

長寿医療研究開発費 平成28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、(1)ファージディスプレイによる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。最後に、候補モチーフを結合させた抗体の BBB 通過を *in vitro*、可能であれば *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。本年度においては、*in vitro* BBB モデルを利用したトランスサイトosisアッセイを作成し、BBB 透過モチーフ候補の機能的かつ効率的な評価を可能とした。そしてこのアッセイ系を用いて TfR 結合性が認められているモチーフについて *in vitro* での BBB 透過性の評価を行った。今後は、有望なモチーフについて最適化を行いつつ、より有効な BBB 透過モチーフ候補の選別を進める。

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EDIUMで培養した。不死化マウス血管内皮細胞 bEnd.3 は、Dolbecco's Minimum Essential Medium+10% Fetal Bovine Serum (FBS)で、結腸腺癌由来不死化ヒト腸管上皮細胞 Caco2 は Eagle's Minimum Essential Medium + 1 x MEM non-essential amino acid + 1 mM Sodium Pyruvate + 10% FBS で、イヌ腎臓尿細管上皮由来細胞 MDCK (Madin-Darby canine kidney cell) は Eagle's Minimum Essential Medium+ 10% 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. 3460)に対して、約 5x10⁴ 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。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 Fcy 抗体を 0.1ml 加え吸着させた後、サン

ルを添加・培養の後、ビオチン標識抗マウス F(a,b)'で反応後、Streptavidin-PolyHRP40で処理し、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。

d) トランスサイトーシスアッセイによる T7 ファージ透過の評価

トランスサイトーシスアッセイで採取した T7 ファージサンプルは、プラークアッセイでファージ力価を定量した。

e) iCell EC への T7 ファージのエンドサイトーシス評価

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 に対し、各 T7 ファージクローンを添加し、1 時間培養の後 4%パラホルムアルデヒドで固定し、マウス抗 T7 Phage tail 抗体(Milopore)およびウサギ抗 Rab5 抗体(Abcam)で反応させ、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。染色後、共焦点レーザー顕微鏡にて T7 Phage tail および Rab5 シグナル像を確認した。

II. T7 ファージライブラリーからの BBB 透過モチーフ候補のスクリーニング

a) T7 ファージの増幅

BBB 通過機能をもつタンパク質モチーフのスクリーニングのため、組換え T7 ファージライブラリーを利用した。このファージライブラリーは、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、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提示する（長寿医療研究開発費 課題番号 25-17 平成 27 年度報告書参照）。このファージの増幅には、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 μ 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 MgSO₄)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。

また、Knottin モチーフを提示する T7 クローンの増幅について、増幅後 Tfr との結合性が低下する現象が見られたが、増幅に用いる S5403 の培養条件を改良することにより、結合性を維持しつつ増幅を行う条件を確立した。

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：長寿医療研究開発費 課題番号 25-17 H26 年度報告書を参照)を約 25 μ g/ml の濃度で 8M Urea, 100mM Tris-HCl pH 8.0 で希釈し、50 μ 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 μ 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。

c) T7 ファージクローンの TfR 結合性評価

各パニング後に取得できた T7 ファージ群の TfR 結合能を ELISA で検討した。約 1 μ g/50 μ l の組換え TfR を NUNC Immuno Plate F96 Maxisorp の各ウェルに加え、一晩 4 度で静置後、PBS(-)で洗浄し、各ファ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 ファージ量を評価した。

(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

iCell ECを用いたin vitro BBBモデル (長寿医療研究開発費 課題番号25-17 H27年度報告書を参照)を使用して生体高分子の細胞透過性を評価できるトランスサイトーシスアッセイを新たに開発した。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。実験動物等を用いたこれまでの研究によりBBBを透過性があるとされる市販の抗TfR抗体、A、B、C、Dを用い、iCell ECを用いてその側底側 (Fig.1、右“Transcytosed”)、あるいは頂端側(左 “Recycled”) への抗体輸送を検証したところ、ヒトTfRを認識する抗体B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が示唆された。一方、齧歯類のTfRより作成された他3種の抗体は、iCell ECを用いてのアッセイでは頂端側、あるいは側底側への透過性は見られなかった。

