

RAGE介在性エンドサイトーシスによる脳疾患治療薬の新たなBBB薬物輸送法構築
(30-40)

主任研究者 小関 弘恵知 国立長寿医療研究センター
ラジオアイソトープ管理室 (流動研究員)

研究要旨

今日まで認知症を始めとする脳疾患関連治療薬として様々な抗体医薬が開発され、なかでもAD治療薬候補として抗アミロイド β ($A\beta$)抗体が開発されたが、期待された薬効が未だ発揮できていない。これは抗体が血液脳関門 (Blood-Brain-Barrier、以下 BBB) を容易に通過できないことが一因として考えられている。その解決手段の一つとして、トランスフェリン受容体 (TfR) やインスリン受容体 (IR) を標的とした受容体介在性エンドサイトーシス (Receptor-mediated endocytosis、以下 RME) による BBB 薬物輸送を狙った二重特異性抗体などの抗体医薬が開発されてきたが未だ承認・上市まで至っていない。このことは薬物の BBB 通過の達成にはこれら以外の受容体を標的とする BBB 薬物輸送法の開発が必要であることを示している。

終末糖化産物受容体 (Receptor for advanced glycation end products、以下 RAGE) は BBB 上に発現する一回膜貫通型の受容体で終末糖化産物をリガンドとし、そのリガンドの一つ $A\beta$ も結合することが明らかとなっている。RAGE は脳内 $A\beta$ 動態において血中から脳内への $A\beta$ 輸送に関与し、特に AD 患者で RAGE 発現が亢進していることより脳内 $A\beta$ の蓄積に関与するとされている。これらのことより RAGE が RME による BBB 薬物輸送を担える可能性があるのではと考えた。

そこで本研究では標的受容体としてこれまで活発に研究開発が行われてきた TfR や IR を介した RME による BBB 薬物輸送法ではなく、RAGE を介した RME による BBB 薬物輸送法を確立することを目的とした。平成30年度は薬剤に連結可能でかつ薬物の BBB 通過を可能にする BBB 透過モチーフ (RAGE に結合できる短鎖ペプチド、すなわち RAGE 結合性ペプチド) を探索するためのアッセイ系を構築した。

主任研究者

小関 弘恵知 国立長寿医療研究センター ラジオアイソトープ管理室 (流動研究員)

A. 研究目的

薬剤に連結可能でかつ薬物のBBB通過を可能にするBBB透過モチーフ (RAGE結合性ペプチド) を開発するためには、まずそのモチーフ配列を探索するためのアッセイ方法が必要となる。平成30年度は1) 組換えRAGEタンパク質の取得、2) RAGEに特異的に結合するBBB透過モチーフの探索及び同定、3) 同定した透過モチーフのBBB透過性評価、以上3つを研究目的として当該アッセイ方法の構築を目指した。

B. 研究方法

1) 組換えRAGEタンパク質の取得

(1) BBB透過モチーフの結合対象となるRAGEタンパク質ドメイン

ヒトRAGEの細胞外領域はリガンド結合部位であるV型ドメイン (Vドメイン) 1つとC型ドメイン (C1ドメイン、C2ドメイン) 2つで構成され、細胞外領域全長はV-C1-C2として表される。本研究では細胞外領域全長、Vドメイン、およびC1-C2ドメインの3種類に分け、各々をBBB透過モチーフが結合する標的ドメインとすることにした。

(2) 大腸菌用RAGE発現ベクターの設計

ヒトRAGEタンパク質を可溶性タンパク質として効率よく大腸菌で発現させるためのベクター設計を行った。具体的には、1) ヒトRAGE遺伝子配列を大腸菌用コドンに最適化する、2) ヒトRAGEタンパク質をGST融合タンパク質として発現させる、3) コールドショック発現系ベクター (pColdベクター、Takara) を使用する、である。またHisタグアフィニティー精製を行うため、Hisタグ付きRAGEタンパク質として発現できるようベクター設計を行った。

(3) 大腸菌用RAGE発現ベクターの作製

大腸菌用RAGE発現ベクターの作製を次の通り実施した。まず人工遺伝子合成 (外注) により大腸菌用コドンに最適化されたヒトRAGE遺伝子を取得した。その後上記 (1) および (2) を考慮してPCR等の遺伝子工学実験を行い、組換えヒトRAGEタンパク質 (GST融合タンパク質) を発現できる下記4種類の大腸菌用RAGE発現ベクターを作製した。

- GSTのみ：コントロールとして使用
- GST-RAGE (VC1C2)：ヒトRAGE細胞外ドメインの全領域 (V-C1-C2)
- GST-RAGE (V)：Vドメインのみ
- GST-RAGE (C1C2)：C1-C2ドメインのみ

(4) 組換えRAGEタンパク質の大腸菌発現と精製

組換えRAGEタンパク質の大腸菌発現と精製は次の通り実施した。まず上記(3)で作製した大腸菌用RAGE発現ベクターを1種類ずつ使用してタンパク質発現用大腸菌(BL21(DE3))を形質転換し、組換えヒトRAGEタンパク質を発現する大腸菌形質転換体を4種類作製した。次にこの形質転換体を用いてIPTG存在下15℃で大腸菌大量培養を行い、組換えヒトRAGEタンパク質が大量発現された菌体4種類を取得した。最後に得られた菌体4種類を用いてHisタグアフィニティー精製を実施した。

2) RAGEに特異的に結合するBBB透過モチーフの探索及び同定

(1) リボソームディスプレイ法

本研究では所属研究室にて開発された図1のような提示タンパク-RNAリボソーム複合体で構成されるリボソームディスプレイ法を実験で使用した(長寿医療研究開発費 課題番号28-23 平成29年度報告書を参照)。

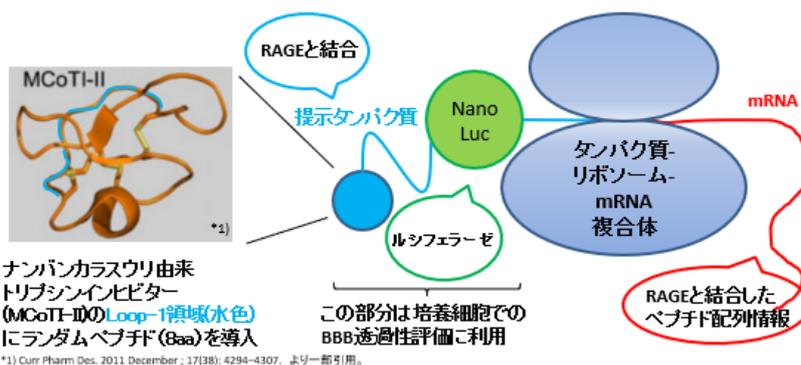


図1 実験に使用した提示タンパク-RNAリボソーム複合体の概要図

概要は次の通りとなる。探査子となる提示タンパク質にはナンバンカラスウリ由来トリプシンインヒビターであるMCoTI-IIを用いた。MCoTI-IIは34個のアミノ酸で構成される環状ペプチド分子であり、分子量は非常に小さいが分子内に3組のジスルフィド結合を有する。これらジスルフィド結合の存在により分子内環状ループ構造のペプチド部分の動的構造が制限され、標的タンパク質に対する結合性がより向上した結合性タンパク質(以下結合性ペプチドとする)が選別されることが期待できる。そこでこのMCoTI-II内にあるLoop 1と呼ばれるループ構造領域に8アミノ酸残基のランダムペプチド配列が含まれるようにランダムペプチドライブラリーを構築し、このライブラリーの中からヒトRAGEタンパク質に特異的に結合する結合性ペプチドを探索することとした。

また本研究の提示タンパク質には迅速なスクリーニングが可能になるようMCoTI-IIタンパク質のC末端側にレポータータンパク質としてNanoLucルシフェラーゼを融合させたものを使用した。

(2) リボソームディスプレイ法によるBBB透過モチーフの探索とその同定

下記の実験スキームに従い、リボソームディスプレイ法を実施した。

- 1 : DNAライブラリー (1 ラウンド目はランダムペプチドライブラリー) を用いて、提示タンパク質-RNAリボソーム複合体を無細胞タンパク質合成 (PUREfrex system、ジーンフロンティア) により *in vitro* 合成する。
- 2 : 提示タンパク質-RNAリボソーム複合体を免疫沈降法により精製する。
- 3 : 精製した提示タンパク質-RNAリボソーム複合体をRAGEタンパク質に結合させ免疫沈降法により補足する。
- 4 : 補足した複合体を洗浄する。
- 5 : RAGEタンパク質に結合した提示タンパク質-RNAリボソーム複合体からRNAを抽出する。その際pHの異なるBufferで連続的にRNA抽出操作を実施する。
※pH5.5のBuffer(トランスサイトーシス時のエンドソーム内pHで結合解離するペプチドを狙うための条件)で抽出を行い、次にpH7.5のBuffer(複合体を解離させるためのEDTAを含みRNA全抽出条件)で抽出を行う。
- 6 : 抽出したRNAからDNAライブラリーをRT-PCR合成する。

上記ステップ 1 ~ 6 を 1 ラウンドとし、このラウンドを複数回展開させることで目的のRAGE結合性ペプチドを探索することとした。同時に上記各ステップの実験条件について随時適切に最適化した。RAGE結合性ペプチド候補は最終的にDNAライブラリーとして取得した。

(3) BBB透過モチーフ候補のRAGE結合性評価

リボソームディスプレイ法の各ラウンドで得られたDNAライブラリーを用いて、無細胞系タンパク質合成 (PUREfrex) により提示タンパク質-NanoLucルシフェラーゼ融合体を合成した。この融合体をアナライトとし、Maxisorpプレート (Thermo Fisher Scientific) に固相化した組換えRAGEタンパク質 (GSTのみ、またはGST-RAGE(V)) に対する結合性評価 (Binding Assay) を行った。融合体の結合量は発光検出 (Nano-Glo Luciferase Assay, Promega) により定量化した。

3) 同定した透過モチーフのBBB透過性評価

組換え RAGE タンパク質への結合性が評価できた BBB 透過モチーフ候補は所属研究室にて開発したヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞を使用したトランスサイトーシスアッセイ法 (長寿医療研究開発費 課題番号 28-23 平成 29 年度報告書を参照) により、その BBB 透過性を評価する。

(倫理面への配慮)

本研究では該当するヒト試料は扱っていない。組換え DNA 実験は「遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律 (カルタヘナ法)」を遵守し、「国立研究開発法人 国立長寿医療研究センター 遺伝子組換え実験安全規定」に則り実施した。

C. 研究結果

1) 組換えRAGEタンパク質の取得

コールドショッカー大腸菌発現系により最終的に作製予定4種類のうち3種類の組換えRAGEタンパク質 (GSTのみ、GST-RAGE (VC1C2)、GST-RAGE (V)) を取得することができた。作製できたこれら組換えRAGEタンパク質はSDS-PAGEならびにウエスタンブロット解析により設計通りのものであることが確認された。残り1つの組換えRAGEタンパク質 (GST-RAGE (C1C2)) については大腸菌発現を検討した結果、目的のGST-RAGE (C1C2) 以外にその分解物と見られるものが確認され精製まで至らなかった。

2) RAGEに特異的に結合するBBB透過モチーフの探索及び同定

精製できたヒトRAGE組換えタンパク質GST-RAGE (V) を標的タンパク質としてリボソームディスプレイを実施した。この際、免疫沈降、複合体の洗浄Buffer組成、RNA抽出方法、及びRT-PCR条件と多岐にわたり実験条件の最適化に時間を割いた。最終的にリボソームディスプレイは3ラウンド実施し、ラウンド毎にDNAライブラリーを取得した。

次に取得できたDNAライブラリーから無細胞系タンパク質合成により提示タンパク質-NanoLucルシフェラーゼ融合体を合成し、その合成した融合体をアナライトとしてGSTのみ、ならびにGST-RAGE (V) に対する結合性評価 (Binding Assay) を行った。その際のBuffer条件として、リボソームディスプレイ実験時の条件 (Wash Buffer, 50mM Mg (OAc)₂, 400mM KClが特徴) または生理的条件 (PBS) にて結合性評価を行った。その結果どちらのBuffer条件でも概ねGSTのみへの結合よりもGST-RAGE (V) への結合が大きいたことが明らかとなり (図2)、本研究においてリボソームディスプレイ法によりヒトRAGE結合性ペプチドが得られた可能性が示唆された。

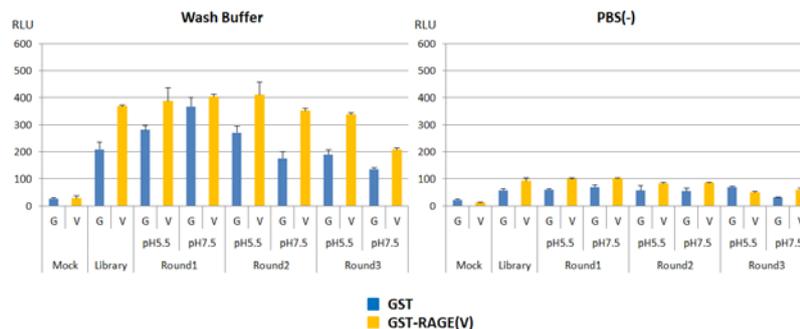


図2 結合性ペプチド候補のヒト RAGE に対する結合性評価

D. 考察と結論

本研究はRAGEを介したRMEによるBBB薬物輸送法を確立することを目的として開始し、今年度はリボソームディスプレイ法によるヒトRAGEに結合できる短鎖ペプチドが探索可能なアッセイ系を構築した。結合性評価の結果はヒトRAGEに対する結合性ペプチドが取得された可能性を示しており、MCoTI-IIを提示タンパクとしたリボソームディスプレイ法を実施することでヒトRAGEに対する結合性ペプチドを探索できる可能性が期待できた。特に今回の結果で、RNA抽出をpH5.5のBufferで実施したDNAライブラリー由来の提示タンパク質-NanoLucルシフェラーゼ融合体においてもヒトRAGEに対する結合性が示されたことにより、本研究にて構築したアッセイ法はヒトRAGEに結合しかつエンドソーム内で解離するような抗体医薬のトランスサイトーシスにとって有利な結合性ペプチド、すなわちBBB透過モチーフを探索できる可能性を示した点において意義があった。

一方でリボソームディスプレイ法の実験条件検討に時間を費やす必要が生じたため、A. 研究目的でも述べた「3) 同定した透過モチーフのBBB透過性評価」まで実施することができなかった。DNAライブラリーとして取得できたヒトRAGE結合性ペプチド候補は次世代シーケンス解析より得られるDNA塩基配列を基にアミノ酸配列の同定を行い、その同定したヒトRAGE結合性ペプチドを用いてBBB透過性評価を行う予定であった。その評価まで行うことができればBBB透過モチーフ候補をより強固に提示できた可能性が考えられる。そこまで辿り着くためにはより迅速にリボソームディスプレイ法を実施できるよう操作方法も含めた実験条件の更なる最適化や改善が必要と思われる。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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