

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659052

研究課題名(和文) 病因物質を生体内の別の代謝経路から除去する新たな治療法・メタボリックスイッチング

研究課題名(英文) A Novel System for Removing Etiologic Factors from the Blood Stream: Drug-Navigated Clearance System(DNCS)

研究代表者

馬原 淳(Mahara, Atsushi)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：80416221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本プロジェクトでは、体内の正常な代謝経路を利用して、蓄積した病因物質を除去するというメタボリックスイッチング機構を利用した新たな薬物代謝治療法(Drug Navigated Clearance System; DNCS)の開発した。IIミクログロブリンを透析アミロイドーシスのモデル物質として選択して、病因物質を代謝経路へと誘導するナビゲータ分子の設計と合成、マウスを用いた薬物輸送効果について検討した。その結果、病因物質をナビゲータ分子により肝臓細胞へ誘導できる可能性を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have developed the Drug navigated clearance system (DNCS) for metabolic abnormality. To remove the etiologic factor in the blood, the heterofunctional protein complex (Navigator) containing the ligands for the cell receptor and etiologic factor was designed. The uptake efficiency of the etiologic factor into the HepG2 and navigation efficiency of the

II-microglobulin in mice were evaluated. We found that the etiologic factor could be navigated into another metabolic pathway by using navigator complex based on the DNCS strategy.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：メタボリックスイッチング DNCS タンパク複合体 代謝異常疾患

1. 研究開始当初の背景

本プロジェクトでは、体内の正常な代謝経路を利用して、蓄積した病原因物質を除去するというメタボリックスイッチング機構を利用した新たな薬物代謝治療法(Drug Navigated Clearance System; DNCS)の開発を目的としている。代謝異常疾患として知られる高コレステロール血症や β 2 ミクログロブリンの蓄積により引き起こされる透析アミロイドーシスは、血中において LDL などの代謝されるべき物質が高濃度に蓄積することで引き起こされる。これまでに、このような代謝異常疾患に対する治療法は、異常な代謝経路を正常化する薬剤を使った内科的治療や、血液透析において除去カラムを挿入することで病原因物質を吸着し除去する手法が使われている。本研究では、このような既存の治療戦略の概念を拡張したものではなく、生体内において蓄積した物質を別の代謝経路へと“誘導”するという新たな視点に基づく治療方法の開発にある。具体的には、病原因物質に対して選択的に結合するリガンドと、代謝経路のレセプターに対する結合リガンドとを結合させたヘテロファンクショナルな分子を設計したものを治療薬剤 (Navigator) として用いる。血中内において、病原因物質を Navigator 分子で補足し、代謝経路となる細胞のなどの表面レセプターに結合し細胞内で分解、除去させることで、血中の病原因物質の濃度が選択的に低減させられる。この除去機構により病原因物質が血中から排泄させることで治療を達成するものである。この DNCS という概念は、代謝異常疾患全般に対して適応できる基礎概念であるため、リガンドの組み合わせを拡張する事で、種々の疾患に対して適応できると期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、代謝異常に対する新たな治療戦略を確立する目的で、体内で病原因物質をトラップし、別の代謝経路へと誘導して体外へ排泄させる“メタボリックスイッチング”という新たな治療メカニズムの実現化に挑戦する。予備的検討して、Protein A と LDL とを複合させたナビゲータ分子を設計・合成して、培養細胞系 (肝臓細胞) において、病原因物質として補足される抗体の細胞輸送効果について検討していた。その結果、蛍光標識した抗体を顕微鏡下でモニターすることで、ナビゲータ分子特異的に細胞内へ抗体が誘導されている様子が認められた。つまり、肝臓細胞の LDL レセプター特異的に病原因物質を輸送できる可能性を見い出せた。しかしながら、この実験で用いたナビゲータ分子は、Protein A と LDL とが 1 対 1 で結合した分子ではなく、数分子が結合した分子複合体として合成されている。輸送効率の向上や病原因物質に対する選択性を向上させるためにも、病原因物質を補足する部位と細胞のリガンドに対して結合する部位が 1 対 1 で結合した分

