HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies of potential applications of peptide ligands for the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein type 1 receptor for therapeutic options of bone and calcium metabolic diseases [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	野田, 寛
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第7135号
Issue Date	2021-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82413
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	NODA_Hiroshi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：　野田　寛

学位論文題名

Studies of potential applications of peptide ligands for the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein type 1 receptor for therapeutic options of bone and calcium metabolic diseases

（Ⅰ型副甲状腺ホルモン受容体に対するペプチドリガンドの骨とカルシウム代謝疾患への適用可能性に関する研究）

Ⅰ型副甲状腺ホルモン受容体（PTHR1）は family B の G タンパク質共役型受容体（GPCR）に属し、副甲状腺ホルモン（PTH）と副甲状腺ホルモン関連タンパク質（PTHrP）を内因性のリガンドとして持つ。PTHR1 を介したこれらリガンドの作用により、生体内でのカルシウム（Ca）とリンの恒常性維持に加え、骨組織の成長と代謝制御が行われる。そのため、PTHR1 は骨粗鬆症、副甲状腺機能低下症および Jansen 型骨幹端異形成症（JMC）を含む骨代謝関連疾患の重要な創薬ターゲットとして位置づけられる。family B の GPCR は、近年の技術革新により立体構造が解かれ、創薬研究の手掛かりが提供され始めている。一方で各リガンドと受容体の相互作用が、受容体下流の各種シグナル伝達応答をどのように制御するかについては、未だ不明な点も多い。また、PTHR1 を標的とした薬剤は限られ，その適応症は骨粗鬆症と副甲状腺機能低下症のみであり、ペプチドの持つ特徴である短い生体内半減期が、幅広い PTHR1 関連疾患に対して臨床応用の実質的な障壁となっている。従って、PTHR1 関連疾患のための各種ペプチドリガンドによる治療可能性を追求することは、各疾患への新たな治療選択肢を提供するだけでなく、骨代謝関連疾患への理解を促進し、PTHR1 を含む family B GPCR に対する創薬機会を広げることが期待できる。

そこで本研究では、まず JMC の病態モデルマウスを用いて、PTHR1 に対する inverse agonist ペプチド（[Leu^{11},dTrp^{12},Trp^{23},Tyr^{36}] - PTHrP(7 - 36)、以下 IA）の治療薬としての可能性を検討した。JMC は PTHR1 の恒常活性化型変異により引き起こされる常染色体優性遺伝性疾患で、低身長症、長管骨の骨幹端部の骨異形

成症、高 Ca 血症および高 Ca 尿症といった症状を呈する。有効な治療法は存在しない。

JMC 変異の一つである 223 番目のアミノ酸がヒスチジンからアルギニンへ変異した PTHR1（PTHR1-H223R）を Collagen 1a1 プロモーター制御化で骨芽細胞特異的に過剰発現させたマウス（C1HR マウス）は、四肢の短縮を伴う長管骨の骨幹端部の骨異形成、骨髄腔を埋める程の海綿骨量の増加と皮質骨の菲薄化、高骨代謝回転に伴う骨髄の繊維化や骨代謝マーカーの増加を呈する。この C1HR マウスへ IA を 1 回の投与当たり 500 nmol/kg の用量で生後 7 日目から 17 日間 1 日 2 回連日皮下投与したところ、C1HR マウスの病態の一部、すなわち過剰な骨量増加、高骨代謝回転に伴う骨髄の繊維化や骨代謝マーカーの増加が有意に改善された。この検討結果は、PTHR1 に対する IA が JMC の治療法として有効な選択肢となり得るというコンセプトを、初めて *in vivo* において実証したものであり、今後の JMC に対する治療薬の開発に対して有用な知見を提供したと考えられる。ただし、この検討で用いたトランスジェニックマウスの病態は、骨芽細胞のみでのシグナル異常を反映しているため、低身長症を再現する軟骨細胞特異的 PTHR1-H223R 過剰発現マウスでの検討も今後の重要な研究課題として挙げられる。また、500 nmol/kg という高投与量での頻回投与をもってしても部分的な病態改善にとどまったことから、実臨床への応用に向けて、IA 自体の活性向上だけでなく、薬物動態の改善やシグナル制御レベルでの作用の延長を図る取り組みが必要と考えられる。

次に本研究では、PTH と PTHrP とのハイブリッドペプチドを創成・改変することで、リガンドの血中濃度非依存的に作用が持続するアゴニストペプチド（LA-PTH）を創成し、副甲状腺機能低下症に対する適用可能性を検討した。副甲状腺機能低下症は PTH の分泌低下もしくは欠損によって起こり、低 Ca 血症を呈する疾患である。標準療法として Ca 製剤とビタミン D 製剤が用いられるが、尿中 Ca 排泄の上昇を伴うことで、血中 Ca を十分正常化できず、長期的には腎結石などによる腎機能の低下が課題である。近年 PTH(1-84)の 1 日 1 回の皮下投与が、本疾患の新たな治療選択肢として米国と EU で承認されたが、その血中半減期の短さから十分な効果が示されていない。

受容体への結合様式とシグナル持続性を比較した近年の研究により、受容体の構造のうち、G タンパク質結合型活性化構造（R^G）への選択的リガンドと比べて、G タンパク質非結合型構造（R^0）への選択的リガンドは、*in vivo*、*in vitro* ともに作用が持続することが明らかとなった。その後、PTH と PTHrP との間にも R^G/R^0 選択性とシグナル持続性の違いがあることが明らかとなったことから、本検討で様々な PTH/PTHrP ハイブリッドアナログを合成し、その結合様式を評価することで R^0 選択性の強い PTH/PTHrP ハイブリッドアナログである [$Ala^{1,3,12}$,Gln^{10},Arg^{11},Trp^{14}] - PTH(1 - 14)/PTHrP(15–36)（以下、M - PTH/PTHrP）を見出した。

R^0 選択性の強い M - PTH/PTHrP は正常ラットにおいて、PTH(1-34)や PTHrP(1-36)と比べて明らかに長い血中 Ca 上昇作用を示し、副甲状腺機能低下症の病態モデルである甲状腺・副甲状腺摘出（TPTX）ラットにおいては、PTH(1-34)

が一過性の血中 Ca 上昇であったが、M - PTH/PTHrP は 24 時間以上の持続的な血中 Ca 上昇作用を示した。興味深いことに、M - PTH/PTHrP は PTH(1-34)と同様に投与後 1 時間以内に速やかに血中から消失し、その持続的な血中 Ca 上昇作用は、血中濃度非依存的なものであることが示された。TPTX ラットへの 11 日間の連日投与による検討では、活性型ビタミン D 製剤であるアルファカルシドールの経口投与が尿中 Ca 排泄を有意に上昇させながら血中 Ca を正常化する一方で、M - PTH/PTHrP の皮下投与は、尿中 Ca 排泄を亢進せずに血中 Ca を正常化した。さらに、皮下注射剤として重要である中性付近での溶解性を高めたアナログペプチド [$Ala^{1,3,12,18,22}$,Gln^{10},Arg^{11},Trp^{14},Lys^{26}] - PTH(1 - 14)/PTHrP(15–36)（以下、LA-PTH）を創成し、TPTX ラットと正常サルにおいて M - PTH/PTHrP と同等レベルの血中 Ca 上昇作用を示した。

本研究において、JMC には IA を、また副甲状腺機能低下症にはシグナル持続性の強い LA-PTH の適用可能性を示したことで、それぞれの疾患への新たな治療選択肢が提示されると共に、PTHR1 の持つ薬剤標的としての幅広い可能性が改めて示された。さらに、ペプチド薬が持つ短半減期という薬物動態的課題に対し、R^G/R^0 選択性という結合様式に基づいたシグナル持続性の強いペプチドリガンドの選別により、作用の持続する薬剤を創出できる可能性が示された。近年の研究からこのコンセプトは PTHR1 以外の GPCR へも共有される可能性が高く、本研究での知見は他の GPCR 関連疾患に対する薬剤開発に有用と考えられ、今後の発展が期待される。