構造計算に基づく標的結合小型タンパク質の創製とがん治療への応用

門之園哲哉,* 近藤科江

Semi-rational Design of Target-binding Small Proteins for Cancer Treatment

Tetsuya Kadonosono* and Shinae Kizaka-Kondoh

School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology;
4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama 226-8501, Japan.

(Received July 29, 2019)

Small proteins that have a high affinity for cancer cell surface markers can be promising cheap alternatives to antibodies (antibody mimetics). Various types of antibody mimetics have thus been extensively developed. We recently found that a target-binding peptide binds to its target molecule more strongly when it is structurally constrained. To apply this finding to the development of chemically synthesizable small antibody mimetics, we have established an efficient method of creating such proteins, named fluctuation-regulated affinity proteins (FLAPs). To identify desirable scaffolds, first, 13 human proteins (46–104 aa) were selected from the Protein Data Bank. Then, thirteen graft acceptor (GA) sites that efficiently immobilize the grafted peptide structure were identified from six small protein scaffolds using molecular dynamics simulation. To assess the designed antibody mimetics *in vitro*, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-binding peptides were selected from the anti-HER2 antibody drugs trastuzumab and pertuzumab by calculating the binding energy, and these were then grafted into the GA sites of scaffolds to create 65 FLAP candidates. The FLAP candidates were expressed in bacteria as fusion proteins with Renilla luciferase (Rluc), and their relative binding affinity to HER2 was easily determined by measuring the Rluc bioluminescence intensity without protein purification. Finally, four out of the 65 showed specific binding to HER2 with a dissociation constant (K_D) of 24–65 nM, and these were used for the detection of HER2-expressing cancer cells. Our design strategy will promote the development of antibody mimetics for the effective treatment of cancers and other diseases.

Key words—antibody mimetics; constrained peptide; small protein scaffold

1. はじめに

近年、抗体の強い結合力を利用して標的分子を認識する抗体医薬の開発が盛んに進められ、がんを始めとする様々な疾患の治療に用いられている。抗体医薬は生体内で安定に長期間存在でき、免疫システムとの共役による細胞障害活性、シグナル中和活性、アゴニスト活性など多様な薬効を持たせることができる。また、抗体を抗原発現細胞への薬剤輸送キャリアとして利用した抗体薬物複合体 (antibody-drug conjugate; ADC) や画像診断プローブが開発され、光免疫療法への応用も検討されている。このように抗体医薬は非常に有用な薬剤である

一方で、分子量 150 kDa の大きなタンパク質であるため組織浸透性が低く適用疾患が限られてしまうことや、細胞膜を透過できないため標的にできる分子の種類が少ないことなど、いくつかの大きな課題が残っている。これらの課題を克服するために、小さな分子量でありながら抗体の機能を代替できる小型タンパク質医薬の開発が注目されている。^{1–5)}

標的分子に特異的に強く結合するペプチドや小型タンパク質 (分子量 3–12 kDa) は、抗体医薬と同様に様々な疾患の分子標的治療薬としての利用が期待できる。このような標的結合小型タンパク質は抗体よりも組織浸透効率や体外排出効率がよく、細胞膜に発現する分子に限らず細胞内に局在する分子も標的として利用できるため、従来の抗体医薬を凌ぐ治療薬を開発することも可能である。そのため、新たな創薬モダリティとして臨床応用するために、標的結合小型タンパク質のデザイン技術の高度化と汎

東京工業大学生命理工学院 (〒226-8501 横浜市緑区長津田町 4259)

*e-mail: tetsuyak@bio.titech.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 139 年会シンポジウム S08 で発表した内容を中心に記述したものである。

用化が進められている。

従来、標的結合小型タンパク質を開発するためには分子進化工学的手法が多用される。⁶⁻⁸⁾ まず、特定の小型タンパク質を足場骨格として選択し、次にそれらの分子表面に存在するアミノ酸残基を他の19種類のアミノ酸へとランダム置換した分子ライブラリーを作成し、その中から各種迅速スクリーニング法によって標的に強く結合する分子を取得する。この場合、網羅性に優れたスクリーニングが実現できるものの、ランダム化する残基が1つ増えるごとにライブラリーサイズが20倍になるため、各スクリーニング方法のライブラリーサイズの制限に依存して、必然的にランダム化できる残基の数は限られてしまう。また、結合領域を選択できないため期待する場所に結合するとは限らず、標的結合分子を取得できたとしても薬効を示さないことがある。一方、スーパーコンピュータの高性能化と計算科学的手法の進歩により、構造計算で標的との結合構造をデザインし、合理的に標的結合分子を取得することが可能になりつつある。しかし、分子間の結合構造を正確に予測できる一般的な方法はまだ確立されておらず、計算技術の高精度化による汎用性の拡大が課題となっている。

このような状況の中、筆者らを含むいくつかの研究グループは、計算科学的手法と迅速スクリーニング法を組み合わせた半合理的デザイン技術の開発を試みている。⁹⁾ この場合、構造計算によってサイズの小さなライブラリーを作成し、迅速スクリーニングによってすべての候補分子を評価することが特徴である。これにより、現段階での構造計算技術の不完全性をカバーすることが可能になる。本稿では、筆者らが開発してきた半合理的デザイン技術の例として、抗体構造中の抗原結合ペプチドを利用した標的結合小型タンパク質のデザインについて概説する。

2. 標的結合小型タンパク質のデザインコンセプト

抗体分子内で直接抗原と結合する領域は相補性決定領域 (complementarity determining region; CDR) と呼ばれ、合計6本のCDRループが存在している。¹⁰⁾ それぞれのCDRループの5-10程度のアミノ酸配列 (CDR ペプチド) は抗体によって異なり、この違いによって様々な抗原結合表面を形成することで、抗原特異的に結合することができる。このこ

とから、CDR ペプチドを利用した抗原結合分子の開発が試みられてきたが、ほとんどの場合 CDR 由来直鎖ペプチドは抗原に結合しないことが知られており、これまでに医薬品として認可された例はない。この原因の1つとして、筆者らはペプチドの構造ゆらぎに注目した。つまり、抗体分子内では一定の構造に保たれている CDR ペプチドであっても、直鎖ペプチド化すると溶液中で様々な構造をとることが可能になる。そのため、直鎖 CDR ペプチドが抗原と結合するには構造を固定化する必要があり、大きなエントロピー損失が生じる。その結果、結合エネルギーが弱くなると考えた。この仮説を検証するために、複数の抗体分子構造を分子動力学 (molecular dynamics; MD) シミュレーションによって解析したところ、同じ配列の CDR ペプチドであっても抗体分子内にある場合と直鎖の場合では構造ゆらぎは大きく異なり、抗体骨格の働きによって CDR ペプチドの構造ゆらぎが抑制されていることが示唆された。さらに、抗体の成熟過程において CDR ペプチドのアミノ酸配列だけでなく、構造ゆらぎも最適化されていることを支持する報告も増えてきている。¹¹⁻¹⁴⁾ これらの解析結果や先行研究を受けて、抗体骨格に替わる小型タンパク質に CDR ペプチドを組み込んで構造ゆらぎを抑制することにより、結合力の強い抗原結合分子を創出するというデザインコンセプトが立てられた。

3. 標的結合小型タンパク質 FLAP の創出

タンパク質構造データベース Protein Data Bank には、現在15万件以上が登録されている。この中から、CDR ペプチドを組み込むのに適した足場となる小型タンパク質を探索するために、イン・シリコ・スクリーニング法を開発した。この方法は MD シミュレーションをベースにしておき、どのようなアミノ酸配列を持つペプチドと置換してもその構造ゆらぎを抑制できるループ領域 (graft acceptor サイト; GA サイト) を持った足場タンパク質を同定することができる。この探索方法を用いて、13種類の小型のヒト由来タンパク質 (分子量5-11 kDa) の構造を評価したところ、6種類の小型タンパク質内に13ヵ所のGAサイトを同定できた。そこで、モデルとして human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) 結合抗体医薬 trastuzumab 及び pertuzumab から5種類のHER2結合CDRペプチド配

Fig. 1. Rapid Evaluation of FLAP Candidates

(Left) Schematic diagram of the RLuc-fused FLAP structure and the principal for affinity determination by BL-ELISA. The affinity of FLAP candidates to HER2 was quantified by the bioluminescence (BL) signal intensity obtained by the reaction between RLuc and coelenterazine. (Right) HER2-Fc affinity of the 65 FLAP candidates. HER2 affinity of FLAP candidates were evaluated by BL-ELISA. The average radiance of each well and their relative intensity toward the value of scaffold proteins are shown.

列を抽出し、13カ所のループ領域と置換して合計65種類の候補分子をデザインした。これらの候補分子をMDシミュレーションで解析すると、予想通り、組み込まれたCDRペプチドの構造ゆらぎはすべて抑制されていることが確認できた。

デザインした65種類の候補分子の結合力を簡便に評価するために、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼRLucを利用する生物発光ELISA法 (bioluminescence enzyme-linked immunosorbent assay; BL-ELISA) を新たに開発した。本法においては、評価したい候補分子タンパク質とRLucの融合タンパク質を大腸菌内で発現させ、菌体破碎上清の生物発光活性をイメージングで測定することで、含まれる候補分子タンパク質の量を揃えたサンプルを調製した。続いて、一般的なELISAと同様に96wellプレート内で融合タンパク質を抗原と反応させ、抗原結合量を生物発光イメージングにより測定する (Fig. 1)。BL-ELISAシステムにより65種類の候補分子のHER2への結合力は簡便かつ迅速に比較でき、4種類の小型タンパク質が強くHER2に結合できることが分かった。筆者らは、このように構造ゆらぎが抑制されたペプチドを有する標的結合タンパク質を、fluctuation-regulated affinity protein (FLAP) と名付けた。これらのHER2結合FLAPは比較的強くHER2に結合し ($K_D = 24\text{--}65\text{ nM}$)、非特異吸着はほとんどみられなかった。また、FLAPとFLAP認識蛍光抗体を用いてHER2過剰発現がん細胞株を容易に検出できた (Fig. 2)。FLAPは分子量10 kDaと小さいことから、HER2

Fig. 2. Characterization of Anti-HER2 FLAPs

Immunostaining of HER2-expressing SK-BR-3 cells with His-tagged FLAP1 or trastuzumab. The Alexa Fluor 488-conjugated mouse anti-His tag secondary antibody or Alexa Fluor 488-conjugated mouse anti-human IgG Fc secondary antibody were used to fluorescently label the His-tagged FLAP1 or trastuzumab, respectively.

結合抗体医薬の機能を代替可能な小型タンパク質医薬候補として期待される。

4. FLAPの高度化と医療応用

本稿では、標的結合小型タンパク質デザインの例として、HER2抗体のCDRペプチドを組み込んだHER2結合FLAPデザインを紹介した。このデザイン技術は抗原との複合体構造が明らかになっているすべての抗体に対して応用できるため、様々な抗体医薬の代替小型タンパク質の創出につながると期待される。現在は、標的結合ペプチドの構造ゆらぎ

制御をキーワードとして、様々なコンセプトに基づく標的結合小型タンパク質デザイン技術の考案と検証を進めており、この過程で得られる小型タンパク質を利用したドラッグデリバリーシステム開発にも取り組んでいる。¹⁵⁾ 今後、さらにデザイン技術の高度化と汎用化を達成することにより、画期的な医薬品の開発を実現したい。

謝辞 本研究は、科研費挑戦的萌芽研究、武田科学振興財団医学系研究奨励の助成を受けて実施したものであり、ここに感謝申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Löfblom J., Frejd F. Y., Ståhl S., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**, 843–848 (2011).
- 2) Richards D. A., *Drug Discov. Today*, **30**, 35–46 (2018).
- 3) Škrlec K., Štrukelj B., Berlec A., *Trends Biotechnol.*, **33**, 408–418 (2015).
- 4) Vazquez-Lombardi R., Phan T. G., Zimmermann C., Lowe D., Jermutus L., Christ D., *Drug Discov. Today*, **20**, 1271–1283 (2015).
- 5) Weidle U. H., Auer J., Brinkmann U., Georges G., Tiefenthaler G., *Cancer Genomics Proteomics*, **10**, 155–168 (2013).
- 6) Friedman M., Nordberg E., Höiden-Guthenberg I., Brismar H., Adams G. P., Nilsson F. Y., Carlsson J., Ståhl S., *Protein Eng. Des. Sel.*, **20**, 189–199 (2007).
- 7) Ramamurthy V., Krystek S. R. Jr., Bush A., Wei A., Emanuel S. L., Das Gupta R., Janjua A., Cheng L., Murdock M., Abramczyk B., Cohen D., Lin Z., Morin P., Davis J. H., Dabritz M., McLaughlin D. C., Russo K. A., Chao G., Wright M. C., Jenny V. A., Engle L. J., Furfine E., Sheriff S., *Structure*, **20**, 259–269 (2012).
- 8) Zahnd C., Wyler E., Schwenk J. M., Steiner D., Lawrence M. C., McKern N. M., Pecorari F., Ward C. W., Joos T. O., Plückthun A., *J. Mol. Biol.*, **369**, 1015–1028 (2007).
- 9) Chevalier A., Silva D. A., Rocklin G. J., Hicks D. R., Vergara R., Murapa P., Bernard S. M., Zhang L., Lam K. H., Yao G., Bahl C. D., Miyashita S. I., Goresnik I., Fuller J. T., Koday M. T., Jenkins C. M., Colvin T., Carter L., Bohn A., Bryan C. M., Fernández-Velasco D. A., Stewart L., Dong M., Huang X., Jin R., Wilson I. A., Fuller D. H., Baker D., *Nature*, **550**, 74–79 (2017).
- 10) Sela-Culang I., Kunik V., Ofra Y., *Front. Immunol.*, **4**, 302 (2013).
- 11) Babor M., Kortemme T., *Proteins*, **75**, 846–858 (2009).
- 12) Manivel V., Sahoo N. C., Salunke D. M., Rao K. V., *Immunity*, **13**, 611–620 (2000).
- 13) Thorpe I. F., Brooks C. L. 3rd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 8821–8826 (2007).
- 14) Wong S. E., Sellers B. D., Jacobson M. P., *Proteins*, **79**, 821–829 (2011).
- 15) Kadonosono T., Yamano A., Goto T., Tsubaki T., Niibori M., Kuchimaru T., Kizaka-Kondoh S., *J. Control. Release*, **201**, 14–21 (2015).