



慶應義塾大学



平成 30 年 5 月 31 日

滋賀医科大学
京都大学
慶應義塾大学
日本医療研究開発機構

筋萎縮性側索硬化症の異常凝集体を除去する治療抗体の開発に成功

-ALS の根治治療への道を開く -

ポイント

- ・ 筋萎縮性側索硬化症の異常凝集体を除去する治療抗体の開発に成功しました。
- ・ 自己分解型細胞内抗体は、細胞内で ALS の治療抗体を作らせるシステムで、発症に関わる TDP-43 の異常構造のみと結合して分解を進めますが、正常に働いている TDP-43 とは反応しません。
- ・ 自己分解型細胞内抗体はプロテアソームとオートファジーという 2 大分解経路での分解を促す 2 つのシグナルを有しており、細胞内で作られた後、速やかに分解されます。
- ・ 自己分解型細胞内抗体は培養細胞における TDP-43 の異常凝集体を減少させ、細胞死を著明に抑制しました。
- ・ 自己分解型細胞内抗体は胎児マウス脳においても TDP-43 の異常凝集体を著明に減少させ、さらに脳内で細胞内抗体を作らせた胎仔マウスは正常に出産、発育をしました。

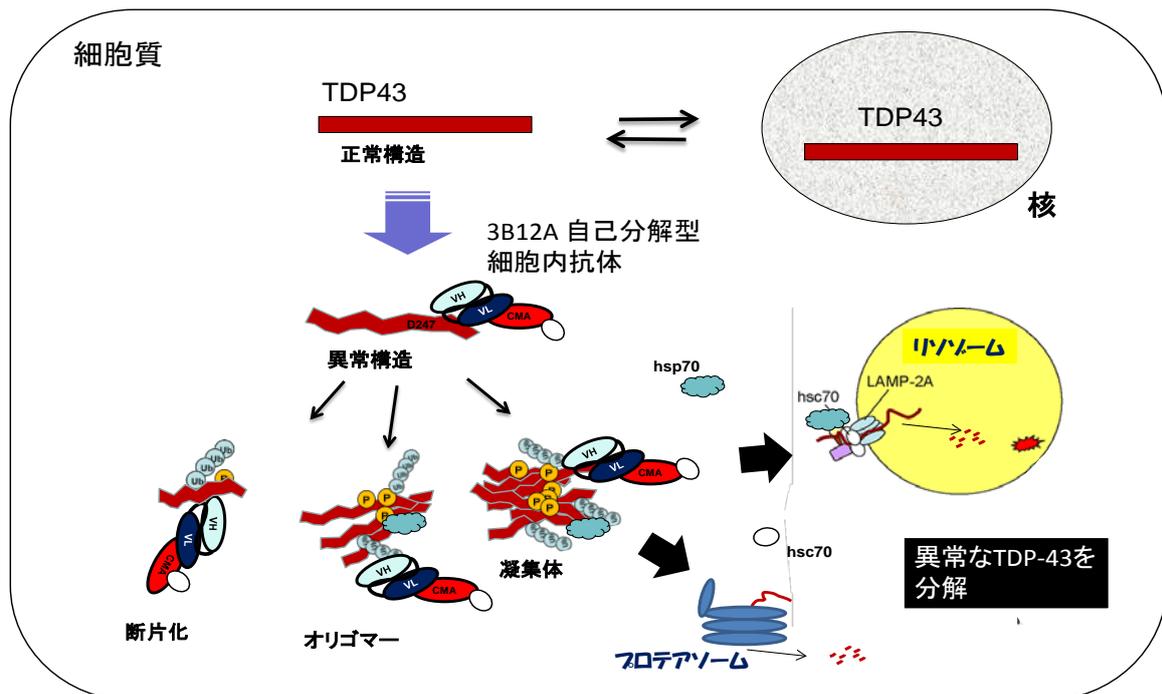
要旨

滋賀医科大学内科学講座神経内科 漆谷 真教授、玉木良高 特別研究学生（現 病院助教）らの研究グループは、京都大学大学院医学研究科神経内科 高橋良輔教授、慶應義塾大学理工学部 古川良明准教授との共同研究により、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の原因蛋白質である TDP-43^{注1}の異常凝集体^{注2}を除去する新たな治療抗体の開発に成功しました。ALS は全身の筋肉が萎縮し力が入らなくなってくる重篤な神経難病で、進行とともに全身の運動ニューロンが消失します。進行を遅らせる治療の開発は徐々に進んでいるものの、根治的な治療法はまだありません。長らく原因は不明でしたが、本来細胞の核内に存在する TDP-43 という RNA 結合蛋白質が、ALS 患者の運動ニューロンの核から消失し細胞質で異常な凝集体を形成していること、さらにこの凝集体によって神経細胞死に至る様々な有害事象が起こることが判明し、TDP-43 の異常な凝集体を除去することが ALS の根治治療に直結するという可能性が注目されています。

