

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15159

研究課題名(和文) PEG脂質を介した低分子抗体の細胞膜表面修飾による細胞選択的接着の向上

研究課題名(英文) Improvement of cell-selective adhesion by cell surface modification with low molecule antibody via PEG lipid

研究代表者

樋口 ゆり子 (Higuchi, Yuriko)

京都大学・薬学研究科・講師

研究者番号：40402797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：従来の薬物治療と同様に、細胞治療においてもDrug Delivery Systemの概念に基づく治療法の開発が有効である。まず、低分子抗体をリガンドとして細胞膜表面に修飾する方法を開発した。E-selectinに対するscFvにアジドフェニルアラニンを導入し、DBCO-PEG-DSPEとの結合体を作製した。その結合体を含む培地中で間葉系幹細胞(MSC)をインキュベーションすることで、MSCにscFvを修飾することができた。細胞に修飾されたscFvはE-selectinとの結合能を保持していた。さらに、scFv修飾により、流れ場におけるMSCのHUVECへの接着を向上させることができた。

研究成果の概要(英文)：Development of Drug Delivery System for cell based medicine is a promising method for cell therapy. At first, we developed the method for cell surface modification with low molecular weight antibody. In order to connect PEG-DSPE to anti-E-selectin single-chain variable fragment (scFv) without hindering its binding affinity, an unnatural amino acid, azide phenylalanine (AzF), was introduced at the opposite end of binding site in scFv. Then, scFv-PEG-DSPE were prepared by conjugating with scFv(AzF) and DBCO-PEG-DSBE via click reaction. Mesenchymal stem cells (MSCs) were modified with scFv by incubating cells in the medium containing scFv-PEG-DSPE. We confirmed that scFv on MSCs could keep its binding affinity toward E-selectin. Moreover, scFv modification could improve the adhesion ability of MSCs to HUVEC.

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：ドラッグデリバリー 低分子抗体 PEG脂質 間葉系幹細胞 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞を投与・移植して治療を行う細胞治療において、投与・移植された細胞がどこで、いつ、どの様な機能を発揮するかが、治療効果を決定する重要な要素であると考えられ、Drug Delivery System の概念に基づく治療法の開発が有効である。これまで薬物を標的細胞へデリバリーするために、標的細胞に選択的に認識されるリガンドを修飾する方法が用いられてきた。細胞の表面にリガンド分子を修飾する方法は、リガンド分子発現配列を有するベクターをトランスフェクションする生物学的方法、細胞の膜タンパク質の官能基に対してリガンドを共有結合させる化学的方法、細胞膜を構成する膜脂質に親和性の高い脂質にリガンドを結合し、脂質をアンカーとして細胞膜表面にリガンドを修飾する物理学的方法に大別される。我々は、添加するだけで修飾できるという簡便さ、添加された細胞のほぼ全ての細胞に修飾できる修飾効率の高さ、遺伝子導入法と比較して数時間で修飾ができる操作時間の短さの点から、リガンドを結合させた PEG 脂質を用いて、細胞膜表面へリガンドを導入する方法の開発を行ってきた。しかしながら、タンパク質をリガンドとして PEG 脂質と結合させる場合は、タンパク質の構造や機能に影響を与えない箇所を選択して結合させる必要がある。そこで、PEG 脂質をタンパク質の特定の箇所にだけ結合させることを目的に、蛍光タンパク質 mKO2 に非天然アミノ酸であるアジドフェニルアラニン (AzF) を遺伝子工学的手法で挿入し、アジド基とクリック反応することが知られる DBCO を結合した PEG 脂質と水系で反応させて、mKO2-PEG 脂質を作製する方法を確立した。また、その方法で PEG 脂質を結合させても mKO2 の蛍光特性に影響を及ぼさないことを確認した。さらに、mKO2-PEG 脂質を含有する培地で細胞をインキュベーションすると、細胞膜表面に mKO2 を導入できることも確認した。

