

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791291

研究課題名(和文) ScFv抗テネイシンC抗体による心疾患の分子標的イメージング診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of diagnosis based on molecular targeting imaging of cardiovascular diseases by scFv antibody against Tenascin-C

研究代表者

下條 尚志(Shimojo, Naoshi)

三重大学・医学部・技術員

研究者番号：70410751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：テネイシン-C(TN-C)は虚血性心疾患などの炎症部位に一過性に高発現する。TN-Cを特異的に認識する抗体を用いて、分子診断薬として改良可能かどうかを検証した。ハイブリドーマのRNAから抗TN-C抗体のH鎖可変領域(VH)とL鎖可変領域(VL)遺伝子をクローニングし、重複伸長PCRを行い、VH-linker-VL遺伝子(scFv遺伝子)を大腸菌、in vitroセルフリー(RTS小麦胚芽)の発現系、哺乳類細胞株(HEK293)へそれぞれ遺伝子導入した。その結果、HEK293において最も多く発現量が得られた。準備が整い次第、心筋炎モデル動物に注入して病巣への集積を確認する予定である。

研究成果の概要(英文)：Tenascin-C(TN-C) is expressed transiently inflammatory regions in various cardiovascular diseases. We investigated the possibility that specific antibody against TN-C is useful for detecting cardiovascular diseases as a molecular diagnostic reagent. Heavy chain variable region (VH) and light chain variable region (VL) genes of anti-TN-C antibody were obtained from total RNA in hybridoma, and were performed overlap-extended PCR. Expression vector inserted VH-linker-VL gene (scFv) was used in *E. coli*, in vitro cell free (RTS wheat germ) and mammalian cell line (HEK293) expression systems. As a result, the antibody expression was highly effective in HEK293 cell line system. As soon as it's ready, we are planning to experiments of antibody accumulation in foci of myocarditis model mice.

研究分野：抗体工学

キーワード：ScFv型抗体 テネイシン-C 分子イメージング 虚血性心疾患

1. 研究開始当初の背景

心臓の病気は心筋梗塞をはじめ、心筋炎、拡張型心筋症、川崎病、心奇形など多岐にわたり、全身へ血液を送る働き上、重篤な症状を起こすものが多い。心筋炎は、特別な所見に乏しい上に急性の転機をたどることから临床上重要であるが、診断に苦慮する疾患の一つとされている。心筋炎の確定診断は、心内膜心筋生検によって採取された組織像に炎症細胞が浸潤しているか否かで決定する。しかしながら、当該方法は侵襲性やサンプリングエラーといった課題点が残るため、低侵襲かつ精確な早期診断を行うための新規診断技術が待ち望まれている。

テネニン-C (TN-C) は、正常な成体組織では発現せず、種々の病変部位で一時的に再発現する細胞外マトリックス糖蛋白質の一つである。申請者のグループが心筋炎のモデル動物を用いた実験から、TN-C は心筋炎の初期～中期に現れ、治癒段階では消失することを見出した。さらに、独自に改良したモノクローナル抗 TN-C 抗体を用いて、単一光子放射断層撮影 (SPECT) で心疾患モデル動物の病巣の撮像に成功した。

2. 研究の目的

TN-C に対して得られたモノクローナル抗体のなかで、特異性が高く、結合力の強い別のクローンを一本鎖可変領域断片 (scFv) へと遺伝子改変し、分子イメージング診断法の確立を目指す。

3. 研究の方法

心筋炎モデルマウスの作製

本研究では、マウス実験的自己免疫性心筋炎モデルを採用した。マウスの心筋特異的に発現するミオシン H 鎖 (MyHC-) 由来ペプチド、[Ac-RSLKLMATLFSTYASADR-OH]⁶¹⁴⁻⁶²⁹ を用いて行った。完全フロイントアジュバントと混和した当該ペプチドを BALB/c マウス背側皮下に 2 回 (day0, 7) 注入後、14 日後に犠牲剖検して組織学的に評価した。

IgG 型抗体の解離定数測定

GE 社製 Biacore®3000 を用いて抗体の解離定数 (K_D) を測定した。センサーチップは CM (カルボキシルメチルデキストラン) 5 を採用し、N-ヒドロキシコハク酸イミド/エチル(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドにより抗原-デキストラン間を架橋した抗体抗原結合反応で使用した緩衝液は HBS-P (10mM HEPES / 0.15 M NaCl / 0.005 % Surfactant P 20 (pH 7.4)) を使用し、機器

本体内の反応検出部は 25 に温度設定して測定を行った。

scFv 型抗 TN-C 抗体の設計・発現系の構築

抗 TN-C 抗体を産生するハイブリドーマの RNA から抗体の H 鎖可変領域 (VH) と L 鎖可変領域 (VL) 遺伝子をクローニングした。次に、重複伸長 PCR を行い、リンカーを介した VH-linker-VL 遺伝子 (scFv 遺伝子) を設計した。大腸菌、哺乳類細胞などの宿主間におけるコドン使用頻度の違いを考慮し、設計した scFv 抗体遺伝子配列を各宿主間で発現でき得る様にコドンの最適化を行った。これをそれぞれの発現ベクター系、pET 系 (大腸菌)、RTS pIVEX Wheat Germ His6-tag (in vitro 合成系・セルフリーシステム)、pEB-Multi-Hyg (HEK293 細胞) へサブクローニングしたのち宿主に導入して発現系の構築を試みた。

4. 研究成果

心筋炎モデルマウスの作製

BALB/c マウスへ MyHC- ペプチドを注入し、犠牲剖検後に心臓を摘出してホルマリン固定・パラフィンブロック作製後、組織評価を行った。その結果、注入した全てのマウスにおいて、炎症細胞の浸潤像が確認された。浸潤部位や炎症細胞数は各マウスで多彩な組織像を呈していた (図 1)。

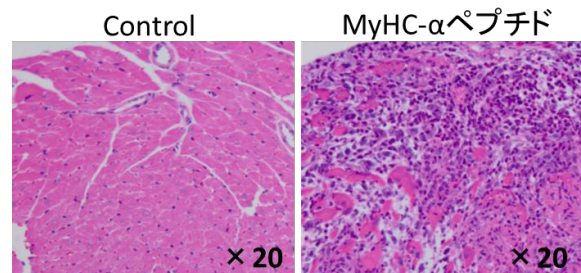


図 1. 実験的自己免疫性心筋炎の組織所見像 (ヘマトキシリン・エオジン染色)

抗体の K_D 測定

抗 TN-C 抗体の結合力を算出するために、Biacore を用いて測定した結果、 $K_D=3.98 \times 10^{-12} M$ であり、非常に解離の遅い、つまり抗原との結合が強い抗体であることが分かった (図 2)。抗体の遺伝子設計等でフレームワークのシフトにより、改良型抗体の結合力が大幅に低下する可能性もあるため、本数値を基準に改良型抗体の機能を解析する。

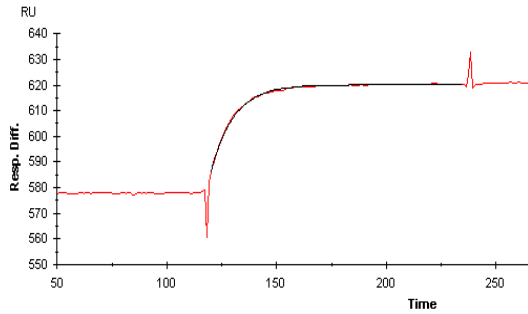


図 2. IgG 型抗 TN-C 抗体の TN-C に対する結合センサーグラム

scFv 型抗 TN-C 抗体の設計・発現系の構築

可溶性一本鎖可変領域断片 (scFv) タンパク質を調製するために、まず抗 TN-C 抗体を産生するハイブリドーマの RNA から抗体の H 鎖可変領域 (VH) と L 鎖可変領域 (VL) 遺伝子をクローニングした。次に、重複伸長 PCR を行い、リンカーを介した VH-linker-VL 遺伝子 (ScFv 遺伝子) を構築し、これを各発現ベクターへサブクローニングしたのち各発現システムにて試みた。

