

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 26 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25242068

研究課題名(和文) 進化分子工学を基盤とする分子標的化合物の新しい設計法

研究課題名(英文) A novel methodology for generation of molecular-targeting drugs via directed evolution in combinatorial libraries of conformationally constrained peptides

研究代表者

藤井 郁雄 (Fujii, Ikuo)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70189984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,400,000円

研究成果の概要(和文)：進化分子工学(細胞表面ディスプレイ技術)とペプチド構造構築理論を組み合わせることにより、分子標的化合物の新しい設計法を開発した。すなわち、強固な立体構造をもつヘリックス・ループ・ヘリックス構造ペプチドのファージ表面提示ライブラリーを構築し、標的タンパク質でスクリーニングすることにより分子標的ペプチド(マイクロ抗体と呼ぶ)を獲得した。このペプチドは期待する生物活性を持ち、生体内でも安定であることから、次世代抗体医薬として期待できる。さらに、ペプチドの立体構造情報をもとにビフェニル化合物を設計・合成し、低分子量の分子標的化合物の獲得に成功した。

研究成果の概要(英文)：Despite intense research into the design of small ligands that target protein-protein interaction, a novel methodology for the rational design of such ligands remains an elusive goal. To design such ligands, our group has examined the directed evolution in a phage-displayed library of helix-loop-helix peptides. Screening of the library against targeted proteins provided bioactive peptides, whose rigid structures showed the spatial orientation of the pharmacophores, thus facilitating structure-based design of peptidomimetics. We constructed a phage-displayed library of the peptides and screened the library against several targeted proteins. The obtained peptide showed a strong binding affinity ( $K_d$  of 4 nM), and a long half-life (>2 weeks) in mouse sera. In addition, the peptides provide structural information of the pharmacophores to facilitate structure-based design of peptidomimetics. Finally, we succeeded to generate biphenyl compounds binding to the targeted proteins.

研究分野：ケミカルバイオロジー、タンパク質化学

キーワード：分子標的医薬品 ペプチド 進化分子工学 ファージ表面提示法 ヘリックス構造

### 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おり、生命科学研究や医薬品開発の標的タンパク質が劇的に増えてきている。この急速なプロテオーム解析に迅速に対応するために、タンパク質-タンパク質相互作用を制御する分子標的化合物の新しい設計法が求められている。現在、分子標的化合物探索のために、タンパク質の立体構造をもとにした医薬品設計 (SBDD) やコンビナトリアル・ケミストリー (コンビケム) に膨大な研究資金が投入されているが、これら従来法とは違う新しい設計コンセプトが必要である。

### 2. 研究の目的

進化分子工学 (細胞表面ディスプレイ技術) とペプチド構造構築理論を組み合わせることにより、分子標的化合物の新しい設計法を開発する。すなわち、強固な立体構造をもつペプチド (ヘリックス構造など) の細胞表面提示ライブラリーを構築し、標的タンパク質に結合するペプチド (マイクロ抗体と呼ぶ) をスクリーニングする。得られるペプチドは立体構造を持っているので、結合活性アミノ酸 (ファーマコフォア) の空間配置を容易に決定することができる。そこで、この立体構造情報をもとに分子標的化合物を設計する。

### 3. 研究の方法

当研究室では、すでに、ヘリックス-ループ-ヘリックス構造モチーフをもつ立体構造規制ペプチド (マイクロ抗体) を設計している (図1)。このペプチドは3つの領域で構成される [ N末端ヘリックス (14アミノ酸残基からなる構造支持領域) 、ループ (Gly 7残基からなるリンカー) 、 C末端ヘリックス (14アミノ酸残基からなる相互作用領域) ]。2つのヘリックスは、内側に存在する Leu 基の疎水相互作用および側面の Glu 基と Lys 基の静電相互作用により寄り添い、安定な構造を形成する。一方、ヘリックス外側のアミノ酸は立体構造構築に関わっていない。したがって、外側のアミノ酸 (X部分) をさまざまなアミノ酸に置換することにより、同一構造のペプチド・ライブラリーを構築することができる。そこで、本研究では、ヘリックス-ループ-ヘリックス構造ペプチドを土台分子として、4つの戦略で分子標的化合物の作製技術を検討する。(1)試験管内進化によるマイクロ抗体の開発、(2)立体構造情報に基づくマイクロ抗体の開発、(3)親和性、生物活性、生体内での安定性、膜透過性、体内動態、抗原性、(4)分子標的化合物の設計と合成および生物活性。

### 4. 研究成果

(1)試験管内進化によるマイクロ抗体の開発

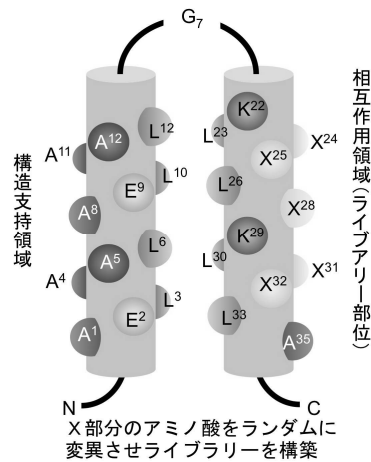


図1. 立体構造規制ペプチド・ライブラリーの分子設計

立体構造規制ペプチドライブラリーの構築: さまざまなタンパク質-タンパク質相互作用のトポロジーを考慮し、 $\alpha$ -ヘリックス部分のライブラリー以外に、ヘリックス+ループ部分ライブラリー ( $\alpha$ -helix+loop) を構築した。C末端ヘリックスに位置する6残基のアミノ酸と11残基のループの9残基をランダム化し、さらにN末端とC末端にシステイン残基を導入しジスルフィド結合を形成するマイクロ抗体ライブラリー (PTA-6Rloop11-C) を作製した。

立体構造規制ペプチドライブラリーのスクリーニング: PTA-6Rloop11-CライブラリーをM13ファージ表面に提示させたファージライブラリーを用いて血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) に対してバイオパンニングを行い、結合性ペプチドのスクリーニングを行った。ストレプトアビジン修飾磁気ビーズを使用し、ビオチン化 VEGF と結合しているファージを回収した。バイオパンニングは4ラウンド行った。3ラウンドのバイオパンニングで回収されたファージの塩基配列を解析したところ、ループ部位に3種類のコンセンサス配列を観測した。

立体構造規制ペプチド (マイクロ抗体) の結合活性: ファージミドベクターよりペプチドをコードする遺伝子を切り取り、3種のチオレドキシシン融合ペプチド (Trx-41, Trx-42, Trx-49) を作製した。これら融合ペプチドの解離定数 (Kd) は表面プラズモン共鳴法で測定した。その結果、いずれの融合ペプチドも VEGF に対して高い結合活性を示し、特異的に結合することが明らかとなった (Kd 値 Trx-41: 602 nM, Trx-42: 333 nM, Trx-49: 0.67 nM)。さらに、VEGF-受容体相互作用の阻害活性を行ったところ、いずれのペプチドも VEGF とその受容体との結合を阻害することが明らかとなった。

(2)立体構造情報に基づくマイクロ抗体の開発

プロテイン・グラブティングによるマイクロ

口抗体の設計を検討した。すでに、多くのタンパク質-タンパク質相互作用のX線構造解析が行われている。そこで、X線構造から得られる立体構造情報をもとに、分子認識に必要なアミノ酸残基をヘリックスループ-ヘリックス構造ペプチドに移植することにより、目的のマイクロ抗体を取得する。そこで、p53とMDM2とのタンパク質-タンパク質相互作用を標的とした。この相互作用では、p53のヘリックス部分がMDM2と結合しており、その結合に關与するp53ヘリックス上の4つのアミノ酸(Phe<sup>19</sup>, Phe<sup>22</sup>, Trp<sup>23</sup>, Leu<sup>26</sup>)を、C末端ヘリックス上に移植した(エピトープ・グラフティング)。また、p53-MDM2相互作用が細胞内のイベントであることから、ポリアルギニンをN末端ヘリックスにグラフティングして細胞膜透過性を付与した(アルギニン・グラフティング)。表面プラズモン共鳴法による阻害活性試験より、得られたペプチド(HLHp53-1R)が、p53-MDM2との相互作用を強く阻害することが判明した(IC<sub>50</sub> = 36 nM)。細胞内では、本ペプチドがp53-MDM2相互作用を阻害し、p53の遊離されることにより、アポトーシスを誘発することが期待される。

(3)親和性、生物活性、生体内での安定性、膜透過性、体内動態、抗原性

マイクロ抗体自身の分子標的化合物(次世代抗体)としての潜在能力を評価した。マイクロ抗体は立体構造を持つことにより、抗体と同様に、高い特異性と親和性さらに生細胞内での安定性(酵素抵抗性)を獲得することができる。そこで、G-CSF受容体マイクロ抗体を固層法によりペプチド合成し(P8-2KA)、円二色性スペクトル法(CD)より立体構造を評価した。さらに、ペプチドのN末端とC末端をチオエーテル結合で環状化を行い(P8-2KA-thioether)、ヘリックスの安定性を最適化するとともに結合活性および生体内安定性の向上を行った。する。どちらのペプチドも安定なヘリックス構造をもち、マウス血清中での酵素分解に対し強い抵抗性を示した(半減期、P8-2KA: 6.3 h, P8-2KA-thioether: 15 days)。同様に、VEGF結合マイクロ抗体も酵素分解(トリプシン)に対して強い安定性をもつことが判明した(半減期、M49: 20 h)。

VEGF結合マイクロ抗体の腫瘍増殖阻害試験を検討した。動物実験にあたり、薬物滞留性を上げるために、チオレドキシンの融合タンパク質(Trx-M49)を合成し、その生理活性を評価した。VEGFにより細胞増殖が誘導されるヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いて、細胞増殖阻害試験を行ったところ、7.6 nMのIC<sub>50</sub>値を示した。また、ヒト大腸がん(LS174T株)をヌードマウスに移植した異種移植モデルに対して腫瘍増殖阻害試験を行ったところ、10 mg/kgの投与で、抗

VEGF抗体(ベバシズマブ)と同等の腫瘍細胞増殖抑制作用を持つことが判明した。

p53-MDM2相互作用阻害ペプチド(HLHp53-1R)について、2種のがん細胞を用いて細胞傷害性試験を行った(HCT-116: p53野生型がん細胞, SW480: p53変異型がん細胞)。ペプチド(25 μM)の投与により、HCT-116細胞の増殖が完全に阻害された。一方、SW480細胞に対しては、同濃度での細胞増殖阻害は観測されなかった。また、ポリアルギニンのみをグラフティングしたペプチドYT-1Rは、阻害活性を示さない。これらの実験により、ペプチドは、細胞内に浸透し、p53-MDM2相互作用を阻害することによりp53が再活性化し、細胞増殖を抑制していることが示唆された。

(4)分子標的化合物の設計と合成および生物活性

G-CSF受容体結合マイクロ抗体の活性アミノ酸の立体構造情報をもとに、低分子化合物のテンプレート分子をデータベースから検索する。この分子に、活性残基の側鎖に対応する官能基を導入し、低分子の分子標的化合物を合成する。G-CSF受容体結合マイクロ抗体のアラニンスキャンニングにより、ヘリックス上の結合活性アミノ酸残基を決定した(Leu<sup>28</sup>, Lys<sup>29</sup>, Glu<sup>32</sup>)。次に、活性アミノ酸の側鎖の動きを分子動力学計算により決定し、それを情報として低分子データベースを検索して、低分子の土台分子としてビフェニル誘導体を設計した。現在結合活性アミノ酸に対応する官能基(イソプロピル基, アミノ基, カルボン酸基)を導入した化合物を合成中である。

おわりに

近年、分子標的医薬として抗体医薬が注目されているが、その限界も明らかにされている。抗体医薬には、以下のような問題点が指摘されている。1)ヒト化等が必要である。2)細胞内のタンパク質をターゲットとすることができない。3)生産に膨大なコストを必要とする。さらに、4)特許の制限が複雑に絡み合っている。これらの問題は、抗体の基本構造に起因するものである。そこで、当研究室では、イムノグロブリン構造(IgG)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研究を行っている。そこで、抗体様物質として、強固な立体構造(ヘリックス・ループ・ヘリックス)をもつペプチドを考案し、ファージ表面提示法を組み合わすことにより独自の立体構造規制ペプチド・ライブラリーを開発した。これを疾患関連タンパク質に対してスクリーニングし、高い結合活性(K<sub>d</sub>値: 数nM)をもつペプチドを獲得することに成功した。得られたペプチドは、強固な立体構造をもつため、酵素分解に対し抵抗性を示し、血清中においても安定であった(半減期: 15日)。

さらに、非抗原性であること、細胞膜透過性を持つことを確認した。このような中分子量（分子量：3000～5000）の分子標的ペプチドを「マイクロ抗体」と名付けた。さらに、マイクロ抗体の立体構造情報をもとにビフェニル化合物を設計し、標的タンパク質に結合活性をもつ低分子化合物（ペプチドミミック）の獲得に成功した。本法が、タンパク質-タンパク質相互作用の生物学的意義の解明やリード化合物開発の助けになることを大いに期待する。

#### 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 13 件)

1. Kawahata, W., Asami, T., Fujii, I., and Sawa, M., ‘Turn On/Off’ fluorescence probe for the screening of unactivated Bruton’s tyrosine kinase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**, 2141-2145 (2015) (査読有).
2. Imai, S., Takahashi, T., Naito, S., Yamauchi, S., Okada, C., Notsu, Y., Sakikawa, A., Hatanaka, M., Iswasaki, T., Morita, A., Fujii, I., Yamane, S., Development of a novel immunoassay specific for mouse intact proinsulin, *Analytical Biochemistry*, **484**, 91-98 (2015) (査読有).
3. Imai, S., Naito, S., Takahashi, T., Yamauchi, A., Nakamura, E., Sato, M., Matsuda, Y., Takagi, H., Numata, Y., Fujii, I., Development of an ultrasensitive immunoassay using affinity matured antibodies for the measurement of rodent insulin, *Analytical Biochemistry*, **473**, 72-79 (2015) (査読有).
4. Takahashi, K., Michigami, M., and Fujii, I., Chemical Synthesis of Head-to-Tail Cyclized Anti-VEGF Microantibody, *Peptide Science*, 143-144 (2014) (査読有).
5. Kitada, H., Oguri, M., Fujiwara, D., Fujii, I., Design of helix-loop-helix peptide inhibitor for p53-HDM2 interaction, *Peptide Science*, 271-271 (2014) (査読有).
6. Michigami, M., Ye, Z., Koezuka, Y., Fujii, I., Tumor Growth Inhibition by Anti-VEGF Microantibody, *Peptide Science*, 273-274 (2014) (査読有).
7. Takayama, R., Fujiwara, D., Fujii, I., Molecular Design of Protein Kinase Inhibitors: Conjugation of ATP-Competitive Molecules with Kinase Surgece-Targeted Peptides, *Peptide Science*, 313-314 (2014) (査読有).
8. Suzuki, M., Michigami, M., Ye, Z., Fujii, I., Isolation of Anti-VEGF Neutralizing Microantibodies from Phage-displayed Peptide Library, *Peptide Science*, 315-31 (2014) (査読有).
9. Tsumuraya, T., Fujii, I., Hiramata, M., Preparation of anti-ciguatoxin monoclonal antibodies using synthetic haptens: sandwich ELISA detection of ciguatoxins, *J. AOAC Int.*, **97**, 373-379 (2014) (査読有).
10. Tsumuraya, T., Fujii, I., Directed Evolution of Hydrolytic Antibodies in Phage-displayed Combinatorial Libraries, *Chem. Lett.*, **34**, 272-280 (2014) (査読有).
11. Yoshimoto, N., Tatematsu, N., Iijima, M., Niimi, T., Maturana, AD, Fujii, I., Kondo, A., Tanizawa, K., Kuroda, S., High-throughput *de novo* screening of receptor agonists with an automated single-cell analysis and isolation system, *Sci. Rep.* 2014 Feb 28; 4: 4242. Doi:10.1038/srep04242. (2014) (査読有).
12. Kawabata K., Nagai H., Konishi N., Fujiwara D., Sasaki R., Ichikawa T., and Fujii I., Peptide-based immunoabsorbents: molecular grafting of IgG-Fc-binding epitopes of Protein A onto a *de novo*-designed helix-loop-helix peptide, *Bioorg. Med. Chem.*, **22**, 1845-1849 (2014) (査読有).
13. Fujiwara, D. and Fujii, I., Phage selection of peptide “microantibodies”, *Curr. Protoc. Chem. Biol.*, **5**, 171-194 (2014) (査読有).

〔学会発表〕(計 15 件)

1. Fujii, I., Holoabzyme: Catalytic antibodies with antigen-combining sites for artificial catalytic components, Advanced Industrial Biotechnology and Bioengineering for Sustainable Bioindustry (2015 年 7 月, Tsinghua University (招待講演)).
2. 藤井郁雄, ポスト抗体医薬: 中分子創薬のすすめ 進化分子工学による分子標的ペプチド“マイクロ抗体”の創出, シオノギ未来創薬セミナー (2015 年 6 月, 北海道大学) (招待講演).
3. 藤井郁雄, ポスト抗体医薬: 抗体様分子標的ペプチドの創出, 第 9 回高度医療都市を創出する未来技術シンポジウム, 生命医用工学の新展開(1) “未来の医療, 医薬品を支える新規技術創出と人材育成” (2015 年 4 月, 岡山大学) (招待講演).
4. 藤井郁雄, ポスト抗体医薬: 抗体様分子標的ペプチドの創薬研究, 日本薬学会第 135 回シンポジウム「中分子創薬研究のフロンティア」(2015 年 3 月, 神戸学院大学) (招待講演).
5. 藤井郁雄, ポスト抗体医薬: 進化分子工学による分子標的ペプチドの創出, 第 20 回ペプチドフォーラム「生命分子・ペプチド機能に学ぶ医薬品」(2015 年 3 月, 長浜バイオ大学) (招待講演).
6. Ikuo Fujii, Post-antibody drugs: Generation of molecular-targeting peptides “Micro Antibodies” by phage-displayed libraries, Workshop on Innovation and Pioneering Technology 2015: Innovation by Synergy of Computational & Synchrotron Radiation Sciences (2015 年 3 月, 神戸大学) (招待講演).

7. Ikuo Fujii, “MicroAntibodies”: Generation of Molecular-targeting Peptides by Directed Evolution in Phage-displayed Libraries of Conformationally Constrained Peptides, IBC’s 7<sup>th</sup> Annual Asia TIDES (2015年3月, 大阪) (招待講演) .
8. Ikuo Fujii, Post-antibody drugs: Generation of molecular-targeting paptides “Micro Antibodies” by phage-displayed libraries, The 8<sup>th</sup> International Symposium for Future Technology Creating Better Human Health and Society (2015年2月, 岡山大学) (招待講演) .
9. Fujiwara, D. and Fujii, I., “Micro Antibodies”: Generation of Molecular-targeting Peptides by Directed Evolution in Conformationally Constrained Peptide Libraries, 3<sup>rd</sup> Asian Chemical Biology Conference (2014年12月, National University of Singapore) (招待講演) .
10. 藤井郁雄, マイクロ抗体：立体構造規制ペプチドライブラリー法による分子標的ペプチドの創出, 第37回日本分子生物学会年会(2014年11月, パシフィコ横浜) (招待講演) .
11. Ikuo Fujii, “MicroAntibodies”: Generation of Molecular-targeting Peptides by Directed Evolution in Phage-Displayed Libraries of Structured Peptides, 15<sup>th</sup> Tetrahedron Symposium (2014年10月, Singapore) (招待講演) .
12. Ikuo Fujii, Generatio of Molecular-Targeting Peptides by Phage-Displayed Libraries of Helix-Loop-Helix Peptides “MicroAntibody”, 15<sup>th</sup> Akabori Conference, Japanese-German Symposium on Peptide Science (2014年9月, Goppard, Germany) (招待講演) .
13. Ikuo Fujii, Generation of Molecular-Targeting Peptides by Phage- Displayed Libraries of Helix-Loop-Helix Peptides “MicroAntibody”, 2<sup>nd</sup> TKU-OPU, 4<sup>th</sup> TKU-ECIST-OPU-KIST International Symposium (2014年9月, Taiwan) (招待講演) .
14. Ikuo Fujii, “MicroAntibodies”: Generation of Molecular-targeting Peptides by Directed Evolution in Phage-Displayed Libraries of Structured Peptides, International Porum on Green Inetgrative Biotechnology(2014年7月, Tsinghua University, China) (招待講演) .
15. Ikuo Fujii, Holoabzyme: Catalytic antibodies with antigen-combining sites for artificial catalytic components, 7<sup>th</sup> Singapore Catalysis Forum, Singapore Catalysis Society (2014年5月, Singapore) (招待講演) .

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2件)

名称：IgG 結合ペプチド  
 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 2016-049153  
 出願年月日：平成 28 年 3 月 14 日  
 国内外の別：国内

名称：免疫グロブリン G に対する親和性を有するペプチドを担持した IgG 型抗体吸着剤  
 発明者：藤井郁雄，永井宏和，市川高文  
 権利者：公立大学法人大阪府立大学，  
 旭化成メディカル株式会社

種類：特許  
 番号：特願 2016-049197  
 出願年月日：平成 28 年 3 月 14 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
- (3) 連携研究者  
 藤原 大佑 (FUJIWARA, Daisuke)  
 大阪府立大学大学院理学系研究科・助教  
 研究者番号：30611420