

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08853

研究課題名(和文) Evaluation of an immunotherapy for chronic pain by expressing a single domain intrabody against the pain marker GCH1 in the rat dorsal root ganglion neurons

研究課題名(英文) Evaluation of an immunotherapy for chronic pain by expressing a single domain intrabody against the pain marker GCH1 in the rat dorsal root ganglion neurons

研究代表者

J・P Bellier (Bellier, Jean-Pierre)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・助教

研究者番号：80346022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：GTPシクロヒドラーゼ(GCH1)は、テトラヒドロピオプテリン(BH4)合成経路の最初の律速酵素です。BH4は、モノアミンおよびニトロ作動性神経伝達物質の生合成に必要な補因子です。GCH1は痛みのマーカーであり、GCH1が不足している、BH4の利用可能性が低い人は、神経因性疼痛が少ないです。このプロジェクトでは、GCH1に対する特異的なモノクローナル抗体を作成します。scFvを作成し、細胞培養で体内として発現しました。GCH1活性をブロックするそれらを評価されました。実験は、体内としてのscFv発現が可能であることを示した。それらの凝集傾向を減少させることによる体内効率の改善も研究された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究課題名：ラットの脊髄後根神経節ニューロン内の痛みマーカーに対して作られたsingle domain intrabodyを用いた免疫療法の慢性疼痛に対する評価

「痛みは避けられないが、でも苦しみは自分次第」・・・村上春樹・・・痛みをどのように感じるか、そのメカニズムを探ることは新規治療法を開発する上で極めて重要である。その目的のために、我々は痛みのマーカーであるGCH1に対する新たな抗体、疼痛を感じるメカニズムを細胞内で遮断する抗体をintrabody(細胞内産生抗体)として作る。

研究成果の概要(英文)：GTP cyclohydrolase 1 (GCH1) is the first and rate-limiting enzyme in the tetrahydrobiopterin (BH4) synthesis pathway. BH4 is a cofactor required for the biosynthesis of monoaminergic and nitroergic neurotransmitters. GCH1 is a pain marker and BH4 level is linked to chronic pain, individuals with deficient GCH1 and low availability in BH4 experience low neuropathic pain. During this project, we produced specific monoclonal antibodies against GCH1, cloned their sequence, and produce single-chain antibodies (scFv). scFv were expressed in cell culture as intrabody, and their potential to block GCH1 activity was tentatively evaluated. Our observation suggested that scFv expression as intrabody is possible, but the aggregation of intrabody in cell jeopardize their action. Improvement of intrabody efficiency by reducing their aggregative propensity was also studied. Developed methods and techniques are shown to be useful to also study highly aggregative proteins such as amyloid-beta 42.

研究分野：Peripheral nervous system

キーワード：GTP Cyclohydrolase 1 tetrahydrobiopterin antibody scfv intrabody

1. 研究開始当初の背景

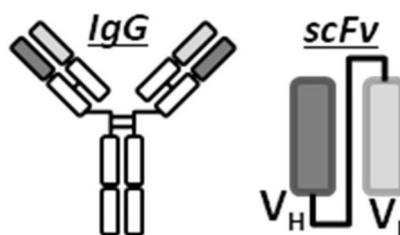
慢性疼痛(特に、神経系の疼痛、および癌による疼痛)の処置には限界がある。現在用いられている鎮痛剤のほとんどが非ステロイド系抗炎症薬、及びCOX2阻害薬である。これらに効果がない場合には、オピオイド鎮痛剤が使われる。オピオイド鎮痛剤は強い鎮痛作用を示すが、しかし耽溺性などの多くの副作用を有する。

GTP cyclohydrolase (GCH1)はモノアミン系神経伝達物質(セロトニン[5-HT]、カテコールアミン類、一酸化窒素[NO])を作るのに必要な補酵素であるテトラヒドロピオプテリン(BH4)の生成に関わる最初で、しかも律速段階で機能する酵素である。人間の場合、GCH1 遺伝子の中に特定の制限酵素切断片多型を持っていると、神経障害性の疼痛が弱いことが示された。これは、GCH1 活性と痛覚消失の関係が極めて強いことを示している。多くの基礎研究及び臨床研究を重ねることにより、テトラヒドロピオプテリン(BH4)が神経障害性疼痛の鍵となることが分かってきた(BH4の産生と慢性疼痛の関係性が、12の独立した集団でGCH1の共通のハプロタイプを調べることにより確認された)。

