

氏 名	大 井 二 郎
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 (論) 第 3 5 9 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 0 年 9 月 1 0 日
学 位 論 文 題 目	Isolation of specific peptides that home to dorsal root ganglion neurons in mice  (マウスの脊髄後根神経節に結合する特異ペプチドの抽出)
審 査 委 員	主 査 教 授 野 坂 修 一 副 査 教 授 江 口 豊 副 査 教 授 堀 池 喜 八 郎

## 論文内容要旨

*整理番号	363	(ふりがな) 氏名	おおい じろう 大井 二郎
学位論文題目	Isolation of specific peptides that home to dorsal root ganglion neurons in mice (マウス脊髄後根神経節に結合する特異ペプチドの抽出)		
<p><b>【目的】</b> Phage display 法は、特定の組織や細胞を標的とする peptide 配列を検索するために有用な手段である。この実験では、M13 phage library を利用し、マウスの脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) に結合するペプチドの抽出を試みた。 DRG は、末梢神経 (感覚) 障害の治療標的部位の 1 つであり、様々な疾患における neuropathic pain の治療対象部位と考えられている。DRG ニューロンに親和性の高い peptide (sequence) を抽出することで、これらに対する drug delivery や gene therapy が可能となる。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>1. <i>In vitro</i> biopanning マウス DRG ニューロンを単離後、phage library (<math>1 \times 10^{10}</math> pfu) を附置 (10 分) し、wash にて親和性の弱い phage を除去、DRG に結合した phage を回収し、その phage を再度大腸菌に感染させ増幅して DRG ニューロンに附置。以上の操作を繰り返すことで DRG ニューロンに親和性の高い phage を得ることが可能となる (biopanning)。また DRG ニューロンに対する特異性をあげるために無関係の細胞を利用した subtractive panning も施行した。計 5 回この操作を繰り返し、最終的に phage plaque の sequence を確認し、その出現頻度より、DRG に親和性の高い phage (peptide) の候補を得て、以下の実験を施行した。</p> <p>2. 単離 DRG neuron への phage の結合 (<i>in vitro</i>) 候補 phage が <i>in vitro</i> でどの程度 DRG ニューロンに結合するかを抗 phage 抗体を用いた免疫染色法にて検討した。また染色される DRG ニューロンの size distribution も検討した。さらに相同配列を示す peptide (<math>10^{-4}</math> or <math>10^{-6}</math> M) の共附置で、その結合が阻害されるかの検討も行った。</p> <p>3. DRG への GST 融合 peptide の結合 (<i>in vivo</i>) 候補 peptide 配列が <i>in vivo</i> でも DRG ニューロン選択性を示すかを、候補 peptide を結合した GST 融合蛋白を利用して検討した (size distribution の検討も施行)。</p>			

**【結果】**1. *In vitro* biopanning

計5回のround後113個のphage plaqueが得られ、そのうち複数回検出されたものをDRGに親和性の高い候補phage (peptide配列) としDRG1、DRG2、DRG3とした。

2. 単離DRG neuronへのphageの結合 (*in vitro*)

候補phage (DRGp-1, DRG-p2, DRG-p3)の*in vitro*でのDRGニューロンへの結合結果は、DRG-p1 38% (83/219)、DRG-p2 43% (100/231)、DRG-p3 29% (69/235)であった。なおcontrol phage libraryは8% (45/539)であった。また相同配列を示すpeptide ( $10^{-4}$  or  $10^{-6}$  M)の共附置では、 $10^{-4}$  Mではほぼ完全にblock、 $10^{-6}$  Mでは部分的にblockされるという結果であった。これらのblockingはpeptide配列特異的であった。またDRG-p1、DRG-p3は主に小径ニューロンに結合 ( $22.0 \pm 5.3 \mu\text{m}$ ,  $23.2 \pm 6.7 \mu\text{m}$ ) し、DRG-p2は主に大径ニューロンに結合 ( $30.9 \pm 7.0 \mu\text{m}$ ) した。

3. DRGへのGST融合蛋白の結合 (*in vivo*)

候補peptide (GST-DRG1, GST-DRG2, GST-DRG3)が*in vivo*でどの程度DRGニューロンに結合するかを見たところGST-DRG1は39% (368/949)、GST-DRG2は25% (214/848)、GST-DRG3は14% (147/1081)であった。なおGST単独投与群の抗GST染色は陰性であった。またGST-DRG1、GST-DRG3は小径ニューロンに結合 ( $21.6 \pm 5.2 \mu\text{m}$ ,  $22.7 \pm 6.6 \mu\text{m}$ ) し、GST-DRG2は大径ニューロンに結合 ( $33.5 \pm 7.4 \mu\text{m}$ ) した。

**【考察】***in vitro*のbiopanningで得られたDRGニューロンに親和性の高いphage (peptide配列)は、*in vivo*の確認実験でもDRGに対する親和性を示した。またDRG1, 3が小径ニューロンに、DRG2が大径ニューロンへの親和性を示し、この結果も両実験系で同様であった。形態学的にDRGニューロンは小径と大径に分けられるが、臨床的にも障害されるニューロン、神経線維の大きさ・太さでsmall fiber neuropathy、large fiber neuropathyに分けられる。今回確認したpeptide配列により、今後DRGニューロンの機能分類の研究が一層進んだり、*in vivo*で病態に応じたdrug delivery systemの構築が可能となる可能性がある。

**【結論】**

*In vitro*のphage display法を利用して、*in vitro/in vivo*の両方でDRGニューロンに結合する3つの異なるpeptide配列を抽出した。そのpeptide配列は、2つの異なるsizeのニューロンを認識することが示された。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	363	氏名	大井 二郎
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>この論文はマウスの脊髄後根神経節 (DRG) に結合する特異ペプチドの抽出に関する論文である。DRGは末梢神経障害の治療対象部位の一つである。今回、このDRGに結合するペプチドの抽出に、M13 phage library を利用して、DRGニューロンへの結合を検討した。In vitro biopanning を利用して、DRGニューロンに親和性の高い3種類のペプチドを得た。次に、これらのペプチドが In vitro で、選択的に同ニューロンに結合するか、免疫染色法にて検討したところ、2種類のペプチドは小径ニューロンに、残りの1種類のペプチドは大径ニューロンにそれぞれ高い親和性を示した。更に、In vivo の確認実験でも同様な結果を得た。DRGニューロンは形態学的には、小径と大径ニューロンに分類できるが、今回の結果はこの確認したペプチド配列の研究を進めることにより、末梢神経障害の病態に応じた選択的な治療が可能となり、医学の進歩の多いに貢献すると期待される。よって本論文は博士 (医学) に値する。</p>			
(平成20年 9月 3日)			