2. 研究の目的

抗体は、抗原と特異的かつ強固に結合する点でリガンドとして極めて有効である。しかしながら、分子量が大きく、発現・精製が困難である点が課題である。そこで、本研究では、分子量が小さく、かつ抗原との特異的で強固な結合能を有し、さらに、大腸菌で比較的簡単に発現・精製が可能な低分子抗体をリガンドとして用いることにした。本研究は、

PEG 脂質を介して低分子抗体を細胞膜に修飾し、標的細胞との接着能を向上させることを目的とする。修飾される細胞には、抗炎症作用および免疫調整作用による治療効果が期待される間葉系幹細胞 (MSC) を用い、低分子抗体を修飾することで、サイトカインを処理した炎症モデル血管内皮細胞 (HUVEC) との接着を評価した。

3. 研究の方法

(1) AzF 導入低分子抗体の発現・精製

mCherry に対する Variable domain of heavy chain of heavy chain antibody (VHH 抗体) 及び GST の配列と両者の間に TEV プロテアーゼ認識配列を pET22b(+)ベクターに組み込んだ。このベクターの VHH 抗体とプロテアーゼ認識配列の間にナンセンス変異を導入した。さらにこの発現ベクターのほか、先のナンセンス変異に対応する UAG コドン翻訳する tRNA 及びこの tRNA に AzPhe を導入するアミノアシル tRNA 合成酵素を同時に発現するプラスミドベクター pCDF / pAzAz で同時に大腸菌 (BL21(DE3)) の形質転換を行い、OD600 = 0.6 になるまで培養後、IPTG を最終濃度 1 mM になるように加えさらに 8 時間培養した。菌体を回収し破碎後、遠心分離により可溶性画分を回収しグルタチオンアガロースレジンを用いて精製した。精製後の Az-VHH-GST を TEV プロテアーゼと 24 時間反応させ、再度レジンを用いて精製し Az-VHH を得た。

E-selectin に対する single-chain variable fragment (scFv) の N 末端と PDI の間に TEV プロテアーゼ認識配列を挿入し、上記と同様の方法で AzF を挿入し、さらに C 末端に HNtag を導入した。このベクターを用い、大腸菌 (Origami B (DE3)) を利用して scFv(AzF) の発現・精製を行った。

(2) VHH 抗体の細胞表面修飾

0.2% TEA 含有 THF 中で NH₂-PEG2000-DSPE と DBCO-NHS を反応させた後、反応液を水に滴下し DBCO-NHS を凝集沈殿により除去し、さらに 5% THF を含有する水中で透析し結合体を得た。株化ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を DBCO-PEG-DSPE 及び α シクロデキストリン (α CD) を含む 10% FBS 含有培地中で 30 分間転倒混和した後、DBCO-PEG-DSPE を含まない 10% FBS 含有培地中で 30 分間転倒混和した。さらに Az-VHH を含むスクロース含有 HEPES 緩衝

液中で 1 時間転倒混和した。細胞表面への VHH 抗体の修飾は、さらに mCherry を含む無血清培地中で 30 分間転倒混和後、Hoechst 33342 による核染色と 4%パラホルムアルデヒドによる固定を行い、共焦点蛍光顕微鏡で観察することにより確認した。

(3) scFv の細胞表面修飾

DBCO-NHS と scFv(AzF)を HEPES 中で反応させ、scFv-PEG-DSPE を得た。scFv-PEG-DSPE、 α CD を含有する DMEM 中で間葉系幹細胞を 37 で 2 時間インキュベーションした後、遠心により scFv-PEG-DSPE を除去した。

(4) ディッシュ上に固定化された E-selectin に対する細胞接着の評価

ガラスボトムウェルに hydrogen peroxide/sulfuric acid (1:3, v/v)を添加してヒドロキシ化し精製水で洗浄した後、1% (3-aminopropyl)triethoxysilane 含有エタノールを添加して 20 で 16 時間反応させてチオール基を導入し、maleimide-PEG-NH₂ および maleimide-PEG を反応させた。カルボキシル基を活性化して NHS 基を導入した E-selectin をディッシュに添加し、E-selectin をガラスディッシュに固定化した。

