

令和 5 年 3 月 2 日現在

機関番号：32658

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22722

研究課題名（和文）ボツリヌス神経毒素を用いた神経細胞特異的な薬物送達システムの開発

研究課題名（英文）Botulinum neurotoxin-based drug delivery systems for targeting neurons

研究代表者

宮下 慎一郎（MIYASHITA, SHIN-ICHIRO）

東京農業大学・生物産業学部・助教

研究者番号：20883292

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内タンパク質を標的としたペプチドあるいは抗体製剤が開発されているが、標的細胞内への効果的な送達は未だに困難である。本研究では、細菌毒素であるボツリヌス神経毒素を利用して、神経細胞を標的とする新たな薬物送達システムの構築を目的とした。

本研究では、薬物キャリアーとして新たな無毒化 BoNT を作製し、無毒化 BoNT に連結された VHH 抗体が神経細胞内に送達されることを示した。さらに、培養細胞へのペプチド製剤の輸送とその効果について検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病に代表される神経変性疾患は高齢化社会における課題である。本研究では、神経細胞内の病原タンパク質の分解を目的として、無毒化したボツリヌス神経毒素（BoNT）を薬物キャリアーとした新規薬物送達システムの構築を行った。本研究において、B型 BoNT の受容体結合ドメインを含む新規の無毒化 BoNT を開発し、ペプチドあるいは抗体送達活性を検証した。本成果は、神経細胞変性を引き起こす病原タンパク質を標的とした新規治療法の開発に寄与すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Peptides and antibodies for targeting intracellular proteins have been developed. However, the effective delivery of it into the targeted cells remains challenging. Here, I have developed a detoxified-BoNT for targeted synaptotagmin-expressed neurons. The VHH fused to the new detoxified-BoNT was delivered into neurons with compatible efficacy with previously reported detoxified-BoNT for SV2-expressed cells. Furthermore, the degeneration efficacy of the peptides for aggregated proteins involved with Parkinson's disease was evaluated using the cultured cell model.

研究分野：細菌学

キーワード：ボツリヌス神経毒素 DDS ペプチド製剤 -シヌクレイン ボツリヌス中毒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ペプチドあるいは抗体などのタンパク質性医薬品を細胞内に効率よく送達することは困難である。一方、細菌が産生する毒素タンパク質は標的細胞へ特異的に結合し、その酵素活性ドメインを細胞質内に送達する。このことから、申請者は、無毒化した細菌毒素を薬物送達システム(DDS)のキャリアーとして利用できるのではないかと考えた。

ボツリヌス神経毒素 (BoNT) はボツリヌス菌が産生するタンパク質分解酵素であり、血清型によって A~G 型に分類される。BoNT は 3 つの機能的ドメイン (LC, H_N, および H_C) を持ち、標的である神経細胞において毒性を発現する (図 1)。受容体結合ドメイン (H_C) は神経細胞に存在する受容体に結合し、毒素が細胞内に取り込まれ、トランスロケーションドメイン(H_N) により LC が細胞質内に送達される。酵素活性を持つ LC は神経伝達物質の放出に必須である SNARE タンパク質を分解し神経伝達物質の放出を遮断する(ボツリヌス中毒)。LC は神経細胞内における半減期が長いため、神経麻痺が数力月から 1 年程度持続する。ボツリヌス中毒の治療は抗-BoNT 抗体が用いられるが、神経細胞内に既に侵入した毒素を中和することはできない。申請者は、先の研究で酵素活性を消去した「無毒化 BoNT」に抗体を連結することで、抗体が神経細胞内に送達され、先に侵入した LC を中和することを明らかにした。本システムはボツリヌス中毒発症後の治療法として利用できるだけでなく、神経細胞変性疾患の新規治療法の開発に貢献する画期的な成果である。しかし、無毒化 BoNT が送達可能なペプチドあるいはタンパク質の種類やサイズは不明であり、神経変性疾患治療に対して有効性を検証する必要がある。



図 1. ボツリヌス神経毒素の3ドメイン構造

2. 研究の目的

本研究では、神経変性疾患を引き起こす病原タンパク質を標的として、無毒化ボツリヌス毒素によるペプチド・抗体の神経細胞への送達効果を検証する。さらに、無毒化 BoNT の受容体結合ドメイン H_C を変更することにより新規薬物キャリアーを作製し、神経細胞特異的な非ウイルス型薬物送達システムの基盤構築を行うことを目的とした (図 2)。

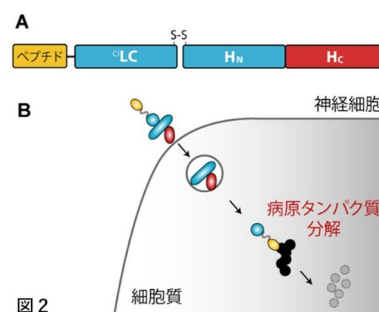


図 2

A. ペプチド-無毒化BoNTのデザイン
無毒化BoNTのN末端にペプチドを連結した
B. 病原タンパク質分解モデル
無毒化BoNTの受容体結合ドメイン H_C により神経細胞に結合し、ペプチドが細胞質に送達される

3. 研究の方法

(1) α -synuclein を標的としたペプチドを連結した無毒化 BoNT の発現・精製

パーキンソン病に關与する病原タンパク質である凝集体 α -synuclein を標的とした既報のペプチドを選択した。

ペプチドを無毒化 BoNT の N 末端に連結したコンストラクトを設計した。大腸菌による組換えタンパク質発現系を構築し、各種クロマトグラフィーにより精製した。

(2) 凝集体 α -synuclein 蓄積細胞モデル

市販キットに従い、 α -synuclein 遺伝子を含むプラスミドを培養細胞にトランスフェクションした。シードタンパク質を添加することで凝集体形成を引き起こした細胞モデルを構築した。

(3) ペプチド-無毒化 BoNT による α -synuclein の凝集抑制効果

凝集体 α -synuclein が蓄積した培養細胞にペプチド-無毒化 BoNT を添加し、凝集体形成への影響を蛍光顕微鏡により解析した。

(4) 新規無毒化 BoNT の設計および開発

B 型 BoNT の H_C を含む VHH-無毒化 BoNT (typeB) のコンストラクトを作製し、大腸菌を用いて組換えタンパク質を発現した。VHH-無毒化 BoNT (typeB) と既報の VHH-無毒化 BoNT (typeA: A 型 H_C を含む) の抗体送達活性をマウス DAS アッセイにより比較した。

4. 研究成果

(1) ニッケルアフィニティーおよびゲルろ過カラムにより、大腸菌培養液 1L あたりから約 2 mg のペプチド-無毒化 BoNT を高純度に精製した。還元剤存在下で、ペプチド-無毒化 BoNT はペプチド-LC と HN-HC に分離したことから、ジスルフィド結合が形成されていることが分かった。

(2) 市販キットに従い α -synuclein 遺伝子を含むプラスミドを培養細胞へトランスフェクションしたが、蛍光顕微鏡により α -synuclein を検出できなかった。この問題は、他のトランスフェクション試薬を用いることにより解決し、 α -synuclein が高発現し、シードタンパク質を添加した

ところ α -シヌクレインの凝集体が観察された。

(3) 凝集体 α -シヌクレイン培養細胞モデルに対しペプチド-無毒化 BoNT を添加し、凝集形成への影響を観察したところ、凝集体形成は抑制されず、その分解も促進されなかった。

(4) 本システムの薬物キャリアーである無毒化 BoNT は A 型 BoNT の受容体結合ドメイン Hc を含む (type A)。A 型 Hc は神経細胞の SV2 タンパク質、B 型 Hc はシナプトタグミンに結合するため、新たな VHH-無毒化 BoNT を組換えタンパク質として発現および精製を行った。プロトタイプの VHH-無毒化 BoNT (type B) の発現量は少なく不安定であることが推察された。そこで、GS リンカーを挿入したところ安定的な VHH-無毒化 BoNT (type B) を得ることに成功した。さらに、VHH-無毒化 BoNT (type B) の神経細胞内への VHH 抗体送達効果は type A と比較して同程度であった。

今後は、神経細胞変性を引き起こす病原タンパク質を標的としたペプチドあるいは抗体の細胞内送達を目指すと共に、タンパク質分解を促進するデグロンを無毒化 BoNT に付与しその効果を検証する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮下慎一郎、Jie Zhang、 Sicai Zhang、 相根義昌、 Charles B. Shoemaker、 Min Dong
2. 発表標題 キメラボツリヌス神経毒素を利用した薬物送達システムの開発
3. 学会等名 第67回トキシシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮下慎一郎、Jie Zhang、 Sicai Zhang、 相根義昌、 Charles B. Shoemaker、 Min Dong
2. 発表標題 ボツリヌス神経毒素を利用した神経細胞への抗体送達によるボツリヌス中毒の治療
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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		
米国	Boston Children's Hospital	Harvard Medical School	