

# 日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

## I 基本情報

研究開発課題名：(日本語) アカデミア創薬を担う次世代のメディシナルケミストと薬物動態/物性評価研究者の育成  
(英語) Training of the next-generation of medicinal chemists and pharmacokinetics/physical property evaluation researchers responsible for the academia drug discovery

研究開発実施期間：2016年4月1日～2019年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 辻川 和丈  
(英語) Kazutake Tsujikawa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 国立大学法人大阪大学 大学院薬学研究科 教授  
(英語) Osaka University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Professor

## II 研究開発の概要

本研究は、大阪大学薬学研究科構造展開ユニットに所属する製薬企業から出向のメディシナルケミスト、薬物動態/物性評価研究者と大阪大学薬学研究科教員とが連携し、アカデミア創薬において次世代を担うメディシナルケミスト、薬物動態/物性評価研究者を「メディシナルケミスト等育成コース」の研究やプログラムを通して育成するとともに、メディシナルケミスト自身が高度な技能をさらに育成することを旨とした「高度技能育成コース」で創薬研究を展開することを目的とした。

研究開発計画としてメディシナルケミスト等育成コースでは、「核酸脱メチル化酵素阻害剤を基盤とした癌治療薬研究」と「含フッ素芳香族化合物合成法の開発と創薬構造展開」により2名のメディシナルケミストを、また「薬物動態、メタボロミクス解析による安全性、有効性評価研究」により1名の薬物動態/物性評価研究者を育成することを旨とした。さらに高度技能育成コースでは、製薬企業出身のメディシナルケミストがアカデミアとの連携により「新規中枢神経系疾患治療薬」の開発研究を実施した。具体的な研究開発による成果を下記に示す。

### 1. 核酸脱メチル化酵素阻害剤を基盤とした癌治療薬研究

核酸脱メチル化酵素 X と Y は、2-oxoglutarate (2-OG), Fe(II)-dependent oxygenase family に属する。核酸脱メ

チル化酵素 X は膀胱癌や非小細胞肺癌、核酸脱メチル化酵素 Y は膠芽腫といった難治性癌において高発現し、予後不良性とも相関することが分かっている。よって核酸脱メチル化酵素 X と Y はこれら難治性癌に対する有望な治療標的分子になると考えられる。そしてこの核酸脱メチル化酵素 X と Y を阻害できる化合物は、これら難治性癌の有望な治療薬となることが期待できる。そこでこの核酸脱メチル化酵素 X と Y の酵素活性阻害化合物を取得し、生物活性評価に基づく誘導体合成展開することを目的とした。2-OG, Fe(II)-dependent oxygenase は superfamily を構成しており、その中には腎性貧血に対する治療薬として阻害剤の探索研究が世界中で進んでいる prolyl hydroxylase-2 (PHD2)がある。また PHD2 に対する阻害薬は複数市販されている。まず核酸脱メチル化酵素 X と Y の結晶構造を比較したところ、2-OG 結合ポケットは類似していることが分かった。そこで被育成者は入手可能な PHD2 阻害薬を元に、構造展開ユニット所属のメディシナルケミストならびに薬物動態/物性評価研究者の指導と、生物活性評価研究者と連携して、核酸脱メチル化酵素 X ならびに核酸脱メチル化酵素 Y の酵素活性阻害化合物の構造展開を実施した。これにより下記に示すような成果とヒット化合物が取得され、さらにメディシナルケミストの育成に繋がった。

- 市販 PHD2 阻害薬と核酸脱メチル化酵素 X の共結晶構造解析を行い、その情報を使用して誘導体合成展開を行った。その結果、核酸脱メチル化酵素 X を選択的に阻害し、膜透過性を有し、膀胱癌細胞の増殖を抑制する化合物を取得した。
- 核酸脱メチル化酵素 Y の *in vitro* 評価系を構築し、上記核酸脱メチル化酵素 X 阻害剤開発で誘導体展開した化合物を評価したところ、用量依存的に核酸脱メチル化酵素 Y の酵素活性を阻害し、かつ核酸脱メチル化酵素 X の酵素活性も阻害する化合物と阻害しない化合物を取得した。それらの化合物はグリオブラストーマ細胞の増殖抑制作用も示した。
- 核酸脱メチル化酵素活性を質量分析計で評価するため、標準品が市販されていない核酸修飾体の合成を進めた。その結果、5-carboxymethyl-2-thiouridine(cm5S2U)、5-carbamoylmethyl-2-thiouridine(ncm5S2U)、5-methylaminomethyl-2-thiouridine(mnm5s2U)、5-carbamoylmethyluridine(ncm5U)、及び N6-methylthreonylcarbamoyl adenosine(m6t6A)の合成に成功した。これらは薬物動態/物性評価研究者育成コースの被育成者に提供され、質量分析計の標準品として化合物の on target 作用評価研究に使用された。

## 2. 含フッ素芳香族化合物合成法の開発と創薬構造展開

ヒット化合物の構造展開に於いて、薬効や作用選択性の向上、薬物動態の改善のためにフッ素導入は頻繁に行われてきた。しかし、芳香環に直接フッ素が置換した化合物は医薬品として多用されているが、芳香環の望む位置に直接フッ素を導入することは困難であった。赤井らは最近、この問題の解決策として、電子豊富なカテコール構造を酸化することで求電子性のオルトキノンに極性転換し、それに Deoxofluor などのフッ素陰イオン供与剤を反応させて脱酸素フッ素化反応を行う「脱酸素フッ素化法」を開発した。そこで、本研究では、本法を応用して、種々の芳香族化合物に位置選択的にフッ素を導入する反応の開発と、本法を生物活性を有する化合物や医薬品候補化合物に適用して、フッ素導入を基盤とする創薬構造展開に発展させることを目的とした。その結果、以下の4点において成果を得て、マイルストーンをほぼ達成した。

- 多数の医薬品に含まれる含窒素芳香族化合物の代表格であるキノリン構造に脱酸素フッ素化法を適用し、2通りの位置でフッ素を導入する新技術を創出した。
- ベンゼン環化合物であるピロガロール類に脱酸素フッ素化法を適用し、2通りの位置でフッ素を導入する新技術を創出した。
- 極めて汎用的な生物活性化合物であるカテキン類に前記2の方法を適用して、フッ素導入を基盤とする創薬構造展開が実施可能であることを検証した
- 月例報告会を開催し、また、随時、積極的に討論を行い、育成者のフッ素化を構造展開に活用する知識や技能の習得を進めた。

### 3. 薬物動態、メタボロミクス解析による安全性、有効性評価研究

誘導体化合物の作用機序に基づく特異性評価やバイオマーカーの創出、安全性評価においてこれまでの技術や手法に加えて、最新の質量分析計の応用技術の習得は次世代の薬物動態/物性評価研究者に望まれる技能となる。そこで本研究では、癌細胞やマウスを用いた薬物動態解析、メタボロミクス解析や「核酸脱メチル化酵素阻害剤を基盤とした癌治療薬研究」で必要となる生体における核酸の修飾変化を解析する基盤技術の確立研究により、薬物動態/物性評価研究者を育成することを目標とした。その成果を下記に示す。

#### ● 初期薬物動態評価項目の手法習得と誘導体化合物の評価

薬物動態/物性評価研究者の指導の下、被育成者には誘導体展開において重要となる下記初期薬物動態評価項目を習得させた:logD 算出、リン酸緩衝生理食塩水に対する溶解度、膜透過性(Caco-2 細胞、Parallel Artificial Membrane Permeability Assay)、肝ミクロソームでの代謝安定性、血漿タンパク質結合性、Cytochrome P450 阻害性、Cytochrome P450 誘導性。さらにこれらの習得技術をメディシナルケミストとしての被育成者が合成した化合物に適用して、誘導体展開に繋げた。

#### ● エピトランスクリプトーム解析

RNA の後天的な修飾によるタンパク質の翻訳制御は、最近エピトランスクリプトミクスという新たな分子生物学的概念を創出した。RNA の修飾は 100 種類以上知られており、これら RNA 修飾の全体像の理解はエピトランスクリプトームと呼ばれている。メディシナルケミスト育成コースの被育成者が誘導体展開した化合物の標的分子である核酸脱メチル化酵素 X や Y は、メチル化 RNA を脱メチル化できる酵素である。そこで全 32 種の修飾塩基の分離測定法を構築するとともに、マウスの主要臓器における RNA を用いて質量分析計により解析した。その結果、各臓器において特徴的な RNA 修飾体の存在を認めた。この成果は、エピトランスクリプトーム解析により各臓器の状態を鋭敏に評価できることから、医薬品候補化合物の安全性試験への応用に繋がると期待された。

#### ● メタボローム解析

成体由来する代謝物を網羅的に解析するメタボロームは、生体機能の解明とともに医薬品創製や疾患バイオマーカーの探索などにおいて有用な手段となる。よってメタボローム解析を実施できる知識や技能の習得は、薬物動態/物性評価研究者に大きく期待される。そこで被育成者は超高速液体クロマトグラフィー-四重極飛行時間型質量分析計を用いて血漿中のメタボローム解析基盤技術を構築した。この技術を利用して、化合物の代謝物の同定の実践も行った。

