

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791013

研究課題名(和文)人工抗体を用いた滑膜増殖の制御

研究課題名(英文) Inhibitory effects of H-Ras/Raf-1-binding affibody molecules on synovial cell function

研究代表者

関口 昌弘 (Sekiguchi, Masahiro)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：50528958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Affibodyを用いた細胞内におけるシグナル伝達系タンパク質分子の制御を検討した。AffibodyはProtein Aを構成するドメインの一部に由来する分子である。ファージディスプレイ法を用いてH-RasあるいはRaf-1分子に対する人工抗体を作成してその効果を検討した。(1)プラスミドあるいはタンパクとしてこれらの人工抗体の細胞内への導入が可能であった。(2)細胞内への人工抗体導入により、細胞増殖能、IL-6、MMP-3、PG産生能が抑制された。(3)ウエスタンブロット解析からERK1/2のリン酸化抑制、MAP-kinaseカスケード抑制が確認できた。

研究成果の概要(英文)：Affibody molecules targeting H-Ras (Zras122,Zras220, and Zras521) or Raf-1 (Zraf322) were introduced into the MH7A synovial cell line using two delivery methods: transfection with plasmids encoding the affibody molecules or direct introduction of affibody protein using a cell-penetrating peptide reagent. Affibody molecules could inhibit IL-6 and PGE2 production in TNF- α -stimulated MH7A cells. The inhibitory effect was stronger when affibody molecules were delivered as proteins via a cell-penetrating peptide reagent than when plasmid-DNA encoding the affibody molecules was transfected into the cells. Plasmid-expressed Zras220 inhibited phosphorylation of ERK in TNF- α -stimulated MH7A cells. Protein-introduced Zraf322 inhibited the production of IL-6 and PGE2 and inhibited cell proliferation in MH7A cells. Affibody molecules specific for H-Ras and Raf-1 can affect intracellular signal transduction and inhibit cell proliferation and production of inflammatory mediators by synovial cells.

研究分野：膠原病アレルギー内科学

キーワード：人工抗体 Affibody

1. 研究の背景

近年、抗体医薬開発の進歩に伴い関節リウマチ (RA) 患者の予後が劇的に改善されつつある。しかし、免疫による抗体医薬は高分子ヒト型 IgG を基盤としており、標的組織への送達、特に細胞内への移行に問題がある。この問題を解決する方法として、抗体と同じ機能を持つ低分子抗体様医薬がある。低分子抗体医薬として注目されている分子に人工抗体 (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り、IgG に比較して分子量が 1/25 以下 (6 kDa) であり、IgG を基盤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。現在、膜タンパク質 HER2 をターゲットにした affibody は、スウェーデンのウプサラ大や王立工科大を中心としたグループによる乳癌の診断方法の開発や、人工抗体医薬としての臨床試験まで発展している。申請者の協力研究者らは、ファージ表面提示抗体ライブラリーを使って、細胞内シグナル伝達蛋白である Ras/Raf の両者に結合し、Ras/Raf 間シグナル伝達を阻害する人工抗体の作成に成功している。滑膜増殖には Ras/Raf 間シグナル伝達が重要な役割を担っており、Ras/Raf 両者に結合する人工抗体により、滑膜増殖を制御できる可能性がある。本研究では、低分子量 (6 kDa) 人工抗体により、細胞内シグナル伝達タンパク (Ras/Raf) を阻害し、滑膜増殖を制御する新規 RA 治療薬の開発を目指す。

2. 研究の目的

申請者の協力研究者らは、細胞内シグナル伝達蛋白である H-Ras と Raf-1 の両者に結合し、Ras/Raf 相互間シグナル伝達を阻害する人工抗体 ZRaf322 の作成に成功している。そして、ZRaf322 は H-Ras と Raf-1 の結合を完全に阻害できることを確認している。滑膜増殖において MAP-kinase カスケードが重要である。Ras/Raf 蛋白は MAP-kinase カスケードの上流に位置し、人工抗体 ZRaf322 が MAP-kinase カスケードのシグナル伝達を遮断できれば、滑膜細胞の増殖を抑制できる可能性がある。本研究では RA 患者滑膜細胞あるいは、滑膜細胞株 (MH7A) に Zraf322 に加えて、Zras122, Zras220, Zras521 プラスミドあるいはタンパクを導入し、滑膜細胞内に人工抗体を発現させ、その効果を検討した。

3. 研究の方法

本研究では人工抗体が滑膜細胞と骨芽細胞の増殖・分化に及ぼす効果を、1) ヒト滑膜細胞や滑膜細胞株 (MH7A)、2) 骨芽細胞に分化する筋芽細胞株 (C2C12) を用いて検討した。研究体制は、兵庫医科大学リウマチ科 (人工抗体の *in vitro*, *in vivo* の効果の解析)、兵庫医療大学薬学部 (人工抗体の提供、精製)、兵庫医科大学整形外科 (RA 患者滑膜の提供) の協力のもとで実施した。具体的な研究計画・方法

(1) 人工抗体の滑膜細胞の増殖、炎症性サイトカイン産生抑制効果

滑膜における人工抗体の効果を検討するために、RA 患者滑膜由来の滑膜細胞株 (MH7A) を使用した。

滑膜細胞培養系に人工抗体プラスミドを添加し、細胞内に人工抗体を発現さ

せ、細胞増殖能を MTT アッセイにて、炎症性サイトカイン・炎症性ケミカルメディエーターの産生を培養上清中の IL-6、PGE2、MMP-3 を ELISA 法にて測定し、その効果を検討した。

