

長寿医療研究開発費 平成30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

年間全体

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。

平成 28 年度

ヒト iPS 細胞より分化させた iCell EC を用い、トランスサイトosis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。

平成 29 年度

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、BBB 透過モチーフ候補の 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ァ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リボソームディスプレイ系を構築した。

平成 30 年度

ヒト **TfR** の種特異的な **epitope** に結合に依存したトランスサイトシスを前臨床での検証に用いるため、細胞・動物レベルでの実験系構築を試みた。

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）

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) 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

年間全体

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. 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。

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。

平成 28 年度

I. In vitro BBB モデルによる高分子透過性の評価

a) 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。

b) 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(Milpopore)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 Trs-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、Kottin 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 Trs-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、一晩 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。

平成 29 年度

II. T7 ファ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 ファ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® 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® 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。

平成 30 年度

I. ヒト TfR を強制発現する bEnd.3 細胞の樹立

a) ヒト・マウス TfR cDNA の作製

hCMEC/D3細胞(不死化ヒト脳微小血管内皮細胞)およびbEnd.3細胞より Isogen II (ニッポンジーン)で細胞RNAを抽出・精製し、それぞれのTfR遺伝子特異的プライマーにより各 TfR cDNAを増幅、そしてレンチウイルスベクターDNA、CSII CMV IRES Bsd(理化学研究所)へクローニングした。また、CytoC. (細胞質ドメインのみマウスTfR由来、他はヒトTfR由来)およびTM C. (膜貫通領域まではマウスTfR由来、細胞外ドメインはヒトTfR由来)については上記の特異的プライマーにより上記のレンチウイルスベクターDNAにクローニングした。各ベクターDNAを利用してレンチウイルスベクターを作製し、bEnd.3細胞に各TfR遺伝子の導入を行った。導入後、遺伝子導入された細胞を選択するためブラストサイジンにて2週間処理した。

b) 抗 TfR 抗体による免疫染色

コラーゲン I コートしたカバースリップに各細胞を播き、1日後 4%パラホルムアルデヒドで固定、マウス抗ヒト TfR 抗体およびラット抗マウス TfR 抗体で反応させ、対応する二次抗体、AlexaFluor555 抗マウス IgG, AlexaFluor488 抗ラットを用いて免疫蛍光染色を行った。染色後、BZ9000(Keyence)にてヒト TfR およびマウス TfR シグナル像を確認した。

II. 改良 AAV ベクターの作製とマウス個体への導入

a) AAV-BR1 の作製

脳血管特異的に遺伝子導入が可能とされる改良 AAV ベクター(AAV-BR1)を作成した(Körbelin et al. EMBO Molec.Med. 2016, 8: 609–625). pRC-mi342(Takara)にたいしてそのコードする AAV CAP 遺伝子の C 末端側配列に NRGTEWD 配列を新たに導入し、pAAV-BR1 を作製した。pAAV-BR1 と pHelper、そしてパッケージされる DNA を発現する pAAV-CAG Fluc を同時に 293T 細胞に導入し、Optiprep 密度勾配遠沈などの精製操作を経て、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現する改良 AAV ベクター(AAV-BR1)を 10^{11} genome copy/ml レベルで調整した。

b) マウス個体への導入と遺伝子部位の同定

FVB/N♀マウス4匹に対し、尾静脈経路で1匹あたり 6×10^9 /genome copyのAAV-BR1を導入した。導入15日後に導入マウス2匹、未導入マウス1匹について、それぞれD-luciferin (15mg/mL)を200 μ L腹腔内投与し、投与10分後にIVIS Lumina II (Caliper Life Sciences)にて発光シグナルを計測しルシフェリルシフェラーゼ活性部位を調べた。同様の操作は導入20日後に導入マウス2匹、未導入マウス1匹について行った。この際、全身での発光シグナルの計測を行った後、脳、肝臓、心臓を取り出し、12wellプレートにてD-luciferin (15mg/mL)溶液500 μ Lに浸漬しつつ、IVIS Lumina IIでの発光シグナルを計測した。

(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モデルによる高分子透過性の評価

iCell EC(ヒト血管内皮細胞株)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。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行が示された。またこの移行はBafilomycin A1、Tannic acid処理に感受性であった。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、bEnd.3細胞(マウス血管内皮細胞)ではマウス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。ヒトTfRを強制発現するマウス細胞においては、抗ヒトTfR抗体がトランスサイトーシス様移行を示した。

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)。TfR細胞外ドメインの組換えタンパク質に結合するT7クローン19種を選別し、個々のクローンの組換えTfR結合性をELISAにより評価したところ、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 クロンのうち 7 種をトランスサイトーシスアッセイに供した。それぞれのクローンを同じ力価に調整し、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浄・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。定量できた力価の変動が大きいため、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。

TfR 結合性がある抗 TfR 抗体全てがトランスサイトーシスの対象とはならず、細胞内に貯留されリゾ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ため、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。調べたクローンの中では細胞内で T7 ファ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。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。

トランスサイトーシスアッセイの結果から、効率的な透過能をもつモチーフが見つからなかったと判断されたため、再度 T7 クロンの選別を行った。新たに 5 クロンの取得し、以前に取得した 10 クロンと併せて、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。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。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。

III. リボソームディスプレイプラットフォームの作成

T7 ファ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は、提示されているモチーフがファージ上に数十あり、対象分子とは多価の結合を想定している。弱い結合も多価結合で検出する意図があったが、結果は強い結合モチーフさえも検出できなかった。このため、一価で強い結合を簡便かつ高速なスクリーニングするために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。この方法は、試験管内での転写・翻訳の際、翻訳終了を阻害すると、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。ランダムペプチドライブラリーを提示する翻訳されたタンパク質の結合を介して mRNA を回収できる。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。本実験では Myc-tag-

Linker – ランダムペプチドを提示するMCoTI-II – Linker – NanoLuc – 3xFLAG – SecM
といった順番の配列をデザインし、リボソームスクリーニングのライブラリーを構築した。

平成 28 年度

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)。

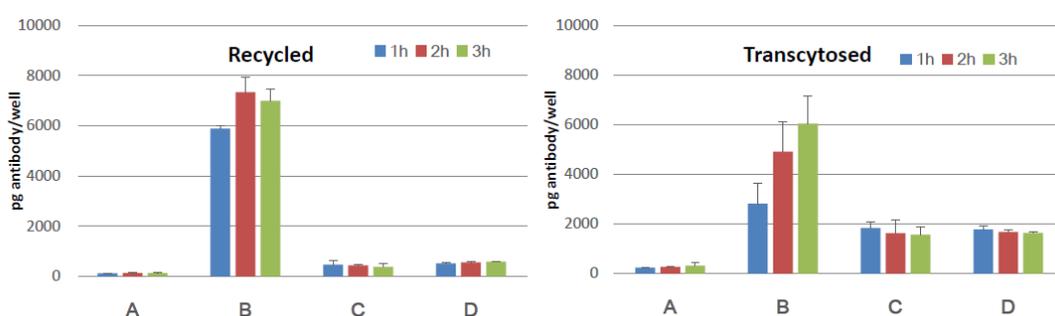


Fig. 1 iCell ECを用いた抗TfR抗体のトランスサイトーシスアッセイ

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.)。

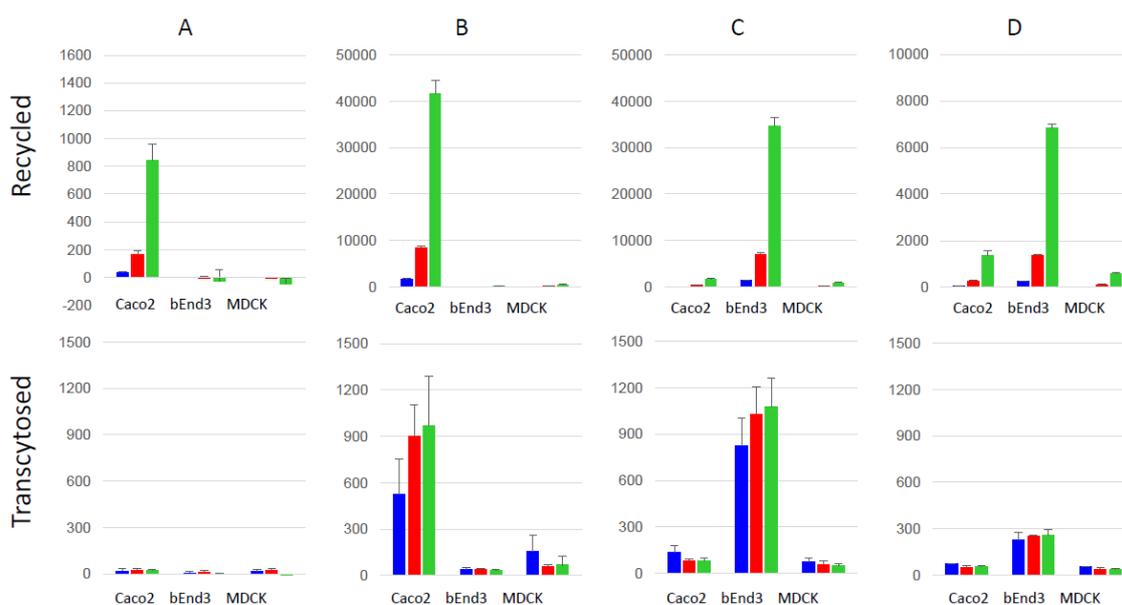


Fig. 2 Caco-2, bEnd.3, MDCKを用いた抗TfR抗体のトランスサイトーシスアッセイ
抗TfR抗体, A, B, C, DをCaco-2, bEnd.3, MDCKに1時間吸収させた後、培養液中の抗体を洗浄・除去し、細胞内に吸収された抗体がその後の1, 2, 3時間の培養の後、頂端側(Recycled)、側底側(Transcytosed)へ移行した量をSandwich ELISAで定量した。

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 フェ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浄・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ため、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。

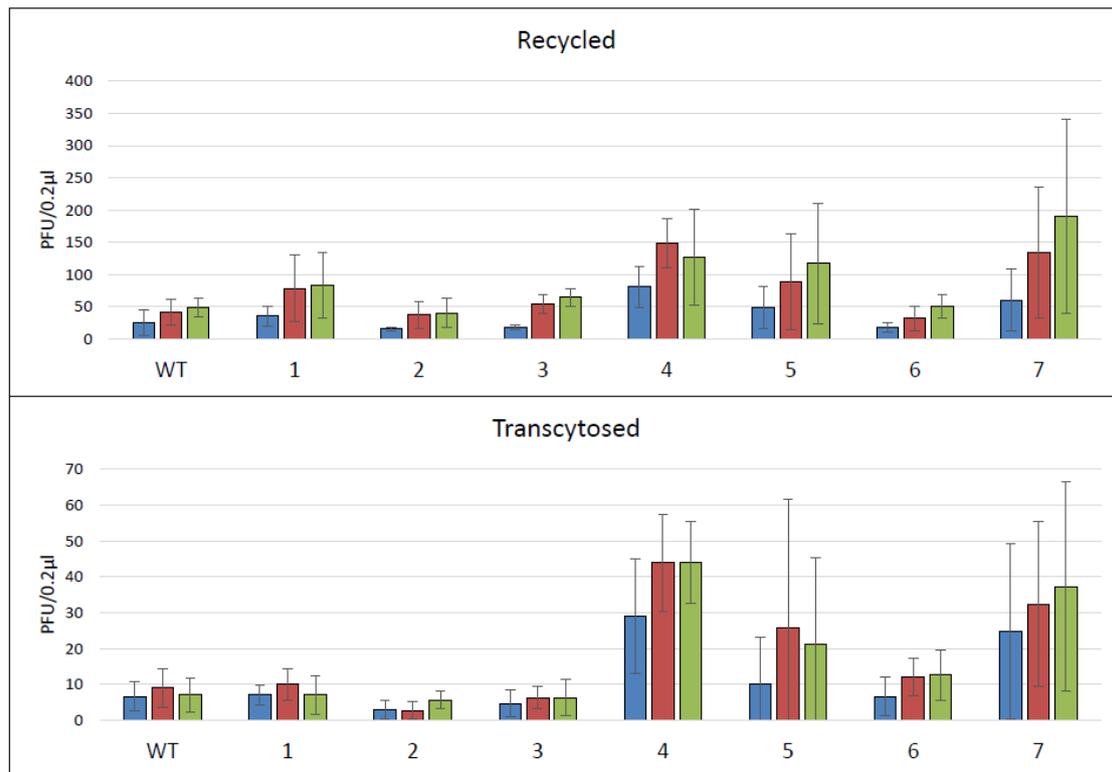


Fig. 3 iCell ECを用いたT7ファージクローンのトランスサイトーシスアッセイ
TfR結合性のT7ファージクローン1~7および野生型T7ファージをiCell ECに1時間吸収させた後、培養液中のファージを洗浄・除去し、細胞内に吸収されたファージがその後の1, 2, 3時間の培養の後、頂端側(Recycled)、側底側(Transcytosed)へ移行した数をブランクアッセイでその力価を定量した。

TfR 結合性がある抗 TfR 抗体全てがトランスサイトーシスの対象とはならず、細胞内に貯留されリソゾ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 ファ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。

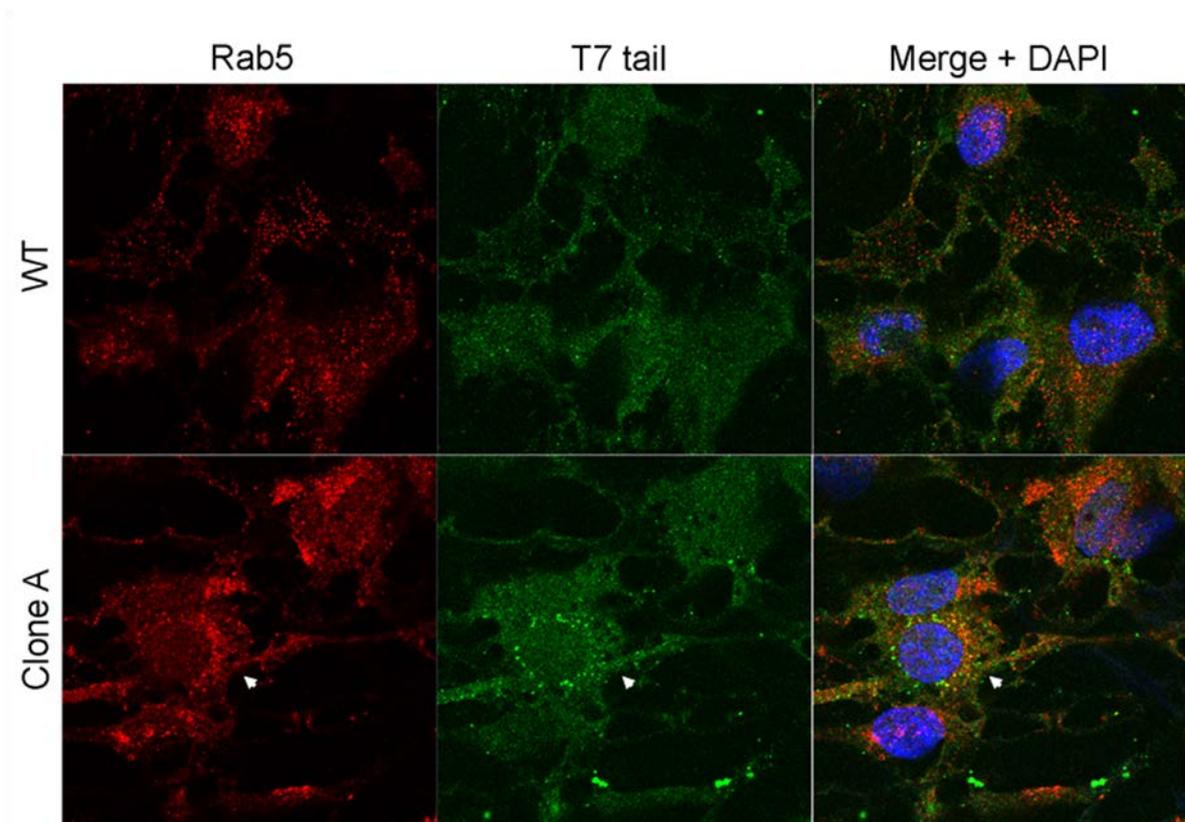


Fig. 4 iCell ECへのT7ファージクローンの吸収と細胞内分布

T7 ファージクローン (WT, Clone A) を1時間吸収させ洗浄の後、固定、T7 ファージ抗原(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。

平成 29 年度

I. In vitro BBB モデルによる高分子透過性の評価

iCell ECによるトランスサイトーシスアッセイについて、抗 $\text{A}\beta$ 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 $\text{A}\beta$ 抗体(Fig.5)、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。

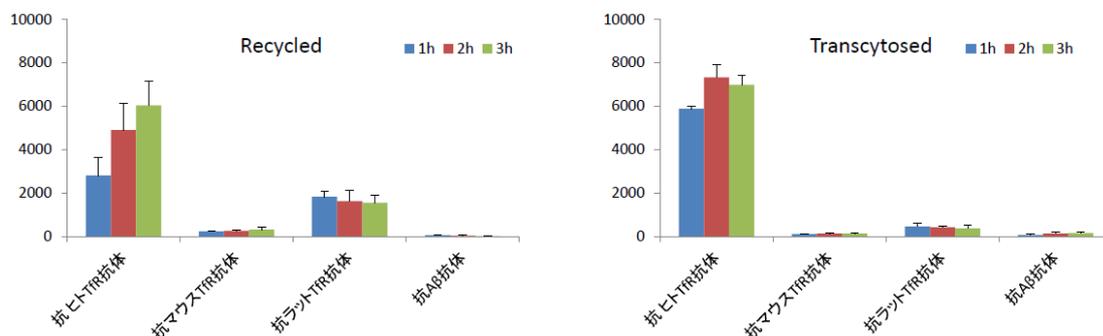


Fig.5 iCell ECを用いた各抗体のトランスサイトーシスアッセイ

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 ファ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 ファ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 ファージよりも組換え 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. 6A)。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.6B)。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.6C)。

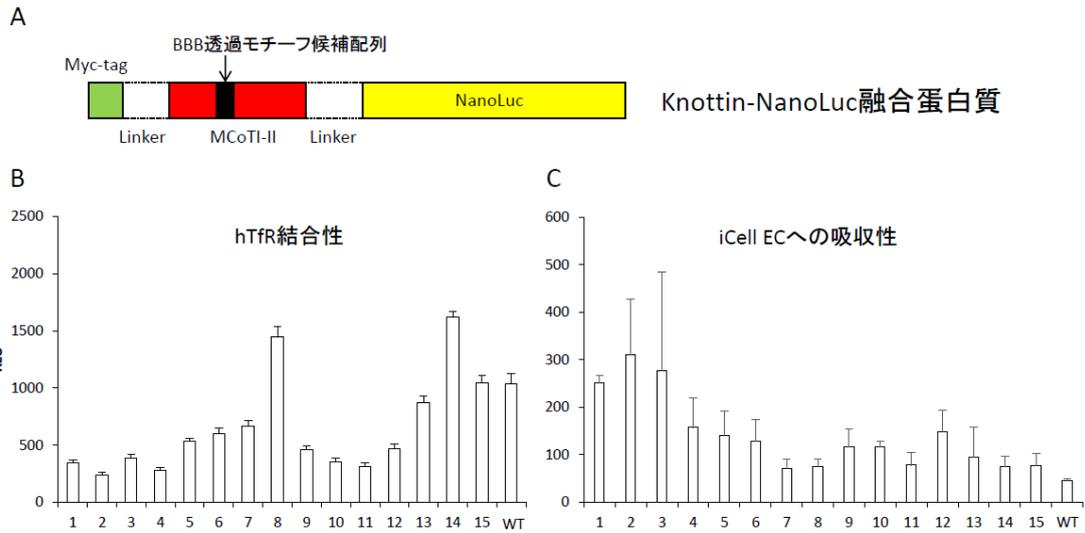


Fig.6 Knottin-NanoLuc 融合蛋白質による BBB 透過モチーフ候補配列の解析：(A), Knottin-NanoLuc 融合蛋白質の模式図；(B), 各融合タンパク質について、組換え hTfR タンパク質への結合性を解析。縦軸は NanoLuc 活性を示す。；(C), 各融合タンパク質について iCell EC への吸収性を評価。それぞれ一定量を 1 時間細胞に吸収させた後、培養液の交換・細胞の洗浄を行い、細胞内に吸収されたタンパク質量について、NanoLuc 活性を指標に評価した。

