

## 血液脳関門透過抗体の開発およびマウスを用いた in vivo での透過能評価

浅野 梨紗<sup>1</sup>、中西 優<sup>2</sup>、辻村 和樹<sup>2</sup>、若狭 希洋<sup>3</sup>

<sup>1</sup>工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 津本研究室

<sup>2</sup>工学系研究科 化学生命工学専攻 神経細胞生物学研究室

<sup>3</sup>薬学系研究科 薬科学科専攻 分子薬物動態学研究室

### 著者紹介

浅野 梨紗：二重特異性抗体を中心とした抗体エンジニアリングおよび蛋白質の相互作用解析を専門とする。本研究では、抗体作製および ELISA を用いた抗体の定量解析を行った。

中西 優：三次元電子顕微鏡における技術開発およびその技術を用いたマウス脳構造解析を専門とする。本研究では、脳の取り出し、脳切片作成と観察を行った。

辻村 和樹：分子生物学的手法や蛍光顕微鏡観察を用いた神経細胞内分子メカニズム探索を専門とする。本研究では、免疫染色を行い、共焦点顕微鏡を用いた観察により、抗体の局在を評価する。

若狭 希洋：マウスやゼブラフィッシュを用いた希少肝疾患の新規メカニズム探索を専門とする。本研究では、マウスへの抗体の静脈注射および採血を行った。

### 1. 研究背景

血液脳関門 (BBB) は、血液と脳組織間の物質移動を厳重に制御する機構である。血液からの病原体や有害物質の侵入を防御し、中枢神経系の機能維持を担う一方、脳組織への薬物送達を困難にする。特に抗体分子の脳内移行性はわずか 0.2 %程度にとどまる<sup>1</sup>。そこで、BBB 透過能を高め、脳内に薬物を送達する手法として生体内での物質輸送機構を利用する戦略が提案されており、有望な標的の1つがトランスフェリン受容体 (TfR1) である<sup>2</sup>。TfR1 は細胞内への鉄の取り込みおよび細胞の成育に重要な役割を担う受容体で、脳血管内皮細胞で高発現し、鉄の血液脳関門通過に寄与する<sup>3</sup>。浅野らは、独自に抗 TfR1 VHH 抗体を取得しており、In vitro の BBB モデル系を用いて血液脳関門透過能を有することが示

唆された。しかし、本抗体がモデル動物で血液脳関門を透過するかは明らかでない。本自発融合研究では、マウスモデルを用いた抗体の血液脳関門透過能の評価を目指した。

## **2. 実験結果と考察**

### **2.1. 抗体の調製**

マウス TfR1 に結合し、血液脳関門を透過することが報告されている 8D3 IgG 抗体<sup>4</sup>、ネガティブコントロールとして抗リゾチーム HyHEL10 IgG 抗体<sup>5</sup>、抗 TfR1 VHH 抗体である VHHm1、ネガティブコントロールとして抗 MtsA 抗体 VHH43<sup>6</sup> を哺乳細胞発現系で発現、粗精製の後にサイズ排除クロマトグラフィーで最終精製を行った。これらの抗体にはすべて ELISA での検出用に HA タグを C 末端に付加した。

### **2.2. マウスを用いた既存 IgG 抗体の透過率評価**

精製した IgG 抗体をそれぞれ C57BL/6 系統、8 週齢、メスの野生型マウスに尾静脈注射した(投与量 1 mg/kg)。投与後 4 時間および 24 時間に、静脈採血を行い、回収した血液を遠心分離して血漿を分画した。さらに、麻酔下で全身灌流を実施し、血液をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に置換後、脳を摘出した。摘出した脳はホモジナイザーおよび超音波破碎で均質化し、遠心分離によって上清を回収した。血漿および脳組織中の抗体量は、ELISA により定量した。プレートに抗 HA タグ抗体を固定し、血漿および脳組織サンプルを添加後、HRP 標識抗 mouse IgG1 抗体を用いて検出した。

投与量に対する脳重量あたりの抗体量は、8D3 IgG 抗体では投与 4 時間後に 0.9 %、24 時間後に 0.13 %となった(図 1)。一方、HyHEL10 IgG 抗体は、4 時間後に 1.1 %、24 時間後には検出限界を下回った。本結果はいずれも n=1 の結果であり、値の信頼性には留意が必要であるが、8D3 の脳内移行性が示唆された。しかしながら、ネガティブコントロールとして用いた HyHEL10 IgG 抗体も投与後 4 時間では同程度の移行性を示した。抗リゾチーム抗体が脳内移行性を持つ可能性は低いと考えられるため、本実験系において全身灌流の不十分さや定量性の問題など、改良の余地があると考えられる。

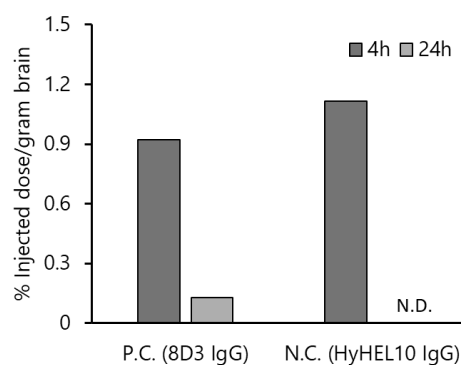


図 1. IgG 抗体の脳内移行率 (n=1)

### 2.3. マウスを用いた VHH 抗体の透過率評価

精製した VHH 抗体を 2.2 同様、尾静脈注射した。投与量 11 mg/kg とし、VHHm1 は 3 匹、VHH43 は 2 匹に投与した。VHH 抗体の血中半減期の短さを鑑みて、投与 1 時間後に静脈から採血、脳組織の摘出を行った。2.2 において、全身灌流が不十分である可能性が示唆されたため、脳切片染色によって脳中の赤血球を計数することで、全身灌流の成功可否を判定した(図 2)。図 2b,e では、赤血球が大腦皮質の血管内に残存しており、全身灌流が不十分であると判断した。

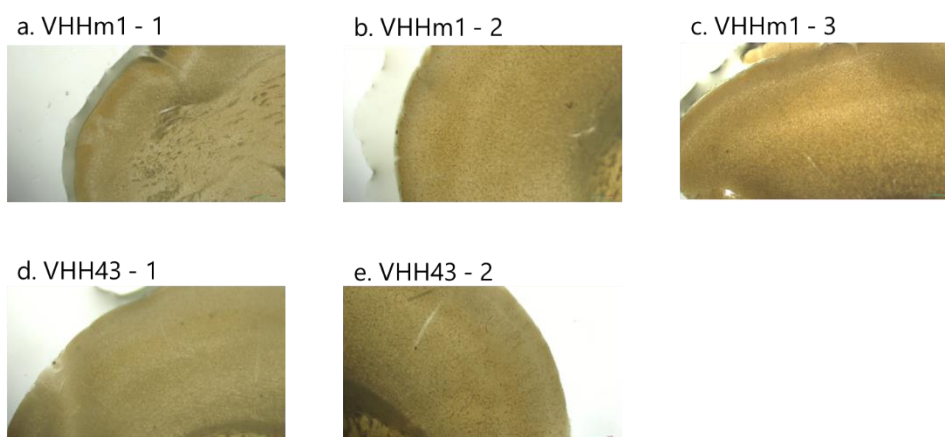


図 2. 脳切片染色 (a-c : VHHm1 投与マウス、d,e : VHH43 投与マウス)

全身灌流に成功したマウスについて抗体量を ELISA により定量した。プレートに抗 HA タグ抗体を固定し、血漿および脳組織サンプルを添加後、1 次抗体として抗 VHH ヤギ抗体、2 次抗体として HRP 標識抗ヤギ IgG 抗体を用いて検出した。投与量に対する脳重量あたりの抗体量は、VHHm1 抗体では投与 1 時間後に 0.01 %、VHH43 抗体で 0.003%となった(図 3)。VHHm1 は VHH43 に比較して、高い透過率を示したが、既存抗体と比較すると非常に低い値となった。低透過率の原因として、高投与量であること、VHH 抗体の血中半減期の短さが考えられる。

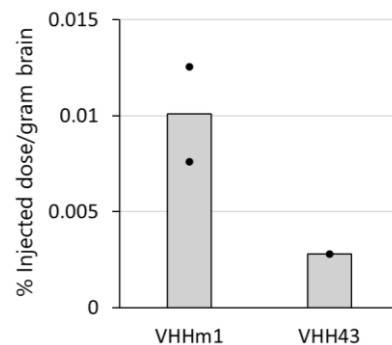


図 3. VHH 抗体の脳内移行率

### 3. まとめと今後の展望

本自発融合研究では、抗 TfR1 抗体である VHHm1 の血液脳関門透過能をマウスで評価することを目指した。まず、評価系の構築に成功した。その結果、VHHm1 がネガティブコントロールよりも高い透過率を示すことが示唆された。今後は、再現性の確認に加え、投与量の最適化、VHH 抗体の血中半減期を伸ばす抗体エンジニアリングを通じて、血液脳関門透過抗体の最適化が期待される。

### 4. 謝辞

本研究の遂行にあたり、指導教員である工学系研究科 津本 浩平教授、平林 祐介准教授、薬学系研究科 楠原 洋之教授にご支援・ご指導を賜りましたことを感謝申し上げます。また、副指導教員である理学系研究科 大栗 博毅教授、塩見 美喜子教授、薬学系研究科 富田 泰輔教授、医科学研究所 柴田 龍弘教授に本研究をご快諾いただきましたこと御礼申し上げます。本研究の遂行にあたり、多大なご助言、ご協力をいただきました中木戸 誠 講師に深く御礼申し上げます。最後に、本融合研究に対する研究費の援助をいただきました MERIT-WINGS に深く感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Goulatis, L. I. & Shusta, E. V. Protein engineering approaches for regulating blood-brain barrier transcytosis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **45**, 109–115 (2017).
2. Haqqani, A. S., Bélanger, K. & Stanimirovic, D. B. Receptor-mediated transcytosis for brain delivery of therapeutics: receptor classes and criteria. *Front. Drug Deliv.* **4**, (2024).
3. Candelaria, P. V., Leoh, L. S., Penichet, M. L. & Daniels-Wells, T. R. Antibodies Targeting the Transferrin Receptor 1 (TfR1) as Direct Anti-cancer Agents. *Front. Immunol.* **12**, 607692 (2021).
4. Manich, G. *et al.* Study of the transcytosis of an anti-transferrin receptor antibody with a Fab' cargo across the blood-brain barrier in mice. *Eur. J. Pharm. Sci.* **49**, 556–564 (2013).
5. Tsumoto, K. *et al.* Contribution to antibody-antigen interaction of structurally perturbed antigenic residues upon antibody binding. *J. Biol. Chem.* **269**, 28777–28782 (1994).
6. Asano, R. *et al.* Characterization of a novel format scFv×VHH single-chain biparatopic antibody against metal binding protein MtsA. *Protein Sci.* **33**, e5017 (2024).