

Title	プロテオーム創薬の実現に向けた機能性蛋白質の創出技術の開発とその評価
Author(s)	柴田, 寛子
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47244
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	柴 田 寛 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 2 1 1 0 1 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	プロテオーム創薬の実現に向けた機能性蛋白質の創出技術の開発とその評価
論文審査委員	(主査) 教授 中川 晋作 (副査) 教授 前田 正知 教授 山元 弘 教授 土井 健史

論 文 内 容 の 要 旨

ゲノムプロジェクトに引き継ぐ次世代研究領域として、蛋白質の多様な時空間的・質的・量的な発現様式と生命現象や病態との連関を、網羅的に解析しようとするプロテオミクス研究が進展している。このような疾病治療に有効な蛋白質を探索・同定しようとするプロテオミクス研究を、創薬技術の根幹として発展させ、疾患関連蛋白質を医薬品開発に有効活用しようとするプロテオーム創薬に熱い期待が寄せられている。しかし、過去の事例からも明らかなように、有効な医薬品として期待されていたサイトカインや各種増殖因子など、多くの蛋白質は複数のレセプターを介して多様な生理作用を発現するため、目的とする治療作用のみならず、それ以外の副作用までも同時に招いてしまう。従って、疾患の発症・悪化・治癒に関わる蛋白質情報を医薬品開発へ有効活用するには、この問題点を克服し、目的蛋白質の作用機序に基づいた医薬品設計を可能とする創薬戦略を構築せねばならない。即ち、疾患や治療目的に応じて、目的とするレセプターに対して選択的な、言い換えれば標的レセプターに対するターゲティング能を有したアゴニストやアンタゴニストといった機能性人工ペプチドや機能性人工蛋白質（構造変異体、アミノ酸改変体）を迅速に創製できるシステムの開発が必要不可欠である。しかし、治療目的に最適化された機能性人工ペプチドや蛋白質は、化学合成あるいは点突然変異法等で作製されたものの中から、個別に機能評価するという煩雑な方法で創出されてきたため、効率が悪く、さらに目的に適ったものは殆ど得られていない。

その点、当研究室ではファージ表面提示法を駆使することで、1億種類もの多様性を有した構造変異体（ペプチド・蛋白質）ライブラリを構築し、その中から医薬価値に優れた機能性人工ペプチド・蛋白質を迅速かつ効率良く創出し得る方法論を構築している。以上の観点から本研究では、代表的な炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 TNF をモデル蛋白質として用い、「特定レセプターへのアゴニストやアンタゴニスト等の医薬価値に優れた機能性人工ペプチド・蛋白質の迅速創出技術の開発」を試みることで、プロテオーム創薬の実現に向けた基礎情報の集積を行った。

TNF は、その過剰発現がリウマチなど自己免疫疾患の発症や悪化に関与しており、TNF に対する中和抗体や可溶性 TNF レセプターが臨床応用されている。本研究でも、より有効な TNF に対する中和抗体の作製について基礎検討を行っている。しかし最近になり、TNF の 2 つのレセプター (TNFR1 及び TNFR2) を介した生理作用は宿主の生体防御機構に必須であるため、これら TNF 阻害剤は感染症の発症率や発がん率の上昇といった副作用を招くことが明らかとなった。そこで、本研究では、既存の TNF 阻害剤に代わる全く新しい薬物分子を開発すべく、独自のファ

ージ表面提示法を駆使することで、特に炎症反応の惹起に深く関与している TNFR1 に注目し、TNFR1 ヘターゲティング能を有したペプチド性・蛋白性アンタゴニストの創出方法の確立を試みた。

ペプチド性アゴニストやアンタゴニストを創出するには、蛋白質中のレセプター結合や生物活性を担う機能性ペプチドを同定する必要がある。そこで本研究では、まず始めに、機能性ペプチドの迅速かつ効率的な創出を可能にする断片化ペプチドライブラリの構築方法について検討を行った。遺伝子工学技術を巧みに組み合わせることで、質・サイズ共に優れた TNF 断片化ペプチドファージライブラリが構築できた。さらに、このライブラリを用いることで、抗 TNF 抗体のエピトープ領域を迅速に同定することに成功し、本方法によって効率良く蛋白質中の機能性ペプチドが同定できることが示された。しかし残念ながら、TNF の断片化ペプチドは TNFR1 に対して全く結合親和性を示さず、ペプチド性の機能分子を創出するのは困難であると判断した。そこで次に TNF のアミノ酸を改変した構造変異 TNF を用いて、医薬価値に優れた機能性人工蛋白質の迅速創出技術の開発を行った。

TNF のレセプター結合領域と考えられているアミノ酸を網羅的に他のアミノ酸へ置換した構造変異 TNF ファージライブラリを構築し、TNFR1 への結合親和性を利用したパンニングを複数回行うことで、野生型 TNF と同程度の TNFR1 に対する結合力を保持しつつ、TNFR2 に対する結合力は野生型 TNF の約 5 万分の 1 にまで低下した TNFR1 指向性変異体 (T2) が得られた。T2 は TNF の TNFR1 を介した生物活性に対して選択的に阻害活性を示し、TNF の TNFR2 を介した作用には何ら影響を与えなかったことから、T2 は TNFR1 ヘターゲティング能を有した蛋白性アンタゴニストであることが判明した。このように、レセプターに結合するにも関わらず、アンタゴニスト活性を発揮する機能性人工蛋白質を作製できたという報告は皆無であり、T2 は世界的にも他に類の無い「蛋白性アンタゴニスト」であると言える。さらに、TNF の過剰発現が病態の発症・悪化に関与している肝障害および関節リウマチ動物モデルを用い、T2 の *in vivo* における抗炎症効果を検討した結果、両モデルにおいて優れた抗炎症効果を発揮することが明らかとなった。また、既存の TNF 阻害剤とは異なり、T2 がウイルス感染に対する生態防御反応に何ら影響を与えないことを確認し、T2 が既存の TNF 阻害剤の問題点を克服できる優れた治療薬になり得ることを示した。TNF が関与する疾患の中には、TNFR2 を介した作用が病態の治癒に関与している場合もあり、既存の TNF 阻害剤では病態悪化を招いていた。従って、T2 は TNF 阻害剤では適応できなかった疾患にも適応可能であり、炎症性疾患に対して画期的な治療戦略を提示できるものと期待された。

以上、本研究ではプロテオーム創薬の実現に向けて、特定レセプターヘターゲティング能を有した蛋白性アンタゴニストを迅速に創出可能なシステムの必要性を提案し、炎症性疾患の創薬ターゲットとして注自されている TNF について TNFR1 指向性アンタゴニストを作製することで、その有用性を実証した。今後、本研究成果がプロテオーム創薬の進展に大きく貢献できることを期待している。

論文審査の結果の要旨

本研究では、代表的な炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 TNF をモデルとして用い、プロテオーム創薬の実現に向けて、「特定レセプターへのアゴニストやアンタゴニスト等の医薬価値に優れた機能性人工ペプチド・蛋白質の迅速技術の開発」を試み、以下に示す結論を得た。

1. ファージ表面提示法と遺伝子工学的手法を利用することで、蛋白質のあらゆる部位・長さを網羅した蛋白質断片化ペプチドライブラリの構築に成功した。
2. 1 で構築した断片化ペプチドライブラリを用いることで、抗体のエピトープを迅速に単離可能であることを示した。
3. ファージ表面提示法を駆使した独自の機能性人工蛋白質の創製システムを応用することで、世界的にも他に類の無い、特定レセプター指向性を有した「蛋白性アンタゴニスト」の作製に成功した。
4. 作製した TNFR1 指向性アンタゴニストが急性・慢性炎症性疾患に対して抗炎症効果を発揮すると共に、従来までの TNF 阻害剤の問題点を克服できる可能性を示した。
5. TNFR1 指向性アンタゴニストの立体構造解析から、アンタゴニスト活性を発揮するメカニズムについての考察

を試み、野生型 TNF とは TNFR1 への結合様式が異なる可能性を示した。

以上、プロテオーム創薬の実現に向けて、炎症性疾患の創薬ターゲットとして注目されている TNF について TNFR1 指向性アンタゴニストを作製し、その有用性を実証した。これらの成果は、プロテオーム創薬の進展に大きく貢献できることを示すものであり、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものとする。