

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06516

研究課題名（和文）免疫チェックポイントを阻害する、人工抗体分子の迅速設計と調製

研究課題名（英文）Rapid design and preparation of artificial antibodies to inhibit immune checkpoints

研究代表者

宮武 秀行（Miyatake, Hideyuki）

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員

研究者番号：50291935

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：がんは1980年代から、我が国の死亡原因の第1位である。近年、急速な高齢化に伴い、その患者数は増え続けている。がんの治療方法としては、手術、抗がん剤、放射線療法が3本の柱であったが、近年、本庶佑教授らが開発した、オプジーボなどによる、がん免疫療法が第4の柱となりつつある。一方、オプジーボなどは抗体医薬品であり、高額な薬価、低侵襲性、さらに予想外の免疫原性などが問題となっている。そこで、研究代表者等は、オプジーボを代替する、人工抗体タンパク質および低分子化合物の調製に取り組んだ。その結果、免疫チェックポイント阻害効果を持つ、候補薬剤の調製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オプジーボなどのモノクローナル抗体薬は、免疫チェックポイント阻害剤としてだけでなく、抗がん剤や、最近では、アルツハイマーの治療にも使われている。一方、モノクローナル抗体薬は、製造コストが高いため、一般に薬価は高額であり、国の健康医療保険制度に負担をかけている。そのため、本研究で成功した手法により、モノクローナル抗体医薬品を代替できるようになれば、薬価を抑え、医療コストの抑制につながることを期待できる。これは、国の医療制度の持続可能性を高めることにつながる。

研究成果の概要（英文）：Since the 1980s, cancer has consistently been the leading cause of death in our country, and it is said that one in two citizens will suffer from it in their lifetime. Furthermore, with rapid aging, the number of patients continues to increase. The mainstays of cancer treatment have been surgery, chemotherapy, and radiotherapy, but in recent years, cancer immunotherapy, such as OPDIVO developed by Professor Honjo and others, is becoming the fourth pillar. On the other hand, drugs like OPDIVO are antibody medicines and are problematic due to their high cost, minimally invasive nature, and unexpected immunogenicity. Therefore, the lead researchers tackled the preparation of artificial antibody proteins and small molecule compounds as alternatives to OPDIVO, using an in-silico/in-cell hybrid selection method. As a result, we succeeded in preparing candidate drugs with immune checkpoint inhibition effects.

研究分野：構造生物化学、計算機構造創薬

キーワード：免疫チェックポイント PD-1/PD-L1 人工抗体タンパク質 低分子阻害剤 in-silicoスクリーニング 抗がん剤

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

モノクローナル抗体医薬品は、副作用が少ない分子標的薬として注目を集めている一方、その製造過程が複雑であるため、薬価が非常に高額になることが問題点の一つである。PD-1/PD-L1 免疫チェックポイントを阻害するモノクローナル抗体は、がん免疫療法として成功を収めているが、その高コストと、大きな分子サイズによる低浸透性が課題となっている。本研究では、これらの問題を解決するために、より小さく、コスト効率の良い人工抗体タンパク質医薬品の開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が考案した手法である、in-silico/in-cell 複合選択法により、以下の2つの目標を達成することである。

(1) PD-1 タンパク質の高親和性変異体の調製：

PD-1/PD-L1 相互作用を競合的に阻害する新規非モノクローナル抗体薬を開発することを目指す。具体的には、インシリコ変異導入と細胞内タンパク質-タンパク質相互作用アッセイを組み合わせ合わせた手法を用いて、高親和性 PD-1 変異体を開発する。

(2) mTORC1 阻害剤の開発：

PD-1/PD-L1 で確立したインシリコ創薬を、さらに、インシリコおよびインセル複合選択法に発展させ、これにより、mTORC1 の新規阻害剤を開発する。mTORC1 はセリン・トレオニンキナーゼの一種で、細胞成長や代謝を制御する重要なタンパク質複合体であり、その阻害はがん治療において重要な戦略の一つである。ラパマイシンは、mTORC1 をピンポイントで阻害することが知られているが、同時に免疫細胞も抑制するため、抗がん剤としての効果は限定的である。そこで、本研究では、免疫細胞への影響が少なく、mTORC1 を精密に阻害する新規化合物の開発を試みる。

