

Artificial HGF based on cyclic peptides

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/42084

【総説】

環状ペプチドによる人工 HGF の創製

Artificial HGF based on cyclic peptides

金沢大学がん進展制御研究所腫瘍動態制御分野
酒井 克也

はじめに

増殖因子やサイトカインは受容体の二量体化や多量体化によって細胞内シグナル伝達を活性化し、細胞の応答性を引き起こす。増殖因子やサイトカインは顕著な生理活性を示すことから、組換えタンパク質がバイオ医薬品として利用されている。

肝細胞増殖因子 (HGF : Hepatocyte Growth Factor) は Met 受容体の二量体化によって生理活性を発揮する。最近私たちは、Met 受容体に高親和性で結合する 10 ~ 15 アミノ酸程度の環状ペプチドを二量体化したものが、HGF タンパク質と同等の生理活性を発揮することを報告した (図1, 2)¹⁾。この方法は HGF に限らず、種々の増殖因子受容体やサイトカイン受容体に応用可能である。分子サイズの大きいタンパク質の生理活性を、化学合成が可能な小さな分子で代替する技術の、可能性や優位点、今後の展望を考察したい。

HGF と Met 受容体

HGF と Met の機能

HGF は初代培養肝細胞の DNA 合成を促す生理活性タンパク質として同定された。その後、上皮細胞の細胞分散を引き起こす因子として精製された scatter factor は HGF と同一分子であること、細胞膜貫通チロシンキナーゼ Met が HGF に対する受容体であることが明らかにされた。

HGF-Met 系は上皮細胞、血管内皮細胞、神経細胞などの増殖、遊走、生存を促進する^{2,3)}。肝臓や肺、乳腺などの発生過程の組織形成において、上皮組織と間葉組織の相互作用が重要であるが、HGF は間葉組織に由来する因子の1つとして肺、腎臓、乳腺などにおける上皮組織の形態形成を促している^{2,3)}。細胞・組織特異的 Met 遺伝子 KO マウスの表現型から、各種組織における成体期の HGF-Met 系の生理機能が明らかにされている (図3)²⁾。HGF は肝傷害時の肝細胞死を抑制し、肝再生・増殖を担うとともに、肝線維化を抑制する。腎臓においても傷害や線維化の抑制と、再生の促進に参与する。表皮角化細胞の遊走と表皮再生は HGF に依存している。このように Met と HGF は上皮系細胞と間質細胞との相互作用を介した組織の発生や再生を制御する分子といえる。

組換え HGF タンパク質による臨床試験

様々な傷害、疾患モデル動物に組換え HGF タンパク質を投与する基礎研究からも、組織の傷害や病態に対して HGF-Met 系の活性化が再生を促進し、組織を保護することが明らかにされた²⁾。このような背景から、組換え HGF タンパク質の臨床開発が進められている。脊髄

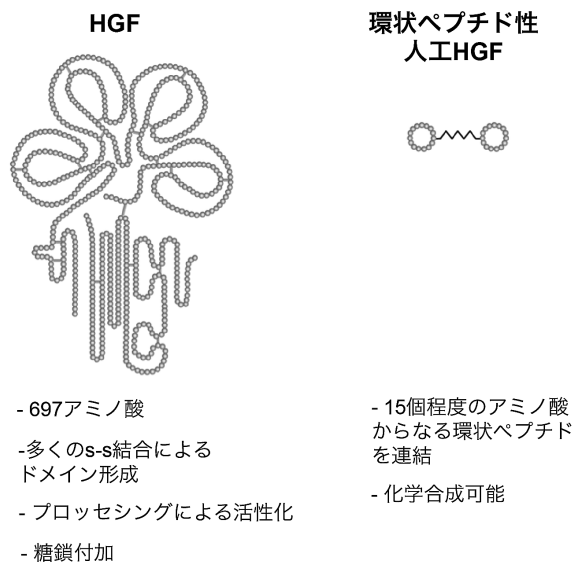


図1. HGF と環状ペプチドの模式図

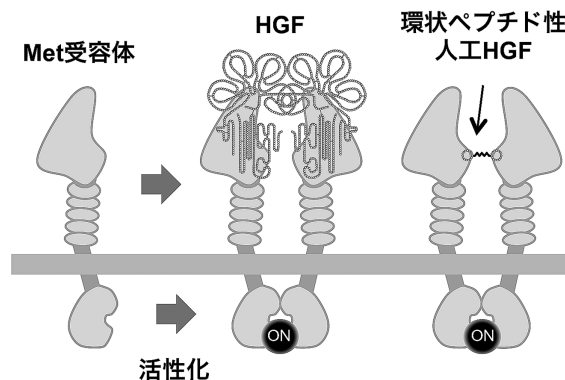


図2. HGF と環状ペプチドによる Met 受容体活性化の模式図

損傷患者の髄腔内にHGFを局所投与するフェーズI/II試験が慶應大学で2014年から進められ、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を対象とした臨床試験が東北大学で2011年から進められている。その他、劇症肝炎や急性腎疾患を対象としたフェーズI試験も国内外で実施された。

HGFを代替する環状ペプチド

HGFは697アミノ酸と増殖因子の中でも大きく、多数のS-S結合から構成され、プロセッシングによって活性化されるなど(図1)、医薬品基準のHGF製造には高い技術が必要であり、製造コストも高い。また、グリコサミノグリカン親和性を介した肝臓への集積により血中半減期は短い⁴⁾。私たちはHGFの機能を代替する合成ペプチドを開発することで、1) HGFタンパク質製造の生産性

の低さとコストを解決する、2) 血中動態を改善し体内の安定性を高めることで治療効果を高める、3) 吸入や皮膚浸透など投与ルート追加により適用を拡大できる、ことを期待した。

環状ペプチドのスクリーニング (RaPID 法)

天然には様々な環状のペプチドが存在し、免疫抑制剤シクロスポリンに代表されるように、医薬品として利用されているものもある。ペプチドが環状構造をとる優位点は、プロテアーゼ耐性など体内安定性が増すことや、構造が固定されることによって標的タンパク質に対して高い親和性を持つことが挙げられる。ファージディスプレイや*in vitro*翻訳系によるペプチドライブラリーのスクリーニングは、目的のペプチドを見出す強力な方法だが、抗体並みの親和性や活性を持つペプチドを得ることは難しい。東京大学の菅裕明博士らは、環状ペプチドライブラリーの*in vitro*翻訳系と目的タンパク質へのaffinity selectionを用いたRaPID (Random Peptide Integrated Discovery) 法を開発した(図4)⁵⁾。RaPID法は目的タンパク質に抗体並みの親和性で結合する15アミノ酸程度の環状ペプチドを迅速に、高い成功率で見出すことのできる方法である。この方法の要となる技術は自発的に環状化する側鎖を持った非天然アミノ酸の*in vitro*翻訳を可能にした点であり、この技術は菅博士らが独自に開発した特殊酵素フレキシザイムに基づいている⁶⁾。

Met欠損組織・細胞	主な表現型
肝臓	
肝細胞	傷害に伴う肝細胞死の拡大。傷害後の肝細胞の増殖、再生の減損と肝線維化の亢進。加齢マウスで脂肪肝。
肝幹細胞	肝幹細胞の細胞死増加と遊走、肝細胞への分化の減損。
腎臓	
尿細管	平常では正常な腎機能だが、腎傷害後の炎症や腎不全が悪化。
ポドサイト	平常では正常な腎機能だが、腎傷害後は激しいポドサイトの細胞死、アルブミン尿。
集合管	尿管結紮による細胞死、線維化の憎悪。再生の遅延。
尿管芽	EGF受容体遺伝子とMet受容体遺伝子のダブルノックアウトマウスで糸球体の枝分かかれと数が減少。
皮膚	
角化細胞	皮膚創傷後の角化細胞の遊走と表皮再生の欠如。
膵臓	
β細胞	グルコースに対する急性インスリン分泌能、耐糖能の低下。
神経系	
背側脳外套前脳神経	思春期以降の新皮質錐体神経ネットワークの変化。皮質の減少。
心臓	
心筋細胞	心臓の発生は正常だが、6ヵ月齢で心筋肥大と軽度の線維化。9ヵ月齢で収縮不全。
免疫系	
樹状細胞	炎症時の排出リンパ節への遊走不全。アレルギーに対する接触過敏反応の不全。

図3. 組織特異的なMet遺伝子欠損マウスの表現型(文献2より改変)

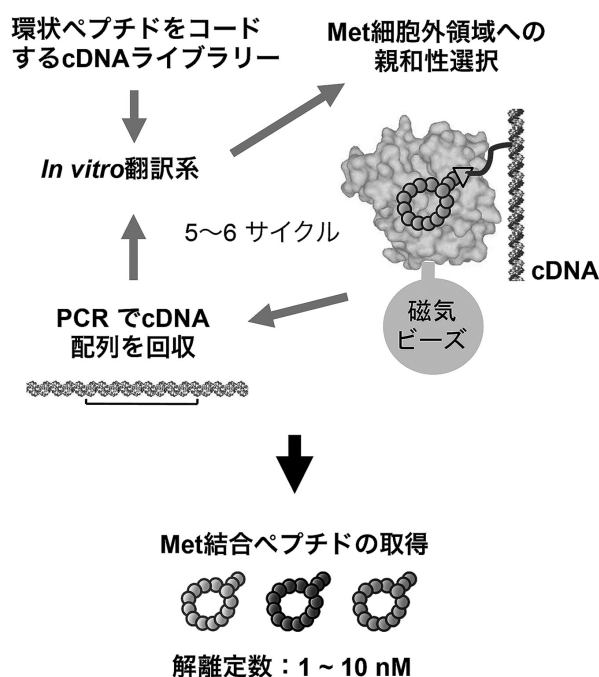


図4. RaPID法によるMet結合環状ペプチドのスクリーニング

Met 受容体結合ペプチドの二量体化

ヒトMet細胞外領域を標的タンパク質として、RaPID法により32種類のMet結合環状ペプチドが取得された¹⁾。配列の類似性から、これらのペプチドはいくつかのグループに分類できたが、配列の多様性があることから、Metへの結合部位が異なると推定されるペプチドが得られた。3種類の配列の異なるペプチドについてさらに評価したところ、どれもMetに対する解離定数が数nMと非常に強い親和性を示した。これらペプチドはHGFとMetの結合を阻害しなかった。つまり、これらペプチドはHGFと関連した構造、配列を持つものでは

なく、HGFとは異なるMetへの結合様式を示すものであった。

次に適当な間隔でペプチドを二量体化することでMet受容体を近接化し活性化できると考えた(図5a)¹⁾。リンカーとしては構造的柔軟性があり医薬品にも用いられるポリエチレングリコール(PEG)が3個ないし11個つながったものなどを用いた。ペプチドによって、つまりMetへの結合部位の違いによって、最適なリンカーの長さは異なるが、至適なリンカーで二量体化した環状ペプチドはMetの二量体化とリン酸化をHGFと同等に誘導した(図5b)。最大のMet活性化を誘導するペプチドの濃度域100 nMにおいて、Met以外の受容体型チロシンキナーゼのリン酸化は検出されず、これらペプチドの特異性が非常に高いことが分かった(図5c)。

