

無細胞技術を活用し、血液脳関門バリア機能を担う クローディン5を阻害する抗体を創出 — 脳へのドラッグデリバリーシステムへの応用に期待 —

研究成果のポイント

1. これまで大量生産できなかったクローディン5タンパク質の大量生産に、愛媛大学発の技術であるコムギ無細胞タンパク質合成技術を用いて成功しました。
2. クローディン5の細胞外領域に結合する抗体を創出するために、人工的に改変したクローディン5抗原を設計しました。人工デザインしたクローディン5抗原をマウスに免疫し、クローディン5の細胞外領域に結合する抗体を複数取得しました。
3. 創出したクローディン5抗体がクローディン5のバリア機能を低下させることを確認しました。
4. 本成果で創出したクローディン5の細胞外領域に結合して阻害する抗体は、クローディン5を標的とした新たな脳内ドラッグデリバリーシステムの開発に貢献することが期待されます。
5. 本研究で開発した膜タンパク質の細胞外領域に結合する抗体を効率的に作製する手法は、抗体医薬開発を効率化する技術として、今後注目されると期待されます。

研究の背景

現在、世界規模で高齢者人口が急増し、2050年には14億人余りに達すると試算されています。世界に先駆けて高齢社会を迎える我が国では、「健康長寿」をどう実現するかが大きな課題になっています。特に問題になっているのは、高齢化に伴い増加する認知症、アルツハイマー病などの中枢神経系疾患です。しかし、中枢神経系疾患を治療するための薬を脳内へ届けることが難しく、中枢神経系疾患薬の開発が立ち遅れています。薬の脳内送達に難しい理由は、脳の血管が持つ特別な仕組みにあります。肝臓や腎臓などの臓器の中に張り巡らされている通常の毛細血管は細かい穴が空いており血管と組織の間で物質のやりとりをするのに適した構造をしています。一方、脳の毛細血管は簡単に物質を通さないような障壁（バリア）を作って、最も重要な臓器の一つである脳を守っています。脳の毛細血管は穴や隙間が空いておらず、通常の臓器より50～500倍以上、物質を通しにくくなっています。さらに脳の毛細血管の内側の細胞（脳血管内皮細胞）は細胞同士が密着・結合した「**血液脳関門**」という強固なバリアを作っており、脳の中に入る物質を非常に厳密に選別、制御しています。この血液脳関門のおかげで、毒物などが脳に簡単に入り込むことはありませんが、同時に、薬も脳の中には入っていきません。現

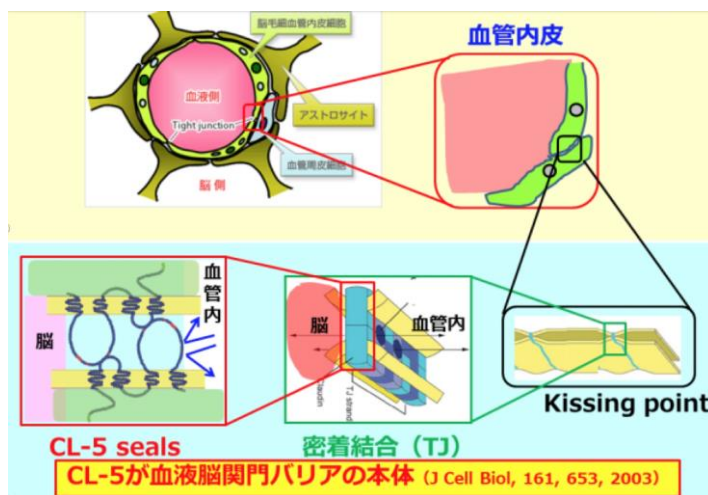


図1. 血液脳関門のバリア機能を担う CLDN-5.

