

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 脳科学研究戦略推進プログラム
(英語) Strategic Research Program for Brain Sciences

研究開発課題名： (日本語) 血液脳関門通過型抗アミロイドβオリゴマー抗体の創生によるアルツハイマー病の分子イメージング診断、治療法の開発及び発症メカニズムの解明
(英語) Developing imaging agents of molecules for diagnosis and treatment of Alzheimer's disease (AD), and an analysis of pathophysiological mechanisms in AD by developing blood-brain barrier transitable Aβ antibodies

研究開発担当者 (日本語) 東京医科歯科大学脳神経病態学分野 主任教授 横田 隆徳
所属 役職 氏名： (英語) Tokyo Medical and Dental University, Department of Neurology and Neurological Science, Chief Professor, Takanori Yokota

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究の目的は、アルツハイマー病 (AD) を対象に Aβオリゴマー (AβO) を標的分子に焦点を絞り、米国で第一相治験が開始されている抗 AβO 抗体を用いて、Glucose transporter-1 (GLUT1) リガンドを有するキャリアーに封入、あるいは結合させて、血液脳関門(BBB)通過型 AβO 抗体を創生し、さらに、その抗体を用いた AβO PET/MRI 造影剤を開発し、診断、AβO 病態の解析、BBB 通過型 AβO 抗体の治療効果を解析することである。

「マウス AβO 抗体とヒト AβO 抗体の作製、評価」

松原グループより津本グループにマウスハイブリドーマと IgG2b 遺伝子情報、scFv 遺伝子情報を供給し、フルボディ抗体とフラグメント抗体 F(ab')₂ 供給体制を整えた。さらに、他のフラグメント抗体(scFv：一本鎖抗体)も、大腸菌発現からの供給体制を整えた。一方、松原グループが目指す哺乳細胞からの抗体取得は、一本鎖抗体 scFv が電気泳動上で確認できない等の問題に直面している

が、その設計プラスミドからの低発現が主因と考え、外注元からのアドバイスのもと、様々な工夫（使用培地やスケールなど培養条件、トランスフェクション条件、細胞密度調整等）を重ね、その取得を目指している。ヒト化抗体では ABO 特異性と抗体結合能評価の結果、マウス可変領域を有すキメラ抗体と同等の結合能を有す 8 個のフルボディ抗体と優れた結合能を有す 1 個のフルボディ抗体取得に成功した。津本グループには 16 個のヒト化 IgG1 遺伝子情報も提供した。

津本グループでは、A β オリゴマー抗体の組換え抗体としてヒト IgG1 キメラ抗体ならびに Fab-Fc 融合抗体を作製し、これらが基となったマウス抗体と同様の物性を示すことを明らかとした。また、組換え抗体から F(ab')₂ を作製し、片岡グループに供与するスキームを構築した。一方で一本鎖抗体 scFv は満足な物性を有さなかった。これらの抗体のコントロールとして、既存の A β 抗体の組換え作製系を構築し、各グループへの供与を行っている。

「GLUT1 結合リガンド、および GLUT1 結合 ABO 抗体の作製」

血液脳関門 (BBB) 通過性リガンドに関しては、津本グループにおいて、その取得法を見直すことで複数のクローンをモノクローナルなものとして解析できる状態になった。

片岡グループでは、「GLUT1 結合リガンド分子 (GLUT1L) の合成・基礎物性評価」に関して、当初の計画に則り 3 種類の GLUT1L ((a)ミセル型、(b)分岐型、(c)直鎖型)を高分子・有機合成技術を用いて調製し、脳へ抗体をデリバリーする上で重要なパラメタである血中循環性を評価し、(a)ミセル型が著しく長い血中半減期を有することを見出した。「ABO 抗体導入法の最適化 (GLUT1-ABO 抗体の構築)」については、GLUT1L に津本グループより供給された F(ab')₂-ABO 抗体の導入を検討し、ミセル表層に ABO 抗体を 1 分子導入することに成功した。「核種を搭載した GLUT1 結合リガンド分子の設計・合成」については、キレート剤をコアに修飾した高分子ミセルの構築に成功した。造影剤をキレート後に、量子科学技術研究開発機構の青木 G にサンプルを供給し造影剤濃度を算出したところ、最適なミセル構造を得ることができ、現行の臨床用造影剤と同程度の緩和能が得られた。しかし、BBB 透過性を検出するための MR イメージングに十分な造影効果を得るためには更なる改良を要することが判明した。今後は、ミセルの調製法を変更することで、キレート量を改善する。

「AD モデルマウスの入手、モデルマウスにおける抗体の特異性の検証」

大分大学、東京医科歯科大学にて、AD メカニズム解明に必要な AD モデルマウス使用に関する MTA を理化学研究所や大阪市立大学と締結した。それらのモデルマウスの使用に関して、放射線医学研究所が MTA を締結した。

横田グループでは、松原グループが開発し、津本グループより産生・供給された ABO 抗体を用いて、アルツハイマー病モデルマウスである CRND8 の脳切片の染色を行い、CRND8 の脳には ABO 抗体に対して免疫反応性を有する沈着が認められることを確認した。

「血液脳関門通過型抗 A β オリゴマー抗体の創生によるブレインイメージング法の開発」

GLUT1 結合リガンドおよび GLUT1 結合抗体を可視化し、生体イメージングによって評価することは、これらの脳内送達の効率、安定性、病態に対する有効性、安全性や副作用の評価等に重要である。青木グループでは、平成 28 年度は、片岡グループが調整した化合物を用いて、撮像法の最適化を行い、平成 29 年度の *in vivo* 実験に向けた準備を完了した。

Gluc-ABO 抗体等に関する研究開発として、ブランチ構造やミセル等の造影能を評価し、片岡グル

ープと共同でより緩和能の高いMRIプローブの開発と *in vitro* 評価を行った。各種構造を持つプローブを、7テスラMRIおよび1テスラMRI装置の両方で、T1定量計測、T2定量計測を行い、画像解析によりそれぞれ縦緩和能 (r1)、横緩和能 (r2) を計算した。その結果を片岡グループに戻して、構造と濃度、緩和能との関係を議論した結果、ミセル構造が最適なものであることを見だし、現行の臨床用造影剤と同程度の緩和能を達成した。今後、BBB通過を検出するために、さらに濃度と緩和能の向上を実施する。また、本プローブに対応したMRI撮像法の最適化を進め、モデル動物移入の手続きを完了した。

The aim of our study is focusing on amyloid- β oligomer (ABO) of Alzheimer's disease, and we will use anti-ABO antibodies the phase 1 clinical trial of which for prevention of AD has already been progressing in the United States. We will newly develop a carrier with Glucose transporter-1 (GLUT1) ligands packaging the antibodies, or directly fuse the antibodies to GLUT1 ligands, which will be able to penetrate blood-brain barrier (BBB). Then we also develop new PET/MRI contrast agents for ABO using our newly created antibodies, which can be used for the diagnosis of early AD, analysis of ABO pathophysiology, and of treatment effects for preventing AD.

Production and validation of mouse anti-ABO antibody and its humanized antibody

To organize a supply system of antibodies, such as a whole-body antibody and antibody fragment (Fab'), Matsubara group provided mouse hybridomas, IgG2b gene information, and scFv gene information to the Tsumoto group. As a result, antibody fragments such as scFv expressed from *E. coli* and/or Fab' have been available and provided to Yokota and Kataoka groups, respectively. On the other hand, our on-going acquisition from the mammalian cells is troublesome, mainly owing to the low expression from the plasmid designed. We have continued to obtain it under the professional advice, such as culture conditions, medium and scale, transfection conditions, cell density adjustment, and so on. Evaluation of specificity and affinity via competition ELISA revealed that, among 16 whole-body humanized ABO antibodies, one was superior to and 8 ones were similar to the chimeric antibody having a mouse variable region. To accelerate the supply process, 16 humanized ABO antibody (IgG1) genetic information and their plasmids designed were provided to the Tsumoto group in 2016.

Tsumoto group produced recombinant antibodies based on the information of the present ABO antibody in the form of human IgG1 chimera and Fab-Fc fusion. These antibodies were proved to have similar properties as the original one. Scheme for supplying F(ab')₂ produced from the recombinant antibody was started. Single-chain Fv (scFv) was produced but poor physical properties were found out. As control for these molecules, conventional antibodies against A β were also prepared and distributed among the team.

Oita university, TMDU, NIRS have concluded the MTA for the use of AD-model mice with Riken, and Osaka city university.

Yokota group have performed an immunohistochemistry of brain specimens from AD model mouse, CRND8, using anti-ABO antibodies, which was created by Matsubara group and produced by Tsumoto group, and found anti-ABO immunoreactivity on the specimens from those mouse brain

Synthesis and validation of GLUT1 ligand

As to the blood-brain barrier (BBB) transition (GLUT1) ligands are under development by Yokota and Tsumoto groups, and Tsumoto group improved methods for the selection. Multiple monoclonal domain antibodies are under assessment.

With respect to "*Synthesis and characteristic properties evaluation of GLUT1 ligand molecule (GLUT1L)*", Kataoka group successfully synthesized 3 types of GLUT1L ((a) micelle type, (b) branched type and (c) linear type) according to the initial plan. Kataoka group evaluated blood circulation, an important parameter for delivering antibodies to the brain, and found that (a) micelle type has a remarkably long half-life in bloodstream. For "*Optimization of Amyloid β oligomer (ABO) antibody introduction to GLUT1L (development of GLUT1-ABO antibody)*", Kataoka group successfully introduced one molecule of ABO fragment antibody (Fab), which was supplied from Tsumoto group, to GLUT1L. For "*Designing and synthesizing nuclide-loaded, conjugated GLUT1L*", Kataoka group successfully constructed polymeric micelles modified with a chelating agent as a core. After chelating the contrast agent, we supplied samples to Aoki group at the NIRS to calculate the concentration of the contrast agent. As a result, it was revealed that the micelle formation was suitable for practical use of BBB permeable carrier and the developed Gd-PIC micelle reached similar relaxivity level as a clinical Gd-DOTA contrast agent. However, farther improvement is required to detect the BBB permeability in vivo using MR imaging. In the future, we will improve the amount of chelate by changing the preparation method of polymeric micelle.

Development of a brain imaging by developing blood-brain barrier transitable ABO antibodies

Visualization of GLUT1 ligands using in vivo imaging is important for the evaluation of drug delivery efficiency through the BBB, stability, safety, and side effect profile. In 2016, Aoki group optimized magnetic resonance imaging (MRI) parameters and prepared an in vivo study to be performed in 2017 using newly synthesized compounds developed by Kataoka group.

For the development and research of Gluc-ABO compounds, we tested several high-sensitivity MRI contrast agents, such as branch or micelle structure, with Kataoka group in vitro. Aoki group measured the T1 and T2 relaxation time in several differently structured samples using both 7-tesla and 1-tesla MRI systems and calculated the T1 relaxivity (r1) and T2 relaxivity (r2). We discussed the results with Kataoka group and performed improvements. Regarding the results, we found that the micelle structure is the most promising candidate as a BBB permeable agent. We also optimized the MRI parameters for the new compound and prepared animal models.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 0件)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 二重特異性抗体の抗原上構成を利用した抗体 DDS へのアプローチ, ポスター, 秋葉宏樹、高柳憲介、湯村恭平、浜窪隆雄、津本浩平, 第 32 回日本 DDS 学会学術集会, 2016/7/1, 国内
2. ドラッグデリバリーを指向した二重特異性抗体の抗原上形成, ポスター, 秋葉宏樹、高柳憲介、湯村恭平、浜窪隆雄、津本浩平, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016/9/8, 国内
3. Approach to Multiscale Imaging using Micro-MRI and Functional Contrast Agents. International Symposium on Multimodal Medical Engineering (MME), 口頭, Ichio Aoki, Chiba University, 2017/3/3, 国内.
4. 機能性 MRI 造影剤と腫瘍内の微小環境解析、口頭、青木伊知男、Medical Research Conference、国立がん研究センター東病院、2017/1/25、国内.
5. 前臨床脳機能 MRI によるモデル性評価の試みと問題点、口頭、青木伊知男、日本認知症学会・シンポジウム 28 「認知症モデル動物のモデル性を議論する」、東京国際フォーラム、2016/12/3、国内.
6. Functional and Theranostic Contrast Agents for MRI, The 18th Northeastern Asian Symposium on Molecular Imaging-based Precision Medicine (A3 Molecular Imaging symposium), 口頭, Ichio Aoki, JSPS-NSFC-NRF, Eastern Cloud Hotel, Hangzhou, China. 2016.11.12、国外.
7. Functional and Theranostic Contrast Agent, 口頭, Ichio Aoki, 日本磁気共鳴医学会、JSMRM-KSMRM joint symposium、大宮ソニックシティ、2016/9/10、国内.
8. 高磁場 MRI による細胞トラッキングとマイクロイメージング、口頭、青木伊知男、第 37 回日本炎症・再生医学会、京都市勧業館、2016/6/16、国内.
9. 脳実質内での挙動制御を指向したデュアルリガンド搭載高分子ミセルの構築, ポスター, 渡邊拓也, 溝口明祐, 安楽泰孝, 福里優, 堀真緒, J.-Y. Ahn, 片岡一則, 第 65 回高分子学会年次大会, 2016/5/26, 国内
10. 血液脳関門を効率的に通過する高分子ミセルの開発, 口頭, 安楽泰孝, 桑原宏哉, 福里優, 溝口明祐, 藤加珠子, 松本有, 横田隆徳, 片岡一則, 第 26 回インテリジェント材料・システムシンポジウム, 2017/1/11, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 高磁場 MRI による演習とクイズを実施、福島と千葉の小学生親子サイエンスキャンプ、青木伊知男、量研機構・放医研（千葉県千葉市）2016/8/26、国内.

(4) 特許出願