3. 研究の方法

免疫チェックポイント PD-1/PD-L1 を阻害する、高親和性 PD-1 変異体を、図1の方法で調製した。まず、PD-1/PD-L1 複合体結晶構造 (PDB: 4ZQK) を用いて、相互作用に関わる PD-1 のアミノ酸残基を特定した。それらのアミノ酸残基に、インシリコで変異を導入し、PD-1 と PD-L1 の相互作用を強める候補変異を選びだした (in silico 選択)。次に、NanoBit 技術を用いて、各 PD-1 変異体実際に PD-L1 と結合が強くなるか、細胞内発光測定により確かめた (in-cell 選択)。選びだした変異を PD-1 に導入し、変異体を調製して、免疫チェックポイント阻害活性などを測定した。

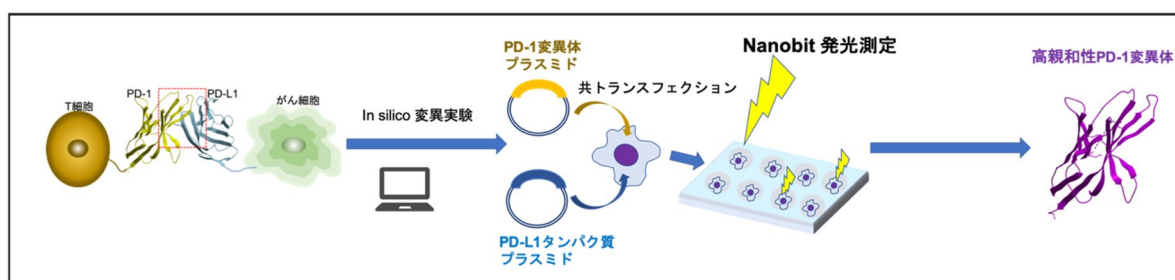


図1：In silico 変異実験と細胞内発光アッセイ (in silico/in-cell 複合選択法) を用いた高親和性 PD-1 変異体の調製。

さらに、in silico/in-cell 複合選択法を用いて、セリン・トレオニンキナーゼである mTORC1 阻害剤の開発も試みた (図2)。mTORC1 の、ラパマイシン・FKBP12 結合部位である FRB との 3 量体結晶構造 (PDB: 1FAP) を ICM-Pro 内にダウンロードし、ラパマイシンをドッキングテンプレートとして、リガンドデータベース ZINC15 から選んだ、約 70 万種類のリガンドのドッキングを行った (in silico 選択)。さらに、細胞内アッセイ (in cell 選択) により、目的タンパク質を精製することなく、FRB と FKBP12 の会合を促す化合物を選びだした。最終的に WRX606 を選び出し、これを用いて、細胞実験および動物実験で抗がん効果を調べた。

