

令和元年9月12日現在

機関番号：32633

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07182

研究課題名（和文）試験管内分子進化技術を用いた癌免疫療法のための中分子創薬研究

研究課題名（英文）Discovery research of medium molecule drugs for cancer immunotherapy using in vitro molecular evolution technology

研究代表者

平家 勇司（HEIKE, Yuji）

聖路加国際大学・専門職大学院公衆衛生学研究科（公衆衛生大学院）・教授

研究者番号：90260322

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：試験管内進化技術を用いてPD-1と特異的に結合する2種類の3-finger protein (3-FP) を選択した。そのcDNAから小麦胚芽蛋白質合成系にて3-FPの合成を試みたが、十分量の蛋白質は得られなかった。並行して、3-FP由来のOne-fingerペプチド(1-FP)の機能解析を行った。化学合成と逆相HPLCを用いて高純度1-FPを取得し、PD-1に対する結合能及びアゴニスト/アンタゴニスト活性を評価した。結果、いずれもnM～μMオーダーの結合活性を示すものの、機能活性は示さないか、抗PD-1抗体より明らかに低かった。さらに、その混合物でもPD-1の機能に影響を与えなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、がん治療の分野で注目を集めている、抗PD-1抗体の問題点を解決するために、PD-1/PD-L1の相互作用を阻害する中分子特殊蛋白(3-finger protein)をスクリーニングした上で合成を行い、より効果が高く、かつ安価なPD-1阻害剤の開発を行うことを目標とした。免疫チェックポイント阻害によるがん治療は今後がん治療の主流となると期待されているが、薬剤の価格が高いため医療財源を圧迫しかねないとの懸念が生じている。本研究より、3-finger proteinによるチェックポイント阻害効果が確認できれば、より安価な治療薬の開発につながる可能性があり学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：We screened two of 'three-finger protein' specifically binding to PD-1 using 'in vitro evolution system' from three-finger protein library. Although we attempted to synthesize 3-finger protein in a wheat germ protein synthesis system based on the cDNA clone obtained, enough protein was not finally acquired.

In parallel to that, we acquired each finger peptide down-sized from three-finger peptide and performed functional analysis. We obtained one-finger peptides with high purity by using reversed HPLC method and confirmed that each peptide showed moderate to high binding activity to the target PD-1. We also made an assessment for the peptides of agonist / antagonist activity using in vitro functional assay of human lymphocytes PD-1.

However, none of the synthesized one-finger peptides had any effect on the biological function of PD-1 or was evidently less active than the existing anti-PD-1 / PD-L1 antibody. Furthermore, the peptide mixtures did not affect the function of PD-1.

研究分野：臨床がん免疫

キーワード：PD-1 3-finger protein 小麦胚芽蛋白合成系 合成ペプチド 試験管内進化技術

1. 研究開始当初の背景：

本研究開始時点で、抗 PD-1 を始めとする免疫チェックポイント分子をターゲットとした抗体医薬によるがん免疫療法が注目され始めていた (Ito, Tada, et al, *Biomed Res Int*, 2015)。一方、先行する米国における臨床試験の結果より、その有用性と共に、有害事象や治療の限界等の問題も徐々に明らかとなっていた。

抗 PD-1 抗体の奏効率は、承認された癌腫いずれにおいても総じて 20-30%程度であり、多くの患者において満足できる結果ではない。その原因の 1 つとして、腫瘍局所環境中の PD-1 のすべてに抗 PD-1 抗体が結合しているわけではないことが挙げられている (Das, et al, *J Immunol*, 2015)。従って、より PD-1 に親和性が高く、腫瘍局所に集積し、腫瘍局所で安定的な薬剤の開発が望まれる。

また他の原因として、PD-1/PD-L1 以外の他の免疫チェックポイント分子による免疫抑制が関与していることも挙げられている。そのため、抗 PD-1 抗体に、抗 CTLA-4 抗体や抗 Tim-3 抗体、抗 LAG-3 抗体などを併用する臨床試験が進行中である。

抗 PD-1 抗体の適応疾患の広がりに伴い、その高額な薬剤費も問題になりつつある。薬価の改定によりそれ自体の価格は徐々に下がってきてはいるものの、有効性を高めるための併用療法の有用性が証明され広まってきている現在、総額の薬剤費はさらに膨大になり、公的医療保険財政の破綻につながりかねない。そのため、より効果的に、より安価に、PD-1 を始めとする免疫チェックポイント分子の機能を阻害できる物質が今後求められている。

2. 研究の目的：

3-finger protein library の試験管内加速進化技術を用い、programmed death-1 (PD-1) と PD-1 ligand (PD-L1, 2) の相互作用を阻害する中分子特殊タンパク質を取得する。さらに、取得されたリード化合物の分子プロファイリングを明らかにし、薬剤としての最適化を行う。これにより新たながん免疫療法のための創薬を目指す。

3. 研究の方法：

1) 3-finger protein library の試験管内進化技術を用いて PD-1 と特異的に結合する 3-finger protein のスクリーニングを行う。

2) 収斂した 3-finger protein の cDNA をクローニングする。

3) 得られた cDNA クローンを鋳型とし、split PCR 法を用いて cDNA クローンの 5' 側に SP6 プロモーター配列、オメガ配列、コザック配列を、さらに 3' 側に poly A シグナル配列を付与した DNA を合成する。

4) その DNA より、in vitro の転写系にて RNA を合成し、それを元に小麦胚芽タンパク質合成系にて 3-finger protein を合成する。

5) 並行して、3-finger protein に由来する各 One-finger peptide を化学合成し、その結合能並びに機能を in vitro 機能アッセイを用いて評価する。

6) 抗体に変わる新しい抗 PD-1 阻害剤の効果を in vitro にて確認する。

7) 大量産生を目指して、小麦胚芽法に変わる大量産生系を確立する。

4. 研究成果

当初の研究計画に従い、3-finger protein library の試験管内進化技術を用いて PD-1 と特異的に結合する 3-finger protein のスクリーニングを 10 回繰り返し、特定のアミノ酸配列に収斂することを確認した。そのうちの収斂率の高い (約 36%) 2 種類の cDNA (図 1 ; 27a 及び 22) をクローニングした。

図 1

アミノ酸配列											
番号	Finger 1			Finger 2			Finger 3			個数	頻度
27a	MGGSLVCYE	SWRTLPG	TLETCPDDFTCVHYHI	THHHSITQYCS	HACAI	PQNTTSNY	CCQ	TDK	CNG	16	36%
29a	MGGSLVCYE	SWRTLPG	TLETCPDDFTCVHYHI	THHHSITQYCS	HACAI	PQNTTSNY	CCQ	TDK	CDG	1	2.30%
29c	MGGSLVCYE	SWRTL SG	TLETCPDDFTCVHYHI	THHHSITQYCS	HACAI	PQNTTSNY	CCQ	TDK	CNG	1	2.30%
19	MGGSLVCYE	SWRTLPG	TLETCPDDFT VVHYLI	THHHSITQYCS	HACAI	PQNTTSNY	CCQ	TDK	CNG	1	2.30%
6	MGGSLVCYC	LVSF CPG	TLETCPDDFTCVYCHI	THHHSITQYCS	HACAI	PQNTTSNY	CCQ	TDK	CNG	1	2.30%
7a	MGGSLVCYC	LVSF CPG	TLETCPDDFTCVY YHI	THHHSITQYCS	HACAI	PQNTTSNY	CCQ	TDK	CNG	1	2.30%
20a	MGGSLVCYC	FMXLLPG	TLETCPDDFTCVNPNYH	THPKYTQYCS	HACAI	PKTPSTNY	CCQ	TDK	CNG	1	2.30%
22	MRGSLVCYL	RGSLPG	TLETCPDDFTCVAAASNP	NYNRTQYCS	HACAI	PNHKTHHR	CCQ	TDK	CNG	16	36%
6a	MRGSLVCYL	RGSLPG	TLETCPDDFTCVAAASNP	NYNRTQYCS	HACAI	PNHKTHHR	CC R	TDK	CNG	1	2.30%
26a	MRG PL VCYL	RGSLPG	TLETCPDDFTCVAAASNP	NYNRTQYCS	HACAI	PNHKTHHR	CCQ	TDK	CNG	1	2.30%
23a	MGGSLVCYV	MVLCRPG	TLETCPDDFTCVDIIT	HLRNNSTQYCS	HACAI	PNHKTHHR	CCQ	TDK	CNG	1	2.30%
23	MGGSLVCYW	GSVLGPG	TLETCPDDFTCVTTRR	STRSATTQYCS	HACAI	PNHNNRIT	CCQ	TDK	CNG	1	2.30%
11	MGGSLVCYL	KNPLTPG	TLETCPDDFTCVHHNS	PDHNNSTQYCS	HACAI	PISTTHRD	CCQ	TDK	CNG	1	2.30%
23c	MGGSLVCYG	AGCR LP G	TLETCPDDFTCVNSSH	HTLHRATQYCS	HACAI	PNNTHNNT	CCQ	TDK	CNG	1	2.30%

得られた cDNA クローンを鋳型とし、split PCR 法を用いて cDNA クローンの 5' 側に SP6 プロモーター配列、オメガ配列、コザック配列を、さらに 3' 側に poly A シグナル配列を付与した DNA を合成した (図 2)。その合成 DNA より、in vitro の転写系にて RNA を合成し、それを元に小麦胚芽タンパク質合成系にて 3-finger protein の合成を試みた。しかしながら、細胞アッセイに供するための十分な量の 3-finger protein を調製することができなかった。研究期間を通して、タンパク質合成系の至適化のための条件検討 (小麦胚芽無細胞タンパク質合成系への界面活性剤の添加、合成温度や融合タグの検討、透析法による長時間合成など) を行い、候補となる当該タンパク質の調製を試みたものの、最終的には十分量の確保には至らなかった。その原因として、特異なアミノ酸配列によるタンパク質の凝集、低効率リフォールディングや、タンパク質合成系の成分に対するペプチドの阻害効果 等が考えられる。

並行して、研究計画に従い、3-finger から down-sizing した One-finger ペプチドの取得と機能解析を行った。スクリーニングにて得られた 2 種類の 3-finger protein に由来する合計 6 種類の One-finger peptide (peptide 1-6) を合成した。それぞれの One-finger peptide について、

- 1) 表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いたペプチドと PD-1 との結合特性解析
- 2) ヒトリンパ球を用いた PD-1 の in vitro 機能アッセイによりそのアゴニスト/アンタゴニスト活性評価

を試みた。即ち、PD-1 を発現するエフェクター細胞 (レポーター) と PD-L 1/L 2 および TCR アクティベータを発現する細胞との機能阻害 (促進) 効果を計測したものの、十分な活性は得られなかった。原因検索のため、6 種類の One-finger peptide を HPLC や質量分析により純度検定したところ、想定以上の副産物や酸化・還元状態の混合が認められており、それが生物活性が低い原因と考えられた。そこで、化学合成法の後、逆相カラム HPLC 法にて高純度 One-finger peptide (peptide 1-6) を獲得することとした。左記方法にて、高純度のペプチドを取得した。

- 1) Recombinant human PD-1 protein (アブカム, ab174035) を金センサチップ (ピアコア, CM5) に固定化し、それに対してペプチドをアナライトとして流して SPR 計測を行った。濃度依存的センサグラムから、各ペプチドと PD-1 との結合解離乗数 K_d を算出した (表 1)。解析は BIAevaluation に基づく。3-finger protein 22 に由来する One-finger peptide は、

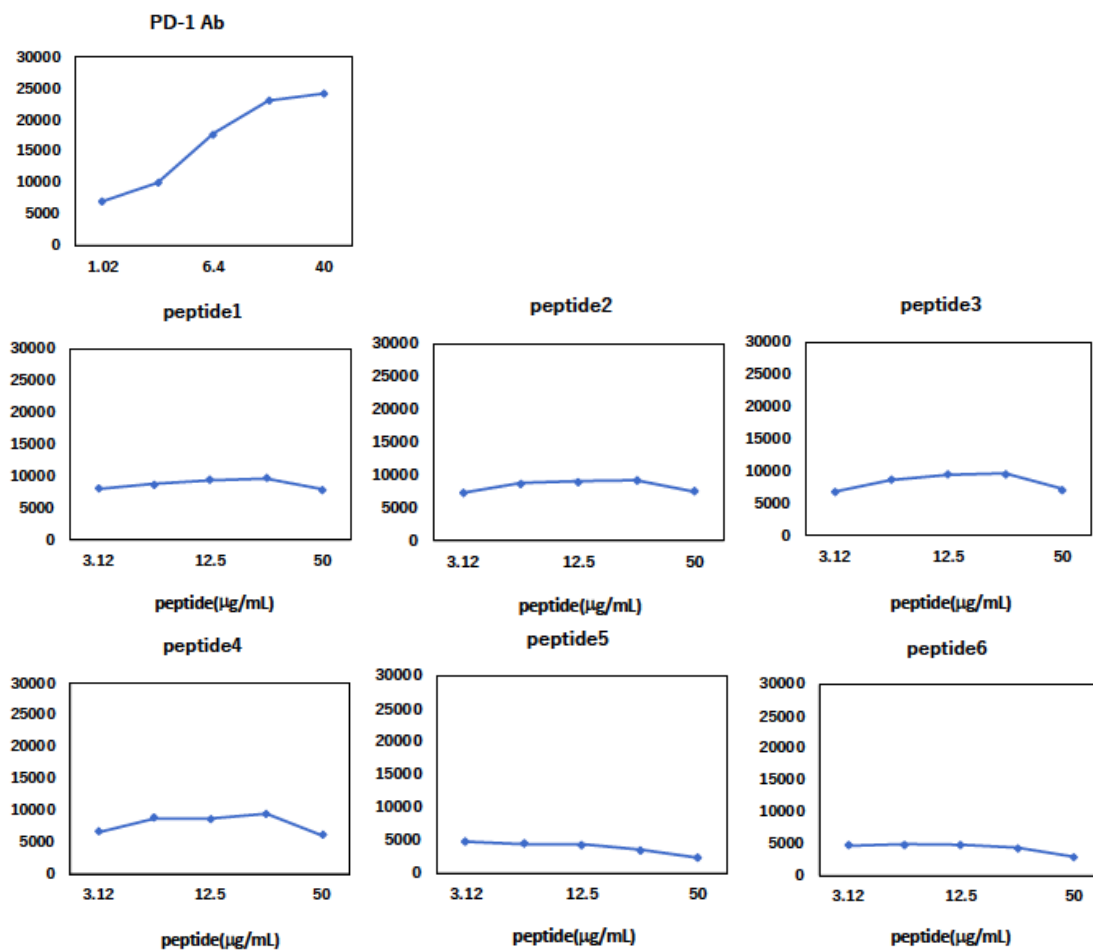
いずれも Kd が nM オーダーの強い結合親和性を示した。一方、3-finger protein 27a に由来するペプチドの Kd は μM オーダーと、やや緩やかな親和活性を持つことが判明した。

表 1

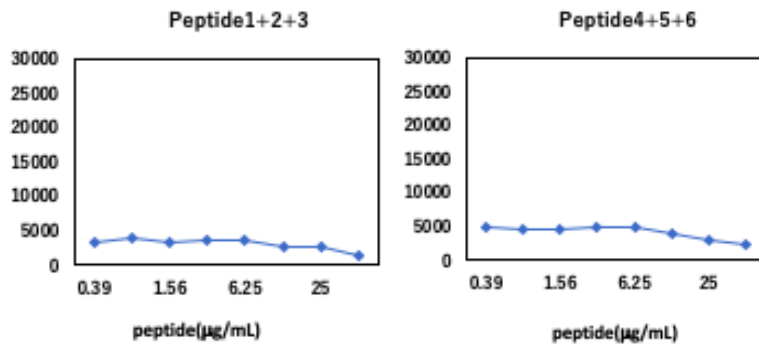
Three Finger	22			27a		
One Finger	Peptide 1	Peptide 2	Peptide 3	Peptide 4	Peptide 5	Peptide 6
Kd	12 nM	6.6 nM	14 nM	8.7 μM	2.0 μM	2.4 μM

2) 高純度 One-finger peptide を用いて再度機能アッセイをおこなったものの、その生物活性は現在臨床で使用されている、抗 PD-1 抗体と比較し、明らかに低かった。

結果を以下に示す。



ポジティブコントロールの抗 PD-1 抗体は濃度依存的に制御解除の効果を示しているものの、いずれの One-finger peptide も計測濃度範囲において PD-1 の機能には効果を示さなかった。さらには、One finger の複合作用の可能性を検証するために、3 finger を構成する各 peptide の混合物 (Peptide1+2+3 並びに Peptide4+5+6) の混合物で検討を行った。



結果、混合物でも PD-1 の機能に影響を与えなかった。

5. 主な発表論文等

なし

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：久保 泰

ローマ字氏名：KUBO Tai

所属研究機関名：産業技術総合研究所

部局名：創薬分子プロファイリング研究センター

職名：副研究センター長

研究者番号 (8 桁)：10178030

研究分担者氏名：五島 直樹

ローマ字氏名：GOSHIMA Naoki

所属研究機関名：産業技術総合研究所

部局名：創薬分子プロファイリング研究センター

職名：研究チーム長

研究者番号（8桁）：70215482

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。