漆谷教授らは 2012 年、異常構造をとった TDP-43 のみを認識し正常な核内の TDP-43 には結合しない、モノクローナル抗体 3B12A を滋賀医科大学にて開発しました。本研究では、この抗体を細胞内の異常蛋白質を除去する遺伝子治療薬とするため、3B12A 抗体分子の中で抗原と結合する重鎖、軽鎖由来の可変領域遺伝子をクローニングし、2 つを繋いで一本鎖抗体（single chain variable fragments; scFv）^{注3}を作り出す人工遺伝子を作製、さらに凝集体をオートファジーで効率よく分解するため、シャペロン介在

性オートファジー（CMA）シグナルというタンパク質分解シグナル遺伝子を scFv に付与し、自己分解型細胞内抗体を発現するベクター遺伝子（3B12A scFv-CMA）を作製しました。その結果、自己分解型細胞内抗体は培養細胞で異常な TDP-43 のみと結合し、凝集体を減少させ、さらに凝集体によって生じる細胞死を著明に抑制しました。興味深いことに 3B12A scFv-CMA と異常凝集体との結合によって heat shock protein 70 (HSP70) という分子シャペロン^{注9}が誘導され、TDP-43 の異常凝集体を解きほぐすことで減少させる（リフォールド）効果も認めました。3B12A scFv-CMA の凝集体減少効果は培養細胞のみならず、子宮内電気穿孔法^{注10}という手法を用いて遺伝子を導入した胎児マウス脳においても、TDP-43 凝集体の著明な抑制効果を認め、脳の発育に明らかな有害事象を認めませんでした。この自己分解型細胞内抗体は、結合する凝集体が存在しない細胞では速やかに分解されてしまうため抗体蓄積による有害事象の懸念も少なく、分子標的治療として極めて有望です。今後 ALS における運動ニューロンへの TDP-43 異常凝集体を再現する ALS モデルマウスでの効果確認や、サルなどの霊長類での安全性確認実験が必要ですが、オートファジーとプロテアソーム^{注4}という 2 つの分解系での自己分解能を付与した抗体を使って細胞内の凝集体を除去するというユニークなアプローチで難病 ALS の根治治療の道を開く成果です。

この研究成果は 2018 年 4 月 16 日 10 時（英国時間：日本時間 4 月 16 日 18 時）に英国科学誌「Scientific Reports」でオンライン公開されました。



1. 背景

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は脳が意図する筋肉の運動を司る「運動ニューロン」が脳と脊髄で徐々に死滅することで、全身の筋力が低下し、筋萎縮が進行する神経難病です。呼吸に必要な神経も障害されるため、発症から3～5年で自ら呼吸することが困難になり、人工呼吸器による補助が必要となります。長らく原因が不明でしたが、遺伝性 ALS において原因遺伝子が次々と発見され、遺伝しない孤発性 ALS では TAR DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) という、本来細胞の核の中に存在する RNA 結合蛋白質が、核外の細胞質に異常な局在をし、凝集体を形成する原因物質であることが発見されました。さらに TDP-43 が細胞質で異常な凝集体を形成することで、①核内 TDP-43 が喪失して機能低下を来したり、②蛋白質の分解を障害したり、③細胞の生存にとって必須の蛋白質を合成するための RNA への作用が障害される、など様々な有害事象が生じることが明らかとなり、この TDP-43 凝集体を除去することは ALS の根本的な治療になりうると注目されています。しかし治療上の大きな問題点として、細胞生存にとって重要である、正常な TDP-43 への影響を避けること、そして細胞内の TDP-43 の異常構造をできるだけ初期に捉えて除去することが困難であるという 2 点がありました。

2. 研究手法・成果

蛋白質の正常・異常の間のわずかな構造変化を見分ける物質として抗体は非常に有望です。我々は以前、正常な核内の TDP-43 には結合せず、異常構造をとった TDP-43 のみを認識するモノクローナル抗体 3B12A の開発に成功しました。TDP-43 の異常な凝集体はリン酸化をうけるため、リン酸化 TDP-43 に対する抗体を用いれば、正常な TDP-43 との区別は可能ですが、TDP-43 のリン酸化は比較的の構造変化と考えられるため、治療標的としては遅きに失する可能性があります。

また、抗体分子は非常に大きいため、そのまま血中や髄液など細胞の外から加えても神経細胞内に効率よく取り込まれることは期待できません。また凝集体との結合が得られても、その後凝集体が除去されることを意味するわけではありません。

【研究手法】

我々は、以前に滋賀医科大学で作製したモノクローナル抗体 3B12A を産生するハイブリドーマ細胞から抗原と結合する 2 つの可変領域と言われる構造 (VH,VL) の遺伝子を取り出し (クローニング) し、VH と VL を連結した一本鎖抗体 (single chain variable fragments; scFv) の人工遺伝子を作製しました。遺伝子配列の解析から VH の中に細胞内のタンパク質分解の場であるプロテアソームへの移行を促す信号 (PEST) 配列^{注4}が含まれていることが分かりました。さらに凝集体をオートファジー^{注7}での分解を促すため、シャペロン介在性オートファジー (CMA) シグナルという分解シグナルをもつ scFv 遺伝子をデザインし、細胞の中で自己分解型細胞内抗体を発現するベクター遺伝子 (3B12A scFv-CMA) を作製しました。ヒト不死化培養細胞やマウスの神経系培養細胞に正常な TDP-43 や、さらにマウスの胎仔脳において ALS 凝集体モデルを遺伝導入によって発現させた様々な ALS モデルに対し、3B12A scFv-CMA の同時発現による凝集体の除去効果、細胞死抑制効果、脳初期発生に及ぼす影響について検討しました。

