

RaPID 法による HGF 阻害環状ペプチド (HiP-8) の取得と性能



松本 邦夫
Matsumoto Kunio

1 はじめに

細胞増殖因子 (Growth Factor) は、組織の再生・修復を担う生理活性タンパク質であり、いくつかの細胞増殖因子は、組織の再生・治癒促進のための医薬品としても使用されている。一方、遺伝子変異等に起因する細胞増殖因子受容体の過剰な活性化は発がんやがんの悪性進展につながることから、がん分子標的薬の多くは増殖因子とその受容体、増殖因子受容体の活性化に続く、シグナル伝達分子を標的としている。私たちは最近、HGF (Hepatocyte Growth Factor: 肝細胞増殖因子) に対して、高い選択特異性をもつ HGF 阻害ペプチド (HiP-8: HGF-inhibitory Peptide-8) を取得することに成功した¹⁾。HiP-8 は環状ペプチドであり、PET (positron emission tomography) を用いたがんのイメージング診断に応用されることが期待される。

2 HGF と MET 受容体

HGF は肝細胞に対する増殖促進因子として日本で発見、クローニングされた^{2,3)}。HGF は 697 個のアミノ酸からなり、増殖因子としては分子サイズが大きい、分子内にジスルフィド結合が多く (図 1)、安定性に優れている。HGF に対する受容体である MET は細胞内にチロシンキナーゼドメインをもち、HGF の結合が受容体のチロシンリン酸化につながる

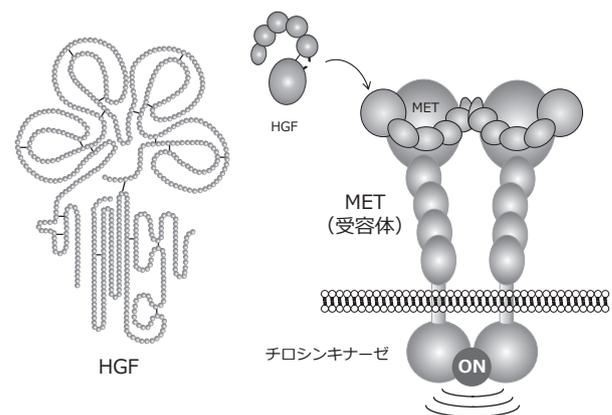


図 1 HGF と MET 受容体の概要

り、これにより細胞内シグナル伝達系が活性化される。

MET 受容体は肝細胞やニューロンを含む多くの細胞に発現されている。MET 受容体の活性化は、細胞増殖促進に加え、細胞遊走や生存の促進、形態形成 (上皮管腔形成) につながる。組織特異的 MET ノックアウトマウスでは、HGF-MET 系が破綻することによって、再生・修復の遅延、細胞死の著しい拡大につながる⁴⁾。現在までに、HGF を用いた、脊髄損傷並びに筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を対象とする、それぞれ第 I/II 相並びに第 II 相臨床試験が終了あるいは進行中である。

HGF はがん細胞の浸潤を促進する活性が強く、がん転移に関与する⁴⁾。HGF のもつ生存促進活性は、

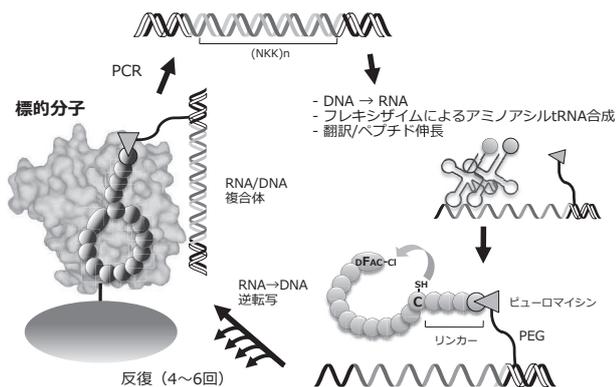


図2 RaPID法の概略

抗がん剤に対するがん細胞の生存，すなわち薬剤耐性に関与する。METの遺伝子増幅，HGFの過剰発現によるMETの過剰な活性化は，がん転移や薬剤耐性の獲得につながることから，HGF-MET系に対する阻害剤開発が進められている。ただし，HGF-MET系阻害剤の臨床試験が複数実施されたが，薬効が検証されたものはない。理由として，HGF-MET系が活性化されているかどうかを判断する技術がないことにより，適切に患者を絞り込むことができないことがあげられる。

3 特殊環状ペプチドと合成HGF

ペプチドは，抗体並みの特異性をもちながらも，化学合成によって製造が可能であり，化学的修飾が容易である点等，創薬分子として魅力的である。近年，とりわけ環状ペプチドが注目されている。環状ペプチドは直鎖状ペプチドに比べ，標的分子への親和性・特異性において優位であると共に，生体安定性にも優れている。アミノ酸は天然に絞っても20種類あることから，例えば，10～15アミノ酸からなるペプチドの構造多様性は $10^{12} \sim 10^{14}$ にも及ぶ。この莫大な構造多様性をもつゆえに，ペプチドライブラリーの中には，目的の分子に対して高い親和性・特異性で結合する環状ペプチドが必ず存在する。

RaPID (Random non-standard Peptide Integrated Discovery) システムは，菅裕明博士（東京大学）らによって確立された技術で，標的分子に高い特異性で結合する特殊環状ペプチドを高効率に取得する革新的な技術である（図2）⁵⁾。ランダムDNAをス

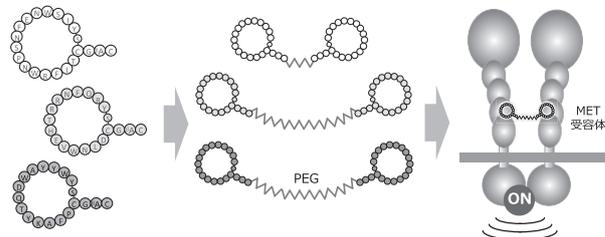


図3 合成人工HGFの構造と作用機作の概略

タートに，無細胞系でのペプチド翻訳，標的分子に結合したペプチドの回収に続く。カギとなる技術として，人工的な酵素としてリボザイムを用いることにより，L型アミノ酸に加え，D型アミノ酸，更には非天然の側鎖構造をもつアミノ酸がペプチドに取り込まれる。例えば，N末のアミノ酸として取り込まれるクロロアセチル-D-フェニルアラニン (DFAC-Cl) はシステインと自発的に結合し，ペプチドの自発的環状化が起こる。また，ペプチド配列をコードするRNA/DNAはリンカーを介してペプチドと結合している。標的分子と一緒に回収されたペプチドには，それをコードするRNA/DNAが連結されている。PCR増幅することで，目的のペプチドをコードするDNAが濃縮される。このサイクルを繰り返すことによって，標的分子に高親和性結合する環状ペプチドが高効率に取得される。

筆者らはHGFに結合する環状ペプチドを取得する研究に先立って，MET受容体に結合する環状ペプチドを取得した。増殖因子受容体の活性化には受容体同士の2量体（ダイマー）形成が必須である。そこで，METに結合する環状ペプチドをポリエチレングリコール（PEG）で架橋することによって合成METアゴニスト，言い換えると合成HGFの創成に成功した（図3）^{6,7)}。この合成HGFは，HGFタンパク質と同等の生物活性を示す。ほぼ完全な合成HGFの創成と言える。

4 HGF阻害環状ペプチド (HiP-8)

HGFは不活性型の1本鎖HGF (single-chain HGF:

