

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 1 月 17 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510273

研究課題名(和文) 後続バイオ医薬品開発を目指した環状化サイトカインの分子設計と合成

研究課題名(英文) molecular design and synthesis of cyclized cytokines for biobetter development

研究代表者

本田 真也 (HONDA, Shinya)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・副研究部門長

研究者番号：50344122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ医薬品として認可済みのサイトカインタンパク質の生体内安定性を向上させたバイオベター型後続バイオ医薬品の開発を目指して、同タンパク質を構成するポリペプチド主鎖の両末端をアミド結合で連結した環状化サイトカインを合成し、その機能と構造に関する *in vitro* 分子特性を評価した。その結果、環状化サイトカインのレセプター結合活性および細胞増殖活性は野生型と同等であり、かつその構造安定性とプロテアーゼ分解耐性は野生型より優れたものであることが明らかになった。これは、当該分子があらたなバイオ医薬品として有望な創薬シーズであることを示すものである。

研究成果の概要(英文)：Aiming at the development of 'biobetter' medicines that are improved in metabolic stability than the cytokine proteins which had been already approved as pharmaceutical molecules, we synthesized new cyclic protein in which the both ends of its polypeptide backbone are connected to each other with amide bond and analyzed its functional and structural characteristics. As a result, receptor binding activity of the cyclized cytokine and its cell proliferation activity were found to be equal to a wild type cytokine. Moreover, it has been demonstrated that the thermal stability and protease tolerance are superior to the wild type. This shows that the molecule are promising a lead compound in drug discovery for new biologics.

研究分野：複合新領域

キーワード：蛋白質 蛋白質工学 バイオ医薬品 バイオテクノロジー 分子設計

1. 研究開始当初の背景

バイオベター型後続バイオ医薬品の開発において必要とされるのが、治療効果が実証されたタンパク質の作用機序に影響を及ぼすことなく、医薬品として望まれる分子特性を合理的に改善させる分子設計技術である。そこで、本申請課題は、申請者らのこれまでの技術ポテンシャルを活用し、バイオ医薬品として認可済みのサイトカインタンパク質の薬物動態の改善を目指した分子改変研究を行う。当該サイトカインが有する生理活性を損なうことなく、かつ医薬品として求められる諸条件を失うことなく、その生体内安定性のみを向上させることができれば、患者負担を軽減させることができるからである。タンパク質分子の安定性を向上させるための分子工学的的方法論には、すでにいくつかの戦術が存在するが、医薬品の改変に際しては、安全性を含めた多岐に渡る複数の条件を満足しなければならない。例えば、安定化のための改変部位が抗原性増大の原因となってしまう、などの負の効果が生じてはならない。この点に鑑み、本研究では、分子改変による不測のリスクを極力低減させることを研究開発の第一指針に設定する。具体的には、最小限のアミノ酸配列の変化で立体構造の変位を最小限に留めつつ、構造安定性を大きく向上させる方法の完成を目指す。これを実現するための手段として、ポリペプチド主鎖の両末端を連結する分子環状化戦略を採用し、当該サイトカインへの適用を検討する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、バイオ医薬品として認可済みのサイトカインタンパク質の生体内安定性を向上させたバイオベター型後続バイオ医薬品の開発を目指して、同タンパク質を構成するポリペプチド主鎖の両末端をアミド結合で連結した環状化サイトカインを合成し、その機能と構造に関する *in vitro* 分子特性を評価することである。改変するサイトカインタンパク質には、顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte-colony stimulating factor; G-CSF)を採用した。G-CSFは、顆粒球産出の促進等の作用を持つサイトカインであり、ヒト組換え G-CSF はがん化学療法に伴う好中球減少症等の治療薬として広く利用されている。

3. 研究の方法

本研究は、以下の8項目に分けて段階的に遂行した。

- (1) 連結配列設計プログラムの開発
- (2) スプリットインテイン融合タンパク質発現ベクターの構築
- (3) 野生型サイトカインの合成と精製
- (4) 環状化サイトカインの合成と精製
- (5) 野生型サイトカインと環状化サイトカインのレセプター結合活性の測定
- (6) 野生型サイトカインと環状化サイトカ

インの熱安定性解析

- (7) 野生型サイトカインと環状化サイトカインの細胞増殖活性の測定
- (8) 野生型サイトカインと環状化サイトカインのプロテアーゼ分解耐性解析

4. 研究成果

(1) 連結配列設計プログラムの開発
連結部分のアミノ酸を最適な配列にするためのコンピュータプログラムを開発した。野生型サイトカインタンパク質の立体構造データを用いて、主鎖の両末端をストレス無くつなぐ適切なセグメント主鎖構造を複数抽出し、次いで、それぞれに対し任意の側鎖を発生させ、分子全体のエネルギーを評価した。エネルギー関数は Rosetta、側鎖の配向は CHOMP のライブラリ、配向探索は FASTER アルゴリズムを採用した。開発したプログラムを用いて、78種の候補の中から最適の連結配列(Gly-Ser)を決定した。

(2) スプリットインテイン融合タンパク質発現ベクターの構築

タンパク質を人為的に環状化するための手法として、スプリットインテインシステムによるプロテインスプライシング機構を採用し、本機構の反応を確実に進行させるため、Tavassoli らが開発した方法を参考に汎用発現ベクターを構築した。各々の遺伝子は、アミノ酸配列をもとにコドンをもとに最適化したうえ化学合成により調達した。

(3) 野生型サイトカインの合成と精製

環状化サイトカインの比較対象として用いる野生型サイトカインを合成した。野生型の DNA 配列のコドンと GC 含量を最適化した人工遺伝子を設計し、これを化学合成により調達した。この遺伝子を市販の高発現ベクターに挿入し、大腸菌を形質転換した。培養溶菌後の不溶性画分から、リフォールディング処理により目的物を回収し、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーで高純度に精製した。精製品を SDS-PAGE で分析し、相当する分子量の位置に単一バンドが表れることを確認した。

(4) 環状化サイトカインの合成と精製

前々項で作成した発現ベクターを用いて、環状化サイトカインを合成した。(1)の手法で末端配列を最適化した改変体(C163)に加えて、対象として末端配列の最適化なしに環状化のみを施した改変体(C177)を合成、精製した。野生型サイトカインの大腸菌発現と同様の方法で形質転換、培養、溶菌、リフォールディング、クロマトグラフィー精製、同定を行った。スプリットインテインの脱離を SDS-PAGE でチェックすることで環状化反応の進行を確認した。リフォールディング、HiTrapQ カラム(GEヘルスケア)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーの過程で、スプ

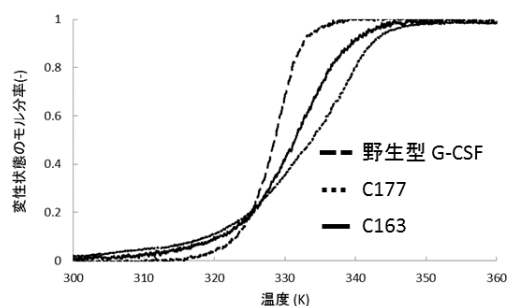
リットインテインの連結した状態の副生成物は完全に除去することができた一方で、分子量が同程度の副生成物が混入した。ESI-MSを用いて、副生成物の分子量を評価したところ、主生成物と比較して18 Da大きく、スプライシング反応の途中で加水分解により開裂した直鎖状副生成物であることが明らかとなった。MonoQ カラム(GEヘルスケア)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーの条件を最適化することで、直鎖状副生成物を取り除いて高純度の環状化サイトカインを調製した。末端配列を最適化した改変体 C163は、C177と比較して直鎖型副生成物の混入が有意に少なく、末端配列の最適化がスプライシング反応の進行に有利に寄与している可能性が示唆された。

(5) 野生型サイトカインと環状化サイトカインのレセプター結合活性の測定

分子間の結合活性をSPRを用いて定量的に評価した。レセプターは市販品を購入し、これをセンサーチップに固定化して、濃度の異なる試料溶液を連続的にインジェクトし、シングルカインेटクス法で解析したところ、C163、C177の解離定数はそれぞれ101 pM、67 pMであった。これらの値は野生型サイトカインの解離定数82 pMと同等であった。これより、環状化サイトカインが正しくフォールドし、活性な立体構造を形成していることが明らかとなった。

(6) 野生型サイトカインと環状化サイトカインの熱安定性解析

円偏光二色性測定器を用いて試料溶液の温度を一定速度で昇温し、得られた熱変性曲線を解析した。熱変性温度を定量的に評価したところ、C163、C177の T_m はそれぞれ58.2、59.7を示し、野生型サイトカインの T_m 値(56.5)と比較して、有意に上昇していた。以上より、環状化により安定化していることを明らかにした(図1)。



(図1) 作製したG-CSF改変体の熱変性曲線

(7) 野生型サイトカインと環状化サイトカインの細胞増殖活性の測定

各検体の細胞増殖活性をNFS-60細胞を用いて、Ishiyamaらの方法に従い、WST-8試薬の450nm発色でアッセイした。ロジスティッ

ク回帰により各々のEC50値を算出したところ、C163、C177のEC50値はそれぞれ60.7 pg/mL、80.6 pg/mLであった。これらの値は野生型サイトカインの82.3 pg/mLと同程度であり、環状化サイトカインが活性な状態を維持していることを確認した。

(8) 野生型サイトカインと環状化サイトカインのプロテアーゼ分解耐性解析

一定量のエキソプロテアーゼと混合したときの試料の残存量を電気泳動法で定量した。擬一次反応を仮定して、半減期を算出したところ、野生型サイトカインの半減期が1.7時間となる条件下において、C163、C177は11時間、230時間の半減期を示した。サイトカインが環状化により安定化していることをプロテアーゼ分解耐性で明らかにした。

以上の*in vitro*分子特性解析により、環状化サイトカインのレセプター結合活性および細胞増殖活性は野生型と同等であり、かつその構造安定性とプロテアーゼ分解耐性は野生型より優れたものであることが明らかになった。これは、当該分子が後続バイオ医薬品として有望な創薬シーズであることを示すものである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計13件)

- Oshiro S, and Honda S, Imparting Albumin-Binding Affinity to a Human Protein by Mimicking the Contact Surface of a Bacterial Binding Protein, *ACS Chemical Biology*, 査読有、9、1052-1060 (2014)、10.1021/cb400946m
- Watanabe H, Yamasaki K, Honda S., Tracing primordial protein evolution through structurally guided stepwise segment elongation, *Journal of Biological Chemistry*, 査読有、289、3394-3404 (2014)、10.1074/jbc.M113.530592
- Watanabe H, Matsumaru H, Ooishi A, Honda S., Structure-based histidine substitution for optimizing pH-sensitive Staphylococcus protein A, *Journal of Chromatography B*, 査読有、929、155-60 (2013)、10.1016/j.jchromb.2013.04.029
- Tomii K, Sawada Y, Honda S., Convergent evolution in structural elements of proteins investigated using cross profile analysis, *BMC Bioinformatics*, 査読有、13、11 (2012)、10.1186/1471-2105-13-11
- Feng, Y.W., Ooishi, A., Honda, S.: Aggregation factor analysis for protein formulation by a systematic approach using FTIR, SEC and design of

experiments techniques、査読有、
*Journal of Pharmaceutical and
Biomedical Analysis*, 27, 143-152
(2011)、10.1016/j.jpba.2011.08.035

〔学会発表〕(計 23 件)

渡邊 秀樹、山崎 和彦、本田 真也、微小タンパク質を構造構成要素とした小型人工タンパク質設計、日本化学会第 94 春季年会、2014 年 03 月 26 日、名古屋大学 (名古屋)

塚本 雅之、大石 郁子、渡邊 秀樹、本田 真也、コンビナトリアル・ヒスチジン・スキャンニングによる抗体精製に向けた pH 感受性変換リガンドタンパク質の設計、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 03 月 24 日、立命館大学 (滋賀)

大城 理志、本田 真也、アルブミン結合部位の移植による血清アルブミン結合性ヒトタンパク質のデザイン、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、福岡国際会議場 (福岡)

富井 健太郎、澤田 義人、本田 真也、Cross profile analysis により同定されたタンパク質セグメントの収斂、生物物理関東地区研究会、2012 年 3 月 5 日、東京農工大学 (東京)

二島 渉、本田 真也、タンパク質構造予測における主成分を用いた高効率・高精度のエネルギー最適化手法、第 11 回日本蛋白質科学会年会、2011 年 6 月 7 日、ホテル阪急エキスポパーク (大阪)

〔図書〕(計 5 件)

本田 真也、渡邊 秀樹、エヌ・ティー・エス、進化分子工学の最前線、(2013)、213-221

本田 真也、シーエムシー出版、抗体医薬品の開発と市場、(2012)、55-73

本田 真也、馮 延文、シーエムシー出版、次世代に向けた抗体医薬品開発の技術と展望、(2012)、242-258

本田 真也、シーエムシー出版、バイオ医薬品製造の効率化と生産基材の開発、(2012)、226-238

本田 真也、サイエンス&テクノロジー、バイオ (抗体) 医薬品 / 後続品における CMC 研究・申請と同等性確保、(2011)、149-172

〔産業財産権〕

出願状況 (計 14 件)

名称：微小タンパク質の骨格構造に基づく分子ライブラリ

発明者：本田 真也、渡邊 秀樹、山崎 和彦

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：PCT/JP2013/007238

出願年月日：2013 年 12 月 09 日

国内外の別：外国

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

本田 真也 (HONDA Shinya)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・副研究部門長

研究者番号：50344122

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

渡邊 秀樹 (WATANABE Hideki)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：90422089