

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06970

研究課題名(和文)抗体医薬の中分子化を目指した多点結合型Multi-FLAPの創製

研究課題名(英文)Design of Multi-FLAP as a high-performance antibody alternative protein

研究代表者

門之園 哲哉 (Kadonosono, Tetsuya)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：10510282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：がんを始めとする様々な疾患の分子標的治療薬として、抗原に強く結合する抗体医薬が盛んに開発されている。しかし、抗体は分子サイズが大きく複雑な構造を持つため医薬としての利用には制限があり、分子改変により抗体を小型化する技術の開発が求められている。本研究では、スーパーコンピューターを駆使した分子デザインにより、抗体の15分の1のサイズの小型代替分子Multi-FLAPを創り出すことに成功した。また、抗原との結合領域を2か所設計することで、相乗効果により強い結合力が得られる現象を見出した。さらに、今後の医薬応用に向けて、体内動態を改善する手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体医薬は分子サイズが大きく複雑な構造を持つため、適用疾患に限られることや、製造コストおよび治療コストが非常に高額であることなど、新たな課題が顕在化している。本研究でデザイン理論を構築したMulti-FLAPは、分子サイズが小さいため化学合成で安価に調整でき、さらに組織浸透性の向上により適用疾患の拡大に繋がると期待できる。本研究はすべての人々に安価かつ高品質な医療を提供することを目指している。

研究成果の概要(英文)：Antibody drugs have been extensively developed as molecular-targeted therapeutic drugs for various diseases including cancer. However, since an antibody has a large molecular size and a complex structure, its clinical application is limited. Therefore, a design strategy for developing the small antibody mimetics is required. In this study, we successfully developed an antibody mimetic small protein, Multi-FLAP, which is one-fifteenth the size of an antibody, by computational design and screening. We also found that by designing two antigen-binding regions in one molecule, a strong binding affinity can be obtained due to the synergistic effect. Furthermore, we have developed a strategy to improve pharmacokinetics of Multi-FLAP for future clinical applications.

研究分野：創薬科学

キーワード：中分子創薬 創薬デザイン技術 タンパク質分子設計 抗体代替分子 標的結合小型タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗体は標的抗原に対して高い特異性と親和性を示し、治療標的タンパク質を認識する医薬品として盛んに開発が進められている [1]。しかし、抗体は複雑な構造と大きな分子量を持つため化学合成できず、組織浸透性が低いために適用疾患が限られることや、製造コストおよび治療コストが非常に高額であることなど、新たな課題が顕在化している。そのため、分子改変による小型抗体代替分子の開発が望まれている [2]。

抗体の構造は全てに共通の定常領域と各抗体に固有の可変領域で構成され、直接抗原との結合に関わるのは可変領域の中の相補性決定領域 (complementarity-determining region, CDR) と呼ばれる、重鎖中の 3 本、軽鎖中の 3 本からなる合計 6 本のループである [3]。このことから、CDR ループと同じ配列を持つペプチド (CDR ペプチド) も抗原特異的に強く結合すると期待されるが、実際には抗体から取り出した CDR ペプチドの標的結合力は非常に弱くなる [4]。そのため、抗体分子の強力な結合力の謎を解き明かし、その原理に基づいて結合力の強い人工抗体や抗体代替分子を創製する研究が進められている。

申請者は先行研究において、溶液中で CDR ペプチドの結合力が弱い理由として、ペプチドの「構造ゆらぎ」が主な原因と考えた。つまり、抗体では束縛されている抗原結合部位の立体構造が、ペプチド化によりゆるぐことが可能となり、その結果、エントロピー損失により結合力が低下する。そこで CDR ペプチドを足場タンパク質に組み込み、ゆらぎを抑制することで、結合力が上昇することを見出した [5]。さらに、MD シミュレーションにより小型足場タンパク質を同定し、CDR ペプチドを組み込むことで、抗原に強力に結合する小型標的結合タンパク質 (FLuctuation-regulated Affinity Protein, FLAP) の創出に成功した。

2. 研究の目的

本研究では、「結合エネルギー的には寄与が少なくとも複数の異なる CDR ペプチドにまたがって結合点を持つことで抗原認識領域が広がり、複合体形成に有利に働くのではないか？」と仮説を立て、結合エネルギーの異なる 2 つ以上の CDR ペプチドを同時に組み込み、抗体の結合力に匹敵する小型標的結合タンパク質 Multi-FLAP を創製して仮説を検証するとともに、抗体代替分子を創出するデザイン技術の確立を目指した。

3. 研究の方法

同時に組み込んだ複数のペプチドの構造ゆらぎを抑制できる足場を、120 アミノ酸長以下の小型タンパク質から探索し、結合エネルギーの異なる CDR ペプチドを同時に複数組み込んで結合力を比較し、強力な抗原結合力を有する Multi-FLAP を少なくとも 1 例創製することを目指した。

(1) 足場分子のイン・シリコ・スクリーニング

先行研究において、MD シミュレーションを用いて足場候補分子を評価する手法を確立している。本研究においても同様に計算を行い、組み込んだ 2 種類の CDR ペプチドの構造ゆらぎを抑制することが可能な足場分子を同定した。

(2) Multi-FLAP のデザインと結合力予測

抗体医薬 Trastuzumab と抗原 HER2 との結合エネルギー計算により複数の HER2 結合 CDR ペプチドを抽出し、結合エネルギーの異なる 2 つ CDR ペプチドを同時に足場分子に組み込んで Multi-FLAP 候補をデザインした。次に、Multi-FLAP 候補分子の構造を MD シミュレーションにより予測し、Trastuzumab の構造と比較することで候補分子を絞り込んだ。

(3) Multi-FLAP の結合力評価

Multi-FLAP 候補分子を大腸菌発現系により調整し、ELISA で結合パラメーターを測定した。強い結合力を持った Multi-FLAP については、CDR ペプチドを 2 種類組み込むことの効果を検証するために、それぞれ 1 種類の CDR ペプチドのみを持つ FLAP も調整して評価した。また、Multi-FLAP の予測構造を用いて、イン・シリコで結合様式を解析した。

(4) Multi-FLAP の有用性評価

Multi-FLAP を診断薬、治療薬として高機能化を目指すための準備を行った。Multi-FLAP は分子量が 10 kDa 程度であるため、腎排泄により速やかに体外排泄されると予測される。そこで血中での分子量を最適化して体内滞留性を高めるために、Multi-FLAP にアルブミン結合ドメイン (ABD) [6] を融合したタンパク質を調製し、近赤外蛍光標識して担がんモデルマウスに投与し、体内動態・体内滞留性・腫瘍検出感度を生体蛍光イメージングで評価した。動物実験は東京工業大学動物実験委員会の審査承認を受け、適正に実施した。

4. 研究成果

(1)足場分子のイン・シリコ・スクリーニング

イン・シリコ・スクリーニングによって、Multi-FLAP の足場となる小型タンパク質を探索した。Protein Data Bank に登録されている 120 アミノ酸長以下の小型タンパク質の構造情報を用いて、天然構造のゆらぎ、モデルペプチドを組み込んだ際のループの構造ゆらぎを MD シミュレーションにより計算した結果、2 種類の抗体 CDR ペプチドの構造ゆらぎを抑制できる小型タンパク質 FN3 の同定に成功した。

(2)Multi-FLAP のデザインと結合力予測

HER2-Trastuzumab の複合体結晶構造を PDB より取得して MD シミュレーションを実施し、MM-GBSA 法により抗原結合残基の結合エネルギーを計算した。この結果を用いて、Trastuzumab の軽鎖 CDR の 3 つの残基または重鎖 CDR の 2 つの残基を含む 2 種類の CDR ペプチド領域を抽出した (図 1)。次に、これらの残基を FN3 のループ領域に組み込み、80 種類の Multi-FLAP 候補分子 (FN3.1 ~ FN3.80) をデザインした。候補分子の構造は全て MD シミュレーションで安定化し、組み込んだ残基の配置を Trastuzumab と比較した結果、FN3.38 と FN3.58 の 2 つの分子は Trastuzumab と非常によく似た残基配置 (RMSD < 2 Å) を持つことが明らかになり (図 2)、HER2 に強く結合することが示唆された。

(3)Multi-FLAP の結合力評価

FN3.38 および FN3.58 の発現プラスミドを構築し、大腸菌で発現させ、アフィニティクロマトグラフィーで精製した。精製タンパク質の HER2 への結合力を ELISA により測定したところ、FN3.38 および FN3.58 の解離定数 K_D はそれぞれ 380 nM および 58 nM であった (表 1)。そこでより強く HER2 に結合する FN3.58 を Multi-FLAP とした。

続いて、Multi-FLAP の多点結合の意義を検討するために、軽鎖 CDR 由来ペプチドのみ、あるいは重鎖 CDR 由来ペプチドのみを FN3 に組み込んだ FN3-L および FN3-H を調製し、同様に結合力を測定した結果、 K_D はそれぞれ 3700 nM あるいは 620 nM であった。つまり、重鎖 CDR 由来ペプチドのみ、あるいは軽鎖 CDR 由来ペプチドのみでは結合力は非常に弱いですが、これらを同時に組み込むことにより、結合力が飛躍的に高まることが明らかになった。

さらに詳細に結合様式を検証するために、HER2 と Multi-FLAP の複合体モデルを作成し、ドッキングシミュレーションを利用して組み込んだ残基の結合エネルギーを予測した。その結果、重鎖 CDR 由来ペプチドの方は大きな結合エネルギーを持っていたが、軽鎖 CDR 由来ペプチドのエネルギー的寄与は少ないことが示唆された。ELISA の結果と合わせると、申請者の仮説「結合エネルギー的には寄与が少なくても、複数の CDR にまたがって結合点を持つことで抗原認識領域が広がり、複合体形成に有利に働く」を支持する結果が得られた。

(4)Multi-FLAP の有用性評価

Multi-FLAP のモデルとして、分子サイズに近い HER2 結合 Nanobody (Nb) を使用し、先行論文で報告されているアルブミン結合ドメイン (ABD) を融合させた ABD-Nb を設計した。大腸菌発現系を用いて Nb および ABD-Nb を精製した。精製タンパク質の結合力を ELISA により測定したところ、Nb、ABD-Nb の HER2 への結合力は、それぞれ $K_D < 100$ pM と強く結合することが分かった。また、Nb はマウス由来アルブミンには結合しなかったが、ABD-Nb は $K_D < 100$ pM で強くアルブミンに結合した。

精製タンパク質を近赤外蛍光色素で標識し、イメージングプローブを作製した。続いて、HER2 を高発現するがん細胞株をヌードマウスに移植して担がんモデルマウスを作製し、作製したイ

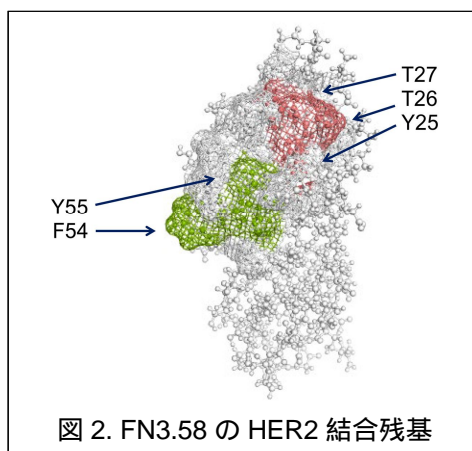
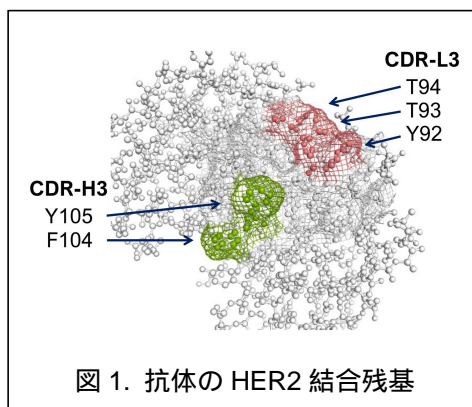


表 1. FN3 改変体の結合力解析

FN3改変体	K_D (nM)
FN3.38	380
FN3.58	58
FN3-L	3700
FN3-H	620

メーキングプローブを静脈投与して体内動態および腫瘍検出感度を生体蛍光イメージングで評価した (図 3)。その結果、ABD の融合によって小型抗原結合タンパク質の血中滞留性が向上し、腫瘍の検出感度が高まることが明らかになった。

(5)まとめ

本研究により、抗体代替分子開発における多点結合の重要性が明らかになった。この現象は 抗原認識領域の拡大による結合速度定数の向上と、分子内 avidity 効果による見かけの解離速度定数の減少に起因するのではないかと考えられる。今後、さらに変異体を増やして解析を進めることで、それぞれの寄与を詳細に検証していきたい。

また、ABD を融合して血中での分子サイズを大きくすることで、Multi-FLAP を長時間体内に滞留させることが可能になった。ABD とアルブミンの結合力を変化させることで ABD 融合タンパク質の滞留時間も変化することが報告されているため [6]、ABD 融合 Multi-FLAP の滞留時間も自在に調整できると示唆される。今後は具体的な治療標的に対して Multi-FLAP を開発し、診断薬、治療薬として高機能化を目指していきたい。

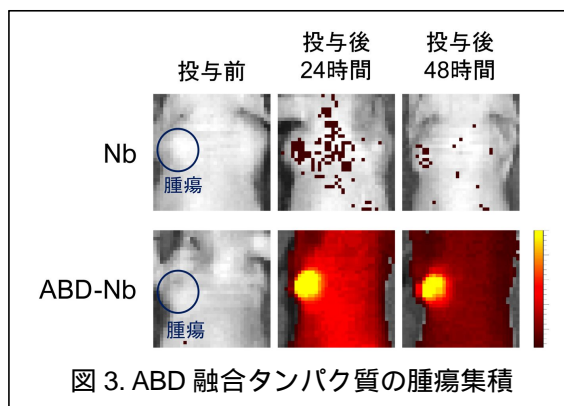


図 3. ABD 融合タンパク質の腫瘍集積

<引用文献>

- [1] *Nat Rev Drug Disc*, **5**, 147-159 (2006)
- [2] *Drug Discov Today*, **20(10)**, 1271-83 (2015)
- [3] *Front Immunol*, **4**, 302 (2013)
- [4] *Nat Biotechnol*, **18**, 194-198 (2000)
- [5] *PLoS One*, **9(8)**, e103397 (2014)
- [6] *Protein Eng Des Sel*, **28(10)**, 385-393 (2015)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yimchuen Wanaporn, Kadonosono Tetsuya, Ota Yumi, Sato Shinichi, Kitazawa Maika, Shiozawa Tadashi, Kuchimaru Takahiro, Taki Masumi, Ito Yuji, Nakamura Hiroyuki, Kizaka-Kondoh Shinae	4. 巻 10
2. 論文標題 Strategic design to create HER2-targeting proteins with target-binding peptides immobilized on a fibronectin type III domain scaffold	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 15154 ~ 15162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0RA00427H	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 See Kyra, Kadonosono Tetsuya, Ota Yumi, Miyamoto Kotaro, Yimchuen Wanaporn, Kizaka Kondoh Shinae	4. 巻 15
2. 論文標題 Reconstitution of an Anti HER2 Antibody Paratope by Grafting Dual CDR Derived Peptides onto a Small Protein Scaffold	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 2000078 ~ 2000078
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/biot.202000078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kadonosono Tetsuya, Yimchuen Wanaporn, Ota Yumi, See Kyra, Furuta Tadaomi, Shiozawa Tadashi, Kitazawa Maika, Goto Yu, Patil Akash, Kuchimaru Takahiro, Kizaka-Kondoh Shinae	4. 巻 10
2. 論文標題 Design Strategy to Create Antibody Mimetics Harboring Immobilised Complementarity Determining Region Peptides for Practical Use	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 891
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-57713-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kadonosono Tetsuya, Kizaka-Kondoh Shinae	4. 巻 140
2. 論文標題 Semi-rational Design of Target-binding Small Proteins for Cancer Treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 159 ~ 162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.19-00187-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 門之園 哲哉
2. 発表標題 抗体構造情報を利用した分子標的ペプチドの創製
3. 学会等名 日本薬学会第141回大会シンポジウム『中分子創薬研究のフロンティア：生体分子を標的とした機能性ペプチドの創製』（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 門之園 哲哉
2. 発表標題 スマートデザインによる高性能標的結合の創製
3. 学会等名 日本農薬学会第46回大会シンポジウム『生物と化学のはざままで』（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tetsuya Kadonosono
2. 発表標題 Novel biopharmaceuticals for molecular target therapy of cancer. In silico design and evaluation of biopharmaceuticals
3. 学会等名 RWTH-Tokyo Tech Joint Workshop『In silico, AI, AR in Life Science』（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kyra See, Tetsuya Kadonosono, Kotaro Miyamoto, Wanaporn Yimchuen, Shinae Kizaka-Kondoh
2. 発表標題 Double-CDR grafting for the development of small HER2-targeting proteins
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 門之園 哲哉
2. 発表標題 スマートデザインによる抗原結合小型タンパク質FLAPの創製
3. 学会等名 Yokohama Scientists Spotlight (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kyra See, Tetsuya Kadonosono, Kotaro Miyamoto, Wanaporn Yimchuen, Shinae Kizaka-Kondoh
2. 発表標題 Development of small HER2-binding proteins by paratope reconstitution
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tetsuya Kadonosono
2. 発表標題 A smart design of target-binding small proteins for molecular target therapy
3. 学会等名 第58回生物物理学会年会シンポジウム『Biomolecular Design to Control their Functions』(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 門之園 哲哉
2. 発表標題 スマートデザインによる抗体医薬代替小型タンパク質の創製
3. 学会等名 第93回日本生化学会シンポジウム『化学で攻める新しい創薬のカタチ』(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 門之園 哲哉
2. 発表標題 構造計算による抗原結合小型タンパク質デザインと創薬研究
3. 学会等名 生物工学フォーラム『情報解析が切り拓く創薬・生物工学研究の新展開』（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kyra See, Tetsuya Kadonosono, Wanaporn Yimchuen, Shinae Kizaka-Kondoh
2. 発表標題 Double-CDR grafting for the development of small HER2-targeting proteins
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 門之園 哲哉
2. 発表標題 標的結合ペプチドを利用する小型タンパク質医薬デザイン
3. 学会等名 第2回モダリティ創薬デザイン研究会シンポジウム『成長するモダリティ創薬の展望』（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門之園 哲哉
2. 発表標題 抗体医薬の代替となる小型タンパク質の半合理デザイン
3. 学会等名 第71会日本生物工学会 シンポジウム『タンパク質工学におけるドライ-ウェット技術融合の新展開』（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Kadonosono
2. 発表標題 A design strategy for generating cancer marker-binding small proteins
3. 学会等名 Nano-Bio Research-Industry International Symposium 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門之園 哲哉
2. 発表標題 標的結合ペプチドを搭載した小型タンパク質FLAPのデザイン
3. 学会等名 第51回若手ペプチド夏の勉強会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Kadonosono, Wanaporn Yimchuen, Kyra See, and Shinae Kizaka-Kondoh
2. 発表標題 A design strategy for developing practical antibody mimetic small proteins for cancer therapy
3. 学会等名 25th Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Kadonosono, Kyra See, Wanaporn Yimchuen, Shinae Kizaka-Kondoh
2. 発表標題 A design strategy for creating a small and high-affinity antibody mimetics by double-CDR grafting
3. 学会等名 11th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wanaporn Yimchuen, Tetsuya Kadonosono, Shinichi Sato, Takahiro Nomoto, Kyra See, Hiroyuki Nakamura, Nobuhiro Nishiyama, and Shinae Kizaka-Kondoh
2. 発表標題 Development of photoimmunotherapy probe using a small antibody mimetic with structurally constrained anti-HER2 CDR peptides
3. 学会等名 11th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kyra See, Tetsuya Kadonosono, Wanaporn Yimchuen, Shinae Kizaka-Kondoh
2. 発表標題 Development of a small anti-HER2 antibody mimetic by double-CDR grafting
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kyra See, Tetsuya Kadonosono, Wanaporn Yimchuen, Shinae Kizaka-Kondoh
2. 発表標題 Design of a small and high-affinity anti-HER2 antibody mimetic by double-CDR grafting
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------