

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04923

研究課題名(和文) 拡張型心筋症治療を目指した新たな自己抗体除去システムDNCSの開発

研究課題名(英文) Development of a new DCM therapeutic strategy, DNCS, to remove etiologic factors in the blood

研究代表者

湊谷 謙司 (Minatoya, Kenji)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：20393241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：血中に存在する自己抗体を肝臓へと誘導して分解排泄させる新規薬物である「ナビゲーター」分子として、標的結合抗体と肝臓LDLレセプターに結合するApoE分子の結合体を合成した。まずナビゲーター分子が標的分子とよく結合することをin vitroで確認され、肝細胞への誘導分子の肝細胞選択的取込みもin vitroで確認することに成功した。この時37度で培養した場合に4℃の場合よりも蛍光強度が低くなることから、ナビゲーターが幹細胞内に取り込まれて分解されることも確認できたと考えている。さらにナビゲーター分子のマウス体内動態を検討したところ、肝臓への蓄積量が有意に高く、基本的POCが確立できた。

研究成果の概要(英文)：A conjugate molecule of a etiologic molecule-binding molecule and an ApoE molecule that binds to the liver LDL receptor was synthesized as a "navigator" molecule, which is a novel drug that navigate the target etiologic molecule to the liver and reduce it blood level. First, it was confirmed in vitro that the navigator molecule binds well with the target molecule, and hepatocyte selectively uptake the navigating. When cultured at 37 degree C the fluorescence intensity in the hepatocytes became much lower than when cultured at 4 degree C, which suggests that the navigator was taken up by the hepatocytes and degraded in the cells. Furthermore, we investigated the body distribution of the navigator molecule in the mouse, and found that the liver accumulated was significantly higher, indicating the basic POC.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：人工臓器学

1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症に対する自己抗心筋抗体除去療法が注目を集めている。選択的血漿成分吸着器を用いたアフエーシス治療が検討され、ドイツに於いては既に他施設間共同研究が実施されているところである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、共同研究者の山岡らが国立循環器病研究センターにて開発した「薬物誘導型血中病因物質除去システム」を拡張型心筋症モデル動物に適用し、その有効性を検証することである。血中に存在する拡張型心筋症の原因と考えられる抗自己心筋抗体を、「ナビゲーター」薬剤により肝臓へと誘導して分解・排泄させるという新たな治療概念であり、これまで、文部科学研究費挑戦的萌芽的研究により小規模ではあるが検討を進め、その有効性が実証されたことから、今回、対象疾患を拡張型心筋症に設定して研究を進めた。

3. 研究の方法

【ナビゲーター分子合成スキームの確立】

ミクロ BCA 法により IgG と ApoE の濃度を確定した。病因物質誘導分子 ApoE に 2-iminothiolane (trauts reagent) を加え室温で 30 分間反応してチオール基を導入した。PD-10 カラムで精製し、回収量、回収率を求めた。次に病因物質捕捉分子 IgG に DMSO (脱水) で 25mM に調整した NHS-PEG2-maleimide を加え室温で 30 分間反応することで IgG-PEG2-maleimide を得た。上述と同様に、PD-10 カラムで精製した。BCA 法で算出した濃度から回収量、回収率を求めた。ApoE-SH に IgG-PEG2-maleimide を加え、37 で 30 分間インキュベートすることによって IgG-ApoE を得た。

【病因物質捕捉分子の調整】

病因物質捕捉分子にはプロテイン G、または、さらに結合力の高い抗体分子そのものを利用する計画を立てた。ただし、Fc 領域の非選択的な影響を低減させるために、Fab または Fab '2 の形態として用いることも選択肢とした。Fab Preparation Kit を利用して Fab を、また、古くから知られている酵素反応的手法により Fab '2 を調整した。調整したフラグメント化抗体は、定法に従って、SDS-PAGE、CBB 染色により確認した。

【病因物質誘導分子の肝臓細胞選択的な結合と取り込み】

ApoE がナビゲーターの肝臓への誘導部位として用いることが出来るかを確認するために、選択的に LDL レセプターと結合し肝臓細胞に取り込まれるかを確認した。まず、ApoE に Alexa647 NHS ester を 1.2 mol 当量加え 1 時間反応させて標識した後、等量の 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocol

ine (DMPC) と混合し一晩で反応させてサンプルを得た。一方、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、マウス線維芽細胞 (NIH/3T3)、マウス正常肝臓細胞 (NMuLi) を 35mm dish もしくは、24 well プレートに播種し、3 日間培養した。なお、サンプル添加前に一晩フェノールレッド不含、血清不含培地で培養した。その後、5 μ M Alexa647 標識 ApoE/フェノールレッド不含、血清不含培地を細胞に滴下し、4 もしくは、37 で 2 時間培養した。PBS で 3 回洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光観察およびプレートリーダーによる蛍光強度の測定を行った。蛍光強度測定後、細胞数をカウントし、蛍光強度を細胞数で割り付けることによって結合、取り込み量を定量的に評価した。

【ナビゲーター分子を介したマウス IgG の取り込み評価】

ナビゲーター分子を介したマウス IgG の HepG2 細胞取り込みを検討した。HepG2 (あるいは HUVEC) を N=4 で 35 mm collagen coated glass dish bottom に 2×10^5 個播種して 37 で 2 日間インキュベートする。コントロールとして蛍光標識抗体のみを 4.23uL 添加したものと、蛍光標識抗体に加えて、上述により合成したナビゲーター分子を添加したものを 37 で所定時間培養した。PBS (pH7.2) で 3 回洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡にて撮像した。培養にはガラスボトムディッシュを使用し、共焦点レーザー顕微鏡により Z 軸分解し、両分子の共局在を観察した。

【In vivo 実験】

上述のナビゲーター分子を用いて、(1) 蛍光標識病因物質をナビゲーター分子と混合したあとに、マウス体内の投与した後の体内動態の経時的変化、および、(2) 遊離の蛍光標識病因物質をマウスに投与して全身に分布させた後に、追ってナビゲーター分子を投与した後の体内動態の経時的変化を検討した。

4. 研究成果

血中に存在する拡張型心筋症の原因と考えられる抗自己心筋抗体を、肝臓へと誘導して分解・排泄させる新規薬物である「ナビゲーター」分子として、標的結合抗体と肝臓 LDL レセプターに結合する ApoE 分子の結合体を合成した。それぞれの 1 対 1 結合体の合成は容易ではなく、複数分子が結合したナビゲーターでの検討を進めた。まず、ナビゲーター分子と標的分子との結合についてゲル電気泳動により調べたところ、ナビゲーター合成後にも、標的分子との結合能を有することを確認した。

病因物質誘導分子の肝臓細胞選択的な結合と取り込み評価の結果 (図 1、2)、4、37 とともに NMuLi で最も強い蛍光発光が認められ、HUVEC では蛍光発光がほぼ認められなかった。NMuLi において、4 で NIH/3T3 の 3.5 倍、

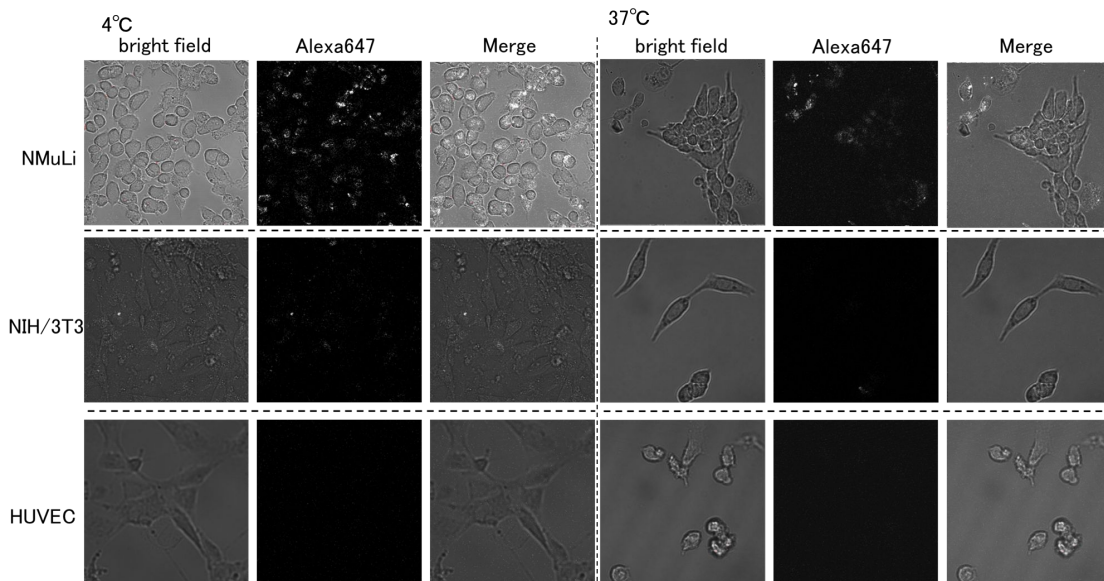


図 1 . 種々の細胞による Alexa647-ApoE の取り込み(共焦点レーザー顕微鏡観察)

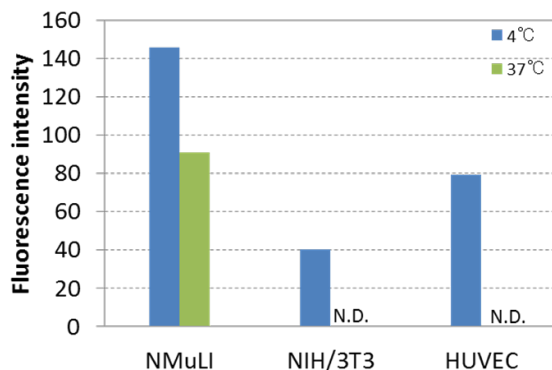


図 2 . 種々の細胞による Alexa647-ApoE の取り込み(プレートリーダー)

HUVEC の 2 倍の蛍光強度が得られた。また、37 に関しては NMuLi でのみ蛍光が認められた。NMuLi で 37 の蛍光強度が 4 より低かったが、これは、NMuLi 内に取り込まれ分解されたためと考えられる。このことから、NMuLi に最も多く LDL レセプターが発現し、ApoE と結合して選択的に取り込まれると考えられる。

ナビゲーション現象を in vitro で検証するために、ヒト肝細胞 HepG2 細胞と対照細胞としてヒト内皮細胞を利用した。ナビゲーター分子とターゲット分子を、それぞれ、緑および赤の蛍光色素で標識して検討したところ、HepG2 において、ナビゲーター分子が共存するときのみ、標的分子の細胞内取り込みが増加した。また、両蛍光スポットが共存することから、ナビゲーター分子の働きにより、標的分子を肝細胞に誘導できることが証明できた。

ナビゲーター分子のマウス体内動態を検討したところ、肝臓への蓄積量が有意に高くなったことから、ナビゲーター分子は誘導能を有していることが確認された。さらに、蛍

光標識分子の肝臓ナビゲーション現象を in vivo 実験で検討したところ、標的分子の肝臓への移行性も in vivo 蛍光イメージングシステムで確認することが出来た。

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 3 件)

1. Tanaka H, Minatoya K, Sasaki H, Seike Y, Itonaga T, Oda T, Kobayashi J. Recent thoracoabdominal aortic repair outcomes using moderate to deep hypothermia combined with target reconstruction of the Adankiewicz artery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2015;20: 605-610.
2. Mahara A, Sago M, Yamaguchi H, Ehashi T, Minatoya K, Tanaka H, Nakatani T, Moritan T, Fujisato T, Yamaoka T. Micro-CT evaluation of high pressure-decellularized cardiovascular tissues transplanted in rat subcutaneous accelerated-calcification model. *J Artif Organs*. 2015;18:143-150.
3. Mahara A, Harada-Shiba M, Yamaoka T. A Novel Strategy for Etiologic Factor Removal: Drug-Navigated Clearance System (DNCS). *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2017;65:649-652.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 山岡哲二. 「DNCS: 病因物質をナビゲートする新しい創薬を目指して」 遺伝子・デリバリー研究会 第 15 回シンポジウム. 2015-2016 年
2. 神戸裕介, 山岡哲二. 「血中病因物質の

捕捉及び異所代謝経路への誘導を目指したキメラタンパクナビゲーターの開発」第44回医用高分子シンポジウム。2015-2016年

3. 神戸裕介, 山岡哲二. 「血中ベータ2ミクログロブリンの捕捉・除去を行う遺伝子組換えナビゲーター薬剤の開発」第15回日本再生医療学会総会。2015-2016年
4. 松本真依, 神戸裕介, 馬原淳, 大矢裕一, 山岡哲二. 「抗2mg抗体-ApoE化学結合体による2-ミクログロブリンの肝細胞への誘導」第15回日本再生医療学会総会。2015-2016年
5. Kambe Y, Yamaoka T. Development of chimeric navigator to capture and remove beta2-microglobulin in the blood. 10th World Biomaterials Congress. 2016-2017年
6. 神戸裕介, 山岡哲二. 「血中病因物質を捕捉し、異所代謝経路へ誘導するキメラタンパクナビゲーターの開発」第65回高分子学会年次大会。2016-2017年
7. 神戸裕介, 山岡哲二. 「病因物質の代謝経路のスイッチングを行うキメラタンパクナビゲーター分子の開発」日本バイオマテリアル学会シンポジウム2016。2016-2017年
8. 古屋敷賢人, 神戸裕介, 平野義明, 山岡哲二. 「血中病因物質を捕捉し、異所代謝経路へ誘導する”ナビゲーター薬剤”の開発」第17回遺伝子・デリバリー研究会。2017-2018年
9. 古屋敷賢人, 神戸裕介, 平野義明, 山岡哲二. 「スパイタグ スパイキャッチャー反応を利用した血中病因物質除去用ナビゲーター分子の開発」第66回高分子学会年次大会。2017-2018年
10. Yusuke Kambe, Tetsuji Yamaoka. 「Development of a chimeric navigator to switch the metabolic pathway of an etiologic agent」第66回高分子学会年次大会。2017-2018年

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

(1)名称：体内に存在する病因物質の低下剤
発明者：山岡哲二、斯波真理子、馬原 淳、加藤良仁
権利者：同上
種類：特許
番号：未定
取得年月日：2018年3月6日
国内外の別：海外 欧州特許登録(2018.3.6)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kyoto-cvs.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

湊谷謙司(MINATOYA KENJI)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20393241

(2)研究分担者

山岡哲二(YAMAOKA TETSUJI)

国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：50243126