

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300195

研究課題名(和文)細胞内在化機能を有する抗体を利用した安定かつ無毒性生体内イメージング技術

研究課題名(英文)Development of cell internalizing antibody as a safe and nontoxic imaging tool

研究代表者

Kaul Sunil (Kaul, Sunil)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・上級主任研究員

研究者番号：10356751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円、(間接経費) 4,170,000円

研究成果の概要(和文)：抗モータリン抗体の細胞内在化特性を診断や運搬に応用するために、抗モータリン抗体を複製し、機能を解析した。内在化能を持つ抗体と持たない抗体では、異なるエピトープを有していた。内在化の機序を複数の阻害剤で調べた結果、ニスタチンにより最も強く阻害されたことから、脂質ラフトを介するエンドサイトーシスの関与が示唆された。さらに、三つのラフト経路の阻害剤を用いて調べた結果、内在化はダイナミン阻害剤で強く阻害される一方で、カベオリン-1阻害剤とCDC42阻害剤には弱い効果を示した。これらにより、抗モータリン抗体の細胞内在化は、ダイナミンとカベオリンに依存性のエンドサイトーシスの関与が大きいと結論した。

研究成果の概要(英文)：In order to develop application of anti-mortalin antibody for diagnostics and delivery, we generated new antibodies and performed a characterization. We found that the cell internalizing and non-internalizing antibodies possess distinctly different epitopes. Mechanism of internalization was determined by adopting multiple inhibitor approach. We found that the antibody internalization was inhibited most strongly by Nystatin, implying that it involves lipid raft mediated endocytosis. We next used specific inhibitors of three raft pathways. The internalization was strongly inhibited by dynamin inhibitor. On the other hand, caveolin-1 inhibitor and CDC42 inhibitor showed weak effect. It was concluded that the internalization of new internalizing anti-mortalin antibodies is mostly mediated by Dynamin and Caveolin dependent endocytosis.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用システム

キーワード：検査・診断システム バイオイメージング 抗モータリン抗体

1. 研究開始当初の背景

幹細胞研究の発展に伴い、in vivoにおける幹細胞の系譜を追跡する必要性が高まっている。基礎研究においても臨床応用においても、幹細胞を簡便にかつ再現性良く標識する手法の開発が待たれている。近年、半導体ナノ粒子(量子ドット)が、これまで用いられてきた有機色素に代わる高品質な蛍光代替物として注目を集めている。量子ドットは物理的な大きさと蛍光波長の間に相関があるため、マルチカラーのバイオイメージングにも非常に適していると考えられる。一方で、当研究室でクローニングされたhsp70ファミリーに属するモータリンは、様々ながん由来の細胞や組織で強く発現しており、ヒトの腫瘍形成に関与している。機能解析のために作製した様々な抗モータリン抗体の中で、細胞内に内在化する性質を持つ抗体があることを発見した。我々は、その抗体と量子ドットを融合させることによって、細胞内在化量子ドットを作製し、その複合体が培養がん細胞で複数回の分裂を経た後でも観察できることを明らかにした。さらに、複数の量子ドットを用いて、長時間にわたり、正常な分裂を行うマルチカラーの細胞を得ることに成功した。細胞内在化抗体はナノ運搬体として非常に将来性があり、長期間の細胞レベルあるいは個体レベルでのマルチカラーイメージングに使用可能であることが明らかになった。このようなツールは、急速に発展してきているiPS、幹細胞、再生医療、がん診断の分野で非常に有用であると考えられる。

2. 研究の目的

これまで抗モータリン抗体が培養液に加えるだけで内在化する特徴的な現象を観察してきた。この特性を利用して細胞を簡便に標識する手法を開発し、一定の成功を収めている。しかし、モータリンを抗原とする全ての抗体が内在化の性質を示すわけではなく、特異性と抗体価が同じでも内在化しない抗体もある。このことから、内在化はモータリンの特定のエピトープに限られた現象だと考えられるため、分子レベルまで解明していく必要がある。本研究では細胞内在化の現象に潜む分子機構を詳細に調べて、基礎研究および臨床研究に有用なイメージングツールとしての発展を目指す。そのために、以下を目標とした。

- (1) 複数の抗モータリンモノクローナル抗体を作製し、細胞内在化機能をスクリーニングの基準の一つとして最良のハイブリドーマを選別
- (2) モータリン抗体の細胞内在化の分子機構の解明
- (3) 細胞レベルあるいは個体レベルにおけるイメージング試薬・プロトコルの開発

3. 研究の方法

- (1) 内在化効率の高いモータリン抗体を作製

する

- (2) 新規に作製したモータリン抗体のエピトープを同定する

① Hisタグ付き組み換えモータリンタンパク質を用いたエピトープ領域の決定

② ヒト培養細胞を用いたエピトープ領域の決定

③ RepliTopeマッピングを用いて単アミノ酸レベルまで決定

- (3) 単鎖抗体の抗原性と内在化能を検討する
エピトープ情報に基づき、大腸菌で発現する単鎖抗体を作製し、内在化能を評価

- (4) 量子ドット(イメージング)およびDNA(遺伝子導入)を目的とした運搬体の機能を確認する

当研究室で確立されている細胞内在化抗体とQdotsとの結合法を用い、各クローンとQdotsを結合させ、各クローンの結合率および内在化効率をがん細胞を用いた画像解析により検討

- (5) がん細胞、間葉幹細胞、iPS細胞を標識するプロトコルを確立する

細胞内在化効率および内在化する保持時間を検証

- (6) 下記の阻害剤を用いたアプローチにより抗体内在化の機能を解析する

① クロロプロマジン- クラスリン媒介のエンドサイトーシス阻害剤

② サイトカラシン- クラスリン媒介のエンドサイトーシス阻害剤

③ メチル化 β -サイクロデキストリン-カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤

④ ナイスタチン-脂質ラフト-カベオラエンドサイトーシス阻害剤

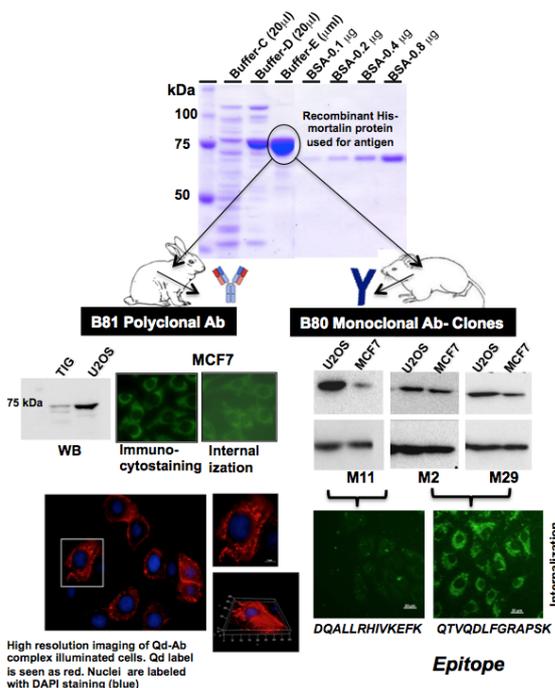
⑤ EIPA-マクロピノサイトーシス

4. 研究成果

まず、より内在化効率の高いモータリン抗体を得るために、モータリンに対する新しいポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作製した。Hisタグで標識化した組換えモータリンタンパク質をバクテリア内で発現させ、NTAアガロースを用いて精製した。タンパク質の純度は、SDSゲルにより確認し、単一バンドを有する高純度のタンパク質をウサギおよびマウスへの免疫に使用し、モータリンに対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の作製に成功した。これらの抗体のヒト細胞モータリンに対する反応性をウェスタンブロッティングおよび免疫染色により検討し、高い特異性を確認した。また、細胞内在化機能を検討したところ、新規に作製したポリクローナルおよびモノクローナル抗体には、過去に作製した細胞内在化抗体と同様、培養液に加えるだけで内在化する特徴的な機能を有する抗体があった。

