

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14339

研究課題名（和文）ペプチド-薬物複合体：分子標的ペプチドを用いた効率的ドラッグデリバリーシステム

研究課題名（英文）Peptide-Drug Conjugate: Targeted Intracellular Drug Delivery by Molecular-Targeting Peptide

研究代表者

道上 雅孝 (Michigami, Masataka)

大阪府立大学・理学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：60802428

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、抗体分子が抱える課題を克服するために、低分子量と高機能を両立した抗体様分子を開発することである。申請者は抗体様分子として、安定なヘリックス-ループ-ヘリックス構造を持つ分子標的ペプチドの開発を行っている。本ペプチドは低分子量であるにも関わらず、抗体と同等の結合活性を示し、血清中でも高い安定性を示す（半減期：14日以上）。本研究では、それをさらに高機能化し、分子標的ペプチドに抗がん剤を修飾した「ペプチド-薬物複合体」を開発する。これは、抗体医薬品の問題点を一挙に解決し、これに代わる革新的医薬品の開発に繋がる喫緊の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本基盤技術を確立できれば、他の標的タンパク質に対しても、自由自在にテラーメイドの分子標的化合物が創出できる。すなわち、狙った細胞に任意の化合物を送達できるようになる。これを使って分子レベルで生命活動をコントロールすることで、従来の分子標的化合物では得ることのできなかった新しい知見を手に入れることが可能になる。また、本研究で開発する「ペプチド-薬物複合体」は、通常のペプチド固相合成による化学合成が可能であることから、細胞培養を基本とするバイオ医薬品の特殊な製造装置や、GMP管理を必要としないため、化学合成の設備しか持たない大学・企業でも、分子標的医薬の開発や製造への参加が可能となる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to develop a molecular-targeting peptide that have high binding affinity like as antibodies. We have designed molecular-targeting peptides with a stable helix-loop-helix (HLH) structure as an alternatives to antibodies. Despite its low molecular weight, the HLH peptides exhibit high affinity and stability in serum (half-life: 14 days). As a new alternative to antibody-drug conjugates, we generated "ligand-targeting" peptide-drug conjugates, which utilize receptor-mediated endocytosis for targeted intracellular drug delivery. The peptide-drug conjugate makes a complex with an extracellular ligand and then binds to the receptor on the cell surface to stimulate intracellular uptake via the endocytotic pathway.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

抗体-薬物複合体 (Antibody-drug conjugate: ADC) は、モノクローナル抗体に抗がん剤を結合させた医薬品である。がん細胞に結合する抗体を利用して、抗がん剤を直接がん細胞まで運び、放出することで抗腫瘍効果を発揮する。当時、2種類のADCが上市され、40種類以上のADCが臨床開発に進んでいた。その一方で、ADCには下記のような問題がある： 部位特異的な抗がん剤の修飾が困難 製造コストが高い 抗体に修飾した抗がん剤由来の強い副作用が出る。これらの問題は、抗体の巨大で複雑な立体構造に起因するため、抗体をより小さな分子に置き換えることで解決できる。そこで、抗体の低分子化や、抗体の免疫グロブリン構造を利用しない結合性分子の設計が行われている。しかし、いずれも天然タンパク質を基本構造とするため、抗原性や抗がん剤の部位特異的修飾が難しいといった問題が残る。

2. 研究の目的

本研究では、ADCの抗体部分をヘリックス・ループ・ヘリックス (HLH) 構造ペプチドに置き換えた「ペプチド-薬物複合体」(Peptide-drug conjugate: PDC)を開発する。HLH構造ペプチドは、申請者らが de novo 設計したペプチドで、強固な立体構造を保持するため、タンパク質分解酵素による分解を受けにくく、生体内でも安定である。また、分子工学的手法と組み合わせることにより、抗体のように高い結合活性を示す分子標的ペプチドが設計できる。分子量は約4,500であるため、化学合成により安価に調製できるだけでなく、種々の化学反応を用いて抗がん剤の修飾が可能である。本研究では、PDCが、がん細胞の増殖を抑制できるか明らかにし、新しい作用機序の分子ツールとなるか検証する。

3. 研究の方法

(1) 分子標的 HLH ペプチドの細胞内取り込み

これまでに、ヒト血管内皮増殖因子 (VEGF) の生理活性を阻害する分子標的ペプチドを設計してきた。その中で、VEGF に対して阻害活性は示さないものの、非常に強く結合する HLH ペプチド M49 を見出した ($K_D = 0.87 \text{ nM}$)。この結合の強さは抗体医薬品アバスタチン (VEGF 中和抗体で抗がん剤として利用されている) や、これまで報告されてきたどの VEGF 結合性ペプチドよりも強い。そして、ペプチド M49 に任意の化合物を修飾すれば、それを細胞内へ運搬するシステムが構築できるのではと考えた。図 1 は本研究で開発したペプチド-薬物複合体を利用した薬物送達メカニズムである。VEGF に結合したペプチド-薬物複合体が VEGF 受容体を介したエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれた後、ペプチドと薬物間のリンカーが開裂し、薬物がエンドソームから放出され、細胞増殖を抑制する。まず、ペプチド-薬物複合体が細胞内へ取り込まれるか明らかにするために、VEGF 標的ペプチド M49 を Fmoc 固相合成法で合成したのちに蛍光分子を標識した。そして、HLH ペプチド M49 の蛍光標識体が VEGF に結合することを表面プラズモン共鳴 (SPR) 法で確かめた。最後に、本ペプチドが細胞内へ取り込まれるか、共焦点レーザー顕微鏡や、フローサイトメーターを利用して解析した。

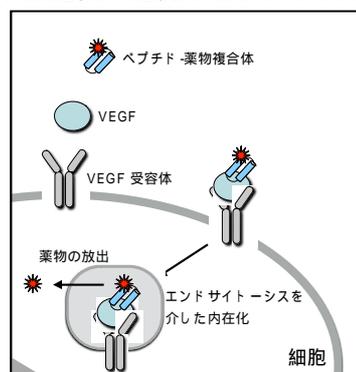


図 1. 薬物送達メカニズム

(2) ペプチド-薬物複合体の細胞増殖阻害活性の評価

細胞増殖阻害活性の評価に先立ち、ペプチド-薬物複合体を合成した。HLH ペプチド M49 に連結する化合物には、monomethylauristatin E (MMAE) を用いた。MMAE は非常に強い微小管重合阻害剤で、低濃度でも細胞増殖を阻害する。HLH ペプチド M49 と MMAE との間のリンカーには細胞内に局在する加水分解酵素 (カテプシン B) によって特異的に切断される vc リンカーを利用した。そして、ペプチド-薬物複合体が細胞増殖を阻害するか明らかにするために、大腸がん細胞 (HCT116 株) をマイクロプレート上に播種した後、ペプチド-薬物複合体を添加し、細胞の生存率を WST-1 試薬によって評価した。

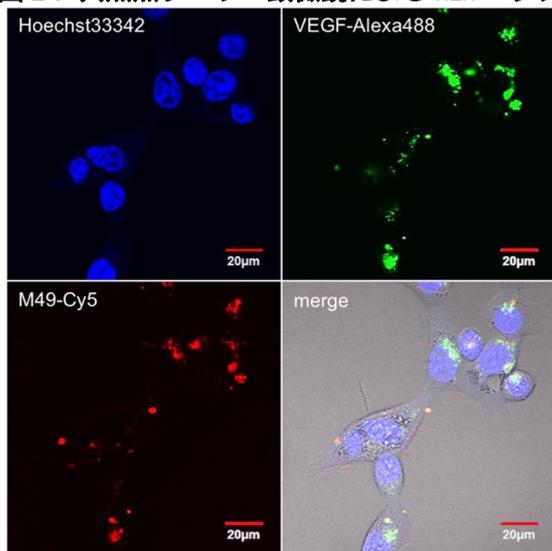
4. 研究成果

(1) 分子標的 HLH ペプチドの細胞内取り込み

分子標的 HLH ペプチド M49 が細胞内へ取り込まれるか評価するために、ペプチド M49 の蛍光標識体を合成した。Fmoc 固相合成法によりペプチド M49 を合成し、N 末端にシステイン残基を導入した。そこへマレイミド基を有する蛍光分子 (Cy5) を反応させた。生成物 (M49-Cy5) は逆相 HPLC で精製し、分子量は MALDI-TOF-MS によって同定した。次に合成した M49-Cy5 が VEGF に結合するか SPR 法を用いて評価した。ヒト VEGF をセンサーチップに固定化し、M49-Cy5 をアナライトとして添加した。その結果、VEGF に対して特異的に結合することが判明した ($K_D = 5.5 \text{ nM}$)。ペプチド M49 に蛍光標識を実施しても VEGF に対する結合活性が保持されることが判明したので、

次に、M49-Cy5 が細胞内へ取り込まれるか評価した。ヒト大腸がん由来の HCT116 株に Alexa488 を蛍光標識した VEGF と M49-Cy5 を添加し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、M49-Cy5 は細胞内へ移行することが判明した。また、VEGF の細胞内局在を示す Alexa488 の蛍光輝点と M49 の局在を示す Cy5 の蛍光輝点がよく重なることから、ペプチド M49 は VEGF と共に細胞内へ取り込まれていると示唆される (図 2)。

図 2. 共焦点レーザー顕微鏡による HLH ペプチドの細胞内取り込み評価



(2) ペプチド-薬物複合体の細胞増殖阻害活性の評価

ペプチド-薬物複合体が、がん細胞に対して増殖阻害活性を示すか確かめるために、ペプチド M49-MMAE 複合体を合成した。M49 は Fmoc 固相合成法により合成し、N 末端にシステイン残基を導入した。そこへマレイミド基が誘導化された MMAE を反応させ、生成物を逆相 HPLC で精製した (図 3A)。また、MALDI-TOF-MS によって分子量を測定し、計算値と実測値が一致したことから目的のペプチド-薬物複合体が合成できていることを確認した。次に M49-MMAE が VEGF に結合するか SPR 法を利用して評価した。センサーチップ CM5 に VEGF をアミンカップリング法で固定化し、M49-MMAE をアナライトとして添加した。結合活性測定は 25 °C、ランニング緩衝液には HBS-EP+ を用いた。そして、得られたセンサーグラムを 1:1 Langmuir モデルにフィッティングし、VEGF に対する解離定数 (K_D) を求めたところ、 K_D 値 30 nM の強さで結合することがわかった。

最後に、M49-MMAE の細胞増殖阻害活性を評価した。細胞株にはヒト大腸がん由来の HCT116 株を使用した。各濃度の M49-MMAE を VEGF 存在下で HCT116 に加え、48 時間後に WST-1 試薬を加え細胞の生存率を測定した。その結果、VEGF に結合しないペプチドと MMAE との複合体 (Control-MMAE) では細胞の生存率が低下しなかったが、M49-MMAE をがん細胞に添加した場合は、濃度依存的に細胞の生存率が低下した (図 3B)。すなわち、ペプチド M49 が薬剤を細胞内へ運搬したと考えられる。

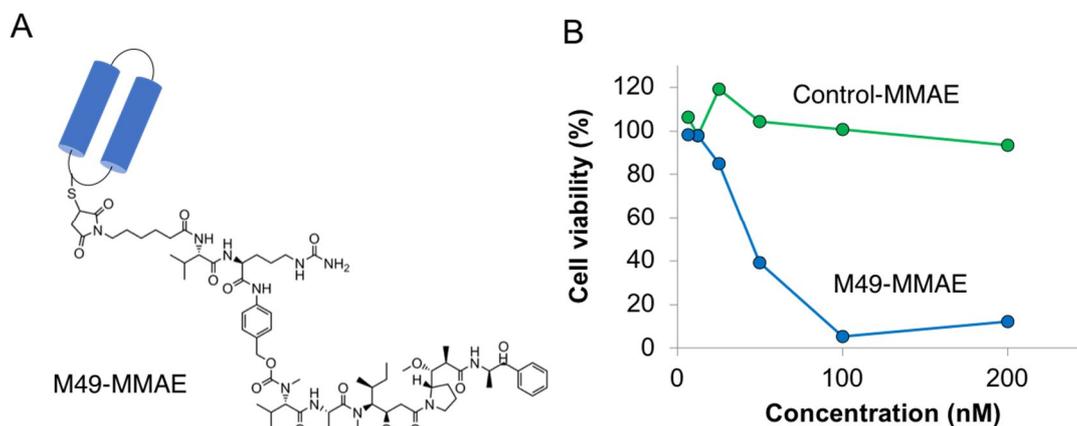


図 3. ペプチド-薬物複合体の生物活性 (A) VEGF 標的ペプチド M49-MMAE 複合体の構造 (B) HCT116 細胞株に対する M49-MMAE 複合体の細胞増殖阻害活性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Michigami Masataka, Takahashi Kentaro, Yamashita Haruna, Ye Zhengmao, Nakase Ikuhiko, Fujii Ikuo	4. 巻 16
2. 論文標題 A “ligand-targeting” peptide-drug conjugate: Targeted intracellular drug delivery by VEGF-binding helix-loop-helix peptides via receptor-mediated endocytosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0247045
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0247045	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 Fujii Ikuo, Fujiwara Daisuke, Michigami Masataka	4. 巻 35
2. 論文標題 A new class of drug modalities based on molecular-targeting helix-loop-helix (HLH) peptides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 212 ~ 221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2745/dd.35.212	査読の有無 無
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0件

〔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
---------	---------