

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14473

研究課題名(和文)ヘテロ受容体カップリングのシグナル特性と人工リガンド創成の研究

研究課題名(英文)Signal characteristics of hetero-receptor coupling and generation of artificial ligand

研究代表者

松本 邦夫 (Matsumoto, Kunio)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：90201780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞増殖因子受容体をダイマー化する人工リガンド技術は再生医療に応用可能であるとともに、従来にない生物活性をもつ人工リガンドを創成できる可能性が考えられる。本研究は、異なる受容体同士を人為的にダイマー化することで、ヘテロ受容体のシグナル活性化につながるかを検討した。ダイマー形成の評価系としてsplit luciferase系と原子間力顕微鏡による解析系を確立した。一方、MET受容体、RET受容体、IGF受容体についてヘテロダイマー形成を誘導したが、シグナル活性化は認められなかった。増殖因子受容体の新たな組合せを検討し、ヘテロ受容体活性化人工リガンド創成の可能性を検討することが必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Artificial ligands that induce the dimerization of growth factor receptors may be applicable to regenerative medicine, and generation of artificial ligands that have unique and novel biological activities may be possible. We here investigated signal activation by hetero-dimerization between different growth factor receptors. The split luciferase fusion protein system and observation of receptor molecules by atomic force microscopy were performed and determined to be appropriate for evaluation of growth factor receptor dimerization. Hetero-dimer formation between MET, RET, and IGF receptors was induced in cultured cells using FKBP/FRB fusion receptors, however, activation of these receptor and downstream signaling molecules were not seen. Combination of other growth factor receptors seemed to be required to further clarify possibility for generation of artificial ligands capable of inducing hetero-receptor dimerization and activation.

研究分野：生物化学・腫瘍生物学

キーワード：細胞増殖因子 チロシンキナーゼ 受容体 サイトカイン 増殖因子受容体 シグナル伝達

(1) 研究開始当初の背景

細胞増殖因子による受容体活性化は、細胞増殖・分化、生存、ダイナミックな遊走など多彩で重要な生物活性を引き起こす。細胞増殖因子は、組織の再生・修復を支えることから、細胞増殖因子の組換えタンパク質は生物学的医薬として疾患の治療にも利用されている。細胞増殖因子受容体を介した生理活性、制御機構やシグナル伝達について理解が深まった一方で、これらの知見に基づいて、人工的に受容体を制御する試みは少ない。私達は HGF (肝細胞増殖因子)の研究で先導的な成果を上げるとともに、医療への応用を進めてきた (Sakai et al, J Biochem, 157: 271-284, 2015)。現在、脊髄損傷ならびに筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 治療を目的に、組換え HGF タンパク質による世界に先駆けた臨床試験が国内で進められている。

増殖因子受容体チロシンキナーゼが、他の受容体を活性化する現象は trans-activation として知られている。HGF は MET 受容体を介して生理活性を発揮するが、MET 受容体について、1) EGF 受容体から MET の trans-activation、2) インスリン受容体と MET の同時活性化による強固なインスリン応答性が報告されている。私達は、上皮管腔形成において、MET が RET 受容体の trans-activation を誘導するという結果を得ている。MET ならびに RET は腎尿管形成に関与している。したがって異なる受容体の同時活性化がより強固でユニークな生物活性を誘導する可能性が示唆される。しかしながら、異なる受容体同士を同時活性化することによって、強固でユニークな生物活性を誘導できるかどうか、これまで研究がなされていない。

(2) 研究の目的

細胞増殖因子による受容体活性化には、受容体のダイマー (2量体) 形成やオリゴマー (多量体) 形成が必要である。私達は環状ペプチド性人工リガンドによる MET 受容体のダイマー形成・活性化に成功した (Ito et al. Nat Commun, 2015)。本手法を用いれば異なる受容体間の活性化 (ヘテロ受容体カップリング) を引き起こすことが可能である (左図)。そこで、本課題ではヘテロ受容体カップリング (ダイマー化) を人為的に誘導することによって、それぞれの受容体活性化を誘導し、強固なシグナルや生物活性発現につながるかどうか (相加的あるいは相乗的) を評価することを目的とした。

(3) 研究の方法

- (1) 細胞増殖因子受容体の選択: MET 受容体、RET 受容体、IGF 受容体 (IGFR) をヘテロ受容体カップリングのモデル受容体として選択した。
- (2) 人為的ダイマー形成誘導: FKBP (FK506-binding protein) と FRB (FKBP12-rapamycin associated protein1) が rapamycin 存在下でダイマーを形成することを利用して、MET、RET、IGFR それぞれの細胞内領域 C 末に FKBP または FRB ドメインを融合したタンパク質を HEK293 細胞に発現させ、rapamycin 添加によりホモダイマー化またはヘテロダイマー化を誘導した。
- (3) シグナル分子活性化: ERK1/2、STAT3、AKT の発現、活性化/リン酸化を Western blot によって調べた。
- (4) 組換えタンパク質の発現・精製: 受容体細胞外領域の組換えタンパク質を HEK293 細胞または CHO 細胞を宿主にして発現し、培養上清から精製した。
- (5) 受容体同士のダイマー形成の定量的評価: 受容体同士のダイマー形成を定量的に評価するため、split luciferase アッセイ法を利用した。
- (6) 原子間力顕微鏡 (AFM): 受容体同士の相互作用ならびにダイマー形成を評価するために、高速原子間力顕微鏡での観察を行った。高速 AFM 観察については、金沢大学新学術創成研究機構・バイオ AFM 先端研究センターの柴田幹大博士との共同研究として実施された。

(4) 研究成果

- (1) 分割 luciferase によるダイマー形成評価系: 分割 luciferase を用いたタンパク質間相互作用の解析では、タンパク質同士が近接して複合体を形成する条件で luciferase 発光が可能となるため、ダイマー形成を定量的に評価するために有用と考えられた。そこで、MET 細胞外ドメイン C 末に分割 luciferase (small bit または large bit) を融合タンパク質 (それぞれ MET-S、MET-L) として発現させ、培養液から親和性クロマトグラフィーによって精製した。MET-S と MET-L のダイマー形成のリガンド (HGF) 依存性を、MET 融合分割 luciferase によって調べた結果、HGF が生物活性を示す生理的濃度域で HGF による MET ダイマー形成が認められた。したがって、増殖因子受容体細胞外領域を分割

luciferase 融合タンパク質として発現させることで、ダイマー形成を評価できると考えられた。

- (2) AFM による受容体相互作用の観察・評価: 精製した MET 受容体細胞外ドメインを用いて、AFM による MET タンパク質間相互作用やダイマー形成を観察・評価できるかどうかを解析した。その結果、複数の条件を最適化させ、MET 受容体細胞外ドメインのダイマー形成が高速 AFM によって観察されたことから、増殖因子受容体同士のダイマー形成の構造ダイナミクスや評価に AFM を利用することが可能と判断された。
- (3) ヘテロ受容体カップリングによるシグナル活性化の検証: 人為的な受容体ダイマー形成の第一段階として、MET、RET、IGFR、それぞれについて、FKBP または FRB ドメインを融合したタンパク質として細胞に発現させ、rapamycin 添加によるホモダイマー形成によるシグナル活性化を検証した。MET、RET、IGFR、それぞれを発現する培養細胞に、rapamycin を添加したところ、rapamycin の濃度依存的に、ERK1/2、AKT、STAT3 のリン酸化/活性化が上昇した。したがって、MET ホモダイマー、RET ホモダイマー、IGFR ホモダイマー形成が誘導され、その結果、下流のシグナル系が活性化されると判断された。
- (4) 上記の結果に基づき、第二段階として、ヘテロダイマー形成によるシグナル活性化を検証した。MET、RET、IGFR、それぞれを FKBP/FRB 融合タンパク質として発現させ、MET-RET、MET-IGFR、RET-IGFR 形成によるシグナル活性化を調べた。その結果、MET-RET、MET-IGFR、RET-IGFR、いずれの組み合わせにおいても、rapamycin 添加による活性型 ERK1/2、AKT、STAT3 の上昇は認められなかった。したがって、MET-RET、MET-IGFR、RET-IGFR の組み合わせにおいては、ヘテロダイマー形成による受容体ならびにシグナル活性化を誘導することは難しいと判断された。
- (5) 考察: 今回、MET、RET、IGFR をヘテロダイマー形成によるシグナル活性化の受容体として調べたが、ヘテロダイマー形成による受容体シグナル活性化は認められず、本研究の目的を達成できなかった。ヘテロダイマー形成による受容体シグナル活性化は当初の想定よりも難しいと思われた。しかしながら、増殖因子受容体は約 50 種類に及ぶことから、MET、RET、IGFR 以外の受容体を用いることで、ヘテロダイマー

形成による受容体シグナル活性化が可能になることも考えられる。ただし、すべての受容体を候補として組み合わせを検証することを一定の期間内で終了することは難しい。シグナル解析や生物活性について、評価系がもっとも確立している MET 受容体を中心にしつつ、RET、IGFR 以外の受容体について、融合タンパク質を順次準備し、ヘテロ受容体カップリングによるシグナル活性化・増強について検討することを計画している。

(5) 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Tode N, Kikuchi T, Sakakibara T, Hirano T, Inoue A, Ohkouchi S, Tamada T, Okazaki T, Koarai A, Sugiura H, Niihori T, Aoki Y, Nakayama K, Matsumoto K, Matsubara Y, Yamamoto M, Watanabe A, Nukiwa T, Ichinose M. Exome sequencing deciphers a germline MET mutation in familial epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer. *Cancer Science*, 査読有, in press, 2017. DOI: 10.1111/cas.13233.
- ② Imamura R, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor in physiology and infectious diseases. *Cytokine*, 査読有, 2017, in press. doi: 10.1016/j.cyto.2016.12.025.
- ③ Cecchi F, Kato T, Lee YH, De Silva DM, Roy A, Matsumoto K, Bottaro DP. The Met/hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase. *Biochemical Society Transactions*, 査読有, 2017, in press.
- ④ Sato H, Aoki S, Kato T, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor. *Encyclopedia of Signaling Molecules*, 査読有, 2nd edition. Springer, 2017, in press.
- ⑤ Matsumoto K, Umitsu M, De Silva DM, Roy A, Bottaro DP. HGF-MET in cancer progression and biomarker discovery. *Cancer Science*, 査読有, 108: 296-307, 2017. DOI: 10.1111/cas.13156.
- ⑥ Isozaki H, Ichihara E, Takigawa N, Ohashi K, Ochi N, Yasugi M, Ninomiya T, Yamane H, Hotta K, Sakai K, Matsumoto K, Hosokawa S, Bessho A, Sendo T, Tanimoto M, Kiura K. Non-small cell lung cancer cells acquire resistance to the ALK inhibitor alectinib by activating alternative receptor tyrosine kinases. *Cancer Research*, 査読有, 76: 1506-1516, 2016. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1010.

- ⑦ Umitsu M, Sakai K, Ogasawara S, Kaneko M, Asaki R, Tamura-Kawakami K, Kato Y, Matsumoto K, Takagi J. Probing conformational and functional states of human hepatocyte growth factor by a panel of monoclonal antibodies. *Scientific Reports*, 査読有, 6: 33149, 2016. DOI: 10.1038/srep33149.
- ⑧ Adachi E, Sakai K, Nishiuchi T, Imamura R, Sato H, Matsumoto K. Cell-autonomous changes in Met receptor expression regulate the growth and metastatic characteristics in malignant melanoma. *Oncotarget*, 査読有, 7: 70779-70793, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.12221.
- ⑨ Ito K[†], Sakai K[†], Suzuki Y, Ozawa N, Hatta T, Natsume T, Matsumoto K[§], Suga H[§]. Artificial human Met agonists based on macrocycle scaffolds. *Nature Communications*, 査読有, 6: 6373, 2015. (†equal contribution; §corresponding authors) DOI: 10.1038/ncomms7373
- ⑩ Tada Y, Hiroshima K, Shimada H, Morishita N, Shirakawa T, Matsumoto K, Shingyoji M, Sekine I, Tatsumi K, Tagawa M. A clinical protocol to inhibit the HGF/c-Met pathway for malignant mesothelioma with an intrapleural injection of adenoviruses expressing the NK4 gene. *SpringerPlus*, 査読有, 4: 358, 2015. DOI: 10.1186/s40064-015-1123-3.
- ⑪ Sakai K, Aoki S, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor and Met in drug discovery. *Journal of Biochemistry*, 査読有, 157: 271-284, 2015. DOI: 10.1093/jb/mvv027

[学会発表] (計 16 件)

- ① 松本邦夫: 細胞増殖因子による再生医療と次世代バイオ医薬技術. 第 122 回 日本解剖学会総会・全国学術集会シンポジウム “最先端の再生医学研究が切り開く革新医療と発生学の展望”, 2017 年 3 月 30 日 (長崎大学坂本キャンパス)
- ② 松本邦夫: HGF-MET 系を介した再生・がんの制御と創薬. 大阪大学蛋白質研究所ワークショップ “動物細胞発現系を用いた高難度蛋白質生産支援と糖鎖工学・抗体工学を用いたその高度化”, 2017 年 1 月 27 日 (みのお山荘・箕面市)
- ③ Kunio Matsumoto. Regulation and probing of HGF-MET by peptide-based technology. The 21st Japan – Korea Cancer Research Workshop, 2016 年 12 月 23 日 (ソウル)
- ④ 松本邦夫. HGF-MET 受容体の制御・構造解析支援と創薬. 第 4 回創薬等支援技術

基盤プラットフォーム公開シンポジウム (2016 年 12 月 7 日、有楽町朝日ホール)

- ⑤ 海津正賢、有森貴夫、酒井克也、小笠原諭、北郷悠、金子美華、加藤幸成、松本邦夫、高木淳一. HGF/c-Met シグナリングの解明に向けた二本鎖 HGF の構造決定. 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜)
- ⑥ 今村 龍、Jangphattananont Nawaphat、酒井克也、松本邦夫: Purification and functional analyses of multi-functional cytokine Lect2. 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016 年 11 月 30 日)
- ⑦ 足立恵理、酒井克也、今村龍、松本邦夫: B16F10 メラノーマの造腫瘍性/転移性における Met 階層的発現の意義. 第 75 回日本癌学会学術総会 (2016 年 10 月 8 日、パシフィコ横浜)
- ⑧ 磯崎英子、市原英基、瀧川奈義夫、松本邦夫、千堂年昭、谷本光音、木浦勝行. EML4-ALK 融合遺伝子陽性肺癌に置ける ALK 阻害剤耐性克服. 第 75 回日本癌学会学術総会 (2016 年 10 月 8 日、パシフィコ横浜)
- ⑨ Miao Wenyu、酒井克也、小澤直也、伊藤健一郎、菅裕明、松本邦夫: 特殊環状ペプチドからなる人工 MET/HGF 受容体アゴニストの細胞内シグナル・遺伝子発現制御特性. 第 89 回日本生化学会大会 (2016 年 9 月 25 日、仙台)
- ⑩ 酒井克也、伊藤健一郎、鈴木芳典、小澤直也、菅裕明、松本邦夫: 特殊環状ペプチドによる人工 Met アゴニスト. 第 89 回日本生化学会大会 (2016 年 9 月 25 日、仙台)
- ⑪ 松本邦夫. 特殊環状ペプチドによる人工細胞増殖因子の創製. 第 22 回ペプチドフォーラム. (2016 年 3 月 5 日、金沢大学サテライト・プラザ)
- ⑫ 海津正賢、酒井克也、小笠原諭、加藤幸成、松本邦夫、高木淳一: HGF 蛋白質のエンジニアリングによる c-Met シグナリング機構の解明. 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会 (2015 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド)
- ⑬ 足立恵理、酒井克也、松本邦夫: 悪性黒色腫における Met 受容体の階層的発現に連動する腫瘍特性 (薬剤耐性・転移性) 制御. 第 74 回日本癌学会学術総会 (2015 年 10 月 10 日、名古屋国際会議場)
- ⑭ 酒井克也、伊藤健一郎、菅裕明、松本邦夫: 環状ペプチドによる人工 Met 受容体ア

ゴニストの創製. 第 74 回日本癌学会学術
総会 (2015 年 10 月 9 日、名古屋国際会議
場)

- ⑮ 松本邦夫、酒井克也、伊藤健一郎、菅裕
明: 特殊環状ペプチドによる Met/HGF 受容
体アゴニストの創製. 第 80 回インターフェロ
ン・サイトカイン学会 (2015 年 7 月 18 日、東
京工業大学)
- ⑯ 松本邦夫、酒井克也、伊藤健一郎、菅裕
明: 特殊環状ペプチドによる人工 HGF の
創製. 第 22 回肝細胞研究会 (2015 年 6 月
5 日、鳥取県米子市)

[図書] (計 2 件)

- ① 松本邦夫: “HGF”, 「サイトカイン・増殖因
子キーワード事典」, 羊土社, pp. 258-259,
2015.
- ② 酒井克也、松本邦夫: “Msp と Msp 受容体
(Ron)”, 「サイトカイン・増殖因子キーワード
事典」, 羊土社, pp 261-263, 2015.

[その他]

ホームページ等

<https://www.k-matsumoto-kanazawa-u.org>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 邦夫 (MATSUMOTO, Kunio)
金沢大学・がん進展制御研究所・教授
研究者番号: 90201780

(2) 連携研究者

菅 裕明 (SUGA, Hiroaki)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号: 00361668

(3) 研究協力者

酒井 克也 (SAKAI, Katsuya)
金沢大学・がん進展制御研究所・助教
研究者番号: 10523318