図1

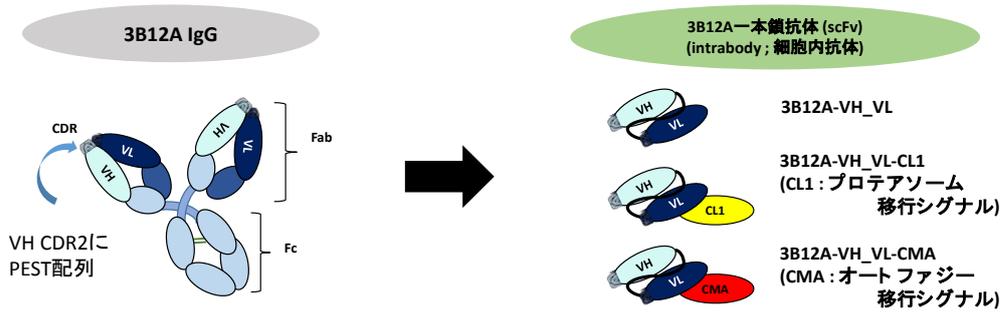


図1 3B12A 全長抗体(IgG)から一本鎖抗体の合成を説明した図

抗体には抗原と結合する可変領域と呼ばれる構造があり、長い重鎖由来の VH と短い軽鎖由来の VL があります。3B12A を産生する細胞(ハイブリドーマ)のメッセンジャーRNA から VH と VL をコードする遺伝子を同定し VH と VL を連結して一本鎖抗体(scFv)を作製しました。VH 内の抗原結合部位の一つである CDR2 はプロテアソーム移行シグナル PEST 配列を有していました。さらに scFv の自己分解性を高めるために、プロテアソーム移行シグナル(CL1)とシャペロン介在性オートファジーでの分解シグナル CMA を連結した scFv も合成しました。

【成果】

1. 3B12A scFv-CMA は病原構造特異的に TDP-43 と結合した

ヒト腎臓細胞由来の HEK293A 細胞に TDP-43(野生型、細胞質型、凝集体形成型)と 3B12A scFv を過剰発現させ蛍光二重免疫染色を行いました。3B12A scFv は細胞質型、凝集体形成型のみと共染色され野生型 TDP-43 とは共染色されませんでした(図2)。免疫沈降法^{注5}-ウェスタンブロッティング法でも 3B12A は、野生型 TDP-43 とは共沈降されず、異常 TDP-43 のみと共沈降された。さらにサンドイッチ ELISA 法^{注6}による定量評価では、3B12A は細胞質型、凝集体形成型に加え家族生 ALS の原因遺伝子として同定されている変異型 TDP-43 に対しても野生型に比べ高い反応性を示しました。

図2

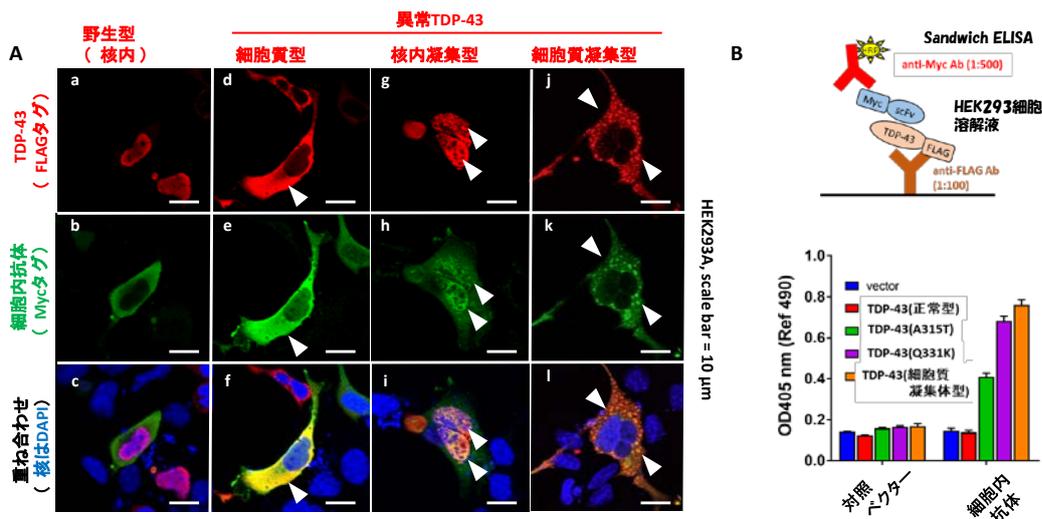


図2 A. HEK293A 細胞に TDP-43(正常型と3つの異常型(朱:細胞質型、核内凝集型、細胞質凝集型 FLAG タグで標識)と 3B12A scFv 細胞内抗体(緑: Myc タグで標識)を遺伝子導入によって同時に発現させました。48 時間後に細胞を固定し、FLAG 抗体と Myc 抗体を用いて免疫染色し、顕微鏡で観察しました。緑色で染まる細胞内抗体は、細胞質型、凝集体型のみ TDP-43 の信号と一致しています。B. サンドイッチ ELISA 法による TDP-43 と scFv の結合性の定量解析。細胞内抗体が異常な TDP-43 のみと高い吸光度(OD405nm)を認めます。

2. 3B12A scFv-CMA はプロテアソームとオートファジーの両方で分解された

3B12A は PEST 配列を有するため、培養細胞に遺伝子導入して後 10 時間後に著明に減少したが、プロテアソーム阻害薬によって分解が抑制されました。さらに CMA シグナルを付加することによって、プロテアソームのみならずオートファジー分解阻害薬による分解阻害を受けたことからプロテアソーム^{注4}とオートファジー^{注7}の両者での分解を促進する細胞内抗体であることを確認しました。

3. 3B12A scFv-CMA 細胞内抗体は凝集体形成型 TDP-43 の分解を促進した

TDP-43 蛋白質に Halo タグという標識を付加し、培養細胞に発現させました。Halo タグ^{注8}を用いたパルスチェース法により、3B12A scFv-CMA は異所性局在型、凝集体形成型 TDP-43 のみ分解を促進し、野生型 TDP-43 には影響を与えませんでした (図 3)。この分解促進効果はプロテアソーム阻害薬やオートファジー阻害薬によって抑制されました。

図3

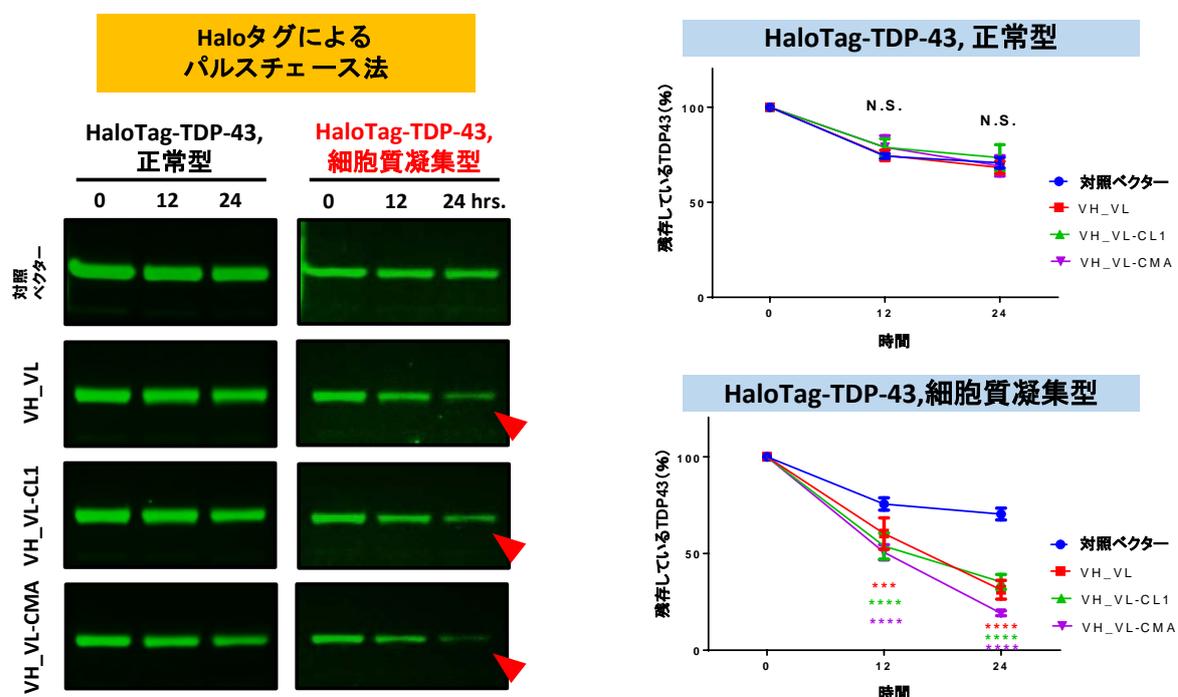


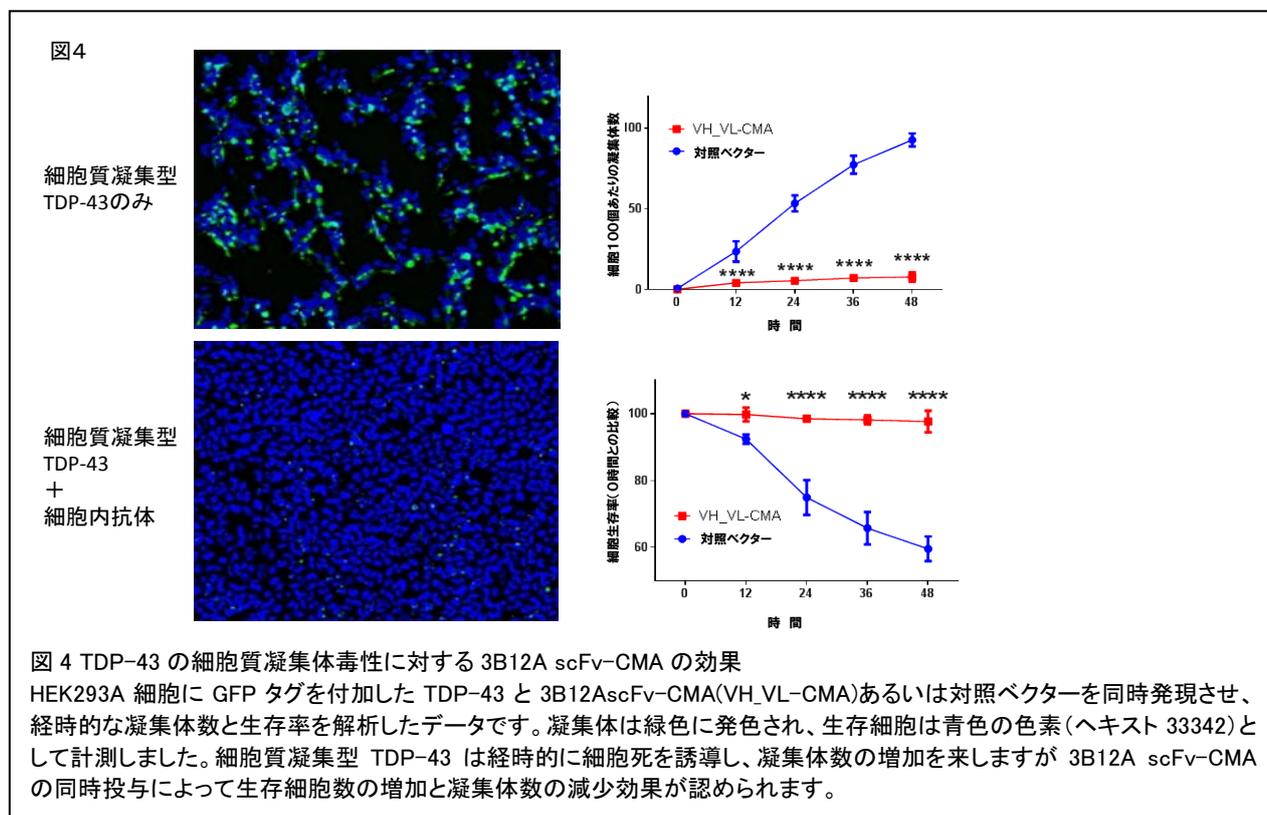
図 3 3B12A scFv による TDP-43 の分解効率率に対する影響を調べたデータ

HEK293A 細胞に、Halo タグを標識した TDP-43 と 3B12A scFv の同時に発現させ、蛍光リガンドである diAcFAM を培養培地に 15 分間投与した後、直後(0) 12、24 時間後に 0 時間後に比べ何%の TDP-43 が残存しているかを示したデータ。3B12 scFv はいずれも対照ベクターに比べて細胞質凝集型 TDP-43 の分解を有意に促進していますが、その効果は CMA シグナル (VH_VL-CMA)において最も著明に見られます。