a. 大腸菌

抗体遺伝子を挿入した pET 系プラスミドを用いて、BL21 株 DE3 competent cell に形質転換を行った。アンピシリン耐性下で得られたコロニーからラージスケールで 37 24 時間培養し、IPTG 添加後に菌体を回収した。その後、浸透圧ショック法により回収したペリプラズム画分を His カラムで精製し、電気泳動を行った。CBB 染色によるバンドの確認はできなかったが、抗 His 抗体によるウエスタンブロッティング (WB) 法を行った結果、少量発現していた。高発現量を検討するため、低温培養 (25、30) も行ったが 37 と同等の発現量であった。

b. セルフリー

宿主への毒性やコドンの使用頻度を考慮しなくてもよい in vitro 合成系を使用したタンパク質発現系、RTS Wheat germ (ロシユ社) を用いて発現解析を行った。発現容量によって異なる 2 種の製品 (100、500) を用いた結果、CBB 染色では大腸菌同様に見られなかったが、WB 法では大腸菌に比して発現量が増加していることがわかり、さらに 500 の発現系ではさらに増加した (図 3)。しかしながら、依然として、動物実験に必要な量は精製できていないため、さらなる検討・異なるシステムを用いる必要がある。

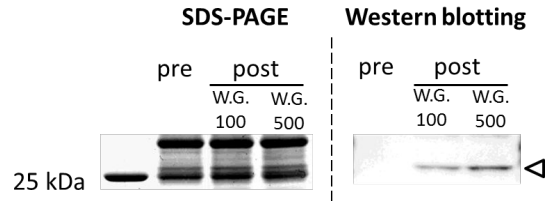


図 3. RTS システムを用いた scFv 化抗体の発現結果 抗 His \times 6 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った結果、scFv 化抗体分子量に相当する領域 () にバンドが出現した。

c. 哺乳類細胞 (HEK293)

ヒト細胞で使用頻度の高いコドンを採用した配列を合成後、遺伝子工学的に合成遺伝子をエピゾーマル型発現ベクターへ組み込んだ。その後、プラスミドを HEK293 細胞へ遺伝子導入した結果、1 週間で細胞の増殖率が正常に戻り、タンパク質の発現を確認したため、無血清培地への馴化作業を行った。まず、10%FBS 入り DMEM 培地からスタートし、継代時に Serum Free Medium II (SFMII) との比率を順次変更し (DMEM:SFMII=9:1、4:1、3:2、2:3、1:4、1:9) 最終的に SFMII へ馴化した。細胞の増殖が正常に戻った時点 (d0) から培養上清を毎日回収し、ウエスタンブロッティングを行った結果、抗体の発現が経時的に上昇した (図 4)。

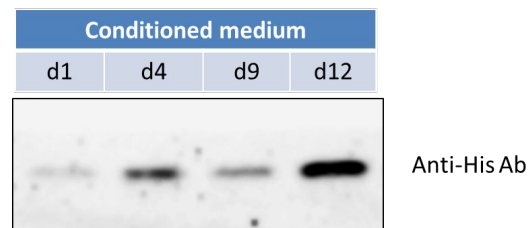


図 4. HEK293 細胞を用いて無血清培地中に発現した抗体の発現結果

本研究では、哺乳類細胞による無血清培地を用いて scFv 型抗体の発現系を構築させることに成功した。発現量を増加させる作業の最適化検討など一定の課題はあるものの、血清培地中に含まれるアルブミンなどが一切ない状態で培養系を確立できたことは、診断薬の創製において非常に重要な点である。現在、動物実験に必要な抗体量を調製しており、順次、標識して動物への注入を試み、病巣集積の解析を行う予定である。

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7件)

