

サイトカイン模倣低分子化合物の探索  
- トロンボポエチン様作用を持つベンゾジアゼピン化  
合物の同定

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/16305">http://hdl.handle.net/2297/16305</a>

氏名	木村達也
生年月日	
本籍	石川県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙第199号
学位授与の日付	平成11年9月30日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	サイトカイン模倣分子化合物の探索—トロンボポエチン様作用を持つベンゾジアゼピン化合物の同定—
論文審査委員(主査)	正宗 行人(研究科・教授)
論文審査委員(副査)	宮本 謙一(医病院・教授) 中西 義信(薬学部・教授) 向田 直史(がん研・助教授) 安川 洋生(富山大学・助教授)

## 学位論文要旨

### Summary

Thrombopoietin (TPO) will be applied as a therapeutic medicine for thrombocytopenia, aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. TPO is a cytokine which acts on growth and differentiation of platelet producing megakaryocytic lineage cells. TPO acts on megakaryocytic lineage cells through binding to TPO receptor. Therefore, I was looking for small molecular mimetic of TPO from among binding molecules to TPO receptor.

First, I have obtained several peptides which bind specifically to soluble TPO receptor from random phage peptide library. I could prove that one of these peptides mimics the TPO function *in vitro*, for example, the growth of TPO dependent cells and differentiation of mouse bone marrow cells. Second, to search a non-peptide TPO mimetic, I presumed that TPO mimetic peptide has  $\beta$ -turn structure and it would be an active site. My tentative focus for the synthesis was set on 1,4-benzodiazepine skeleton which is widely used as a  $\beta$ -turn mimic scaffold. One of the synthesized compounds proved to be agonists which stimulate the growth and differentiation of TPO dependent cells.

In conclusion, I could obtain TPO mimetic compounds, some of which are peptide and others are non-peptide compound. In particular, as for a non-peptide compound, this is the first

demonstration of the activation of cytokine receptor by it. The present discovery of a TPO mimetic may lead to the identification of more potent compounds that mimic TPO.

## 序論

ペプチドホルモンは本質的に「抗原となりやすい」、「血管透過性が悪い」、「生体内半減期が短い」、「経口吸収が悪い」などの欠点を持つ。これらのことは、ペプチドホルモンの作用を模倣する経口投与可能な非ペプチド低分子化合物を見出すことにより、解決できるかもしれない。このような非ペプチド性のアゴニストの例として、偶然に後から理由のわかった10前後のアミノ酸からなるopiateの作用を模倣するモルヒネ (Pert *et al.*, 1973)と副作用の分離から同定された22個のアミノ酸からなるmotilinの作用を模倣するエリスロマイシン誘導体がある (Itoh *et al.*, 1985)。また、最近では14アミノ酸からなる somatotropin-release-inhibiting factor (SRIF-14) はその3次元構造の解析より、8アミノ酸からなる cholecystokinin (CCK) はアンタゴニストのスクリーニングの過程で、それぞれの作用を模倣する低分子リード化合物が発見され、現在、経口投与可能な化合物の探索が行われている (Pohl *et al.*, 1995; Hirst *et al.*, 1996; Papageorgiou *et al.*, 1996)。しかし、100アミノ酸以上のペプチドから構成されペプチドホルモンであるサイトカインや増殖因子では、非ペプチド低分子化合物でその作用を模倣することは未だに証明されていない。このような現状で、まず、サイトカインや増殖因子の作用を非ペプチド低分子化合物で模倣できることを証明することは重要な意義があり、さらに、このことが証明されれば、将来的には経口投与可能な化合物の発見にもつながると思われる。よって、本研究では、サイトカインの作用を非ペプチド低分子化合物で模倣できることを証明することにした。

Thrombopoietin (TPO) はオーファンレセプターであった MPL (Skade *et al.*, 1993; Vigon *et al.*, 1992) のリガンドとして発見されたサイトカインであり、巨核球・血小板の分化と増殖に作用する (de Sauvage *et al.*, 1994; Lok *et al.*, 1994; Kaushansky *et al.*, 1994; Bartley *et al.*, 1994)。その cDNA の塩基配列より、ヒトやマウスでは 353 アミノ

酸で構成されている約 38 kDa の蛋白質と推定されているが、生体内から精製される TPO は、N 末端ドメインから構成される約 20kDa の蛋白質で、これが活性体であると考えられている。

現在、血小板減少症に対する治療法は、日本では血小板輸血のみで、その需要は増加傾向にあるが、数回の投与で効果がなくなることや赤血球輸血に比べ副作用が多いことなどの欠点がある。このようなことより、TPO は化学療法や骨髄移植後の血小板減少症の治療薬として臨床応用が期待される。よって、TPO と同様な作用を持つ非ペプチド低分子化合物も有用であると考えられるので、TPO をターゲットとするサイトカインとし、TPO のレセプターである MPL に結合し、それを活性化することのできる非ペプチド低分子化合物を同定することを最終目標とした。

## TPO の作用を模倣する非ペプチド低分子化合物同定の戦略

ファージランダムペプチドライブラリー (PRPL) はファージの構造蛋白質にランダムなアミノ酸を融合発現させたもので、特定の蛋白質などに結合するペプチドのスクリーニング・同定に利用される (Scott & Smith, 1990; Cwirla *et al.*, 1990; Devlin, *et al.*, 1990)。これを用いて、TPO レセプターに結合する低分子ペプチドをスクリーニングし、次に得られたペプチドの中から TPO の作用を模倣するペプチドを同定することにした。また、この同定したペプチドの機能発現に必要な領域を決めた後、ペプチドの非ペプチド低分子化合物への変換を試み、TPO 様の生物活性を有する低分子化合物を設計することにした。

## TPO レセプター結合ファージクローンの PRPL からのスクリーニング

pIII 構造蛋白質にランダムな最高 15 アミノ酸を発現する  $1 \times 10^9$  クローンを持つ PRPL を作製した。可溶性 TPO レセプターは、TPO レセプター遺伝子 *mpl* の細胞外領域とヒト IgG の Fc 領域 cDNA を結合させ、蛋白として発現させることにより作製した。この MPL-IgG に TPO が結合することを確認した後、この MPL-IgG に結合

するファージクローンを PRPL からスクリーニングし、MPL-IgG 結合性を示す 6 ファージクローンを同定した。これらのファージに特異的に発現するペプチドのアミノ酸配列を決定した (Table 1)。これらのペプチドのアミノ酸配列は、TPO のどの部分とも相同性を示さなかった。

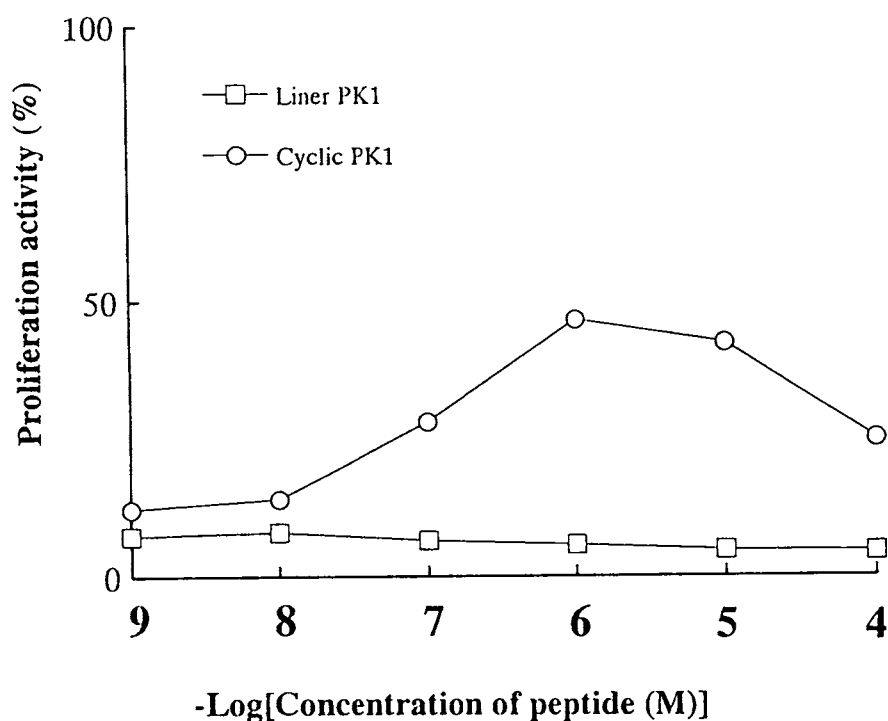
Table 1. Amino acid sequences of MPL-IgG binding phage clones

Clone	Sequence
PK1	L Q <b>G</b> C T <b>L R</b> A <b>W</b> R A G M C
PK2	C M <b>G</b> L S <b>L R</b> P <b>W</b> M L C A K
PK7	V R Q <b>W N</b> L T <b>E F</b> V L D T H P
PK9	F E <b>W N</b> Y V <b>E F</b> S W A S V
PK6	V R R Q I V E Y K H R L T L P
PK8	S T R S E S R H P F P W L L

The amino acids are identified with single letter code. Residues within the random peptide have been aligned to show consensus between PK1 and PK2, and PK7 and PK9.

### PRPL から得られたペプチドの活性測定

MPL-IgG に結合性ファージクローンが提示するペプチドを化学合成した。PK1 と PK2 については 2 個のシステインを保持することより、直鎖状と自己環状の二形態を取り得るので、直鎖状と環状のペプチドを合成した。このペプチドが TPO 様活性を有するかどうかを、TPO 依存的に増殖する細胞の増殖に対する作用より調べた。この結果、環状 PK1 のみが、特異的に TPO 依存性細胞の増殖を刺激したが (Fig. 1)、その他のペプチドでは TPO 依存性細胞の増殖が得られなかった。Acetylcholine esterase (AChE) はマウスなどの齧歯類の巨核球前駆細胞から巨核球までの細胞でその活性が



**Fig. 1. Proliferative response of TPO-dependent cells to peptides.** TPO-dependent cells were plated at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well in RP1640 medium containing 10% FCS and 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol. Cells were incubated in the presence of cyclic PK1 or linear PK1. After 44 hr, the absorbance was measured by the WST-1 assay. Data are expressed as the percentage of maximal response of rhTPO. Each value is the average of triplicate determination.

存在する。次に、これらのペプチドがマウス骨髄細胞の巨核球への分化誘導を刺激するかどうか調べたが、環状 PK1 のみ AChE を誘導し (Fig. 2)、その他のペプチドは誘導がみられなかった。さらに、誘導された細胞の構造と形態を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて観察したところ巨核球様の細胞が得られた。以上より、PRPL より得られたペプチドの中から環状 PK1 のみが TPO と同様の活性を持つことがわかった。

### 環状 PK1 の必須アミノ酸領域の解析

環状 PK1 の構成アミノ酸の内どのアミノ酸が TPO 様活性発現に必要なのか調べるため、PK1 のアミノ酸に変異の入ったペプチドを発現させた PRPL を作製し、先と同様にスクリーニングし、MPL-IgG 結合活性のあるペプチドを同定した (Table 2)。これらのペプチドを合成し、TPO の MPL-IgG への結合阻害と TPO 依存性細胞の増殖

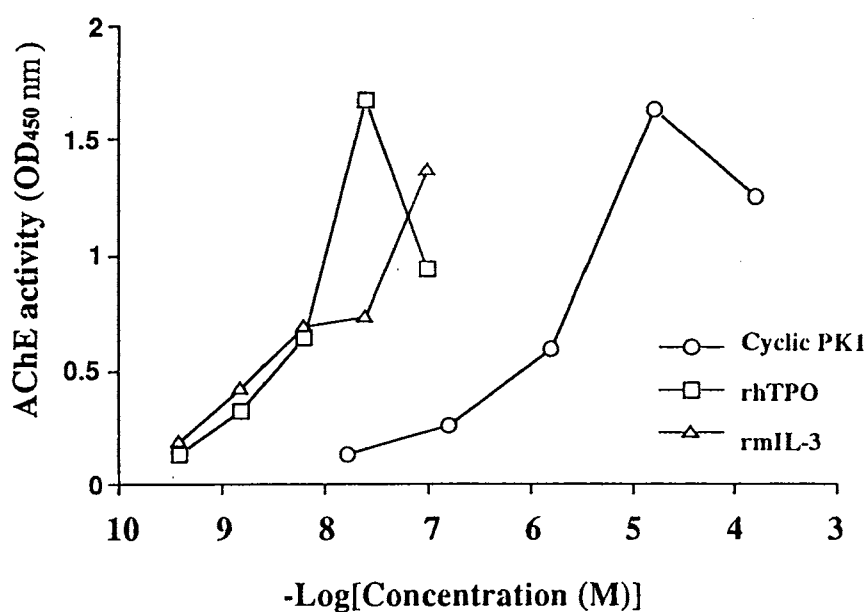


Fig. 2. Induction of AChE in mouse bone marrow cells. Mouse bone marrow cells were cultured for 6 days in the presence of various amounts of cyclic PK1, rhTPO or rmIL-3. After preparation of cell lysate, AChE activity was measured by DTNB method. Each value is the average of triplicate determination.

効果を調べた (Table 2)。また環状 PK1 の各アミノ酸をアラニンで置換したペプチドを合成し、同様の実験を行った (Table 3)。これらの結果より、環状 PK1 のトリプトファンが MPL-IgG への結合に重要であることがわかった。

### TPO 様活性を持つ非ペプチド低分子化合物の探索

SRIF-14 のアミノ酸配列は AGCKNFFWKFTSC で、分子内の 2 個のシステインによるジスルフィド結合が活性体であり、NMR による構造解析より、N 末端から 8 番目のトリプトファンと 9 番目のリジンで  $\beta$  ターン構造を形成することが予想された。また、SRIF-14 とそのアナログの解析により、このトリプトファンは SRIF-14 のレセプターへの結合に必須のアミノ酸であった (Pohl *et al.*, 1995)。 $\beta$  ターン構造を形成したペプチドはそのターン領域をベンゾジアゼピン骨格に変換可能なことがある (Fig. 3; Dean, 1994)。これらの情報をもとに、SRIF-14 の  $\beta$  ターン領域にあるトリプトファン

**Table 2. Binding and agonist activities of peptides derived from the PK1 mutagenesis library.**

Clone	Sequence <sup>a</sup>														Competitive TPO ELISA IC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	Maximal activity of cell proliferation <sup>c</sup>
	1							14								
PK1	L	Q	G	C	T	L	R	A	W	R	A	G	M	C	50	++
PK101	L	Q	G	C	T	L	R	A	W	L	A	G	M	C	30	±
PK102	F	Q	G	C	R	L	R	A	W	R	A	G	M	C	10	+++++
PK103	I	Q	G	C	T	L	R	A	W	L	A	G	M	C	40	-
PK104	P	Q	G	C	T	L	R	A	W	L	A	G	M	C	100	-
PK105	L	Q	G	C	T	L	R	A	W	R	A	G	L	C	100	-
PK106	L	Q	G	C	T	L	R	S	W	R	A	G	L	C	200	-
PK107	L	L	G	C	T	L	R	A	W	R	A	G	M	C	50	+
PK108	F	Q	G	C	T	L	R	A	W	R	A	G	L	C	50	±
PK109	I	E	G	C	T	L	R	A	W	L	A	G	V	C	130	±
PK110	L	Y	G	C	T	L	R	A	W	R	A	G	M	C	10	+
PK111	L	K	G	C	T	L	R	A	W	R	A	G	V	C	20	+++
PK112	F	Q	G	C	T	L	R	A	W	R	G	G	I	C	50	+++
PK113	L	K	G	C	T	L	K	A	W	R	A	G	V	C	80	++
PK114	Y	H	G	C	T	L	R	A	W	R	A	G	I	C	60	+++
PK115	F	K	G	C	T	L	R	A	W	R	A	G	M	C	7	+++++
PK116	L	W	G	C	T	L	R	V	W	R	A	G	M	C	5	++
PK117	I	S	G	C	T	L	R	A	W	R	A	G	I	C	50	±
PK118	L	Q	G	C	T	L	R	S	W	R	A	G	M	C	6	+++
PK119	F	R	G	C	T	L	R	A	W	S	A	G	I	C	20	++

<sup>a</sup> The amino acids are identified with single letter code. The consensus amino acids are indicated by shaded boxes. <sup>b</sup> The binding affinity of each synthesized peptide to MPL-IgG was assayed by competitive TPO ELISA. The results presented are the mean values of duplicate assays and are expressed as the concentration at which half-maximal competition (IC<sub>50</sub>) was observed. <sup>c</sup> The TPO agonist activity of each peptide was estimated as proliferation activity of TPO dependent cell assessed by the WST-1 method and are shown here as the mean value of maximal activity at concentrations ranging from 0.1 to 100 μM, in triplicate. Absorbance in cultures with half maximal effective of rhTPO was defined to as 100%, -, 0-<10% ; ±, 10-<20% ; +, 20-<40% ; ++, 40-<60% ; +++, 60-<80% ; +++++, 80-<100% ; ++++++, 100-<120% ; or ++++++, 120-<130%.



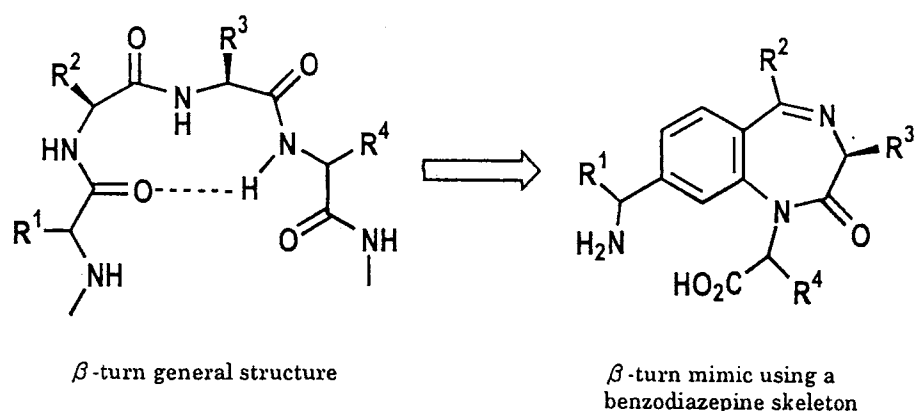
Table 3. Binding and agonist activities of PK1 mutant peptides.

Name	Sequence		Competitive TPO ELISA IC <sub>50</sub> (μM)	Maximal activity of cell proliferation
	1	14		
PK1	L Q G C T L R A W R A G M C		50	++
Alanine scan				
PK1L1A	A - - - - -		60	++
PK1Q2A	- A - - - - -		60	+++
PK1G3A	- - A - - - - -		50	-
PK1T5A	- - - - A - - - - -		100	-
PK1L6A	- - - - - A - - - - -		1000	-
PK1R7A	- - - - - - A - - - - -		200	-
PK1W9A	- - - - - - - A - - - - -		930	-
PK1R10A	- - - - - - - - A - - - - -		200	-
PK1G12A	- - - - - - - - - A - - - - -		70	±
PK1M13A	- - - - - - - - - - A - - - - -		60	-

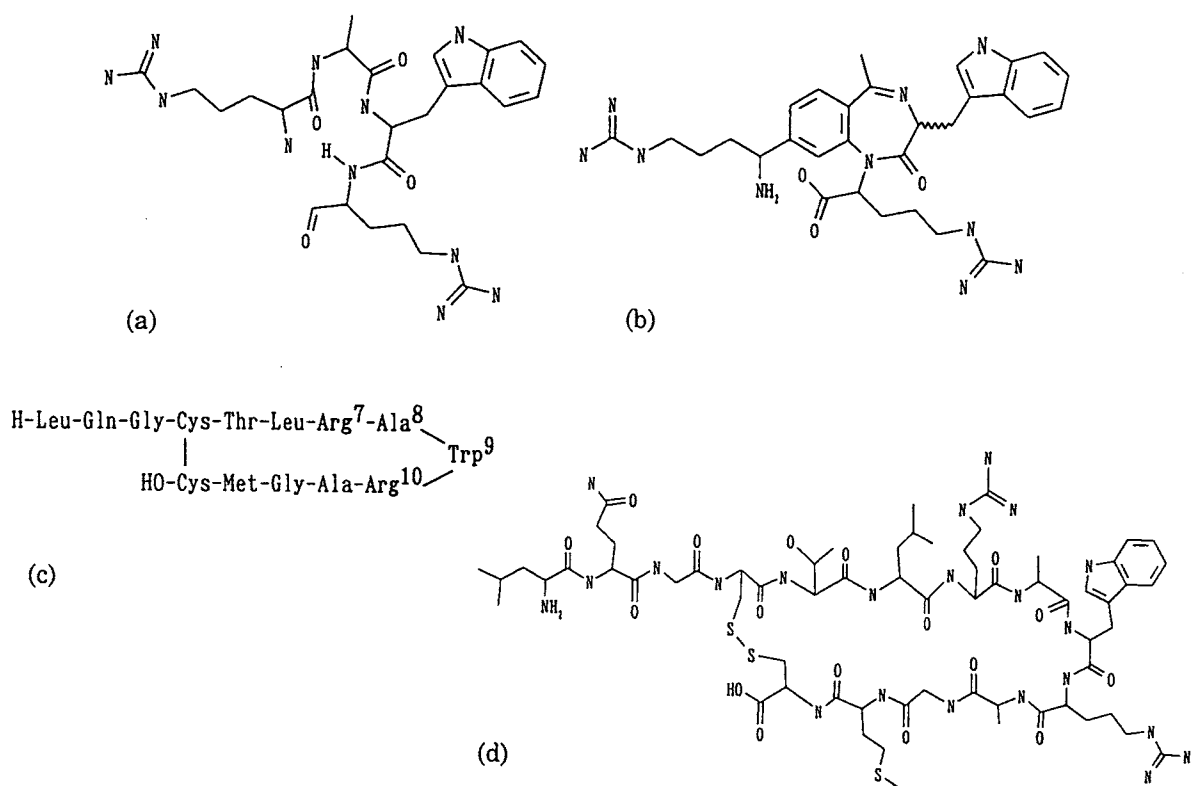
The amino acids are identified with single letter code. The sequences of the replaced alanine are represented by the substituted residue; others were omitted. Competitive TPO ELISA and Maximal activity of cell proliferation were described in Table 2.

トリジンを含む 4 アミノ酸領域をベンゾジアゼピン骨格に転座することで、低分子合成化合物のアゴニストを得ることができた (Papageorgiou *et al.*, 1996)。

環状 PK1 に関してもこれらの SRIF-14 と同様に環状構造が活性に重要であり、トリプトファンが結合に重要である。これらのことより環状 PK1 においても SRIF-14 のようなトリプトファン部位での βターン構造形成を予想し、ベンゾジアゼピン化合物骨格を母核にした TPO 模倣非ペプチド低分子化合物の一案をデザインした (Fig. 4)。この仮定の化合物そのものは合成不可能だったため類似したベンゾジアゼピン構造を持つ化合物 (TM 化合物) を約 50 検体合成し、TPO の MPL-IgG 結合の阻害実験、TPO 依存的細胞に対する増殖刺激活性を解析することにより、これらの合成化合物をスクリーニングした。この結果、TM41 が、TPO 様活性を保持していた (Fig. 5 and 6)。このことより、ヒトサイトカインや増殖因子のレセプターに作用し、シグナルを伝達する非ペプチド低分子化合物を得ることができた。



**Fig. 3.** Tentative focus is on 1,4-benzodiazepin-2-one skeleton which is widely used as  $\beta$ -turn mimetic scaffold. The  $\beta$ -turn structure of peptides (left). A benzodiazepine-based  $\beta$ -turn mimetic (right).



**Fig. 4.** Structures of PK1 peptide and a benzodiazepine based  $\beta$ -turn mimetic of PK1. Amino acids sequence (c) and chemical structure (d) of the cyclic PK1 peptide, the fragment 7-10 (Arg-Ala-Trp-Arg) of PK1 cyclic (a), and its mimic utilizing benzodiazepine as scaffolding (b).

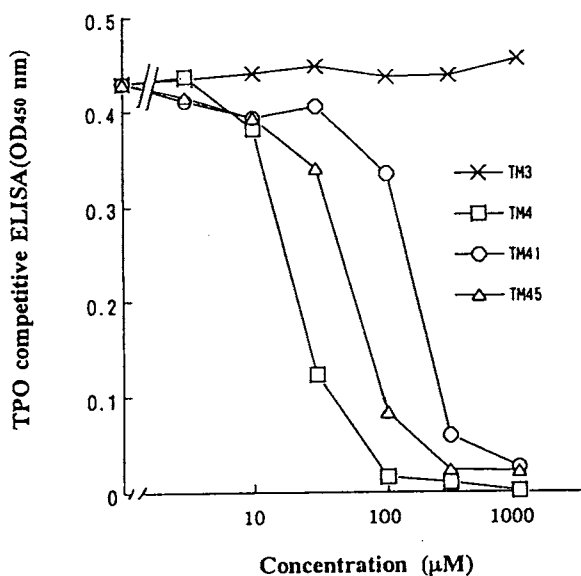


Fig. 5A)

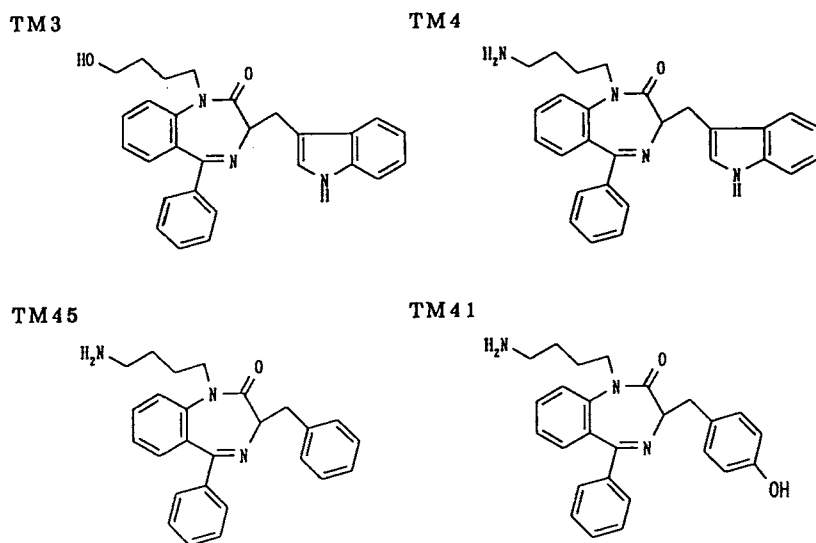


Fig. 5B)

**Fig. 5. Competition binding assay and chemical structures of TM compound.** (A) 96-well plates were coated with MPL-IgG. TM compounds (3  $\mu$ M-1 mM) and 2 ng/ml TPO were added and incubated in MPL-IgG immobilized wells. The wells were then washed and the remaining bound TPO was detected by goat anti-TPO antibody and then donkey anti-goat IgG conjugated to HRP. The absorbance was measured. The values shown are the means of duplicate determination. (B) Structures of TM compounds.

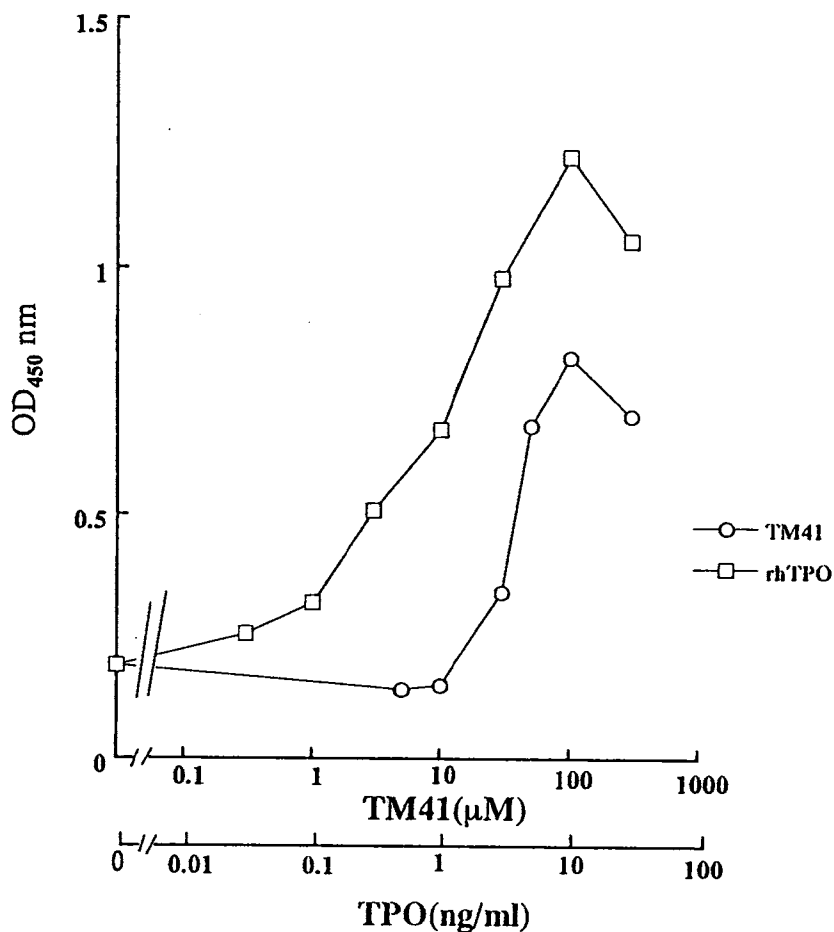


Fig. 6. Proliferative response of TPO-dependent cells to TM41. TPO-dependent cells were plated at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well in IMDM containing 10% FCS and incubated in the presence of TM41 or rhTPO. After 3 days, the absorbance was measured by the WST-1 assay. Each values is the average of triplicate determination.

## 総括と展望

TPO 様作用を模倣できる非ペプチド低分子化合物の発見を目標に掲げて本研究をスタートさせた。PRPL を作製し、これから可溶性 TPO レセプターである MPL-IgG 結合性のペプチドを同定し、この中から TPO 様作用を示すペプチドの構造をもとに非ペプチド低分子化合物をデザインし、この化合物に類似した化合物の中から TPO 様作用を模倣できる化合物を同定することができた。

以上より、TPO 様作用を発揮する濃度は高濃度であるが、非ペプチド低分子化合物でも TPO の作用を模倣できることを証明した。今後、この化合物の構造活性相

関を検討することにより、さらに活性の強い化合物の同定、さらには経口投与可能な化合物の発見につながるであろう。また、TPO とアミノ酸配列に相同性のある EPO, G-CSF, GM-CSF や IL-3 など造血に関与するサイトカインであり、これらのレセプターもサイトカインレセプタースーパーファミリーに属し、レセプター間のアミノ酸配列にも相同性がある (Skoda *et al.*, 1993)。従って、これらのサイトカインについても、同様に非ペプチド低分子化合物でその作用を模倣できることは容易に予想できる。この研究の論文発表後、マウス G-CSF レセプターに作用する非ペプチド低分子化合物が報告された (Tian, *et al.*, 1998)。本研究やマウスの G-CSF レセプターで、非ペプチド低分子合成化合物でサイトカインの作用を模倣できることを証明できたことは、近年薬物のスクリーニングに用いられるようになったハイスループットスクリーニングを利用したサイトカイン様作用を示す非ペプチド低分子化合物の探索に拍車をかけると思われる。

## 参考文献

- Bartley, C. M. *et al. Cell* **77**, 1117-1124 (1994).
- Cwirla S. E. *et al.* **87**, 6378-6382 (1990).
- de Sauvage F. J. *et al. Nature* **369**, 533-538 (1994).
- Devlin, J. J. *et al. Science* **249**, 404-406 (1990),
- Hirst, G. C. *et al. J. Med. Chem.* **39**, 5236-5245 (1996).
- Itoh, Z. *et al. Am. J. Physiol.* **248**, G320-325 (1985).
- Kaushansky, K. *et al., Nature* **369**, 568-571 (1994).
- Kaushansky, K. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 3234-3238 (1995).
- Lok, S., *et al. Nature* **369**, 565-568 (1995).
- Papageorgiou, C. and Borer, X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6**, 267-272 (1996).
- Pert, C. and Snyder, S. H. *Science* **179**, 1011-1014 (1973).
- Pohl, E. *et al., Acta Cryst. D* **51**, 48-59 (1995).

Scott, J. K. and Smith, G. P., *Science* **249**, 386-390 (1990).

Skoda, R. C. *et al.*, *EMBO J.* **12**, 2645-2653 (1993).

Tian, S. S. *et al.*, *Science* **281**, 257-259, 1998

Vigon, I. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 5640-5644, 1992

## 学位論文審査結果の要旨

本論文の審査は、各審査員が提出された論文の内容につき慎重な審査を行いつつ申請者と面接した結果並びに口頭発表(平成11年7月6日開催)の内容を踏まえて、平成11年7月6日開催の論文審査委員会で行われ、以下の通り判定した。

本論文は著者が北陸製薬株式会社研究開発本部研究部中央研究所で行った“サイトカイン模倣低分子化合物の探索—トロンボポエチン様作用を持つベンゾジアゼピン化合物の同定—”に関する研究をまとめたものである。トロンボポエチン(TPO)は、巨核球細胞の血小板生産の調節に重要な因子であり、抗がん剤投与等により引き起こされる血小板減少症の治療に有効と考えられる。しかし、TPOは高分子タンパクであり抗原性を考えるとこのままでは医薬品にならない。そこで木村はTPO様活性を持つ経口投与可能な非ペプチド低分子化合物が合成できないか研究した。まず、TPOレセプターに結合するペプチドをファージランダムペプチドライブラリーから検索し、PK1と名付けたペプチドを環状化したものに強いTPO様活性を見出した。このPK1のアミノ酸配列はTPOと相同性はなかった。環状PK1のTPO様活性に必要な構造としてトリプトファンを中心とした $\beta$ -turn構造を推察し、この構造を模倣する低分子化合物としてベンゾジアゼピン骨格を持つ化合物を考えた。この推察構造に近いベンゾジアゼピン誘導体を多数合成し、これらの化合物のTPO様活性を調べた。その結果TM41と名付けた化合物を得ることが出来た。しかし、この化合物も医薬品として開発するにはまだ特異性が低く、さらなる検索が必要であることが分かった。

以上この論文はTPO様作用を持つ低分子化合物の探索を行い、その候補と成り得る化合物を見出した研究である。木村はファージランダムペプチドライブラリーを構築してペプチドの検索をする遺伝子工学的手法や、各種細胞を利用したレセプターアッセイを行う等、新しい手法を有効に利用した。この研究は種々のサイトカイン模倣低分子化合物を探索して行く一般的手法を開発したものであり、今後各種サイトカイン様活性を持つ経口投与可能な医薬品創製の可能性を示唆するものである。研究内容もしっかりしておりこの論文は博士論文に値すると判定する。