

京都大学	博士（薬科学）	氏名	青木 啓輔
論文題目	Synthetic Studies of Therapeutic Targets and Their Application to the Development of Mirror-Image Single-Domain Antibodies （治療標的タンパク質の化学合成研究と鏡像単ドメイン抗体の開発への応用）		

（論文内容の要旨）

生物のタンパク質を構成するアミノ酸は L 型であり、DNA を構成する糖は D 型である。このように、生体関連分子の多くは一方の鏡像異性体のみが存在する。一方で、自然界に存在しない鏡像分子は化学合成によりアクセス可能であり、天然に存在する化合物とは異なる特性を有することから、医薬品としての活用が期待できる。鏡像分子からの医薬品シーズ探索は、化学合成した標的分子の鏡像体（D-Target）

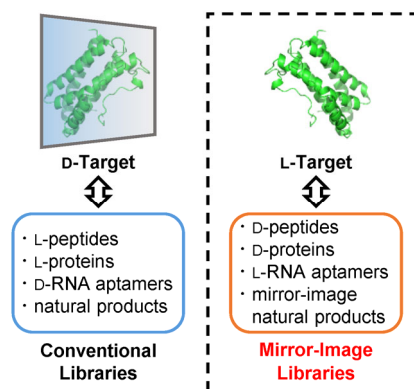


Figure 1. Concept of Mirror-Image Screening.

に対して、容易に入手可能な化合物ライブラリーを作用させる鏡像スクリーニング法によって可能である（Figure 1）。著者は、抗体フラグメントの鏡像体をリソースとした医薬品シーズ探索と標的タンパク質の化学合成を通じて、創薬分野における鏡像スクリーニング法の適用範囲の拡張に向けた検討を行った。

第一章：鏡像単ドメイン抗体の探索に向けたスクリーニング系の開発と応用

抗体医薬などのタンパク質製剤の臨床応用や開発過程では、投与したタンパク質製剤に対する抗体（抗薬物抗体）の産生によって薬効の減弱や副作用を誘発する免疫原性を考慮する必要がある。一方、鏡像体タンパク質はプロテアーゼ耐性を有することから、免疫細胞中でのタンパク質の断片化が起こりづらく、免疫原性が低いことが期待される。著者は、抗体の結合能を維持する最小ドメインである VHH 抗体の鏡像体（鏡像 VHH 抗体）が、標的への高い特異性・親和性と低い免疫原性を両立した新たな医薬品モダリティになると期待し、鏡像 VHH 抗体の探索プロセスの構築と医薬品候補化合物の取得に向けた検討を行った。

第一章第一節：鏡像 VHH 抗体の化学合成プロセスの確立と免疫原性評価

VHH 抗体（約 120 残基）の鏡像体タンパク質の化学合成プロセスを検討し、抗原認識に最も重要な C 末端側の相補性決定領域（CDR3）を含むセグメントを最後に連結する効率的な合成ルートを確認した。鏡像 VHH 抗体のマウスへの投与では抗薬物抗体の産生がほとんど誘発されず、医薬品への応用を見据えた際

の鏡像 VHH 抗体の優位性を明らかにした。

第一章第二節：血管内皮増殖因子に対する鏡像 VHH 抗体の探索

鏡像 VHH 抗体の探索プロセスの構築を目的として、相補性決定領域の一部をランダム化した VHH 抗体の配列を提示するライブラリー（VHH 抗体ライブラリー）を T7 ファージ上に作製した。加齢黄斑変性症などの治療標的である血管内皮増殖因子（VEGF）の鏡像体（鏡像 VEGF）に対して VHH 抗体ライブラリーを作用させ、鏡像 VEGF に対して選択的に結合するヒット VHH 抗体の配列情報を同定した。続いて、化学合成により取得したヒット VHH 抗体の鏡像体が、VEGF（天然型）に選択的に結合することを確認した。この鏡像 VHH 抗体を投与したマウスでは抗薬物抗体の産生が認められず、得られた鏡像 VHH 抗体が十分な標的結合能と低免疫原性を両立した分子であることを実証した。

第二章：鏡像分子の探索を指向した治療標的タンパク質の化学合成研究

鏡像スクリーニング法による鏡像分子の探索には、標的分子の鏡像体タンパク質の調製が不可欠である。著者は、鏡像分子の探索範囲の拡大を目指して、これまでに報告例のない 2 種類の治療標的タンパク質の化学合成プロセスについて検討した。

第二章第一節：B 型肝炎ウイルス全長コアタンパク質の化学合成とカプシド形成

鏡像体化合物群をリソースとした B 型肝炎治療薬の探索を目指して、B 型肝炎ウイルス全長コアタンパク質の鏡像体の化学合成に向けた検討を行った。4 つのペプチドセグメントを C 末端側から連結する経路により、コアタンパク質全長（183 残基）を化学合成するプロセスを構築した。また、化学合成により取得したコアタンパク質からカプシド様粒子を構築する条件を確立した。

第二章第二節：インターロイキン 6 の化学合成と鏡像 VHH 抗体探索への応用

炎症性疾患や自己免疫疾患に対する標的分子であるインターロイキン 6 (IL-6) の鏡像体（鏡像 IL-6）の化学合成と鏡像 VHH 抗体の探索に向けたスクリーニングについて検討した。IL-6 の全長配列（183 残基）を 6 つのペプチドセグメントに分割し、N 末端側から順次連結することで、IL-6 とその鏡像体を化学合成した。IL-6 結合ペプチドとの結合試験により、鏡像 IL-6 が立体選択的な分子認識を示すことを実証し、鏡像スクリーニング法に利用可能であることを明らかにした。また、得られた鏡像 IL-6 を利用して VHH 抗体ライブラリーを用いた探索を実施し、鏡像 IL-6 との結合に重要な相補性決定領域の配列を同定した。

上記の研究により、抗体フラグメントの鏡像体タンパク質が優れた特性を有する医薬品探索のリソースとして利用可能であることを実証するとともに、鏡像スクリーニング法に利用可能な標的分子の増大に貢献した。

(論文審査の結果の要旨)

本博士論文は、鏡像タンパク質の合成と探索研究について述べている。近年の創薬研究において、タンパク質やペプチドが有用な医薬品モダリティとして利用されているが、生体内の不安定性に由来する免疫原性などの様々な問題点を有している。そこで著者は、鏡像タンパク質を創薬に利用することに着目し、鏡像体の抗体フラグメントの取得を目的とした医薬品シーズ探索と、そのために必要となる標的タンパク質の化学合成研究を実施した。

第一章では、鏡像単ドメイン抗体 (VHH 抗体) の化学合成プロセスの確立と免疫原性評価について述べている。第一節では、抗原認識において最も重要な C 末端側の相補性決定領域フラグメントを合成終盤で連結する NCL 法により、約 120 残基の VHH 抗体およびその鏡像体の合成を行った。さらに、鏡像 VHH 抗体のマウス投与実験により、鏡像 VHH 抗体からは抗薬物抗体がほとんど産生されないことを確認し、医薬品として高い潜在特性を有することを示した。引き続き第二節においては、VEGF を標的とした鏡像 VHH 抗体の探索研究を実施した。相補性決定領域の一部をランダム化した VHH 抗体の配列を提示するライブラリーを T7 フェージ上に作成し、化学合成した鏡像 VEGF に対して選択的に結合する VHH 抗体を 3 種見出した。引き続き、高い結合親和性を有するヒット VHH 抗体の鏡像体を化学合成し、これが天然型 VEGF に選択的に結合することを確認した。

第二章では、鏡像分子の探索を指向した治療標的タンパク質の化学合成を行った。第一節では、183 残基の B 型肝炎ウイルス全長コアタンパク質の化学合成とフォールディングに成功し、カプシド様粒子が構築されていることを確認した。第二節においては、6 つのフラグメントを NCL によって順次連結することによって、183 残基の IL-6 およびその鏡像体を化学合成することに成功した。さらに、得られた鏡像 IL-6 に対して VHH 抗体ライブラリーを作用させることで、合成した鏡像 IL-6 が VHH 抗体の鏡像スクリーニングに利用可能であることを示した。さらに、鏡像 IL-6 との結合に重要な相補性決定領域の配列を同定した。

以上の研究成果は、鏡像 VHH 抗体が優れた医薬品モダリティとなる可能性を示しただけでなく、鏡像スクリーニング法に利用できるタンパク質の適用範囲の大幅な拡大に貢献するものであるため、本論文を博士 (薬科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 6 年 2 月 16 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日：2024年6月24日以降