

令和元年6月21日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H01882

研究課題名(和文)細胞内送達を可能にする分子標的ペプチド(中分子化合物)の新しい設計法

研究課題名(英文) A molecular design of molecular-targeting peptides (mid-size medicines) with cell membrane permeability.

研究代表者

藤井 郁雄 (Fujii, Ikuo)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70189984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,100,000円

研究成果の概要(和文)：進化分子工学(細胞表面ディスプレイ技術)とペプチド構造構築理論を組み合わせることにより、細胞内送達を可能にし、細胞内タンパク質をターゲットとする分子標的ペプチド(中分子化合物)の新しい設計法を開発した。抗MDM2マイクロ抗体に膜透過性ペプチドであるポリアルギニンを導入し、細胞膜透過性および生物活性を検討した。その結果、蛍光を指標にした共焦点顕微鏡観察により、本マイクロ抗体の細胞膜透過性を確認した。また、抗VEGFマイクロ抗体-薬物複合体の合成し、細胞膜透過性および生物活性を検討した結果、細胞増殖阻害活性を観測した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、標的タンパク質が細胞内タンパク質にまで一挙に及ぶことになり、ケミカルバイオロジーの進展に貢献する。すなわち、自由自在に分子標的化合物が創出できるので、これらを使って生命活動をコントロールすることで、従来の分子生物学的方法では得ることのできなかった新しい知見を手に入れることができる。また、医薬品開発においても細胞内疾患関連タンパク質を標的とすることができるので、新薬開発の標的タンパク質の数が劇的に増えるとともに、新しい作用機序の医薬品開発が可能になる。

研究成果の概要(英文)：Despite intense research into the design of ligands that target intracellular protein-protein interaction, a novel methodology for the rational design of such ligands remains an elusive goal. We developed a method for the design of molecular-targeting peptides that control the function of intracellular proteins by combining directed evolution and conformationally-constrained peptide.

The cell-penetrating peptide, polyarginine, was introduced into the anti-MDM2 micro antibody, we examined its cell membrane permeability and biological activity. After the synthesis of the fluorophore-labeled anti-MDM2 micro antibody, we confirmed the membrane permeability of the peptide by confocal microscopic observation.

And we successfully synthesized anti-VEGF micro antibody-drug conjugate that exhibits cellular uptake in endothelial cells and cell growth inhibition activity.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：分子標的ペプチド

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

21世紀に入るとともにヒトの遺伝子構造の全容が明らかにされた。現在、ゲノムから翻訳されるタンパク質の網羅的な解析が進められており、生命科学研究や医薬品開発の標的タンパク質が劇的に増えてきている。この急速なプロテオーム解析に迅速に対応するために、細胞内タンパク質-タンパク質相互作用を制御する分子標的化合物の新しい設計法が求められている。すなわち、抗体は細胞膜を透過しないため、細胞内疾患関連タンパク質をターゲットにできないことから、その利用範囲に制限がある。また、抗体-薬物複合体(ADC)においても、全長の抗体を用いているために薬物の細胞内送達効率が極めて悪い。これらの問題は、抗体の基本構造(IgG)に起因するものである。そこで、近年、抗体のような高い特異性と低分子化合物の汎用性を併せ持つ中分子化合物(約0.5-5 kDa)が期待されている。

2. 研究の目的

進化分子工学(細胞表面ディスプレイ技術)とペプチド構造構築理論を組み合わせることにより、細胞内送達を可能にし細胞内タンパク質をターゲットとする分子標的ペプチド(中分子化合物)の新しい設計法を開発する。すなわち、強固な立体構造を持つペプチドの細胞表面提示ライブラリーを構築し、標的タンパク質に結合するペプチド(マイクロ抗体)をスクリーニングする。得られるペプチドは立体構造を持っているので、生体内の酵素分解に対しても安定であり、抗体と同等の高い特異性と強い結合活性を持つ。そこで、本研究では、この分子標的ペプチドを利用して、特定の細胞を標的し細胞内に効率よく送達される分子標的中分子の開発を行う。図1に示すように、このマイクロ抗体の利点を活かし、細胞内疾患関連タンパク質と細胞表面受容体の両方を分子標的として2つの細胞内送達法(細胞膜透過性マイクロ抗体、マイクロ抗体-薬物コンジュゲート)を確立する。