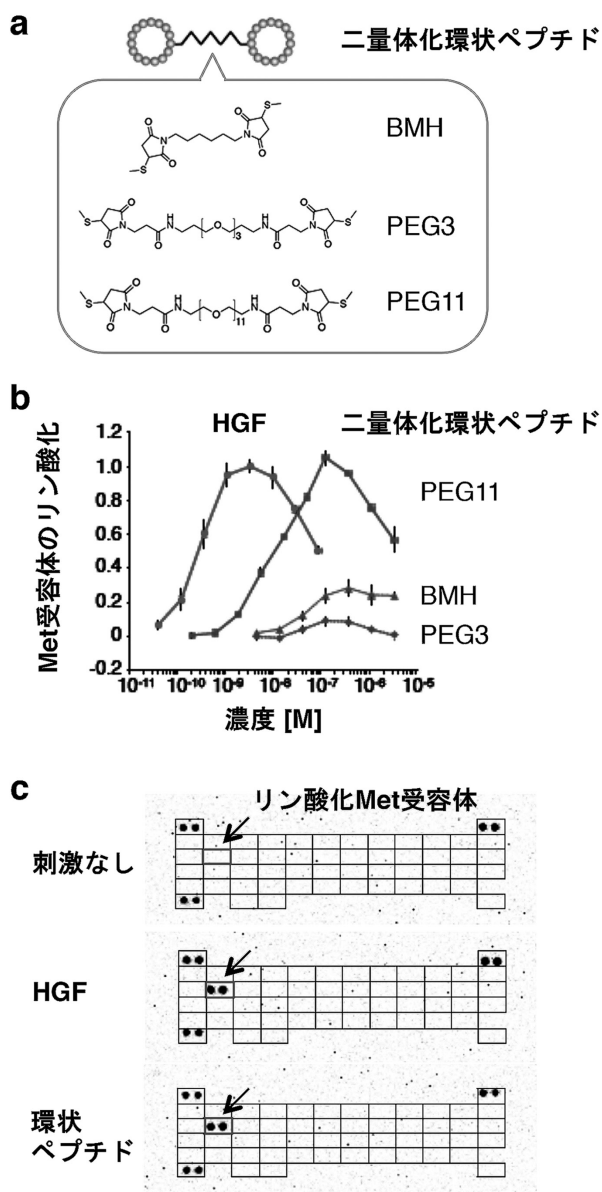


図5. Met結合環状ペプチドの二量体化 (a) とMet受容体の活性化 (b)。Met活性化環状ペプチドの選択性を受容体チロシンキナーゼアレイで検討 (c)。(文献1より改変)

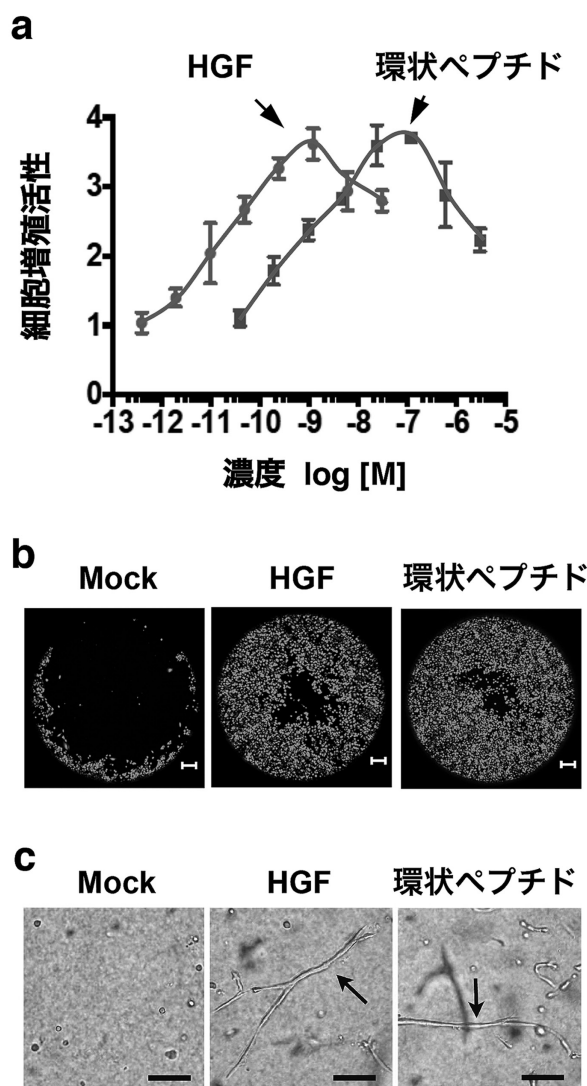


図6. Met活性化環状ペプチドの生物活性。表皮角化細胞の増殖活性 (a)、近位尿管上皮細胞の遊走活性 (b) とチューブ形成 (c)。(文献1より改変)

環状ペプチドの生物活性

ヒト初代培養細胞（表皮角化細胞，腎近位尿管上皮細胞，血管内皮細胞など）を用いて，環状ペプチドとHGFによる細胞増殖と細胞遊走を比較検討した（図6a, b)⁹⁾。これらの細胞応答性において，ペプチドとHGFの最大活性は一致した。また，ペプチドによる50%作用濃度は数nMの濃度域であった。さらに，ペプチドは細胞の増殖，移動，接着，マトリックス分解など複雑な過程を含む腎近位尿管上皮細胞の管腔形態形成を，HGFと同様に誘導した（図6c）。これらの結果から，私たちの取得した環状ペプチドは医薬品として実用可能な濃度域でHGFと同等の生物活性を誘導できると結論した。