在、多くの製薬企業が中枢神経系疾患の治療薬の開発に力を入れています。脳へ薬を届ける有効な技術（**脳内薬物デリバリー技術**）がないことが、治療薬の実用化のための大きな障害になっています。

血液脳関門を作っているのは、脳血管内皮細胞の表面にある「**クローディン5 (CLDN-5)**」タンパク質であることが知られています。CLDN-5 は4回膜貫通タンパク質と呼ばれる細胞膜に刺さったタンパク質です。血管内皮細胞の外側に飛び出た CLDN-5 の一部（細胞外領域）が、隣の細胞の CLDN-5 の細胞外領域に結合することで、血管内皮細胞同士を強く接着し、血液脳関門を作ります（図1）。CLDN-5 が血液脳関門の正体であることが報告されてから、15年以上にわたり世界中で CLDN-5 を標的とした脳内薬物デリバリー技術開発の取り組みがされてきましたが、まだ開発に成功したという報告はありません。

CLDN-5 の機能を抑え、血液脳関門を開いて薬剤を通過できるようにするには、CLDN-5 の細胞外領域に結合する分子を開発して、CLDN-5 同士の相互作用の邪魔をさせることが有効です。特定のタンパク質に結合し、その機能を抑える分子の代表例が**抗体**です。抗体は病原体などを攻撃するために動物が作るタンパク質です。抗体の持つ、特定のタンパク質などを認識して、特異的に強く結合する機能はライフサイエンス基礎研究や診断、医薬開発などで様々な応用されています。抗体は例えば、標的タンパク質の定量、検出、インフルエンザや癌などの病気の診断で使われていますし、また最近ではハーセプチンやオプジーボに代表される抗体医薬など治療にも欠かせないツールになっています。過去に CLDN-5 の機能を抑えて血液脳関門を開こうと、CLDN-5 の細胞外領域に結合する抗体（**細胞外結合抗体**）をつくる試みが多く研究者によって行われてきましたが、これまでそのような抗体が得られたという報告はありませんでした。

研究内容と成果

CLDN-5 の細胞外結合抗体をつくるのが難しい理由は2つあります。一つは、CLDN-5 が膜タンパク質で、大量生産が難しいことです。もう一つはヒトの持つ CLDN-5 の細胞外領域とマウスの CLDN-5 の細胞外領域の配列が非常に似ていることです。愛媛大・大阪大の共同研究チームはこれらの問題を、愛媛大発の技術である「**コムギ無細胞タンパク質合成技術**（コムギ無細胞系）」を応用して創出した**人工デザイン抗原**を用いて克服し、CLDN-5 を抑制する抗体をつくることに成功しました。

CLDN-5 大量生産に初めて成功

抗体をつくるためには、マウスなどの動物に抗体を作らせたいタンパク質（抗原）を接種します。免疫と言います。免疫するには、たくさんの抗原タンパク質を用意する必要があります。普通のタンパク質は大腸菌や培養細胞を用いて、大量のタンパク質を生産することは難しくありません。しかし、CLDN-5 のような膜タンパク質は生体膜に刺さった複雑な構造を持っているため、細胞にたくさん作らせると凝集してしまいます。これまでマウスに免疫するだけの CLDN-5 を大量生産することが難しかったことが、CLDN-5 抗体を

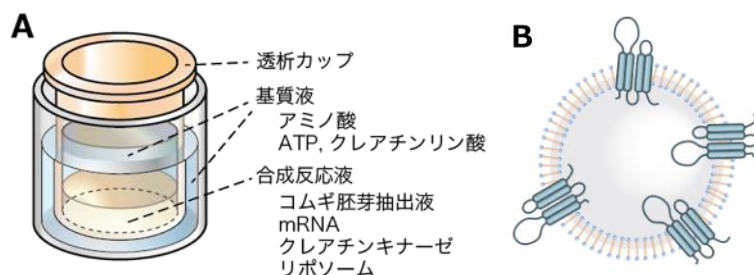


図2. コムギ無細胞技術を用いた CLDN-5 大量生産. A, 透析重層法による膜タンパク質合成法. B, 無細胞合成した CLDN-5 プロテオリポソームの模式図.

開発するボトルネックになっていました。

そこで、共同研究チームはコムギ無細胞系を用いた CLDN-5 の生産を試みました。コムギ無細胞系を使って人工脂質小胞（リポソーム）の膜の上に膜タンパク質を安定して合成できます（図 2）。コムギ無細胞系を使った膜タンパク質の大量生産は過去に数十種類の成功例がある強力な方法です。しかし期待に反して、CLDN-5 の生産は一筋縄では行きませんでした。CLDN-5 と似ている CLDN-1、CLDN-2、CLDN-3、CLDN-4 は問題なくつくることができましたが、CLDN-5 だけは全く合成できませんでした（図 3A）。その原因を追求した結果、研究チームは