1. Fujimoto M, Shiba M, Kawakita F, Shimojo N, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Kanamaru K, Taki W, Suzuki H. Vasoconstrictive effect of tenascin-C on cerebral arteries in rats. *Acta Neurochir Suppl.* 2015;120:99-103. 査読有
2. Fujita S, Shimojo N, Terasaki F, Otsuka K, Hosotani N, Kohda Y, Tanaka T, Nishioka T, Yoshida T, Hiroe M, Kitaura Y, Ishizaka N, Imanaka-Yoshida K. Atrial natriuretic peptide exerts protective action against angiotensin II-induced cardiac remodeling by attenuating inflammation via endothelin-1/endothelin receptor A cascade. *Heart Vessels.* 2013 Sep;28(5):646-657. 査読有
3. Fujimoto M, Suzuki H, Shiba M, Shimojo N, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Kanamaru K, Matsushima S, Taki W. Tenascin-C induces prolonged constriction of cerebral arteries in rats. *Neurobiol Dis.* 2013 Jul;55:104-109. 査読有
4. Katoh D, Nagaharu K, Shimojo N, Hanamura N, Yamashita M, Kozuka Y, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T. Binding of $\alpha 1$ and $\alpha 6$ integrins to tenascin-C induces epithelial-mesenchymal transition-like change of breast cancer cells. *Oncogenesis.* 2013 Aug 19;2:e65. 査読有
5. 下條尚志, 橋詰令太郎, 今中-吉田恭子, 吉田利通: "テネイシン-C" 臨床化学 42. 5-12 (2013), 査読無
6. Shiba M, Suzuki H, Fujimoto M, Shimojo N, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Kanamaru K, Matsushima S, Taki W. Role of platelet-derived growth factor in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats. *Acta Neurochir Suppl.* 2013;115:219-223. 査読有
7. Shiba M, Suzuki H, Fujimoto M, Shimojo N, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Kanamaru K, Matsushima S, Taki W. Imatinib mesylate prevents cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage via inhibiting tenascin-C expression in rats. *Neurobiol Dis.* 2012 Apr;46(1):172-179. 査読有

〔学会発表〕(計18件)

1. Shimojo, N. and Imanaka-Yoshida, K. Knockout of Tenascin-C attenuates Angiotensin II-induced perivascular fibrosis in mouse. 第31回 International Society of Heart research 日本部会総会, 2014年11月28, 29日, ウィンクあいち(愛知県・名古屋市)
2. Shimojo, N., Hashizume, R., Kanayama, K., Suzuki, Y., Hara, M., Nishioka, T., Yoshida, T., Imanaka-Yoshida, K. A Functional Role of Tenascin-C in Mouse hypertensive heart. American Heart Association Scientific Sessions 2014, 15-19 Nov. 2014, Chicago (USA)
3. 下條尚志. A Functional Role of Tenascin-C in Mouse hypertensive heart. 日本循環器学会第144回東海・第129回北陸合同地方会, 2014年10月25日, ウィンクあいち(愛知県・名古屋市)
4. Shimojo, N. and Imanaka-Yoshida, K. テネイシン-Cの欠損は高血圧による心血管周囲の線維化進展を抑制する. 第18回日本心不全学会, 2014年10月10-12日, 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
5. Shimojo, N., Hashizume, R., Kanayama, K., Suzuki, Y., Hara, M., Nishioka, T., Yoshida, T., Imanaka-Yoshida, K. Knockout of tenascin-c reduces cardiovascular fibrosis by activation of macrophages via integrin $\alpha 3$ /NF- κ B in mouse hypertensive heart. The 16th International SHR Symposium, 18 Jun. 2014, Roma (Italy)
6. Shimojo, N., Hashizume, R., Kanayama, K., Suzuki, Y., Hara, M., Nishioka, T., Yoshida, T., Imanaka-Yoshida, K. Tenascin-C may accelerate cardiac fibrosis by activating macrophages via integrin $\alpha 3$ /NF- κ B/IL-6 axis. The European and the International Societies of Hypertension 2014, 13-16 Jun. 2014, Athens (Greece)
7. Shimojo, N., Hashizume, R., Kanayama, K., Suzuki, Y., Hara, M., Nishioka, T., Yoshida, T., Imanaka-Yoshida, K. Tenascin-C accelerates cardiac fibrosis by activating macrophages via integrin $\alpha 3$ /NF- κ B/IL-6 axis. 22nd International Symposium on Molecular Cell Biology of MACROPHAGES 2014, 2-3 Jun. 2014, 神戸商工会議所(兵庫県・神戸)