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 フェ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. 7)。

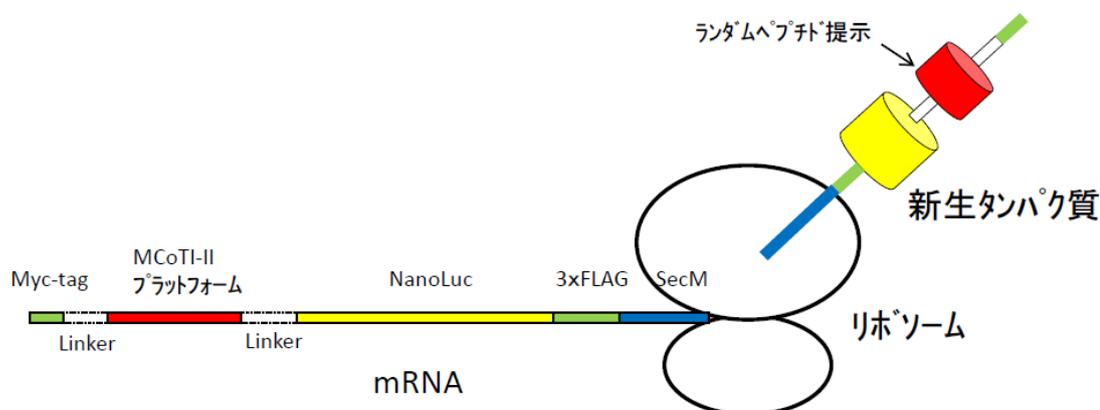


Fig. 7 リボソームディスプレイの模式図

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。

平成 30 年度

I. ヒト抗ヒト **TfR** 抗体の **BBB** 透過性評価に際して前臨床試験を目的とした *in vitro* モデル構築

マウス**TfR**を抗原とする抗マウス**TfR**抗体は、ヒト由来細胞である*iCell EC*での吸収排出が殆ど見られなかった一方、マウス不死化血管内皮細胞株である**bEnd.3**細胞では効率は低いものの頂端側・側底側への透過がみられた。これは、トランスサイトosis様の移行ができる抗**TfR**抗体は種間で異なる**TfR**のエピトープを認識することを示している。従ってヒト**TfR**結合性で選別された**BBB**透過モチーフ候補が、種間で異なるヒト特異的なエピトープに結合するものである場合は、実験動物レベルでの検証ができない。もしヒト**TfR**を発現させることによって、抗ヒト**TfR**抗体のトランスサイトosis様移行ができる組換えマウスがあれば動物レベルでの検証が可能である。このためまず、マウス細胞で発現したヒト**TfR**がマウス**TfR**と同様に抗体のトランスサイトosis様移行を支持するか調べた。ヒト**TfR**全長 cDNA、細胞側ドメインがマウス**TfR**で細胞外ドメインはヒト**TfR**のcDNA、マウス**TfR**全長 cDNAそれぞれを発現するレンチウイルスベクターを作成し、**bEnd.3**細胞に導入した(**Fig.8**)。各**TfR**発現カセットを導入された**bEnd.3**細胞は、発現カセットに含まれる**Bsd**(ブラストサイジン耐性)遺伝子を利用して、ブラストサイジンで選択したのち、各**TfR**の発現を免疫染色によって確認した(**Fig.9**)。

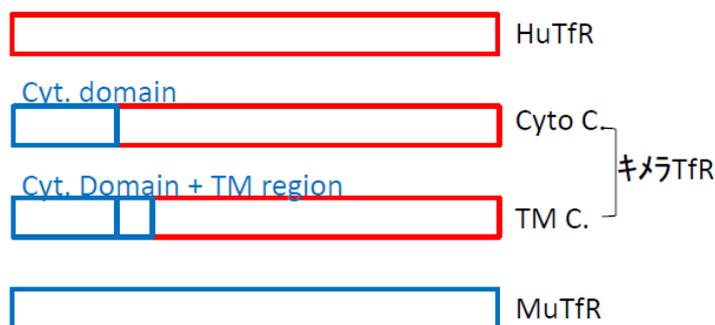


Fig.8 マウス細胞に強制発現させた**TfR**のドメイン構造

HuTfR; ヒト**TfR**全長

CytoC.; **Cyto.domain**(細胞質ドメイン)のみマウス**TfR**由来、他はヒト**TfR**由来

TM C.; TM region(膜貫通領域)まではマウスTfR由来、細胞外ドメインはヒトTfR由来
MuTfR; マウスTfR全長

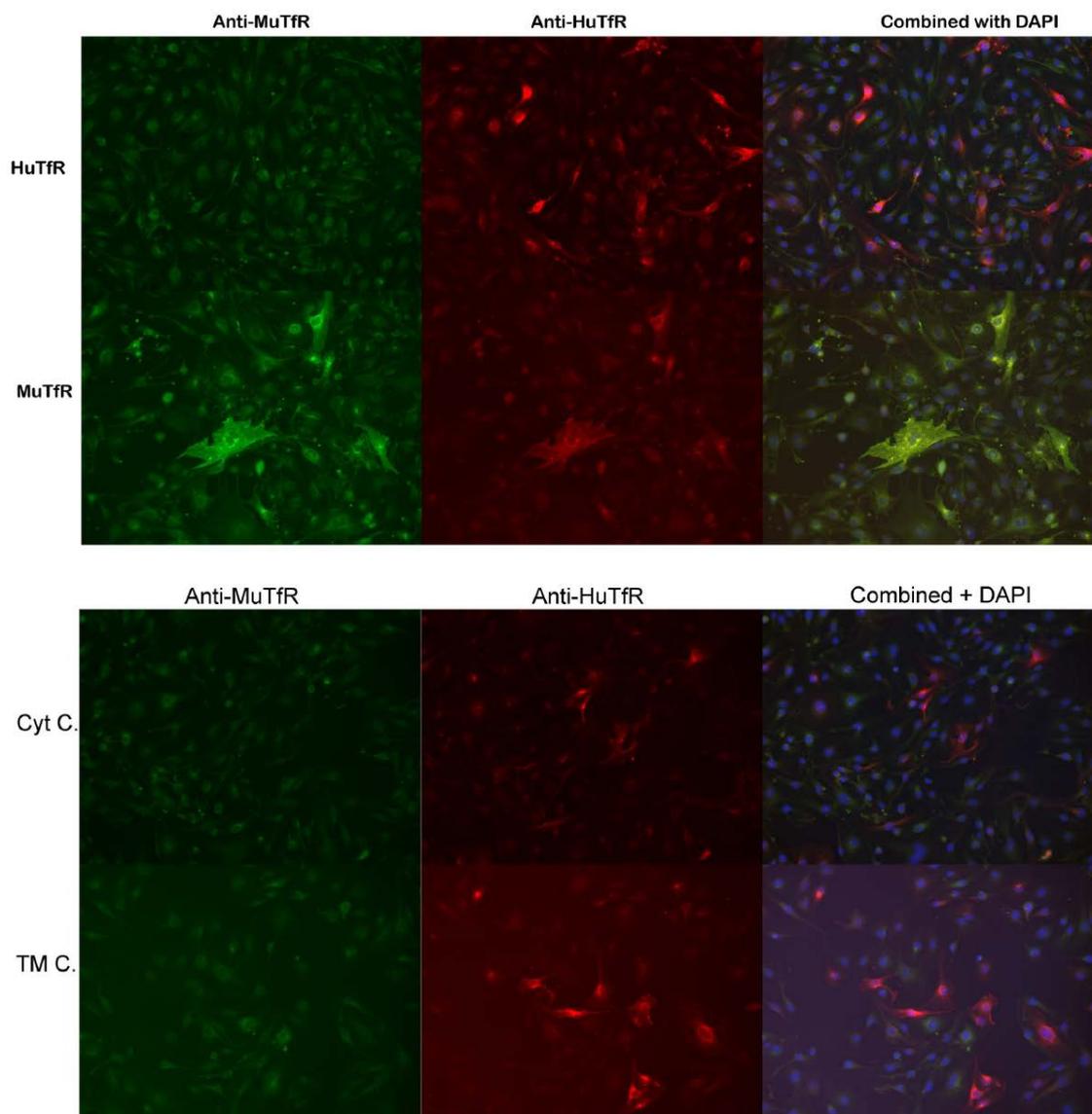


Fig. 9 ヒト/マウスTfRの免疫染色による検出

各TfR(HuTfR, CytoC., TM C., MuTfR : Fig. 8参照)の免疫染色による発現確認。抗マウスTfR抗体はヒトTfRを弱いながらも認識するため、マウスTfRを過剰発現した細胞では、ヒトTfRのシグナルとオーバーラップした様に見える。

これらの細胞における抗ヒトTfR抗体のトランスサイトosis様移行を調べたところ、マウスTfR cDNAを発現する細胞を除き、ヒトTfR 細胞外ドメインを発現する細胞については全て抗ヒトTfR抗体がトランスサイトosis様移行で透過されることを観察

することができた(Fig.10)。この結果により、マウスにヒトTfR cDNAを導入すれば、抗ヒトTfR抗体のトランスサイトーシス様移行の実験動物モデルとして利用できることが示唆された。

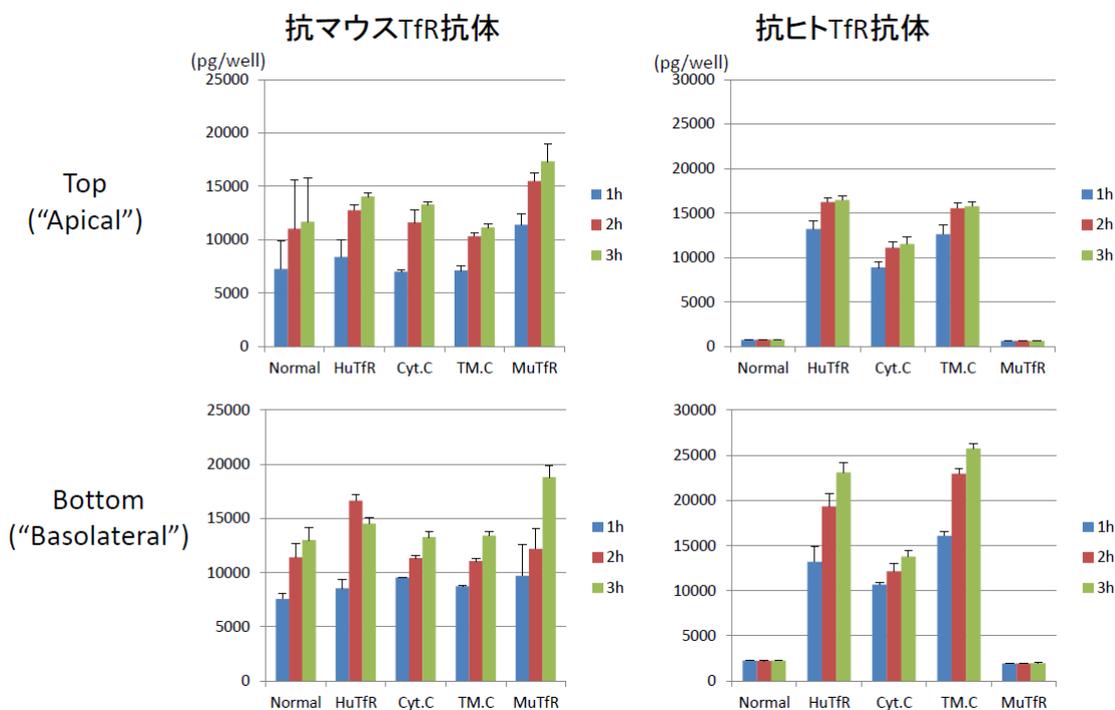


Fig.10 各TfRを強制発現するbEnd.3細胞を用いた抗マウス・抗ヒトTfR抗体のトランスサイトーシスアッセイ

各抗体をそれぞれの細胞に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。Normal; Non-transduced bEnd.3, HuTfR, Cyt.C, TM.C, and MuTfR; bEnd.3 cells transduced with expression cassette for HuTfR, Cyt.C, TM.C, and MuTfR, respectively.

ヒトTfRをマウスのBBBを形成する脳微小血管内皮細胞に発現させるため、脳血管特異的に遺伝子導入が可能とされる改良AAVベクター(AAV-BR1)を作成した(Körbelin et al. EMBO Molec.Med. 2016, 8: 609–625)。このベクターにホタルLuciferaseを組み込み、ベクター粒子を 10^{11} genome copy/mlレベルで作成・精製・調整した。このAAV-BR1ベクターをマウスに尾静脈経由で導入し、導入臓器・組織をIVISによるルシフェラーゼ発現により確認した。その結果、ルシフェラーゼ活性は見かけ上全身にみられ、発表された論文では頭部にのみ集中して活性がみられたものとは全く異なる結果となった(Fig.11)。また、脳、肝臓、心臓を取り出してそのルシフェラーゼ活性を検討したとこ

