

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19102

研究課題名（和文）標的指向型ファージ提示法とナノ粒子技術の融合による次世代ペプチド医薬品開発

研究課題名（英文）Target-directed phage display method and functional nanoparticles for next generation peptide medicines

研究代表者

三原 久和（Mihara, Hisakazu）

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：30183966

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：申請者が独自に開発した標的指向型ファージ提示法により、ガラクトース結合性レクチンの1つで、ガン関連タンパク質であるガレクチン3に結合するペプチドリガンド探索を実施した。ガラクトース修飾環状ペプチドファージライブラリを構築し、ガレクチン3に対してスクリーニングを行った結果、ガレクチン3に対して高い結合活性を示す糖修飾環状ペプチドを見出すことができた。得られたガラクトース修飾環状ペプチドを修飾した蛍光シリカナノ粒子を調製し、ガレクチン3との相互作用を評価した結果、クラスター効果により結合活性が向上する結果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、独自に開発した標的指向型ファージ提示法を活用したペプチド医薬品の開拓に加え、ナノ粒子との複合化によるMultivalent drugに展開することで、抗体に匹敵する結合親和性をもつナノ粒子型ペプチド医薬品の開発手法の確立を目的とした。独自のペプチド創薬技術をMultivalent drugに融合する手法はこれまでに類を見ない挑戦的なアプローチであり、学術的に意義のある研究である。また、生体適合性を高めたナノ粒子を活用することで、ペプチド医薬品の体内安定性を向上させることも可能であり、ガンやウイルス感染などに対する優れた治療薬の開発に貢献できるため、社会的にも有意義な研究である。

研究成果の概要（英文）：We found peptide ligands that bind to galectin 3, one of the galactose-binding lectins and a cancer-related protein, using our originally developed target-directed phage display method. A galactose-modified cyclic peptide phage library was constructed and screened against galectin 3, and as results galactose-modified cyclic peptides with high binding affinities to galectin 3 were successfully identified. Fluorescent silica nanoparticles modified with the obtained galactose-modified cyclic peptides were prepared and their interaction with galectin 3 was evaluated, showing enhanced binding activity due to the cluster effect.

研究分野：生命化学

キーワード：ペプチド リガンド ファージ提示法 ナノ粒子 クラスター効果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

現在、ガンを含むさまざまな疾患の治療に抗体が広く利用されている。抗体医薬品は標的  
生体分子のみに特異的かつ高い結合活性で作用するため、低分子医薬品と比較して副作用  
が少ない。しかし、高い製造コストや厳密な品質管理が必要であるため、医療費の高騰の一  
因にもなっている。そのため、安価に製造可能かつ品質管理が容易な抗体代替医薬品の開  
発が課題となっている。

この課題に対して、 $10^6$  種類を超えるペプチドライブラリを活用した医薬品開発が精力的に  
進められ、ペプチドが次世代の医薬品として注目を集めている。ペプチドは、(1)比較的安価  
に合成が可能、(2)化学的に非常に安定で品質管理が容易、(3)化学修飾による機能付与が  
可能、などの点で抗体医薬品や低分子医薬品より優れている。一方、安価に合成可能な短鎖  
のペプチド単独では、結合活性の点で抗体に劣るという課題を解決する画期的な方法論は未  
だ研究途上である。

## 2. 研究の目的

これまでに、さまざまな構造設計ペプチドライブラリを構築し、標的タンパク質に特異的に結  
合するペプチドリガンドの創製研究を展開してきた。特に、ファージ上に提示した設計ペプ  
チドライブラリに低分子リガンドを化学修飾することによりペプチドライブラリに標的指向性を付与  
し、効率的にペプチドリガンドを探索可能な標的指向型ファージ提示法の開発を積極的に行  
っている。また、ペプチドリガンドをナノ粒子上に集積してクラスター効果を利用することにより、  
結合活性を 1000 倍以上に向上させ、抗体に匹敵する結合活性をもつナノ粒子型ペプチドリ  
ガンドを開発することに成功している。本研究では、標的指向型ファージ提示法とナノ粒子技  
術を融合させることによりナノ粒子型ペプチド医薬品を開発する萌芽的基盤技術を確立するこ  
とを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ガレクチン 3 に結合する糖ペプチドリガンドの探索

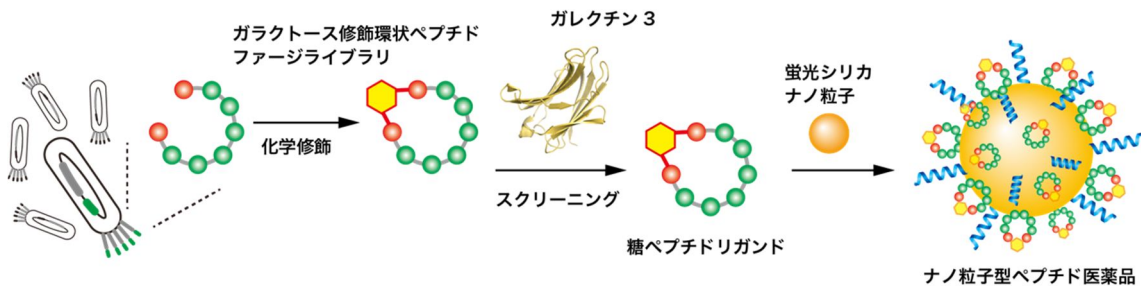
ガレクチン 3 を標的タンパク質として、ガレクチン 3 に結合する糖ペプチドリガンドの探索を行  
った。ガラクトース誘導体を化学合成し、ファージ上に提示したペプチドライブラリに選択的に  
化学修飾することにより、ガラクトース修飾環状ペプチドファージライブラリを構築した。ガレク  
チン 3 は大腸菌発現系を用いて発現・精製し、ビオチン化した後、ストレプトアビジン磁気ビー  
ズ上に固定した。3 ラウンドのバイオパニングによるスクリーニングを実施した後、ファージのク  
ローニングと DNA 配列解析により濃縮されたペプチドの配列を同定した。糖ペプチド提示フ  
ァージクローンをを用いて ELISA を行い、ガレクチン 3 に強く結合する糖ペプチド配列候補を選  
別した。

### (2) ガラクトース修飾環状ペプチドリガンドの結合活性評価

候補のガラクトース修飾環状ペプチドリガンドを化学合成した。ペプチドを固相合成した後、  
固相担体から切り出し、ガラクトース誘導体と反応させてガラクトース修飾環状ペプチドを得た。  
固相合成にはアルキル基を側鎖に導入したリジン誘導体を使用し、C 末端側にアルキル基を  
もつペプチドとして合成した。アジド基を導入した蛍光色素フルオレセイン誘導体を用いてガ  
ラクトース修飾環状ペプチドを標識し、蛍光偏光法によりガレクチン 3 に対する結合活性を評  
価した。

### (3) ガラクトース修飾環状ペプチドリガンドを修飾した蛍光シリカナノ粒子の調製

アジド基を提示した蛍光シリカナノ粒子を調製した。ペプチドの C 末端に導入したアルキン基を介して、Click 反応によりガラクトース修飾環状ペプチドを修飾した蛍光シリカナノ粒子を調製した。糖ペプチド修飾蛍光シリカナノ粒子とガレクチン 3 の相互作用は凝集活性として評価した。



## 4. 研究成果

本研究では、ガン細胞の増殖や転移への関与が示唆されているガレクチン 3 を標的タンパク質として、ガラクトース修飾環状ペプチドファージライブラリを構築し、ガレクチン 3 に結合する糖ペプチドリガンドの探索を行った。3 ラウンドのバイオパニングによるスクリーニングを実施した結果、ガレクチン 3 に結合する糖ペプチド提示ファージを濃縮することができた。3 ラウンドのファージをクローニングし、DNA 配列を解析した結果、5 種類のペプチド配列を同定することができた。各糖ペプチド提示ファージクローンのガレクチン 3 に対する結合を ELISA により評価した結果、このうち 1 つをガレクチンに対して高い結合活性を示す糖ペプチドとして同定することができた。

高い結合活性を示した糖ペプチドを含めて 3 つのガラクトース修飾環状ペプチドを化学合成し、ガレクチン 3 に対する結合活性を評価した結果、ファージ ELISA で最も高い結合活性を示した糖ペプチドが強い結合親和性をもつことが明らかとなった。また、過剰のラクトースを用いた競合阻害実験により、ガラクトース修飾環状ペプチドがガレクチン 3 の糖結合部位に結合していることもわかった。

ガレクチン 3 に対して強い結合親和性を示したガラクトース修飾環状ペプチドを用い、糖ペプチドリガンドを修飾した蛍光シリカナノ粒子の調製を行った。糖ペプチドの修飾数が一定数以上になると蛍光シリカナノ粒子が凝集してしまっていたが、修飾条件を最適化することにより、蛍光シリカナノ粒子の分散安定性を保持した状態で 1 粒子あたり 30 個程度の糖ペプチドリガンドを修飾できることがわかった。シリカナノ粒子上に糖ペプチドを集積することにより、クラスター効果が発現してガレクチン 3 に対する結合活性が向上するという結果を得ることができた。

以上の結果から、標的指向型ファージ提示法によりガレクチン 3 に対して高い結合親和性を示すガラクトース修飾環状ペプチドリガンドを獲得することができ、糖ペプチドリガンドを蛍光シリカナノ粒子上に集積することにより、結合活性が向上したナノ粒子型ペプチド医薬品へと展開可能であることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松浦 右京・三原 久和・堤 浩
2. 発表標題 ガラクトース結合タンパク質の解析を指向したリガンド修飾蛍光シリカナノ粒子の創製
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yue Qiu・Hisakazu Mihara・Hiroshi Tsutsumi
2. 発表標題 Construction of a galactose-modified peptide phage library and screening of peptide ligands binding to galectin-3
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023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
---------	---------