子を設計する必要がある。さらに、培養細胞系における誘導効果のみならず、in vivo においてナビゲータ分子の誘導効果についても評価する必要がある。さらに、本システムは、病原因物質が蓄積する種々の疾患にも応用可能であることが理論的に考えられる。この原理の拡張性についても検討する必要があるため、これまで実験で用いてきた抗体を病原因物質とするものではなく、透析アミロイドーシスをモデル疾患として β II ミクログロブリンをターゲットとした治療効果についても検討した。実験の詳細とその結果について後述する。

3. 研究の方法

研究内容を 4 つの項目に分類して、実施した。項目 1、項目 2 においては主に、ナビゲータ分子の設計法に関する実験である。項目 3 では、 β II ミクログロブリンをターゲットとした in vivo での病原因物質輸送効果について検討した。さらに項目 4 では、種々のナビゲータ分子を合成できる新たな手法として、DNA を結合リンカーとしたタンパク複合体の合成経路について検討した。

1) Sulfo-SMCC を用いたナビゲータ分子の合成経路の検討

LDL レセプター結合ドメインの 20 量体オリゴペプチドとタンパクを補足するための Protein A とを sulfo SMCC で結合させる合成法を検討した。

2) PEG リンカーを用いたナビゲータ分子の合成の検討

タンパクの構造変性を抑制するために、バイオナートなリンカーとして PEG を選択して、Protein A と β II ミクログロブリンに対する抗体とを結合させた複合体の合成法について検討した。

3) 透析アミロイドーシスをモデルとし、 β II ミクログロブリンを用いた in vivo における病原因物質除去効果の検討

In vivo における病原因物質輸送効果を検討するため、蛍光標識した β II ミクログロブリンをモデル病原因物質として、2) で合成したナビゲータ分子による病原因物質の誘導効果について、in vivo イメージャーにより定量的に検討した。

4) DNA 結合型タンパク質を用いたナビゲータ分子の設計と合成

病原因物質を補足するリガンドと、代謝経路となる細胞のレセプターに結合するためのリガンドを、安定に種々の組み合わせで結合させるため、オリゴ DNA の 2 重鎖形成を利用したタンパク複合体の作製方法について検討した。

4. 研究成果

1) Sulfo-SMCC を用いたナビゲータ分子の合成経路の検討

24量体の CGWGLRKLRLRLRLRKLRLR配列を LDL レセプター結合リガンドとして選択した。Protein A(47kDa)に対して、sulfo SMCC を添加し、アミノ基を活性化した後、マレイミド基に対して、オリゴペプチドを結合させる反応経路を検討した。SDS-PAGE により合成後の反応物を評価した結果、Protein A に複数個のオリゴペプチドが結合した分子である事が示された。肝臓細胞 (HepG2 細胞) に対して、作製した分子を添加し細胞への集積を調べた結果、リガンド選択的な集積は示されなかった。細胞結合部位となるオリゴペプチドの分子が小さく、細胞に対する特異的な結合を誘導できなかったと考えている。

2) PEG リンカーを用いたナビゲータ分子の合成の検討

β II ミクログロブリンに対する抗体と、ApoE とを PEG リンカーにより結合させたナビゲータ分子の合成を検討した。種々の条件を検討した結果、最適な合成法を確立できた。ApoE に対して、10等量の Traut's 試薬により SH 基を導入した。一方で、抗体に対して10等量の NHS-PEG2-maleimide を反応させることで、マレイミド基を導入した。精製後、作製した2つの分子を反応させることで、複合体を作製した。SDS-PAGE により合成物を評価した結果、高分子量体の付近にスミアなバンドが示された。1対1複合体ではないが、2種類の分子が結合した複合体を作製することができた。