戸市)

8. Shimojo, N., Kanayama, K., Yoshida, T., Imanaka-Yoshida, K: A role of tenascin-C in hypertensive cardiac fibrosis. 2013 American Society for Cell Biology Annual Meeting, 14-18 Dec. 2013, New Orleans (USA)
9. Shimojo, N., Hashizume, R., Suzuki, Y., Hara, M., Nishioka, T., Yoshida, T., Imanaka-Yoshida, K. Tenascin-C worsens myocardial inflammation and fibrosis by enhancing macrophage activation via NF- κ B in mouse hypertensive heart. High Blood Pressure Research 2013 Scientific Session, 11-14 Sep. 2013, New Orleans (USA)
10. 下條尚志, 橋詰令太郎, 鈴木由香, 原万里, 吉田利通, 今中-吉田恭子. テネイシンCはNF- κ Bを介してマクロファージを活性化させて高血圧心の炎症・線維化を促進する. 第45回日本結合組織学会, 2013年6月28-29日, 和歌山県立医科大学講堂(和歌山県・和歌山市)
11. Shimojo, N., Hashizume, R., Nishioka, T., Yoshida, T. Tenascin-C aggravates cardiac fibrosis by enhancing macrophage activation in AngiotensinII induced hypertension in mice. 第65回日本細胞生物学会大会, 2013年6月19-21日, ウィンクあいち(愛知県・名古屋市)
12. 下條尚志, 橋詰令太郎, 吉田利通, 今中-吉田恭子. テネイシンCはNF- κ Bを介してマクロファージを活性化させ, 高血圧心線維化進展を促進する. 第102回日本病理学会総会, 2013年6月6-8日, ロイトン札幌(北海道・札幌市)
13. 吉田利通, 下條尚志, 小塚祐司, 今中-吉田恭子. テネイシン-Cはインテグリン α v β 6を介して上皮間葉移行を誘導する. 第102回日本病理学会総会, 2013年6月6-8日, ロイトン札幌(北海道・札幌市)
14. Shimojo, N., Hashizume, R., Nishioka, T., Yoshida, T., Imanaka-Yoshida, K. Knockout of Tenascin-C relieves cardiovascular fibrosis induced by angiotensin II and suppresses macrophage infiltration in mice. 第29回国際心臓研究学会日本部会総会, 2012年10月26-27日, 九州大学医学部百年講堂(福岡県・福岡市)
15. 加藤大祐, 下條尚志, 吉田利通. テネイシン-Cはインテグリン α v β 1と α v β 6を介して乳癌細胞の上皮間葉移行を誘導する. 第101回日本病理学会総会, 2012年4月26-28日, 京王プラザホテル(東京都・新宿区)
16. 藤田修一, 下條尚志, 寺崎文生, 西岡朋弘, 吉田利通, 廣江道昭, 石坂信和, 今中恭子. 心房性ナトリウム利尿ペプチドはアンジオテンシンIIによる心筋線維化, 炎症を抑制する. 第101回日本病理学会総会, 2012年4月26-28日, 京王プラザホテル(東京都・新宿区)
17. 加藤大祐, 下條尚志, 吉田利通. テネイシン-Cはインテグリン α v β 1と α v β 6を介して乳癌細胞の上皮間葉移行を誘導する. 第109回日本内科学会総会 サテライトシンポジウム研修医, 医学生の内科学会, 2012年4月13-15日, 京都大学医学部芝蘭会館本館(京都府・京都市)
18. 下條尚志, 藤田修一, 廣江道昭, 吉田利通, 今中恭子. ANPは抗炎症作用を有し, 心室リモデリングを抑制する. 第49回日本臨床分子医学会学術集会 2012年4月13-14日, みやこめっせ(京都府・京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下條 尚志 (SHIMOJO, Naoshi)
三重大学・医学部・技術員
研究者番号: 70410751

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号: