

審査の結果の要旨

氏名 浅見 泰司

浅見 泰司は「Design and Synthesis of Short-length KISS1R Agonists for the Functional Analysis of an Orphan G Protein-coupled Receptor KISS1R (オーファン受容体 KISS1R の機能解析を指向した短鎖型 KISS1R リガンドの創製)」を論文題目とし、以下の研究をおこなった。

薬物の標的タンパク質の中で、主要な生体機能を担っている G 蛋白共役型受容体 (GPCR) は、創薬のターゲットとして重要視されている。実際に、数多くの市販医薬品が GPCR を標的としたものである。ヒトゲノム上には約 800 種の GPCR がコードされており、近年、多くのオーファン GPCR のリガンド分子が同定されてきた。

メタスチン (metastin) /キस्पепチン (kisspeptin) は、2001 年にオーファン GPCR である GPR54/hOT7T175 (後に KISS1R と命名) の内因性リガンドとして発見された。メタスチンは、ガン転移 (metastasis) 抑制遺伝子である *KISS-1* の遺伝子産物であったことから、当初メタスチン (metastin) と命名された。しかし、メタスチンによる黄体形成ホルモン (LH) 分泌活性が見出され、GPR54 遺伝子の異常が低ゴナドトロピン性腺機能低下症を惹起することが報告されたことで、KISS1R の生殖神経内分泌分野での役割が注目されている (図 1)。

メタスチンは 54 残基のアミノ酸からなるが、C 端 10 残基の短鎖型ペプチド *metastin(45-54)* は、メタスチンに比較して受容体親和性、アゴニスト活性ともに 10 倍程度向上した (図 2)。しかし、ペプチドやタンパク質は生体内に存在するプロテアーゼによりペプチド結合が加水分解され、特に短鎖型ペプチドは非常に速い消失を示すことが知られている。

哺乳類の生殖機能は視床下部-下垂体-性腺軸 (HPG axis) によって制御されている。HPG axis における KISS1R の機能を解明する上で、受容体親和性、アゴニスト活性に優れた *metastin(45-54)* には大いに期待が持たれた。その反面、*metastin(45-54)* の生体内での不安定性がその有用性に制約を加えることも予想された。そこで、*metastin(45-54)* の生体内での安定性を評価するとともに、その高活性を保持した上で血中安定性を付与する合成研究を立案した。

本研究では、(1) KISS1R の生理作用を解明するために、*in vivo* において機能するペプチド誘導体を取得すること、(2) オーファン GPCR を標的とした創薬研究において、内在性ペプチドの安定化誘導体を用いて生理機能を解明する方法論を確立することの二点を目的として研究を行った。化合物は、1) 細胞内カルシウムイオン上昇活性、2) 受容体親和性、3) *in vitro* マウス血中安定性を指標に評価した。

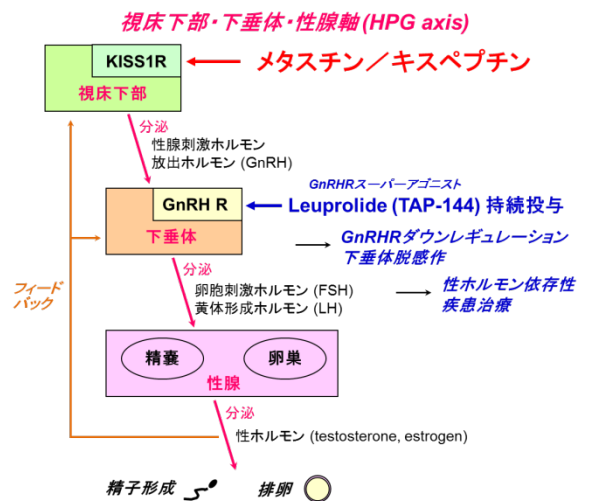


図 1 神経内分泌制御におけるメタスチンおよび KISS1R

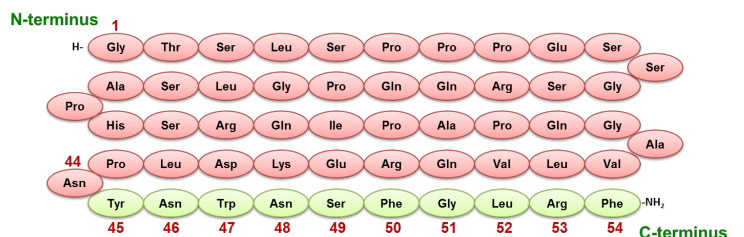


図 2 メタスチンおよびメタスチン(45-54) の構造

1. Metastin(45-54)の血中切断部位の同定

Metastin(45-54) をマウス血漿で5分間処理すると、ほぼ原体が消失した。代謝物をLC/MS解析することで種々のペプチド断片を同定し、主たる切断部位が45、47、50、51、53位のC端であることを見出した。特に45-46位間、53-54位間での切断速度が速いことから、まずこの2箇所の切断回避を目指して誘導体合成に着手した(図3)。

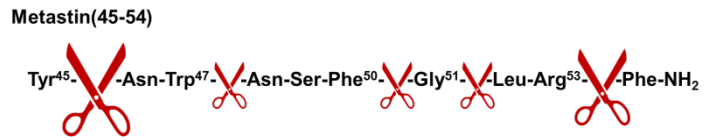


図3 メタスチン(45-54)の切断部位

2. Arg(Me)⁵³置換によるArg⁵³-Phe⁵⁴の切断回避

53-54位間は、trypsin-family serine proteases による切断が予想されたことから、P1位に相当する53位置換体を合成した。塩基性アミノ酸以外の置換体はアゴニスト活性を減弱させたことから、アミノ酸側鎖のグアニド構造を保持しながら最小限の変換を加えることで、KISS1R に対する認識を保ちつつ、プロテアーゼによる切断が回避出来るものと考えた。一連の誘導体は期待通りのアゴニスト活性を保持し、中でも Arg(Me) 置換体 **8** には metastin(45-54) を上回るアゴニスト活性が認められた(表1)。化合物 **8** はマウス血清5分処理により種々の断片に分解されるものの、53-54位間での切断断片は認められなかった。ウシ trypsin 消化による影響を検討したところ、metastin(45-54) が53-54位間で完全に切断される条件において、Arg(Me) 置換体 **8** には切断断片が観察されなかった。Arg のメチル化は生体内における翻訳後修飾として知られているが、合成ペプチドに応用して安定性の向上を図った例はない。今回の結果は、Arg(Me) 置換が、他の Arg 含有ペプチドの血中安定性向上においても有効な手段の一つになる可能性も示唆する。

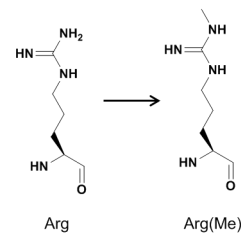
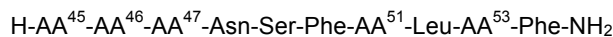


図4 化合物 **8** の化学構造

表1 メタスチン(45-54) および代表誘導体の生物活性と血中安定性



compound	AA ⁴⁵	AA ⁴⁶	AA ⁴⁷	AA ⁵¹	AA ⁵³	agonist activity		stability in mouse serum
						EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ ratio ^a	residual ratio (%) ^b
metastin(45-54)	Tyr	Asn	Trp	Gly	Arg	0.065	1.0	ND ^c
8	Tyr	Asn	Trp	Gly	Arg(Me)	0.023	0.31	ND ^c
22	D-Tyr	Asn	Trp	Gly	Arg(Me)	0.065	0.93	18.1
26	D-Tyr	Asn	Trp	azaGly	Arg(Me)	0.050	2.8	39.5
49	—	D-Tyr	Trp	azaGly	Arg(Me)	0.057	2.4	43.4
56	—	D-Tyr	D-Pya(4)	azaGly	Arg(Me)	0.27	4.8	54.9

^a EC₅₀ values of [Ca²⁺]_i increasing activities of all peptide analogues were evaluated as ratios to that of metastin(45-54). ^b Residual ratio after 60-min incubation in mouse serum at 37 °C was evaluated. ^c Not determined.

3. D-Tyr⁴⁵置換によるD-Tyr⁴⁵-Asn⁴⁶の切断回避

他の切断位置を手当てするため D-アミノ酸置換体を合成したところ、[D-Tyr⁴⁵]metastin(45-54) はアゴニスト活性を保持するとともに、45-46位間での切断を回避した。D-Tyr⁴⁵、Arg(Me)⁵³置換組み合わせ体 **22** は高いアゴニスト活性を保持するとともに、マウス血清60分処理においても原体が主成分として残存した(表1、図5)。さらなる安定

性の向上には、50-52 位間の微細な構造変換を図った上で、45-47 位間を最適化する手順を計画した。

4. azaGly⁵¹ 置換による Phe⁵⁰-azaGly⁵¹-Leu⁵² の切断回避

50-51 位間の切断回避を意図した誘導体の中で、チオアミド体 (Phe⁵⁰-ψ(CSNH)-Gly⁵¹)、アミド結合 inverse 体(Phe⁵⁰-ψ(NHCO)-Gly⁵¹)、51 位 azaGly 置換体の血中安定性が向上した。51 位 azaGly 置換体 **26** には 51-52 位間の切断も認められず、zinc metalloendopeptidases の回避も期待された。化合物 **26** は高活性であり、固相法により簡便に合成できたことから、さらなる誘導体合成を進めた(表 1、図 6)。

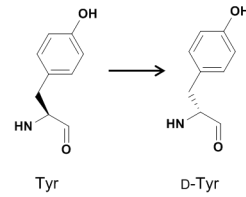
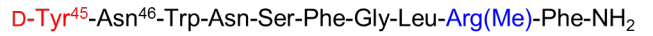


図 5 化合物 **22** の化学構造

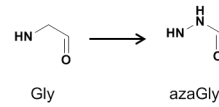


図 6 化合物 **26** の化学構造

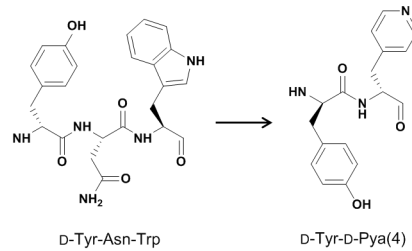
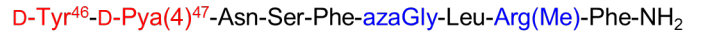


図 7 化合物 **56** の化学構造

5. Asn⁴⁶ 欠落と47位アミノ酸置換によるノナペプチド **56** の創出

化合物 **26** の 45-47 位間のアミノ酸置換体を合成したところ、アゴニスト活性を保持したデカペプチド誘導体が種々見出された。血中安定性の向上も観察され、47 位 Ser, Thr, 3-pyridylalanine (Pya(3))、D-Trp 置換体のマウス血清 60 分処理による残存率は 50%を上回った。水溶液中での安定性向上を意図した化合物 **26** の Asn⁴⁶ 欠落体 **49** は、metastin(45-54) と同等のアゴニスト活性を示した(表 1)。46-47 位を置換したノナペプチドの中で、化合物 **56** が高活性を有すると同時にマウス血清 60 分処理による残存率が 50%を越えた。化合物 **56** が目標とする活性、安定性を有することを見出した(表 1、図 7、8)。

6. 化合物 **56** の生物活性評価

メタスチンによる KISS1R を介した細胞増殖阻害作用が知られていることから、metastin(45-54)、デカペプチド誘導体、ノナペプチド誘導体の増殖阻害活性を評価した。

高いアゴニスト活性と血中安定性を示した化合物 **56** は、KISS1R を強制発現した CHO 細胞の増殖阻害活性においてもメタスチンに比較して強力な IC₅₀ 値を示した。

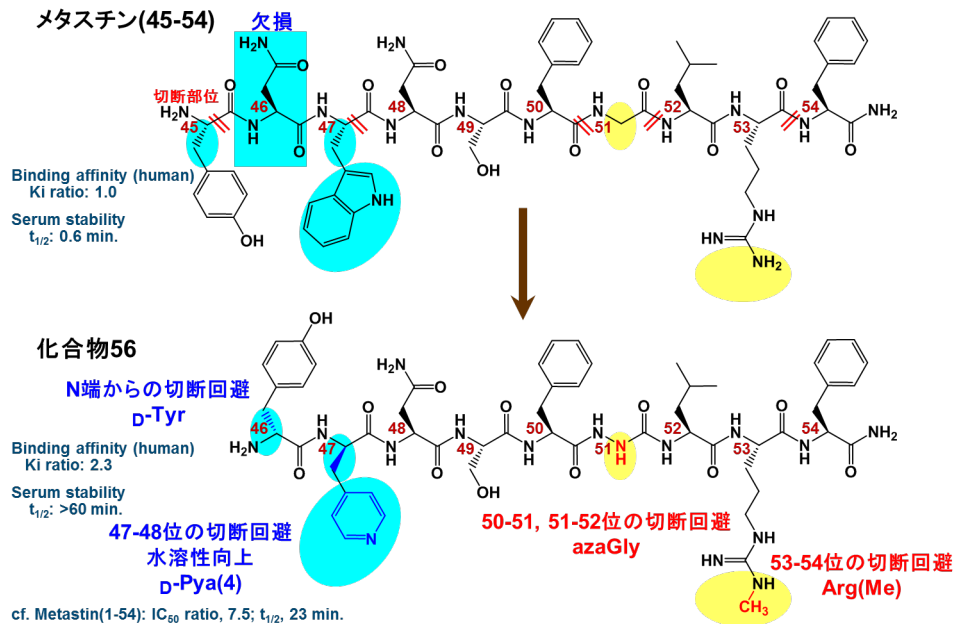


図 8 メタスチン(45-54) から化合物 **56** への構造変換

化合物 **56** の *in vivo* 活性を、未成熟雌 Wistar ラットに単回皮下投与した際の排卵誘発活性で評価した。ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) の皮下投与によって認められる排卵誘発が、メタスチンまたは化合物 **56** 投与群にも観察された。この結果は、化合物 **56** による KISS1R アゴニズムが GnRH を分泌、次いで卵胞刺激ホルモン (FSH)/黄体形成ホルモン (LH) が排卵を誘発することを示唆している。排卵誘発活性は *metastin(45-54)* 投与群には確認できず、血中安定性を付与した化合物がはじめて *in vivo* において効果的に薬理活性を発現することがわかる。

化合物 **22**、**56** を雄性ラットに浸透圧ポンプを用いて 1 週間持続投与 (2 nmol/h/rat) すると、血中テストステロンが有意に低下した。化合物 **22**、**56** を比較すると、血中安定性の向上に伴い *in vivo* 活性も向上した。化合物 **56** (2 nmol/h) の薬理作用は、高用量のメタスチン (6 nmol/h) 投与群に比較しても強力であった。この結果は、分子量がメタスチンの 1/5 程度の短鎖型誘導体に血中安定性を付与することで、天然リガンドを上回る活性を創出できることを示唆している。

化合物 **56** と、ホルモン依存性疾患治療薬として上市されている *leuprolide* との薬効を比較した。*Leuprolide* は、GnRHR のスーパーアゴニストとして GnRHR のダウンレギュレーション、下垂体の脱感作を惹起することで、血中テストステロンを低下させる。雄性 SD ラットを用いて 2 週間持続投与すると、化合物 **56** 投与群において 6 日以内に血中テストステロンが有意に低下した (図 9)。GnRHR のダウンレギュレーション、下垂体の脱感作には長期投与を要することから、*leuprolide* 投与群の 6 日後において血中テストステロンの有意な低下は認められていない。13 日後では両群ともに血中テストステロンが低下し、その活性は同程度であった。

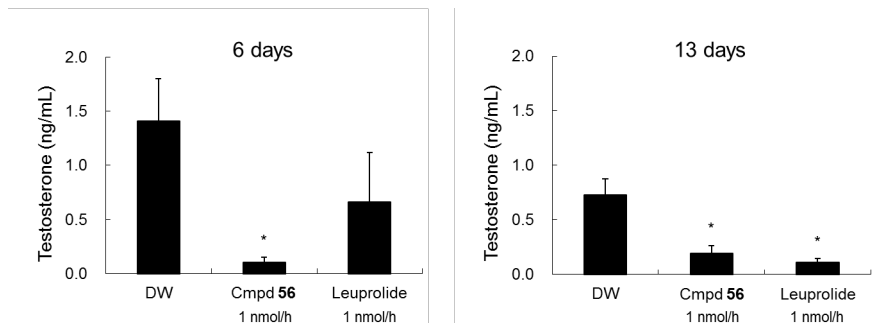


図 9 化合物 **56**、*leuprolide* の 2 週間持続投与によるテストステロン抑制活性

浅見 泰司は、*metastin(45-54)* の構造変換により、高活性・高安定性短鎖型誘導体 **56** を取得し (図 8)、さらに化合物 **56** をリード化合物として、臨床化合物 TAK-683 および TAK-448 の開発に達している (図 10)。*In vivo* において機能する化合物 **56** を用いることで、KISS1R 作動薬が GnRH 作動薬とは異なるメカニズムで、迅速かつ強力に血中テストステロンを低下させることを明確に提示した。化合物 **56** の薬理活性は、短鎖型 KISS1R 作動薬が前立腺癌などのホルモン依存性疾患の治療薬になる可能性を示した世界初の例になる。また、本研究では、ペプチドリガンドを有するオーファン GPCR の機能解明に、天然ペプチドの生体内安定性を向上させた誘導体が有用であることを示した。

以上の業績は、従来一般法のなかったオーファン

GPCR からの創薬において、極めて効果的な方法論のひとつを提示したものであり、薬学分野における医薬化学の進展に貢献し、また疾患治療の進歩にも有意に貢献するものであり、博士 (薬科学) の授与に値するものと考えられる。

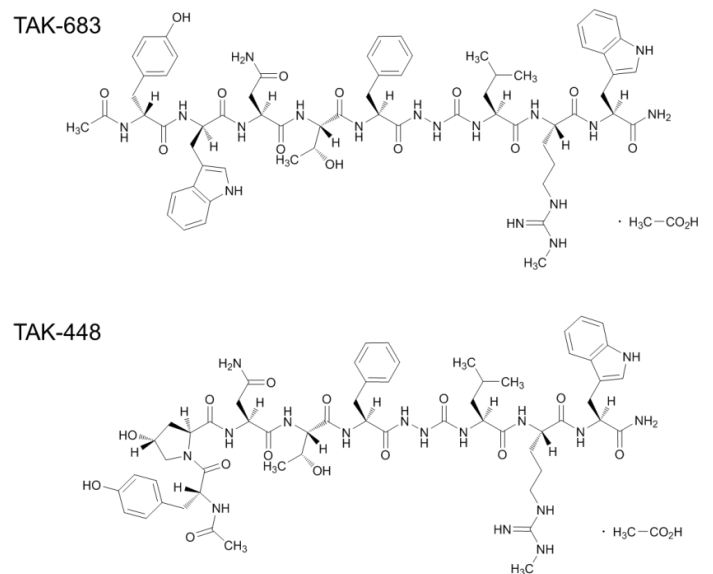


図 10 TAK-683 および TAK-448 の化学構造