

# 日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

## I 基本情報

研究開発課題名： *In silico* デザインで実現する受容体アゴニストの精密活性制御  
Precise control of receptor agonist activity based on *in silico* design

研究開発実施期間：令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：山東 信介  
Shinsuke Sando

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
東京大学大学院・工学系研究科化学生命工学専攻・教授  
The University of Tokyo, Graduate School of Engineering, Professor

## II 研究開発の概要

増殖因子は受容体チロシンキナーゼを活性化し、分化や遊走、増殖など生理学的に重要な細胞機能を引き起こす。その有用な機能のため、医療応用や細胞培養等における広範な活用が期待されてきた。本研究では、化学合成可能な核酸や大量発現可能なポリペプチドから構成され、増殖因子受容体の活性を精密制御可能な人工アゴニストを開発することを目標とした。この課題を達成するため、増殖因子が誘導する受容体二量化というタンパク質-タンパク質相互作用プロセスに着目し、*in silico* 解析・設計を利用したアプローチにより高機能化増殖因子のデザインを試みた。これにより、増殖因子の抱える問題を解決し、シグナル伝達強度が制御された受容体アゴニストの創出を目指した。

特に、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor: HGF) を標的増殖因子として設定し、その高機能化と代替化学合成アゴニストの開発を中心課題として計画を遂行した。

本研究では、受容体活性の精密制御に向けて2種類の研究を実施した。

- (1) DNA型アゴニスト、
- (2) 増殖因子断片ポリペプチドアゴニスト

それぞれの研究開発概要は下記の通りである。

### (1) 受容体活性を精密に制御する DNA 型アゴニストの開発

増殖因子受容体の活性化レベルが制御された、理想的な DNA 型アゴニスト分子の設計指針を提案することに成功した。具体的には、細胞膜上での増殖因子受容体の会合頻度・会合様式を制御可能な DNA 型

アゴニスト分子の設計に成功している (Akiyama and Ueki *et al.* DNA-based Synthetic Growth Factor Surrogates with Fine-tuned Agonism, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2021, 22745.). 特に、1 本鎖環状 DNA から構成される受容体結合性アプタマー分子「CiD agonists」の概念を新たに提案した (Ueki *et al.* CiD agonists: Circular DNA-based agonists for the fine-tuning of receptor signaling, *ChemRxiv*. 10.26434/chemrxiv-2022-wx8jg.). 本コンセプトの開発において、分子動力学計算によって DNA の溶液中でのダイナミクスを計算科学的に解析し、受容体結合領域の距離・配向性が人為的に制御可能であることを確認した。本分子は受容体二量化を誘起する二つの受容体結合ドメイン間に位置する DNA リンカーの配列によって受容体間の距離・配向を制御可能であり、受容体活性の人為的な精密制御が可能であることが示された。

実際に、代表者らが開発した DNA 型アゴニスト分子および、CiD agonists 分子の生理活性評価を実施し、その機能を実証した。ELISA 等による HGF 受容体のリン酸化計測結果から、いずれの分子も DNA の配列設計に応じて HGF 受容体の最大活性化量を調節可能なパーシャルアゴニスト開発の基盤となることを見出された。また、HGF の持つ生理作用のうち、特に医療応用上重要と考えられる、細胞増殖・細胞遊走・血管新生などについて一連のパーシャルアゴニスト分子の活性評価を実施した。その結果、いずれの場合においても受容体の最大活性化レベルに応じた形でこれらの生理作用が発現する強度が変化することが確認された。このことから、今回開発したパーシャルアゴニスト分子は、分子設計に基づいた受容体最大活性化レベルの調節を通じて、細胞の精密機能発現などの応用可能性を持つことを見出された (東京大学/AMED/JST/理研 共同でプレスリリースを発行)。

さらに、DNA 型アゴニストの再生医療等製品としての応用可能性を検証する目的で、多能性幹細胞の肝細胞分化プロセスへの適用を検討した。iPS 細胞をサイトカイン・増殖因子の順次添加によって肝細胞へと誘導するプロトコルを基本とした分化誘導実験を実施した。残念ながら HGF 依存的な肝分化・成熟は現時点では確認されていない。DNA アゴニストの性能評価を実施する適切な実験系の確立が必要であると考えられる。一方で、DNA アプタマーは、核酸からなるため物理/化学的安定性が高く、組み替えタンパク質と比較して製剤の自由度が高いことが期待される。これら核酸アプタマーの特性を生かし、HGF 代替化合物としての医療応用可能性を見出すに至った (本資料は公開資料のため、詳細情報は割愛)。

## (2) 増殖因子断片ポリペプチドアゴニスト

HGF (約 80 kDa) の低分子量断片ペプチドのうち、アゴニスト活性を示す増殖因子断片ポリペプチドアゴニストに着目し、受容体二量化能を制御することでアゴニスト化・シグナル活性の制御を試みた。増殖因子断片ポリペプチドアゴニストの相互作用界面に着目し、Rosetta FlexddG と呼ばれる手法に基づいて、熱力学的に安定な集合界面を形成するようにアミノ酸配列を改変した。10 種類程度の変異体を発現し、HGF 受容体活性化能を ELISA で評価した結果、天然型増殖因子断片ポリペプチドアゴニストと比較して高い受容体活性化能を示す増殖因子断片ポリペプチドアゴニスト変異体が見出された (本資料は公開資料のため、詳細情報は割愛)。

天然型と比較して高い活性を示したある有望な増殖因子断片ポリペプチドアゴニスト変異体について

て、発現・精製・結晶化条件の最適化を進め、分解能 2Å 前後の非常に質の高い X 線結晶構造の取得に成功した。解析の結果、変異体の全体的なフォールディング様式は野生型とほぼ同様に保たれており、*in silico* 計算に基づいて導入したアミノ酸変異の側鎖が相互作用界面において新たな水素結合を形成していることが示唆された。

また、有望な増殖因子断片ポリペプチドアゴニスト変異体について、基本的な生理作用の評価を実施した。HGF の持つ生理作用のうち、特に医療応用上重要と考えられる、細胞増殖・細胞遊走などについて検討した。細胞遊走アッセイにおいては、天然型の完全長 HGF と同様に細胞の遊走挙動が確認されており、変異型増殖因子断片ポリペプチドアゴニストも細胞レベルでのアゴニスト活性を示すことを見出した。増殖因子断片ポリペプチドアゴニストは、主として昆虫細胞などの真核細胞宿主での発現を要する HGF とは異なり大腸菌で生産可能であり、HGF と同様の活性を示す変異体が得られれば、実応用上の価値は非常に高いと期待される。

以上の通り、肝細胞増殖因子受容体を標的とした DNA 型アゴニスト、ペプチド型アゴニストの *in silico* 設計手法の開発について、基本的なコンセプトの創出、細胞レベルでの実証実験にも成功した。今後は、各モダリティにおける医療応用上の問題点（体内動態/安定性）の克服、疾病モデルを用いた受容体活性精密制御による治療効果の検討など、より実応用に向けた実証を検討する。

The objective of this study was to develop artificial agonists consisting of nucleic acids and polypeptides that can precisely regulate the activity of receptor tyrosine kinases (RTKs). To achieve this goal, we focused on the complex protein-protein interaction process of receptor dimerization mediated by growth factors and attempted an approach using in silico-guided design. We aimed to overcome the problems associated with the use of growth factors and to create receptor agonists with fine-tuned activity.

In particular, the main target was hepatocyte growth factor (HGF)-Met receptor interaction, and the specific projects were as follows.

- (1) Development of DNA-type agonists,
- (2) Development of polypeptide-based agonists consisting of growth factor fragments

### **(1) Development of DNA-type agonists that precisely control receptor activity**

We have succeeded in proposing a design guideline for DNA-type agonist that precisely controls the activation level of RTKs. We have succeeded in developing DNA-type agonist that can control the dimerization of RTKs on the cell membrane (Akiyama et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 60, 22745; Ueki et al. *ChemRxiv*. 10.26434/ChemRxiv. 10.26434/chemrxiv-2022-wx8jg.). In particular, we have proposed the new concept of "CiD agonists," receptor-binding aptamers composed of single-stranded circular DNA. In constructing this concept, we analyzed the dynamics of DNA components in solution using molecular dynamics calculations and found that the distance and orientation of receptor binding domains can be artificially controlled. Therefore, it is possible to fine-tune the activity of receptors artificially and precisely by controlling the distance and orientation between receptors through the sequence of DNA linkers located between two receptor binding domains.

### **(2) Development of polypeptide-based agonists consisting of growth factor fragments**

Among the low molecular weight fragment peptides of HGF (about 80 kDa), we focused on the specific peptide domain, which shows agonist activity. We attempted to create superior mutants of the peptide domain-based agonist by controlling the interaction propensity. Therefore, we focused on the interaction domain of a specific peptide domain and introduced mutations at the interaction interface based on Rosetta FlexddG technology to design mutants that form more thermodynamically stable complexes. The RTK-activating ability of these mutants were evaluated by ELISA and found to be superior to that of the natural form of the peptide domain (detailed information is omitted since this report is publicly available).