様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 ３０ 日現在

機関番号：９２７２０
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2022～2024
課題番号：２２Ｋ２０６４３

研究課題名（和文）虚血性心筋を標的とするナノボディ修飾細胞外小胞を使用した心筋梗塞治療法の開発

研究課題名（英文）Nanobody-Modified Extracellular Vesicles Targeting Ischemic Myocardium

研究代表者
ヤン　ジュンジー（Yang, Junjie）

医療法人徳洲会湘南鎌倉総合病院（臨床研究センター）・湘南先端医学研究所 再生医療開発研究部・主任研究員

研究者番号：２０９６２１３７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,200,000円

研究成果の概要（和文）：相補性決定領域（CDR）を効率的に組み換え可能なモジュール型ファージディスプレイライブラリを構築しました。本ライブラリを用いて、心筋梗塞における低酸素応答関連タンパク質CD29およびCD166に対するナノボディの選抜を行いました。得られたナノボディは、心筋組織の病態診断や標的治療のためのドラッグデリバリーシステムへの応用が期待されます。

研究成果の学術的意義や社会的意義
Identifying highly specific and high affinity nanobodies that target ischemic myocardium by biopanning of our novel phage display nanobody library is of vital significance for enhancing EV therapeutic benefits for myocardial infarction.

研究成果の概要（英文）：I have designed a highly diverse and modular phage display library that allows for rapid and efficient replacement of complementarity determining regions. CD29 and CD166 were selected as hypoxia-related proteins in cardiomyocytes.

研究分野：cardiovascular repair

キーワード：myocardial infarction　exosomes　nanobody　exosome engineering

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

間葉系幹細胞（MSC）由来の細胞外小胞（EV）は、心血管疾患の治療における治療媒体の中でも最も広く研究されているものの一つとなっており、低毒性、低免疫原性、低凝集性、高い生体適合性および生体バリア透過性により、搭載された生体分子を標的細胞へ輸送することが可能である。EV を臨床応用する上で、主な障壁の一つは、体内における組織分布の特異性の欠如であり、これが治療効果の低下および不要なオフターゲット効果を引き起こす原因となっている。高親和性の標的化ベクターを生成するために、さまざまな標的に対して高い特異性と親和性で結合可能なファージディスプレイナノボディライブラリを設計した。EV をナノボディで修飾することで、高度に特異的な標的化能力を持つ EV を生成することが可能となる。

２．研究の目的

本研究では、新たに開発したファージディスプレイナノボディライブラリを用いて、虚血性心筋を標的とするナノボディを同定し、それによって MSC 由来の EV を修飾・標的化することで、心筋梗塞に対する治療効果を高めるという革新的なアプローチの開発を目的とする。

３．研究の方法

（1）心筋梗塞（MI）モデルマウスにおけるファージディスプレイナノボディライブラリの in vivo バイオパンニングによる、標的化ナノボディの同定

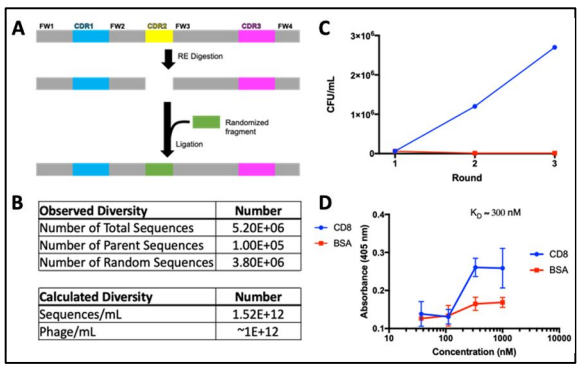
MI モデルマウスを用いて in vivo ファージディスプレイセレクションを行い、その後、虚血性心筋タンパク質に対する in vitro セレクションを実施した。虚血性心筋タンパク質に対して最も高い結合比を示したナノボディは、ELISA による確認のために増幅・精製した。最良のナノボディについて各ファージミド DNA に加え、初回の ELISA において結合が見られなかったナノボディ 3 種のファージミド DNA も、プラスミドミニプレップ法で回収し、自動サンガーDNA シーケンシングを実施した。その後、バイオインフォマティクス解析、免疫組織染色、免疫蛍光法、リアルタイム PCR による in vitro 検証、およびバイオディストリビューションと in vivo イメージングによる in vivo 検証を行った。

（2）標的化ナノボディを用いた MSC 由来改変 EV 作製

標的化ナノボディは、EV 表面の濃縮タンパク質であるリソソーム関連膜タンパク質 2b(LAMP2b)に遺伝子改変を行うことで挿入した。MSC に標的化ナノボディ-LAMP2b を強制発現させることで、それらの細胞から分泌される EV 表面に標的化ナノボディ-LAMP2b が発現される。

４．研究成果

（1）相補性決定領域（CDR）の迅速かつ効率的な置換を可能にする、高い多様性とモジュール性を備えたファージディスプレイライブラリを設計した。個々の CDR（図中の色付きバー）は、特異的かつ迅速に除去され、ランダムなアミノ酸に置き換えることが可能であり、EV 上に表示させる個別の標的ユニットとして使用できる新規ナノボディの選抜を可能にする（図 1A）。CDR2 領域に 17 個のランダムアミノ酸を挿入した後、合計 520 万種類の配列が親ファージミドから回収された。そのうち、親ファージミド配列はわずか 10 万種類であり、未消化のファージミドの混入が最小限で、ライブラリが効率的に構築されたことを示している（図 1B）。CD8 は概念実証として、このヒト化ナノボディライブラリによる選抜の代表的な標的として選ばれた。対照（BSA）と比較して、2 ラウンドの選抜後に 120 倍、3 ラウンド後には約 300 倍の濃縮が確認された（図 1C）。このライブラリから単離されたナノボディは、CD8 に対して特異的に結合し、解離定数（Kd）は 300 nM であった（図 1D）。



Observed Diversity	Number
Number of Total Sequences	5.20E+06
Number of Parent Sequences	1.00E+05
Number of Random Sequences	3.80E+06

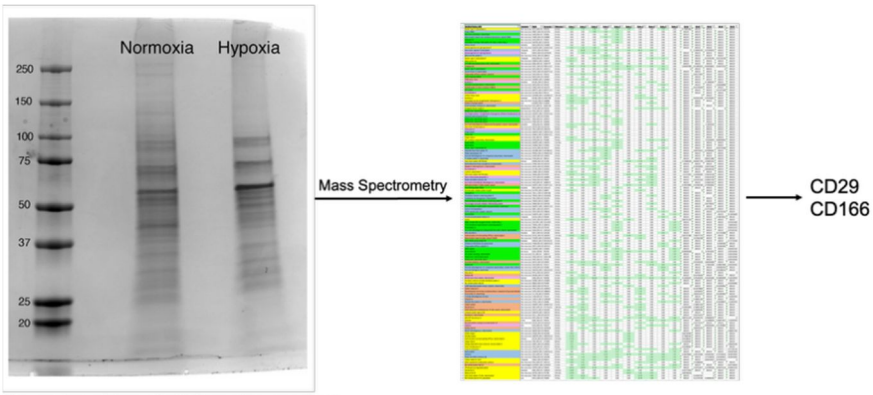
Calculated Diversity	Number
Sequences/mL	1.52E+12
Phage/mL	~1E+12

図 1

（2）　心筋細胞は、酸素 1%、二酸化炭素 5%、窒素 94%の条件下で 48 時間処理した。通常および低酸素条件下の心筋細胞から、Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit を用いて膜タンパク質を抽出し、Stain-free ゲルで可視化した。Stain-free ゲル上の差異バンドを切り出して質量分析（Mass Spectrometry）を行った結果、合計 449 種類のタンパク質が同定された。これらの中から、フォールド変化が 1.5 倍以上、かつ P 値が 0.05 未満のタンパク質を差異タンパク質として抽出した。さらに、低酸素状態下でのタンパク質機能と組み合わせて、CD29 および CD166 を今後の実験に用いる候補タンパク質として選定した。

CD29 および CD166 は最初にビオチン化され、その後、ビオチン化された CD29 および CD166 は

Maxisorb プレート上に固定化された。2 ラウンドの標的結合、ファージ結合、洗浄、溶出および増幅の工程を経て、濃縮されたファージが回収され、次世代シーケンシング（NGS）に供された。



Normoxic and hypoxic CM membrane protein visualized on stain-free gel

（3）心筋梗塞治療における改変 EV の治療効果評価

今後、標的化ナノボディ-LAMP2b-EV の in vivo での体内分布を、ライブイメージングおよびマルチモーダルイメージングにより調査する。また、マウス MI モデルを用いて、細胞生存率、新生血管形成、梗塞サイズ、炎症、心機能といった指標を通じて、治療メカニズムおよび有効性を評価している。EV の脂質二重膜は近赤外蛍光色素 DiR で蛍光標識されるため、これを利用して IVIS Spectrum in vivo イメージングシステムにより DiR で標識された改変 EV の蛍光シグナル強度を解析し組織分布の確認を進める。経胸壁心エコー検査および免疫染色を実施し、心臓の機能および組織学的変化を評価し、その治療効果を明らかにする。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計0件

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関