

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16335

研究課題名(和文) 生体内病因物質の捕捉・異所代謝経路への誘導を行うキメラタンパク薬剤の設計開発

研究課題名(英文) Development of a chimeric navigator to capture and remove an etiologic agent in the blood

研究代表者

神戸 裕介 (Kambe, Yusuke)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：30747671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体内病因物質を捕捉し、異所代謝経路へ誘導するDrug-navigated clearance systemでは、捕捉と誘導の両機能を示す「ナビゲーター」の合成を要する。本研究では、透析アミロイドーシスの病因であるβ2ミクログロブリン(β2MG)を肝臓へと誘導するナビゲーターの開発に取り組んだ。キメラタンパク技術により作製したナビゲーターは、In vitroで、β2MG捕捉能、肝細胞結合能及び肝細胞培地中のβ2MG除去能を示した。これより、in vitroでの病因物質の代謝経路のスイッチングが明らかとなった。一方、in vivoでのナビゲーターの機能は不十分であり、改善が望まれる結果となった。

研究成果の概要(英文)：In the drug-navigated clearance system, a drug called “navigator” needs to be synthesized to switch the metabolic pathway of an etiologic agent. Here, dialysis-related amyloidosis was used as a model disease and its etiologic agent, beta 2-microglobulin (β2MG), was targeted to switch its metabolic pathway from the kidney to the liver. A navigator composed a capturing part and a navigating part was developed as a chimeric protein, and its functions were evaluated. In vitro, immunoprecipitation and competitive inhibition assays showed that the navigator captured β2MG and bound to LDL-receptor, which is highly expressed on hepatocytes, respectively. Additionally, the removal of β2MG from the culture medium of hepatocytes by the navigator was shown in an ELISA. Although the navigator accumulated in the liver when injected intravenously, the body distribution of β2MG in mice unchanged regardless of the introduction of the navigator. In vivo functions of the navigator need to be enhanced.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：キメラタンパク メタボリックスイッチング DDS DNCS バイオマテリアル

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、「生体内病因物質を、生体が備えている別の分解・排泄機構へと誘導する（メタボリックスイッチング）ための技術，方法論」である“Drug-Navigated Clearance System (DNCS)”を提唱してきた（特許 5429804 号，US Patent US8,834,887,B2）。具体的には、「病因物質を捕捉する機能」と「別の代謝経路へと誘導する機能」とを併せ持つ“ナビゲーター”を体内に導入することで，病因物質の低減を図る疾患治療システムである。

DNCS による治療の対象となる疾患の一つに，透析アミロイドーシスが挙げられる。本疾患は，腎機能の低下・障害による $\beta 2$ ミクログロブリン（ $\beta 2$ MG）の血中濃度の増加が原因である。 $\beta 2$ MG を除去するために，現在は，特殊な透析やアフエーシスが行われているが，患者の QOL の低下や高額な医療費が問題となり，新たな治療法が望まれている。そこで，我々の研究グループは，DNCS による血中 $\beta 2$ MG 除去のコンセプトの確立を目指している。

これまでの DNCS 研究では，市販のタンパクや糖を出発点とする半合成によってナビゲーターが作製されてきた。しかし，ナビゲーターの合成効率や機能が不十分で，*in vivo*での DNCS の実証には至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究では，複数の機能性タンパクの恒常的な融合およびアミノ酸配列レベルでの分子設計による機能増強・改変を可能とするキメラタンパク技術を利用し，ナビゲーターを合成すること，そして，合成したナビゲーターの機能を *in vitro*，*in vivo* で評価し， $\beta 2$ MG のメタボリックスイッチングを可能とするナビゲーターを開発することを目指している。

### 3. 研究の方法

ナビゲーターの合成: $\beta 2$ MG 捕捉分子として，主要組織適合遺伝子複合体の $\alpha$ 鎖およびその内の $\alpha 3$ ドメインを選択した。一方， $\beta 2$ MG の誘導先を肝臓とし，そこへの誘導分子として，LDL レセプターとの親和性を示すアポリポタンパク E の N 末端領域（ApoE NTD）を選択した。そして，両者のリンカーとして，

一本鎖抗体のリンカーとしても多用される GGGGS の三回繰り返し配列を選んだ。

遺伝子組換え大腸菌を利用し，N 末端から，ApoE NTD，(GGGGS) $_3$ ， $\alpha$ 鎖もしくは $\alpha 3$ ドメインが融合したタンパク（ナビゲーター）をコードする DNA を作製した。なお，CD8 陽性細胞によるトラップを低減するよう， $\alpha$ 鎖および $\alpha 3$ ドメインには，D227K の点変異を導入した（Mol Immunol 2000;37:141-9）。得られた DNA を大腸菌用発現ベクターに挿入し，ナビゲーターの発現を行った。そして，Ni キレートカラムおよびゲル濾過カラムを用いて，大腸菌抽出液からナビゲーターを精製した。精製後，PBS 中にて透析したところ，ApoE NTD-(GGGGS) $_3$ - $\alpha$ 鎖は析出したため，以降の機能評価には ApoE NTD-(GGGGS) $_3$ - $\alpha 3$ から成るナビゲーターを用いた。

また，ナビゲーターの誘導分子（ApoE NTD）の機能を評価するため， $\alpha 3$ ドメインの代わりに緑色蛍光タンパク（Umikinoko-Green, UKG）が ApoE NTD-(GGGGS) $_3$ と融合した ApoE NTD-(GGGGS) $_3$ -UKG も合成した。

ナビゲーターの *in vitro* 機能評価: ナビゲーターと $\beta 2$ MG との混合に，抗 $\beta 2$ MG 抗体および抗 $\alpha 3$ ドメイン抗体固定化磁気ビーズを添加し，得られた沈降物を SDS-PAGE もしくは抗 $\beta 2$ MG 抗体を用いた western blot により解析した。なお，それぞれの抗体の特異性は事前に確認した。

ApoE NTD-(GGGGS) $_3$ -UKG と脂質（1,2-ジミリスチル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン，DMPC）とを混合し，両者の複合体を形成した。これにより，ApoE NTD が構造変化を起こし，LDL レセプター結合サイトが露わになることが知られている（J Lipid Res 1999;40: 93-9，Prog Lipid Res 2011;50:62-74）。なお，複合体の形成は，蛍光相関分光法によって求めた分子の拡散係数が減少したことにより確認した。得られた ApoE NTD-(GGGGS) $_3$ -UKG-DMPC 複合体を，マウス正常肝細胞（NMuLi）の培地に加えた。この際，市販のリコンビナント ApoE と DMPC との複合体を様々な濃度で追加した。そして，一定時間インキュベートした後，共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光観察を行った。

NMuLi の培地に $\beta$ 2MG およびナビゲーター-DMPC 複合体を加え、一定時間インキュベートした後、培地を回収した。そして、抗 $\beta$ 2MG 抗体固定化プレートを用いた ELISA を行い、回収した培地に含まれる $\beta$ 2MG 量を測定した。

ナビゲーターの *in vivo* 機能評価：近赤外線蛍光化学物質 (Alexa750) で蛍光ラベル化したナビゲーター (Alexa750-ナビゲーター) と DMPC との複合体を健常 C57BL/6 マウスに尾静注した。適切な麻酔下で開腹し、注入から 1 時間にかけて *in vivo* イメージャーを用いた蛍光観察を行った。注入から 1 時間後にヘパリン化 PBS を還流した後、臓器を回収し、蛍光観察を行った。

Alexa750 で蛍光ラベル化した $\beta$ 2MG を、等モル量のナビゲーター-DMPC 複合体と共に室温で 1 時間インキュベートした。この溶液を健常 C57BL/6 マウスに尾静注し、上記と同様に *in vivo* イメージングを行った。

#### 4. 研究成果

キメラタンパク技術によって合成したナビゲーターの収率は、大腸菌懸濁液 1 L あたり 100 mg 以上であり、その純度は 90% 以上であった。

免疫沈降法の結果、抗 $\beta$ 2MG 抗体固定化磁気ビーズ、抗 $\alpha$ 3 ドメイン抗体固定化磁気ビーズに $\beta$ 2MG が結合していた。これより、ナビゲーターの $\beta$ 2MG 捕捉能が示された。

NMuLi の培地に単独で加えられた ApoE NTD-(GGGGS)3-UKG は、細胞表面にほとんど結合しなかった。一方、DMPC と複合体を形成した ApoE NTD-(GGGGS)3-UKG は、細胞表面に結合した。また、この結合は、市販リコンビナント ApoE-DMPC 複合体の添加量が増すごとに、より阻害された。これらの結果は、ApoE NTD を有するナビゲーターが ApoE と同じ機構、すなわち、LDL レセプターを介して肝細胞表面に結合できることを示唆している。

ELISA による NMuLi の培地中に含まれる $\beta$ 2MG を定量した結果、ナビゲーター-DMPC の添加により、培地中の $\beta$ 2MG 量が有意に減少することが示された。ナビゲーター-DMPC を添加していない場合、培地中の $\beta$ 2MG 量は、実験開始直後から 6 時間にかけて、ほぼ一定だった。一方、ナビゲーター-DMPC を添加

した場合、培地中の $\beta$ 2MG 量は、6 時間で、およそ 70% に減少した。

静脈投与された Alexa750-ナビゲーター-DMPC 複合体は、投与後 1 時間で、その 70% 近くが肝臓に集積することが分かった。これより、ナビゲーターの肝臓誘導能が示唆された。しかし、静脈投与された Alexa750- $\beta$ 2MG は、等モル量のナビゲーター-DMPC 複合体の有無に関わらず、投与量の約 35%、50% がそれぞれ肝臓、腎臓に集積した。

以上より、本研究で作製したナビゲーターが、*in vitro* において、 $\beta$ 2MG のメタボリックスイッチングを可能とすることが明らかとなった。しかしながら、 $\beta$ 2MG と等モル量血中投与されたナビゲーターは、 $\beta$ 2MG の体内動態に影響を及ぼさなかった。ナビゲーター自体は肝臓への集積能を示したことから、ナビゲーターの $\beta$ 2MG 捕捉能の強化の必要性が見出された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

- 1) Kambe Y, Yamaoka T: 「Development of chimeric navigator to capture and remove an etiologic agent in the blood」, 第 64 回高分子学会年次大会, 2015/5/29, 札幌コンベンションセンター
- 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, 2015/7/27, 産業技術総合研究所臨海副都心センター
- 3) 神戸裕介, 山岡哲二: 「血中  $\beta$ 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, 2016/3/17, 大阪国際会議場
- 4) Kambe Y, Yamaoka T: 「Development of chimeric navigator to capture and remove beta2-microglobulin in the blood」, 10th World Biomaterials Congress, 2017/5/19, Montreal Convention Center
- 5) 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, 2016/5/26, 神戸国際  
会議場

- 6) 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,  
2016/11/22, 福岡国際会議場

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

- 1) [http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/bio  
medical\\_engineering/13-theme06.html](http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/bio<br/>medical_engineering/13-theme06.html)  
2) 神戸裕介:第 44 回医用高分子シンポジウ  
ム PostDoc 奨励発表最優秀賞, 2015/7/27

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

神戸 裕介 (Kambe Yusuke)

国立研究開発法人国立循環器病研究センタ  
ー・研究所・流動研究員

研究者番号 : 30747671