

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：重症 GVHD 治療に向けた CD25 中和抗体代替ペプチド製剤の開発

Development of CD25 antibody mimetics for treatment of severe GVHD

研究開発実施期間：2018年5月1日～2020年3月31日

研究開発代表者 氏名：門之園 哲哉

Tetsuya Kadonosono

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東京工業大学 生命理工学院 助教

Assistant Professor, School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

II 研究開発の概要

Graft versus host disease (移植片対宿主病、GVHD) は、造血幹細胞移植により移植された造血幹細胞から成熟・分化したドナーリンパ球が患者の体組織を異物として認識し攻撃する免疫学的な移植合併症であり、重症化すると致命的経過を辿る。このため、標準治療であるステロイドによる免疫抑制療法に加えて、臓器移植時に使用される CD25 抗体医薬 Daclizumab の応用が検討されている。しかし、抗体は複雑な構造と大きな分子量を持つため組織浸透性が低いことや製造コストが高額であることから、Daclizumab による GVHD 治療のコストは非常に高額になると懸念される。

抗体医薬の安価な代替薬として、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医薬の開発が期待されている。しかし、これまでに多数の標的結合ペプチドが報告されているが、いずれのペプチドも抗体と比較すると結合力が弱く、医薬品として認可された例はない。研究開発代表者らは、ペプチドの結合力が弱い原因として構造のゆらぎに注目し、組み込んだ標的結合ペプチドの構造ゆらぎを抑制できる足場ペプチドをデザインすることで、標的に対して強い結合力和高い特異性を持つペプチドを創出する独自の技術を確認してきた。そこで本研究では、これまでの基盤技術を応用し、細胞障害性 T 細胞に発現する CD25 に特異的に強く結合して IL2 シグナルを中和する分子標的結合ペプチドを創出することにより、CD25 中和抗体を代替する新規 GVHD 治療ペプチド医薬の開発に繋げることを目標とした。

本研究開発では、組み込んだペプチドの構造ゆらぎを抑制することができる足場分子にランダムペプチドを組み込んで構造ゆらぎ抑制ペプチドライブラリーを作成し、その中から T 細胞上の CD25 に特異的に強く結合して IL2 シグナルを中和する分子標的結合ペプチドを同定することを目的とした。

1) CD25 結合ペプチドスクリーニングシステムの構築

1-1) スクリーニングに利用する細胞株の樹立

本研究で開発を目指す分子標的結合ペプチドは、CD25 と IL-2 との結合により誘起されるシグナルを遮断する中和活性を持つ必要がある。そこでまず、IL-2/CD25 シグナルによる T 細胞の活性化を蛍光タンパク質の発現で検出できるレポーター細胞株を検討したが、樹立した変異細胞株は IL-2 刺激への応答が弱く、スクリーニングには使用できないと判断した。そこで次に、候補ペプチドと CD25 を共発現させた細胞と蛍光標識した Daclizumab を反応させ、Daclizumab の細胞への結合阻害量を指標とするスクリーニング法を考案し、本システムに必要となる、CD25 を恒常発現する細胞株 (CD25+細胞株) を樹立した。

1-2) Daclizumab の 1 本鎖フラグメント化 (scFv 化)

考案したスクリーニング法の条件を最適化するコントロールとして使用するために、Daclizumab のアミノ酸配列情報から、一本鎖フラグメント抗体 scFv をデザインした。この scFv を培養細胞に分泌させて精製し、結合力を測定した結果、非常に強く CD25 に結合し (解離定数 $K_D=49.6$ pM)、Daclizumab の scFv 化に成功した。

1-3) スクリーニング条件の最適化

CD25+細胞株に、Daclizumab-scFv を細胞膜上にディスプレイするための遺伝子を導入し、CD25+scFv+細胞株を樹立した。次に、親細胞株、CD25+細胞株、CD25+scFv+細胞株と蛍光標識した Daclizumab を反応させ、セルソーターの条件検討を行い、CD25 結合ペプチドを発現している細胞群を回収する領域を決定した。

2) CD25 結合ペプチドスクリーニング

2-1) ペプチドの構造ゆらぎを抑制する新規足場ペプチドの探索

化学合成が容易であり (50 アミノ酸長以下、SS 結合を持たない)、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、スーパーコンピューターを駆使した構造計算により探索し、新たに 33 アミノ酸長のヒト由来ペプチドを同定した。

2-2) 構造ゆらぎ抑制ペプチドライブラリーの作成

抗原-抗体結合エネルギーに基づいてデザインした構造ゆらぎ抑制ペプチドで構成される、Energy-based and Immobilized Peptide (EIP) ライブラリーを考案した。まず、中和抗体 Daclizumab および Basiliximab と CD25 の複合体結晶構造データを基に、結合エネルギー計算により CD25 との結合に重要なペプチド配列を抽出した。次に、これらのペプチドを足場ペプチドに組み込んで構造ゆらぎを抑制し、直接 CD25 と相互作用しているアミノ酸残基は変えずにそれ以外のアミノ酸残基をランダム化することで、9,620 種類からなる構造ゆらぎ EIP ライブラリーを設計した。このライブラリー遺伝子を 1-3) で作成した融合遺伝子中の scFv 遺伝子と置換した DNA ライブラリーを作成した。

2-3) CD25 結合ペプチドスクリーニング

考案したスクリーニング法により CD25 結合ペプチドを同定した。まず、CD25+細胞株に DNA ライブラリーを導入して変異細胞ライブラリーを作成し、CD25 結合ペプチドを発現している細胞群を回収した。次に、細胞にディスプレイされているペプチド配列を次世代シーケンサーで解析し、CD25 結合ペプチドを同定した。リードカウントの上位 8 種類のペプチドについて MD シミュレーション解析を実施したところ、いずれのペプチドにおいても構造ゆらぎが抑制されており、EIP ライブラリーの精度を実証できた。

3) CD25 結合ペプチドの T リンパ球活性抑制効果の確認

予備検討として、ヒト末梢血単核球を CD3/CD28 刺激で活性化させる際に、抑制効果のあるシクロスポリン A (CyA) または Daclizumab を添加して細胞増殖の変化を解析した。その結果、いずれの条件においても活性化の抑制傾向が確認された。また、足場 ZIF ペプチドの添加では効果はみられず、抗原性を持たないことが示された。今後、同様の試験により CD25 結合ペプチドによる T リンパ球活性抑制効果を評価する。

4) 結合力および抗原性評価

スクリーニングで同定した CD25 結合ペプチド 5 種類について結合力を測定した。これらのペプチドを化学合成で調整し、バイオレイヤー干渉法で結合カインेटィクスを測定したところ、最も強いものは解離定数 $K_D=150$ nM で CD25 に結合することが分かった。

また、足場ペプチドの抗原性を評価した。化学合成した足場ペプチドをマウスに複数回投与し、体重、免疫関連組織（脾臓、胸腺）重量、白血球数、グロブリン A/G 比を測定したところ、白血球数が 2 倍程度増加したがそれ以外の項目に差はなく、抗原性は認められなかった。一般的に抗原性が生じるにはある程度の分子量（6 kDa 以上）が必要であると言われていることから、分子量 4 kDa の足場ペプチドおよび CD25 結合ペプチドは抗原性を持たないことが強く示唆される。

5) リンパ球混合試験による免疫反応抑制効果の検討

二者より採血したヒト末梢血を用いてリンパ球混合試験を行い、化学合成した CD25 結合ペプチドの免疫反応抑制効果の検討を進めている。

以上のように、本研究開発では CD25 に結合する構造ゆらぎ抑制ペプチドの創出に成功した。また、これらのペプチドは抗原性を持たないことも強く示唆された。引き続き、免疫反応抑制効果を検証し、新規 GVHD 治療ペプチド医薬の開発を目指す。

創薬デザイン技術開発の観点からみると、新たに考案したスクリーニング法はガイドに利用する抗体と同じ結合領域（エピトープ）を持つ結合ペプチドを同定できることが特徴であり、既存の抗体医薬をガイド抗体とすることで同じ作用機序を持つペプチドが得られる可能性が高い。また、デザインペプチドライブラリーをコードする遺伝子を評価用細胞株に導入して培養するだけでスクリーニングが実施できるため、抗体代替ペプチド探索の汎用的なプラットフォームとなり得る。

本研究開発において考案した EIP ライブラリーのコンセプトは、様々な標的に対する抗体代替ペプチドのライブラリーデザインにおいて汎用的に適用できる。本研究開発ではわずか 9,620 種類のペプチドから CD25 結合ペプチドの取得に成功した。さらに、ペプチドのアミノ酸配列だけでなく構造の違いによっても結合力は大きく異なることから、今後は MD シミュレーションでペプチド置換後の構造も考慮することで、より精度の高い EIP ライブラリーのデザイン技術が構築できると期待される。

Graft versus host disease (GVHD) is an immunological transplant complication in which donor lymphocytes that have matured and differentiated from transplanted hematopoietic stem cells (HSCs) recognize and attack the patient's body tissue as a foreign body. If GVHD becomes severe it follows a lethal course. For this reason, in addition to immunosuppressive therapy with steroid, which is a standard therapy, therapeutic application of anti-CD25 antibody drug Daclizumab at the time of organ transplantation attracts attention. However, antibody drugs have complicated structures and large molecular weights, therefore manufacturing costs and treatment costs are often very high.

As an inexpensive alternative to antibody drug, a peptide drug having a small molecular weight and capable of chemical synthesis and having target binding properties is expected. However, although a large number of target binding peptides have been reported so far, none of the peptides has a comparable affinity with an antibody and there is no case where it has been approved for medical use. We focused on structural fluctuation as a cause of weak affinity of peptides and designed a scaffold peptide that suppresses structural fluctuation of incorporated target binding peptides, thereby providing high affinity and high specificity. Based on this concept, we have developed a CD25 neutralizing peptide as a novel GVHD therapeutic drug seed, while proving the versatility of our design technique.

In this research, we succeeded in developing structurally immobilized peptides that binds to CD25. It was also strongly suggested that these peptides have no antigenicity. We will continue to verify the immunosuppressive effect and aim to develop a novel peptide drug for GVHD treatment.

From the view of drug design technology, the newly constructed screening system is useful to identify a target binding peptide having the same epitope as the guide antibody drugs. Therefore, there is a high possibility that identified peptides have the same mechanism of action as the guide antibody drugs. In addition, the screening can be carried out simply by introducing a gene encoding a design peptide library into cell lines for evaluation thus it can be a universal platform for developing antibody alternative peptides.

In addition, we proposed Energy-based and Immobilized Peptide (EIP) library as a universal design strategy of antibody alternative peptides for various targets. We succeeded to identify CD25 binding peptides from only 9,620 kinds of candidate peptides. Furthermore, since the binding affinity of peptides is greatly affected by their structure in addition to their amino acid sequence, we will try to design a more accurate EIP library by considering the peptide structure using MD simulations.

In the future, we hope to extend these technologies to a wider range of antibody drugs for developing their alternative peptide drugs.