

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450439

研究課題名(和文)「細胞内発現する人工小型抗体」封入ナノ粒子の血中投与による狂犬病治療法の開発

研究課題名(英文) The development of treatment of rabies by injection of nanoparticle-encapsulated intracellular antibodies

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：狂犬病ウイルス(Rabies virus: RABV)に感染すると、ウイルスは血流を介さず、末梢神経細胞を経由して中枢神経へと伝達され、狂犬病を発症する。発症後の致死率は100%であり、有効な治療法はない。本研究では、狂犬病発症後の治療法の開発を目的として、RABV感染細胞内でウイルス蛋白質に結合できる人工小型抗体を複数作出し、一部についてはウイルスの増殖阻害効果を有することを確認した。また人工小型抗体の遺伝子をナノ粒子に封入し、神経細胞へのin vitroデリバリー系の構築を行った。

研究成果の概要(英文)：Rabies virus (RABV) travels via retrograde fast axonal transport within axons in peripheral nerves to central nervous system. After clinical symptoms appear, the mortality rate is almost 100% and no reliable treatment is available. In this study, aiming to develop the treatment of rabies after the onset, several single chain variable fragments (scFvs) against RABV were produced, and some of which were confirmed to bind to RABV protein inside the cells and inhibit viral propagation. Also, nanoparticle-based in vitro delivery system was constructed to deliver scFv-expressing plasmid DNAs to neural cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：狂犬病 intrabody 治療 ドラッグデリバリー ナノ粒子

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。日本では、ヒトの国内感染症例は 1956 年以来、動物の症例は 1957 年以来発生していない。しかし、人や動物の国際的な移動が増大するなか、海外から狂犬病が侵入する可能性は十分にある。2006 年 11 月に、京都、横浜において発生したヒト狂犬病の輸入症例で、2 名の方が亡くなったことは記憶に新しい。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。

2. 研究の目的

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、細胞内に導入した人工小型抗体による治療法に着目した。本研究は、RABV に対する人工小型抗体を RABV 感染神経細胞に導入して、細胞内で標的となるウイルス蛋白質に結合し、その機能を直接阻害することで、RABV の増殖を阻害することにより、狂犬病の治療法の開発を目指す。本研究では、作用機序が異なる複数種の人工小型抗体を作出するとともに、中枢神経へのデリバリー系の構築を行い、ウイルス増殖阻害効果について検討する。

3. 研究の方法

1) RABV 蛋白質に対する複数種の小型抗体の作出

固相化した RABV-P、-N 蛋白質に対して、人工小型抗体 (single chain variable fragment; scFv) 発現ファージディスプレイライブラリー Tomlinson I+J をパンニングし、同蛋白質に対する scFv の遺伝子を複数選択した。また東京大学大学院 工学系研究科の河原正浩博士の研究協力を得て、同博士が開発した Signalobody 法を上記ライブラリーに応用し、RABV-P、-N 蛋白質に対する複数の scFv 遺伝子を選択した。

2) 抗 RABV 小型抗体の細胞内反応性の解析

上記 scFv 遺伝子を細胞内で intrabody として発現させた際の i) 細胞内での標的蛋白質との結合性、ii) RABV の増殖阻害能を解析するために、まず細胞内への scFv 発現プラスミドの高効率導入系を検討した。マウス神経芽腫由来 MNA 細胞およびヒト胎児腎臓由来

HEK293T 細胞に対して、1 種類のエレクトロポレーション法 (Lonza 社 Amaxa nucleofector) および 2 種類のリポフェクション用試薬 (Lipofectamine LTX および Fugene HD) を検討した。続いて、scFv 発現細胞に RABV を接種し、RABV 蛋白質との結合性を蛍光抗体法および免疫沈降法により確認した。

