

化学合成可能な増殖因子代替化合物の開発

Development of synthetic surrogates of growth factors

植木 亮介 Ryosuke Ueki, PhD (Assistant professor)

東京大学大学院工学系研究科 助教
Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

山東 信介 Shinsuke Sando, PhD (Professor)

東京大学大学院工学系研究科 教授
Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

キーワード ... 増殖因子、アゴニスト、DNAアプタマー

01 はじめに ~増殖因子の再生医療応用と問題点~

細胞の増殖・分化や器官形成を制御するタンパク質として知られる増殖因子は、その独特の生理作用から再生医療分野において重要な役割を果たしている。例えば、褥瘡や皮膚潰瘍などの創傷治療において増殖因子の組換えタンパク質（例：トラフェルミン）が外用薬として利用されている。また、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞を体外で培養、あるいは特定の体細胞へ分化誘導する際に、培地中に増殖因子を添加して生体内のシグナルを模倣するアプローチが取られている。今後も再生医療における増殖因子の重要性は高まると考えられるが、マテリアルとしての観点から見ると増殖因子は多くの問題点を抱えている。一つに、組換えタンパク質である増殖因子の製造には生物宿主を用いた発現系が必要であり、一般的に製造コストは非常に高価となる。また、糖鎖修飾やジスルフィド結合の形成パターンにばらつきが生じ得るため、化合物としての均一性を担保するのが難しい。更に、活性の発現に重要なタンパク質の折りたたみ構造は熱的に不安定なことが多く、失活あるいはロット間で活性差が生じる原因となる。上記のように、組換えタンパク質は化学合成品と比べて製造コストや品質管理等の観点でいくつかの問題を抱えている。本稿では、これらの問題を解決するアプローチについて著者らの研究例を交えつつ紹介したい。

02 肝細胞増殖因子 (HGF)

肝臓の再生因子として知られる肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor; HGF) は、細胞膜上に発現する受容体Metの二

量体形成を誘起することでMetを活性化させ、肝細胞をはじめとする様々な細胞の増殖・アポトーシス阻害に繋がるシグナル伝達を誘起する（図1）¹⁾。このようなリガンド結合に伴う受容体の二量化は、多くの増殖因子に共通の活性化機構である。二量化した受容体は細胞内ドメインのリン酸化を受け、細胞内へのシグナル伝達を開始する。組換えHGFは、その生理作用から肝炎・肝硬変などの難治性肝疾患²⁾や、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 治療への応用が検討されている³⁾。最近では、HGF遺伝子をコードするプラスミド「コラテジェン（ベベルミノゲンペルプラスミド）」が国内初の遺伝子治療薬として条件・期限付き承認を得るなど、再生医療分野への応用が期待されている。一方で、複雑な構造を持つポリペプチドであるHGFは組換えタンパク質生産における高価な製造コスト、収率の低さ、熱安定性の低さが実用上の問題点となる⁴⁾。この問題を解決するべく様々なアプローチが試みられているが、本節ではHGFの断片ポリペプチドを利用したアプローチについて紹介する。

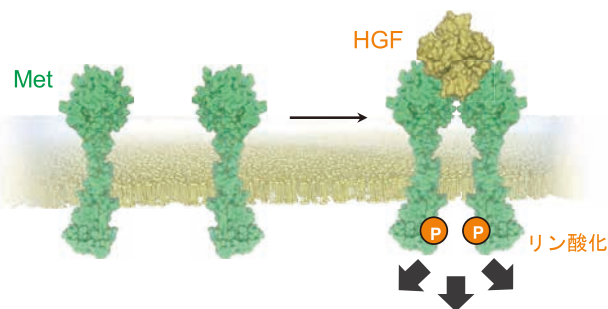


図1 肝細胞増殖因子 (HGF) による受容体 (Met) 二量化を介した細胞活性化

HGFはα鎖とβ鎖からなり、α鎖はN、K1、K2、K3、K4 ドメインから構成されている（図2a）。このうちNとK1ドメインからなる

NK1断片は弱いながらもMet活性化能を示すアゴニストとして機能することが知られている⁵⁾。一方で、NからK2ドメインからなるNK2断片はMet活性化能力を示さない。NK1は結晶構造においてNDドメインとK1ドメイン間のリンカー配列(図2b, 赤)を相互作用界面としたホモ二量体を構成している。一方でNK2単量体の結晶構造ではこのリンカー配列が構造内部に埋没することで二量体形成が妨げられていた(図2c, 赤)⁶⁾。つまり、このNDドメインとK1ドメイン間のリンカー配列の自己集合性が受容体二量化を介した活性化に必要であることを強く示唆している。ただし、NK1は受容体の活性化能は示すものの、HGFと同様に発現収量の低さや熱的な不安定性の問題を抱えている上、HGFと比較して受容体活性化能力が低いため、代替物質としての利用価値は低い。

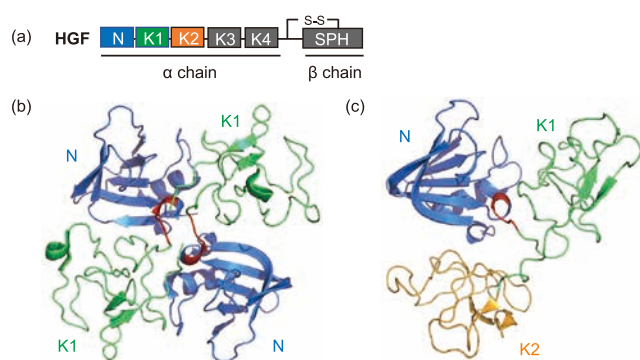


図2 HGFの構造とアゴニスト活性の相関
(a) HGF構造の概略図 (b) NK1および (c) NK2の結晶構造
(PDB ID: 2QJ2, 3HN4 を元に作図。
青:NDドメイン、緑:K1ドメイン、
橙:K2ドメイン、赤:N-K1ドメイン間配列)

この問題を解決すべく、Cochranらはイーストディスプレイ法によって高収率で発現可能、かつ高熱安定性のNK1変異体を取得することに成功している⁴⁾。具体的には酵母の細胞表層に発現するAga2pタンパク質にerror-prone PCRでランダム変異を導入したNK1を融合発現させた。こうして酵母の表層に提示されたNK1の変異体ライブラリは、FACSによって単離・配列解析することができる。変異体の中から高い発現量、Metへの高い結合能を示した変異体を解析したところ、熱安定性の指標である融解温度が20℃近く向上し、組換え発現での収率が40倍向上したNK1変異体の取得に成功している。更に、この高機能化されたNK1変異体の適切な位置にシステイン残基を導入することで、ジスルフィド結合によってホモ二量体を形成するNK1変異体の開発を報告している。この戦略により、HGFに匹敵する受容体活性化能力を示しながらも、高い熱安定性と高収率で発現可能なNK1変異体の開発に成功している。

一方、発現系に依存しない化学合成によるアプローチも低コスト化や品質の均質化という観点から非常に重要である。例えば、Vicogneらの研究グループでは化学合成とバイオコンジュゲーションによる機能的HGF断片の構築に成功している⁷⁾。彼らはビオチン修飾されたHGFのNDドメイン、K1ドメインを個別に化学合成し、ビオチン/ストレプトアビジン相互作用によって多量化する戦略を採用している。NDドメイン、K1ドメインは固相合成された

複数のポリペプチド断片をChemical ligationによって連結することで合成されている。これらの生理活性を評価した結果、K1ドメイン/ストレプトアビジン複合体のみがMet活性化能力を示し、K1ドメインが受容体への相互作用に重要であることを示唆している。なお、この複合体は組換えNK1とほぼ同等の生理活性を示すことが確認されている。ただし、ホモダイマー形成能を失ったK1ドメインを集積化する目的でストレプトアビジンを利用しているため、未だ組換えタンパク質発現系に依存していることは注意が必要である。

03 DNAアプタマーからなるHGFの合成代替物

我々は、特定の高次構造に折りたたまれ、標的分子に選択的に結合する一本鎖DNA「DNAアプタマー」⁸⁾を用いた増殖因子の代替化合物の開発を進めている。DNAアプタマーは試験管内進化法と呼ばれる手法で取得することが可能である。本手法では1)ランダム配列のDNAライブラリを化学合成、2)標的分子に結合したDNA配列を単離、3)PCRによって増幅というサイクルを繰り返すことで、標的結合DNA配列を特定する(図3)。一般的にDNAアプタマーは20-100塩基程度の長さであり、ホスホロアミダイト法と呼ばれる固相合成法によって安価に化学合成可能である。また、DNA高次構造の熱変性は可逆的であり、タンパク質のように熱的な失活を起こす恐れが低い。

我々は、HGFと競合的にMetに結合する50塩基のDNAアプタマー⁹⁻¹⁰⁾を5'末端から直列に二分子連結し、アプタマー二量体(ss-0, 図3a)を合成、これがMetの活性化を誘導するアゴニストとして機能することを見出した¹¹⁾。DNAの相補鎖形成を利用してMet結合アプタマーを二量化した検証実験においても、アプタマーの二量化に依存した受容体活性化が見られたことから、受容体二量化を誘導するアプタマーの設計戦略の有効性が示された(lane 4, 図3b)。このアゴニスト活性を持つアプタマー二量体は受容体の活性化のみならず、HGF様の生理活性を示すことも確認されている。ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)の増殖試験において、アプタマー添加群はHGF添加群と同様にHUVECの増殖を促進した(図3c)。対照実験として、受容体への結合能を示さないアプタマーの逆配列(ss-0 Rev)を添加した場合には、有意な増殖の促進は見られなかったことから、アプタマー特異的な受容体への結合および二量化を支持している。

前述のように組換えHGFは肝炎・肝硬変治療薬としての応用が検討されているが、DNAアプタマーの医薬品応用においては生体内での安定性が問題となる。一般的に、DNAは血中の分解酵素(ヌクレアーゼ)により速やかに分解されてしまうため、全身投与の際には化学修飾による安定化を施すことが望ましい。しかし、50%ウシ胎児血清(FBS)中での評価において、コントロール核酸が1時間ほどでほぼ完全に分解したのに対し、我々の開発したアプタマー二量体は24時間後も一部が完全長のまま残存するほどの強い酵素分解耐性を示した¹²⁾。検討の結果、このアプタマー二量体の独特の折りたたみ構造によって、酵素分解への耐

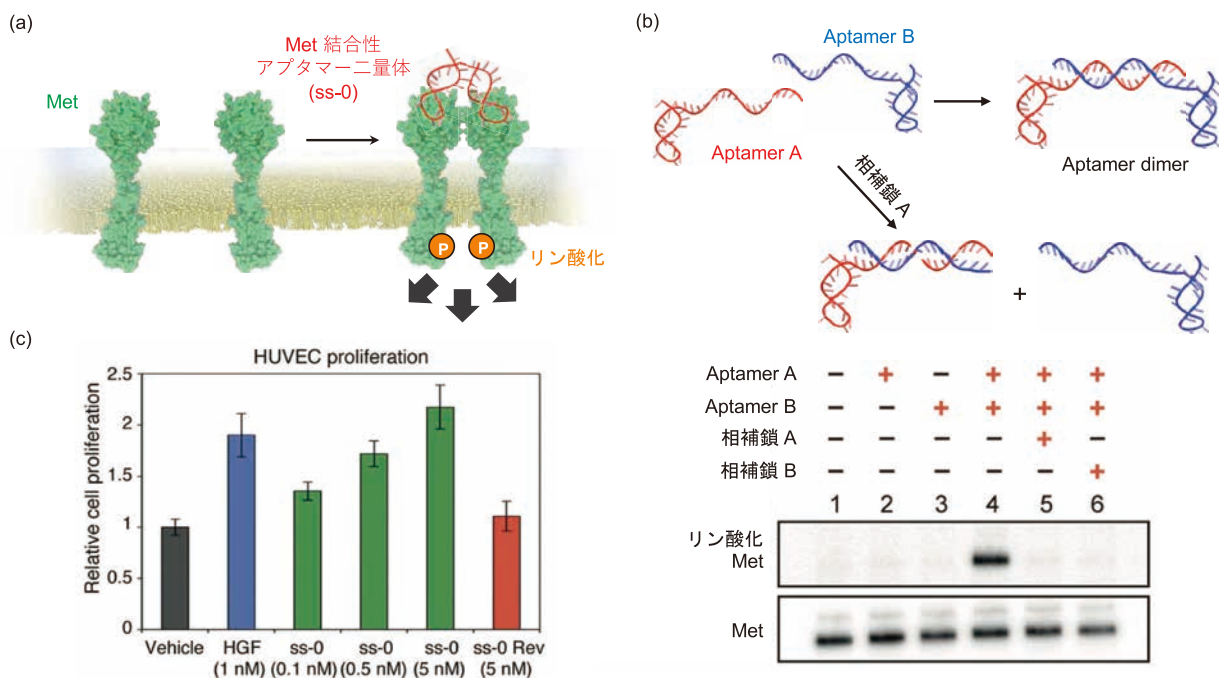


図3 HGF代替化合物として機能するDNAアプタマーの設計と生理作用
(a)アプタマー二量体による受容体活性化
(b)相補鎖形成を介したアプタマー二量体形成と受容体活性化能の相関
(c)ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の増殖試験結果(Adapted with permission from Reference 11.)

性が向上していることが判明した。このアプタマーをマウスに尾静脈投与したところ、肝臓組織におけるMetの活性化が確認され、投与されたアプタマーの一部が機能を保ったままの形で肝臓へ移行していることが示唆された。肝炎マウスモデルを用いた実験においても、アプタマー投与で肝細胞のアポトーシス抑制を示唆する結果が得られている¹²⁾。このように、本アプタマーは細胞レベル、および個体レベルでの生理活性が確認されており、化学合成可能なHGF代替物質としての応用が期待される。

04 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)

次に、著者らの研究グループでは塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factors; 以下bFGF) の代替化合物の開発に着手した (図4a)。bFGFのシグナル伝達はヒトES細胞・iPS細胞などの多能性幹細胞の未分化状態維持に重要な役割を果たすため、培地の添加物として用いられている。例えば、2011年Thomsonらは、血清などの夾雑物質を含まず、既知成分のみから構成されたiPS細胞培養用培地を報告しているが、この培地に含まれる組換えタンパク質はbFGF、TGF- β 、トランスフェリン、インスリンのみである¹³⁾。先に紹介したHGFとは異なり、bFGFは大腸菌で簡便に発現可能であるが、そのままの状態では生理条件下での安定性が低く、Thomsonらの報告によると細胞培養条件で24時間後にはほぼ活性を失う¹⁴⁾。そのため、bFGFの安定化剤や、安定な代替化合物の開発は重要な課題である。

bFGFは高度に硫酸化された天然多糖であるヘパリンと相互作用することで安定化することが知られており、保管や使用の際にヘパリンと共存させることで活性持続時間を延長することが

できる¹⁴⁾。ただし、ヘパリン自体が生物由来の製造原料を用いているため、不純物の混入リスクや脱硫酸反応による品質の不均一性の問題を抱えている。Maynardらは、ヘパリン模倣材料としてポリエチレングリコール (PEG) を側鎖に持つメタクリル酸メチルユニットとスチレンスルホン酸の共重合ポリマー p(SS-co-PEGMA) を設計した (図4b)¹⁵⁾。このポリマーをbFGF上のシステイン残基とジスルフィド結合を介して結合して得られた複合体は、様々な保管環境において安定性が向上していることが示された。例えば、55℃で30時間の熱処理、1%トリフルオロ酢酸溶液中で2時間の酸処理、トリプシン存在下で16時間の酵素消化条件において、組換えbFGFがほぼ完全に失活したのに対し、bFGF/ポリマー複合体は生理活性を維持していた。重要なことに、このbFGF/ポリマー複合体は一般的な組換えbFGFと同等の生理活性を示したことから、ポリマー修飾はFGF受容体との相互作用やシグナル伝達を阻害しないことが示唆されている。これまで組換えタンパク質へのPEG修飾によって体内動態を改善するアプローチは一般的であったが、この報告ではヘパリン模倣ポリマーによって組換えタンパク質の安定性向上が可能であることを初めて示している。

bFGFの抱える問題点を根本的に解決する方法として、化学合成可能で安定な代替化合物の開発はより魅力的である。HGFと同様、bFGFも部分断片を利用するアプローチがいくつか報告されている。具体的には、bFGFの受容体との相互作用部位である、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 11$ - $\beta 12$ 領域に由来するペプチドであるCanofinなどが報告されている (図4a, c)¹⁶⁾。これらの断片は10アミノ酸程度のペプチドであるため化学合成可能であるが、残念ながらbFGFに匹敵する強い活性を示す断片配列は未だ報告されていない。

05

bFGF代替アプタマーの開発

我々は、bFGF代替アプタマー開発のため、ヒトES細胞に発現し、bFGFと高親和性を示す受容体FGFR1を標的としたDNAアプタマーの取得を行なった¹⁷⁾。40塩基のランダム配列を含むDNAライブラリを合成し、これをFGFR1の細胞外ドメインと抗