CLDN-5 のタンパク質の設計図である DNA の配列に注目しました。DNA は A, T, G, C の 4 つの核酸が数百～数千繋がってできていますが、CLDN-5 の DNA は G と C が極端に多い配列だったのです（図 3B）。研究チームは CLDN-5 のアミノ酸配列は変えずに DNA の GC の割合を下げる手法を開発しました。再設計した DNA を用いて CLDN-5 の無細胞合成を試みたところ、今度は非常に良好に合成が確認されました。これは、CLDN-5 の大量生産に成功した初めての例です。

CLDN-5 の大量生産が可能になったので、次に研究チームは大量生産した CLDN-5 をマウスに免疫して抗体作製を試みました。ところが、マウスは CLDN-5 の細胞外結合抗体を全く作りませんでした。

人工デザイン CLDN-5 抗原の開発

大量生産した CLDN-5 タンパク質をマウスに免疫しても、CLDN-5 の細胞外結合抗体が得られなかった原因を探るため、研究チームが CLDN-5 のアミノ酸配列をよく検討した結果、ヒトの CLDN-5 とマウスが持つ CLDN-5 がとてもよく似ていることがわかりました。免疫には、自分自身と全く同じ、または近いものは攻撃しない、という仕組みがあります（さもなければ、抗体が自分の細胞を攻撃してしまいます）。マウスはヒトの CLDN-5 とほとんど同じ機能や構造を持っているマウス CLDN-5 を持っています。特に細胞外の領域はほとんど同じアミノ酸配列と言って良いほど似ています。そのため、マウスに免疫してもヒト CLDN-5 の細胞外結合抗原はできにくいのだと考えられました。なんとかマウスに細胞外結合抗体を作らせるため、研究チームは CLDN-5 の配列をもとに新たに設計した人工膜タンパク質を 2 種類考案しました。

最初に設計したのは、ヒトとマウスの CLDN-5 を融合させたヒト/マウス キメラ CLDN-5 です（図 4A）。この膜タンパク質は、全体としては CLDN-5 に似た形をしています。外側と内側で異なる構成をしています。抗体を作って欲しい細胞外側にあたる部分はヒトの CLDN-5 の配列、細胞内側の部分はマウスの CLDN-5 の配列からできています。細胞内側は抗体ができて欲しくないで、マウスの配列に

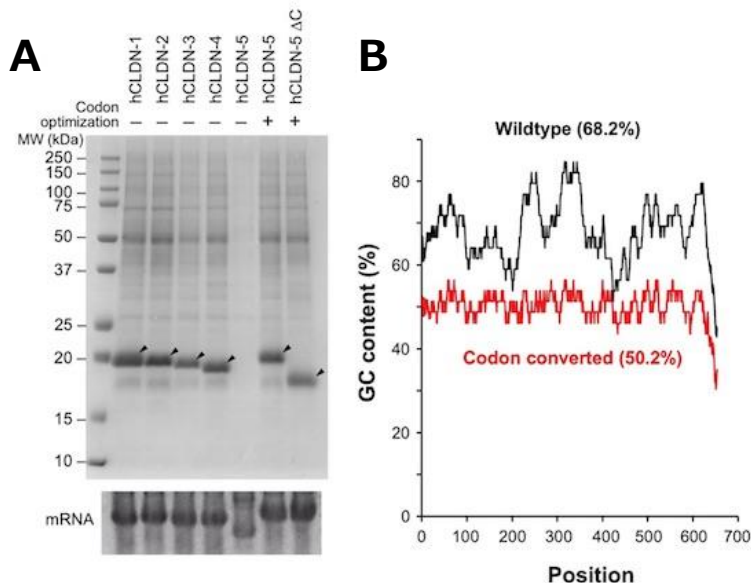


図 3. 遺伝子改変により CLDN-5 の大量生産に初めて成功. A, 無細胞合成したクローディングタンパク質. B, CLDN-5 遺伝子の GC 含量. 黒: ヒトが元来持つ CLDN5 の配列、赤: GC 含量を減らした CLDN-5 配列. 両者はともに同じ CLDN-5 タンパク質をコードしている.

