

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15141

研究課題名(和文) 中分子創薬にむけた標的結合ペプチドを制御する天然足場ペプチドの探索

研究課題名(英文) Design principle for creating chemically synthesizable antibody mimetics composed of constrained target-binding peptides and natural scaffold peptides

研究代表者

門之園 哲哉 (KADONOSONO, TETSUYA)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：10510282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：分子量が小さく化学合成が可能で、標的結合性を有するペプチドが抗体の代替となる中分子薬として期待されている。しかし、多くの標的結合ペプチドは結合力が弱く、これまでに実用化された例はない。そこで本研究では、A)「構造ゆらぎ」の制御による高性能な抗体代替ペプチドの創製理論を確立し、B)足場ペプチドとして利用可能な天然ペプチドの探索法、C)足場ペプチドへの組み込みによる「構造ゆらぎ」の制御法を構築し、化学合成可能な中分子ペプチドの創製原理を確立した。本研究で確立したデザイン技術のさらなる高度化と汎用化を実現することにより、将来的には抗体医薬に代わる中分子医薬の開発に発展させたい。

研究成果の概要(英文)：Target-binding peptides which have a small molecular weight and capable of chemical synthesis are expected as an alternative drug to antibodies. However, target-binding peptides often have weak affinity and no examples have been put into clinical use so far. Therefore, in this study, I aimed to establish the design principle of chemically synthesizable antibody mimetics composed of constrained target-binding peptides and natural scaffold peptides and obtained following results; A) establishment of the generation theory of high performance antibody mimetics by controlling "structural fluctuation", B) establishment of search method of natural peptide usable as a scaffold peptide, C) establishment of the control method of peptide fluctuation by using natural scaffold peptides. Based on this principle, it is expected that it will be able to provide cheap antibody alternatives with binding capacity equivalent to that of antibodies.

研究分野：創薬化学

キーワード：中分子創薬 創薬デザイン技術 タンパク質分子設計 抗体代替分子 標的結合小型タンパク質 インシリコスクリーニング HTS HER2

## 1. 研究開始当初の背景

抗体は標的抗原に対して高い特異性と親和性を示し、治療標的タンパク質を認識する医薬品として盛んに開発が進められている。しかし抗体は複雑な構造と大きな分子量 (150 kDa) を持つため、製剤コストが高額であり、また組織浸透性が低いために投与量も多い。そこで、分子量が小さく化学合成が可能で、標的結合性を有するペプチドが抗体の代替となる中分子薬として期待されている。しかし、抗体の標的結合領域から取り出したペプチドは結合力が弱く、抗体に匹敵する感度で標的分子を検出することは難しい。

ペプチドの結合力が弱い原因として、標的結合部位構造のゆらぎの増大が考えられる。つまり、抗体では束縛されている抗原結合部位の立体構造が、ペプチド化によりゆらぐことが可能となり、その結果、エントロピー損失により結合力が低下すると考えられる。そこで申請者は先行研究において、標的結合ペプチドの「構造ゆらぎ」と「結合力」の関係に着目し、蛍光足場タンパク質 gFPS を開発して標的結合ペプチドを組み込み、「構造ゆらぎ」を抑制してエントロピーを低下させることで、結合力を約 100 倍高めることに成功した [1]。

しかし、gFPS 分子は依然として大きく (28 kDa) 化学合成は出来ない。目的とする抗体代替中分子薬を開発するためには、化学合成可能なサイズのペプチドを用いて「構造ゆらぎ」を抑制する足場を創製する必要がある。

[1] PLoS One, 9(8), e103397 (2014)

## 2. 研究の目的

申請者は、標的結合ペプチドの「構造ゆらぎ」を足場タンパク質で制御することで、抗体に匹敵する結合力が得られることを強く示唆する結果を得ている。そこで本研究では、まず、「構造ゆらぎ」の制御理論に基づき、化学合成可能なサイズの天然ペプチドの中から適切な足場ペプチドを決定した。次に、この足場に標的結合ペプチドを組み込んだ中分子ペプチドを調整し、その結合力を評価することで、抗体に匹敵する標的結合ペプチドの創製が可能かを検証し、新規標的結合ペプチド創製技術の構築を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 足場ペプチドのイン・シリコ・スクリーニング

組み込んだペプチドの構造ゆらぎを抑制できる足場ペプチドを高い精度で探索するために、東京工業大学スーパーコンピュータ-TSUBAME を利用した構造計算条件を最適化した。本研究では標的結合ペプチドとして一般的な 6 アミノ酸からなるヘキサペプチドを組み込み、「構造ゆらぎ」を制御するための足場を探索した。計算手順の構築においては次の 2 つの基準を設けた。

### 【基準 1】野生型構造でゆらぎが抑制されていること

足場ペプチドは、いかなるアミノ酸配列を持つヘキサペプチドを導入しても「構造ゆらぎ」を抑制できなければならない。そのような足場ペプチドは、野生型配列でも「構造ゆらぎ」が抑制されているはずである。そこで PDB より 120 アミノ酸長以下の天然ペプチドの構造データを取得し、MD シミュレーションにより残基ごとの「構造ゆらぎ」を計算し、ゆらぎが抑制されたループ構造を持つ足場ペプチド候補を絞り込んだ。

### 【基準 2】ゆらぎやすいモデルヘキサペプチドを組み込んでゆらぎが抑制されること

足場ペプチドは、静電的反発が予測される最も極性の強いヘキサペプチドや、ファンデルワールス力が最も弱い、原子数の少ないヘキサペプチドであっても「構造ゆらぎ」を抑制できなければならない。そこで、これらを含む 20 種類のモデルヘキサペプチドを足場ペプチド候補に組み込み、MD シミュレーションにより「構造ゆらぎ」を計算し、全てのヘキサペプチドのゆらぎを抑制できる足場ペプチドを同定した。

### (2) 標的結合ヘキサペプチドを組み込んだ中分子ペプチドの結合評価

HER2 結合抗体医薬 Trastuzumab および Pertuzumab の結晶構造を利用して、HER2 との結合エネルギー計算により HER2 結合ヘキサペプチド配列を抽出した。このヘキサペプチドを足場に組み込んだ中分子ペプチドを作成し、HER2 への結合力を ELISA で評価した。

### (3) 標的分子発現細胞を用いた機能評価

最も強い結合力が得られた中分子ペプチドを用いて、HER2 発現細胞の検出や HER2 陽性腫瘍切片の免疫染色を検討した。腫瘍作成実験は、東京工業大学動物実験委員会の承認を受け、適正に実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 足場ペプチドのイン・シリコ・スクリーニング

生体親和性が高く 120 アミノ酸長以下の大きさの中分子ペプチド 21 種類を、足場ペプチド候補として選択した。【基準 1】の条件を満たす候補分子を同定するために、まず、野生型構造を用いて MD シミュレーションを行った。野生型構造中には、ヘキサペプチドを組み込むことが可能なループ領域が 270 ヶ所存在していたが、この中で溶媒露出面積が設定値以上であり、また構造ゆらぎが設定値以下の領域に絞ると、12 種類の中分子ペプチド中の 32 ヶ所の領域が得られた。

次に、【基準 2】の条件を満たす候補分子を同定するために、20 種類のモデルヘキサペプチドを足場ペプチド候補に組み込み、MD シ

ミュレーションにより構造ゆらぎを計算した。その結果、11 種類の中分子ペプチド中の 26 ヶ所の領域は全てのモデルヘキサペプチドの構造ゆらぎを抑制できたため、これらの領域にはどのような配列を持つヘキサペプチドを組み込んででもゆらぎが抑制できることが強く示唆された。

#### (2) 標的結合ヘキサペプチドを組み込んだ中分子ペプチドの結合評価

HER2 抗体医薬と HER2 の複合体構造を元に結合エネルギー計算を実施し、HER2 との結合に重要な 5 種類のペプチド配列を同定した。これらの HER2 結合ペプチドを足場分子の 26 ヶ所の領域に組み込んで 130 種類の中分子ペプチドをデザインした。MD シミュレーションの結果、予想通り、組み込んだ HER2 結合ペプチドは全て構造ゆらぎが抑制されていた。

デザインした分子は発光酵素との融合タンパク質として大腸菌内で発現させた。これによりタンパク質を精製することなく、発光 ELISA で簡便に HER2 との結合力を評価できた (図 1)。

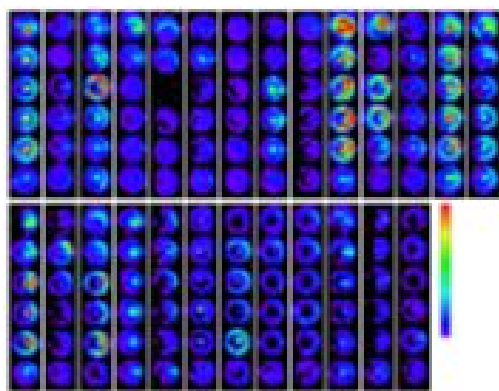


図 1. 発光 ELISA の imaging

これらの中から、野生型構造ではほとんど結合しないが、HER2 結合ペプチドを組み込むことで強く HER2 に結合した 4 種類の分子を大腸菌発現系により精製し、ELISA で結合力を詳細に測定した結果、最も強い結合力を持っていた分子 SC113 の解離定数  $K_D$  は 24 nM であり、抗体に匹敵する結合力を有していた。

#### (3) 標的分子発現細胞を用いた機能評価

抗体代替分子としての SC113 の機能評価するために、HER2 を過剰発現させた HeLa 細胞 (HER2/HeLa) を用いて細胞染色と腫瘍切片の免疫染色を行った。比較として、親株の HeLa 細胞を用いた。その結果、SC113 は HeLa 細胞にはほとんど結合しないが HER2/HeLa 細胞には強く結合し、また、HER2/HeLa 腫瘍切片には SC113 のみ細胞への強い結合が確認できた (図 2)。

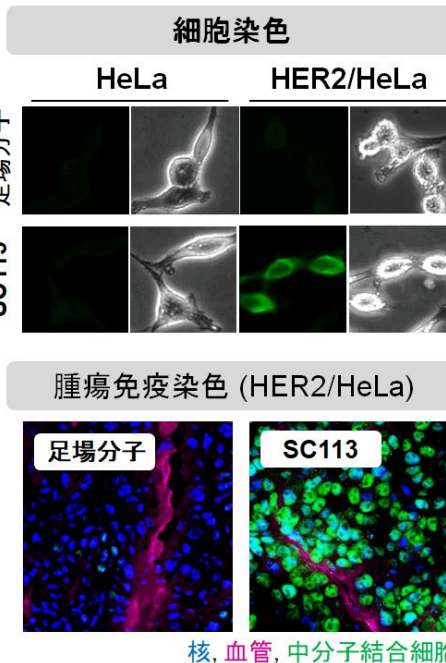


図 2. 細胞染色と腫瘍免疫染色

#### (4) まとめ

このように、本研究により A)「構造ゆらぎ」の制御による高性能な抗体代替ペプチドの創製理論を確立し、B)足場ペプチドとして利用可能な天然ペプチドの探索法、C)足場ペプチドへの組み込みによる「構造ゆらぎ」の制御法を構築でき、化学合成可能な中分子ペプチドの創製原理が確立できた。この原理を元に、現在医薬品やライフサイエンス研究で汎用されている抗体と同等の結合能力のある代替分子を安価に提供できるようになると期待される。本研究で確立したデザイン技術のさらなる高度化と汎用化を実現することにより、将来的には抗体医薬に代わる中分子医薬の開発に発展させたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 20 件)

門之園 哲哉, 抗体代替中分子の半合理的デザイン, 第 6 回蛋白質間相互作用研究会, 2018 年 3 月 28 日, 伊豆長岡 小松家八の坊 (静岡)

門之園 哲哉, Wanaporn Yimchuen, Kyra See, 太田 優美, 口丸 高弘, 近藤 科江, 抗体 CDR ペプチドの構造ゆらぎ制御による小型抗体代替分子の創製, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月 9 日, 神戸ポートアイランド (兵庫)

太田 優美, 門之園 哲哉, 口丸 高弘, 瀧真清, 伊東 祐二, 近藤 科江, ヒトフィブロネクチン III 型ドメインを足場とする小型 HER2 結合分子の創製, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月 7 日, 神戸ポートアイランド (兵庫)

Tetsuya Kadonosono, Yumi Ota, Wanaporn Yimchuen, Kyra See, Tadaomi Furuta, Takahiro Kuchimaru, Shinae Kondoh, Creation of high performance antibody drug alternatives harboring constrained CDR peptides, 第 54 回ペプチド討論会, 2017 年 11 月 21 日, 大阪府立大学 (大阪)

Yumi Ota, Tetsuya Kadonosono, Takahiro Kuchimaru, Masumi Taki, Yuji Ito, Shinae Kondoh, Development of HER2-targeting small protein harboring a structurally constrained peptide, 第 54 回ペプチド討論会, 2017 年 11 月 20 日, 大阪府立大学 (大阪)

Wanaporn Yimchuen, Tetsuya Kadonosono, Kyra See, Tadaomi Furuta, Takahiro Kuchimaru, Shinae Kondoh, Development of anti-HER2 antibody mimetics with structurally constrained CDR peptides, 第 54 回ペプチド討論会, 2017 年 11 月 20 日, 大阪府立大学 (大阪)

門之園 哲哉, Kyra See, 勝見 茉莉奈, 太田 優美, Wanaporn Yimchuen, 相田 一希, 口丸 高弘, 近藤 科江, 腫瘍悪性化促進因子の活性を中和する抗体代替分子の創製, 第 15 回がんとハイポキシア研究会, 2017 年 11 月 10 日, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫)

Yumi Ota, Tetsuya Kadonosono, Wanaporn Yimchuen, Takahiro Kuchimaru, Shinae Kondoh, Development of high affinity anti-HER2 antibody mimetics by use of human fibronectin type III domain, The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2017 年 9 月 30 日, パシフィコ横浜 (神奈川)

Tetsuya Kadonosono, Yumi Ota, Wanaporn Yimchuen, Takahiro Kuchimaru, Shinae Kondoh, A screening system for identifying biocompatible low-molecular-mass scaffold proteins to develop small antibody mimetics, The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2017 年 9 月 30 日, パシフィコ横浜 (神奈川)

太田 優美, 門之園 哲哉, 口丸 高弘, 瀧真清, 伊東 祐二, 近藤 科江, 構造ゆらぎ抑制による抗 HER2 抗体代替分子の創製, 第 49 回若手ペプチド夏の勉強会, 2017 年 8 月 6 日, 長崎ブルースカイホテル・スカイホテル (長崎)

門之園 哲哉, 太田 優美, 口丸 高弘, 近藤 科江, 小型抗体代替分子の創出に向けた低分子量足場タンパク質の探索, 第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2017 年 6 月 16 日, 九州大学医学部百年講堂・同窓会館 (福岡)

太田 優美, 門之園 哲哉, 口丸 高弘, 近藤 科江, ヒトフィブロネクチン III 型ドメインを利用した抗 HER2 抗体代替分子の開発, 第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2017 年 6 月 15 日, 九州大学医学部百年講堂・同窓会館 (福岡)

Wanaporn Yimchuen, Tetsuya Kadonosono, Tadaomi Furuta, Takahiro Kuchimaru, Shinae Kondoh, Development of high-affinity tumor imaging probes based on constrained target-binding peptides, 第 12 回日本分子イメージング学会総会・学術集会, 2017 年 5 月 25 日, 横浜港大さん橋ホール (神奈川)

門之園 哲哉, 構造ゆらぎの抑制による抗体代替分子の創製, 第 5 回蛋白質間相互作用研究会, 平成 29 年 3 月 29 日, 御殿場時之栖 (静岡)

門之園 哲哉, 構造ゆらぎ制御による抗体代替分子の創製, 第 2 回マイクロプロテイン研究会, 平成 29 年 1 月 27 日, 東京工業大学すずかけ台キャンパス (神奈川)

門之園 哲哉, Wanaporn Yimchuen, 塩澤 唯, 北澤 舞花, 太田 優美, 口丸 高弘, 近藤 科江, 「構造ゆらぎ」制御による高性能な抗体医薬品代替分子の創製, 第 5 回 次世代がん治療推進専門家養成プランシンポジウム, 平成 28 年 12 月 3 日, 東京医科歯科大学湯島キャンパス (東京)

Tetsuya Kadonosono, Wanaporn Yimchuen, Tadashi Shiozawa, Maika Kitazawa, Yumi Ota, Takahiro Kuchimaru, and Shinae Kondoh, A protein-engineering method for identifying a scaffold making peptides structurally constrained in order to develop high-affinity antibody mimetics, 第 53 回ペプチド討論会, 平成 28 年 10 月 27 日, 京都テルサ (京都)

門之園 哲哉、Wanaporn Yimchuen、塩澤唯、北澤 舞花、太田 優美、口丸 高弘、近藤 科江、標的結合ペプチドのゆらぎ制御による抗体代替分子の創製法, 第 75 回日本癌学会学術総会, 平成 28 年 10 月 8 日、パシフィコ横浜 (神奈川)

門之園 哲哉, 化学合成可能な高性能抗体代替分子の開発技術, 技術情報協会セミナー「ペプチド医薬品の市場予測・事業化戦略と製剤化技術の開発」, 平成 28 年 9 月 20 日, 技術情報協会セミナールーム (東京)

門之園 哲哉, 口丸 高弘, 近藤 科江, 抗体由来標的結合ペプチドの「構造ゆらぎ」抑制による高性能な抗体代替分子の開発, 第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2016 年 5 月 31 日、別府国際コンベンションセンター (大分)

〔図書〕(計 1 件)

門之園 哲哉, 技術情報協会, 化学合成可能な高性能抗体代替分子の開発技術, ペプチド医薬品開発のためのスクリーニング・安定化・製剤化技術 (分担執筆), 2017, 557

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 標的結合ペプチドの安定化方法  
発明者: 門之園 哲哉, 近藤 科江  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2016/089017  
出願年月日: 平成 28 年 12 月 28 日  
国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門之園 哲哉 (KADONOSONO, Tetsuya)  
東京工業大学・生命理工学院・助教  
研究者番号: 10510282

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし