

学位論文の要旨

氏名

田中孝一

学位論文題目

単クローン抗体を分子鋳型にした新規機能性ペプチド設計における基盤研究
-アルツハイマー病の原因分子を標的として-

本論文は単クローン抗体を分子鋳型に用いた機能性ペプチドの設計法と、それにより作製されたペプチドの機能解析を行ったものである。本研究では、特にアルツハイマー病の原因分子である、アミロイドベータタンパク (A β) を分子標的とし、近年の抗体工学技術によって確立された線維状A β 特異的抗体の、1) エピトープ解析を行い、2) エピトープペプチドによるA β 線維形成阻害の機序、3) 動物に免疫することで誘導される抗体の性質を解析することで、分子鋳型設計法によって設計したペプチドが抗原の構造を模倣 (ミミック) し、有用なワクチンとして応用できることを証明した。本論文は以下の7章から成り立っている。

第1章では、本論文の序論を示した。タンパク質間の相互作用を代表するような、様々な分子間の反応を制御し得る小分子は、医薬品をはじめとする多岐にわたる分野で有用である。現在の創薬研究に用いられている、低分子化合物ライブラリーやペプチドライブラリーは、既存の化合物の誘導體や天然物由来など偏りのあるライブラリーである事が多く、さらにこのようなライブラリーの中から目的の小分子をスクリーニングすることは決して容易なことではない。ここでは現在広く用いられている化合物及びペプチドライブラリーと、そのスクリーニング法を紹介し、本論文で用いている分子鋳型設計法の有用性についてまとめた。

第2章では、本論文の基盤となる、分子鑄型設計法についてその背景をこれまでの知見と共に示した。リガンド・レセプター間の結合を阻害する抗リガンド抗体は、リガンド表面の結合領域の構造を相補的に認識することから、抗体側の構造は、レセプターのリガンド結合領域の構造を部分的に模倣（ミミック）している事が考えられる。本章では、鑄型に用いる抗体と、そのエピトープ解析に用いるランダムペプチドディスプレイライブラリーについて紹介し、抗IL-6抗体、抗MCP-1抗体を分子鑄型に用いたミミック分子設計の現状についてまとめた。

第3章では、本論文の標的疾患であるアルツハイマー病（AD）の発症機序と、現在開発段階の薬剤を含めた治療法について示した。AD患者の脳内では神経伝達物質の発現量の低下や、炎症、神経細胞の軸索や樹状突起の萎縮、老人斑（アミロイド斑）の沈着、さらには大脳全体の萎縮といった様々な病理所見が見いだされている。1984年にアミロイド斑の主要成分が約40アミノ酸のペプチド（Aβ）であることが報告され、さらにAD発症者が多い家系においてアミロイド前駆体タンパク質（APP）内に特有の遺伝子変異が発見されたことで、AβがAD発症機構の中心的な役割を担う事が確定した。その後多くの研究により、2002年に脳内に蓄積したAβが引き金となって、脳内の炎症、神経細胞間のシナプス障害、神経原線維変化、神経細胞死が起こり、最終的に認知症になるというアミロイドカスケード仮説が提唱され、現在においても広く受け入れられている。現在、ADの治療法として神経伝達物質の一つであるアセチルコリンの分解酵素（アセチルコリンエステラーゼ）を標的にした塩酸ドネペジル（アリセプト）や、開発段階ではあるが、免疫機能を利用するAβワクチン療法などがある。本章では、このような開発段階の薬剤も含めたAD治療法の現状を問題点と共にまとめた。

第4章では、本研究で行った抗Aβ抗体を分子鑄型に用いたエピトープ解析の結果を示した。近年、吉原らによって、線維状Aβ42に特異的に結合し、さらなる線維形成を阻害する

4種の完全ヒト一本鎖抗体 (B6、B7、D1、F10) が確立された。これらの抗体を、本研究の基盤となる分子鋳型とし、ランダムペプチドファージディスプレイライブラリー (PhD C7C, PhD 12) を用い、特異的結合活性を有するファージクローンを単離した。単離したファージクローンのモチーフシーケンスの遺伝子解析することで、それぞれの抗体のエピトープ解析を行った。その結果、環状ペプチドライブラリーを用いた解析で、B6、B7、D1のそれぞれの抗体に共通したエピトープ (B6-C15) がある事が明らかとなった。得られたエピトープのAβ42とのホモロジー解析を行った結果、わずかにAβのC-末端領域に相同性があることが分かった。