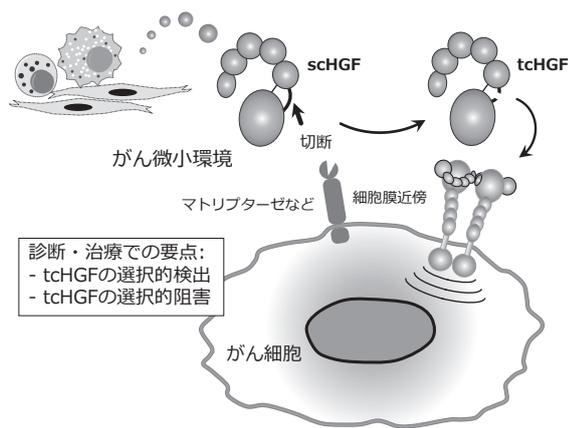


図4 がん細胞近傍での scHGF から tcHGF への変換とがん微小環境における tcHGF の意義

scHGF)として細胞外に分泌され、セリンプロテアーゼによって2本鎖活性型 HGF (two-chain HGF: tcHGF) にプロセッシングされる (図4)。正常組織に存在する HGF のほとんどは scHGF である。tcHGF は傷害組織で生成されるほか、がん細胞表面近傍で生成される。したがって、HGF-MET 系を標的とするがんの診断や治療においては、tcHGF の特異的検出、特異的阻害が極めて有効と考えられる。

筆者らはヒト HGF タンパク質をターゲット分子として、RaPID 法により HGF を阻害する特殊環状ペプチド HiP-8 (HGF-inhibitory Peptide-8) を取得した (図5)¹⁾。HiP-8 は12アミノ酸からなり、HGF に高い親和性で結合し、HiP-8 を結合した HGF は、もはや MET 受容体に結合することはできない (図5左)。その結果、HiP-8 は極めて低濃度で MET 受容体への HGF の結合を阻害する (図5右)。また、scHGF、tcHGF への選択性を調べた結果、HiP-8 は scHGF には結合せず、tcHGF に選択的に結合することが分かった¹⁾。

5 HiP-8 分子プローブによる診断への応用

HiP-8 は tcHGF に特異性をもつことから、抗がん剤に耐性となった原因としての tcHGF の過剰産生や HGF-MET 系の活性化を検出するプローブ分子になる可能性が考えられた。一方、RaPID 法によって取得された環状ペプチドの優位点として、ターゲット分子に特異性をもつ環状ペプチド部分に影響することなく、スパーサーを介して各種の化学修飾とが

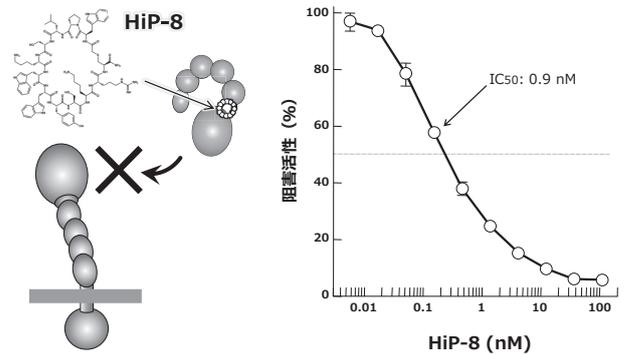


図5 HiP-8 の作用機作 (左) 並びに HiP-8 による HGF-MET 相互作用の阻害 (右)¹⁾

可能であることが挙げられる。

HiP-8 をビオチン標識し、ヒト肺がん組織での tcHGF や活性化 MET の局在を検討した¹⁾。scHGF と tcHGF を区別せずに両者を認識する抗体で染色した場合、がん細胞を含め比較的広い範囲で HGF の局在が認められたが、活性化 MET の局在と比較すると、重複された部分は一部に留まっており、ほとんどは scHGF であることと一致する。これに対して、ビオチン化 HiP-8 を用いて検出した結果、HiP-8 によって検出される tcHGF の局在は活性化 MET の局在とよく一致していた。この結果は、HiP-8 による tcHGF の特異的検出は活性化 MET とも関連することを示している。