抗体BについてiCell ECでの吸収・排出は、エンドサイトーシスに関連していることを示すため、Bafilomycin A1 (200nM) をこのアッセイ系に加えると、弱いながらも頂端側への排出が有意に阻害された。また、トランスサイトーシスの阻害剤として知られるTannic acid (0.125%)は、側底・頂端側への輸送を共に阻害した (Data not shown)。

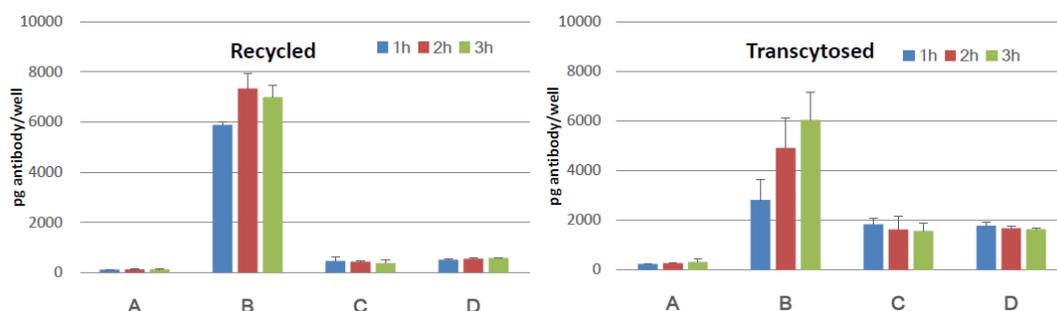


Fig. 1 iCell ECを用いた抗TfR抗体のトランスサイトーシスアッセイ

抗TfR抗体, A, B, C, D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。

齧歯類のTfRより作成された抗TfR抗体, A(ラット), C(マウス), D(マウス)は、ヒトiPS由来細胞である、iCell ECでの吸収排出が殆ど見られなかった。しかしながら、不死化ヒト腸管上皮細胞Caco-2を使用すると、抗体Bのみならず、ラットTfRを抗原とする抗体Aでも、弱いながらも頂端側への排出が検出できた(Fig.2, “A”, “Recycled”)。一方、マウス不死化血管内皮細胞株であるbEnd.3細胞では、マウスTfRより作成されたCとDの2種の抗体において、効率はBに及ばないものの頂端側・側底側への透過がみられた (“C” and “D”)。イヌ細胞であるMDCKではどの抗体についても透過がみられなかった。bEnd.3, Caco2細胞での各抗体の頂端側と側底側への抗体排出量を比較すると、頂端側への排出量が圧倒的に多く、吸収した側から再び排出するrecyclingの機能が勝っていた (“Recycled”)。しかしiCell ECで特徴的なのは、検証した他の細胞に比べて側底側への抗体の排出がはるかに多く、この細胞種はトランスサイトーシス機能が亢進しているとも考えられた (Fig. 1)。またこの結果は、不死化されたヒト脳微小血管内皮細胞であるhCME/D3の結果とも一致していた (PLoSOne 2014 9:e96340)。