4. 3B12A は培養細胞において TDP-43 異常凝集体を減少させ細胞死を抑制した

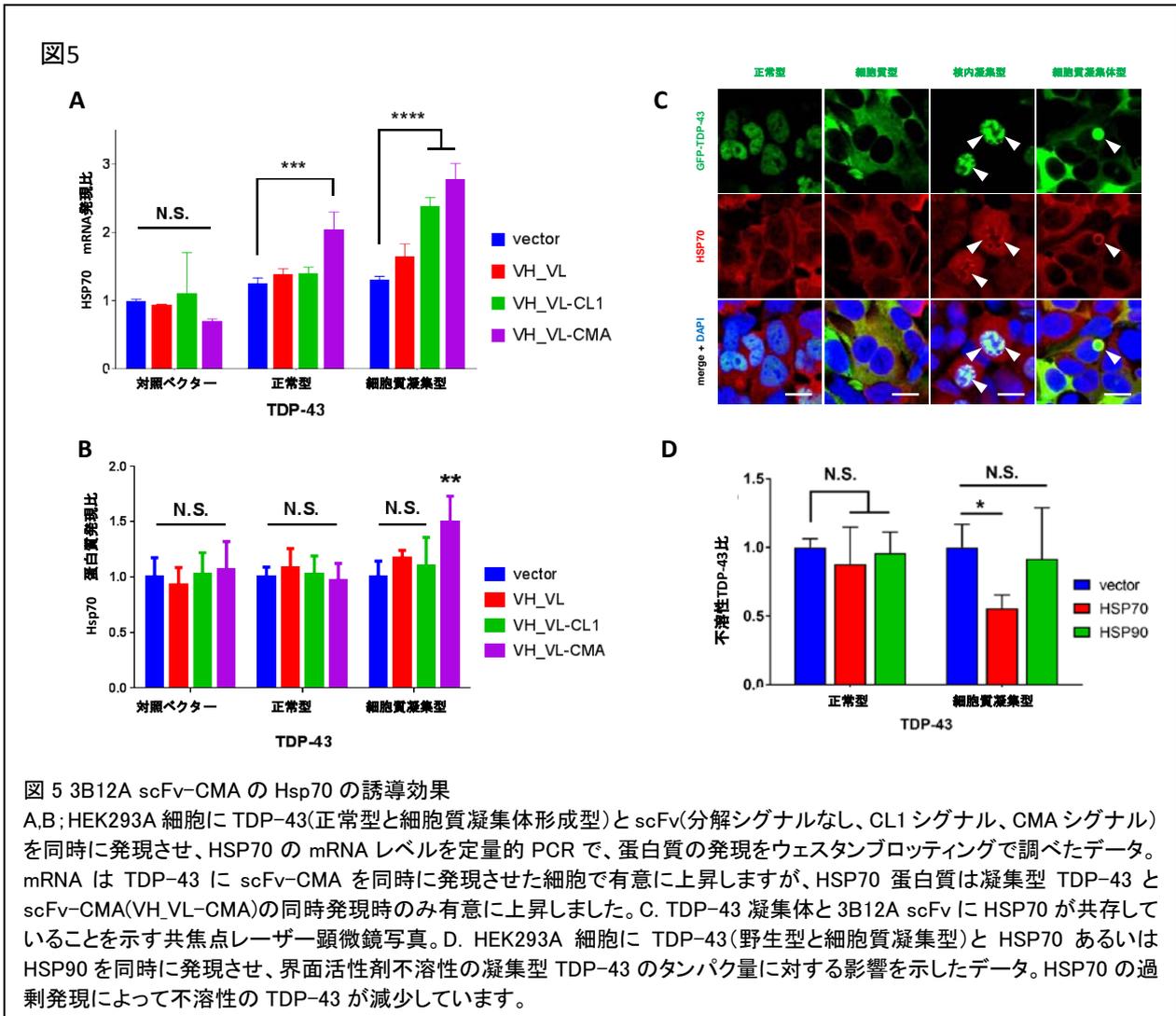
HEK293A に GFP タグを標識した凝集体型 TDP-43 を発現させ、タイムラプス蛍光顕微鏡を用いて経時観察しました。凝集体形成 TDP-43 は時間と共に細胞内の TDP-43 凝集体を有する細胞が増加、凝集体サイズも増大しましたが、3B12A scFv-CMA を同時発現させると凝集体形成が著明に抑制されました。さらにヘキスト 33342 という試薬で生細胞の核染色を行ったところ 3B12A scFv-CMA 群では残存細胞

数の減少が著明に抑制されました (図 4)。マウス神経の不死化細胞 Neuro2A 細胞に TDP-43 (野生型、細胞質型、凝集体形成型) と 3B12A scFv (分解シグナルなし、プロテアソーム移行シグナル (CL1)、オートファジー分解シグナル (CMA)) を同時に発現させ、TDP-43 の凝集体形成による細胞生存率の低下と毒性の増強効果が、さまざまな分解シグナルを持つ 3B12A の間で比べたところいずれも細胞の保護と細胞死抑制効果を認めましたが、CMA シグナルを付加した scFv が最も高い効果を示しました。



5. 3B12A scFv-CMA は TDP-43 凝集体との結合によって HSP70 を誘導し凝集体減少効果が増大した

HEK293A 細胞に TDP-43 (野生型、細胞質型、凝集体型) と 3B12A scFv (シグナルなし、CL1, CMA シグナル) を様々な組み合わせで同時に発現させ、分子シャペロン^{注9}である heat shock protein 70 (HSP70)の蛋白質発現量をウェスタンブロッティング法、転写の誘導を定量的 PCR 法で検討したところ、CMA シグナルを有する scFv と凝集体 TDP-43 の組み合わせにおいて RNA、蛋白質両者が有意に誘導され、免疫蛍光観察と免疫沈降法によって、凝集体と細胞内抗体に HSP70 が結合していることが確認されました。さらに HSP70 を凝集体 TDP-43 と同時に発現させると界面活性剤を含む細胞抽出液 (バッファー) に溶解せず沈殿する不溶性成分が減少することが示され、CMA シグナルを有する細胞内抗体が凝集体と結合すると分解が促進されると共に凝集体を解きほぐすことで構造を整える (リフォールド) する効果があることを確認しました (図 5)。



6. 3B12A scFv-CMA はマウス胎仔脳における TDP-43 異常凝集体を有意に減少させ、脳の初期発生に明らかな影響を与えなかった

培養細胞における自己分解型細胞内抗体の効果が確認できたため、次の個体脳における効果を確認した。妊娠 13.5 日目のマウスに吸入麻酔し子宮内胎仔脳の脳室に TDP-43 と 3B12A scFv の各発現ベクターを注入、子宮内電気穿孔法^{注10}という方法を用いて遺伝子を胎仔脳に導入し再び妊娠を継続させました。妊娠 16.5 日目に胎仔マウス脳を固定し脳切片を顕微鏡観察したところ、大脳皮質から皮質下に TDP-43 の凝集体が形成されましたが、3B12A scFv-CMA の同時投与によって凝集体数は有意に減少しました。野生型 TDP-43 は脳内で明らかな凝集体を形成せず、3B12A scFv-CMA の同時投与による変化は認めませんでした (図 6)。細胞内抗体の脳発育に対する悪影響の有無を見るため、一部のマウスは出産後 21 日まで観察を続けましたが、正常に出産、発育し、21 日目における脳組織の観察に於いて抗体が発現している部位に於いて明らかな神経細胞の減少やグリオシスなどは認めませんでした。

