

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02868

研究課題名(和文)天然物様三次元骨格を持つペプチド擬態化合物の分子設計と作用機序

研究課題名(英文)molecular design and action mechanism of peptidomimetics using natural products-like cubic scaffolds

研究代表者

松岡 茂(Matsuoka, Shigeru)

大分大学・医学部・特任教授

研究者番号：60456184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：約200化合物からなる大分大学独自のペプチドミメティクスライブラリから、細胞を使った抗線維化*in vitro*スクリーニングにより、線維化阻害化合物を複数見出した。PTSAおよびITC実験により、この一部がPPLaseの特定のサブタイプに結合することが判明した。このPPLaseサブタイプのノックダウンでも同様の線維化阻害が確認された。さらに、ブレオマイシン誘導肺線維症マウスモデルでも、3つの化合物で症状の軽快化が見られた。これらの成果により、約200種類の化合物の中から肺線維症の予防/治療効果を持つ化合物を見つけることに成功した。医薬品候補化合物の有望な新しい化学空間を見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

切れ味の鋭い生理活性物質の発見は生命科学の飛躍的な進歩に貢献してきたが、天然資源が枯渇している近年は新規物質の発見が困難となっており、天然物化学の従来法に代わる新しい探索手法の開発が望まれている。本研究では、生理活性ペプチドやタンパク質の部分構造から新しい低分子を設計・合成することで得られる化合物のライブラリから、医薬品のシードとして有望な複数の化合物をスクリーニングにより見出すことができることを示した。枯渇する天然資源に変わって、新規の有望なケミカルスペースを提供する方法論として、ペプチドミメティクスの有用性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：From a unique peptide mimetic library of about 200 compounds owned by Oita University, several fibrosis-inhibiting compounds were identified through anti-fibrotic *in vitro* screening using cells. PTSA and ITC experiments revealed that some of these compounds bind to a specific subtype of PPLase. A similar fibrosis inhibition was confirmed by knockdown of this PPLase subtype. Furthermore, in a bleomycin-induced pulmonary fibrosis mouse model, alleviation of symptoms was observed with three compounds. These results have successfully found compounds with preventive/therapeutic effects on pulmonary fibrosis among about 200 types of compounds. We have succeeded in discovering a promising new chemical space for drug candidate compounds.

研究分野：創薬化学

キーワード：ペプチドミメティクス 活性発現の分子機構 生体機能物質 医薬品探索

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

切れ味の鋭い生理活性物質の発見は生命科学の飛躍的な進歩に貢献してきたが、天然資源が枯渇している近年は新規物質の発見が困難となっており、天然物化学の従来法に代わる新しい探索手法の開発が望まれている。

これに代わる新しい医薬品のシードとして、人工ペプチドが注目を集めていた。各種ディスプレイ法の登場により、従来の低分子創薬では困難とされてきた創薬ターゲットに対しても、人工ペプチドリガンドの取得が確実なものとなり、新薬の発見に繋がるのが期待されていた。しかし、ペプチドの細胞膜透過性や生体内安定性の低さなど、改善すべき問題点は多い。

一方で、 $\alpha$ -ヘリックスや $\beta$ -ターンなど、代表的なタンパク質二次構造を低分子で擬態するペプチドミメティクスが1990年代から研究されてきた。主にタンパク質間相互作用(PPI)阻害剤開発において、PPIの鍵となる比較的小さな構造を低分子に置き換える技術として発展してきた。

これら2つの技術を統合すると、優れたペプチドリガンドをペプチドミメティクスで低分子化する、理想的な高効率医薬品開発スキームができると期待される。しかし、このハイブリッド型医薬品開発を現実化するためには、現在ペプチドミメティクス技術が抱える幾つかの問題点を解決しなければならない。

大分大学で研究代表者らは天然物様骨格にアミノ酸側鎖を導入した独自の分子設計概念により、低分子ライブラリを構築してきた。一般的な化合物ライブラリに比べて小規模であるが、抗腫瘍活性や細胞分化抑制、抗ウイルス活性など、多様な生理活性試験でヒット化合物が得られている。この結果は、抗体やペプチドでは到達できない細胞内PPIに直接作用する、特異な作用機序によるものと予想される。本化合物群の限られたケミカルスペースに隠れて広がる特徴的なアクティビティスペースを探索し、生物学および医薬品開発に有用な新規生理活性物質を見いだせることが期待されていた。

### 2. 研究の目的

本研究では大分大学のペプチドミメティクス化合物の限られたケミカルスペースに隠れて広がる特徴的なアクティビティスペースを探索し、生命科学および医薬品開発に有用な新規生理活性物質を見いだすことを目的とする。とくに、大分大学医学部内での化学-生物学-医学の円滑な異分野連携により、医薬品のリードとしても利用価値が高い化合物を見出す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 令和元年度以前に設計・合成したペプチドミメティクス化合物の活性評価と標的同定

本研究開始前に保有していた、立体的な(3S,3aS,6R)-octahydro-5H-3,6-methanopyrrolo[3,2-b]pyridin-5-one骨格(アルカロイド骨格: W02020036211, W02020246503)を有する化合物群のスクリーニングにより $IC_{50} < 10 \mu M$ の狂犬病ウイルス増殖阻害化合物、腫瘍細胞増殖阻害化合物、線維化阻害化合物を得ることができた。

この中から、狂犬病ウイルス増殖阻害活性化合物1(感染細胞実験 $IC_{50}=1 \mu M$ : W02020246503)について、標的分子の同定を試みた。すなわち、活性化合物にフリーのアミノ基を導入し、これを足場にビオチンリンカーを導入し、アビジンビーズに固定化することで、狂犬病ウイルスタンパク質のプルダウンアッセイを行った。*In silico*での低分子ペプチドミメティクスとタンパク質X線結晶構造のフィッティング実験から、狂犬病Nタンパク質への結合が予想されたため、ビーズ上の狂犬病ウイルス増殖阻害化合物へのNタンパク質の結合を調査したが、ウエスタンブロッティングで確認できなかった。他のウイルスタンパク質、または宿主細胞のタンパク質を阻害する可能性が示唆されたと解釈できた。

しかし、2000化合物以上の構造展開を経ても、アルカロイド骨格では種々の薬理活性が細胞毒性の10倍を超えなかったため、医薬品のシード化合物としては不適格であると判断し、本化合物群を研究対象から除外した。

#### (2) 令和2年度以降に設計・合成したペプチドミメティクス化合物の評価

アルカロイド骨格に代わる医薬品として有望な骨格を探索するために、令和2年度以降に当グループで新たに設計・合成した低分子ペプチドミメティクス化合物ライブラリ(松岡ら, PCT/JP2022/025361; 土川ら, 特願2023-076174)のスクリーニングを行った。

TGF- $\beta$ 刺激によるMRC-5(胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞)のEMT(上皮細胞の間葉系細胞への分化, epithelial-mesenchymal transition)の阻害を指標として、本ペプチドミメティクスライブラリ(200化合物)から繊維化阻害化合物を20個以上見出した。これらの化合物はPPIase(ペプチジルプロリルイソメラーゼ, peptidyl prolyl isomerase)ファミリーの阻害を

標的として設計・合成されたフォーカストライブラリに含まれていた。

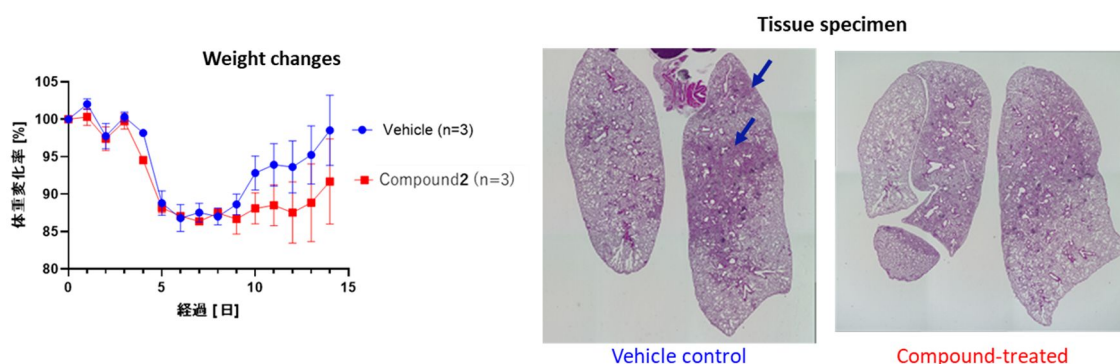
そこで TsiRNA による細胞レベルでのノックダウン実験を実施し、GF- 刺激による EMT 過程に関わる PPIase のサブタイプの特定を試みた。その結果、PPIase の 2 つのサブタイプが TGF- 刺激による EMT 課程に関与することが特定できた。

このうち一方の PPIase サブタイプについて、精製タンパク質を用いた PTSA (protein thermal shift assay) および ITC (isothermal titration calorimetry) による結合確認実験を実施して、ライブラリ化合物との相互作用を調査した。この結果、抗繊維化活性を示したライブラリ化合物の中で、化合物 2 を含む 3 化合物が  $K_d = 10 \mu\text{M}$  程度の結合を示した。一方、それ以外の化合物では結合が確認できず、異なるタンパク質を標的とすることが示唆された。

### (3) 抗線維化化合物の in vivo 活性

コラーゲン と 平滑筋アクチンの合成阻害効果の時間依存性を検証し、分子の化学構造的特徴も考慮しながら、in vivo での活性が期待できる有望な化合物を 8 つ選択した。この中に化合物 2 も含まれていた。

選択した化合物についてはブレオマイシン誘導肺線維症マウスモデルを用いて in vivo 活性を評価した。マウス (C57BL/6J) にブレオマイシンの気管内投与後、候補化合物を 10 mg/kg/day で 2 週間に渡って皮下投与し治療を試みた。その結果、化合物 2 を含む、異なるケモタイプを持つ 3 つの化合物で症状の軽快が見られた。一方、これらとは異なるケモタイプを持つ化合物では症状の増悪が見られた。



### (4) 抗線維化化合物のがん細胞パネルスクリーニング

さらに AdAMS の支援を受け、化合物 2 を含む 7 つの化合物について細胞株パネルを用いた分子プロファイリング試験を行った。この結果、化合物 2 を含む 6 つの化合物についてはほとんど細胞増殖阻害活性が見られず、レファレンス化合物との比較ができなかった。しかし、細胞傷害性がほとんどなく、線維化の機序にのみ作用する化合物であることが示され、興味深い結果となった。残りの 1 化合物については弱いながらも細胞装飾阻害が見られ、チューブリン阻害薬との類似性が示唆された。

## 4. 研究成果

本研究により、令和 2 年度以降に大分大学で設計・合成してきた約 200 化合物のペプチドミメティクスライブラリから、TGF- 刺激による MRC-5 の EMT 阻害を指標とした in vitro スクリーニングにより、線維化阻害剤として有望な低分子化合物が複数見いだされた。この中で化合物 2 は、ある PPIase サブタイプへの結合を示すことが TSA および ITC により確認された。また、その PPIase サブタイプを siRNA によりノックダウンした実験でも、同様の線維化阻害が確認された。さらに、ブレオマイシン誘導肺線維症マウスモデルを用いた in vivo 試験では、化合物 2 を含む 3 化合物で症状の軽快が見られた。一方、4 つの化合物では症状の増悪が見られた。

これらの成果により、約 200 化合物のペプチドミメティクスライブラリの中から、動物レベルで肺線維症の予防/治療効果を示す化合物を見出すことに成功した。本化合物群は工程数 5 段階以内での合成が可能であり、治療薬のリードとしても有望である。

一方、in vitro では線維化阻害作用を示すものの、in vivo では症状を増悪させる化合物群も見つかった。ブレオマイシン誘導肺線維症マウスモデルでは、肺がブレオマイシンの傷害を受け炎症が起こる初期と、線維化を伴いながら肺がダメージから回復していく中期以降で、線維化の役割とそこに寄与する細胞や分子メカニズムが変化している可能性が挙げられる。本化合物の作用機序を詳細に研究することで、線維症研究に有用な分子ツールを提供できることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuoka Shigeru, Sindelar Miriam, Bansal Sonal, Patti Gary J., Schaefer Jacob	4. 巻 330
2. 論文標題 Quantitative rotational-echo double resonance for Carbon-13 spin clusters	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Magnetic Resonance	6. 最初と最後の頁 107043 ~ 107043
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmr.2021.107043	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 該当する

1. 著者名 Inoue Naomi, Terabayashi Takeshi, Takiguchi-Kawashima Yuri, Fujinami Daisuke, Matsuoka Shigeru, Kawano Masanori, Tanaka Kazuhiro, Tsumura Hiroshi, Ishizaki Toshimasa, Narahara Hisashi, Kohda Daisuke, Nishida Yoshihiro, Hanada Katsuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 The benzyloisoquinoline alkaloids, berberine and coptisine, act against camptothecin-resistant topoisomerase I mutants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7718
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-87344-2	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松岡 茂
2. 発表標題 新しい低分子ペプチド模倣技術の開発と検討
3. 学会等名 第3回モダリティ創薬デザイン研究会シポジウム ~ 最先端のアカデミア研究がもたらす革新的モダリティ開発~（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shigeru Matsuoka, Kentaro Yamada, Akira Kato, Hiroyuki Koji, Akira Nishizono, Naoto Uemura
2. 発表標題 Peptidomimetic inhibitor of rabies virus replication
3. 学会等名 Joint Congress on Global Health 2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松岡 茂
2. 発表標題 大分大学医学部での狂犬病治療薬開発研究
3. 学会等名 第41回日本臨床薬理学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石崎 敏理
2. 発表標題 タンパク質間相互作用に着目した新規治療薬の探索
3. 学会等名 第31回日本緑内障学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	石崎 敏理  (Ishizaki Toshimasa)  (70293876)	大分大学・医学部・教授    (17501)	

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
---------	---------