### 4. 高度技能育成コース

本研究では Transient Receptor Potential(TRP)チャネル X の活性化に着目した創薬を展開し、中枢神経系に作用する薬剤を創製することを目的とした。高度技能育成コースの研究者が既に見出していた TRP チャネル X 活性化剤 W をリード化合物とし約 130 検体の誘導体合成を行った。それらの活性を評価した結果、リード化合物を上回る活性化能を持つ化合物 Y を見出した。一方、合成化合物の中に阻害活性を持つものが見つかり、これを最適化した結果、新規 TRP チャネル X 阻害剤 Z を得た。阻害剤 Z は薬物動態的にも優れ、TRP チャネル X 活性をサブ  $\mu\text{M}$  のオーダーで阻害した。

TRP チャネル X 活性化剤 W を、中枢性疾患モデルマウスを用いて評価したところ改善作用も悪化作用も認められなかった。続いて、TRP チャネル X 阻害剤 Z を同じモデルで評価したところ、有意な差はなかったものの改善傾向を示した。さらに、阻害剤 Z を別の中枢性疾患モデルマウスに経口投与したところ、有意な改善効果を示した。正常マウスに対しては、同じ投与条件で毒性所見は見られなかった。また、阻害剤 Z については線維芽細胞を用いた線維化抑制効果を評価したところ、有意な効果が確認できた。これにより、製薬企業出身のメディシナルケミストがアカデミアとの連携することにより、新規中枢神経系疾患治療薬の開発研究が展

開できた。

以上の研究により 2 名のメディシナルケミスト、1 名の薬物動態/物性評価研究者を育成することができた。さらに高度技能育成コースの研究者による研究成果は物質特許の出願にもつながった。本事業によるメディシナルケミストや薬物動態/物性評価研究者の育成は、製薬企業やアカデミアにおける創薬研究者として活躍するキャリアパスへと繋がった。

The purpose of this research was to train the next generation of medicinal chemists in cooperation with medical chemists and pharmacokinetics/physical properties evaluation researchers seconded from pharmaceutical companies belonging to the Lead Exploration Unit of the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, on a medicinal chemist's training course. Moreover, the advanced skills of a medicinal chemist can be honed further in an advanced skills training course. In this research project, two medicinal chemists and a pharmacokinetics/physical properties evaluation researcher were given training on the themes of "Cancer therapeutic drug discovery based on the development of nucleic acid demethylation enzyme inhibitors" and "Development of a fluorine-containing aromatic compound synthesis method and drug discovery structure" through a medicinal chemist training course. In addition, a medicinal chemist conducted research on the development of a novel therapeutic agent for the central nervous system disease through collaboration with academia on advanced skills training course. The results of this research project are shown below.

### **Medicinal chemist training course**

#### Cancer therapeutic drug discovery based on the development of nucleic acid demethylation enzyme inhibitors

1. The co-crystalline structural analysis of a prolyl hydroxylase-2 inhibitor and nucleic acid demethylation enzyme X was performed. A selective inhibitor, Z, for the nucleic acid demethylation enzyme, X, with inhibitory activity against the growth of pancreatic cancer cells has been obtained from this information.
2. Compound Z was also shown to inhibit the enzymatic activity of the nucleic acid demethylation enzyme Y in a dose-dependent manner, and inhibited the growth of glioblastoma cells.
3. To evaluate the inhibitory activity of compound Z for enzymes X and Y by using mass spectrometry, modified nucleic acid bases were synthesized and used as standards. The standard nucleic acid bases were provided to a researcher on the pharmacokinetics/physical properties evaluation researchers training course for the on-target evaluation of compound Y.

#### Development of a fluorine-containing aromatic compound synthesis method and drug discovery structure

1. The deoxyfluorination method was applied to the pyrogallols and the nitrogen-containing aromatic rings, both of which are often found in many bioactive substances and pharmaceuticals, and new regioselective fluorination methods have been established in these two aromatics.
2. One of the above methods was applied to catechins to verify its utility in the fluorination-based drug expansion.

## **Advanced skills training course**

### Development of a novel therapeutic agent for central nervous system disease

The researcher synthesized roughly 130 compounds, as based on the structure of a tool compound W previously discovered by the researcher together with Prof. Mori of Kyoto University as a certain TRP channel X activator. These compounds were evaluated their activity at Prof. Mori's labs and as a result, several compounds including compound Y were found to be more active than compound W. On the other hand, the researchers also found that some of them showed inhibitory activity to channel X rather than the channel activation. Among them, novel compound Z demonstrated sub-micro molar activity to the channel X and excellent pharmacokinetic profiles. Compound Z exhibited not only anti-fibrotic activity in cell-based assay at Prof. Nishida's labs of National Institute of Natural Science at Okazaki but also significant efficacy with oral administrations in several animal models including the model developed by Prof. Hibino's labs of Niigata University.

Two medical chemists and one pharmacokinetics/physical properties evaluation researcher were sponsored for this research. In addition, the research results from the advanced skills training course also led to the application for a material patent. The sponsored medicinal chemists and the pharmacokinetics/physical properties evaluation researcher have gained experience of career paths that incorporate active drug discovery in pharmaceutical companies and academia.