

日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 事後評価報告書



I 基本情報

補助事業課題名：（日本語）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業
（プログラム名）（英語）Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

実施期間：平成29年4月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：（日本語）藤井 郁雄
（英語）Ikuo Fujii

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：
（日本語）大阪府立大学・大学院理学系研究科・教授
（英語）Osaka Prefecture University・Graduate School of Science・Professor

II 補助事業の概要

現在、タンパク質相互作用に対する分子標的ツールとして抗体が注目されており、また分子標的医薬品としても汎用されるようになってきている。しかし、抗体（抗体医薬）には、致命的な欠点があり、以下のような問題点が指摘されている。①抗体は、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できず、細胞内の疾患関連タンパク質をターゲットとすることができない。②ヒトに対する抗原性を下げるため、ヒト化等が必要である。③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。その結果として薬剤治療費が高騰し社会問題になっている。さらに、④抗体医薬の開発や生産には、特許の制限が複雑に絡み合っている。これらの問題点は全て、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研究が始まっている。本研究では、抗体様物質としてヘリックス・ループ・ヘリックス (HLH) 構造をもつペプチドの開発を行った。分子標的 HLH ペプチドは、天然アミノ酸からなる比較的小さなペプチドであるにもかかわらず抗体と同等の結合活性（Kd：数 nM 以下）と安定性（血清中半減期：14 日以上）を持ち、免疫システムに対して寛容であり抗原性を示さない。これらのことから、上記の抗体（抗体医薬）の問題点を一挙に解決し、抗体に代わる新しい分子標的物質として期待される。

（1）支援

分子標的 HLH ペプチド・ライブラリー（サイズ： $>10^9$ ）とファージ表層提示法・酵母表層提示法を用いた独自のスクリーニング技術を活用して、創薬等ライフサイエンス研究に資するケミカルシーズ探索の「支援」を実施した。

分子標的 HLH ペプチド・ライブラリーの作製

ヘリックス領域ライブラリー、ループ領域ライブラリーおよびヘリックス+ループ領域ライブラリーを構築し、ランダム化する位置を変えることにより、タンパク質相互作用トポロジーの異なる各種ライブラリーを作製した(図1)。

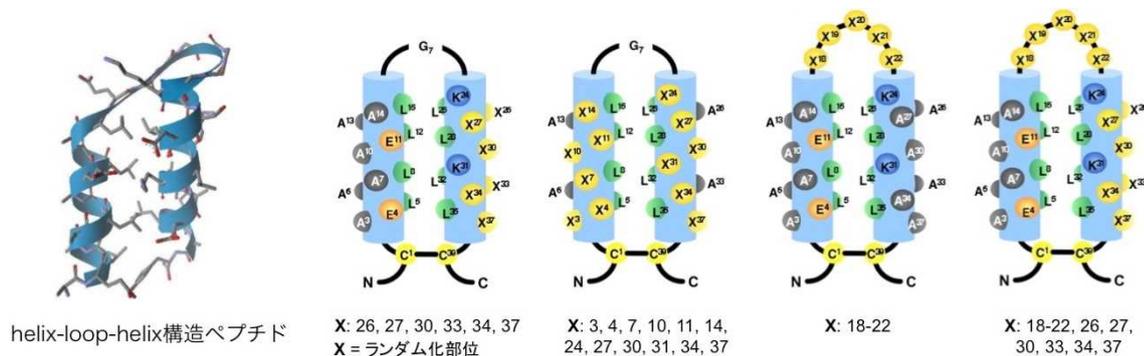


図1. 立体構造規制分子標的 HLH ペプチド・ライブラリーの構築

免疫チェックポイント関連タンパク質に対するスクリーニング

本研究では、細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 (CTLA-4) に結合し、CTLA-4/B7 相互作用阻害活性をもつ分子標的 HLH ペプチドを創出した。CTLA-4 は、T 細胞の表面に発現する免疫チェックポイント受容体の 1 つで、がん細胞は CTLA-4 経路を利用して免疫応答の進行を抑制する。樹状細胞から腫瘍抗原の提示を受けて活性化した T 細胞表面には CTLA-4 が発現し、樹状細胞 B7 に結合することで、T 細胞活性化が抑制される。抗 CTLA-4 分子標的ペプチドは、CTLA-4 に結合することで B7 との結合を阻害し、T 細胞活性化を増強・持続し、活性化した抗腫瘍 T 細胞を誘導することが期待される(図2)。そこで、上記 6 種類の酵母表面提示ライブラリーの混合溶液を用いた CTLA-4 結合性クローンのスクリーニングを行った。

ヒト由来 CTLA-4-IgG/Fc 融合タンパク質に対してスクリーニングを行い、CTLA-4 結合活性をもつ HLH ペプチドを獲得した。本 HLH ペプチドを添加して末梢血単球細胞と成熟樹状細胞を混合培養したところ、細胞分裂の活性化を観測することに成功した。すなわち、ERY2-4 は CTLA-4/B7-1 相互作用を阻害し、免疫細胞を活性化させることが明らかとなった。

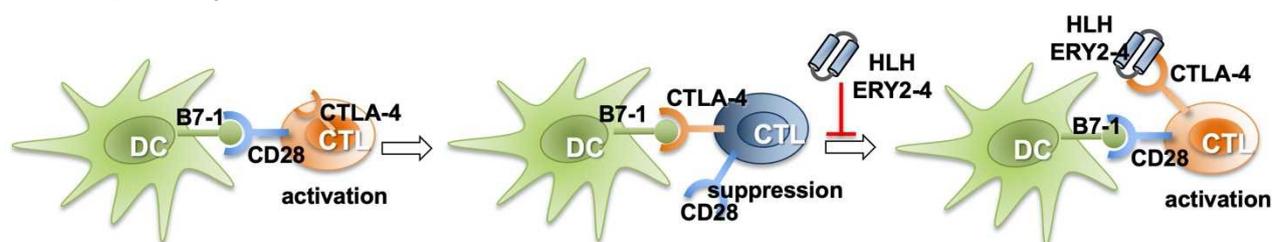


図2 分子標的 HLH ペプチドによる免疫チェックポイント阻害

(2) 高度化

分子標的 HLH ペプチドは立体構造を持っているので、生体内の酵素分解に対しても安定であり、抗体と同等の高い特異性と強い結合活性をもつ。そこで、この分子標的ペプチドを利用して、特定の細胞を標的し細胞内に効率良く送達される分子標的 HLH ペプチド-薬物複合体の開発を行った。

VEGF を分子標的とした血管内皮細胞への薬物送達

血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) は、脈管形成および血管新生に関与する糖タンパクであり、がん細胞から過剰に分泌され、腫瘍組織周辺の血管内皮細胞へ作用し、腫瘍血管の形成を誘導する。すなわち、VEGF を分子標的とした薬物は、腫瘍血管の形成を阻害する抗がん剤になるだけでなく、がん細胞特異的な薬物送達のキャリアとして期待される。そこで、分子標的 HLH ペプチドのファージ表面提示ライブラリーを、VEGF に対してスクリーニングした。バイオパンニングのファージ溶出条件を変えることにより、結合様式の異なる 2 種の VEGF 結合性ペプチドを獲得した。1 つは、VEGF 受容体を添加して競合的に溶出させて得られるペプチド VS42-LR3 であり、このペプチドは VEGF と受容体との結合を阻害する。もう 1 つは、ファージの溶出を酸性条件 (Gly-HCl 緩衝液, pH 2.0) で行う事により得られるペプチド M49 であり、これは VEGF の受容体結合を阻害しない。これら VEGF 結合ペプチドの X 線構造解析に成功し、結合様式の違いを明らかにした (図 3)。

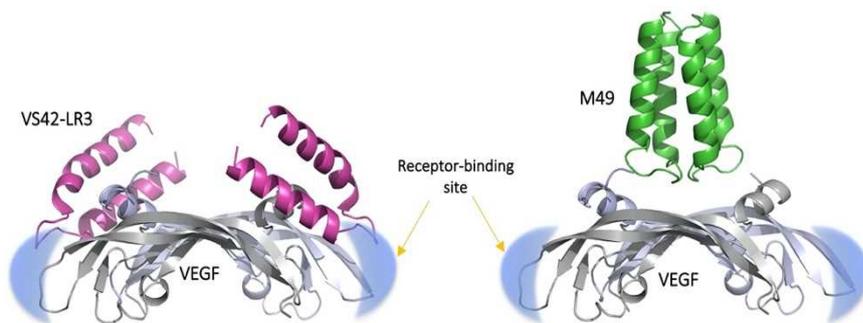


図 3. X 線構造解析: VEGF 結合分子標的 HLH ペプチド VS42-LR3 および M49

ペプチド VS42-LR3 は、受容体結合部位に覆うように結合するため、受容体への結合を阻害し、動物実験において、VEGF によるがん細胞の増殖を阻害した。一方、ペプチド M49 は結合部位やその周辺以外の、受容体結合を妨げない領域に相互作用しているので、この結合特性を利用して、分子標的 HLH ペプチド-薬物複合体 (PDC) の開発を検討した (図 4)。すなわち、ペプチド M49-薬物複合体は、がん細胞が活発に生産する VEGF と結合したのち、VEGF 受容体とアゴニスティックに結合して受容体依存性エンドサイトーシスを誘起し、細胞内に取り込まれる。チューブリン重合阻害剤である Cemadotin をペイロードとして分子標的ペプチド M49 の PDC を合成した (図 4)。M49-薬物複合体 (M49K-Cem) を HUVEC に添加したところ、細胞増殖阻害活性を観測することに成功した。

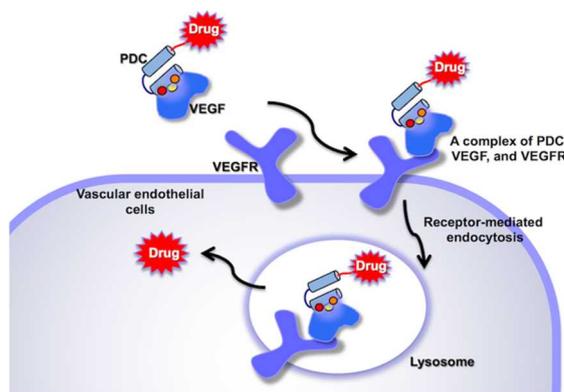


図 4. 分子標的 HLH ペプチド-薬物複合 (PDC): VEGF 受容体を介した薬物送達メカニズム

^{10}B -ホウ素導入した分子標的 HLH ペプチドによるホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) の適応拡大

ホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy: BNCT) は、がん細胞に集積させた ^{10}B -ホウ素と体外から照射する低エネルギーの熱中性子線により、がん細胞のみを破壊に導く非侵襲的な次世代のがん治療法の一つとして注目され、再発難治性がんを対象とした臨床研究がわが国を中心として行われてきた。しかし、BNCT には学術的、技術的に未解決な幾つかの課題が残されており、さらなる革新的ホウ素薬剤の開発が強く求められている。特に、BNCT の中核要素であるホウ素薬剤開発に関しては、多くの候補化

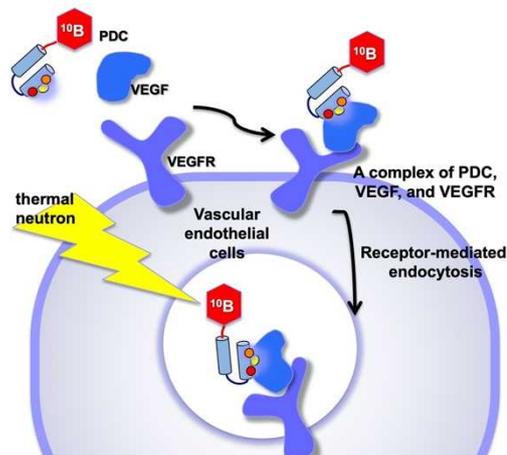


図 5. ホウ素化分子標的 HLH ペプチドによる高選択的ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT)

化合物が報告され、多面的で複合的な開発研究が行われてきたが、現在のところ、臨床に実用されているホウ素薬剤は、L-BPA と BSH の2つのみであり、その適応症も再発の悪性脳腫瘍（神経膠腫）、メラノーマ、頭頸部がん等に限定されている。そこで、本研究では、分子標的 HLH ペプチドをホウ素キャリアとして導入した高選択的ホウ素薬剤を開発した（図 5）。

（3）連携

分子標的 HLH ペプチドによる新しい分子標的化合物設計法の開発

進化分子工学（分子標的 HLH ペプチド・ライブラリー技術）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、分子標的 HLH 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可能で、この立体構造情報をもとに分子標的中分子化合物を設計する。本法は、従来のペプチドミミックによる低分子化とは根本的にコンセプトもアプローチも異なり、低コストで迅速な分子標的化合物の獲得が達成される。

当研究室で獲得した顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 受容体に結合する分子標的 HLH ペプチドの立体構造から、結合活性アミノ酸（ファーマコフォア）の空間配置を決定した。その情報から、ビフェニル化合物を合成したところ、G-CSF 受容体結合活性のある化合物の獲得に成功した。さらに、細胞毒性海洋天然物である環状ペプチドの apratoxin A を土台分子として、分子標的 HLH ペプチドのファーマコフォア空間配置に適合する apratoxin A 誘導体を設計し（担当：筑波大・広川貴次）、各種誘導体を合成（担当：東北大・土井隆行）したところ、G-CSF 受容体への結合を確認した（担当：大阪府大・藤井郁雄）。

Project Title

“Post-antibody Drugs: Generation of Molecular-targeting Peptides by Directed Evolution in Phage-displayed Libraries of Conformationally Constrained Peptides”

Summary

Antibodies are indisputably the most successful reagents in molecular-targeting therapy. However, use of antibodies has been limited due to the biophysical properties and the cost to manufacture. 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 (HLH) peptide. In this project, we have screened cell-surface displayed libraries of HLH peptides against disease-related proteins to generate the molecular-targeting peptides, that show antibody-like functions. The HLH peptide shows a strong binding affinity and high specificity for targeted proteins, and a long half-life (>2 weeks) in mouse sera, proving an enzyme-resistant property. Furthermore, immunization of the peptide to mice showed no induction of the antibody titer (non-immunogenic).

Construction of phage- and yeast-displayed libraries of conformationally constrained peptides: Since the helix-loop-helix (HLH) peptide folds by virtue of the interactions between the amino acid residues (8 leucine) positioned inside the molecule, the outside solvent-exposed residues are possible to be mutated with a variety of amino acids to give a library of the helix-loop-helix peptides. We constructed the phage-displayed libraries with different randomized positions.

Generation of molecular targeting HLH peptides for CTLA-4: Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) downregulates immune responses of cytotoxic T-cells by interaction with B7-1. To induce immune stimulatory activity, we used directed evolution methods to generate a HLH peptide that binds to CTLA-4, inhibiting the CTLA-4–B7-1 interaction and inducing immune stimulatory activity. Yeast-displayed libraries of HLH peptides were screened against CTLA-4 to give a binding peptide, ERY2-4. The peptide specifically bound to CTLA-4 with a KD of 196.8 ± 2.3 nM. Furthermore, ERY2-4 inhibited the CTLA-4–B7-1 interaction with an IC_{50} of 1.1 ± 0.03 μ M and blocked the interaction between CTLA-4 and dendritic cells (DCs) presenting B7 on their surface. Importantly, ERY2-4 showed no cross-reactivity against CD28, suggesting it does not suppress T-cell activation. Finally, in a mixed lymphocyte reaction assay with DCs and T cells, ERY2-4 enhanced an allogeneic lymphocyte response. Since CTLA-4 is a critical immune checkpoint for restricting the cancer immune response, this inhibitory HLH peptide represents a new class of drug candidates for immunotherapy.

A “ligand-targeting” peptide-drug conjugate: As a new alternative to antibody-drug conjugates, we generated “ligand-targeting” peptide drug conjugates (PDCs), which utilize receptor-mediated endocytosis for targeted intracellular drug delivery. The PDC makes a complex with an extracellular ligand and then binds to the receptor on the cell surface to stimulate intracellular uptake via the endocytic pathway. A helix-loop-helix (HLH) peptide was designed as the drug carrier and randomized to give a conformationally constrained peptide library. The phage-displayed library was screened against vascular endothelial growth factor (VEGF) to yield the binding peptide M49, which exhibited strong binding affinity ($KD = 0.87$ nM). The confocal fluorescence microscopy revealed that peptide M49 formed a ternary complex with VEGF and its receptor, which was then internalized into human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) via VEGF receptor mediated endocytosis. The backbone-cyclized peptide M49K was conjugated with a drug, monomethyl auristatin E, to afford a PDC, which inhibited VEGF-induced HUVEC proliferation. HLH peptides and their PDCs have great potential as a new modality for targeted molecular therapy.

Molecular design of small organic molecules based on structural information of HLH peptides: Despite intense research into the design of small ligands that target protein–protein interaction interfaces, a novel methodology for the rational design of such ligands remains an elusive goal. To design such ligands, we have examined the directed evolution of a phage-displayed library of HLH peptides. Screening of the library against targeted proteins should provide bioactive HLH peptides, whose rigid structures indicate the required spatial orientation of the pharmacophores, thus facilitating structure-based design of peptidomimetics. We have applied our method to ligand design for granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) receptor to generate two small organic molecules binding to the receptor.