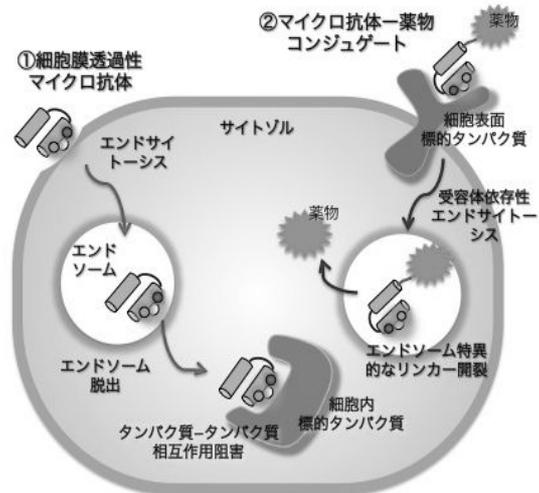


図1 細胞内送達を可能にする分子標的ペプチド(中分子化合物)の開発

3. 研究の方法

本研究では、進化分子工学および立体構造情報を利用して分子標的ペプチド(マイクロ抗体)を獲得し、これを土台分子として2つの戦略で細胞膜透過性分子標的化合物の作製法を検討する。「細胞膜透過性マイクロ抗体」では、細胞内標的タンパク質であるプロテインキナーゼ(Aurora A, Aurora B)やヒトMDM2(HDM2)に結合するマイクロ抗体を獲得する。その後、マイクロ抗体に細胞膜透過性ペプチド(CPP: cell-penetrating peptide)を導入し、細胞内送達を検討する。AuroraとMDM2は新規がん治療薬の標的タンパク質として認知されている。また、細胞内において、HDM2はp53と相互作用しており、このタンパク質-タンパク質相互作用を阻害することによりアポトーシスを誘導する。「マイクロ抗体-薬物コンジュゲート」では、細胞外タンパク質として血管内皮増殖因子(VEGF)を分子標的とする。VEGFの膜受容体であるKDRは、エンドサイトーシスを起こすので、受容体-リガンド相互作用を利用して、リガンドに結合するマイクロ抗体に薬物を連結させ、受容体依存性エンドサイトーシスにより細胞内に送達させる。これは、抗体-薬物複合体(ADC)に代わる新しい薬物送達法であり、分子サイズの観点からも効率的かつ安全な薬物送達が期待される。

4. 研究成果

細胞膜透過性マイクロ抗体

オーロラキナーゼは癌細胞において過剰に発現するプロテインキナーゼであり、特異的阻害剤は抗がん剤として期待されている。ファージ表面提示マイクロ抗体ライブラリーを用いて、オーロラキナーゼA(AurA)に対してスクリーニングを行い、AurAに対するキナーゼ阻害活性(IC₅₀)103 μMのペプチドBip-03を得てきた。細胞内標的分子である

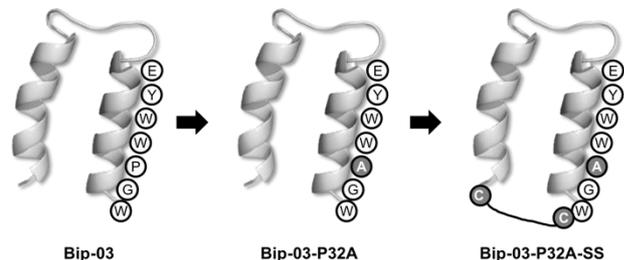


図2 オーロラキナーゼA阻害活性を持つマイクロ抗体

AurAに作用させるために、標的分子に対する親和性や特異性を向上させる必要があった。図2に示すように、ヘリックス構造を壊しうるPro残基をAlaに置換し(Bip-03-P32A)、さらに、ジスルフィド架橋で分子内環状化した(cBip-03-P32A-SS)。CDスペクトル測定それぞれBip-03

より高い α -ヘリックス含有率を示し、cBip-03-P32A-SSのキナーゼ阻害活性(IC_{50})が24.4 μ Mを示した。本ペプチドは引き続き、進化分子工学の手法を用いて親和性を向上させて、キナーゼ阻害活性を向上させる必要がある。細胞透過性の付与は実施せず、さらなる親和性成熟の検討が必要である。

p53-HDM2 相互作用に対する特異的阻害剤は、p53を活性化させてがん細胞のアポトーシスを引き起こすことから、抗がん剤として期待されている。転写因子p53は、トランスアクティベーション(TA)ドメインの結合残基(Phe¹⁹, Leu²², Trp²³, Leu²⁶)を介してHDM2の疎水性ポケットに結合する。このドメインは α ヘリックス構造をもつため、HLHペプチドはこのエピトープを模倣しうる。図3に示したように、HLHペプチドのC末端側ヘリックスの溶媒露出部位にp53由来の4残基を移植し(エピトープ・グラフティング)、HDM2に対する結合活性の付与を試みた。また、ポリアルギニンなどの正電荷を帯びたペプチドが細胞膜透過性をもつことが知られており、HLHペプチドのN末端側ヘリックスに6残基のアルギニンを付与することで(アルギニン・グラフティング)、細胞膜透過性の付与を試みた。さらに、細胞内の還元的な環境下でも開裂せずに安定なチオエーテル架橋により環状化した。このように設計したペプチドcHLHp53-Rを合成して、HDM2に対する結合活性、p53-HDM2相互作用阻害活性、細胞膜透過性、またがん細胞増殖阻害活性を調べた。

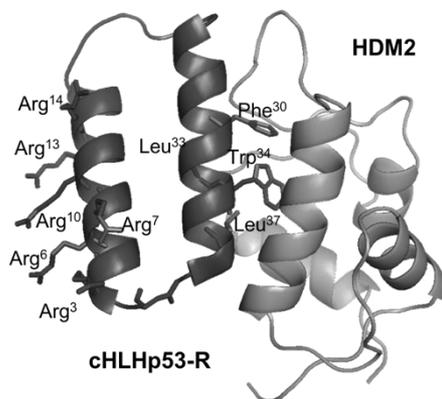


図3 細胞膜透過性マイクロ抗体cHLHp53-Rの立体構造: cHLHp53/HDM2複合体のMD計算結果

PBSにおける二次構造をCDスペクトルにより確認したところ、 α ヘリックス構造を有していた。表面プラズモン共鳴(SPR)法による測定結果から、cHLHp53-RのHDM2に対する解離定数(K_D 値)は10 nMであった。また、p53-HDM2相互作用阻害活性 IC_{50} は36 nMであった。分子動力学(MD)計算結果より得た遊離のcHLHp53-Rの立体構造はHLH構造を有し、CDスペクトル測定の結果とよく一致した。MD計算結果より得たcHLHp53-R/HDM2複合体の立体構造からは、移植(エピトープ・グラフティング)した4つの結合残基がHDM2の疎水ポケットに結合していた。また、cHLHp53-Rは、キモトリプシン様の細胞内プロテアーゼであるカテプシンGに対して高い安定性を示し、細胞アッセイ条件下における高い安定性を示唆した。赤色蛍光色素テトラメチルローダミンでラベルしたcHLHp53-R(TMR-cHLHp53-R)を合成し、蛍光偏光解消法によりHDM2に対する結合活性を測定したところ K_D 値が6 nMであった。このTMR-cHLHp53-RをHeLa細胞へ添加後共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、短時間でサイトゾルへ拡散する様子が観察できた。すなわちcHLHp53-Rは、細胞透過性を持つことを確認した。このcHLHp53-Rは野生型p53をもつがん細胞LnCapおよびHCT116選択的な増殖阻害活性を示した。これらのことから、細胞内PPIを阻害する細胞膜透過性マイクロ抗体の分設計法方法の確立とした。

マイクロ抗体-薬物コンジュゲート

本項目では、進化分子工学を利用して、細胞外タンパク質である血管内皮増殖因子A(VEGF)に結合する分子標的ペプチド(マイクロ抗体)を獲得し、これを土台分子としてマイクロ抗体-薬物コンジュゲートの作製法を検討した。VEGF受容体は、エンドサイトーシスを起こすので、受容体-リガンド相互作用を利用して、リガンドに結合するマイクロ抗体に薬物を連結させ、受容体依存性エンドサイトーシスにより細胞内に到達させる。

VEGFに対するマイクロ抗体を取得するため、ファージ表面提示ペプチドライブラリーを構築し、結合性ペプチドをスクリーニングした。得られた複数の候補ペプチドをFmoc固相合成法により合成し、表面プラズモン共鳴(SPR)法でVEGFに対する結合活性を評価したところ、ペプチドM49が非常に高い結合活性と結合特異性を示した(図4)。ペプチドM49の立体構造安定性を評価するため、CDスペクトルを用いて熱安定性を測定したところ、80において α -ヘリックス構造を保持していた。また、タンパク質分解酵素(トリプシン)に対する安定性は、一般的なランダム構造を保持するペプチドと比較して、半減期が約240倍も長く、高い安定性を示した。

次に、ペプチドM49が細胞内へ取り込まれるか確認した。ペプチドM49に蛍光物質を部位特異的に修飾するため、M49の誘導体であるM49Kを合成した。M49KはSHフリーのシステイン残基を有するペプチドで、この部位に化合物を部位特異的に修飾できる。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に蛍光物質(Cy5)を標識したM49KとAlexa488を修飾したVEGFを添加し、共焦点レ

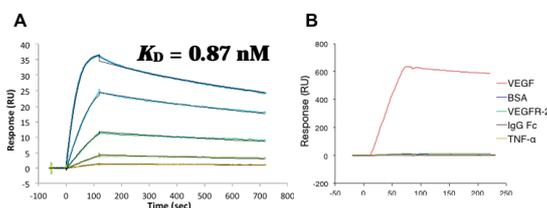


図4 SPR法を用いたペプチドM49の結合活性(A)と結合特異性(B)の評価

レーザー顕微鏡とフローサイトメーターにより解析した。その結果、VEGF 存在下でのみ、Cy5 の蛍光が細胞内に観察され、VEGF に標識した Alexa488 の蛍光と共局在していた。すなわち、M49 は VEGF に結合し、VEGF 受容体を介したエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれることが明らかとなった (図 5)。

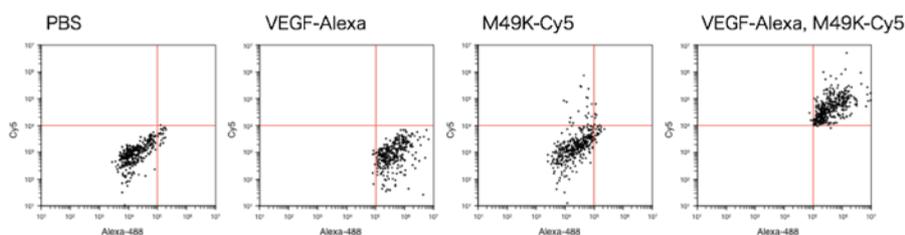


図 5 ペプチド M49 の細胞取り込み試験。HUVEC に PBS, VEGF-Alexa488 (100 nM), M49K-Cy5 (500 nM), VEGF-Alexa488 と M49K-Cy5 の混合物をそれぞれ添加し、6 時間後に洗浄とトリプシン処理を行ったのちフローサイトメーターで解析した。

そこで、ペプチド M49 を利用した「ペプチド-薬物コンジュゲート」を合成した。薬物にはチューブリンの重合阻害剤である CemCH₂-SH を利用し、M49K のシステイン残基とジスルフィド結合を介して結合させた。細胞内は多量のグルタチオンが存在し、還元条件下であるため、M49K-Cem が細胞内へ取り込まれると、このジスルフィド結合が切断され、薬物が毒性を発揮すると想定した。M49K-Cem を用いて HUVEC の増殖阻害試験を実施した結果、M49K-Cem は細胞増殖を濃度依存的に阻害した (IC₅₀ = 45 nM)。一方、VEGF に結合しないマイクロ抗体 YT1 を利用した薬物コンジュゲート YT1-Cem は、細胞増殖を阻害しなかった。これは、YT1 が VEGF に結合しないため、細胞内には取り込まれず、細胞増殖阻害を示さなかったと考えられる。本研究では、抗 VEGF マイクロ抗体を利用して、細胞内に薬物を送達する中分子ペプチドを開発した。これは、抗体-薬物複合体 (ADC) に代わる新しい薬物送達であり、分子サイズの観点からも効率的かつ安全な薬物送達が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. 藤原大佑, 弓場英司, 白石一乗, 中瀬生彦, 藤井郁雄, ポスト抗体医薬品: 立体構造規制ペプチド「マイクロ抗体」を土台とした中分子創薬, MEDCHEM NEWS, 査読有, 28, 2018, 83-87
2. 藤井郁雄, ポスト抗体医薬: 進化分子工学による分子標的ペプチド「マイクロ抗体」の創出, MEDCHEM NEWS, 査読有, 27, 2017, 30-34
3. 藤井郁雄, ポスト抗体医薬: 抗体様分子標的ペプチド「マイクロ抗体」の創出, 化学と生物, 査読有, 55, 2017, 1-2
4. Nishihara, T., Kitada, H., Fujiwara, D., Fujii, I. Macrocyclization and labeling of helix-loop-helix peptide with intramolecular bis-thioether linkage, Biopolymers, 査読有, 106, 2016, 415-421
5. 藤井郁雄, 中分子創薬のすすめ: 進化分子工学による分子標的ペプチドの創出, ファルマシア, 査読有, 52, 2016, 116-120
6. 藤原大佑, 藤井郁雄, ポスト抗体医薬品: 高機能化分子標的ペプチドの設計と創出, 化学と工業, 査読有, 67, 2016, 861-867

[学会発表] (計 39 件)

1. Fluorescent PPI-visualization of cyclized helix-loop-helix peptide "MicroAntibody" inhibiting intracellular HDM2-p53 interaction, Daisuke Fujiwara, Kazunori Zikihara, Shunsuke Inaura, Masataka Michigami, Eiji Yuba, Ikuhiko Nakase, Ikuo Fujii, 10th International Peptide Symposium 第 55 回ペプチド討論会, 2018 年
2. Efficient intracellular delivery of cyclized helix-loop-helix peptide by conjugation of cell-penetrating peptides, Shunsuke Inaura, Hidekazu Kitada, Kazunori Zikihara, Masataka Michigami, Daisuke Fujiwara, Ikuhiko Nakase, Ikuo Fujii, 10th International Peptide Symposium 第 55 回ペプチド討論会, 2018 年
3. Conjugation of CPPs to cyclized helix-loop-helix peptides enhances the intracellular inhibitory activity of p53-HDM2 interaction. Shunsuke Inaura, Hidekazu Kitada, Kazunori Zikihara, Masataka Michigami, Daisuke Fujiwara, Ikuhiko

- Nakase, Ikuo Fujii, 6th TKU-OPU-HCMUT-DLU-TNU Joint Symposium, 2018 年
4. Post-antibody drugs: In vitro evolution for molecular-targeting helix-loop-helix peptides, Ikuo Fujii, 6th TKU-OPU-HCMUT-DLU-TNU Joint Symposium, 2018 年
 5. Peptide-drug conjugate(PDC): A de novo designed helix-loop-helix peptides for targeted drug delivery utilizing VEGF receptor-mediated endocytosis, Michigami Masataka, Fujii Ikuo, 6th TKU-OPU-HCMUT-DLU-TNU Joint Symposium, 2018 年
 6. Cyclized Helix-Loop-Helix Peptide “Microantibody” as a Molecular Scaffold for Inhibitors against Protein-Protein Interactions, Daisuke Fujiwara, E.T. Kaiser Memorial Symposium, 2018 年
 7. プロテインキナーゼ指向型ファージ表層提示ペプチドライブラリーの構築, Daisuke Fujiwara, Kosuke Mihara, Yusuke Nakamura, Ikuo Fujii, 36th メディシナルケミストリーシンポジウム, 2018 年
 8. ペプチド-薬物複合体(PDC)を基盤とした新しい創薬モダリティー, 道上雅孝, 藤井郁雄, Bio Medical Forum 2019, 2019 年
 9. Post-antibody drugs: Generation of molecular-targeting peptides “MicroAntibodies” by directed evolution, Ikuo Fujii, Joint Symposium of Asia Five Universities, 2017 年
 10. ポスト抗体医薬: 進化分子工学による分子標的ペプチド “マイクロ抗体” の創出, 藤井郁雄, 平成 29 年度京都大学原子炉実験所専門研究会, 2017 年
 11. ポスト抗体医薬: 進化分子工学による分子標的ペプチドの開発, 藤井郁雄, 第 39 回バイオシーズ公開会 NPO 法人 近畿バイオインダストリー振興会議, 2017 年
 12. ポスト抗体医薬品: 立体構造規制ペプチド「マイクロ抗体」を土台とした中分子創薬, 藤原大佑, 道上雅孝, 弓場英司, 白石一乗, 児玉靖司, 中瀬生彦, Sihyun Ham, 藤井郁雄, 第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2017 年
 13. 中分子創薬のすすめ: 進化分子工学による抗体様分子標的ペプチドの創出, 藤井郁雄, 岡山県医用工学研究会 平成 29 年度第 2 回【第 112 回】セミナー/交流会, 2017 年
 14. Functional Improvements of a Cyclized Helix-loop-Helix peptide cHLHp53-R that inhibit intracellular p53-HDM2 Interaction, Ryouhei, Konda, Ikuo Fujii, Joint Symposium of Asia Five Universities, 2017 年
 15. A Helix-Loop-Helix Peptide Inhibiting Intracellular p53-HDM2 Interaction: A Role of Poly ARG in Non-Interacting Surface of the N-Terminal Helix, Shunsuke Inaura, Hidekazu Kitada, Kazunori Zikihara, Daisuke Fujiwara, Ikuo Fujii, 第 54 回ペプチド討論会, 2017 年
 16. Synthesis of VEGF-targeting helix-loop-helix peptide-monomethyl auristatin E conjugate, Haruna Yamashita, Masataka Michigami and Ikuo Fujii, 第 54 回ペプチド討論会, 2017 年
 17. ポスト抗体医薬: 進化分子工学による分子標的ペプチド “マイクロ抗体” の創出, 藤井郁雄, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
 18. Cyclized helix-loop-helix peptide as a molecular scaffold for the design of intracellular protein-protein interaction inhibitors by epitope and arginine grafting, I. Fujii, The 16th Akabori Conference, 2016 年

19. MicroAntibodies ” Generation of Molecular-targeting Peptides as a Post-antibody drug,
Ikuo Fujii, Asian Chemical Biology Initiative 2017 Ho Chi Minh Meeting, 2017 年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：藤原 大佑

ローマ字氏名：**FUJIWARA, daisuke**

所属研究機関名：大阪府立大学

部局名：大学院理学系研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：**30611420**

(2)研究分担者

研究分担者氏名：道上 雅孝

ローマ字氏名：**MICHIGAMI, masataka**

所属研究機関名：大阪府立大学

部局名：大学院理学系研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：**60802428**

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。