

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23655161

研究課題名（和文） マイクロ抗体：進化分子工学による分子標的ペプチドの創出

研究課題名（英文） Microantibody: Directed evolution of Molecular-targeting Peptides in Phage-displayed Libraries

研究代表者

藤井 郁雄 (FUJII IKUO)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：70189984

研究成果の概要（和文）：抗体は、分子標的化合物の第一候補として注目されているが、抗原性や細胞膜透過性、また高い製造コストなどその限界も明らかにされてきている。これらの問題点は、抗体の基本構造に起因するものである。そこで、イムノグロブリン構造を利用せず、目的の標的タンパク質に対して特異的に結合する抗体様物質の開発が望まれている。そこで、抗原性のない、低分子性の抗体様物質の開発を提案する。抗体様物質とは、IgGを利用せず、特定の標的抗原に対して特異的に結合するヘリックス-ループ-ヘリックス構造ペプチドのことであり、「マイクロ抗体」と名付けた。本研究では、ファージ表面提示ペプチドライブラリーにより得られたマウス顆粒球コロニー刺激因子受容体（G-CSFR）結合ペプチドの獲得の生体内での安定性や膜透過性、また抗原性を検討し、次世代抗体としての可能性を検証するとともに、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）に結合するマイクロ抗体の獲得に成功した。

研究成果の概要（英文）：Use of antibody medicines has been limited due to the biophysical properties, immunogenicity, non-cell permeability, high cost to manufacture, and so on. To enable new applications where antibodies show some limitations, we have developed an alternative-binding molecule with non-immunoglobulin domain. The molecule is a helix-loop-helix peptide. In previous work, we constructed a phage-displayed library of the helix-loop-helix peptides and then screened the library for G-CSF receptor to obtain a molecular-targeting peptide. Here, we examined the ability of the binding peptide as an alternative to antibody medicines. The peptide showed strong binding affinity (K_d : 4 nM) to the receptor, an enzyme-resistant property (half-life: 15 days in mouse sera), and non-immunogenicity. This peptide is named “*microAntibodes*” due to having the same properties as those of antibodies. Furthermore, we examined to screen the library of helix-loop-helix peptides against VEGF to successfully gain a tight-binding peptide. The semi-rational strategy, which combines directed evolution with *de novo* design, provides a new way to generate a post-antibody therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ペプチド，進化分子工学，ファージライブラリー，分子標的医薬，試験管内進化法，抗体

1. 研究開始当初の背景

21世紀に入るとともにヒトの遺伝子構造の全容が明らかにされた。現在、ゲノムから翻訳されるタンパク質の網羅的な解析が進められて、生命科学や医薬品開発のターゲットとなるタンパク質の種類も数も劇的に増えている。このような急速なプロテオーム解析研究にともなって、分子標的化合物の第一候補として注目されているのが抗体である。しかし、抗体の研究が進むにつれ、その限界も明らかにされてきている。抗体には、以下のような問題点が指摘されている。

①抗体は多数のジスルフィド結合を含む巨大タンパク質であるため、細胞内に導入したり、細胞内で機能させたりすることが難しい。したがって、細胞内の疾患関連タンパク質を分子標的にすることができない。

②抗体を医薬品として利用するときには、抗原性を下げるため、ヒト化（マウス抗体のアミノ酸配列をヒト抗体のものに入れ替える）する必要である。

③現在の抗体医薬はそのほとんどがモノクローナル抗体であるために生産に膨大なコストを必要とする。

これらの問題点は、抗体の基本構造に起因するものである。そこで、イムノグロブリン構造を利用せず、目的の標的タンパク質に対して特異的に結合する抗体様物質の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本萌芽研究では、抗原性のない、低分子性の抗体様物質の開発を提案する。抗体様物質とは、IgGを利用せず、特定の標的抗原に対して特異的に結合するペプチドのことであり、「マイクロ抗体」と名付ける（Fig.1）。このマイクロ抗体は、強固な立体構造をもつペプチド（分子量：3000～5000）で、ヒトに投与しても安定であり、かつ低分子量のため抗原性を示さない。すなわち、抗体の機能を低分子ペプチドで実現する。当研究室では、早くから試験管内進化法に取り組んできており、免疫システムがもつ抗体タンパク質の多様性を利用して、テラーメイド人工酵素である「抗体酵素」を開発してきている。また、試験管内進化の主要技術であるファージ表面ディスプレイ法を利用して、抗体の基質特異性の改良（*Nature, Biotechnology, 1998, 16, 463*）や抗体の結合活性の最適化に成功している（*Nature biotechnology, 2001, 19, 563-567*）。このような経験を生かし、本研究では、試験管内進化法とタンパク質構造構築理論とを組み合わせることにより、IgGとは全く異なる構造モチーフをもつマイクロ抗体の分子ライブラリーを構築し、抗体に代わる分子プローブや分子標的医薬の開発を行

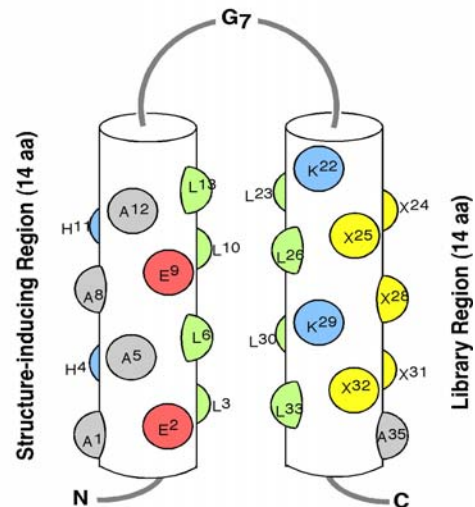


Fig. 1. マイクロ抗体：ヘリックスループ-ヘリックス構造を土台にして、X部分をランダム化したライブラリーを構築する。

う。さらに、生体内での安定性や膜透過性、また抗原性を検討し、次世代抗体としての可能性を検証する。

3. 研究の方法

マイクロ抗体は3つの領域で構成される【①N末端ヘリックス(14アミノ酸残基からなる構造支持領域)、②ループ(グリシン7残基からなるリンカー)、③C末端ヘリックス(14アミノ酸残基からなるライブラリー領域)】（Fig.1）。これまでに、ファージ表面提示法によって、C末端ヘリックス外側のアミノ酸をランダム変異したマイクロ抗体のライブラリーを構築し（ライブラリーサイズ： 1.5×10^6 ）、マウス顆粒球コロニー刺激因子受容体（G-CSFR）に対してスクリーニングしたところ、受容体結合性のマイクロ抗体が得られている（*Peptide Science 2001, 309*）。

本研究では、まず、G-CSF結合性ペプチドを用いて、マイクロ抗体としての潜在能力を評価する。すなわち、生体内（血清中など）での安定性、細胞膜透過性や抗原性について検討する。つづいて、G-CSF結合性ペプチドの試験管内進化を再度検討し、結合活性の向上を図る。さらに、本マイクロ抗体・ライブラリーを血管内皮増殖因子（VEGF）に適用し、VEGF結合性のマイクロ抗体を取得する。このような一連の研究からマイクロ抗体の開発法を確立する。

4. 研究成果

(1) G-CSF結合性マイクロ抗体の機能解析と生体内安定性

G-CSF 結合性マイクロ抗体を固層法によりペプチド合成し、CD を測定したところ、安定な α -ヘリックス構造を持つことが判明した。また、マイクロ抗体の N 末端と C 末端とをジスルフィド結合によって架橋した環状ペプチドを合成したところ、ヘリックス構造がさらに安定化され、高い親和性 ($K_d = 4 \text{ nM}$) を示した。さらに本マイクロ抗体の血清中での安定性を検討したところ、半減期が 2 週間であることが判明した。

(2) マイクロ抗体の抗原性試験

マイクロ抗体をマウスに検疫し、抗原性が無いことを確認した。

(3) マイクロ抗体の膜透過性の検討および膜透過性ペプチドの導入

マイクロ抗体を蛍光分子 (FITC など) で化学修飾し、共焦点顕微鏡により、細胞膜透過性を確認した。

(4) VEGF 結合性マイクロ抗体のスクリーニング

前年度までに作製済みのマイクロ抗体ファージライブラリーについて、VEGF 固定化磁気ビーズを用いてスクリーニングし、VEGF 結合性のファージ粒子を獲得した。

(5) VEGF 受容体結合性マイクロ抗体の合成

単離されたファージをクローニングし、対応するペプチドのアミノ酸配列を決定し、マイクロ抗体をペプチド固相法により合成した。

(6) VEGF 結合性マイクロ抗体の結合性試験

合成されたサイトカイン受容体結合性マイクロ抗体の受容体結合活性を、表面プラズモン共鳴法 (BIA-CORE) を使って評価したところ、抗体に匹敵する高い親和性 ($K_d = 0.1 \text{ nM}$) を示した。また、円二色性スペクトル (CD) により、ヘリックス構造の安定性を確認した。

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 8 件)

- (1) Nobuo Yoshimoto, Akiko Kida, Masaya Kurokawa, Masumi Iijima, Tomoaki Nimi, Andres D. Maturana, Itoshi Nikaido, Hiroki R. Ueda, Kenji Tatematsu, Katsuyuki Tanizawa, Akihiko Kondo, Ikuo Fujii, Shun'ichi Kuroda, An automated system for high-throughput single cell-based breeding, *Sci Rep.*, 査読有, 3, 2013, 1-9.

DOI:10.1038/srep01191

- (2) Shoichi Naito, Tatsuya Takahashi, Junji Onoda, Akira Yamauchi, Taeko Kawai, Junji Kishino, Shoji Yamane, Ikuo Fujii, Naoshi Fukui, Yoshito Numata, Development of a Neutralizing Antibody Specific for the Active Form of Matrix Metalloproteinase-13, *Biochemistry*, 査読有, 51, 2012, 8877-8884.
DOI:10.1021/bi301228d

- (3) Takayuki Irie, Ikuo Fujii, Masaaki Sawa, Design and combination of a novel kinase-focused library using click chemistry-based fragment assembly, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, 22, 2012, 591-596.
DOI:10.1016/j.bmc.2011.10.076

- (4) D. Kitagawa, M. Gouda, Y. Kiri, N. Sugiyama, Y. Ishihama, I. Fujii, Y. Narumi, K. Akita, K. Yokota, Characterization of kinase inhibitors using different phosphorylation states of colony stimulating factor- α receptor tyrosine kinase, *J. Biochem.*, 査読有, 2012, 47-55.
DOI:doi: 10.1093/jb/mvr112

- (5) Takeshi Tsumuraya, Katsutoshi Takeuchi, Shuji Yamashita, Ikuo Fujii, Masahiro Hirama, Development of a monoclonal antibody against the left wing of ciguatoxin CTX1: Thiol strategy and detection using a sandwich ELISA, *Toxicon*, 査読有, 60, 2012, 348-357.
DOI:10.1016/j.toxicon.2012.04.347

- (6) 織田昌幸, 円谷健, 藤井郁雄, 酵素反応における基質の基底状態不安定化の熱力学的特性, *生物工学会誌*, 89, 2011, 388-390.
https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/8907/8907_tokushu_6.pdf
- (7) Mingzhe Liu, Muye Xu, Xian Jun Loh, Hiroshi Abe, Takeshi Tsumuraya, Ikuo Fujii, Jun Li, Tae Il Son, Yoshihito Ito, PEGylated antibody in organic media, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有,

564-568.

DOI:10.1016/j.jbiosc.2011.01.001

- (8) Takaaki Kojima, Satoshi Karasawa, Atsushi Miyawaki, Takeshi Tsumuraya, Ikuo Fujii, Novel screening system for protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation assay in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, 111, 2011, 397-401.
DOI:doi:10.1016/j.jbiosc.2010.12.013

〔学会発表〕(計36件)

- (1) Ikuo Fujii, Molecular Design of Bio-functional Molecules. Proteins and Peptides, Asian Chemical Biology Initiative 2013 Bangkok Meeting, 2013年1月25日, バンコク (タイ).
- (2) 藤井郁雄, 次世代抗体医薬 (マイクロ抗体): 立体規制ペプチド・ライブラリーによる分子標的ペプチドの創出, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日, 福岡国際マリンメッセ福岡.
- (3) Ikuo Fujii, Directed Evolution of Antibodies and Peptides by One Cell Screening, 25th Annual and International Meeting of the Association for Animal Cell Technology, 2012年11月28日, 名古屋国際会議場.
- (4) Ikuo Fujii, Post-Antibody "MicroAntibodies": Generation of Molecular-targeting Peptides by Directed Evolution in Phage-displayed Libraries, 2012 International Symposium on Advanced Biological Engineering, 2012年10月26日, 桂林 (中国).
- (5) Ikuo Fujii, Post-Antibodies: Generation of Molecular-targeting Peptides by Directed Evolution in Phage-displayed Libraries, The 6th Peptide Engineering Meeting, 2012年10月12日, アトランタ (アメリカ).
- (6) 藤井郁雄, 次世代抗体医薬: 立体構造規制ペプチドライブラリーを用いた分子標的ペプチド (マイクロ抗体) の創製, 日本薬学会, 2012年3月28日, 札

幌.

- (7) Ikuo Fujii, Holoabzyme: Construction of an antigen-combining site for artificial catalytic components, 14th Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress, 2012年2月23日, シンガポール.
- (8) Ikuo Fujii, MicroAntibody: Directed Evolution of Antibody-like Peptides in Phage-displayed Libraries, The 2nd international Seminar on Chemistry 2011. Indonesia Chemical Society, 2011年11月24日, インドネシア.
- (9) Ikuo Fujii, MicroAntibody: Directed Evolution of Antibody-like Peptides in Phage-displayed Libraries, Nanobiomaterials Science and Technology for Medicine and Biology, 7th GCOE International Symposium 2011, 2011年10月21日, 東京工業大学.
- (10) Ikuo Fujii, Holoabzyme: Construction of an antigen-combining site for artificial catalytic components, 2011 The Korean Society for Microbiology and Biotechnology, International Symposium, Korean Society for Microbiology and Biotechnology, 2011年6月22日, 韓国.

〔図書〕(計6件)

- (1) 藤井郁雄, シーエムシー出版, ペプチド医薬の最前線, 2012, 112-116.
- (2) 藤井郁雄, メディカルドウ, 最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用, 2012, 244-249.
- (3) 藤井郁雄, シーエムシー出版, ドラッグデリバリーシステムの新展開 II, 2012, 144-148.
- (4) 藤井郁雄, 円谷健, 藤原大佑, 多田俊治, 木下誉富, 恩田真紀, 切畑光統, 谷森紳二, 神川憲, 乾隆, NTS, 社会との垣根を超える大学の挑戦, 2011, 257-273.
- (5) 藤井郁雄, 円谷健, NTS, 新機能抗体ハンドブック, 2011, 46-49.
- (6) 藤井郁雄, 円谷健, NTS, 新機能抗体ハンドブック, 2011, 50-53.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：VEGF 結合性融合ペプチド

発明者：藤井郁雄

権利者：公立大学法人 大阪府立大学

種類：特許

番号：特願 2012-190551

出願年月日：平成 24 年 8 月 30 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~fujii/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 郁雄 (FUJII IKUO)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：70189984

(2) 研究分担者

円谷 健 (TSUMURAYA TAKESHI)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・准教

授

研究者番号：00372855