

「博士論文」合否査定資料

申請者 同志社女子大学大学院 薬学研究科医療薬学専攻
職・氏名 西原 冴佳

学位の名称 博士（薬学）

論文名 非メチル化 CpG DNA による自然免疫応答を増強する抗菌
ペプチドに関する研究

審査委員 主 査 前川 京子

副 査 藤井 健志

副 査 川崎 清史

審査結果 合

博士学位論文審査結果報告書

2022年

1月

20日

学位申請者	西原冨佳	
審査委員	主査	前川京子 
	副査	藤井健志 
	副査	川崎清史 

本学大学院薬学研究科医療薬学専攻在学中の西原冨佳氏から必要書類を添えて博士学位論文「非メチル化 CpG DNA による自然免疫応答を増強する抗菌ペプチドに関する研究」が提出された。論文の提出を受けて、主査として前川京子教授、副査として藤井健志教授と川崎清史教授の3名の審査委員を選出した。前川教授と藤井教授は論文内容に合致する専門性から、川崎教授は西原氏の指導教授として選出された。そして本研究科では1月13日に公開で博士論文発表会を開催した。各委員は発表会での発表内容と議論を踏まえて論文を査読し、個別に申請者に試問を行った。論文は非メチル化 CpGDNA による自然免疫応答を抗菌ペプチドが増強する機構に関するものである。本研究では刺激増強作用を有する抗菌ペプチドを新たに発見したうえでその作用機構を解析することにより、増強作用に必要な抗菌ペプチドの性質とその作用機序を明らかにしている。本研究成果は、新しい医薬品開発につながる基礎研究として非常に価値のあるものと判断された。さらに、申請者は重要な研究成果を挙げたことに加えて、その成果について発展的な議論ができる点で、研究者として大変に優れた資質を備えていると評価できた。審査過程を通じて審査委員は申請者の研究科での研究活動がディプロマポリシー（学位授与の方針）の各基準を満たしていることを確認した。そして、提出論文の水準が研究科で定めた「学位論文審査基準」の評価項目を十分に満たすものであることを確認した。

従って、審査委員は全員一致して西原冨佳氏に対して博士（薬学）の学位を授与することが相応しいと判断した。

博士学位論文審査結果要旨

2022年

1月

20日

学位申請者	西原冨佳	
審査委員	主査	前川京子 
	副査	藤井健志 
	副査	川崎清史 
論文題名	非メチル化 CpG DNA による自然免疫応答を増強する抗菌ペプチドに関する研究	
(要旨)	<p>本論文はまず「第1章 研究の背景と目的」において研究全体の背景と目的を丁寧に解説している。先行研究の状況、未解明の課題、そして本研究の新規性が本章により十分に理解できるものとなっている。引き続き「第2章 実験材料と方法」では研究に利用した試薬や実験条件等が詳細かつ適切に記述されていた。そして「第3章 結果」ではまず第1節で抗菌ペプチド Kn2-7 に非メチル化 CpGDNA 刺激の増強作用があること、その増強作用にはペプチドの DNA 細胞内取り込み増加作用が必要ではあるがその作用だけでは増強に十分ではないことが記述されていた。第2節では Kn2-7 と CpGDNA との結合が増強作用に必要なことと、その結合にペプチドの塩基性アミノ酸が重要な役割を果たすことが示されていた。第3節では CpGDNA 刺激の増強作用にはペプチドの両親媒性が重要であることが示されていた。第4節では Kn2-7 による CpGDNA 刺激の増強に関わる細胞内シグナル伝達系の解析結果が記述されており、TLR9 刺激伝達全体が増強されるのではなくて p38 リン酸化を含む特定のシグナルが増強されている可能性が示された。「第4章 考察」では第3章の結果に基づき「細胞膜透過性ペプチドとしての Kn2-7」、</p>	

「Kn2-7による CpGDNA の高次構造化」、「ペプチド両親媒性の CpGDNA 認識応答増強作用への関与」、「Kn2-7による CpGDNA 認識応答増強メカニズム」、そして「本研究の臨床応用への展望」がそれぞれの項目ごとに実験結果に基づき丁寧に考察されると同時に、将来展望も含めて論述されていた。続く「第5章 総括」では本論文で行われた研究結果のまとめが簡潔に書かれている。ここまでの内容から本研究論文が学術的に新規性を有しかつ独創性の高いものであることが十分に理解できた。また、薬学分野においてインパクトのある研究であると判断できた。そして「論文目録」では本研究成果の一部が *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2020) vol.530, p100-106、および *BPB Reports* (2021) Vol.4, p55-58 に西原氏が筆頭著者の英文学術論文としてすでに発表されていることが示されていた。「参考文献」では内外の関連する学術論文75報が適切に引用されていた。図は23枚あり、実験結果等がわかりやすく適切に示されていた。さらに、以上の論文内容は研究発表会での議論と口頭試問での議論を通じて適切性が確認された。このように、本論文は全体を通じて丁寧に研究成果が論述されていること、学術的に新規性を有すると同時に独創性の高いものであること、結論を導く実験手法が適切であること、結果に再現性があること及び結果の解釈が適切であること、そして結果の考察が十分に深くなされていること、が確認できた。

以上の審査結果から、審査委員は全員一致で、本論文が博士論文の水準に十分達していると結論した。

博士学位論文要旨

2022 年 1 月 6 日

学位申請者名 西原 冨佳

論文題目：

非メチル化 CpG DNA による自然免疫応答を増強する抗菌ペプチドに関する研究

【背景・目的】

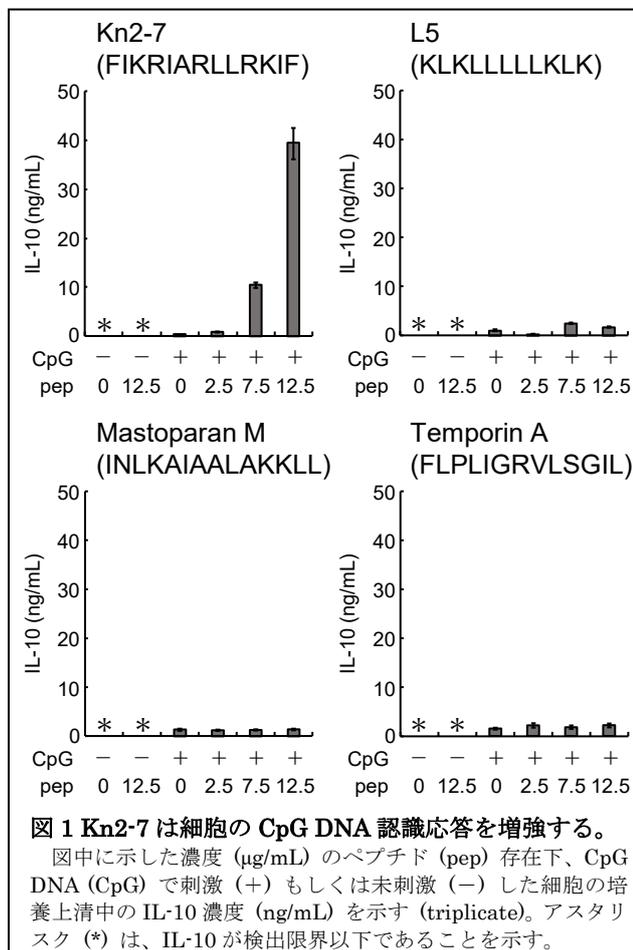
マクロファージなどの自然免疫細胞は、Toll 様受容体 (Toll like receptor, TLR) などのパターン認識受容体を介して病原体に特有の構造を認識することで炎症応答などを誘導し、感染初期の生体防御に働く。パターン認識受容体のうち、細胞内のエンドソーム/リソソームに局在する TLR9 は、細菌やウイルスに特有の非メチル化シトシングアニン配列を有する 1 本鎖 DNA (CpG DNA) を認識することで自然免疫応答を誘導する。自然免疫の活性化はワクチンの効果発現に必須であることから、ワクチンの免疫原性を強めるアジュバントとして CpG DNA の利用が試みられている。さらに CpG DNA は、Th1 優位の細胞性免疫応答や細胞傷害性 T 細胞の活性化を誘導することから、抗腫瘍薬や抗アレルギー薬としての利用が期待されている。このように、医薬品開発における CpG DNA の有用性は多岐にわたる。したがって、CpG DNA による免疫応答を増強する物質の発見や、その調節メカニズムの解明は、薬学領域において非常に重要な課題である。

抗菌ペプチドもまた、自然免疫において重要な因子の 1 つである。抗菌ペプチドはそのアミノ酸配列による正電荷領域や疎水性領域、二次構造などの性質に基づいて殺菌作用を示し、広い範囲の微生物に作用する。そして、一部の抗菌ペプチドは殺菌作用だけでなく、免疫担当細胞の核酸認識応答を増強したり、グラム陰性菌成分のリポ多糖による炎症応答を中和したりするなど、宿主の自然免疫応答を調節する作用が知られている。このうち、核酸認識応答の増強については、増強作用を有するペプチドの特徴や、その作用機序については不明な点が多く残されている。これらを明らかにすることで、抗菌ペプチドを感染症治療薬としてだけでなく、CpG DNA による自然免疫応答を増強する補助剤として、がんやアレルギーなどの治療薬の開発やワクチンアジュバントの創生に、応用できるようになる。そこで本研究では、CpG DNA 認識応答を増強する抗菌ペプチドを探索し、増強作用を示すペプチドの性質、およびその作用メカニズムを明らかにすることを目的として解析を行った。

【結果・考察】

1. 抗菌ペプチド Kn2-7 の CpG DNA 認識応答増強作用と、CpG DNA 細胞内取り込み増加作用の解析

α -ヘリックス構造をとる4種の抗菌ペプチド Kn2-7、L5、Mastoparan M ならびに Temporin A が細胞の CpG DNA 認識応答を増強するかを、マウスマクロファージ様培養細胞株 RAW264.7 からの IL-10 分泌量の増加を指標として解析した。その結果、Kn2-7 は細胞の CpG DNA 認識応答を顕著に増強することがわかった (図 1)。一方、L5、Mastoparan M ならびに Temporin A ではその増強がほとんど認められなかった (図 1)。Kn2-7 に CpG DNA 認識応答増強作用があることがわかったため、その増強メカニズムを詳しく調べた。CpG DNA は細胞内に局在する TLR9 に認識されるので、CpG DNA の細胞内への取り込み増加が、細胞応答の増強にとって重要なステップの1つだと考えられる。そこで、蛍光標識 CpG DNA の細胞内取り込みに対する Kn2-7 の効果を共焦点顕微鏡とフロー



サイトメトリーで解析したところ、Kn2-7 は CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させることがわかった。次に、Kn2-7 による CpG DNA の細胞内への取り込み増加が、CpG DNA 認識応答の増強に関与するかを調べた。ペプチドの細胞内移行性にはその配列中の Arg 残基が重要なことが知られている。このペプチドの細胞内移行性が CpG DNA 細胞内取り込み増加作用に関わると考えて、Arg に着目して Kn2-7 の配列を改変した。Kn2-7 の Arg を Ala に置換した Kn2-7RA の CpG DNA 細胞内取り込み増加作用は Kn2-7 と比べて弱く、Kn2-7 の Lys を Arg に置換した Kn2-7KR の CpG DNA 細胞内取り込み増加作用は Kn2-7 と比べて強かった。そこで、これら改変ペプチドの CpG DNA 認識応答増強作用を解析したところ、増強作用は Kn2-7 と比べて Kn2-7RA は弱く、Kn2-7KR は強かった。したがって、Kn2-7 による細胞の CpG DNA 認識応答の増強には、Kn2-7 の CpG DNA 細胞内取り込み増加作用が関与することが明らかとなった。一方、すべて D-アミノ酸で合成した Kn2-7 (D-Kn2-7) は、Kn2-7 と同様に細胞内への CpG DNA の取り込みを増加させる作用があるが、CpG DNA 認識応答は増強しなかった。このことから、Kn2-7 による細胞の CpG DNA 認識応答の増強に

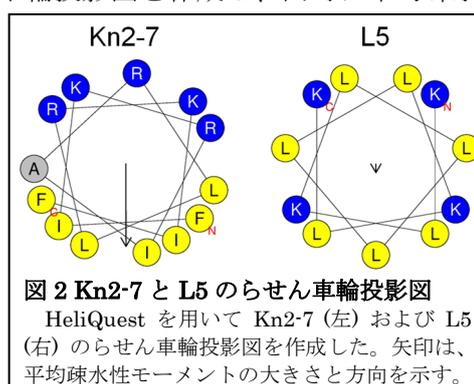
は、CpG DNA の細胞内取り込み増加作用が必須だが、それだけでは不十分で、その他の性質や作用が関与する可能性が考えられた。

2. Kn2-7 と CpG DNA の結合親和性の解析

Kn2-7 が CpG DNA の細胞内への取り込みを増加させたのは、Kn2-7 が CpG DNA と結合し、その複合体が細胞内に取り込まれたためだと考えられる。しかしながら、Kn2-7 の CpG DNA との結合親和性と、CpG DNA 細胞内取り込み増加作用との関係が不明である。そこで、Kn2-7 およびその改変ペプチドの CpG DNA との結合親和性を解析した。その結果、CpG DNA との結合親和性は Kn2-7 と比べて Kn2-7RA の方が小さく、Kn2-7KR の方が大きかった。これらのペプチドの CpG DNA との結合親和性は、上述した CpG DNA 細胞内取り込み増加作用と比例していた。このことから、Kn2-7 による CpG DNA の細胞内への取り込み増加には CpG DNA との結合親和性が重要であり、その結合には Kn2-7 の塩基性アミノ酸が関与すると考えられた。一方、Kn2-7 の Leu を Ala に置換した Kn2-7LA は Kn2-7 と同程度の CpG DNA との結合親和性を示したが、CpG DNA の取り込みを増加させなかった。これらのことから、Kn2-7 による CpG DNA の細胞内への取り込み増加には、Kn2-7 の塩基性アミノ酸による CpG DNA との結合親和性と、疎水性アミノ酸による細胞膜透過性が重要であると考えられた。

3. Kn2-7 の両親媒性と CpG DNA 認識応答増強作用の解析

L5 は CpG DNA の細胞内への取り込みを Kn2-7 と同程度増加させる作用があるが、CpG DNA 認識応答を増強しない。一方、Kn2-7 は CpG DNA の細胞内への取り込み増加に比例して CpG DNA 認識応答を増強する。Kn2-7 と L5 は共に α -ヘリックス構造をとるので、ペプチドをヘリックスの中心軸から見下ろしたらせん車輪投影図を作成し、同時に平均疎水性モーメントを算出してその両親媒性を予測したところ、Kn2-7 は両親媒性が高いが L5 は両親媒性が低いと考えられた (図 2)。そこで、ペプチドの両親媒性が細胞の CpG DNA 認識応答の増強に関与する可能性を考え、Kn2-7 および L5 のアミノ酸組成は変化させずに、一部のアミノ酸を入れ替えてそれぞれの両親媒性を变化させたペプチドの CpG DNA 認識応答増強作用を調べた。その結果、Kn2-7 の両親媒性を低下させたペプチドは CpG DNA 認識応答を増強しなかった。一方、L5 の両親媒性を上昇させたペプチドは、CpG DNA 認識応答を顕著に増強した。このことから、 α -ヘリックスペプチドの両親媒性が、細胞の CpG DNA 認識応答の増強にとって重要な性質であり、その機序は不明だが細胞の CpG DNA 刺激応答に何らかの作用をもたらす可能性が考えられた。

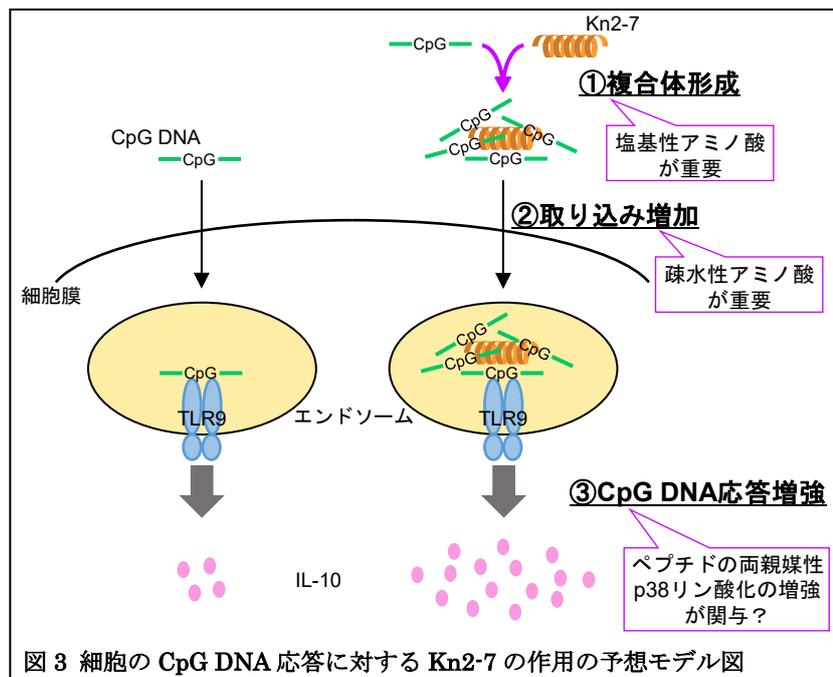


4. Kn2-7による CpG DNA 認識応答の増強に関わる細胞内シグナル分子の解析

TLR9がCpG DNAを認識すると、転写因子NF-κBの活性化やMAPKsのリン酸化を介して細胞のサイトカイン分泌が誘導される。そこで、CpG DNA刺激による細胞のNF-κB活性化やMAPKsリン酸化に対する、Kn2-7の効果を解析した。NF-κB活性化をゲルシフトアッセイにより評価したところ、CpG DNA刺激による細胞のNF-κB活性化は、Kn2-7により増強されなかった。また、ウェスタンブロットにより、3つの主なMAPKs(p38、JNK、ERK)のリン酸化タンパク質を検出したところ、Kn2-7はCpG DNA刺激による細胞のp38リン酸化を増強するが、JNKおよびERKのリン酸化には大きな影響を与えないことがわかった。これらの結果から、Kn2-7はCpG DNA刺激により活性化されるシグナル伝達を全体的に増強するのではなく、p38リン酸化を含む特定のシグナルを選択的に増強すると考えられた。

【結論】

本研究において、抗菌ペプチドKn2-7が細胞のCpG DNA認識応答を顕著に増強すること、そしてその増強にはKn2-7のCpG DNA細胞内取り込み増加作用が関与することを見出した。ペプチドの性質解析により、Kn2-7によるCpG DNAの細胞内取り込み増加には、CpG DNAとの結合親和性が重要であり、その結合にはKn2-7の塩基性アミノ



酸が関与することがわかった(図3①)。また、Kn2-7と結合した後のCpG DNA取り込み増加には、Kn2-7の疎水性アミノ酸が重要であることが示された(図3②)。一方、Kn2-7によるCpG DNA認識応答の増強には、CpG DNAの取り込み増加以外のKn2-7の性質や作用が関与することも明らかとなり、そのような性質の1つとしてペプチドの両親媒性の関与が示唆された(図3③)。さらに、Kn2-7がCpG DNA刺激により活性化されるシグナル伝達を全体的に増強するのではなく、p38リン酸化を含む特定のシグナルを選択的に増強したことも、Kn2-7によるCpG DNA認識応答増強メカニズムを明らかにする上で重要な手がかりになると考えられた(図3③)。

試問結果の要旨

2022年 1月 20日

学位申請者	西原冨佳	
審査委員	主査	前川京子 
	副査	藤井健志 
	副査	川崎清史 
(要旨)		
<p>公開で行われた博士論文発表会、および審査委員（主査・副査）による面談において、申請者に対して試問が行われた。その結果、申請者の研究の新規性、独自性、そして薬学上の価値を確認できた。さらに薬学上の見識を備えた人物であることが確認でき、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしい人物であると判断できた。以下に試問の主なやりとりをまとめる。</p> <ol style="list-style-type: none">1. CpGDNA の刺激増強は自己免疫疾患につながるか？→可能性はある。しかし、そもそもワクチン接種等はそのリスクよりもメリットがある場合に行われるものである。増強機構の解明はリスクの低減につながるものでもあると思う。2. Kn2-7 は細胞内に入って作用するのか。TLR9 を結合した状態で刺激するのか→証明はないが、CpGDNA と結合した状態で細胞内に入ると思う。TLR9 への刺激に結合が影響するかは不明3. 抗菌ペプチドが多量体化して細胞に何らかの影響を与えていないか→抗菌活性の点では哺乳動物細胞に影響を与えない濃度で実験を行っている4. RNA ワクチン等の他の核酸にペプチドは効果があるか→調べていないが、研究成果は役立つと期待している5. IL-10 は免疫抑制性のサイトカインであり、NF-κB は転写調節に関与していないのか→CpGDNA の刺激増強強化がもっともよく検出できるマーカーとして IL-10 分泌を指標とした。Kn2-7 は TNF α の分泌増強もするので、NF-κB 活性化の増強を予測することは自然だと思う。6. ペプチドにより CpGDNA 取り込みが増加したので TLR9 シグナル全体が増加したのか→TLR9 シグナル全体が増加したのであれば NF-κB 活性化の増強も起こるはずだがそうではないので、一部のシグナルがペプチドにより増強されていると考えている7. 細胞内取り込みに疎水性アミノ酸が重要ということだが、エンドサイトーシスで取り込まれることと矛盾しないか→そうかもしれない。しかし、実験結果としては疎水性アミノ酸の重要性和エンドサイトーシスによる取り込みが示唆されているので、今後詳細を解析したい8. シグナル伝達分析の統計処理について適切に行うべきである→ありがとうございます。投稿論文作成において注意します9. TNF-a と比べて IL-10 の方が Kn2-7 を加えたときの増強の程度が大きいが、これは細胞の特性か？→現段階では不明。このサイトカインの種類による増強の程度の違いが Kn2-7 による CpGDNA 認識応答の増強メカニズム解明の手掛かりになるかもしれないので、今後さらなる解析をしていきたい。		