3) 抗 RABV-P scFv が認識する抗原決定基の解析

RABV-P の全アミノ酸配列 (297 残基) について、3 残基ずつシフトさせた 13mer のペプチドセット (全 96 種類) をガラススライド上に固着させた (JPT 社 Peptide Technologies "PepStar")。このガラススライド上で、精製した scFv を反応させ、マイクロアレイで検出することにより、RABV-P 上で scFv が結合する領域 (抗原決定基) を明らかにすることを目指した。直鎖状の抗原決定基を認識することが確認されている抗 RABV-P scFv 4 クローンについて、解析を進めた。

マイクロアレイの結果から推測された抗原決定基の候補領域を確認するため、RABV-P の翻訳開始コドンの異なる 5 種の isoform (P1, P2 [NΔ19], P3 [NΔ52], P4 [NΔ68], P5 [NΔ82]) と、C 末端を段階的に欠失した P1 を pCAG プラスミドにより HEK293T 細胞で一時的に発現させた。これらを抗原とした間接蛍光抗体法により抗 RABV-P scFv の認識する領域を解析した。

4) 血液脳関門 (BBB) 透過性ペプチドを用いた *in vitro* デリバリー系の構築

RABV-G 蛋白質由来のペプチド 29 残基 (RVG29) を血中に投与すると、BBB を越えて広範囲の脳実質へ移行することが報告されており、脳への薬剤デリバリーの研究に応用されている。BBB 透過性ペプチドと scFv 発現プラスミドの混合物だけで効率的なデリバリーが達成できれば、ナノ粒子を用いるよりもはるかに簡便かつ安価に投与が可能になることから、抗 RABV scFv にも応用が可能かを検証することを目指した。RVG29 を RABV 感染者に投与した場合、発症後に上昇が見込まれる抗 RABV-G 抗体が RVG29 に結合し、デリバリーを阻害する可能性が懸念されることから、まず同ペプチドの抗 RABV-G 血清に対する反応性を ELISA で検証した。続いて、同ペプチドと scFv 発現プラスミドとの適切な混合比を決定するために DNA shift assay を行い、その結果を踏まえて、MNA 細胞への導入試験を実施した。

5) ナノ粒子を用いた *in vitro* デリバリー系の構築

研究開始当初の目的では、RABV-G 蛋白質由来のペプチド 29 残基 (RVG29) 等の BBB 透過性ペプチドを表面に外套したナノ粒子を作製したうえで、これに scFv 発現プラスミドを封入し、血中投与による神経細胞特異的な

デリバリー系の構築を目指していた。しかし、近年のドラッグデリバリーシステム (DDS) 研究の進展により、ナノ粒子を経鼻接種することで脳神経組織へのデリバリーが可能なが報告され、血中投与よりも効率的かつ侵襲性が少ない DDS として注目されるようになった。そこで、将来性を考えて当初の計画を変更し、静岡県立大学薬学部の浅井知浩博士の研究協力を得て、経鼻接種を想定した scFv-P19 発現プラスミド (pCAGbsr) 封入ナノ粒子の作製を行った。得られたナノ粒子を MNA 細胞、HEK293T 細胞へ 1 回または複数回接種し、発現効率および細胞毒性の検証を行った。

4. 研究成果

1) RABV 蛋白質に対する複数種の小型抗体の作出

一般的なパンニング法に加え、近年開発された Signalbody 法を併用することにより、RABV-P、-N 蛋白質に対する複数の scFv 遺伝子をクローニングに成功し、これらの遺伝子を細胞内発現抗体 (intrabody) として発現させるため、哺乳細胞用発現ベクター pCAGbsr にクローニングした。