E-selectin 固定化プレートに、Hoechst33342 で蛍光標識した細胞を添加し、37 で 1 時間インキュベーションした。1% BSA 含有 DMEM で未接着の細胞を除去した後、各ウェルの蛍光強度をマイクロプレートリーダーで測定した。

(5) 流れ場における scFv 修飾細胞と HUVEC の接着の評価

フローチャンバーに HUVEC をまいて接着させた後、TNF α および IL-1 β を添加して 5 時間インキュベーションした。Calcein-AM で蛍光標識した間葉系幹細胞に scFv を表面修飾し、1%BSA 含有 DMEM に分散させ、シリジポンプを用いてフローチャンバーの流路に流した。フローチャンバーの中央付近を蛍光顕微鏡でタイプラプスイメージングした。

4. 研究成果

まず、モデルの低分子抗体として、mCherry に対する低分子抗体 VHH 抗体に対して、アジドフェニルアラニン (Az-F) を導入するベクターの構築を行った。可溶化および精製を目的に GSTtag を導入し、さらに GSTtag の切り出しを目的に GSTtag と VHH 抗体の間に

TEV protease 切断配列を挿入したが、切断効率が極めて悪く十分なタンパク質量が得られなかった。そこで、TEV protease の前後にリンカー配列を挿入すると切断効率を向上できた。GST tag を融合した Az-VHH を大腸菌に発現させ、単離精製後プロテアーゼ処理により GST tag を除去し、Az-VHH を得た。

Az-VHH をアジド基特異的に反応する FITC-ホスフィンと反応させた後 SDS-PAGE を行ったところ、VHH 抗体の分子量の位置に FITC 由来の蛍光のバンドが検出された。一方でアジド基を導入していない VHH 抗体を反応させたものでは蛍光のバンドが観察されなかったことから、VHH 抗体に導入したアジド基の反応性が確認された (Fig.1)。

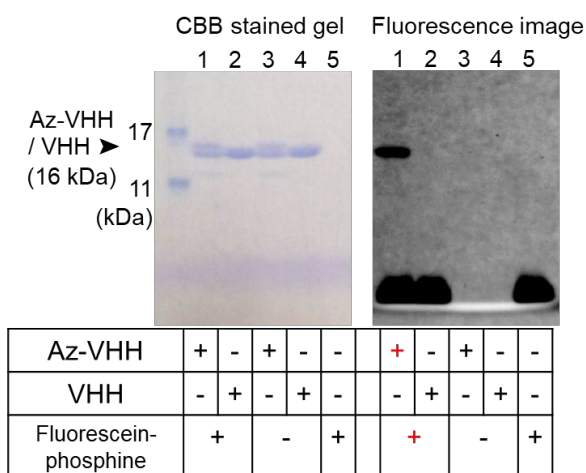


Figure 1 Confirmation of azide reactivity

Az-VHH (lane 1 or 3) or VHH (lane 2 or 4) was incubated with fluorescein-phosphine followed by SDS-PAGE. Only fluorescein-phosphine was added in lane 5. After capturing fluorescence image of the gel, gel was stained with CBB and observed.

次に PEG 脂質を用いた細胞表面修飾の条件を検討した。DBCO-PEG-DSPE または α CD の濃度を变化させて細胞表面を修飾し、10%FBS 含有培地中で転倒混和後、さらにアジド基を有する蛍光色素を含む無血清培地中で転倒混和し、フローサイトメーターで細胞の蛍光強度を測定した。その結果、DBCO-PEG-DSPE 100 μ M 及び α CD 5 mM で蛍光強度がプラトーに達したことから、以降の実験ではこの濃度で修飾を行った (Fig. 2)。

接着分子 E-selectin に対する scFv に対して上記の方法を応用してベクターを作製し、十分な Az-scFv を得られる方法を確立した。得られた Az-scFv と DBCO-PEG-DSPE を結合させて電気泳動すると、CBB 染色で scFv(Az) の位置より上位にバンドが認められたが、

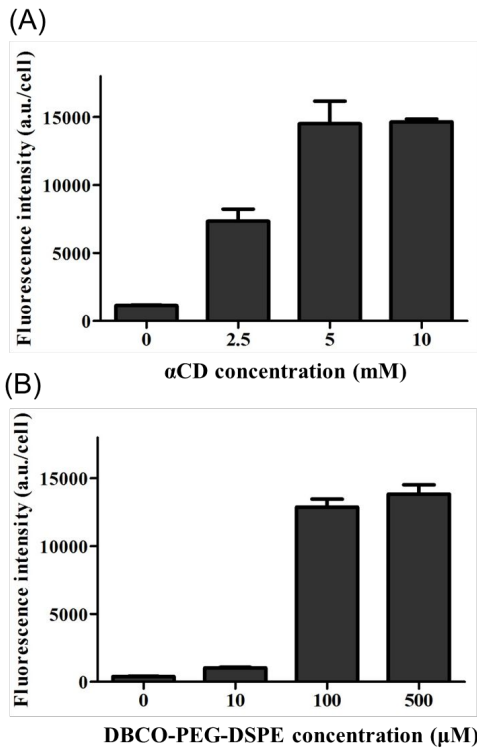


Figure 2 Influence of concentration of αCD and DBCO-PEG-DSPE on cell surface modification efficiency

Suspended hMSCs were incubated with each concentration of αCD and 100 μM of DBCO-PEG-DSPE (A) or 5 mM of αCD and each concentration of DBCO-PEG-DSPE (B) for 30 min at 37 °C followed by incubation with 20 μM azide-functionalized rhodaminegreen for 1 h at 37 °C. The cell surface fluorescence intensity of modified hMSCs was measured by flow cytometry. Each result represents the mean ± S.D. (n=3)

その位置に蛍光は認められなかった。すなわち、このバンドは、scFv(Az)より分子量が大きく、アジド基が反応活性を有しないことから、scFv-PEG-DSPE であると考えられる (Fig.3)

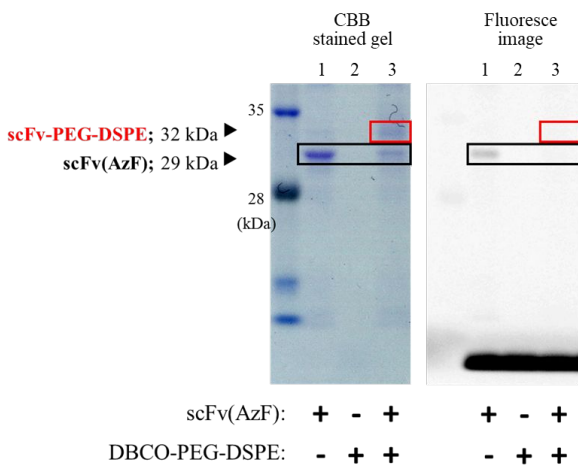


Figure 3 Confirmation of conjugation with scFv(Az) and DBCO-PEG-DSPE

scFv(AzF) (lane 1), DBCO-PEG-DSPE (lane 2) or reactant of scFv(AzF) and DBCO-PEG-DSPE (lane 3) was incubated with DBCO-Texas Red followed by SDS-PAGE. After capturing fluorescence image of the gel, gel was stained with CBB and observed.

scFv(AzF)と DBCO-PEG-DSPE を結合させて得られた scFv-PEG-DSPE を間葉系幹細胞 (hMSC) に添加し、さらに FITC 標識した E-selectin を添加したところ、細胞膜上に蛍光シグナルが確認できた。さらに、未修飾の MSC に FITC 標識 E-selectin を添加した場合にはほとんど蛍光シグナルが認められなかった (Fig. 4)。以上の結果より、scFv-PEG-DSPE を含有する培地でインキュベーションすることにより細胞膜表面に scFv を導入でき、その scFv が E-selectin と結合できることを確認できた。

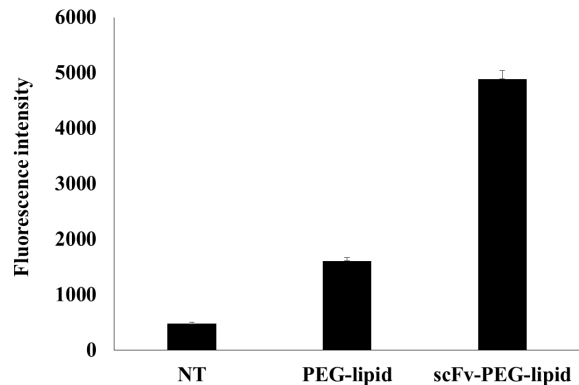


Figure 4 Binding affinity of scFv modified MSC and fluorescence labeled E-selectin

After cells were modified with or without scFv-PEG-DSPE or PEG-DSPE, cells were incubated with fluorescence labeled E-selectin. Fluorescence intensity of wells were measured by microplate reader.

そこで、scFv 修飾が細胞接着に及ぼす効果を評価した。まず、E-selectin または PEG を固定化したプレートを作成し、蛍光標識細胞を添加して、ウェルの蛍光強度を指標に接着した細胞数を評価した。scFv 修飾細胞は、PEG 固定化プレートと比較して E-selectin 固定化プレートに約 5 倍の細胞が接着し、未修飾細胞および PEG 修飾細胞はいずれのプレートにもほとんど接着しなかった。さらに、E-selectin 固定化プレートに対する scFv 修飾細胞の接着の増強は、抗 E-selectin 抗体の前処理により有意に阻害され、scFv を介した接着増強が示唆された (Fig. 5)。

最後に、生体内では血流の流れ場で血管内皮細胞と接着するため、流れ場において HUVEC と間葉系幹細胞の接着する実験系を構築した。流路の底面に HUVEC を播種し、サイトカイン処理後、蛍光標識間葉系幹細胞をシリンジポンプで送り出し、HUVEC 上の間葉系幹細胞の移動速度をリアルタイムイメージングで評価した。scFv 修飾細胞は PEG 修飾細胞と比較して移動速度が低く、さらに、一定時間流した後 HUVEC 上に接着した細胞数は、scFv 修飾細胞は PEG 修飾細胞の約 1.5

倍であった。さらに、scFv 修飾細胞を過剰な E-selectin 含有培地でインキュベーションしてから流した場合、E-selectin の前処理がない場合と比べて HUVEC 上に接着した細胞数は減少した (Fig. 6)

