

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06589

研究課題名（和文）抗体酵素を用いた革新的タウオパチー治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of innovative tauopathy therapeutic agents using catalytic antibodies

研究代表者

田口 博明（Taguchi, Hiroaki）

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：20549068

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：タウオパチーは、微小管結合タンパク質であるタウタンパク質が神経細胞内に多量に貯留する神経変性疾患の総称で、アルツハイマー病などが含まれる。本研究では、タウオパチーの原因物質であるタウタンパク質を加水分解する抗体酵素を誘導するための抗体酵素誘導試薬の分子設計と合成を行った。タウタンパク質の凝集、それに続く神経毒性を発現するアミノ酸配列を含む抗体酵素誘導試薬を分子設計し、固相ペプチド合成法と液相法を組み合わせることにより抗体酵素誘導試薬の合成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

効果的な治療薬がないタウオパチーの治療薬の創製を目指し、タウタンパク質を分子標的とした抗体酵素を得る誘導試薬の合成は、タウタンパク質を特異的に加水分解する抗体を作製することができる独自のアプローチであり、学術的評価は高い。また、これまで根本的治療薬がなかったタウオパチーの治療を大きく前進させることができる可能性がある。また、抗体酵素は既存の抗体医薬に比べ、投与量を大幅に減少させることができることから、抗体医薬がかかえる副作用や高額な医療費などの問題を解決することが期待されるため、社会的意義もあると考えている。

研究成果の概要（英文）：Tauopathy is a general term for neurodegenerative diseases in which a large amount of tau protein, which is a microtubule-associated protein, is stored in nerve cells, and includes Alzheimer's disease and the like. In this study, we designed and synthesized catalytic antibody-inducing reagents for generating a catalytic antibody that cleaves tau protein, which would be the causative molecule of tauopathy. We have successfully synthesized a catalytic antibody-inducing reagent by molecularly designing a catalytic antibody-inducing reagent containing the amino acid sequence that expresses tau protein aggregation and subsequent neurotoxicity, and by combining a solid-phase peptide synthesis method and a liquid phase method.

研究分野：医薬品化学

キーワード：抗体酵素 タウオパチー タウタンパク質

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省発表の認知症施策推進総合戦略(新オレンジプラン)では、我が国での認知症高齢者の数は2012年で462万人(高齢者の約7人に1人)と推計されており、2025年には約700万人(高齢者の約5人に1人)になると推測されている。認知症の約60%以上を占めると考えられているアルツハイマー病やピック病など一部の疾患は、微小管結合タンパク質であるタウタンパク質が神経細胞内に多量に貯留する神経変性疾患で、それらはタウオパチーと総称されている。研究開始当初、高齢化により患者数は急増し、治療・予防薬の開発が喫緊の課題となっていた。

研究代表者の田口は、2001年に抗体酵素の開発にリン酸ジフェニルエステル誘導体が有用であることを見だし(*J. B. C.* 2001)、その後リン酸ジフェニルエステル誘導体を含む抗原を免疫することにより抗体酵素が産生されることを見だし(*J. B. C.* 2003)。2008年には、ヒト血液中にタンパク質のアミド結合を加水分解する抗体酵素が存在することを発見し(*J. B. C.* 2008)、抗体酵素が生体防御に関与している可能性を動物実験で示した(*J. B. C.* 2015)。その後、病原性タンパク質を加水分解する多くの抗体酵素が報告され、この分野の研究が急速に展開している。

高齢者の増加に伴い、タウオパチー患者は増加の一途をたどっている。タウオパチーは患者のQOLのみならず介護者にもその影響をおよぼし、社会問題にまで発展している。しかしながら、タウオパチーの発症メカニズムははまだ解明されていない。重要な仮説の一つとして、微小管結合タンパク質であるタウタンパク質が、異常なリン酸化を受けて不溶性となり、細胞内に蓄積することが考えられている。タウオパチー治療薬としてタウタンパク質のリン酸化を阻害するリン酸化酵素阻害剤、タウタンパク質凝集阻害剤、タウタンパク質ワクチンをもちいた臨床研究が進行していた。

研究代表者は、効果的な治療薬がないタウオパチー治療薬の創製を目指し、タウを分子標的とした抗体酵素を得ることを目的とした。すなわち抗体酵素を誘導する抗原をマウスに投与することにより、タウタンパク質を特異的に加水分解する抗体の作製を行う。タウタンパク質を特異的に除去する抗体酵素が開発されれば、これまで根本的治療薬がなかったタウオパチーの治療を大きく前進させることができると考える。また、抗体酵素1分子はその触媒作用により、生体内の半減期で約数万個の病原分子を破壊することができる。その結果、既存の抗体医薬に比べ、投与量を大幅に減少させることができる。このことから、抗体医薬がかかえる副作用や高額な医療費などの問題を解決することが可能であり、社会的意義もあると考えている。

2. 研究の目的

タウオパチー治療薬の標的分子として考えられるのは、凝集体を形成し神経毒性を示すタウタンパク質である。現在、タウタンパク質を標的分子としたタウオパチー治療薬の開発は進んでいない。本研究の目的は、タウオパチーの原因物質であるタウタンパク質を加水分解する抗体酵素を作製し、タウタンパク質の凝集を抑制することによりタウオパチー治療薬へと展開するための創薬研究基盤を確立することである。タウタンパク質のリン酸化とそれに続くタウタンパク質の凝集を阻害することにより、タウタンパク質の神経毒性が抑制されることが報告されている。研究代表者は、タウタンパク質の神経毒性を抑制するために病原性タウタンパク質を破壊することを考えた。これまで標的分子を破壊する手法として放射線などが用いられてきたが、リン酸ジエステルを用いる研究代表者独自の方法で作製される抗体酵素を、病原性タウタンパク質の破壊分子として用いる(図1)。

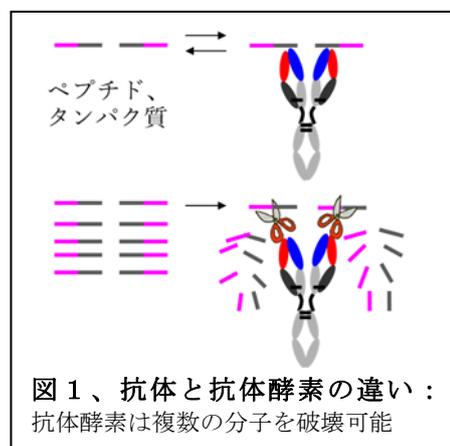


図1、抗体と抗体酵素の違い：
抗体酵素は複数の分子を破壊可能

本研究では、タウタンパク質の凝集を抑制する抗体酵素を得ることを目的とし、以下の方法①リン酸ジエステルを含む新規抗体酵素誘導抗原の合成、②免疫による抗体酵素の作製、③抗体酵素のタウタンパク質凝集抑制作用の検討、によりタウオパチー治療・予防薬へと展開するための創薬研究基盤を確立する。

