

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601
研究種目：基盤研究(A) (一般)
研究期間：2017～2020
課題番号：17H01522
研究課題名(和文) タンパク質精密構造変換法の創出と展開

研究課題名(英文) Precise Synthetic Modifications of Proteins

研究代表者

金井 求 (Kanai, Motomu)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：20243264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 28,000,000円

研究成果の概要(和文)：独自に開発したトリプトファン選択的タンパク質修飾反応を用いた、均質性の高い抗体-薬物複合体の合成と活性評価を目標とした。その結果、keto-ABNOと抗がん剤を結合させた分子を、薬物/抗体比を制御して、抗体に対して結合することに成功した。これらの活性を評価したところ、抗体に結合する抗原を発現したがん細胞に対して毒性を発現することを見いだした。以上の成果から、トリプトファン結合型抗体-薬物複合体は均質性高く合成することが可能で、新規な抗がん剤として高い潜在性を有していることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

副作用が低く、効果が高い抗がん剤の開発が広く望まれている。強い細胞毒性を持つ分子を抗体に結合させて、毒をがん細胞選択的に送り込む抗体-薬物複合体は、そのような抗がん剤であると注目されている。従来の合成法では、抗体の様々な位置に不均質の結合数で薬物が結合した抗体-薬物複合体しか作れなかった。一方で、我々が開発した方法を用いると、特定の位置に数を定めて抗体-薬物複合体を合成できるようになった。この新しい抗体-薬物複合体は、抗がん効果を示すことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The goal of this project was to synthesize highly homogeneous antibody-drug conjugates (ADC) using the originally developed tryptophan-selective protein modification reaction and evaluate their activities. We synthesized keto-ABNO covalently bound to an anticancer drug. The molecules were conjugated to an antibody to produce ADCs with a controlled drug / antibody ratio. Those tryptophan-ADCs were toxic to cancer cells expressing antigens that bind to the antibody. It was shown that the tryptophan-ADCs can be synthesized with high homogeneity and has high potential as a novel anticancer agent.

研究分野：有機合成化学

キーワード：抗体-薬物複合体 トリプトファン 抗がん剤 ラジカル 官能基許容性

1. 研究開始当初の背景

タンパク質製剤は、低分子医薬品の欠点を補う次世代医薬の鉱脈である。タンパク質の発現・精製技術の進歩により、近い将来に多くのタンパク質がより安価に製造できるようになることは間違いない。また有機合成化学や分析化学の進歩に牽引されて、化学者が扱える分子サイズや構造複雑性は大幅に増大している。しかし、有機分子や低分子医薬と同レベルでタンパク質を自由自在にデザインし、デザインに合わせて構造変換する合成技術を人類は未だ手にしていない。

タンパク質化学修飾の分野は未だ黎明期にあり、大きな展開や応用の可能性を秘めているが、一方で創薬分野においては今のところ期待したほどの成果が無いように感じられる。その一因は、タンパク質修飾反応の種類が乏しいことにある。分野の飛躍的発展とそれに基づく疾病克服や人類の福祉への貢献のためには、反応や触媒の開発といった基礎化学からの取り組みにより、タンパク質修飾反応の種類や精度を格段に向上させることが必要不可欠な段階に来ている。創薬における波及効果の大きさを鑑みると、我が国の化学系薬学はこの新しい潮流の後塵を拝することなく、基礎と応用の両面で主導権を握りながら分野を開拓していくことが極めて重要である。

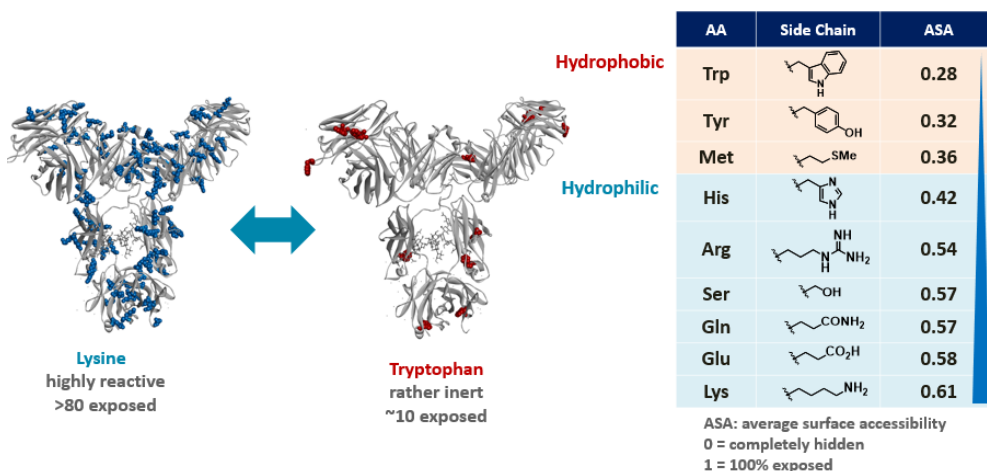
その医薬的具現化として、タンパク質修飾反応によって抗体に低分子医薬を結合させた抗体-薬物複合体(antibody-drug conjugate, ADC)が挙げられる。次世代型抗ガン医薬品として有望視されている医薬モダリティだが、現在までに市販されている全ての ADC はリジン(Lys)およびシステイン(Cys)修飾法に頼る都合、不均質混合物を与えてしまい、薬効制御・品質管理面での課題が残されている。また ADC の均質性向上が体内動態と薬効に大きなインパクトをもたらす事実は、各種基礎研究を根拠に業界のコンセンサスとなっている。

2. 研究の目的

本研究では、従来は不可能であった反応位置および精度でのタンパク質構造変換を可能とする化学触媒・反応剤を創製し、タンパク質の構造展開を基盤とした新機能創出を目的とする。より具体的には、独自開発したトリプトファン (Trp) 選択的タンパク質修飾反応を応用し、均質性を高めた抗体-薬物複合体 (均質 ADC)の開発を目指す。

3. 研究の方法

疎水性アミノ酸残基である Trp は Lys などの親水性残基に比べて抗体表面露出数が少ないため、Trp を薬物担持修飾の標的にすることができれば、ADC の均質性を簡便に高めることができると考えた。そのような ADC を合成し、機能実証を行う形で上述の目的達成を目指すことにした。たとえば市販 ADC である Kadcyra (Lys 修飾法で製造) の抗体部 (Herceptin) の三次元構造を解析すると、アクセシブルな Lys は抗体表面に 80 残基以上存在する。これにランダム修飾がかかると数百万通り以上の位置異性体が生じてしまう。一方で、表面露出する Trp 残基は 10 残基程度にとどまり、各々の溶媒接触度も大きく異なっている。Trp を修飾標的とすることで、医薬結合数や位置異性体の分布を極少化できると考えた。また各残基の溶媒接触度差を反映させた選択的修飾への展開性も期待した。



4. 研究成果

1) Trp 修飾型 ADC の創製

市販 ADC である Kadcyra との比較を念頭に置いた新規クロスリンカーの開発を行ない、抗ガン薬物 DM1 と抗体 Trp 残基を介して連結させた新規 ADC (Trp-ADC) の製造を試みた。

既に開発済である窒素酸化物 (NOx) 活性化条件を用いることで、Herceptin と抗腫瘍性分子 (DM1) のクロスリンクが進行し、Trp-ADC が高収率で合成できることが明らかとなった。また Trp-ADC は、HER2 過剰発現がん細胞 (SK-BR-3) に対する細胞毒性を示すことも実証された。Intact MS 解析およびペプチドマッピングによって Trp-ADC の構造決定を行ったところ、主

には抗体重鎖 Fc 領域に存在する Trp 残基において薬物修飾が進行していることが明らかとなった。さらには Lys 修飾型 ADC と比較しても Trp-ADC は高い構造的均質性を持つことも実証された。また ELISA 実験において Trp-ADC は非修飾抗体と変わらない抗体結合能を保持しており、Trp 修飾法が抗原-抗体反応にほぼ影響を及ぼさないことも明らかとなった。

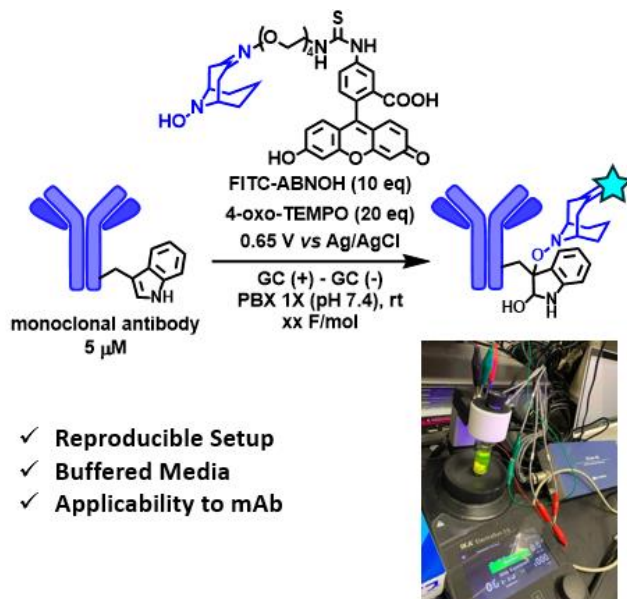
2) 中性条件下で実施可能な Trp 修飾法の開発と抗体修飾への応用

上述の NOx 活性化を用いると、生成する Trp-ADC の物性が良くないことが判明した。これは、反応条件として弱酸性 (pH~3) が必要となっており、抗体の高次構造に変成的影響を与えてしまうことに起因していると考えた。そこで中性 pH 条件で進行する反応条件の探索を行った。

その結果、電極酸化による反応剤活性化を適用することで、タンパク質への Trp 修飾反応が中性 pH 条件で進行することを見いだした。より具体的には、ガラス状炭素を作用極・対極とし、4-oxo-TEMPO を電解メディアータとした定電位電解を行うことで、PBS バッファ (pH7.4) 中での抗体への蛍光分子 (FITC) 修飾が可能となった。

またこの電解条件検討の最中に、TEMPO オキシアンモニウム体 (TEMPO+) を活性化剤として加えるだけで反応が進行することも明らかとなり、電解セットアップを必要としない簡便な抗体修飾プロトコルを併せて確立することにも成功した。

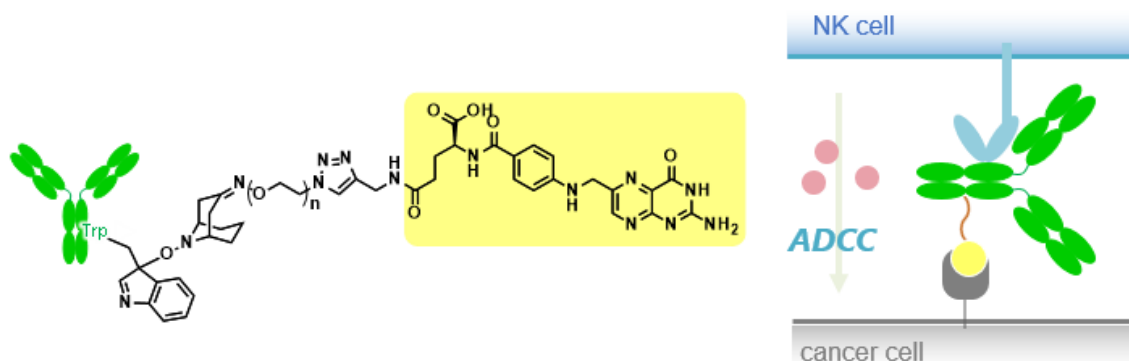
現在はこの改良条件を用いる ADC 製造および安定性試験を遂行中である。



3) Trp 修飾法を用いる抗体-葉酸コンジュゲートの創製と Fab 非依存型 ADCC 活性の確認

がん細胞には葉酸受容体の発現が亢進していることから、葉酸分子はがん細胞ターゲット分子として古くから検討されてきた。抗体-葉酸コンジュゲートは葉酸を介するがんターゲット能を示しつつ、抗体の Fc エフェクター能 (たとえば ADCC 活性) を発揮し、がん細胞選択的な医薬機能を発揮する新たなモダリティになることが期待される。しかしながら Lys 修飾法を用いた製造を行うと、エフェクター能に関与する領域がランダム修飾によって毀損されてしまい、ADCC 活性が大きく減ぜられてしまう。Trp 修飾法も Fc 領域への修飾を行うが、ADCC 活性に必要な FcγRIIIa 認識領域と異なる部位が修飾点として選ばれていた。この点に着目し、Trp 修飾法を用いて抗体-葉酸コンジュゲートを作成すれば、ADCC 活性の毀損を最小限に抑えた医薬モダリティ創製が行えると期待した。

反応剤と葉酸分子を PEG リンカーで連結した反応剤を新たに合成し、Trp 修飾反応に附することで anti-CD20 抗体-葉酸コンジュゲートを合成した。IGROV-1 細胞 (FRα+, CD20-) にコンジュゲート分子をアプライし、NK 細胞による ADCC 活性を評価したところ、抗原欠損型細胞を標的とするにも関わらず、ADCC による細胞死が確認された。また各種対照実験により、コンジュゲート分子は葉酸を介して Fab 非依存的に IGROV-1 細胞と結合していることも確認された。Trp 法は Lys 修飾法に比べてピンポイントな修飾が施されるため、タンパク質機能毀損を回避する点でも優位性を持つことが実証できた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10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 Katsuya Maruyama, Motomu Kanai	4. 巻 48
2. 論文標題 Synthetic Methodology-Driven Chemical Protein Modifications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 1421 ~ 1432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.190652	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 Yamamoto Masashi, Shinoda Kiyomichi, Sasaki Daisuke, Kanai Motomu, Sohma Youhei	4. 巻 27
2. 論文標題 Design and properties of [Met35(0)]A ₄₂ -lactam(Asp23/Lys28) possessing a lactam tether as a salt-bridge surrogate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 888 ~ 893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.01.038	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 Taniguchi Atsuhiko, Sawazaki Taka, Shimizu Yusuke, Sohma Youhei, Kanai Motomu	4. 巻 10
2. 論文標題 Photophysical properties and application in live cell imaging of B,B-fluoro-perfluoroalkyl BODIPYs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 MedChemComm	6. 最初と最後の頁 1121 ~ 1125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9MD00011A	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 Takano, Hori Yukiko, Sawazaki Taka, Shimizu Yusuke, Nemoto Yu, Taniguchi Atsuhiko, Ozawa Shuta, Sohma Youhei, Kanai Motomu, Tomita Taisuke	4. 巻 55
2. 論文標題 Photo-oxygenation inhibits tau amyloid formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 6165 ~ 6168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9CC01728C	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 Masashi Yamamoto, Kiyomichi Shinoda, Daisuke Sasaki, Motomu Kanai, Youhei Sohma	4. 巻 27
2. 論文標題 Design and properties of [Met35 (O)] A 42-lactam (Asp23/Lys28) possessing a lactam tether as a salt-bridge surrogate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem.	6. 最初と最後の頁 888-893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.01.038	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 T Sawazaki, Y Shimizu, K Oisaki, Y Sohma, M Kanai	4. 巻 20
2. 論文標題 Convergent and Functional-Group-Tolerant Synthesis of B-Organo BODIPYs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Organic letters	6. 最初と最後の頁 7767-7770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.8b03138	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 J Ni, T Oguro, T Sawazaki, Y Sohma, M Kanai	4. 巻 20
2. 論文標題 Hydroxy Group Directed Catalytic Hydrosilylation of Amides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Organic letters	6. 最初と最後の頁 7371-7374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.8b03014	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 K Yamatsugu, M Furuta, S Xi, Y Amamoto, J Liu, SA Kawashima, M Kanai	4. 巻 26
2. 論文標題 Kinetic analyses and structure-activity relationship studies of synthetic lysine acetylation catalysts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & medicinal chemistry	6. 最初と最後の頁 5359-5367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2018.07.009	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 K Yamatsugu, SA Kawashima, M Kanai	4. 巻 46
2. 論文標題 Leading approaches in synthetic epigenetics for novel therapeutic strategies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current opinion in chemical biology	6. 最初と最後の頁 10-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2018.03.011	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 Jizhi Ni, Atsuhiko Taniguchi, Shuta Ozawa, Yukiko Hori, Yoichiro Kuninobu, Takashi Saito, Takaomi C Saido, Taisuke Tomita, Youhei Sohma, Motomu Kanai	4. 巻 4
2. 論文標題 Near-infrared photoactivatable oxygenation catalysts of amyloid peptide	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem	6. 最初と最後の頁 807-820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chempr.2018.02.008	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16件 (うち招待講演 16件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Motomu Kanai
2. 発表標題 Chemical Catalysis Targeting Biomacromolecules
3. 学会等名 Chemical Biology Seminar Series, Department of Chemistry, Texas A&M University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motomu Kanai
2. 発表標題 Transition Metal-Free Tryptophan-Selective Bioconjugation of Proteins
3. 学会等名 the 257th ACS National meeting & exposition (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 生体分子の構造変換ダイナミズムへの人工介入を目指した触媒研究
3. 学会等名 サントリー-生命科学財団セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motomu Kanai
2. 発表標題 Aerobic Oxygen-Driven Functionalizations of Proteins
3. 学会等名 27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 反応開発を基軸とするタンパク質化学修飾
3. 学会等名 日本プロセス化学会2019 ウィンターシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 生体分子の構造変換ダイナミズムへの人工介入を目指した触媒研究
3. 学会等名 京都大学大学院工学研究科、特別講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motomu Kanai
2. 発表標題 Synthetic Lysine Acylation of Histones
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium, Kyoto (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motomu Kanai
2. 発表標題 Aerobic Oxygen-Driven Functionalizations of Proteins
3. 学会等名 The 4th International Symposium on Middle Molecular Strategy (ISMMS-4), Tohoku University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motomu Kanai
2. 発表標題 Aerobic Oxygen-Driven Functionalizations of Proteins
3. 学会等名 The University of Tokyo-University of Strasbourg Joint Symposium, Symmetry and Asymmetry in Science, The University of Tokyo (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 生体分子の構造変換ダイナミズムへの人工介入を目指した触媒研究
3. 学会等名 山口大学 IoLセンターシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motomu Kanai
2. 発表標題 Aerobic Oxygen-Driven Functionalizations of Proteins
3. 学会等名 Chirality 2018, Princeton University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 生体分子の構造変換ダイナミズムへの人工介入を目指した触媒研究
3. 学会等名 第29回 万有仙台シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motomu Kanai
2. 発表標題 Aerobic Oxygen-Driven Functionalizations of Proteins
3. 学会等名 Organic & Biomolecular Chemistry Symposium, SI0C, China (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 旗艦たる触媒化学の創造を求めて
3. 学会等名 「ハイブリッド触媒」 第1回 若手道場 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 生体分子を基質とする化学的構造変換法の創出と展開
3. 学会等名 創薬生命科学特別講義I、名古屋市立大学（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motomu Kanai
2. 発表標題 Aerobic Oxygen-Driven Functionalizations of Proteins
3. 学会等名 Singapore Japan Bilateral Meeting, Nanyang Technological University, Singapore（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金井研HP http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~kanai/index.html 東京大学大学院薬学系研究科 有機合成化学教室ホームページ http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~kanai/

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