

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03516

研究課題名(和文)細胞膜表面の低分子抗体修飾による細胞製剤の標的指向化

研究課題名(英文) Targeted delivery of cell medicine by cell surface modification with low molecular weight antibody

研究代表者

樋口 ゆり子 (Higuchi, Yuriko)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：40402797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞は、抗炎症作用や免疫調節作用、多分化能を有するが、静脈内投与後比較的すみやかに体内から消失する。細胞治療においても、治療細胞を治療の標的部位への集積や、標的の細胞との相互作用の増強などの生体内動態制御が治療効果の向上に繋がると考えられる。本研究では、非天然アミノ酸の導入により低分子抗体を細胞膜上に配向性を揃えて修飾する方法を確立した。さらに、抗ICAM1 VHHの修飾により、間葉系幹細胞を炎症肝へ選択的に集積させることができた。本研究の成果は、間葉系幹細胞の組織選択的な炎症抑制効果を増大させるだけでなく、将来的には組織再生医療にも繋がることが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、VHH修飾により、特定の組織への間葉系幹細胞の集積に成功した。これにより、組織選択的な治療効果と他の臓器での副作用の軽減を得ると共に、治療に必要な間葉系幹細胞数を減らすことで提供された細胞の有効活用が可能になる。また、間葉系幹細胞は肝臓、神経、筋肉ほか様々な組織への分化能を有し、再生医療への利用が期待されているが、間葉系幹細胞を静脈内投与すると、体内からの消失が早く分化には至らない。本研究の成果により治療対象組織に間葉系幹細胞を生着させることができれば、分化を利用した組織再生医療に繋がると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells have anti-inflammatory, immunomodulatory, and multipotent differentiation potential, but disappear from the body relatively quickly after intravenous administration. In cell therapy, in vivo kinetic control of the therapeutic cells, such as accumulation of the cells at the target site of therapy and enhancement of their interaction with the target cells, may lead to improved therapeutic efficacy. In this study, we established a method to modify small molecule antibodies by introducing non-natural amino acids to align their orientation on the cell membrane. Furthermore, the modification of anti-ICAM1 VHH allowed the selective accumulation of mesenchymal stem cells to the inflamed liver. The results of this study are expected not only to increase the tissue-selective anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells, but also to lead to tissue regenerative medicine in the future.

研究分野：薬剤学、ドラッグデリバリー、生体医工学

キーワード：ドラッグデリバリー 間葉系幹細胞 低分子抗体

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は、多分化能を有し、その分泌物が抗炎症作用および免疫調整作用を示すことが知られている。さらに、他家移植しても免疫拒絶されにくいことが知られ、2015年に日本で初めて「テムセル注」が承認されて以降、現在3つの間葉系幹細胞の製剤が承認されている。これらの製剤は静脈内から点滴で投与され、細胞からの分泌物により治療効果が得られるとされている。一方で、投与された細胞の体内動態に関して、投与して24時間後には体内からほとんど消失してしまうことが知られている。これまで、低分子化合物だけでなく、タンパク質や核酸などの高分子化合物からなる医薬品に関して、Drug Delivery System (DDS) の概念に基づき、吸収促進、徐放化、標的指向化などの体内動態制御を可能にする手法が開発されてきた。細胞を使った治療法においては、細胞をシート状に培養して心臓や網膜などの組織に移植することで組織再生を効率よく行う手法が確立されてきた。しかしながら、間葉系幹細胞製剤のように血管内に細胞の分散液を注入する場合、生体内に投与された細胞の体内動態を制御する方法は確立されていない。薬物である細胞を治療の標的部位へ送達し、一定時間定着させ、組織選択的に作用させる細胞のDDSが確立できれば、間葉系幹細胞からの分泌物による治療効果の増強や、当初期待されていた多分化能を利用した再生医療への発展が期待できる。

治療細胞である間葉系幹細胞を治療の標的となる生体内の特定の箇所にデリバリーするためには、対象となる細胞との接着を増強する方法が必要である。例えば、生体内において白血球の細胞膜に発現する接着分子は、炎症組織の血管内皮細胞に高発現する接着分子と選択的に結合することで、炎症組織に集積し浸潤して抗炎症作用を発現する。このような生体内イベントを模倣し、「生体内に投与される細胞」に対してその細胞膜表面に人工的に設計されたリガンド分子を修飾し、標的となる特定の細胞と選択的に接着させる方法が有効であると考えられる。実際、遺伝子導入法により接着分子を高発現させた細胞を血管内に投与すると、炎症部位への集積を向上したことが報告されている(1)。PEG脂質を介した方法や、細胞膜タンパク質の官能基への化学修飾法は、より短い時間で、修飾量を制御できる点で有効であるが、修飾密度の最適化、リガンド分子の配向性の制御、修飾されたリガンドの安定性など、の問題が残されている。

