

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：34533

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760653

研究課題名(和文)人工抗体のシグナル伝達阻害薬への応用

研究課題名(英文)Application of artificial antibody for an inhibitor against signal transduction

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) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：人工抗体として機能し得るAffibody分子スクリーニング系として、酵母PCA法を用いたタンパク質ライブラリーを構築した。これにより、細胞内における標的親和性クローンの取得方法が確立された。細胞内シグナル伝達系のタンパク質として重要なRasならびにRafを標的分子とし、これらのシグナル伝達機能を阻害するようなAffibodyクローンを選抜し、培養細胞内での機能評価を行なった。モデル疾患としてはRas/Rafシグナル伝達経路が関与するリウマチ(RA)を想定した。滑膜細胞や骨芽細胞内で、取得したAffibodyクローンの細胞増殖やサイトカイン産生への影響を評価した。

研究成果の概要(英文)：In this study, protein library using yeast PCA method has been developed for screening system of artificial antibody. Thus, the screening method of cytosolic target-affinity molecules was established. Important molecules of intracellular signal transduction cascade, Ras and Raf, were chosen as target molecules. Then, affinity molecules against these molecules were selected and evaluated in cytosol. As a model disease, rheumatoid arthritis which is involved in Ras/Raf signal transduction cascade. Under these conditions, selected affibody clones were evaluated on proliferation or cytokine-production using synovial and osteoblast cell lines.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：人工抗体 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

1990年代から、タンパク質工学を基盤とした抗体医薬(生物学的製剤)が次々と開発されている。国内外では多くの抗体医薬が認可され、現在も開発研究が活発に行われている。しかし抗体医薬には、ヒト型イムノグロブリン(Ig)を基本としているため、分子量は150kDaと大きく、標的組織への送達、特に細胞内への移行に問題がある。中には、10 μ g/mlと高い血中濃度を数ヶ月間維持しないと治療効果が現れないものもある。この問題を解決する方法として、次の二つの点が考えられる。(I)抗体医薬品の効果的な標的化と細胞内移行を可能とする新しいドラッグデリバリーシステムの開発、ならびに(II)抗体と同じ機能を持つ低分子抗体様医薬の探索、という手法である。抗体医薬品と同様、ドラッグデリバリーシステムを開発するには莫大なコストと労力が必要である。従って、(II)低分子抗体様医薬の開発が課題解決への近道であると考えられる。

近年、低分子人工抗体として注目されている分子にAffibodyがある。これは黄色ブドウ球菌 *S. aureus* 由来 Protein A 分子の Z-ドメインにコンビナトリアル変異を加え、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 を基本骨格とする抗体医薬の分子サイズに関する問題点を解決できる。また、ヒト以外の生物種由来のタンパク質が基本構造となっているが、免疫原性がないというメリットも併せ持っている。

2. 研究の目的

近年、細胞内において標的タンパク質に結合する分子の相互作用を解析する方法が、新薬の探索に応用されはじめている。一例として、酵母ツーハイブリッド法(Y2H)や、蛍光エネルギー移動を利用する手法などがあるが、注目を集めているものの一つにPCA(Protein-fragment Complementation Assay)法がある。本手法ではまず、生理活性を有するタンパク質を、2つの断片に分解する。各々を2つの異なるタンパク質に融合して、これらが相互作用した場合、元のタンパク質が再構成され、活性が回復することを利用している。Y2Hと比較し、利用できる細胞に制限が少ないという利点を持つ。研究代表者はこれまで、酵母 *S. cerevisiae* を宿主とし、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)の再構成を指標としたPCAシステムの構築に取組んできた。本課題では、この酵母PCA法を発展させ、細胞内標的分子の機能を阻害できるAffibodyのスクリーニングを目的としている。

まず、Gタンパク質共役型受容体などの下流でシグナル伝達系に関与しているRasならびにRafを標的タンパク質とし、抗体機能を有するAffibodyクローンの取得方法の確立

を目指した。本課題でモデル疾患とするリウマチ(RA)の治療は近年、抗体医薬の開発により劇的に進歩している。しかし、中和抗体によるアレルギー反応、治療抵抗性などの課題がある。細胞内シグナル伝達を阻害する人工抗体は、中和抗体によるこれらの課題を解決できる可能性がある新規治療薬となり、RA患者の生命予後、QOLのさらなる改善が期待できる。そこで、細胞内においてRasまたはRafに特異的結合能を持つ分子を取得し、病因タンパク質分子をターゲットとした汎用性の高い人工抗体探索システムの構築を目指した。最終的には、取得した抗Rasならびに抗Raf-Affibodyによる培養細胞内での効果の検討を目的とする。

3. 研究の方法

(1)クローンの標的親和性、特異性の向上
酵母PCA系を用いた既存クローンの標的親和性と選択性の向上を目指し、既に実証済みの方法の確認として、酵母PCA法において阻害剤添加培地における増殖速度を指標にDHFRの形成について検討を加えた。

Affibodyライブラリーの作製には、3つのヘリックス領域のうち2つにPCRを用いてランダムな変異を導入した。ライブラリー細胞集団を蛍光色素により標識したTMPの細胞内保持量を指標にフローサイトメーターを用いて陽性クローンを分取・解析した。

(2)Affibody遺伝子発現システムの構築
培養細胞発現用ベクターpcDNA3.1を用いて、現有のAffibody分子、Affi_{ras}ならびにAffi_{raf}をコードする遺伝子配列をクローン化し、ヒト滑膜細胞MH7Aに導入した。これらの遺伝子の導入に先立ち、緑色蛍光タンパク質をコントロールとした、遺伝子導入条件の最適化を進めた。

(3)滑膜細胞の増殖・炎症性サイトカイン産生への影響

滑膜における人工抗体Affibodyの効果を検討するために、滑膜細胞株(MH7A)を使用した。滑膜培養細胞にAffibodyタンパク質を発現するプラスミドをリポエフェクション法により導入し、細胞内に人工抗体を発現させた。リウマチで増加するサイトカインTNF- α 存在下での細胞増殖能をMTTアッセイにて評価した。炎症性サイトカイン・メディエーター産生を培養上清中のIL-6、PGE₂、MMP-3をELISA法にて測定し、滑膜細胞における人工抗体の効果を検討した。

(4)骨芽細胞の増殖・分化への影響

骨芽細胞の分化には、BMP-smadシグナルの他、Ras-Raf-MAP-kinaseカスケードシグナルが関与していることが明らかになっている。人工抗体によるRas-Raf-MAP-kinaseカスケード阻害により、滑膜細胞の増殖や炎症性サイトカイン産生が抑制できても、これによ

り骨新生に重要な骨芽細胞の分化が抑制されれば治療薬として好ましくない。そこで、骨芽細胞における人工抗体の効果を検討するために、BMP-2 (Bone morphogenetic protein-2) 刺激で骨芽細胞へ分化するマウス由来の C2C12 細胞を用いて、Affibody の影響を解析した。(3)と同様に C2C12 細胞株に Affibody を導入し、Ras-Raf- MAP-kinase カスケードシグナルの阻害による骨芽細胞分化への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) クローンの標的親和性、特異性の向上
増殖速度を指標にした Affibody ライブラリーのスクリーニングが完了した。ランダム変異を導入後、ライブラリー細胞集団から取得した陽性クローンを解析したところ、オリジナルのクローンと比較し、1.2 倍~1.5 倍の標的親和性を示すクローンが取得された。

(2) Affibody 遺伝子発現システムの構築
pcDNA3.1 を用いて、現有の Affibody 分子、Affi_{ras} ならびに Affi_{raf} をコードする遺伝子配列がクローン化され、ヒト滑膜細胞 MH7A に導入された。緑色蛍光タンパク質をコントロールとした、遺伝子導入条件が最適化された。

(3) 滑膜細胞の増殖炎症性サイトカイン産生への影響

TNF- α 存在下での細胞増殖能を評価したところ、ほとんど全てのクローンで増殖抑制することが明らかとなった。また、培養上清中の IL-6、PGE₂、MMP-3 の産生能もそれぞれが抑制 (10~20%程度) されることが明らかとなり、細胞内における、シグナル伝達系分子の阻害効果が示唆された。また、各クローンをコードするプラスミドを用いたトランスフェクション、TNF- α 添加後 1 日で抑制効果が現れた。

