

平成28年度 委託実験調査成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 創薬支援推進事業 創薬総合支援事業
(英語) Drug Discovery Support Promotion Project “The iD3 Booster”

実験調査課題名： (日本語) 神経保護作用を発揮するLRP-1作動薬の探索-cell-based functional assay
の確立と実施
(英語) Search for LRP-1 agonists as neuroprotectant: To establish and perform
cell-based functional assay

実験調査担当者 (日本語) 学校法人東京薬科大学 薬学部 講師 林 秀樹
所属 役職 氏名： (英語) Hideki Hayashi, Assistant Professor, School of Pharmacy, Tokyo
University of Pharmacy and Life Sciences

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担実験 (日本語) 神経保護作用を発揮するLRP-1作動薬の探索
調査課題名： (英語) Search for LRP-1 agonists as neuroprotectant

実験調査分担者 (日本語) 学校法人東京薬科大学 薬学部 講師 林 秀樹
所属 役職 氏名： (英語) Hideki Hayashi, Assistant Professor, School of Pharmacy, Tokyo
University of Pharmacy and Life Sciences

II. 成果の概要

網膜神経節細胞に発現する LRP-1 (low density lipoprotein receptor related protein-1) を標的として、抗ヒト LRP-1 アゴニスト抗体のスクリーニングを実施し、視神経保護効果を有する新たな緑内障治療薬の創製に取り組んでいる。

初代培養網膜神経節細胞を用いた成果 (in vitro 評価) :

- ・ グルタミン酸誘導性神経障害 (アポトーシス) に対する抗ヒト LRP-1 抗体の神経保護効果を評価するスクリーニング系を確立した。
- ・ 組み換え LRP-1 ドメイン蛋白質に対する抗 LRP-1 scFv 抗体スクリーニングを実施し、LRP-1 の細胞外領域に結合する複数の scFv 抗体を取得した。
- ・ スクリーニングを行った抗 LRP-1 scFv 抗体の中に、初代培養網膜神経節細胞のグルタミン酸誘導性神経障害に対する保護効果 (アポトーシス抑制作用) を有する抗体が存在することを確認した。

ラット NMDA 誘発性視神経障害モデルを用いた成果 (in vivo 評価) :

- ・ In vitro スクリーニングで得られた抗 LRP-1 scFv 抗体をラット NMDA 誘発性視神経障害モデルの硝子体内に投与した結果、視神経障害に対する保護効果を有する抗体クローンが存在することを確認した。

LRP-1 細胞外領域タンパク質を抗原としてモノクローナル抗体を取得するために、LRP-1 完全長細胞外ドメイン発現のためのベクターの構築と高発現 CHO 細胞を樹立した。

It has been demonstrated that agonists, such as apolipoprotein E-containing lipoproteins, of low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) show neuroprotective effect against optic nerve degeneration. Therefore, we performed antibody screening of anti-human LRP-1 agonistic antibodies and have been engaged in developing a novel therapeutic agent for glaucoma.

Results using primary rat retinal ganglion cells (in vitro analysis):

- ・ We developed a cell-based assay system, which evaluates the neuroprotective effect of anti-human LRP-1 agonistic antibodies against glutamate neurotoxicity.
- ・ Anti-human LRP-1 scFV antibodies bound to extracellular domains of LRP-1 were acquired by a screening system of anti-human LRP-1 scFV antibodies.
- ・ We found the anti-human LRP-1 scFV antibody that has the neuroprotective effect on primary rat retinal ganglion cells against glutamate neurotoxicity.

Results using a rat glaucoma model of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced optic nerve degeneration (in vivo analysis):

- The anti-human LRP-1 scFV antibody, which shows the protective effect in in vitro analysis, also demonstrated the protective effect on retinal ganglion cells against NMDA-induced optic nerve degeneration.

We developed a vector construct of full length of human LRP-1 and then acquired stably LRP-1 expressing CHO/DG44 cells to purify human LRP-1 proteins for immunization.

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 件、国際誌 件）
該当なし
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし
- (4) 特許出願
該当なし