そこで、本研究では、分子量が小さく細胞の表面に高密度に修飾できることが期待でき、抗体同様に抗原特異的な結合能を有する低分子抗体をリガンド分子として、細胞膜に人工的に修飾する方法を確立する。抗原特異的な結合能を維持しつつ細胞膜に導入し、リガンドとして機能させるためには、①細胞膜表面に導入すること、②低分子抗体-抗原結合を阻害しないような向き・位置で配向性を揃えて細胞膜上に導入することが必要である。そこで、低分子抗体に非天然アミノ酸を遺伝子工学的的手法による導入することで天然に存在しない官能基をピンポイントに導入することで結合箇所、配向性を制御する方法を確立する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、非天然アミノ酸を利用して低分子抗体の特定の部位で細胞膜上に結合し、血液中に投与された治療細胞を特定の組織へ集積させることである。

3. 研究の方法

(1) アジド基 (Az) またはテトラジン (tet) を導入した蛍光タンパク質または低分子抗体の発現・精製

ICAM1 に対する Variable domain of heavy chain of heavy chain antibody (VHH 抗体) 及び HN タグ配列を pColdIII ベクターに組み込んだ。このベクターの VHH 抗体と HN タグ配列の間にナンセンス変異を導入した。さらにこの発現ベクターのほか、先のナンセンス

変異に対応する UAG コドン翻訳する tRNA 及びこの tRNA にアジドフェニルアラニン (AzPhe) を導入するアミノアシル tRNA 合成酵素を同時に発現するプラスミドベクター pCDF / pAzAz で同時に大腸菌 (OrigamiB(DE3))の形質転換を行い、OD600 = 0.6 になるまで培養後、IPTG と AzPhe をそれぞれ最終濃度 1 mM になるように加えさらに 48 時間培養した。菌体を回収し破砕後、遠心分離により可溶性画分を回収しコバルトレジンをを用いて精製し Az-VHH を得た。上記と同様の方法で、pDule/Tet.v2.0 を利用して BL21 (DE3) を用いて mKO2 または抗 ICAM1-VHH ヘテトラジンフェニルアラニン (tetPhe) を導入した。

(2) 細胞培養

ヒト間葉系幹細胞 (UE7T-13 cells) は RIKEN Cell Bank から入手し、ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) は Kurabo より入手し、プロトコルに従って培養した。

(3) 細胞膜への蛍光タンパク質または低分子抗体の修飾

代謝標識によってアジド基を導入した MSC を Accutase : 0.25% trypsin EDTA = 1:1(v/v) 溶液で剥離し、DMEM-HEPES に分散させた。DBCO-PEG12-TCO と 37°C で 1 時間反応させた後、遠心分離により細胞を回収した。次に、DMEM-HEPES 中で tet-mKO2 または tet-VHH と 37°C で 1 時間反応させ、遠心分離により細胞を回収した。Tet の導入は、TCO 結合蛍光色素との反応、VHH の修飾は、蛍光標識した ICAM1 との反応により確認した。

(4) in vivo 体内動態の評価

6 週齢の雌の BALB/c マウスに D-galactosamine および LPS を腹腔内投与し、急性肝炎モデルとする。D-galactosamine および LPS を投与後、1~8 時間後に肝臓を摘出し、ウェスタンブロット法および免疫染色により ICAM1 の発現が誘導されていることを確認した。量子ドットで蛍光標識した MSC に抗 ICAM1-VHH 修飾し、マウスに尾静脈内投与し、一定時間後に摘出した肝臓の凍結切片の蛍光観察により肝臓における MSC の分布を評価した。また、蛍光標識しない MSC に抗 ICAM1-VHH 修飾し、マウスに尾静脈内投与し、一定時間後に摘出した肝臓を破砕して得られた mRNA に対して、AluYb8 の primer (forward: 5'-CGAGGCGGGTGGATCATGAGGT-3'、reverse: 5'-TCTGTCGCCAGGCCGGACT-3') を用いてゲノム PCR により肝臓に集積した細胞数を定量的に評価した。

