



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	乙第1882号
学位記番号	論 第197号
氏名	安達 祐介
授与年月日	平成 29年 9月 28日
学位論文の題名	細胞膜透過性と薬理活性の評価に基づいた細胞内タンパク質を標的とするペプチド医薬品の研究
論文審査担当者	主査： 尾関 哲也 副査： 中川 秀彦, 梅澤 直樹, 佐藤 匡史

氏名	あだち ゆうすけ 安達 祐介
学位の種類	博士（薬科学）
学位の番号	薬論博第 197 号
学位授与の日付	平成 29 年 9 月 28 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	細胞膜透過性と薬理活性の評価に基づいた細胞内タンパク質を標的とするペプチド医薬品の研究
論文審査委員	(主査) 教授 尾関 哲也 (副査) 教授 中川 秀彦 ・ 准教授 梅澤 直樹・准教授 佐藤 匡史

論文内容の要旨

生体内におけるタンパク質同士の相互作用はタンパク質間相互作用 (protein-protein interaction、PPI) と呼ばれ、シグナル伝達や酵素反応などの重要な役割を担い、生物の発生や発達、恒常性の維持に不可欠である。PPI は種々の疾患とも関連しており、特に細胞内における異常な PPI を阻害することは新たな治療手段となり得る。これまでに、リガンドと受容体との作用を標的とした多数の低分子医薬品が創出されてきた。しかしながら、従来の低分子創薬の手法では、タンパク質同士の平坦で広い作用面を阻害することは困難であった。一方で、分子量が大きいペプチドやマクロサイクルといった中分子化合物は、広く浅いタンパク質表面との作用に適すと考えられ、中分子 PPI 阻害薬が注目を集めている。中分子化合物には良好な PPI 阻害活性を期待できるものの、多くの場合、細胞膜を透過しない点が課題となっている。細胞内に到達可能な中分子 PPI 阻害薬は、アンメットメディカルニーズを満たす革新的な医薬品となる可能性がある。

膜透過性ペプチド (cell penetrating peptide、CPP) を用いることで、中分子化合物の薬理活性を改善した例は多く報告されているものの、同時に細胞内移行性を評価している例はほとんどない。そこで本研究では、ペプチド性 PPI 阻害薬の構造活性相関研究において、薬理活性に加えて膜透過性も評価し、膜透過性が薬理活性に与える影響を加味した上で、最適化を進める研究手法の確立を目的とした。標的として dedicator of cytokinesis 2 (DOCK2) と Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) との PPI を選択した。

ファージディスプレイスクリーニングにより取得したペプチド **4** は、DOCK2-Rac1 の PPI を 4.7 nM の IC₅₀ 値で阻害したが、DOCK1 に対しては阻害活性を示さなかった。また、10 μM の濃度で MINO 細胞の遊走を完全に抑制した。既に報告されている低分子 DOCK2 阻害薬 CPYPP と比べ、**4** は優れた活性および選択性を示し、PPI の阻害には作用面積の大きい化合物が有利であると示唆された。一方で、**4** は 3.3 μM 以下の濃度では細胞遊走を阻害せず、膜透過性が低いと考えられたため、CPP によるコンジュゲーションを検討することとした。

リードペプチド **4** への CPP コンジュゲーションに先立ち、ルシフェリンとルシフェラーゼとの反応に基づいた評価系を用い、13 種類の既知 CPP の膜透過性を比較した。一律に膜透過性があると報告されているペプチドであっても、その膜透過性には優劣があり、oligoArg、Nle-Pen および S4₁₃-PV が、他の CPP と比較して良好な膜透過を示した。また、新規 CPP の取得を目指し、A 型インフルエンザウイルスタンパク質 PB1-F2 の C 端側ヘリカル構造に着目し、74 位から 83 位に相当する断片ペプチド (PF5) が高い膜透過性を示すことを明らかにした。

次いで、良好な膜透過性を示した4種類のCPPを4とコンジュゲーションしたところ、oligoArgおよびPF5とのコンジュゲートでは、細胞遊走の阻害活性が約3倍増強し、膜透過性も改善した。さらにDOCK2阻害ペプチドの構造変換を検討し、ペプチドの両端にoligoArgを分割して配置し、ジスルフィド結合の代わりに σ -xyleneリンカーで架橋した誘導体が、リードペプチド4と比較して、約30倍強い遊走阻害活性を示し、膜透過性の向上とも相関していた。

以上のように、細胞遊走阻害の評価系およびルシフェリンとルシフェラーゼとの反応に基づいた評価系を用いることで、PPI阻害ペプチドの細胞内標的由来の薬理作用と、細胞質への到達との相関を明確にした研究手法を提示できた。ペプチドにとって細胞膜の透過は重大な課題であり、こうした研究手法は、PPIを阻害するペプチド医薬品の創製に大きく貢献できると考えられる。

論文審査の結果の要旨

タンパク質間相互作用(PPI)はシグナル伝達や酵素反応など生体内で重要な役割を担っており、特に細胞内におけるPPI阻害は新たな治療手段として注目を集めている。ペプチドやマクロサイクルなどの中分子化合物は、タンパク質表面と広範に作用することから低分子化合物よりも有用と考えられるが、多くの場合細胞膜を透過しないことが課題となっている。このため、中分子化合物の膜透過性を向上を目指して様々な手段が検討されており、その中で細胞膜透過性ペプチド(CPP)の利用が近年増加している。

安達祐介は、ペプチド性PPI阻害薬の構造活性相関研究において、薬理活性に加えて膜透過性も評価し、膜透過性を考慮した生物活性を指標に最適化を進める研究手法の確立を目的として研究を行った。DOCK2とRac1のPPIに着目して研究を行った結果、膜透過性評価を加えた構造活性相関研究の方法により、両者のPPIを阻害する新規ペプチドの創出を達成し、また新規CPPの開発に成功した。

本論文について、論文審査担当者により個別に論文内容の審査および安達祐介との面談・諮問を行い、最終審査発表会を行った。最終審査発表会後に最終論文審査会を開催し、論文審査担当者の総意により博士(薬科学)の学位に値すると判定した。