(2) 人工抗体の骨芽細胞の増殖・分化への影響

骨芽細胞における人工抗体の影響を検討するために、BMP-2 (Bone morphogenetic protein-2) 刺激で骨芽細胞へ分化するマウス由来の細胞株、C2C12 細胞を使用した。

C2C12 細胞の培養系に人工抗体プラスミドを添加し、人工抗体を細胞内に発現させ、Ras-Raf- MAP-kinase シグナルを阻害し、骨芽細胞分化への影響を検討した。

C2C12 細胞の培養系に人工抗体プラスミドを添加し、Runx2 の発現を RT-PCR 法にて測定し、C2C12 における破骨細胞分化誘導能に対する効果を検討する。

4 . 研究成果

(1) MH7A へのプラスミッド DNA 導入効率 :

コントロールプラスミッド pcDNA3.1(+), 蛍光色素標識プラスミッド (pcDNA-AGF (AcGFP), pcDNA-DRD (DsRed), and pcDNA-STB (mStrawberry)) を MH7A に遺伝子導入し、導入効率、細胞の生存率を確認した結果、高い導入効率と細胞生存率が確認できた (図 1) 。

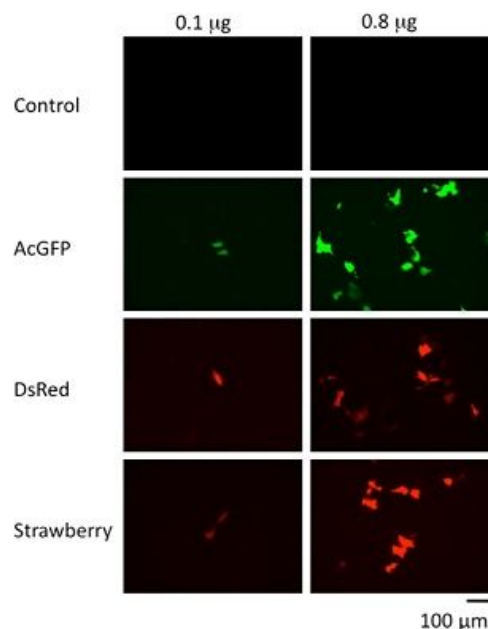


図 1

(2) 人工抗体プラスミッド遺伝子導入による MH7A の IL-6、プロスタグランジン産生における効果 :

TNF- 刺激 MH7A 細胞に人工抗プラスミッドを遺伝子導入した。その結果、コントロールプラスミッド導入に比べて、人工抗体導入により、有意に IL-6 およびプロスタグランジン産生が抑制された。

(3) 人工抗体タンパク導入による MH7A の IL-6、プロスタグランジン産生における効果 :

次に人工抗体タンパクを cell-penetrating peptide reagent. を用いて導入し、MH7A の IL-6、プロスタグランジン産生における効果を検討した。その結果、遺伝子導入と同様に抑制効果が認められた。

(4) 人工抗体プラスミッド遺伝子導入による MH7A の増殖能における効果 :

MTT アッセイを用いて MH7A 細胞の増殖

能を検討した結果、人工抗体プラスミッド導入による増殖能抑制効果は認められなかった。

(5) 人工抗体タンパク導入による MH7A の増殖能における効果：
次に人工抗体タンパクを cell-penetrating peptide reagent. を用いて導入し、MH7A の増殖能への効果を検討した結果、増殖能の抑制効果が認められた。

(6) 人工抗体の ERK1/2 のリン酸化への影響：
ウエスタンブロット解析により、人工抗体投与により ERK1/2 のリン酸化が抑制されることが明らかになり、MAP-kinase カスケードが抑制されることが確認できた。

(7) C2C12 細胞に対する人工抗体の効果：
人工抗体投与により C2C12 細胞の BMP-2 による Runx2 発現やオステオカルシン産生が抑制されることが明らかになった。

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)

[学会発表](計5件)

1. Masahiro Sekiguchi, Tsuyoshi Iwasaki, Seiji Shibasaki, Per-Åke Nygren, Torbjörn Gräslund, Hajime Sano. Affibody molecules inhibiting the interaction between Ras and Raf suppress the proliferation and the production of inflammatory mediators by synovial cells. European League

Against Rheumatism (EULAR) June13, 2014, Paris.

2. 芝崎誠司、関口昌弘、岩崎剛、佐野統 他。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学術集、2014.4.25 グランドプリンスホテル新高輪 東京。
3. 芝崎誠司、唐崎美樹、岩崎剛、関口昌弘、佐野統 他。人工抗体 Affibody による細胞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、2013.12.5 神戸国際会議場 神戸。
4. 芝崎誠司、唐崎美樹、岩崎剛、関口昌弘、佐野統 他。抗 Ras 人工抗体 Affibody の取得と細胞内シグナル伝達阻害、日本薬学会第 133 年会、2013.3.27 パシフィコ横浜 横浜
5. 渡邊沙知子、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ならびに人工抗体リガンドを用いたサイトカイン制御機構、第 35 回日本分子生物学会、2012.12.14 福岡国際会議場・マリムメッセ福岡 福岡

6. 研究組織

(1)研究代表者

関口 昌弘 (SEKIGUCHI, MASAHIRO)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：50528958

(2)研究協力者

岩崎 剛 (IWASAKI, TSUYOSHI)
兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：10151721

佐野 統 (SANO, HAJIME)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：00196304

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

