

課題番号 17

タイトジャンクション分子に対するナノボディーの作製

[1] 組織

代表者：東 智仁
(福島県立医科大学医学分)
対応者：白川 龍太郎
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：齋藤 明 (福島県立医科大学医学部)
東 淳子 (福島県立医科大学医学部)

研究費：物件費 10 万円

[2] 研究経過

腫瘍免疫チェックポイントの研究および標的治療薬の開発は、近年ますますその重要性を増している。本共同研究では、免疫チェックポイントに関与することが示唆されているアンギュリン3の細胞外ドメインを標的としたナノボディーを開発することを目的として研究を行った。

以下、研究活動状況の概要を記す。

昨年度に引き続き、新型コロナウイルス流行のため白川博士と直接面会して実験内容を打ち合わせすることはできず、電子メールでやりとりをしつつ研究を進めた。実際の実験においても、東北大学でのFACS、MACSを用いたスクリーニングを予定していたが、固着細胞を用いたプロトコルに変更し、福島県立医科大学において組換えDNA実験計画を申請し承認を得た上で、適宜白川博士の助言をあおぎつつ、実験を進めてきた。

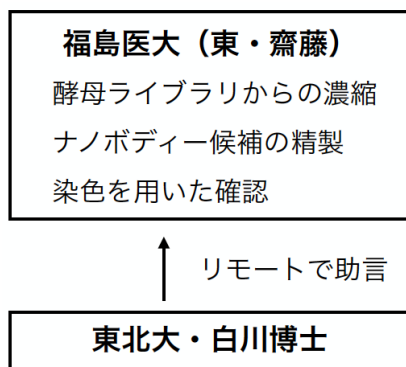


図1 本研究の進め方の概要

[3] 成果

(3-1) 研究成果

ヒトアンギュリン1、2、3の発現ベクターを作成し、アンギュリン3の発現ベクターを元に特異的なナノボディーのスクリーニングを行って、ポジティブな染色像を呈するクローンを単離した。

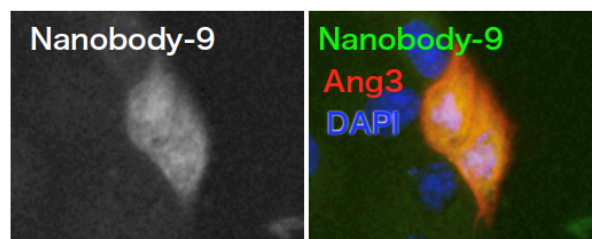


図2 アンギュリン3を認識するナノボディークローンによる染色例

しかしながら、単離したクローンは力価と特異性が低く、内在性のアンギュリン3の染色には用いることができないことが分かったため、改めてスクリーニングを行った。

アンギュリン3を一過性に発現したHEK293T細胞に結合し野生型のHEK293T細胞に結合しないクローンを4回選別した後、同じスクリーニングをMDCK II細胞でさらに4回行った。そののちに濃縮されたライブラリからナノボディー遺伝子をクローニングし、16個のコロニーを選択してナノボディーを精製し、それぞれについて染色を試みたが、今回のスクリーニングではアンギュリン3に特異的に反応するクローンは得られなかった。また、難治性のがんとして知られる悪性上皮腫の細胞で発現が亢進していることを明らかにしたクローディン15 (Watanabe et al., Sci Rep, 2021) についても、同様にHEK293T細胞を用いてスクリーニングし、16クローンを単離・精製したが、特異的なナノボディーは得られなかった。

今後、FACSやMACSを用いたスクリーニングによって力価と特異性の高いクローンを濃縮するプロトコルを確立した上で改めてスクリーニングを行いたい。また、アンギュリン3を認識するナノボディーとして既に単離したクローン9について、PCRを用いた変異の導入によって力価を向上させることを試みたい。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により、東北大学と福島県立医科大学の研究者の交流が活性化し、若手研究者の育成にも繋がった。アンギュリン3のナノボディーが開発されたあかつきには、がん免疫チェックポイントの新しい創薬につながる可能性がある。また、アンギュリン3以外に、アンギュリン1やクローディンに対する抗体も同様のストラテジーで単離できることが期待できる。アンギュリンやクローディンは多くのウイルスや細菌毒素の標的受容体となることが既に明らかになっており、また、腫瘍において異所的発現が見られることが知られている。そのため、これらの分子に特異的に結合するナノボディーが開発できると、ウイルス・細菌感染の新たな治療薬や、CAR-T などのがん治療法の開発につながることも期待できる。

[4] 成果資料

現在のところ、本共同研究の直接的な成果によって出版された論文はまだないが、本研究に関連して進めているタイトジャンクションのプロジェクトにおいて、以下の論文を発表した。

1. [Higashi AY](#), [Higashi T](#), Furuse K, Ozeki K, Furuse M, Chiba H.

Claudin-9 constitutes tight junctions of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland.

Sci Rep, 11(1): 216442, 2021.

2. Watanabe M, [Higashi T](#), Ozeki K, [Higashi AY](#), Sugimoto K, Mine H, Takagi H, Ozaki Y, Muto S, Okabe N, Matsumura Y, Hasegawa T, Shio Y, Suzuki H, Chiba H.

CLDN15 is a novel diagnostic marker for malignant pleural mesothelioma.

Sci Rep, 11(1): 12554, 2021.