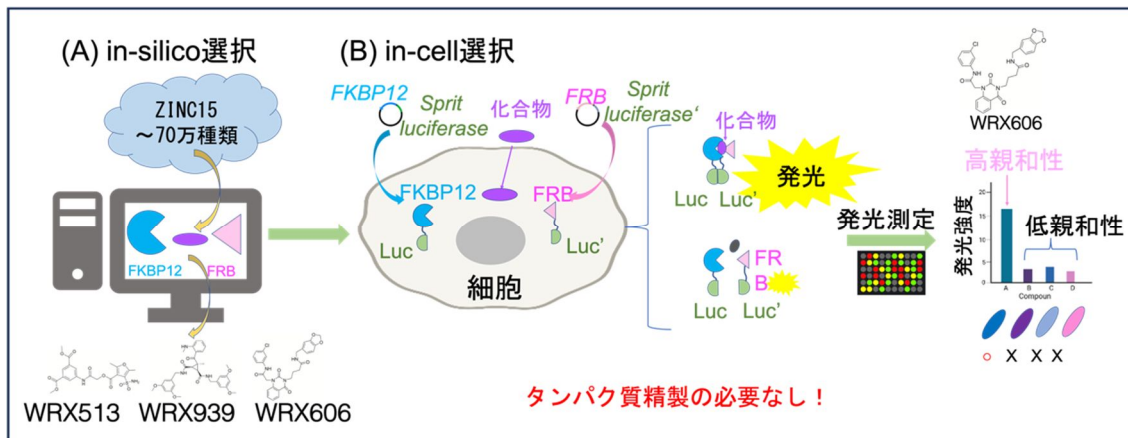


図 2 : In silico 変異実験と細胞内発光アッセイ (in silico/in-cell 複合選択法) を用いた、mTORC1 阻害剤の開発。

4. 研究成果

ICM-Pro を使用した in silico 変異解析により、PD-L1 との相互作用を強める可能性のある PD-1 変異体を選択した (図 3)。In-cell 選択により、A132V、Y76Y 変異体がそれぞれ、PD-L1 との相互作用を強めることが分かった (図 4A)。そこで、これらの 2 変異を導入した 2-PD-1 のプラスミドを調製し、in-cell 解析を行ったところ、PD-L1 と最大の結合力が得られることが分かった (図 4B)。そこで、2-PD-1 タンパク質を実際に調製し、AlphaLISA 測定を行った結果、PD-1/PD-L1 の結合阻害活性が野生型 PD-1 と比較して 100 倍ほど強まっていることが分かった (図 3C)。また、T 細胞の再活性化活性は、野生型 PD-1 と比較して、約 20 倍増加していることが分かった (図 3D)。

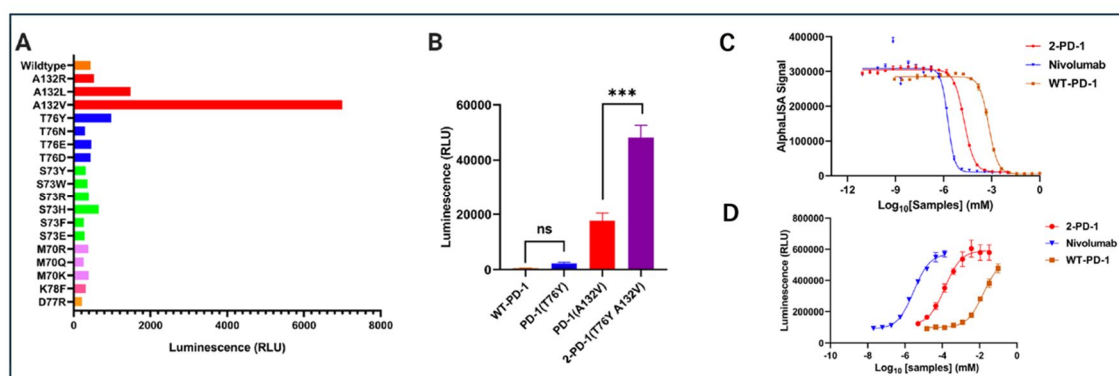
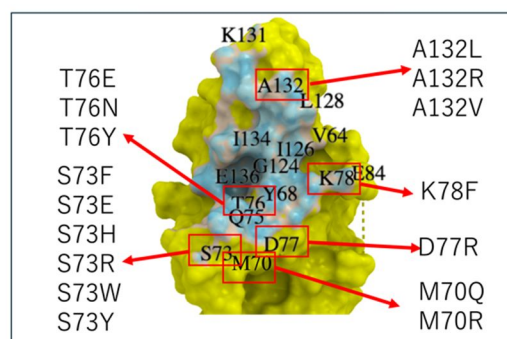


図 3 : 2-PD-1 (T76Y, A132V) の各種測定。(A) in-cell 選択による、変異体選択。(B) 2-PD-1 の in-cell 測定。(C) AlphaLISA による、WT-PD-1、Nivolumab (Opdivo)、2-PD-1 の PD-1/PD-L1 阻害活性測定。(D) 2-PD-1 の、T 細胞再活性化活性測定。

さらに、BLI 法 (バイオレイヤー干渉法) により、2-PD-1 と PD-L1 との結合 K_D を測定したところ、野生型と比較して、100 倍ほど強くなっていることが分かった (表 1)。

表 1: WT-PD-1 と 2-PD-1 の K_D 測定

samples	K_D (M)	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	χ^2
WT-PD-1	$1.04 \pm 0.02 \times 10^{-6}$	$2.11 \pm 0.03 \times 10^4$	$2.20 \pm 0.02 \times 10^{-2}$	0.85
2-PD1	$1.42 \pm 0.03 \times 10^{-8}$	$1.54 \pm 0.01 \times 10^5$	$2.23 \pm 0.02 \times 10^{-3}$	0.10

^a K_D , equilibrium dissociation constant; k_a , association rate constant; k_d , dissociation rate constant; χ^2 , calculated χ^2 of the fitted curve. The standard errors of K_D , k_a , and k_d are indicated.