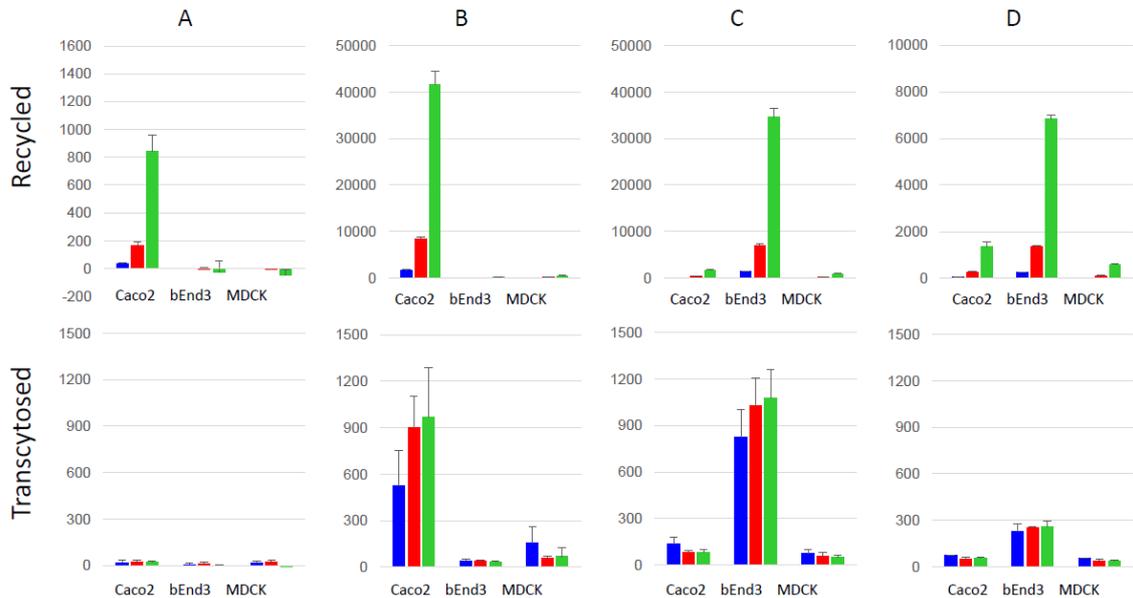


Fig. 2 Caco-2, bEnd3, MDCKを用いた抗TfR抗体のトランスサイトーシスアッセイ
 抗TfR抗体, A, B, C, DをCaco-2, bEnd3, MDCKに1時間吸収させた後、培養液中の抗体を洗淨・除去し、細胞内に吸収された抗体がその後の1, 2, 3時間の培養の後、頂端側(Recycled)、側底側(Transcytosed)へ移行した量をSandwich ELISAで定量した。

II. T7 ファージライブラリーからの BBB 透過モチーフ候補のスクリーニング

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 ファージディスプレイプラットフォームの作成、そして 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 T7 ファージライブラリーの作成については、以前報告した(長寿医療研究開発費 課題番号 25-17 平成 27 年度報告書参照)。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を TfR と想定し、その細胞外ドメインの組換えタンパク質を用いて TfR 結合モチーフのスクリーニングを試みた。5 回のパニングを行い、得られたライブラリー配列を次世代シーケンスで解析して得られた上位 19 のモチーフ候補、そして更に 3 回のパニングを行って得られた 1 つのモチーフについて、組換え TfR タンパク質への結合性を検討した。モチーフを介して組換え TfR に結合する T7 ファージを抗ファージ抗体で検出する ELISA 法によって評価したところ、少なくとも 10 つの T7 クローンについて、野生型 T7 ファージよりも高い結合性が見られた。

これら T7 クローンをトランスサイトーシスアッセイに供し、我々が作成した *in vitro* BBB モデルでの透過性の有無を検討した。TfR の結合性が高いと考えられるクローン 7 つ(1~7)と野生型 T7 ファージをそれぞれ同じ力価を、トランスウェル内の iCell EC に添加・培養し、培養液中に残存するファージを洗淨・除去の後、1~3 時間培養し、頂端側(Recycled)、

側底側 (Transcytosed) へ移行するファージ数をプラークアッセイで定量した (Fig. 3)。定量できた力価の変動が大きいと、明確には結論が出せないが、ELISA で検出した Tfr の結合性が大きく変わらないと考えられる 7つのクローンの中でも、側底側により多く排出されているように見える 4, 5, 7といったクローンが見つかった。全体の約 1%が側底側あるいは頂端側に検出できた抗 Tfr 抗体の場合とは異なり、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いた。

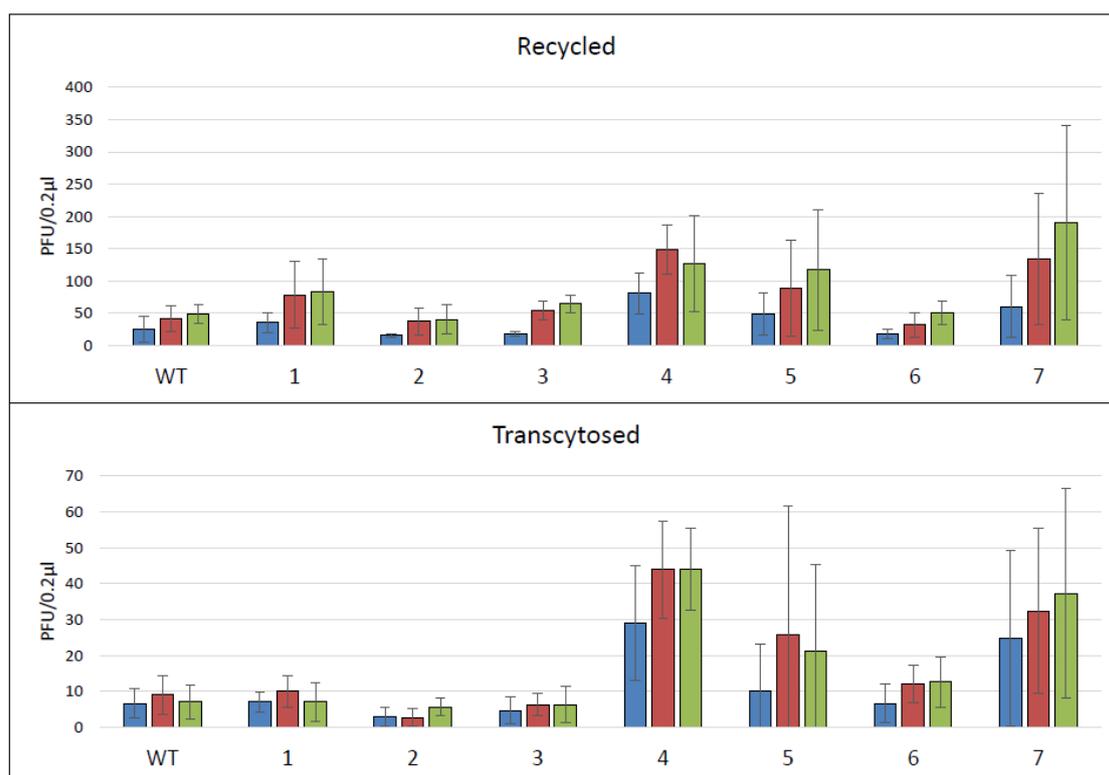


Fig. 3 iCell ECを用いたT7ファージクローンのトランスサイトosisアッセイ
Tfr結合性のT7ファージクローン1~7および野生型T7ファージをiCell ECに1時間吸収させた後、培養液中のファージを洗浄・除去し、細胞内に吸収されたファージがその後の1, 2, 3時間の培養の後、頂端側(Recycled)、側底側(Transcytosed)へ移行した数をプラークアッセイでその力価を定量した。

Tfr 結合性がある抗 Tfr 抗体全てがトランスサイトosisの対象とはならず、細胞内に貯留されリソソーム等での分解へのルートに分別される抗体があることも知られている (Sci Transl Med 2013 5(183):183ra57, 1-12.; PLoSOne 2014 9:e96340.; J Exp Med 2014 211:233-244.)。同様な現象が同じ Tfr 結合性を持つと考えられる T7 クローンについて見られるか、iCell EC への吸収後の T7 ファージの細胞内分布を初期エンドソームマーカーである Rab5 の分布と比較を行った (Fig.4)。調べたクローンの中で例えばクローン A (Clone

A)の場合、トランスサイトーシスアッセイでは側底側あるいは頂端側に検出できたクローン数はWTと大差は無かったが (Data not shown)、細胞内で T7 フェージ抗原の強いシグナルが見られ、その一部が Rab5 陽性シグナルと重複している像が観察できた (Fig.4, “Clone A”, arrowheads)。一方 WT の場合では、Rab5 陽性顆粒は確認できるが、T7 tail の強いシグナルを示す顆粒は確認できなかった。

