

令和元年6月3日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04658

研究課題名(和文) 生体ペプチドを基盤とする中分子ペプチドの分子機能と実践的創薬基盤研究

研究課題名(英文) Studies on molecular functions of mid-size peptides derived from living system and their basic research for practical drug discovery

研究代表者

林 良雄 (Yoshio, Hayashi)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10322562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、2つの生体分子に由来するペプチドを基盤に創薬志向型研究を展開した。

- (1) ニューロメジンU (NMU) を基盤とした抗肥満薬の創製研究においては、NMUの血中における鍵代謝酵素としてトロンピンを同定することができ、当該代謝を受けにくい安定化誘導体として1型NMU受容体選択的アゴニストCPN-267の創製に成功した。
- (2) 筋萎縮性疾患克服のための高活性マイオスタチン阻害ペプチド創製研究では、マウスマイオスタチンプロドメイン由来の23残基ペプチド1を基にした網羅的構造活性相関研究により、筋注により筋機能改善効果を示す独自高活性誘導体MIPE-1686 (16残基) の創製に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

- (1) 創製した1型NMU受容体選択的アゴニストCPN-267は、2型NMU受容体選択的アゴニストCPN-116と共に、今後の抗肥満創薬研究や受容体機能解析研究において、有望なシーズあるいはツールとなることが期待される。CPN-267の代謝安定化においては、基質切断部位から離れた部位の構造変換による安定化が可能なことを示すことができ、ペプチド創薬における有益な知見の一つとして提案できるものである。
- (2) マイオスタチン阻害戦略において、有望なペプチドシーズMIPE-1686を創出することができた。またSARにより得られた知見は今後の医薬品開発における有用な情報として活用できるものである。

研究成果の概要(英文)：This medicinal chemistry research focuses on two biomolecules called “neuromedin U (NMU)” and “myostatin” that are deeply involved in obesity and muscle weakness caused by modern lifestyle and aging.

- (1) NMU activates two NMU receptors (NMUR1 and NMUR2), and is a useful anti-obesity drug lead. Here, we discovered a novel NMUR1 selective hexapeptide agonist CPN-267 that suppressed body weight gain in wild-type mice. CPN-267 showed improved NMUR1 selectivity, serum stability, and pharmacokinetics compared with conventional agonist CPN-170.
- (2) Inhibition of myostatin is a promising strategy for treatment of muscle atrophic disorders. We had already identified a 23-mer peptide (1) as a synthetic myostatin inhibitor. Structure-activity relationship studies based on 1 consequently afforded 16-mer inhibitory peptide MIPE-1686, which significantly increased not only muscle mass but also hindlimb grip strength in Duchenne muscular dystrophic model mice.

研究分野：医薬品化学

キーワード：ペプチド ニューロメジンU マイオスタチン 構造活性相関研究

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分子標的に高い親和性と選択性を有する「生体ペプチド」は、生命現象の解明をめざす基盤研究や医薬品創製研究において極めて意義深く魅力的な戦略的機能分子である。既に、その成功例として、インスリン、カルシトニン、ナトリウム利尿ペプチド、ゴナドトロピン放出ホルモン、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) などの生体ペプチド研究は医薬品の創製につながり、社会貢献を果たしている。GLP-1 の基礎研究では鍵代謝酵素 DPP-IV が見いだされ、GLP-1 のみならず、その代謝を阻害する DPP-IV 阻害剤が糖尿病治療薬として創製されている。このようにペプチドを礎とする創薬志向型研究の充実は、医薬品開発を支える大きな柱となっている。本研究では、以下の2つの生体分子に由来するペプチドを基本に研究を展開した。

(1) 「ニューロメジン U (NMU)」は、1984年に南野らにより、ブタ脊髄より単離された摂食抑制ペプチドであり、抗肥満薬の創薬シーズとして世界的に注目されている。しかし、NMU に関わる2つの受容体(1型、2型)各々に対する選択的アゴニストの創製は皆無であった。

1型は末梢性、2型は中枢性受容体であるが、摂食抑制等の各生理作用に対する詳細な役割分担は十分に解明されていない。そこで我々は、NMU の C 末端共通構造に着目した構造活性相関研究 (SAR) により、選択的アゴニストの獲得を試みてきた。高い2型受容体選択性を示すアゴニスト CPN-116 および非選択的高活性アゴニスト CPN-170 (いずれも6残基) の創製に成功しており、またこれらアゴニストの血清中での代謝切断部位を世界に先駆けて同定していた。ゆえに、生体内安定性が高い持続型アゴニストの創製が可能となりつつある状況であった。

(2) 「マイオスタチン」は TGF- β スーパーファミリーに属し、骨格筋量を負に制御する分子である。当該遺伝子の欠損動物やマイオスタチン中和抗体投与では筋量が有意に増加することがわかっており、抗マイオスタチン療法では筋肉増強の POC が確立されていた。ところが、比較的小さなペプチドによりマイオスタチンを効果的に阻害する報告は皆無であった。我々は、生来のマイオスタチン阻害機構に着目し、マウスマイオスタチン前駆体配列から、マイオスタチンの機能を阻害するペプチド **1** (23 残基、最小構造単位) を世界に先駆けて創製していた。また、本ペプチドの筋量増加効果はデュシェンヌ型筋ジストロフィーモデル *mdx* マウス前脛骨筋への筋肉内投与で確認されており (20%増)、創薬戦略分子として化学構造を最適化することで、広範な筋萎縮疾患への適用が期待できるものであった。

2. 研究の目的

(1) NMU 誘導体ペプチドを用いた抗肥満薬の創製研究においては、1型受容体選択的アゴニストペプチドの創製、NMU 分解酵素の同定、代謝安定化を指向した誘導体の創製を目的に検討を進めた。

(2) 筋萎縮性疾患克服のための高活性マイオスタチン阻害ペプチド創製研究では、上述のペプチド **1** を基にした網羅的 SAR による独自高活性誘導体の創出と、効果的なマイオスタチン阻害活性発現のための分子機能解明を目的に検討を進めた。

3. 研究の方法

いずれの検討においても、ペプチドは通常の Fmoc 固相合成法を用いて合成し、95%以上の純度で精製したものを活性評価に用いた。

(1) NMU 誘導体ペプチドを用いた抗肥満薬の創製研究：

1型受容体選択的アゴニストペプチドの創製においては、構造誘導未実施の部位に着目し、非天然アミノ酸を活用した SAR 研究を実施した。アゴニスト活性は、ヒト1型及び2型受容体を各々安定発現する CHO 細胞を用い、細胞内カルシウム濃度変動を指標に評価した。

NMU 分解酵素の同定においては、血清中で活性化している酵素に着目し、阻害剤の添加によるペプチドの安定化を指標に鍵酵素の同定を試みた。血清に添加したペプチドは、C18 固相カートリッジを用いて抽出し、逆相 HPLC にてペプチドの安定性および産生される代謝物を解析した。代謝物の同定は質量分析にて行った。

代謝安定化を指向した誘導体の創製は、同定した酵素による切断部位周辺の構造を誘導したペプチドを合成し、アゴニスト活性と代謝安定性の両面から検討を進めた。

ペプチドの薬物動態解析は Wistar ラットを用いた静脈内投与、体重増加抑制効果の検討は *ddy* マウスを用いた皮下投与にて実施した。

(2) 筋萎縮性疾患克服のための高活性マイオスタチン阻害ペプチド創製研究：

独自高活性誘導体の創出においては、23 残基ペプチド **1** の各アミノ酸残基を網羅的に置換する SAR 研究を進めた。ペプチドのマイオスタチン阻害活性は、HEK293 細胞を用いてマイオスタチン応答性ルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価した。

マイオスタチン阻害活性発現のための分子機能解明においては、SAR 研究と円二色性 (CD) スペクトル解析の両面から知見を得ることで検討を進めた。CD スペクトルは、2,2,2-トリフルオロエタノールを 10%含む 20 mM リン酸バッファー (pH 7.4) を用いてペプチド濃度 5 μ M にて測定した。病態モデル *mdx* マウスおよび野生型 ICR マウスへのペプチド投与では、生理食塩水にて 0.75 mM に調製したペプチド溶液を 40 μ L 筋肉内に day 0 および day 14 に注射した。day 42 における筋重量および握力を測定した後、組織切片を作製し、ヘマトキシリン-エオシン染色を経て筋断面積を算出することで、ペプチドによる筋肥大効果を検証した。

4. 研究成果

(1) NMU 誘導体ペプチドを用いた抗肥満薬の創製研究：

1 型受容体選択的アゴニストペプチドの創製においては、構造誘導が未実施であった N 末端から 2 残基目の Phe の 4 位に着目した。本部位に、高い置換基を導入することで、1 型選択性が向上することを突き止めた。低濃度 (0.1 nM) におけるアゴニスト活性と選択性の両面から、N 末端から 2 残基目の側鎖がインドールであること (Trp) が望ましい結果を得た。

