

機関番号：35307

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590102

研究課題名(和文)テトラスパニンCD81を標的とした新規リウマチ治療薬および診断薬の開発

研究課題名(英文)Development of novel antibody therapy targeting tetraspanin CD81

研究代表者

中西 徹(Nakanishi, Tohru)

就実大学・薬学部・教授

研究者番号：30243463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：テトラスパニンCD81の細胞外領域を大腸菌で効率的に組換えタンパクとして大量発現し、これを精製してマウスに免疫し、抗CD81モノクローナル抗体を樹立した。これらの抗体の中からCD81の機能を阻害するものを選別して、コラーゲン投与関節炎ラットに投与して抗体医薬品によるリウマチ治療のモデル実験を行った。またこれらの抗体の中から認識するエピトープの異なる抗体を選別してサンドイッチELISAによるCD81の定量システムを構築して実際に定量のための標準曲線を作成した。また、CD81siRNAをSW982細胞に導入して、シノビオリン発現や炎症性サイトカインの発現が抑制されることを示した。

研究成果の概要(英文)：Extracellular domain of CD81 was expressed in E.coli and immunized into mice. Monoclonal antibodies against CD81 were established from these mice, and antibody treatment of RA was performed by using CIA rat model. Furthermore, quantitative sandwich ELISA system was established by using recombinant CD81 and anti-CD81 antibodies. CD81siRNA introduced into SW982 cells reduced the expression of inflammatory cytokines and synoviolin.

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：テトラスパニン CD81 siRNA モノクローナル抗体 サンドイッチELISA 炎症性サイトカイン シノビオリン

1. 研究開始当初の背景

クラスター分化抗原 CD81 は TAPA-1 と呼ばれ、22-26kDa の 4 回膜貫通型分子テトラスパニンファミリーの一つである。我々は、以前より、リウマチ性疾患の原因因子や診断マーカーの探索研究を進めてきたが、ヒト型高密度 DNA チップを用いた変形性関節症 (OA) 滑膜細胞と関節リウマチ (RA) 滑膜細胞の遺伝子発現比較において、RA で発現亢進する遺伝子群の中にこの CD81 を見出した。そこで、ヒト滑膜由来滑膜肉腫細胞株である SW982 を用いて、抗体による CD81 の刺激に対するこの細胞の応答を、さらにヒト全ゲノム型 DNA チップを用いて解析したところ、RA における滑膜細胞の異常増殖を引き起こし、関節リウマチの原因遺伝子と考えられているシノビオリン遺伝子の発現がこの刺激で誘導されることがわかった。そこで、この分子を標的とした根絶的リウマチ治療薬開発の可能性について検討を進めた。その結果、コラーゲン投与リウマチモデル動物 (ラット) を用いた実験で、この CD81 分子の発現を関節に投与した siRNA で抑制すると、関節リウマチの症状が大幅に改善され、さらにシノビオリンの発現も抑制されるという画期的成果を得るに至った。

2. 研究の目的

我々は上述のように滑膜様細胞においてシノビオリンの発現を直接促進する可能性のある因子として CD81 を同定し、この分子を標的とした根絶的リウマチ治療薬開発の可能性について検討を進めた結果、この分子の発現を siRNA で抑制するとリウマチの症状が大幅に改善されるという発見に至った。従って、この炎症の発症と強く関連する CD81 を標的とする創薬が、シノビオリン発現の抑制と炎症性応答の抑制という二重の作用で、現在、対照療法に終始しているリウマチ性疾患の究極の治療薬になる可能性がある。そこで、今回、より詳細な CD81 のリウマチ発症における作用機序の解明と、CD81 を標的とする抗体医薬品の開発に着手したいと考えた。

3. 研究の方法

・ RA 病態惹起における CD81 の作用機序の解明を行う。SW982 細胞を用いて、シノビオリン発現誘導や炎症性サイトカイン産生誘導と CD81 発現の関連について調べる。具体的には、CD81siRNA を使用して、これを SW982 細胞に導入し、CD81 の発現を抑制した時のシノビオリン発現の変化や炎症性サイトカイン等の発現変化を調べる。

・ CD81 分子の機能を阻害するモノクローナル抗体を樹立し、この抗体をリウマチモデル動物に投与してリウマチ治療薬開発のための基礎実験 (抗体治療実験) を行う。具体的に

は、まず CD81 分子の細胞外領域 LEL を大腸菌で組換えタンパク質として大量発現する。次に、この組換え LEL を精製して抗原とし、マウスに免疫して抗 CD81 モノクローナル抗体を樹立する。これらのモノクローナル抗体の中から、CD81 機能を阻害する抗体を選び出して、これを腹水化して抗体を大量に生産し、さらに精製して、リウマチモデル動物に投与することで治療効果を判定する。

