

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461713

研究課題名(和文) 非病原性天疱瘡抗体を用いた表皮特異的ドラッグデリバリーシステムの開発

研究課題名(英文) Development of the skin-targeted drug delivery system by using non-pathogenic pemphigus antibody

研究代表者

河野 通良 (Kouno, Michiyoshi)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：30403182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：TRAILは増殖する表皮細胞にアポトーシスを誘導し、活性化T細胞を抑制するため、炎症性皮膚疾患に対する治療効果が期待される。本研究は、天疱瘡患者からクローニングされた非病原性抗体Px44とTRAILを結合させた融合タンパクPx44TRAILを作製し組織特異的ドラッグデリバリーシステムによる治療モデルの開発を目的とした。Px44TRAILは活性化されたCD4陽性T細胞のIFN-g産生を抑制し、増殖する培養ヒト表皮細胞に細胞死を誘導し、分化した表皮細胞には影響を与えなかった。Px44TRAILの皮膚組織特異的ドラッグデリバリーシステムによる炎症性皮膚疾患治療の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：TRAIL is known to cause apoptosis of hyperproliferative keratinocytes and inhibit the effector function of activated lymphocytes. Since many skin diseases have these features, we developed a method of targeting TRAIL to the epidermis. Px44 is an anti-desmoglein (Dsg) non-pathogenic antibody (Ab) previously cloned from a pemphigus patient. We linked Px44 to TRAIL to produce Px44TRAIL fusion protein. Px44TRAIL inhibit IFN-g production of activated CD4+ T cells. When targeted to proliferating (in low Ca) cultured human keratinocytes, Px44TRAIL caused apoptosis of up to 50% of cells at 16 hrs, but did not cause apoptosis of differentiating (in high Ca) keratinocytes. Furthermore, soluble Dsg3 blocked the binding and pro-apoptotic activity of Px44TRAIL. AM3-13TRAIL (in which AM3-13 is an irrelevant Ab) was negative in these assays. These data show the feasibility of targeting TRAIL to skin lesions, and suggest such therapy may be useful for hyperproliferative and inflamed skin lesions.

研究分野：皮膚科学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム 抗体

1. 研究開始当初の背景

天疱瘡は表皮細胞間接着分子であるデスメグレイン (Dsg) に対する自己抗体により誘導される自己免疫疾患である。これまでに天疱瘡患者の B 細胞から自己抗体を構成する H 鎖、L 鎖をクローニングし、single-chain variable fragment (scFv) として発現させる系が構築され、多くの scFv 抗体がクローニングされてきた。これらの抗体のうち複数のクローンは、表皮細胞間に結合するが、細胞間接着を破壊せず、水疱形成も来さない非病原性抗体であった。この非病原性抗体のうちの一つ Px44 を green fluorescent protein (GFP) につなげた融合タンパクをマウスの皮下に注射すると、GFP の表皮細胞間への誘導が認められ、Px44 による表皮特異的ドラッグデリバリーシステムの開発が可能であると考えられた。

2. 研究の目的

TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は腫瘍細胞に特異的にアポトーシスを誘導する癌抑制分子として知られている。近年、種々の自己免疫疾患モデルマウスに対して、TRAIL が炎症細胞を抑制することによって治療効果を示すことが報告され、さらに、増殖している表皮細胞に対してのみ、選択的にアポトーシスを誘導することが報告された。炎症細胞浸潤と表皮の肥厚 (表皮細胞の増殖) は種々の炎症性皮膚疾患の病理における重要なファクターであり、これらを抑制する TRAIL は有効な治療薬になりうると考えられた。本研究では Px44 を TRAIL に結合した融合タンパク Px44TRAIL を作製し、皮膚に対するドラッグデリバリーシステムによる選択的治療モデルの開発を目的とした。