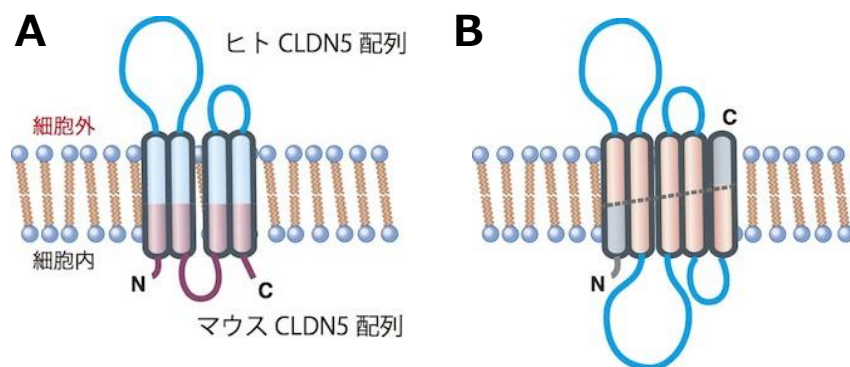


図4. CLDN-5の細胞外結合抗体を作るための人工CLDN-5の模式図。
A, ヒト/マウス キメラCLDN-5抗原. B, シンメトリックCLDN-5抗原.

して抗体ができるのを防いでいます。そうすることで、細胞外側のわずかなアミノ酸の違いが強調され、マウスが細胞外結合抗体を作ってくれるのではないかと予想しました。

次に設計したのは、ヒトCLDN-5の細胞外側配列を膜の両側に対称に配置したシンメトリックCLDN-5抗原です(図4B)。このより挑戦的な設計の人工膜タンパク質は、細胞内側の配列が全て除かれ、代わりにもう一組の細胞外領域が配置されています。すでにCLDN-5本来の形から大きく外れているこの人工膜タンパク質は細胞接着させるCLDN-5の本来の機能は持たないかもしれません。しかしマウスに免疫する抗原としては、CLDN-5の細胞外側の配列を免疫系に対して強くアピールする役割を十分果たしてくれそうです。

研究チームは新たに設計した2種の人工デザインCLDN-5抗原を、コムギ無細胞系を用いて大量生産しました。人工デザイン抗原を免疫されたマウスは、高い確率でCLDN-5の細胞外結合抗体を発現しました。この結果は、人工デザイン抗原がCLDN-5の細胞外側のわずかな違いをマウスの免疫系に示すことに期待通り成功したことを示しています。

CLDN-5 機能阻害抗体を取得

研究チームは人工デザイン抗原を免疫されたマウスから、CLDN-5細胞外結合抗体のモノクローナル化を行いました。これらのマウスはCLDN-5の細胞外結合抗体だけではなく、他のタンパク質に結合する数え切れない数の抗体を持っています。このうち特定の1種類の抗体だけを取り出し、大量に増やしたものがモノクローナル抗体です。CLDN-5を標的にした脳内薬物デリバリー技術の研究開発を進めるためには、性質が均一で大量生産もできるモノクローナル抗体が是非とも必要でした。研究チームは最終的に5種類のCLDN-5細胞外結合モノクローナル抗体の取得に成功しました。

CLDN-5細胞外結合モノクローナル抗体の詳細な解析の結果、これらの抗体はCLDN-5の細胞外領域に選択的に結合することがわかりました。これらのモノクローナル抗体は培養細胞、あるいはコムギ無細胞系で作ったCLDN-5以外のクローディングタンパク質には全く結合しませんでした(図5)。研究チームはさらにこれらの抗体が結合するCLDN-5の部位についても明らかにしました。

最後に、研究チームは取得したモノクローナル抗体を使ったCLDN-5の機能抑制を試みました。ヒトCLDN-5を発現させたMDCKIIというイヌ腎臓由来の培養細胞を使って擬似的な血液脳関門を作り、CLDN-5細胞外結合モノクローナル抗体をかけました。すると5種類のモノクローナル抗体のうち、2B12という抗体がバリアを弱めていることが観察されました(図6)。よりヒトの血液脳関門に近い、

カニクイザルの脳毛細血管の内皮細胞を用いた実験でも、同様に 2B12 抗体によりバリア機能が低下することが確認されました。これらの結果は、CLDN-5 の細胞外領域に結合する 2B12 が CLDN-5 のバリア機能を抑制したことを示しています。

