

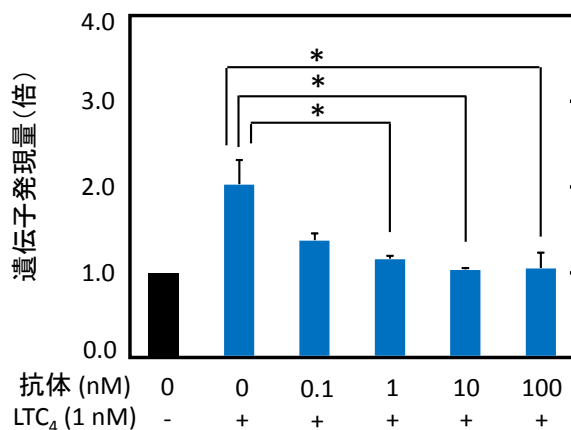
申請者	学科名	栄養学科	職名	教授	氏名	高橋 吉孝 印
調査研究課題	肺線維症に対する抗体治療薬の開発を目指した基礎研究					
交付決定額	480,000円					
調査研究組織	氏名	所属・職		専門分野	役割分担	
	代表	高橋 吉孝	教授	病態生化学	研究総括・単鎖抗体発現	
	分担者	川上 祐生	助教	脂質生化学	酵素免疫測定・細胞実験・動物実験	
調査研究実績の概要	<p>ロイコトリエンC_4 (LTC_4)、LTD_4、LTE_4は、ペプチドLTと総称される。これは、アラキドン酸から5-リポキシゲナーゼ経路により合成されるLTA_4に、LTC_4合成酵素が働いてLTA_4の6位にグルタチオン（グルタミン酸-システイン-グリシンからなるトリペプチド）が結合するとまずLTC_4が生成する。このLTC_4にγ-グルタミルトランスぺプチダーゼが作用すると、グルタチオン部分からグルタミン酸がはずれてLTD_4となり、さらにLTD_4にジペプチダーゼが作用すると、グリシンがはずれて分子内にシステインのみをもつLTE_4が生成する、少なくとも3種類の受容体サブタイプ（CysLT1、CysLT2、およびCysLTE）との結合を介して、気管支喘息のような急性炎症性疾患だけでなく、肺線維症のような慢性炎症性疾患の増悪に関わる。申請者らはこれまでに、LTC_4に対するマウスモノクローナル抗体（抗LTC_4モノクローナル抗体）がLTC_4あるいはD_4と結合し、1 nMの低濃度で標的細胞上の2つの受容体への結合を阻害する中和抗体として働くことを見出した。また実際に、この抗体を気管支喘息モデルマウスに投与すると喘息の所見が軽快することを証明した。さらに、抗体を構成する2本のタンパクそれぞれの抗原結合部位をつないで1本にすることにより、変異の導入が自在に行える抗LTC_4単鎖抗体を作製してCOS-7細胞で発現させ、これが元のモノクローナル抗体と同様に中和抗体として働くことを示した。</p> <p>本年度は、慢性炎症性疾患の一つである肺線維症に対する効果的な治療薬を作製することを最終目的として、線維芽細胞によるコラーゲン産生が、LTC_4の受容体の一つであるCysLT2受容体を介して行われるとの知見に基づき、抗LTC_4モノクローナル抗体あるいは酵母で発現させた抗LTC_4単鎖抗体が、マウスの肺から単離して培養した線維芽細胞による</p>					

調査研究実績
の概要

コラーゲン産生を抑制するかどうかを検討した。

なお、単鎖抗体発現系として大腸菌を用いた場合は、短時間で変異体の作製から発現までを行うことができるため、変異体の網羅的な検討には適していたが、発現量が少ないこと、また元のモノクローナル抗体と比較してLTC₄との結合親和性が大きく低下することが問題であった。そこで昨年度までの検討により、メタノール資化酵母である*Pichia pastoris*を用いた発現系を構築した結果、培養上清1 Lあたり約3.1 mgの精製抗LTC₄単鎖抗体が得ることができ、発現量を図ることができた。また、この抗LTC₄単鎖抗体は、抗LTC₄モノクローナル抗体と比較してタンパク重量当たりほぼ同じ結合活性を示し、結合親和性の上昇も図ることができた。結合親和性の上昇の理由として、翻訳後の修飾が考えられたが、単鎖抗体はPAS染色で染色されず、糖鎖修飾の可能性は否定された。このことから、大腸菌の発現系では糖鎖修飾が行われない以外の何らかの理由で正しい立体構造が構築されていないと考えられた。さらに、LTC₄に最も高い親和性で結合し、LTD₄とLTE₄にも部分的に結合したが、LTB₄にはほとんど結合しないという、抗LTC₄モノクローナル抗体と同様のLTへの結合特異性が確認された。

マウス肺線維芽細胞をLTC₄あるいはLTD₄で刺激したときに起こるコラーゲン産生が、抗LTC₄モノクローナル抗体あるいは抗LTC₄単鎖抗体によって抑制されるかどうかについて、刺激して30分後にtotal RNAを回収し、Type I コラーゲンの遺伝子であるCOL1A1およびCOL1A2のmRNA量を、real time PCRで測定することにより検討した。1 nMのLTC₄および1 nMのLTD₄によって、COL1A1遺伝子の発現はそれぞれ、1.7~2.7倍および1.5~2.1倍、COL1A2遺伝子は1.5~2.8倍および1.5~1.8倍上昇した。これらの上昇は、いずれも1 nM以上のCysLT2受容体拮抗薬であるHAMI-3379により有意に抑制されたが、CysLT1受容体拮抗薬であるMK-571では抑制されなかった。1 nMのLTC₄によるmRNAレベルの上昇は、COL1A1は1 nM以上、COL1A2は0.1 nM以上の抗LTC₄モノクローナル抗体で有意に抑制された。一方1 nMのLTD₄によるCOL1A1、COL1A2の上昇は、いずれも10 nM以上の抗LTC₄モノクローナル抗体で有意に抑制された(p<0.05)。また、1 nMのLTC₄によるCOL1A1、COL1A2のmRNAレベルの上昇は、いずれも1 nM以上の抗LTC₄単鎖抗体により有意に抑制され、1 nMのLTD₄によるこれらの遺伝子の発現は、いずれも100 nMの抗LTC₄単鎖抗体により有意に抑制された(p<0.05)。



【図】抗LTC₄単鎖抗体によるコラーゲン遺伝子発現上昇の抑制

線維芽細胞培養培地に、各濃度の酵母で発現させた抗LTC₄単鎖抗体の存在下で、LTC₄ 1 nMを添加し、30分後に総RNAを抽出して、cDNA合成を行い、リアルタイムPCRでType I コラーゲンの遺伝子 (COL1A1) のmRNA量を定量し、LT非添加のコントロールを1として比較した。 (*P<0.05)

以上より、抗LTC₄モノクローナル抗体および抗LTC₄単鎖抗体によって、マウス肺線維芽細胞によるコラーゲン遺伝子の発現は抑制され、これが、CysLT2受容体へのLTの結合を阻害することに基づくことが示唆された。

成果資料目録

1. Yuki Kawakami, Hirano S, Kinoshita M, Otsuki A, Suzuki-Yamamoto T; Suzuki M, Kimoto M, Sasabe S, Fukushima M, Kishimoto K, Izumi T, Oga T, Narumiya S, Sugahara M, Miyano M, Yamamoto S, Takahashi Y., Neutralization of leukotriene C₄ and D₄ activity by monoclonal and single-chain antibodies. BBA - General Subjects, 2014, 1840, 1625-1633.