ろ、心臓にのみ活性がみられた。また腹膜周辺の筋肉組織にもよく活性がみられたところから、この改良ベクターは筋肉組織をターゲットしていると推測された。

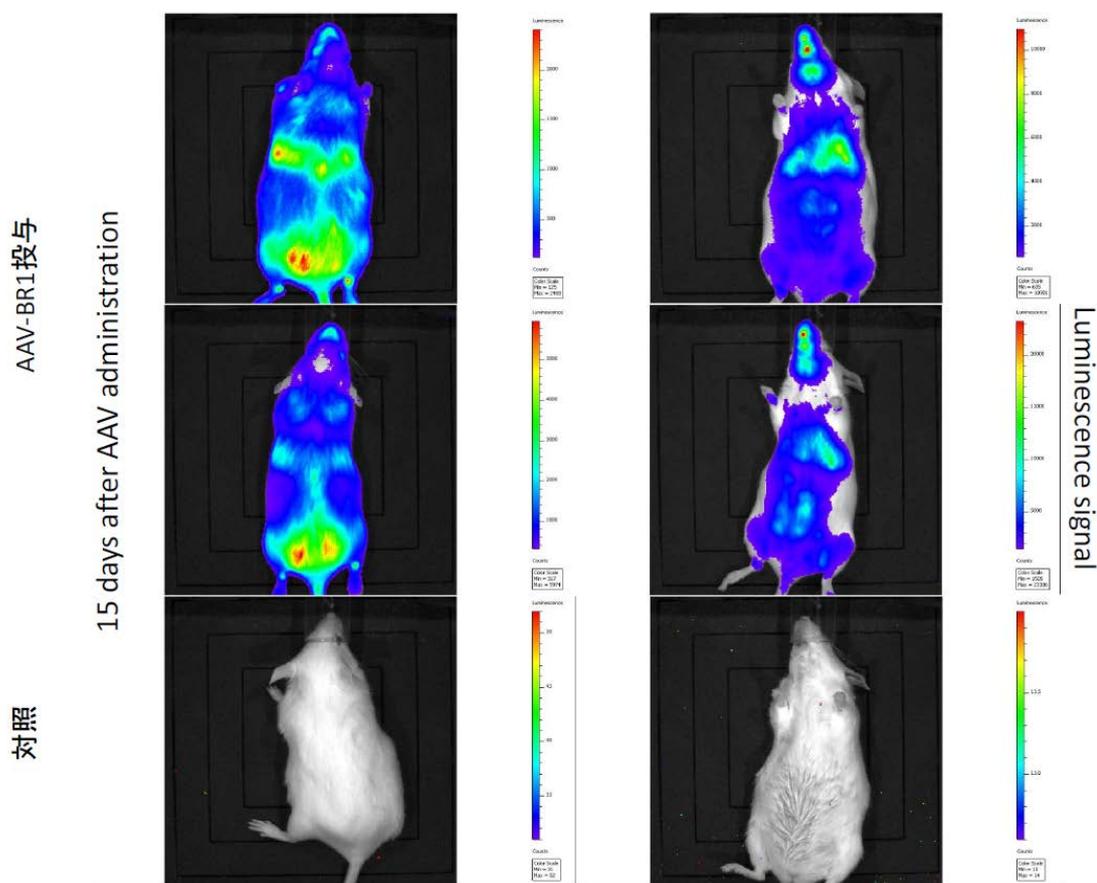


Fig. 11 AAV-BR1の導入特異性の検証

ルシフェラーゼ発現AAV-BR1ベクターを導入（上2匹）、未導入(下1匹)のマウスについて、発光シグナルをIVISにて計測した結果。

D. 考察と結論

年間全体

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（トランスサイトシスアッセイ）を作成した。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。この実験系により、種々の抗体におけるトランスサイトシス様移行の評価が可能となり、本研究の推進に大いに役立つものとなった。一方、ヒト TfR の種特異的な epitope に結合に依存したトランスサイト

ーシスを前臨床での検証に用いるため、細胞・動物レベルでの実験系構築を試みた。

BBB 透過モチーフの探索においては、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ライブラリーより得られたTfR結合モチーフについて、T7ファージクローンとして、そしてモチーフ単体の*in vitro* TfR結合性、*in vitro* BBBモデルによるトランスサイトーシス様移行を評価した。また、T7ファージディスプレイ法よりも高速でスクリーニングが可能なりボソームディスプレイ法によるスクリーニング系を構築した。

平成28年度

iCell ECを用いたトランスサイトーシスアッセイでは、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ーシスを利用するBBB透過性機構は、種特異性が高いことが明らかになった。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ー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.)。TfR結合モチーフのスクリーニングの結果得られたT7クローンについて、トランスサイトーシスアッセイで*in vitro* BBBモデルにおける透過性を検討し、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)。TfRに結合できてもトランスサイトー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。

平成29年度

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はこれまでTfRに対する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 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 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 の関門性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を試してみたが、トランスサイトーシス様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 結合候補モチーフを、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 フェージ上に提示されている場合は数十分子が一つのフェ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 フェ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り、本年度において実験系の確立とライブラリーの作成を行った。

平成 30 年度

抗TfR抗体によるTfRを介したトランスサイトーシスは、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。しかしながら前臨床レベルでの検証では、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。ヒトTfRの細胞外ドメインを発現するマウス血管内皮細胞bEnd.3は、抗ヒトTfR抗体のトランスサイトーシス様移行を支持することから、in vivoでもヒトTfRを発現するマウスを利用したBBB透過性検討が可能と考えられる。脳血管内皮特異的と言われるAAVベクターを利用した遺伝子導入系は論文発表内容とは異なった結果になったが、今後はヒトTfR遺伝子ノックインマウスの作製によるアプローチが必要と考えられる(ヒトTfR遺伝子導入マウスの作製は大臣確認が必要な遺伝子組換え体作製となる)。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

平成 28 年度

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

平成 29 年度

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

平成 30 年度

1) Upregulation of CHOP participates in caspase activation and virus release in human astrovirus infected cells.

Isobe T, Tange S, Tasaki H, Kanamori K, Kato A, Nakanishi A

J.Gen.Virol. in press

2) 認知症治療薬の血液脳関門薬剤通過のメカニズムと評価

中西 章

認知症の早期診断技術と進行抑制・予防へ向けた治療薬と機能性食品の開発 (仮)
技術情報協会 in press

2. 学会発表

平成 28 年度

- 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

平成 29 年度

- 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

平成 30 年度

- 1) Isobe T, Kanamori K, Nakanishi A
The induction of apoptosis by unfolded protein response is crucial for propagation of human astrovirus.
37th Annual Meeting of American Society for Virology (2018) July 16, College Park, MA, USA

2) 磯部智康、田崎秀尚、金森久美子、中西章

アストロウイルス感染時の eIF2alpha-ATF4 経路の活性化とその意義

第 66 回日本ウイルス学会学術集会 2018 年 10 月 29 日 京都

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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし