

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24655158

研究課題名(和文)血液脳関門(BBB)を突破するナノ抗体の創出

研究課題名(英文)Preparation of nano-body capable of passing through blood brain barrier (BBB)

研究代表者

一三三 恵美(HIFUMI, EMI)

大分大学・全学研究推進機構・教授

研究者番号：90254606

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)：脳疾患治療における重要課題は、薬剤が脳内に移行し難いことである。これは、毛細血管から脳実質への物質移動が、血液脳関門(BBB)によって厳しく制限されていることによる。本研究では、数nmサイズのナノ抗体を用いてBBBの突破を試みた。主に1)ヒト型ナノ抗体ライブラリーの作製と合成、2)微量分析系の確立、3)in vitro BBB透過性試験を行い、BBBの透過率は分子サイズに従い、ナノ抗体単量体(25 kDa)、ナノ抗体二量体(50 kDa)、完全抗体(150 kDa)の順であることが判明した。これにより、25 kDa程度のナノ抗体に脳治療の機能を持たせれば、脳疾患の治療が可能であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：An important subject in brain disease therapy is in the difficulty of transfer of drugs into the brain. The migration of drugs into the brain is limited by (blood-brain barrier : BBB) to keep the nerve cells in the brain being safe. In this study, I have conducted to develop the nano-body (being several nanometer in size) to pass through the BBB and deliver the drugs into brain. As shown in the following, 1) the human form nano antibody synthesis, 2) Construction of establishment, 3) permeability test of nano antibodies and complete antibody of using the BBB permeability test kit, etc. were carried out. As the results, monomeric nano-body, dimeric nano-body, and a whole antibody, whose molecular size is, 25kDa, 50kDa, and 150kDa, respectively, showed a small passage through the BBB. The passage efficient through BBB was in the order of the molecular size, 25kDa > 50kDa >150kDa. As the conclusion, nano-size-antibody was effective as a drug to pass the BBB and enter into brain.

研究分野：抗体工学

キーワード：ナノ抗体 血液脳関門 BBB

以降の実験に使用した。

高純度・大量精製方法としては、1 L スケールで培養した大腸菌体を回収し、超音波破碎して可溶性画分を調整して Ni-NTA カラムクロマトグラフィーに供した。imidazole で溶出した軽鎖画分を回収し、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) に交換して、TSK gel SP-5PW カラム (TOSOH) を用いる陽イオン交換クロマトグラフィーを実施した。NaCl の gradient で溶出した画分は、SDS-PAGE の結果に応じて取りまとめ、0.15 M NaCl, 20 mM Tris-HCl buffer に交換して限外濾過濃縮 (Amicon ultra, 10,000 kDa) を行なった後に PBS に置換して、以降の実験に用いた。

精製方法の改良実験では、Ni(NO₃)₂, MgCl₂・6H₂O, Zn(NO₃)₂・6H₂O, CaCl₂・2H₂O, CuCl₂・2H₂O などの金属イオンを精製に用いる緩衝液に加えて軽鎖タンパクへの取り込みを試み、陽イオン交換クロマトグラムや SDS-PAGE に加え、UV-Vis スペクトル解析や二次元電気泳動、サイズ排除クロマトグラフィーを行なって、金属イオンによる影響を調べた。

(3) がん細胞傷害性試験

ヒト抗体軽鎖によるがん細胞傷害性は WST assay や MTT assay により調べた。抗体軽鎖のがん細胞傷害性には、「複数のがん細胞株に対して効果を示す」という特徴が認められることから、スクリーニングには、主に肺胞上皮がん細胞の A549 や卵巣がん細胞の ES-2 を用い、効果の認められた軽鎖クローンについてはヒトグリア芽腫細胞の U87 MG、アストロサイトーマの U251 MG などの脳腫瘍細胞株に体する試験も実施した。

軽鎖の処理時間は 48 時間を基準とし、24 時間、または 72 時間の試験を組み合わせた。細胞の播種数は、用いるがん細胞の増殖速度とインキュベーション時間を考慮して、予備実験により、試験の期間中に軽鎖未処理の条件で、がん細胞が順調に増殖可能な数を設定した。

(4) BBB kit による透過試験

BBB kit (ファーマコセル) を用いて透過性実験を行った。まず、BBB kit(細胞付き)を解凍し、1~3 日間 CO₂ インキュベーター 37°C で培養した。次に、4 日目に電気抵抗を測定し tight junction が形成されていることが確認できたのを確認してから使用した。血管側にナノ抗体や完全抗体を加え、予備実験としては 30 分、1 時間、4 時間、8 時間、24 時間のインキュベーション後に、本実験としては 6 時間ごとに 24 時間までインキュベーションし、血管側と脳側の培養液を回収して、培地中に含まれるナノ抗体を定量した。

また、血管側、脳側の培養液中に含まれるナノ抗体・完全抗体の定量を目的として、新たにサンドイッチ型 ELISA を構築した。用いる抗体の組み合わせやインキュベーション

時間、緩衝液組成などの各種条件の検討を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト型ナノ抗体の作製~特に抗体軽鎖遺伝子に着目して~

H24 年度申請書に示したように、まず、ヒト型抗体軽鎖遺伝子に着目して、ライブラリーを作製した。本研究でいうライブラリーとは、通常、世間的に言う遺伝子ライブラリーではなく、タンパク質ライブラリーである点特徴である。この目標を達成するために克服すべき課題が 2 点ある。一つは目的にあった遺伝子を効率的にクローニングすること、二つめは効率的で収量の多い精製方法の確立である。

前者については、申請者のこれまでの研究成果を元に、ヒト型抗体遺伝子の中で subgroup II gene の選択的な取得を行った。次いで、それをベクターにクローニングし、大腸菌への形質転換を行って、タンパク質生産系を構築し、それを発現回収してその生化学的性質を調べた。結果的に、タンパク質ライブラリーとしてアミノ酸配列まで確定したヒト型抗体軽鎖 (ナノ抗体) は約 100 種類にのぼるものが作製された。

以下に、当初の計画に対して行った実験結果について概説する。

① subgroup II gene のクローニング

1 段階の PCR では、選択的な subgroup II 遺伝子の取得が困難であったことから、2 段階 PCR による subgroup II gene 選択的な取得を試みた。この時に設計した primer 配列を以下に示す。

1 段階目の Primer:

1st-forward

(5'-agttCCATGGAGCTCCTGGGGCTGCTAATG-3') 下線は NcoI site.

1st-reverse

(5'-ccgtCTCGAGACACTCTCCCCTGTTGAAG-3') 下線は XhoI site

2 段階目の Primer:

2nd-forward

(5'-agttCCATGGATRTTGTGATGACYCAG-3') 下線は NcoI site

2nd-reverse

(5'-ccgtCTCGAGACACTCTCCCCTGTTGAAG-3') 下線は XhoI site

PCR 反応には Phusion DNA polymerase 使用し、98°C で 30 秒の熱変性の後、98°C で 10 秒の熱変性、60°C で 30 秒のアニーリング、72°C で 30 秒の伸長反応によるサイクルを 30 回繰り返した。

これらの手法により、ほぼ 100% に近い確率で subgroup II gene の選択的な取得に成功した。

② ナノ抗体の大腸菌での発現系の構築

当初は大腸菌可溶性画分への発現が困難だと予想されたために、pIg vector による培地

画分への発現を試みた。しかしながら、培地中のナノ抗体タンパク濃度は低く、回収時の遠心分離に膨大な作業が必要となることから、非効率的であると判断した。pET20b(+) vector と大腸菌 BL21(DE3)pLysS の組み合わせにより、低温培養することで可溶性画分への発現量が向上し、上記の培地画分よりも効率的にナノ抗体タンパクが得られた。

精製方法の検討としては、スクリーニング用ナノ抗体精製の high-throughput 化を目的として Maxwell 16 による半自動精製を試みた。しかし、精製後の純度・量ともにスクリーニングには不十分であったため、この方法は断念して、1 L 培養に切り替えた。3-(2)項に示した方法により、数 mg から数十 mg のナノ抗体タンパクの取得が可能となった。

③ナノ抗体の修飾・改変

先の手法でライブラリー化したヒト型ナノ抗体ライブラリーは、軽鎖全長遺伝子である。C 末端に H 鎖との S-S 結合に預かる Cys が存在することから、このまま発現・精製すると Dimer 化が起こる (分子サイズ 50 kD となる)。そこで、上記 C 末端の Cys を Ala に変えた Monomer 変異体を作製した。

さらに分子サイズを小型化して分子サイズの影響を調べると同時に、軽鎖タンパクに共通する性質を把握するために、ヒト kappa 型軽鎖の定常領域のみをクローニングした。クローニングには pET20b(+) vector を用い、C 末端が Cys の野生型とともに、Ala に置き換えた monomer 変異体を作製した。Monomer 変異体の分子サイズは 15 kDa である。

発現には大腸菌 BL21(DE3)pLysS を用いた。18°C での一晩の発現誘導を行った後に菌体を回収して可溶性画分を調製し、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーと陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。発現・精製条件を最適化することで、1 L の培養液から高純度の定常領域タンパク (小サイズナノ抗体) を約 50 mg 取得出来た (Fig. 3 参照)。

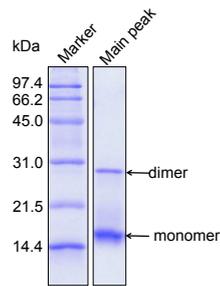


Fig. 3 小サイズナノ抗体の SDS-PAGE

(2) BBB 透過性試験 (in vitro)

Fig.2 に示す BBB 透過試験キットを用いるには血管側および脳側におけるナノ抗体を測定するシステムを構築する必要がある。このために Fig.4 に示すサンドイッチ ELISA の構築を試み、次に分子サイズの異なるナノ抗体を用いて透過試験を実施した。

①ELISA 測定系の確立

固相化抗体として、ROCKLAND 製と

Thermo 製の抗ヒト IgG F(ab')₂ 抗体と BETHYL 製の抗 6x His 抗体、標識

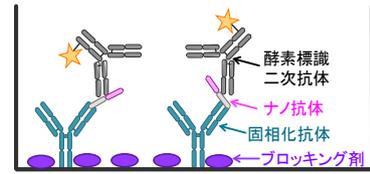


Fig. 4 ナノ抗体測定系

二次抗体として、ALP で標識された抗ヒト IgG F(ab')₂ ポリクローナル抗体と POD で標識された同抗体 (いずれも Thermo 製) を用意した。

まずは、固相化抗体と標識二次抗体との間で交差反応の確認を行ったところ、ROCKLAND 製の抗ヒト IgG F(ab')₂ 抗体、および BETHYL 製の検出用の抗 6x His 抗体と標識二次抗体との間には無視出来ない交差反応が認められ、今回の反応系には使用出来ないことが分かった。

次に Thermo 製の抗ヒト IgG F(ab')₂ 抗体を固定化し、ヒトナノ抗体の標準系列を反応させた後に、前述の酵素標識二次抗体を反応させると、両方の二次抗体でシグモイドの標準曲線を作製することが出来た。ALP 標識抗体と POD 標識抗体では、後者の方がやや感度が高かったことから、二次標識抗体は Thermo 製の POD 標識抗ヒト IgG F(ab')₂ ポリクローナル抗体を用いることに決めた。

続いてブロッキング剤として 2%ゼラチンと 0.5% BSA の比較を行い、0.5%BSA を用いることに決定し、最終的にはヒトナノ抗体 (あるいはヒト IgG) を 10⁻⁸~10⁻¹¹(M)の範囲で測定することの出来る ELISA 系を確立した (Fig. 5)。

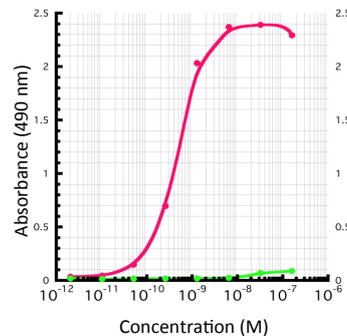


Fig. 5 構築したサンドイッチ ELISA (標準曲線)

②ヒトナノ抗体単量体の AFM 分析

BBB 透過性試験に先立って、

AFM によりナノ抗体のサイズを見積もった。

ヒト軽鎖 A クローンの Monomer 変異体について実施した結果を Fig.6 に示す。

Monomer 変異

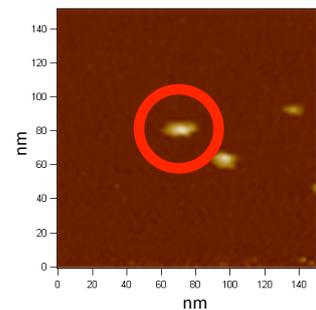


Fig. 6 ナノ抗体 A クローンの AFM 像

体のサイズは 5 x 4 x 20 nm であった。これは、二量体の半分、完全抗体の数分の 1 以下の大きさである。

③血管側から脳側への透過予備実験

最初に A, B, 2 種類のナノ抗体 monomer 変異体 (分子サイズは 25 kDa) を用いる予備実験を行い、本実験に用いるナノ抗体の選別と①で確立した ELISA 系の確認を行った。その結果、ELISA の系については、ナノ抗体を固相化抗体と反応させる一次反応において、反応液中に含まれる培地成分が影響することが分かった。血管側の定量においては、ナノ抗体の濃度に比べて確立した ELISA の感度が高いため、試料を緩衝液で希釈する形で分析が可能であった。一方、脳側は透過量が少ないことから培地を用いて標準系列を立てる形で分析することとした。

ナノ抗体 monomer 変異体としては、A クローンの透過性が良好であったことから、これを用いて以下の検討を行った。

④ナノ抗体 A クローン monomer 変異体 (25kDa)を用いた BBB 透過試験

血管側にナノ抗体 A クローン monomer 変異体を、実験 1 として 123 $\mu\text{g/ml}$ 、実験 2 として 107 $\mu\text{g/ml}$ 添加して、6 時間ごとに 24 時間まで 4 回のサンプリングを行った。ナノ抗体 A クローン monomer 変異体の脳側への透過量を Table 1 に纏めた。

Table 1 ナノ抗体 A クローン monomer 変異体の BBB 透過性

経過時間 (hr)	実験 1 (ng)	実験 2 (ng)	平均値 (ng)
0	3	4	3.5
6	3	33	18
12	48	56	52
24	77	79	78

⑤ナノ抗体 A の二量体(50 kDa)を用いた BBB 透過試験

血管側のナノ抗体 B 二量体を、実験 1 として 145 $\mu\text{g/ml}$ 、実験 2 として 118 $\mu\text{g/ml}$ 添加して、6 時間ごとに 24 時間まで 4 回のサンプリングを行った。ナノ抗体 A クローン二量体の脳側への透過量を Table 2 に纏めた。

Table 2 ナノ抗体 A クローン二量体の BBB 透過性

経過時間 (hr)	実験 1 (ng)	実験 2 (ng)	平均値 (ng)
0	0	0	0
6	7	10	8.5
12	4	6	5
24	91	94	92.5

⑥完全抗体(150 kDa)を用いた BBB 透過試験

血管側にヒト完全抗体を、実験 1 として 158 $\mu\text{g/ml}$ 、実験 2 として 147 $\mu\text{g/ml}$ 添加して、6 時間ごとに 24 時間まで 4 回のサンプリ

ングを行った。ヒト完全抗体の脳側への透過量を Table 3 に纏めた。

Table 3 ヒト完全抗体の BBB 透過性

経過時間 (hr)	実験 1 (ng)	実験 2 (ng)	平均値 (ng)
0	3	4	3.5
6	19	23	21
12	36	32	34
24	129	136	133

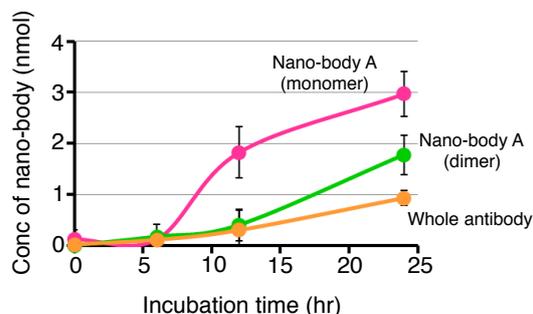


Fig. 7 各ナノ抗体、完全抗体の BBB 透過

上記の各ナノ抗体や完全抗体の BBB 透過性を経時的に纏めた (Fig. 7)。分子サイズの小さい方が、透過性が高いことが判る。即ち、ナノ抗体 A クローン monomer 変異体 (約 25kDa)、ナノ抗体 A クローン二量体 (約 50 kDa)、完全抗体 (約 150 kDa) で差が見受けられ、分子サイズの小さいナノ抗体 A クローン monomer 変異体では 3.0 nmol 透過し、透過率としては 0.24%、次いでナノ抗体 A クローン二量体は 1.8 nmol の透過で、透過率としては 0.14%、完全抗体は 0.9 nmol 透過しており、透過率としては 0.068% であった。以上のことより、ナノ抗体 A クローンは分子数として完全抗体の約 3~4 倍透過していることが分かった。ナノ抗体の BBB 透過性は興味ある結果となり、今後、さらなる研究の進展が期待される。

なお、ナノ抗体によるがん細胞傷害性試験については、現在実施中で有り、今後、学会等で発表して行く計画である。

(3) ナノ抗体精製方法の改良

大腸菌可溶性画分からの精製過程において、適切に金属イオンを取り込ませることで、ナノ抗体の構造多様性に变化が認められ、特に野生型の精製において、電荷の揃った二量体が得られることが明らかとなった。本件については、クローン毎の比較を含めた詳細な解析を進めているところであり、成果を学会や論文で発表していく計画である。

(4) 結論

ナノ抗体 monomer 変異体、ナノ抗体二量体、完全抗体という順序で、その分子サイズ、25 kDa, 50 kDa, 150 kDa に応じて、サイズの小さいものが BBB を通過しやすいことが判明し

た。従って、将来的には、より透過性の高い配列を持つナノ抗体を選別し、25 kDa 程度のナノサイズの抗体に脳治療の機能を持たせれば、脳疾患の治療が可能である。

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 0 件)

[学会発表] (計 13 件)

① 糸永省吾, 宇田泰三, 一二三恵美, 「ヒト型抗体軽鎖 (κ 型) の定常領域の発現と諸性質」, 第 95 春季日本化学会年会, 2015 年 3 月 27 日, 日本大学船橋キャンパス (千葉県船橋市)

② 宇田泰三, 一二三恵美, 「最近の抗体酵素研究と今後の展開」, 第 95 春季日本化学会年会, 2015 年 3 月 26 日, 日本大学船橋キャンパス (千葉県船橋市)

③ 一二三恵美 (招待講演), 「スーパー抗体酵素の発見と展開」, 第 24 回バイオ・高分子シンポジウム, 2014 年 7 月 24 日, 東京工業大学大岡山キャンパス (東京都目黒区)

④ 野中珠実, 楠木智也, 宇田泰三, 一二三恵美, 「スーパー抗体酵素のがん細胞傷害性(I)」, 第 51 化学関連支部九州合同大会, 2014 年 6 月 28 日, 北九州国際会議場, (福岡県北九州市)

⑤ 山口美沙, 一二三恵美, 宇田泰三, 「ヒト型抗体酵素#1 シリーズの生化学的活性の検討」, 第 51 化学関連支部九州合同大会, 2014 年 6 月 28 日, 北九州国際会議場 (福岡県北九州市)

⑥ 友岡美幸, 森山和基, 楠木智也, 藤本尚子, 一二三恵美, 宇田泰三, 「Subgroup II 由来ヒト抗体軽鎖の特徴」, 第 94 日本化学会春季年会, 2014 年 3 月 28 日, 名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市)

松本真吾, 一二三恵美, 宇田泰三, 「スーパー抗体酵素 (antigenase) の構造多様性」, 第 94 日本化学会春季年会, 2014 年 3 月 28 日, 名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市)

⑧ Emi Hifumi, Sari Sonoda, Taizou Uda, “Characteristic Features of Human Catalytic Light Chains(Antigenases) Killing Some Kinds of Cancer Cells”, Conference on Antibody Engineering and Therapeutics 2013, Dec.9, 2013 (Los Angeles, USA)

⑨ 一二三恵美 (招待講演), 「抗体酵素 (Antigenase) の深遠な特徴と性質」, 第 7 回バイオ関連シンポジウム, 2013 年 9 月 29 日, 名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市)

⑩ 楠木智也, 一二三恵美, 宇田泰三, 「ヒト型スーパー抗体酵素(Antigenase)のがん細胞傷害性に関する研究」, 第 7 回バイオ関連シンポジウム, 2013 年 9 月 28 日, 名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市)

⑪ 山口美沙, 楠木智也, 阿部竜也, 一二三恵美, 宇田泰三, 「ヒト型抗体酵素#1 シリーズの生物学的活性の検討」, 第 7 回バイオ関連シンポジウム, 2013 年 9 月 28 日, 名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市)

⑫ Emi Hifumi, Sari Sonoda, Taizo Uda, “Human antigenases (catalytic antibody light chains) exhibiting cell cytotoxicity against cancer cells”, International Soft Matter Conference 2013, Sep.17, 2013 (Rome, Italy)

⑬ Emi Hifumi, Sari Sonoda, Taizo Uda, “Cytotoxic features of human antigenases (catalytic antibody light chains) against some cancer cells”, World Biotechnology Congress 2013, June 5, 2013, (Boston, USA)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一二三恵美 (HIFUMI, Emi)

大分大学・全学研究推進機構・教授

研究者番号: 90254606