

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)	氏名	大田 哲也
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 ①・② 項該当		
論文題目			
<p>Interaction mechanisms of small unilamellar vesicle and monoclonal antibody targeting to oxidized LDL receptor protein LOX-1</p> <p>(酸化 LDL 受容体タンパク質 LOX-1 を標的にする小型単層ベシクルおよびモノクローナル抗体の相互作用メカニズム)</p>			
論文審査担当者			
主 査	教 授	楯 真一	
審査委員	教 授	泉 俊輔	
審査委員	教 授	中田 聡	
審査委員	准教授	富樫 祐一	
〔論文審査の要旨〕			
<p>大田氏は、動脈硬化発症の原因物質である血液中の酸化 LDL を血管内皮細胞上で感受する受容体 LOX-1 を標的した創薬を目指す分子化学的研究をテーマとして、以下の 2 つの項目の研究を実施した。</p>			
<p>1) 動脈硬化病巣にある血管内皮細胞に対し特異的に薬物を輸送する分子デバイスの構築</p> <p>2) 酸化 LDL 受容体としての LOX-1 が持つ機能を阻害する抗体の機構解明</p>			
<p>以下、各研究項目における成果の概略を記す。</p>			
<p>1. 動脈硬化病巣にある血管内皮細胞に対し特異的に薬物を輸送する分子デバイスの構築</p> <p>酸化 LDL 受容体 LOX-1 は、正常な血管内皮細胞上には、わずかしか発現していない膜タンパク質である。血液中で生成する酸化 LDL が細胞膜上の LOX-1 に結合すると、酸化 LDL は細胞内に輸送され、エンドソーム中で分解されることにより内皮細胞に対して機能障害(dysfunction)を誘導する。機能障害を誘導された内皮細胞は LOX-1 の発現を誘導し細胞膜上における LOX-1 の存在量を増やす。細胞膜上に大量に発現した LOX-1 は、細胞膜上でクラスターを形成することにより酸化 LDL に対してさらに高い親和性を獲得する。この結果、機能不全状態にある血管内皮細胞は血液中にある酸化 LDL を強力に取り除く機能を獲得する。血液中から回収された酸化 LDL は、血管壁中でマクロファージに取り込まれるが、マクロファージ中では分解されずに蓄積するために泡沫細胞(foam cell)となり血管壁中に集積してコブ状の病巣 (plaque) を形成するために動脈硬化が発症する。すなわち、血管内皮細胞上で LOX-1 クラスターが形成されることが動脈硬化発症を促進する分岐点となる。</p> <p>上記の研究背景をもとに本研究では、細胞膜上に LOX-1 クラスターを持つ機能不全</p>			

状態にある細胞に特異的に結合する分子デバイスを開発し、さらなる酸化 LDL 取り込みによる動脈硬化症進展を抑制すると同時に、機能不全状態にある細胞に対して選択的な薬物輸送の実現を目指した。

表面プラズモン共鳴センサー上に分子配向を揃えてクラスター化した LOX-1 を調製した。これにより、細胞膜上で形成される LOX-1 クラスターに対して最適な結合活性を示す分子デザインを探索した。その結果、脂質 DOPG を用いて調製した 70 nm の直径を持つ単層膜リポソームが目的とする性質を持つことを見いだした。実際に培養細胞を使った実験により、この DOPG リポソームは、アセチル化 LDL (酸化 LDL の安定種モデル分子) が 150 倍多く存在する条件下でも LOX-1 クラスターを持つ細胞に取り込まれることを確認した。

上記の研究を通して、簡便に調製可能な 70 nm の直径を持つ DOPG リポソームが、酸化 LDL よりも 20 倍強い LOX-1 クラスターに対する結合活性をもち、そのため機能不全状態にある細胞に対して選択的に結合する活性をもつことを示した。さらに、DOPG リポソームは、機能不全状態にある細胞中に効率的に取り込まれることを示した。以上の研究結果から、DOPG リポソームは、動脈硬化症治療に利用可能な選択的なドラッグデリバリーを実現するキャリアー分子になることが示された。

2. 酸化 LDL 受容体としての LOX-1 が持つ機能を阻害する抗体の機構解明

広島大学・生物生産学部・古澤らによって開発されたニワトリ由来の LOX-1 抗体 (HUC52) は高い LOX-1 結合能をもち、動脈硬化の進展阻害活性をもつ有望な生物製剤として注目されている。大田氏は、HUC52 の抗原認識部位に形成されるジスルフィド結合の役割に注目して、HUC52 抗体と LOX-1 の相互作用様式を *in silico* で解析した。その結果、HUC52 の抗原認識部位にあるループ部位が、ジスルフィド結合形成により特定の構造に固定されることが、LOX-1 の酸化 LDL 結合表面を構成するアミノ酸側鎖を認識して、酸化 LDL の結合を阻害する機構を明らかにした。ニワトリ由来の抗体に特徴的なジスルフィド結合をもつ基質認識ループ構造が、HUC52 の高い LOX-1 認識能に関わることを明らかにした。

大田氏は、武田薬品工業・光工場 (山口県) に勤務しており、工場では抗体製造に関わっている。LOX-1 を標的とした分子デバイス開発研究と HUC52 抗体の LOX-1 分子認識機構の解明は、企業における大田氏の仕事とは切り離れたテーマとして、社会人学生として研究を進めた。大田氏が博士課程で行った研究は、研究室で積み上げてきた LOX-1 の構造生物学的研究成果を、創薬という応用研究につなげる上で重要な足がかりとなる。企業人としての視点を生かした個性的な研究成果であると評価できる。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士 (理学) の学位を授与される十分な資格があるものと認める。

公表論文

1. DOPG small unilamellar vesicles function as nano-carriers targeting the clustered lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1) on the cell surface
Ohta,T., Yamada,R., Fujita,S., Takahata,T., Shiba,K., Machida,S., and Tate,S.
J. Drug. Deliv. Sci. Technol. 51, 327-336 (2019).

参考論文

1. Study on an inactivation evaluation method of cleaning processes for biopharmaceuticals
Kaminagayoshi,T., Takenaka,K., Ohta,T., Doi,T., Sadamitsu, M., Omori,S., Tsuji,S., Miko,Y., Shirokizawa,O., and Walsh,A.
Biopharm International 31, 22-28 (2018).