

学位論文の要旨

氏名

吉原 智樹

学位論文題目

アルツハイマー認知症の免疫療法に関する抗体工学研究
(Antibody Engineering on Immunotherapy for Alzheimer's Disease)

痴呆性老人の増加は、先進国が共通に抱える社会問題である。高齢者における痴呆症の主な原因の1つにアルツハイマー疾患がある。アルツハイマー疾患の全容と真の発症原因は依然として不明であり、根本的な予防や治療法もいまだ確立されていない。アミロイドベータにはいくつかの構造体が存在していることが知られており、本研究では、ファージディスプレイライブラリーを用いてアルツハイマー病の発症に関与していると考えられるアミロイドベータペプチドの構造体に特異的に結合する抗体を作製しそれらの活性を評価した。本論分は以下の5章から成り立っている。

第1章ではアルツハイマー疾患発症のメカニズムについての一般論を示しアルツハイマー治療法開発の戦略と課題を述べた。近年アルツハイマー疾患には、アミロイドベータペプチド(A β)が深く関与していることがわかってきた。このA β ₁₋₄₂は、時間の経過とともにモノマーから、オリゴマー、ファイバーとその構造を変えることが報告された。この構造変化によって生じるコンフォーマーと疾患の関係が指摘されているが、まだはっきりとした証明はなされていない。従来のハイブリドーマ法を用いた抗体作製法では、抗原を免疫する際に抗原の構造変化が生じてしまい、期待する抗体の取得は困難である。そこで本研究では、それらの課題を克服するためにファージディスプレイライブラリーを用いてA β ₁₋₄₂に対する抗体の作製を行った。ファージディスプレイ法では、構造を決定した抗原をプレートに直接コートし、それらに対して抗体を取得することができるので

期待される抗体の取得ができる。

ファージディスプレイライブラリーの技術は1985年Smith, G.がScience誌に報告したファージディスプレイライブラリーの論文、さらに1991年にWinter, G.がJ. Mol. Biol.誌に報告したヒト抗体をファージディスプレイできるという論文から始まる。ヒトB細胞から抗体のVH, VL遺伝子を増幅後ランダムに組み合わせた抗体ファージライブラリーの技術は、それまで不可能であったヒトモノクローナル抗体を多種多様な抗原(自己抗原を含む)に対して作製することを可能にした。ヒト抗体の作製は疾患の診断や治療においてマウス由来の抗体よりもより抗原性がなく、非常に優れたツールとなる。

第2章は、アミロイドベータペプチドのコンフォーマーについて述べた。このA β は、1回膜貫通型のたんぱく質である β アミロイド前駆体たんぱく(APP)が β セクレターゼと γ セクレターゼにより切断されることにより生じる。切断を受ける際切断部位がずれることによりA β_{1-40} (アミノ酸1番から40番までのペプチド断片)、A β_{1-42} (アミノ酸1番から42番までのペプチド断片)という2種類の長さの異なる分子が産生される。産生されたペプチドは時間依存的に構造を変えていく。オリゴマーA β_{1-42} はいくつかの種類が報告されている。それらは、分子量、形態がことなり、*in vitro*、*in vivo*で作製または発見されたものである。これらのオリゴマーはSDS-PAGEにより容易に可溶性A β_{1-42} と区別することができ、その結果を示す。また、線維状A β_{1-42} は*in vivo*でも観察され電子顕微鏡を用いた解析や、Thioflavin Tを用いた解析により確認できる。また近年、この線維状A β_{1-42} のX線結晶構造解析が報告され詳細な構造がわかった。この章では現在までに報告されているオリゴマー、ファイバーを作製しそれぞれについて解析を行いその構造を確認した。

第3章は、可溶性A β_{1-42} 、線維状A β_{1-42} に対する抗体の作製を行った。抗体作製は従来の方法に従い、抗原をプラスチックプレートにスパーサーを介して共有結合により

