

論文の内容の要旨

論文題目 Development and applications of thioether-macrocyclic peptides targeting c-Met-HGF signaling pathway

(c-Met-HGF シグナル伝達系を標的としたチオエーテル大環状ペプチドの開発と応用)

氏名 伊藤 健一郎

序論 (第1章)

肝細胞増殖因子受容体 c-Met は受容体チロシンキナーゼ(RTK)の一種であり、生体内で増殖能や遊走能など重要な細胞の機能を制御していることが知られている。c-Met はリガンドである HGF タンパク質との結合を介して二量化することで自己リン酸化を起こし、活性化状態となる。c-Met の活性化は下流の Akt シグナル経路や Erk1/2 (MAPK)シグナル経路といった一連のシグナル伝達系を介して、種々の細胞機能を促進する。c-Met-HGF シグナル伝達系の活性化は発生や損傷した臓器の再生に必要である一方、癌細胞では異常な活性化による浸潤や転移、抗癌剤に対する耐性獲得といった悪性の挙動を引き起こす側面も持つ。そのため、c-Met-HGF シグナル伝達系を活性化することで脊髄損傷や劇症肝炎など難治性疾患の治療を、逆に阻害することで抗癌治療を可能にすることが期待されている。そこで、本博士論文では c-Met-HGF シグナル伝達系を人工的に制御することを目標とし、阻害剤および活性化剤 (アゴニスト) の開発を行った。

c-Met-HGF シグナル伝達系を標的とする薬剤としては低分子阻害剤や、抗体などのタンパク質性の阻害剤及びアゴニストが主に報告されている。しかし、低分子化合物は一般的に非特異的な結合による副作用が生じ得るという問題が、タンパク質製剤は高い製造コストや免疫原性の可能性といった問題を有する。近年、比較的低分子量で化学合成が可能でありながら、高い特異性を持つペプチド医薬とその開発法が注目を浴びている。我々の研究室でも大規模な特殊 (非天然) ペプチドライブラリから標的タンパク質に結合するペプチドを高速にスクリーニングする手法として Random non-standard Peptide Integrated Discovery (RaPID)システムが開発され、これまでに RaPID システムによって、様々な標的タンパク質に結合するチオエーテル大環状ペプチド (特殊ペプチドの一種) が開発されてきた。これらのチオエーテル大環状ペプチドは標的のタンパク質に対し、非還元性の大環状構造に起因すると考えられる強力かつ選択的な結合を示した。そこで私は c-Met および HGF を標的としてチオエーテル大環状ペプチドを RaPID システムによってスクリーニングし、c-Met-HGF シグナル伝達系を阻害および活性化するペプチドを開発するという戦略を

考えた。

c-Met-HGF シグナル伝達系を阻害するチオエーテル大環状ペプチドの開発（第2章）

種々の癌細胞では c-Met-HGF シグナル伝達系が異常に活性化されることで悪性挙動の原因となっており、その阻害剤開発が進んでいる。近年、癌細胞が周辺の微小環境で分泌される HGF を受容することで抗癌剤に対する薬剤耐性を獲得することが明らかとなり、特に HGF に対する阻害剤開発が高く注目されている。序論で述べたように、HGF を強力に阻害する低分子量ペプチドは有望なリード化合物となると考えられるものの未だ報告はなく、HGF と c-Met 間の非常に強力 ($K_D < 1 \text{ nM}$) なタンパク質—タンパク質相互作用阻害が、通常のペプチドでは困難であるためと予想される。私はチオエーテル大環状ペプチドであれば強力な c-Met-HGF 相互作用を阻害出来るのではないかと予想し、RaPID システムを用いて HGF 阻害ペプチドの開発を行った (図 1a)。