次に、新規に作製した細胞内在化抗モータリン抗体のエピトープ解析を2つの方法により行った。V5タグモータリン欠損変異体を哺乳類細胞内で発現させ、細胞溶解液をモー

タリン抗体で免疫沈降した。これにより、抗モータリン抗体への結合に必須の80アミノ酸を同定した。さらに、バクテリアを用いてHisタグ付組換えモータリンの欠損変異体を作製し、NTAアガロースで精製した。標準化した精製条件により、SDSゲル上で単一バンドの高純度タンパク質を得た。Hisタグ付き組換え変異モータリンタンパク質を基質とし、新規抗体を用いてELISA解析を行い、AA（アミノ酸残基）246-330（領域I）及びAA375-415（領域II）の候補エピトープ領域を同定した。ここで、候補エピトープの1つに対する単鎖抗体を、バクテリア内で発現するHisタグ付き組換えタンパク質により得た。この単鎖抗体のモータリンタンパク質に対する反応性を、ウェスタンブロッティングにより調べた。この単鎖抗体は、モータリンタンパク質に対し高い反応性を有したが、細胞内在化能は優れていなかった。これらのデータから、ウサギあるいはマウスにおいて生成された従来型の抗体が、より高い細胞内在化能を持つという結論に至った。二つの領域の合成ペプチドを用いて、3つのクローンのエピトープを決定した。領域Iから71のペプチドを、領域IIから16のペプチドを合成した。各ペプチドは、開始AAを一残基ずつずらしてオーバーラップさせたもので、15AAよりなり、TECON HS400 ミクロアレイ・プロセッシング・ステーションによってELISAを行った。それにより、抗原抗体反応の親和性を定量的に測定した。その結果、モータリンのAA279-291に対応する13AAよりなるDQALLRHIVKEFK配列が、B80-M2とB80-M11クローンのエピトープであると結論した。B80-M29クローンはタンパク質のAA397-409に対応するQTVQDLFGRAPSKをエピトープとすることがわかった。



各抗体クローンにつき、ヒトがん細胞 (MCF7, MDA-MB231, A549, U2OS, IMR32 HT1080) を用いて、細胞への内在化能を調べた。抗体をがん細胞培養液中に添加し、6-24時間培養後、2次抗体で染色した。B80-M11は内在化能を示さず、B80-M2は弱い内在化能を示し、B80-M29は高い内在化能を示した。抗体の内在化能は細胞でのモータリンの発現に関連しており、MCF7とMDA-MB231細胞では、レトロウイルスの発現ベクターによるモータリンの発現が抗体の内在化能を増加させていることがわかった。組換えモータリンタンパク質あるいはペプチドとインキュベートした細胞では、抗体の内在化が多かった。がん細胞、間葉幹細胞、iPS細胞を用い、抗体にナノ粒子を結合させ、ナノ運搬体としての可能性を調べた。in vitroでもin vivoでも、これらの細胞では、長時間にわたりナノ粒子によるラベルが見られた。さらに、細胞への内在化は、ポリクローナル抗体よりモノクローナル抗体が良いことが観察された。内在化された抗体の細胞での保持時間は、時間経過観察を行った結果、3-5時間であった。

抗体の内在化のメカニズムについて、複数の阻害剤を用いて調べた。エンドサイトーシスの4種類の阻害剤、(1) クラスリンを介するもの、クロルプロマジンとサイトカラシンB、(2) カベオリ依存性のエンドサイトーシス阻害剤、メチル化β-サイクロデキストリン、(3) 脂質ラフト依存性のエンドサイトーシス阻害剤、ナイスタチン、(4) マクロピノサイトーシス阻害剤、EIPAを用いた。この実験により、抗体の内在化はナイスタチンによって最も強く阻害されることがわかったが、抗モータリン抗体の内在化には、クラスリンが関与する過程は無関係であり、脂質ラフトを介するエンドサイトーシスが関与することが示唆される。ラフトが関与する抗モータリン抗体の内在化につき、三つのラフト経路のさらに特異的な阻害剤を用いて調べた。それらは、①ダイナミンとカベオリンに依存性のもの、②ダイナミン依存性でカベオリン非依存性のもの、③ダイナミン非依存性かつCDC42依存性のもの、である。これにより、内在化はダイナミンの阻害剤、ダイノールで強く阻害されることがわかった。一方、カベオリン-1阻害剤、ダイゼインとCDC42阻害剤ML141は弱い効果を示した。これらにより、抗モータリン抗体の細胞への内在化には、ダイナミンとカベオリンに依存性のエンドサイトーシスの関与が大きいと結論した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- Gao, R., Singh, R., Kaul, Z., Kaul, S. C., and Wadhwa, R.. Targeting of DNA damage signaling pathway induced

- senescence and reduced migration of cancer cells. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 査読有, 2014(in press). DOI : 10.1093/gerona/glu019
2. Pietilä, M., Lehenkari, P., Kuvaja, P., M., Kaul, S. C., Wadhwa, R., and Uemura T.. Mortalin antibody-conjugated quantum dot transfer from human mesenchymal stromal cells to breast cancer cells requires cell-cell interaction. *Exp. Cell Res.* 査読有, 319, 2013, pp. 2770-2780. DOI:10.1016/j.yexcr.2013.07.023.
 3. Saxena, N., Katiyar, SP., Liu, Y., Grover, A., Sundar, D., Kaul, S. C., and Wadhwa, R.. Molecular interactions of Bcl-2 and Bcl-xL with mortalin: Identification and functional characterization. *Biosci. Rep.* 査読有, 33, 2013, pp. 797-806. DOI:10.1042/BSR20130034
 4. Grover, A., Priyandoko, D., Gao, R., Shandilya, A., Widodo, N., Bisaria, V. S., Kaul, S. C., Wadhwa, R., and Sundar, D.. Withanone binds to mortalin and abrogates mortalin-p53 complex: Computational and experimental evidence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 査読有, 44, 2012, pp. 496-504. DOI:10.1016/j.biocel.2011.11.021
 5. Deocaris, C. C., Lu, W. J., Kaul, S. C., and Wadhwa, R.. Druggability of mortalin for cancer and neuro-degenerative disorders. *Curr. Pharm. Des.* 査読有, 19, 2012, pp. 418-429. DOI:10.2174/1381612811306030418
- [学会発表] (計 17 件)
1. Wadhwa, R., Kaul, Z., Na, Y., Ryu, J., Yun, C-O., and Kaul, S.. Cell internalizing anti-mortalin antibodies for *in vitro* and *in vivo* imaging applications: mechanism. 日本組織培養学会第87回大会, 2014年5月29日, 星陵会館 (東京都)
 2. Wadhwa, R. Mortalin - an hsp70 stress chaperone in human carcinogenesis. Workshop on "Frontiers in Science & Technology", 2014年5月24-26日, シッキム (インド) .
 3. Wadhwa, R. Molecular link between cellular aging and carcinogenesis". 10th International Conference on Geriatric Care. 2013年11月16-17日, ニューデリー (インド) .
 4. Kaul S. C. Mortalin-based imaging reagents and technologies. BPPT-AIST Joint Symposium on Life Science and Technology Innovation, 2013年11月12-16日, ノボテルボゴール (インドネシア) .
 5. Wadhwa R. Mortalin in health and disease: Insights from cancer and brain derived cells. International Symposium on Neuroscience and XXXI Annual Conference of Indian Academy of Neurosciences, The National Academy of Sciences, 2013年10月25-27日, アラハバッド (インド) .
 6. Wadhwa, R. In vitro and in vivo approaches to investigate the role of mortalin in human carcinogenesis and neuronal differentiation. IBRO-APRC Associate School of Neuroscience. 2013年10月19-23日, バナラスヒンドゥー大学 (インド) .
 7. Kaul, S.C., Na, Y., Ryu, J., Yaguchi, T. and Wadhwa, R. Cell-internalizing anti-mortalin antibodies as imaging tools. 日本組織培養学会第86回大会, 2013年5月30日, 産業技術総合研究所 (茨城県) .
 8. Sugaya, H., Mishima, H., Li, M., Aoto, K., Yoshioka, T., Ogawa, T., Yaguchi, T., Gao, R., Kaul, S., and Wadhwa, R. Fate of bone marrow mesenchymal stem cells following the autologous transplantation into a rabbit osteonecrosis model. 日本組織培養学会第86回大会, 2013年5月30日, 産業技術総合研究所 (茨城県)
 9. Ryu, J., Na, Y., Yaguchi, T., Wadhwa, R., and Kaul S. Cell internalizing anti-mortalin antibodies as imaging tools. 日本組織培養学会第86回大会, 2013年5月30日, 産業技術総合研究所 (茨城県)
 10. Uemura, T., Yoshioka, T., Pietilae, M., Mishima, H., Long, X., Matsumoto, R., Kaul, S., and Wadhwa, R.. Long term labeling of mesenchymal stem cells by internalizing quantum dots conjugated with anti-mortalin antibody: application to cartilage regeneration and study of cancer cells/stem cells interaction. 日本組織培養学会第86回大会, 2013年5月30日, 産業技術総合研究所 (茨城県)
 11. Liu, Y., Saxena, N., Sundar, D., Wadhwa, R. and Kaul, S.C.. Functional characterization of Bcl-2/BclxL-mortalin complexes in human cancer cells. 日本組織培養学会第86回大会, 2013年5月30日, 産業技術総合研究所 (茨城県)
 12. Ryu, J., Yaguchi, T., Na, Y., Yun, Ch., Kaul, S.C. and Wadhwa, R. Non-mitochondrial mortalin promotes human tumorigenesis through activation of telomerase and hnRNP-K. 日本組織培養学会第86回大会, 2013年5月30日, 産業技術総合研究所 (茨城県)