結合させた。スペーサーを介することで、直接固定化することによる構造変化を防ぐことができる考えた。また、線維状 $A\beta_{1-42}$ 特異的抗体を作製するに当たっては、可溶性 $A\beta_{1-42}$ で一度反応させることで可溶性 $A\beta_{1-42}$ に結合する抗体の除去を行った後線維状 $A\beta_{1-42}$ と反応させることで特異的抗体の作製を行った。これらの方法により抗体ファージライブラリの探索を行い、5種類の $A\beta_{1-42}$ 特異的ヒト抗体(Fv1E1, Fv1E4, Fv2A7, Fv2A8, Fv2B6)、及び線維状 $A\beta_{1-42}$ 特異的抗体を4種類(B6, B7, D1, F10)単離した。特にB6抗体は他の線維状 $A\beta_{1-42}$ 特異的抗体に比べより特異性を示したのでこの抗体について詳細に解析した。液層中での抗原との反応性をサンドウィッチELISAにより評価したところ、この抗体は固定化した抗原のみならず液層中の抗原とも特異的に結合することがわかった。

第4章は、得られた抗体が $A\beta_{1-42}$ の線維化を抑制するかどうかを検討した。得られた抗体を $A\beta_{1-42}$ と共に37°Cで静置後、Thioflavin Tを用いて蛍光強度を測定することにより線維化を調べた。得られた抗体のうちFv1E4, B6, B7, D1, F10が線維化を抑制した。線維状 $A\beta_{1-42}$ に特異的な抗体はすべて線維化を阻害していた。B6についてより詳細な阻害のメカニズムを調べた結果、線維化反応後に抗体を加えることでより先の線維化を阻害することがわかった。しかしながら、一度できた線維状 $A\beta_{1-42}$ についてはそれらをより小さな $A\beta_{1-42}$ へと分解することはできないということもわかった。したがって、この抗体は線維化の進行を抑制するが、線維化物の分解はできないという活性をもつ抗体であるということが判明した。また、抗体のエピトープマッピングによりこの抗体は $A\beta_{1-42}$ のC末を認識していることもわかった。

第5章は、以上の結果を総括し、アルツハイマー疾患の診断、治療法の開発における今後に残された課題を提唱した。

論文審査の要旨

報告番号	理工研 第289号	氏名	吉原 智樹
審査委員	主査	杉村 和久	
	副査	隅田 泰生	伊東 祐二
学位論文題目			
アルツハイマー認知症の免疫療法に関する抗体工学研究 (Antibody Engineering on Immunotherapy for Alzheimer's Disease)			
審査要旨			
<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認知症における免疫療法に関する抗体工学研究について述べたもので、全文5章より構成されている。</p> <p>第1章はコンフォメーション疾患と免疫療法に関してまとめたものである。コンフォメーション病は生体内に存在する正常タンパク質が、異常型と呼ばれるコンフォメーションへ構造変化することで引き起こされる疾患である。アルツハイマー疾患ではアミロイドベータペプチドと呼ばれる42残基のアミノ酸からなるペプチドが疾患の原因分子であることが報告され、モデルマウスに抗アミロイドベータ抗体を投与することで疾患を予防することが示され、アミロイドベータに対する抗体の有用性が示された。</p> <p>第2章では実際に論文等で報告されているアミロイドベータのコンフォーマーを作製した。これらのコンフォーマーは<i>in vitro</i>で種々の条件で安定な状態で作製することができる。作製したコンフォーマーはSDS-PAGE、チオフラビンTアッセイ、電子顕微鏡によってその構造が確認された。</p> <p>第3章では作製したコンフォーマーに対してバイオパニングを行い抗体の作製を行った。従来のハイブリドーマ法を用いた抗体作製では、マウスの体内でコンフォメーションの変化や小さいペプチドへの断片化が生じるためにコンフォメーション特異的な抗体の作製は困難であった。本研究では、<i>in vitro</i>で調整したコンフォーマーに対して直接バイオパニングを行うことでコンフォメーション特異的な抗体の作製に成功した。</p> <p>第4章では得られた抗体の性状解析を行った。今回作製された抗体は、アミロイドベータのモノマーからファイバーへの構造変化を阻害した。この抗体の阻害メカニズムを調べるために、エピトープの同定を行ったところアミロイドベータのC末端領域を認識していることが示唆された。ファイバーの構造と抗体のエピトープ情報をもとに抗体の阻害メカニズムのモデルを提唱した。</p> <p>第5章は本論分の総括である。以上本論分では、アミロイドベータをモデルにコンフォメーション特異的な抗体の作製法に関する研究を行い、従来のハイブリドーマ法では達成困難なコンフォメーション特異的な抗体の作製を可能にした。</p> <p>以上本論文はアミロイドベータのコンフォメーション特異的な抗体の作製を目的とし、ファージディスプレイ法と抗体エンジニアリングによりヒト抗体を創出した論文で、コンフォメーション特異的な抗体の作製を可能にした。さらには抗体のエピトープ解析を行いアミロイドベータの線維化阻害メカニズムのモデルを提唱した。今回用いた手法はアミロイドベータのみならず他のコンフォメーション病にも応用可能であると考えられる。よって、審査委員会は学位(博士)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289号	氏名	吉原 智樹
審査委員	主査	杉村 和久	
	副査	隅田 泰生	伊東 祐二
<p>最終試験の結果は、研究発表内容の質、発表状況、質疑応答の内容を総合的に審査した。</p> <p>博士論文の発表と質疑応答：平成20年2月8日、14時30分より産学官連携推進機構VB部門ディスカッションルームにて学位論文の聴講会が行われた。40分の研究論文の発表後、研究内容について20分間の質疑応答が行われた。具体的には以下のような質疑応答がなされた。</p> <p>1. ファイバー、オリゴマーの具体的な作製法は？ 回答：ファイバーに関しては、100 μMの濃度になるようにリン酸バッファーで希釈後37°Cで2日静置した。オリゴマーに関しては、400 μMの濃度になるようにリン酸バッファー、SDS（終濃度0.2%）を加え37°Cで6時間静置後、終濃度100 μMになるように超純水を加えさらに37°Cで18時間静置した。</p> <p>2. 生体内でコンフォメーションを変えるような分子を安定に作製できるのか？ 回答：確かに、生体内で産生されたアミロイドベータペプチドは産生された直後はモノマーであるが時間の経過とともにオリゴマー、ファイバーへと構造を変えることが知られている。しかしながら、いくつかの論文では<i>in vitro</i>で安定的にオリゴマーを作製する手法が報告されており、実際追試をしたところSDS-PAGE、電子顕微鏡での観察ができるほど安定であった。</p> <p>3. 今回作製した抗体はC末を認識し、アミロイドベータのファイバーのみを特異的に認識することが示されているが、同様にアミロイドベータのC末を認識するマウスのモノクローナル抗体はファイバーのみならず低分子オリゴマーを認識するといったような特異性の違いが見られるのか？ 回答：アミロイドベータのファイバーのC末の構造は分子間相互作用をしておらずある決まった構造をとっている。一方アミロイドベータのモノマー、オリゴマーのC末はファイバーの状態とは違った構造をとると考えられるので今回単離した抗体はファイバーでの特異的な構造のみを敏感に認識していると考えられる。対照的にマウスのモノクローナル抗体は同じC末でも1次配列を認識しているので多少構造が異なっても認識していると考えられる。</p> <p>4. 現在オリゴマーとファイバーは同じ構造変化をたどるのかそれとも別々の経路をたどってそれぞれの構造になるのかは議論のさなかだと思うが今回の研究結果からこの疑問に対する答えは導き出されるのか？ 回答：一言でオリゴマーといってもその種類は多様であり全てが同じような構造をとっているわけではない。一部は<i>in vitro</i>でのみ調整されており実際の生体内での存在が確認されていないものもある。従って一概にすべてのオリゴマーについて結論づけることはできない。しかしながら、ファイバーへと構造変化を起こす過程で観察されるオリゴマー（60～80 kDa）の形成をこの抗体が阻害すること、及びファイバーの形成も阻害することからこの実験で観察されるオリゴマーはファイバーの前駆体である可能性が示唆される。</p>			