(4) 骨芽細胞の増殖・分化への影響

BMP-2 刺激後、マウス由来 C2C12 細胞を用いて、Affibody の影響を解析したところ、各クローンで 10~15%程度の細胞増殖抑制があることが確認された。とくに、クローン Affi_{raf} においては顕著な抑制効果が確認された。

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6件)

Shibasaki S, Aoki W, Nomura T, Karasaki M, Sewaki T, Ueda M. Evaluation of Mdh1 Protein as an Antigenic Candidate for a Vaccine against Candidiasis. *Biocontrol Sci.* 2014, 19(1):51 査読有

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bio/19/1/19_51/_article

Shibasaki S, Aoki W, Nomura T, Miyoshi A, Tafuku S, Sewaki T, Ueda M. An oral vaccine against candidiasis generated by a yeast molecular display system. *Pathog Dis.* 69(3), 262, 2013 年 12 月、査読有
doi: 10.1111/2049-632X.12068.

Shibasaki S, Aoki W, Ueda M. Biochemical Analysis and Application of Molecular Display Technology on *Candida albicans* for Diagnosing and Preventing Candidiasis. *Yakugaku Zasshi* 133, 1145, 2013 年 11 月、査読有
http://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/133/11/133_13-00212-1/_article

Iwasaki T, Shibasaki S. Hepatocyte growth factor regulates immune reactions caused by transplantation and autoimmune diseases. *Yakugaku Zasshi* 133, 1159, 2013 年 11 月、査読有、

http://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/133/11/133_13-00212-3/_article

Aoki W, Kitahara N, Fujita A, Shibasaki S, Morisaka H, Kuroda K, Ueda M. Detection of *Candida albicans* by using a designed fluorescence-quenched peptide. *J Biosci Bioeng.* 116(5), pp. 573 2013 年 11 月、査読有

doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.05.003.

Shibasaki S, Fujita A, Usui C, Watanabe S, Kitano S, Sano H, Iwasaki T. Effect of transient expression of fluorescent protein probes in synovial and myoblast cell lines. *Springerplus* 1(1), pp. 36 2012 年 12 月、査読有

DOI: 10.1186/2193-1801-1-36

[学会発表](計7件)

芝崎誠司、関口昌弘、北野幸恵、岩崎剛、佐野統、人工抗体 Affibody による炎症性メディエーター産生の制御、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都)、2014 年 4 月 25 日

芝崎誠司、唐崎美樹、関口昌弘、渡辺沙知子、岩崎剛、佐野統、人工抗体 Affibody による細胞内シグナル伝達系と炎症性メディエーター産生の制御、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸国際展示場(神戸市)、2013 年 12 月 5 日

白井千裕、唐崎美樹、関口昌弘、北野幸恵、佐野統、岩崎剛、芝崎誠司、抗 Ras 人工抗体 Affibody の取得と細胞内シグナル伝達経路の阻害、日本薬学会第 133 年会、パシフィコ横浜(横浜市)、2013 年 3 月 29 日

芝崎誠司、青木航、植田充美、バイオディフェンス 免疫システム分子制御の新たな局面、日本薬学会第 133 年会、パシフィコ横浜(横浜市)、2013 年 3 月 29 日

渡辺沙知子、唐崎美樹、関口昌弘、北野幸恵、佐野統、岩崎剛、芝崎誠司、滑膜細胞

における分子標的薬ならびに人工抗体リガンドを用いたサイトカイン抑制効果、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場（福岡市）、2012 年 12 月 14 日

芝崎誠司、東岸任弘、第三世代抗体医薬開発を目指した先導的研究、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場（福岡市）、2012 年 12 月 14 日

Shibasaki S., Aoki W., Ueda M. Evaluation of proteases derived from *Candida albicans* using expression system in *Pichia pastoris*. Japan-Finland Biotechnology Symposium 2012、東北学院大学押川記念ホール（仙台市）、2012 年 6 月 6 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
該当無し

〔その他〕
該当無し

6. 研究組織

(1) 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