2) 抗 RABV 小型抗体の細胞内反応性の解析

エレクトロポレーション法 (Lonza 社 Amaxa nucleofector を使用) では、クローンによっては同法により激しい細胞障害性を示したことから、リポフェクション法を採用することにした。導入効率/発現効率/細胞傷害性を総合的に比較した結果、Fugene HD を用いて HEK293T 細胞に導入すると、もっとも高効率に scFv を導入/発現でき、細胞傷害性も低いうえ、scFv の発現は少なくとも導入後 4 日間は継続して観察できた。この手法により抗 RABV-P scFv の 1 クローン (P19) を導入した HEK293T 細胞に RABV (CVS11 株) を感染させ、同クローンが感染細胞内において RABV-P 蛋白質との結合していることを蛍光抗体法および免疫沈降法により確認した。さらに、scFv-P19 発現細胞/非発現細胞に RABV (CVS11 株) を感染させて、ウイルス増殖を比較したところ、同クローンが RABV の増殖阻害能力を有することを確認した。また他の複数のクローンについても、細胞内で標的蛋白質と結合していることが示された。

3) 抗 RABV-P scFv が認識する抗原決定基の解析

RABV-P の全アミノ酸配列に基づくペプチドセットを固着させたガラススライド上で、4 種の精製 scFv クローン (P19, P38, P80, P115) を反応させ、マイクロアレイ解析を行ったところ、RABV-P の C 末端側 1/3 の領域を中心に複数の陽性スポットが確認された。一方、非特異反応と思われるスポットも複数出現したことから (図 1)、ブロッキングや二次抗体等の条件を検討したが、特異的/非特

異的に反応するスポットを峻別することは本法ではできなかった。

そこで、まず細胞内で発現させると RABV の増殖阻害効果のある scFv-P19 を、5 種の isoform (P1, P2 [ΔN19], P3 [ΔN52], P4 [ΔN68], P5 [ΔN82]) と、C 末端を段階的に欠失した P1 (図 2) を transient に発現した HEK293T 細胞に対して間接蛍光抗体法を実施したところ、P3 [ΔN52], P4 [ΔN68], P5 [ΔN82] を除くすべての isoform および C 末端欠失 P1 に反応したことから (図 3)、認識するエピトープは RABV-P の N 末端から 19~52 残基の間に存在すると考えられた。この領域は、RABV-N 蛋白質との結合部位、L 蛋白質との結合の安定性に寄与する部位、核外搬出

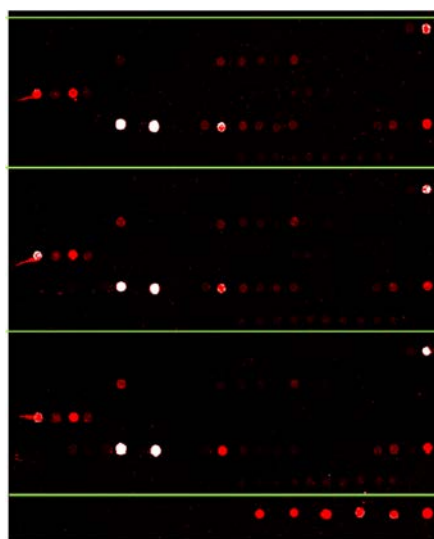


図1 RABV-P由来ペプチドを固相化したマイクロアレイスライドの反応結果 (scFv-P115の結果の一部)。

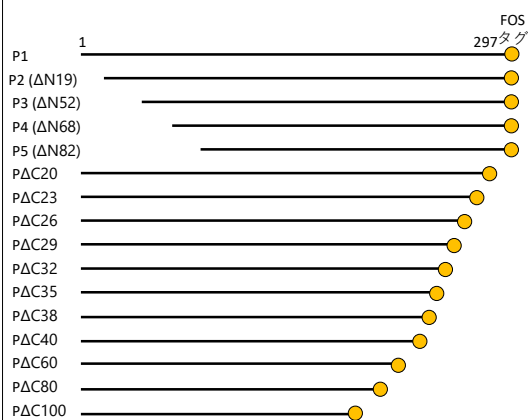


図2 RABV-Pのisoform5種およびC末端を段階的に欠失したP1の模式図

シグナルなど、複数の機能ドメインを含むとされている。現在、さらに抗原決定基の範囲を絞るとともに、他の抗 RABV-P scFv クローンについても同様の解析を進めている。

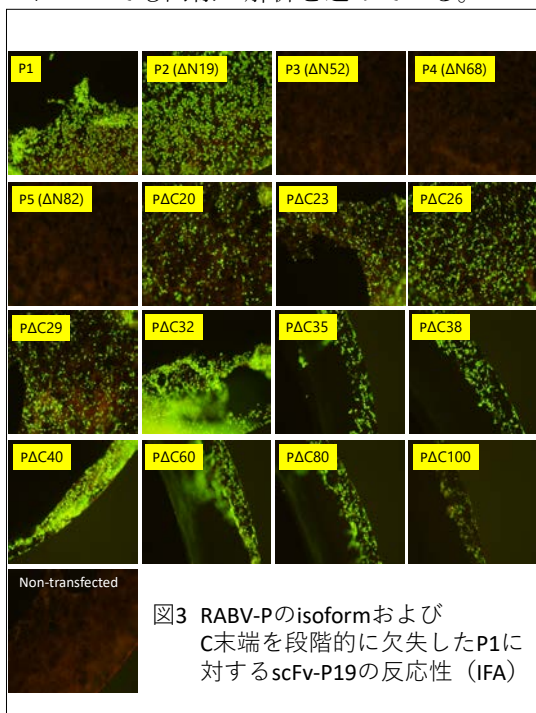


図3 RABV-PのisoformおよびC末端を段階的に欠失したP1に対するscFv-P19の反応性 (IFA)

4) 血液脳関門 (BBB) 透過性ペプチドを用いた *in vitro* デリバリー系の構築

RVG29 のほかに、同様に BBB 透過性が報告されているヘビ毒由来ペプチド KC2S および陰性対照ペプチドを作製した。各ペプチドの C 末端には、静電的な作用でプラスミド DNA と結合できるように、9 個のアルギニン残基 (-9rR) を付加した。これらのペプチドをイムノプレートに固相化し、抗 RABV-G 血清を用いて ELISA を行ったところ、いずれのペ

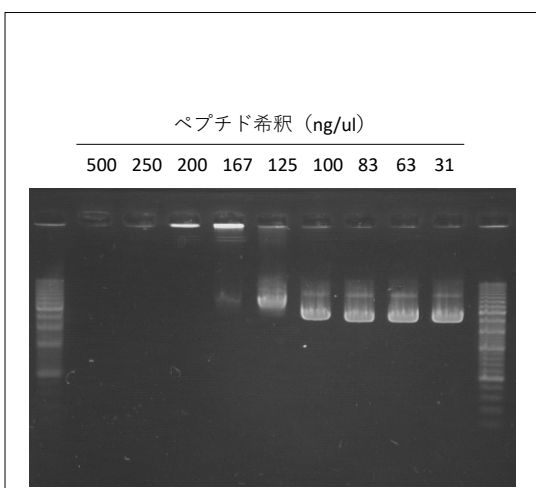


図4 DNA shift assay結果

階段希釈したペプチド液 (RVG29-9rR) 10ulを scFv-P19/pCAGプラスミド (1mg/ml) 10ulと混合し、電気泳動を行った。

プチドに対しても反応性が認められなかったことから、これらのペプチドが狂犬病患者体内の血中で阻害される可能性は低いと考えられた。続いて scFv 発現プラスミドとペプチドの混合比を段階的に変えて、DNA shift assay を行い、各ペプチドについて適切な混合比を決定した (図 4)。

この結果をふまえて、scFv 発現プラスミドと各ペプチドの複合体を作製し、マウス神経芽腫細胞に対する導入試験を行った。導入 2 日後に細胞を固定し、scFv の発現状況を間接蛍光抗体法で確認したところ、導入効率は数%にとどまっていた。導入効率の上昇を図るため、緑色蛍光蛋白質発現プラスミドを用いて諸条件の再検討を行ったが、発現効率の向上は認められなかった。このため、現時点においては BBB 透過性ペプチド単独でのデリバリー系の構築は困難と判断した。