13. Wadhwa, R and KAUL, S.C. Basic studies on how a stress protein ‘mortalin’ regulates old age cancers and brain disorders. International Conference on Geriatric Care 2012. 2013年10月13-14日, ベルガム (インド)
14. Yaguchi, T., Ryu, J., Wadhwa, R. and Kaul, S. C. New cell internalizing anti-mortalin antibodies for bio-imaging. 第6回ナノ・バイオメディカル学会大会, 2012年7月9-10日, 産業技術総合研究所 (茨城県) .
15. Wadhwa, R. and KAUL, S.C. Stress chaperone mortalin in mitochondrial functions and age-related neurodegeneration. 1st World Congress on Healthy Ageing 2012. 2012年3月19-22日, クアラルンプール (マレーシア)
16. Kaul, S. C. An internalizing antibody conjugated with quantum dot for *in vitro* and *in vivo* imaging. Invited Lecture in the Life Sciences Center, 2011年9月25日, マニパル (インド) .
17. Kaul, S. C. An internalizing antibody based generation of illuminating cells and their real time imaging *in vitro* and *in vivo*. 6th Biyani’ s International Conference 2011 (BIOCON-11) on Innovations In the Latest Healthcare Issues. 2011年9月20日, ジャイプール (インド)

[図書] (計1件)

Mortalin Biology: Life, Stress and Death (Eds: Sunil C Kaul & Renu Wadhwa) Springer, 2012

1章 Wadhwa, R., and Kaul, S. C.. Birth of mortalin: multiple names, niches and functions connecting stress, senescence and cancer. pp. 3-20.

2章 Deocaris, C. C., Kaul, S. C., and Wadhwa R.. Mortalin’ s Machinery. pp. 21-30

19章 Uemura, T., Nishi, M., Kaul, S. C., and Wadhwa, R.. Cell internalizing anti-mortalin antibody for generation of illuminating MSCs for long-term *in vitro* and *in vivo* tracking. pp. 295-305.

20章 Gao, R., Kaul, Z., Yaguchi, T., and Wadhwa, R.. Mortalin Staining Pattern as A Reporter for Cell Based Anti-Cancer Drug Screening. pp. 307-322.

21章 Kaul, Z., Wadhwa, R., and Kaul, S. C.. Cell Internalizing Anti-Mortalin Antibody as a Nanocarrier. pp. 323-335.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Kaul Sunil (KAUL, Sunil)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ
メディカル研究部門・上級研究員
研究者番号：10356751

(2) 研究分担者

Wadhwa Renu (WADHWA, Renu)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ
メディカル研究部門・研究グループ長
研究者番号：30371090