

論文の内容の要旨

論文題目 Discovery and study on macrocyclic peptides that cross bind to human and mouse hepatocyte growth factor receptors aiming at medical applications
(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)

氏名 森岡 智美

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、医薬品の開発においても非常に盛んに行われている。一方で、低分子医薬でもタンパク・抗体医薬のような高分子バイオ医薬ではない医薬品としてペプチド医薬は古くから研究・開発されてきている。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は新しい技術として注目されている。

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を示した。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っていない。

医薬品はその開発段階として実験動物を対象とした前臨床試験により薬効と安全性が確認されて初めてヒトに投与される。しかしながら、動物実験で有効性や安全性が認められた候補化合物が臨床段階になって有効性が認められないことや、ヒトにおける有効性が期待できる候補化合物にも関わらず、動物での有効性・安全性が確保されないことが多くある。動物とヒトにおける有効性や安全性には少なからずギャップがあり、それは分子標的となるタンパク質についても同じことが言える。実際にマウスで前臨床試験を行う場合、種差における有効性の差異は創薬において非常に大きな障壁となる。

本研究ではMET/HGFシグナル経路を標的とした人工ペプチドの医療応用を目標として研究を行った。具体的な論文の内容について以下に記す。

1章ではMETやそのリガンドであるHGFの構造・結合様式とMET/HGFシグナル経路の生物学的機能について述べた。またMET/HGFシグナル経路を対象とした医薬品の開発状況を作用する機構とクラスによって分類した。また、これらの医薬品に対するペプチド医薬の利点や既存の医薬品の問題点と本研究で用いたRaPIDシステムの詳細について記述し、RaPIDシステムでこれまでに得られた特殊大環状ペプチドを紹介した。さらに先行研究の詳細とヒトMET (hMET)とマウスMET (mMET)の相同性について述べた。

2章ではペプチド創薬に向け、候補となるペプチドをマウスを使ったin vivo実験に適用するため、mMETを標的とし、マウスMET/HG経路を活性化するペプチド医薬の候補となる特殊大環状ペプチドの探索を行った(図1a)。その結果、mMETと結合する特殊大環状ペプチドをRaPIDシステムを用いて同定することができた。化学合成した11種類のうち5種類のペプチドについて $K_D < 20$ nMの結合解離定数が得られ、中でも1つのペプチドにおいてはサブnMという非常に強い親和性を示したが、これらのペプチドは二量体でMETを活性化することはなかった。しかし、本研究で得られたペプチドは単量体でMET活性を阻害する可能性がある。MET活性を阻害する医薬品はこれまでに多く開発が行われてきているが、中でもMETに直接結合しMET活性を阻害する薬剤は高分子バイオ医薬に限られている。ペプチドは抗体医薬やタンパク医薬などの高分子バイオ医薬と比較して、その合成が安価である点が利点として挙げられる。本研究で得られたmMET結合ペプチドが阻害活性を持つ場合、阻害剤としての応用だけでなく、活性化剤との違いを知るツールとなることが期待される。

3章では種差による有効性の違いを克服するため、mMETとhMETに活性を持つペプチドを得るため、mMETとhMETに結合するペプチドの探索を行った。RaPIDシステムは各ラウンド毎にDNAを回収し、同じ操作を繰り返す手法である。mMETとhMETをクロス結合するペプチドを同定するために、本研究ではラウンド毎に標的タンパクをmMETとhMETと交互に用いた(図1b)結果、mMETとhMETとクロス結合する特殊大環状ペプチドを同定することができた。これまでmRNAディスプレイを用いた標的と結合するペプチドの探索は数多く実践されているが、2種類のタンパク質にクロス結合するペプチドは類を見ず、新たな試みだと言える。本章で得られたクロス結合するペプチドの中でも1種類について、単量体においてはmMET及びhMETに対する親和性は $K_D < 150$ nM程度であったが、二量体においては $K_D < 10$ nMと非常に強い親和性を持つことが示された。本章で提案した手法はラウンド毎に濃縮する手法であれば、他のディスプレイ法(i.e. リボソームディスプレイ法、ファージディスプレイ法)にも応用することができる。つまり本研究では、METと結合するペプチドを同定しただけではなく、異なるタンパク質に同時に結合する分子を同定することに成功し、この手法を確立することができた。今後一層種々のディスプレイ法を用いた研究や開発が行われていく中、本研究が種差という障壁を乗り越える一助になることが期待される。

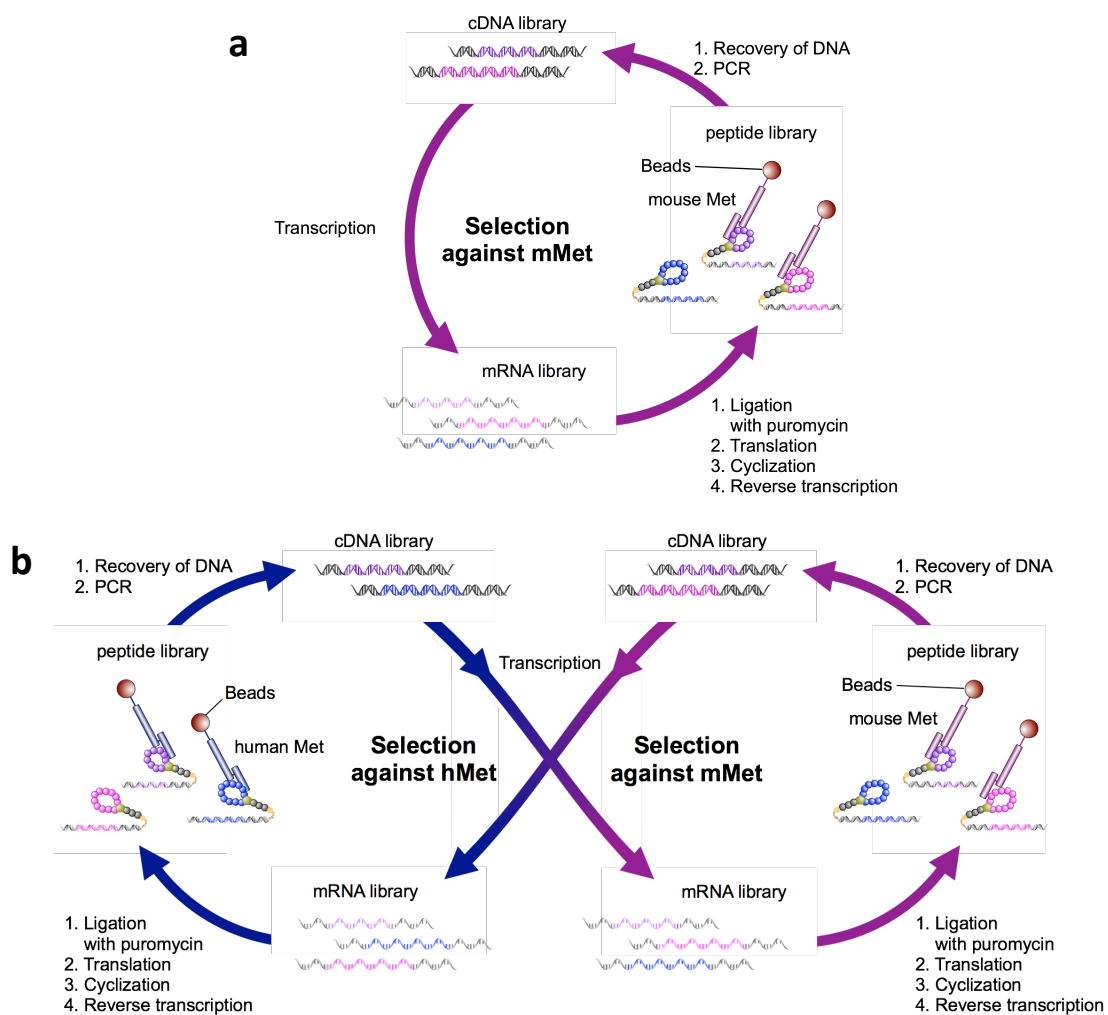


図1 本研究で用いたRaPIDシステム (a)マウスMETに結合するペプチドの探索、(b)マウスMETとヒトMETにクロス結合するペプチドの探索に用いた戦略

4章ではMET活性化の機構を明らかにするため、先行研究で得られたペプチドを用いたhMETとの共結晶の結晶構造の解明を目的として、先行研究で得られたペプチドと複数種類のtruncated hMETとの親和性を表面プラズモン共鳴法で測定した。その結果、先行研究で得られたhMET活性化ペプチドが単量体で結合するhMETのドメインを特定することができた。この結果は、hMET阻害剤の開発においても、hMET活性化剤の開発においても重要な知見であると言える。本研究はMETとペプチドとの結合様式について解析するために共結晶を得ることが目的であり、結合部位を特定したことで発現するタンパクの大きさが限定されるため、その一助となると考える。

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ペプチド創薬への応用について述べた。

これまで標的の機能を制御するために人工的に同定されたペプチドはヒトのタンパクを標的にした例しかなく、その実用化には多くの工程が残されている。本研究では2種類の標的タンパクに結合するペプチドの探索を成功したことにより人工的なペプチドの探索に幅を与え、またマウスのタンパク質に結合するペプチドの同定によりペプチド創薬の更なる発展に寄与したと言える。