

# **Ghrelin**のC末端側構造の機能解析と創薬への応用研究

2017年

諸住（若林） なおみ

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。なお、報文内容の転載許可は、出版社から取得済みである。

- 1) Naomi Morozumi, Takeshi Hanada, Hiromi Habara, Akira Yamaki, Mayumi Furuya, Takashi Nakatsuka, Norio Inomata, Yoshiharu Minamitake, Kazuhiro Ohsuye, and Kenji Kangawa. The role of C-terminal part of ghrelin in pharmacokinetic profile and biological activity in rats. *Peptides*. **2011**, 32, 1001-1007.

[第1章]

- 2) Naomi Morozumi, Seiji Sato, Sayaka Yoshida, Akira Yamaki, Mayumi Furuya, Norio Inomata, Norio Ohnuma, Yoshiharu Minamitake, Kazuhiro Ohsuye, and Kenji Kangawa. A new strategy for metabolic stabilization of motilin using the C-terminal part of ghrelin. *Peptides*. **2012**, 33, 279-284.

[第1及び2章]

- 3) Naomi Morozumi, Seiji Sato, Sayaka Yoshida, Yuriko Harada, Mayumi Furuya, Yoshiharu Minamitake, and Kenji Kangawa. Design and evaluation of novel natriuretic peptide derivatives with improved pharmacokinetic and pharmacodynamics property. *Peptides*. **2017**, 97, 16-21.

[第3章]

## 目次

序論	4
本論	6
第1章 Ghrelin改変体の構造活性相関に関する研究	6
第1節 緒言	6
第2節 実験材料及び方法	7
第1項 被験物質	7
第2項 動物	7
第3項 カルシウム動員アッセイ	7
第4項 Ghrelin、ghrelin改変体及びanamorelinのPK評価	8
第5項 ラット血漿及び肝臓ホモジェネート中でのghrelin及びghrelin(1-7)-Lys <sup>8</sup> -amideの安定性評価	9
第6項 Ghrelin、ghrelin改変体及びanamorelinのGH分泌促進活性の比較	9
第7項 統計学的解析	10
第3節 実験結果	11
第1項 Ghrelin、ghrelin改変体及びanamorelinのGHS-R アゴニスト活性	11
第2項 Ghrelin、ghrelin改変体及びanamorelinのPK評価	13
第3項 ラット血漿及び肝臓ホモジェネート中でのghrelin及びghrelin(1-7)-Lys <sup>8</sup> -amideの安定性評価	16
第4項 Ghrelin、ghrelin改変体及びanamorelinのGH分泌活性の比較	17
第5項 Ghrelin、ghrelin改変体及びanamorelinのGH分泌促進活性に対する迷走神経切断の影響の比較	19
第4節 考察	21
第5節 小括	23
第2章 Motilin/ghrelin chimeric peptidesを用いたghrelinのC末端配列の機能に関する研究	24
第1節 緒言	24
第2節 実験材料及び方法	25
第1項 被験物質	25
第2項 動物	25
第3項 カルシウム動員アッセイ	25
第4項 ラットを用いたmotilin及びmotilin/ghrelin chimeric peptidesのPK評価	25
第5項 統計学的解析	25
第3節 実験結果	26
第4節 考察	30
第5節 小括	32

第3章 GhrelinのC末端配列の機能を利用した新規C型ナトリウム利尿ペプチド誘導体の デザインと評価 .....	3 3
第1節 緒言 .....	3 3
第2節 実験材料及び方法 .....	3 5
第1項 被験物質 .....	3 5
第2項 動物 .....	3 5
第3項 Cyclic guanosine monophosphate 産生活性の測定 .....	3 5
第4項 精製中性エンドペプチダーゼを用いた <i>In vitro</i> 代謝実験 .....	3 6
第5項 ラットを用いたCNP(1-22)及びCNP/ghrelin chimeric peptidesのPK評価 .....	3 6
第6項 正常幼若マウスを用いたCNP(6-22)ghrelin(12-28)の骨伸長作用の評価 .....	3 6
第7項 統計学的解析 .....	3 7
第3節 実験結果 .....	3 8
第1項 CNP/ghrelin chimeric peptidesの受容体アゴニスト活性及びPK評価 .....	3 8
第2項 CNP(1-22)及びCNP(6-22)ghrelin(12-28) の代謝安定性の比較 .....	4 2
第3項 正常幼若マウスを用いた CNP(6-22)ghrelin(12-28)の骨伸長作用の評価 .....	4 5
第4節 考察 .....	4 7
第5節 小括 .....	4 9
総括 .....	5 0
結論 .....	5 4
謝辞 .....	5 5
引用文献 .....	5 6
Appendices .....	6 1

なお、本文中及び図表中で用いた略号は以下の通りである。

GH	: Growth Hormone
hGHRH	: Human Growth Hormone-Releasing Hormone (1-44)-amide
ANP	: Atrial Natriuretic Peptide
GLP-1	: Glucagon-Like Peptide-1
CNP	: C-type Natriuretic Peptide
GHS-R	: Growth Hormone Secretagogue Receptor Type 1a
NPR-B	: Natriuretic Peptide Receptor B
IMC	: Interdigestive Migrating Contraction
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
PBS	: Phosphate Buffered Saline
cGMP	: Cyclic Guanosine Monophosphate
PEG	: Polyethylene Glycol
hNEP	: Human Neutral Endopeptidase
HPLC	: High-Performance Liquid Chromatography
ESI-MS	: Electrospray Ionization-Mass Spectrometry
LC-MS	: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
RIA	: Radioimmunoassay
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
CHO	: Chinese Hamster Ovary Cells
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	: Intracellular Calcium Ion Concentration
EC <sub>50</sub>	: Half Maximal Effective Concentration
PK	: Pharmacokinetics
PD	: Pharmacodynamics
AUC	: Area Under the Plasma Drug Concentration-Time Curve
MRT	: Mean Residence Time
V <sub>dss</sub>	: Volume of Distribution at Steady State
T <sub>1/2</sub>	: Plasma Half-Life
iv	: Intravenous
SD	: Standard Deviation

## 序論

Ghrelinは、成長ホルモン分泌促進因子レセプター1a (Growth Hormone Secretagogue Receptor type 1a : 以下、GHS-R) の内因性リガンドである。主に胃粘膜で産生され、脳下垂体から成長ホルモン (以下、GH) の分泌を亢進させる脳-消化管ペプチドの一つであると共に、今まで知られている中で唯一の末梢で産生される摂食促進ペプチドでもある [1, 2]。他にも、体重増加作用、体脂肪増加作用、消化管運動亢進作用及び心機能改善作用等、多岐に亘る活性が報告されており、生体が恒常性を維持する上で重要な役割を果たしていると考えられている [2]。

Ghrelinは1999年に児島、寒川らによってラットとヒトの胃から単離され、構造が決定された。ヒト型ghrelinは、アミノ酸28残基からなるペプチドであり、N末端から3番目のSer残基がオクタン酸に代表される脂肪酸でアシル化された構造を有している [3]。このような疎水性修飾構造を有する生理活性ペプチドは極めて珍しく、生体から単離されたペプチドホルモンとしては、現在までghrelin以外には報告がない [4]。

Table 1 に示す様に、これまでラットとヒト以外にも、マウス、ブタ、ウシ、ウマ等をはじめとした様々な動物種でghrelinの一次構造が決定されている [2]。中でも哺乳類においてはghrelinの一次構造は極めて類似しており、いずれの動物種においても3位のSer残基の側鎖水酸基がオクタン酸やデカン酸等の脂肪酸によりアシル化されている他、お互いに種を超えてGHS-Rアゴニストとして作用しうることが判っている。これまでの先行研究で、GHS-Rアゴニストとしての活性責任部位はアシル基を含むN末端側の構造付近にあることが判明している。その為、構造活性相関に関する研究の多くはN末端側の構造を中心としたものであり [5, 6, 7]、C末端側構造に着目した研究は限定されたものに過ぎず、その生理学的意義についても未だ不明な点が多い [8]。

筆者は、受容体アゴニスト活性の発現には直接的に寄与しないと考えられるghrelinのC末端側のペプチド配列が幅広い動物種間で極めて相溶性が高いことに着目し、C末端側のペプチド部分についてもこれまで未解明ではあるが、生理的には重要な機能があると推測し、その解明と応用を目的として研究を開始した。

すなわち、本研究の目的は、ghrelinのC末端配列の持つ機能の一端を明らかにするとともに、見出された特性を医薬品開発に応用する可能性を提示することである。

**Table 1 Amino acids sequences of endogenous ghrelin from various animal species**

Animal species	Amino acid sequences (One-letter codes for amino acids)
Human	<u>GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR</u> <u>GSSFLSPEHQRVQ-RKESKKPPAKLQPR</u>
Monkey	<u>GSSFLSPEHQRAQQRKESKKPPAKLQPR</u>
Cattle	<u>GSSFLSPEHQRLQ-RKEAKKPSGRLKPR</u> <u>GSSFLSPEHQRLQ-RKEPKKPSGRLKPR</u>
Horse	<u>GSSFLSPEHHRVQHRKESKKPPAKLKPR</u>
Swine	<u>GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPAAKLKPR</u>
Dog	<u>GSSFLSPEHQRLQQRKESKKPPAKLQPR</u>
Deer	<u>GSSFLSPEHQRLQ-RKEPKKPSGRLKPR</u> <u>GSSFLSPDHQRLQ-RKEPKKPSGRLKPR</u>
Sheep	<u>GSSFLSPEHQRLQ-RKEPKKPSGRLKPR</u>
Gout	<u>GSSFLSPEHQRLQ-RKEPKKPSGRLKPR</u>
Cat	<u>GSSFLSPEHQRVQ-RKESKKPPAKLQPR</u>
Rabbit	<u>GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPAAKLKPR</u>
Rat	<u>GSSFLSPEHQRAQQRKESKKPPAKLQPR</u> <u>GSSFLSPEHQRAQ-RKESKKPPAKLQPR</u> <u>GSSFLSPEHQRTQQRKESKKPPAKLQPR</u>
Whale	<u>GSSFLSPEHQRLQ-RKEAKKPSGRLKPR</u>
Turkey	<u>GSSFLSPAYKRIQQQKDTRKPTARLHPR</u>
Chicken	<u>GSSFLSPTYKRIQQQKDTRKPTARLHRR</u> <u>GSSFLSPTYKRIQQQKDTRKPTARLH</u> <u>GSSFLSPTYKRIQQQKDTRKPTAR</u>
Turtle	<u>GSSFLSPEYQRTQQRKDPKKHTK-LNRR</u>
Frog	<u>GLTFLSPADMQKIAERQSQNKLRHGNMNR</u> <u>GLTFLSPADMQKIAERQSQNKLRHGNMN</u> <u>GLTFLSPADMQKIAERQSQNKLRHGNM</u>
Eel	<u>GSSFLSPS-QRRQG-KD-KKP-PRVGRR</u> <u>GSSFLSPS-QRRQG-KD-KKP-PRV-amide</u>
Catfish	<u>GSSFLSPT-QKRQNR-GDRKPP-RVGRR</u> <u>GSSFLSPT-QKRQNR-GDRKPP-RVG</u> <u>GSSFLSPT-QKRQNR-GDRKPP-RV-amide</u>
Shark	<u>GVSFHPRLKEKDDNSSGNSRKSNPKR</u>

S,T : fatty acid acylation site

Underlined part : defined as C terminal moiety of ghrelin this study which is non-responsible for ghrelin agonist activity

- : deletion of one amino acid

## 第1章 Ghrelin改変体の構造活性相関に関する研究

### 第1節 緒言

第1章では、ghrelin改変体のPharmacokinetics（以下、PK）プロファイルとGH分泌促進作用に関するPharmacodynamics（以下、PD）解析に焦点を当てた研究の結果について述べる。

本研究において解析の対象としたghrelinのC末端配列とは、ghrelinの12-28位のアミノ酸配列全体またはその一部を指す。先行研究において、ghrelinの11位以降の配列を欠失させた時の受容体アゴニスト活性への影響は軽微であること、並びに、ヒト型とラット型のghrelinでは12-13位の配列 [ ヒト ; Val<sup>12</sup> - Gln<sup>13</sup> vs ラット ; Ala<sup>12</sup> - Gln<sup>13</sup> または Ala<sup>12</sup> - Thr<sup>13</sup> 、 Table 1 参照 ] が異なるが、ラット型GHS-R受容体に対するアゴニスト活性はほぼ同等であるが報告されている [6]。もともと、12位から14位の構造は、哺乳類を含めた動物種間で配列相同性が最も低い部分であり、ラットを含めた一部の種では14位のGln残基が欠落したペプチド [ des-Gln<sup>14</sup>-ghrelin ] も見出され、14位のGln残基の有無は受容体アゴニスト活性や*In vivo*でのGH分泌促進作用にほとんど影響を及ぼさないことも報告されている [9]。これらのことから、試験を開始するに当たり、ghrelinのC末端配列の中でも12位から14位の配列については、その一部を改変、あるいは欠失させた場合でもghrelinとしての基本的な性質は大きく変わらないものと予想した。

なお、本報告においてghrelin改変体とは、ghrelinの一部構造を欠失させたghrelinの断片ペプチドとghrelin断片ペプチドの配列の一部を置換したペプチド ; ghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amideの総称として用いた。また、試験内で用いたghrelin、desacyl-ghrelin及びghrelin改変体は、特に記載がない限り、すべてヒト型ghrelin配列由来のペプチド及びその改変体を意味する。



## 第2節 実験材料及び方法

### 第1項 被験物質

ヒト型配列のghrelinは、3位がオクタノイル化されたN末端側7残基部分（化学合成ペプチド）と遺伝子組み換え大腸菌を用いて製造したC末端側の21残基部分（遺伝子組換えペプチド）を結合させる半合成法で作製した [10]。Desacyl-ghrelin及びghrelin 改変体はいずれも固相合成法で化学合成した。すべてのペプチドは High-Performance Liquid Chromatography（以下、HPLC）法で精製し、最終品の純度はいずれも90%以上であった。ペプチドの構造確認は、エレクトロスプレーイオン化質量分析（以下、ESI-MS）、アミノ酸組成分析及びアミノ酸配列分析のいずれか、またはその組み合わせによって実施した（詳細はAppendicesに記載）。

GhrelinのN末端側構造を模倣したGHS-Rの低分子アゴニストの一つである anamorelin hydrochloride (JAN/USAN)（以下、anamorelin）は、Paul らの報告 [11] に従って化学合成した。ヒト型成長ホルモン放出ホルモン（hGHRH(1-44)-amide、以下、hGHRH）は市販品（株式会社ペプチド研究所）を用いた。

なお、本章において個々のアミノ酸の名称は、特に記載がない限り本文中では3文字略号で、Table 中では1文字略号で記載した。

### 第2項 動物

本研究は、アスピオファーマ株式会社の動物実験倫理委員会によって審査され、総括責任者の承認を受けて、動物実験実施基準に従い実施した。

6～7週齢のSprague-Dawley系ラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し、12時間毎の明暗周期（7時から19時までが明期）の下で飼育した。餌と水は自由に摂取させた。すべての動物は、所定の検疫・予備飼育期間を経過した後に7～8週齢で実験に供した。

なお、雄性ラットにおいて、GHは3～4時間毎に下垂体よりパルス状に分泌される。薬理作用として血漿中GH濃度を測定する際には、内因性のGH分泌と投薬によって誘発されたGH分泌とを区別することが困難な為、GHS-Rアゴニスト活性を有する被験物質をラットに投薬する試験においては、内因性の血漿中GH濃度の変動が少ない雌性ラットを用い、それ以外の試験では、一般的に汎用される雄性ラットを用いた。

### 第3項 カルシウム動員アッセイ

Ghrelin 及び ghrelin 改変体の GHS-R アゴニスト活性は、ラット型 GHS-R を安定発現させた chinese hamster ovary cells（以下、CHO 細胞）を用いたカルシウムイオン（以下、Ca<sup>2+</sup>）動員アッセイ法で測定した [3,9]。Assay plate として flat-bottom black 96-well plates を用い、GHS-R 発現細胞を 4×10<sup>4</sup>cells/well の濃度で播いて一日培養した。Assay buffer として、Hanks' Balanced Salts Solution (Hanks' buffer) を用いた。Ca 染色液 (FRIPR Calcium 3 Assay kit, Component A, Molecular Devices Corporation) を 20 mM HEPES、2.5 mM probenecid 及び 0.1% bovine serum

albumin を含有した Hanks' buffer に溶解して各 well に添加し、1 時間放置した。被験物質は蒸留水に溶解後に Hanks' buffer にて所定濃度となるよう希釈したものを assay plate に添加した。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 (以下、 $[Ca^{2+}]_i$ ) の変化は FlexStation™ (Molecular Devices Corporation) を用いて測定した。測定時間を 2 分間とし、得られた結果を SOFTmax™ PRO (Molecular Devices Corporation) で解析した。EC<sub>50</sub> 値は Deltasoft III Ver. 2.247 (Dr. E. Bechtold and BioMetallics, Inc.) を用いて算出した。

#### 第 4 項 Ghrelin、ghrelin 改変体及び anamorelin の PK 評価

雌性 Sprague-Dawley 系ラットに ghrelin、C 末端側欠失型 ghrelin 改変体 [ghrelin(1-26)、ghrelin(1-20) 及び ghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amide] または anamorelin を静脈内投与したときの血漿中濃度推移を測定した。

予め、ペントバルビタール麻酔を施したラットの大腿動脈内に採血用カニューレを挿入した後に、被験物質のいずれか一つを各個体の尾静脈内に投与した。その際、ghrelin、ghrelin(1-26)、ghrelin(1-20) 及び anamorelin の投与量は 10 nmol/kg とし、ghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amide の投与量は 300 nmol/kg とした。被験物質を投与したラットから経時的に採血し、採取した血液には抗凝固剤として 1/100 容量の 10% ethylenediaminetetraacetic acid (以下、EDTA) 溶液を添加した。さらに、ghrelin または ghrelin 改変体を投与した個体から採取した血液には、脱アシル化反応を抑制する為に血液の 1/50 容量の 500 mM ペファブロック SC (AEBSF) (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社) を加えて遠心分離 (12,000 rpm × 5 min, 4 °C) で血漿とした後に、1/10 容量の 1 N HCl を加え、使用時まで -80°C 設定の冷凍庫内で凍結保存した。

Ghrelin または C 末端側欠失型 ghrelin 改変体投与後の血漿中 ghrelin 免疫活性濃度は、Ser<sup>3</sup>(O-n-octanoyl) を含む N 末端側構造を特異的に認識するウサギ抗血清を用いて [<sup>125</sup>I]-標識 [Tyr<sup>29</sup>]-rat ghrelin との競合 radioimmunoassay (以下、RIA) 法で測定した。定量限界は 0.03 pmol/mL であった。投与前の血漿中濃度 (内因性グレリン濃度) と投与後の血漿中濃度との差 (増分) を求め、その増分を血漿中濃度と表記した。

血漿中 anamorelin 濃度は液体クロマトグラフィー質量分析 (以下、LC-MS) 法 (使用機器: API5000, Applied Biosystems/MDS SCIEX) により測定した。

血漿中濃度-時間曲線下面積 (以下、AUC)、及び平均滞留時間 (以下、MRT) は WinNonlin Professional Version 4.0.1 (Pharsight Corporation) の Noncompartment model を用いて算出した。消失半減期は血漿中濃度の消失相における数点を結ぶ直線の傾きから、最小二乗法により算出した。

N 末端側欠失型 ghrelin 改変体の血漿中濃度推移についても同様の方法で評価した。その際、試験系として雄性 Sprague-Dawley 系ラットを用いた。被験物質は desacyl-ghrelin、ghrelin(13-28)、ghrelin(15-28) 及び ghrelin(17-28) とし、投与量は 6 nmol/kg とした。採取した血液には抗凝固剤として 1/100 容量の 10% EDTA 溶液及び代謝代謝阻害剤として 1/50 容量の 5000 U/ml aprotinin 溶液 (ナカライテスク株式会社) を添加したのちに遠心分離で血漿とした。採取した血漿試料は使用時まで、-80°C 設定の冷凍庫内で凍結保存し、血漿中 ghrelin 免疫活性濃度は、ghrelin の C 末端配列を特

異的に認識するウサギ抗血清を用いて [<sup>125</sup>I]-標識 [Tyr<sup>12</sup>]-rat ghrelin(12-28)との競合RIA法にて測定した。定量限界は0.02-0.05 pmol/mL であった。

#### 第5項 ラット血漿及び肝臓ホモジェネート中でのghrelin及びghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amideの安定性評価

Ser<sup>3</sup>(O-n-octanoyl) を含むN末端側構造 (GHS-Rアゴニスト活性の責任部位) の代謝安定性に及ぼすghrelinのC末端配列の影響を調べるために、ラット血漿及び肝臓ホモジェネート中でghrelin及びghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amideをインキュベートしたときのghrelin免疫活性濃度変化を測定した。

雄性Sprague-Dawley系ラットより採取した肝臓組織に生理食塩水を加えてポリトロンホモジナイザー (株式会社セントラル科学貿易) で破砕・均一化して、0.1 (w/v)% 肝臓ホモジェネートを調製した。0.1 (w/v)% 肝臓ホモジェネートあるいはEDTA添加ラット血漿に、ghrelinまたはghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amideを0.15 nmol/mLの濃度になるように添加し、37°Cの水浴中で保温し、添加直後から保温開始から最大60分後まで経時的に試料の一部を採取した。採取した試料に1/10容量の1 N HCl を加えて脱アシル化反応を停止させ、Ser<sup>3</sup>(O-n-octanoyl) を含むN末端側構造を特異的に認識するウサギ抗血清を用いた [<sup>125</sup>I]-標識 [Tyr<sup>29</sup>]-rat ghrelinとの競合RIA法により、ghrelin免疫活性濃度を測定した。

#### 第6項 Ghrelin、ghrelin改変体及びanamorelinのGH分泌促進活性の比較

雌性Sprague-Dawley系ラットを用いてghrelin、ghrelin改変体 [ghrelin(1-26)、ghrelin(1-20)、ghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amide] 及びanamorelinのGH分泌促進作用を検討した。

実験方法は第4項のPK評価試験に準じ、ペントバルビタール麻酔下のラットに被験物質を静脈内投与した。その際、ghrelin及びghrelin(1-26)の投与量は、1、3、10及び30 nmol/kg、ghrelin(1-20)及びanamorelinの投与量は、3、10、30及び100 nmol/kg、ghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amideの投与量は、30及び300 nmol/kgとした。投与前から投与30分後まで経時的に採血し、1/100容量の10% EDTA溶液を加えた後に遠心分離で血漿を分取した。血漿中GH濃度は市販のELISA Kit (Rat/Mouse Growth Hormone ELISA, EZRMGH-45K, Millipore Co.) を用いて測定し、台形法にてAUCを算出した。

次いで、ペントバルビタール麻酔下の雌性Sprague-Dawley系ラットを用いてGH分泌促進作用の発現における迷走神経を介した情報伝達経路の寄与について確認した。予め、頸部両側で迷走神経を切断し [1, 12]、その約30分後にghrelin、ghrelin(1-20)、anamorelinまたはhGHRHのいずれかを尾静脈内に投与した。投与量はghrelin及びghrelin(1-20)を10 nmol/kg、anamorelinを30 nmol/kg、hGHRHを1 nmol/kgとし、対照群には迷走神経の露出までを操作したsham operation (以下、Sham Ope) 群を設定し、それぞれ同用量の被験物質を投与した。投与前から投与30分後まで経時的に採血し、先の記載と同様の方法で血漿中GH濃度を測定、台形法にてAUCを算出した。

## 第7項 統計学的解析

得られた個別データをもとに平均値と標準偏差を算出した。

各被験物質を投与したときの血漿中GH濃度に基づいて算出されたAUCについて、迷走神経を切断した群とSham Ope群の間で、Student's t-test (EXSUS version 7.6.0.1、Arm SystexCo., Ltd.)を用いて有意差検定を行った。その際、p値が0.05 未満の場合に統計学的に有意差があると判断した。

### 第3節 実験結果

本検討に用いた ghrelin、desacyl-ghrelin 及び ghrelin 改変体のアミノ酸配列、並びに anamorelin の化学名（脚注に構造式）を Table 2 に示す。

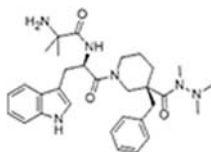
**Table 2 Amino acids sequences of ghrelin and ghrelin analogs or chemical structure of anamorelin**

Test compounds	Amino acids sequences <sup>a</sup> or chemical structure
Anamorelin <sup>#</sup>	[1-(2-Methylalanyl)-d-tryptophyl]-3-benzylpiperidine-3(R)-carboxylic acid trimethylhydrazide
Ghrelin	GSS*FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR
Ghrelin(1-26)	GSS*FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQ
Ghrelin(1-20)	GSS*FLSPEHQRVQQRKESKK
Ghrelin(1-7)-Lys <sup>8</sup> -amide	GSS*FLSPK - amide
Desacyl-ghrelin	GSS*FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR
Ghrelin(13-28)	QQRKESKKPPAKLQPR
Ghrelin(15-28)	RKESKKPPAKLQPR
Ghrelin(17-28)	ESKKPPAKLQPR

a One-letter amino acid notation is used.

S\* Modified with n-octanoic acid

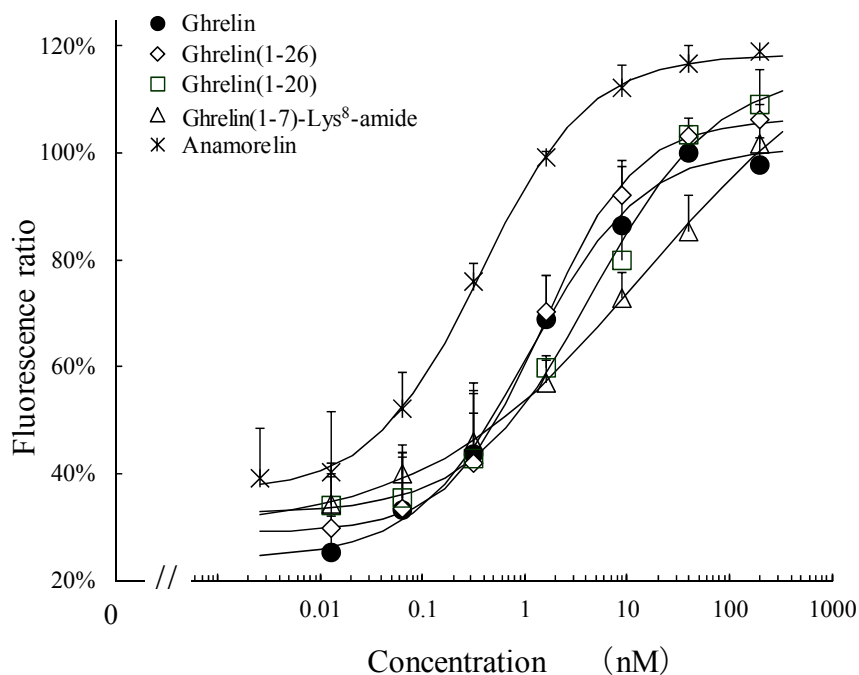
# Chemical structure of anamorelin



#### 第1項 Ghrelin、ghrelin改変体及びanamorelinのGHS-R アゴニスト活性

ラット型 GHS-R を安定発現させた CHO 細胞を用いて ghrelin、ghrelin 改変体及び anamorelin のアゴニスト活性を測定し、EC<sub>50</sub> 値を算出した。濃度作用曲線を Fig. 1 に、EC<sub>50</sub> 値を Table 3 に示す。なお、desacyl-ghrelin 及び N 末端側欠失型 ghrelin 改変体は活性責任配列である N 末端側の構造を欠失していることから、GHS-R 活性を有しないことが明らかであったため、アゴニスト活性を測定しなかった。

Ghrelin は GHS-R 発現細胞において [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を用量依存的に上昇させ、EC<sub>50</sub> 値は 1.12 nM であった。ghrelin(1-26)、ghrelin(1-20)及び ghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amide の EC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 1.50、4.61 及び 13.9 nM であり、ペプチド鎖が短くなるにつれてわずかに大きくなった。C 末側配列の欠失により活性が低下する傾向はあるものの、いずれのペプチドもフルアゴニスト活性を有していると考えられる。Anamorelin の EC<sub>50</sub> 値は 0.369 nM であり、ghrelin よりも活性が約 3 倍高かった。



**Fig. 1 Dose–response relationships of ghrelin, the C-terminal-deleted ghrelin analogs and anamorelin for the changes in  $[Ca^{2+}]_i$  in CHO cells expressing rat GHS-R**

The basal  $[Ca^{2+}]_i$  without the compound and the maximum increase in  $[Ca^{2+}]_i$  by ghrelin were regarded as 0 and 100%, respectively. Each value represents the mean±SD of triplicate determinations.

[Peptides. 2011; 32: 1001-1007. Fig.1 - 一部改変 - ]

**Table 3  $EC_{50}$  values of ghrelin, the C-terminal-deleted ghrelin analogs and anamorelin in  $[Ca^{2+}]_i$  increasing responses in CHO cells expressing rat GHS-R**

Test compounds	$EC_{50}^a$ (nM)
Anamorelin	0.369
Ghrelin	1.12
Ghrelin(1–26)	1.50
Ghrelin(1–20)	4.61
Ghrelin(1-7)-Lys <sup>8</sup> -amide	13.9

a  $EC_{50}$  value was calculated based on triplicate determinations (Fig. 1).

## 第2項 Ghrelin、ghrelin改変体及びanamorelinのPK評価

ラットに ghrelin、C 末端側欠失型 ghrelin 改変体及び anamorelin を静脈内投与した後の血漿中濃度 - 時間曲線を Fig.2 に、PK パラメータ ( $AUC_{0-\infty}$ 、 $MRT_{0-\infty}$ 及び $T_{1/2}$ ) を Table 4 に示す。

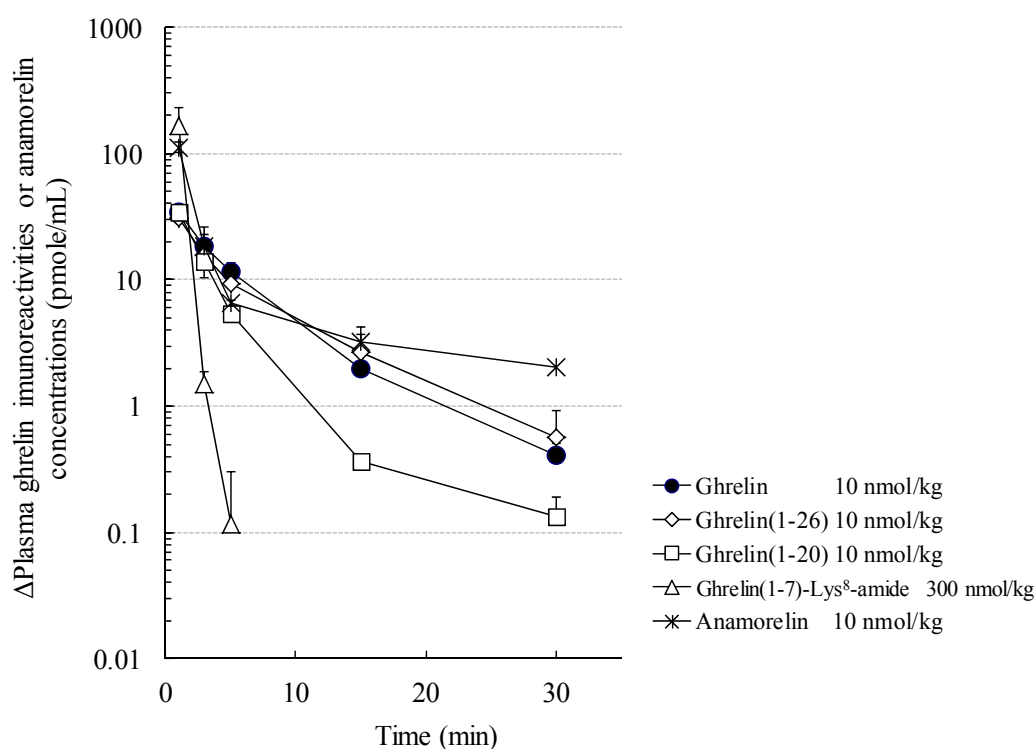
Ghrelin(1-26)を 10 nmol/kg の用量で投与した後の血漿中濃度は、同用量の ghrelin を投与したときとほぼ同様に推移した。Ghrelin 及び ghrelin(1-26)の  $MRT_{0-\infty}$ は  $5.70\pm 0.74$  分 (平均値±標準偏差、以下同じ) 及び  $6.75\pm 1.72$  分、消失半減期は  $8.5\pm 1.2$  分及び  $8.1\pm 2.3$  分であり、両者で明らかな差はなかった。このことから、C 末端 2 残基の欠失は ghrelin の PK プロファイルにほとんど影響を及ぼさないと考える。

Ghrelin(1-20)を 10 nmol/kg の用量で投与した後の血漿中濃度は、投与直後から投与 15 分後までは ghrelin を投与したときよりも低く推移し、 $MRT_{0-\infty}$ は  $4.18\pm 1.07$  分と ghrelin よりもやや短かく、投与 15 分後以降の血漿中濃度推移から算出した消失半減期は  $14.4\pm 4.0$  分となり、ghrelin と比較して明らかな差はなかった。

Ghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amide を 300 nmol/kg の用量で投与した後の血漿からの ghrelin 免疫活性濃度の消失は極めて速く、MRT は  $0.23\pm 0.03$  分、消失半減期は  $0.4\pm 0.1$  分であり、投与 10 分後にはすでに検出限界以下にまで低下していた。

Anamorelinを 10 nmol/kgの用量で投与した後の血漿中濃度は二相性を示し、総じてghrelinと同等かやや高い濃度で推移した。MRTは $6.33\pm 3.64$ 分とghrelinとの差は認められず、消失相の半減期は $21.2\pm 0.2$ 分とghrelinよりも長かった。

以上、ghrelin の C 末端配列を欠失させた改変体の PK プロファイルは、C 末端側 2 残基の欠損では ghrelin と変わらず、21-26 位の欠失で投与直後の血漿中濃度が ghrelin よりも低くなった。8-20 位の欠失は PK プロファイルに大きな影響を及ぼし、ghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amide の消失半減期は ghrelin よりも 10 倍以上短くなり、速やかに血漿中から消失した。このことから、ghrelin の C 末 8 位以降の構造は、3 位のアシル化部位の脱アシル化反応とペプチドの血漿からの消失に対して抑制的に作用する可能性が認められた。



**Fig. 2 Plasma ghrelin immunoreactivities or anamorelin concentrations after a single intravenous (iv) administration of ghrelin, the C-terminal-deleted ghrelin analogs or anamorelin in anesthetized rats.**

Each value represents the mean + SD of 3 rats.

[Peptides. 2011; 32: 1001-1007. Fig.2 - 一部改変 - ]

**Table 4 PK parameters of ghrelin immunoreactivities or anamorelin after a single iv administration of ghrelin, the C-terminal-deleted ghrelin analogs or anamorelin in anesthetized rats.**

Test compounds	Dose (nmol/kg)	AUC <sub>0-∞</sub> (pmol·min/mL)	MRT <sub>0-∞</sub> (min)	T <sub>1/2</sub> (min)
Ghrelin	10	214±31	5.70±0.74	8.5±1.2
Ghrelin(1-26)	10	201±32	6.75±1.72	8.1±2.3
Ghrelin(1-20)	10	150±13	4.18±1.07	14.4±4.0
Ghrelin(1-7)-Lys <sup>8</sup> -amide	300	1131±594	0.23±0.03	0.4±0.1
Anamorelin	10	471±4	6.33±3.64	21.2±0.2

MRT<sub>0-∞</sub> = AUMC<sub>0-t</sub> + Clast / λz

MRT<sub>0-∞</sub> = AUMC<sub>0-∞</sub> / AUC<sub>0-∞</sub>

AUMC : Area under the first moment plasma concentration-time curve.

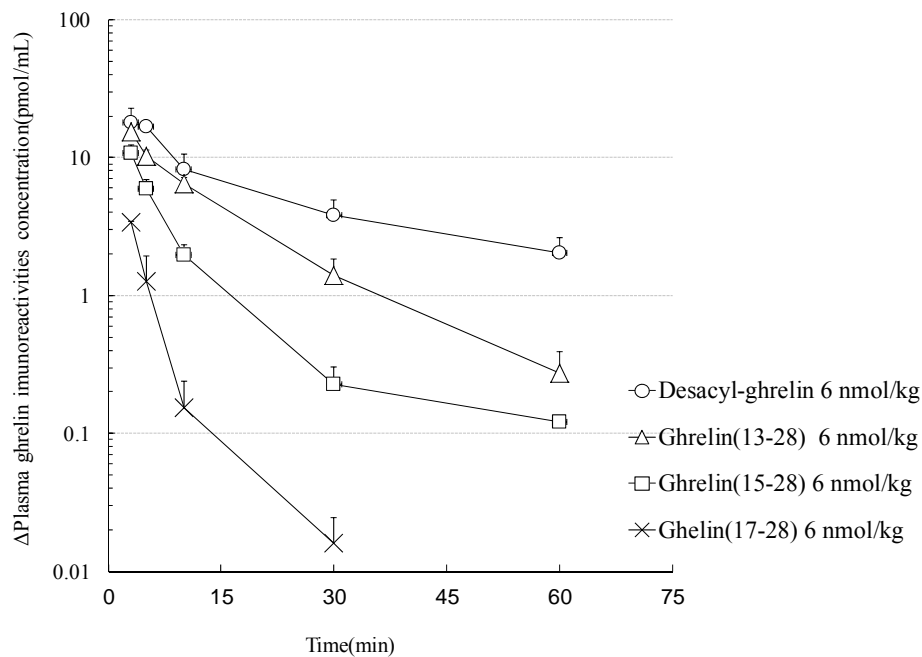
Each value represents the mean + SD of 3 rats.



次いで、ラットに desacyl-ghrelin 及び N 末端側欠失型 ghrelin 改変体 [ghrelin(13-28)、ghrelin(15-28)及び ghrelin(17-28)] を 6 nmol/kg の用量で静脈内投与したときの血漿中 C 末端側 ghrelin 免疫活性濃度推移を評価した。血漿中濃度 - 時間曲線を Fig.3 に、消失半減期 ( $T_{1/2}$ ) を Table 5 に示す。

Desacyl-ghrelin の血漿からの消失半減期は  $24.8 \pm 0.4$  分と ghrelin の  $8.5 \pm 1.2$  分よりも約 3 倍長く、ghrelin(13-28)及び ghrelin(15-28)の消失半減期は  $10.8 \pm 1.2$  分及び  $8.9 \pm 5.5$  分と、ghrelin とほぼ同等かそれより長かった。それらと比較して、ghrelin(17-28)を投与したときの血漿からの消失は速く、消失半減期は  $3.5 \pm 0.3$  分であった。

以上、N 末端側欠失型 ghrelin 改変体をラットに静脈内投与したときの血漿中濃度の消失は、ペプチド鎖の長さに依存して変化した。特に、1-12 位または 1-14 位を欠失させた時と比べて、15-16 位の [Arg<sup>15</sup>-Lys<sup>16</sup>] を含む 1-16 位を欠失させた時の影響が大きく、血漿中からの消失半減期が著しく短縮することがわかった。本試験で評価したペプチドはいずれもアシル化部位を持たないことから、これらの影響はペプチドの血漿からの消失速度の違いを反映したものと考えられる。



**Fig. 3 Plasma ghrelin immunoreactivities after a single iv administration of ghrelin or the N-terminal-deleted ghrelin analogs at 6 nmol/kg to anesthetized rats.**

Each value represents the mean $\pm$ SD of 3 rats. Ghrelin immunoreactivity was determined by RIA using antiserum recognizing the C-terminal region.

[Peptides. 2012; 33: 279-284. Fig.2 - 一部改変 - ]

**Table 5 Plasma half-lives of ghrelin immunoreactivities after a single intravenous administration of desacyl-ghrelin and the N-terminal-deleted ghrelin analogs in anesthetized rats.**

Test compounds	T <sub>1/2</sub> (min)
Desacyl-ghrelin	24.8 ± 0.4
Ghrelin(13-28)	10.8 ± 1.2
Ghrelin(15-28)	8.9 ± 5.5
Ghrelin(17-28)	3.5 ± 0.3

T<sub>1/2</sub>: plasma half-lives

Each value represents the mean ± SD of 3 rats.

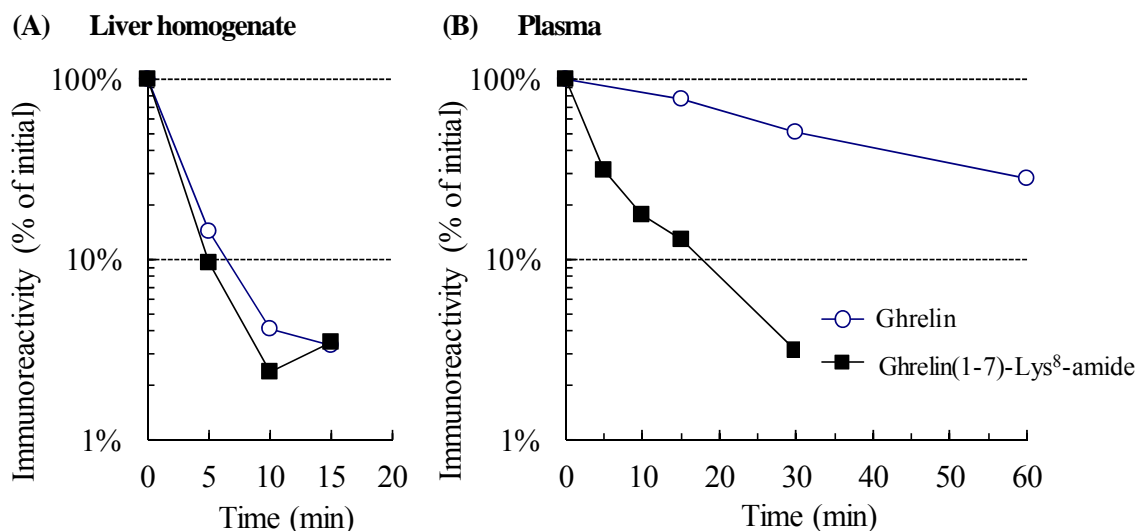
Ghrelin改変体のPKプロファイルを評価した結果、C末端側を欠失させたghrelin改変体において、8-20位までの構造が欠失することで消失半減期が著しく短縮することがわかった。一方で、N末端を欠失させたghrelin改変体においては、15-16位を含む構造を欠失させたときの消失半減期の短縮が著しかった。両結果を考え合わせると、15-20位の配列部分の有無がghrelinのPKプロファイルに大きな影響を及ぼす可能性があると考えられた。

### 第3項 ラット血漿及び肝臓ホモジェネート中でのghrelin及びghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amideの安定性評価

GHS-Rアゴニストの活性責任配列であるN末端部分の代謝安定性に及ぼすghrelinのC末端配列の影響を評価する目的で、ラットの血漿と 0.1 (w/v)% 肝臓ホモジェネート溶液中でのghrelinと ghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amideの代謝安定性を比較した。得られた結果は、反応開始時の試料中N末端 ghrelin免疫活性濃度を100%としたときの相対濃度として表記した。結果をFig.4に示す。

肝臓ホモジェネート中におけるghrelin及びghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amideの代謝はどちらも速やかであり、両ペプチドで代謝速度に差はなかった。一方で、血漿中における代謝安定性には明確な差が認められ、ghrelinを37°Cで30分間インキュベートした後でも、反応開始時の70%に相当する量が残存していたのに対し、ghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amideの代謝は速やかであり、反応開始時の約3%に相当する量しか残存していなかった。

血漿中において、ghrelinは、Ser<sup>3</sup>(O-n-octanoyl)のエステル結合が加水分解(脱アシル化)されて desacyl-ghrelinとなることでGHS-Rアゴニスト活性を消失するものと考えられる [13]。本試験において、試料中濃度の測定はアシル化部位周辺を認識するN末端認識RIA法を用いていることから、免疫活性濃度の低下は、主には上記の脱アシル化の反応速度を反映したものである。Ghrelin と ghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amideでは、どちらも抗体認識部位の構造は同じであり、肝臓ホモジェネート中での代謝はほぼ同じ速度で進行したにも関わらず、血漿中での代謝安定性には両ペプチドで明確な差が認められ、ghrelinと比較してghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amideの代謝は速やかであることがわかった。これらのことから、血漿中においてghrelinのC末端側の構造があることでN末端側のアシル化部位の脱アシル化(代謝)速度が低下するものと考えられる。



**Fig. 4 Stability of ghrelin and ghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amide in 0.1% rat liver homogenates (A) and plasma (B).** The hydrolysis of octanoylated Ser<sup>3</sup> was assessed by RIA using antiserum against N-terminal part of ghrelin. The initial immunoreactivity was regarded as 100%, and % changes after the incubation at 37 °C were analyzed. Each value represents the mean of two experiments.

[Peptides. 2011; 32: 1001-1007. Fig.3 - 一部改変 - ]

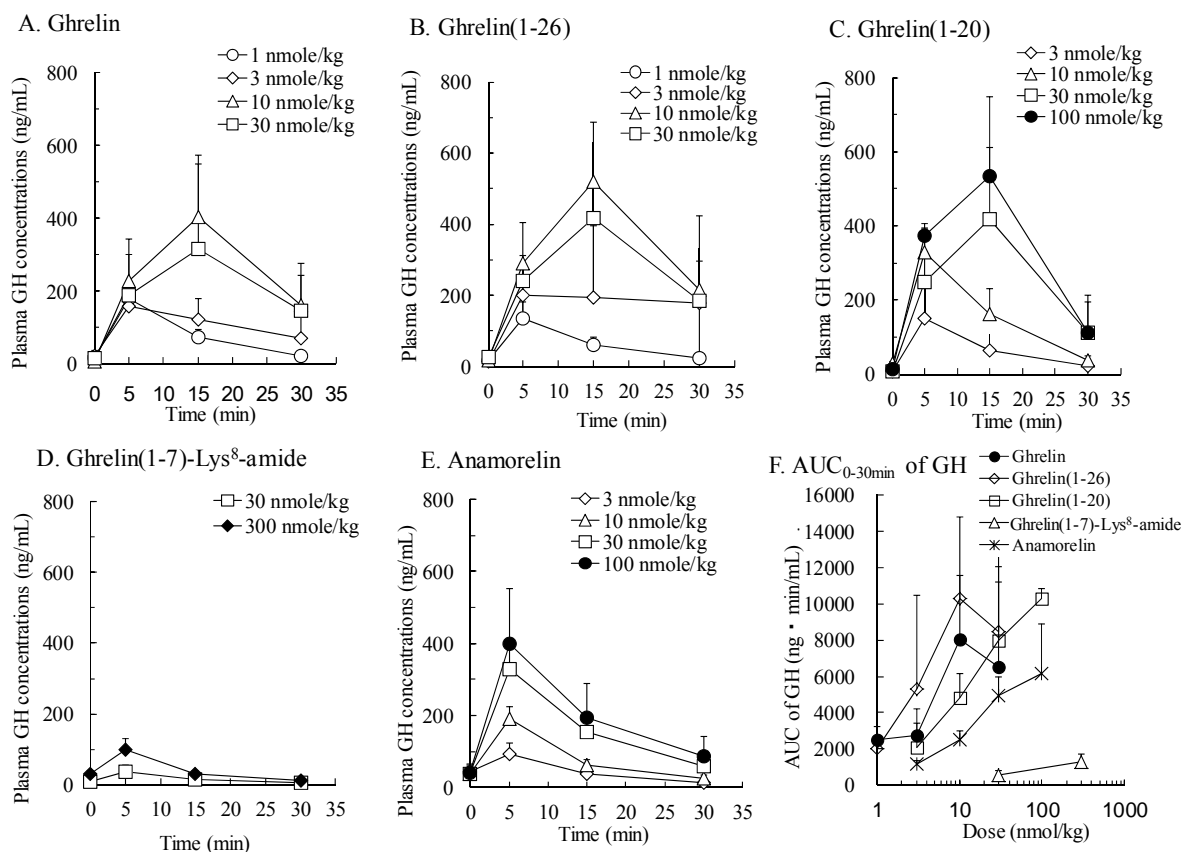
#### 第4項 Ghrelin、ghrelin改変体及びanamorelinのGH分泌活性の比較

次に、ghrelinのGH分泌促進活性に及ぼすghrelinのC末端配列の影響を検討した。

雌性Sprague-Dawley系ラットにghrelin、C末端側欠失型ghrelin改変体またはanamorelinを静脈内投与したときの血漿中GH濃度 - 時間曲線をFig.5 に示した。ghrelinあるいはghrelin(1-26)を投与したときの血漿中GH濃度は、1-10 nmol/kgの範囲で用量に依存して上昇し (Fig.5A, B)、30 nmol/kg投与時の血漿中GH濃度は10 nmol/kg投与時よりも低く、活性の飽和が認められた。ghrelin(1-26)投与時の血漿中GH濃度はghrelin投与時とほぼ同等であり、両者の活性に明らかな差はないと考えられた。

Ghrelin(1-20)を投与したときの血漿中GH濃度は、同用量のghrelin またはghrelin(1-26)を投与したときと比べて低く推移した (Fig.5C)。Ghrelin(1-20)のGH分泌促進活性は、AUC<sub>0-30min</sub>比較でghrelinの約1/3-1/10と考えられた。一方で、Ghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amide を30または300 nmol/kgの用量で静脈内投与しても血漿中GH濃度の上昇はほとんど認められなかった (Fig.5D)。

Anamorelinを投与したときの血漿中GH濃度は用量に依存して上昇したがその作用は同用量のghrelinを投与したときよりも弱く、AUC<sub>0-30min</sub>比較でghrelinの1/10以下であり、作用持続時間も短かった (Fig.5E)。この結果は、GHS-R発現細胞を用いて測定したアゴニスト活性や血漿中濃度推移から想定したよりも低いものであった。



**Fig. 5 Plasma GH concentrations – time curves after a single iv administration of ghrelin, ghrelin analogs or anamorelin in anesthetized rats.**

[A–E] Shows the time course of plasma GH concentrations after the iv injection of ghrelin, ghrelin(1–26), ghrelin(1–20), ghrelin(1–7)-Lys<sup>8</sup>-amide and anamorelin, respectively.

[F] Shows the increases in AUC<sub>0-30min</sub> of plasma GH concentrations by ghrelin (●), ghrelin(1–26) (◇), ghrelin(1–20) (□), ghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amide(△), and anamorelin (\*).

Each value represents the mean±SD of 3 rats.

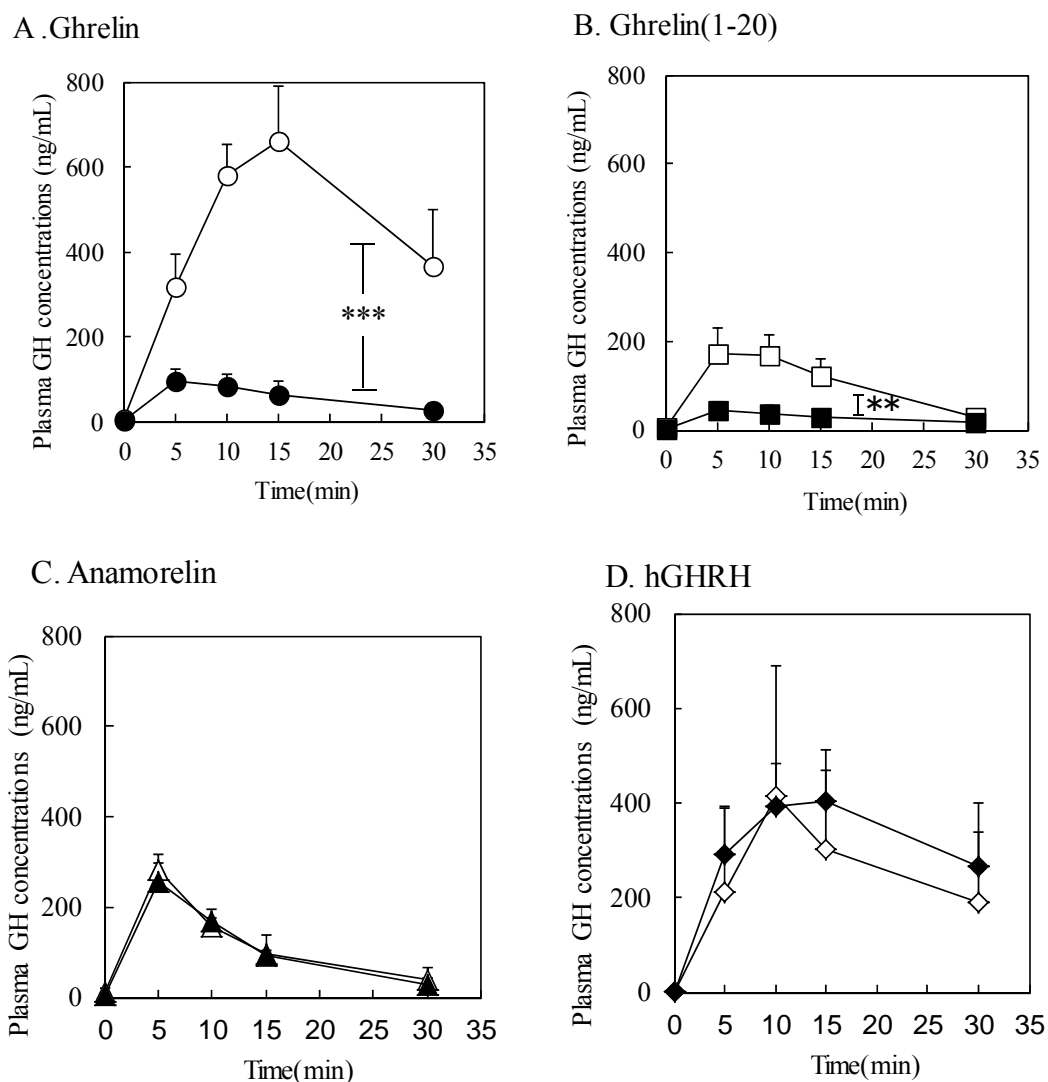
[Peptides. 2011; 32: 1001-1007. Fig4 - 一部改変 - ]

## 第5項 Ghrelin、ghrelin改変体及びanamorelinのGH分泌促進活性に対する迷走神経切断の影響の比較

GhrelinのGH分泌促進作用には、下垂体に直接作用する経路以外に迷走神経を介した作用経路が関与していることが知られている [1]。本項では、事前に頸部両側で迷走神経を切断した雌性Sprague-Dawley系ラットにghrelin、ghrelin(1-20)、anamorelinまたはhGHRHを静脈内投与したときの血漿中GH濃度 - 時間曲線をSham Ope群での成績と比較した。結果をFig.6に示す。

迷走神経を切断したラットにghrelinを投与したときの血漿中GH濃度のAUC<sub>0-30min</sub>はSham Ope群の約1/8であり、ghrelinのGH分泌活性は迷走神経切断により著しく低下した (Fig.6A)。他方、ghrelin(1-20)を投与したときの血漿中GH濃度に対する迷走神経切断の影響はghrelin投与時よりも軽微であり (Fig.6B)、anamorelinを投与したときの血漿中GH濃度は、迷走神経切断の影響を受けなかった (Fig.6C)。視床下部から分泌後に下垂体に直接作用してGH分泌を促進することが知られているhGHRHを投与したときの血漿中GH濃度についてもanamorelinを投与したときと同様に迷走神経切断の影響を受けなかった (Fig.6D)。

末梢からのghrelin刺激による情報は腹部の求心性迷走神経を介して中枢に伝達する [1]。本研究において、ghrelinを投与したときの血漿中GH濃度の上昇は、迷走神経の切断によって著しく減弱することが示された。一方で、ghrelin(1-20)を投与したときの血漿中GH濃度に対する迷走神経の切断の影響は、ghrelinを投与したときよりも軽微であり、迷走神経を介した経路の寄与の割合がghrelinよりも少ないものと考えられた。加えて、ghrelinのN末端部分の構造を模倣した低分子アゴニストであるanamorelinを投与したときのGH分泌促進作用は、下垂体への直接作用によるものがほとんどであり、迷走神経を介した経路はほとんど寄与していないと考えられた。これらのことから、迷走神経を介したGH分泌促進作用の発現には、ghrelinのC末端配列の関与が示唆される。



**Fig. 6 Effect of vagotomy on GH responses to ghrelin, ghrelin(1–20), anamorelin and hGHRH in anesthetized rats.**

Ghrelin, ghrelin(1–20), anamorelin and hGHRH were administered at 10, 10, 30, and 1 nmol/kg by a single iv injection, respectively. Open symbols show GH responses in sham operated rats, and closed symbols show those in vagotomized rats. Each value represents the mean±SD of 4 rats for ghrelin, ghrelin(1–20) and anamorelin, 3 rats for hGHRH in sham group and 5 rats for hGHRH in vagotomized group. Significant differences between AUC<sub>0-30min</sub> of plasma GH concentrations in sham rats and those in vagotomized rats are indicated by asterisks: \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001.

[Peptides. 2011; 32: 1001-1007. Fig.5 - 一部改変 - ]

#### 第4節 考察

本章では、ghrelin改変体及びanamorelinを用いてghrelinのPKプロファイル及びGH分泌促進活性に関する構造活性相関を検討し、C末端配列の生理的な機能を推定した。

C末端配列を欠失させたghrelin改変体のGHS-Rアゴニスト活性は、すべての改変体でフル活性を維持しており、欠失の影響は軽微であると考えられた。一方で、PKプロファイルやGH分泌促進活性に及ぼすC末端配列欠失の影響はそれに比べて大きかった。Ghrelin(1-20)を投与したときの投与直後の血漿中ghrelin免疫活性の低下は、ghrelinを投与したときよりも速やかであったが、投与15分後以降の消失半減期についてはghrelinを投与したときとほとんど変わらず、PKプロファイルの変化に伴い、GH分泌促進活性もghrelinの約1/3-1/10に低下した。一方で、ghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amideを投与したときの血漿からの消失は極めて速やかであり、GH分泌促進活性はほとんど認められなかった。In vitro試験系で測定されたGHS-Rアゴニスト活性の低下に比べて、in vivo系でのGH分泌促進活性の低下が顕著であり、生体内でghrelinが有効に機能するためには、C末端配列の存在が不可欠であると考えられた。さらに、ghrelin(1-20)とghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amideの間でPKプロファイルとGH分泌促進活性の違いが顕著であったことから、ghrelinの8位から20位の構造の少なくとも一部にghrelinが生体内で機能する上で重要な領域があることが示唆された。

本試験で新たに確認されたC末端配列の機能と関連する現象として、ghrelinが血漿中でリポ蛋白質と結合し、Ser<sup>3</sup>(O-n-octanoyl)のエステル加水分解反応の制御に関与することが報告されている[14, 15]。一般的に、血漿蛋白への結合が、薬物のPKプロファイルに影響を及ぼすことが知られており、構成物質であるアポ蛋白及びリン脂質は負電荷を有しているリポ蛋白質と、塩基性アミノ酸が豊富なghrelinのC末端配列が電気的に結合することで、ghrelin自身のPKプロファイルとGH分泌促進活性の発現に影響を及ぼしている可能性が考えられる。本研究において、ghrelinとghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amideの代謝安定性を比較した結果、ラット血漿中においてghrelinの方がghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amideよりも安定であり、肝臓ホモジェネート中での代謝速度には差が認められなかった。このことより、ghrelinが血漿中のリポ蛋白質と結合することで脱アシル化反応が抑制された可能性が考えられる。

また、アシル化結合部位を持たないN末端側欠失型ghrelin改変体をラットに静脈内投与したときの血漿中濃度の消失は、ghrelin(15-28)及びghrelin(13-28)ではghrelinと同等かそれより遅かったが、ghrelin(17-28)の消失半減期は短く、血漿中から速やかに消失した。加えて、ghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amideのSer<sup>3</sup>(O-n-octanoyl)構造をより安定なCys<sup>3</sup>(octyl)に変換して脱アシル化反応の影響を排除しても、ghrelin(1-7)-Lys<sup>8</sup>-amideとPKプロファイルがほとんど変わらないかったこと（詳細データは示さず）から、ghrelinの15-16位を含む配列部分には、脱アシル化反応の抑制以外にも、ペプチドそのものの半減期を延長させる作用があると考えている。

さらに、C末端配列は、ghrelinのGH分泌促進作用の発現においても重要な役割を果たしていることが示唆された。

GhrelinのGH分泌促進作用には、脳下垂体のGHS-R受容体に直接作用する経路と迷走神経を介して情報を視床下部に伝達する経路があることが知られている[1, 16, 17]。すなわち、ghrelinをラットに静脈投与すると視床下部GHRHニューロンのFosタンパク発現が上昇し、その作用は迷走神経

を切断することで消失すること及びghrelin投与後のGH分泌作用は抗GHRH抗体の前処置によって著しく減弱することから、末梢からグレリンを投与したときのGH分泌促進作用の少なくとも一部は、迷走神経を介した脳への情報伝達と視床下部から分泌されるGHRHの刺激が関与していることが示されている。

本研究において、anamorelinのGHS-Rアゴニスト活性はghrelinよりも強く、ラットに投与したときの血漿中濃度はghrelinと同等かそれより高く推移したにも関わらず、ラットに静脈内投与したときのGH分泌促進作用はghrelinの1/10以下に過ぎなかった。加えて、ghrelinのGH分泌促進作用は迷走神経の切断により顕著に抑制されたのに対し、anamorelinを投与したときの血漿中GH濃度推移は、迷走神経切断群とSham-ope群とで変わらなかった。これらのことより、anamorelinのGH分泌促進作用はghrelinよりも弱く、迷走神経を介した経路がほとんど機能していないものと考えられた。

Anamorelinは低分子GHS-Rリガンドの一つであり、現在、がん悪液質の改善薬として国内外でも開発中の薬剤である [18]。これまでに報告された低分子GHS-Rリガンドの多くは、ghrelinのGHS-Rアゴニスト活性の責任配列であるN末端側構造を模倣したものであり [6]、anamorelinについてもそれらと共通した構造上の特徴を有している。本研究の結果は、anamorelinのようなghrelinのN末端側の構造のみを模倣した低分子リガンドでは、必ずしもghrelinの持つ多彩な作用のすべてを再現できない可能性を示したものと考ええる。

Anamorelin が迷走神経末端の受容体に作用できない理由は明確ではないが、ghrelinとanamorelinでは迷走神経末端への移行性や滞留性が異なることが原因の一つではないかと推定している。循環血液と末梢神経幹の間には、血液神経関門 (blood-nerve barrier) と呼ばれる血液脳関門に類似したバリアシステムが存在し、必要なもののみを能動的に取り込み、不要物を排出して局所環境の恒常性を維持しているといわれている [19]。今後の検討で、ghrelinのペプチド構造と作用局所における分子挙動との相関関係が明確になることに期待する。



## 第5節 小括

本研究において、ghrelin 改変体をラットに静脈内投与したときの血漿中濃度推移と GH 分泌促進作用は、C 末端配列の構造改変によって変化することが示された。すなわち、本試験の結果から、ghrelin が、生体内で生理活性を発現するに十分な体内滞留性を維持する上で、C 末端配列が不可欠であった。

加えて、ghrelin の GH 分泌促進作用の一部は迷走神経を介しており、そのシグナル伝達の過程においても、C 末端配列が重要な役割を有する事が示唆された。本試験で対照薬として用いた低分子 GHS-R アゴニストである anamorelin は、ghrelin とは異なり迷走神経を介した GH 分泌促進作用をほとんど有していなかった。本結果から、創薬ターゲットとして GHS-R アゴニストを検討するに当たっては、GHS-R アゴニスト活性の責任配列である ghrelin の N 末端部分のみならず、C 末端配列のもつ機能を考慮した分子設計をすることが有用であると考えられる。

## 第2章 Motilin/ghrelin chimeric peptidesを用いたghrelinのC末端配列の機能に関する研究

### 第1節 緒言

第2章ではghrelinのC末端側の中でペプチドの半減期延長作用に重要な配列部分を特定することを目的に、ghrelinと同じく消化管から分泌されるペプチドホルモンであるmotilinに着目し、motilinの受容体アゴニスト活性の責任配列とghrelinのC末端側の構造を結合させたmotilin/ghrelin chimeric peptidesを用いて、その構造とPKプロファイルとの相関関係を検討した結果について述べる。

Motilinは22個のアミノ酸残基からなる直鎖型のペプチドホルモンである [20]。Ghrelinのようなアシル化部位は持たない。作用面ではghrelinが空腹期に分泌して食欲を亢進する [21] のに対して、motilinは空腹期に胃から消化管下部に伝播する空腹期伝播性強収縮 (Interdigestive Migrating Contraction、以下、IMC) を誘発することが知られている [22, 26]。内因性の血漿中motilin濃度は食後期にはほとんど検出されず、空腹期に約100分ごとに分泌され、IMCを誘発した後に速やかに血漿中から消失するパルス型の血漿中濃度推移を示す [22, 23, 26]。さらに、motilinの受容体アゴニストとしての責任配列は、ghrelinと同様にN末端側に局在しており、N末から12残基までの構造；motilin(1-12)があれば、全長配列とほぼ同等の活性を示すことが判っている [24]。これらのことから、motilinはghrelinのC末端側の機能を評価するに適したモデルペプチドになると考えた。

本報告において、motilin/ghrelin chimeric peptidesとは、N末端側にmotilinの受容体アゴニスト活性の責任配列；motilin(1-12)を配置し、C末端側にghrelin配列の一部またはその1アミノ酸置換体を結合させたmotilinとghrelinの複合ペプチドの総称として用いる。なお、motilinの11-12位とghrelinの10-11位の配列は[Gln-Arg]で共通していることから、検討を開始するに当たっては、motilin(1-10)-Gln-Arg-ghrelin(12-28) (以下、motilin(1-12)ghrelin(12-28))を本研究の対象となるmotilin/ghrelin chimeric peptidesの基本構造と位置づけた。また、ラットやマウスを含むげっ歯類では、motilin及びmotilin受容体の両方が偽遺伝子化している為 [25]、本検討内でmotilin/ghrelin chimeric peptidesのmotilin受容体アゴニスト活性の評価は、ヒト型motilin受容体安定発現CHO細胞を用いて実施し、*in vivo*での活性評価試験は行わなかった。

なお、本研究においてmotilinとは、特に記載がない限りヒト型motilinを意味する。

## 第2節 実験材料及び方法

### 第1項 被験物質

Motilinは大腸菌を用いた遺伝子組換え法で製造し、motilin/ghrelin chimeric peptidesはすべて固相合成法で製造した。製造したペプチドはHPLC法で精製し、純度はいずれも95%以上であった。構造確認はESI-MSによる質量分析、及びアミノ酸配列分析のいずれか、またはその組み合わせによって実施した（詳細はAppendicesに記載）。

なお、本章において個々のアミノ酸の名称は、特に記載がない限り、本文中では3文字略号で、Table中では1文字略号で記載した。

### 第2項 動物

本研究は、アスピオファーマ株式会社の動物実験倫理委員会によって審査され、総括責任者の承認を受けて、動物実験実施基準に従い実施した。6~7週齢の雄性Sprague-Dawley系ラットを日本チャールス・リバー株式会社より入手し、所定の検疫・予備飼育期間経過後、7~8週齢で実験に供した。飼育条件等は第1章 第2節 第2項と同じとした。

### 第3項 カルシウム動員アッセイ

Motilin受容体アゴニスト活性の評価はヒト型motilin受容体安定発現CHO細胞（以下、motilin受容体発現細胞）を用いて実施した。測定条件及び方法は第1章 第2節 第3項と同じとした。

### 第4項 ラットを用いたmotilin及びmotilin/ghrelin chimeric peptidesのPK評価

Motilinまたはmotilin/ghrelin chimeric peptidesをラットに静脈内投与したときの血漿中motilin免疫活性濃度推移を評価した。その際、評価したペプチドの投与量は10 nmol/kgとし、採取した血液には凝固剤として1/100容量の10% EDTA溶液を添加した後に遠心分離により血漿を分取した。得られた血漿は使用時まで凍結保存した。血漿中motilin免疫活性濃度はmotilinのN末端側構造を特異的に認識するウサギポリクローナル抗体と [<sup>125</sup>I]-標識 [Tyr<sup>7</sup>]-motilinを用いた競合RIA法にて測定した [25]。定量限界は0.02-0.05 pmol/mLであった。それ以外の試験方法は、第1章 第2節 第4項に記載した方法に準じた。

### 第5項 統計学的解析

得られた個別データをもとに平均値と標準偏差を算出した。

統計学的有意差検定は実施しなかった。

### 第3節 実験結果

Table 6にmotilinと評価に供した14種類のmotilin/ghrelin chimeric peptidesの構造及びmotilin受容体アゴニスト活性のEC<sub>50</sub>値を示す。いずれのペプチドもフルアゴニスト活性を維持していた。EC<sub>50</sub>値は0.024~1.5 nMの範囲であり、ヒト型motilinのEC<sub>50</sub>値 (0.089 nM) と大きな差は認められなかった。

**Table 6 Amino acids sequences and EC<sub>50</sub> values of human motilin receptor agonist activity of human motilin and various motilin/ghrelin chimeric peptides**

Peptides		Amino acid sequence	EC <sub>50</sub> (nM)
Ref.	Ghrelin	GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	-
	Motilin	<sup>1</sup> FVPIFTYGELQRM <sup>12</sup> QEKERNKGQ	0.089
	Motilin(1-12)ghrelin(6-28)	FVPIFTYGELQRSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1.5
	Motilin(1-12)ghrelin(8-28)	FVPIFTYGELQREHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	0.14
	Motilin(1-12)ghrelin(10-28)	FVPIFTYGELQQRVQQRKESKKPPAKLQPR	0.16
①	Motilin(1-12)ghrelin(12-28)	FVPIFTYGELQRVQQRKESKKPPAKLQPR	0.086
	Motilin(1-12)ghrelin(14-28)	FVPIFTYGELQRQRKESKKPPAKLQPR	0.61
	Motilin(1-12)ghrelin(16-28)	FVPIFTYGELQRKESKKPPAKLQPR	1.2
	Motilin(1-12)ghrelin(18-28)	FVPIFTYGELQRSKKPPAKLQPR	0.10
	Motilin(1-12)ghrelin(19-28)	FVPIFTYGELQRKKPPAKLQPR	0.11
	Motilin(1-12)ghrelin(12-26)	FVPIFTYGELQRVQQRKESKKPPAKLQ	0.085
	Motilin(1-12)ghrelin(12-24)	FVPIFTYGELQRVQQRKESKKPPAK	0.048
②	Motilin(1-12)ghrelin(12-22)	FVPIFTYGELQRVQQRKESKKPP	0.024
	Motilin(1-12)ghrelin(12-20)	FVPIFTYGELQRVQQRKESKK	0.073
	Motilin(1-12)ghrelin(12-18)	FVPIFTYGELQRVQQRKES	0.88
	Motilin(1-12)ghrelin(12-16)	FVPIFTYGELQRVQQRK	0.12

Hatching area : Amino acid sequence derived from motilin

Motilin及びmotilin/ghrelin chimeric peptidesのいずれかを10 nmole/kgの用量でラットに静脈内投与したときの血漿中motilin免疫活性濃度 - 時間曲線をFig.7に、血漿からの消失半減期 (T<sub>1/2</sub>) をTable 7に示した。

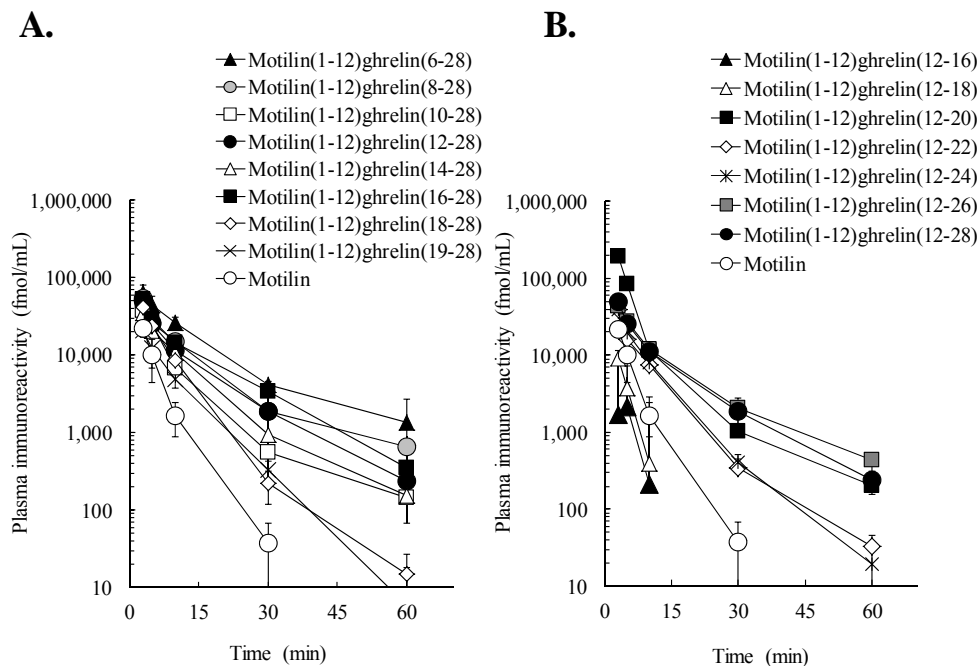
付加する ghrelin の配列の N 末端側開始位置を 2 アミノ酸残基ずつ変更した motilin/ghrelin chimeric peptides (Table 7 カラム①) を投与したときの血漿中濃度は、すべてのペプチドで motilin 投与時よりも高く推移した (Fig. 7A)。特に、motilin(1-12)ghrelin(6-28)から motilin(1-12)ghrelin(16-28)の消失半減期は 8.3~11.7 分の範囲となり、motilin の消失半減期 (3.3 分) と比較して 2 倍以上長かった。一方、motilin(1-12)ghrelin(18-28)及び motilin(1-12)ghrelin(19-28)の消失半減期は 5.3 及び 6.0 分と motilin との差は僅かであった。ghrelin の 15 位の配列は motilin の 12 位で代替されると考えると、特に 15 位以降の配列には当該ペプチドの半減期を延長作用させる機能を有していると思われる。

一方、付加する ghrelin 由来配列の N 末側の開始位置を 12 位に固定して C 末端を 2 アミノ酸残基ずつ削除した motilin/ghrelin chimeric peptides (Table 7 カラム②) の PK プロファイルを評価した結果、motilin(1-12)ghrelin(12-28)、motilin(1-12)ghrelin(12-26)及び motilin(1-12)ghrelin(12-20)を投与し

たときの血漿中 motilin 免疫活性は、いずれも motilin を投与したときよりも高い濃度で推移した (Fig. 7B)。消失半減期は 7.0~10.4 分と motilin の消失半減期よりも 2 倍以上長かった。Motilin(1-12)ghrelin(12-22)または motilin(1-12)ghrelin(12-24)を投与したときの血漿中濃度も、motilin 投与時よりも高い値で推移したが、motilin(1-12)ghrelin(12-16) 及び motilin(1-12)ghrelin(12-18)を投与して時の消失半減期は天然型 motilin を投与したときよりも短くなった。Motilin(1-12)ghrelin(12-20)と motilin(1-12)ghrelin(12-18)の間で消失半減期の変化が最も大きかったことより、ghrelin の 12-20 位までの構造の少なくとも一部が消失半減期の延長に重要であることが示唆された。

以上、カラム①のグループで明確な半減期延長作用が認められた最短配列は ghrelin の 16-28 位であり、ghrelin の 15 位の配列は motilin の 12 位で代替されると考えるとその構造は、[(Arg)<sup>15</sup>-Lys<sup>16</sup>-Glu<sup>17</sup>-Ser<sup>18</sup>-Lys<sup>19</sup>-Lys<sup>20</sup>-Pro<sup>21</sup>-Pro<sup>22</sup>-Ala<sup>23</sup>-Lys<sup>24</sup>-Leu<sup>25</sup>-Gln<sup>26</sup>-Pro<sup>27</sup>-Arg<sup>28</sup>] であった。一方、カラム②のグループで明確な半減期延長作用が認められた最短配列は ghrelin の 12-20 位であり、その構造 [Val<sup>12</sup>-Gln<sup>13</sup>-Gln<sup>14</sup>-Arg<sup>15</sup>-Lys<sup>16</sup>-Glu<sup>17</sup>-Ser<sup>18</sup>-Lys<sup>19</sup>-Lys<sup>20</sup>] であったことから、両検討で選択された配列の共通部分として、下線部の 15-20 位を特定した。

すなわち、motilin/ghrelin chimeric peptides の消失半減期を延長させる配列として、ghrelin の 15-20 位の配列 [Arg<sup>15</sup>-Lys<sup>16</sup>-Glu<sup>17</sup>-Ser<sup>18</sup>-Lys<sup>19</sup>-Lys<sup>20</sup>] の有用性が推定された。



**Fig. 7 Comparison of plasma motilin immunoreactivities after iv administration of various motilin/ghrelin chimeric peptides.**

- (A) PKs of chimeric peptides composed of motilin(1-12) and various N-terminal deleted ghrelin.  
 (B) PKs of chimeric peptides composed of motilin(1-12) and various N- and C-terminal deleted ghrelin.  
 Each value represents the mean  $\pm$  SD of 3 rats. Motilin immunoreactivities in all samples were determined by RIA.

[Peptides. 2012; 33: 279-284. Fig.3 - 一部改変 - ]

**Table 7 Plasma half-lives of human motilin and various motilin/ghrelin chimeric peptides in anesthetized rats.**

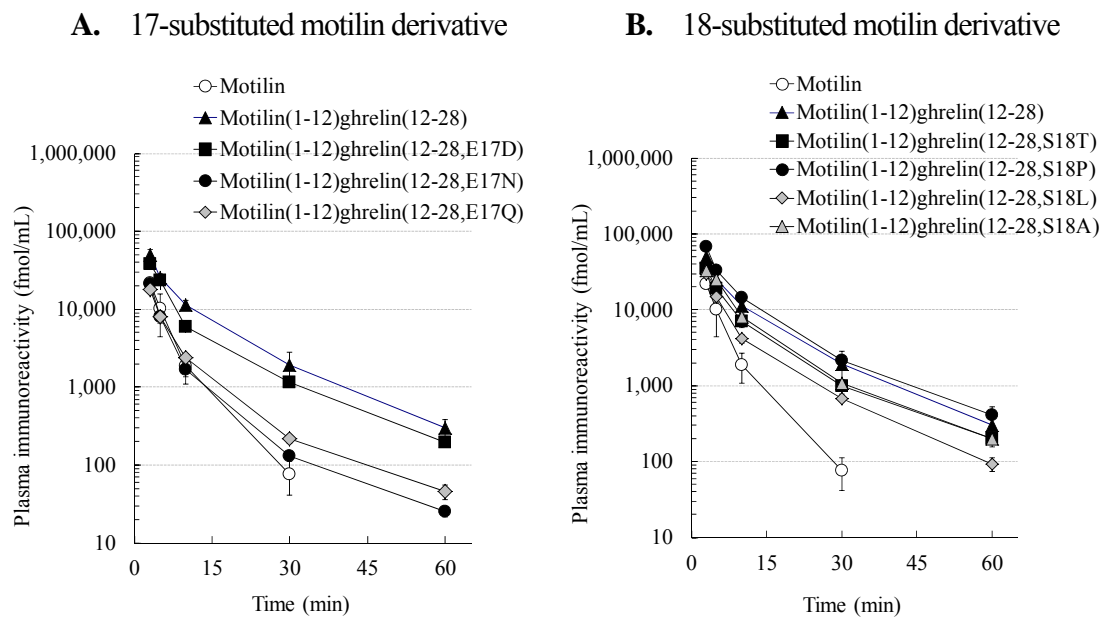
Each value represents the mean of triplicate measurements or the mean  $\pm$  SD of 3 rats.

Motilin immunoreactivities in all samples were determined by RIA.

Peptides		T <sub>1/2</sub> (min)	Peptides		T <sub>1/2</sub> (min)	
Motilin		3.3 $\pm$ 1.0	-		-	
①	Motilin(1-12)ghrelin(6-28)	11.7 $\pm$ 3.4	②	Motilin(1-12)ghrelin(12-26)	10.4 $\pm$ 0.1	長
	Motilin(1-12)ghrelin(8-28)	11.1 $\pm$ 0.7		Motilin(1-12)ghrelin(12-24)	5.8 $\pm$ 0.7	半
	Motilin(1-12)ghrelin(10-28)	8.9 $\pm$ 0.5		Motilin(1-12)ghrelin(12-22)	6.3 $\pm$ 0.5	減
	Motilin(1-12)ghrelin(12-28)	8.9 $\pm$ 0.5		Motilin(1-12)ghrelin(12-20)	7.0 $\pm$ 2.6	期
	Motilin(1-12)ghrelin(14-28)	8.0 $\pm$ 0.7		Motilin(1-12)ghrelin(12-18)	3.1 $\pm$ 0.7	
	Motilin(1-12)ghrelin(16-28)	9.4 $\pm$ 0.6		Motilin(1-12)ghrelin(12-16)	2.4 $\pm$ 0.7	
	Motilin(1-12)ghrelin(18-28)	5.3 $\pm$ 1.3				
	Motilin(1-12)ghrelin(19-28)	6.0 $\pm$ 0.3				

今回特定された 15-20 位の配列 [Arg<sup>15</sup>-Lys<sup>16</sup>-Glu<sup>17</sup>-Ser<sup>18</sup>-Lys<sup>19</sup>-Lys<sup>20</sup>] は、6 残基中両端の各 2 残基が塩基性アミノ酸の Arg または Lys であり、17 位は哺乳類においては酸性アミノ酸の Glu であり、18 位には中性アミノ酸（ヒトでは Ser）となっている。両端の塩基性アミノ酸の欠失が消失半減期の短縮に繋がることは、これまでの検討から明らかであることから、次に、17 位と 18 位のアミノ酸特異性を評価するために、それぞれについて一残基置換体を合成して、先と同様の条件で PK を評価した。結果を Fig.8 に示す。

17 位の Glu を同じ酸性アミノ酸である Asp に置換しても、血漿中 motilin 免疫活性濃度推移はほとんど変わらず、中性アミノ酸である Gln または Asn に置換することで消失半減期延長作用は完全に消失し、その血漿中濃度推移は motilin を投与したときとほとんど変わらないものとなった。この結果から 17 位は少なくとも酸性アミノ酸であることが重要であると考えられる。一方で、18 位の Ser については、中性アミノ酸である Pro（シカ、ヒツジ及びヤギ型 ghrelin の当該部位のアミノ酸に同じ）、Ala（ウシ及びクジラ型 ghrelin の当該部位のアミノ酸に同じ）、Thr（シチメンチョウ及びニワトリ型 ghrelin の当該部位のアミノ酸に同じ）または Leu に置換しても、その作用は置換前とほとんど変わらなかった。よって、18 位については少なくとも中性アミノ酸への置換にしても消失半減期延長作用への影響はほとんどないことが判った。



**Fig. 8 Comparison of PK profiles of motilin/ghrelin chimeric peptides having single amino acid mutation.**

Each value represents the mean  $\pm$  SD of 3 rats.

Motilin immunoreactivities in all samples were determined by RIA.

[Peptides. 2012; 33: 279–284. Fig.4 - 一部改変 - ]

以上の結果から、motilin/ghrelin chimeric peptides の半減期延長作用には ghrelin(15-20)の配列 [Arg<sup>15</sup>-Lys<sup>16</sup>-Glu<sup>17</sup>-Ser<sup>18</sup>-Lys<sup>19</sup>-Lys<sup>20</sup>] の寄与が最も大きく、その中でも 17 位については酸性アミノ酸であることが重要であることが判った。前章において、ghrelin 改変体の PK プロファイルを検討し、15-16 位の [Arg<sup>15</sup>-Lys<sup>16</sup>] を含む 8-20 位の配列の欠失によって、ghrelin 改変体の半減期が著しく短縮することが判ったが、本章において得られた知見は、先に ghrelin 改変体で得られたものとよく一致した。

## 第4節 考察

第1章で推定されたghrelinのC末端側構造の消失半減期延長作用をより詳細に検討するために、ghrelinと同じ消化管ホルモンであるmotilinに着目し、その受容体アゴニスト活性の責任配列；motilin(1-12)にghrelinのC末端側構造の一部を付加したmotilin/ghrelin chimeric peptidesの構造とラットに静脈内投与したときのPKプロファイルとの相関について検討した。

その結果、試験に供したいずれのペプチドでもmotilinとほぼ同等のmotilin受容体アゴニスト活性を維持しており、C末端側構造の置換の影響は軽微であった。一方で、ラットに静脈内投与したときの血漿中motilin免疫活性濃度推移は付加したghrelinのC末端側の長さや配列部位に依存して変化し、消失半減期の延長に最も有効な配列としてghrelinの15-20位 [Arg<sup>15</sup>-Lys<sup>16</sup>-Glu<sup>17</sup>-Ser<sup>18</sup>-Lys<sup>19</sup>-Lys<sup>20</sup>] が特定された。本章においてmotilin/ghrelin chimeric peptidesで得られた結果は、第1章においてghrelin 改変体で得られた結果と矛盾のないものであった。

さらに、ghrelinの15-20位の配列のうち、17位のGluを同じ酸性アミノ酸であるAspに置換しても同様の作用が保たれるが、同部位を中性アミノ酸であるGlnまたはAsnに置き換えると、半減期延長作用が完全に消失し、血漿中濃度推移はmotilinと変わらないものとなった。一方で、18位のSerについては他の中性アミノ酸へ置換しても血漿中濃度推移にほとんど影響を与えなかった。15-16位及び19-20位の塩基性アミノ酸については、その欠失により消失半減期が短縮することが判ったが、アミノ酸残基の特異性やArg及びLysの相互置換や一部欠失、あるいは追加等の影響は検討しなかった。塩基性アミノ酸残基の陽電荷は、血漿中のリポ蛋白質や受容体が存在する細胞膜、あるいは細胞外マトリクスの中のムコ多糖等の負電荷を帯びた成分と親和性を有する可能性が高く、そのことで体内滞留性が向上するものと推察されるが、詳細は不明であり、今後の検討によってその機能が解明されることに期待する。

Motilinの生理機能はIMC と呼ばれる胃体部に始まる伝播性の収縮運動を引き起こすことで消化管内を掃除し、次の摂食に備えることである [20, 22, 26]。同時に各種消化酵素の分泌も刺激することも知られている。Motilinの消化管運動亢進作用は消化管の平滑筋の受容体に直接作用する経路と神経系を介した間接的な作用経路が関与することがわかっており、ghrelinとも作用経路で共通する部分がある [1, 27]。加えて、motilinとghrelinでは受容体配列の相同性も高く、構造上及び機能上の類似性を有した消化管ホルモンファミリーを構成している [28, 29]。

これまでに、motilinの強力な消化管運動亢進作用に着目して、motilin受容体作動薬を消化管運動機能改善薬として開発することを目指し、様々な臨床研究が進められてきた。しかしながら、副作用としての悪心、嘔吐の発生も一因となってこれまで開発に成功した事例はない [30]。副作用の発症メカニズムに関してはいくつかの報告がある [27, 31]。Motilin受容体作動薬を空腹期に短時間作用させると生理的なmotilin作用を模倣する伝播性の収縮運動が誘発されるのに対し、食後期に比較的の薬剤を高濃度で長時間作用させた場合には、血漿中濃度に依存した胃内容物の排出促進作用を示し、悪心、嘔吐の発症も顕著になると考えられているが、これらの違いの少なくとも一部は、消化管平滑筋に対する直接作用と神経系を介した作用の違いで説明されている。前章で



の検討で、ghrelinのC末端側の構造は、ghrelinの迷走神経を介した作用の発現に重要な役割を担っていることが示唆されたことから、今後、ghrelinとmotilinのC末側の構造の違いに着目し、神経を介した作用発現を前提とした構造活性相関の研究を進めることで、副作用の少ない新規のmotilin受容体作動薬の開発に繋がる可能性も期待される。

## 第5節 小括

Motilinの受容体アゴニスト活性の責任配列部分であるmotilin(1-12)にghrelinのC末端配列を結合させたmotilin/ghrelin chimeric peptidesを用いてghrelinのC末端配列の機能を検討した。その結果、motilinのC末端配列をghrelinのC末端配列に置き換えることで、motilin受容体アゴニスト活性にほとんど影響を及ぼすことなく、*In vivo*で投与したときの血漿中濃度推移がghrelin様に変化し、消失半減期が延長することがわかった。加えて、この消失半減期の延長作用に特に重要な配列として15-20位 [Arg<sup>15</sup>-Lys<sup>16</sup>-Glu<sup>17</sup>-Ser<sup>18</sup>-Lys<sup>19</sup>-Lys<sup>20</sup>] を特定した。

本結果から、ghrelinのC末端配列の改変がghrelinそのものの体内動態や活性発現に重要な影響を及ぼすのみでなく、同配列をghrelin以外のペプチドに付加することで付加された活性ペプチドのPKプロファイルが変化し、血漿からの消失を遅延させることができると考えられた。

### 第3章 GhrelinのC末端配列の機能を利用した新規C型ナトリウム利尿ペプチド誘導体のデザインと評価

#### 第1節 緒言

これまでに得られた知見から、血漿中からの消失が速い生理活性ペプチドの活性の責任配列に ghrelin の C 末端配列を付加して誘導体化することで体内滞留性が向上し、血漿中からの消失半減期を延長する可能性が見出された。この知見は新たな創薬に応用しうる興味深いものと考えられる。

そこで、第3章では、血漿中からの消失が速い生理活性ペプチドの代表例として、C型ナトリウム利尿ペプチド（以下、CNP）を選択し、その受容体であるナトリウム利尿ペプチド受容体-B（以下、NPR-B）アゴニスト活性の責任配列に、ghrelin の C 末端側構造またはその改変体を付加した新規 CNP 誘導体を用いて、その PK プロファイルと薬理活性に与える ghrelin の C 末端配列付加の影響を検討した結果について述べる。

本検討を開始するに当たり、本評価に適したペプチドを“定量的評価が可能で明確な薬理活性を有するが、体内からの消失が速いためそのままでは医薬品として開発するに適さない生理活性ペプチド”と設定した。候補となるペプチドの具体的例としては、第2章で使用した motilin に加えて、インスリンやソマトスタチン、glucagon-like peptide-1（以下、GLP-1）、心房性ナトリウム利尿ペプチド（以下、ANP）あるいは CNP 等が挙げられる。中でもインスリン、ソマトスタチン及び GLP-1 については、PK プロファイルが改善された誘導体を得られ、医薬品としての実用化に成功した実績がある [32, 33, 34]。一方で、ANP については、天然型ペプチドそのものを有効成分とした持続静脈内投与用製剤が急性心不全の治療薬として市販されている。ANP の血漿中半減期は極めて短く、患者の状態に合わせて投与速度を調整することで至適血漿中濃度にコントロールすることが容易になっており、血圧の過低下等の副作用の発現を回避することに適している [35, 36]。半減期が短い事を利点として医薬品化することに成功した例と考える。

それに対して、同じナトリウム利尿ペプチドである CNP は、これまで天然型ペプチド及びその誘導体を含めて上市された実績はない。遺伝子改変動物を用いた検討で、CNP/NPR-B 系が骨伸長を促進し、血管平滑筋の増殖抑制作用を有する事、等が報告されており、臨床応用が期待されている。しかしながら、生体内における消失が極めて速いため、薬効発現に十分な血漿中濃度の維持が困難であることが、医薬品として開発する上での大きな課題と考えられている [37, 38, 39]。

天然型 CNP としては、22 個のアミノ酸からなる CNP(1-22)と CNP(1-22)の N 末端側に 31 個のアミノ酸残基からなる直鎖ペプチドがついた CNP(1-53)の 2 種類が存在し [40]、新鮮組織中では CNP(1-53)が大部分を占める一方で、循環血漿中では微量ながらも、主には CNP(1-22)が存在することが明らかとなっている。興味深いことに、CNP は ghrelin と同様に、哺乳類、鳥類、両生類及び魚類で普遍的に存在し、構造が種を超えてよく保存されている [40]。特に CNP(1-22)の配列は、哺乳類ではいずれも同じである。さらに、CNP の受容体である NPR-B に対するアゴニスト活性の責任部位は 17 アミノ酸残基からなる環状構造部分；CNP(6-22)に限局していることから、その

N 末端側や C 末端側に新たなペプチド配列を付加しても基本的な NPR-B 受容体アゴニスト活性はそのまま維持される可能性が高いと考えた [41]。

これらの背景から、CNP の NPR-B アゴニスト活性の責任配列である CNP(6-22)の N または C 末端側、あるいはその両方に ghrelin の C 末端側由来構造を付加した複数の CNP/ghrelin chimeric peptides を用いて、その構造と NPR-B 受容体アゴニスト活性及びそれらのペプチドをラットに静脈内投与したときの PK プロファイルとの相関を評価した。加えて、評価したペプチドの中から最も医薬品候補物質として有望と判断した CNP(6-22)ghrelin(12-28)を正常幼若マウスに反復皮下投与したときの骨伸長作用を検討した。

なお、本研究において、CNP/ghrelin chimeric peptides とは、CNP(6-22)の N 末あるいは C 末端側のいずれか、もしくはその両方に ghrelin 配列の一部である ghrelin(12-28)またはその関連配列（逆配列や、C 末端アミド化ペプチド等）を配した複合ペプチドの総称を意味する。

## 第2節 実験材料及び方法

### 第1項 被験物質

CNP(1-22) は大腸菌を用いた遺伝子組換え法で製造した。CNP(6-22)ghrelin(12-28)は大腸菌を用いた遺伝子組換え法または固相合成法で製造した。その他のCNP/ghrelin chimeric peptides はいずれも固相合成法で製造した。すべてのペプチドはHPLC法で精製し、純度は95%以上であった。ペプチドの構造確認は、ESI-MS、アミノ酸組成分析、及びアミノ酸配列分析のいずれか、またはその組み合わせによって実施した（詳細はAppendicesに記載）。

なお、本章において個々のアミノ酸の名称は、特に記載がない限り、本文中では3文字略号で、Table 中では1文字略号で記載した。

### 第2項 動物

本研究は、アスピオファーマ株式会社の動物実験倫理委員会によって審査され、総括責任者の承認を受けて、動物実験実施基準に従い実施した。6または7週齢の雄性Sprague-Dawley系ラット及び2週齢の雌性Crlj : CD1(ICR)系マウスを日本チャールス・リバー株式会社より入手し、所定の検疫・予備飼育期間経過後に、ラットは7~8週齢で、マウスは3週齢で実験に供した。

飼育条件は第1章 第2節 第2項と同じとした。

なお、骨伸長作用の評価に用いる幼若マウスには、発育成長が比較的緩やかで薬理作用を検出しやすい雌性動物を選択した。その他の試験については一般的に使用される雄性ラットを用いた。

### 第3項 Cyclic guanosine monophosphate 産生活性の測定

NPR-B アゴニスト活性は、ヒト型 NPR-B を安定発現させた CHO 細胞（以下、NPR-B 発現細胞）を用いて cyclic guanosine monophosphate（以下、cGMP）産生促進活性で評価した。

すなわち、flat-bottom 96-well plates に NPR-B 発現細胞を  $1 \times 10^4$  cells/well の濃度で播いて一日間培養した。被験物質は蒸留水あるいは 0.1 N 酢酸溶液に溶解し、phosphate buffered saline（以下、PBS）で規定濃度まで希釈した。測定前の細胞を 80  $\mu$ l/well の 0.75 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine と 10 mM glucose を含有する Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4) で 10 分間処理した後に、40  $\mu$ L/well の被験物質溶液または 陰性対照として PBS を加えて 37°C で 15 分間反応させた後に反応停止液を加えた。得られた反応液を回収して、cGMP 濃度測定時まで凍結保存した。試料中の cGMP 濃度は市販の Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay（以下、ELISA）キット（the CatchPoint cyclic-GMP Fluorescent Assay Kit, Molecular Devices Corporation）を用いて測定した。

血漿中 cGMP 濃度は市販の RIA キット（Yamasa Cyclic GMP Assay Kit、ヤマサ醤油株式会社）を用いて測定した。

#### 第4項 精製中性エンドペプチダーゼを用いた *In vitro* 代謝実験

市販の精製ヒト型中性エンドペプチダーゼ（以下、hNEP）に対する CNP(1-22)と CNP/ghrelin chimeric peptides の代謝安定性を比較した。

実験は各サンプル N=2 で実施した。hNEP（R&D systems Inc.）を含有する反応溶液中に CNP(1-22)または CNP(6-22)ghrelin(12-28)を終濃度で 0.5  $\mu\text{g/mL}$  になるように添加した。初期値の評価用試料は調整直後に、安定性評価試料は 37°C に設定した恒温槽にて 1 時間放置した後、それぞれ 5 分間煮沸し、反応を停止させた。煮沸後のサンプルに蒸留水を 100  $\mu\text{L}$  添加し、よく混和したものを測定試料とし、HPLC（LC-10A システム、株式会社島津製作所）を用いて分析した。反応後の試料中未変化体のエリア面積（N=2 の平均値）を初期値で除することで 1 時間後の未変化体残存率を算出した。

#### 第5項 ラットを用いた CNP(1-22)及び CNP/ghrelin chimeric peptides の PK 評価

CNP(1-22)及び各種 CNP/ghrelin chimeric peptides を 7 または 8 週齢の雄性 Sprague-Dawley 系ラットに静脈内投与したときの血漿中 CNP 免疫活性濃度推移を評価した。投与量は 10 nmol/kg とし、尾静脈より急速注入した。投与開始前から投与 60 分後まで経時的に採血し、1/100 容量の 10% EDTA 溶液を添加後に遠心分離により血漿を得た。血漿中 CNP 免疫活性濃度は CNP(6-22)を認識するウサギ抗血清を用いて [<sup>125</sup>I]-標識 [Tyr<sup>0</sup>]-CNP(1-22)との競合 RIA 法にて測定した。定量限界は 0.02-0.05 pmol/mL であった。その他の実験方法は第 1 章 第 2 節 第 4 項に準じた。

CNP(1-22)及び CNP(6-22)ghrelin(12-28)を用いて NEP 阻害剤併用試験を実施した。7 週齢の雄性 Sprague-Dawley 系ラットにペントバルビタール麻酔を施し、NEP 阻害剤持続投与用のカニューレを大腿静脈に、採血用のカニューレを大腿動脈にそれぞれ挿入した。ペプチドを投与する 10 分前から試験終了時まで、インフュージョンポンプ（CFV2100、日本光電株式会社）を用いて 5% マンニトール（100  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{body}$ ）または NEP 阻害剤の DL-thiorphan（Sigma-Aldrich Co. LLC.）を 30  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}/\text{min}/\text{body}$  の速度で大腿静脈から定速注入した。CNP(1-22)及び CNP(6-22)ghrelin(12-28)の投与量は 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  とし、尾静脈より投与した。投与開始前から投与 60 分後まで経時的に採血し、1/100 容量の 10% EDTA 溶液を添加後に遠心分離により血漿を採取し、前述の競合 RIA 法にて血漿中 CNP 免疫活性濃度を測定した。

#### 第6項 正常幼若マウスを用いた CNP(6-22)ghrelin(12-28)の骨伸長作用の評価

3 週齢の雌性 Crlj : CD1 (ICR) 系マウス（n=10 あるいは 8/group）に CNP(1-22)及び CNP(6-22)ghrelin(12-28)を 1 日 2 回×29 日間または 1 日 3 回×30 日間反復皮下投与したときの、体重、体長（吻臀長）及び尾長を測定した。加えて、投与終了時に前後脚の長管骨を摘出して、ノギスを用いて長さを計測した。投与媒体には 10% (w/v) sucrose と 1% (w/v) benzyl alcohol を含有する 30 mM 酢酸溶液（pH 4.0）を用い、コントロール群には投与媒体を投与した。

## 第7項 統計学的解析

得られた個別データをもとに平均値と標準偏差を算出した。加えて、骨伸長作用評価試験で得られたデータは、Tukey-Kramer's HSD test (JMP10 software、SAS Institute Japan Ltd.) による有意差検定を実施し、媒体投与群との有意差の有無を調べた。その際、p値が0.05未満の場合に統計学的に有意差があると判断した。

### 第3節 実験結果

#### 第1項 CNP/ghrelin chimeric peptidesの受容体アゴニスト活性及びPK評価

CNPはNPR-Bの内因性リガンドであり、受容体に結合して細胞内でセカンドメッセンジャーとしてcGMPの産生を促進する。

アゴニスト活性の責任配列であるCNP(6-22)のN末とC末側の片側または両側にghrelin(12-28)またはその逆配列；ghrelin(28-12)、あるいはC末端アミド化された配列；ghrelin(12-28)amideを付加した6種類のCNP/ghrelin chimeric peptidesを合成し、NPR-B発現細胞におけるcGMP産生活性を評価した。

実験に供したCNP(1-22)及びCNP/ghrelin chimeric peptidesのアミノ酸配列及び分子量をTable 8に示す。

**Table 8 Amino acids sequences and molecular weight of CNP(1-22) and CNP/ghrelin chimeric peptides.**

Peptides (Molecular Weight)	Amino acid sequence <sup>ab</sup>
CNP(1-22) (2197.6)	GLSKG <u>C</u> FGLKLD RIGSMSGL <u>C</u>
CNP(6-22)ghrelin(12-28) (3755.5)	<u>C</u> FGLKLD RIGSMSGL <u>C</u> VQQRKESKKPPAKLQPR
CNP(6-22)ghrelin(12-28)amide (3754.5)	<u>C</u> FGLKLD RIGSMSGL <u>C</u> VQQRKESKKPPAKLQPR-amide
Ghrelin(12-28)CNP(6-22) (3755.5)	VQQRKESKKPPAKLQPR <u>C</u> FGLKLD RIGSMSGL <u>C</u>
Ghrelin(28-12)CNP(6-22) (3755.5)	RPQLKAPPKKSEKRQV <u>C</u> FGLKLD RIGSMSGL <u>C</u>
Ghrelin(12-28)CNP(6-22)ghrelin(12-28) (5755.9)	VQQRKESKKPPAKLQPR <u>C</u> FGLKLD RIGSMSGL <u>C</u> VQQRKESKKPPAKLQPR
Ghrelin(28-12)CNP(6-22)ghrelin(12-28) (5755.9)	RPQLKAPPKKSEKRQV <u>C</u> FGLKLD RIGSMSGL <u>C</u> VQQRKESKKPPAKLQPR

a One-letter amino acid notation is used

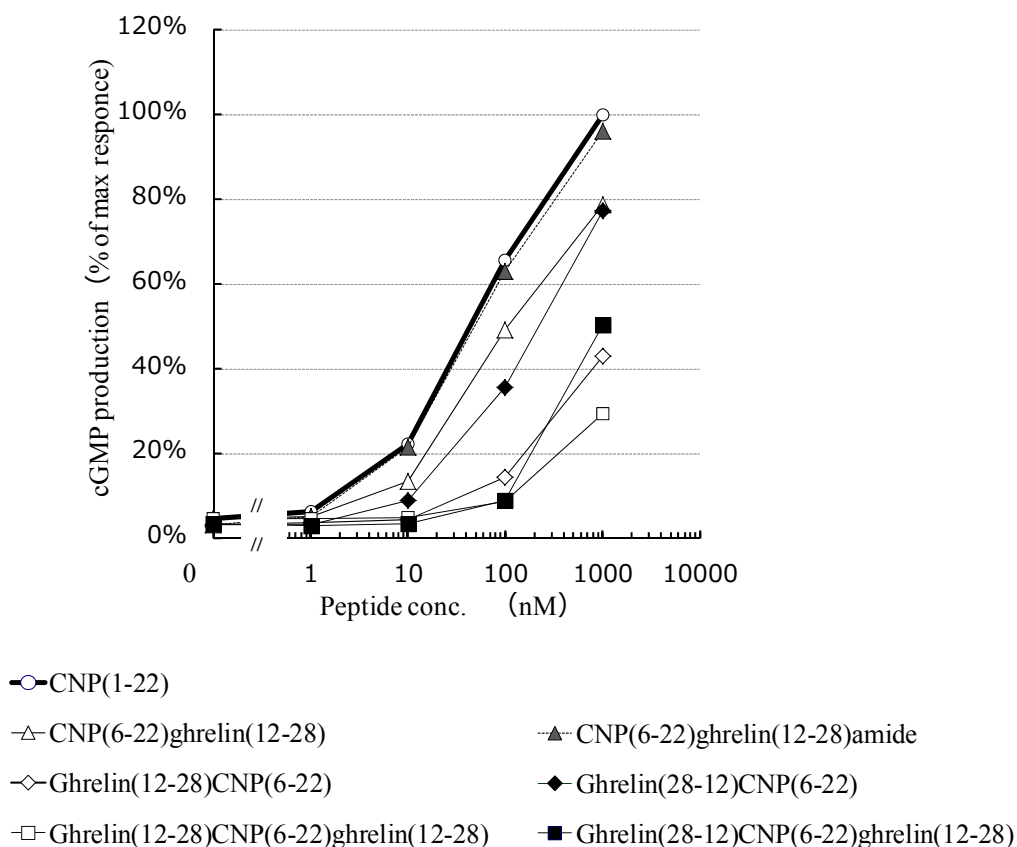
b C : half cystine

NPR-B発現細胞を用いて、CNP(1-22)及びCNP/ghrelin chimeric peptidesのcGMP産生活性を測定した結果をFig.10に示す。評価したすべてのペプチドで濃度依存的にcGMP産生を促進したものの、CNP(1-22)と比較するといずれも活性が低下する傾向があった。中では、CNP(6-22)のC末端側にGhrelin(12-28)を結合させたCNP(6-22)ghrelin(12-28)のNPR-B受容体アゴニスト活性の低下は僅かであり、さらにC末端部分をアミド化してCNP(6-22)ghrelin(12-28)amideとすることにより、CNP(1-22)とほぼ同等まで回復した。N末端側にghrelin(12-28)を結合させたghrelin(12-28)CNP(6-22)のアゴニスト活性はCNP(6-22)ghrelin(12-28)よりも弱かった。N末側に付加するghrelinのC末端側構造を逆配列のghrelin(28-12)とした結果、ghrelin(28-12)CNP(6-22)のアゴニスト活性はghrelin(12-28)CNP(6-22)よりも高く、CNP(6-22)ghrelin(12-28)とほぼ同程度まで回復した。



Ghrelin(12-28)を CNP(6-22)の N 及び C 末端の両方に結合させた ghrelin(12-28)CNP(6-22) ghrelin(12-28)のアゴニスト活性は、片側のみに結合させた ghrelin(12-28)CNP(6-22)あるいは CNP(6-22)ghrelin(12-28)より弱く、同様に ghrelin(28-12)CNP(6-22)ghrelin(12-28) の活性は ghrelin(28-12)CNP(6-22) あるいは CNP(6-22)ghrelin(12-28)よりも弱かった。CNP(6-22)のリング構造の両端に ghrelin の C 末端構造を付加することで受容体の活性ポケットへの結合が阻害されたものと推定される。

これらのことから、NPR-B 受容体アゴニスト活性の維持する上で、結合させる ghrelin の C 末端構造の付加は片側のみがよく、結合部位は N 末端側よりも C 末端側の方が活性低下の影響が軽微であった。さらに、C 末端をアミド化することで、NPR-B 受容体アゴニスト活性が向上しうることが示された。



**Fig. 10 Human NPR-B agonist activity of CNP(1-22) and CNP/ghrelin chimeric peptides**

cGMP production activity in CHO cells stably expressing human NPR-B. Each value represents the mean of duplicate determinations.

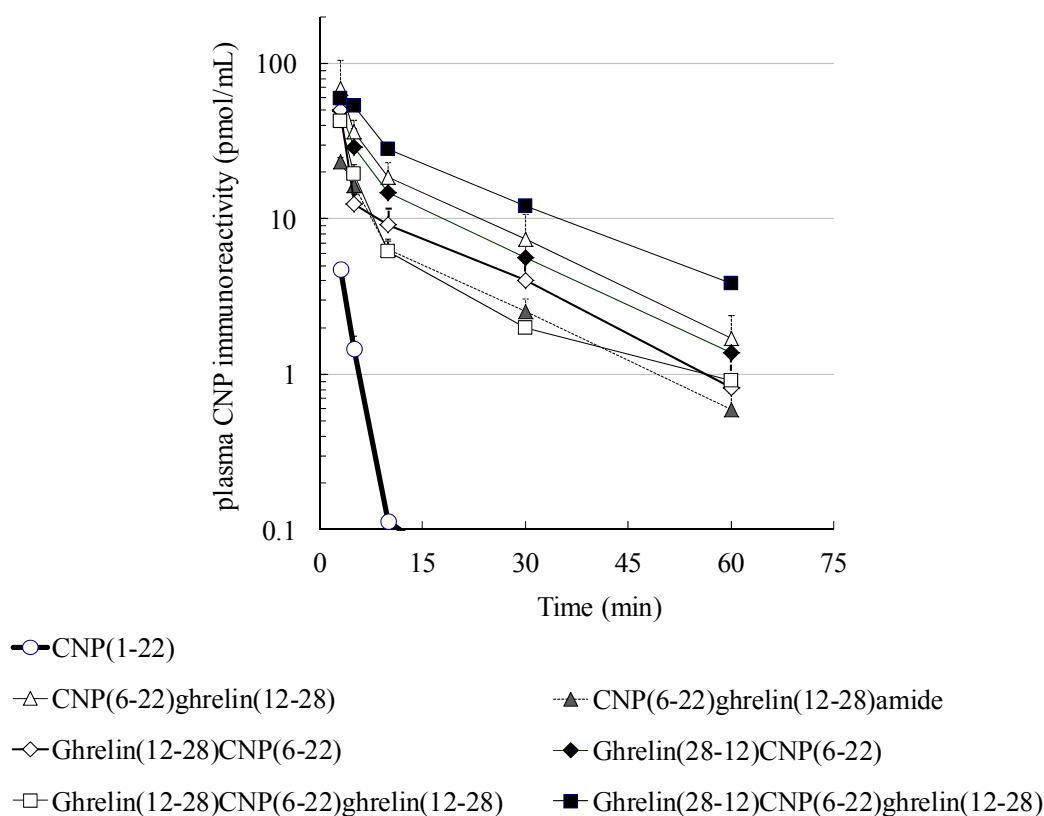
[Peptides. 2017; 97: 16-21. Fig.1 - 一部改変 -]

次に、CNP(1-22)または CNP/ghrelin chimeric peptides をラットに 10 nmole/kg の用量で静脈内投与したときの血漿中 CNP 免疫活性濃度 - 時間曲線を Fig.11 に、血漿中濃度推移をもとに算出した AUC<sub>0-60min</sub> 及び消失半減期を Table 9 に示す。

ラットに CNP/ghrelin chimeric peptides を静脈内投与したときの血漿中濃度はいずれも CNP(1-22)よりも高く推移した。消失半減期は 14.50~18.40 分 (3 例の平均値) の範囲となり、CNP(1-22)の 4.34 分よりも 3 倍以上長く、 $AUC_{0-60min}$  は CNP(1-22)の 45 pmole·min/mL と比較して 7.3~23.6 倍大きかった。評価したペプチドの中では、ghrelin(28-12)CNP(6-22)ghrelin(12-28)の血漿中濃度が最も高く、同じく CNP(6-22)の N 及び C 末の両端に ghrelin の C 末端由来構造を付加した ghrelin(12-28)CNP(6-22)ghrelin(12-28)と比べて  $AUC_{0-60min}$  で約 2 倍大きかった。CNP(6-22)の N または C 末端のいずれかに ghrelin の C 末端由来構造を付加したペプチドの中では C 末端側に付加した CNP(6-22)ghrelin(12-28)を投与したときの血漿中濃度が最も高かった。Ghrelin(28-12)CNP(6-22)及び ghrelin(28-12)CNP(6-22)を投与したときの血漿中濃度から算出した  $AUC_{0-60min}$  はほぼ同等であり、受容体アゴニスト活性が最も高かった CNP(6-22)ghrelin(12-28)amide を投与したときの  $AUC_{0-60min}$  は、CNP(6-22)ghrelin(12-28)の約 1/3 であり、評価した CNP/ghrelin chimeric peptides の中で最も低かった。

CNP/ghrelin chimeric peptides をラットに静脈内投与したときの血漿中濃度推移から算出した消失半減期はいずれも CNP(1-22)よりも長く、ペプチド間で大きな差は認められなかったのに対し、 $AUC_{0-60min}$  はペプチド間で最大約 3 倍の違いが認められ、分布容積が異なることによる差と考えられる (定常状態の分布容積 ( $V_{dss}$ ); CNP(6-22)ghrelin(12-28):  $132 \pm 71$  mL/kg, CNP(6-22)ghrelin(12-28)-amide:  $403 \pm 13$  mL/kg)。CNP の標的組織は骨端部にある成長板であり、組織内に血管が侵入していないことから一般的には薬剤の移行性が低い組織と考えられている。その為、分布容積の違いは、薬効強度に直接的に影響を及ぼす可能性もあり、留意が必要である。

以上、CNP(6-22)に ghrelin の C 末端由来構造を付加することで、体内での安定性が向上して消失が遅延した。一方で、その結合部位及び配列の違いによって分布容積が異なり、ペプチドの標的組織移行性が異なる可能性が示唆された。



**Fig. 11 PK profile of CNP(1-22) and CNP/ghrelin chimeric peptides**

Plasma CNP immunoreactivity concentration-time curves after the single iv administration of CNP (1-22) or CNP/ghrelin chimeric peptides (10 nmole/kg) to male rats.

Each value represents the mean + SD of 3 rats.

Plasma CNP immunoreactivity was determined by RIA.

[Peptides. 2017; 97: 16-21. Fig.1 - 一部改変 -]

**Table 9 AUC and plasma half-lives of CNP/ghrelin chimeric peptides in anesthetized rats.**

Each value represents the mean of triplicate measurements or the mean±SD of 3 rats.

Plasma CNP immunoreactivity was determined by RIA.

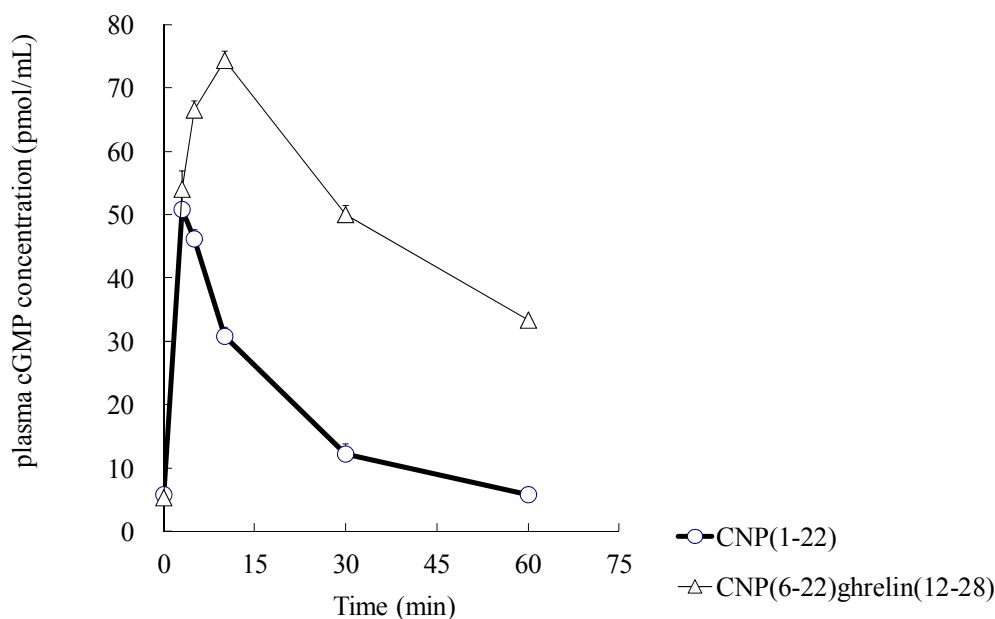
Peptides	AUC <sub>0-60min</sub> (pmole·min/mL)	T <sub>1/2</sub> (min)
CNP(1-22)	45 ± 2	4.34 ± 0.20
CNP(6-22)ghrelin(12-28)	1009 ± 52	15.03 ± 4.31
CNP(6-22)ghrelin(12-28)amide	330 ± 37	14.50 ± 0.85
Ghrelin(12-28)CNP(6-22)	705 ± 84	17.75 ± 3.99
Ghrelin(28-12)CNP(6-22)	734 ± 100	14.86 ± 2.64
Ghrelin(12-28)CNP(6-22)ghrelin(12-28)	489 ± 52	18.40 ± 2.05
Ghrelin(28-12)CNP(6-22)ghrelin(12-28)	1060 ± 160	17.38 ± 1.00

AUC was calculated by the area of the trapezoids defined.

T<sub>1/2</sub> was calculated individually by the least-squares method.

次に、これまでに評価した CNP/ghrelin chimeric peptides の中で、NPR-B アゴニスト活性と PK プロファイルがいずれも良好であった CNP(6-22)ghrelin(12-28)を選択し、ラットに 10 nmol/kg の用量で静脈内投与したときの血漿中 cGMP 濃度推移を CNP(1-22)を投与したときと比較した。結果を Fig.12 に示す。

CNP(6-22)ghrelin(12-28)を投与したときの血漿中 cGMP 濃度は、評価したいずれの時間においても CNP(1-22)を投与したときよりも高い濃度で推移した。



**Fig. 12 Plasma cGMP concentration-time curves after the single iv administration of CNP(1-22) or CNP(6-22)ghrelin(12-28) (10 nmole/kg) to male rats.**

Each value represents the mean  $\pm$  SD of 3 rats.

cGMP in all samples were determined by RIA.

[Peptides. 2017; 97: 16-21. Fig.1 - 一部改変 -]

## 第2項 CNP(1-22)及びCNP(6-22)ghrelin(12-28)の代謝安定性の比較

第1項での検討結果をもとに CNP(6-22)ghrelin(12-28) を選択し、ヒト型中性エンドペプチダーゼ (hNEP) に対する代謝安定性を CNP(1-22)と比較した。結果を Table 10 に示す。hNEP の入った反応液中に各ペプチドを添加して 37°C で 1 時間反応させた結果、CNP(1-22)では初期値の 16.7%まで含量が低下したのに対し、CNP(6-22)ghrelin(12-28) については初期値の 83.8%に相当する量が代謝されずに反応液中に残存していた。CNP に ghrelin の C 末端側構造を付加したことにより血漿成分等を含まない反応液中においても、hNEP に対する代謝抵抗性が向上したものと考えられた。

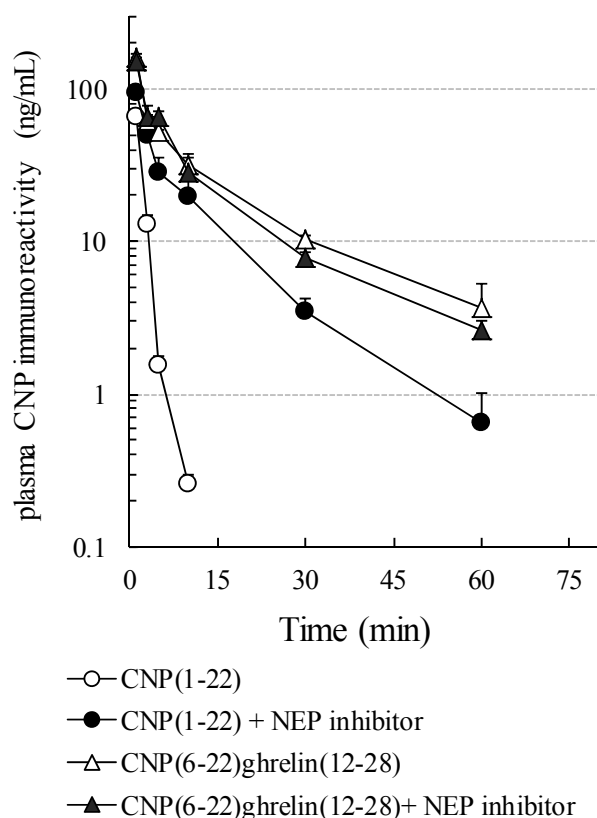
**Table 10 Stability against human neutral endopeptidase**

Each value represents the mean of 2 assays.

Peptides	% of initial contents
CNP(1-22)	16.7
CNP(6-22) ghrelin(12-28)	83.8

次いで、ラットに CNP(1-22)または CNP(6-22)ghrelin(12-28)を NEP 阻害剤である DL-thiorphan と併用投与したときの血漿中 CNP 免疫活性濃度推移を比較し、血漿中濃度推移に与える NEP による代謝の影響を評価した。血漿中濃度-時間曲線を Fig.13 に、血漿中濃度推移をもとに算出した  $AUC_{0-60min}$  及び消失半減期を Table 11 に示す。

NEP 阻害剤を併用投与することにより、CNP(1-22)を静脈内投与したときの血漿中濃度の消失半減期が約 5 倍に延長し、 $AUC_{0-60min}$  は 3.7 倍高くなった。一方で、CNP(6-22)Ghrelin(12-28)を静脈内投与したときの血漿中 CNP 免疫活性濃度推移は NEP 阻害剤の併用投与によって、ほとんど変化しなかった。CNP(6-22)ghrelin(12-28)を単独投与したときの消失半減期は  $14.9 \pm 3.1$  分、NEP 阻害剤を併用したときでは  $12.7 \pm 1.2$  分であり、NEP 阻害剤の併用の有無にかかわらず、CNP(1-22)と NEP 阻害剤を併用投与したときの消失半減期 ;  $9.94 \pm 1.40$  分よりも長く、 $AUC_{0-60min}$  も大きかった。本結果から、ラット体内で CNP(6-22)ghrelin(12-28)は NEP による代謝に対して抵抗性を示すのみでなく、CNP(1-22)と NEP 阻害剤を併用投与したときよりもさらに高い血漿中濃度で推移することが判った。



**Fig. 13** Effect of NEP inhibitor co-administration on CNP immunoreactivity concentration–time curves in plasma after the single iv injection of CNP(1-22) or CNP(6-22)ghrelin(12-28) (0.02 mg/kg) combined with iv infusion of either 5% mannitol or DL-thiorphan (30  $\mu$ g/min/body) to male rats.

Each value represents the mean +SD of 3 rats.

[Peptides. 2017; 97: 16-21. Fig.2 - 一部改変 -]

**Table 11** Pharmacokinetic parameters of CNP(1-22) and CNP(6-22)ghrelin(12-28) in rats

The native CNP(1-22) or CNP(6-22)ghrelin(12-28) was intravenously administered at a dose of 0.02 mg/kg. Each value represents the mean +/- SD of 3 rats.

Peptides	Dose (mg/kg)	NEP inhibitor	AUC <sub>0-60min</sub> (ng · min/ml)	T <sub>1/2</sub> (min)
CNP(1-22)	0.02	-	201± 24	1.96±0.05
		+	748± 84	9.94±1.40
CNP(6-22) ghrelin(12-28)	0.02	-	1386± 57	14.9±3.1
		+	1293±160	12.7±1.2

AUC was calculated by the area of the trapezoids defined.

T<sub>1/2</sub> was calculated individually by the least-squares method.

### 第3項 正常幼若マウスを用いた CNP(6-22)ghrelin(12-28)の骨伸長作用の評価

3週齢の雌性 Crlj : CD1 (ICR) 系マウス (n=10/group) に、CNP(1-22) (0.25 mg/114 nmole/kg) または CNP(6-22)ghrelin(12-28) (0.25 mg/67 nmole/kg) を1日2回×29日間反復皮下投与した後の体重、体長及び尾長を媒体投与群と比較した。結果を Table 12 に示す。媒体投与群と比較して、CNP(1-22) 投与群では体重、体長及び尾長のいずれにおいても有意な差は認められなかった。一方で、CNP(6-22)ghrelin(12-28)を投与した群の体長及び尾長は媒体投与群と比較して有意に伸長し、体重には差がなかった。

投与終了時に採取した血液を用いて投与したペプチドに対する抗体価の産生を評価した結果、すべての個体で抗体値の上昇は認められなかった (詳細データは示さず)。

**Table 12 Effect of CNP(1-22) and CNP(6-22) ghrelin(12-28) on the body weight and the longitudinal growth of ICR mice.**

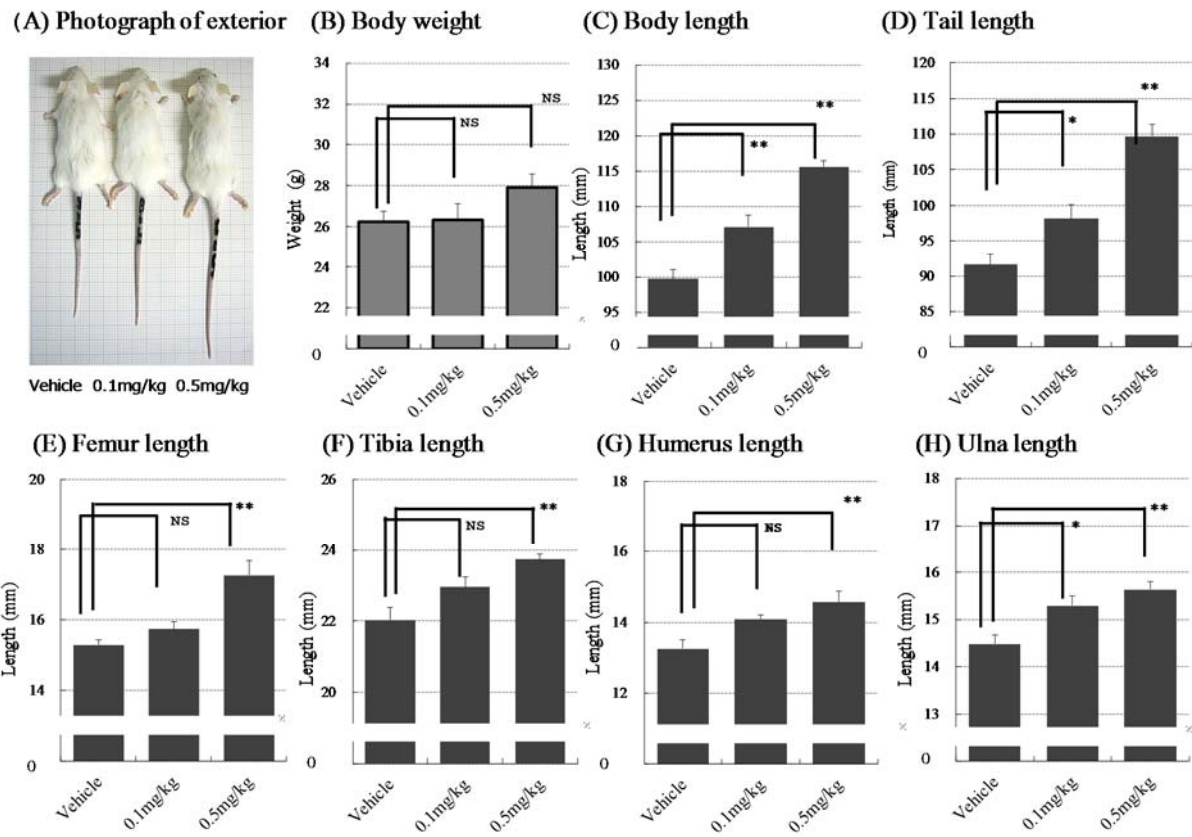
The native CNP(1-22) or CNP(6-22)ghrelin(12-28) was repeatedly administered subcutaneously at a dose of 0.25 mg/kg twice daily for 29 days. Each value represents the mean +/- SD of 10 mice.

Test compounds	Body weight (g)	Body length (mm)	Tail length (mm)
(Vehicle control)	28.0 ±2.1	102.9 ±2.6	90.7 ±4.0
CNP(1-22)	27.2 ±1.4 <sup>NS</sup>	103.0 ±2.1 <sup>NS</sup>	90.7 ±2.8 <sup>NS</sup>
CNP(6-22)ghrelin(12-28)	27.5 ±1.9 <sup>NS</sup>	109.5 ±2.7 <sup>**</sup>	96.8 ±3.5 <sup>**</sup>

NS: not significant (P>0.05), \*\*: Significant(p<0.01) with Tukey-Kramer's HSD test

次いで、3週齢の雌性 Crlj : CD1 (ICR) 系マウス (n=8/group) に CNP(6-22)ghrelin(12-28)を 0.1 または 0.5 mg/kg (27 または 133 nmole/kg) の用量で1日3回×30日間反復皮下投与したときの骨伸長作用を検討し、骨伸長作用の用量依存性を評価した。投与終了翌日の動物の外観、体重、体長、尾長、上腕骨、尺骨、大腿骨と脛骨の計測結果を Fig.14 に示す。

CNP(6-22)ghrelin(12-28) の反復皮下投与により、用量依存的且つ有意にマウスの骨伸長が促進された。媒体投与群に比べて 0.1 mg/kg 投与群では体長、尾長、及び尺骨の長さが有意に伸長し、0.5 mg/kg 投与時においては、体長、尾長に加えて測定したすべての長管骨 (大腿骨、脛骨、上腕骨及び尺骨) の長さが有意に伸長した。体重についてはいずれにおいても群間で有意差は認められなかった。



**Fig. 14** Body weight, body length and tail length of female mice after the repeated sc administration of CNP(6-22)ghrelin(12-28) at doses of 0.1 or 0.5 mg/kg thrice daily for 30 days.

Each value represents the mean + SD of 8 mice.

NS: not significant ( $P > 0.05$ ), \*: significant ( $p < 0.05$ ) and \*\*: significant ( $p < 0.01$ ) with Tukey-Kramer's HSD test

[Peptides. 2017; 97: 16-21. Fig.3 - 一部改变 -]



#### 第4節 考察

CNPの生理機能については様々な報告があり [40]、中でも強力な軟骨内骨化の促進作用に注目が集まっている [44]。これまでに、CNP及びその受容体であるNPR-Bの遺伝子改変動物を用いた検討において活性獲得型の遺伝子改変ではいずれも過剰な骨伸長が、機能損失型の遺伝子改変ではいずれも成長障害が、それぞれ誘発されることが報告されている [42, 43]。特に、CNP遺伝子欠損マウスでは骨端にある成長板の狭小化が認められたことから、CNPが軟骨内骨化の正の制御因子として生理的に機能していることが明らかになっている。

一方で、生体内においてCNPは作用部位の近傍で発現・分泌するオートクリンまたはパラクリン物質と考えられている。血漿中における内因性CNP濃度は極めて低く、天然型配列のCNP(1-22)を投与しても速やかに消失してしまうために、これまでに医薬品として開発することは困難であった [37, 38, 39]。

そのような状況の中で、本研究で見出されたCNP/ghrelin chimeric peptidesは、いずれもNPR-Bアゴニスト活性を保持したまま代謝安定性が向上し、体内からの消失半減期が延長していた。中でもNPR-Bアゴニスト活性とPKプロファイルのいずれもが良好であったCNP(6-22)ghrelin(12-28)を幼若マウスに反復皮下投与した結果、骨の伸長が強力に促進された。CNP(1-22)を同じ条件で反復皮下投与しても作用は認められなかった。

八十田らは、CNP(1-22)を幼若マウスに1  $\mu$ g/kg/min (1.44 mg/kg/day)の投与速度で4週間定速静脈内投与することで、体長及び骨伸長が促進することを報告している [45]。皮下投与時の生物学的利用率(約20%と想定)を考慮すると、この投与量は、今回の検討で用いたCNP(622)ghrelin(12-28)の投与量(0.25 mg/kg $\times$ 1日2回または0.1 mg/kg $\times$ 1日3回)の20倍以上に相当する高い用量であることから、誘導體化によりPKプロファイルの改善し、薬効が増強に寄与したと考えられる。

一方で、Wendtらはpolyethylene oxideを結合させたCNP誘導體(以下、PEG化CNP)を合成し、それがNEPに対して代謝抵抗性を示し、血漿中での消失半減期が著しく延長することを報告した[46]。しかしながら、このPEG化CNPをマウスに反復皮下投与すると、*in vivo*で十分な血漿中cGMP濃度の上昇を示したにも関わらず、ほとんど骨伸長作用を示さなかった。また、CNP(1-22)のC末端に蛇毒であるdendroaspis natriuretic peptideのC末端構造を結合させたcenderitide(CD-NP)の前臨床・臨床試験報告においても骨・軟骨に対する作用は報告されていない [47]。代謝安定性を向上させて血漿中での消失半減期を延長しても、標的組織である成長板への移行性が十分ではない場合には、期待するような薬効を示せないと考えられる。

成長期の子供の長管骨の骨端部にある成長板は、軟骨細胞とそれを取り囲む細胞外マトリクスからなる層状の軟骨組織である。成長板には、血管、神経、リンパ管の侵入が認められない為に、薬剤、酵素及び組織維持に必須の栄養素の供給は、近隣組織の血管からの受動拡散に依存している。PEG修飾や抗体タンパクとの結合などで血中滞留性を向上させることは、成長板組織への移行性を低下させる要因となる可能性が高い。たとえば、中枢作用薬については、血液脳関門

を通過して脳に薬剤が移行する効率が薬効発現のための重要な因子になることが広く知られているように、低身長治療薬についても、成長板組織内に存在する軟骨細胞に薬剤を有効に作用させるためには、軟骨組織への移行性に関わる要因を特定して、それに適合した性質を薬剤に付与することが重要である。

本検討で CNP(6-22)ghrelin(12-28)は、骨伸長において CNP(1-22)よりも効率的に作用しうることが示された。CNP(6-22)ghrelin(12-28)の分子量は 4000 以下と比較的小さいこと、NEP に対する代謝抵抗性が向上したこと、血漿中での消失半減期が延長したことで移行に十分な時間が確保されたこと等に加えて、塩基性アミノ酸を多く含む ghrelin の C 末側の構造を CNP に付加することで、負電荷を帯びた軟骨組織内の細胞外マトリクス成分との親和性が向上し、作用局所へのペプチドの移行性と局所での滞留性が改善されたのではないかと推察している。

## 第5節 小括

Ghrelin の C 末端側に由来する構造を CNP の NPR-B アゴニスト活性の責任配列部分である CNP(6-22)に結合させた CNP/ghrelin chimeric peptides は、NPR-B アゴニスト活性を保持したままで、ラットに静脈内投与したときの血漿からの消失半減期が延長した。中でも、CNP(6-22)ghrelin(12-28)は、NPR-B アゴニスト活性、PK プロファイル及び NEP に対する代謝安定性のいずれにおいても良好な性質をもち、ラットに静脈内投与したときの血漿中 cGMP 濃度上昇作用は CNP(1-22)よりも優れていた。加えて、CNP(6-22)ghrelin(12-28)を幼若マウスに約 1 ヶ月間反復皮下投与することで体長及び骨長の伸びが用量依存的、且つ有意に促進され、CNP(1-22)ではその作用が確認できなかった。Ghrelin の C 末端側構造の付加により PK プロファイルが改善したことに加えて、成長板組織への移行性が改善し、成長板組織内に存在する軟骨細胞への作用効率が改善したものと推定している。

## 総括

本研究の対象となったghrelinは、アミノ酸28残基からなるペプチドホルモンであり、N末端から3番目のSer残基がオクタン酸に代表される脂肪酸でアシル化された特徴的な構造を有している [3]。GhrelinはGHS-Rの内因性リガンドであり、主に胃粘膜で産生され、脳下垂体からGHの分泌を亢進させる脳-消化管ペプチドの一つであるとともに、今まで知られている中で唯一の末梢で分泌して作用する摂食促進ペプチドでもある [1, 2]。胃では閉鎖型内分泌細胞 A-like 細胞で産生され、顆粒内に蓄積した後に循環血中に放出される [3]。胃以外にも腸、膵臓、視床下部、胎盤、腎臓などでも産生され、各組織から分泌されたghrelinは、近傍に発現しているGHS-Rに直接作用すると共に、迷走神経求心路末端に存在する受容体に結合し、情報を中枢組織に伝達することが判っている [1]。加えて、血中を介して下垂体に直接作用してGH分泌を促進する経路も存在する [2]。言い換えれば、ghrelinはオートクリン・パラクリン因子として分泌部位近傍の受容体に直接作用したり、神経伝達物質の一つとして末梢から中枢に情報を伝達すると共に、内分泌ホルモンとして遠隔部の組織にも直接作用しうる、作用機構において多様性を有した生体内ペプチドである。それ故に、ghrelinは長期にわたる適応と進化の過程において生体内でそれらの全て役割と作用様式に対応できる構造として最適化され、種を超えて保存されてきたと推定される。

この作用様式の多様性に加えて、アシル化ペプチドという構造上の特徴に基づくghrelinと脱アシル化されたdesacyl-ghrelinの生理的機能の比較に関する研究、ペプチド鎖の一部が切れた短鎖型のghrelinの活性に着目する研究、あるいはghrelinと低分子GHS-Rアゴニストとの構造相関に関する研究等、さまざまな構造活性相関に関する研究報告があり、これまでに多くの興味深い知見が得られている [5, 8, 48]。

それらの背景を踏まえて、本研究ではこれまではあまり研究が進んでいないghrelinのC末端側構造に着目し、ghrelinのPK/PDプロファイルに及ぼすC末端側構造の役割に関して、その一端を明らかにした。加えて、motilinの受容体アゴニスト活性の責任配列であるmotilin(1-12)にghrelinのC末端側構造を付加することで、motilin受容体に対するアゴニスト活性は維持したままで、PKプロファイルがghrelin様に変化することを示した。さらに、ghrelin及びmotilin誘導体のPKプロファイルに最も影響を及ぼす配列部位としてghrelinの15-20位の配列；Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lysを特定した。

加えて、本研究により、ghrelinのC末端側構造がghrelinの迷走神経を介した活性発現に重要であることを示された。すなわち、ghrelinをラットに投与したときのGH分泌促進作用は、迷走神経の切断で著しく減弱したことから、ghrelinのGH分泌促進作用の少なくとも一部は迷走神経を介していると考えられる。一方で、ghrelinのN末端側の構造を模倣した低分子アゴニストであるanamorelinのGH分泌促進作用は、迷走神経切断の影響を受けなかったことから、anamorelinは迷走神経を介したGH分泌促進作用を有していないと考えられる。

さらに、ghrelinのC末端側構造をCNPに付加することで、NPR-Bアゴニスト活性を保持したままで代謝安定性が向上し、血漿中での消失が遅延することを見出した。本研究で見出された新規のCNP誘導体、CNP(6-22)ghrelin(12-28)をマウスに反復皮下投与することで骨伸長が用量依存的に亢進した。

以上、本研究によって ghrelin の C 末端側構造が ghrelin の体内滞留性の維持と生理活性発現に重要な役割を担っていることを初めて明らかにし、この ghrelin の C 末端側構造を付加した motilin 誘導体やCNP 誘導体を用いて、ghrelin の C 末端側構造の持つ機能が ghrelin 以外のペプチドにも応用し得るものであることを示した。今後、創薬研究への応用が期待できる。

医薬品の開発研究の中で、生体内ペプチドを医薬品として利用する最大のメリットは、作用の確実性とその特異性の高さにあると考える。もともと生体内で機能している生理活性物質として同定されたものであり、総じて比活性が高く、Off-targetな毒性が発現するリスクは低分子化合物と比べて低いと考えられる。

しかしながら、ペプチドは消化管内の消化酵素等で容易に代謝されて不活性化するために、経口剤での開発は総じて困難である。注射剤として投与しても体内で代謝され、尿中に排泄されることで速やかにその作用を失う場合が多く、実際に生体内ペプチドそのものが医薬品として応用された例は限定されている。一方で、近年では機能性製剤の開発や誘導体化などの手法を用いてそれらのペプチドの持つ弱点を克服することでペプチド医薬品の可能性が見直されつつあり、医薬品として上市されるものも増えてきている。実際、生理活性ペプチドの体内滞留性を向上させた誘導体で医薬開発を達成した代表例としては、glucagon-like peptide-1 (GLP-1) が挙げられる [49]。天然型のGLP-1(7-36)amideの血漿中半減期は極めて短く、長い間、その臨床応用は困難とされていたが、現在では、さまざまな手法を用いた長時間作用型GLP-1受容体作動薬が市場に出ている。例えば、ノボ ノルディスク ファーマ株式会社のliraglutideは、GLP-1(7-37)の 26 位を N-パルミトイル-グルタミン酸を付加したLysに置換することで血漿タンパク質との結合率を高め、生体内での代謝安定性を向上させることで、1日1回の投与でも有効性を示す長時間作用型のPK/PDプロファイルの獲得に成功している [50]。さらにliraglutideに続く次世代GLP-1作動薬である日本イーライリリー株式会社のdulaglutideは、IgG4抗体のFc領域にGLP-1アナログを2分子結合させることで1週間に1回の投薬でもliraglutideとほぼ同等の有効性を示すことが報告されている [51]。

実際には、生理活性ペプチドを医薬品として応用する上で求められる性質は多様であり、その方法も様々である。加えて、GLP-1受容体作動薬の臨床実績が増え、実際に医薬品として多くの種類が使用される中で、同じGLP-1受容体作動薬でも短時間作用と長時間作用では治療効果の違いがあることも明らかになってきた [52]。消化管運動抑制作用や食直後のインスリン分泌作用は短時間作用型GLP-1でしか認められず、短時間作用型のGLP-1誘導体は食後血糖値の改善に利用される一方で、長時間作用型のGLP-1誘導体は作用時間が長いことから、空腹時血糖値の改善効果に優れていると言われている。

最も臨床応用が進んだペプチドホルモンであるインスリンについても同様の事が言える。ウシやブタの膵臓から抽出したインスリンの臨床応用から始まり、遺伝子工学で作られたヒトインスリンが製品化し、現在では、基礎分泌を補う長時間作用型インスリン製剤から食後期の追加分泌を補う速攻型あるいは超速攻型インスリン製剤まで、様々なPKプロファイルを有した製剤が開発されている。

異なるPKプロファイルをもった複数の誘導体を混合した2相性製剤も臨床応用されており、患者の症状や背景に合わせて最適な製剤を選択できる状況になっている。

さらに、副甲状腺ホルモンの当初の研究では、高濃度で長時間暴露させると骨吸収が進み、血液中へのカルシウム流出を促進させることが知られていたが、その後、低濃度で繰り返し投与することで、それとは逆に骨形成を促進する作用が優位になることが示され、現在では骨粗鬆症の治療薬として実際に臨床応用されている [53]。

本研究で認められた ghrelin の C 末端側構造のもつ半減期延長作用は、抗体タンパクとの結合等で達成される血漿中濃度の持続と比べて軽微なものであるが、そのことが本機能の有用性の優劣に繋がるものではないと考える。本研究で、新たに見出された CNP 誘導体の一つである CNP(6-22) ghrelin(12-28)は、CNP(1-22)と比較して、NEP による代謝に対して抵抗性を示し、体内半減期が著しく延長していた。それに加えて、塩基性アミノ酸が多く含有する ghrelin C 末端側構造が、負電荷を帯びた成長板軟骨組織への移行性の改善に寄与していると推定される。そもそも、骨・軟骨には、ghrelin ペプチドとそのアシル化酵素及び受容体が発現しており、骨形成に関与していることも報告されている [54]。そのことから、ghrelin 自身が骨・軟骨に働いて骨形成を促進するペプチドであることが、CNP(6-22)ghrelin(12-28)の成長板組織への移行性の改善作用と関連する可能性も考えられる。CNP のような“オートクリン/パラクリン物質”を外から投与して、循環血漿を介して作用局所に到達させて作用させる場合には、それに十分な血漿中濃度を持続させることに加えて、標的組織である骨端の成長板組織への移行性が極めて重要となるが、その意味でも ghrelin の C 末端側の構造は非常に効率的、且つ有効な配列であると考えている。

本研究で motilin や CNP に付加したペプチドは、もともと血漿中に比較的高濃度で検出される ghrelin 由来の配列である。その配列は、種を超えて保存されていることから抗原性が比較的低く、反復投与を行っても抗体は産生しにくいものと推察している。実際に、本研究で、CNP(6-22) ghrelin(12-28)をマウスに4週間反復皮下投与しても抗体価の上昇は認められなかった。加えて、ghrelin そのものの生理的な役割も明確になってきており、安全性の評価も進んでいることから、その C 末端配列を付与することで想定外の副作用が発現するリスクは、極めて少ないと考える。低身長症の治療では長期間の投薬が必要になるものと想定しており、活性プロファイルが明確であり、安全性上の懸念が少ないことは、医薬品としての応用を考える上で、重要な要素と言える。

以上の結果から、CNP(6-22) ghrelin(12-28)は医薬品として応用する上で十分な PK プロファイルと薬理作用及び安全性を兼ね備えたペプチドであると考えている。

最後に、細胞膜に存在する受容体のリガンドは、細胞外から細胞膜上の受容体に結合することで、細胞外部から細胞内に情報を伝達する。すなわち、細胞をとりまく外環境が本研究で用いた ghrelin、motilin あるいは CNP のようなペプチドの働く場である。生体内では、培養細胞のような単純な環境とは異なり、それぞれの組織は必要な情報を正しく伝達されるように、特異的な細胞外環境を構成している [55]。一方で、情報を伝達するリガンド自身も、その役割を達成するように、その進化の過程で構造が最適化されていると考えられる。すなわち、受け手となる組織の細胞外環境と

それに適したリガンドの構造の特異性により、リガンドと受容体との相互作用に違いが生じ、作用効率を向上とその後のシグナル最適化に結びつくと考えている。

これまで、多くのペプチドリガンドとその受容体に関してその機能の解析に関する研究が進められ、その結果をもとにペプチド誘導体や低分子化合物等の新規活性物質が創出され、実際に医薬品として応用されてきた。一方で、今回の研究の成果から、既知のペプチドであっても、今までその機能がわからずあまり注目されなかった配列部分にも未解明の重要な役割がある可能性が示された。今後の本研究が発展し、それらが明らかになっていくことで、新たな創薬機会が生まれることに期待する。

## 結論

本研究は、これまで役割と機能が明確ではなかったghrelinのC末端側構造に着目したものであり、実際に、各種ペプチド改変体及び誘導体を用いてghrelinのC末端側構造によるPK/PDプロファイルの改善作用を明確に示し、活性のコアとなる配列の特定に至った。加えて、ghrelinのC末端側構造の生理的な機能の一端を明らかにするのみでなく、この機能がghrelin以外のペプチドにも応用可能なものであることを示した。本研究の結果は、今後の創薬研究に応用可能なものであると考えている。



## 謝辞

本論文作成にあたり、有益な御指導と御鞭撻を賜りました京都薬科大学 赤路 健一 教授に謹んで感謝の意を表します。また、本論分をご精読いただき、有益なコメントをいただきました京都薬科大学 柴田 敏之 教授、中田 徹男 教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行する上で、御懇篤な御教示、御助言を戴きました国立循環器病研究センター研究所 理事 寒川 賢治 博士 並びに 故 伊藤 漸 群馬大学医学部名誉教授に心より感謝の意を表します。また、本研究に際し、貴重なご助言とご援助を戴きました古谷 真優美 博士、猪俣 則夫 博士、大沼 規男 博士、田中 正治 博士、及び大末 和廣 博士に心から感謝いたします。

また、南竹 義春 博士、磯野 藤男 博士、前田 博昭 博士をはじめ、本研究に御支援、御協力いただきましたアスピオファーマ株式会社の方々に厚くお礼申し上げます。

## 引用文献

1. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Niiijima A, et al. , Therole of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*, 2002; **123**: 1120–1128.
2. Kojima M and Kangawa K, Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*, 2005; **85**: 495–522.
3. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, et al., Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 1999; **402**: 656-660.
4. Kojima M, Hamamoto A and Sato T, Ghrelin O-acyltransferase (GOAT), a specific enzyme that modifies ghrelin with a medium-chain fatty acid. *J Biochem*, 2016; **160**: 189-194.
5. Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, et al., Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem*, 2000; **43**: 4370-4376.
6. Matsumoto M, Kitajima Y, Iwanami T, Hayashi Y, Tanaka S, et al., Structural similarity of ghrelin derivatives to peptidyl growth hormone secretagogues. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; **284**: 655-659.
7. Matsumoto M, Hosoda H, Kitajima Y, Morozumi N, Minamitake Y, et al., Structure–activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; **287**: 142–146.
8. 佐藤 元康, グレリンシグナルの多様性を支える分子メカニズム. *生化学*, 2007; **85**: 557-561.
9. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H and Kangawa K. Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem*, 2000; **275**: 21995-22000.
10. Makino T, Matsumoto M, Suzuki Y, Kitajima Y, Yamamoto K, et al., Semisynthesis of human ghrelin: condensation of a Boc-protected recombinant peptide with a synthetic O-acylated fragment. *Biopolymers*, 2005; **79**: 238–247.
11. Paul BJ, Littler BJ, Jos F, Vogt PF and Pines SH, A practical synthesis of the pseudotripeptide RC-1291.

*Org Proc Res Dev*, 2006; **10**: 339–345.

12. Smith GP, Jerome C, Cushin BJ, Eterno R and Simansky KJ. Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat. *Science*, 1981; **213**: 1036–1037.
13. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H and Kangawa K, Ghrelin, and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; **279**: 909–913.
14. Beaumont NJ, Skinner VO, Tan TM, Ramesh BS, Byrne DJ, et al. , Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *J Biol Chem*, 2003; **278**: 8877-8880.
15. De Vriese C, Hacquebard M, Gregoire F, Carpentier Y and Delporte C, Ghrelin interacts with human plasma lipoproteins. *Endocrinology*, 2007; **148**: 2355-2362.
16. Tannenbaum GS and Bowers CY, Interactions of growth hormone secretagogues and growth hormone-releasing hormone/somatostatin. *Endocrine*, 2001; **14**: 21-27.
17. Tannenbaum GS, Epelbaum J and Bowers CY, Interrelation ship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology*, 2003; **144**: 967-974.
18. Temel JS, Abemethy AP, Currow DC, Friend J, Duus EM, et al. , Anamorelin in patients with non-small-cell lung cancer and cachexia (ROMANA 1 and ROMANA 2): results from two randomised, double-blind, phase 3 trials. *Lancet Oncol*, 2016; **17**: 519-531.
19. 神田 隆, 血液神経閥門をターゲットとした治療戦略, *臨床神経*, 2011; **51**: 1020-1022.
20. Brown JC, Cook MA and Dryburgh JR., Motilin, a gastric motor activity stimulating polypeptide: the complete amino acid sequence. *Can J Biochem*, 1973; **51**: 533-537
21. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA and Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, et al., Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; **86**: 5992.
22. Poitras P and Peeters TL, Motilin. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2008; **15**: 54–57.
23. Mitznegg P, Bloom SR, Domschke W, Domschke S, Wuensch E, et al., Pharmacokinetics of motilin in man. *Gastroenterology*, 1997; **72**: 413–416.

24. Macielag MJ, Peeters TL, Konteatis ZD, Florance JR and Depoortere I, et al., Synthesis and in vitro evaluation of [Leu<sup>13</sup>] porcine motilin fragments. *Peptides*, 1992; **13**: 565–569.
25. He J, Irwin DM, Chen R and Zhang YP, Stepwise loss of motilin and its specific receptor genes in rodents. *J Mol Endocrinol*, 2010; **44**: 37-44.
26. Tack J, Deloosse E, Ang D, Scarpellini E, Vanuytsel T, et al., Motilin-induced gastric contractions signal hunger in man. *Gut*, 2016; **65**: 214-524.
27. Inatomi N, Sato F, Marui S, Itoh Z and Omura S, Vagus-dependent and vagus-independent mechanisms of action of the erythromycin derivative EM574 and motilin in dogs. *Jpn J Pharmacol*, 1996; **71**:29-38.
28. T L Peeters, Ghrelin: a new player in the control of gastrointestinal functions. *Gut* 2005; **54**: 1638–1649.
29. Takeshita E, Matsuura B, Dong M, Miller LJ, Matsui H, et.al., Molecular characterization and distribution of motilin family receptors in the human gastrointestinal tract. *J Gastroenterol*, 2006; **41**: 223-230.
30. Sanger GJ and Furness JB, Ghrelin and motilin receptors as drug targets for gastrointestinal disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016; **13**: 38-48.
31. Sanger GJ, Wang Y and Hobson A, Motilin: towards a new understanding of the gastrointestinal neuropharmacology and therapeutic use of motilin receptor agonists. *Broad J.Br J Pharmacol*, 2013; **170**: 1323-1332.
32. Tibaldi JM, Evolution of insulin: from human to analog. *Am J Med*, 2014; **127**: S25-38
33. Gadelha MR, Wildemberg LE, Bronstein MD, Gatto F and Ferone D, Somatostatin receptor ligands in the treatment of acromegaly. *Pituitary*, 2017; **20**: 100-108.
34. Bode B, Liraglutide: a review of the first once-daily GLP-1 receptor agonist. *Am J Manag Care*, 2011; **17**: S59-70
35. Park K, Itoh H, Yamahara K, Sone M, Miyashita K, et.al., Therapeutic potential of atrial natriuretic peptide administration on peripheral arterial diseases. *Endocrinology*, 2008; **149**: 483-491

36. 飯塚昌彦、杉本恒明、安田寿一、井村裕夫、河合忠一 ら, 急性心不全に対するカルペリチド (SUN 4936)の臨床的有用性の検討—プラセボを対照とした多施設共同二重盲検比較試験—*臨床と研究* 1993; **70**: 2602-2618.
37. Hunt PJ, Richards AM, Espiner EA, Nicholls MG and Yandle TG, Bioactivity and metabolism of C-type natriuretic peptide in normal man. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994; **78**: 1428-1435.
38. Kenny AJ, Bourne A and Ingram J. Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11. *Biochem J*, 1993; **291**: 83-88.
39. Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK and Dickey DM, Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol*, 2009; **191**: 341-366.
40. Schulz S, C-type natriuretic peptide and guanylyl cyclase B receptor. *Peptides*, 2005; **26**: 1024-1034.
41. Furuya M, Tawaragi Y, Minamitake Y, Kitajima Y, Fuchimura K, et.al., Structural requirements of C-type natriuretic peptide for elevation of cyclic GMP in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992; **183**: 964-969.
42. Nakao K, Osawa K, Yasoda A, Yamanaka S and Fujii T, The Local CNP/GC-B system in growth plate is responsible for physiological endochondral bone growth. *Sci Rep*, 2015; **27**:10554.
43. Yasoda A and Nakao K. Translational research of C-type natriuretic peptide (CNP) into skeletal dysplasias. *Endocr J*, 2010; **57** :659-66.
44. Vasques GA, Arnhold IJ and Jorge AA, Role of the natriuretic peptide system in normal growth and growth disorders. *Horm Res Paediatr*, 2014; **82**: 222-229
45. Yasoda A, Kitamura H, Fujii T, Kondo E, Murao N, et.al., Systemic administration of C-type natriuretic peptide as a novel therapeutic strategy for skeletal dysplasias. *Endocrinology*, 2009; **150**: 3138-44
46. Wendt DJ, Dvorak-Ewell M, Bullens S, Lorget F, Bell SM, et.al., Neutral endopeptidase-resistant C-type natriuretic peptide variant represents a new therapeutic approach for treatment of fibroblast growth factor receptor 3-related dwarfism. *J Pharmacol Exp Ther*, 2015; **353**: 132-149.

47. Lee CY, Huntley BK, McCormick DJ, Ichiki T, Sangaralingham SJ, et.al., Cenderitide: structural requirements for the creation of a novel dual particulate guanylyl cyclase receptor agonist with renal-enhancing in vivo and ex vivo actions. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*, 2016; **2**: 98-105
48. 椎村 祐樹, 中村 祐樹, 佐藤 貴弘, 児島 将康, グレリンとその受容体、およびグレリン脂肪酸転移酵素の比較内分泌学. *比較内分泌学*, 2013; **39**: 159-164
49. Gupta V. Glucagon-like peptide-1 analogues: An overview. *Indian J Endocrinol Metab*, 2013; **17**: 413-421
50. Shomali ME, Ørsted DD and Cannon AJ. Efficacy and safety of liraglutide, a once-daily human glucagon-like peptide-1 receptor agonist, in African-American people with Type 2 diabetes: a meta-analysis of sub-population data from seven phase III trials. *Diabet Med*, 2017; **34**: 197-203.
51. Tuttle KR, McKinney TD, Davidson JA, Anglin G, Harper KD, et.al., Effects of once-weekly dulaglutide on kidney function in patients with type 2 diabetes in phase II and III clinical trials. *Diabetes Obes Metab*, 2017; **19**: 436-441.
52. 大工原裕之, GLP-1 受容体作動薬による血糖コントロールおよび食行動の変化における検討: 短時間作用のリキシセナチドと長時間作用のリラグルチドの比較. *診療と新薬*, 2017; **54**: 89-92.
53. Brixen KT, Christensen PM, Ejersted C and Langdahl BL, Teriparatide (biosynthetic human parathyroid hormone 1-34): a new paradigm in the treatment of osteoporosis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2004; **94**: 260-270.
54. Nikolopoulos D, Theocharis S, Kouraklis G, Ghrelin, another factor affecting bone metabolism. *Med Sci Monit*. 2010; **16**: RA147-RA162.
55. 林 利彦, 細胞外マトリックスとその生物学的機能. *蛋白質核酸酵素*, 1992; **37**: 2269-2278.

## Appendices

本研究に用いたペプチドの純度および構造情報を以下に示す。

### 第1章 Ghrelin 改変体の構造活性相関に関する研究

#### 1. 天然型ペプチド

##### Ghrelin (半合成)

HPLC 純度	; 98 %以上 (社内規格値)
質量分析	; 3369.82 (理論値 3370.86)
アミノ酸組成分析	; Leu 2, Gly 1.0 (1), Ala 1.0 (1), Val 1.0 (1), Phe 1.0 (1), His 1.0 (1), Arg 3.0 (3), Ser3.6* (4), Pro 4.0 (4), Lys 4.0 (4), Glu 5.9 (6) Leu を基準 (基準値 2) としたときの各アミノ酸の組成比を示した。 ( ) 内は理論値である。*オクタノイル化 Ser の加水分解物を含む。
アミノ酸配列分析	; Gly - Ser - X - Phe - Leu - Ser - Pro - Glu - His - Gln - Arg - Val - Gln - Gln - → → → → → → → → → → → → → → → Arg - Lys - Glu - Ser - Lys - Lys - Pro - Pro - Ala - Lys - Leu - Gln - Pro - Arg → → → → → → → → → → → → → → → ( X: 未同定、文献情報と相違なし)

##### Desacyl-ghrelin (化学合成)

HPLC 純度	; 100.0%
質量分析	; 3244.9 (理論値 3244.66)
アミノ酸組成分析	; Leu 2, Ser 3.49 (4), Glu 6.23 (6), Gly 0.98 (1), Ala 0.97 (1), Val 0.82 (1), Phe 0.96 (1), Lys 4.12 (4), His 0.94 (1), Arg 2.99 (3), Pro 3.99 (4) Leu を基準 (基準値 2) としたときの各アミノ酸の組成比を示した。 ( ) 内は理論値である。
アミノ酸配列分析	; Gly - Ser - Ser - Phe - Leu - Ser - Pro - Glu - His - Gln - Arg - Val - Gln - Gln - → → → → → → → → → → → → → → → Arg - Lys - Glu - Ser - Lys - Lys - Pro - Pro - Ala - Lys - Leu - Gln - Pro - Arg → → → → → → → → → → → → → → → (文献情報と一致)

## 2. C 末端側欠失型 ghrelin 改変体

純度検定に用いた HPLC 分析条件

Column	; Inertsil ODS-3 $\Phi$ 4.6 mm $\times$ 250 mm
Eluent	; A: 0.1% TFA/H <sub>2</sub> O, B: CH <sub>3</sub> CN
Flow rate	; 1.5 mL/min
Gradient mode	; B conc. 5 $\rightarrow$ 65% (30 min)
Wave	; 220 nm

### Ghrelin(1-26) (化学合成)

HPLC 溶出時間	; 16.01 分
HPLC 純度	; 99.70%
質量分析	; 3116.8 (理論値 3117.6)
アミノ酸組成分析	; Leu 2, Gly 1.00 (1), Ala 1.00 (1), Val 0.98 (1), Phe 0.99 (1), His 1.00 (1), Arg 1.97 (2), Ser 3.55* (4), Pro 3.00 (3), Lys 3.94 (4), Glu 5.79 (6) Leu を基準 (基準値 2) としたときの各アミノ酸の組成比を示した。 ( ) 内は理論値である。 * オクタノイル化 Ser の加水分解物を含む。

### Ghrelin(1-20) (化学合成)

HPLC 溶出時間	; 16.19 分
HPLC 純度	; 98.52%
質量分析	; 2482.1 (理論値 2482.8)
アミノ酸組成分析	; Leu 1, Gly 1.00 (1), Val 0.98 (1), Phe 1.00 (1), His 1.00 (1), Arg 1.97 (2), Ser 3.56* (4), Pro 1.00 (1), Lys 2.96 (3), Glu 4.85 (5) Leu を基準 (基準値 1) としたときの各アミノ酸の組成比を示した。 ( ) 内は理論値である。 * オクタノイル化 Ser の加水分解物を含む。

### Ghrelin(1-7)-Lys-amide (化学合成)

HPLC 溶出時間	; 19.23 分
HPLC 純度	; 97.59%
質量分析	; 947.8 (理論値 947.1)
アミノ酸組成分析	; Leu 1, Phe 1.00 (1), Gly 1.00 (1), Ser 2.70* (3), Pro 1.00 (1), Lys 1.00 (1) Leu を基準 (基準値 1) としたときの各アミノ酸の組成比を示した。 ( )内は理論値である。 * オクタノイル化 Ser の加水分解物を含む。



3. N 末端側欠失型 ghrelin 改変体

Ghrelin(13-28) (化学合成)

HPLC 純度 ; 92.6%

質量分析 ; 目的ペプチドの理論値と一致することを確認した。

Ghrelin(15-28) (化学合成)

HPLC 純度 ; 99.1%

質量分析 ; 目的ペプチドの理論値と一致することを確認した。

Ghrelin(17-28) (化学合成)

HPLC 純度 ; 98.3%

質量分析 ; 目的ペプチドの理論値と一致することを確認した。

## 第2章 Motilin/ghrelin chimeric peptides を用いた ghrelin の C 末端配列の機能に関する研究

### 1. 天然型ペプチド

#### Motilin (遺伝子組換え)

HPLC 純度	; 99.4%
質量分析	; 2699 (理論値 2699.08)
アミノ酸配列分析	; Phe - Val - Pro - Ile - Phe - Thr - Tyr - Gly - Glu - Leu - Gln - Arg - Me - Gln - → → → → → → → → → → → → → → → Glu - Lys - Glu - Arg - Asn - Lys - Gly - Gln (文献情報と一致) → → → → → → → → →

### 2. Motilin/ghrelin chimeric peptides

純度検定に用いた HPLC 分析条件

Column	; Inertsil ODS-3 $\Phi$ 4.6 mm $\times$ 250 mm
Eluent	; A: 0.1% TFA/H <sub>2</sub> O, B: CH <sub>3</sub> CN
Flow rate	; 1.5 mL/min
Gradient mode	; B conc. 5→65% (30 min)
Wave	; 220 nm

#### Motilin(1-12)ghrelin(6-28) (化学合成)

HPLC 溶出時間	; 14.28 分
HPLC 純度	; 95.38%
質量分析	; 4206.62 (理論値 4204.9)

#### Motilin(1-12)ghrelin(8-28) (化学合成)

HPLC 溶出時間	; 14.32 分
HPLC 純度	; 95.74%
質量分析	; 4021.74 (理論値 4020.7)

#### Motilin(1-12)ghrelin(10-28) (化学合成)

HPLC 溶出時間	; 14.37 分
HPLC 純度	; 95.57%
質量分析	; 3756.63 (理論値 3754.4)

#### Motilin(1-12)ghrelin(12-28) (化学合成)

HPLC 溶出時間	; 14.98 分
HPLC 純度	; 95.84%
質量分析	; 3469.88 (理論値 3470.0)

Motilin(1-12)ghrelin(14-28) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 14.38 分  
HPLC 純度 ; 96.58%  
質量分析 ; 3241.67 (理論値 3242.8)

Motilin(1-12)ghrelin(16-28) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 14.55 分  
HPLC 純度 ; 97.50%  
質量分析 ; 2958.00 (理論値 2958.5)

Motilin(1-12)ghrelin(18-28) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 14.82 分  
HPLC 純度 ; 97.24%  
質量分析 ; 2700.61 (理論値 2701.2)

Motilin(1-12)ghrelin(19-28) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 14.92 分  
HPLC 純度 ; 97.92%  
質量分析 ; 2613.34 (理論値 2614.1)

Motilin(1-12)ghrelin(12-26) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 14.96 分  
HPLC 純度 ; 96.97%  
質量分析 ; 3215.82 (理論値 3216.8)

Motilin(1-12)ghrelin(12-24) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 14.80 分  
HPLC 純度 ; 97.42%  
質量分析 ; 2975.247 (理論値 2975.5)

Motilin(1-12)ghrelin(12-22) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 15.07 分  
HPLC 純度 ; 97.93  
質量分析 ; 2775.927 (理論値 2776.2)

Motilin(1-12)ghrelin(12-20) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 15.12 分  
HPLC 純度 ; 97.88%  
質量分析 ; 2581.639 (理論値 2582.0)

Motilin(1-12)ghrelin(12-18) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 15.70 分  
HPLC 純度 ; 98.09%  
質量分析 ; 2325.252 (理論値 2325.7)

Motilin(1-12)ghrelin(12-16) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 15.75 分  
HPLC 純度 ; 98.35%  
質量分析 ; 2109.220 (理論値 2109.5)

Motilin(1-12)ghrelin(12-28, E17D) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 14.67 分  
HPLC 純度 ; 98.82%  
質量分析 ; 3455.2 (理論値 3456.1)

Motilin(1-12)ghrelin(12-28, E17N) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 14.70 分  
HPLC 純度 ; 98.86%  
質量分析 ; 3454.4 (理論値 3455.1)

Motilin(1-12)ghrelin(12-28, E17Q) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 14.70 分  
HPLC 純度 ; 98.87%  
質量分析 ; 3468.3 (理論値 3469.1)

Motilin(1-12)ghrelin(12-28, S18T) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 14.74 分  
HPLC 純度 ; 98.16%  
質量分析 ; 3483.2 (理論値 3484.1)

Motilin(1-12)ghrelin(12-28, S18P) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 14.74 分  
HPLC 純度 ; 98.07%  
質量分析 ; 3479.6 (理論値 3480.1)

Motilin(1-12)ghrelin(12-28, S18L) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 14.84 分  
HPLC 純度 ; 98.06%  
質量分析 ; 3495.4 (理論値 3496.2)

Motilin(1-12)ghrelin(12-28, S18A) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 14.72 分  
HPLC 純度 ; 98.59%  
質量分析 ; 3452.9 (理論値 3454.1)

### 第3章 Ghrelin のC末端配列の機能を利用した新規C型ナトリウム利尿ペプチド誘導体デザインと評価

#### 1. 天然型ペプチド:

##### CNP(1-22) (遺伝子組換え)

HPLC 純度	; 98.80%
質量分析	; 2197.0 (理論値 2197.6)
アミノ酸組成分析	; Leu 4, Asp 0.99 (1), Ser 2.58 (3), Gly 5.92 (6), Met 0.98 (1), Cys ND (2), Ile 0.98 (1), Phe 1.00 (1), Lys 2.00 (2), Arg 0.99 (1) Leu を基準 (基準値 4) としたときの各アミノ酸の組成比を示した。 ( ) 内は理論値である。

#### 2. CNP/ghrelin chimeric peptides

##### 純度検定に用いた HPLC 分析条件

Column	; Inertsil PREP ODS $\Phi$ 4.6 mm $\times$ 250 mm
Eluent	; A: 0.1% TFA/H <sub>2</sub> O, B: CH <sub>3</sub> CN
Flow rate	; 1.5 mL/min
Gradient mode	; B conc. 5 $\rightarrow$ 65% (30 min)
Wave	; 220 nm

##### CNP(6-22)ghrelin(12-28) (化学合成)

HPLC 溶出時間	; 14.62 分
HPLC 純度	; 96.93%
質量分析	; 3754.208 (理論値 3755.5)
アミノ酸組成分析	; Leu 4, Asp 1.00 (1), Ser 2.65 (3), Glu 4.06 (4), Gly 3.97 (4), Ala 1.02 (1), 1/2Cystine 1.58 (2), Val 0.99 (1), Met 0.85 (1), Ile 0.99 (1), Phe 1.00 (1), Lys 5.00 (5), Arg 3.01 (3), Pro 3.04 (3) Leu を基準 (基準値 4) としたときの各アミノ酸の組成比を示した。 ( ) 内は理論値である。

##### CNP(6-22)ghrelin(12-28)amide (化学合成)

HPLC 溶出時間	; 14.49 分
HPLC 純度	; 99.40%
質量分析	; 3753.73 (理論値 3754.5)

Ghrelin(12-28)CNP(6-22) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 14.63 分  
HPLC 純度 ; 98.17%  
質量分析 ; 3754.55 (理論値 3755.5)

Ghrelin(28-12)CNP(6-22) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 14.88 分  
HPLC 純度 ; 97.33%  
質量分析 ; 3753.89 (理論値 3755.5)

Ghrelin(12-28)CNP(6-22)ghrelin(12-28) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 13.34 分  
HPLC 純度 ; 98.72%  
質量分析 ; 5756.08 (理論値 5755.9)

Ghrelin(28-12)CNP(6-22)ghrelin(12-28) (化学合成)

HPLC 溶出時間 ; 13.40 分  
HPLC 純度 ; 97.11%  
質量分析 ; 5756.89 (理論値 5755.9)