まず、ヒト組み換え HGF に対して RaPID システムを用い、結合するチオエーテル大環状ペプチドのスクリーニングを行ったところ、HGF に結合を示すペプチドが数種類得られた。その中で配列に類似性を有するもの、有さないものから幅広く 16 種類の候補を選択し、ヒト細胞の c-Met-HGF シグナルを阻害できるペプチドを阻害能ベースで二次的にスクリーニングした。候補の中での 4 種類のペプチドにおいて阻害が確認されたため、さらなる阻害能の検証を行った。4 種類の HGF 阻害ペプチドを用いて、上記の阻害実験を広い濃度域で行ったところ、HiP-8 というペプチドが IC_{50} 値で 610 pM という、抗体に匹敵する非常に強力な阻害能を有することが明らかとなった。さらに、この HiP-8 ペプチドは c-Met-HGF 結合を阻害することによって、Akt や Erk1/2 経路といった下流の分岐シグナル伝達も阻害した。

本研究で開発した HiP-8 ペプチドは c-Met-HGF 間のタンパク質—タンパク質相互作用を非常に強力に阻害し、c-Met-HGF シグナル伝達系全体を阻害するチオエーテル大環状ペプチドであり、抗癌剤への応用が可能であると期待している。

c-Met-HGF シグナル伝達系を活性化する c-Met 結合ペプチドダイマーの開発（第3章）

c-Met-HGF シグナル伝達系を活性化させ、細胞の増殖能や形態形成能を促進することで難治性疾患の再生治療や創傷治癒が可能になると考えられている。実際に、組み換え HGF や HGF 遺伝子医薬など c-Met に対するアゴニストの臨床試験が行われており、医薬品としての有効性が期待されている。ペプチドなどの低分子から中分子量域の化合物で c-Met-HGF シグナル伝達系を活性できれば、非常に強力なツールになると考えられるが、そのような報告はこれまでになく、困難であることが考えられた。私は人工的に c-Met アゴニストとな

るペプチドの開発を図 1b に示す戦略により行った。

まず、私は RaPID システムを用いて c-Met に結合するチオエーテル大環状ペプチドをスクリーニングした。単離された複数のペプチドの中から候補となるペプチドを 3 種類選択し、表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定を行ったところ、どれもが c-Met の細胞外ドメインに $K_D = 2.3 \text{ nM} \sim 19 \text{ nM}$ と強力に結合することが明らかとなった。同じ配列を有する直鎖状の c-Met 結合ペプチドとの比較より、これらの c-Met 結合ペプチドの高い結合能は環状構造に起因することが明らかとなった。

続いて、c-Met 結合環状ペプチドの安定性を評価したところ、aML5, aMD5 という 2 種類のペプチドが高い血清中安定性を示した。しかし aMD4 というペプチドは血清中で速やかに加水分解されてしまった。私は aMD4 の安定性を向上させるため、aMD4 のアミノ酸残基に対して一つ一つ N メチル化修飾を行い、結合能と安定性の両面ですぐれた修飾ペプチドをスクリーニングした。その結果、配列中の 2 箇所のアミド結合に N メチル化を施すことで、ペプチドの c-Met 結合能を保ちながら安定性を向上させることに成功した。この手法は RaPID システムによるスクリーニング後のペプチドクローンに適用できるため、ペプチドの血中安定性を向上させる一般的な手法として応用できると考えられる。

次に、私は細胞上の c-Met 二分子を捕捉することで人工的に自己リン酸化を促進できるのではないかと推測し、c-Met 結合ペプチドをクロスリンカーで二量体化したペプチドダイマーを合成した。このペプチドダイマーを c-Met 発現ヒト細胞に作用させたところ、c-Met および下流のシグナルに関与する Gab1, Akt, Erk1/2 タンパク質のリン酸化レベルが顕著に向上し、c-Met-HGF シグナル伝達系が活性化されたことが示された。刺激された細胞では遊走能と分枝形態形成能、DNA 合成の強い促進が観察された。また、他の RTK の活性化は観察されなかったことから、一連のシグナル活性化は c-Met 選択的なものであることが示された。ただ、c-Met-HGF シグナル伝達系の活性化はマウスおよびイヌの細胞では見られず、ヒト細胞特異的であることが示唆された。SPR 測定より、c-Met 結合ペプチドはマウスおよびイヌ由来の c-Met に対して結合せず、ヒト c-Met に対する高い選択性を有することが明らかになった。

以上、本研究では RaPID システムによるペプチドのスクリーニングと c-Met の活性化機序に合ったリガンドデザインを組み合わせることで、人工的な c-Met-HGF シグナル伝達系のアゴニストを開発することに成功した。c-Met-HGF シグナル伝達系を活性化するペプチドは他に報告がなく、全く新しい再生医薬としての応用が期待される。

結論 (第 4 章)

本博士論文における研究では、RaPID システムを利用することで HGF を強力に阻害するチ

オエーテル大環状ペプチドおよび、c-Met を人工的に活性化するペプチドダイマーの開発に成功した。前者は HGF 中和抗体や低分子 c-Met 阻害剤に代わる c-Met-HGF シグナル伝達系阻害剤になることが、後者は組み換え HGF や HGF 遺伝子治療に代わる新しい再生医薬になることが期待される。さらには、チオエーテル大環状ペプチドの血中安定性をスクリーニング後に向上させる手法も確立し、チオエーテル大環状ペプチド実際の薬剤への応用可能性を一段と高めることに成功した。

また、本論文を通じて RaPID システムを用いて強力なタンパク質—タンパク質相互作用を阻害するペプチドをスクリーニングできること、得られたペプチドが異なる生物種由来のタンパク質をも区別できる高い標的特異性を持つことが実証された。本論文で開発された手法や得られた知見は今後のペプチド創薬において有用なものになること、そして開発した c-Met-HGF シグナル伝達系に対するペプチドはこれまでの阻害剤やアゴニストの概念を変えるような強力な薬剤となることを確信している。

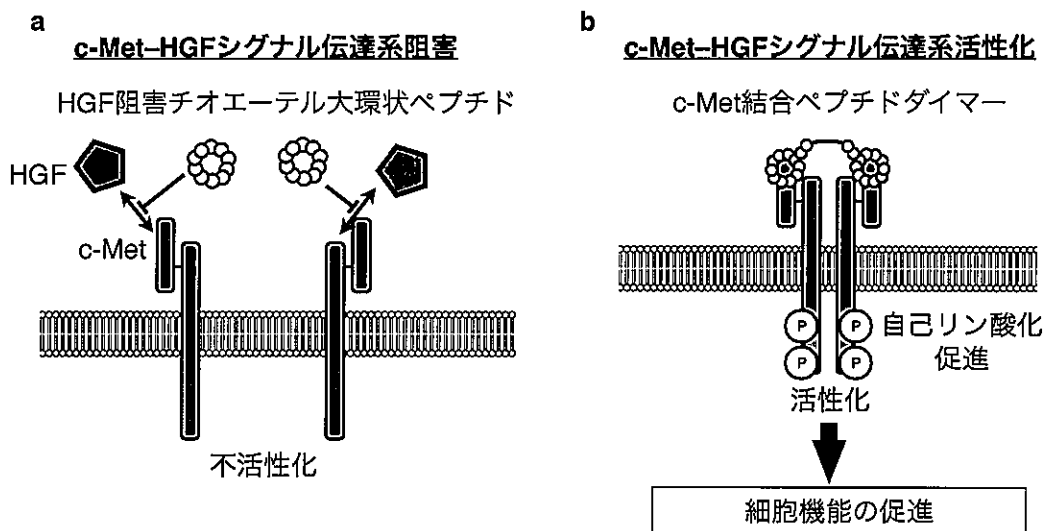


図 1. 本論文の概要。(a) RaPID システムで HGF 阻害能を有するチオエーテル大環状ペプチドをスクリーニングし、c-Met-HGF シグナル伝達系阻害を阻害する。(b) c-Met 結合チオエーテルを用い、c-Met 結合ペプチドダイマーを合成する。c-Met 二分子を捕捉することで c-Met の自己リン酸化を誘導し、細胞機能を促進する。