

# Discovery and study on macrocyclic peptides that cross bind to human and mouse hepatocyte growth factor receptors aiming at medical applications

|          |   |
|----------|---|
| その他のタイトル | 医療応用に向けたヒト・マウス肝細胞増殖因子受容体にクロス結合する特殊環状ペプチドの開発と機能評価に関する研究                          |
| 著者       | 森岡 智美   |
| 学位授与年月日  | 2016-03-24  |
| URL      | <a href="http://doi.org/10.15083/00073572">http://doi.org/10.15083/00073572</a> |

## 審査の結果の要旨

氏名 森岡 智美

森岡 智美氏は大環状ペプチドスクリーニング法である RaPID システムを用いてヒト・マウス肝細胞増殖因子受容体にクロス結合するペプチドの探索を行った。その結果、ヒト・マウス MET を同時に認識する大環状ペプチドを獲得した。

肝細胞増殖因子受容体 (MET または HGFR; Hepatocyte Growth Factor Receptor) は膜上のレセプター型チロシンキナーゼ (RTKs) の一つであり、HGF (肝細胞増殖因子; Hepatocyte Growth Factor) の受容体である。MET/HGF シグナル経路は細胞増殖、形態形成、分化、遊走、浸潤の制御に重要な役割を果たしており、癌細胞に過剰発現していることも知られている。MET/HGF シグナル経路の制御は近年注目を集めており、創薬においても非常に盛んに行われている。一方で、これまでに輩出されたペプチド医薬は天然のペプチドを製剤化したものであり、人工的なペプチド医薬の進展は未だ乏しいと言わざるを得ない。そこで先行研究では人工的なペプチド医薬の開発を目的として、mRNA ディスプレイ法の改変型である Random non-standard Peptide Integrated Discovery (RaPID) システムによってヒト MET に結合するペプチドを同定し、これらのペプチドを二量体化することで MET/HGF シグナル経路を活性化する機能を持つことが示された。しかしここで得られたペプチドはヒト MET にのみ結合し、マウス MET には結合せずマウスを用いた動物実験の実現には至らなかった。そこで本研究ではペプチド医薬の医療応用に向け、マウス MET 結合するペプチド、マウス・ヒト MET にクロス結合するペプチドの探索を行っている。

1 章では、MET と HGF の構造と結合様式、MET と HGF が結合することで活性化される MET/HGF シグナル経路の生物活性及び各種疾患との関連について記載した後、開発されてきたこれまでに MET/HGF シグナル経路を対象とした医薬品を紹介している。次に本研究の主要技術である RaPID システムの詳細と過去に RaPID システムで獲得された大環状ペプチドの特長について述べられている。さらに、本研究の先行研究となるヒト MET に結合し、ヒト MET/HGF シグナル経路を活性化する大環状ペプチドに関する研究結果について詳細が記載されており、

同研究の問題点とヒト MET とマウス MET の相同性について述べられている。

2章では RaPID システムを用いた mMET に結合するペプチドの探索について記されている。1度目の試行では標的に結合するペプチドを得ることができなかったが、種々の条件を変更した2度目の試行で複数種類の候補ペプチド (mM2Ps) を同定することに成功している。表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) を用いた解析では、4種類のペプチド (mM2P9, 10, 12, 14) について高い親和性 ( $K_D < 20$  nM) を示すことを報告している。これらのペプチドは mMET と強い親和性を持つものの、二量体の状態で mMET を活性化しなかったが、逆に mMET を阻害する能力をこれらのペプチドが持つことが示唆される。従来の RaPID システムの適用では mMET を活性化するペプチドが得られなかったことから、本研究で得られたペプチドで mMET をブロックすることで mMET 活性化ペプチドを獲得する戦略を提案している。

3章では mMET と hMET にクロス結合するペプチドの探索を行っている。通常 RaPID システムを含む mRNA ディスプレイ法では、標的タンパクを固定化したビーズと、*in vitro* で翻訳されたペプチドライブラリーを混合することで標的タンパクと結合するペプチドを回収し、この操作を繰り返し行うことで標的タンパクと結合するペプチドをコードする DNA の配列を得る。本章では mMET, hMET 両タンパク質にクロス結合するペプチドを得るため、標的タンパクを hMET と mMET としてそれぞれをビーズに固定化し、hMET と mMET に結合するペプチドを回収する操作を交互に繰り返している。その結果、複数種類の hMET と mMET にクロス結合する候補ペプチド (hMPs) の DNA 配列を同定することに成功し、SPR 法を用いた解析では hMP4 が mMET・hMET にクロス結合し、両タンパク質に親和性 ( $K_D < 100$  nM) を持つことが示されている。hMP4 に準じた候補として hMP5 は mMET に強い親和性 ( $K_D = 34.2$  nM) を持つことが分かり、本章を通して、複数のタンパク質を標的としたスクリーニング手法を確立している。

4章では先行研究で得られた hMET の hMET 活性化ペプチドとの結合ドメインが MET の IPT1, 2 ドメインであることを特定している。この結果から、IPT1, 2 ドメインへの化合物の結合が MET を阻害しないこと、及び IPT1, 2 ドメインが MET 活性化に重要な役割を果たす可能性を考察している。

5章では本研究の総括として本研究で得られた hMET・mMET にクロス結合するペプチドの有用性及び本研究の戦略の今後のペプチド創薬への応用について述べている。

以上、本論文では、ペプチド創薬における新たな手法が提案・確立されている。これらの成果が、今後のバイオテクノロジー及びペプチド創薬の発展に与える意義は非常に大きい。よって、本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格であると認められる。