

令和 4 年 10 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15693

研究課題名（和文）増殖因子ミメティクス核酸に基づく受容体パーシャルアゴニズムの解明

研究課題名（英文）DNA-based mimetics of growth factors to reveal molecular mechanisms underlying partial agonism

研究代表者

植木 亮介 (Ryosuke, Ueki)

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・助教

研究者番号：90755703

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、増殖因子・サイトカイン受容体の活性発現に重要な受容体二量化プロセスに着目し、それら受容体の活性を決定する因子を特定することを目指した。この目的のため、研究代表者らの開発した、増殖因子ミメティクス核酸を用いた解析を実施し、受容体の二量化効率と、結果として得られる受容体の最大活性化レベルの相関を評価した。また、これらの増殖因子ミメティクス核酸を用いて、受容体活性化の制御に基づいた、細胞機能の精密制御が可能であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

増殖因子・サイトカインは、細胞の増殖や分化を制御する重要なタンパク質であり、その稀有な整理活性から再生医療分野で大きな注目を集めている。一方で、これらのタンパク質を用いた治療は、多様な機能発現や過剰な活性化による副作用と隣り合わせであり、その活性を精密に制御可能な戦略が求められている。本研究では、天然のリガンド分子を模倣した人工化学ツールを用いた解析を実施し、安全性の高い増殖因子・サイトカインの新たな設計指針を得ることに成功した。

研究成果の概要（英文）：Receptor dimerization is an important process of growth factor- or cytokine-induced cell signaling. In this project, we aimed to identify the factors that determine the activity of growth factor or cytokine, focusing on the receptor dimerization process. To this aim, we conducted an analysis using oligonucleotide-based mimetics of growth factors and evaluated the correlation between the dimerization efficiency of the receptors and the resulting maximum activation level of the receptors. We also revealed that these growth factor mimetics could be used to control cell functions.

研究分野：生体関連化学

キーワード：アプタマー 受容体 アゴニスト 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜上における受容体の二量化は、細胞が外界環境を感知して適切な応答を誘起するための代表的な分子機構の一つである。例えば、増殖因子やサイトカインは受容体の二量化を誘起し、細胞内ドメインのリン酸化を誘起することで多様な細胞機能の発現を制御している。これらの分子は、その生理作用から再生医療への応用が検討されてきたが、細胞の増殖・分化・遊走・免疫反応など様々な機能発現に關与するため、発がんやアレルギー反応などの副作用のリスクを併せ持つ。上記の理由からその応用範囲は限られているのが現状である。近年、天然増殖因子と比較して受容体の活性化効率が低下した「パーシャルアゴニスト」と呼ばれる分子が、低副作用の再生医療を実現する新たな分子基盤として注目を集めている。しかし、その分子レベルでの作用機序は不明な点が多く、合理的な分子設計指針は未だ確立されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者らが開発した増殖因子ミメティクスを利用した受容体活性化過程の解析を実施し、受容体の二量化という現象を通じて、どのようにパーシャルアゴニズムが発現しているのかを解明することを目指す。この目的のため、申請者らが開発した受容体活性制御ツールである増殖因子ミメティクスを利用した多面的な解析を実施する。増殖因子ミメティクスは、試験管内進化法 (SELEX 法) によって獲得可能な核酸アプタマーから構成されている。申請者らは、増殖因子受容体を認識するアプタマーを二量体として利用することで、天然増殖因子と同様に受容体の活性化が可能であることを実証している (Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 579.)。このミメティクス分子は DNA から構成されるため、塩基配列によって構造を自在に規定可能であり、受容体のクラスタリング形式 (距離・配向) を精密に制御することができる。また、受容体に対する結合部位の特定もなされており、塩基配列の変異による親和性の調節も可能である (Chem. Commun. 2014, 13131.)。

## 3. 研究の方法

本研究課題では、肝細胞増殖因子 (HGF) の受容体である Met を標的として、検証を実施する。これまでに申請者らは Met に対する核酸アプタマーからなる増殖因子ミメティクスの開発に成功している。興味深いことに、二量化されたアプタマーの分子設計に応じて、受容体最大リン酸化量 ( $E_{max}$ ) が低下したパーシャルアゴニストが得られることが判明している。具体的には、片側のアプタマーのみ親和性を低下させたヘテロダイマー型分子において  $E_{max}$  値が低下する現象が確認されている。これら異なる  $E_{max}$  値を示す増殖因子ミメティクスの受容体リン酸化挙動を比較し、パーシャルアゴニズムの発現に対する寄与を明らかにする。また、このようなパーシャルアゴニズムを示す分子の有用性についても検証を実施した。

## 4. 研究成果

### ・増殖因子ミメティクスが示すパーシャルアゴニズムの解析

異なる  $E_{max}$  値を示す増殖因子ミメティクスを用いて Met 発現 A549 細胞を刺激し、各タイムポイントにおいて細胞破砕液を作成し、受容体リン酸化の時間依存性を ELISA によって計測した。その結果、いずれのミメティクス分子においても反応開始 15 分程度に最大のリン酸化を示し、その後徐々にリン酸化量が低下することが確認された。すなわち、これら分子においてはリン酸化の時間プロファイル変化ではなく、最大のリン酸化レベルが減衰することでパーシャルアゴニズムが発現することが明らかとなった。

また、受容体の細胞内ドメインにおけるリン酸化サイトのリン酸化挙動定量検出も実施し、最大リン酸化量の変化をもたらす機構について解析を実施した。

### ・パーシャルアゴニストによる細胞挙動の精密制御

異なる  $E_{max}$  値を示す増殖因子ミメティクスを用いて Met 発現 HUVEC 細胞を刺激し、細胞増殖および血管新生に対する影響を評価した。これまでの報告から、Met アゴニストによってこれらの細胞挙動が誘起されることは知られていたが、本課題ではパーシャルアゴニストによる細胞挙動の精密制御が可能か検証した。その結果、これらアゴニストが示す受容体の最大リン酸化量に応じて、細胞挙動の制御が可能であることが示された。

さらに詳細な解析を行うため、Met 発現 DU145 細胞の遊走挙動の定量評価を実施した。その結果、本解析においても同様の傾向が見られ、定量画像解析によって、一定時間内における細胞の平均遊走距離が精密にコントロールされていることが明らかとなった。

これらの研究成果は、下記の通りプレプリント公開済みであり、2021年4月時点で論文投稿中である。

Ueki, Ryosuke; Akiyama, Momoko; Sando, Shinsuke (2019): DNA-Based Synthetic Growth Factor Surrogates with Fine-Tuned Agonism. ChemRxiv. Preprint.  
<https://doi.org/10.26434/chemrxiv.9703013.v1>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ueki Ryosuke, Hayashi Shota, Tsunoda Masaya, Akiyama Momoko, Liu Hanrui, Ueno Tasuku, Urano Yasuteru, Sando Shinsuke	4. 巻 in press
2. 論文標題 Nongenetic control of receptor signaling dynamics with a DNA-based optochemical tool	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d1cc01968f	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eguchi Akihiro, Ueki Ayaka, Hoshiyama Junya, Kuwata Keiko, Chikaoka Yoko, Kawamura Takeshi, Nagatoishi Satoru, Tsumoto Kouhei, Ueki Ryosuke, Sando Shinsuke	4. 巻 in press
2. 論文標題 A DNA Aptamer That Inhibits the Aberrant Signaling of Fibroblast Growth Factor Receptor in Cancer Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACS Au	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacsau.0c00121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ueki Ryosuke, Akiyama Momoko, Sando Shinsuke	4. 巻 n/a
2. 論文標題 DNA-Based Synthetic Growth Factor Surrogates with Fine-Tuned Agonism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemRxiv	6. 最初と最後の頁 n/a
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26434/chemrxiv.9703013.v1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryosuke Ueki
2. 発表標題 Oligonucleotide-based mimetics of growth factors
3. 学会等名 Trends in Nucleic Acid（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植木亮介
2. 発表標題 細胞シグナルの人為的制御を目指したDNAナノテクノロジー
3. 学会等名 CBI学会2019年大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植木亮介
2. 発表標題 増殖因子ミメティクス核酸 分子設計と応用展開
3. 学会等名 核酸化学懇話会2020（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 植木亮介
2. 発表標題 受容体シグナル操作に向けたDNAケミカルツールの開発
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 植木亮介
2. 発表標題 機能性核酸に基づく増殖因子受容体アゴニストの開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本核酸化学会、杉本 直己	4. 発行年 2020年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 576
3. 書名 核酸科学ハンドブック（担当セクション：膜受容体結合核酸）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------