

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04652

研究課題名(和文) ペプチドミメティックを活用した中分子型創薬リードの創製

研究課題名(英文) Development of mid-size drugs based on peptidomimetic

研究代表者

玉村 啓和 (TAMAMURA, Hirokazu)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：80217182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々が長年にわたって蓄積してきたペプチドおよびペプチドミメティックの研究成果を基に、種々の中分子サイズの創薬リードの発展的開発を推進した。具体的には、ヘリックス構造が高活性に必須なヒト免疫不全ウイルス(HIV)インテグラーゼ阻害剤のヘリックス構造強化ペプチド、GPCRの二量体状態を捉えることのできる我々が開発した2価結合型GPCRリガンド、HIVが有する外被タンパク質gp41のC末端ヘリックス領域の再構成二量体および三量体を基にした膜融合阻害剤等を題材にし、二次構造、三次構造等の高次構造模倣型のペプチドミメティックを基盤とした中分子サイズの創薬リードを創出した。

研究成果の概要(英文)：Peptidomimetics that mimic conformation such as secondary and tertiary structures of peptides/proteins have led to the recent development of anti-cancer and anti-HIV agents. Some examples are described as follows. Chemokine receptor CXCR4 antagonists based on cyclic peptides having conformationally constrained structures have been synthesized as agents with anti-chemotactic activity against cancer cells and inhibitory activity against HIV entry. HIV protein-derived stapled peptides with helix mimetics have been developed as HIV integrase inhibitors. Dimer and trimer mimetics of a C-terminal helical region (CHR/C34) of an envelope protein gp41 have been developed as HIV fusion inhibitors. In addition, bivalent ligands based on the above CXCR4 antagonists such as 14-mer peptide T140 derivatives have been synthesized to produce effective metastatic inhibition with the therapeutic potential. Taken together, these advantaged of mid-size drugs were shown.

研究分野：創薬化学

キーワード：中分子 ペプチドミメティック 環状ペプチド HIV がん ステープルペプチド CXCR4 GPCR

1. 研究開始当初の背景

近年の生命科学の発展に伴い、低分子有機化合物を基盤とした種々の疾患に対する医薬品が登場した。また最近では、抗体医薬等の高分子のバイオ医薬品が分子標的創薬において、精力的に開発されるようになってきた。低分子の化合物は、経口投与可能で適応性が高く、免疫原性も低い反面、特異性が低いこともあり、副作用が問題になることもある。一方、高分子の化合物は、投与方法等の適応性や免疫性に問題があるが、特異性が高く、副作用が少ないことが多い。すなわち、低分子、高分子とも、それぞれ一長一短がある。そこで、これらの長所を保持し、短所を軽減した、分子量的に中間となる中分子のペプチド性化合物が注目され始めている。また、最近、菅らにより、特殊アミノ酸を含むペプチドライブラリーが容易に得られる技術(RaPID システム)が開発された(菅裕明ら, *MEDCHEM NEWS (日本薬学会医薬化学部会)*, 24, 8, 2014)。このことが、中分子サイズの医薬探索の効率化を進めることになっている。

2. 研究の目的

最近の創薬研究において、中分子サイズの医薬品開発の重要性が注目されている。本研究では申請者が長年にわたって蓄積してきたペプチドおよびペプチドミメティックの研究成果を基に、種々の中分子サイズの創薬リードの発展的開発を推進する。具体的には、ヘリックス構造が高活性に必須なヒト免疫不全ウイルス(HIV)インテグラーゼ阻害剤のヘリックス構造強化ペプチド、GPCR の二量体状態を捉えることのできる申請者が開発した 2 価結合型 GPCR リガンド、HIV が有する外被タンパク質 gp41 の C 末端ヘリックス領域の再構成二量体および三量体を基にした膜融合阻害剤等を題材にし、二次構造、三次構造等の高次構造模倣型のペプチドミメティックを基盤とした中分子サイズの創薬リードの創出を目指す。また、2 価結合型 GPCR リガンドと他のドラッグをリンカーで結合し、治療標的の疾病に関与する GPCR が過剰発現した細胞へ他のドラッグを特異的にターゲティングし、標的細胞で効率的にリリースするドラッグシャトルの創製を目指す。

3. 研究の方法

(1) HIV インテグラーゼ阻害剤のヘリックス構造を強化した化合物の創製
以前我々が創製した HIV インテグラーゼ阻害活性を有するステープルペプチドは、EAIIRILQQLLFHFIRIG のアミノ酸配列で、4 番目の Ile(I)と 8 番目の Gln(Q)のアミノ酸側鎖をオレフィン架橋へ変換した構造である (W. Nomura, et al., *ACS Chem. Biol.*, 8, 2235, 2013)。このステープルペプチドは、顕著なヘリックス性と細胞膜透過性を有し、細胞ベースの抗 HIV 活性試験でマイクロモラーレベルの

EC₅₀を有する。架橋を導入しない鎖状のペプチドは、有意なヘリックス性、細胞膜透過性を示さず、培養細胞で抗 HIV 活性も持たなかった。この結果より、ステープル化(オレフィン架橋)の有用性が確認できたので、オレフィン架橋を二カ所導入したステープルペプチドをデザインする。合成に関しては、ペプチド鎖構築時にオレフィン含有アミノ酸を 4 個導入するが、真ん中の 2 個のアミノ酸側鎖の長さを短くすることにより、位置選択的にオレフィン架橋されるように工夫する。得られたステープルペプチドに関して、CD による二次構造解析、細胞膜透過性試験、抗 HIV 活性試験を行う。

オレフィン架橋の二カ所導入の効果があればそのステープルペプチドを基にして、効果がなければ最初のステープルペプチドを基にして、ステープル部位の構造変換を検討する。具体的には、オレフィン架橋を導入することによるオレフィン部位の疎水性の上昇を軽減するため、ヒドロキシ基を導入したステープルペプチドを合成する。さらに、オレフィン含有アミノ酸を 4 級アミノ酸にすることでヘリックス性が向上することが報告されている(G. L. Verdine, et al., *Org. Lett.*, 12, 3046, 2010)ので、このペプチドにも適用してみる。また、さらなるステープル部位の構造変換の検討や親水性と疎水性のバランスを考慮した化合物の分子設計を行う。

(2) 2 価結合型 CXCR4 リガンドの創製—がん転移阻害剤

研究目的で述べた、CXCR4 の二量体状態を捉えることのできる我々が創製した 2 価結合型リガンド(T. Tanaka, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 15899, 2010)は、環状 5 残基ペプチド FC131 誘導体を 2 個用いて長さを固定したポリプロリンやポリプロリン PEG リンカーで架橋した二量体化合物である。FC131 は我々が以前に CXCR4 アンタゴニストとして開発した(N. Fujii, et al., *Angew. Chem., Int. Ed.*, 42, 3251, 2003)ものであるが、そのもとの化合物は 14 残基ペプチド T140 誘導体である(H. Tamamura, et al., *Org. Biol. Chem.*, 1, 3663, 2003)。CXCR4 二量体の診断・検出用の分子プローブとしては、より分子サイズの小さい 5 残基ペプチド FC131 を使用の方が適していると考えられるが、治療用の医薬品としては、受容体をより広く覆う 14 残基ペプチド T140 誘導体を採用するほうが有用であると思われる。そこで、FC131 誘導体含有の 2 価型リガンド創製のノウハウを利用して、T140 誘導体を 2 個有する 2 価型 CXCR4 リガンドの創製、最適化をはかる。具体的には、種々の長さのポリプロリンリンカーやポリプロリン PEG リンカーを用いて 2 価型化合物を合成し、CXCR4 結合親和性を解析し、最適な T140 誘導体含有 2 価型リガンドを創出する。CXCR4 結合親和性が高い 2 価型リガンドが得られたら、in vitro のがん転移抑制活性の測定試験であるチャンパーアッセイ(H.

Tamamura, et. al., *FEBS. Lett.*, **550**, 79, 2003)を用いて、種々のがん細胞(膵臓がん、乳がん、メラノーマ、白血病細胞)の遊走(migration)の阻害活性を検定する。実際、認識ユニットが FC131 から T140 誘導体へ変わったことを考慮し、FC131 の 2 価型リガンドの最適なリンカー長から T140 誘導体の大きさ分を差し引いたリンカー長をデザインし、2 価型リガンドを創製する。

CXCR4 は多くのがん細胞で過剰発現しているだけでなく、HIV の第二受容体として機能しており、エイズおよび HIV 感染症にも大きく関与している。そこで、2 価型 CXCR4 リガンドの CXCR4 に対する強い親和性を利用して、CXCR4 を発現する細胞へ特異的にターゲティングするドラッグシャトルの創製を検討する。2 価型リガンドのリンカー部位に、他の抗がん剤、あるいは、抗エイズ薬を共有結合で導入する。これらの化合物を投与した際に、CXCR4 を発現する細胞へターゲティングし、細胞内へ内在化し、導入した他のドラッグが放出され、細胞内で活性を発現することを期待している。なお、CXCR4 発現細胞にて、蛍光標識した 2 価型リガンドが内在化する様子はすでに観測できている(T. Tanaka, et. al., *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 15899, 2010)。具体的には、ポリプロリンリンカーの中央部から出ている別のリンカーの先端に抗がん剤 (トポイソメラーゼ阻害剤 Etoposide) や抗エイズ薬 (プロテアーゼ阻害剤 Saquinavir) を導入する。これらの二量体認識ドラッグシャトルとしての評価(抗がん活性試験や抗 HIV 活性試験)を行う。効率的にドラッグリリースするシャトルが得られない場合は、ドラッグを導入するリンカー構造を種々改変し、リリースしやすい構造を探索する。

(3) HIV 外被タンパク質 gp41 の C 末端ヘリックス領域(CHR/C34)の再構成二量体をもとにした膜融合阻害剤の創製

我々はすでに、HIV gp41 の CHR(C34)の二量体および三量体の人工再構成ペプチドがもとの単量体に比べて、約 100 倍の膜融合阻害活性を有することを見出している(W. Nomura, et. al., *ChemMedChem*, **7**, 205, 2012; W. Nomura, et. al., *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 4452, 2013)ので、C34 二量体の構造を基にして、さらに構造安定性の向上したペプチドミメティックをデザインする。具体的には、もとの C34 二量体(N 末端や C 末端にジスルフィド架橋を導入したペプチドミメティックや、さらにステーブル架橋を導入したペプチドミメティックを合成する。なお、ジスルフィド架橋を 2 本導入する場合は我々が培ってきた位置選択的ジスルフィド架橋法(H. Tamamura, et. al., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **45**, 312, 1995)を用い、ステーブル架橋を導入する場合は前述の(1)の方法を用いる。得られたペプチドミメティックの CD 測定を行い、ヘリックス性および構造安定性を評価する。また、これら

の抗 HIV 活性試験を行う。Boger らが低活性ながら報告している CHR(C34)由来の低分子膜融合阻害剤(L. R. Whitby, et. al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 2861, 2012)の構造等を基に、二量体安定化の概念を取り入れて、種々の二量体誘導体を合成する。活性評価は同様に行う。実際、リンカーの種類、長さ、数(1 本または 2 本)、導入する部位を検討する。

4. 研究成果

創薬研究において中分子サイズの医薬品開発の重要性が注目されている。本研究では我々が長年にわたって蓄積してきたペプチドおよびペプチドミメティックの研究成果を基に、種々の中分子サイズの創薬リードの発展的開発を推進した。具体的には、ヘリックス構造が高活性に必須なヒト免疫不全ウイルス(HIV)インテグラーゼ阻害剤のヘリックス構造強化ペプチド、GPCR の二量体状態を捉えることのできる我々が開発した 2 価結合型 GPCR リガンド、HIV が有する外被タンパク質 gp41 の C 末端ヘリックス領域の再構成二量体および三量体を基にした膜融合阻害剤等を題材にし、二次構造、三次構造等の高次構造模倣型のペプチドミメティックを基盤とした中分子サイズの創薬リードの創出を目指した。実際、HIV のアクセサリタンパク質である Vpr 由来のヘリックス構造を強化した HIV インテグラーゼ阻害活性を有するペプチド断片をもとに、アミノ酸配列の i 番目と $i+4$ 番目をクロスリンクしたステーブルペプチドを創出し、ヘリックス性と抗 HIV 活性の向上に成功した。詳細には、ヘリックス構造強化ペプチドについては、これまでの研究で、単純な炭化水素で構成された末端オレフィン側鎖部位においてオレフィンメタセシスを行うアルキル型ステーブル化反応は良好な反応効率を示すのに対し、末端アリルエーテル部位においてオレフィンメタセシスを行うエーテル型ステーブル化反応は反応効率が低いという問題点があった。そこで本研究では、これまでの Fmoc 固相合成法ではなく、新規ペプチド液相合成プロトコルである AJIPHASE 技術を用いることで、オレフィンメタセシス反応の効率改善を行った。また、研究代表者らが見出した GPCR の一種であるケモカインレセプター CXCR4 の二量体状態を捉える 2 価結合型 CXCR4 リガンドの近赤外ラベル体を創出した。さらに、より有用な GPCR リガンドを創製し、2 価結合型 GPCR リガンドと他のドラッグをリンカーで結合し、治療標的の疾病に関与する GPCR が過剰発現した細胞へ他のドラッグを特異的にターゲティングし、標的細胞で効率的にリリースするドラッグシャトルの創製を行った。さらに、膜融合阻害活性が向上した gp41 の C 末端ヘリックス領域(CHR/C34)の二量体ミメティックを創出した。これらはいずれも天然の二次構造、三次構造等を基盤とした高次構造模倣型のペプ

チドミメティックである。これらを題材として、低分子と高分子の間に位置する中分子の分子量 700 ~ 20,000 の種々のサイズの創薬リードを創出し、中分子創薬を推進することができた。

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 20 件)

Takuya Kobayakawa, Yudai Matsuzaki, Kentaro Hozumi, Wataru Nomura, Motoyoshi Nomizu & Hirokazu Tamamura, Synthesis of a Chloroalkene Dipeptide Isostere-Containing Peptidomimetic and Its Biological Application. ACS Med. Chem. Lett., 査読有, 9 巻, 2018, 6-10, DOI:10.1021/acsmedchemlett.7b00234

Nami Ohashi, Ryosuke Kobayashi, Wataru Nomura, Takuya Kobayakawa, Agnes Czikora, Brienna K Herold, Nancy E. Lewin, Peter M. Blumberg & Hirokazu Tamamura, Synthesis and Evaluation of Dimeric Derivatives of Diacylglycerol-Lactones as Protein Kinase C Ligands. Bioconjugate Chem., 査読有, 28 巻, 2017, 2135-2144, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00299

Takuya Kobayakawa & Hirokazu Tamamura, Stereoselective Synthesis of Xaa-Yaa Type (Z)-Chloroalkene Dipeptide Isosteres via Efficient Utilization of Organocopper Reagents Mediated Allylic Alkylation. Tetrahedron, 査読有, 73 巻, 2017, 4464-4471, DOI: 10.1016/j.tet.2017.06.003

Hikaru Takano, Tetsuo Narumi, Wataru Nomura & Hirokazu Tamamura, Microwave-Assisted Synthesis of Azacoumarin Fluorophores and the Fluorescence Characterization. J. Org. Chem., 査読有, 82 巻, 2017, 2739-2744, DOI: 10.1021/acs.joc.6b02656

Tomohiro Tanaka, Toru Aoki, Wataru Nomura & Hirokazu Tamamura, Bivalent 14-mer Peptide Ligands of CXCR4 with Polyproline Linkers with Anti-Chemotactic Activity against

Jurkat Cells. J. Pept. Sci., 査読有, 23 巻, 2017, 574-580, DOI: 10.1002/psc.2946

Wataru Nomura, Haruo Aikawa, Shohei Taketomi, Miho Tanabe, Takaaki Mizuguchi & Hirokazu Tamamura, Exploration of Labeling of Near Infrared Dyes on the Polyproline Linker for Bivalent-Type CXCR4 Ligands. Bioorg. Med. Chem., 査読有, 23 巻, 2016, 6967-6973, DOI: 10.1016/j.bmc.2015.09.040

Hikaru Takano, Tetsuo, Narumi, Wataru Nomura, Toshiaki Furuta & Hirokazu Tamamura, Utilization of the Heavy Atom Effect for the Development of a Photosensitive

8-Azacoumarin-type Photolabile Protecting Group. Org. Lett., 査読有, 17 巻, 2016, 5372-5375, DOI: 10.1021/acs.orglett.5b02720

Nami Ohashi, Shigeyoshi Harada, Takaaki Mizuguchi, Yu Irahara, Yuko Yamada, Misato Kotani, Wataru Nomura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura & Hirokazu Tamamura, Small Molecular CD4 Mimics Containing Mono-cyclohexyl Moieties as HIV Entry Inhibitors. ChemMedChem a joint special issue with ChemBioChem: Protein & Protein Interactions, 査読有, 11 巻, 2016, 940-946, DOI: 10.1002/cmdc.201500590

Wataru Nomura, Nami Ohashi, Atsumi Mori & Hirokazu Tamamura, An In-cell Fluorogenic Tag-probe System for Protein Dynamics Imaging Enabled by Cell Penetrating Peptides. Bioconjugate Chem., 査読有, 26 巻, 2015, 1080-1085, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00131

Wataru Nomura, Taisuke Koseki, Nami Ohashi, Takaaki Mizuguchi & Hirokazu Tamamura, Trivalent Ligands for CXCR4 Bearing Polyproline Linkers Show Specific Recognition for Cells with Increased CXCR4 Expression. Org. Biomol. Chem., 査読有, 13 巻, 2015, 8734-8739, DOI: 10.1039/c5ob00891c

[学会発表](計 78 件)

玉村啓和: 2018年3月7日、第61回ヒューマンサイエンス・バイオインターフェース バイオ技術移転のための交流

の場、東京、「ペプチドミメティックを基盤とした中分子創薬」

玉村啓和：2017年6月14日、平成29年度(春季)有機合成化学講習会、東京、「ペプチドミメティックを基盤とした中分子創薬とケミカルバイオロジー」

玉村啓和：2017年1月13日、システム薬学研究機構「第8回新たな創薬パラダイムの創出」、東京、「ペプチドミメティックを活用した中分子創薬の研究」

玉村啓和：2016年11月25日、第30回日本エイズ学会学術集会シンポジウム「HIV envelope を標的とした感染防御」、鹿児島、「HIV envelope の構造変化をターゲットとした阻害剤の創製」

玉村啓和：2016年3月28日、日本薬学会第136年会シンポジウム「抗ウイルス感染症のフロンティア」、横浜、「HIV 外被タンパク質 gp41 由来ペプチド C34 の二量体を基盤とした膜融合阻害剤」

玉村啓和：2015年8月29日、第21回ペプチドフォーラム - ペプチドと創薬：ペプチド科学と創薬の新しい接点と可能性を探る -、東京、「ペプチドを基盤とした中分子創薬研究 - 抗 HIV 剤の創製」

〔図書〕(計 4 件)

Hirokazu Tamamura, Takuya Kobayakawa & Nami Ohashi, "Mid-Size Drugs Based on Peptides and Peptidomimetics: A New Drug Category" In "Springer Briefs in Pharmaceutical Science & Drug Development," Springer, 152 Beach Road, #21-01/04 Gateway East, Singapore 189721, Singapore, pp. 1-100, 2018.

小早川拓也、玉村啓和：「第II編 第3章 ペプチドミメティック(ジペプチドイソスター)の合成と応用」中分子医薬開発に資するペプチド・核酸・糖鎖の合成・高機能化技術「監修 千葉一裕」(株式会社 シーエムシー出版 東京)、36-48、2018年2月28日

玉村啓和、大橋南美：「第2章 ペプチドミメティックの開発と中分子創薬研究への応用 第1節「ペプチドミメティックを活用した中分子創薬研究」」ペプチド医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術(株式会社 技術情報協会 東京)、85-96、2017年12月27日

Nami Ohashi & Hirokazu Tamamura, "Peptide-derived mid-sized anti-HIV agents" In "Amino Acids, Peptides and Proteins," ed. by Maxim Ryadnov and Ferenc Hudecz, The Royal Society of Chemistry, Cambridge CB4 0WF, UK, vol. 41, pp. 1-29, 2017.

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉村 啓和 (TAMAMURA, Hirokazu)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：80217182

(2) 研究分担者

野村 渉 (NOMURA, Wataru)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：80463909

水口 貴章 (MIZUGUCHI, Takaaki)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：30732557

大橋 南美 (OHASHI, Nami)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：90707051

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

吉村 和久 (YOSHIMURA, Kazuhisa)

村上 努 (MURAKAMI, Tsutomu)

〔産業財産権〕