

創薬展開を見据えたリラキシンの化学合成基盤の創出

—セレン化学に立脚したリラキシン製剤開発—

1. 研究の目的

妊娠期の女性の黄体および胎盤から分泌される『ヒトリラキシン2 (以下リラキシン)』は、異なる2本のポリペプチド鎖 (A鎖・B鎖) が、システイン (Cys) 残基間で形成される2組のジスルフィド (S-S) 結合によってリンクした構造をもつ (図1)。リラキシンは本来、妊娠女性の産道を拡張するために分泌されるホルモンであるが、近年ではその心不全緩和、抗繊維化、抗炎症などの作用が見いだされ、製剤としての臨床応用が期待されている。一方で、一般試薬として販売されているリラキシンは極めて高額であり、その希少性から基礎研究の遂行すらままならない。現状のリラキシン製造では、遺伝子組換え技術を利用した生物依存的な合成法が採用されており、人工アミノ酸の導入による機能改変は困難である。本研究は、化学合成に立脚したリラキシンの効率的な製造基盤を確立し、分子デザインの自由度を拡張するとともに、具体的な高機能リラキシンを提案することを最終目標としている。研究初年度 (2022年度) において、A鎖とB鎖からの直接的なカップリング (二重鎖酸化的 folding) による新たなリラキシンの化学合成経路を開拓し (下記2. 研究計画を参照)、人工のリラキシンであるセレノリラキシン (図1; SeRlx- α) の化学合成からその有効性を証明した。初年度の成果を受け、研究2年目 (2023年度) は創薬展開も見据えた下記2点を小目的として設定した。

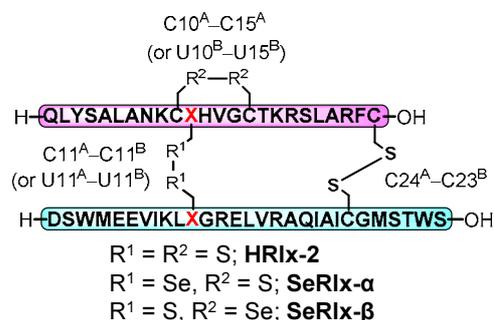


図1: ヒトリラキシン2の一次配列ならびにジスルフィド結合トポロジー。

- (1) 新たなセレノリラキシン (図1; SeRlx- β) を化学合成し、合成効率 (速度・収率) の観点から適切なジセレンド (SeSe) 架橋位置を探索する。
- (2) 合成したリラキシンアナログの子宮内膜症緩和薬としての可能性を探る。

2. 研究の計画

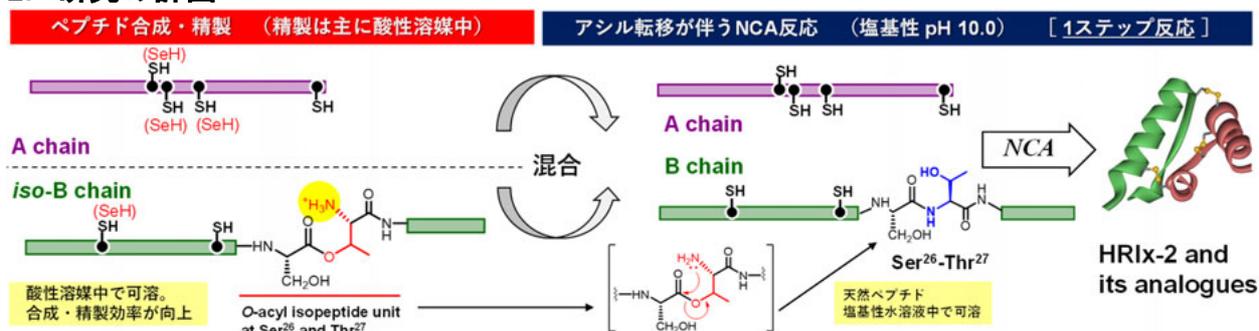


図2: *o*-アシルイソペプチド (AIP) 法を組み込んだリラキシンアナログの二重鎖酸化的 folding。

リラキシンは、A鎖とB鎖がS-S結合で架橋されたヘテロダイマー型の構造を有し、分離した各構成ペプチド鎖から適切な鎖間カップリングを介して高次構造を形成させることは難しい。加えて、B鎖は中性以下の水溶液中では難溶であり、ペプチド合成において必須である酸性水溶液中でのペプチド精製工程を極めて困難なものとする。我々は前年度、リラキシンの構成ペプチド鎖 (A・B鎖) を1:1のモル比で混合するだけで、目的の高次構造体を得ることができる手法 (二重鎖酸化的 folding) を確立した (図2)。さらに、酸性水溶液中での溶解性を克服するため、B鎖の配列上に *o*-アシルイソペプチド (*o*-AIP) ユニットを組み込んだ。当該ユニットは、構造上、酸性溶液中でイオン化したアミノ基が遊離した形で存在するため、ペプチド鎖の溶解性の向上が期待できる (図2)。NCA反応は、塩基性条件下で行われるため、*o*-AIPユニットはアシル転移によって天然ペプチド結合へと迅速に変化し、最終的には目的のリラキシンを得ることがで

きる (図 2)。さらに、鎖間で形成されるジスルフィド (SS) 結合をより形成速度が速く安定な SeSe 結合に置き換えることで、folding 効率が向上し、野生型のリラキシン (48%) を大幅に上回る収率で目的の SeR1x- α (43%) を得ることに成功した。SeSe 結合の導入位置が folding 効率およびフォールド体の構造にどのような影響を与えるかは興味深い。また、得られたリラキシンアナログの生理機能に関する基礎的知見の蓄積は、今後の創薬展開において重要である。そこで、研究 2 年目は下記 3 点に注力し、リラキシンの新規合成戦略の成熟をはかるとともに、子宮内膜症治療薬としてのリラキシンアナログの有効性に関する基礎データを得ることにした。

- (1) A 鎖内の SS 結合を SeSe 結合に置換した新規アナログ (SeR1x- β) の合成
- (2) 構造特性の評価と化学的安定性試験 (CD と分解実験)
- (3) 合成したセレノリラキシンの子宮内膜症関連因子に対する発現抑制効果の検証。

3. 研究の成果

(1) A 鎖内の SS 結合を SeSe 結合に置換した新規アナログ (SeR1x- β) の合成

SeR1x- β の構成ペプチド鎖となるペプチド **1** および **2** を前年度に確立したペプチド合成法を用いて調製した (図 3a)。ペプチド **1** は 2 個の Pys 基と 1 対の SeSe を有する単一アイソマーとして生成し、単離収率は 1.3% であった。ペプチド **2** は前年度合成済みである。次に、ペプチド **1** と **2** の二重鎖酸化的 folding によって SeR1x- β を得た。ペプチド **1** は Pys 基で保護されているため、DTT^{red} 存在下、好気的環境下で pH 10.0、4 °C で反応を開始した。一定時間後に得られたサンプルのごく一部を HPLC で分析し、反応中間体の変化を追跡した (図 3b)。結果として、反応開始から 24 時間で正しい位置に SS および SeSe 架橋を有するフォールドした SeR1x- β が収率 34% で得られた (図 3b)。SeR1x- β の収率は野生型リラキシンおよび SeR1x- α よりも低下した一方で、その反応は、SeR1x- α よりも速やかに完結した (図 3c)。

(2) 構造特性の評価と化学的安定性試験 (CD と分解実験)

単離されたリラキシンアナログをトリプシンで処理したところ、正しい SS 結合および SeSe 結合パターンを有するフォールド状態から生じる得る妥当なペプチドフラグメントが観測された。リラキシンアナログの構造を特徴づけるために circular dichroism (CD) 測定を行った (図 4a)。合成した SeR1x- α の CD スペクトルは、市販の組み換えリラキシンおよび合成リラキシンのそれと全く同じ形状を示し、SeR1x- α の 2 次構造含有量は野生型のものと同程度であることが示唆された。一方で SeR1x- β は他のアナログ体よりもごくわずかに少ない α -helix 含量を示した。次に、得られたリラキシンアナログの化学的安定性を評価した。

まず、還元因子による分解挙動を調べるために、合成リラキシンを生体内で最も多く遍在している低分子還元剤であるグルタチオン (GSH) で処理した。一定時間後、サンプルの一部を HPLC で分析し、反応進行率を見積もった (図 4b)。SeR1x- β の分解速度は、リラキシンのそれと同等かわずかに遅かった一方で、SeR1x- α は GSH によって、より速やかに還元された。次に、リラキシンを血清処理し、一定時間後におけるリラキシンアナログの残存量を HPLC で分析したところ、す

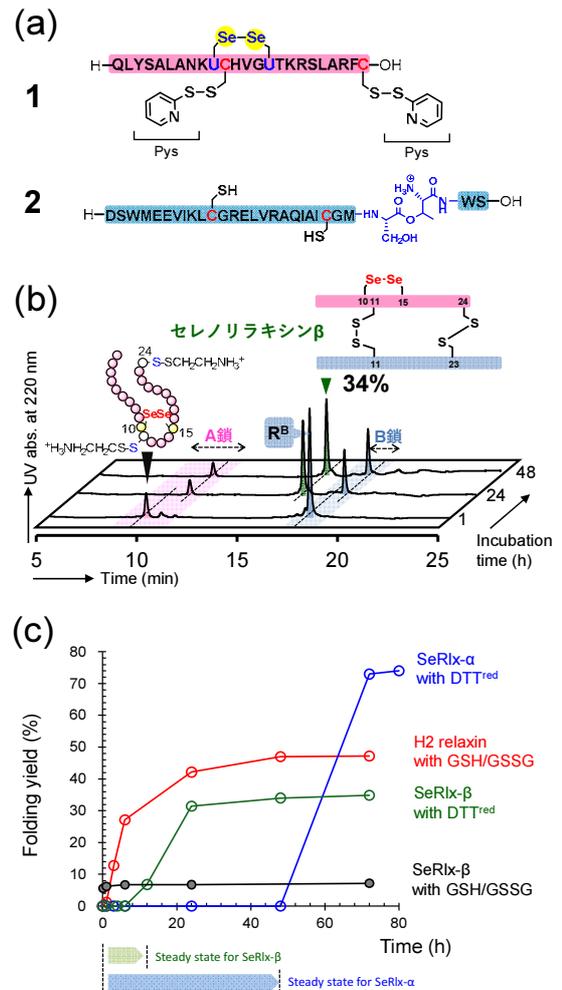


図 3: SeR1x- β の合成。(a) SeR1x- β の構成ポリペプチド鎖 **1** および **2** のアミノ酸配列。U はセレノシステイン残基。(b) ペプチド鎖 **1** および **2** の二重鎖酸化的 folding 実験から得た HPLC クロマトグラム。(c) リラキシンアナログ各種の二重鎖酸化的 folding におけるフォールド体生成量の経時変化。

すべてのリラキシンアナログは血清中でほぼ同じ速度で分解された (図4c)。

(3) 合成したセレノリラキシンの子宮内膜症関連因子に対する発現抑制効果の検証。

妊娠可能年齢のおよそ 10%の女性が罹患していると考えられている子宮内膜症は、月経困難症、性交疼痛症、排便障害などを誘発し、女性のクオリティ・オブ・ライフを著しく低下させる。吉野らを筆頭とする本共同研究グループは、リラキシンが、子宮内膜症の緩和効果をもつ可能性を報告しており (O. Yoshino, *et al.*, *Biomedicines*, **2020**, *8*, 467)、SeRlx アナログも同様の効果を示すか否かは興味深い。そこで、合成した SeRlx アナログの子宮内膜症抑制剤としての応用可能性について評価した。子宮内膜症患者由来の子宮内膜間質細胞 (ESCs) にはリラキシンの一次受容体である leucine-rich G protein-coupled receptors 7 (LGR-7) が遍在している。

ここでは、子宮内膜間質細胞に対する合成セレノリラキシンの機能について、プラスミノゲン活性化抑制因子 1 (PAI-1) の発現抑制効果に焦点を当てて検討した。PAI-1 は、組織の線維化において重要な役割を果たし、子宮内膜症患者の腹腔内液中の高濃度の PAI-1 は、腹膜病変の発生に寄与していることが示唆されている。PAI-1 の mRNA の発現量は、合成リラキシン (100 ng/mL) で処理したすべてのグループにおいて、有意な減少が観測された (図 5)。特筆すべきは、2種のセレノリラキシンが野生型のリラキシンよりも効果的に PAI-1 mRNA の発現を抑制したことである。また、低濃度 (33 ng/mL) におけるセレノリラキシン β は、この測定において最も高い有効性を示した。これらの結果は、PAI-1 の生産抑制という観点からセレノリラキシンの高い子宮内膜症抑制効果の可能性を示唆している。

4. 研究の反省・考察

(1) 新規アナログ (SeRlx- β) の合成に関する考察

反応開始直後、ペプチド **1** はほぼ単一の isomer へと変換され、SeRlx- α の folding 初期事象とは対照的であった。ペプチド **1** に由来する当該フラクションの MS 分析の結果は、熱力学的に最安定な SeSe 結合 (U11^A-U11^B) を 1 対有していることを示唆し、B 鎖と直接カップリング可能な鍵中間体が選択的に生成していることが示唆された (図 3b)。つまり、folding 経路上に存在する中間体を選択的に経由したことが、結果として folding 速度の向上につながったものと考えられる。SeRlx- α および SeRlx- β の folding に関して得られたこれまでの知見を総合的に考慮すると、フォールド状態において溶媒露出した SS 結合 (C11^A-C11^B) および埋没した SS 結合 (C10^A-C15^B) が、リラキシンの二重鎖酸化的 folding 経路において中間体および生成物の熱力学および速度論の強化にそれぞれ強く寄与していることを暗示している。

(2) 構造特性の評価と化学的安定性試験に関する考察

SeRlx- β の CD スペクトルは、他のアナログ体よりもごくわずかに少ない α -helix 含量を示した。このことは SeRlx- β が他のリラキシンアナログとは異なる安定性、生理活性強度を有している可能性を暗示しているかもしれない。分子表面に SeSe 結合をもつ SeRlx- α は、グルタチオ

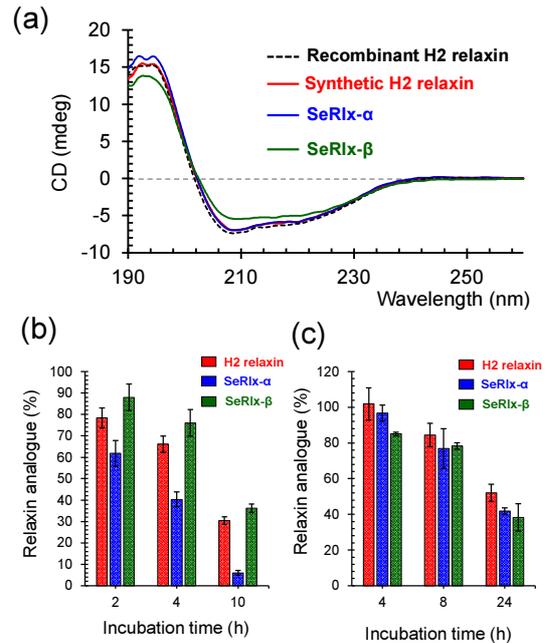


図 4: レラキシン類縁体の構造と化学的安定性の特性評価。(a) 10 mM Tris-HCl 緩衝液中、pH7.5、25°Cにおけるレラキシン類縁体の CD スペクトル。(b)還元グルタチオンによるレラキシンの還元的アンフォールディング (c) ヒト血清中のレラキシンの安定性アッセイ。

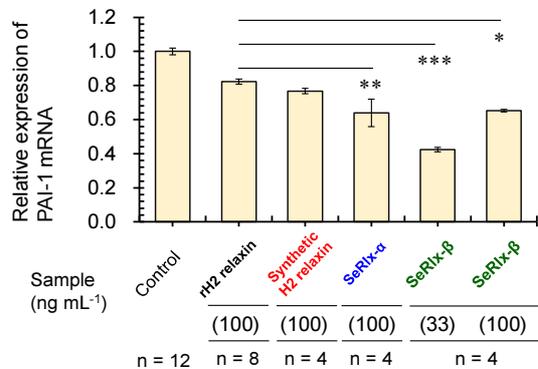


図 5: 子宮内膜間質細胞 (ESCs) に対するレラキシンの効果。ESCs をレラキシン (33 または 100ng/mL) と 8 時間インキュベートし、定量的 PCR を行い、コントロール群とレラキシン処理群における PAI-1 の mRNA 発現量を測定した。

ン共存下において他のリラキシンアナログよりも速やかに分解された。SeSe 結合はSS 結合よりも熱力学的に安定である一方で、速度論的には不安定性を有することから、SeR1x- α における溶媒露出した SeSe 結合 (U11^A-U11^B) が GSH によって速やかに開裂されたことで、協同的な unfolding を引き起こしたものと考えられる。一方で、血清中での各種リラキシンアナログの安定性には有意な差は観測されなかった。リラキシンの血中での不安定性は、その製剤化における懸念点の一つとしてフォーカスされるが、リラキシンがすでに臨床試験が実施されていることを考慮すれば、SeSe 結合の挿入が血中安定性に影響を及ぼさないという事実は、SeR1x の製剤応用の観点からは好都合である。

(3) セレノリラキシンの子宮内膜症関連因子に対する発現抑制効果の検証に関する考察

合成した 2 種のセレノリラキシンが高い PAI-1 発現抑制能を有することが明らかとなった。一方で、その分子メカニズムについてはより詳細な解析が必要である。今後は、セレノリラキシンと LGR-7 との複合体形成に関する構造学的、物理化学的研究を進めることで、セレノリラキシンの PAI-1 発現抑制能をさらに高めることができるものと期待できる。また、セレノリラキシンを子宮内膜症治療薬として実用化するため、セレノリラキシンの他の子宮内膜症関連因子の発現抑制効果を総合的に検討するとともに、疾患モデル動物を用いた薬力学的、薬物動態学的検討を行う必要があるものと考えられる。加えて、セレノリラキシンの製剤応用を目指すうえで、前臨床試験における慎重な安全性評価も必要である。

(本研究成果は、論文としてまとめ受理・掲載済みである。下記(1)-①参照)

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Yuri Satoh, Yosuke Ono, Rikana Takahashi, Hidekazu Katayama, Michio Iwaoka, Osamu Yoshino and Kenta Arai*, Seleno-relaxin analogues: Effect of internal and external diselenide bonds on the foldability and a fibrosis-related factor of endometriotic stromal cells, *RSC. Chem. Biol.*, **2024**, in press. (DOI: 10.1039/D4CB00095A)
- ② Kenta Arai,^{*†} Masaki Okumura,[†] Young-Ho Lee,[†] Hidekazu Katayama, Kenji Mizutani, Yuxi Lin, Sam-Yong Park, Kaichiro Sawada, Masao Toyoda, Hironobu Hojo, Kenji Inaba, Michio Iwaoka*, Diselenide-bond replacement of the external disulfide bond of insulin increases its oligomerization leading to sustained activity, *Commun. Chem.*, **2023**, *6*, Article number: 258 ([†]equal contribution) (DOI: 10.1038/s42004-023-01056-4)
- ③ Yuya Nishizawa,[†] Yuri Satoh,[†] Osamu Kanie and Kenta Arai*, Resin-supported cyclic telluride as a heterogeneous promoter of disulfide formation under solid-liquid biphasic conditions, *New J. Chem.* **2023**, *47*, 18537-18546 ([†]equal contribution) (DOI: 10.1039/D3NJ02646A) (Selected as front cover picture).

(2) 口頭発表

- ① 高橋莉奏, 荒井堅太, 易化学修飾インスリンを鍵前駆体とした新規持効型インスリン製剤の化学合成, 2024年3月22日, 日本化学会第104春季年会 (2024) (日本大学理工学部 船橋キャンパス)。
- ② Allosteric selenopeptides as a model of selenoenzymes, The 9th International Selenium Conference, focused on Selenium in Chemistry, Biology and Medicine (Se2023). Jun. 2023 (Daejeon, South Korea) Invited lecture.
- ③ 佐藤有里, 荒井堅太, セレノシステインを挿入したヒトリラキシンアナログの化学合成法と機能評価, 2023年3月22日, 第23回日本再生医療学会 (朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンターホテル日航新潟)。

(3) 出版物

- ① Michio Iwaoka*, Chalcogen-containing protein and nucleic acid derivatives - synthesis and applications, in *Chalcogen Chemistry: Fundamentals and Applications*, edited by V. Lippolis, C. Santi, Eder J. L. and A. L. Braga. The Royal Society of Chemistry, **2023**, Chapter 24, pp. 625-647.