

論文内容の要旨

博士論文題目 効率的ペプチド構造最適化手法の開発と新規 TrkA 阻害剤の創製

氏 名 山田 徹

(論文内容の要旨)

オピオイドは強い鎮痛効果を示す一方で、適切に使用しても多くの副作用が発現する課題がある。そのため、オピオイドとは異なる作用メカニズムで強い鎮痛薬効を発現し、オピオイドとの併用または置き換えによりオピオイドの使用量を低減させる薬剤の開発が望まれている。

緒論では、TrkA 細胞外ドメインを疼痛治療の標的とすることの妥当性が科学的根拠とともに述べられている。また、TrkA と内在性リガンドである NGF のタンパク質間相互作用を阻害するため、創薬モダリティとして中分子であるペプチドを選定することが述べられている。さらに、ペプチド医薬の変遷についてまとめられている。

第一章では、TrkA 親和性ペプチド取得のための mRNA ディスプレイスクリーニングについて述べられている。TrkA に対する親和性スクリーニングでは TrkA 結合ペプチドは取得できたが、TrkA と NGF のタンパク質間相互作用を阻害する化合物は取得できなかった。TrkA には NGF 結合部位よりも創薬可能な部位が存在し、その部位に結合する分子が優先的に濃縮されると考察した。そこで、スクリーニングによって濃縮された分子を共存させ、最も創薬可能であると想定される部位をブロックした状態で親和性スクリーニングを実施することで、NGF 結合部位に結合しタンパク質間相互作用を阻害する分子の獲得に成功した。

第二章では、スクリーニングにより得られた化合物の構造最適化研究について述べられている。ペプチド医薬は低分子医薬に比べて分子サイズが大きい、低分子医薬と類似した構造最適化手法が用いられることが多い。そこで、ペプチド医薬の研究手法に改善の余地があると考え、ペプチドが *in vitro* 翻訳によって簡便に合成できる特徴に着目した。起点化合物に対して数カ所に変異を導入し

たライブラリーを *in vitro* で調整し、標的タンパク質に対して親和性スクリーニングを実施することで、活性が向上した化合物の創出に成功した。さらに、ライブラリー分子をプロテアーゼで処理し、プロテアーゼに対して不安定な化合物を排除したライブラリーを活用すると、ヒト・ラット血清中およびラット生体内で安定性の高い化合物が取得できることを明らかにした。本手法によって得られた化合物はラット術後痛モデルで高い鎮痛薬効を示し、TrkA に結合して NGF との相互作用を阻害する化合物が痛みの発現を抑制することを明らかにした。

以上のように本論文では、mRNA ディスプレースクリーニングにより得られた化合物を共存させて再度スクリーニングを行うことで、標的タンパク質の異なる部位に結合する化合物を取得できることを実証した。さらに、*in vitro* 翻訳を活用して、活性と安定性が改善したペプチド化合物を取得する手法を確立した。本手法は、有機合成により一化合物ずつ合成する従来法に比べて迅速に構造を最適化できる手段であり、広くペプチド構造最適化に応用できる。また、TrkA 細胞外ドメインに結合して、TrkA と NGF のタンパク質間相互作用を阻害する化合物が鎮痛薬効を発現することを示し、疼痛治療に対する新しい知見を得た。

氏 名	山田 徹
-----	------

(論文審査結果の要旨)

現在、多様なメカニズムに基づく疼痛治療薬が利用されているが、術後痛や癌性疼痛など重度の疼痛にはアンメットメディカルニーズが存在する。具体的には、①治療効果が十分でない、②効果の高いオピオイド鎮痛薬では副作用が多く程度も大きい、の2点が挙げられる。本論文では、副作用リスクの少ない新規メカニズムに基づく疼痛治療薬の創製を目的としており、効率的なペプチド構造最適化手法の開発を行っている。本論文で得られた成果は以下の通りである。

1. TrkA 細胞外ドメインに結合することにより、Trk と NGF のタンパク質間相互作用を阻害する化合物が痛みの発現を抑制すると仮説を立て、TrkA 親和性ペプチドをスクリーニングした。TrkA に結合するペプチドは取得できたが、NGF とのタンパク質間相互作用を阻害する化合物は取得できなかった。そこで、TrkA の結晶構造を精査し、リガンドが結合しやすい創薬可能な部位が存在すると仮説を立てた。スクリーニングによって得られたペプチドを添加して、創薬可能な部位をマスクした条件下で親和性スクリーニングを実施することで、通常スクリーニングによって得られる化合物とは異なる部位に結合する化合物を取得した。このように、先行して実施したスクリーニングから得られた化合物を利用することで、標的タンパク質の所望の部位に結合する化合物が取得できることを明らかにした。

2. 起点化合物の構造の一部をランダム化したペプチドライブラリーを構築し、標的タンパク質に対する親和性スクリーニングを実施した。その結果、起点化合物よりも活性の向上した化合物が得られた。また、不安定な化合物をプロテアーゼにより分解したライブラリーを用いてスクリーニングを実施し、活性と安定性が高い化合物を取得した。このように *in vitro* 翻訳により調製できるペプチドの特徴を活かすことで、一化合物ずつ有機合成する従来法と比較して迅速に化合物を構造最適化できることを実証した。また、本手法で得られた化合物をラット術後痛モデルに投与すると高い鎮痛効果を示したことから、仮説通り TrkA 細胞外ドメインに結合することにより、Trk と NGF とのタンパク質間相互作用を阻害する化合物が痛みの発現を抑制することを明らかにした。

以上のように、本論文では通常スクリーニングによって得られたペプチドを添加した条件で再スクリーニングを行うことにより、所望のタンパク質間相互作用を阻害するペプチドを取得した。また、得られたヒットペプチドの構造最適化の手法として、*in vitro* 翻訳で作製したライブラリーを活用する手法を検討した。本研究成果は医薬品の創製研究に対する新たな方法論を提案し、痛みの制御に関連する新たな知見を与えるものであり、薬学分野および生命科学分野の研究として高く評価でき、学術的に大きな意義がある。よって審査委員一同は本論文が博士（理学）の学位論文として価値あるものと認めた。