環状ペプチドによる受容体活性化の可能性と展望

今回私たちが見出した方法は，HGFに限らず種々の増殖因子受容体やサイトカイン受容体に応用できる。環状ペプチドで増殖因子やサイトカインを代替する優位点として，まず生産性やコストの有利さが挙げられる。特にHGFのように大きく複雑なタンパク質の場合，合成可能なペプチドによる代替は生産性とコストを大きく改善できる。また，合成可能であり，比較的分子量が小さいことは，エンジニアリングによって新たな機能性分子を生み出す潜在的可能性が高いといえる。

次に増殖因子やサイトカインとそれを代替する環状ペプチドでは薬物動態が異なることが挙げられる。もちろん薬物動態の違いはメリットだけでなくデメリットも考えられるので，個々のケースについて比較検討が必要である。HGFについて考察すると，ラットに静脈投与したHGFの血中半減期は3.2分程度と短く，これは大部分のHGFが肝臓に分布するためである⁴⁾。この肝臓への集積はHGFのN末端ヘアピン構造とグリコサミノグリカン鎖との親和性によると考えられている。HGFを代替する環状ペプチドはグリコサミノグリカン鎖との親和性は無いので，肝臓への分布が軽減され，他臓器への分布に優れることが期待できる。

また，環状ペプチドは比較的分子量が小さいため，HGFのような比較的大きなタンパク質よりも組織浸透性に優れることが期待される。皮膚創傷や慢性閉塞性肺疾患に対するHGFの治療効果が動物実験で報告されているが，皮膚塗布や吸入による投与において組織浸透性に優れることが予想される環状ペプチドは，これら疾患における薬物動態の優位性が期待できる。

アゴニスト抗体との比較

TPO受容体，EPO受容体，IFN受容体などのホモ二量体化やヘテロ二量体化を誘導するアゴニスト抗体が知られている⁷⁻⁹⁾。アゴニスト抗体が天然リガンドの代替として広く利用されるに至っていない理由の1つは，明確

な優位点が見出せないためと考えられる。

アゴニスト抗体の開発や生産は時間とコストがかかり，天然リガンドの開発や生産と比較して，優位性が少ない。RaPID法を用いた環状ペプチドのスクリーニングとリンカーによる二量体化は迅速かつ容易にアゴニストを複数同定することが可能であり，かつ生産コストの面でも優位であるといえる。逆に抗体医薬品は開発ノウハウが蓄積されているが，環状ペプチドは今後の研究開発の積み重ねが必要だろう。

抗体は血中安定性が高い。これは阻害剤としてのメリットは大きいですが，アゴニスト抗体の場合はdose controlや副作用，抗原性の面でデメリットも考えられる。

また，しばしばwhole antibodyとしてアゴニスト抗体を取得するのは困難であり，Diabodyやsc (Fv) 2といったMinibody（低分子化抗体）のエンジニアリングによってアゴニスト活性を得ることができる。抗Epo受容体Diabodyの報告によると，アゴニストDiabodyによって二量体化されたEpo受容体の位相は，天然Epoリガンドによる位相と明らかに異なり，下流のシグナル伝達にも若干の偏りがあることが示されている⁸⁾。つまり，抗体やMinibodyでは，立体障害の問題で完全なアゴニスト活性を得にくいと考えられる。このことは逆に，抗体やMinibodyでは受容体を不活性な位相の二量体に固定できるという特徴があるといえる。これに対して二量体化環状ペプチドはMinibodyの1/10程度の分子量であり，構造的柔軟性をもつ適当な長さのリンカーで二量体化することで容易にアゴニストを得られたように，完全なアゴニスト活性を得やすいと考えられる。ただし，私たちは環状ペプチドによって二量体化したMet受容体の構造や，下流シグナル伝達の詳細について解析しておらず，環状ペプチドによるMetの活性化が完全なものかについては今後の解析が必要である。

受容体サブセットの選択的な活性化

EGFファミリーとEGF受容体ファミリー，VEGFファミリーとVEGF受容体ファミリーの関係に見られるように，多くの増殖因子とその受容体は複数:複数の対応関係である。また，サイトカインと受容体の関係も複数:複数の対応関係が見られる。例えば，IL-4の受容体はIL-4R α - γ c，もしくはIL-4R α -IL-13R α 1である。 γ cもしくはIL-13R α 1の発現量は細胞によって異なるため， γ cもしくはIL-13R α 1のどちらかの受容体に対する選択性を高めたengineered IL-4は作用する標的細胞とその生物活性に選択性を持つ¹⁰⁾。このような受容体サブセットの選択的な活性化は環状ペプチドでも可能と考えられる。このような選択的な受容体の活性化は治療の上で有効であると考えられ，新たな機能性分子創出の一例といえる。

おわりに

環状ペプチドによる増殖因子受容体、サイトカイン受容体の活性化は、バイオ医薬品の開発に新たな選択肢を提供する。環状ペプチドの優位性と医療ニーズとを考慮してMode of Action (MOA) の活用を図ること、今後の研究開発によって優れた臨床効果と安全性を示すことが重要である。

謝辞

本稿で紹介させていただいた研究は、東京大学大学院理学系研究科化学専攻 伊藤健一郎博士（現・味の素株式会社）、菅裕明教授と、著者の所属する金沢大学がん進展制御研究所腫瘍動態制御研究分野 松本邦夫教授らの共同研究の成果です。

参考文献

- 1) Ito K, Sakai K, Suzuki Y, Ozawa N, Hatta T, Natsume T, Matsumoto K, Suga H. Artificial human Met agonists based on macrocycle scaffolds. *Nat Commun.*, 6, Article number: 6373 doi:10.1038/ncomms7373, 2015
- 2) Sakai K, Aoki S, Matsumoto K. Hepatocyte Growth Factor and Met in Drug Discovery. *J. Biochem.*, In press, 2015
- 3) Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 11: 834-848, 2010
- 4) Uematsu Y, Fujise N, Kohsaka K, Masunaga H, Higashio K. Effective administration route for the deleted form of hepatocyte growth factor to exert its pharmacological effects. *J Pharm Sci.*, 88: 131-135, 1999
- 5) Passioura T, Katoh T, Goto Y, Suga H. Selection-Based Discovery of Druglike Macrocyclic Peptides. *Annual Review of Biochemistry*, 83: 727-752, 2014
- 6) Kawakami T, Ohta A, Ohuchi M, Ashigai H, Murakami H, Suga H. Diverse backbone-cyclized peptides via codon reprogramming. *Nature Chem Biol.*, 5: 888-890, 2009
- 7) Orita T, Tsunoda H, Yabuta N, Nakano K, Yoshino T, Hirata Y, Ohtomo T, Nezu J, Sakumoto H, Ono K, Saito M, Kumagai E, Nanami M, Kaneko A, Yoshikubo T, Tsuchiya M. A novel therapeutic approach for thrombocytopenia by minibody agonist of the thrombopoietin receptor. *Blood*, 105: 562-566, 2005
- 8) Moraga I, Wernig G, Wilmes S, Gryshkova V, Richter CP, Hong WJ, Sinha R, Guo F, Fabianar H, Wehrman TS, Krutzik P, Demharter S, Plo I, Weissman IL, Minary P, Majeti R, Constantinescu SN, Piehler J, Garcia KC. Tuning Cytokine Receptor Signaling by Re-orienting Dimer Geometry with Surrogate Ligands. *Cell*, 160: 1196-1208, 2015
- 9) Patent US8563692. Interferon-antibody fusion proteins demonstrating potent apoptotic and anti-tumor activities.
- 10) Junttila IS, Creusot RJ, Moraga I, Bates DL, Wong MT, Alonso MN, Suhoski MM, Lupardus P, Meier-Schellersheim M, Engleman EG, Utz PJ, Fathman CG, Paul WE, Garcia KC. Redirecting cell-type specific cytokine responses with engineered interleukin-4 superkines. *Nat Chem Biol.*, 8: 990-998, 2012