

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05732

研究課題名(和文) 分子模倣ペプチドによる免疫疾患制御法の開発

研究課題名(英文) Regulation of immune system by mimetic peptides

研究代表者

野中 元裕 (Nonaka, Motohiro)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70514173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多くの自己免疫疾患は自己抗体が発症に関与していると考えられており、一部の自己抗体は診断にも利用されている。また、アレルギー疾患ではIgEが発症に深く関与している。本研究は、ランダム配列からなるファージライブラリーを用いて、抗体に結合する短鎖ペプチドを効率よく取得する方法の開発を行った。一方、抗体エピトープには、抗原の一次構造配列からなるものがあり、それらの情報を網羅的に解析することができれば抗体結合ペプチドを効率的に取得することができる。本研究では、臓器由来のタンパク質(cDNA)を提示するライブラリーを用いて、スクリーニングおよび次世代シーケンサーによる効率的解析法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患の一部やアレルギー疾患は体内に存在する抗体が抗原と結合することが引き金となって引き起こされる。本研究は、抗体が結合する抗原決定部位(エピトープと呼ばれる)を効率的に探索する、あるいはペプチド配列に置き換えることを目的に行った。本研究による成果は、将来的には上記疾患の診断マーカーに繋がる可能性があり、さらには液性免疫の制御法の開発に繋がる可能性があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Autoantibodies secreted from B cells in an autoimmune disease are sometimes correlated with the stage and are even associated with the onset of the disease. Such autoantibodies can be used as diagnostic markers. Immunoglobulin E is involved in the type I allergy. Using phage random peptide library, we have developed an efficient screening system for epitope mimetics against antibodies. In addition, we have established a system to obtain the epitope information directly from the autoantigen primary sequences by combining cDNA library screening and next-generation sequencing technologies.

研究分野：糖鎖生物学、生体分子化学、創薬化学

キーワード：ファージディスプレイ 自己免疫疾患 自己抗体 エピトープ

## 1. 研究開始当初の背景

これまで糖鎖は様々な疾患に関与することが明らかにされてきたが、糖鎖そのものをベースにした創薬研究は依然として難しい。それは糖鎖の生合成や化学合成、品質管理が極めて難しいからである。代表者の過去の所属研究室 (Michio N. Fukuda lab) は、この問題を回避するために、ファージディスプレイ法を利用して糖鎖をペプチドに置き換える手法を考案した。IF7 と名付けた糖鎖模倣ペプチドは、悪性腫瘍に特異的に標的する性質をもち、IF7 結合抗がん剤は低投与量でマウスの腫瘍の増殖を抑制した (S. Hatakeyama, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 19587-92, 2011)。研究代表者は、IF7 が血液-脳腫瘍関門を超え、脳腫瘍においても IF7 が抗がん剤を送達できることを見出したとともに、IF7 を超える、体内で安定かつ経口投与可能な悪性腫瘍標的ペプチドを同定した (本研究は後に M. Nonaka, *Br. J. Cancer*, 123, 1633-43 2020、M. Nonaka, *PLoS One*, 16, e0241157, 2021 にて発表した)。また、弘前大学医学研究科との共同研究にて、IF7 をホウ素製剤とコンジュゲートさせた薬剤を用いた新しい中性子捕捉療法を開発した (後に T. Yoneyama, *BMC Cancer*, 21, 72, 2021 にて発表)。

T7 ファージディスプレイ法は、T7 ファージの外殻タンパク質にランダム配列ペプチドやタンパク質を提示させ、標的分子に結合する配列を取得する技術である。代表者は、これまでファージスクリーニングで得られたクローンを一度に大量に次世代シーケンサーにかけ、提示配列を網羅的に取得する手法を構築した (科研費若手研究 B、H28-29 年度)。本手法を用いれば抗体に結合するペプチド配列を効率的に取得可能であることから、抗体が関与する疾患の原因解明や疾患そのものの制御が可能になると考えた。

自己免疫疾患は、異物の排除に関わる免疫細胞や抗体が過剰に働くことで正常な組織に損傷をきたす病気の総称である。その他、液性免疫 (抗体) が関与する疾患としては、I 型アレルギー疾患がある。I 型アレルギーでは、肥満細胞や好塩基球上の IgE 受容体に抗原 (アレルゲン) が結合・架橋するとヒスタミン等のケミカルメディエーターが分泌されることで症状が引き起こされる。そこで、これら抗体に結合するペプチド配列を取得できれば、配列特異的 (抗原特異的) に制御でき、副作用の少ない治療法の開発に繋がると考えた。特に、最近の臨床試験において B 細胞標的抗体 (rituximab 等) が全身性エリテマトーデス (SLE) や関節リウマチの患者に対して一定の有効性を示した。現状の抗体では全ての成熟 B 細胞が除去されるため、感染症等の深刻な副作用が大きな問題として残されているが、このことは、抗原情報特異的に免疫システムを制御することの重要性を支持するものである。

抗原決定基 (エピトープ) とは、抗原分子のうち抗体への結合に直接関与する部位を指す。エピトープがタンパク質の場合では、一次構造上連続したアミノ酸で構成される線状エピトープの他、連続してはいないが高次構造上で立体的に隣接する立体エピトープが存在する。さらに、エピトープになり得る分子は、タンパク質だけではなく、核酸、糖鎖、脂質、その他の修飾物などの可能性がある。以上を踏まえると、エピトープの分子に関わらず短鎖ペプチド鎖に置き換えることができれば、当該ペプチドを用いた研究を行うことが可能出ると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、喘息アレルギーモデルマウスを用いて、抗原分子の構造を模倣させたペプチドの探索法や特異性の確認を行う。その際、次世代シーケンス解析結果を元に、想定されるエピトープ上のアミノ酸の変異体を作製し、結合実験によって結合に重要なアミノ酸を決定する。また、本研究課題を進める上で、実際の抗原タンパク質情報と短鎖ペプチド情報がリンクできれば良いと考えた。そこで、短鎖ペプチドと並行して臓器由来 cDNA を T7 ファージに提示したライブラリーを作製し、次世代シーケンス解析を行う研究も開始することとした。すなわち、従来の短鎖ランダムペプチドのライブラリーとは独立して、マウス臓器由来のタンパク質提示ライブラリーの作製法を確立し、自己抗原および関連エピトープを直接同定する方法を構築する。

## 3. 研究の方法

T7 ファージディスプレイ法には、7、8、10 アミノ酸をランダム化した短鎖ペプチドライブラリー (それぞれ多様性  $>1 \times 10^8$ ) を用いた。抗原分子をコートしたウェルにライブラリーを反応させ、結合したファージに対して大腸菌 (BLT5403 株) を感染させ、この操作を数回繰り返すことでファージを増殖させた。得られたファージプールを次世代シーケンサー (iSeq 100 systems,

illumina 社) につけ、ペプチド配列を解析した。個別のクローンの結合実験には、相同性の認められたペプチド配列のうち、重要だと想定されるアミノ酸を欠失または変異させたものを使用した。細胞上への提示ペプチドの結合実験は、ファージクローンをを用いたフローサイトメトリー法で行った。決定された配列に基づいて合成ペプチドを作製し、ELISA にて結合を確認する実験を行った。

タンパク質 (cDNA) を提示するファージライブラリーの作製は、Balb/c マウスより心臓組織を回収し、mRNA を抽出、逆転写後、T7 10-3b のゲノム DNA (g10 タンパク質) の直下に挿入することで作製した。得られたライブラリーを用いて自己免疫疾患モデルマウス由来の抗体に対してスクリーニングを行った。

#### 4. 研究成果

ヒト骨髄腫細胞株 U266 細胞由来の IgE を標的として以前に得られたペプチド配列の様々な変異体を作製し、IgE との結合を確かめた。その結果、次世代シーケンス解析で上位に得られた配列の特異性を確認することができた。そこで、U266 細胞に対してファージを用いて結合実験を行ったところ、ファージの力価依存的に結合が確認されたものの、コントロールファージの場合も結合が認められ、特異性は確認できなかった。この理由として、U266 細胞では細胞上の IgE の発現が低いことが考えられた。また、以前に作製した OVA 感作喘息アレルギーマウス由来 IgE に結合するペプチドに関して、ペプチドを提示するモノクローンファージを作製し、結合実験を行ったところ、当該ペプチド配列の OVA 感作マウス由来 IgE に対する特異性を確認できた。

BALB/c マウスの心臓組織より mRNA を抽出、断片化し cDNA を作製後、T7 ファージのゲノム DNA を挿入したところ、 $6.1 \times 10^7$  の多様性からなるファージライブラリーが取得できた。次に、自己免疫性の拡張型心筋炎のモデルである BALB/c PD-1 KO マウス (H. Nishimura et al *Science*, 291, 319-22, 2001) の血清由来 IgG を用いて、スクリーニングを行った。得られたファージプールを次世代シーケンサー (iSeq 100 system) にて解析したところ、トロポニン I がヒットした。この分子は先行研究で報告されたものと同じ分子であったことから、本手法は自己抗原の解析法として妥当であると考えられた。さらなる解析の結果、トロポニン I のエピトープ領域は IT-hand domain に存在することが推定された。

研究期間全体を通しては、これまでの短鎖ペプチドによるスクリーニング法に加えて、自己抗原情報を効率的、網羅的に解析するために cDNA library を用いたスクリーニング基盤を構築することができた。自己免疫疾患モデルマウスを用いた解析から、従来知られている自己抗原がヒットしたことから、本ライブラリーおよびスクリーニングシステムの有用性が確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野中元裕
2. 発表標題 糖鎖模倣ペプチドを用いた悪性脳腫瘍治療
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------