「疼痛におけるBH4仮説」(Schema 1)によれば、GCH1活性がBH4の産生量を調整し、従って神経伝達物質(一酸化窒素、セロトニン、カテコール)の生産量が制限され、最終的には疼痛が弱められることになる。BH4の過剰な存在は、これら神経伝達物質の過剰な生産につながり、痛みの原因になるようだ。

GCH1の阻害因子を用いた治療の研究では、鎮痛作用を示している。しかし、そのような薬は脊髄後根神経節(DRG)だけでなく、他の組織においてもBH4の産生が抑えられるので、様々な組織において多くの生理機能障害が起きることになる。特に心臓においてはBH4の量が減ることで、一酸化窒素合成酵素型の機能的連結が壊され、心臓の組織全体に酸化的損傷を与える結果につながる。

Schema 2



Schema 1



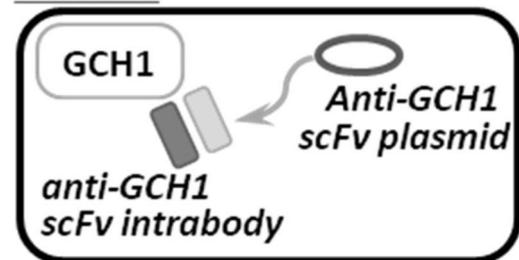
2. 研究の目的

この研究の目的は、GCH1抗体を用いてDRG内のBH4産生を抑えること、そして、このことにより慢性の神経性疼痛を軽減する免疫療法を開発することである。主たる挑戦はGCH1が細胞内に局在することから生じた；モノクローナル抗体(IgG)は、大きすぎて細胞の中に入って行けないので、細胞内区画に接近できない。この研究の目的は、慢性神経性疼痛に対して、生きた細胞の中でGCH1に対する抗体として働くintrabodyを作り、それによって発現される免疫療法を評価することにある。ここで、intrabodyはその標的となる物を特異的に認識し、相互作用して中和した。intrabodyは改良され得るし、可変切片(scFv)の単鎖抗体として知られるものは非常に小さい。scFv(単鎖可変領域フラグメント)は免疫

グロブリン (IgG) (Schema 2;左) の重鎖 (VH) と軽鎖 (VL) の可変領域を短いリンカーでつないだ融合タンパクである。単鎖ペプチドの抗原結合領域を安定性の増加と発現レベルで示すことは便利な方法である

この研究の目的はこのような scFv を作ること、そしてこの作られた scFv が、生きている細胞の中で intrabody (Schema 3) として働き、脊髄後根神経節内の BH4 レベルを減じることで、免疫療法となり得るかどうかを判断し、慢性神経性疼痛に対する新たな鎮痛治療法を開発することにある。

Schema 3



3. 研究の方法

遺伝子操作による抗 GCH1 単鎖抗体の作成

ヒトの GCH1 に対するモノクローナル抗体を作った。そして、in vivo で GCH1 とより強く親和するクローンを、ラット DRG の一次求心性神経の切片を用いた免疫組織化学によって集めた。次に、ウエスタンブロット分析を行い、目的とする大きさの single protein を認識する特異抗体に焦点を絞った。最後に、得られた抗体の BH4 産生抑制能力を in vitro で調べた。最終的に得られた抗体は、従って、自然の状態ですべての標的に強い親和性を有し、特異性にも問題はなく、なおかつ GCH1 (酵素活性を抑える) に対して抑制的、中和的に働いた。

上に得られたハイブリドーマを、抗 GCH1 抗体の可変領域を増幅するために、5'-RACE-RT-PCR 法に供した。RT-RACE PCR 法を用いたのは、IgG の可変領域における塩基配列が未知であったからである。可変領域の塩基配列が未知であるがために特異的プライマーが使えない。そこで、モノクローナル抗体の重鎖 (VH) と軽鎖 (VL) の可変領域をクローンするために、RACE-RT-PCR 法を用いたのである。加えて、データベースを使って塩基配列の分析を行い、CD 領域 (CDR) の体細胞超変異のレベルも同定した。

scFv はモノクローナル抗 GCH1 抗体の重鎖 (VH) と軽鎖 (VL) のそれぞれの可変領域をクローニングすることで構築され、その適合性もコンピュータシミュレーション (in silico) によって検証された。リンカー (15 個のアミノ酸がつながったペプチド) を含む backbone vector に VH と VL を導入した。そしてその構築法には Gibson assembly 法を用いた。また、ヒト細胞内でのコドン最適化と Kozak 配列の導入は後で行うことにした。加えて、scFv の凝集を避けるために親水性のアミノ酸を導入したが、これは scFv を中和する能力の向上にもつながった。

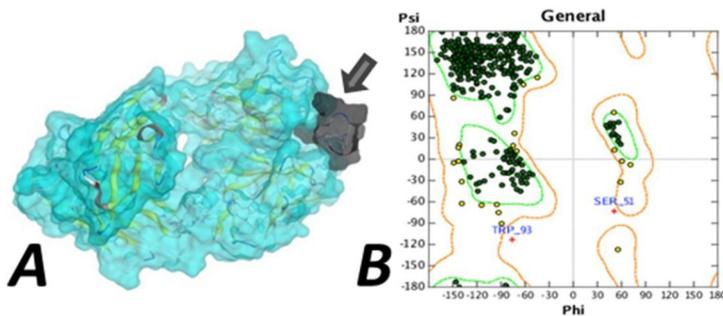
できたものを色々な種類の細胞に導入し、その細胞を共焦点レーザー顕微鏡と高分解能

電子顕微鏡で観察することにより、発現の程度を調べた。また、分子動力学の手法を用いて、抗原と抗体の結合部位を調べ、より特異的に強く結合する抗体を選んだ。

4. 研究成果

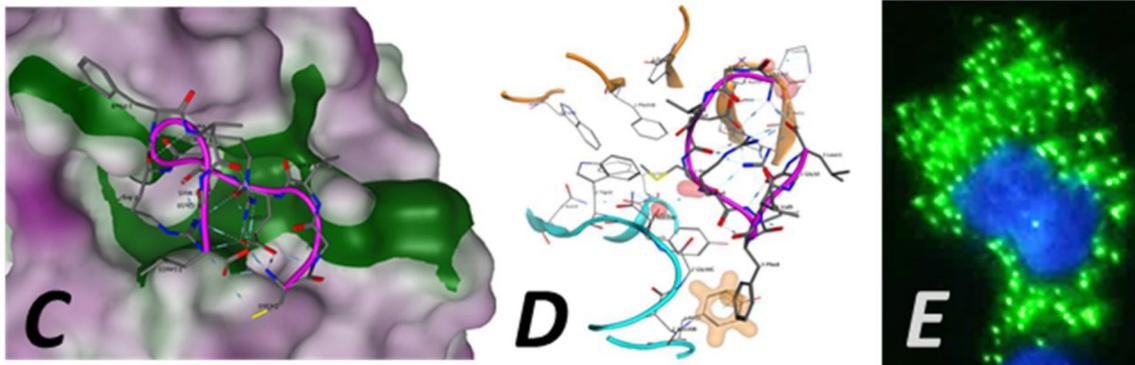
ヒト GCH1 に対して作られたモノクローナル抗体は、ラット DRG の一次求心性神経において GCH1 に対して強く免疫反応を示した。また、すべてのラット DRG ニューロンにきれいに染色された。さらに抗体の分布を調べたところ、上行路を含めて上行性の痛みに関わる全ての要素が観察された。この観察及び目的の大きさのバンドを示したウエスタンブロットの結果を合わせると、得られた抗体はラットの中樞神経系と末梢神経系ともに GCH1 を特異的に認識していることが分かった。BH4 レベルを測定した追加実験では、モノクローナル抗体が *in vitro* で GCH1 に対して、中和能を示すことが分かった。

数種のハイブリドーマクローンの VH 及び VL 領域におけるシーケンシングを、5'-RACE-RT-PCR 法を用いて行った。分子動力学によるシミュレーションは、最適の VH と VL の組み合わせを持つ scFv Intrabody を構築するの役に立った（抗原抗体の形の予想）。GCH1 及びその抗体の X-線画像も得られた。結果を以下に示す。



(A) scFv (青色) とその標的物である GCH1 の想定される相互作用

(B) 想定されたモデルを質的にチェックするための psi-phi のプロット。2つのアミノ酸だけに molecular clash が観察された。これは想定モデルがかなり良いものであることを示している。



- (C)は scFv の想定される抗原結合部位(緑色)と抗原決定基(アミノ酸の鎖をピンク色で示す)における疎水性部分を示す。
- (D)に抗原と抗体の間に働く相互作用(抗原-抗体間に働くイオン結合、水素結合、van der Waals 力)を詳しく示す。
- (E) scFv の塩基配列を有するプラスミドが導入された HEK293 細胞。この細胞は scFv の塩基配列を intrabody として発現する。ただ、intrabody の凝集もあることは注意しなければならない。

今回のこの研究の科学的意義は細胞内の GCH1 を標的にし得ることを明確に立証した点にある。次に、神経障害疼痛には実験的にも臨床的にも BH4 (テトラヒドロピオチン) が関係していることが明らかなので、今回の intrabody を用いた研究は慢性の神経障害疼痛に対する麻酔薬開発の新たな戦略の基礎固めに道を開いたと言える。この意味で、intrabody がヒト GCH1 に対して働く抗体であることに注目する必要がある。従って、GCH1 の変異株が炎症性疼痛を和らげ、癌による疼痛を遅延させることが分かっているので、この報告にある intrabody は慢性の神経障害性疼痛以外の痛みにも応用できるのではないかと考えている。

この研究プロジェクトには3つの大きな特徴がある。まず第一に、ここに述べた intrabody(細胞内産生抗体)は、我々が知る限り、疼痛の治療法となり得る世界で初めてのものである。第二に、細胞内で中和 intrabody を用いて酵素 GCH1 の表現型をロックアウトすることを基礎とする今回のこの方法は、他に類を見ない画期的なものである。最後に、GCH1 の活性を中和するために効果的で顕著な能力をもつ scFv をデザインするのに、分子動力学とタンパク構造想定 of 技術を用いた点である。

GCH1 阻害を目的として開発された薬物療法はしばしば特異性に欠ける。それに対し、ここに示した方法は DRG のみを標的にしており、高い特異性を示すので、他の組織(肝臓、中枢神経系、循環系免疫細胞)の生理機能を損なわずに守ることができる。

今回の研究を通して開発された画像法、抗体のキャラクタリゼーション法や技術は共同研究において有効に利用された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 11件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yuan Pu Qing, Bellier Jean Pierre, Li Tao, Kwaan Mary R., Kimura Hiroshi, Tache Yvette	4. 巻 33
2. 論文標題 Intrinsic cholinergic innervation in the human sigmoid colon revealed using CLARITY, three dimensional (3D) imaging, and a novel anti human peripheral choline acetyltransferase (hpChAT) antiserum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurogastroenterology & Motility	6. 最初と最後の頁 e14030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nmo.14030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mendsaikhan Anarmaa, Tooyama Ikuo, Bellier Jean-Pierre, Serrano Geidy E., Sue Lucia I., Lue Lih-Fen, Beach Thomas G., Walker Douglas G.	4. 巻 7
2. 論文標題 Characterization of lysosomal proteins Progranulin and Prosaposin and their interactions in Alzheimer's disease and aged brains: increased levels correlate with neuropathology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-019-0862-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hamezah Hamidah Shahirah, Durani Lina Wati, Yanagisawa Daijiro, Ibrahim Nor Faeizah, Aizat Wan Mohd, Bellier Jean Pierre, Makpol Suzana, Ngah Wan Zurinah Wan, Damanhuri Hanafi Ahmad, Tooyama Ikuo	4. 巻 111
2. 論文標題 Proteome profiling in the hippocampus, medial prefrontal cortex, and striatum of aging rat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Gerontology	6. 最初と最後の頁 53~64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exger.2018.07.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tano Ayami, Kadota Yosuke, Morimune Takao, Jam Faidruz Azura, Yukiue Haruka, Bellier Jean-Pierre, Sokoda Tatsuyuki, Maruo Yoshihiro, Tooyama Ikuo, Mori Masaki	4. 巻 132
2. 論文標題 The juvenility-associated long noncoding RNA Gm14230 maintains cellular juvenescence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 227801
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.227801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Bellier Jean-Pierre, Yuan Pu-Qing, Mukai-sho Kenichi, Tooyama Ikuo, Tache Yvette, Kimura Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 A Novel Antiserum Against a Predicted Human Peripheral Choline Acetyltransferase (hpChAT) for Labeling Neuronal Structures in Human Colon	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnana.2019.00037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 de Girolamo Paolo, Bellier Jean-Pierre, D'Angelo Livia	4. 巻 15
2. 論文標題 Editorial: Brain Evolution: Clues From Aquatic Organisms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 683489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnana.2021.683489	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Abu Bakar Zulzikry Hafiz, Kato Tomoko, Yanagisawa Daijiro, Bellier Jean-Pierre, Mukai-sho Ken-ichi, Tooyama Ikuo	4. 巻 54
2. 論文標題 Immunohistochemical Study of Mitochondrial Ferritin in the Midbrain of Patients with Progressive Supranuclear Palsy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 97 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.21-00019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kageyama Yusuke, Irie Yumi, Matsushima Yuka, Segawa Tatsuya, Bellier Jean-Pierre, Hidaka Kumi, Sugiyama Hiroshi, Kaneda Daita, Hashizume Yoshio, Akatsu Hiroyasu, Miki Kunio, Kita Akiko, Walker Douglas G., Irie Kazuhiro, Tooyama Ikuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Characterization of a Conformation-Restricted Amyloid Peptide and Immunoreactivity of Its Antibody in Human AD brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Chemical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3418 ~ 3432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acchemneuro.1c00416	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Abu Bakar Zulzikry Hafiz, Bellier Jean-Pierre, Yanagisawa Daijiro, Kato Tomoko, Mukaiho Ken-ichi, Tooyama Ikuo	4. 巻 23
2. 論文標題 LC3/FtMt Colocalization Patterns Reveal the Progression of FtMt Accumulation in Nigral Neurons of Patients with Progressive Supranuclear Palsy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 537 ~ 537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010537	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsui Atsuya, Bellier Jean-Pierre, Kanai Takeshi, Satooka Hiroki, Nakanishi Akio, Terada Tsukasa, Ishibe Takafumi, Nakamura Yoshiaki, Taguchi Hiroyasu, Naruse Nobuyasu, Mera Yutaka	4. 巻 23
2. 論文標題 The Effect of Ethanol on Disassembly of Amyloid-1-42 Pentamer Revealed by Atomic Force Microscopy and Gel Electrophoresis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 889 ~ 889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23020889	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsushima Yuka, Irie Yumi, Kageyama Yusuke, Bellier Jean Pierre, Tooyama Ikuo, Maki Takahito, Kume Toshiaki, Yanagita Ryo C., Irie Kazuhiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Structure Optimization of the Toxic Conformation Model of Amyloid-42 by Intramolecular Disulfide Bond Formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 e202200029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202200029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Jean-Pierre Bellier, Pu-Qing Yuan, Ikuo Tooyama, Yvette Tache, Hiroshi Kimura.
2. 発表標題 Visualization of the human enteric cholinergic system using a newly generated antibody against the human pChAT.
3. 学会等名 ISAN 2019 (International Society for Autonomic System) Los Angeles, California, USA (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Pu-Qing Yuan, Jean-Pierre Bellier, Tao Li, Mary R. Kwaan, Hiroshi Kimura, Yvette Tache.
2. 発表標題 Three-dimensional (3D) imaging and phenotyping of intrinsic cholinergic innervation in the human colon.
3. 学会等名 ISAN 2019 (International Society for Autonomic System) Los Angeles, California, USA (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jean-Pierre Bellier, Pu-Qing Yuan, Kenichi Mukaisho, Ikuo Tooyama, Yvette Tache, Hiroshi Kimura
2. 発表標題 hpChAT, un nouveau marqueur pour visualiser le système cholinergique intestinal humain
3. 学会等名 23e Journée Francophone de la Recherche. Maison Franco-Japonaise, Ebisu, Tokyo.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Bellier Jean-Pierre, Tooyama Ikuo, Kimura Hiroshi
2. 発表標題 Developing a novel antiserum against human peripheral choline acetyltransferase.
3. 学会等名 第46回日本脳科学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jean-Pierre Bellier, Pu-Qing Yuan, Kenichi Mukaisho, Ikuo Tooyama, Yvette Tache, Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Visualization of the peripheral choline acetyltransferase in human tissue: From predicted sequence to antiserum.
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jean-Pierre Bellier, Toshifumi Morimura, Yu Xie, Ikuo Tooyama
2. 発表標題 GTPシクロヒドラーゼ1とその調節タンパク質GFRPのin vivo相互作用
3. 学会等名 日本神経化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jean-Pierre Bellier, Yu Xie, Cecile Bellanger, Ikuo Tooyama
2. 発表標題 Comparative anatomy of the serotonergic pathways in the peripheral nervous system of vertebrate and cephalopods
3. 学会等名 日本組織細胞化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jean-Pierre Bellier, Ikuo Tooyama
2. 発表標題 Reappraisal of acetylcholinesterase staining: a nanomaterial hidden into an old technique
3. 学会等名 日本組織細胞化学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ヒト末梢性コリン作動性神経検出用抗体	発明者 Bellier JP, Kimura H, Tooyama I	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、04412018JP	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	守村 敏史 (Morimura Toshifumi) (20333338)	滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・准教授 (14202)	

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