

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08042

研究課題名(和文) ウイルス感染細胞特異的ドラッグデリバリーシステムによる狂犬病治療法の開発

研究課題名(英文) Development of treatment of rabies using drug delivery system to virus-infected cells

研究代表者

加来 義浩 (Kaku, Yoshihiro)

国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官

研究者番号：70392321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：狂犬病ウイルス(rabies virus; RABV)の増殖阻害効果を示す人工小型抗体(single chain variable fragment; scFv) (scFv-P19)を発現する遺伝子を、効率的に神経組織へ送達することを目的として、新規ナノ粒子を開発した。scFv-P19のエピトープマッピングを行い、RABV-P蛋白質のN末端に近い6アミノ酸残基の幅に絞り込むことができた。また発現効率の低いscFvによるRABV増殖阻害効果を測定するために、scFv/GFP共発現ベクターを導入した細胞をflow cytometryに供し、scFv/GFP発現細胞のみを選別する方法を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ナノ粒子を用いて抗RABV人工小型抗体遺伝子を神経組織へ効率的に送達するための技術基盤が整備された。また、RABVの増殖阻害効果を示す人工小型抗体のエピトープが特定されたことや、発現効率の低い小型抗体のRABV増殖阻害効果の測定系が構築されたことにより、小型抗体を利用した狂犬病の治療法開発に向けた展望が開けた。ナノ粒子による遺伝子の神経組織への送達は、アルツハイマー病、パーキンソン病といった難治性神経疾患についても、応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed novel nanoparticles aiming to efficiently deliver a gene expressing a small artificial antibody molecule (single chain variable fragment; scFv), scFv-P19, which showed an inhibitory effect on the growth of rabies virus (RABV), to nervous tissue. By conducting epitope mapping of scFv-P19, we were able to narrow down the range of epitope of scFv-P19 to 6 amino acid residues near the N-terminus of RABV-P protein. In addition, in order to measure the RABV growth inhibitory effect of scFv having low expression efficiency, we developed a method of selecting only scFv/GFP-expressing cells from the cells transfected with the scFv/GFP co-expression vector using flow cytometry, to be subjected to measure the RABV growth inhibitory effect of scFvs.

研究分野：ウイルス学

キーワード：scFv 狂犬病 ナノ粒子 DDS 経鼻接種

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

狂犬病は、狂犬病ウイルス (Rabies virus: RABV) を原因とする人獣共通感染症である。痙攣・麻痺など神経症状を主徴とし、世界で毎年 55,000 人以上の死者を出しているほか、動物衛生上も甚大な被害をもたらしている。狂犬病は、感染後であっても、速やかに予防的なワクチン接種を行えば発症を阻止できるが、ひとたび発症すると致死率はほぼ 100% であり、確実な治療法はない。2004 年、米国において、発症後のヒトに人為的に昏睡状態を誘導し、複数の抗ウイルス薬を投与することで回復した症例が初めて報告された。その後複数の医療機関が同様の方法を試みたが、成功例はきわめて限られており、狂犬病の治療につながる基礎知見の蓄積が強く求められてきた。RABV は血流を介さず、神経細胞から神経細胞へと伝達されることから、我々は細胞内に導入した人工小型抗体 (single chain variable fragment; scFv) による治療法に着目した。これまでに、RABV 蛋白質に対する scFv を作製し、抗 RABV P 蛋白質 (RABV-P) scFv 1 クローンが、*in vitro* で細胞内発現抗体 (intrabody) として RABV 増殖阻害効果を示すことを明らかにした。また、scFv 遺伝子を脳へデリバリーするためのナノ粒子の構築を進めてきた。

### 2. 研究の目的

抗 RABV scFv 遺伝子を封入したナノ粒子について、脳組織への効率的なデリバリー法を開発し、*in vivo* における RABV 増殖阻害効果を検証することを目的とする。当初の計画では、抗 RABV scFv 遺伝子を封入したナノ粒子を血中に投与し、血液脳関門 (BBB) を通過させて脳実質へ送達することを目指し、BBB 透過性分子と RABV 感染細胞特異マーカーで修飾したナノ粒子の開発を計画していた。しかし近年、経鼻接種により、薬剤を脳実質へ送達する技術が報告され、Drug delivery system (DDS) 研究において進展が期待される分野のひとつになっている。経鼻接種による脳内への薬物移行メカニズムは完全に明らかにされていないものの、血中投与より低い侵襲性で効果が期待できることから、本研究においても経鼻接種を前提にナノ粒子の開発を進めることとした。同時に、これまでに RABV 増殖阻害効果が示された抗 RABV-P scFv クローン (P19) について、その作用機序を明らかにすることを目的としてエピトープマッピングを行う。また他の抗 RABV scFv クローンの性状解析を進めるため、発現効率の低い scFv にも応用可能な RABV 増殖阻害効果測定系の構築を進める。

### 3. 研究の方法

#### 1) RABV 増殖阻害効果を有する scFv クローンのエピトープマッピング

我々のこれまでの研究で、intrabody として発現させると RABV の増殖阻害効果を示す scFv-P19 について、認識するエピトープは linear であり、RABV-P の N 末端から 19~52 残基の間に存在すると明らかにした。同領域は、RABV-P の 5 種の isoform (P1, P2, P3, P4, P5) のうち、P2 および P3 の開始コドンの間に位置する。本研究において、エピトープの範囲をさらに絞り込むため、RABV の N 末端を段階的に欠失した P1 の cDNA (図 1) を pCAG-MCS2-FOS ベクターにサブクローニングした。これらのプラスミドをヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞に transfection して transient に発現させ、10% ホルマリリン + 0.4% Triton X により固定と permeabilization を行った。これに精製 scFv-P19 を反応させ、マウス抗 anti-myc タグ抗体および FITC 標識抗マウス IgG 抗体を用いて間接蛍光抗体法 (IFA) を実施した。

#### 2) 発現効率の低い scFv にも応用可能な RABV 増殖阻害効果測定系の構築

我々のこれまでの研究で、scFv-P19 を含めた全 4 クローンの抗 RABV-P scFv 遺伝子、および RABV とは無関係な蛋白質に対する scFv として、抗ルーセットオコウモリ IgG (bat-IgG) に対する scFv 遺伝子を pCAG ベクターにクローニングした。これらを哺乳動物細胞に transfection し、intrabody として発現させたが、scFv-P19 を除く 3 クローンの抗 RABV-P scFv (P38, P80, P115) および抗 bat-IgG scFv については細胞内の発現効率が低く、RABV 増殖阻害効果の検証に供することができなかった。本来ならば scFv-P19 の RABV 増殖阻害効果を検証するためには、scFv-P19 発現細胞と、(陰性対照として) 抗 bat-IgG scFv 発現細胞における RABV 増殖レベルを比較するべきであるが、上述のとおり両 scFv の発現効率に著しい差があったため、これらの細胞間での RABV 増殖レベルを比較することができなかった。

そこで、各 scFv の発現効率を均一にするとともに、また scFv 発現細胞のみを選択して増殖阻害効果の検証に供することを目的に、各 scFv 遺伝子のコドンをもとに最適化した (P19m, P38m, P80m, P115m, bat-IgGm)。次にこれらの遺伝子を、pIRES2-AcGFP1-Nuc ベクターにサブクローニングし、IRES を挟んで 5' 側に scFv 遺伝子、3' 側に核内発現型 GFP 遺伝子を配置した。さらに同ベクターから scFv-IRES-AcGFP1-Nuc 遺伝子を pCAG ベクターにサブクローニングし、5 種類の scFv-IRES-AcGFP1nuc/pCAG ベクターを作製した。これらのプラスミドを MNA 細胞に transfection し、翌日に GFP の発現を確認するとともに、先述の方法で scFv の発現を確認した (ただし 2 次抗体には TRITC 標識抗マウス IgG 抗体を使用した)。また transfection 翌日に、細胞を flow cytometry に供し、GFP 発現細胞のみをソーティングすることで、scFv 発現細胞だけを選択できる系の構築を試みた。

#### 3) scFv 遺伝子封入ナノ粒子の作製および改良

scFv 遺伝子を、経鼻接種により脳組織にデリバリーすることを目的に、抗 RABV-scFvP19 発現

プラスミド DNA とポリカオチンリポソーム (PCL) から形成されるナノ粒子を開発した。研究期間内に、組成の異なる 3 種類の PCL を作製し、*in vitro* における scFv 遺伝子の導入効率、細胞毒性を検討した。経鼻接種において核酸のデリバリー効率を高めるためには、「ナノ粒子の粒子径およびゼータ電位が重要となることから、「粒子径<300nm」「正のゼータ電位」を維持しつつ、高用量の核酸を封入できるナノ粒子を開発することを目的に、PCL の改良を重ねた。またマウス経鼻接種では、投与できるナノ粒子液量が 1 回 (= 1 日) あたり 20-30ul 程度に限られるため、ナノ粒子液の濃縮方法についても検討を加えた。

#### 4) ナノ粒子の *in vitro* 接種による scFv 発現の評価

上記 3) において開発した、マウス経鼻接種に応用可能となる「粒子径<300nm」「正のゼータ電位」「高濃度核酸の封入」の条件を備えた PCL-2 を用いて、まず濃縮前のナノ粒子を用いて *in vitro* における発現効率・細胞毒性の検証を行った。具体的には、PCL-2 を段階的に希釈し、1 $\mu$ g/50 $\mu$ l の scFv-P19m/pCAG と混合し、それぞれの PCL/DNA 比 (mM/ $\mu$ g) = 0.25 にそろえてマウス神経芽腫由来 MNA 細胞に接種した。接種 4 時間後に培地を交換し、さらに 20 時間培養後、細胞毒性を観察したうえで、ホルマリリン + 0.4% Triton で固定した。これを用いて scFv-P19 の発現状況を解析するために、マウス anti-myc タグ抗体と FITC 標識抗マウス IgG 抗体を用いて IFA を実施した、2 次抗体液には 0.002% evansblue を加え、カウンターステインを行った。続いて、濃縮後のナノ粒子を用いて *in vitro* における発現効率・細胞毒性の検証を行った。具体的には、下記「4. 研究成果 (3)」に示した方法により PCL-2 と核酸を混合後、濃縮し、得られた濃縮ナノ粒子液を  $\times 1 \sim \times 4096$  まで 4 倍階段希釈して、96-well プレートの MNA 細胞に 5 $\mu$ l/well ずつ接種した。その後、濃縮前のナノ粒子接種時と同様のプロトコールで培養後、細胞毒性の観察と IFA を実施した。

#### 5) ナノ粒子のマウス経鼻接種による scFv 発現の評価

4 ヶ月齢の ICR マウス (メス) 22 匹を 8 群に分けて、異なる組成の scFv-P19m 発現ナノ粒子および対照ナノ粒子を接種した。各群に接種したナノ粒子の詳細および接種・採材スケジュールを表 2 に示した。

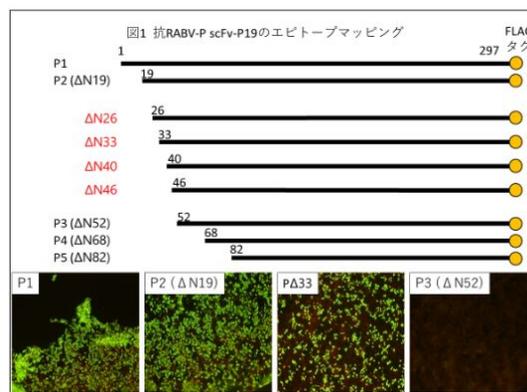
経鼻接種は以下の方法で行った。マウス・ラット用麻酔マスク (シナノ製作所) により 2% イソフルランで吸入麻酔下のマウスを仰向けに固定した。各ナノ粒子液を、マイクロピペットを用いて左右の鼻孔に交互に 1 $\mu$ l ずつ、1 回 / 1 分以上の間隔を開けて接種した。またマウス生体における遺伝子の導入・発現確認のため、一部のナノ粒子液については、group 8 のマウス 2 匹の左右後肢の腓腹筋に、30G シリンジを用いて各 50 $\mu$ l ずつ接種した。

表 2 に示すスケジュールに沿って、安楽殺した個体から頭部および左右後肢を切除した。頭蓋骨を除き大脳を露出させた頭部検体および左右後肢を、4% パラホルムアルデヒドで 48 時間、4 で固定した。国立感染症研究所 感染病理部 飛梅実博士の協力を得て、以下の方法で scFv の発現を解析した。頭部検体は鼻腔と脳を同時に標本とするため、固定後 10% EDTA 溶液で脱灰を行った。パラフィン包埋後、薄切標本を作製し、1 次抗体として抗 myc マウスモノクローナル抗体、2 次抗体として HRP 標識抗マウス IgG ラット抗体を用いて免疫組織化学染色を実施し、scFv の発現を確認した。

## 4. 研究成果

### 1) RABV 増殖阻害効果を有する scFv クローンのエピトープマッピング

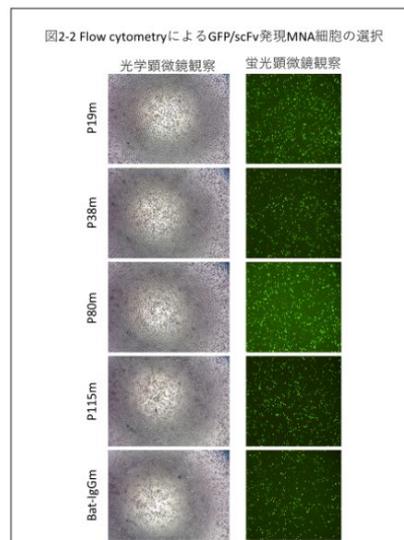
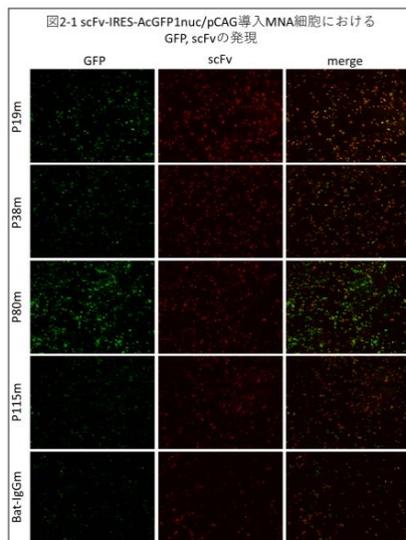
*in vitro* におけるウイルス増殖阻害効果を確認済みの抗 RABV-P 蛋白質 scFv クローン (scFv-P19) について、エピトープマッピングを行い、P 蛋白質の N 末端に近い 6 アミノ酸残基の幅に絞り込むことができた。同領域については、過去に L 蛋白質との相互作用に与与する可能性を示唆する報告がなされていることから、同 scFv が P 蛋白質と L 蛋白質の結合を阻害する可能性が示唆されたことから、岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科の伊藤直人博士および牧野真知子氏の協力を得て、P および L 蛋白質発現細胞 lysate を用いた共免疫沈降法を実施したが、scFv-P19 による P-L 蛋白質間の結合阻害作用は確認できなかった。



### 2) 発現効率の低い scFv にも応用可能な RABV 増殖阻害効果測定系の構築

マウス細胞発現用にコドン最適化した各 scFv 遺伝子 (P19m, P38m, P80m, P115m, bat-IgGm) をクローニングした pIRES2-AcGFP1-Nuc ベクターを、MNA 細胞に transfection し、翌日にこれらの細胞をホルマリリン + 0.4% Triton X で固定後、上述の方法で IFA を実施したところ、全てのクローンにおいて GFP と scFv が同一細胞に共発現していた (図 2-1)。続いて、これらの細胞を flow cytometry に供し、GFP 発現細胞のみをソーティングした。得られた細胞を

96 穴プレートにまきこみ、翌日に蛍光顕微鏡で GFP 発現状況を観察したところ、確認できる全ての細胞が GFP を発現していた(図 2-2)。これらの結果から、pIRES2-AcGFP1-Nuc ベクターを transfection し、GFP 発現細胞をソーティングすることで、scFv 発現細胞のみのポピュレーションが得られることが確認できた。その一方で、ソーティング翌日の細胞には多くの死細胞も含まれており、scFv クローンごとにその割合も異なっていた。各 scFv 発現細胞における RABV 増殖阻害効果を比較するためには、細胞数をそろえた状態で RABV を接種することが必須であることから、ソーティング条件の変更で生細胞のみを選択することや、ソーティングで得られた細胞から恒常発現細胞をクローニングすることを進めている。



### 3) scFv 遺伝子封入ナノ粒子の作製および改良

研究期間内に、組成の異なる 3 種類の PCL (PCL-0, PCL-1, PCL-2) を作製した。各 PCL の組成は、以下の通りである。

■PCL-0: dicetylphosphate-diethylenetriamine 誘導体 (DCP-DETA)/コレステロール(Chol)/ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)(混合比: 1/1/1)

■PCL-1: dioleoylphosphate-diethylenetriamine (DOP-DETA)/Chol/ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)(同: 2/2/1)

■PCL-2: DOP-DETA/DCP-DETA/Chol(同: 2/1/2)

まず PCL-0 を用いて、5mM の PCL 液を段階的に希釈したうえで、1 $\mu$ g のプラスミド DNA (scFv-P19/pCAG) と混合し、PCL:DNA 比が異なる複数のナノ粒子を形成させた。これらを MNA 細胞に接種し、発現効率および細胞毒性を検証した。対照に使用した市販の transfection 試薬 (Fugene HD, Promega) に比べて発現効率が劣ったことから、組成を改良し、PCL-1 を作製した。PCL-1 を用いて、上記と同様に段階的に PCL:DNA 比を変えたうえで、MNA 細胞における発現効率および細胞毒性を検証した。結果として、発現効率は Fugene HD に及ばなかったものの、PCL-0 に比べて発現効率の上昇、細胞毒性の低減が認められた。

上記の発現実験では、ナノ粒子液中における核酸濃度は最大でも 0.02 $\mu$ g/ $\mu$ l であった。一方、経鼻接種による効率的なデリバリーを達成するには、「粒子径 < 300nm」「正のゼータ電位」を維持しつつ、さらに高濃度の核酸を封入できるナノ粒子を使用する必要があることから、ナノ粒子液中における核酸濃度を 1 $\mu$ g/ $\mu$ l まで高めることを目標として組成の改良を進め、PCL-2 を作製した。PCL-2 を用いた発現効率・細胞毒性の検証は、次項に示す。

続いて、PCL-2 液 (5mM) と低濃度核酸 (0.05 $\mu$ g/ $\mu$ l) を混合後に濃縮を行い、核酸濃度 1 $\mu$ g/ $\mu$ l のナノ粒子液を 20 $\mu$ l 作製する方法を開発した。具体的には、実際の接種に供する核酸 20 $\mu$ g (scFv-P19m/pCAG および scFv-P19m 発現 mRNA) を 0.05 $\mu$ g/ $\mu$ l (400 $\mu$ l) に調製し、240 $\mu$ l の 5mM PCL-2 と混合したあとで濃縮遠心機に供することで、最終的に 20 $\mu$ l まで濃縮した。濃縮前後の粒子径およびゼータ電位を測定したところ、一部の検体を除き「粒子径 < 300nm」「正のゼータ電位」が維持されていることを確認した(表 1)。これにより、高用量核酸 (20 $\mu$ g) の封入とともに、マウス経鼻接種における接種液量の低減が可能となった。

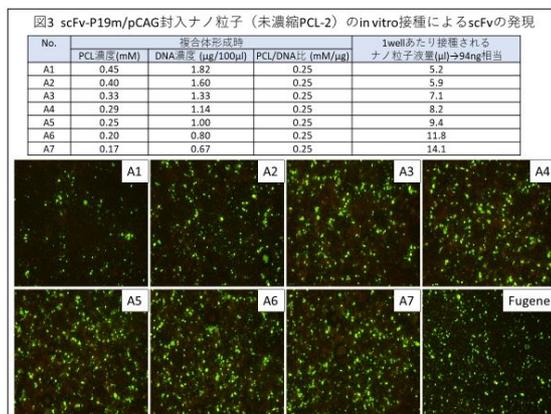
表1 scFv-P19m発現プラスミドDNA/mRNA封入ナノ粒子の粒子径およびゼータ電位の測定

検体No.	検体詳細	濃縮	粒子径 (nm)	ゼータ電位 (mV)
1	5mMPCL+DNA	+	200.7	+21.2
2	3.3mMPCL+DNA	+	999.9	-42.8
3	5mMPCL+mRNA	+	216.5	+18.2
4	3.3mMPCL+mRNA	+	209.8	+4.2
5	5mMPCLのみ	+	127.1	-0.0
6	3.3mMPCLのみ	+	125.4	-0.0
7	5mMPCL+DNA	-	3610.0	-28.4
8	5mMPCLのみ	-	126.0	+29.5
9	Fugene+DNA	-	2665.0	-13.3
10	Fugeneのみ	-	158.2	+27.3

### 4) ナノ粒子の in vitro 接種による scFv 発現の評価

まず未濃縮の scFv-P19m/pCAG 封入 PCL-2 ナノ粒子を接種した MNA 細胞について、(接種 4 時間後に培地を交換したうえで) 接種 24 時間後に細胞毒性を観察した。ナノ粒子接種細胞では、未接種細胞に比べて細胞の増殖レベルは下がっているものの、Fugene HD による

transfection を実施した細胞と比較して顕著な細胞毒性は観察されなかった。PCL 濃度の異なる各ナノ粒子接種細胞における scFv-P19m の発現状況の比較を図 3 に示した。PCL を希釈せずに使用（核酸との複合体形成時の PCL 濃度：0.45mM）した場合と比較し、PCL を希釈したとき（同濃度 0.25 - 0.17mM）の方が発現効率は高かった。PCL 濃度 0.25 - 0.17mM においては、scFv が高発現している細胞の割合は、Fugene HD 使用細胞と同等であった。一方、カウンステインによる細胞質の発色状況が異なることから、scFv が低発現している細胞の割合は Fugene HD 使用細胞を下回っていると考えられた。



続いて、濃縮後の scFv-P19m/pCAG 封入 PCL-2 ナノ粒子について、上記と同様に細胞毒性および scFv 発現状況を解析した。対照として、同様の方法で濃縮した scFv-P19m/pCAG 封入 PCL-1 ナノ粒子を用いた。PCL-1, PCL-2 とともに、X16 希釈までは細胞毒性が出現しており、細胞毒性の程度は PCL-2 の方が強かった。一方、scFv-P19m の発現は PCL-1 よりも PCL-2 の方が高かった。濃縮 PCL-2 による発現レベルは、未濃縮 PCL-2 による発現を大きく下回っていたものの、濃縮 PCL-2 は in vivo（経鼻接種）における発現を最適化するために開発された組成であるため、in vitro における発現が未濃縮 PCL-2 を下回ることが想定内であった。また細胞毒性の出現に関しても、in vitro における培養された単層細胞で得られた結果と、実際の動物組織で得られる結果は異なることが予想されるため、当初の計画どおり濃縮 PCL-2 を in vivo 経鼻接種に利用することとした。また経鼻接種の際は、濃縮 PCL-2 接種マウス群とともに未濃縮 PCL-2 接種マウス群も用意し、scFv 発現を比較することとした。

### 5) ナノ粒子のマウス経鼻接種による scFv 発現の評価

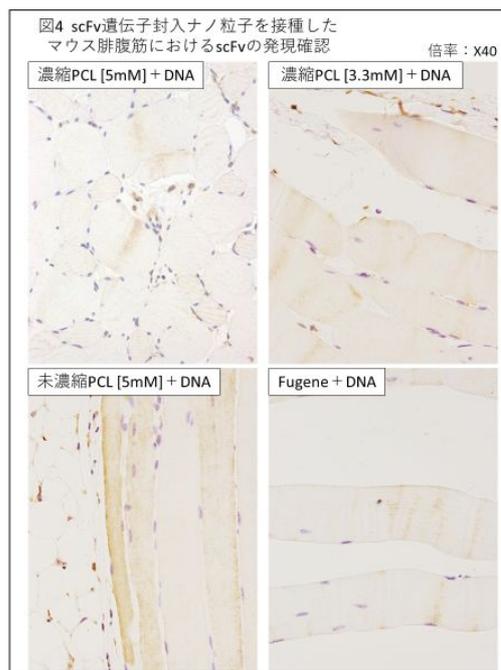
当初の計画では、2020年3月にマウス経鼻接種実験を実施する予定であったが、新型コロナウイルス SARS-CoV-2 流行に伴い、国立感染症研究所戸山庁舎動物実験施設における新規動物実験は原則中止となり、本実験の開始は6月中旬まで延期された。このため、採材後の脳検体については、脱灰処理および scFv 発現解析が本報告書提出期限の7月15日までに完了できなかった。

マウス生体における遺伝子の導入・発現確認のため、scFv 遺伝子を封入した4種類のナノ粒子液（濃縮 PCL [5mM] + DNA、濃縮 PCL [3.3mM] + DNA、未濃縮 PCL + DNA、Fugene + DNA）を接種した、マウス2匹の左右後肢の腓腹筋については、穿刺痕周囲の組織を採取し、免疫染色後に観察した。その結果、いずれも接種部位周辺の線維芽細胞、筋細胞、脂肪細胞等に scFv の発現が確認された（図4）。

表2 ナノ粒子マウス経鼻接種スケジュール

Group	ナノ粒子詳細	匹	スケジュール(日)							
			1	2	3	4	5	6	7	
1-1D1	濃縮PCL [5mM] + DNA	2	I	F						
1-2D1	濃縮PCL [3.3mM] + DNA	2	I	F						
1-1D2	濃縮PCL [5mM] + DNA	2	I	I		F				
1-2D2	濃縮PCL [3.3mM] + DNA	2	I	I		F				
2-1	濃縮PCL [5mM] + mRNA	2	I	I		F				
2-2	濃縮PCL [3.3mM] + mRNA	2	I	I		F				
3-1	濃縮PCL [5mM]のみ	1	I	I		F				
3-2	濃縮PCL [3.3mM]のみ	1	I	I		F				
4	未濃縮PCL [5mM] + DNA	2	I	I	I		I	I	F	
5	未濃縮PCL [5mM]のみ	1	I	I	I		I	I	F	
6	Fugene + DNA	2	I	I	I		I	I	F	
7	Fugeneのみ	1	I	I	I		I	I	F	
8	陽性対照	2	I	F						

I: Injection (ナノ粒子接種) F: Fixation (安楽殺後、摘出組織を固定)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加来義浩、井上智、野口章、森川茂
2. 発表標題 狂犬病ウイルスの増殖を阻害する抗P蛋白質intrabodyが認識するエピトープの解析
3. 学会等名 第160回日本獣医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshihiro KAKU, Ken-ichi INOUE, Satoshi INOUE, Akira NOGUCHI, Shigeru MORIKAWA
2. 発表標題 Analysis of epitope on rabies virus phosphoprotein recognized by a single chain variable fragment which inhibits rabies virus growth.
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会
4. 発表年 2017年

〔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
研究分担者	浅井 知浩  (Asai Tomohiro)  (00381731)	静岡県立大学・薬学部・教授    (23803)	
連携研究者	井上 智  (Inoue Satoshi)  (90213157)	国立感染症研究所・獣医科学部・室長    (82603)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	野口 章 (Noguchi Akira)  (70342897)	国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官  (82603)	