

Title	ファージ表面提示法によるレセプター指向性人工TNFの創出基盤の最適化
Author(s)	阿部, 康弘
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59416">https://hdl.handle.net/11094/59416</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	阿部 康弘
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 24863 号
学位授与年月日	平成23年8月2日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	ファージ表面提示法によるレセプター指向性人工 TNF の創出基盤の最適化
論文審査委員	(主査) 教授 堤 康央 (副査) 教授 藤尾 慈 教授 橋本 均 教授 小比賀 聡

### 論文内容の要旨

昨今の国内外の研究から、自己免疫疾患をはじめとする広範な炎症の病態において、Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF) がkey molecule の一つとして認識されつつあり、TNFを創薬ターゲットとした医薬品開発が進められている。既に本邦においても、慢性関節リウマチに対する特効薬として、TNF中和抗体や可溶性TNFレセプターといったTNF阻害薬が臨床に供され、リウマチ患者の完治も可能にするなど、切れ味鋭い治療効果を発揮している。しかし、これら抗TNF療法では、宿主の生体防御機構に重要な役割を担うTNFの2種類のレセプター (TNFR1 及び TNFR2) を介した作用を同時に阻害するため、免疫力の低下から感染症の発症率や発癌率の上昇といった副作用を招いてしまうことが問題となっている。更に多発性硬化症患者の一部では、脱髄症状が認められたことから本疾患でのTNF阻害薬の使用は禁忌になっている。そのうえ、両TNFRは、TNFだけでなく、リンフォトキシンも利用していること、膜結合型・可溶性が体内には存在すること、TNFR2には種特異性があることなど、その作用が複雑に制御されているため、従来のノックアウト細胞・マウスなどでは十分に機能解明 (病態との連関解明) ができていない。従って、種々の自己免疫疾患・炎症性疾患の治療には、TNFR1及びTNFR2の役割分担と病態との連関を分子レベルで明らかにするとともに、それら情報をTNF阻害薬の開発にフィードバックすることで、TNFの特定の機能のみを選択的に活性化あるいは阻害できる新たなアプローチの開発がまさに待望されている。

以上の観点から本研究では、TNFシグナルの制御に基づく画期的治療法・治療薬の開発を念頭に、TNFとTNFR1/TNFR2の機能・役割の分担の解明に資する新たな方法論の確立を試みた。そのため、TNFレセプターの中でもシグナル伝達メカニズムについて未知の部分が多く、創薬標的として未開拓なTNFR2に着目し、ファージ表面提示法を駆使することで、TNFR2指向性を有する機能性人工TNFの創出基盤の最適化を行った。まず、構造変異TNF発現ファージライブラリの構築は、点突然変異解析や立体構造シミュレーション解析によってレセプター結合に重要であると推測されるアミノ酸残基6箇所を、一挙に20種類のアミノ酸へ網羅的に置換することで作製した。本ライブラリの中から、TNFR2指向性変異体を効率良くスクリーニングするための方法論として、コンペティティブパンニングを考案しその最適化を行った。さらに、hTNFR2/mFas発現preadipocyteを樹立することで、TNFR2を介した生物活性を簡便かつ感度良く測定可能な評価系を新たに構築した。

上記の最適化されたスクリーニング系を駆使することで、最終的にTNFR2指向性アゴニストを8種類得ることに成功した。これまでも、TNFR2のバイオロジー解明を目指して点突然変異法によるTNFR2指向性の変異体の作製などが精力的に進められてきたが、現在報告されているTNFR2指向性アゴニスト (D143N/A145R) は、TNFR2に対する結合力並びに生物活性もwtTNFの15%以下にまで大きく低下したものでしかなく、機能解明のツールとしては不十分と言わざるを得なかった。この点、本研究において作製したTNFR2指向性変異体は、wtTNFと同等以上のTNFR2親和性を保持しつつ、圧倒的に優れたTNFR2指向性を示した。中でも、R2-7はそのTNFR2指向性がwtTNFの約18万倍であり、TNFR2を介した生

物活性を完全に保持していたことから、TNFR2の生理的意義や病態との連関解析に有効なツールとしてだけでなく、新たなTNFR2に対する選択的機能制御薬としての応用も期待される。

そこで次に、TNFR2指向性アゴニストを機能解析ツールとして活用することで、これまで解析困難であったTNF/TNFR2のシグナル伝達メカニズムの解析と構造-活性相関情報の集積を図った。まず、TNFR2指向性発揮のメカニズムを構造学的に考察するため、最もTNFR2指向性に優れていたR2-7のX線結晶構造解析を通じて、3次元構造情報を収集した。さらにTNFR1及びTNFR2との複合体シミュレーション解析を行うことで、TNFの変異とそれに伴う構造変化、さらにはレセプター結合様式に与える影響など、興味深い知見を収集した。このR2-7より得られた構造-活性相関情報は、TNFR1及びTNFR2の構造差異を認識し、TNFR2選択的な分子の特徴を反映するものであるため、将来的にTNFR2選択的阻害剤の分子設計に有用な情報を提供するものと期待される。

続いて、TNFR2の細胞内ドメインに結合するアダプター分子を明らかにするため、R2-7を用いた免疫沈降を行った。免疫沈降後に回収したTNF/TNFR2複合体を質量分析により解析することで、蛋白質の同定を行った。R2-7刺激群でのみ特異的に検出された蛋白質の中には、既にTNFR2のアダプター分子として知られるTNF receptor-associated factor 2 (TRAF2)に加え、Probable Xaa-Pro aminopeptidase 3 (APP3) など新規TNFR2関連蛋白質の候補が複数同定された。以上の結果は、本手法がTNFR2指向性変異体を用いた機能解析基盤として極めて有用であることを示すものである。

今後、本研究で得られたTNFR2指向性変異体を有効活用することで、生命現象や病態におけるTNFやレセプターの機能を解明していく予定である。さらに、各疾患におけるレセプターの役割が明らかとなれば、これらレセプター指向性変異体が目的とする治療作用のみを選択的に引き出し得る、医薬価値に優れた機能性人工TNFとなる可能性も秘めており、TNFの臨床応用への道を切り拓くものと考えられる。今後、本研究で提示したレセプター指向性変異体の創出基盤とその解析手法が、次世代型創薬の進展の一翼を担うことを期待している。

### 論文審査の結果の要旨

本研究では、TNFあるいはTNFレセプターと病態の発症・悪化、さらには治癒との連関解明と、その選択的な機能制御薬 (バイオ医薬) の開発を念頭に、レセプター指向性人工TNFの創製とその有効活用を試みた。特に、自己免疫疾患等におけるTNFとTNFR1/TNFR2の機能・役割分担を解明することに資する新たな方法論の確立を目的に、ファージ表面提示法を駆使したレセプター指向性変異体の創出基盤の最適化を試み、以下の結論を得た。

- ① レセプター指向性変異体をハイスループットにスクリーニング可能な方法論として、コンペティティブパンニングを考案し、その最適化を行った。
- ② hTNFR2/mFasキメラレセプター発現細胞を樹立することで、TNFR2を介した生物活性を簡便に感度良く測定可能な評価系を新たに構築した。
- ③ 最適条件下でコンペティティブパンニングを行うことで、TNFR2を介した生物活性を完全に保持しつつ、優れたTNFR2指向性を有する機能性人工TNFを見出した。
- ④ TNFR2指向性変異体のX線結晶構造解析を通じて、レセプター選択性に重要な構造-活性相関情報に関する有益な知見を得た。
- ⑤ TNFR2指向性変異体を用いた免疫沈降法が、新たなTNFR2の細胞内シグナル伝達機構の解析基盤として有用であることを示した。

以上、本研究では、ファージ表面提示法を用いた独自の機能性人工蛋白質創出技術の最適化を通じてTNFR2指向性変異体 (R2-7) を創出するとともに、機能解析ツールとしての有用性を実証した。さらに本方法は、プロテオーム解析で絞り込まれてきた“創薬ターゲットあるいは医薬品シーズ候補の蛋白質”について、数千万種類以上もの構造変異体ライブラリを1週間以内に作製し、それら変異体のリガンド・レセプター結

合の親和性・指向性といった機能情報を迅速かつ網羅的に集積可能とするものである。これによって得られる体系的な“蛋白質の構造-活性相関情報”は、構造ゲノミクスのさらなる進展や、バイオインフォマティクスなどを利用した低分子医薬の分子設計など、創薬を指向したプロテオミクス研究を強力に推進するものと期待され、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものと考えられる。