

令和 2 年 3 月 18 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年度

受付番号 201960047

氏名 薩田 健史

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名)用務地: エドモントン (国名: カナダ)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。特異体質薬物毒性の非侵襲かつ経時的な 3D モニタリング法の確立

3. 派遣期間: 平成 31 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 3 月 3 日

4. 受入機関名及び部局名

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Alberta5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注) 「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

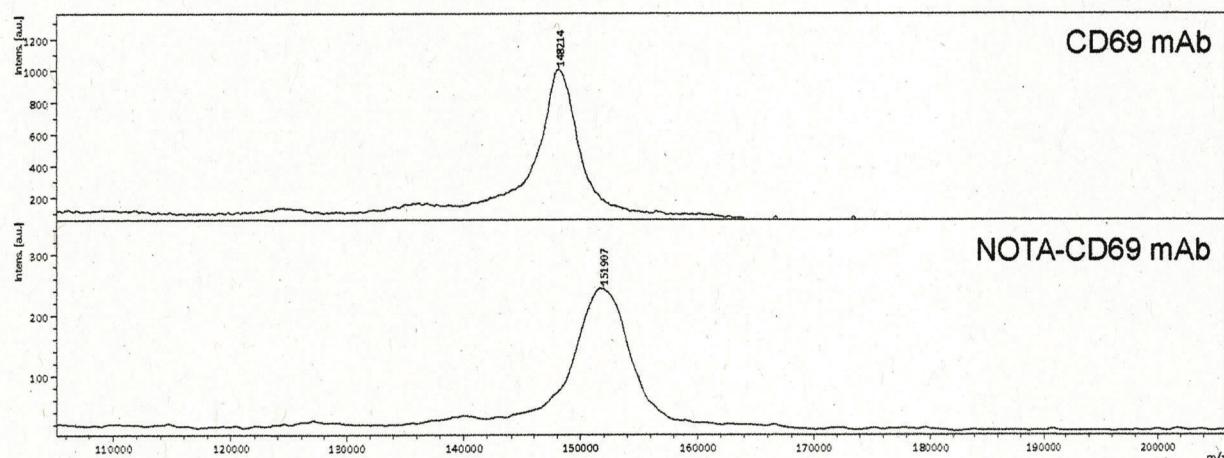
目的の遂行状況及び成果

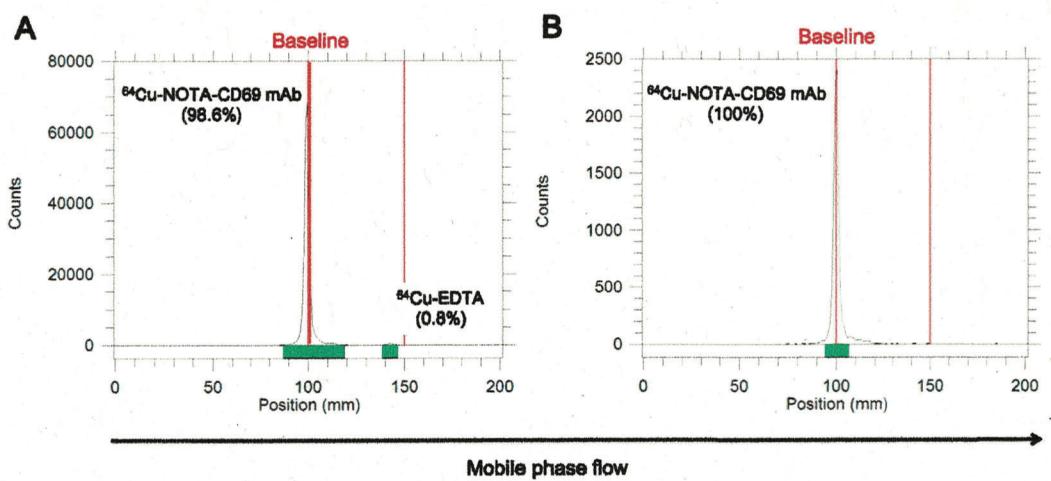
私が今回の派遣において立案した研究内容は、「特異体質薬物毒性発症における組織特異性を解明するための非侵襲的な 3D ライブイメージングメソッドを確立すること」であった。特異体質薬物毒性(IDT)とは、「特定の体質(遺伝子)・環境といった個人差により発症の有無が左右される副作用」であり、臨床上無視できない有害事象として知られており、中には死亡例も報告されている。現在までの研究で、ヒト白血球抗原(HLA)多型の一つである HLA-B*57:01 を有する人においては抗 HIV 薬であるアバカビルが皮膚、抗菌薬であるフルクロキサシリンが肝臓をそれぞれ主標的として IDT を惹起することが見出されているものの、IDT 発症の組織特異性を生み出す要因については未解明であることが問題となっている。したがって、前臨床段階において未知の創薬候補化合物の IDT 発症の組織特異性を予測するためには、(1) IDT により活性化した免疫細胞(CD8⁺ T 細胞)の生体内分布を明らかにし、(2) 活性化 CD8⁺ T 細胞の発生から体内を移動して臓器傷害に至るまでの経過を全身レベルでくまなく継時的に評価する手法を確立することが必要不可欠であると私は考えた。

本研究で使用する 3D ライブイメージング法のツールとして、派遣先期間が所有する小動物用 Positron Emission Tomography (PET) -CT を選択した。PET-CT の特長は、陽電子と陰電子の衝突によって生じる消滅 γ 線を検出することで生体内部の放射性トレーサーの 3D 機能画像が取得可能となることである。そこで、本派遣では、(1) 活性化免疫細胞の挙動を追跡するための陽電子放出核種標識抗体(プローブ)を合成し、(2) 局所曝露により免疫系が賦活したマウスモデルに本化合物を尾静脈投与し、炎症発生部位に分布したプローブが実際に PET-CT により検出可能か確認することを目指した。

(1) 活性化免疫細胞の挙動を追跡するための陽電子放出核種標識プローブの合成

本研究で標的とする活性化免疫細胞のマーカーとして免疫細胞特異的に表面発現量が上昇する CD69 を選択した(<https://www.proteinatlas.org>)。まず、anti-mouse CD69 抗体 1 mg をキレート剤 p-SCN-Bn-NOTA 0.5 mg と混合し、pH9.0 (37°C) で十分反応させることにより NOTA 修飾した anti-mouse CD69 抗体 (NOTA-CD69 mAb) を合成した。サイズ排除クロマトグラフィーカラムを用いた精製後に BCA Protein assay により収量を確認したところ、その際の収率は 80% 程度であった。さらに、反応後の NOTA-CD69 mAb 及び出発物質(CD69 mAb)について MALDI-TOFMS を用いてそれぞれの質量を比較したところ、その差は 3693 であった(下図)。したがって、今回得られた NOTA-CD69 mAb において、NOTA(分子量:450) は mAb 1 分子あたり平均 8.21 分子結合していることが明らかとなった。





次に、陽電子放出核種 (^{64}Cu : 半減期 12.7 時間) を NOTA-CD69 mAb に標識させる反応に進んだ。0.1 mg の NOTA-CD69 mAb に対して約 90MBq の $^{64}\text{CuCl}_2$ を混合し、100mM NH₄OAc (pH5.5) を溶媒として 40°C で 1 時間反応させた。得られた反応物に対して EDTA による非抱合核種除去操作を実施し、薄層クロマトグラフィーによって生成物の純度を確認したところ、98.6% であった（上図 A）。さらに、これら生成物についてサイズ排除クロマトグラフィーカラムを用いて精製したところ、最終的に 100% 純度の ^{64}Cu -NOTA-CD69 mAb を取得することができた（上図 B）。最終産物の収量を測定したところ 27.6MBq/300 μL であり、派遣先プロトコールの推奨投与量である “6.4 to 8.7MBq of ^{64}Cu -labeled mAb in 70–90 μL (< 2 μg of mAb) (Wagner et al. *Nucl Med Biol.*, 2018)” をクリアしていた。

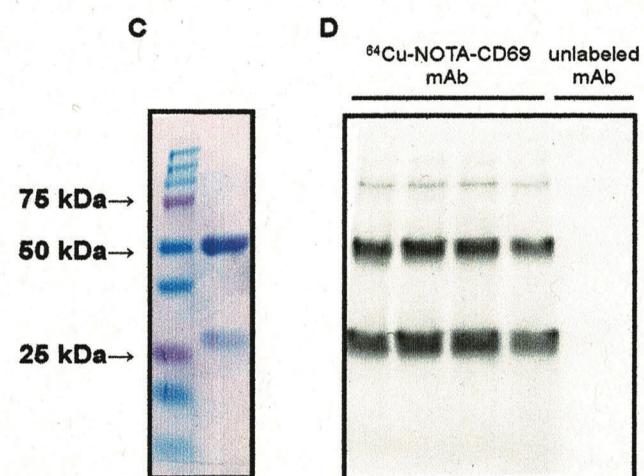
さらに、最終産物を SDS-PAGE 法により分離し、得られた ^{64}Cu -NOTA-CD69 mAb の品質について分子量の点から評価した。CBB 染色（右図 C）の結果、最終産物から重鎖（分子量：約 50 kDa）及び軽鎖（分子量：約 25 kDa）がともに検出された。また、同じ SDS-PAGE サンプルにおける放射性物質の分布をオートラジオグラフィーにより測定したところ、最終産物では CBB 染色と同様の位置でバンドが検出された一方で、標識前の抗体では検出されなかった（右図 D）。

以上より、活性化免疫細胞の挙動を追跡するための陽電子放出核種標識抗体（プローブ）の作製に成功した。

(2) 局所曝露により免疫系が賦活したマウスモデルを用いた検証

次に、2,4-ジニトロクロロベンゼン(DNCB)の局所曝露（耳介塗布）により免疫系が賦活したマウスモデルを使用して(1)で合成したプローブが実際に有用か検証することを試みた。本モデルでは、DNCB を 3 日間耳介塗布することで局所リンパ節でのみ CD8⁺ T 細胞における CD69 の表面発現量が増加し、その一方で脾臓では表面発現量が上昇しないことを共同研究先の千葉大学薬学部において確認していた。

しかし、結果として本実験を派遣期間中に実施することは不可能であった。理由は本実験の遂行に必要なマウス実験の実施許可が派遣終了直前まで下りなかつたためである。動物実験実施の申請を派遣開始直後に着手したのにも関わらず 1 年近く経過しても実施許可が得られなかつたことは全くの想定外であった。非常に残念ではあるが、動物実験実施許可が下りた後に後任のスタッフ・学生が本プロジェクトを引き続き取り組んでくれることとなつたため、今後の成果に期待したい。



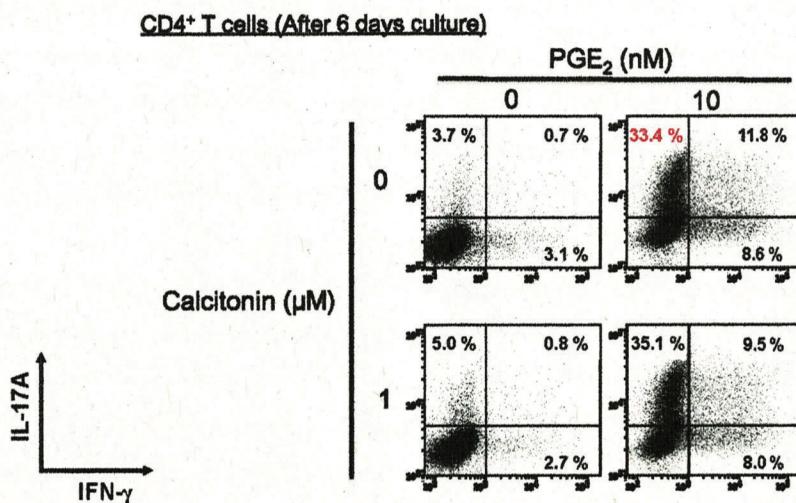
(※今回の派遣目的プロジェクト以外に派遣先研究室に実施を依頼された研究の成果)

以下の研究についても実施を依頼されたのでその成果も併せて報告する。

カルシトニンによる抗炎症メカニズムの解明

派遣先研究室が過去に報告した「関節リウマチラットモデルにおいて観察されたカルシトニンによる抗炎症効果」について、*in vitro* 単離初代培養リンパ球を用いてそのメカニズムを解明することを依頼された。Host researcher の説明から、カルシトニンによる活性化リンパ球産生の抑制が主な機序として考えられたため、その検証に着手することとした。まず始めに活性化ヘルパーCD4⁺ T cell を炎症性物質プロスタグランジン E₂(PGE₂)の添加のみにより作製することを試みたが、炎症性サイトカインの分泌増加が認められず、失敗した。そこで次に、関節リウマチにおいて増殖・活性化が報告されている(Komatsu et al. *Clin Exp Immunol.* 2018) 炎症由来の活性化ヘルパーCD4⁺ T cell (Th17 細胞) に着目し、このサブセットを *in vitro* 培養系において作製することを着想した。具体的には、過去の文献 (Yao et al. *Exp Nat Med.* 2009) を参考に、PGE₂依存的な Th17 細胞の増殖・活性化を再現することを試みた。

ラットより CD4⁺ T cell をポジティブセレクションにより単離した後、Th17 分化に必要なサイトカイン類 (IL-6, TGF-β) を添加し 3 日間培養した (1 次刺激)。次に PGE₂ 10 nM 及び IL-23 を加え、3 日間さらに培養した (2 次刺激)。その結果、PGE₂ 10 nM 存在条件において IL-17⁺CD4⁺ T cell の顕著な増加 ($33.8 \pm 1.6\%$) がコントロールと比較して認められ、PGE₂ 依存的な活性化 Th17 細胞の作製に成功した (左図)。しかし、カルシトニン 1 μM の共存化において、CD4⁺ T cell 中の活性化 Th17 紹介細胞の割合に変化は認められなかった ($32.5 \pm 5.2\%$) ことから、カルシトニンは PGE₂ 依存的な活性化 Th17 紹介細胞の産生に影響しないことが示唆された (下図)。



したがって、当初の仮説である「カルシトニンによる活性化リンパ球産生の抑制」のうち、Th17 紹介細胞が関与している可能性が低くなり、本研究の仮説を再構築する必要に迫られた。そこで、「本研究の根拠となった関節リウマチラットモデルにおいてどの免疫細胞の産生がカルシトニンに投与によって変化しているのか」を見出すことが *in vitro* 実験での確実な仮説の着想に至ると考え、一旦 *in vivo* 実験に立ち返って再検証する必要があることを Host researcher に提案したところ、賛成・承認された。しかしながら、こちらの動物実験については 2 年以上実施許可が取得できていないようであり、結局本研究も打つ手無しとなった。