図6

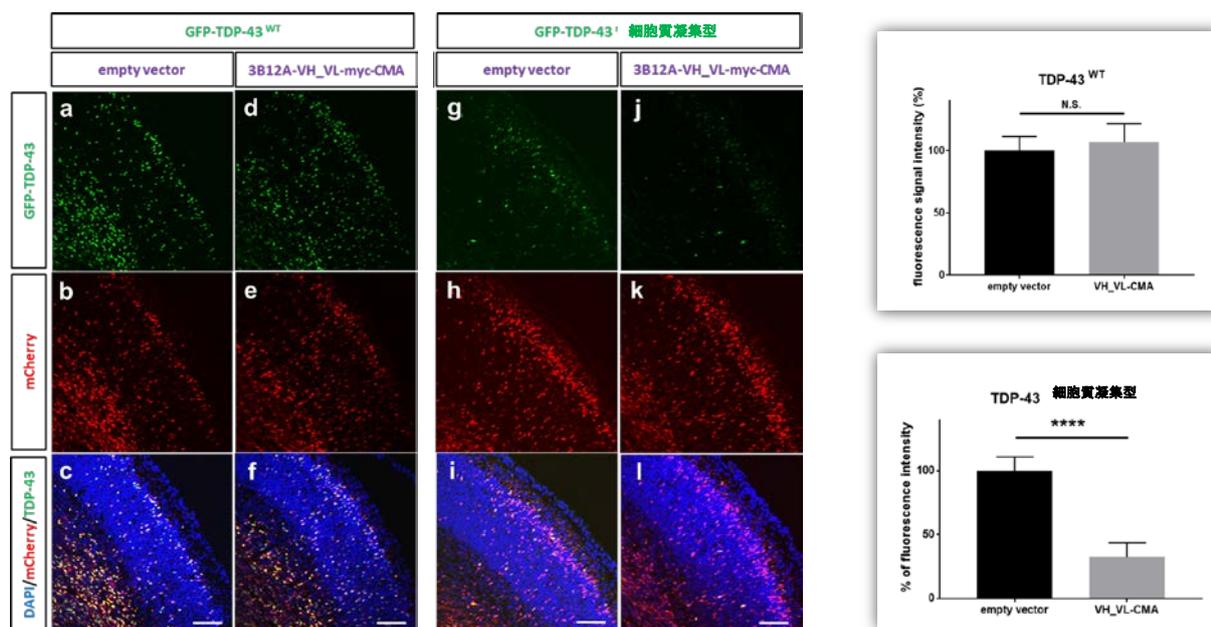


図6 マウス胎仔脳における TDP-43 凝集体に対する 3B12A scFv-CMA
子宮内電気穿孔法によって妊娠 13.5 日齢マウスの子宮内の胎仔脳に凝集型 TDP-43 と 3b12A scFv-CMA あるいは対照ベクターを発現させ、scFv の TDP-43 分解効果を検討したデータ。3B12A scFv-CMA の同時投与によって TDP-43 の凝集体は有意に減少しました。遺伝子導入効率が均等であることは内部標準ベクター mCherry (赤) を同時に導入することで確認しています。

3. 波及効果

本来生理的な役割を持つ蛋白質が、細胞内で異常な構造をとって疾患を引き起こす様々な疾患には、アルツハイマー病、パーキンソン病、多系統萎縮症など様々な神経難病があります。今回の研究成果は ALS に対する新たな治療法の可能性を提唱するのみならず、そうした他の神経変性疾患にも応用できる可能性があります。今後は TDP-43 の凝集体を発現する ALS のモデル動物を用いて効果を確認し、さらに安全性についての確認することが必要です。

論文名と著者

論文名

Elimination of TDP-43 inclusions linked to amyotrophic lateral sclerosis by a misfolding-specific intrabody with dual proteolytic signals

ジャーナル名・巻・号・DOI

Scientific Reports, 8:6030 (doi: 10.1038/s41598-018-24463-3)

著者

Yoshitaka Tamaki^{1,2}, Akemi Shodai¹, Toshifumi Morimura³, Ryota Hikiami^{1,2},

Sumio Minamiyama^{1,2}, Takashi Ayaki², Ikuo Tooyama³, Yoshiaki Furukawa⁴, Ryosuke Takahashi², Makoto Urushitani^{1,3}

1. 滋賀医科大学医学部内科学講座神経内科
2. 京都大学大学院医学研究科臨床神経学
3. 滋賀医科大学神経難病研究センター
4. 慶應義塾大学理工学部

本研究への支援

本研究はAMED 難治性疾患実用化研究事業「筋萎縮性側索硬化症の病原タンパク質に対する自己分解型細胞内抗体の実用化に向けた前臨床研究」による支援を受けました。

<用語解説>

注1 TAR DNA-binding protein-43 (TDP-43) :

ALS の脳脊髄病巣で蓄積することが知られていたユビキチン化された異常封入体の主要な構成蛋白質。RNA 結合蛋白質であり、RNA の安定化、蛋白質の発現や細胞外のストレスに対する細胞内の適応に重要な役割を果たす。本来核内に存在するが、ALS では異常なリン酸化と、切断を受けた短い断片が蓄積しており、現在 ALS を引き起こす原因蛋白質の一つである。

注2 蛋白質凝集体:

蛋白質は一次構造であるアミノ酸配列により立体構造を形成して機能を果たす。蛋白質が正しい立体構造をとる過程は折りたたみ（フォールディング）と呼ばれ、何らかの理由で正しくフォールディングされなかった（ミスフォールディング）異常構造の蛋白質は通常ユビキチン・プロテアソーム系（後述）で分解される。分解されなかったミスフォールディング蛋白質は蓄積、凝集して毒性を示すと考えられており、異常な構造の蛋白質が原因となる一群の疾患は蛋白質ミスフォールディング病と呼ばれる。ALS をはじめ様々な神経変性疾患で認められる封入体形成蛋白質は異常構造を示しており、蛋白質ミスフォールディング病と考えられている。

注3 Single chain variable fragment (scFv)

抗原を認識する役割を担う抗体分子内の可変領域（variable fragment; Fv）を構成する必要最小単位である重鎖（heavy chain; VH）および軽鎖（light chain; VL）の両者を、可動性のあるペプチドリンカーで人工的に結合させた一本鎖抗体可変領域分子である。

注4 PEST 配列:

ユビキチンという小さな蛋白質を標識に用いて、標的となる蛋白質（基質）を特異的に分解する蛋白質分解機構。基質は特定のユビキチンリガーゼにより選択的にユビキチンで標識され、プロテアソームによって分解される。

注 5 免疫沈降法

可溶性の抗原をセファローズビーズやプロテイン G などの担体に結合させた抗体と特異的に反応させ、不溶化し沈殿させる反応を用いることで、目的の抗原を検出・分離する実験手法。沈殿物質を適当なバッファーで洗浄し、遠心分離をすることで非特異的に吸着する成分を取り除くことができる。この手法を用いることで、抗体の抗原となるタンパク質と複合体を形成するなど相互作用をきたす別のタンパク質との複合体を回収することが可能である。

注 6 サンドイッチ ELISA 法

捕捉抗体と検出抗体の 2 種類の抗体を用いて試料をはさみこむことで目的の抗原を検出し、定量する実験手法。捕捉抗体の抗原となるタンパク質と複合体を形成する別のタンパク質を検出抗体で同定することで、異なるタンパク質同士の結合性を検証することができる。

注 7 オートファジー

主要な細胞内分解機構の一つであり、細胞質で不要となった成分をリソソームに輸送し分解する現象である。

注 8 Halo タグを用いたパルスチェース法

Halo タグは外来性の TDP-43 タンパク質に対する標識で、リガンドと呼ばれる低分子物質を一時的に共有結合させると、リガンドが結合した TDP-43 の寿命（細胞内の残量）を追跡することが可能。

注 9 Heat shock protein (HSP: 熱ショックタンパク質)

HSP は、熱などのストレスによって誘導されるタンパク質の総称で、細胞内でタンパク質の正常な折り畳み構造（フォールディング）を維持したり、ミスフォールドしたタンパク質の異常な折り畳み構造をときほぐして正常な構造に戻す働きをする。細胞内タンパク質の品質管理において重要な役割を担っている。分子量により、HSP70, HSP90 などが存在する。

注 10 子宮内電気穿孔法

マウスなどの子宮内胎仔に子宮外から胎仔脳室に DNA を注入したのち、子宮壁の外側から胎仔の頭部を電極で挟み込んで電気穿孔をすることで、胎生期マウスの神経幹細胞に目的遺伝子を導入する実験手法。マウスの成熟とともに遺伝子導入を行った神経幹細胞が神経細胞へと発達することで、導入した遺伝子の発現が生体における神経細胞において確認することができる。

<お問い合わせ先>

漆谷 真（うるしたに まこと）

滋賀医科大学医学部 内科学講座 神経内科教授

滋賀県大津市瀬田月輪町

TEL:077-548-2160 FAX: 077-548-2160

E-mail: uru@belle.shiga-med.ac.jp

京都大学 総務部 広報課 国際広報室

京都市左京区吉田本町 36 番地 1

TEL : 075-753-5729 FAX : 075-753-2094

E-mail : comms@mail2.adm.kyoto-u.ac.jp

古川 良明（ふるかわ よしあき）

慶應義塾大学理工学部化学科 准教授

神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1

TEL:045-566-1807 FAX:045-566-1697

E-mail: furukawa@chem.keio.ac.jp

<AMED 事業に関するお問い合わせ先>

国立研究開発法人日本医療研究開発機構

戦略推進部 難病研究課

東京都千代田区大手町 1-7-1

TEL : 03-6870-2223

E-mail : nambyo-info@amed.go.jp