

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870581

研究課題名(和文) 新型イムノトキシンの開発と特定神経回路機能制御による霊長類高次脳機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of primate brain function regulating specific neural network by generation of new type immunotoxin

研究代表者

伊原 寛一郎 (Ihara, Kanichiro)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90551523

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)：ハイブリドーマ3クローンから抗体可変部位をクローニング、緑膿菌毒素との融合タンパク質を大腸菌で発現させることを試みた。発現系の改善や立体構造の改良などを経て、発現量を高める事には成功した。しかしながら、3クローンはいずれもmIL-2R に対する特異性が低いものであった。そこで抗体産生能力が高いウサギへ免疫し、ウサギモノクローナル抗体の配列取得を目指した。まず、ウサギへ免疫する抗原タンパクの取得を行った。抗原とするmIL-2R の細胞外ドメインは、当初は発現量が上がり、ほとんど収量が得られなかった。しかし、発現ベクターや培養系などの発現の条件を検討し、最適な条件を見いだした。

研究成果の概要(英文)：I cloned specific variable regions of antibodies from three hybridoma. In turn, I tried expression of variable regions and toxic region of Pseudomonas fusion protein in E. coli. Furthermore, improvement of expression conditions and modified conformation of proteins resulted in high yield. However, all three clones had low affinity for mouse interleukin 2 receptor alpha. I next tried to clone high affinity sequence for mouse interleukin 2 receptor alpha by generating rabbit monoclonal antibodies. Antigen protein, extracellular domain of mouse interleukin 2 receptor alpha was less expressed at first. Finally, I obtained antigen in high yield by investigating expression conditions.

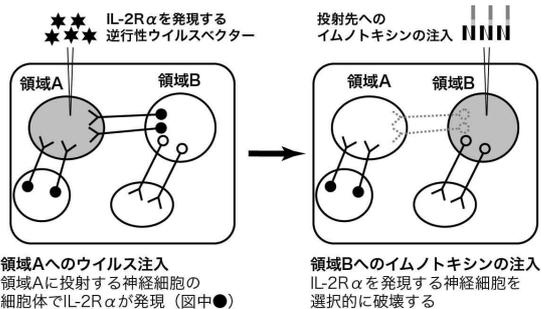
研究分野：遺伝子工学

キーワード：イムノトキシן 神経回路 脳機能 霊長類モデル

1. 研究開始当初の背景

複雑な神経回路を持つ脳において、その個々の経路の役割を明らかとすることは、脳機能解明のために重要である。これまでに、薬剤や電気刺激によって、特定の領域にある神経細胞を破壊する方法が取られてきた。しかしながら、多様な神経細胞種が隣接する脳領域においては、特定の神経細胞種のみを選択的に破壊することはできなかつた。これを解決するために開発されたのがイムノトキシン細胞標的法である。この方法はヒトインターロイキン2受容体サブユニット(hIL-2R)に対するモノクローナル抗体の可変部位に、緑膿菌体外毒素を結合した融合タンパク質毒素であり、hIL-2Rを発現する細胞に特異的に結合して細胞死を誘導する。

マウスにおいては特定の神経回路を破壊し、その機能を明らかとする手法が確立され研究が進んできた(下図)。一方で、霊長類における研究は遅れている。サルを始めとする霊長類は、げっ歯類と比べて高度な学習を行うことができるため、ヒトの脳機能を理解するためのモデル動物として欠かせない。しかしこれまで用いられてきたイムノトキシンはhIL-2Rに対するものであり、ヒトと配列の近いサルの内在性IL-2Rへ影響する可能性が示唆されてきた。そこで、ヒト・サルとは配列相同性が低いマウスIL-2R(mIL-2R)に対するイムノトキシンの開発が急務となっていた。



2. 研究の目的

背景で述べた通り、これまでのイムノトキシンは主にhIL-2Rを発現させたげっ歯類の神経細胞に対して用いられてきた。霊長類への適用も試みてこられたが、サルの場合ではhIL-2Rと配列相同性が高いため、内在性のIL-2Rへ干渉し、脳組織に損傷をきたす可能性が指摘されていた。

そこでまず、霊長類へのイムノトキシン細胞標的法の適用を目指し、霊長類とはアミノ酸配列を大きく異にするmIL-2Rに対する

モノクローナル抗体から可変部位コーディング領域をクローニングし、それを用いて新型のイムノトキシンを開発することを第一の目的とした。

次に、作製した新型イムノトキシンの、mIL-2Rに対する結合特異性を確認すること、マウスにおいて新型イムノトキシンがワークすることを確認した上で適切な注入条件を導き出すこと、そして霊長類に対して適用することで、霊長類における特定神経回路の行動機能に対する役割解明を、本研究の最終的な目的とした。

3. 研究の方法

本研究計画では、以下の4つのステップにて計画した。

- (1) 新型イムノトキシンの開発
- (2) 新型イムノトキシンの検定
- (3) mIL-2Rを発現する逆行性レンチウイルスベクターの開発
- (4) 生体内におけるイムノトキシンの活性の確認

(1) 新型イムノトキシンの開発

以下のステップにて、mIL-2Rを特異的に認識する抗体から配列を取得し、それを元にイムノトキシンを作製する。

a. 抗体可変部位をコードする塩基配列のクローニング:mIL-2Rを特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマを入手し、5'RACE法によって可変部位をコードする領域をクローニングする。

b. 大腸菌でのタンパク質発現・精製:大腸菌にて緑膿菌体外毒素との融合タンパク質を封入体として発現させ、グアニジン塩酸塩での可溶化、イオン交換カラムでの精製を経て、活性を持つイムノトキシンを得る。

(2) 新型イムノトキシンの検定

作製したイムノトキシンの、mIL-2Rへの特異性と細胞毒性について、以下のステップにて検定する。

a. mIL-2Rへの特異性の確認:ELISAにより、マイクロプレートに吸着させた可溶性IL-2R(マウス及びヒト)に対して精製したイムノトキシンを結合させ、mIL-2Rに対して特異性を持つか確認する。

b. イムノトキシンの細胞毒性の確認:mIL-2RあるいはhIL-2Rを発現する培養細胞の培養液中にイムノトキシンを添加し、mIL-2Rを発現する細胞への特異的な細胞死誘導を確認する。

(3) ウイルスベクターの開発

標的とする神経細胞にmIL-2Rを発現さ

せるための、逆行性レンチウイルスベクターを以下のステップにて作製する。

a. ウイルスベクターの作製：mIL-2R cDNA を持つプラスミドベクターから、両端に制限酵素サイトを付加したプライマーを用いてサブクローニングする。制限酵素の切り出しにより、トランスファープラスミドのマルチクローニングサイトへ mIL-2R の配列を組み込む。

b. ウイルスの作製・濃縮：培養細胞にてウイルスベクターを作製し、培養上清からベクターを精製する。HEK293T 細胞に作製したプラスミド(トランスファープラスミド)、エンベローププラスミド及びパッケージングプラスミドをトランスフェクションし、ウイルスを培養上清中に産生させる。回収した培養上清を遠心濃縮し、イオン交換クロマトカラムを用いて精製を行う。

(4) 生体内におけるイムノトキシンの活性の確認

作製したイムノトキシンが生体内において機能するかどうかを、以下のステップにて動物に打ち込んで精査する。

a. マウス脳へのインジェクション：ウイルスベクターの注入によって mIL-2R を発現させたマウスに、イムノトキシンを注入する。これにより特定の神経回路を除去することが可能となるが、様々な量や濃度の注入条件を検討し、最も効率よく標的とする神経細胞を破壊できる条件を見出す。

b. サル脳へのインジェクション：サル脳内へのウイルスベクター及びイムノトキシンの注入、さらに神経除去の検定を行う。マウス同様、様々な量や濃度の注入条件を検討し、最も効率よく標的とする神経細胞を破壊できる条件を見出す。最終的には特定神経回路を除去したサルを用いた行動試験も行う。

4. 研究成果

ハイブリドーマ3クローンから抗体可変部位を5' RACE法にてクローニングし、緑膿菌毒素との融合タンパク質をとって大腸菌での発現を試みた。当初はほとんど発現しないクローンもあったが、発現系の改善や立体構造の改良などを経て、発現量を高める事に成功した。作製したこれらイムノトキシンの用いて、ELISA法にてmIL-2R に対して特異性を示すか検討を行った。しかしながら、3つのクローンはいずれも mIL-2R に対する特異性が低いものであった。

そこで、別なハイブリドーマを入手することを検討しつつ、同時に抗体産生能力が高いウサギへ免疫し、ウサギモノクローナル抗体の配列取得を目指した。まずは、ウサギへ免

疫する抗原タンパクの取得を行った。抗原とする mIL-2R の細胞外ドメインは、当初は発現量が低く、ほとんど収量が得られなかった。そこで、発現ベクターや培養系などの発現の条件を検討し、最適な条件を見いだした。期間内に特異性の高い新型イムノトキシンの作製には至らなかったものの、この方法によって質の高い新型イムノトキシンの作製が可能となり、今後、霊長類の特定神経回路の機能解明に大きく寄与できると期待される。

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)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

伊原寛一郎, 加藤成樹, 菅原正晃, 小林憲太, 小林和人. HiRet と NeuRet ウイルスベクターによる逆行性遺伝子導入の特性と比較. Neuro2013 第 36 回日本神経科学大会、第 56 回日本神経化学学会大会、第 23 回日本神経回路学会大会; 2013 06 20; 京都.

[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

伊原 寛一郎 (IHARA, Kanichiro)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：99551523

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

加藤 成樹 (KATO, Shigeki)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：90443879

高田 昌彦 (TAKADA, Masahiko)
京都大学・霊長類研究所・教授
研究者番号：00236233