

組換え scFv 抗体の培養細胞への送達法の開発に関する研究

中島 治[#], 蜂須賀暁子, 手島玲子, 澤田純一

Study on a method for delivering scFv recombinant antibody into cultured cells

Osamu Nakajima[#], Akiko Hachisuka, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada

We try to develop a method for delivering antibody from blood circulation through blood brain barrier to brain. In order to achieve this goal, antibody has to cross cellular membrane of brain capillary endothelial cells twice. As a first step of our study, we examined the ability for scFv antibody to cross cellular membrane of RBL-2H3 cells once and be delivered into the inside of the cultured cells with the help of TAT peptide. TAT peptide was originally found in Tat protein from the HIV-1 virus and known as one of protein transduction domains. First, oligonucleotide encoding TAT peptide was linked to 5' terminal of gene fragment of scFv antibody by PCR technology. TAT-linked scFv gene fragment was subcloned into pET-23b vector and successfully expressed in *E. coli* as inclusion body. After solubilization and purification, TAT-linked scFv recombinant protein was added to the culture of RBL-2H3 cells. TAT-linked scFv delivered into RBL-2H3 cells was detected by means of immunocytochemistry using fluorescence microscopy. TAT-linked scFv crossed cellular membrane more efficiently than scFv without TAT peptide.

Key Words: blood brain barrier, drug delivery, scFv, TAT peptide

緒 言

抗体は抗原と特異的かつ高い親和性で結合する。この性質を利用して抗体の医薬品としての応用が注目を集めている。

ところで、血液循環と脳の間には血液脳関門が存在し、血中から中枢神経系に様々な物質が自由に移行できなくなっている。この血液脳関門の存在は、脳が必要な物質だけを取り込み、かつ不要な物質の脳への侵入を抑制して、脳が微妙な化学的なバランスを保ちながら機能することを可能にしている。しかし、中枢神経の医療を目的として抗体を投与するときには、水溶性高分子である抗体はそのままでは血液脳関門を透過することができず、ドラッグデリバリーにおける問題点となる。

本研究では、連結させたタンパクを細胞内へ送達する能力を有し HIV ウイルス由来 TAT タンパク伝達領域として知られるペプチド¹⁾を組換え scFv (短鎖可変部抗体) 抗体に連結させて、血液脳関門透過性運搬体としての利用を試みた。

本研究の成果によって、抗体を中枢神経系に送達でき

れば医療や研究に広範に応用できると期待される。

抗体が血液脳関門を透過して中枢神経系に到達するためには、脳毛細血管の内皮細胞を2回透過する必要がある。今回は本研究の最初の段階として、組換え scFv 抗体が培養細胞の細胞膜を1回透過して、細胞内へ送達されることを検証した。

実験方法

1) TATペプチドを連結させた組換え scFv 抗体遺伝子の調製

組換え scFv 抗体としては、抗モルヒネマウスモノクローナル抗体 (MOR131) から作成したものをを用いた。その遺伝子の構造は5'側に V_H 遺伝子断片、3'側に V_L 遺伝子断片を配置し、これらをセリンやグリシンに富む配列をコードするリンカーで連結させた。TATペプチドの配列を組換え scFv 抗体のN端に連結させるために、3段階のPCRを行った。センスプライマーの5'側にTATペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを含ませて、3段階のPCRで配列を徐々に伸長させた後に、ヌクレオチド配列を確認した (Fig.1)。

2) TATペプチドを連結させた組換え scFv 抗体の大腸菌における発現

上記の遺伝子構築物を pET-23b ベクター (Novagen 社) の *EcoR* I サイトと *Xho* I サイトに連結した。これに

[#]To whom correspondence should be addressed;

Osamu Nakajima; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo
158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9437; Fax: 03-3707-6950;
E-mail: onakajim@nihs.go.jp

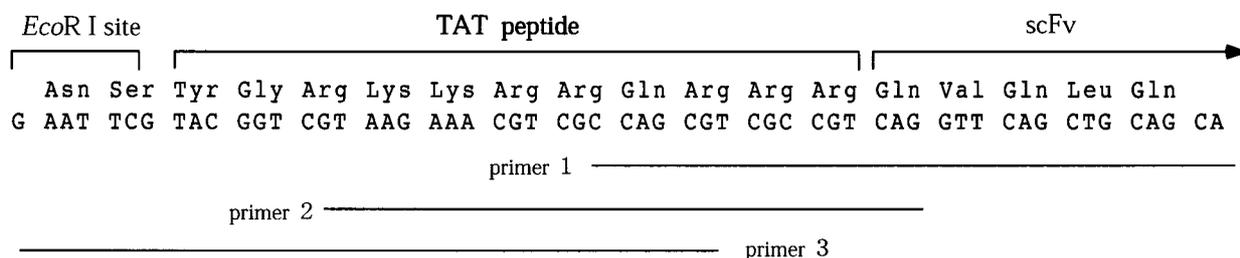


Fig.1 Addition of TAT sequence to scFv antibody by PCR

scFv gene fragment was subjected to 3-step PCR to add oligonucleotide encoding TAT peptide to the 5' terminal of scFv gene fragment. Throughout the 3-step PCR the same anti-sense primer was repeatedly used. Sense primers were changed in the process: For the first, the second, the third step primer 1, 2, 3 were used, respectively. The three sense primers overlapped. At the 5' end of the oligonucleotide encoding TAT peptide, *EcoR* I site was introduced to facilitate subcloning into pET-23b vector. To adjust open reading frame of the recombinant protein to that of the vector one nucleotide G was added behind the *EcoR* I site.

より, TATペプチドと組換え scFv 抗体との融合タンパクに pET-23b ベクターに由来する T7 タグが N 端に, ヒスチジンタグが C 端に連結した (Fig.2). これを大腸菌 BL21 (DE3) pLysS (Novagen 社) にトランスフォーメーションした. 組換え scFv 抗体の発現誘導は IPTG を最終濃度 0.4 mM になるように加えることで行った. インクルージョンボディとして発現された組換え scFv 抗体は洗浄後に 8 M 尿素を含む緩衝液に溶解して, まず 4 M 尿素を含む緩衝液に対して, 次に尿素を含まない緩衝液に対して透析を行い, 2 段階で尿素を除いて可溶化させた.

対照実験として, TATペプチドを連結させていない組換え scFv 抗体単独でも同様に発現と可溶化を行った.

3) 培養細胞への組換え scFv 抗体の添加と細胞膜を透過した組換え scFv 抗体の蛍光免疫染色による検出

RBL-2H3 細胞をガラス製チャンバースライド上でコンフルエントになるまで培養した. 血清を含まない培地に交換してから, 組換え scFv 抗体を最終濃度 4 nM になるように培地に添加して 37 °C で 15 分間 CO₂ インキュベーター中で培養した. 細胞をすばやく洗浄した後に 3.7% ホルムアルデヒド・PBS 中で室温で 20 分間インキュベートすることによって固定した. 0.2% TritonX-100・PBS で室温で 2 分間インキュベートした後に, 10% ヤギ血清・PBS を用いてブロッキングした. 検出は以下の 2 つの条件で行った. 一番目の条件として, 一次抗体に 30,000 倍希釈したマウス抗 T7 タグ抗体 (Novagen 社),

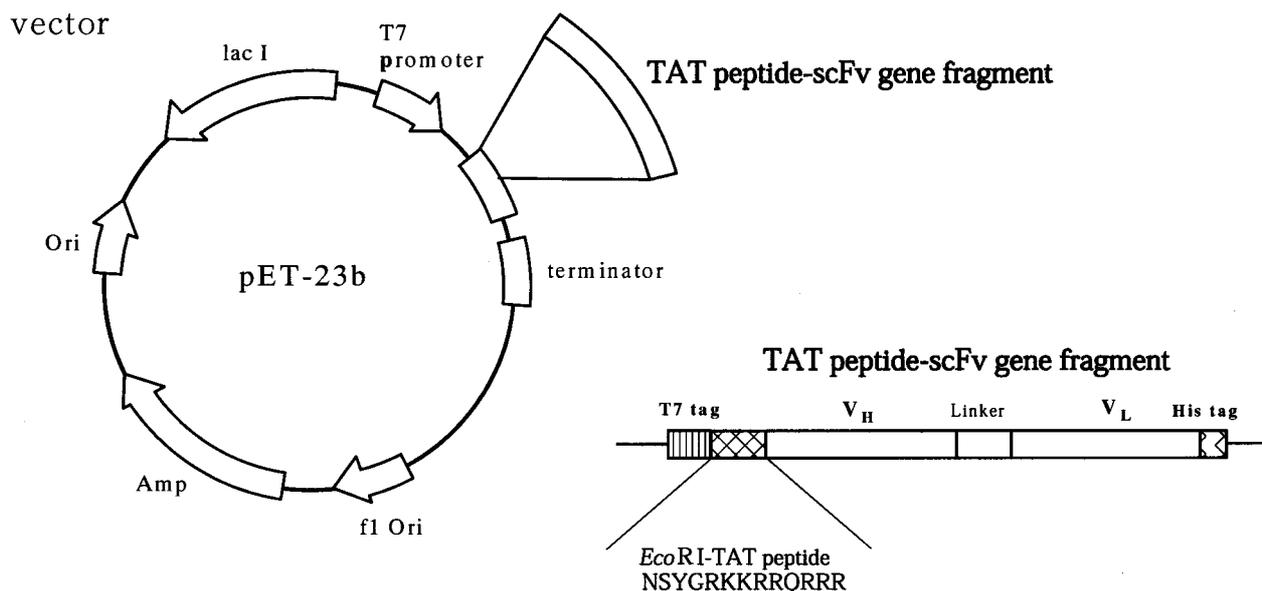


Fig.2 The structure of TAT-linked scFv antibody gene fragment in pET-23b

After addition of oligonucleotide encoding TAT peptide, scFv antibody gene fragment was subcloned into pET-23b. For subcloning *EcoR* I site was introduced to the 5' end of the oligonucleotide. The scFv gene fragment contained V_H gene fragment at the 5' end, V_L gene fragment at the 3' end and a linker between them. T7 tag and histidine tag were added to the recombinant protein at the N terminal and the C terminal, respectively, both of which were derived from pET-23b vector.

二次抗体に1,200倍希釈したアレクサー594標識ヤギ抗マウスIgG (Molecular Probe社)を用いた。二番目の条件として、一次抗体に500倍希釈したウサギ抗マウスラムダL鎖抗血清 (Organ Teknika Corporation製)、二次抗体に300倍希釈したFITC標識ヤギ抗ウサギIgG (Sigma社)を用いた。一次抗体と二次抗体のインキュベーションの間、二次抗体のインキュベーションの後には0.05% Tween20・PBSを用いて洗浄した。マウントして、蛍光顕微鏡による観察を行った。

4) 画像解析

蛍光の検出のための条件ごとに、シャッタースピードを一定にして写真撮影をした。デジタル化した画像をフォトショップバージョン6.0を用いてグレースケールに変換した後に階調を反転させた。この処理を施した画像について、NIHイメージ1.62FATを用いて蛍光の部分を選択して、単位面積当たりの蛍光強度を求めて、ヒストグラムを作成した(蛍光強度と面積の単位は任意である)。

結 果

1) TATペプチドを連結させた組換えscFv抗体の大腸菌における発現

TATペプチドを組換えscFv抗体に再現性よくかつ確

実に連結させるために、クロスリンクによるのではなく、PCR法を用いて遺伝子レベルで2つの配列を連結させた (Fig.1)。TATペプチドをコードするオリゴヌクレオチドの設計は、後の大腸菌において、TATペプチドを連結させた組換えscFv抗体の発現を促進するために、大腸菌で使用頻度の高いコドンを形成するように考慮した。

そして、このTATペプチドを連結させた組換えscFv抗体を大腸菌中で大量に発現させることができた (Fig.3)。TATペプチドを連結させた組換えscFv抗体はインクルージョンボディとして発現しており、8M尿素で可溶化した後で透析により尿素を除去するとかなりの量が再び沈殿してしまった。一部の可溶化できたタンパクをSDS-PAGEとCBB染色で分析すると、TATペプチドを連結させた組換えscFv抗体はシングルバンドになるまで精製されていることが明らかになった (Fig.4)。

2) TATペプチドを連結させた組換えscFv抗体のRBL-2H3細胞内への侵入の増加

RBL-2H3細胞に侵入したTATペプチドを連結させた組換えscFv抗体の検出は蛍光免疫染色によった。すなわち、細胞内に到達したTATペプチドを連結させた組

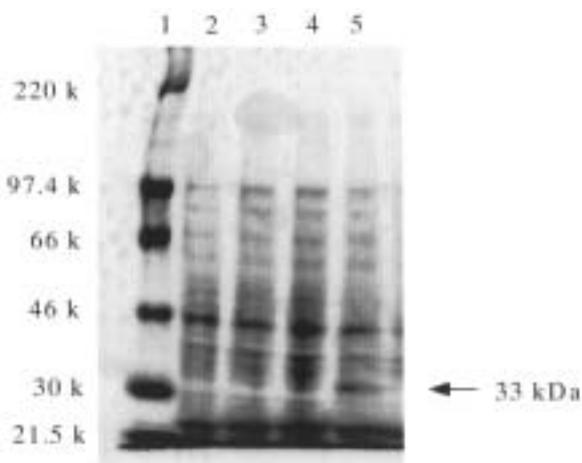


Fig.3 Expression of TAT-linked scFv antibody in *E. coli*

E. coli strain BL21(DE3)pLysS was transformed with pET-23b alone or TAT-linked scFv in pET-23b. Total proteins from *E. coli* described above were compared with or without 0.4 mM IPTG in SDS-PAGE (8-16 T% gel). The arrow indicated TAT-linked scFv antibody in lane 5. lane 1: molecular weight marker
lane 2: BL21(DE3)pLysS transformed with pET-23b alone, without IPTG
lane 3: BL21(DE3)pLysS transformed with pET-23b alone, with IPTG
lane 4: BL21(DE3)pLysS transformed with TAT-linked scFv in pET-23b, without IPTG
lane 5: BL21(DE3)pLysS transformed with TAT-linked scFv in pET-23b, with IPTG

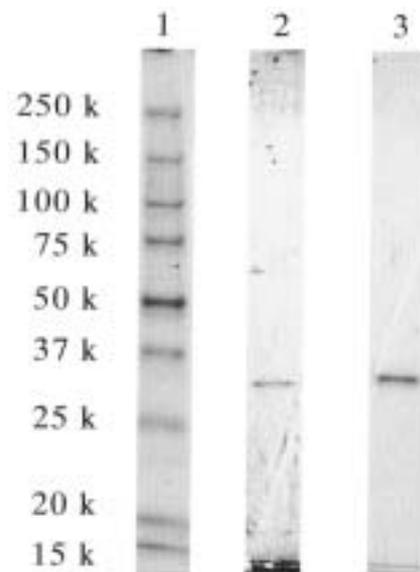


Fig.4 Solubilization and purification of scFv antibody and TAT-linked scFv antibody

scFv antibody and TAT-linked scFv antibody were expressed in *E. coli* as inclusion body. The inclusion body was washed and solubilized in buffer containing 8 M urea. After removal of urea by dialysis the recombinant proteins were obtained as a single band on SDS-PAGE (8-16 T% gel). lane 1: molecular weight marker
lane 2: scFv antibody
lane 3: TAT-linked scFv antibody

換え scFv 抗体の量を蛍光強度に変換して計算する手法を採った。一次抗体と二次抗体の組み合わせは、実験方法に記した2通りで行った。画像解析を行ってみると、TATペプチドを連結させていない組換え scFv 抗体でも RBL・2H3 細胞内への侵入が検出された。また、蛍光の検出のための条件を一定にしたときでも、単位面積当たりの蛍光強度は一定の値にならず、ある幅を持った分布を示すことが明らかになった。そこで、横軸には画像解析の結果得られた単位面積当たりの蛍光強度（単位は任意）、縦軸にはそれに対応する出現頻度を取り、ヒストグラムを作成して、その分布の状態を明らかにした。蛍光強度を測定した部位数（細胞数）は113から146個である。

Fig.5およびFig.6のヒストグラムから、組換え scFv 抗体に TAT を連結させたときには単位面積当たりの蛍光強度の分布が右にシフトしていることが分かった。これにより、TAT を連結させることにより、組換え scFv 抗体の RBL・2H3 細胞内への侵入が増強されることが明らかになった。

考 察

筆者らは、抗体の中枢神経系への送達法の開発を試みている。抗体を中枢神経系に送達することができれば、中枢神経系の疾病に対して用いる治療薬として、さらには診断薬や毒性試験等の研究用試薬など広範な応用が期待される。

すなわち、中枢神経系に送達された抗体は、中枢神経系の疾病の際に異常を起こしたり、過度に発現しているタンパクの機能を阻害する治療薬となりうる。また、抗体を用いて中枢神経系に発現している分子の機能を阻害したときに、脳の形態や動物の行動にどのような変化が現れるかを調べるなど、中枢神経系に送達された抗体には研究用の試薬としても興味深い使用法が考えられる。

抗体を中枢神経系へ送達させるには、ヘキサメチレンジアミンと N・エチル・N'・[3・(ジエチルアミノ)プロピル]カルボジイミドを用いて抗体をカチオン化させる方法がこれまでに知られている²⁾。しかし、この方法には、抗体のコンフォメーションを乱してしまったり、または抗原結合部位の重要なアスパラギン酸残基やグルタミン

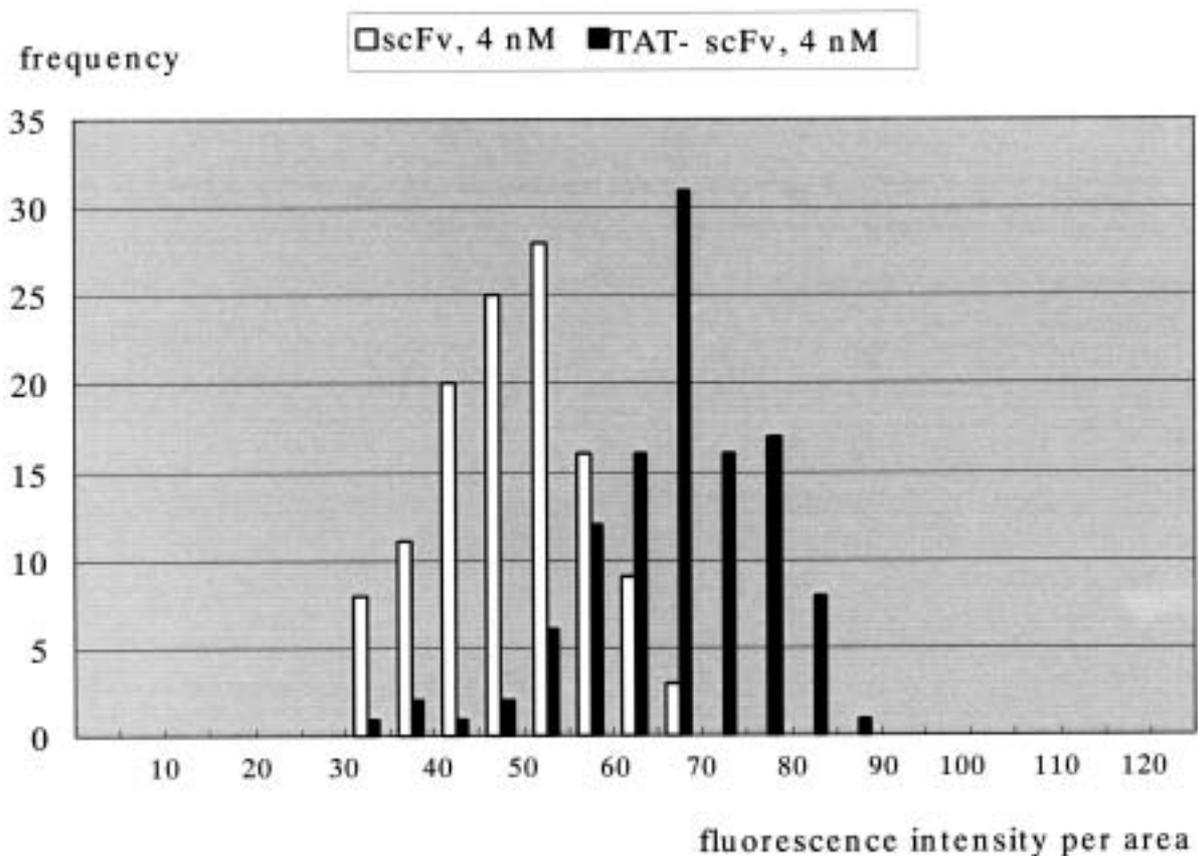


Fig.5 Detection of TAT-linked scFv antibody in RBL-2H3 cells by fluorescence microscopy (1)

scFv antibody or TAT-linked scFv antibody was added to the culture of RBL-2H3 cells. The recombinant antibodies delivered into the cells were detected immunocytochemically. Mouse anti T7 tag antibody was diluted 30,000 fold and used as the first antibody. Alexa 594-labeled goat anti mouse IgG antibody was diluted 1,200 fold and used as the second antibody. 120 and 113 areas were measured for fluorescent intensities for scFv antibody 4 nM and TAT-linked scFv antibody 4 nM, respectively.

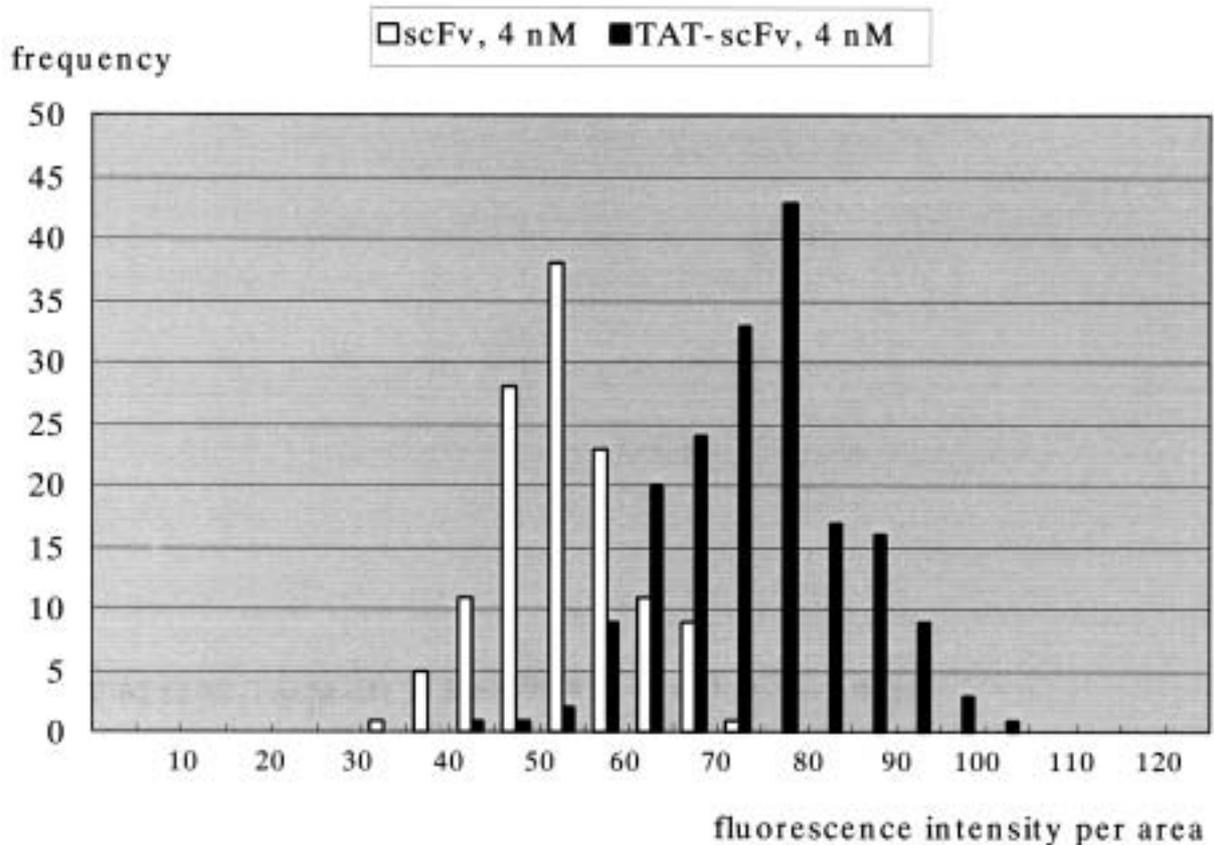


Fig.6 Detection of TAT-linked scFv antibody in RBL-2H3 cells by fluorescence microscopy (2)

scFv antibody or TAT-linked scFv antibody was added to the culture of RBL-2H3 cells. The recombinant antibodies delivered into the cells were detected immunocytochemically. Rabbit anti mouse lambda L chain antiserum was diluted 500 fold and used as the first antibody. FITC-labeled goat anti rabbit IgG antibody was diluted 300 fold and used as the second antibody. 127 and 146 areas were measured for fluorescent intensities for scFv antibody 4 nM and TAT-linked scFv antibody 4 nM, respectively.

酸残基を修飾してしまうなど、抗体の本来の性質を損なってしまう例が報告されていた³⁾。また、抗体を中枢神経系に送達する第2の方法論には、抗トランスフェリン受容体抗体と目的の抗体を結合させる方法がある。この方法では、トランスフェリンが血中に比較的高濃度で存在するために、抗トランスフェリン受容体抗体と目的の抗体の融合タンパクが血中のトランスフェリンと競合してしまい、効率よくトランスフェリン受容体に結合できない問題点が指摘されていた⁴⁾。

本研究では抗体を中枢神経系に送達させるための戦略として、TATペプチドを組換え scFv 抗体の末端に連結させる方法を検討している。TATペプチドはHIVウイルス由来TATタンパク伝達領域として知られており、塩基性のペプチドを多く含むことが特徴的である。TATペプチドが結合されたタンパクを細胞内へ送達させる機構は十分明らかにはされていないが、TATペプチド中のアルギニン残基のグアニジン基が有するプラスの電荷と細胞膜の脂質二重膜中のリン酸基が保持するマイナスの電荷が相互作用して、TATペプチドと連結したタンパクは

脂質膜の中を透過すると推定されている⁵⁾。TATペプチドを利用して組換えタンパクを細胞内へ送達させた例としては、細胞周期調節タンパクであるCdk2が報告されている⁶⁾。

抗体が血液脳関門を透過して中枢神経系に到達するためには、脳毛細血管の内皮細胞の細胞膜を2回透過する必要がある。今回は本研究の最初の段階として、TATペプチドと連結させたときに組換え scFv 抗体が培養細胞の細胞膜を1回透過して、細胞内へ送達されることを検証した。

この段階での成果は細胞内免疫への応用が考えられる。例えば、抗*ras*オンコジーン抗体が野生型のタンパクは認識せず、変異型のタンパクを認識するとの報告がある⁷⁾。したがって、本研究の成果を応用して細胞内に送達させた抗体が癌に対する新しい治療法につながることを期待される。

ところで、TAT以外にもタンパクを細胞内に送達させる能力を有するペプチドが知られている^{8, 9)}。今後は、それらを組換え scFv 抗体に連結させたときの組換え

scFv 抗体の細胞内への送達能力を比較検討する予定である。また、TAT ペプチドを連結させた組換え抗体を放射標識して、動物に投与したときの脳への移行を検証する予定である。

謝 辞

本研究は、原子力委員会の評価に基づき、文部科学省原子力試験研究費により実施されたものである。

文 献

- 1) Vives, E., Brodin, P. and Lebleu, B. : *J. Biol. Chem.*, **272** (25) 16010-16017 (1997)
- 2) Triguero, D., Buciak, JB., Yang, J. and Pardridge, WM. : *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86** 4761-4765 (1989)
- 3) Bickel, U. : *Advanced Drug Delivery Reviews* **15** 53-72 (1995)
- 4) Huebers, HA. And Finch, CA. : *Physiol. Rev.* **67** 520-582 (1987)
- 5) Rothbard, JB., Kreider, E., VanDeuson, CL., Wright, L., Wylie, BL. and Wender, PA. : *J. Med. Chem.* **45** 3612-3618 (2002)
- 6) Nagahara, H., Vocero-Akbani, AM., Snyder EL., Ho, A., Latham, DG., Lissy, NA., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, SA. and Dowdy, SF. : *Nature Medicine* **4** (12) 1449-1452 (1998)
- 7) La Vecchio, JA., Hamer PJ., Ng, SC., Trimple, KL. and Carney, WP. : *Oncogene* **5** 1173-1178 (1990)
- 8) Schwarze, SR. and Dowdy SF. : *TIPS* **21** 45-48 (2000)
- 9) Morris, MC., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. and Divita, G. : *Nat. Biotechnol.* **19** 1173-1176 (2001)