体のFc領域を融合させたタンパク質と混合した。この融合タンパク質はProtein G修飾磁気ビーズに結合するため、磁石を用いて簡単にFGFR1結合配列を単離できる。6回の選別・増幅過程を繰り返した後にシーケンス解析を行い、いくつかの候補配列を特定した。配列の結合活性評価と最小化を行なった結果、FGFR1に約10 nMの解離定数で結合する38塩基のDNA配列SL38.2を特定した(図5a)。

このアプタマーを受容体を活性化するアゴニストへ変換する

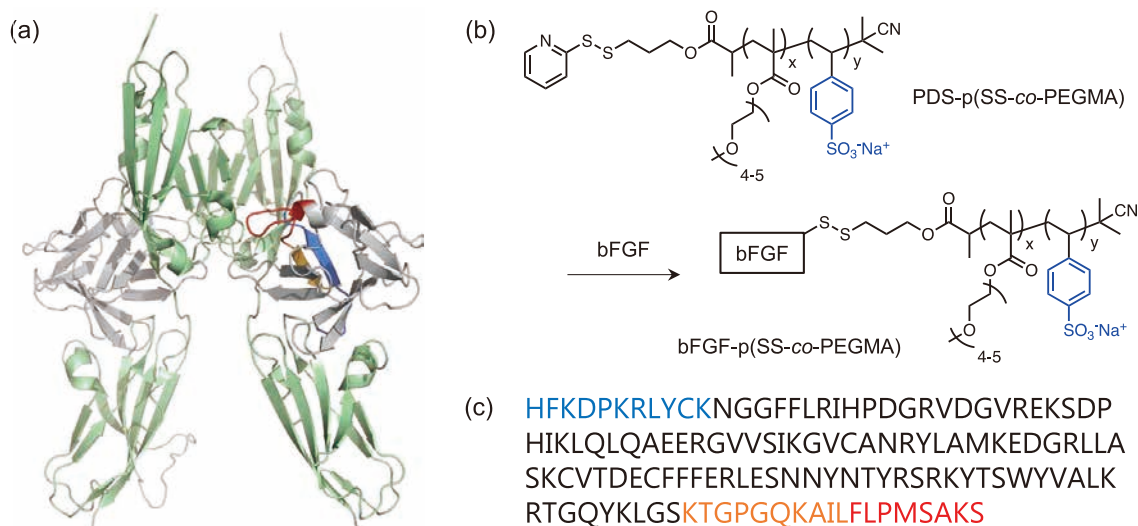


図4 bFGFの安定化、および機能的断片の化学合成を志向したアプローチ

(a) bFGF/FGFR1の2:2複合体の結晶構造 (PDB ID: 1FQ9) を元に作図。緑:FGFR1、灰:bFGF、青:Canofin 1、橙:Canofin 2、赤:Canofin 3
(b) ヘパリン模倣ポリマーp(ss-co-PEGMA)の構造とbFGFへのコンジュゲーション
(c) bFGF配列中のCanofin部分。文字色は図4aと対応。