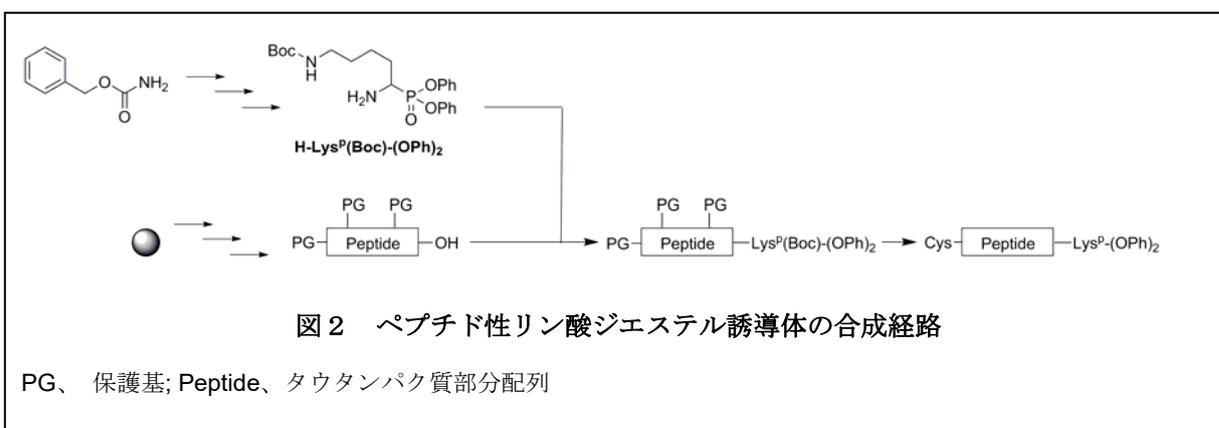
3. 研究の方法

3.1 タウタンパク質部分配列を含むペプチド性リン酸ジフェニルエステル誘導体の分子設計: タウオパチーではタウタンパク質が過剰にリン酸化され、その結果凝集体を形成し細胞内に蓄積する。タウタンパク質は441個のアミノ酸より構成され、これまで40箇所以上のリン酸化部位が報告されており、これらのうちSer 396、Ser 404のリン酸化は、病原性との関連性が深いことが報告されている。また、タウタンパク質凝集体形成においてリン酸化タンパク質同士が

相互作用するのに重要な部分であるタンパク質 294-305 や神経毒性に関与すると考えられているタンパク質の N 端部分などが標的部位として考えられる。そこで、以下の結合を加水分解できる抗体酵素を誘導可能な抗原であるペプチド性リン酸ジフェニルエステル誘導体①-③を合成する。① リン酸化タウタンパク質より C 端側約 50 残基を取り除くため、Lys 395 - Ser 396 の結合 ② リン酸化タウタンパク質同士の相互作用を阻害するため、Lys 298 - His 299 の結合 ③ リン酸化タウタンパク質より N 端側約 20 残基を取り除くため、Lys 24-Asp 25 の結合。

3. 2 タウタンパク質部分配列を含むペプチド性リン酸ジフェニルエステル誘導体の合成：

抗体酵素のタウ凝集抑制作用の最適化を図るため、ペプチド部分としてタウタンパク質 12-23、286-297、384-393 を用い、それぞれの C 末端側にリシンを模倣したリン酸ジフェニルエステル部分を導入する (図 2)。リシンを模倣したリン酸ジフェニルエステル誘導体 (H-Lys^P(Boc)-(OPh)₂) の合成は、ベンジルカルバメートを出発物質として Oleksyszyn 反応を用い合成する。保護タウタンパク質部分ペプチドの合成は、Fmoc 固相合成法により行い、得られた保護ペプチドを H-Lys^P(Boc)-(OPh)₂ と縮合する。得られたペプチド性リン酸ジフェニルエステル誘導体は、脱保護カクテルを用い保護基を除去したのち、HPLC にて精製し、目的物を得る。H-Lys^P(Boc)-(OPh)₂ は、合成工程が長く収率が低いため、必要があれば工程短縮や収率改善の条件検討を行い、最適な合成経路で H-Lys^P(Boc)-(OPh)₂ を得る。最終目的物の収率が低い場合は、保護ペプチドの精製、脱保護カクテルや脱保護条件を検討し最適な経路や条件を用いる。



3. 3 チオフラビン T を用いた凝集阻害活性測定法の確立：チオフラビン T は、タンパク質が凝集するとき形成する β シート構造と相互作用することにより蛍光を発する。この蛍光強度の増加により、タンパク質の凝集を定量的に測定することができる。この機構を利用し抗体酵素の凝集阻害活性を測定する。モデルタンパク質として種々の濃度のアミロイド β ペプチドを用い、種々の濃度のチオフラビン T を予め添加しておき、マイクロプレートリーダーを用いて経時的に蛍光強度の定量測定を行う。さらにアミロイド β ペプチドを加水分解する抗体酵素を添加して経時的に蛍光強度の定量測定を行う。

4. 研究成果

4. 1 Cys-Tau(382-294)-Lys^P(OPh)₂ の合成：Fmoc 固相合成法により得られた保護 Cys-Tau(382-294) を H-Lys^P(Boc)-(OPh)₂ と縮合し、脱保護カクテルである reagent K にて脱保護後、HPLC 分析を行った。HPLC クロマトグラム上複数のピークが見られたので、それらを単離し質量分析を行ったところ目的物を確認することができなかった。そこで目的物が得られなかった原因が、保護 Cys-Tau(382-294) の純度が低いからではないかと考え、保護 Cys-Tau(382-294) の粗生成物を HPLC にて精製した。その後、同様の反応を繰り返したが、目的物は得られなかった。脱保護後したものを詳細に分析した結果、構造決定には至らなかったが、目的物より分子量が小さい化合物が生成されていることが判明した。これは脱保護中にペプチド鎖が求核攻撃を受け、ペプチドの一部が除かれたためであると考えられる。このような副反応は、脱保護カクテルの検討により解決できることが示唆された。

4. 2 Cys-Tau(12-23)-Lys^P(OPh)₂ の合成：Fmoc 固相合成法により得られた保護 Cys-Tau(12-23) を H-Lys^P(Boc)-(OPh)₂ と縮合し、脱保護カクテルである reagent K にて脱保護後、HPLC 分析を行った。HPLC クロマトグラム上複数のピークが見られたので、それらを単離し質量分析を行ったところ目的物を確認することができなかった。4. 1 と同様に、保護 Cys-Tau(12-23) の粗生成物を HPLC にて精製した後、H-Lys^P(Boc)-(OPh)₂ と縮合し、脱保護を行った。粗生成物の HPLC 分析を行い、クロマトグラム上に現れたピークを単離した後、質量分析を行った。保持時間 28 分のピークに目的物の質量と一致する化合物 ((M+H)⁺、理論値：1709.71、実測値：1709.63) が

得られた。

4. 3 Cys-Tau(286-297)-Lys^P(OPh)₂ の合成：Fmoc 固相合成法により得られた保護 Cys-Tau(286-297)を H-Lys^P(Boc)-(OPh)₂ と縮合し、脱保護カクテルである reagent K にて脱保護後、HPLC 分析を行った。HPLC クロマトグラム上複数のピークが見られたので、それらを単離し質量分析を行ったところ目的物を確認することができなかった。4. 1 と同様に、保護 Cys-Tau(286-297)の粗生成物の精製を HPLC にて試みたが、保護 Cys-Tau(286-297)は疎水性が高いためカラムより溶出されなかった。そこで、N 末端側の保護基を除去した保護 Cys-Tau(286-297)を新たに合成することにより、HPLC を用いた保護 Cys-Tau(286-297)の精製に成功した。その後、同様の反応を繰り返したが、目的物は得られなかった。4. 1 と同様に、目的物より分子量が小さい化合物が生成されていることが判明した。

4. 4 チオフラビン T を用いた凝集阻害活性測定法の確立：本研究課題において抗体酵素の凝集阻害活性を測定するために、蛍光色素であるチオフラビン T と凝集性タンパク質のモデルとしてアミロイド β ペプチドを用い凝集測定法の条件検討を行った。チオフラビン T 濃度 5 μM、アミロイド β ペプチド濃度 25 μM、37 °C でインキュベーションすることにより蛍光強度の増強が見られ、凝集体の生成が示唆された。さらに、アミロイド β ペプチドを加水分解する抗体酵素を添加することにより蛍光強度の増強が見られなくなった (図 3)。すなわちアミロイド β ペプチドが加水分解されることにより凝集体が生成されなくなったことが示唆された。以上のことより凝集阻害活性測定法が確立された。

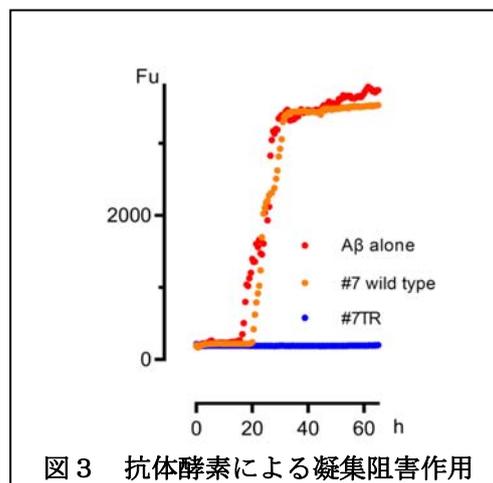


図 3 抗体酵素による凝集阻害作用

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hifumi Emi, Taguchi Hiroaki, Nonaka Tamami, Harada Takunori, Uda Taizo	4. 巻 2
2. 論文標題 Finding and characterizing a catalytic antibody light chain, H34, capable of degrading the PD-1 molecule	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 220 ~ 229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CB00155D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Emi Hifumi, Hiroaki Taguchi, Haruna Tsuda, Tetsuro Minagawa, Tamami Nonaka, and Taizo Uda	4. 巻 6
2. 論文標題 A new algorithm to convert a normal antibody into the corresponding catalytic antibody	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Adv.	6. 最初と最後の頁 6441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aay6441	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ryu Tashiro, Hiroaki Taguchi, Kumi Hidaka, Masayuki Endo, Hiroshi Sugiyama	4. 巻 14
2. 論文標題 Effects of Physical Damage in the Intermediate Phase on the Progression of Amyloid Fibrillization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem. Asian J.	6. 最初と最後の頁 4140-4145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.201901193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hiroaki Taguchi ¹ , Yuki Kato, Taminao Ito, Emi Hifumi, and Taizo Uda	4. 巻 56
2. 論文標題 Discovery of Antibody Light Chains Possessing Tau Protein-Hydrolyzing Activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Peptide science	6. 最初と最後の頁 139-140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroaki Taguchi, Iida Yuki, Mao Oba, Yoshio Fujita, Emi Hifumi, Taizo Uda	4. 巻 55
2. 論文標題 Discovery of Antibody Light Chains Capable of Hydrolyzing Tau Protein Using Fluorescence-Quenched Substrate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peptide science 2018	6. 最初と最後の頁 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Emi Hifumi, Hiroaki Taguchi, Eiichi Toorisaka, Taizo Uda	4. 巻 1
2. 論文標題 New technologies to introduce a catalytic function into antibodies: A unique human catalytic antibody light chain showing degradation of amyloid molecule along with the peptidase activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB BioAdvances	6. 最初と最後の頁 93-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fba.1025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uchida R, Egawa T, Fujita Y, Furuta K, Taguchi H, Tanaka S, Nishida K	4. 巻 105
2. 論文標題 Identification of the minimal region of peptide derived from ADP-ribosylation factor1 (ARF1) that inhibits IgE-mediated mast cell activation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Immunol.	6. 最初と最後の頁 32-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molimm.2018.11.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 田口 博明、伊藤 民直、加藤 佑規、一二三 恵美、宇田 泰三
2. 発表標題 Discovery of Antibody Light Chains Possessing Tau Protein-Hydrolyzing Activity
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口 博明、伊藤 民直、加藤 佑規、一三三 恵美、宇田 泰三
2. 発表標題 タウタンパク質を加水分解する抗体酵素の開発
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口 博明、伊藤 民直、加藤 佑規、一三三 恵美、宇田 泰三
2. 発表標題 タウタンパク質のリピート2部分を加水分解する抗体酵素の開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroaki Taguchi, Iida Yuki, Mao Oba, Yoshio Fujita, Emi Hifumi, Taizo Uda
2. 発表標題 Discovery of Antibody Light Chains Capable of Hydrolyzing Tau Protein Using Fluorescence-Quenched Substrate
3. 学会等名 10th international peptide symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田代 竜、田口 博明、日高 久美、遠藤 政幸、杉山 弘
2. 発表標題 アミロイド 1-42プロトフィブリルの伸長のリアルタイム観測
3. 学会等名 日本薬学会東海支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryu Tashiro, Hiroaki Taguchi, Kumi Hidaka, Masayuki Endo, Hiroshi Sugiyama
2. 発表標題 Observation of growing amyloid protofibrils 2D network with high speed AFM
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taizo Uda, Hiroaki Taguchi, Emi Hifumi,
2. 発表標題 Unique antigenases to enzymatically cleave Tau peptide at C- and N-terminal moiety
3. 学会等名 The 12th ECCE(European Congress of Chemical Engineering) & 5th ECAB(European Congress of Applied Biotechnology) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇田 泰三、田口 博明、一二三 恵美
2. 発表標題 Tauペプチドを分解するヒト型抗体軽鎖
3. 学会等名 第99回春季日本化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇田 泰三、田口 博明、一二三 恵美
2. 発表標題 2種類の抗原 (Tau&A)を同時に分解する2機能型抗体酵素の作製と性質
3. 学会等名 第100回春季日本化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田口博明、一二三恵美、宇田泰三
2. 発表標題 アミロイド ペプチドを加水分解する 抗体酵素の開発
3. 学会等名 第40回日本認知症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水谷百恵、一二三恵美、宇田泰三、田口博明
2. 発表標題 Inhibition of amyloid-beta aggregation by catalytic light chain antibodies
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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
連携研究者	堤 智斉 (Tsutsumi Tomonari) (40273370)	鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授 (34104)	

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
---------	---------