

課題番号 5

# タイトジャンクション分子に対するナノボディーの作製

## [1] 組織

代表者：東 智仁  
(福島県立医科大学医学部)  
対応者：白川 龍太郎  
(東北大学加齢医学研究所)  
分担者：  
齋藤 明 (福島県立医科大学医学部)  
東 淳子 (福島県立医科大学医学部)

研究費：物件費 15 万円

## [2] 研究経過

腫瘍免疫チェックポイントの研究および標的治療薬の開発は、近年ますますその重要性を増している。本共同研究では、免疫チェックポイントに関与することが示唆されているアンギュリン3の細胞外ドメインを標的としたナノボディーを開発することを目的として研究を行った。

以下、研究活動状況の概要を記す。

当初、白川博士と面会の上で実験内容について打ち合わせを行う予定であったが、新型コロナウイルス流行のため、電子メールで打ち合わせを進めた。実際の実験についても東北大学でFACS、MACSを用いたスクリーニングを予定していたが、固着細胞を用いたプロトコルに変更し、福島県立医科大学において組換えDNA実験計画を申請し承認を得た上で、適宜白川博士の助言をあおぎつつ実験を進めている(図1)。

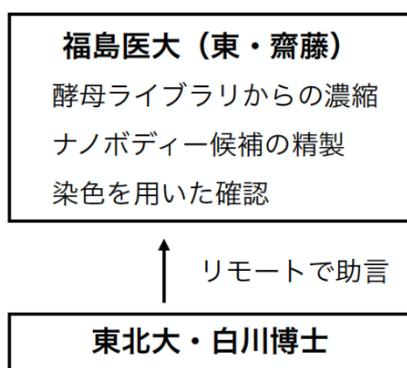


図1 本研究の進め方の概要

## [3] 成果

### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。  
まず第1に、ヒトアンギュリン1、2、3を発現ベクターにクローニングした。  
第2に、アンギュリン3を恒常的に発現するC2C12細胞株を樹立した(図2)。アンギュリン3の細胞内ドメインを認識する特異抗体を用いた免疫染色で、アンギュリン3は細胞間接着部位に特異的に局在していた。

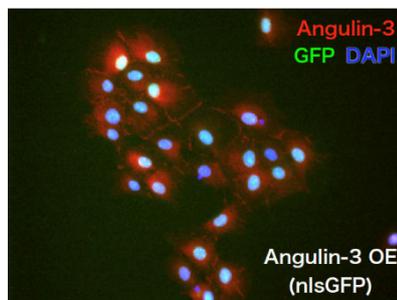


図2 Ang3 強発現 C2C12 細胞の免疫染色

第3に、樹立したアンギュリン3恒常発現細胞を用いて、酵母ナノボディーのスクリーニングを行った。まず、アンギュリン3を発現していない親株C2C12細胞を用いて、非特異的結合を呈するクローンを吸着したのち、アンギュリン3発現C2C12細胞とライブラリをインキュベートして、結合した酵母を単離した。単離された酵母をさらに増幅して同じスクリーニングを3度繰り返し、特異性と力価の高いクローンを濃縮した。3度目のスクリーニング後には、アンギュリン3恒常発現細胞の細胞表面全体に酵母が結合し(図3)、結合能の高いクローンが濃縮されていることが確認できた。

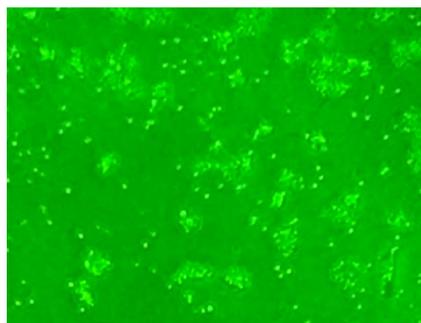


図3 Ang3 発現細胞表面に結合した酵母

現在、濃縮されたクローンからナノボディ遺伝子断片を PCR で単離し、大腸菌で発現したナノボディを精製してスクリーニングを行っている。力価の弱いクローンはすでに単離（図4）できており、今後さらにスクリーニングを進めて、力価の高いクローンを見出すことを目指すとともに、変異の導入によって力価と特異性を向上させることを試みる予定である。

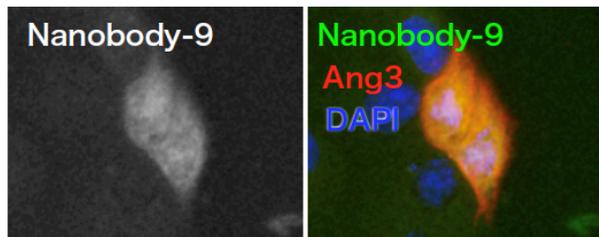


図4 単離されたナノボディーを用いた染色の一例  
Ang3を一過的に過剰発現したMDCK II細胞

### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により、東北大学と福島県立医科大学の研究者の交流が活性化し、若手研究者の育成にもつながった。来年度も本プロジェクトの共同研究が承認されており、引き続きよりよいナノボディーのスクリーニングを行う予定である。アンギュリン3のナノボディーが開発できたあかつきには、がん免疫チェックポイントの新しい創薬につながる可能性がある。また、現在、アンギュリン以外のタイトジャンクション分子に対するナノボディーの作製も計画中である。タイトジャンクション分子の多くはウイルスや細菌毒素の受容体となっており、その結合を阻害できるナノボディーの開発は新たな治療薬の開発につながることを期待できる。

## [4] 成果資料

現在のところ、本共同研究の直接的な成果によって出版された論文はまだないが、本研究に関連して進めているタイトジャンクションのプロジェクトにおいて以下の論文を発表した。

1. [Saito AC](#), [Higashi T](#), Fukazawa Y, Otani T, Tauchi T, [Higashi AY](#), Furuse M, Chiba H.

Occludin and tricellulin facilitate formation of anastomosing tight-junction strand network to improve barrier function.

Mol Biol Cell, in press, 2021.

2. [Higashi T](#), Chiba H.

Molecular organization, regulation and function of tricellular tight junctions.

Biochim Biophys Acta, 1862:183143, 2020.