第5章では、3種の抗Aβ抗体 (B6、B7、D1) に共通して得られたエピトープ配列を合成し、Aβ42の線維化に及ぼす解析結果を示した。ペプチド合成を行うにあたり、親水性を付与する上で、膜透過能を有するTAT配列をN-末端に付加したペプチド (TAT-B6-C15) を合成した。ペプチドの環状構造の必要性を解析するためセリン置換体 (TAT-B6-S15) も同様に合成した。それぞれ合成したペプチドをAβ42線維化実験の0時間目に加え線維形成に及ぼす影響を計時的に解析した。線維形成の指標としてアミロイド線維に特異的に結合する蛍光色素であるチオフラビンT (ThT) を用いて計測した。その結果、Aβ42は6時間でThTが最大値を示すのに対し、ペプチド存在下では7日目においても蛍光強度が低く、線維形成を阻害する事が明らかとなった。次にTAT-B6-C15のAβ42線維化阻害の機序を解析するにあたり、Aβ42の線維形成過程にできるのどのような分子と結合するかDot blot法により解析を行った。その結果、線維形成過程の1.5時間目くらいから形成される分子種と結合活性を有する事が明らかとなった。また、線維化実験の0時間目に存在する分子種とは結合しない事も明らかとなった。次に、線維形成過程の1.5時間目のサンプル中に存在する分子種をゲル濾過カラムによるHPLC解析により検討した。その結果、約300kDaの高分子オリゴマーと、約12kDaの低分子オリゴマーが存在している事が明らかとなった。次に、にこれらの分子種との結合解析をELISAとSPR解析により検討した結果、低分子オリゴマーとは結合せず、高分子オリゴマーと結合能を有する事が明らかとなった。以上の結果から、

TAT-B6-C15は線維化過程の途中で形成される、高分子オリゴマーと結合することで線維化を阻害する事が明らかとなった。最後に、TAT-B6-C15による線維化阻害の機序から、推測されるAB42の線維化機序について考察した。

第6章では、分子鑄型法によって作製したペプチド分子が、抗原の構造を模倣(ミミック)していることを証明するため、ペプチド分子をマウスに免疫することで抗原に対する抗体を誘導するか解析を行った。エピトープペプチドはN-末端がビオチン化しているので、ストレプトアビジンと架橋させることで、ハプテンキャリアーを作製した。その後、水酸化アルミニウムゲルをアジュバントに用い、マウスの皮下に合計4回免疫を行った。最後の免疫から2週間後の血清を用いて、可溶性ABと線維状ABに対する結合活性をELISAで解析した。その結果、低い値ではあるが線維状ABに結合性を示す抗体が誘導されている事が示された。さらに誘導された抗ABフィブリル抗体のサブクラスを解析した結果、IgMであることが分かった。次に、エピトープペプチドを免疫したマウスの脾臓を回収し、ABの1次配列を認識するT細胞の増殖実験を行った。その結果、ABに対するT細胞増殖は誘導しないことが分かった。以上の結果から分子鑄型法によって作製したペプチド分子が、抗原の構造をミミックしていることが示唆された。今回、エピトープペプチド免疫によって誘導される抗原特異的な抗体価が非常に低い値であったため、分子鑄型法によって作製したペプチド分子が、抗原の構造をミミックしているか否かについては示唆される程度に言及した。

第7章では、以上の結果を総括し、分子鑄型設計法によって作製したミミックペプチドによるワクチン開発にむけた今後の課題を提唱した。

論文審査の要旨

報告番号	理工研 第294号	氏名	田中孝一
審査委員	主査	杉村和久	
	副査	青柳隆夫	伊東祐二
<p>学位論文題目 単クロン抗体を分子鋳型にした新規機能性ペプチド設計における基盤研究 -アルツハイマー病の原因分子を標的として-</p> <p>(Molecular design of functional small peptide using monoclonal antibody: Targeting to amyloid-β 42 of Alzheimer's disease)</p> <p>審査要旨</p> <p>提出された学位論文及び論文目録等を基に学位論文審査を実施した。本論文は、アルツハイマー病の原因分子を標的とし、単クロン抗体を分子鋳型に用いた機能性ペプチドの設計法と、それにより作製されたペプチドの機能解析を行ったもので、全文7章より構成されている。</p> <p>第1章は機能性ペプチドの一般的な作製法を述べた序論である。第2章では、膜タンパク質など構造が不安定な分子や、構造情報が不明なタンパク質を標的とした機能性ペプチドの作製法として、本論文で用いた分子鋳型設計法が有用となることを述べている。第3章では、アルツハイマー病の発症機序と、現在開発段階の薬剤を含めた治療法について示し、アルツハイマー病におけるAB凝集機序解明の重要性と、ABワクチン療法の有用性と問題点を示し、アルツハイマー病における本戦略の有用性を述べている。第4章では、本研究で行った抗線維状AB抗体を分子鋳型に用いたエピトープ解析の結果を示しており、得られたエピトープがAB42との相同性が低いことから、線維状ABの立体構造エピトープであることを示している。第5章では、エピトープ配列を合成し、AB42の線維化に及ぼす解析結果を示している。その結果、合成エピトープが、AB42の線維化過程で形成されるオリゴマーと結合することで、ABの線維化を阻害することを明らかにしている。また、この合成エピトープが、ABモノマー、トリマー、テトラマーや線維状ABと結合しないことから、ABの線維伸長が単純なモノマーABの重合反応ではなく、オリゴマーどうしの結合反応によることを示唆しており、未だ明確にされていないABの線維化機序のモデルを提案している。第6章では、分子鋳型法によって作製したペプチド分子の免疫応答誘導能について解析を行っている。その結果、マウスに免疫することで線維状ABに特異的な抗体を誘導することを明らかにしており、本論文で設計したペプチドが線維状ABの部分構造をミミックすることを示唆している。さらにABに対するT細胞増殖を誘導しないことも示しており、本論文で設計したペプチドが、ABに対する自己免疫応答を誘導しないアルツハイマーワクチンとして期待される。第7章は、本論文で設計された機能性ペプチドのAB線維化阻害能と免疫応答誘導能における総括と展望である。</p> <p>以上本論文は、分子鋳型設計法を用いて作製した機能性ペプチド (ABミミックペプチド) が、AB凝集阻害剤として期待されること、さらに、ABオリゴマーとの結合特異性を有することから、治療薬及び、早期診断において有用となることが期待される。また、免疫原として用いた際に、線維状ABに特異的な抗体を誘導したことから、アルツハイマー病における安全なワクチンとしても有用であることが期待され、今後の研究の発展が期待される。</p> <p>よって、審査委員会は博士 (工学) の学位論文として合格と判定する。</p>			

最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第294号	氏名	田中孝一
審査委員	主査	杉村和久	
	副査	青柳隆夫	伊東祐二
<p>本学位論文の本審査は、平成21年2月12日の17時より、鹿児島大学工学部共通棟403号室にて、主査、杉村和久教授、副査、青柳隆夫教授、伊東祐二准教授の出席のもと、その他聴講者が20名程度の前で行われた。約35分の博士論文発表の後、30分間程度、以下の諮問を含む質疑応答が行われた。</p> <p>1) ABミモトープワクチンの有用性について。 本論で述べる機能性ペプチド (ABミモトープペプチド) をマウスに免疫した際に、線維状ABに対する抗体価を誘導し、ABに対するT細胞増殖を誘導しないことから、安全なワクチンとして有用であることが述べられた。</p> <p>2) 他の凝集阻害剤と比較した時の有用性について。 機能性ペプチドが細胞毒性種であるABオリゴマーへの特異的結合活性を有し、他の凝集阻害剤はこのような結合特異性を持たないことから診断薬としての有用性が述べられた。</p> <p>3) 免疫後に誘導された抗体のサブクラスとT細胞増殖の見解について。 免疫原に対するIgG抗体が誘導されており、さらにキャリアタンパクに対するT細胞増殖が誘導されていることが述べられ、この条件下でもABミモトープペプチドに対するT細胞増殖が認められないことより、このペプチドがAB特異的なT細胞を活性化する可能性が低いことが述べられた。</p> <p>4) 免疫後に誘導された抗体の脳内ABとの反応性に対する見解。 免疫によって誘導された抗-線維状AB抗体によるAD脳の免疫染色能に関しては、ADモデルマウスを用いて今後検討することが述べられた。</p> <p>5) TATペプチドの血液脳関門の透過能について。 TATペプチドが、膜透過性が高く、血液脳関門の透過能も有することが述べられた。</p> <p>6) 抗-線維状AB抗体を誘導するワクチンの予防的用法の有用性について。 本論で述べる機能性ペプチドの予防的ワクチン効果の有用性に関してはADモデルマウスを用いて今後解析することが述べられた。</p> <p>以上のように、申請者は、上記の諮問ならびに質疑に的確に回答し、学位を授与するに値する学力を有していると判断された。</p>			