

## 抗体医薬に匹敵する標的結合ペプチドの開発

治療標的に結合する抗体を利用した医薬品（抗体医薬品）は従来の低分子薬剤と比べて副作用が少なく、低分子薬剤をしのご治療成績をあげるものもあり、薬剤として有望視されている。しかし、抗体は大量生産が難しいため製剤費が高額であり、そのため治療費が年間数百万円にも達するという問題がある。そこで我々は、安価に合成できるペプチドを抗体医薬の代替として利用するために、標的結合ペプチドの高性能化を進めている。

### ①ゆらぎ制御による標的結合ペプチドの高活性化と高精度スクリーニング法の開発

結合力の高い標的結合ペプチドを同定するために、ペプチドライブラリーから同定する手法が多用されるが、得られたペプチドの多くは結合力と標的の特異性が低く、実用化に至らない場合が多い。この原因の一つとして、スクリーニングの過程で構造ゆらぎの大きなペプチドで構成されるライブラリーを使用していることが挙げられる。構造ゆらぎの大きな標的結合ペプチドは結合構造を取りにくいいため結合力は低く、また、構造が容易に変化して標的以外の分子にも結合するため、特異性が低いと考えられる（図1）。

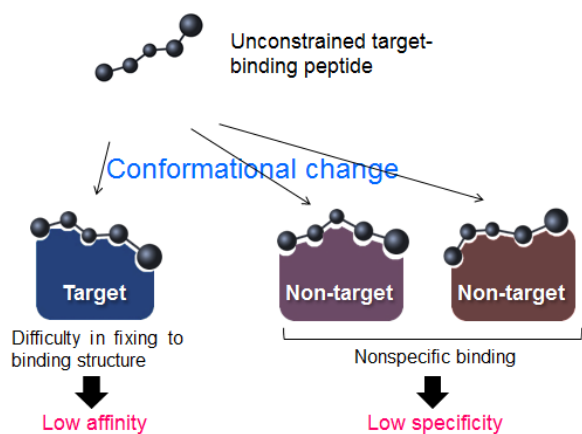


図1. ペプチドの結合力と特異性

そこで我々は、標的結合ペプチドの構造ゆらぎを制限することで強い結合力が得られるのではないかと仮説を立て、ペプチドを組み込むための蛍光足場タンパク質 gFPS の開発を進めた。まず、sfGFP のループ構造中にプロテアーゼ caspase-3 の認識ペプチドを組み込んだ構造モデルを複数の構築し、分子動力学シミュレーションにより、ゆらぎが少ないループ領域を同定した（図2-D）。

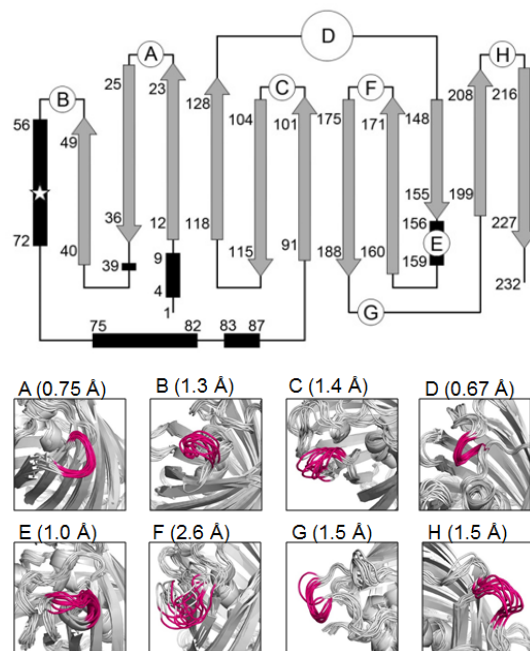


図1. ゆらぎが少ないループ領域の探索

この領域 D に 4 から 12 アミノ酸長のペプチドを組み込むと、アミノ酸配列によらず、構造ゆらぎを抑制できることが分かった（図3）。

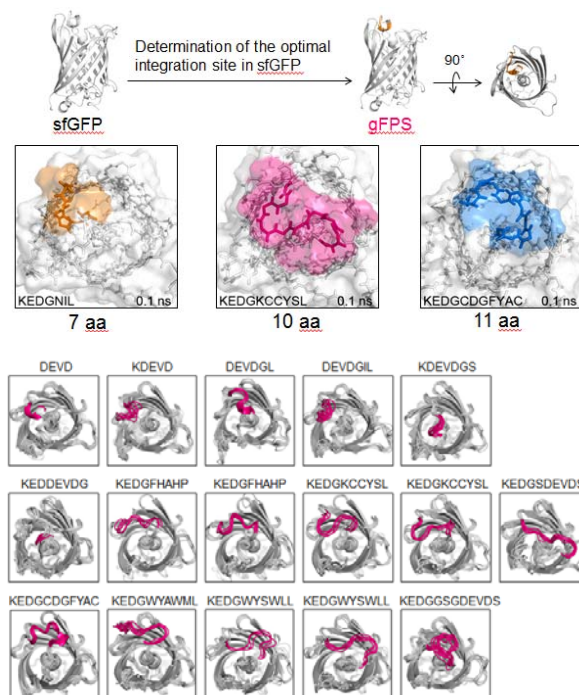


図3. gFPS に組み込んだペプチドの MD シミュレーション

そこで実際に、gFPS に既知の標的結合ペプチドを組み込んで構造ゆらぎを制御し、標的結合力を評価した。乳がんマーカーHER2 の結合ペプチドを組み込んだ gFPS を精製し、培養細胞を用いて結合性を評価したところ、いくつかのペプチドは構造ゆらぎの大きい場合と比べて結合力が 100 倍程度上昇した (図 4)。

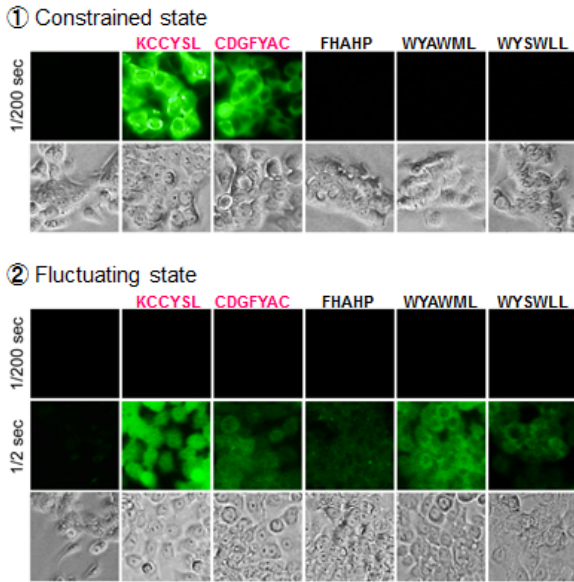
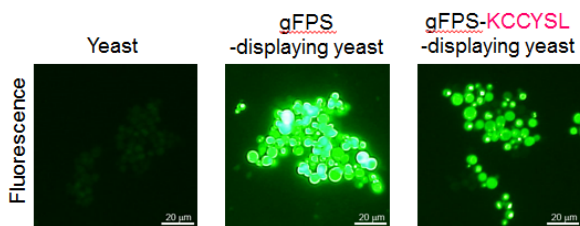


図 4. HER2 結合ペプチドの評価

このように、構造ゆらぎを制御した標的結合ペプチドは抗体に匹敵する結合力を有する可能性があり、抗体の代替分子として期待できる。そこで次に、任意の標的分子に結合する構造ゆらぎ制御ペプチドを取得するためのスクリーニング法の開発に取りかかった。

従来、ペプチドライブラリーとして、ランダムなアミノ酸配列で構成されるペプチドを細胞表層上にディスプレイしたファージ、バクテリア、酵母などが多用される。そこで酵母ディスプレイシステムを用いて、野生型 gFPS および HER2 結合ペプチドを組み込んだ gFPS を酵母細胞表層にディスプレイした (図 5)。



\* Expression vector for molecular display on yeast was kindly provided by Dr. Ueda, Kyoto University.

図 5. gFPS の酵母ディスプレイ

これらの酵母と、赤色蛍光標識した HER2 細胞外ドメインタンパク質を反応させると、標的結合ペプチドを組み込んだ gFPS をディスプレイした酵母のみに赤色蛍光が観察でき、ディスプレイされた状態で gFPS と標的との結合を評価できることが示された (図 6)。

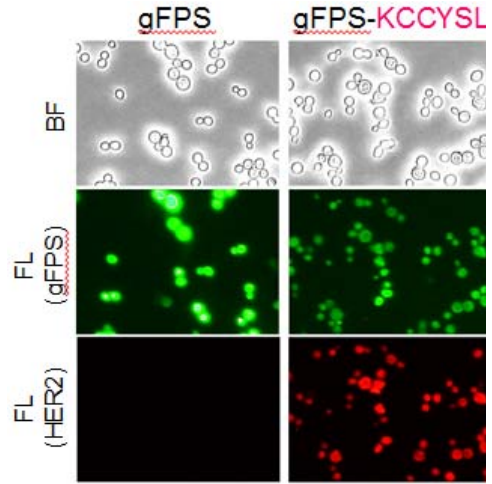


図 6. 標的結合性評価

さらに、gFPS 中に組み込むペプチド配列は、gFPS ディスプレイのためのプラスミド中のペプチド領域を PCR によって容易にランダム化できることから、簡便にペプチドライブラリーを作成できる。これらの技術により、gFPS にペプチドを挿入することで、ペプチドの構造ゆらぎを制御した状態で結合力の高いペプチドを、蛍光を用いて容易にスクリーニングできる系が構築できたことが示唆された。現在、ランダムペプチドを組み込んだライブラリーを作成し、標的的特異性の高いペプチドをスクリーニングしており、標的的特異性の高いペプチド医薬品の開発を進めていきたい。

[論文] *PLoS One* 2014, **9(8)**, e103397

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25084350>

[特許] 特願 2013-090524, PCT/JP2014/061366