OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structure-based design of bioavailable streptavidin and biotin analogs aiming to establish pre-targeting cancer therapy
Author(s)	川戸, 達矢
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52115
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　川戸　達矢　）	
論文題名	Structure-based design of bioavailable streptavidin and biotin analogs aiming to establish pre-targeting cancer therapy（がんのプレターゲティング治療の確立を目指した生体投与可能なストレプトアビジンとビオチン誘導体の構造に基づく分子設計）

論文内容の要旨

Streptavidin (SA)は Biotin (BTN)は生体二分子間では最強の結合力を有し(K_d=10^{-14}-10^{-15} M)、SA-BTN 結合は生化学や遺伝子工学の分野等で使用されてきた。近年、抗体医薬品と SA-BTN 結合を利用したプレターゲティング法が考案されている。まず、SA を融合させた低分子化抗体を投与し、がん細胞への特異的集積と余剰抗体の体外排出を待った後、放射性同位体(RI)標識した BTN を投与し治療を行う。RI 標識 BTN は速やかにがん細胞に届けられるので、抗体を直接 RI 標識する場合に比べ副作用少なく、ピンポイントでがん細胞を治療できる手法として期待されている。しかし、放線菌由来の SA が示す高い免疫原性や、人体に内在する BTN との競合問題によって、その実用化が妨げられていた。そのような中、免疫原性を低下させた SA 変異体、LISA-314 が最近報告されている。

本論文は、がんのプレターゲティング治療の確立のため、上記２つの問題を解決した生体投与可能な SA 変異体および BTN アナログ分子の開発についてまとめたものである。

第 1 章では、低免疫原性 SA 変異体、LISA-314 の結晶構造を X 線結晶構造解析により高分解能で決定した。LISA-314 は野生型 SA に計 6 つの変異を導入した変異体だが、その主鎖構造は野生型 SA の構造とよく一致し、BTN 結合部位および変異導入を含め、主鎖構造に違いは見らなかった。さらに、変異導入箇所における局所的な温度因子の減少も見られなかった。つまり、LISA-314 は野生型 SA の構造をよく保持しながら低免疫原性化されていることが明らかとなり、また BTN 結合様式の詳細な構造情報および低免疫原性化の要因に関する知見を得た。

第 2 章では、第 1 章で明らかにした LISA-314 の構造情報を基に、① 非天然 BTN の分子設計を行うとともに ② 天然の BTN に結合せず、非天然 BTN のみに結合する LIS-314 変異体の開発を行った。まず、LISA-314 に 2 変異を導入し、BTN に対する親和性が大きく低下した LISA-314 変異を開発した。同変異体は BTN アナログに対しては、BTN と同等の親和性を示した。続いて、同変異体と各リガンド分子の複合体の結晶構造を X 線結晶構造解析により明らかにした。その情報を基に、さらに 1 変異を導入した。その結果、BTN 結合能を完全に失いながらも、非天然 BTN アナログには K_d= 5.9×10^{-7} M を示す LISA-314 変異体の開発に成功した。

第 3 章では、第 2 章で開発した変異体と BTN アナログの親和性向上に取り組んだ。構造情報に基づき、アビディティ効果による親和性の向上を期待して、近接する２つの非天然 BTN アナログ分子を共有結合により連結し、結合部位を２つ有する BTN アナログ分子を開発した。その結果、開発した 2 価のアナログ分子は従来よりも 1000 倍高い親和性を示した(K_d= 8.3×10^{-10} M)。

以上、本論文では、LISA-314 の結晶構造を解明し、人体に内在する BTN の影響を受けない SA 変異体および非天然 BTN アナログの開発に成功した。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　川戸　達矢　）	
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主査　教授	井上　豪
	副査　教授	林　高史
	副査　教授	宇山　浩
	副査　教授	桑畑　進
	副査　教授	南方　聖司
	副査　教授	今中　信人
	副査　教授	平尾　俊一
	副査　教授	町田　憲一
	副査　教授	安藤　陽一
	副査　教授	古澤　孝弘
	副査　教授	櫻井　英博

論文審査の結果の要旨

Streptavidin(SA)-Biotin(BTN)結合は極めて高い親和性(K_d=10^{-15} M)を有し、抗体分子を組み合わせたプレターゲティング法がピンポイントのがん治療法として注目されているが、SA の示す高い免疫原性や人体に内在する天然 BTN との競合問題のため実用化には至っていなかった。本論文は、上記 2 つの課題を解決した生体投与可能な SA 変異体とそのリガンド分子の開発についてまとめたものである。主な結果を要約すると以下の通りである。

第 1 章では、東京大学が開発した免疫原性を低下させた SA 変異体、LISA-314 の結晶構造を X 線結晶構造解析により高分解能で決定し、変異の構造への影響を評価している。その結果、LISA-314 は野生型 SA に計 6 つの変異を導入した変異体だが、その主鎖構造は野生型 SA の構造とよく一致し、BTN 結合部位および変異導入を含め、主鎖構造に違いがないことを明らかにしている。さらに、変異導入箇所における局所的な温度因子の減少も見られなかったことより、LISA-314 が野生型 SA の構造をよく保持しながら低免疫原性化されていることを明らかにし、その有用性を示した。

第 2 章では、第 1 章で明らかにした LISA-314 の構造情報を基に、人体に内在する Biotin との競合問題を解決するため、① 非天然 BTN の分子設計を行うとともに ② 天然の BTN に結合せず、非天然 BTN のみに結合する LIS-314 変異体の開発に取り組んでいる。結果、LISA-314 の BTN 結合部位に計 3 変異を導入することで、BTN 結合能を完全に失いながらも、非天然 BTN アナログには K_d= 5.9×10^{-7} M を示す LISA-314 変異体の開発に成功している。

第 3 章では、第 2 章で開発した変異体により高い親和性で結合する BTN アナログを開発している。構造情報より、アビディティ効果による親和性の向上を期待して、近接する２つの非天然 BTN アナログ分子を共有結合により連結することで、従来よりも 1000 倍高い親和性（K_d= 8.3×10^{-10} M)を示す BTN アナログ分子を開発した。

以上のように、本論文は、SA-BTN結合をプレターゲティング法に応用する上で課題とされていた免疫原性およびBTNノイズを克服したSA変異体とそのリガンド分子を開発し、生体内で利用できる有用なデリバリーツールを提供するものである。

よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。人体に内在するBTNの影響を受けないSA変異体および非天然BTNアナログの開発に成功した。

様式 8

最終試験の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　川戸　達矢　）

	職名	氏名
最終試験担当者	主査　教授	井上　豪
	副査　教授	林　高史
	副査　教授	宇山　浩
	副査　教授	桑畑　進
	副査　教授	南方　聖司
	副査　教授	今中　信人
	副査　教授	平尾　俊一
	副査　教授	町田　憲一
	副査　教授	安藤　陽一
	副査　教授	古澤　孝弘
	副査　教授	櫻井　英博

最終試験の結果の要旨

本学学位規程第１０条の規定により、学位申請者に対して学位論文を中心とし、論文内容及びこれに関連のある科目について試問を行い、審査委員全員の協議の結果、

平成　２７年　２月　１７日合格と判定した。