

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06936

研究課題名(和文) 滑膜由来エキソソーム結合性人工抗体によるリウマチ治療薬基盤分子の創製

研究課題名(英文) Development of RA therapeutics binding to exosome derived from synovial cell

研究代表者

芝崎 誠司 (Shibasaki, Seiji)

兵庫医療大学・共通教育センター・准教授

研究者番号：50342530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、炎症性サイトカインや炎症性メディエーター分子が T 細胞分化に重要な機能を有していると考えられてきた。エキソソームに内包され、細胞外に分泌される miRNA が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。そこで本研究では Treg 分化抑制する分子の創製として、エキソソームに含まれる miRNA やタンパク質を認識して結合できる人工リガンド分子の創成を目指し、人工リガンド分子の取得に取り組んだ。マイクロタイタープレートを用いる手法により、抗原結合能を有する人工抗体クローンが複数取得された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチ(Rheumatoid arthritis:RA)は、正確な原因が不明な自己免疫疾患のひとつである。近年、抗体医薬の進歩に伴いRA患者の予後が改善されている。しかし、抗体医薬は、製造コストが薬価を高額にしており、感染症等の合併症で使用できないなど問題点がある。病原性T細胞分化に関わるmiRNAを含むエキソソームを阻害するタンパク質分子は、製造コストの優位性が考えられ、現在用いられているRA治療用抗体医薬の問題点を解決すると期待される。

研究成果の概要(英文)：To date, it has been thought that inflammatory cytokines and mediator molecules have important functions in T cell differentiation. It has been revealed that miRNAs, which are included in exosomes and secreted extracellularly, play an important role. In this study, we aimed to create an artificial ligand molecule capable of recognizing and binding to miRNAs and proteins contained in exosomes as the creation of a molecule that suppresses Treg differentiation, and worked on screening of an artificial ligand molecule. A plurality of artificial antibody clones having an antigen-binding ability were obtained by a method using a microtiter plate.

研究分野：生物学

キーワード：滑膜細胞 エキソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA) では、関節の内側に存在する滑膜組織に炎症を引き起こし、腫れや痛みとなり、それらが続くと関節の変形へと発展する。関節の炎症と骨破壊を引き起こす原因は完全に明らかにされていないが、遺伝に加えウイルスなどの刺激が重なり、自己に対する異常な免疫応答に起因するいわゆる自己免疫疾患であり、我が国では推定 80 万人が罹患している。RA の治療には、副作用の大きい非ステロイド性抗炎症薬や免疫抑制薬などの抗リウマチ薬に加え、近年では治療効果が高い炎症性サイトカインやその受容体を標的とした生物学的製剤が用いられている。しかしながら、経済的負担が大きな治療法である。さらに、分子量は 150 kDa (Ig の場合) と大きく、標的組織への送達、特に細胞内への移行が困難となっており、新しいプラットフォームによる創薬が必要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、低分子人工抗体として注目されている分子 Affibody は、可能性を検討した。Affibody 分子は *S. aureus* 由来 Protein A 分子に由来し、特定の分子に結合親和性を持つようになった変異体である。IgG に比較して分子量が 1/25 以下 (6kDa) であり、IgG を基盤とする抗体医薬のサイズに関する問題点を解消できる可能性がある。

これまでのリウマチ治療における抗体医薬は、IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインやそれらの受容体を標的としている。しかし、炎症性サイトカインには感染症において通常免疫反応誘導という生理機能において必要であり、異なる標的分子の制御による、これまでとは異なる作用機序に基づく、新たな抗体医薬が期待される。そこで、本研究では近年明らかになりつつある、病原性 T 細胞分化に関与が指摘されている、滑膜細胞由来のエキソソームを標的とし、この機能を阻害する抗体医薬の開発のため基盤分子の創製を目的とした。

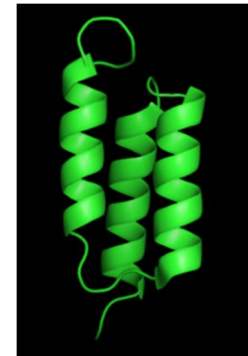


図 1 Affibody の立体構造

Treg から分化する exFoxp3 Th17 細胞は通常の Th17 細胞よりも強力に破骨細胞を誘導し、関節に集積する。このようなメカニズムにより、RA の増悪に強く関与すると考えられてきている。この Treg の分化にはエキソソームによって分泌される miRNA による転写制御因子 Fox の消失が示唆されているので、miRNA をターゲットにした新しい RA 治療薬の開発が考えられる。しかし、エキソソームには他にも miRNA を含む様々な分子が含まれており、miRNA 単独で分化制御していない可能性もある。そこで、研究代表者は、滑膜細胞から分泌されるエキソソームに特異的な抗原タンパク質を分離し、これに親和性を有する Affibody 分子を取得することで、Treg の exFoxp3 Th17 への分化抑制する基盤分子を生み出すことを目指した。

3. 研究の方法

(1) エキソソームの精製とエキソソームタンパク質の単離

滑膜細胞由来エキソソームの精製とタンパク質の単離については、ほとんどがエキソソームに内包されるタンパク質についてのものである。そこで、リウマチ患者由来滑膜培養細胞 (MH7A 細胞) に分泌されるエキソソームを単離し、膜画分に含まれるタンパク質を取得する。電気泳動・質量分析装置によりタンパク質を同定した。

(2) 抗原タンパク質の調製と Affibody のスクリーニング

抗原候補タンパク質をコードする His-tag ベクターを用いてクローニングし、大腸菌でタンパク質を産生させた。Ni カラム精製後の抗原タンパク質を Alexa488 を用いて蛍光標識し、これと結合能を有する Affibody クローンを、酵母表面提示ライブラリー (構築済み) を用いてスクリーニングする。抗原結合クローンの選抜にはフローサートメータを用いた。分取された酵母クローンよりプラスミド DNA を回収し、DNA シークエンサーを用いて、Affibody コード配列を解析した。

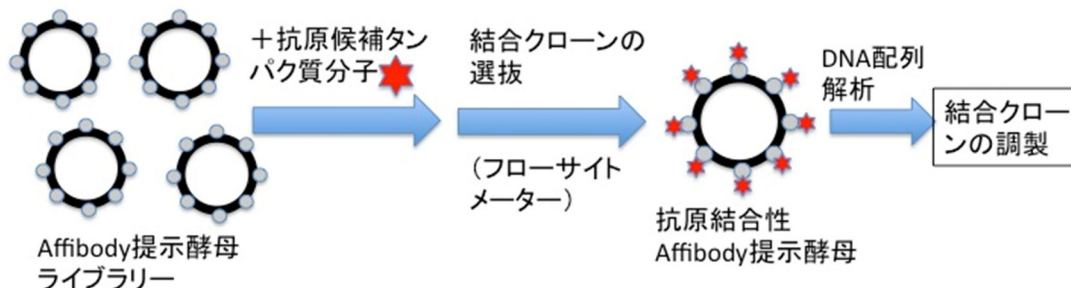


図 2 抗原分子結合能を有する Affibody 調製までの流れ

4. 研究成果

(1) エキソソームタンパク質の単離

研究期間前半において、滑膜培養細胞 (MH7A 細胞) に分泌されるエキソソームを単離し、膜画分のタンパク質の取得に取り組んだ。安定的に回収できるまでに予定計画期間を大幅に超える時間を要した。培養条件を検討する中で、培養スケールが 24well プレートであったが well 数を増やすよりも、6well プレートにスケールアップする方が効率よく回収することができ、さらに TNF- α 存在下、非存在下での差異が明確になった。そして、エキソソームから単離されたタンパク質のうち、抗原候補タンパク質 (クローンコード: AC1~6) の配列情報の解析を終了した。その後、これらのタンパク質のうち、AC1 タンパク質を AlexaFluor488 を用いて蛍光標識した。

(2) Affibody のスクリーニング

上記と並行して、Affibody 分子を細胞表層に提示する酵母ライブラリーの作成を進めた。当初、すでに保有・構築済みのライブラリーを使用する予定であったが、特定のクローンの偏りがあることが判明したため、同じ酵母宿主細胞を用いてライブラリーを再構築した。ライブラリー分子の均一化を確認後、この酵母表層提示ライブラリーを用いて、Alexa-AC1 タンパク質分子と結合を有する Affibody クローンのスクリーニングを開始した。フローサイトメーターによるスクリーニングを数回予備的に行なったが、プレートリーダーによる陽性クローンの増幅方法が確立されたため、途中からは、より簡便なマイクロタイタープレートを用いる本法により進めた。分取された酵母クローンよりプラスミド DNA を回収し、DNA シークエンサーを用いて、Affibody クローンのコード配列を解析した。その結果、抗原結合能を有する 3 クローン (ZAC111, ZAC122, ZAC131) が取得された。これらの Affibody タンパク質分子をエキソソームを含む上清と反応させ、さらに金コロイドで標識した二次抗体と反応させ、エキソソームの表面への結合評価能を免疫電子顕微鏡観察により開始した。さらに、残りの抗原候補タンパク質 5 種類 (AC2~6 タンパク質分子) の AlexaFluor488 蛍光標識を進め、さらなる抗原結合能を有する Affibody クローンスクリーニングの準備が整った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takamura Y, Aoki W, Satomura A, Shibasaki S, Ueda M.	4. 巻 13(8)
2. 論文標題 Small RNAs detected in exosomes derived from the MH7A synovial fibroblast cell line with TNF-stimulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0201851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0201851	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Seiji Shibasaki, Mitsuyoshi Ueda	4. 巻 1625
2. 論文標題 Preparation of an Oral Vaccine by Proteome Analysis and Molecular Display Technology	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 237-245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7104-6_16.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shibasaki S. Karasaki M. Aoki W. Ueda M. Iwasaki T.
2. 発表標題 A proteomic analysis of fibroblast-like synoviocyte treated with TNF-alpha
3. 学会等名 The 11th International Congress on Autoimmunity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Seiji Shibasaki, Mitsuyoshi Ueda
2. 発表標題 A developmental strategy of oral vaccines against candidiasis using molecular display technology and time course proteomics
3. 学会等名 27th ECCMID 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	岩崎 剛 (Iwasaki Tsuyoshi) (10151721)	兵庫医療大学・薬学部・教授 (34533)	