

新規生物活性ペプチドの取得を基盤とした医薬・マテリアルの開発

研究代表者 小出 隆規
(先進理工学部 化学・生命化学科 教授)

1. 研究課題

生物活性を有するペプチドは、その高い標的特異性から医薬品のリード化合物として有用である。しかし、その一方で、生体内での易分解性の克服が課題である。また、ペプチド性リード化合物は、天然のリソースに大きく依存しており、人為的に構築されたペプチドライブラリから得られたリードからの創薬成功例はいまだに少ない。

本研究では、上記問題を解決しうる、リード化合物の新規探索戦略の提案と方法論の開発を行う。すなわち、①優れた生体安定性を有するペプチドの骨格をあらかじめ選定し、②その骨格に固定されたランダムペプチドライブラリを構築し、③その中から高スループットで医薬品リードたり得るペプチドを取得する。ここでは、ペプチド骨格として、生体で高い安定性を示すコラーゲン様 3 重らせんペプチドと、L/D アミノ酸が混在するヘテロキラルなペプチドの二つを選定し、それぞれについて適切なライブラリ構築法、スクリーニング法を開発する。

また、コラーゲン 3 重らせんを模倣するペプチドの理論的な分子デザインから、新しいアイデアに基づく創薬研究を展開する。加えて、生物活性を有するコラーゲン様 3 重らせんペプチドの高分子化、あるいは超分子化によって、新しいゲル状バイオマテリアルを創製し、医療への応用を検討する。

2. 主な研究成果

2.1 3 重らせん型ランダムペプチドライブラリからの新規タンパク質結合ペプチドの探索

コラーゲンの三次構造を模倣する 3 重らせん型ランダムペプチドライブラリを酵母細胞内に構築し、複数のコラーゲン結合タンパク質を標的とした 2-ハイブリッドスクリーニングを実施した。血管新生阻害タンパク質である色素上皮由来因子 (Pigment epithelium-derived factor, PEDF) を標的としたスクリーニングからは新規なアミノ酸配列をもつ結合ペプチドが複数取得された。得られたペプチドに共通してみられるアミノ酸配列は、本年度に大阪大学との共同研究として *PNAS* 誌に発表した、PEDF と 3 重らせんペプチドとの共結晶構造によりよく説明できた。その他、コラーゲン結合型インテグリン、von Willebrand 因子、Discoidin domain 受容体など複数のコラーゲン結合タンパク質を標的としたスクリーニングを実施し、新規な 3 重らせんペプチドを取得しつつある。

2.2 ヘテロキラルなランダムペプチドライブラリからモノクローナル抗体の mimotope を探索する方法の開発

L/D アミノ酸が混在するヘテロキラルなランダムペプチドライブラリ [One-bead 2ⁿ Peptide (OB2ⁿP) Library] から、モノクローナル抗体に結合するペプチド (mimotope) を取得するシステムを、すでに我々は開発したが、抗体が結合したペプチドビーズを検出する際の感度の低さが問題であった。そこで我々は、あらかじめ標的とする抗体に共有結合させた核酸オリゴマーを、DNA ポリメラ

ーゼにより伸長することで、シグナルを増幅することを試みた。その結果、ビオチンあるいは蛍光色素といった情報基を伸長しつつある DNA 鎖中に取り込ませることにより、抗体が結合するペプチドビーズの検出感度が向上した。

2.3 人工コラーゲン様ポリマーの医療への応用

化学合成したコラーゲン様 3 重らせんペプチドの末端をジスルフィド結合により架橋し、ポリマー化したバイオマテリアル（日本国特許 6455862, US10851152, EP3315509）は、その中にインテグリン結合性アミノ酸配列を組み込むことで、細胞接着性を付与できるため、創傷治癒の促進効果が期待できる。また、このマテリアルは、透明性の高い薄膜に加工できるため、眼科領域における医療機器として有望である。黄斑円孔は、眼底中央にある黄斑部位の網膜が硝子体により牽引されて穿孔する疾患であり、放置すると失明に至る危険がある。今回、薄膜状に加工した人工コラーゲンを眼内に挿入し、黄斑円孔部位に貼付し、孔の閉鎖を促すという新たな治療法の開発を目的に、マテリアルの組成、成形加工、動物モデルをもちいた有効性の検討を実施した。これまでに、家兎眼を用いた検討において良好な結果が得られている。

3. 共同研究者

増田 亮（理工総研 次席研究員）

市瀬慎一郎（理工総研 研究助手）

4. 研究業績

4.1 学術論文

S. Kanai, K. Machida, R. Masuda, T. Koide

Peptide precursors that acquire denatured collagen-hybridizing ability by *O*-to-*N* acyl migration at physiological pH

Org. Biomol. Chem. **18**, 2823-2827 (2020), doi: 10.1039/C9OB02136A.

K. Kawahara, T. Yoshida, T. Maruno, H. Oki, T. Ohkubo, T. Koide, Y. Kobayashi

Spatiotemporal regulation of PEDF signaling by type I collagen remodeling

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **117**, 11450-11458 (2020), doi: 10.1073/pnas.2004034117

金井沙也伽, 小出隆規

変性コラーゲンとハイブリッド形成するペプチドを用いた新たな DDS の可能性

Drug Delivery System **35**, 181-190 (2020), doi: 10.2745/dds.35.181

4.2 総説・著書

黒田一稀, 小出隆規

「コラーゲン 基礎から応用」第 10 章 合成コラーゲン 102-108 (2020)

東京農工大硬蛋白質利用研究施設編 (株) インプレス R&D

4.3 招待講演

T. Koide, R. Masuda

“Toward Further Functionalization of Collagen”

18th Akabori Conference (online), 2021 年 3 月

小出隆規, 増田亮, Khine Phyu Phyu Thant, 金井沙也伽, 藤井一徳

「3 重らせんペプチドの分子認識能に着目した創薬研究」

日本薬学会第 141 年会シンポジウム (online), 2021 年 3 月

4.4 受賞・表彰

関根吉郎賞

金井 沙也伽 (小出研究室)

酵素応答型 *O*-*N*アシル転位を利用したペプチドプロドラッグの開発

4.5 学会および社会的活動

日本結合組織学会 理事

日本ペプチド学会 理事

第 58 回ペプチド討論会 (八王子) 運営委員

5. 研究活動の課題と展望

本プロジェクトで構築したペプチドライブラリからの新規医薬品リード化合物の探索を本格化する。酵母 2-ハイブリッド法によるスクリーニングでは、複数の既知のコラーゲン結合タンパク質を標的としたスクリーニングを平行に実施し、それぞれの標的タンパク質に対して高い特異性を有する新規ペプチドの取得を目指す。また、標的をコラーゲン結合タンパク質以外にも拡張し、このシステムの一般性についての scope を示す。OB2^{np} ライブラリからのヘテロキラルペプチドの取得については、検出感度を向上した系を実装し、モノクローナル抗体の mimotope の取得を実践する。

人工コラーゲン様マテリアルの応用については、今後カニクイザルを用いた動物実験を通して、その有効性を検証する。さらに、事前のポリマーの加工成形することを不要とするインジェクタブルな人工コラーゲン様ハイドロゲルの開発を本格化させる。