3. 研究の方法

Px44TRAIL が in vitro, in vivo で表皮細胞に結合するかを調べた。また、増殖する培養条件でヒト表皮細胞にアポトーシスを誘導できるかを調べた。陰性コントロールとして表皮に結合しない非特異的 scFv 抗体 AM3-13 を TRAIL と結合した融合タンパク (AM3-13TRAIL) を作製し、Px44TRAIL の治療効果と比較することにより、抗 Dsg 抗体を用いた表皮特異的な誘導の優位性を調べた。TRAIL は 3 量体を形成した状態で生物活性を有し、室温下では活性のある 3 量体を長く維持できないことが知られている。バクテリオファージ由来の Foldon 配列は融合タンパクの 3 量体維持を促すことが知られており、TRAIL にこの Foldon 配列をつなげた融合タンパクを作製し、3 量体の安定化を調べた。近年、Dsg3 が口腔扁平上皮癌 (OSCC) において高発現していることから、診断、治療における有用なバイオマーカーとして注目され始めている。そこで、Px44TRAIL を 6 名の口腔癌患者の原発巣および転移リンパ節巣から樹立された OSCC に加えて、in vitro での

治療効果を検討した。

4. 研究成果

Px44TRAIL と AM3-13TRAIL をヒト培養表皮細胞、マウス皮膚、マウスに移植したヒトの皮膚に加えたところ、Px44TRAIL のみ表皮細胞に結合した。

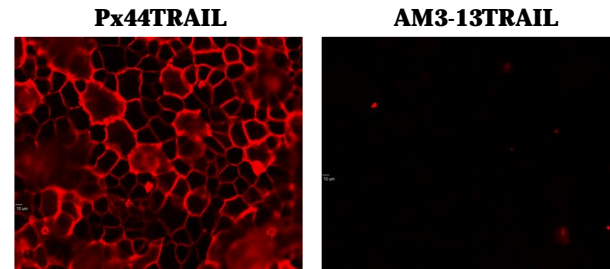


図 1 : ヒト培養表皮細胞に Px44TRAIL は結合したが (左) AM3-13TRAIL は結合しなかった (右)。

Px44TRAIL と AM3-13TRAIL を低 Ca 条件下で増殖しているヒト培養表皮細胞に加え、2 時間後に洗浄し、16 時間後にアポトーシスを調べたところ、Px44TRAIL のみ表皮細胞に結合し、アポトーシスを誘導することができた。さらにリコンビナント Dsg3 を競合的に加え、Px44TRAIL の結合を阻害するとアポトーシスは誘導されなかった。以上の結果から、Px44TRAIL は Dsg3 を標的として表皮細胞に結合し、選択的にアポトーシスを誘導できることがわかった。

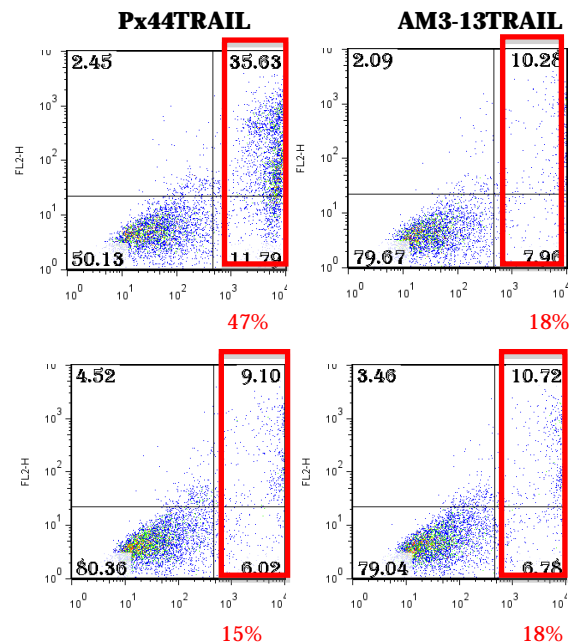


図 2 : Annexin V (横軸) PI (縦軸) で染色した FACS 解析結果
Px44TRAIL は増殖する培養表皮細胞に結合し、

アポトーシスを誘導するが(左上図)、陰性コントロールは AM3-13TRAIL は結合できず、アポトーシスも誘導しなかった(右上図)。リコンビナント Dsg3 を競合的に加えて Px44TRAIL の結合を阻害するとアポトーシスはおこらなかった(左下図)。

将来の治療応用を念頭に、生体内での TRAIL の活性を維持するため、Px44TRAIL に 3 量体維持配列 Foldon を結合させて新たな融合タンパク Px44-foldon-TRAIL を作製した。37 °C の条件下で 4-8 時間放置した後、アポトーシス誘導能を調べたところ、Px44TRAIL は活性を失ったが、Px44-Foldon-TRAIL は活性を維持することができた。

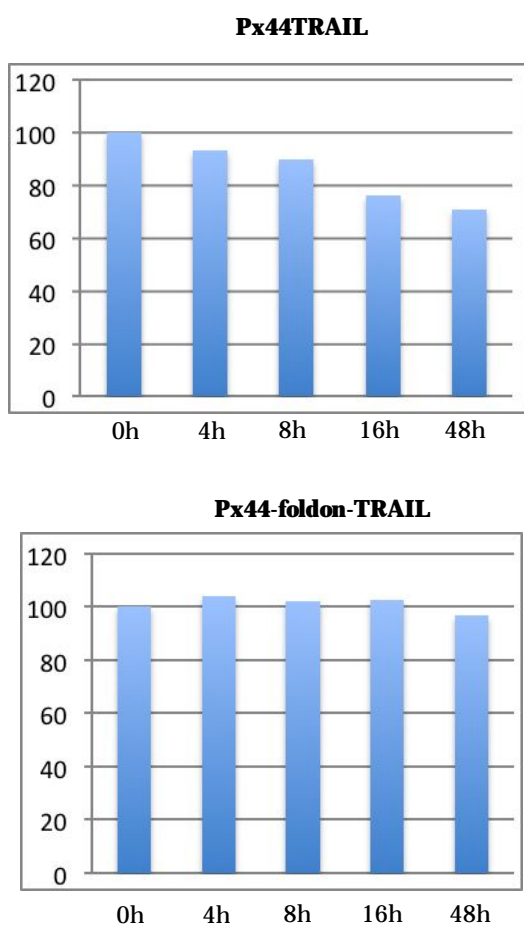


図3: Px44TRAIL(上図)と Px44-foldon-TRAIL(下図)を 37 °C の条件下で 4-8 時間放置した後、Jurkat 細胞に加え、アポトーシス誘導能を調べたところ、Px44TRAIL は活性を失ったが、Px44-Foldon-TRAIL は活性を維持することができた。

Px44TRAIL と陰性コントロール AM3-13TRAIL を OSCC 細胞に加え、2 時間後に洗浄し、16 時間後にアポトーシスを調べたところ、Px44TRAIL は OSCC 細胞に結合し、ア

ポトーシスを誘導することができた。陰性コントロールではアポトーシスはおこらなかった。6 名の口腔がん患者の原発巣、転移リンパ節巣から樹立された計 12 種類の OSCC 細胞に対して同様の実験を行ったところ、9 種類の細胞でアポトーシスが認められた。

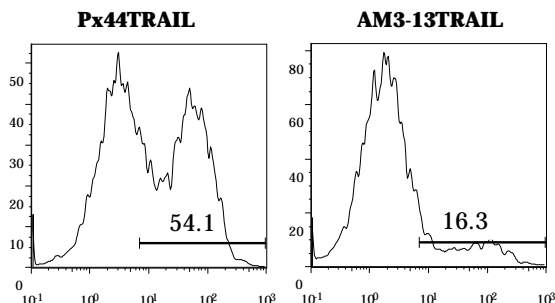


図4: Annexin V (横軸)で染色したFACS解析結果

Px44TRAIL (左図)と AM3-13TRAIL (右図)を OSCC 細胞に加え、2 時間後に洗浄し、16 時間後にアポトーシスを調べたところ、Px44TRAIL は OSCC 細胞に結合し、アポトーシスを誘導することができた。

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1件)

Kouno M, Lin C, Schechter NM, Siegel D, Yang X, Seykora JT, Stanley JR. Targeted Delivery of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand to Keratinocytes with a Pemphigus mAb. The Journal of Investigative Dermatology 133:2210-20,2013

〔学会発表〕(計2件)

M Kouno, N Schechter, JR Stanley: Oral cancer treatment by tumor antigen-targeted drug delivery system. Frontiers in Oral Medicine 2014、アメリカ合衆国、オーランド、2014年、4月10日。

三邊正樹、浮地賢一郎、野村武史、片倉 朗、高橋慎一、立川哲彦、河野通良: 組織特異抗体によるドラッグデリバリーシステムを用いた口腔癌治療モデルの開発。第60回日本口腔外科学会、総会、学術大会、名古屋市、2015年、10月17日。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

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

河野 通良 (KOUNO MICHİYOSHI)
東京歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：30403182

(2) 研究分担者

山上 淳 (YAMAGAMI JUN)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：80327618

(3) 連携研究者

なし