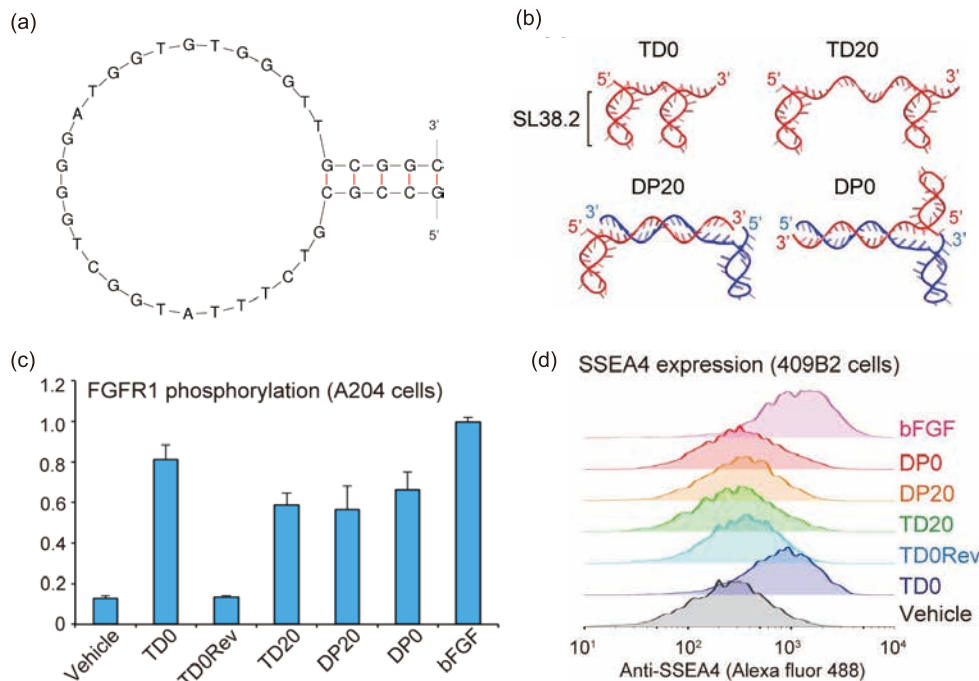


図5 bFGF代替化合物として機能するDNAアプタマーの設計と生理活性

(a) FGFR1結合性アプタマーSL38.2の配列と予測二次構造

(b) 設計したアプタマー二量体の概念図。TDXはX塩基の一本鎖リンカーを介してアプタマーを直列に二分子連結。

DPXはアプタマーをX塩基隔てて20塩基の相補鎖形成で二量化。

(c) FGFR1発現細胞を用いた受容体リン酸化量の評価

(d) ヒトiPS細胞を1週間培養した後の未分化マーカー(SSEA4)の発現量比較 (Adapted with permission from Reference 17.)

目的で、数種類のアプタマー二量体を設計した。5'末端から直列に二分子連結した設計や、DNA相補鎖形成を利用して二量体を形成させる設計を考案した(図5b)。これらの設計はそれぞれ、二つのアプタマー間の距離・配向性が変化しており、受容体の活性化に最適な二量化状態をスクリーニングすることができると考えた。設計したアプタマー二量体をFGFR1発現細胞に作用させ、受容体活性化レベルを評価したところ、いずれの設計でも受容体リン酸化の上昇が確認された(図5c)。特に、アプタマーを直列に二分子連結したアプタマー二量体(TD0)が最も高い活性を示した。次に、iPS細胞の未分化維持培養へ応用できるか検証するため、これらアプタマー二量体をbFGF不含培地へ添加してiPS細胞培養を行なった。培養開始から1週間後にiPS細胞の未分化マーカーの一つであるSSEA4の発現量を評価した結果、興味深いことにTD0のみがSSEA4の発現を維持しており、それ以外のアプタマーはbFGF非添加群とほぼ同等のレベルまでSSEA4発現量が低下していた(図5d)。FGFR発現株を用いた受容体活性化の評価では、いずれのアプタマーもアゴニストとして機能していたが、TD0のみが未分化マーカーの発現を維持したのは予

想外の結果であった。恐らく、アプタマーの二量化様式によって、細胞内シグナル伝達の様式に変化が起きていると考えられる。

TD0添加培地で1週間培養したiPS細胞について、更に評価を行なったところ、細胞が形成するコロニーの形態はbFGF存在下で培養した際の形態と類似しており、蛍光標識抗体を使った染色結果においても、コロニー全体からSSEA-4の発現が確認された(図6)。一方、対照サンプルであるTD0の逆配列(TD0Rev)を添加した培地で培養した場合は、bFGF非添加の際と類似した形態を示しており、SSEA4の発現も大幅に低下していた。定量PCRで未分化マーカーの一種であるOCT4の発現量を評価した結果でも同様の傾向が見られた。ただし、今回開発したアプタマーTD0添加培地で培養を継続した際には、未分化マーカーの緩やかな発現低下が確認されており、bFGF存在下で培養された細胞の状態と必ずしも一致しない可能性が示唆されている。この原因は未解明ではあるが、アプタマーの再進化による活性向上や、シグナル阻害剤との併用などのアプローチによって、bFGF添加培地で培養されたiPS細胞の表現型により近づくことが可能かもしれない。