・ 血中あるいは関節液中の CD81 分子をモノクローナル抗体で高感度に検出できる ELISA システムを樹立し、RA 早期診断のための診断薬を開発する。

4. 研究成果

(1)4回膜貫通型分子テトラスパニンCD81の細胞外領域のうち、長いループであるLELを大腸菌でGSTと融合した形で大量発現し、これを精製して抗原とし、マウスに免疫してCD81に対するモノクローナル抗体を作製した。これらの抗体について抗原に対する結合部位を決定したところ、1種のIgM抗体は抗原全体を認識したが、他のIgG抗体は一部のペプチドを認識していた。またこれらの抗体の機能について調べるため、炎症性サイトカインによって滑膜細胞を刺激した後のシノビオリン発現誘導応答をこれらの抗体が制御できるか調べた。その結果、これらの応答を抑制する抗体を見出した。さらに滑膜細胞を培養して培養系に抗体を添加したところ、滑膜細胞の増殖を抑制する抗体が存在した。代表的な抗体については腹水化による大量生産を行った。(2)アルブミン及びイムノグロブリンを除去した関節液に対して、今回樹立した抗CD81抗体を用いたウェスタンブロットを行った結果、CD81を含む数種のバンドが還元条件下でRA特異的に見いだされた。これらはCD81とその分解物であると考えられた(3)(1)で明らかとなった、CD81上の認識エピトープが異なるモノクローナル抗体IgGとIgMを2つ組み合わせでサンドイッチELISAの系の構築が可能か検討した。その結果、(1)で作製した組換えLELを標準抗原として測定を行うと、抗原濃度依存的に基質の発光量が増大して、標準曲線を作成することが可能であった。しかし、今回の実験ではまだ測定可能濃度範囲が狭く、また測定限界もng/mlのオーダーで、血中CD81測定によるリウマチ診断薬としてこの系を開発して行くためにはさらなる感度の改良が必要と思われた。(4)上記で得た阻害型抗CD81モノクローナル抗体をマウス腹水から大量調製して精製した。この抗体をコラーゲン誘導関節炎ラットに投与して抗体治療実験を実施した。(5)CD81の作用機序を調べるために、SW982細胞にCD81siRNAを導入してその作用、効果を調べた。その結果、CD81siRNAは、SW982

細胞への炎症性サイトカインの添加によって誘導されるシノビオリンの発現を抑制し、さらにCD81siRNAは、SW982細胞からの炎症性サイトカイン産生自身をも抑制することがわかった。この結果から、CD81は、炎症性サイトカインの添加によって誘導されるシノビオリンの発現を促進して滑膜細胞のアポトーシスを抑制し、さらに滑膜細胞自身からの炎症性サイトカインの産生そのものも促進して、このような二重の機構から関節リウマチの病態を促進するものと考えられた。従ってCD81機能の抑制は、これら2つの機構を全体的にブロックすることになり、CD81機能抑制型抗体による関節リウマチの治療は、根絶的かつ有望な新しいリウマチ治療の開発につながると思われる。

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)

1. Fujita H, Yamamoto M, Ogino T, Kobuchi H, Ohmoto N, Aoyama E, Oka T, Nakanishi T, Inoue K, Sasaki J. Necrotic and apoptotic cells serve as nuclei for calcification on osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. Cell Biochem Funct 32, 77-86, 2014
2. Fujimoto E, Mori H, Takehara M, Tanaka M, Ohashi T, Ninomiya Y, Nakanishi T. Establishment of a monoclonal antibody against CD81 that decreases the proliferation of rat glioma cells. J Hard Tissue Biol 23, 131-134, 2014
3. Hanada T, Fujimoto E, Mori H, Ohashi T, Ninomiya Y, Nakanishi T. Small interfering RNA targeting CD81 decreased the expression of tumor necrosis factor-alpha and synoviolin in SW982 cells. J Hard Tissue Biol 22, 195-200, 2013
4. Nakanishi T, Arai Y, Mori H, Nakajima T, Kubo T. Application of tetraspanin CD81 RNAi for diagnosis and therapy of rheumatoid arthritis (RA), Arthr Res Therap 14, 52, 2012
5. Fujita H, Kurokawa K, Ogino T, Ono M, Yamamoto M, Oka T, Nakanishi T, Kobayashi N, Tanaka N, Ogawa T, Suzaki E, Utsumi K, Sasaki J Effect of risedronate on osteoblast differentiation, expression of receptor activator of NF- B ligand and apoptosis in mesenchymal stem cells. Basic Clin Pharmacol Toxicol 109,78-84, 2011

〔雑誌論文〕(計 5件)

1. 中川周士、新井祐志、森宏樹、松下有美、久保俊一、中西 徹:テトラスパニン CD81 を標的とする新規リウマチ治療薬の開発 日本薬学会 平成 26 年 3 月 27 日-30 日 熊本
2. 中西 徹:テトラスパニン CD81 を標的とした新規関節リウマチ治療薬および診断薬の開発 バイオテクノロジー国際会議・国際バイオ EXPO 平成 23 年 6 月 29 日-7 月 1 日 東京

〔学会発表〕(計 2件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)準備中

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中西 徹 NAKANISHI Tohru

(就実大学・大学院医療薬学研究科・教授)

研究者番号：30243463

(2)研究分担者

渡辺雅彦 WATANABE Masahiko

(就実大学・大学院医療薬学研究科・教授)

研究者番号：00182949

新井祐志 ARAI Yuji

(京都府立医科大学・医学部
・講師)

研究者番号：50347449

長塚 仁 NAGATSUKA Hitoshi

(岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授)
研究者番号 : 70237535