

平成22年4月30日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2008

課題番号：19209026

研究課題名（和文） イン・シリコ・ペプチド医薬の開発

研究課題名（英文） Exploring drug target peptides utilizing *in silico* analysis

研究代表者

平田 結喜緒（HIRATA YUKIO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50135787

研究成果の概要：

ヒトゲノム・cDNA資源データベースをバイオインフォマティクス解析して得られた情報をもとに数多くのペプチドを合成し、ペプチド創薬の観点から有用と推測されるものに焦点を絞って重点的に機能解析することによって生理活性因子候補因子からなるペプチドライブラリーを得た。ユニークな機能を有するいくつかの内因性ペプチド性リガンドを見出しつつあり、それらのヒト体液中での正確な分子存在様式を確認することと併行して、哺乳動物主要臓器における受容体の分布や生体内作用などを検討し、さらに物理化学的特性も含めて広範な解析を行った。我々の開発したこの新規ペプチド探索法は、従来の手法では発見できなかった内因性ペプチドホルモンを発見するには特に有効な手段であることが考えられた。

交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費       | 合計         |
|--------|------------|------------|------------|
| 2007年度 | 20,300,000 | 6,090,000  | 26,390,000 |
| 2008年度 | 18,500,000 | 5,550,000  | 24,050,000 |
| 年度     |            |            |            |
| 年度     |            |            |            |
| 年度     |            |            |            |
| 総計     | 38,800,000 | 11,640,000 | 50,440,000 |

研究分野：内分泌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般

キーワード：(1) バイオインフォマティクス (2) ペプチドライブラリー (3) *in silico*  
 (4) 生理活性ペプチド (5) ペプチド創薬 (6) ペプチド性ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

新規生理活性物質を発見する古典的な方法は、活性を指標に大量の組織抽出物や細胞株培養上清抽出物から濃縮と分画を繰り返して精製し、遺伝子クローニングに至る長い経過を要した。その後、ヒトゲノムの解明とともにG蛋白共役型受容体を強制発現させた細胞系を用いてリガンドを捜す、逆内分泌学

が一定の成果を挙げてきたが、最近はこの手法によって同定される新規因子はわずかにとどまっている。研究代表者ならびに分担者らは本研究計画の基盤となった*in silico*ペプチド探索研究によって世界に先駆けて成果を挙げてきた実績がある。すなわち既存のヒトcDNAデータベースを用いて*in silico*解析し、生理活性因子をコードする可能性が

高い cDNA 配列を全長濃縮 cDNA ライブラリーから選択して機能解析する手法であるが、本法を考案・改良する過程で生理活性ペプチドであるサリューシン- $\alpha$  及びサリューシン- $\beta$  の存在を予測した (Nature Medicine 2003;9:1166-72)。このような探索研究の過程で多くの新規ペプチド配列を蓄積してきたが、この中には広範な生理作用を示すものが多数含まれていたにもかかわらず、系統的に解析して新規生理活性ペプチドの具体的な探索研究を始めるには至らなかった。

## 2. 研究の目的

上述のように、これまでヒトゲノム・cDNA 資源データベース情報のバイオインフォマティクス解析によって、分泌性蛋白がプロセッシングを受けて生合成されると推測される配列のペプチドを簡易合成して、合成ペプチド配列を多数獲得していたが、本研究では *in silico* データベース解析をさらに継続してペプチドライブラリーを充実させながら、これらを腫瘍増殖・抑制、代謝制御、循環動態制御、ホルモン分泌・抑制作用などの生理作用の有無について順次、機能解析することによって、種をこえて様々な機能を有し、ペプチド創薬の観点から最も有用と思われるものを新規生理活性因子として選択し、その病態生理学的役割の基盤研究を行うことを目的とした。さらに受容体アゴニストやアンタゴニストの開発が創薬に必要なと考えられる場合には受容体の解析・同定を目指した研究を行うこととした。

## 3. 研究の方法

新規ペプチド配列の物理化学的特性の解明：サリューシン- $\beta$  をはじめとする各種ペプチドについて、安定性、吸着性などの物理化学的特性を明らかにし、各因子の取り扱いに取り扱い手法を確立する。それぞれの因子のアッセイ系の構築に必要な実験条件の詳細な検討を行う。

動脈硬化制御活性の検討：ヒト単球由来培養マクロファージ細胞を用いて各種ペプチドが、Acyl Coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT)-1 活性や泡沫化に影響するかどうか検討する。これらを制御する因子については、スカベンジャー受容体クラス A 活性や ATP 結合カセット輸送体 A1 蛋白への影響を検討すると同時に、これらのシグナルが c-Src チロシンキナーゼ C、プロテインキナーゼ C、MAP キナーゼなどを介した作用かどうかを検討する。

血管収縮/弛緩活性、循環調節作用の検討：血管系細胞を用いた解析にて何らかの細胞応答が確認された高純度ペプチドを用いて、血管収縮/弛緩活性を検討した。平滑筋

細胞において  $Ca^{2+}$  transient および PI-3K 活性化作用を示すものは血管収縮性因子の可能性を、その他のものは血管弛緩性因子の可能性も念頭に置いて検討を行った。さらに、細胞増殖促進作用、細胞内  $Ca^{2+}$  上昇作用、cAMP 産生能、cGMP 産生能、ERK/MAP kinase 活性化作用、p38 kinase 活性化作用などを示すものについて、麻酔下ラットに留置したカテーテルによって大動脈圧、心拍数、大動脈流量などをモニターして全身血行動態を制御するペプチドを捜す。

代謝調節作用の検討：培養ヒトマクロファージを用いてマクロファージ泡沫化活性を評価し、さらに脂肪分化させたマウス 3T3-L1 細胞に対する各種アディポサイトカインの産生制御、骨格筋におけるインスリンシグナルなどを制御する因子を探索した。有意な作用を示すペプチドが見いだされた場合、高脂肪食誘導性マウスへの慢性投与実験を行って詳細な検討を行った。

神経ペプチドの機能解析：中枢神経系で広範な発現が見られるペプチドが異なる臓器由来の細胞系で種々のシグナルを示せば、ペプチドを脳室内投与して行動様式の変化を観察する。ラット摘出下垂体の灌流モデルを作成して視床下部・下垂体ホルモンの分泌刺激となるものがあるか検討した。

腫瘍移植動物の作成と腫瘍増殖抑制作用：血管新生抑制因子であるエンドスタチンと同程度またはより強力な血管新生抑制性シグナル、ならびに内皮遊走・増殖抑制作用を示すペプチドが選択出来た時点で腫瘍増殖抑制作用を明らかにするためにヌードマウス背側皮下に各種ヒト腫瘍細胞由来株を移入して固形腫瘍モデルを作成したうえ、上記の予備探索にて得られたペプチドを腹腔内に反復投与し、腫瘍退縮効果を示すかどうかを検討した。

経脾移植癌転移モデルにおける転移抑制実験：ヒト肺癌細胞株 (A549) を脾臓の下端に注入して、癌細胞を脾臓に移植し、脾臓經由で肝臓に転移させた。癌細胞移植後 3 週間にわたって腹腔内に反復投与したのち、安楽死させて肝臓を中心に病理組織学的に検討し、肝臓転移を定量的に評価した。対照としては同様の操作を行った後、5-fluorouracil (30 mg/kg)/0.5 w/v %カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液 (0.5%CMC-Na) を癌細胞移植後反復投与する群、さらに 0.5%CMC-Na のみの投与群において比較検討した。さらに A549 細胞が産生する腫瘍マーカーである CA15-3 を指標としたモニタリングを行うために、癌細胞移植後 3 週間目に後大静脈腹部より採血した血漿中 CA15-3 を測定した。こうして最終的に、各腫瘍細胞移植部位の固形腫瘍容積増大抑制作用、ならびに転移抑制作用の顕著なものを抗腫瘍/血管新生抑制性ペ

プチドとして選択した。

#### 4. 研究成果

本研究手法で最初にその存在を予測した降圧性ペプチドであるサリュージン- $\alpha$ とサリュージン- $\beta$ については、今回の研究によってヒトにおける存在様式がイン・シリコにて予測された通りの配列であることが明らかになった。サリュージン- $\beta$ の取り扱いについては国際的にもその困難さが問題にされてきたが、現時点での生理学・生化学実験に欠かせないポリプロピレンやポリスチレンの実験器具にきわめて吸着性が高いことが明らかになり、こうした物理化学的特性によってその特性の解明ができなかったばかりでなく、アッセイ系そのものも構築ができず、病態生理学的役割の解明が困難であった事実を始めて明らかにすることができた。その結果、サリュージン- $\beta$ の特性を回避して実験系における取り扱いを容易にする方法を見出すことができ、さらにバイオアッセイ系も確立できるに至って、ヒト体液中に高濃度のサリュージン- $\beta$ が存在することが明らかとなった。さらに、サリュージン- $\alpha$ 、およびサリュージン- $\beta$ が Acyl CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT)-1 活性を強力に制御することを介して、強力な動脈硬化制御機構を示すことも明らかとなり、ペプチド創薬の重要な標的分子となり得る可能性が示された。このようなデータからイン・シリコのペプチド探索手法が内因性ペプチド性因子を同定するうえで有用であることが確認された。今回、明らかになったサリュージン- $\beta$ の性状は本研究課題を進める上で思わぬ障害となり、当初の予測より研究実施期間を延長せざるを得ない原因にもなったが、逆にサリュージン- $\beta$ のように、単離・同定をきわめて困難にする特性を有する未同定のペプチドホルモンが多数存在する可能性が明らかとなった。すなわち、従来、長年にわたって生理活性を指標に精製を行ってきた古典的な同定法や、最近十数年にわたって重要な生理活性ホルモンを多数同定した「reverse pharmacology」の手法では、このような性状を有する因子を単離・同定しようとしても、ペプチド配列を決定するための前段階でその精製過程において喪失してしまう可能性があることが示された。実際に、現在探索中の生理活性ペプチド候補因子の中にも、同様の特性を有するものが存在することが明らかになった。すなわち、現時点でオープン受容体のリガンドの同定に困難をきたしている因子の中には、イン・シリコ法を用いなければ解明の糸口が見出せない因子が含まれていると考えるに至っている。このような検討と併行して、個々の生理活性ペプチド候補因子の解析を進めてきた。す

なわち、動脈硬化制御、循環動態制御、ホルモン分泌・抑制作用、血管新生制御作用などについて簡易的かつ効率的に機能解析することから開始し、機能を有するであろうものについては特定の臓器だけを標的とすることなく詳細な生体内作用の機能解析を行って様々な生理活性について検討を行った。これまでにない中枢性作用を示すもの、血管新生制御作用を示すものなど、いくつもの有用な生理活性を有する因子を見出しつつあり、それらのヒト体液中での分子存在様式を確認することと併行して、哺乳動物主要臓器における受容体の分布や生体内作用に加えて、物理化学的特性も含めて広範な検討を行ってきた。血管新生制御・腫瘍増殖抑制作用を示すペプチド性因子も見出されたが、創薬シーズとして期待するにはその作用は弱かった。このようにヒトにおいて病態生理学的意義が大きいと推測されるものに焦点を絞って、その病態生理学的役割の基盤研究を重点的に検討してきた。本研究では新規因子の構造・機能・発現・特性についての新知見を多数得ることができたが、我々の開発した in silico ペプチド探索法は、従来の reverse pharmacology の手法では発見できなかったペプチド性リガンドを発見するには特に有効な手段であることが考えられ、今後の発展性が期待される結果となった。

#### 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 21 件)

1. Hirono Y, Yoshimoto T, Suzuki N, Sugiyama T, Sakurada M, Takai S, Kobayashi N, Shichiri M, Hirata Y: Angiotensin II receptor type 1-mediated vascular oxidative stress and proinflammatory gene expression in aldosterone-induced hypertension: the possible role of local renin-angiotensin system. *Endocrinology* 2007;148:1688-96.
2. Suzuki N, Shichiri M, Akashi T, Sato K, Sakurada M, Hirono Y, Yoshimoto T, Koyama T, Hirata Y: Systemic distribution of salusin expression in the rats. *Hypertens Res* 2007;30:1255-62.
3. Shichiri M: Reply to 'Salusins; newly identified bioactive peptides with hemodynamic and mitogenic activities' *Nature Med* 2007;13:661-2
4. Tateno T, Izumiyama H, Doi M, Akashi T, Ohno K, Hirata Y: Defective expression of prohormone convertase 1/3 in silent corticotroph adenoma. *Endocrine J* 2007;54:777-82.
5. Tateno T, Izumiyama H, Doi M, Yoshimoto T, Shichiri M, Inosita M, Oyama K, Yamada S,