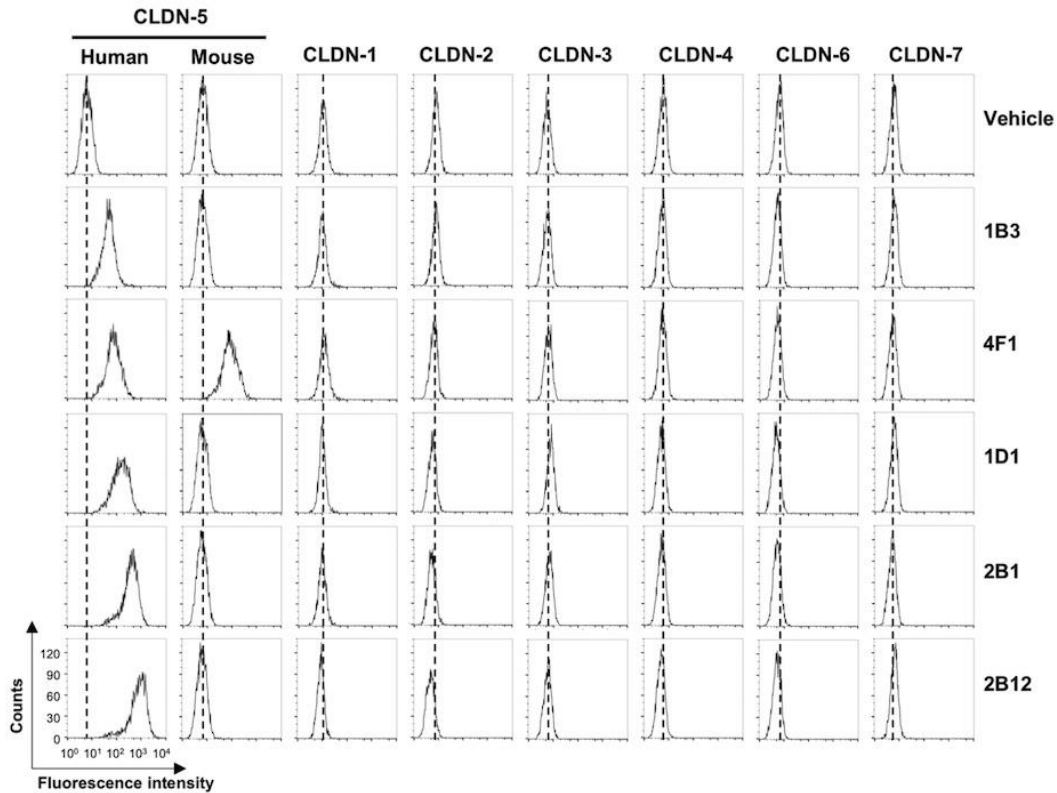


図5. CLDN-5 細胞外結合モノクローナル抗体の CLDN-5 細胞外領域への選択的結合. 各種クローデインを発現させた細胞への抗体の結合を解析した実験の結果. ピーク (山) が点線より右側に移動していれば、抗体が結合したことを示す. 1B3~2B12 が本研究で新たに取得したモノクローナル抗体. 一番上の段は抗体未処理の対称区を示す. 得られた抗体は CLDN-5 以外のクローデインには全く結合していない.

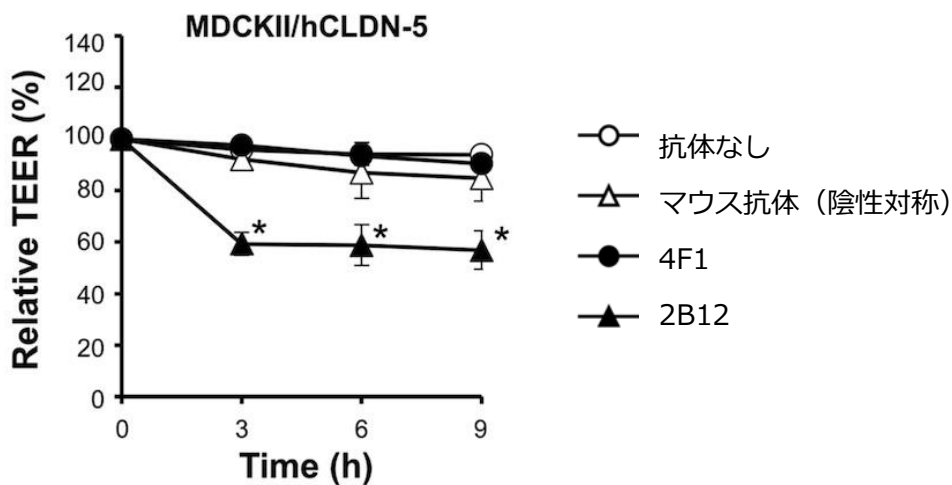


図6. CLDN-5 細胞外結合抗体による CLDN-5 バリア機能阻害. CLDN-5 を発現させた培養細胞にバリアを作らせた. CLDN-5 細胞外結合抗体を添加し、バリアの密閉度を電気生理的に測定した. この結果は 2B12 抗体を処理した時だけバリアが緩んでいることを示している.

社会的意義と今後の展開

これらの研究結果は、脳内薬物デリバリー技術に新たな可能性をもたらします。CLDN-5 を抑える抗体と中枢神経系疾患の治療薬を同時に投与すれば、血液脳関門をシールしている CLDN-5 の機能を一時的に抑えて血液脳関門を開き、薬の脳内デリバリーを補助できるかもしれません（図7）。現在、研究チームは脳内薬物デリバリー技術のより詳細な検証実験を行うために、ヒト CLDN-5 を持つ遺伝子組換えマウスの作製に取り組んでいます。

また、本研究で創出した、人工デザイン抗原を用いて膜タンパク質の細胞外結合抗体を効率的に作らせる手法は、他の膜タンパク質に応用できる可能性があります。膜タンパク質の細胞外領域に結合し、阻害する抗体は抗体医薬の種になりますが、CLDN-5 と同様にその取得は容易ではありません。世界の売り上げ上位の半分を占める抗体医薬の開発をより効率的に進めるために、本技術が注目を集める可能性があります。

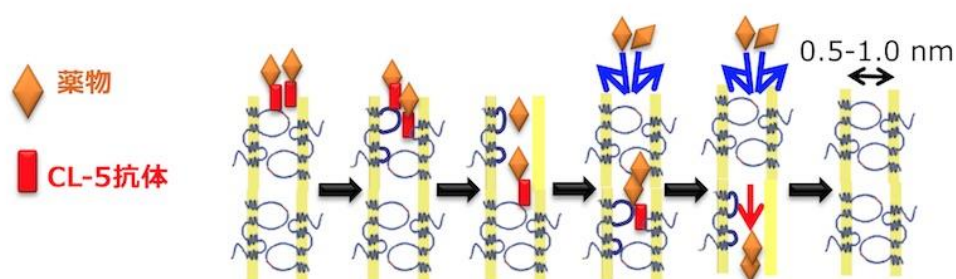


図7. CLDN-5 阻害抗体を用いた脳内薬物デリバリー概念図。CLDN-5 阻害抗体で一時的に CLDN-5 による血液脳関門のバリアをゆるめ、脳内に薬物を到達させる。時間の経過とともに抗体が外れる、あるいは CLDN-5 が入れ替わることでシール機能が復活し、血液脳関門は元に戻る。

謝辞

本研究は、文部科学省/JST 大学発新産業創出プログラム (START)、文部科学省/日本学術振興会 科研費、AMED 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 (PDIS)、AMED 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 (BINDS) からの科学研究費、先進医薬研究振興財団および武田科学振興財団からの助成により実施されました。

【発表論文】

論文タイトル : Engineered membrane protein antigens successfully induce antibodies against extracellular regions of claudin-5 (改変した膜タンパク質抗原を用いてクローディン5タンパク質の細胞外領域に結合する抗体の誘導に成功)

掲載誌 : Scientific Reports

著者 (掲載順) : Yosuke Hashimoto¹, Wei Zhou², Kohtaroh Hamauchi², Keisuke Shirakura¹, Takefumi Doi¹, Kiyohito Yagi¹, Tatsuya Sawasaki², Yoshiaki Okada¹, Masuo Kondoh^{1*}, Hiroyuki Takeda^{2*}.

所属 : ¹愛媛大学プロテオサイエンスセンター、²大阪大学大学院薬学研究科

掲載日 : 2018年5月30日

DOI : 10.1038/s41598-018-26560-9