

立体構造規制ペプチドの分子設計に関する研究: VEGF結合性ヘリックス・ループ・ヘリックス構造ペプチドの創出と 生物活性

大阪府立大学大学院・理学系研究科・生物科学専攻・生命化学研究室
道上雅孝

【序論】

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、医薬品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、分子標的医薬の第一候補として注目されているのが抗体医薬である。免疫システムのもつ抗体の多様性を利用すれば、標的タンパク質に特異的に結合する分子標的医薬を意のままに作製することができる。一方、抗体医薬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。1) 抗体は多数のジスルフィド結合を含む、分子量150 kDa の大きな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ない。2) 医薬品としての利用の際には、抗原性が問題になる。3) モノクローナル抗体は、動物細胞で生産され、高価である。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、イムノグロブリン構造を利用しない低分子量の次世代抗体の開発が望まれている。当研究室では、タンパク質の部分構造であるペプチドを次世代抗体として注目している。

一般に、抗体のように生体内でも安定で標的タンパク質に対して高い親和性を持つペプチドを獲得するのは困難である。なぜなら、ペプチドは柔軟な構造をもつため、生体内では天然酵素の攻撃を受け、すぐさま分解される。また、誘導適合によって標的分子と結合するため、エントロピーの損失が大きく高い結合活性を示さない。この問題の解決策は、安定な立体構造をもつペプチドを設計することである。強固な立体構造を持つペプチドは、天然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、標的タンパク質との結合による立体構造の変化が小さいため、エントロピーの損失が少なく、高い結合活性を示すと期待される。

本研究では、抗体様分子標的ペプチドを開発するため、安定な立体構造を持つペプチドと分子進化工学とを組み合わせた分子設計法を用いた。すなわち、*de novo* 設計されたヘリックス・ループ・ヘリックス構造ペプチドのファージ表層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をスクリーニングした。そして、獲得したペプチドについて、構造安定性や結合活性などを評価し、次世代抗体としての可能性を検討した。

【第1章 VEGF 分子標的ペプチドの創出】

本研究では血管内皮増殖因子A (VEGF) に結合するペプチドを開発した。まず、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た (Fig. 1)。ペプチドのライブラリー領域は、ループ部位の9残基 (X部分) と C 末端側 α -ヘリックスの溶媒面に露出している6残基 (Z部分) であり、ライブラリーサイズは 1.2×10^9 を有する。ループ部位は20種類の天然アミノ酸がコードされるが、ヘリックス部位は、ThrとAla、 α -ヘリックス構造を不安定化するProを含まない17種類のアミノ酸がコードされる。本ペプチドライブラリーからVEGF標的ペプチドをスクリーニングしたところ、クローンM49を獲得した。これを Fmoc 固相合成法により合成し、円二色性 (CD) スペクトルを測定した結果、 α -ヘリックス特有の波形を示した。また、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法により VEGF に対する解離定数 (K_d) を測定したところ、非常に高い結合活性を示した ($K_d = 0.87 \text{ nM}$)。

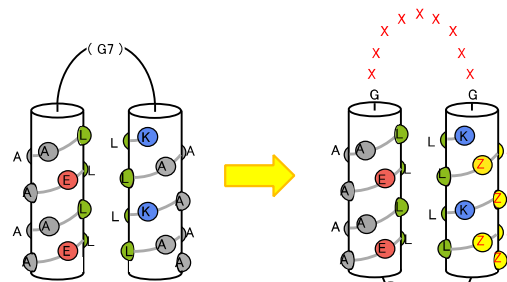
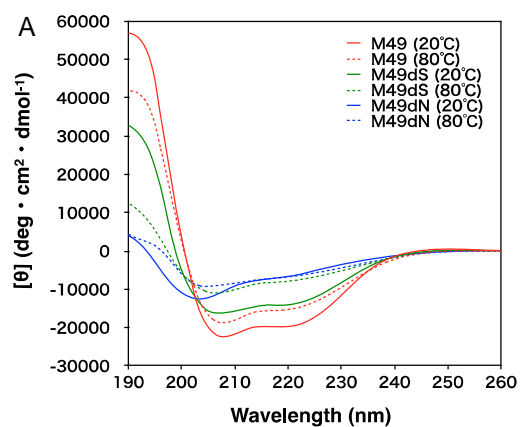