- Hirata Y: Differential gene expression in adrenocorticotropin (ACTH) -secreting and non-functioning pituitary tumors. *Eur J Endocrinol* 2007;157:717-24.
6. Tsuchiya K, Sakai H, Suzuki N, Iwashima F, Yoshimoto T, Shichiri M, Hirata Y: Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high-fat-induced obese mice. *Endocrinology* 2007;148:4548-56.
  7. Yoshimoto T, Hirata Y: Aldosterone as a cardiovascular risk hormone *Endocrine J* 2007;54:359-70.
  8. Morokuma Y, Nakamura N, Kato A, Notoya M, Yamamoto Y, Sakai Y, Fukuda H, Yamashina S, Hirata Y, Hirose S : MARCH-X1, a novel transmembrane ubiquitin ligase implicated in ubiquitin-dependent protein sorting in developing spermatids. *J Biol Chem* 2007;282: 24806-15.
  9. Sakurada M, Shichiri M, Imamura M, Azuma H, and Hirata Y: Nitric oxide upregulates dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 via cyclic GMP induction in endothelial cells. *Hypertension* 2008;52:903-9.
  10. Iwashima F, Yoshimoto T, Minami I, Sakurada M, Hirano Y, Hirata Y: Aldosterone induces superoxide generation via Rac1 activation in endothelial cells. *Endocrinology* 2008;149:1009-14.
  11. Miyake A, Murata Y, Okazawa H, Ikeda H, Niwayama Y, Ohnishi H, Hirata Y, Matozaki T: Negative regulation by SHPS-1 of Toll-like receptor-dependent proinflammatory cytokine production in macrophages. *Genes to Cells* 2008;13:209-19.
  12. Terada Y, Kuwana H, Kobayashi T, Okado T, Suzuki N, Yoshimoto T, Hirata Y, Sasaki S: Aldosterone-stimulated SGK1 activity mediates profibrotic signaling in the mesangium. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:298-309.
  13. Saito T, Dayanithi G, Saito J, Onaka T, Urabe T, Watanabe TX, Hashimoto H, Yokoyama T, Fujihara H, Yokota A, Nishizawa S, Hirata Y, Ueta Y: Chronic osmotic stimuli increase salusin- $\beta$ -like immunoreactivity in the rat hypothalamo- neurohypophyseal system: possible involvement of salusin- $\beta$  on  $[Ca^{2+}]_i$  increase and neurohypophyseal hormone release from the axon terminals. *J Neuroendocrinol.* 2008;20:207-19.
  14. Sato K, Koyama T, Shichiri M: Biosynthesis and secretion of salusin- $\alpha$  from human cells. *Peptides* 2008;29:2203-7.
  15. Watanabe T, Suguro T, Sato K, Koyama T, Nagashima M, Kodate S, Hirano T, Adachi M, Shichiri M, Miyazaki A: Serum salusin- $\alpha$  levels are decreased and correlated negatively with carotid atherosclerosis in essential hypertensive patients. *Hypertens Res* 2008;31:463-8.
  16. Watanabe T, Nishio K, Kanome T, Matsuyama TA, Koba S, Sakai T, Sato K, Hongo S, Nose K, Ota H, Kobayashi Y, Katagiri T, Shichiri M, Miyazaki A. Impact of salusin- $\alpha$  and - $\beta$  on human macrophage foam cell formation and coronary atherosclerosis, *Circulation* 2008;117:638-48.
  17. Nakayama C, Shichiri M, Sato K, Hirata Y: Expression of prosalusin in human neuroblastoma cells. *Peptides* 2009;30:1362-7
  18. Shichiri M, Fukai N, Kono Y, Tanaka Y: Rifampicin as an oral angiogenesis inhibitor targeting hepatic cancers. *Cancer Res* 2009;69:4760-8
  19. Sato K, Sato T, Susumu T, Koyama T, Shichiri M: Presence of immunoreactive salusin- $\beta$  in human plasma and urine. *Reg Peptides* 2009;158:63-7
  20. Sato K, Fujimoto K, Koyama T, Shichiri M: Release of salusin- $\beta$  from human monocytes/macrophages. *Reg Peptides* 2010 ;162:68-72.
  21. Kimoto S, Sato K, Watanabe T, Suguro T, Koyama T, Shichiri M: Serum levels and urinary excretion of salusin- $\alpha$  in renal insufficiency. *Reg Peptides* 2010;162:129-32.
- [学会発表] (計 9 件)
1. 七里真義、平田結喜緒 : In silico 探索法による循環調節因子サリュースインの同定と新たな展開 第 11 回日本心血管内分泌代謝学会 シンポジウム 東京 (2007.11)
  2. Iwashima F, Yoshimoto T, Sakurada M, Minami I, Hirata Y: Possible involvement of small GTP-binding protein, Rac-1, in aldosterone-stimulated superoxide production in endothelial cells : The Endocrine Society Annual Meeting, Toronto, Canada (2007.6)
  3. Tateno T, Izumiyama H, Doi M, Yoshimoto T, Oyama K, Yamada S, Hirata Y: Differential gene expression in adrenocorticotropin (ACTH) -secreting and non-functioning pituitary tumors The Endocrine Society Annual Meeting. Toronto, Canada (2007.6)
  4. Tsuchiya K, Yoshimoto T, Nakayama C, Iwashima F, Sakai H, Hirata Y: Endothelial dysfunction in patients with Cushing's syndrome and acromegaly The Endocrine Society Annual Meeting. Toronto, Canada (2007.6)
  5. Wago T, Tsuchiya K, Kouyama R,

- Izumiyama H, Doi M, Yoshimoto T, Hirata Y: Effects of telmisartan on endothelial function and arterial stiffness in diabetic patients with hypertension. The 17th European Meeting on Hypertension. Milano, Italy (2007.6)
6. Sakurada M, Shichiri M, Imamura M, Azuma H, Hirata Y: NO upregulates dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 via cGMP induction in endothelial cells The 22th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. Berlin, Germany (2008.6)
  7. Tani Y, Tateno T, Izumiyama H, Doi M, Yoshimoto T, Hirata Y: Defective expression of prohormone convertase 4 in pleural solitary fibrous tumor causing non-islet cell tumor hypoglycemia (NICTH) The Endocrine Society Annual Meeting. San Francisco, USA (2008.6)
  8. Tsuchiya K, Nakayama C, Iwashima F, Sakai H, Yoshimoto T, Hirata Y: Metabolic syndrome is associated with endothelial dysfunction: Important roles of hyperinsulinemia and Hypertension. The Endocrine Society Annual Meeting San Francisco, USA (2008.6)
  9. Tateno T, Izumiyama H, Doi M, Yoshimoto T, Oyama K, Yamada Y, Hirata Y: Differential gene expression of somatostatin receptor (SSTR) subtype and dopamine type 2 receptor (D2R) in adrenocorticotropin (ACTH)-secreting and non-functioning pituitary tumors. The Endocrine Society's Annual Meeting. San Francisco, USA (2008.6)

[図書] (計1件)

1. 七里眞義「In silico ペプチド探索」遺伝子医学MOOK第8号「ペプチドと創薬」(寒川賢治、南野直人 編) メディカルドウ(東京): 63-67,2007

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

1. サリューシンをターゲットとする動脈硬化性疾患の治療剤及び検出薬 特願 2007-127131
2. サリューシン-βを含む医薬 特願 2007-279006
3. サリューシン-βのアンタゴニストを含む心筋虚血再灌流傷害抑制剤法 特願 2009-064588

6. 研究組織

(1)研究代表者

平田 結喜緒 (HIRATA YUKIO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 50135787

(2)研究分担者

七里 眞義 (SHICHIRI MASAYOSHI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 10206097