NMU 分解酵素の同定においては、血清中のトロンビンに着目した。トロンビンは Pro-Arg 配列を認識し、その C 末端側のペプチド結合を切断することが知られていた。NMU および我々が創製した誘導体は Pro-Arg 配列を含み、本課題研究開始前に、既に CPN-170 を用いて Arg-Asn 間のペプチド結合が切断されることを明らかにしていた (図 1 A)。そこで、非可逆的トロンビン阻害剤 PPACK および可逆的トロンビン阻害剤アルガトロバンを血清中に添加したところ、CPN-170 の安定性が飛躍的に向上することがわかり、Arg-Asn 間のペプチド結合が切断された代謝物が検出されなくなった。また、25 残基からなる内因性ヒト NMU を用いた検討においても、PPACK の添加により C 末端の Arg-Asn 間のペプチド結合切断が見られなくなった。したがって、血中における NMU およびその誘導体の代謝に関わる鍵酵素がトロンビンであることが示唆された。

代謝安定化を指向した誘導体の創製においては、Pro あるいは Arg の構造誘導を精力的に実施したが、活性発現のためのコア構造であるアミド化 C 末端 3 残基 (Pro-Arg-Asn-amide) の構造誘導は困難であることがわかった。ところが、上述の 1 型受容体選択的アゴニスト創製のための SAR 研究の過程で、最適化された N 末端 2 残基目 Trp (トロンビンの P4 部位にあたる) を α メチル化することで、血清中で比較的安定に存在できることを見出した (CPN-267 の創製、図 1 A)。CPN-170 の血清中半減期が 5 分以内であるのに対し、CPN-267 はラット血清中で 3 時間以上となった (図 1 B)。これは、トロンビンの基質認識機構において S4 ポケットは aryl-binding site として知られており、P4 部位の側鎖 (この場合はインドール) の向きが α メチル化によって望ましくない配座に固定されたことが安定化の要因と考察できる。基質切断部位から離れた P4 部位の構造変換により代謝安定化可能なことを示した非常に有益な知見であると言え、今後のペプチド創薬における重要戦略の一つとなり得るものである。

CPN-267 の *in vivo* における有用性を検証することを目的に、まず薬物動態解析を実施した。その結果、CPN-267 の平均血中滞留時間 (MRT) が 33.6 分であり、CPN-170 の 11.5 分よりも約 3 倍改善した (図 1 C)。CPN-267 の血清中での安定化がこの一因であることが考えられる。最後に、野生型マウスへの皮下投与による体重増加抑制効果を検証した。CPN-267 を 0, 24, 48 時間の 3 回皮下投与し、有意な体重増加抑制効果が確認された (図 1 D)。

以上の結果より、創製した 1 型 NMU 受容体選択的アゴニスト CPN-267 は、既に創製されている 2 型 NMU 受容体選択的アゴニスト CPN-116 と共に、今後の抗肥満創薬研究や受容体機能解析研究において、有望なシーズあるいはツールとなることが期待される。

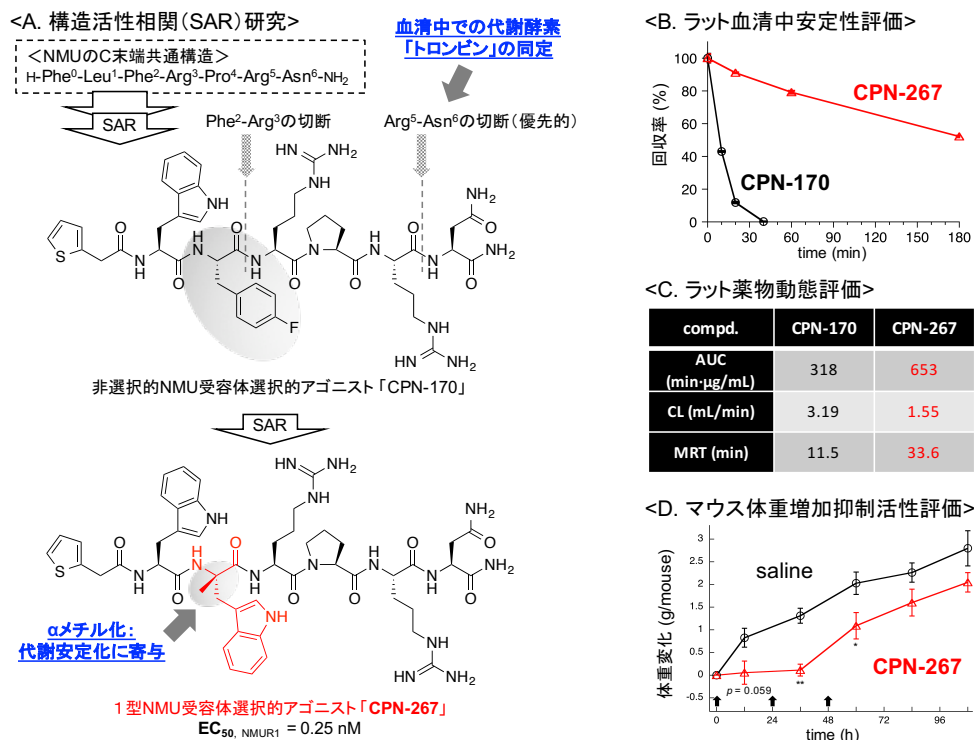


図 1. NMU の C 末端コア構造を基盤とした誘導体創製研究の成果概要

(2) 筋萎縮性疾患克服のための高活性マイオスタチン阻害ペプチド創製研究：

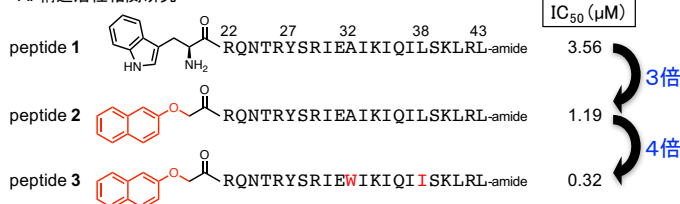
まず、図2Aに示すペプチド**1**（プロドメイン21-43位）の分子機能を解明するために、各アミノ酸を1残基ずつAlaに置換した誘導体を合成し、マイオスタチン阻害活性を評価した（Alaスキャン）。その結果、N末端Trp、27位Tyr、30位よりC末端側全てのIleおよびLeu残基が阻害活性発現に重要であることが明らかとなった。そこで、これらのアミノ酸残基に着目したSAR研究を精力的に展開した。

この中で興味深い残基として27位Tyrが挙げられる。ペプチド**1**の配列は種を越えて高度に保存されているが、27位がTyrなのはマウス、ラット、ウサギなどのげっ歯類のみである。ヒトを含めてほとんどの種がSer残基である。既に、ヒト由来の相当する23残基ペプチドで阻害能を評価すると明らかに弱いことがわかっており、げっ歯類に特徴的にみられるTyr残基の重要性について検証した。その結果、PheやTrpに置換した誘導体ではペプチド**1**と同等の阻害活性を示したのに対し、HisやGln、Arg、Gluを導入した誘導体では阻害能の顕著な減弱が認められた。ゆえに、疎水性の芳香族アミノ酸が本部位に存在することが、ペプチド**1**の効果的なマイオスタチン阻害に必要であることが示唆された（図2B）。一方で、CDスペクトル測定による二次構造解析では、ペプチド**1**が α ヘリックス構造を形成する性質を有することがわかってきた。この α ヘリックス形成能の重要性に関して検討するため、helix breakerとして用いられるProを、活性発現に重要ではない残基（24位Asn、28位Ser、32位Ala、36位Gln、40位Lys）に導入した誘導体を各々合成した。これらのうち、32位と36位にProを各々導入した誘導体において、マイオスタチン阻害活性と α ヘリックス形成能の減弱が特に顕著に観察されたことから、32-36位周辺をコア領域として α ヘリックス構造を形成し得ることが示唆された。この際、2つの疎水面（①、②）が形成されることがコイルモデルより推定され（図2B）、ペプチド**1**の効果的なマイオスタチン阻害に重要な構造的要因を明らかにすることができた。