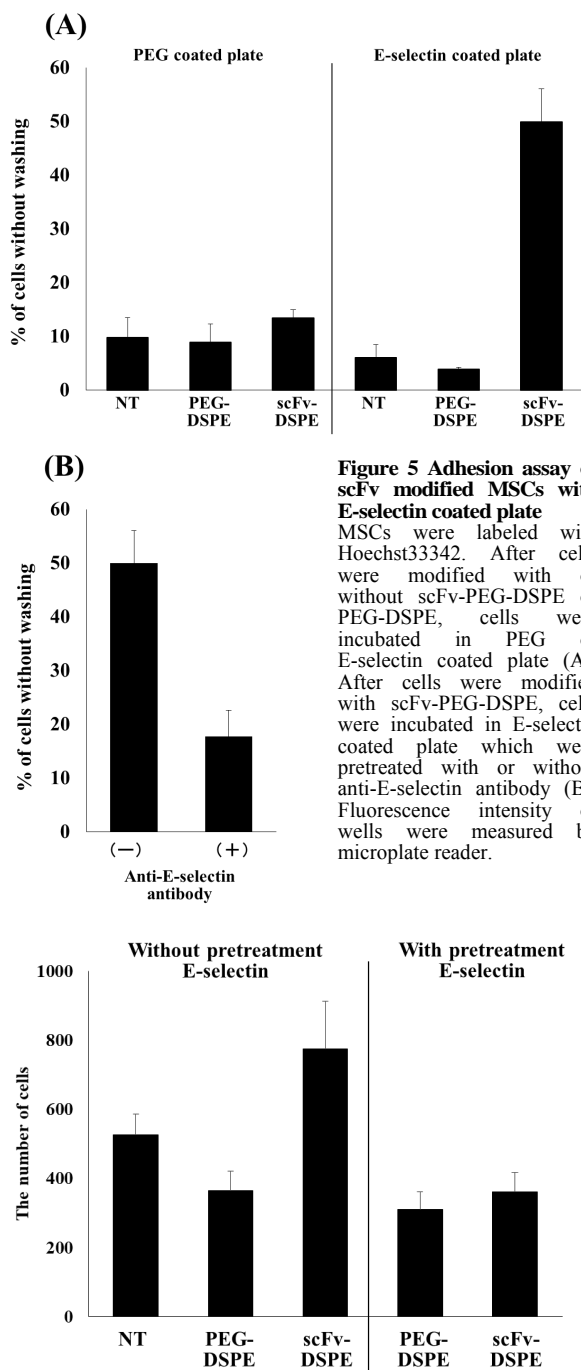


Figure 5 Adhesion assay of scFv modified MSCs with E-selectin coated plate
MSCs were labeled with Hoechst33342. After cells were modified with or without scFv-PEG-DSPE or PEG-DSPE, cells were incubated in PEG or E-selectin coated plate (A). After cells were modified with scFv-PEG-DSPE, cells were incubated in E-selectin coated plate which were pretreated with or without anti-E-selectin antibody (B). Fluorescence intensity of wells were measured by microplate reader.

Figure 6 Adhesion assay of scFv modified MSCs with HUVEC in the flow

HUVEC was cultured on flow chamber, and activated with $TNF\alpha$ and $IL1\beta$. MSCs were labeled with Calcein-AM. After cells were modified with or without scFv-PEG-DSPE or PEG-DSPE, cells were added to flow chamber with or without pretreatment of E-selectin. Calcein AM labeled cells which were remained on flow chamber were counted.

PEG 脂質を介して scFv を間葉系幹細胞に修飾することができた。細胞に修飾された

scFv は E-selectin との結合能を保持していた。さらに、scFv 修飾された間葉系幹細胞は、未修飾細胞および PEG 修飾細胞と比較して、流れ場において HUVEC と接着した細胞数が多かった。以上、PEG 脂質を介して scFv を修飾することにより、間葉系幹細胞の HUVEC への接着を向上させることができた。

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 0 件)

[学会発表](計 5 件)

- 山田創太、樋口ゆり子、杉田かおり、山下富義、橋田充、細胞表面への単鎖抗体の修飾を指向した PEG 脂質複合体の合成、第 32 回日本 DDS 学会学術集会、2016 年 6 月 30 日、グランシップ (静岡)
- Yuriko Higuchi, Cell surface modification with peptide ligand or proteins via PEG-DSPE, International Regenerative Engineering Symposium, 2017 年 1 月 17 日、Seoul National University, Seoul, Korea
- 樋口ゆり子、PEG 脂質を介した低分子抗体の細胞膜表面修飾、NanoBio 第 10 回若手ネットワークシンポジウム、2017 年 6 月 9 日、東京大学 (東京)
- 樋口ゆり子、顕微鏡を利用した細胞の体内動態追跡、第 33 回日本 DDS 学会学術集会、2017 年 7 月 6 日、京都市勧業館みやこめっせ (京都)
- 山田創太、樋口ゆり子、橋田充、山下富義、PEG 脂質を介した細胞膜表面への単鎖抗体修飾、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 27 日、石川県立音楽堂ほか (金沢)

[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

樋口ゆり子 (HIGUCHI, Yuriko)
京都大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号：40402797

(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

橋田 充 (HASHIDA, Mitsuru)
坂本 健作 (SAKAMOTO, Kensaku)
山田 創太 (YAMADA, Sota)