

称号及び氏名 博士(理学) 中谷 勇登

学位授与の日付 2023年3月31日

論文名 分子標的HLHペプチドを基盤とした新規ペプチド-薬物複合体の創出

論文審査委員 主査 中瀬 生彦
副査 佐藤 孝哉
副査 円谷 健

分子標的 HLH ペプチドを基盤とした新規ペプチド-薬物複合体の創出

中谷 勇登 (生命化学)

第1章 序論

現在、抗体は優れた分子標的治療薬として開発が進められている。しかしながら、抗体医薬の研究が進むにつれ、その限界も明らかとなってきた。特に、1) ヒト化されていない抗体は免疫原性が懸念される、2) 動物細胞で作製するため、手法が複雑であり製造コストが高い、3) 細胞内への導入が困難であるため、細胞内利用に制限があるということが指摘されている。これらの問題はいずれも抗体が巨大な分子サイズ（分子量約 15 万）をもつことに起因している。したがって、抗体と同様の機能をもちつつも分子サイズが小さい中分子ペプチドは、抗体医薬の問題を克服できる新たな医薬分子として期待されている。そこで所属研究室では、*de novo* 設計されたヘリックスループヘリックス (HLH) 構造もつ中分子ペプチド、「分子標的 HLH ペプチド」（分子量約 5,000）の開発を進展させている。HLH ペプチドは 3 つの構造領域で構成されている（図 1）。それぞれ、N 末端ヘリックス、C 末端ヘリックス、そしてそれらをつなぐループ領域である。ヘリックス内側に配置された Leu 残基の疎水性相互作用、及び、N 末端部と C 末端部の Cys 残基による分子内ジスルフィド結合により、HLH 構造は強固に安定化されている。一方で、ヘリックス外側やループ領域のアミノ酸（図 1 中の X）は構造形成に寄与していない。そのため、X 部分のアミノ酸をランダムに置き換えることで、HLH 構造を保持しつつも多様なアミノ酸配列を有するペプチド・ライブラリーが構築できる。

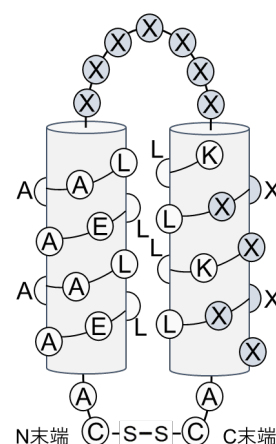


図 1. HLH ペプチドの分子設計. Leu (L) の疎水性相互作用, Cys (C) のジスルフィド結合により構造を安定化. X: 天然アミノ酸 20 種をランダムに配置.

所属研究室では、この HLH ペプチドを土台としてファージ表層提示、及び、酵母表層提示ライブラリーを構築し、さまざまな疾患関連タンパク質に対してスクリーニングを行い、生物活性をもつ分子標的 HLH ペプチドの創出に成功している。HLH ペプチドは、その強固な立体構造により、標的タンパク質に対する強い結合力と高い特異性を有するとともに、生体内の酵素分解に対して抵抗性を示す（血清中半減期：2 週間程度）。また、比較的小さな分子であるため、非免疫原性である。さらに、天然アミノ酸から構成されている HLH ペプチドは、従来のペプチド固相法により簡便にかつ安価に合成できる。これらのことから、抗体に代わる次世代の創薬モダリティとして大いに期待されている。そこで私は本研究において、HLH ペプチドの新たな研究展開として、分子標的 HLH ペプチド-薬物複合体 (peptide-drug conjugate, PDC) の創出を検討した。1 つ目の研究課題（第 2 章）では、血清アルブミン結合性 HLH ペプチド-バイオ医薬品複合体を開発し、バイオ医薬品の体内動態改善に取り組んだ。2 つ目の研究課題（第 3 章）では、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ受容体結合性 HLH ペプチド-抗がん剤複合体を開発し、がん細胞選択的な抗がん剤送達に取り組んだ。以上の研究課題を通して、HLH ペプチドのドラッグデリバリーツールとしての応用性を検討した。

第2章 HLH ペプチド-バイオ医薬品複合体

バイオ医薬品の有効性は、その薬物動態に大きく影響を受ける。特に、小型のバイオ医薬品は腎クリアランスにより排出されやすく、血中半減期が短いことが課題となっている。この課題の解決策として、生体内タンパク質であるヒト血清アルブミン (human serum albumin, HSA) が注目されている。HSA は血中で多量に存在するタンパク質であり、約 3 週間という長い血中半減期をもつ。すなわち、HSA と結合する分子をバイオ医薬品と連結することで、HSA を介した血中半減期の延長が期待できる。そこで、本研究では、HLH ペプチド・ライブラリーを利用して、血清アルブミン結合性 HLH ペプチドを開発した。そして、このペプチドとインスリンを連結させて PDC とし、血清アルブミンを介したインスリンの血中半減期延長を検討することにより、血清アルブミン結合性ペプチドの性能を評価した (図 2)。