4. 研究成果

細胞膜への VHH 修飾法の確立

間葉系幹細胞 (MSC) に、3 種類のアジド糖、GalNAz、ManNAz または GlcNAz を 0~0.04 mM 添加して 48 時間インキュベーションした後、DBCO-PEG-FAM を反応させて蛍光シグナルを測定したところ、蛍光強度は濃度依存的に増加した。また、ManNAz を添加した細胞は、他の 2 種類のアジド糖を添加した細胞と比べて、最も蛍光強度が高かった。0~0.08 mM の ManNAz を添加した細胞に対して、CCK アッセイおよび trypan blue 染色による生存細胞数の評価により細胞毒性を評価したところ、0~0.04 mM では細胞生存率ほぼ 100% であったが、0.08 mM では約 80%であった。以降の実験では 0.04 mM の ManNAz でアジド修飾を行うことにした。次に、アジド修飾 MSC に、リンカーである DBCO-PEG-TCO を 0~0.1 mM 添加して細胞表面に TCO を表出させた後、TCO とクリック反応する tetrazine 結合蛍光色素 Cy5 を過剰量反応させたがいずれの濃度においても蛍光強度はほぼ同じであった。そこで 0.01 mM の DBCO-PEG-TCO を反応させた MSC に tetrazine を導入した蛍光タンパク質 mKO2 (tet-mKO2) と反応させたところ、2 時間までの間では時間依存的に蛍光強度が増大し、0.01 mM までの濃度では tet-mKO2 の添加濃度依存的に蛍光強度が増大した。当初の計画から変更して、scFv より分子量が小さく凝集しにくい VHH を低分子抗体として選択し、anti-ICAM1-VHH に tet を導入した。これと TCO 修飾 MSC を反応させた後、蛍光標識 ICAM1 と反応させたところ未修飾 MSC と比較して強い蛍光シグナルが観察され、このシグナルは過剰量の ICAM1 で阻害された。以上より、細胞膜に VHH が修飾されていることが示された。

上述の方法では、代謝標識によりアジド基を表出させた MSC に PEG 鎖を介して VHH

を修飾させていたが、クリック反応を2回行う必要があるため、代謝標識によりアルキニル基を表出させた MSC に直接アジド基を導入したタンパク質を修飾する方法を確立した。アジド糖の代わりにアルキン糖を処置し、アジド蛍光色素との反応により MSC へのアルキニル基の導入を確認できた。さらに、アジド基を導入した蛍光タンパク質 mKO2 と反応により銅触媒を利用したクリック反応でタンパク質を細胞膜に修飾することも確認した。これらの一連の操作後の細胞生存率を評価したところ約 85%であった。しかしながら、細胞膜に表出させたアルキニル基とアジド導入蛍光タンパク質の反応効率は、前述の方法に劣るため、さらなる改善が必要である。

VHH 修飾による標的細胞との接着の増強

本研究では、VHH 修飾により間葉系幹細胞を炎症組織に集積させることを目的としている。まずは、炎症モデル血管内細胞を用いて *in vitro* で接着増強を評価した。炎症組織には ICAM1 が高発現するため、サイトカイン処理により ICAM1 の発現を増大させた血管内皮細胞 (HUVEC) を準備した。また、カルセイン AM で蛍光標識した間葉系幹細胞を HUVEC に接着させた後、細胞を破壊し蛍光色素量で細胞数を定量評価する系を確立した。炎症モデル HUVEC に、蛍光標識した間葉系幹細胞を添加してインキュベーションすると、VHH 修飾間葉系幹細胞の方が未修飾細胞と比較して接着した細胞数が多かった。さらに、その接着は、抗 ICAM1 抗体の前処理により抑制され、VHH の抗原認識により接着が増強することが確認できた。しかし、比較的短い時間でも VHH 未修飾細胞も HUVEC に接着した。そこで、マイクロ流路上に HUVEC を培養し数分間の流れ場の中で蛍光標識間葉系幹細胞を流し、蛍光タイムラプスイメージングで評価する実験系を確立した。その結果、VHH 修飾間葉系幹細胞を流した流路には未修飾細胞の流路と比較して HUVEC 上に多くの細胞が残存していた。以上の結果より、抗 ICAM1-VHH 修飾により、ICAM1 を高発現する血管内皮細胞への間葉系幹細胞の接着を増強できた。

VHH 修飾による間葉系幹細胞の炎症組織への集積

LPS および D ガラクトサミン投与による急性肝炎モデルマウスを作製した。LPS および D ガラクトサミン投与後に肝臓を摘出し、凍結切片の免疫染色およびウェスタンブロット法により正常マウスの肝臓と比較して ICAM1 の発現が増大していることを確認した。また、量子ドットで蛍光標識した VHH 修飾 MSC をマウスの尾静脈から投与し、摘出した肝臓の凍結切片を蛍光顕微鏡で観察すると量子ドットの蛍光シグナルにより体外から投与された MSC を検出できた。そこで、一定の面積内に存在する細胞の個数で比較したところ、正常なマウスの肝臓と比較して、急性肝炎モデルの肝臓に有意に多数の MSC が検出された。しかしながらこの方法は、肝臓内の分布の観察は可能であるが臓器内に分布する MSC の定量的な評価には限界がある。そこで、マウスにヒト由来の MSC を投与し、ヒトに固有の AluYb8 配列を PCR で定量する方法を確立した。正常マウスから摘出した肝臓のホモジナイズ液に異なる個数のヒト由来 MSC を加えて、qRT-PCR で定量して検出に必要な細胞数や定量方法を確立した。肝炎モデルマウスまたは正常マウスに VHH 修飾 MSC を尾静脈より投与し、1 または 8 時間後に肝臓を摘出し、AluYb8 配列を指標に qRT-PCR で定量評価した。1 時間後にはいずれのマウスの肝臓にも MSC の集積は認められなかったが、8 時間後においては、肝炎モデルマウスへの MSC の集積数は正常マウスと比較して有意に高かった。また、8 時間後の肝炎モデルマウスへの未修飾 MSC の集積量と比較して、抗体修飾 MSC の集積量は有意に高かった。8 時間後の血清中の ALT, AST を測定したが、有意な治療効果が認められなかった。現在、臨床では、MSC からの分泌物による治療効果を利用した治療が承認されているが、MSC は多分化能を有するため、線維化などの組織の機能不全に対する再生医療としての利用も期待されている。今回の結果より、VHH 修飾により MSC を目的の組織へ集積できることが示されたので、特定の組織に集積・生着させることで、分化誘導や組織再生など長期的な治療にも発展させることが可能になると期待できる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yuriko Higuchi, Yoshimasa Takafuji	4. 巻 141
2. 論文標題 Controlling Cell Dynamics by Cell-surface Modification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Yakugaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 661-665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.20-00219-6	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8件（うち招待講演 4件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 平田剛、國井朋佳、横田美咲、樋口ゆり子、山下富義
2. 発表標題 クリック反応を利用したタンパクの細胞膜表面への部位特異的な修飾
3. 学会等名 第15回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋口ゆり子
2. 発表標題 細胞治療を支える次世代医工学
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ○Saya Uneme, Tomohiko Morikawa, Hiromune Ando, Yuriko Higuchi, Fumiyoshi Yamashita
2. 発表標題 Enhanced Cellular Uptake of mK02 by Site Specific Chemical Conjugation of sialyl-Lewis X mimic via Click Reaction
3. 学会等名 The 3rd Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceutics (JKPW 2019)（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樋口ゆり子
2. 発表標題 細胞製剤の体内挙動とその制御
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樋口ゆり子
2. 発表標題 低分子抗体修飾による細胞間接着の向上
3. 学会等名 第23回次世代医工学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuriko Higuchi, Misaki Yokota, Mitsuru Hashida, Fumiyoshi Yamashita
2. 発表標題 Cell surface modification with azide-functionalized anti-mCherry VHH
3. 学会等名 第18回遺伝子・デリバリーシンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuriko Higuchi
2. 発表標題 Improvement cell-cell adhesion by cell surface modification with ligand molecule via PEG-lipid
3. 学会等名 Finland-Japan Workshop: The next generation medical engineering in biomaterials（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 樋口ゆり子
2. 発表標題 細胞膜表面への低分子抗体修飾による細胞間接着の改善
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会東北ブロック講演会（招待講演）
4. 発表年 2018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	山下 富義 (Yamashita Fumiyoshi) (30243041)	京都大学・薬学研究科・教授 (14301)	

	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
連携 研究者	坂本 健作 (Sakamoto Kensaku) (50240685)	国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤 センター・グループディレクター (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------