5) ナノ粒子を用いた *in vitro* デリバリー系の構築

経鼻接種を想定したナノ粒子 (ペプチド非外套) は、静岡県立大学薬学部の浅井知浩博士により作製された。まず Dicycylphosphatediethylenetriamine (DCP-DETA) を含んだポリカチオンリポソーム (PCL) を調製し (DCP-DETA-PCL)、これに scFv-P19 発現プラスミド (pCAGbsr) を添加し、ボルテックス後 20 分間静置することで複合体 (Lipoplex) を形成させた。DCP-DETA-PCL および Lipoplex については、それぞれ作製後

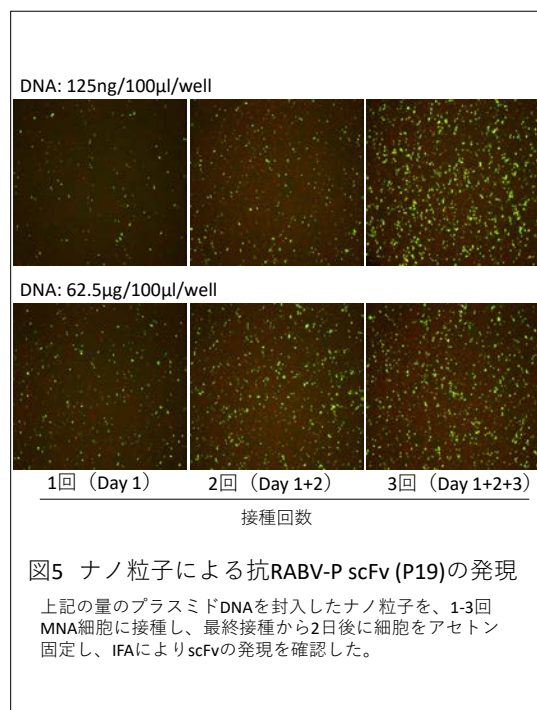


図5 ナノ粒子による抗RABV-P scFv (P19)の発現

上記の量のプラスミドDNAを封入したナノ粒子を、1-3回MNA細胞に接種し、最終接種から2日後に細胞をアセトン固定し、IFAによりscFvの発現を確認した。

にゼータサイザーを用いて粒子径とゼータ電位を測定し、ナノ粒子が形成されていることを確認した。

得られた scFv-P19 発現プラスミド封入ナノ粒子を用いて、MNA 細胞、HEK293T 細胞への導入試験を実施した。まず予備試験とし

て、ナノ粒子液を階段希釈し、両細胞に1回接種し、2日後に細胞毒性の有無を検証するとともに、間接蛍光抗体法により scFv の発現状況を確認した。これらの結果から、ナノ粒子液の適切な使用希釈の範囲を決定した。続いて、細胞毒性が見られない濃度範囲でナノ粒子液を階段希釈し、MNA 細胞に接種したところ、用量依存的な発現効率の推移が確認できた。また1, 2, 3日間の単独/連続投与を比較したところ、連続投与により scFv 発現細胞数が増加した(図5)。一方、市販のDNA導入試薬による遺伝子導入と比較すると、導入/発現効率は低いことから、*in vivo* 接種により RABV の増殖阻害効果を検証するためには、まず *in vitro* 段階でさらに遺伝子導入/発現効率をさらに高める必要があると判断した。

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 2 件)

Growth signalobody selects functional intrabodies in the mammalian cytoplasm
Lee S, Kaku Y, Inoue S, Nagamune T, Kawahara M.
Biotechnology Journal (2016);11(4):565-73.

Engineering a growth sensor to select intracellular antibodies in the cytosol of mammalian cells
Nguyen TD, Takasuka H, Kaku Y, Inoue S, Nagamune T, Kawahara M
Journal of Bioscience and Bioengineering (2017) S1389-1723(17)30004-X.

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

河原正浩 (KAWAHARA Masahiro)
東京大学大学院工学系研究科・准教授

浅井知浩 (ASAI Tomohiro)
静岡県立大学薬学部・准教授