を検討した。結果として当細胞は低分子の透過性について、BMVEC の特徴を反映していなかったが、物理的な関門性、BNVEC 特徴的な遺伝子発現プロファイルより、現時点では iCell EC を用いた in vitro BBB モデルでの解析を進めることが適切と判断した。

BBB 通過モチーフをスクリーニングするための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 タンパク質の一つ、MCoTI-II、を選択し T7 フェージに導入した。そして、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 T7 フェージライブラリーを作成した。そして BMVEC でトランスサイトー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、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、これに結合するモチーフを上記の T7 フェージライブラリーよりパニングによってスクリーニングした。5 回のスクリーニングの結果について、フェージ DNA を次世代シーケンスで解析し、選択された配列を網羅的に調べることにより、上位 10 クローンの同定を行った。

このスクリーニングと同時に、本研究で作製した iCell EC を利用した *in vitro* BBB を用いて、T7 フェージライブラリーから透過性のあるクローンの分離を試み、11 種のクローンを得た。

#### 平成 25 年度

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  $30\text{-}120\Omega/\text{cm}^2$  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  $1,000\Omega/\text{cm}^2$  という値が報告されているため (J Neurochem 2008)、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ェ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 フェージ上に提示し、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)。

#### 平成 26 年度

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 (Fig. 8)。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 モチーフの提示プラットフォームを利用したランダムペプチドライブラリーの作成を行った。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トランスサイトシスされるモチーフの選定を行うに際し、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 M13 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。次年度では、今回作成した *in vitro* BBB モデルと Knottin モチーフにランダムペプチドを提示する T7 ファージ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。

#### 平成 27 年度

本研究で作製した *in vitro* BBB モデルの関門性について更に検討するため、BBB 透過性の指標となる低分子化合物の透過係数を算定した。Caffein, 5,5-Diphenylhydantoin, Digoxin, Hydrocortison, Prazosin, Antipyrin、といった 6 種の放射性ラベルした低分子化合物を用意し、Caco2 細胞、MDCK 細胞と比較しながら、透過係数 (Pe) を算定し *in vitro* BBB システムとしての評価を行った。iCell EC による *in vitro* BBB モデルでは、CNS permeability (脳内浸透性) が低いとされている、Digoxin, Hydrocortison (Cortison) などについて、MDCK 細胞、Caco2 細胞など比較的高い関門性を形成できた細胞にくらべ、高い

Pe 値を示し、浸透性の制御が十分ではないことが示唆された (Fig. 10)。一因として、iCell EC の発現プロファイルの中で、低い発現量を示していたのは ABCB1 と SLC38A5 であるが、特に ABCB1 はドラッグトランスポーターとして BMVEC の血液側への薬剤排出に主要な役割を果たしており、iCell EC においてはその低い発現によって、Digoxin, Cortison といった薬剤の透過性が上昇したものと考えられる。iCell EC はトランスサイトーシスに関わる受容体分子の発現について比較的高いレベルを示していたので、今後はトランスサイトーシスの効率について過去の論文でトランスサイトーシスが可能として用いられている抗 TfR 抗体を利用して本研究で作製した *in vitro* BBB モデルの機能を検証しつつ、本来の目的である BBB 透過モチーフスクリーニングへ生かす解析を行う予定である。

BBB 通過モチーフのスクリーニングについて、当年度は TfR を具体的なターゲットとして想定したスクリーニングを進めた。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、先に作製した T7 フェージライブラリーを用い、組換え TfR に結合するモチーフを 5 回のパニングでスクリーニングを行った。各パニング後に取得できたライブラリー全体の T7 力価は上昇し (Fig. 11)、かつその TfR 結合能は増加したことを ELISA による検討で示す事ができた (Fig. 12)。また、各パニング後のライブラリーよりフェージ DNA を抽出し、PCR による増幅の後ライブラリー毎に約 30000~60000 の配列を MiSeq (Illumina) によってシーケンスを行い、スクリーニングの進行に従って増加したクローンを同定した (Fig. 13)。今後はそのクローンの単離、*in vitro* BBB システムによる Pe 値の算定を行い、その透過能を評価する予定である。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

平成 25 年度

- 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, Solfrosi L, and  
Clementi M  
Clinical and Developmental Immunology Volume 2013, ID 967581, 11 pages

平成 26 年度

- 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

平成 27 年度

- 1) Examination of a plasmid-based reverse genetic system for human astrovirus  
Chapellier B, Tange S, Tasaki H, Yoshida K, Zhou Y, Sakon N, Katayama K,  
Nakanishi A  
Microbiology and Immunology 2015, 59: 586-596

2. 学会発表

平成 25 年度

- 1) 5<sup>th</sup> 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  
Katayama K, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Murakami K, Oka T, Guix S, Sharp TM, Atmar  
RL, Crawford SE, Estes MK
- 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.  
Nakanishi A, Takagi H, Murakami K, Oka T, Takai-Todaka R, Tohya Y, Katayama K
- 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  
Nakanishi A, Tange S, Noguchi Y, Zhou Y

平成 26 年度

- 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

平成 27 年度

- 1) 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015 年 11 月 22 日 福岡  
Role of minor capsid protein VP2 during the murine norovirus life cycle.  
Yoshida K, Takai-Todaka R, Katayama K, and Nakanishi A.
- 2) 第 38 回日本分子生物学会 2015 年 12 月 3 日 神戸  
血液脳関門移行モチーフのスクリーニングに関する研究  
吉田 和央、周 妍、中西 章
- 3) 第 38 回日本分子生物学会 2015 年 12 月 2 日 神戸  
細胞内ノロウイルス複製モニタリングシステムの構築  
戸高 玲子、村上 耕介、朴 英斌、吉田 和央、中西 章、片山 和彦

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

平成 27 年度

出願特許

発明者：芳賀 慧、藤本 陽、戸高玲子、片山和彦、中西 章、三木元博、  
関根 盛、大塚浩史、三森重孝

発明の名称：ノロウイルスが増殖可能な遺伝子組換え細胞、及び、その用途

出願年月日 国内出願：2016 年 2 月 3 日

出願番号：特願 2016-019315(国内)

出願人：芳賀 慧、藤本 陽、戸高玲子、片山和彦、中西 章、デンカ株式会社

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし