

氏名 (生年月日) ^{もろ} ^{ずみ} ^{わか} ^{はやし} 諸 住 (若 林) なおみ (1964年7月3日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 論博 第212号

学位授与の日付 2018年3月17日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 GhrelinのC末端側構造の機能解析と創薬への応用研究

論文審査委員 (主査) 教授 赤路 健一

(副査) 教授 栄田 敏之

(副査) 教授 中田 徹男

論文内容の要旨

序章

Ghrelinは成長ホルモン分泌促進因子レセプター1a (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 (GH) の分泌を亢進させる脳-消化管ペプチドであると共に、末梢で分泌して作用する唯一の摂食促進ペプチドでもある。他にも体重及び体脂肪増加作用、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、生体の恒常性を維持する上で重要な役割を果たすと考えられている。

ヒト型ghrelinはアミノ酸28残基からなり、N末端から3番目のSer残基がオクタン酸でアシル化された構造を有する。生体から単離された中で同様の修飾を受けた生理活性ペプチドは、他に報告がない。これまで多くの動物種で構造が同定されており、特に哺乳類においてはその構造が極めて類似していることが判っている。また、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おり、その構造活性相関に関しては多くの先行研究がある。一方で、C末端側構造に着目した研究は少なく、その生理学的意義については未だ不明な点が多い。

申請者は、アゴニスト活性の発現には直接的に寄与しないC末端側のペプチド配列が幅広い動物種で保存されていることに着目し、この部分についても未解明、且つ重要な生理機能があるものと推測し、その解明と応用を目的とした研究を開始した。本研究は、ghrelinのC末端側構造の機能の一端を明らかにし、そこで見出された特性を医薬品開発に応用する可能性について考察するものである。

第1章 Ghrelin 変体の構造活性相関に関する研究

第1章では、ghrelin 変体の薬物動態 (PK) プロファイルと GH 分泌促進作用に関する構造活性相関について検討した。

ラットに ghrelin、並びに C 末端側欠失体である ghrelin(1-26) または ghrelin(1-20) を静脈内投与した時の血漿中 ghrelin 免疫活性 (アシル化部位を認識) 濃度の消失半減期は 8.1~14.4 分の範囲であり、その違いは軽微であった。一方で、ghrelin(1-7)-Lys⁸-amide の消失半減期は 0.4 分であり、極めて消失が速かった。同様に、ラットに desacyl-ghrelin 並びに N 末端側欠失体; ghrelin(13-28) または ghrelin(15-28)

を静脈内投与した時の血漿中 ghrelin 免疫活性 (C 末端側認識) 濃度の消失半減期は 8.9~ 24.8 分の範囲であったのに対し、ghrelin(17-28) の消失半減期は 3.5 分に低下した。これらの結果から、15-16 位を含む 8-20 位の構造の少なくとも一部に、ghrelin の消失半減期を延長させる機能があると考えられる。

受容体安定発現細胞を用いて測定したアゴニスト活性は、C 末端側の欠失部分が長くなるにつれて低下する傾向はあるものの、その差は軽微で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。一方で、ラットに静脈内投与した時の血漿中 GH 濃度推移は、ghrelin 及び ghrelin(1-26) を投与した時にはほぼ同等で、ghrelin(1-20) の GH 分泌促進作用は ghrelin の約 1/3-1/10 に低下した。Ghrelin の N 末端側を模倣した構造をもつ低分子 GHS-R アゴニストである anamorelin を投与した時の GH 分泌促進作用は ghrelin よりも弱く、*in vitro* 系で評価したアゴニスト活性との間に解離が見られた。Ghrelin(1-7)-Lys⁸-amide を投与しても血漿中 GH 濃度はほとんど上昇しなかった。Ghrelin の GH 分泌促進活性には、下垂体への直接作用と迷走神経を介した作用が関与することが知られている。本研究においてラット頸部で迷走神経を切断したところ、血漿中 GH 濃度の AUC は約 1/8 に低下し、ghrelin の GH 分泌促進作用は著しく減弱した。他方、anamorelin を投与した時には、迷走神経切断の影響を受けなかったことから、anamorelin は主には下垂体に直接作用して GH の分泌を促進すると考えられた。Ghrelin の C 末端側構造は迷走神経を介した GH 分泌促進作用の発現に関与する可能性が考えられる。

第 2 章 Motilin/ghrelin chimeric peptides を用いた ghrelin の C 末端側構造の機能に関する研究

第 2 章では motilin(1-12) と ghrelin の C 末端側構造を結合させた motilin/ghrelin chimeric peptides を用いて、ghrelin の C 末端側ペプチドの消失半減期延長作用を検証した。Motilin は ghrelin と同じく消化管から分泌される。22 残基からなるペプチドであり、N 末から 12 残基までの構造があれば全長配列とほぼ同等のアゴニスト活性を示すことから、ghrelin の C 末端側の構造と機能に関する構造活性相関研究に適していると考えた。

付加する ghrelin 由来配列の長さを 2 残基ずつ変えて評価した結果、motilin/ghrelin chimeric peptides の受容体アゴニスト活性は、天然型 motilin の活性とほぼ同程度であった。一方で、同ペプチドをラットに静脈内投与した時の血漿中 motilin 免疫活性濃度推移は、付加したペプチドの長さ及び配列によって変化した。Ghrelin(6-28)~ghrelin(16-28) を付加したペプチドの消失半減期は 8.3~11.7 分となり、motilin 投与時 (3.3 分) と比較して 2 倍以上長く、ghrelin(12-28)~ghrelin(12-20) を付加した場合でも motilin よりも長かった。それに対し、ghrelin(18-28) を付加したペプチドの消失半減期は 5.3 分で motilin との差は僅かであり、ghrelin(12-16) または ghrelin(12-18) を付加した時の消失半減期は 3.1 または 2.4 分で motilin よりも早く消失した。以上の結果から、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 [Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys] を推定した。加えて、17 位の酸性アミノ酸 Glu を中性アミノ酸である Gln や Asn に置換すると半減期延長作用が完全に消失するが、18 位の Ser を他の中性アミノ酸に置換しても置換前とほとんど変わらないことを明らかにした。

第 3 章 Ghrelin の C 末端側構造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 3 章では、C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) のアゴニスト活性の責任配列; CNP(6-22) に ghrelin の C 末端側ペプチドを付加した CNP/ghrelin chimeric peptides の構造活性相関とその臨床応用の可能性を検討した。これまでの遺伝子改変動物を用いた検討で CNP が強力な骨伸長促進因子である事が明ら

かになっており、臨床応用も期待されている。しかしながら、生体内での消失が極めて速く、血漿中濃度の維持が困難なことが障害と考えられていた。

各種 CNP/ghrelin chimeric peptides を受容体発現細胞に作用させると、いずれもセカンドメッセンジャーである cGMP の産生を用量依存的に亢進した。その際、CNP(6-22) の C 末端側に ghrelin C 末端側構造を結合させてもアゴニスト活性が維持され、ペプチドの C 末端をアミド化することで活性が向上することが分かった。

一方で、ラットに CNP/ghrelin chimeric peptides を静脈内投与したときの血漿中 CNP 免疫活性濃度の消失半減期は 14.5~18.4 分であり、CNP(1-22) を投与した時 (4.34 分) より 3 倍以上長かった。CNP の代謝酵素である中性エンドペプチダーゼに対する代謝安定性が向上したことがその一因と考えられる。さらに、chimeric peptides の一つである CNP(6-22)ghrelin(12-28) を 3 週齢の幼若マウスに 0.25 mg/kg の用量で 1 日 2 回×29 日間反復皮下投与したところ、媒体投与群と比較して体長及び尾長が有意に伸長した。CNP(1-22) 投与群ではその作用は認められなかった。CNP(6-22)ghrelin(12-28) の骨伸長作用には用量依存性が認められ、0.5mg/kg の用量で 1 日 3 回 30 日間反復皮下投与すると、体長及び尾長に加えて前後股の長管骨が有意に伸長した。

以上、CNP に ghrelin の C 末端側構造を付加することによって PK プロファイルが改善し、*In vivo* での活性が増強されることが示された。chimeric peptides の一つである CNP(6-22) ghrelin(12-28) を幼若マウスに反復皮下投与することで用量依存的且つ強力な骨伸長作用が見られ、本ペプチドが低身長症の治療薬として有用である可能性が示唆された。

総括 (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、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 プロファイルの改善作用を明らかにした。加えて、その活性のコア配列として [Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys] を特定した。さらに、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、今後の医薬品開発に応用する可能性を提示した。

論文審査の結果の要旨

Ghrelin は、成長ホルモン分泌促進因子レセプター-1a の内因性リガンドである。脳下垂体から成長ホルモン (GH) の分泌を亢進させるとともに、末梢で作用する摂食促進ペプチドでもある。ヒト型 ghrelin はアミノ酸 28 残基からなり、N 末端側の構造活性相関に関しては多くの先行研究があるが C 末端側構造の生理学的意義については未だ不明な点が多い。申請者は、アゴニスト活性には直接的に寄与しない C 末端側のペプチド配列が幅広い動物種で保存されていることに着目し、この C 末端側配列が持つ生理機能の解明と応用を目指した研究を行った。

1. Ghrelin 改変体の構造活性相関に関する研究

申請者はまず、ghrelin 改変体の薬物動態プロファイルに関する構造活性相関について検討した。その結果、C 末端側欠失 ghrelin 誘導体をラット静脈内に投与した時の血漿中 ghrelin 消失半減期が、ghrelin

あるいは N 末端側欠失 ghrelin 誘導体を投与した時の半減期よりも著しく低下することを見出した。各種欠損体を用いた構造活性相関研究により、15-16位を含む8-20位の構造の少なくとも一部に ghrelin の消失半減期を延長させる機能があることを明らかにした。ついで、ghrelin C 末端側配列が成長ホルモン分泌促進作用に及ぼす影響を評価した。その結果、ghrelin の C 末端側構造が迷走神経を介した成長ホルモン分泌促進に関与する可能性を明らかにした。

2. Motilin/ghrelin キメラペプチドを用いた ghrelin C 末端側構造の機能に関する研究

Motilin のアゴニスト活性を担う motilin(1-12) と ghrelin C 末端側構造を結合させたキメラペプチドを用いて、ghrelin の C 末端側ペプチドの消失半減期延長作用を検証した。その結果、motilin/ghrelin キメラペプチドの消失半減期を延長させる配列として、ghrelin の 15-20 位 [Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys] を特定した。さらに、17 位の塩基性アミノ酸 Glu を中性アミノ酸である Gln や Asn に置換すると半減期延長作用が完全に消失するが、18 位の Ser を他の中性アミノ酸に置換しても置換前とほとんど変わらないことを明らかにした。

3. Ghrelin C 末端側構造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

C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) のアゴニスト活性を担う CNP(6-22) に ghrelin の C 末端側ペプチドを付加したキメラペプチドの構造活性相関とその臨床応用の可能性を検討した。各種 CNP/ghrelin キメラペプチドを受容体発現細胞に作用させ、①CNP(6-22) の C 末端側に ghrelin C 末端側構造を結合させるとアゴニスト活性が維持されること、②ペプチドの C 末端をアミド化することで活性が向上すること、を明らかにした。また、CNP/ghrelin キメラペプチドの血漿中からの消失半減期が CNP 投与時より 3 倍以上長くなることを見出した。さらに、キメラペプチド CNP(6-22)ghrelin(12-28) が幼若マウスの体長及び尾長を有意かつ用量依存的に伸長させることを見出した。これらの結果は、本キメラペプチドが低身長症治療薬としての可能性を持つことを示唆するものである。

以上申請者は本研究において、これまで役割と機能が明確ではなかった ghrelin の C 末端側構造が ghrelin の薬物動態プロファイルを改善させることを明らかにするとともに、その作用発現のコア配列が [Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys] であることを特定した。さらに、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、今後の医薬品開発に応用できる可能性を提示した。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値を有するものと判断する。