

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和2（2020）年度 研究進捗評価用〕

平成29年度採択分
令和2年3月31日現在

血液脳関門通過性ヘテロ核酸の開発

Development of heteroduplex oligonucleotide crossing the blood-brain barrier

課題番号：17H06109

横田 隆徳 (YOKOTA, TAKANORI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授



研究の概要（4行以内）

二本鎖ヘテロ核酸は、新たな分子構造・作用機構を有し、既存の核酸医薬の10～1000倍の有効性を示す。加えて、生体の血糖値を操作することにより、全身投与で高分子医薬を効率的に中枢神経系に送達するデリバリーシステムも開発した。本研究ではグルコーストランスポーターに結合して中枢神経系に送達されるヘテロ核酸を創生し、全身投与で中枢神経系の遺伝子制御を可能とする革新的な核酸医薬を開発する。

研究分野：生体医工学・生体材料学

キーワード：ヘテロ核酸/グルコーストランスポーター/抗体工学/リサイクリング

1. 研究開始当初の背景

核酸医薬は、抗体医薬では標的にできない細胞内の分子を制御できることから、次世代の分子標的医薬として期待されているが、有効性が不十分で肝臓以外の導入が困難であるためにその臨床応用は遅れている。我々は従来の核酸医薬とは、その分子構造、作用機構が異なる第3の核酸医薬であるDNA/RNA 2本鎖ヘテロ核酸を創生した。ヘテロ核酸は標的RNAに結合するアンチセンスの主鎖と、これに相補的なRNA鎖からなる非天然の2本鎖機能核酸である(PCT/JP2012/083180)。既存の核酸医薬の10～1000倍の有効性を示す。しかし、高分子であるヘテロ核酸は、やはり血液脳関門(BBB)を通過できずに、脳だけは遺伝子制御ができなかった。一方、我々は平行して、BBB通過の技術開発を進め、臨床検査であるフルオロデオキシグルコースPETが早朝空腹時に行われることにヒントを得て、Glucose transporter 1 (Glut1)の脳血管内皮細胞内リサイクリングを利用した。Glut1は、脳血管内皮細胞の血液側と脳側の両側の細胞膜上に発現するが、空腹状態ではGlut1は脳にグルコースを供給するために血液側の細胞膜に集まることが知られている。この血液側細胞膜上のGlut1は、血糖値の上昇に伴って細胞内に内在化するが、リサイクリングに伴って血液側だけでなく脳側の細胞膜上にもトランスサイトーシスされる作業仮説を立てた。実際に、表面にグルコースを結合させたグルコース結合ミセルを、一昼夜絶食状態のマウスに静脈投与して、その後にグルコース溶液を投与して血糖値を上昇させると、血糖値の上昇に伴って投与量の6%という驚異的なグルコース結合ミセルの脳内移行が達成され、神経細胞やマイクロリアの細胞質や核への導入が確認された。

2. 研究の目的

本研究では、ミセルではなくヘテロ核酸に直接Glut1結合抗体を結合させて、シンプルで製剤として安定な分子構造として、なおかつエンドソーム内でpH応答性に

抗体のGlut1への親和性を低下させるアミノ酸変異を導入(Nat Biotechnol 28:1203-7, 2010)することで、トランスサイトーシスされたヘテロ核酸が高効率にGlut1から離脱して脳内にデリバリーされる発展的な戦略を立てた。また、目的に応じて、Glut1結合リガンドと反対のRNA鎖末端に、脳内での導入細胞種の選択性を規定する第2リガンドを結合させることも考慮する。

3. 研究の方法

Glucose transporter 最適な低分子抗体クローンを得るためには、1) エピトープの異なる複数のVHHクローンを得ること 2) 臨床展開を図るためにヒトとマウス双方のGlut1に対する特異的分子認識能を持つクローンを得ること、3) 抗原に対する相互作用様式を精査し、親和性の強弱、親和性のpH依存性に関するプロファイルが異なるクローンを創出すること、4) ヘテロ核酸への結合に耐えうる安定なVHHクローンを得ること、が必要となる。また血糖変化依存性にGlut1がトランスサイトーシスされる生体側の機序の解明を共焦点顕微鏡や電子顕微鏡を用いて行う。今後、Glut1抗体結合ヘテロ核酸の神経難病への分子標的治療としての有効性を検証するために、神経難病の中でもアンメットメディカルニーズのもっとも高く、その進行の速さから臨床試験が比較的容易な筋萎縮性側索硬化症を対象として配列のスクリーニングを行う。

4. これまでの成果

当研究プロジェクトでは、血液脳関門通過性ヘテロ核酸を作製するため、Glut1結合抗体にヘテロ核酸をコンジュゲートする。そのための抗体クローンの取得を行う。これまでに、アルパカおよびウサギ、マウスを用いた免疫を行い、適宜ファージディスプレイ法を組み合わせながら抗体選択を行うことにより、各種抗Glut1抗体を取得してきた。その結果、Glut1を一過性発現させた哺乳細胞上において抗原に結合性を示す抗体クローンの取得に成功している。しかしながらマウスを用いたin vivo

の実験において脳内移行性を確認するには至っていない。新たに認識するエピトープを限定するため、Glut1の複数種の部分断片をそれぞれキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた融合タンパク質を活用した抗体選択を行っている。さらに、Glut1と同じファミリーに属するGlut4についても同様にペプチドを用いたウサギ免疫およびファージディスプレイ法を活用した抗体取得を試みている。現在までにGlut4に関してはペプチドに対する結合クローンをウサギに免疫することで複数取得しており、モノクローナルとした各抗体クローンをを用いて細胞免疫染色を行い、細胞上での抗原結合活性ならびに細胞内移行活性について評価している。また、標的ペプチドとの相互作用について、物理化学的手法を用いた解析を行うことにより、結合親和性および相互作用の熱力学的パラメータの算出に成功している。今後、抗体による細胞上での抗原認識の差や細胞内取り込み活性と *in vitro* での結合親和性やエピトープでの解析を比較し、両抗原の細胞内動態について分子レベルで検証を行う。さらに、それぞれの抗原に対する抗体について、十分な細胞内への移行活性が確認されたクローンについてはヘテロ核酸とのコンジュゲートを行い、抗体を介した血液脳関門通過性ヘテロ核酸の開発を進める。動物実験では 以前に報告したグルコースミセルの系を用いて、1) 必要な投与前の絶食時間、2) ミセル投与と糖負荷の時間的關係について決定した。さらに Glut1 のみでなく脂質リガンドでも同様に Fasting や Glucose control で同様に脳内への取り込みが上昇するか併せて検討した。これにより脂質リガンドであれば、食事の影響を受けずに脳内移行が可能と考えられた。神経難病での原因遺伝子である SOD1 に対して新たな配列のスクリーニングを行った。また *In vivo* においてその効果を検討して、十分な抑制効果を得ている。Glut1 を介した内在化のメカニズム解析のため、電子顕微鏡による Glut1 の局在解析を確立した。

5. 今後の計画

細胞上で Glut1 を認識する抗体の取得には成功したものの、現時点でマウス実験によって脳内移行性を確認するに至っていない。そのため、当初の実験計画に加え、標的 Glut1 に対してより広範な標的部位をエピトープとして認識する抗体の取得を試みる。当初の予定通りその上でヘテロ核酸に結合させて、脳内移行性を検討する予定である。加えて Glut1 脳内移行には投与前に絶食の処置が必要となり、実際の医療では患者負担がかかることが考えられる。そこで並行して食事の影響を受けにくいリガンドの開発も検討する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Akiba H, Tamura H, Caaveiro JMM, [Tsumoto K](#). Computer-guided library generation applied to the optimization of single-domain antibodies. *Protein Eng Des Sel*. in press, doi: 10.1093/protein/gzaa006.
2. Akiba H, Takayanagi K, Kusano-Arai O, Iwanari H, Hamakubo T, [Tsumoto K](#). Generation of biparatopic antibody through two-step targeting of fragment antibodies on antigen using SpyTag and SpyCatcher. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2020, 25, e00418. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00418.
3. Kuroda D, [Tsumoto K](#). Engineering Stability, Viscosity, and Immunogenicity of Antibodies by Computational Design. *J Pharm Sci*. 2020, pii: S0022-3549(20)30016-2. doi: 10.1016/j.xphs.2020.01.011.
4. Kondo HX, Kiribayashi R, Kuroda D, Kohda J, Kugimiya A,

- Nakano Y, [Tsumoto K](#), Takano Y. Effects of a remote mutation from the contact paratope on the structure of CDR-H3 in the anti-HIV neutralizing antibody PG16. *Sci Rep*. 2019, 9(1):19840. doi: 10.1038/s41598-019-56154-y.
5. Akiba H, Tamura H, Kiyoshi M, Yanaka S, Sugase K, Caaveiro JMM, Tsumoto K. Structural and thermodynamic basis for the recognition of the substrate-binding cleft on hen egg lysozyme by a single-domain antibody. *Sci Rep*. 2019, 9(1):15481.
6. Eguchi A, Nakakido M, Nagatoishi S, Kuroda D, Tsumoto K, Nagamune T, Kawahara M. An epitope-directed antibody affinity maturation system utilizing mammalian cell survival as readout. *Biotechnol Bioeng*. 2019, 116(7), 1742-1751. doi: 10.1002/bit.26965.
7. Zeniya S, Kuwahara H, Daizo K, Watari A, Kondoh M, Yoshida-Tanaka K, Kaburagi H, Asada K, Nagata T, Nagahama M, Yagi K, [Yokota T](#). Angubindin-1 opens the blood-brain barrier *in vivo* for delivery of antisense oligonucleotide to the central nervous system. *J Control Release*. 2018 Aug 10;283:126-134.
8. Kawade R, Akiba H, Entzminger K, Maruyama T, Okumura CJ, [Tsumoto K](#). Roles of the disulfide bond between the variable and the constant domains of rabbit immunoglobulin kappa chains in thermal stability and affinity. *Protein Eng Des Sel*. 2018, 31(7-8), 243-247, doi: 10.1093/protein/gzy008.
9. Miyabe K, Yamashita T, Abe Y, Akiba H, Takamatsu Y, Nakakido M, Hamakubo T, Ueda T, Caaveiro JMM, [Tsumoto K](#). Tyrosine Sulfation Restricts the Conformational Ensemble of a Flexible Peptide, Strengthening the Binding Affinity for an Antibody. *Biochemistry*. 2018, 57(28), 4177-4185. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00592.
10. Fukunaga A, Maeta S, Reema B, Nakakido M, [Tsumoto K](#). Improvement of antibody affinity by introduction of basic amino acid residues into the framework region. *Biochem Biophys Rep*. 2018, 15, 81-85. doi: 10.1016/j.bbrep.2018.07.005.
11. Akiba H, Ikeuchi E, Ganbat J, Fujikawa H, Arai-Kusano O, Iwanari H, Nakakido M, Hamakubo T, Shimomura Y, [Tsumoto K](#). Structural behavior of keratin-associated protein 8.1 in human hair as revealed by a monoclonal antibody. *J Struct Biol*. 2018, 204(2), 207-214. doi: 10.1016/j.jsb.2018.08.011.
12. Hara RI, Hisada Y, Maeda Y, [Yokota T](#), Wada T. Artificial cationic oligosaccharides for heteroduplex oligonucleotide-type drugs. *Sci Rep*. 2018 8(1):4323. doi: 10.1038/s41598-018-22161-8.
13. Yamashita T, Mizohata E, Nagatoishi S, Watanabe T, Nakakido M, Iwanari H, Mochizuki Y, Nakayama T, Kado Y, Yokota Y, Matsumura H, Kawamura T, Kodama T, Hamakubo T, Inoue T, Fujitani H, [Tsumoto K](#). Affinity Improvement of a Cancer-Targeted Antibody through Alanine-Induced Adjustment of Antigen-Antibody Interface. *Structure*. 2019, 27(3), 519-527.e5. doi: 10.1016/j.str.2018.11.002.
14. Nariai Y, Kamino H, Obayashi E, Kato H, Sakashita G, Sugiura T, Migita K, Koga T, Kawakami A, Sakamoto K, Kadomatsu K, Nakakido M, [Tsumoto K](#), Urano T. Generation and characterization of antagonistic anti-human interleukin (IL)-18 monoclonal antibodies with high affinity: Two types of monoclonal antibodies against full-length IL-18 and the neopeptide of inflammatory caspase-cleaved active IL-18. *Arch Biochem Biophys*. 2019, 663, 71-82. doi: 10.1016/j.abb.2019.01.001.
15. Yoshida K, Kuroda D, Kiyoshi M, Nakakido M, Nagatoishi S, Soga S, Shirai H, [Tsumoto K](#). Exploring designability of electrostatic complementarity at an antigen-antibody interface directed by mutagenesis, biophysical analysis, and molecular dynamics simulations. *Sci Rep*. 2019, 9(1), 4482. doi: 10.1038/s41598-019-40461-5.
16. Anraku Y, Kuwahara H, Fukusato Y, Mizoguchi A, Ishii T, Nitta K, Matsumoto Y, Toh K, Miyata K, Uchida S, Nishina K, Osada K, Itaka K, Nishiyama N, Mizusawa H, Yamasoba T, [Yokota T](#), Kataoka K. Glycaemic control boosts glucosylated nanocarrier crossing the BBB into the brain. *Nat Commun*. 2017 Oct 17;8(1):1001.
7. ホームページ等
なし