

令和元年6月5日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19502

研究課題名(和文) 生体内コラーゲンの分子状態の可視化と医療への応用を目指した新規環状ペプチドの開発

研究課題名(英文) Development of novel cyclic peptides that detect molecular states of collagen in vitro and in vivo

研究代表者

小出 隆規 (KOIDE, Takaki)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：70322253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲンは3重らせん構造をもつ。がんの周辺などでは、その3重らせん構造が変性したコラーゲンが存在すると考えられているが、それを検出できる有効なプローブは無かった。本研究では、緩んだ3重らせんにハイブリッド形成する既報ペプチドの設計を基にして、さらに高感度に変性コラーゲンを検出できるペプチドを開発した。このペプチドは、コラーゲン様ペプチドの環化2量体である。本物質は、既報の1本鎖ペプチドに比べて約百倍強い親和性で変性コラーゲンに結合した。この環状ペプチドがin vitroでコラーゲンの高感度な検出に利用できることを示した。さらに、蛍光標識したペプチドを用いて、マウスに移植したがんを可視化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん、骨・軟骨疾患、線維化、炎症性疾患などでコラーゲン3重らせんが変性していることが予想されており、それを検出するプローブの開発が求められていた。これまでに1本鎖のコラーゲン様ペプチドがこの目的で試されてきたが、本研究においては、分子設計の改変により約2オーダーの結合能の改善を達成できた。これにより、培養細胞レベルから生体のイメージングに至る広範囲な実験系において、緩んだ3重らせんを検出、定量、可視化することが可能となった。この成果は、基礎研究から診断薬・治療薬開発を目指した応用研究まで幅広い研究領域にひとつの新たなツールを付け加えた。

研究成果の概要(英文)：It is proposed that tissues surrounding malignant tumors are rich in (partially) denatured collagen. Thus, development of a probe that detects denatured collagen with high efficiency has been expected. In this study, based on the design of previously published peptides capable of hybridizing with an unfolded triple helix, we have developed peptides that can detect it with higher sensitivity. The peptides are cyclic dimers of peptides with collagen-like sequences. One of the cyclic peptides showed two-orders of magnitude higher affinity to denatured collagen than conventional single chain counterpart. The peptide was shown to be applicable to sensitive detection of collagen in vitro. In addition, it enabled in vivo fluorescent imaging of malignant tumors in mouse models.

研究分野：ペプチド・タンパク質化学

キーワード：コラーゲン ペプチド イメージング 薬物送達 がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

コラーゲンは体のいたるところに存在するタンパク質であるが、悪性度の高い固形がん周辺組織や、骨破壊やリモデリングが活発な部位には、その3重らせん構造が緩んだ変性コラーゲンが存在すると考えられている。緩んだコラーゲンに結合する物質は、病態の理解および疾患の診断や治療に有用であると期待される。コラーゲン様 X-Y-Gly の繰り返し配列を持つ化学合成ペプチドは、3重らせん形成能を有する。Yuらはこの性質を利用して、コラーゲンの3重らせん構造が緩んだ部分とハイブリッド形成するペプチドを開発し、それを変性コラーゲンの検出に応用しようとする研究を行っている。しかし、そのコラーゲンへの結合力は十分でなく、また、ペプチド溶液を室温においておくと、ペプチドの自己集合による3重らせん形成によって変性コラーゲンとのハイブリッド形成能を失うという問題点があった。

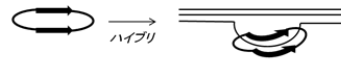
### 2. 研究の目的

既報の1本鎖のコラーゲン様ペプチドよりも強く変性コラーゲンに結合し、かつ自己集合能が低いペプチドを分子設計・合成する。*In vitro*での検討により、変性コラーゲン検出の特異性および感度を検討する。さらに、動物生体内における変性コラーゲンのイメージングへの応用についても検討する。本研究では、さらなる応用研究へと展開するために重要な、ペプチドの分子設計と、それをを用いて基礎的情報を収集することを目的とした。

### 3. 研究の方法

右図に示す二つのタイプのペプチドを設計し、Fmoc型固相法により化学合成した。図1の太い矢印はコラーゲン様 X-Y-Gly 繰り返し配列部分を表す。一年目実施した予備的な検討により、環状平行2量体としたコラーゲン様ペプチド(図1上)は、優れた変性コラーゲン検出能を有することが分かった。環状1本鎖ペプチド(図1下)は、その合成法を確立したが、変性コラーゲンの検出能の改善が見られなかったため、以降は環状平行2量体型のペプチドについて重点的かつ詳細な解析をするとともに、構造-活性相関研究による分子設計の最適化を行った。なお、コラーゲンへの結合力は、ビオチン化ペプチドを用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)により評価した。

環状平行2量体ペプチド



環状1本鎖ペプチド

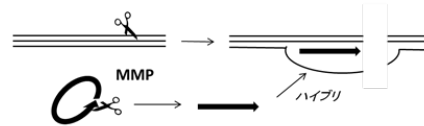


図1. 本研究のコンセプト: 緩んだコラーゲン3重らせんにハイブリッド形成するペプチドの開発

### 4. 研究成果

#### (1) ペプチドの設計・合成

様々な長さの(Pro-Hyp-Gly)の繰り返し配列を有する環状平行2量体型ペプチドを設計・化学合成した。環化のための架橋構造として、Lys 残基の側鎖を利用した分岐、ジスルフィド結合等様々な共有結合を利用した。これらペプチドは、ビオチンあるいは蛍光基(フルオレセインおよび IRdye)により標識し、以下の結合評価に用いた。合成したペプチドの同定は、エレクトロスプレー型質量分析により行い、ペプチドの自己集合能については、円偏光二色性(CD)スペクトル測定により解析した。

#### (2) 変性コラーゲン結合能の評価

様々な長さのペプチド鎖をもつ環状平行2量体型ペプチドと、それに対応する従来型の1本鎖型ペプチドを合成し、それらの熱変性、非変性コラーゲンに対する結合を ELISA により評価した。これらのペプチドは非変性のもよりも熱変性させたコラーゲンに結合しており、環状化したものは、対応する1本鎖ペプチドよりも変性コラーゲンに対してより高い結合能を示した。その中でも最も優れた結果を示したペプチド cCMP7 は、従来型である(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>と比較して100倍程度高い親和性で変性コラーゲンに結合することが明らかになった。また、2本のペプチド鎖を束ねて環化したことによる標的の3重らせんの緩んだ部位へのハイブリダイズ能の向上は、ハイブリッド形成した3重らせんの安定性の向上に起因していることが、分子動力学計算からも裏打ちされた。

#### (3) *In vitro*における変性コラーゲンの検出

上記で良好な成績を与えた環状ペプチド(cCMP7)を用いて、*in vitro*におけるコラーゲンの検出を行った。Western blotting法では、調べたI~V型すべての変性コラーゲンの鎖を染色した(図2左)。これは、当該ペプチドがコラーゲンに共通の構造である(X-Y-Gly)繰り返しからなるアミノ酸配列を認識していることを示している。培養細胞(マウス線維芽細胞)から分泌されたコラーゲンは、そのコラーゲンを熱変性したときのみフルオレセイン標識したcCMP7による蛍光像が観察された(図2右)。また、小胞体内に存在するフォールディング途上のプロコラーゲンの蛍光検出にも成功した。いずれの方法においてもcCMP7は、市販の抗コラ

ーゲン抗体と同等の高い検出感度を示した。このとき、市販の抗コラーゲン抗体は変性・非変性コラーゲンを区別することなく検出したが、cCMP7 は変性コラーゲンを特異的に検出した。

#### (4) 担がんマウスを用いた *in vivo* イメージング

ヒト前立腺がん細胞である PC-3 および LNCap を皮下に移植し、担がんマウスを作成した。蛍光色素により標識した cCMP7 を経静脈的に投与したところ、PC-3 細胞からなる腫瘍を可視化した(図3)。一方、LNCap 細胞からなる腫瘍への cCMP7 の蓄積は観察されなかった。この結果は、がんの特性(たとえば悪性度)を判定するツールとしての本環状ペプチドの応用可能性を示唆するものである。また、椎間板や膝関節への集積も認められたことから、軟骨のコラーゲンを標的とした DDS 等への応用可能性も示唆された。

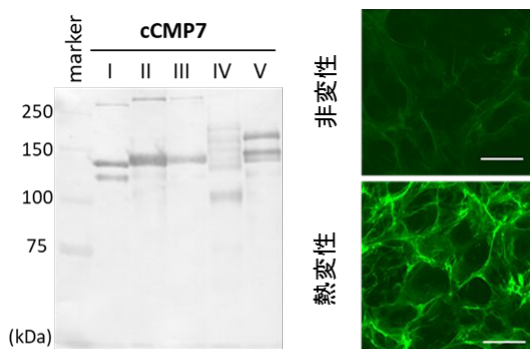


図2. *In vitro*での変性コラーゲンの検出:  
(左) Western blottingでの各型のコラーゲンの検出、(右)細胞外コラーゲンの蛍光検出

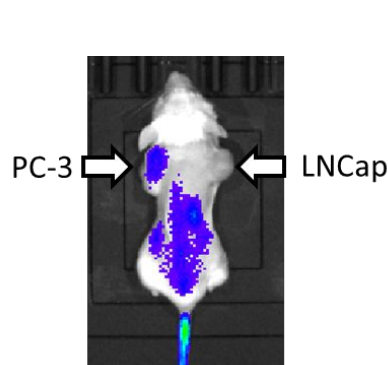


図3. 担がんマウスを用いた腫瘍の *in vivo* 蛍光イメージング

#### (5) 構造 活性相関による環状平行2量体型ペプチドの最適化

環状ペプチド cCMP7 は、既報の一本鎖ペプチドにくらべ優れた変性コラーゲン検出能を有していたが、自らの3重らせん形成による自己集合能は残存していた。そのため、上記の各実験を実施する直前には、ペプチド溶液を加熱処理して自己集合を解除する必要があった。この前処理は、とくに動物実験の実施を煩雑かつ困難にし、研究結果を不安定化する懸念材料であった。そこで、緩んだコラーゲン3重らせんとハイブリッド形成能力を維持したまま、自己集合能が抑制された新たなペプチドの創出を目指して構造 活性相関研究を行った。多数の環状平行2量体型ペプチドを設計・合成して検討した結果、ペプチド鎖内に複数の酸性アミノ酸(グルタミン酸)を導入し、かつ、束ねる2本のペプチド鎖の長さを異なるものとするすることで、その目的を達成できた。また、このようにして構造最適化した環状ペプチドは、直前に加熱しなくても、加熱処理をした cCMP7 と同等の高い変性コラーゲン検出力を有していた。

### 5. 主な発表論文等

#### 〔雑誌論文〕(計 1件)

Takita Koh K., Fujii Kazunori K., Kadonosono Tetsuya, Masuda Ryo, Koide Takaki, Cyclic Peptides for Efficient Detection of Collagen, ChemBioChem, 査読有, 19巻, 2018年, 1613-1617  
10.1002/cbic.201800166

#### 〔学会発表〕(計 6件)

Sayaka Kanai, Takaki Koide, Design and synthesis of a peptide that acquires denatured collagen-binding ability by a spontaneous structural rearrangement, 第51回日本結合組織学会学術大会, 2019年

K.K. Takita, K.K. Fujii, H. Kimura, T. Koide, Development of a collagen-detecting peptide and its application *in vivo*, 第50回日本結合組織学会学術大会, 2018年

小出隆規, コラーゲン3重らせんにインスパイアされたペプチド創薬, 日本薬学会第138年会, 2018年

Takaki Koide, Koh K. Takita, Kazunori K. Fujii, Ryo Masuda, Tetsuya Kadonosono, Hiroyuki Kimura, Targeting Unfolded Collagen by Cyclic Collagen-Mimetic Peptides, 10th International Peptide Symposium (招待講演)(国際学会), 2018年

Kazuki C. Kuroda, Fumiko Hisamatsu, Takaki Koide, Seamless cyclization of collagen-like peptides with Gly-X-Y-repeating sequences, 第54回ペプチド討論会, 2017年

Koh K. Takita, Kazunori K. Fujii, Takaki Koide, Cyclic peptides for efficient detection

of collagen、第 54 回ペプチド討論会、2017 年

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：コラーゲンへの結合活性を有する環状ペプチド

発明者：小出隆規、瀧田講、平和馬

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2018/031920

出願年：2018 年

国内外の別：国内・国外

〔その他〕

ホームページ等：早稲田大学先進理工学部 化学・生命化学科 小出研究室

<http://www.chem.waseda.ac.jp/koida/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：木村 寛之

ローマ字氏名：(KIMURA, Hiroyuki)

所属研究機関名：京都薬科大学

部局名：薬学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：50437240

研究分担者氏名：増田 亮

ローマ字氏名：(MASUDA, Ryo)

所属研究機関名：早稲田大学

部局名：理工学術院

職名：助教

研究者番号(8桁)：90632159

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：瀧田 講

ローマ字氏名：(TAKITA, Koh K.)

研究協力者氏名：藤井 一徳

ローマ字氏名：(FUJII, Kazunori K.)

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。