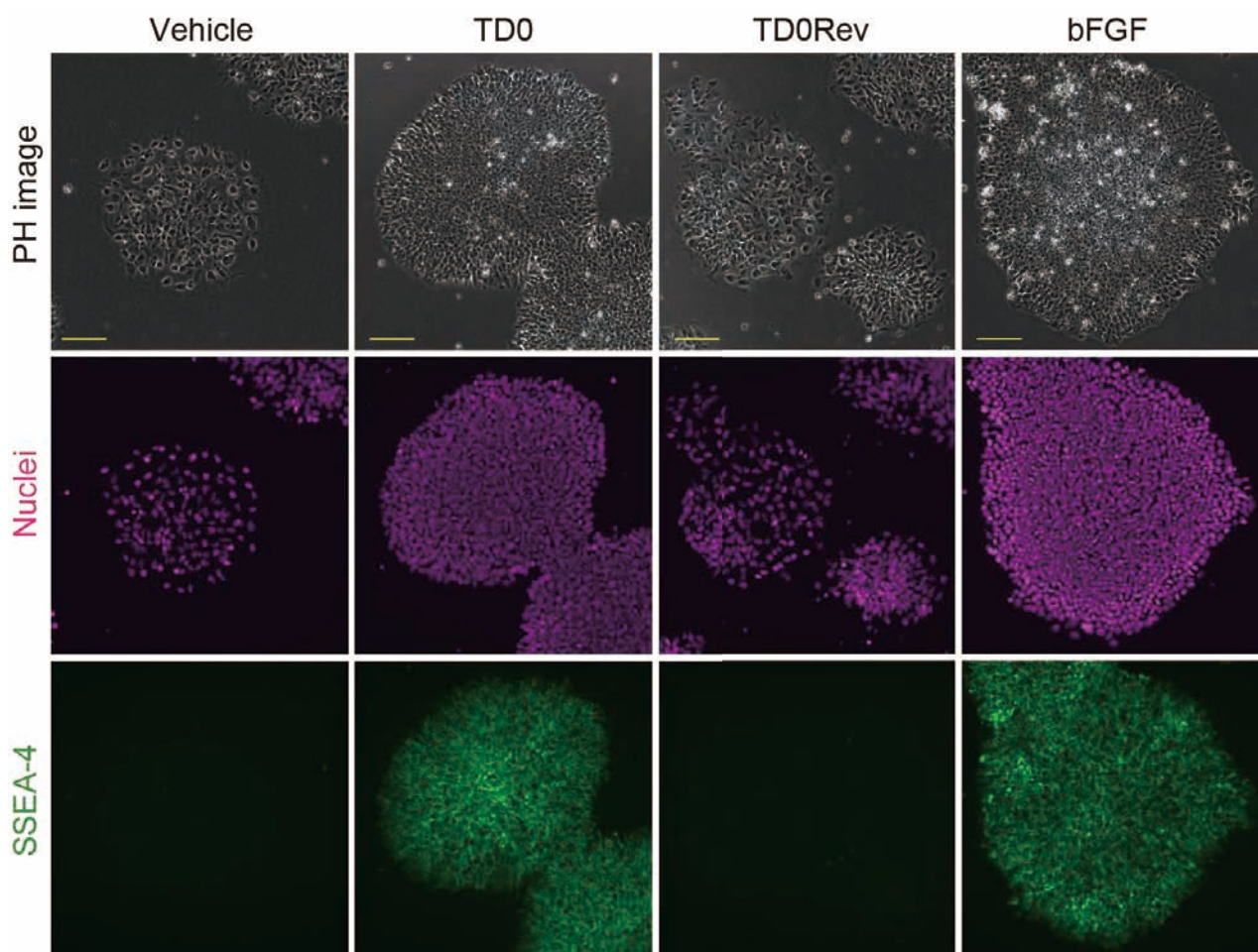


図6 ヒトiPS細胞を1週間培養した後の未分化マーカー(SSEA4)の発現。
上から位相差像、核染色(マゼンタ)、未分化マーカー SSEA4(緑)を表す。(Adapted with permission from Reference 17.)

本稿では、増殖因子の組換えタンパク質が抱える問題点と、その解決に向けたアプローチについて紹介した。我々の研究グループでは化学合成可能なDNAに着目して増殖因子代替化合物の開発を進めているが、進化工学的手法を利用することで、ペプチドなど他の分子から構成される受容体アゴニストの開発も可能である。例えば、今回紹介したHGFについては東京大学の菅らのグループが独自のスクリーニング系を用いて、Metに結合する特殊環状ペプチドを取得し、アゴニスト化に成功している¹⁸⁾。これら核酸・ペプチドからなるアゴニストは、その物性や生理活性に応じて、種々の目的への応用が可能であると期待される。DNAに基づいたアゴニスト設計の利点としては、ワトソン-クリック塩基対形成の選択性によって、二次構造を比較的容易に予測可能であることが挙げられる。これにより、目的の構造や特性を示すアゴニストを合理的に設計することができる。実際に我々のグループでは、アプタマー二量体の配列設計によって、受容体の活性化能を制御可能であることを見出した¹⁹⁾。この手法により、天然の増殖因子とは異なる受容体の活性化レベルを人為的に誘導し、細胞機能の精密な制御が可能であることを報告している。増殖因子が示す再生機能は多面的であり、様々な細胞種の増殖や分化を誘導するため、がん化などの副作用を引き起こすリスクが懸念されている。このようなアゴニスト活性の精密制御は、将来的に安全な再生医療の実現に貢献する分子技術となると期待される。

参考文献

- 1) K. Matsumoto, H. Funakoshi, H. Takahashi, K. Sakai, *Biomedicines* **2**(4), 275-300 (2014).
- 2) A. Ido, A. Moriuchi, M. Numata, T. Murayama, S. Teramukai, H. Marusawa, N. Yamaji, H. Setoyama, I. D. Kim, T. Chiba, S. Higuchi, M. Yokode, M. Fukushima, A. Shimizu, H. Tsubouchi, *J. Transl. Med.* **9**, 55 (2011).
- 3) 東北大学医学部神経内科, 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を対象とした肝細胞増殖因子 (HGF) の第II相試験, <http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/hgf-als.html> (参照 2020-02-10).
- 4) D. S. Jones II, P. C. Tsai, J. R. Cochran, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**(32), 13035-13040 (2011).
- 5) W. D. Tolbert, J. Daugherty, C. Gao, Q. Xie, C. Miranti, E. Gherardi, G. Vande Woude, H. E. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**(37), 14592-14597 (2007).
- 6) W. D. Tolbert, J. Daugherty-Holtrop, E. Gherardi, G. Vande Woude, H. E. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**(30), 13264-13269 (2010).
- 7) C. Simonneau, B. Leclercq, A. Mougél, E. Adriaenssens, C. Paquet, L. Raibaut, N. Ollivier, H. Drobecq, J. Marcoux, S. Cianférani, D. Tulasne, H. de Jonge, O. Melnyk, J. Vicogne, *Chem. Sci.* **6**(3), 2110 (2015).
- 8) J. Zhou, J. Rossi, *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 181-202 (2017).
- 9) A. Boltz, B. Piater, L. Toleikis, R. Guenther, H. Kolmer, B. Hock, *J. Biol. Chem.* **286**(24), 21896-21905 (2011).
- 10) R. Ueki, S. Sando, *Chem. Commun.* **50**(86), 13131-13134 (2014).
- 11) R. Ueki, A. Ueki, N. Kanda, S. Sando, *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**(2), 579-582 (2016).
- 12) R. Ueki, S. Uchida, N. Kanda, N. Yamada, A. Ueki, M. Akiyama, K. Toh, H. Cabral, S. Sando, *Sci. Adv. Accepted*.
- 13) G. Chen, D. R. Gulbranson, Z. Hou, J. M. Bolin, V. Ruotti, M. D. Probasco, K. Smuga-Otto, S. E. Howden, N. R. Diol, N. E. Propson, R. Wagner, G. O. Lee, J. Antosiewicz-Bourget, J. M. Teng, J. A. Thomson, *Nat. Methods* **8**(5), 424-429 (2011).
- 14) G. Chen, D. R. Gulbranson, P. Yu, Z. Hou, J. A. Thomson, *Stem Cells*, **30**(4), 623-630 (2012).
- 15) T. H. Nguyen, S. H. Kim, C. G. Decker, D. Y. Wong, J. A. Loo, H. D. Maynard, *Nat. Chem.* **5**, 221-227 (2013).
- 16) S. Li, E. Bock, V. Berezin, *Int. J. Mol. Sci.* **11**(6), 2291-2305 (2010).
- 17) R. Ueki, S. Atsuta, A. Ueki, J. Hoshiyama, J. Li, Y. Hayashi, S. Sando, *Chem. Commun.* **55**(18), 2672-2675 (2019).
- 18) K. Ito, K. Sakai, Y. Suzuki, N. Ozawa, T. Hatta, T. Natsume, K. Matsumoto, H. Suga, *Nat. Commun.* **6**, 6373 (2015).
- 19) R. Ueki, M. Akiyama, S. Sando, *Preprint in ChemRxiv* <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.9703013.v1> (参照 2020-02-10).