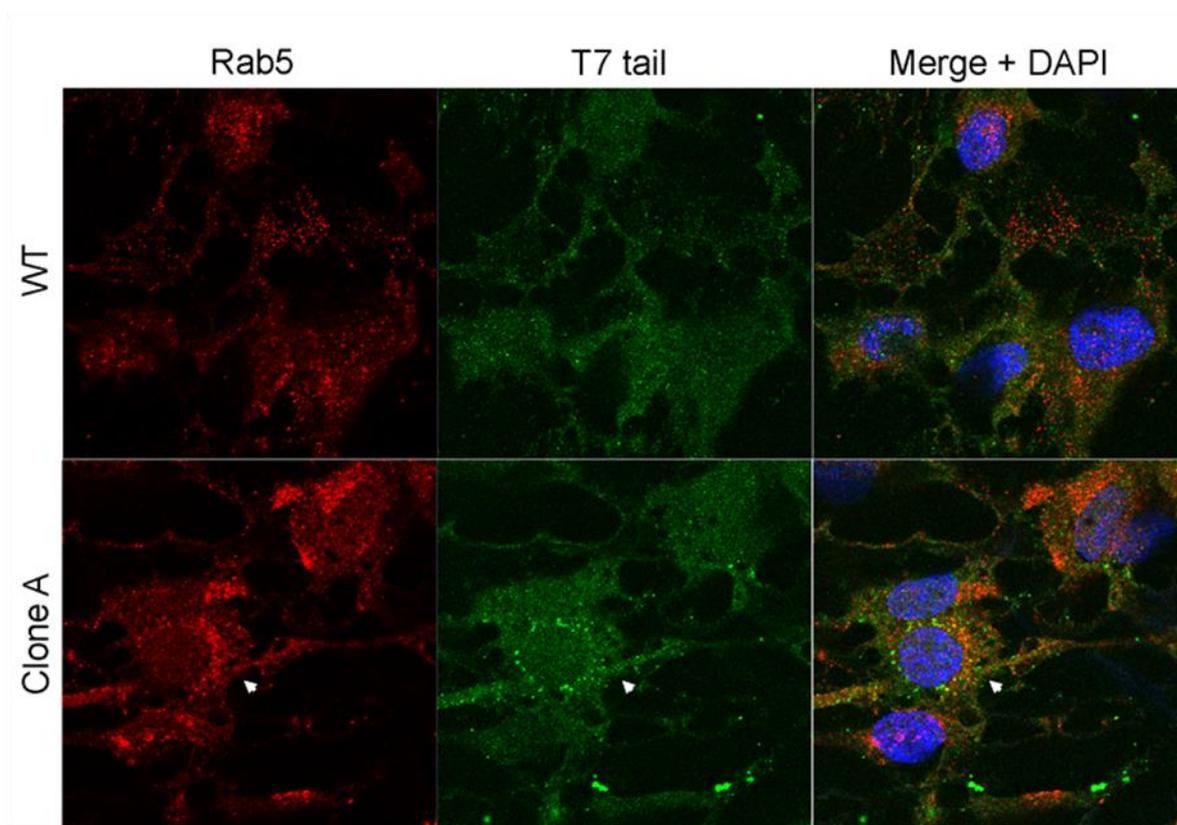


Fig. 4 iCell ECへのT7フェージクローンの吸収と細胞内分布

T7 フェージクローン (WT, Clone A) を1時間吸収させ洗浄の後、固定、T7 フェージ抗原(T7 tail)、初期エンドソームマーカー(Rab5)を蛍光免疫染色した iCell EC。右端は、DAPIによるDNA染色と共に Rab5、T7 tail シグナルを併せた染色像を示す(Merge + DNA)。白い矢印 (arrowhead)は T7 tail での染色で細胞内に強いシグナルを示した細胞を示す。

D. 考察と結論

BBB透過性をin vitroで評価するにあたり、ヒトiPS細胞より分化させたiCell ECを用い、トランスサイトーシスを模した経血管内皮細胞輸送を評価できる実験系 (トランスサイトーシスアッセイ) を作成した (Fig. 1)。この実験系では、既にin vivoの実験よりBBB透過性があるとされている抗TfR抗体について、in vitro BBB実験系で細胞を通過して移送され