これらの結果から、2-PD-1 は、免疫チェックポイント PD-1/PD-L1 を効果的に阻害し、T 細胞再活性化活性を持つ事がわかった。この研究成果は、ACS Chem. Biol. 誌に発表した (Ning, B. et al. ACS Chem. Biol. 16(2), 316-323, (2021))。

一方、mTORC1 阻害剤の開発では、in silico 選択の結果、3 種類の候補化合物が選択された (図 4) さらに、in-cell 選択の結果、WRX606 化合物のみが、FRB と FKBP12 と 3 量体を形成することが分かった。

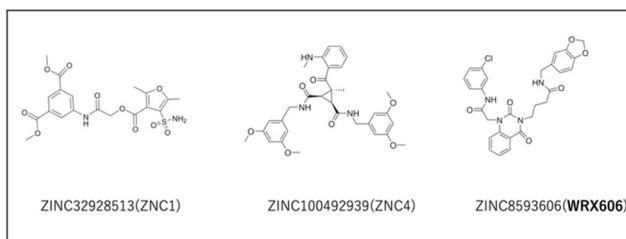


図 4 : in silico 選択による、候補化合物の同定。

WRX606 の in vitro アッセイを行うと、WRX606 は、mTORC1 のキナーゼ活性を、S6K1 だけでなく、4E-BP1 に対しても阻害することが分かった (図 5)。これは、S6K1 のみを阻害するラパマイシンよりも、高い阻害活性を持つことを意味する。

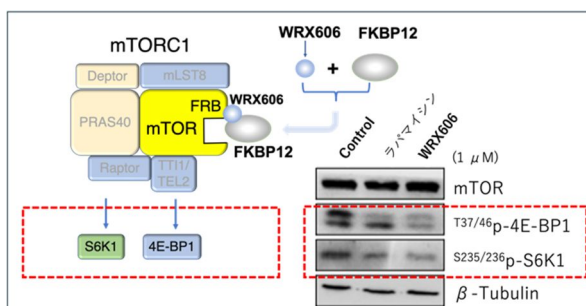


図 5 : WRX606 のキナーゼ阻害活性。WRX606 は、S6K1 および 4E-BP1 のキナーゼ活性を阻害した。一方、ラパマイシンは S6K1 のみを阻害した。

さらに、HeLa 細胞を用いた細胞実験により、WRX606 は、がん細胞に特異的に作用して殺傷し、正常細胞にはほとんど作用しないことが分かった (図 6)。

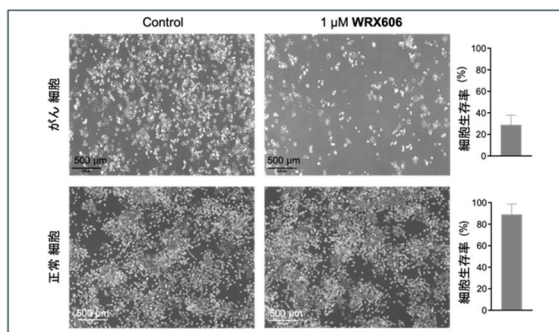


図 6 : WRX606 の抗がん作用。がん細胞 (HeLa) に特異的に作用し、正常細胞にはほとんど作用しなかった。

さらに、胆がんマウスを使った動物実験で、WRX606 はラパマイシンよりも高い抗腫瘍効果を示し、ラパマイシンよりも肺へのがん細胞の転移も少なかった。これにより、WRX606 は、がん細胞の転移がラパマイシンよりも少ない、より効果的な抗がん剤であることが分かった (図 7)。以上の研究成果は、*J. Med. Chem* 誌に発表した (Shams, R. et al. *J. Med. Chem.* 65(2), 1329-1341, (2022))。

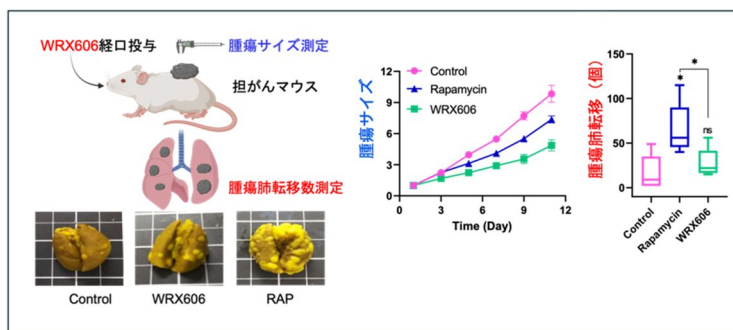


図 7 : 胆がんマウスによる動物実験。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shams Raef, Ito Yoshihiro, Miyatake Hideyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Development of an RHEB-Targeting Peptide To Inhibit mTORC1 Kinase Activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 23479 ~ 23486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.2c01865	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 Shams Raef, Ito Yoshihiro, Miyatake Hideyuki	4. 巻 232
2. 論文標題 Mapping of mTOR drug targets: Featured platforms for anti-cancer drug discovery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmacology&Therapeutics	6. 最初と最後の頁 108012 ~ 108012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pharmthera.2021.108012	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 Ning Boyang, Ren Xueli, Hagiwara Kyoji, Takeoka Shinji, Ito Yoshihiro, Miyatake Hideyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Development of a Non-IgG PD-1/PD-L1 Inhibitor by in Silico Mutagenesis and an In-Cell Protein-Protein Interaction Assay	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 316 ~ 323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.0c00817	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 該当する
1. 著者名 Shams Raef, Matsukawa Akihiro, Ochi Yukari, Ito Yoshihiro, Miyatake Hideyuki	4. 巻 65
2. 論文標題 In Silico and In Cell Hybrid Selection of Nonrapalog Ligands to Allosterically Inhibit the Kinase Activity of mTORC1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 1329 ~ 1341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.1c00536	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 該当する

1. 著者名 Shams Raef, Ito Yoshihiro, Miyatake Hideyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Evaluation of the Binding Kinetics of RHEB with mTORC1 by In-Cell and In Vitro Assays	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8766 ~ 8766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22168766	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 該当する

1. 著者名 Shams Raef, Ito Yoshihiro, Miyatake Hideyuki	4. 巻 232
2. 論文標題 Mapping of mTOR drug targets: Featured platforms for anti-cancer drug discovery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 108012 ~ 108012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pharmthera.2021.108012	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 該当する

1. 著者名 Boyang Ning, Xueli Ren, Kyoji Hagiwara, Shinji Takeoka, Yoshihiro Ito, and Hideyuki Miyatake	4. 巻 16(2)
2. 論文標題 Development of a Non-IgG PD-1/PD-L1 Inhibitor by in Silico Mutagenesis and an In-Cell Protein-Protein Interaction Assay	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 316-323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.0c00817	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 該当する

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Shams Raef, 松川 昭博, 越智 由香里, 伊藤 嘉浩, 宮武 秀行
2. 発表標題 mTORC1のキナーゼ活性をアロステリックに阻害する非ラパログリガンドのin silicoおよびin cellハイブリッド選択
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 新規なmTORC1阻害作用を有する化合物を含む、制癌剤、発がん抑制剤および寿命延長剤	発明者 宮武秀行、他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-160450	出願年 2023年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 新規なmTORC1阻害作用を有する化合物を含む、制癌剤、発がん抑制剤および寿命延長剤	発明者 2020	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-160450	出願年 2020年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 新規なmTORC1阻害作用を有する化合物を含む、制癌剤、発がん抑制剤および寿命延長剤	発明者 宮武秀行	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-160450	出願年 2020年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 5. 新規なmTORC1阻害作用を有する化合物を含む、制癌剤、発がん抑制剤および寿命延長剤	発明者 宮武秀行、伊藤嘉 浩、Raef Shams、松 川 昭博	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT-JP2021-035038	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

伊藤ナノ医工学研究室 http://www2.riken.jp/nano-med.eng.lab/publications.html

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
---------	---------