

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：34306  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K06974  
研究課題名（和文）1型ニューロメジンU受容体アンタゴニストの創出と2型炎症克服のための創薬基盤構築

研究課題名（英文）Development of peptidic NMUR1 antagonist and the application to suppression of type 2 inflammation

研究代表者  
高山 健太郎（Takayama, Kentaro）  
京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70611482  
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）：抗肥満ペプチドとして知られるニューロメジンU（NMU）が、1型受容体（NMUR1）を介した2型炎症惹起に関与することが報告されているが、抑制的に機能するアンタゴニストの報告は皆無である。本研究では、既存のNMU受容体アゴニストペプチドを基盤とした構造変換により、ヒトNMUR1に対する選択的ペプチドアンタゴニストCPN-351の創製に成功した。また本検討の過程で、2型受容体（NMUR2）に対する選択的パーシャルアゴニストCPN-327を発見し、受容体の活性制御における新たな分子機能に関する知見を得ることができた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究をもって、NMU受容体モジュレーターとして、アゴニスト、パーシャルアゴニスト、アンタゴニストをNMUR1、NMUR2に対して全て揃えることができ、各受容体に立脚した機能解析や創薬を展開することができる基盤が整備された。NMUは肥満やエネルギー代謝調節のみならず、2型炎症、プロラクチン分泌などにも関わり、これを制御することによる健康増進を念頭に研究を加速させることができる成果が得られたものである。

研究成果の概要（英文）：Neuromedin U (NMU), which is well known as an anti-obesity peptide, is related to type 2 inflammation by the activation of mast cells, eosinophils and innate lymphoma cell 2 via NMU receptor 1 (NMUR1). To suppress the inflammation, development of NMUR1 antagonists would be one of the promising approach. In this study, a structure activity relationship study based on conventional NMU receptor modulators in our laboratory afforded a first peptide antagonist CPN-351 to human NMUR1. Also, a first partial agonist to human NMU receptor 2 (NMUR2) is successfully discovered. These new findings are valuable for understanding the molecular mechanism in the regulation of NMU receptor function.

研究分野：ペプチド科学、生体機能化学

キーワード：ペプチドモジュレーター ニューロメジンU 抗炎症 抗肥満

1. 研究開始当初の背景

(1) 2型炎症に関する学術的背景: アレルギー炎症の主体とされる2型炎症では、インターロイキン (IL) -4、IL-5、IL-9 のような2型サイトカインが中心的な役割を果たし、2型自然リンパ球 (ILC2)、好酸球、肥満細胞などが活性化され、好酸球性炎症や気道過敏性亢進による喘息などの病態が惹起される (図1)。好酸球性炎症の中でも、好酸球性副鼻腔炎 (国内患者数: 2万人)、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (EGPA、1800人)、好酸球性消化管疾患 (5000人) は、いずれもステロイド療法が選択されるが、完全寛解が困難な疾患であり、難病指定されている。即ち、ステロイドの長期使用による副作用が問題となっており、完全寛解を目指すべく新薬の開発が必要とされている。そこで最近、好酸球の活性化に関わる IL-5 を標的とした医薬品 (抗 IL-5 抗体など) の適用が臨床で模索されている。しかしながら、好酸球性副鼻腔炎患者への抗 IL-5 抗体投与で手術を回避できたのは約 30%との報告 (Bachert *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017, 140) や、EGPA 患者への抗 IL-5 抗体投与によって寛解が得られたのは約 50%との報告 (Wechsler *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 2017, 376) のように、効果は十分とはいえない。そのような状況下、EGPA 病態と血中 ILC2 レベルとの関連性が報告された (Tsurikisawa *et al.*, *Clin. Exp. Allergy*, 2018, 48)。したがって、好酸球性の難病ではあるが、好酸球のみを標的とした治療ではなく、2型炎症に対してより包括的にアプローチできる医薬品が開発が求められるのではないかと考えられた (図1)。

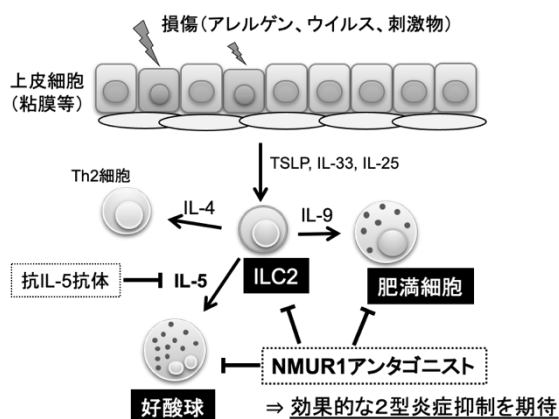


図1. 2型炎症におけるNMUR1の新規創薬標的としての可能性

(2) 標的妥当性: そこで注目すべき標的として、1型ニューロメジンU受容体 (NMUR1) が挙げられる。摂食抑制などに基づく抗肥満作用を有することで知られる神経ペプチドであるニューロメジンU (NMU) が、NMUR1 を介して肥満細胞を直接的に活性化し、炎症誘導することが 2005年に報告された (Moriyama *et al.*, *J. Exp. Med.* 2005, 202)。翌年には、NMUR1 を介した NMU の好酸球の活性化が、アレルギー性の好酸球増多に関与することも報告された (Moriyama *et al.*, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2006, 290)。最近では、ILC2 に関しても NMUR1 を介した炎症惹起が複数報告されており (Klose *et al.*, *Nature*, 2017, 549; Wallrapp *et al.*, *Nature*, 2017, 549)、注目度が高まっている。NMU が作用する受容体には2型受容体 (NMUR2) もあるが、本受容体のアレルギー炎症惹起への関与は知られていない。以上のことから、NMUR1 選択的なアンタゴニストを創製できれば、効果的に2型炎症を抑制できる可能性が極めて高いと推論される。

(3) NMU 受容体モジュレータの研究背景: NMUR1 および NMUR2 のリガンドである NMU (ヒト NMU は 25 残基) を基盤としたペプチド性アゴニストの報告は、我々を含めて複数のグループから多くなされており、また NMUR2 に対する低分子アンタゴニストの創製例はあるが、NMUR1 に対する選択的アンタゴニストは未開拓の領域である。

2. 研究の目的

(1) NMUR1 アンタゴニストの創出: これまで進めてきたヘキサペプチド型アゴニスト創製研究で合成してきたペプチド誘導体の中で顕著なアゴニスト活性が認められない誘導体群に着目し、アンタゴニスト活性スクリーニングを行うことでシーズを獲得する。このシーズを基に構造活性相関研究を展開することで世界初の NMUR1 アンタゴニストを創出する。

(2) 薬理効果の実証: 上述(1)の検討で獲得した NMUR1 選択的アンタゴニストを用いて、ヒト末梢血好酸球細胞およびヒト肥満細胞株の活性化に対する抑制能を検証することで、NMUR1 が2型炎症に対する新しい創薬標的となり得ることを示す。

3. 研究の方法

(1) ペプチド合成: 全てのペプチド誘導体は、通常の Fmoc 固相合成法により合成し、HPLC にて精製し、以下の検討に使用した。

(2) アンタゴニスト/アゴニスト活性評価: 保有するペプチド誘導体のアンタゴニスト活性スクリーニングは、ヒト NMUR1 安定発現チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞およびヒト NMUR2

安定発現 CHO 細胞を用い、ヒト NMU (3 nM) 添加による細胞内カルシウム上昇に対する抑制活性に基づいて (Fluo-4-AM を用いて蛍光測定) 実施した。また、アンタゴニストとして機能的であるかを検証するため、ヒト NMU を添加しない群 (各誘導体のアゴニスト活性) も併せて評価した。最終化合物候補については、ヒト NMU ( $10^{-12}$ ~ $10^{-6}$  M, 11 点) に対するアンタゴニスト活性評価を行い (30, 100, 300, 1000 nM のうち 3 点で評価)、 $pA_2$  値を算出した。マウス受容体に対するアンタゴニスト活性評価は、各受容体一過性発現 HEK293 細胞を用いて同様の方法にて実施した。

(3) ヒト肥満細胞株ならびに凍結ヒト末梢血好酸球細胞を用いた評価系に関する検討：ヒト肥満細胞株 HMC1.2 を用い、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ遊離を指標とした活性化に対する抑制能を評価するにあたり、陽性対照として Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を用いた。凍結ヒト末梢血好酸球細胞の活性化に対する抑制能を評価するあたり、Eotaxin による遊走反応が陽性対照となるよう計画した。

#### 4. 研究成果

(1) NMUR1 アンタゴニスト CPN-351 の創製：我々が保有する NMU の C 末端領域に由来するペプチド誘導体 (CPN) のうち、1  $\mu$ M における相対アゴニスト活性 (vs ヒト NMU) が 20%以下の誘導体群 (A~V、未公表) に着目し、ヒト NMU に対する NMUR1 アンタゴニスト活性の有無を評価したところ、顕著な拮抗作用を示す誘導体 CPN-209 を獲得した (図 2)。CPN-209 をシーズに、各アミノ酸残基の保存的置換を基本とした 70 種を超える誘導体を設計・合成し、ヒト NMU 受容体に対する構造活性相関研究を展開した。その結果、最も良好な  $pA_2$  値 (8.25) を有する NMUR1 アンタゴニスト CPN-333 を得た。ただし、CPN-333 は NMUR2 に対して拮抗作用 ( $pA_2, NMUR2=7.60$ ) を示す一方で、パーシャルアゴニスト活性を有することが確認されたため、NMUR2 に対する当該作用の低減を念頭にした候補化合物選定を継続して実施した。最終的に、NMUR2 よりも NMUR1 に 8 倍選択的なアゴニスト活性を示す CPN-351 ( $pA_2, NMUR1=7.19$ ,  $pA_2, NMUR2=6.27$ ) の創出に成功した。本誘導体 300 nM 以下の濃度において NMUR2 に対するアゴニスト活性は確認されず、CPN-333 では 4 倍程度であった NMUR1 選択性も改善された。一方で、マウス受容体に対するアンタゴニスト活性は認められず、以下の薬理活性評価は、ヒト由来細胞等を用いた検討を進めていく必要性が明らかとなった。

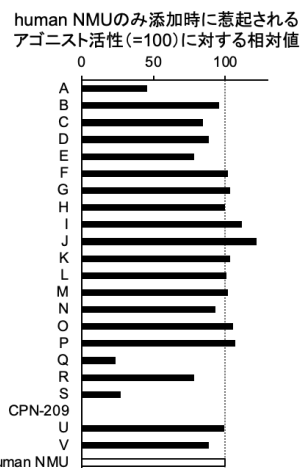


図2. NMUR1発現CHO細胞を用いたアンタゴニストシーズの探索

(2) ヒト肥満細胞株ならびに凍結ヒト末梢血好酸球細胞を用いた評価系に関する検討：ヒト肥満細胞株 HMC1.2 に対して PMA を作用させることで、脱顆粒の指標である  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼの遊離が確認された。しかしながら、NMU を作用させても当該反応は引き起こされず、市販の肥満細胞株以外を用いた検討が必要となることが明らかとなった。また、市販の凍結ヒト末梢血好酸球細胞に関しては陽性対照として用いる Eotaxin による遊走反応そのものが惹起されなかったことから、新鮮血に由来するサンプルを別途準備する必要性が示唆された。これらの課題の克服を今後模索すると共に、マウス NMUR1 にも作用するアンタゴニストの創製が実現すれば、マウス由来細胞を用いた検討ができるようになるなど、より多角的な検証が可能になるものと考えられる。

(3) NMUR2 パーシャルアゴニストの発見：上記(1)において CPN-333 がヒト NMUR2 に対して弱いながらもパーシャルアゴニスト活性を示したことに着目し、一連の構造活性相関研究の過程で合成したペプチド誘導体の当該活性の有無について評価を行った。その結果、ヒト NMUR2 に対して 95 nM の  $EC_{50}$  値でパーシャルアゴニスト活性 (内活性 0.59) を示す CPN-327 の同定に成功した。一方で、マウス NMUR2 に対する当該活性は認められなかった。

(4) 総括および展望：本課題研究の遂行により、ヒト NMUR1 アンタゴニストとして CPN-351、ヒト NMUR2 パーシャルアゴニストとして CPN-327 の創出に世界で初めて成功した。これにより、ヒト NMUR1 並びに NMUR2 各々に対するフルアゴニスト、パーシャルアゴニスト、アンタゴニストが全て出揃った。NMU 受容体の個別機能の解明研究や創薬展開が加速していく契機となる重要な成果と位置付けられる。一方で、CPN-351 および CPN-327 はマウス受容体に対しては明確な作用を示さなかった。これは、ヒトよりもマウス受容体の方が厳密な分子認識に基づいてリガンドと相互作用していることを意味するものと捉えられ、この分子メカニズムの解明が達成されれば、創薬における種差に基づく制約が解消されるものと考えている。これまでのアゴニスト創製研究で構造変換することがなかった C 末端 Pro-Arg-Asn-amide 構造を誘導して、CPN-351、CPN-327 の両化合物を創製できたことは非常に興味深い成果であり、NMU 受容体制御機構を詳細に理解していく上で高い価値を有するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 K. Takayama, K. Mori, R. Saitoh, Y. Sasaki, A. Taguchi, A. Taniguchi, M. Miyazato, Y. Hayashi
2. 発表標題 Molecular function of the C-terminal amidated asparagine-deleted peptide derived from endogenous neuromedin U
3. 学会等名 第 59 回ペプチド討論会
4. 発表年 2022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
研究協力者	森 健二  (Mori Kenji)		

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