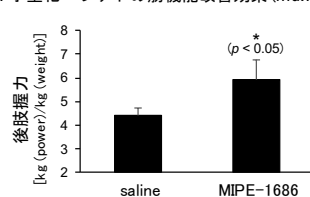
一方で、活性強化を指向したSARにおいて、N末端Trpを2-ナフチルオキシアセチル基にすることで約3倍の阻害活性向上が認められた（ペプチド**2**）。次に、32位AlaをTrpに、38位LeuをIleに置換した誘導体ペプチド**3**が更に約4倍強力な阻害活性を示した（図2A）。このペプチド**3**は、病態モデルmdxマウスおよび野生型ICRマウスの前脛骨筋あるいは腓腹筋への筋肉内投与により、筋重量を10-35%増加させ、顕著な筋肥大効果を示した（図2C）。また最近、ペプチド**3**を基にした2つのSAR研究で成果を挙げた。一つは、環状化の検討である。24位にSerを導入し、28位のSerとの側鎖間でグルタル酸を用いてジエステル架橋を施した環状ペプチド誘導体がペプチド**3**と同等の阻害活性を示すことを報告した。もう一つは、小型化の検討である。最終的に、6残基短い16残基の小型化ペプチドMIPE-1686が*in vitro*でペプチド**3**よりも2倍強力なマイオスタチン阻害能を示すことを見出した。小型化ペプチドMIPE-1686は、筋肉内投与によりmdxマウスの後肢握力を約130%に増大させた（図2D）。即ち、筋機能改善効果を得ることに成功した。高活性化ペプチド**3**やMIPE-1686の二次構造解析を実施したところ、いずれも β シート形成能が高いことが明らかとなった。本結果は、 α ヘリックスを形成する性質を示すペプチド**1**とは異なるマイオスタチン結合様式であることを示唆しており、構造解析研究による詳細な結合状態の解明が、今後の阻害剤開発において重要な課題と言える。

以上の結果より、我々は、筋萎縮性疾患克服のためのマイオスタチン阻害戦略において、有望なペプチドシーズを創出することができた。またSARにより得られた知見は今後の医薬品開発における有用な情報として活用できるものである。

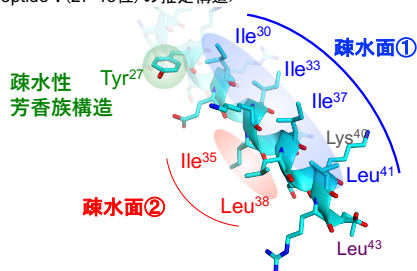
<A. 構造活性相関研究>



<D. 小型化ペプチドの筋機能改善効果 (mdxマウス)>



<B. peptide 1 (27-43位) の推定構造>



<C. peptide 3 の筋肥大効果 (mdxマウス)>

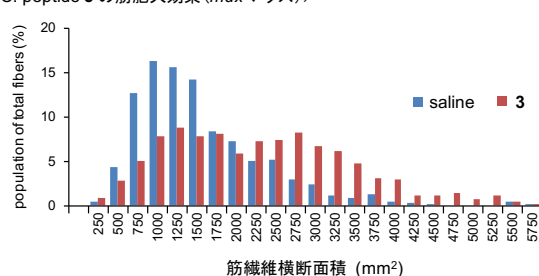


図2. 高活性マイオスタチン阻害ペプチド創製研究の成果概要

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計9件）

- ① Kentaro Takayama, Tomo Asari, Mariko Saitoh, Kei Nirasawa, Eri Sasaki, Yoshimi Roppongi, Akari Nakamura, Yusuke Saga, Takahiro Shimada, Hiroaki Ikeyama, Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Yoichi Negishi, and Yoshio Hayashi, Chain-shortened myostatin inhibitory peptides improve grip strength in mice, *ACS Med. Chem. Lett. in press*. (査読有) DOI: 10.1021/acsmchemlett.9b00174
- ② Cédric Rentier, Kentaro Takayama, Mariko Saitoh, Akari Nakamura, Hiroaki Ikeyama, Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, Design and synthesis of potent myostatin inhibitory cyclic peptides, *Bioorg. Med. Chem.* (2019) 27, 1437-1443. (査読有) DOI: 10.1016/j.bmc.2019.02.019
- ③ Kentaro Takayama, Cédric Rentier, Tomo Asari, Akari Nakamura, Yusuke Saga, Takahiro Shimada, Kei Nirasawa, Eri Sasaki, Kyohei Muguruma, Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Yoichi Negishi, Yoshio Hayashi, Development of potent myostatin inhibitory peptides through hydrophobic residue-directed structural modification, *ACS Med. Chem. Lett.* (2017) 8, 751-756. (査読有) DOI: 10.1021/acsmchemlett.7b00168
- ④ Kentaro Takayama, Kenji Mori, Akiko Tanaka, Erina Nomura, Yuko Sohma, Miwa Mori, Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto, Naoto Minamino, Mikiya Miyazato, Kenji Kangawa, Yoshio Hayashi, Discovery of a human neuromedin U receptor 1-selective hexapeptide agonist with enhanced serum stability, *J. Med. Chem.* (2017) 60, 5228-5234. (査読有) DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00694
- ⑤ Tomo Asari, Kentaro Takayama, Akari Nakamura, Takahiro Shimada, Akihiro Taguchi, Yoshio Hayashi, Structural basis for the effective myostatin inhibition of the mouse myostatin prodomain-derived minimum peptide, *ACS Med. Chem. Lett.* (2017) 8, 113-117. (査読有) DOI: 10.1021/acsmchemlett.6b00420
- ⑥ Kentaro Takayama, Akihiro Taguchi, Fumika Yakushiji, Yoshio Hayashi, Identification of a degrading enzyme in human serum that hydrolyzes a C-terminal core sequence of neuromedin U, *Biopolymers* (2016) 106, 440-445. (査読有) DOI: 10.1002/bip.22770
- ⑦ Kentaro Takayama, Akari Nakamura, Cédric Rentier, Yusaku Mino, Tomo Asari, Yusuke Saga, Akihiro Taguchi, Fumika Yakushiji, Yoshio Hayashi, Effect of *N*-terminal acylation on the activity of myostatin inhibitory peptides, *ChemMedChem* (2016) 11, 845-849. (査読有) DOI: 10.1002/cmdc.201500533

〔学会発表〕（計46件）

- ① K. Takayama, T. Asari, M. Saitoh, Y. Roppongi, A. Nakamura, A. Taguchi, A. Taniguchi, Y. Hayashi, Structural requirements for the effective myostatin inhibition of myostatin prodomain-derived peptide derivatives, 256th American Chemical Society National Meeting & Exposition, 2018.
- ② K. Takayama, K. Mori, E. Nomura, Y. Sohma, A. Tanaka, A. Taguchi, A. Taniguchi, T. Sakane, A. Yamamoto, N. Minamino, M. Miyazato, K. Kangawa, Y. Hayashi, Structure Activity Relationship Study for Obtaining Human Neuromedin U Receptor Selective Hexapeptide Agonists, XXII International Conference on Organic Synthesis – 22-ICOS, 2018.
- ③ K. Takayama, T. Asari, C. Rentier, A. Nakamura, Y. Saga, T. Shimada, A. Taguchi, Y. Negishi and Y. Hayashi, Development of myostatin inhibiting peptides as an attractive therapeutic approach towards muscle atrophic disorders, The 34th European Peptide Symposium and the 8th International Peptide Symposium, 2016.
- ④ K. Takayama, K. Taketa, Y. Sohma, A. Taguchi, F. Yakushiji, Y. Hayashi, Discovery of hexapeptide agonists to human neuromedin U receptors 1 and 2, 10th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS15), 2015.

〔産業財産権〕

○出願状況（計6件）

名称：ペプチドもしくはその薬学的に許容される塩、またはそれらのプロドラッグ

発明者：林良雄、高山健太郎、根岸洋一

権利者：学校法人東京薬科大学

種類：特許

番号：特願 2016-158123

出願年：2016

国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

名称：マイオスタチン阻害ペプチド

発明者：林良雄、伊東史子、薬師寺文華、高山健太郎、ほか5名

権利者：学校法人東京薬科大学、学校法人川崎学園
種類：特許
番号：特許第 6143270 号
取得年：2017 年
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：高山健太郎
ローマ字氏名：(TAKAYAMA, Kentaro)
所属研究機関名：東京薬科大学
部局名：薬学部
職名：講師
研究者番号(8桁)：70611482

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：寒川賢治
ローマ字氏名：(KANGAWA, Kenji)

研究協力者氏名：宮里幹也
ローマ字氏名：(MIYAZATO, Mikiya)

研究協力者氏名：森健二
ローマ字氏名：(MORI, Kenji)

研究協力者氏名：南野直人
ローマ字氏名：(MINAMINO, Naoto)

研究協力者氏名：山本昌
ローマ字氏名：(YAMAMOTO, Akira)

研究協力者氏名：坂根稔康
ローマ字氏名：(SAKANE, Toshiyasu)

研究協力者氏名：田中晶子
ローマ字氏名：(TANAKA, Akiko)

研究協力者氏名：根岸洋一
ローマ字氏名：(NEGISHI, Yoichi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。