るトランスサイトシス様の活性があることを再現できた。輸送効率は、頂端・側底側ともに約1%であり、通常抗体のBBB透過率が0.6%であることからすれば、十分に高い輸送効率と思われる。なおこの実験では、3時間という時間内での輸送量を量っているため、より長時間の培養では輸送効率がより高く評価できることが期待できる反面、*in vitro*実験系のため、他に様々な条件が付加される*in vivo*での挙動を保証するものではない。一方、TfRを介したトランスサイトシスを利用するBBB透過性機構は、種特異性が高いことが明らかになった(Fig. 2)。このことは、(1) 個々の抗TfR抗体は種間抗原の交差性がない、あるいは(2) 交差性はあるが認識する部位によってトランスサイトシス経路への移行性に種特異的な差がある、などといった可能性を考える事ができる。しかし、個々の抗体の細胞への吸収性・結合性をみると、それらは透過性とほぼ一致していたため (Data not shown)、各抗体での結合特異性がその後の透過性を左右しているものと考えられる。しかしなによりもこの結果は、ヒトへの臨床応用をめざす場合ヒト由来細胞・分子の利用が不可欠であり、これまでマウスあるいはラットのTfRに対する抗体を基に行われていたモチーフ解析には臨床応用の道筋が立てにくいことを意味している。同時に、実験動物レベルでの検証については、ヒト由来分子での相互作用を利用できる実験系の採用・作成が今後の課題と思われる。

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(Neuron, 2014 81:49–60; Nat Commun. 2016 7:10759.)。抗体結合に代わるモチーフをスクリーニングするため、我々は3箇所 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 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 T7 ライブラリーを用い、TfR 結合モチーフのスクリーニングを行った。得られた T7 クローンについて、トランスサイトシスアッセイで *in vitro* BBB モデルにおける透過性を検討した結果、3 種について透過性が向上していることを示唆する結果が得られた(Fig. 3)。現在、これらもモチーフについて、TfR 結合性の最適化を指標にして *in vitro* BBB モデルでの透過性向上を目指し、コンセンサス配列の抽出、周辺ペプチド配列の改変を検討中である。また、Fig.4 で示すように、TfR に結合できてもトランスサイトシス活性が比例して上昇する保証がないことは、過去の研究でも示されているため(J. Exp. Med. 2014 211:233-244.)、TfR 結合性を担保しつつ *in vitro* BBB 透過性が高いモチーフを選択することを念頭に置いている。また、現段階では T7 フェージディスプレイという数十個のモチーフが一つのフェージに提示されている実験系を使用していることから、親和性が低いモチーフも選択される余地があるため、今後は Monovalent な結合で TfR との結合をスクリーニングできる実験系を併用して BBB モチーフ候補の選択を行う予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld within the CD300 family enable murine noroviruses to infect cells.

Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Miki M, Doan YH, Murakami K, Yokoyama M, Murata K, Nakanishi A, and Katayama K.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA.113; E6248–E6255, 2016

2. 学会発表

1) Functional role of Murine Noroviral VP2 during the viral life cycle

Yoshida K, Takai-Todaka R, Katayama K, Nakanishi A

American Society for Virology (2016) June 19, Blacksburg, Virginia, USA

2) Genetic approach to examine the role of murine noroviral VP2 during the viral infectious cycle.

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

6th International Calicivirus Conference (2016) Oct. 11, Savannah, Georgia, USA

3) ノロウイルスの複製複合体に集積する核膜孔タンパク質

中西 章、金森 久美子、片山 和彦、戸高 玲子、芳賀慧、藤本陽、加藤 晶子、吉田 和央

第 37 回日本分子生物学会 2016 年 12 月 2 日 横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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：国際出願：2017 年 2 月 1 日

出願番号：PCT/JP2017/3539

出願人：国立感染症研究所、デンカ株式会社

(国立長寿医療研究センターも共願人として名義変更予定)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし