

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04535

研究課題名(和文)細胞内の創薬ターゲットに対するがん細胞選択的な膜透過抗体医薬の開発

研究課題名(英文) Development of cancer cell-selective membrane-permeable antibodies against intracellular disease targets

研究代表者

土居 信英 (Doi, Nobuhide)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授

研究者番号：50327673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者らが発見したヒト由来の膜透過促進ペプチドと、独自のmRNAディスプレイ法による小型抗体やペプチドリガンドの試験管内選択技術を利用して、これまでバイオ医薬の創薬ターゲットにできなかった細胞内の疾患標的を対象とする画期的な抗がん剤の開発のための要素技術を確立した。まず、mRNAディスプレイ法により、がん細胞表面マーカーまたは細胞内疾患標的に結合するヒトVH単ドメイン抗体を創出した。これらをヒト由来膜透過促進ペプチドと組み合わせることで、バイオ医薬モデルとしてのタンパク質、ペプチド、核酸を細胞選択的に細胞内送達することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで創薬ターゲットとすることが困難であった('undruggable')がん細胞内の疾患標的に対するバイオ医薬を、がん細胞選択的に細胞内に送達させることで、2重の鍵をもつきわめて副作用の少ないバイオ医薬を開発するための創薬プラットフォームを確立することが期待できる。従来の抗体医薬による細胞外のターゲットだけではなく、「細胞内に広がっている未開の領域」を新たに創薬ターゲットとすることが可能になれば、我が国のバイオ創薬技術の基盤強化、ひいては国民の医療・福祉の向上に多に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, by using human-derived membrane permeation-enhancing peptides that we discovered and our mRNA display technology for in vitro selection of fragment antibodies and ligand peptides, we established elemental technologies for the development of revolutionary anticancer drugs that target intracellular targets that have not been targeted for biopharmaceuticals.

First, using the mRNA display method, we created human VH single-domain antibodies that bind to marker proteins on the surface of cancer cells or intracellular disease targets. By combining these antibodies with the human-derived membrane permeation-enhancing peptides, we succeeded in cell-selective delivery of proteins, peptides and nucleic acids as biopharmaceutical models.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：蛋白質 核酸 癌 バイオテクノロジー 共焦点顕微鏡

### 1. 研究開始当初の背景

標的分子に対して高い特異性と親和性をもつ抗体医薬・ペプチド医薬などのバイオ医薬は、従来の小分子化合物医薬と比べて副作用が少なく治療効果が高い究極の分子標的薬として注目されているが、膜透過性が低いという欠点があり、ターゲットは細胞外の分子に限られていた。これまでに HIV1 由来の TAT (*Science* 285, 1569, 1999) やポリアルギニンなどのカチオン性ペプチドを融合することで抗体やペプチドを細胞内に輸送した例はあり、実際に TAT を融合したペプチド医薬の臨床試験も複数進行中であるが (*Trends Pharmacol. Sci.* 38, 406, 2017)、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれた後、エンドソームから細胞質への離脱効率が低いという課題があり実用化には至っていない。一方、我々は、TAT ペプチドを連結した GFP などのタンパク質のエンドソーム離脱効率を数十倍向上させる膜透過促進ペプチド S19 を、ヒト胎盤形成時の栄養膜融合に関与するタンパク質 Syncytin1 より発見したが (*J. Control. Release* 255, 1, 2017)、TAT を介したエンドサイトーシスでは、細胞選択性が低いという課題がまだ残されていた。そこで、TAT の代わりに、細胞表面の LDL 受容体と特異的に結合し酸性のエンドソーム内では受容体から解離する pH 応答性ペプチドリガンドを膜透過促進ペプチド S28 や S39 と組み合わせることで、受容体発現細胞選択的なタンパク質のデリバリーが可能となることを見出していた。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、このヒト由来膜透過促進ペプチドを利用した細胞選択的なタンパク質デリバリー技術を応用して、これまでバイオ医薬の標的とするのが困難であった細胞内の疾患標的に作用する、がん細胞選択的な膜透過抗体医薬を開発することを目的とした。具体的には、①がん細胞表面マーカーを特異的に認識するための pH 応答性小型抗体またはペプチド、②膜透過促進ペプチド、および、③バイオ医薬としての小型ドメイン抗体 (またはペプチド、核酸) という 3 つのパーツを創出・最適化して連結し (図1上)、この連結体が、図1下に示すように、①がん細胞選択的にエンドサイトーシスで内部移行し、②膜透過促進ペプチドの作用によりエンドソームを効率よく離脱し、③バイオ医薬が細胞内の疾患標的に作用することを検証した。

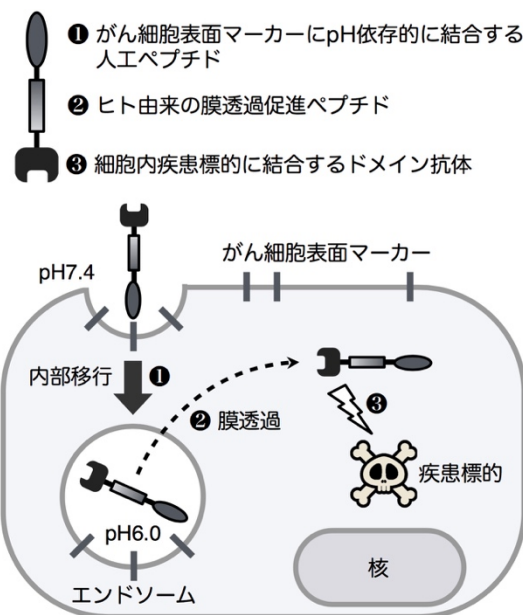


図1:がん細胞選択的膜透過抗体医薬の原理

### 3. 研究の方法

(1) 細胞表面受容体に pH 依存的に結合する小型抗体や、細胞内の還元的な環境で疾患標的に結合できる小型ドメイン抗体を、独自の mRNA ディスプレイ法 (図2) (*Nucleic Acids Res.* 34, e127, 2006; *Nucleic Acids Res.* 37, e147, 2009; *J. Biochem.* 159, 519, 2016) を用いた試験管内選択により創出した。

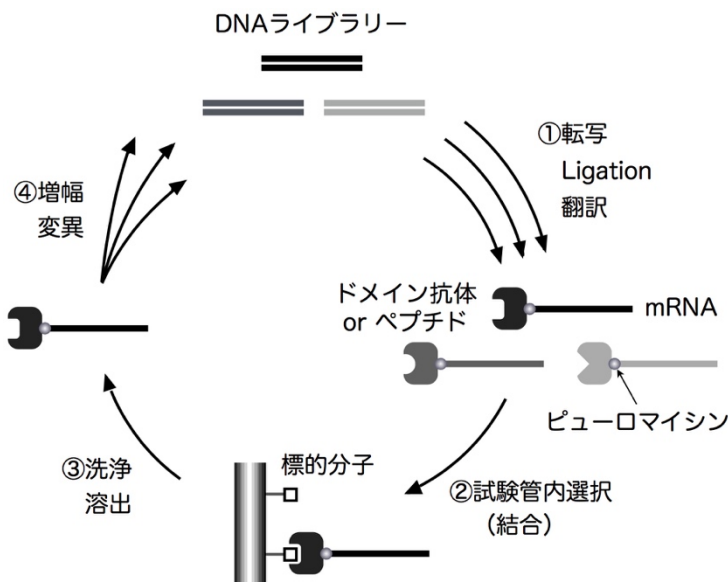


図2:mRNA ディスプレイ法による小型ドメイン抗体/ペプチドの試験管内選択の原理

①ピューロマイシンを連結した mRNA を鋳型として無細胞翻訳を行うことで、タンパク質とそれをコードする mRNA を連結する。この連結分子ライブラリーを、②ビーズに固定した標的分子 (細胞内の疾患標的、または、細胞表面マーカーの細胞外ドメインなど) と結合させ、③洗浄・溶出後、④連結分子の mRNA 部分を逆転写 PCR により増幅する。この①~④の工程を数ラウンド繰り返した後、最終的に濃縮された抗体/ペプチドの遺伝子の塩基配列を決定する

(2) 得られた小型抗体やペプチドと膜透過促進ペプチドを融合したタンパク質を大腸菌で大量発現・精製し、ヒト培養細胞の培地に添加して、細胞内局在を共焦点顕微鏡で観察した。また、細胞質における活性を確認するために、細胞生存率を WST-1 アッセイで、カスパーゼの切断をウェスタンブロットで、細胞内 mRNA 量を RT-qPCR で測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 様々ながん細胞で高発現している上皮成長因子受容体 (EGFR) を認識する pH 応答性の V<sub>H</sub> 単ドメイン抗体を mRNA ディスプレイ法 (図2) により試験管内選択することに成功し、ELISA による 2 次スクリーニングをおこなった結果、pH7.4 よりも pH5.5 で EGFR への結合活性が低下する抗体クローン 5R3mut を取得することができた (図3A)。得られた抗体と膜透過促進ペプチド S39 を蛍光タンパク質 eGFP または mCherry に融合したタンパク質を大腸菌で発現・精製し、EGFR を発現している HeLa 細胞と発現していない HEK293T 細胞に添加した結果、EGFR 発現細胞選択的な融合タンパク質の取り込みを確認することができた (図3B)。

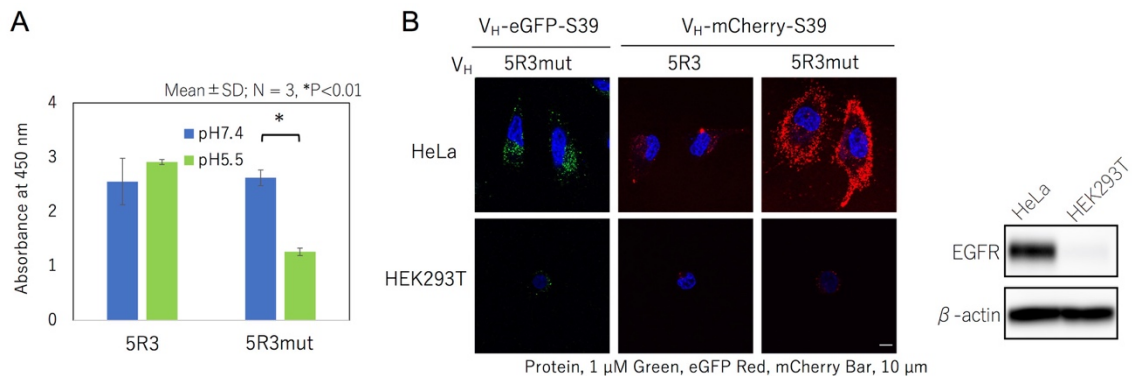


図3: pH 応答性小型抗体の創出およびがん細胞選択的タンパク質デリバリーへの応用

(2) ペプチド医薬のモデルとして、アポトーシス誘導ペプチド KLA を細胞選択的に細胞質に送達させるために、膜透過促進ペプチド S39 を LDL 受容体結合ペプチド ApoE21 とともにアポトーシス誘導ペプチドに融合したタンパク質を大腸菌で大量発現・精製し、ヒト培養細胞に添加したところ、これらをすべて組み合わせた場合にのみ細胞生存率の減少が観察され (図4A)、アポトーシス誘導によるカスパーゼの切断も確認された (図4B)。また、膜透過促進ペプチド S39 によって細胞内送達が進められることも確認できた (図4C)。さらに、LDL 受容体 (LDLR) に対する siRNA でノックダウンすることで、融合タンパク質の細胞内送達とカスパーゼの切断が LDLR 発現細胞選択的であることも確認できた (図4D)。

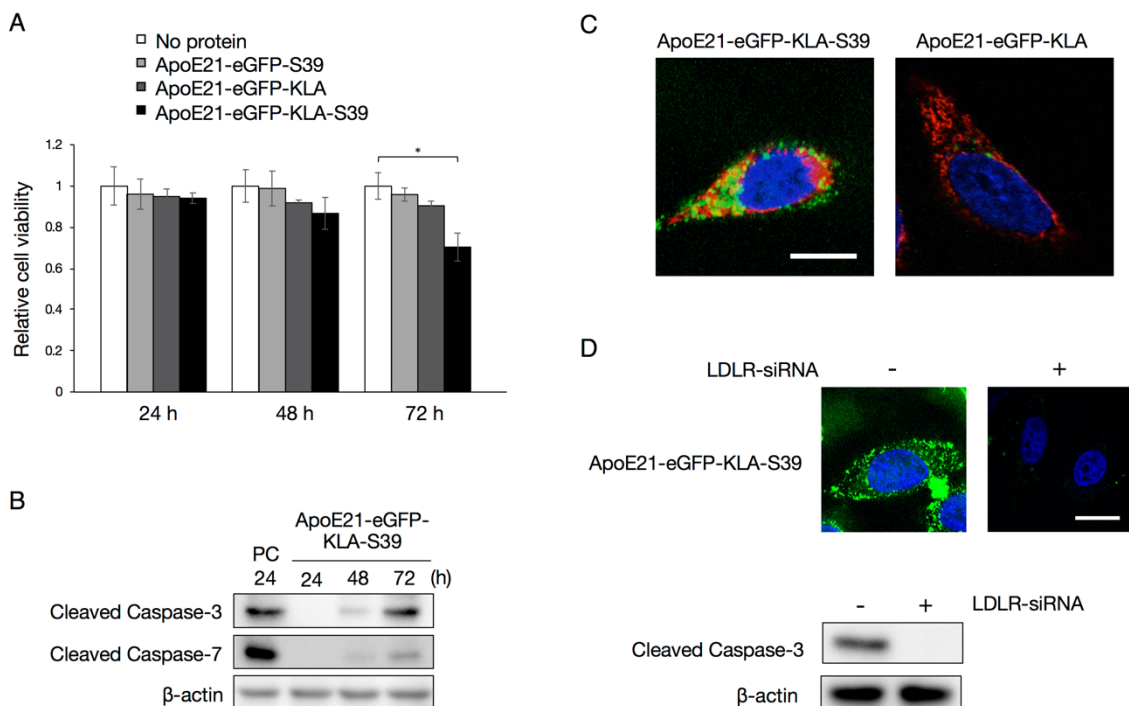


図4: アポトーシス誘導ペプチドの細胞選択的な細胞質送達

(3) 抗アンドロゲン剤抵抗性前立腺がんに対する抗体医薬として、当研究室で作製済みのアンドロゲン受容体スプライスバリエント 7 (AR-V7) に対する小型ドメイン抗体に、受容体結合ペプチドおよび膜透過促進ペプチドを核移行配列とともに融合したタンパク質を大腸菌で大量発現・精製し、前立腺がん由来 LNCaP 細胞に添加した結果、十分な核局在がみられなかった。そこで、抗体医薬だけではなく同じ標的に対する核酸医薬についても並行して検討することでリスクヘッジすることを計画した。まず、核酸医薬として、AR-V7 に対する siRNA と Ago2 タンパク質との RNA-タンパク質複合体を細胞質に効率よく送達させるために、膜透過促進ペプチドを融合した Ago2 タンパク質を昆虫細胞で大量発現・精製し、これをキャリアとして AR および AR-V7 遺伝子の共通部分配列に対する siRNA との複合体を形成させ、LNCaP 細胞に添加した。その結果、膜透過促進ペプチドを融合した Ago2 が LNCaP 細胞の細胞質に効率よく送達し、標的遺伝子が従来法よりも迅速にノックダウンされることを RT-qPCR により確認できた (図5) (*J. Nanobiotechnol.* 20, 458, 2022)。

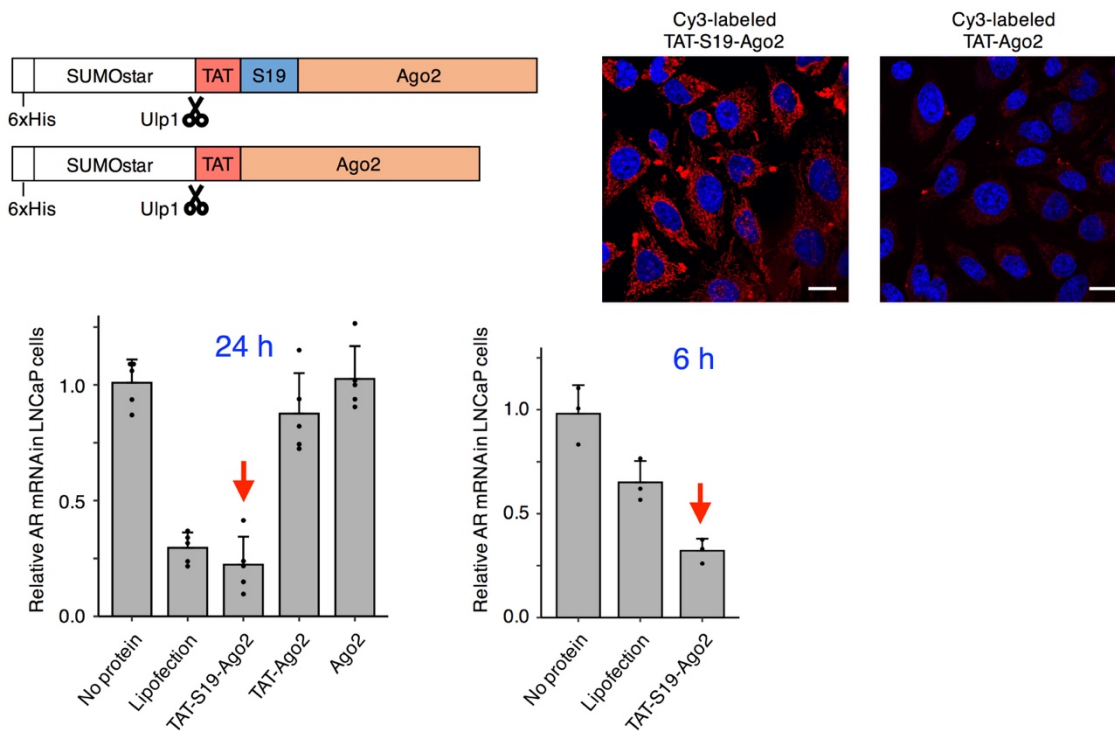


図5: 膜透過促進ペプチドによる Ago2 タンパク質・siRNA 複合体の迅速な細胞質デリバリー

(4) 最後に、本手法の汎用性を示すために、undruggable な疾患標的として代表的な MYC に結合する小型抗体や、細胞表面マーカーとして肝細胞特異的に発現しているアシアロ糖タンパク質受容体 (ASGR) に結合する小型抗体も mRNA ディスプレイ法 (図2) により取得した。さらに、膜透過促進ペプチド S28 と ASGR 抗体を組み合わせることで、ペプチド医薬の肝細胞選択的なデリバリーに成功した (*J. Biol. Chem.* 298, 102097, 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura, M., Fujiwara, K., Doi, N.	4. 巻 20
2. 論文標題 Cytoplasmic delivery of siRNA using human-derived membrane penetration-enhancing peptide.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nanobiotechnology	6. 最初と最後の頁 458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12951-022-01667-4	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 Ide, M., Tabata, N., Yonemura, Y., Shirasaki, T., Murai, K., Wang, Y., Ishida, A., Okada, H., Honda, M., Kaneko, S., Doi, N., Ito, S., Yanagawa, H.	4. 巻 298
2. 論文標題 Guanine nucleotide exchange factor DOCK11-binding peptide fused with a single chain antibody inhibits Hepatitis B Virus infection and replication.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102097	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 Suzuki, M., Iwaki, K., Kikuchi, M., Fujiwara, K., Doi, N.	4. 巻 586
2. 論文標題 Characterization of the membrane penetration-enhancing peptide S19 derived from human syncytin-1 for the intracellular delivery of TAT-fused proteins.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 63-67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.11.065	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 加藤里花子, 藤原慶, 土居信英
2. 発表標題 PURE mRNAディスプレイ法によるヒトVH単ドメイン抗体ライブラリーの試験管内選択
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（幕張メッセ）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野崎智嗣, 津川仁, 鈴木秀和, 藤原慶, 土居信英
2. 発表標題 PURE mRNAディスプレイ法によるアクチンキャップタンパク質CAPZA1に結合するヒト単一ドメイン抗体の試験管内選択
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (幕張メッセ)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kumeno, Y., Sudo, K., Fujiwara, K., Doi, N.
2. 発表標題 Second extracellular loop of human CD9 is a cell-penetrating peptide.
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (オンライン開催) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Furuya, T., Fujiwara, K., Doi, N.
2. 発表標題 Application of human syncytin1-derived fusogenic peptide to direct intracellular delivery of Cas9 protein-gRNA complex.
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (オンライン開催) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 明石尚之, 清野真梨子, 藤原慶, 土居信英
2. 発表標題 がん細胞選択的DDSに向けたEGFRに対する環境応答性単一ドメイン抗体の創出
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (横浜)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前村帆南, 藤原慶, 土居信英
2. 発表標題 細胞選択的なタンパク質デリバリーのためのヒト・シンシチン1由来膜透過促進ペプチドの最適化
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (オンライン開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂田陸郎, 津川仁, 鈴木秀和, 藤原慶, 土居信英
2. 発表標題 CAPZA1過剰発現細胞を標的とした強制的オートファジー誘導タンパク質の開発
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (オンライン開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古屋智規, 藤原慶, 土居信英
2. 発表標題 膜透過性ペプチドを用いたCas9タンパク質-gRNA複合体の直接的な細胞内送達
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (オンライン開催)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ヒト由来膜透過促進ペプチドによって短鎖干渉RNAを簡単に早く細胞質に送達  
<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2022/11/1/28-133025/>

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
研究 分 担 者	藤原 慶  (Fujiwara Kei)  (20580989)	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・准教授     (32612)	

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