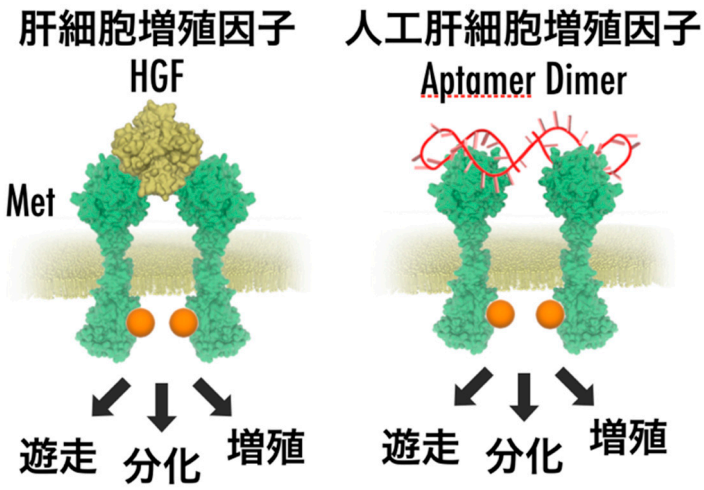
7　医療応用に向けた人工肝細胞増殖因子の創製	山東　信介

【目的】体を構成する細胞は、外界からの刺激に応答してその細胞機能を変化させる。その主要な役割をはたすのが、細胞膜上に発現する細胞膜タンパク質とそれに結合するリガンド分子である。様々なリガンドの中でも、本研究では細胞増殖因子、特に肝細胞増殖因子に着目して研究を進めた。肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor：HGF）は、細胞膜受容体 Met に結合して二量体化を引き起こす。その結果、細胞内部ドメインがリン酸化され、増殖や遊走、分化といった特徴的な細胞機能が誘起される。組換え HGF は、肝細胞に対する作用から肝炎や肝硬変などの肝疾患や筋萎縮性側索硬化症治療への応用が検討されている。一方で、組換えタンパク質作製にかかる製造コスト、活性クオリティーコントロールや熱安定性の低さなど、実応用に向けて克服すべき課題もある。我々は、この問題点を克服すべく、化学合成可能な人工 HGF の開発に取り組んできた。核酸アプタマーを構成要素とする核酸化学型人工 HGF を設計し、この人工 HGF が細胞上に発現する Met 受容体の活性化を引き起こすことを示している。本研究では、開発した人工 HGF の医療応用に向け、生体条件における人工 HGF の安定性評価を行うとともに、動物実験を実施し、肝疾患治療への応用可能性を検討する。

【方法と結果】本研究では、人工 HGF の医療応用評価に向け、生体条件下における安定性評価を実施するとともに、体内動態評価、及び肝炎モデルに対する治療効果評価を進めた。生体条件における安定化は、人工 HGF の血清中の安定化をポリアクリルアミド電気泳動により評価した。その結果、興味深いことに、部分人工 HGF は血清中で速やかに分解されたのに対し、完全長人工 HGF は高い血清安定性を示すことを見出した。また、蛍光標識した人工 HGF を用い、マウス尾静脈から投与した際の体内動態評価を行った。その結果、人工 HGF が肝臓に集積し、さらに肝臓部位における Met リン酸化を引き起こすことを明らかにした。最後に、肝炎モデルマウスを用い、人工 HGF の肝炎抑制能を確認した。その結果、人工 HGF を投与することにより、肝炎マーカーの抑制が確認された。Preliminary な段階であるが、本研究により人工 HGF が生体応用に向けて有望な機能を有していることが示された。

肝細胞増殖因子と人工肝細胞増殖因子の概念図



7. 医療応用に向けた人工肝細胞増殖因子の創製

山東　信介

東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻

Key words：肝細胞増殖因子，HGF，核酸アプタマー

緒　言

体を構成する細胞は、外界からの刺激に応答してその細胞機能を変化させる。その主要な役割をはたすのが、細胞膜上に発現する細胞膜タンパク質とそれに結合するリガンド分子である。様々なリガンドの中でも、本研究では細胞増殖因子、特に肝細胞増殖因子に着目して研究を進めた。

肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor：HGF）は、細胞膜受容体 Met に結合して二量体化を引き起こす。その結果、細胞内部ドメインがリン酸化され、増殖や遊走、分化といった特徴的な細胞機能が誘起される。組換え HGF は、肝細胞に対する作用から肝炎や肝硬変などの肝疾患や筋萎縮性側索硬化症治療への応用が検討されている。一方で、組換えタンパク質作製にかかる製造コスト、活性クオリティーコントロールや熱安定性の低さなど、実応用に向けて克服すべき課題もある。

我々は、この問題点の克服を目指し、化学合成可能な人工 HGF の開発に取り組んできた（図 1）。特に、特定の標的に結合する機能性核酸「核酸アプタマー」に着目した。Met 受容体に結合する核酸アプタマーは［1］、それ自体では HGF-Met 相互作用のアンタゴニストとして機能するが、二量化してアプタマーダイマーにするとアゴニストとして働く［2］。このアプタマーダイマーは人工 HGF として機能し、Met のリン酸化、続く下流リン酸化シグナル、さらには細胞遊走や増殖などのフェノタイプも引き起こすことを明らかにしている。この人工 HGF は化学合成が可能・安定であり、均一のクオリティーを担保しやすいなど、実応用に向けた期待がある。

一方で、生体応用を考えた場合には幾つかの課題があった。課題の 1 つは、体内での安定性である。この人工 HGF は DNA から構成されているため、生体中に存在するヌクレアーゼによって容易に分解されると考えられた。もう 1 つの課題は体内動態である。核酸よりなるアプタマーを生体に投与した場合、どのような動態を示すのかが明らかではない。さらに、人工 HGF が生体条件で機能し、HGF と同じく肝疾患抑制効果を示すかも明らかでない。本人工 HGF の医療応用に向けては、1．生体安定性、2．体内動態、3．生体条件での活性化評価を確認し、評価する必要がある。本研究では、この 3 点に関する研究を進めた。その結果、この人工 HGF が生体中でも安定に存在し、肝臓に集積すること、さらには肝炎モデルにおいて抑制効果を示すことが明らかになった［3］。

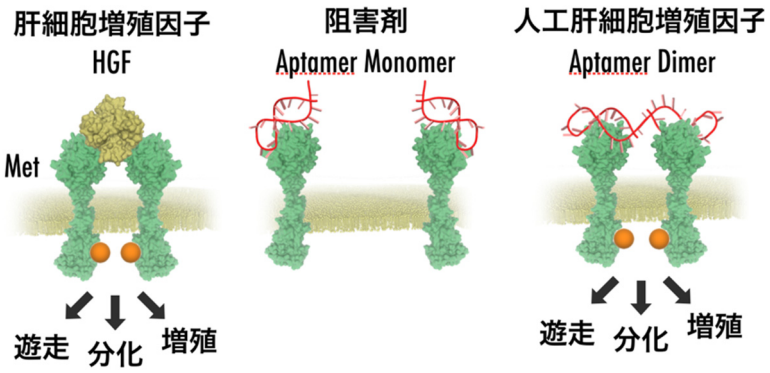


図 1．アプタマーを利用した人工 HGF の概念図

方　法

1.　生体安定性の評価

各種オリゴヌクレオチドサンプルはサーマルサークラーによってアニーリングし（95℃、5 分→降温 0.1℃/分→25℃）、特定の構造をとるようにした。アニーリングした各種オリゴヌクレオチドサンプルを 50%の非動化 FBS を含むリン酸バッファー中、37℃でインキュベートした。その後、サンプルをポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析し、全長オリゴヌクレオチドの残存率から安定性を算出した。

2.　体内動態の評価

蛍光イメージングを行うため人工 HGF の 5'末端を Alexa Fluor 647 でラベル化した蛍光ラベル化人工 HGF を準備した。麻酔下、尾静脈より 0.5 nmol の蛍光ラベル化人工 HGF をマウスに投与した。各臓器へのデリバリーは、臓器摘出後、IVIS イメージングシステム（ex／em = 640／680 nm）による蛍光イメージングによって定量した。また、肝臓組織切片を作製し、共焦点蛍光顕微鏡によって、各アプタマーのより微細な局在を確認した（血管は DyLight 488 ラベル化 Tomato Lectin によって共染色を実施）。

3.　疾患モデルにおける疾患抑制効果の評価

BALB/c マウスを用い、Anti-Fas 抗体を用いて肝疾患モデルマウスを作製した。本モデルにおいては、肝臓に移行した Anti-Fas 抗体が肝細胞表層の Fas を活性化し、アポトーシスを誘導することで急性肝炎を引き起こす。このモデルマウス実験において、人工 HGF（10 nmol）を Anti-Fas 抗体（2μg）と同時に尾静脈投与し、さらに初回投与から 1.5 時間後に再投与（10 nmol）した。初回投与から 4.5 時間後に血液を採取し、臨床化学分析装置によって血液中のバイオマーカー（GPT、GOT、LDH）を検出することで肝炎の進行度を計測した。

結果および考察

1.　生体安定性の評価

図 2 に各種オリゴヌクレオチドを 50%血清中で 0、1、3、24 時間インキュベートした結果を示している。1 本鎖 DNA（Control ssDNA）やアプタマーモノマー（Apt-mono）は、1 時間で速やかに分解され、全長のバンドが消失した。一方で、アゴニストとして働くアプタマーダイマー（Apt-dimer）にしたところ、安定性が向上し、24 時間後においても 40%以上のアプタマーダイマーが残存していることが確認された。

この原因を確認すべく、ステムループ型構造をとる Met 結合アプタマーのステム部位、ループ部位に変異を入れた変異体を作製し、その安定性を確認した。その結果、3'末端のステム部位を欠損したアプタマーダイマーでは、血清中の安定性が失われ、アプタマーモノマーと同程度になることが確認された。このことから 3'末端の安定構造が人工 HGF の血清中の安定化に寄与していることが確認された。

この結果は、生体中、特に血中に存在するヌクレアーゼについて考えると合理的な解釈が可能である。血中に多く存在するヌクレアーゼは 3'-エンドヌクレアーゼであり、3'末端から切断する。今回用いた人工 HGF は、ダイマー化することによって 3'末端に安定なステムループ構造を有する。結果として、この構造が生体安定性の原因になっていると考えられる。いずれにせよ、人工 HGF は非修飾核酸から構成されるが、その特徴的な構造によって生体条件下でも比較的安定に存在でき、生体応用が可能であることが示された。



図2. 50%血清中における人工肝細胞増殖因子の安定性評価

人工肝細胞増殖因子（Apt-dimer）、5'末端のアプタマーモノマー（Apt-mono）、コントロールである1本鎖DNAを50% FBS中37℃で0、1、3、24時間インキュベートした。その後、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって全長バンドを解析した。

From Science Advances, 6, eaay2801(2020). This work is licensed under CC BY-NC（http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/）.

2. 体内動態の評価

人工HGFが生体条件下において安定に存在することを確認できたため、生体投与後の体内動態について検討を進めた。蛍光法によって追跡するため、5'末端をAlexa Fluor 647でラベル化したアプタマーダイマー（人工HGF）を用い、尾静脈投与後の動態を計測した。投与10分後の各種臓器での蛍光強度比を測定した。その結果、人工HGFは、脾臓、腎臓、肝臓にデリバリーされ蓄積することが確認された。

また、肝臓組織における人工HGFの局在を、共焦点蛍光顕微鏡を用いて確かめた。図3にみられるように、人工HGF由来の蛍光（赤色）が、血管を染めたトマトレクチン由来の蛍光（緑色）と共局在していた。このことから、人工HGFは肝内皮に結合していることが示唆された。より詳細に解析すると、その一部は類洞内皮細胞の内側に存在している。このことは、一部の人工HGFが管腔外に漏れ出し、肝実細胞と相互作用している可能性を示唆している。

人工HGF投与後に肝臓組織のMetリン酸化をウェスタンブロッティングにより確認したところ、Met受容体のリン酸化が確認された。以上の結果より、人工HGFは全身投与により肝臓に移行すること、さらに肝臓組織のMet受容体活性化を引き起こす機能を持っていることが確認された。

3. 疾患モデルにおける疾患抑制効果の評価

人工 HGF 疾病治療効果を検証するため、Anti-Fas 抗体を投与した肝疾患モデルマウスを用いて肝炎の抑制効果を評価した。過去の研究により、HGF は Anti-Fas 抗体が誘導する肝細胞のアポトーシスを抑制することが示されていることから、人工 HGF の治療効果検証実験においても良いモデルになると考えられる。

人工 HGF を Anti-Fas 抗体と同時、更に初回投与から 1.5 時間後に再投与し、初回投与から 4.5 時間後の血中バイオマーカー量から肝炎の進行度を評価した。その結果、GPT、GOT、LDH などの肝炎進行度の指標となるバイオマーカー値が Fas 投与による大幅な減少、およびアプタマーの投与によるバイオマーカー値の有意な抑制が認められた。前述の肝臓組織における Met 活性化の結果と照らし合わせると、本人工 HGF が全身投与後に一部は肝臓組織に移行して肝細胞に発現する Met を活性化すること、抗アポトーシス作用を示すことが強く示唆されたと言える。

本研究により、DNA から構成される人工 HGF が抗アポトーシス剤としての医療応用可能性を持つことが示されたほか、肝疾患以外の様々な疾病に対する有効性の検証も期待される。

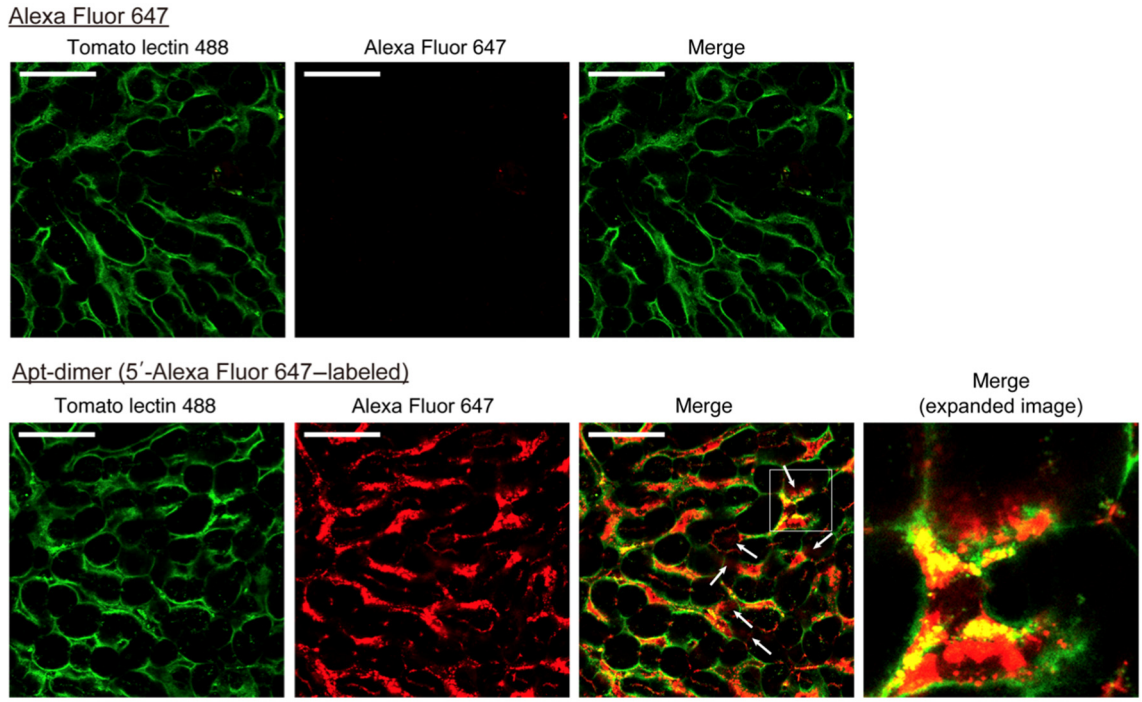


図 3. 肝臓組織における人工肝細胞増殖因子の局在解析

（上段）Alexa Fluor 647（0.5 nmol）のみ、（下段）Alexa Fluor 647 で 5 末端を修飾した人工細胞増殖因子（0.5 nmol）を尾静脈から投与した。肝臓組織切片における局在を共焦点蛍光顕微鏡により解析した。

スケールバー：50 μm.

From Science Advances, 6, eaay2801(2020). This work is licensed under CC BY-NC（http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/）.

共同研究者・謝辞

本研究は、東京大学大学院工学系研究科の植木亮介氏、内田智士氏、神田直人氏、山田直生氏、植木彩香氏、秋山桃子氏、オラシオカブラル氏、川崎市産業振興財団ナノ医療イノベーションセンターの藤加珠子氏との共同研究として実施された。

文　献

1） Boltz A, Piater B, Toleikis L, Guenther R, Kolmar H, Hock B. Bi-specific aptamers mediating tumor cell lysis. J. Biol. Chem. 2011 Jun 17;286(24):21896-905. doi: 10.1074/jbc.M111.238261. Epub 2011 Apr 29. PMID:21531729

2） Ueki R, Ueki A, Kanda N, Sando S. Oligonucleotide-Based Mimetics of Hepatocyte Growth Factor. Angew Chem Int Ed Engl. 2016 Jan 11;55(2):579-82. doi: 10.1002/anie.201508572. Epub 2015 Nov 23. PMID:26592704

3） Ueki R, Uchida S, Kanda N, Yamada N, Ueki A, Akiyama M, Toh K, Cabral H, Sando S. A chemically unmodified agonistic DNA with growth factor functionality for in vivo therapeutic application. Sci Adv. 2020 Apr 1;6(14):eaay2801. doi: 10.1126/sciadv.aay2801. eCollection 2020 Apr. PMID: 32270033