3) 透析アミロイドーシスをモデルとし、 β II ミクログロブリンを用いた in vivo における病因物質除去効果の検討

ヌードマウスに対して、Alexa750 で標識した β II ミクログロブリン(β 2MG-Alex) と、2) で作製したタンパク複合体 (IgG-ApoE) を投与して、投与後の β II ミクログロブリンの体内分布を in vivo イメージャーにて評価した。最適化した条件によってナビゲータ分子の誘導効果を評価した結果、IgG-ApoE を β 2MG-Alex と投与した場合は、マウスの肝臓付近と膀胱付近に β 2MG-Alex の集積が認められた。一方、IgG-ApoE のみを投与した場合は、肝臓への集積は認められなかった。膀胱へ集積は、通常の尿への代謝経路により排泄されたものと考えている。解剖後、それぞれの臓器を摘出して蛍光量を定量した結果、 β 2MG-Alex を IgG-ApoE と投与した場合は、約3倍程度の β 2MG-Alex の集積が増加した。すなわち、IgG-ApoE によって肝臓への集積効率を向上させることに成功した。

4) DNA 結合型タンパク質を用いたナビゲータ分子の設計と合成

天然型の oligoDNA (TTCTCCGAACGTGT-

CACGT 配列) を用いて、IgG と Protein A に対してそれぞれ相補的となる DNA の結合反応を検討した。NHS 基が2分子導入された PEG をリンカーとして、IgG のアミノ基に対して、PEG リンカーを導入し、その後 DNA の 5'末端がアミノ化されている分子を導入した。Protein A についても同様の反応経路によって DNA の導入を試みた。SDS-PAGE により反応を追跡した結果、DNA 分子が導入される割合は極めて低かった。これは DNA と Protein A との立体的な障害により、反応が十分に進行しない可能性が原因であると考えた。しかし、HPLC により DNA に対する PEG の導入反応条件について検討した結果、この反応の段階でも DNA に対する PEG の導入率は低かった。これらの結果より、現在では DNA を導入できるための活性末端の選択や、さらには人工タンパク質を発現させた系においてヘテロファンクショナルな分子を合成する経路なども検討している。

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)

該当なし

[学会発表](計6件)

- 1) ○Tetsuji Yamaoka, Kousuke Atari, Yuichi Ohya, Jeong-Hun Kang, and Atsushi Mahara, A Novel System for Removing Etiologic Factors from the Blood Stream: Drug-Navigated Clearance System(DNCS), 9th World Biomaterials Congress (Chengdu, China) 2012/6/1-5,
- 2) ○當 昂祐・馬原 淳・大矢 裕一・姜 貞勲・山岡 哲二, 血中自己抗体を除去する DNCS 薬剤の作製と評価, 第58回高分子研究発表会(神戸) 2012/7/13
- 3) ○當 昂祐(院生)・馬原 淳・姜 貞勲・大矢 裕一・山岡 哲二, リウマチ因子を除去するタンパク質複合体の作製と In vitro 評価 (Drug-Navigated Clearance System), 関西大学 先端科学技術シンポジウム, 2013/1/29
- 4) ○馬原 淳・當 昂祐・大矢 裕一・山岡 哲二 代謝経路の選択的誘導に基づく病因物質の除去治療法, 第62回高分子討論会(金沢) 2013/9/11-13
- 5) ○松本真依, 馬原淳, 大矢裕一, 山岡哲二, 血中 β 2-ミクログロブリン除去のためのタンパク質複合体開発と in vivo 評価, 第63回高分子学会年次大会(名古屋国際会議場), 2014/5/28-30
- 6) ○松本真依, 馬原淳, 大矢裕一, 山岡哲二, 新規ナビゲーター分子による血中病因タンパク質除去効率の in vivo 評価, 第60回高分子研究発表会(神戸), 2014/7/24-25

[図書](計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

該当なし

○取得状況（計1件）

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：国立循環器病センター総長・興和株式会社

種類：特許取得

番号：WO2009-041037

出願年月日：2008年9月25日

取得年月日：2013年12月13日

国内外の別：国内・国外

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

馬原 淳 (MAHARA Atsushi)

国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：80416221

(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

(3)連携研究者

()

研究者番号：