Figure 1. ペプチドライブラリーのデザイン

M49が安定な立体構造を持ち、それが標的タンパク質に対する高い結合活性や、プロテアーゼ耐性に寄与するのかを明らかにするため、M49の誘導体 (M49dS, M49dN) を合成し、M49との物性を比較した (Fig. 2)。CDスペクトルを用いて、熱安定性を評価したところ、M49は80°Cにおいても α -ヘリックス構造を保持できるほど、安定な立体構造を持っていた。また、この立体構造の形成には、2本のヘリックス間の疎水効果によるところが大きく、分子内ジスルフィド結合によって、その立体構造がより安定化されることが判明した。SPR法を用いた結合活性測定試験・熱力学的解析とタンパク質分解酵素 (トリプシン) に対する安定性試験の結果より、安定な立体構造をもつことで、非常に高い結合活性と、タンパク質分解酵素に対する抵抗性を示すことが判明した。



B

	Sequence	K_d (nM)	$t_{1/2}$ (min)
M49	CAAEALAEALAEALLEGPWKGYPIPYGKLOFLIKKQKLVAC	0.87 ± 0.15	1190 ± 60
M49dS	AELAEALAEALAEALLEGPWKGYPIPYGKLOFLIKKQKLV	27.1 ± 0.4	39 ± 2
M49dN	GPWKGYPIPYGKLOFLIKKQKLV	non-binding	5.1 ± 0.3

Figure 2. M49 の構造活性相関. (A) M49 誘導体の 20°C (実線) と 80°C (点線) における CD スペクトル. (B) ペプチドのアミノ酸配列と結合活性とトリプシン耐性試験における半減期.

現在、VEGFの生理活性を阻害する抗VEGFモノクローナル抗体 (bevacizumab) は、抗がん剤として利用されている。つまり、M49がVEGFの中和活性を保持していれば、M49は次世代抗体医薬品としての応用が期待される。そこで、M49がVEGF-VEGF受容体の相互作用を阻害できるかSPR法を用いて調べたが、M49は阻害活性を示さなかった。そこで、M49にタンパク質を融合することで、その立体障害によりVEGF-VEGF受容体の相互作用を阻害できるのではないかと考え、チオレドキシシン (Trx) との融合タンパク質 (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IC₅₀値を示した。つまり、Trx-M49はVEGF阻害活性を示した。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。10 mg/kg で投与した結果、抗VEGFモノクローナル抗体 (bevacizumab) と同様に、PBSを投与したコントロール群と比べて有意に腫瘍の増殖を抑制することが判明した (Fig. 3)。

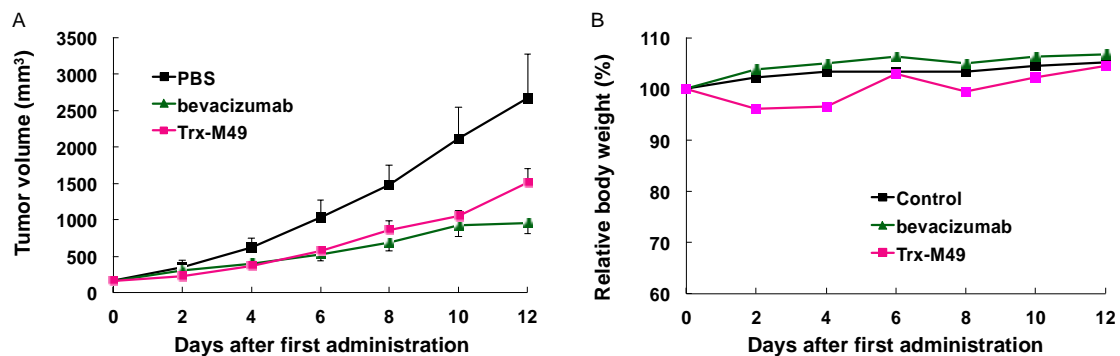


Figure 3. 腫瘍増殖抑制試験. LS174T細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍の平均サイズが160 mm³になったところを0日とした (n = 5). PBS (days 0 - 8 i. p.); bevacizumab (5 mg/kg days 0, 3, 7, 9 i. p.); Trx-M49 (10 mg/kg days 0, 3, 7, 9 i. p.) (A) 腫瘍体積. (B) 体重変化.

【第2章 ペプチド-薬物複合体】

本章では、「抗体-薬物複合体」(Antibody-Drug Conjugate : ADC) の抗体部分に、VEGF標的ペプチドM49を利用した「ペプチド-薬物複合体」

(Peptide-Drug Conjugate : PDC) を作製し、新規薬物輸送システムとしての応用を検討した。ADCの作用機序として、1) 標的細胞特異的な抗原の認識。2) ADCの標的細胞内への取り込み。3) 細胞内での抗体から細胞毒性薬の切り離し。これら3つ過程があり、PDCでもこれらを再現する必要がある (Fig. 4)。

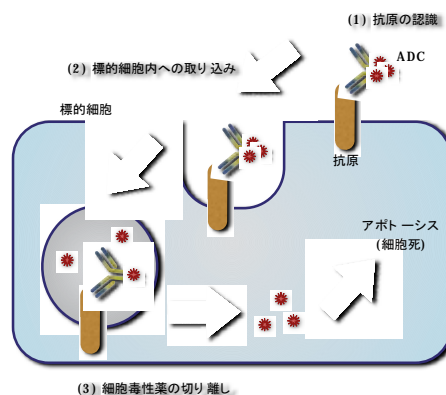


Figure 4. 抗体-薬物複合体の作用機序

1) 標的細胞の認識

VEGFは、がん細胞から過剰に分泌されることが知られている。そこで、VEGF標的ペプチドM49が、生体内で腫瘍組織に集積するか、ポジトロン断層法 (PET) を用いて調べた。まず、PET測定を実施するために、放射線放出核種 ^{18}F の修飾部位をペプチド M49 に導入した誘導体 (M49K) を合成した。M49K は Fmoc 固相合成法とNative Chemical Ligation (NCL) 反応を用いて合成した (収率 6%)。合成したM49Kには遊離のチオール基が一つ存在する。この部位にリンカーを介して ^{18}F を結合させた。ヒト大腸がん (LS174T株) をヌードマウスに移植した、担がんマウスモデルに対して、 ^{18}F を標識した M49K を静脈注射し、PET 測定を実施した。その結果、M49K は腫瘍組織に蓄積することが判明した。また、ペプチドは血中からのクリアランスが速く、時間が経過するにつれて、膀胱への蓄積が観測された。

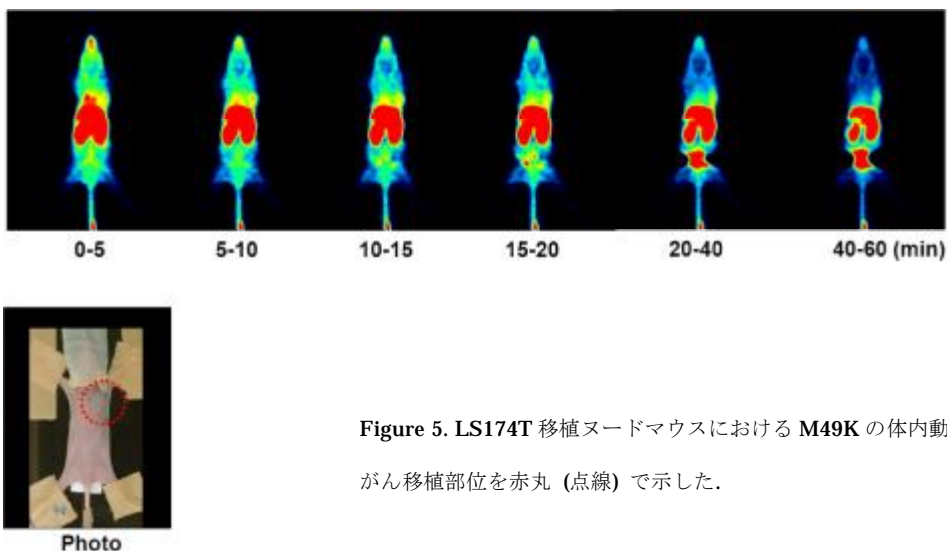


Figure 5. LS174T 移植ヌードマウスにおける M49K の体内動態。
がん移植部位を赤丸 (点線) で示した。

2) 標的細胞内への取り込み

M49K-VEGF₈₋₁₀₉ 複合体の X 線結晶構造を 2.0 Å の分解能で得た。M49Kは、VEGF受容体結合部位とは異なる部位に結合しており、この構造情報から、VEGFに結合したM49は、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ることが期待される。そこで、M49K がHUVEC内へ取り込まれることを確認するために、蛍光物質 (Cy5.1) で標識したM49KをHUVECに添加し、共焦点顕微鏡とフローサイトメーターにより観察した (Fig. 6)。その結果、VEGF 存在下でのみ、Cy5.1 の蛍光が細胞内に観察された。さらに、VEGF に標識した Alexa-488 の蛍光と共局在していたことから、M49K は VEGF に結合し、VEGFR を介したエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれることが示唆された。

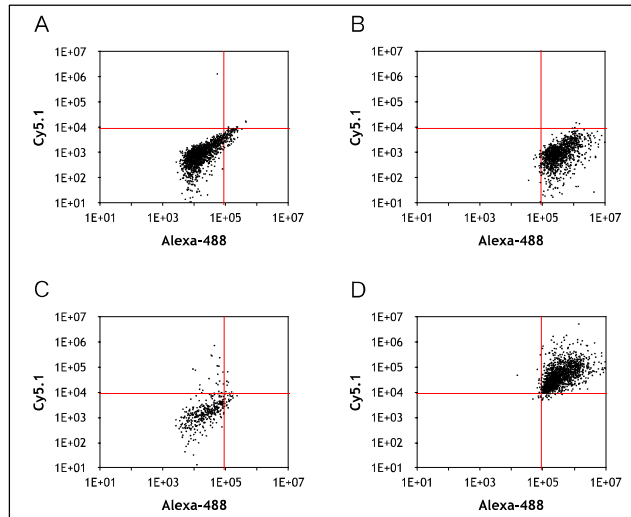
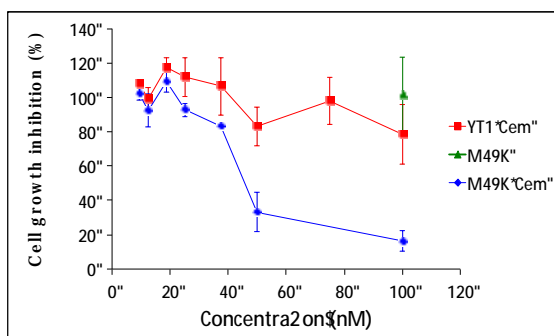


Figure 6. フローサイトメーターによる M49K の細胞取り込み試験. (A) HUVEC (B) VEGF-Alexa488 を処理した HUVEC (C) M49K-Cy5.1 を処理した HUVEC (D) VEGF-Alexa488 と M49K- Cy5.1 を処理した HUVEC.

3) 細胞内での細胞毒性薬の切り離し

まず、M49K-薬物複合体 (M49K-Cem) を合成した。薬物にはチューブリンの重合阻害剤である CemCH₂-SHを利用し、M49Kのシステイン残基とジスルフィド結合を介して結合させた。細胞内は多量のグルタチオンが存在し、還元条件下であるため、M49K-Cemが取り込まれると、このジスルフィド結合は切断され、薬物が毒性を発揮する。M49K-Cemを用いて、HUVECの増殖阻害試験を実施した結果、M49K-Cemは細胞増殖を濃度依存的に阻害した (IC₅₀ = 45 nM)。一方、M49KとYT1-Cemは細胞増殖を阻害しなかった (Fig. 7)。YT1はVEGFに結合しないペプチドであるため、細胞内にはとここまれず、阻害活性が確認できなかったと考えられる。



【統括】

現在、がん治療を目的とした抗体医薬品の開発が活発に行われている。しかしながら、抗体医薬品には抗体タンパク質自身の性質に起因する多くの問題点が指摘されている。そこで、抗体に代わる分子として、安定な立体構造をもつ分子標的ペプチドを開発した。第1章では、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層提示ライブラリーを構築し、VEGFに結合するペプチドをスクリーニングした。獲得したペプチド M49 は、安定なヘリックス・ループ・ヘリックス構造を保持し、その立体構造の安定性が VEGF に対する高い結合活性や、タンパク質分解酵素に対する抵抗性の獲得に寄与することを明らかにした。さらに、Trx-M49 は、VEGF 阻害活性を示し、担がんマウスモデルにおいては、bevacizumab と同様に、抗腫瘍活性を示した。

第2章では、M49K-薬物複合体を用いた新規薬物輸送システムの開発について検討した。まず、担がんヌードマウスを用いた PET 測定により、M49K が腫瘍組織に集積することが判明した。次に、M49K は、VEGF-VEGF 受容体の相互作用を介したエンドサイトーシスにより、HUVEC 内に取り込まれることを共焦点顕微鏡観察により明らかにした。そして最後に、M49K-薬物複合体は、HUVEC の細胞内で薬物がペプチドから切り離され、細胞増殖を阻害することを明らかにした ($IC_{50} = 45 \text{ nM}$)。これらの結果は、抗体-薬物複合体の抗体部分をペプチドに置き換えることが可能であるという事を示しており、PDC の有用性を示唆している。

近年、医薬品には、従来の低分子化合物だけでなく、抗体のような分子量の大きなタンパク質も利用されるようになってきた。しかし、これらの中間の分子量である医薬品（中分子と呼ぶ）については、開発例が非常に少ない。本研究では、中分子ペプチドの癌治療への応用について可能性を示した。また、抗体のように高い結合活性と結合特異性を持つヘリックス・ループ・ヘリックスペプチドは、抗体の代わりになるだけでなく、抗体が対応できなかった新たなアプリケーションについても応用できるだろう。

(1) Michigami, M; Ye, Z.; Koezuka, Y.; Fujii, I. Tumor growth inhibition by anti-VEGF microantibody. *Peptide Science*. (2014) *in press*.

(2) Takahashi, K.; Michigami, M; Fujii, I. Chemical synthesis of head-to-tail cyclized anti-VEGF microantibody. *Peptide Science*. (2014) *in press*.

(3) Suzuki, M; Michigami, M; Ye, Z.; Fujii, I. Isolation of anti-VEGF neutralizing microantibodies from phage-displayed peptide library. *Peptide Science*. (2014) *in press*

(4) Michigami, M; Ye, Z.; Atake, T.; Koezuka, Y.; Fujii, I. A semi-rational approach combining de novo peptide design and directed evolution: helix-loop-helix peptide

inhibitors of VEGF signaling. *J. Am Chem Soc.* *submitted*.