

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15484

研究課題名(和文) フォリスタチン由来ペプチドを基盤とした筋肉増強剤創製の新展開と分子機能解明

研究課題名(英文) Structure activity relationship study of a follistatin-derived myostatin inhibitory peptide for enhancement of skeletal muscle mass

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)：マイオスタチンは骨格筋量を負に制御している生体内因子であり、阻害剤の創製は筋萎縮の克服にアプローチすることができる。本研究で着目したフォリスタチンはマイオスタチンに結合し、その機能を阻害するタンパク質である。本研究では、このN末端領域に由来する14残基ペプチドをマイオスタチン阻害ペプチドとして見出し、構造活性相関研究により活性発現に重要なアミノ酸残基を同定すると共に、高活性誘導体の創製に成功した。またマウスへの筋肉内投与により筋重量が12%増加する成果も得られ、今後の創薬展開が期待される結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイオスタチン阻害剤は、世代縦断的に広範な筋萎縮疾患への適用が期待できる。例えば、がん悪液質、筋ジストロフィー、寝たきり患者などでみられる廃用性筋萎縮、老年性の筋萎縮(サルコペニア)等の克服に応用できる可能性がある。また、マイオスタチン阻害は脂肪細胞の肥大化を抑制するとの報告があり、肥満(メタボリック症候群)に奏功する可能性も秘めていることも興味深い。更にペプチドは、抗体に比べると比較的安価に化学合成可能であり、経済的メリットもある。

研究成果の概要(英文)：Myostatin is a negative regulatory factor against muscular mass. Myostatin inhibition is one of the promising strategies for the treatment of muscle atrophic diseases. Follistatin is well known as a myostatin inhibitory protein, and the N-terminal domain interacts with the type-I receptor binding site of myostatin. We focused on this interaction and synthesized a series of fragment peptides to explore a new inhibitory peptide. Consequently, 14-mer peptides was successfully identified and the important residues for effective inhibition was clarified. Injected intramuscularly, this peptide significantly increased muscle mass to 112% in mice. Also, structure activity relationship study afforded a new derivative with selectively enhanced myostatin inhibitory activity.

研究分野：ペプチド科学

キーワード：フォリスタチン マイオスタチン阻害 構造活性相関

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究で標的とする「マイオスタチン」は、TGF- β スーパーファミリーに属する筋量を負に制御するタンパク性局所ホルモンであり、アクチビン I 型および II 型受容体へ結合することで細胞内ヘシグナル伝達する¹。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し、またデコイ受容体投与では筋崩壊により生じるがん悪液質を改善することが報告されている^{2,3}。即ち、これらタンパク性阻害剤を用いた抗マイオスタチン療法では筋肉増強の proof-of-concept が既に確立されている。ところが最近まで、比較的小き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、マイオスタチンを標的とした中分子ペプチド創薬を開拓するために、まずマイオスタチン阻害タンパク質の一つとして知られるマイオスタチン前駆体プロドメインに着目し、探索を実施した。その結果、マイオスタチン分子中の I 型受容体結合部位と相互作用するプロドメイン N 末端領域から、23 残基のマイオスタチン阻害ペプチド **1** (IC₅₀ = 3.56 μ M) を世界に先駆けて同定し (図 1A)、デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデル *mdx* マウスへの筋注で約 20% の筋重量増加を確認した⁴。本ペプチド **1** を基にした化学構造の最適化研究を先行して推し進めており、既に高活性化に成功している⁵⁻⁷。しかしながら本研究開始当初には、抗原性や製造コストの低減を指向した短鎖化や、マイオスタチン選択性向上につながる知見の獲得には未だ至っていなかった。

そこで、新たな阻害ペプチドのプラットフォームを得るために、上述のプロドメインと同じくマイオスタチン阻害タンパク質として生体内で働くことが知られている「フォリスタチン」に着目した。本分子は既にマイオスタチンとの共結晶構造が報告されており、上述のペプチド **1** の獲得に繋がった I 型受容体結合部位に相互作用する領域として、フォリスタチン N 末端ドメインの α -helix 領域が挙げられる^{8,9}。この領域を中心に、各種フラグメントペプチドを化学合成し、10 μ M の濃度で阻害活性を示すペプチドを探索したところ、14 残基からなるペプチド **2** (position 41-54) の同定に成功した (図 1A)。

2. 研究の目的

本研究では、フォリスタチン由来ペプチド **2** を基に網羅的な構造活性相関研究を実施し、高活性誘導体を獲得すると共に、効果的なマイオスタチン阻害に関わるペプチドの分子基盤を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究で用いたペプチドはすべて、通常の Fmoc 固相合成法によりペプチド鎖を構築し、TFA-H₂O-TIPS-EDT (3 mL, 100:2.5:2.5:1) 混液を用いた cleavage 後、逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製し (純度 95% 以上)、ESI-TOF および MALDI-TOF MS により同定した。各ペプチドのマイオスタチン阻害活性は、マイオスタチン応答性ルシフェラーゼレポーターをトランスフェクションしたヒト胎児腎 (HEK) 293 細胞を用いて評価した (n = 3)。

4. 研究成果

(1) フォリスタチン由来ペプチド **2** のアラニン (Ala) スキャン

ペプチド **2** を構成する各アミノ酸残基の阻害活性への寄与を検証するため、各残基を Ala に置換した誘導体を 14 種合成し、10 μ M のペプチド濃度におけるマイオスタチン阻害活性を評価した (図 1B)。

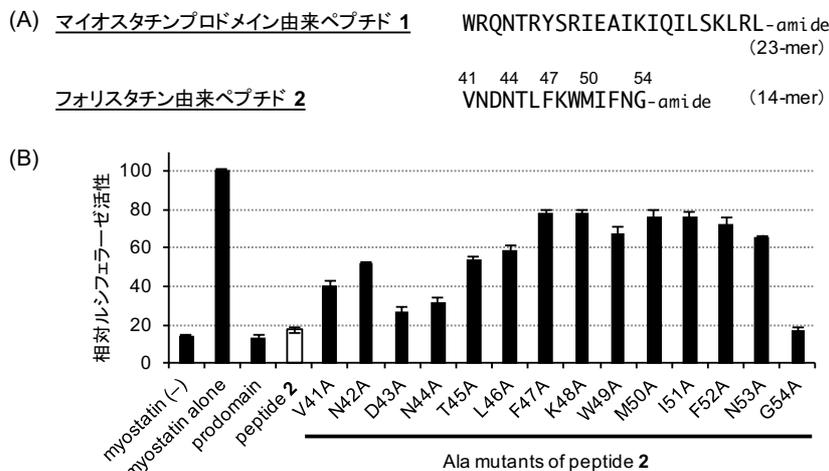


図 1 (A) ペプチド **1** および **2** のアミノ酸配列、(B) ペプチド **2** を基にした Ala スキャン

ほとんどの Ala 置換体でマイオスタチン阻害活性の低下が認められる中、G54A は、ペプチド **2** と同等の阻害能を示したことから、C 末端 Gly の α 炭素にメチル基を導入可能であることが明

らかとなった。ペプチド N 末端 4 残基に関しては、10 μM の濃度において V41A、N42A は中程度の阻害を示した一方で、D43A、N44A は比較的阻害能を保持していた。即ち、Asp43 および Asn44 はペプチド 2 のマイオスタチン阻害活性発現への寄与が比較的小さいことが示唆された。また、残りの残基 (position 45-53) のうち、Phe47 から Phe52 にかけての 6 残基を中心に効果的なマイオスタチン阻害に重要であることが明らかとなった。フォリスタチン-マイオスタチン複合体の X 線結晶構造解析の報告では、フォリスタチン分子中の Phe47、Ile51、Phe52 が明確にマイオスタチンと相互作用することが示されていたが⁸、本研究にて、合成ペプチド阻害剤においては周辺残基も阻害能に寄与していることが新たに示唆された。

(2) マイオスタチン選択性の検証

マイオスタチンに加えて、他の TGF- β スーパーファミリー分子、即ちアクチビン A および TGF- β 1 へのペプチド 2 の作用について、4 点のペプチド濃度 (0.3、1、3、10 μM) で検証した。まず、マイオスタチンに対して、ペプチド 2 は 6.2 μM の IC_{50} 値で作用することが明らかとなった。一方で、アクチビン A や TGF- β 1 に対しては、ペプチド 2 はほとんど阻害作用を示さなかった。ペプチド濃度 10 μM における阻害率はそれぞれ 9%、7%であった。これまでの知見で得られていたマイオスタチンプロドメイン由来ペプチド 1 の各阻害率 33%、18%よりも低い値を示しており、ペプチド 2 は良好なマイオスタチン選択性を有していると言える。

(3) 網羅的なアミノ酸置換による構造活性相関研究

上述(1)の Al α スキャンで得られた知見を基に、網羅的なアミノ酸置換を施した誘導体を合成し、より高いマイオスタチン阻害能を有する誘導体の獲得を試みた。基本的に保存的置換 (元の側鎖構造に近い性質、構造をもったアミノ酸への置換) にて誘導体を設計、合成した。

まず、酸化されやすい Met50 の誘導体化に着手した。Met50 をノルロイシン、*o*-メチルホモセリン、2-チエニルアラニンにそれぞれ置換した誘導体 M50N1e、M50Hse (Me)、M50Thi のマイオスタチン阻害活性を 10 μM のペプチド濃度で評価したところ、M50Thi がペプチド 2 と同等の阻害能を示した。

そこで、M50Thi を新たなリードペプチドとして構造活性相関研究を展開した。各アミノ酸残基に対して 2~7 種の置換を施した誘導体 60 種以上に関して、阻害能向上を検出する目的で 3 μM のペプチド濃度にてマイオスタチン阻害活性を評価した。その結果、N 末端 Val41 をフェニルグリシンに、Trp49 を Phe に、Thi50 をホモフェニルアラニンに、Phe52 を 4-フルオロフェニルアラニンにそれぞれ置換した誘導体など 11 種で明らかな阻害活性の向上がみられた。最終的に、これらの知見を組み合わせた新規誘導体 DF-100 を創製した。DF-100 は、濃度依存性評価においてペプチド 2 よりも 2.5 倍程度良好な阻害活性を有していることが明らかとなった。また、マイオスタチン選択性についても上述(2)と同様に検討し、20 μM の濃度においてもアクチビン A や TGF- β 1 に対する阻害作用を示さなかった。即ち、置換したアミノ酸残基側鎖構造は、マイオスタチンとの相互作用を強化しつつも、アクチビン A や TGF- β 1 との親和性向上には寄与しないことが示唆された。

以上より、本研究においてペプチド 2 を基にマイオスタチン選択的に阻害能を向上させた新規高活性誘導体 DF-100 の創製に成功し、フォリスタチン由来ペプチドの分子機能についての有用な知見を得ることができた。

(4) 課題と展望

ペプチド 2 や DF-100 を含めた一連の活性誘導体に関して、創薬分子としての適性をより高くするためには、水溶性の向上が課題の一つとして挙げられる。水溶性の向上を指向した、アミノ酸置換はいずれもマイオスタチン阻害活性の低下をもたらす結果が本研究を通して得られた。今後は、フォリスタチン由来ペプチド誘導体 DF-100 を基に水溶性の向上を中心に、更なる阻害能の向上の可能性などについても検討する余地があると考えている。

一方で、藤田医科大学の土田邦博博士、常陸圭介博士ご協力の下、10 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用いた薬理評価を実施した。ペプチド 2 (20 nmol) を筋肉内投与した前脛骨筋において、28 日後に 12%の有意な筋重量増加効果が見られた。このようにマウスを用いた本検討でフォリスタチン由来マイオスタチン阻害ペプチドの薬理作用が確認されたことは、今後の創薬展開にとって非常に有意義な知見となった。

<引用文献>

- ① McPherron, A. C.; Lawler, A. M.; Lee, S.-J. Regulation of skeletal muscle in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* **1997**, *387*, 83-90.
- ② Bogdanovich, S.; Krag, T. O.; Barton, E. R.; Morris, L. D.; Whittemore L. A.; Ahima, R. S.; Khurans, T. S. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin

blockade. *Nature* **2002**, *420*, 418-421.

- ③ Zhou, X.; Wang, J. L.; Lu, J.; Song, Y.; Kwak, K. S.; Jiao, Q.; Rosenfeld, R.; Chen, Q.; Boone, T.; Scott Simonet, W.; Lacey, D. L.; Goldberg, A. L.; Han, H. Q. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* **2010**, *142*, 531-543.
- ④ Takayama, K.; Noguchi, Y.; Aoki, S.; Takayama, S.; Yoshida, M.; Asari, T.; Yakushiji, F.; Nishimatsu, S.; Ohsawa, Y.; Itoh, F.; Negishi, Y.; Sunada, Y.; Hayashi, Y. Identification of the minimum peptide from mouse myostatin prodomain for human myostatin inhibition. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 1544-1549.
- ⑤ Takayama, K.; Nakamura, A.; Rentier, C.; Mino, Y.; Asari, T.; Saga, Y.; Taguchi, A.; Yakushiji, F.; Hayashi, Y. Effect of N-terminal acylation on the activity of myostatin inhibitory peptides. *ChemMedChem.* **2016**, *11*, 845-849.
- ⑥ Takayama, K.; Rentier, C.; Asari, T.; Nakamura, A.; Saga, Y.; Shimada, T.; Nirasawa, K.; Sasaki, E.; Muguruma, K.; Taguchi, A.; Taniguchi, A.; Negishi, Y.; Hayashi, Y. Development of potent myostatin inhibitory peptides through hydrophobic residue-directed structural modification. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 751-756.
- ⑦ Takayama, K.; Asari, T.; Saitoh, M.; Nirasawa, K.; Sasaki, E.; Roppingi, Y.; Nakamura, A.; Saga, Y.; Shimada, T.; Ikeyama, H.; Taguchi, A.; Taniguchi, A.; Negishi, Y.; Hayashi, Y. Chain-shortened myostatin inhibitory peptides improve grip strength in mice, *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 985.
- ⑧ Cash, J. N.; Angerman, E. B.; Kattamuri, C.; Nolan, K.; Zhao, H.; Sidis, Y.; Keutmann, H. T.; Thompson, T. B. Structure of myostatin·follistatin-like 3: N-terminal domains of follistatin-type molecules exhibit alternate modes of binding. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 1043-1053.
- ⑨ Cash, J. N.; Rejon, C. A.; McPherron, A. C.; Bernard, D. J.; Thompson, T. B. The structure of myostatin:follistatin 288: insights into receptor utilization and heparin binding. *EMBO J.* **2009**, *28*, 2662-2676.

5. 主な発表論文等

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

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 1. 著者名 Saitoh Mariko, Takayama Kentaro, Hitachi Keisuke, Taguchi Akihiro, Taniguchi Atsuhiko, Tsuchida Kunihiro, Hayashi Yoshio | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 Discovery of a follistatin-derived myostatin inhibitory peptide | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters | 6. 最初と最後の頁 126892 ~ 126892 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2019.126892 | 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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Kentaro Takayama |
| 2. 発表標題 Identification of the minimum bioactive-peptide structure derived from endogenous myostatin inhibitory molecules |
| 3. 学会等名 7th International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences (iPoPS2020) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| 産業財産権の名称 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、齋藤 まりこ、土田 邦博、常 | 権利者 学校法人東京薬科大学、学校法人藤田学園 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-190981 | 出願年 2018年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔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 | 土田 邦博 (Tsuchida Kunihiro) | | |
| 研究協力者 | 常陸 圭介 (Hitachi Keisuke) | | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 林 良雄 (Hayashi Yoshio) | | |