上記の結果をふまえ、HiP-8 を PET 診断用の分子プローブとして応用するための非臨床モデルでの検討を進めた。HiP-8 はヒト HGF に対して特異性が高く、マウス HGF への反応性が低い。そこで、マウス HGF にヒト HGF 遺伝子を置き換えた、ヒト HGF ノックインマウスを用いた (図6)。背部両側の皮下にヒト肺がん細胞 (HGF を産生しない細胞、並びに HGF を安定発現する細胞) を移植し、適切な腫瘍に成長したとところで、陽子線を放出する核種 ⁶⁴Cu で標識した HiP-8 を投与し、腫瘍への集積を解析した。その結果、HiP-8 は、投与後 15 分において、早くも腫瘍組織に集積しはじめ、HGF を安定発現する肺がん組織により高レベルに集積した。90 分経過後、全身の組織におけるバックグラウンドが減少しながら、肝臓、腎臓、膀胱への移行が進む一方、腫瘍組織への集積が明瞭に検証された

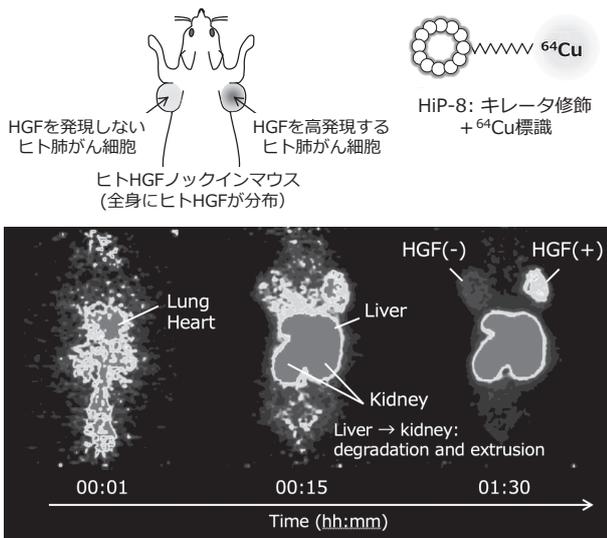


図6 HiP-8をプローブとするPET分子イメージングによるHGF高発現腫瘍の検出

(図6)。

化学修飾並びに放射性元素による標識が安定かつ容易であること、血中や組織への滞留がなく、比較的スピーディに排出されること、tcHGFレベルの高い腫瘍組織に比較的短時間に特異的に集積すること等、環状ペプチドはPET診断用プローブとしての優れた特性を有していると考えられる。一方、HGFによるMET活性化は、分子標的薬に対する耐性獲得につながることから、HiP-8を耐性がんにおけるHGF-MET系活性化のPET評価に利用することで、HiP-8の集積を判断の拠り所として、HGF-MET系阻害剤の選択・非選択が可能になると考えられる。

5 おわりに

HiP-8のtcHGFに対する高い特異性は、(1)タンパク質間相互作用に関与するインターフェースにフィットする分子サイズ、(2)構造多様性と環状構造により、多価(multivalent)の結合が可能である点等、環状ペプチドのもつ化学特性に起因すると考えられる。これらの点を考慮すると、環状ペプチドは抗体並の特異性をもつことに加え、化学修飾の容易性等も含め、優れた化学特性を有する。HiP-8を用いたPET診断への応用を目指している。

謝辞

合成HGFの研究は、主に菅裕明博士ら(東京大学)との共同研究として進められ、HiP-8の研究は主に菅博士、並びに理化学研究所の渡辺恭良博士、向井英史博士らとの共同研究として進められた。共同研究の機会をいただけたことに感謝いたします。

参考文献

- 1) Sakai K., *et al.*, *Nature Chem Biol*, **15**, 598-606 (2019)
- 2) Nakamura T., *et al.*, *Nature*, **342**, 440-443 (1989)
- 3) Miyazawa K., *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, **163**, 967-973 (1989)
- 4) Sakai K., *et al.*, *J Biochem*, **157**, 271 (2015)
- 5) Passioura T., *et al.*, *Ann Rev Biochem*, **83**, 727 (2014)
- 6) Ito K., *et al.*, *Nature Commun*, **6**, 6373 (2015)
- 7) Miao W., *et al.*, *Scientific Rep.*, **8**, 16492 (2018)

(金沢大学ナノ生命科学研究所, 金沢大学がん進展制御研究所)