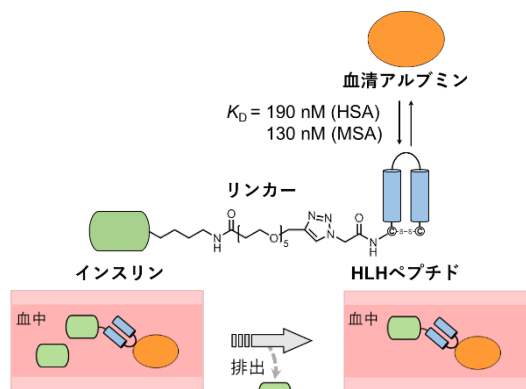


図 2. 血清アルブミン結合性 HLH ペプチドによるインスリンの血中半減期延長. 血中のインスリンは速やかに排出されるが、血清アルブミン結合性ペプチドで PDC 化することで、長時間血中に留まる。

ヒトへの投与、及び、マウスを用いた動物試験を考慮し、本研究では HSA、及び、マウス血清アルブミン (mouse serum albumin, MSA) に対して交差結合性を示す HLH ペプチドの開発を検討した。まず、酵母表層提示 HLH ペプチド・ライブラリーを HSA と MSA に対して交互にスクリーニングすることにより、血清アルブミン結合性ペプチド AY-01 が得られた。AY-01 は HSA、及び、MSA に対する交差結合性を示した (HSA: $K_D = 590$ nM, MSA: $K_D = 560$ nM)。続いて、血清アルブミンに対する結合力を向上させるため、AY-01 の *in vitro* 親和性成熟を行った。エラープローン PCR 法を用いて、AY-01 のアミノ酸配列の一部を変異させた酵母表層提示ペプチド・ライブラリーを作製し、血清アルブミンに対して再びスクリーニングを行った。その結果、強い結合力を有するペプチド AY-VE が得られた (HSA: $K_D = 65$ nM, MSA: $K_D = 20$ nM)。

次に、AY-VE とインスリンの複合体を化学合成した。AY-VE およびインスリンに対して、それぞれの結合活性に関与しない部位へ選択的に官能基を誘導し、銅(I)触媒によるアジド-アルキンの付加環化反応を用いて AY-VE-インスリン複合体を合成した。この複合体は HSA および MSA に対して十分な結合力を示し (HSA: $K_D = 190$ nM, MSA: $K_D = 130$ nM)、インスリン受容体に対しても天然インスリンと同等の結合力を示した (複合体: $K_D = 340$ nM, 天然インスリン: $K_D = 380$ nM)。以上より、合成した複合体は血清アルブミンおよびインスリン受容体に対して、結合力を保持していることが明らかとなった。

最後に、AY-VE-インスリン複合体をマウスに投与

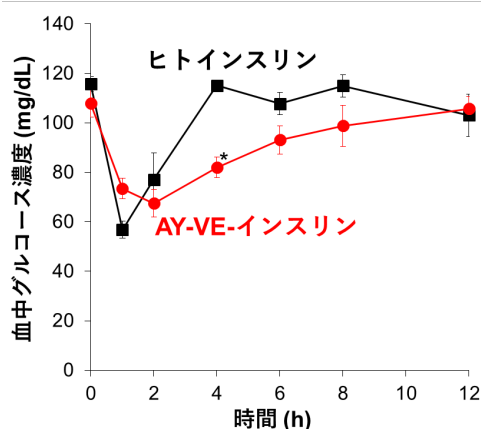


図 3. 血中グルコース濃度の変化. 各サンプルは $38 \mu\text{g/kg}$ (インスリン当量) で健常マウスに皮下投与した. * $p < 0.05$.

し、生体内においてインスリン活性が持続されるかを確かめた (図 3)。インスリンはグルコースの取り込みを促進し、血糖値を低下させる働きをもつ。したがって、血中のグルコース濃度の経時変化を追跡することで、インスリンの活性が長時間持続しているかどうかを評価できる。測定の結果、AY-VE-インスリン複合体は 12 時間にわたる長時間の血糖降下作用を示した。これは対照サンプルであるヒトインスリンと比較して顕著なものであった。これらの結果より、AY-VE はマウス生体内において MSA と結合することで、インスリン活性を長時間持続できたと考えられる。以上より、本研究で開発した血清アルブミン結合性 HLH ペプチドは、バイオ医薬品の体内動態を改善するための応用性の高い分子基盤ツールになると期待できる。

第 3 章 HLH ペプチド-抗がん剤複合体

抗体-薬物複合体 (antibody-drug conjugate, ADC) は、高い分子認識能をもつ抗体を利用して、低分子薬物を効果的に標的細胞へ送達する技術であり、新たながん治療法として開発が進められている。しかしながら、ADC の重大な問題点として薬物修飾の不均質性が指摘されている。抗体の薬物修飾には Lys 残基が利用されるが、抗体は多数の Lys 残基をもつため薬物の修飾部位や個数にばらつきが生じ、不均質な ADC となる。そこで、このような課題をもつ ADC に代わる分子の創出を目指し、抗体と同等の機能

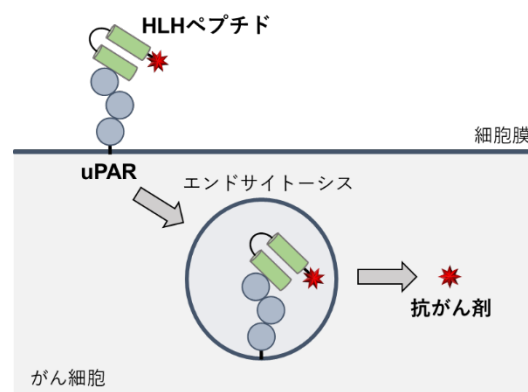


図 4. uPAR 結合性 HLH ペプチドによる抗がん剤の送達. uPAR 結合性ペプチドに抗がん剤を付加し、uPAR のエンドサイトーシス経路を介して細胞内へ送達する。

をもつ分子標的 HLH ペプチドを用いた PDC を設計した。HLH ペプチドは化学合成により作製できるため、薬物の修飾部位や個数が制御可能である。また、PDC の開発においては、標的細胞へのターゲティング機能と細胞内への薬物送達機能が重要となるが、標的細胞膜で過剰に発現している受容体を利用することで、細胞のターゲティング、及び、受容体のエンドサイトーシス機構を介した細胞内薬物送達が可能となる。本研究では、細胞膜に存在する受容体として、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ受容体 (uPAR) に注目した。uPAR は細胞遊走に関わる受容体であり、がん細胞膜で過剰に発現していることが知られている。すなわち、本研究では、uPAR 結合性 HLH ペプチドを開発し、このペプチドに抗がん剤を付加することで、uPAR を介したがん細胞への抗がん剤送達を可能とする PDC の創出を行った (図 4)。

初めに、uPAR 結合性ペプチドの開発を行った。uPAR に対してファージ表層提示 HLH ペプチド・ライブラリーをスクリーニングし、単離したファージクローンのシーケンス解析を行ったところ、数種類のアミノ酸配列が得られた。その中から、配列の多様性を考慮して 5 種類のペプチドを化学合成し、SPR 法により uPAR に対する結合力を測定した。4 種の uPAR 結合性ペプチドは中程度の解離定数 ($K_D = 167\sim 595$ nM) を示したが、1 種のペプチド R4I-7 は強い結合力を示した ($K_D = 4$ nM)。また、R4I-7 は、uPAR と天然リガンドである uPA (ウロキナーゼ型プラスミ

ノーゲンアクチベータ) の相互作用を完全に阻害した (IC₅₀ = 5 nM)。

次に、蛍光色素であるフルオレセインを標識した R4I-7 を用いて、がん細胞内への移行性を確認した。蛍光標識 R4I-7 を各細胞へ添加したところ、uPAR 陽性がん細胞 (MDA-MB-231) において細胞内の蛍光が観測された。一方で、uPAR 陰性がん細胞 (MCF-7) においては細胞内の蛍光が見られなかった。これらの結果より、R4I-7 は uPAR 陽性がん細胞選択的な細胞内移行性を示すことが明らかとなった。

最後に、R4I-7 と抗がん剤であるモノメチルアウリスチン E (MMAE) の複合体を合成し、生物活性を評価した。MMAE はチューブリン重合阻害剤であり、がんの増殖を阻害する作用がある。合成した R4I-7-MMAE 複合体を MDA-MB-231 (uPAR 陽性細胞)、及び、MCF-7 (uPAR 陰性細胞) に添加し、細胞増殖の阻害活性を評価した (図 5)。本実験では、陰性対照として uPAR に結合しない HLH 土台ペプチド YT1-S と MMAE の複合体を用いた。結果として、MDA-MB-231 細胞においては R4I-7-MMAE と YT1-S-MMAE との間に細胞増殖阻害効果の差が確認できた。一方で、MCF-7 細胞においては R4I-7-MMAE と YT1-S-MMAE との間に増殖阻害効果の差は認められなかった。これらの結果より、R4I-7 は uPAR 陽性がん細胞選択的な抗がん剤送達が可能であることが示唆された。以上より、本研究で開発した uPAR 結合性ペプチドは、がん細胞選択的なドラッグデリバリーツールとしてさらなる発展が期待できる。

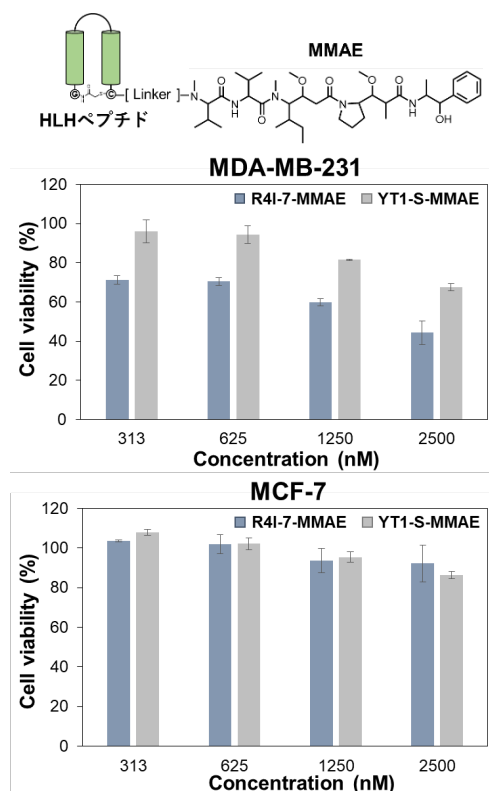


図 5. 細胞増殖阻害アッセイ. 各細胞にサンプルを添加し、72 時間後、WST-1 アッセイにより細胞生存率を測定した. 培地のみを添加した条件を 100%としたときの相対値を示している。

<原著論文>

1. “Human and Mouse Cross-Reactive” Albumin-Binding Helix–Loop–Helix Peptide Tag for Prolonged Bioactivity of Therapeutic Proteins, Nakatani Y., Ye Z., Ishizue Y., Higashi T., Imai T., Fujii I., Michigami M., *Mol. Pharmaceutics* **19**, 7, 2279–2286 (2022).

学位論文提出者氏名 中谷 勇登

学位論文題目

分子標的HLHペプチドを基盤とした新規ペプチド-薬物複合体の創出

2 学位論文検討結果の要旨

現在、高い分子認識能を有する抗体を用いた治療技術は、がんをはじめとした様々な疾患に対して、国内外における医療機関で使用されている。例えば、免疫系での抗体の活用で、難治性がんや自己免疫疾患等での優れた治療効果が認められ、さらなるバイオ医薬品としての進化が期待されている。一方で問題点として、抗体は化学合成ができず、生物を用いた調製が殆どで、莫大な費用がかかることや、分子量が約 15 万と巨大分子であるが故の組織浸潤や細胞内標的の困難さ、限定的な投与方法等が喫緊の解決すべき課題とされている。

本学位論文提出者の中谷勇登氏は、抗体の“小型化”を狙った、中分子ペプチド創薬としての“ヘリックス-ループ-ヘリックス (HLH)”構造を土台とした分子認識技術の構築を進めてきた。本論文において中谷氏は、生体内の体内動態・安定性の改善のための、血清アルブミン結合性 HLH ペプチドの開発とインスリン結合による血中グルコース濃度制御、及び、がん受容体の一種であるウロキナーゼ型プラスミノージェンアクチベータ受容体 (uPAR) 認識 HLH ペプチドの開発と抗がん活性分子の送達技術に関して研究を進めた。いずれの HLH ペプチドも、酵母表層提示ライブラリー、及び、ファージ表層提示ライブラリーから得られた世界で唯一の分子認識 HLH ペプチドであり、抗体に匹敵する分子機能を有した機能性・独創性の極めて高い化学構造を有している。

血清アルブミン結合性 HLH ペプチドの研究においては、ヒトとマウスの両方の血清アルブミンに結合できるペプチドを新規取得することに中谷氏は成功し、動物を用いた研究と、将来のヒトへの応用を繋ぐ一連の非臨床・臨床研究過程に有用な基盤技術構築に至った。加えて、本 HLH ペプチドを用いたインスリン送達において、動物実験での血糖低下作用とインスリン活性の長時間持続効果を確認した。

uPAR 認識 HLH ペプチドの研究においては、悪性度の高い乳がん細胞 (トリプルネガティブ) 由来 MDA-MB-231 細胞において、新規取得した HLH ペプチドの受容体発現に応じた高い細胞内移行性が確認され、さらに抗がん剤モノメチルアウリスタチン E をペプチドに結合させることで、乳がん細胞の殺細胞効果が確認できた。

これらの学位論文の研究内容は、上述の抗体医薬における問題点を解決できる基盤技術になり得ること、また世界的に医療課題となっているテーラーメイド治療への新たな道筋を切り開く技術開発に大きく貢献できる研究成果である。以上より、学位論文審査において本論文内容は博士学位取得に十分に値すると考える。

主査 教授 中瀬 生彦

副査 教授 佐藤 孝哉

副査 教授 円谷 健