

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：Unstructured タンパク質を標的にしたドラッグデザイン手法の確立を目指した研究
Research on the development of new drug design system for disease-related unstructured proteins

研究開発実施期間：2017 年 5 月 1 日～2020 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：上村 尚人
Naoto Uemura

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立大学法人大分大学 医学部臨床薬理学講座 教授
Professor, Division of Clinical Pharmacology, Department of Medicine, Oita University,

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

Unstructured タンパク質を標的にしたドラッグデザイン手法の確立を目指した研究展開において、2017 年度は、標的タンパク質の Unstructured 領域のモチーフ検索と標的の 3 次元構造情報を駆使して、大分大学が独自に開発したアルカロイド骨格を持ったヘリックス模倣化合物から活性化合物を見出すことができた。(狂犬病ウイルス増殖阻害剤と MAL-G actin に対する阻害剤)。狂犬病は一度発症すると有効な治療法がなく、ほぼ 100% 死に至る人畜共通感染症である。大分大学医学部微生物学講座では、長年この狂犬病に対する分子生物学的、疫学的なアプローチに基づき、研究を行ってきた経緯があった。本狂犬病ウイルス研究の分子発症メカニズムに関する検討の結果、N タンパク質 C 末端のトランジエントヘリックス構造がウイルス増殖に必要であることが示唆された。本タンパク質の C 末端は Unstructured タンパク質の特徴を有していることがアミノ酸配列上示唆されていたため、対象となる部位を擬態することで N タンパク質の会合阻害剤を開発することで、狂犬病治療薬となることを期待した。これらの検討は、バックグラウンドが生物学領域の研究者とバックグラウンドが化学領域の研究者のコラボがなければ得られなかったものであり、まさに CMB 人材育成にふさわしいテーマとなった。

その成果をもとに、2018 年度においては、上記で得られた新規アルカロイド骨格の有効性を明らかにするために、ヘリックス構造以外にも適応事例を検討した。その結果、シート構造を持つエリスロポエチンの低分子化に応用することに成功した。他にも仮想スクリーニングの手法を駆使してシート構造だけでなく、ターン構造やストランド構造にも仮想のヒット化合物を得ることができることに成功し、タンパク質の 2 次構造全般に幅広い活性化合物が得られる可能性が高まった。以上の結果から、標的タンパク質の 3 次元構造さえ解明できれば、アルカロイド化合物を用いることでヘリックス構造だけでなく幅広い標的に活性化合物を見出せる可能性が高まった。

しかしながら、2018 年度に展開中のテーマでは、ほとんどが標的を特定できず、当然 3 次元構造情報も得る

ことが出来なかった。そこで活性化合物を取得するために、狂犬病ウイルス阻害剤研究で合成した約 200 化合物を mini ライブラリーとして複数の活性評価系に提供を行ってみた。この mini ライブラリーは、アミノ酸 20 種類の中で、フェニルアラニン (F) とロイシン (L) のみを側鎖構造に持っている為、標的全体の 20~30% のケースにヒット化合物が期待された。

6 つのテーマにおいて mini ライブラリーを用いてスクリーニングを実施した結果、予想外に多くのヒット化合物を得ることに成功した。具体的には RS ウイルス増殖阻害活性、核外移行シグナル阻害活性、インフルエンザ増殖阻害活性、HIF-1 阻害活性、イレッサ耐性肺ガンに対する耐性克服活性の評価系に、活性化合物が見出され、現在最適化が進行中である。逆に KLF5 にはヒットが見出されなかった。

以上の成果から、現在共同研究を行っている株式会社大分大学先端医学研究所の資金援助を受け、アルカロイド骨格を持った 2000 化合物を対象として(タンパク質間相互作用に中心的な役割を持っているアミノ酸を 10 種類選抜し、3 つの側鎖構造にすべての組み合わせとして化合物をデザインした。従って 10 x 10 x 10 の 1000 化合物ですべての組み合わせ化合物をカバーできる。今回は 2 つのアルカロイド骨格を用いたため、トータル 2000 化合物をデザインした。) のライブラリー合成を行い、2019 年 3 月に合成を終了し、1900 化合物の合成に成功することが出来た。

最終年度である 31 年度には、ドラッグデザインシステムの確立における最も有効な手法として、アルカロイド骨格を有する化合物ライブラリーを駆使したスクリーニングの有効性の実証を中心に展開を行った。引き続き、実施したテーマとしては、当初から引き続いて実施している狂犬病治療薬 (大分大学) の他、ALS 治療薬 (東京大学)、エボラウイルス阻害剤 (長崎大学)、白血病治療薬を目指した核外移行シグナル阻害剤 (医薬基盤研)、大腸がん治療薬 (自治医科大学)、インフルエンザ治療薬 (大分大学)、RS ウイルス治療薬 (大分大学)、強皮症治療薬 (大分大学)、治療抵抗性ヘリコバクター・ピロリ (大分大学)、HBV 阻害薬 (東京都医学研)、HIF-1 阻害薬 (京大)、心筋症治療薬 (京都府立医大) があり、化合物ライブラリーから既に 11 化合物がステージアップしている。上述した複数の標的に対する活性評価系を構築し、実際にスクリーニングを実施し、活性化合物が高い確率で得られることを実証してきた。上記の中でも特に力を入れて進めたのが、狂犬病に対するシーズである。狂犬病は WHO の Neglected Tropical Disease にも位置づけられており、インド、中国をはじめとして狂犬病が蔓延する国や地域は未だに多く、治療薬の開発が強く望まれている。しかし、狂犬病の流行地域は貧しい国が多く、採算性の問題から製薬企業は医薬品開発に積極的ではない。よって、本 AMED プロジェクトで強化された創薬機能と本学医学部独自の学術的背景を併せることで、世界初の狂犬病治療薬開発に挑戦することは学術研究としてだけでなく、社会貢献や人道的観点からも意義深いと考えられたため、本課題に取り組んだ。本研究事業期間内の成果としては以下の通りである。N タンパクの必須活性領域を FXXFL と予測し、この予測をもとに Alanine-scan を実施したところ、対象配列を Alanine で代替した配列では順次活性が失われることが確認された。そこで、*in silico* アプローチにより対象領域の 3D 構造を予測し、模倣化合物を合成したところ、デザインした化合物 (TCB-009) に活性が認められた。そこで TCB-009 の最適化を進めたところ、僅か 25 番目にデザインした TCB-025 において動物レベルで活性を確認することができた。上記をリード化合物として最適化を進めたところ活性を改善することに成功し、IC₅₀ が 0.5 μ M 前後の化合物を取得することができた。本化合物は医薬品開発対象として、活性評価の次の段階に移行することができる。

(Computational Medicinal Biologist の育成)

本課題では、Computational Medicinal Biologist/Chemist の育成を推進し、最新の技術を身に付け、製薬会社へ通用する Biologist/Chemist の育成を目指した。本課題開始当初からの育成対象者は Biologist の 1 名であったが、2018 年度にさらに 1 名の Chemist を加え、技術のキャッチアップと新たな展開への準備を進めてきた。順調に技術移管を進めており、新たなテーマ展開に必須の人材が育ちつつある。

また、本プロジェクトでは同時期に課題採択となった京都大学原田浩教授と協力し、育成事業の一環とし

て、2018 年度には 2 日間の大分合宿を含む共同での教育の実施を行った。大分大学で主幹したのは、主として応用領域の包括的な人材育成プログラムである。本プログラムにおいて、座学においては、ファーマビジネス概論、中分子創薬概論、アカデミア創薬概論、活性評価の基礎、特許・知的財産概論、コンピュータを用いた創薬概論等の講義が提供され、その他に参加者が取り組んでいる課題に関する発表と討議が実施された。本プログラムで参加した育成対象者は京大及び東大の育成対象の研究者と合わせて 6 名であり、総勢 20 名以上であった。座学、研究での実践、研究発表を含めた形で、創薬領域の専門家が育成対象者をトレーニングする上包括的な人材育成教育を提供するプラットフォームを達成できたことは非常に大きな価値があるだろう。

In research development aimed at establishing a drug design method targeting unstructured proteins, we developed in FY2017 an alkaloid originally designed in Oita University by making full use of motif search of the target protein's unstructured regions and 3D structure information of the target. An active compound could be found from a helix-mimicking compound having a skeleton. (Rabies virus growth inhibitor and MAL-G actin inhibitor). As a result of the investigation on the molecular pathogenesis mechanism of this rabies virus research, it was suggested that the transient helix structure at the C-terminal of N protein is required for virus growth. Since it was suggested in the amino acid sequence that the C-terminal of this protein has characteristics of unstructured protein, an inhibitor mimicking the target site could be used as a therapeutic drug for rabies.

Based on the results, in FY2018, in order to clarify the effectiveness of the new alkaloid skeleton obtained above, application cases other than the helix structure were examined. As a result, we succeeded in applying it to the reduction of the molecular weight of erythropoietin having a sheet structure. We also succeeded in obtaining virtual hit compounds not only in the sheet structure but also in the turn structure and the strand structure by making full use of the virtual screening method, and a wide range of active compounds can be obtained in all secondary structures of proteins. If the three-dimensional structure of the target protein can be elucidated, the possibility of finding active compounds not only in the helix structure but also in a wide range of targets by using alkaloid compounds has increased. However, most of the themes developed in FY2018 could not identify the target, and for that reason could not obtain 3D structural information. Therefore, in order to obtain active compounds, we synthesized approximately 200 compounds in relation to the research on rabies virus inhibitors as mini libraries and then provided them to multiple activity evaluation systems. Since this mini library has only phenylalanine (F) and leucine (L) in the side chain structure among 20 types of amino acids, a hit compound was expected in 20 to 30% of the cases of the whole target. Based on the above results, with the financial support of the Oita University Institute of Advanced Medicine, Inc, we targeted 2000 compounds with alkaloid skeletons (which play a central role in protein-protein interactions). In March 2019, and succeeded in synthesizing 1900 compounds.

In the final year, as the most effective method for establishing a drug design system, we focused on demonstrating the effectiveness of screening using a compound library having an alkaloid skeleton. We continue expanding the research themes in addition to the rabies drug (Oita University). The ALS drug (University of Tokyo), Ebola virus inhibitor (Nagasaki University), and the leukemia drug outer transition signal inhibitor (RIKEN), colorectal cancer drug (Jichi Medical School), Influenza drug (Oita University), RS virus drug (Oita University), Scleroderma drug (Oita University), Treatment There are resistant *Helicobacter pylori* (Oita University), HBV inhibitor (Tokyo Medical Research Institute), HIF-1 inhibitor (Kyoto Univ.), cardiomyopathy therapeutic drug (Kyoto Prefectural University of Medicine), and 11 compounds are already available from the compound library.

(Developing Computational Medicinal Biologist)

In this subject, we aimed to promote the training of Computational Medicinal Biologist/Chemist, acquire the latest technology, and train Biologist/Chemist who is expected to contribute to the pharmaceutical industry. From the beginning of this project, the number of trainees was one biologist, but in 2018, another chemist initiated training to update the technology and then to prepare for new development. In collaboration with Professor Hiroshi Harada of Kyoto University as part of the training project. In FY2018, joint education including two days of Oita boot camp was conducted. In this program, lectures were provided on topics such as Pharma Business Introduction, Middle Molecule Drug Introduction, Academia Drug Introduction, Activity Evaluation Basics, Patent/Intellectual Property Introduction, Computer-assisted Drug Introduction, etc. In addition, participants presented and discussed their research projects that participants were working on. The total number of trainees was 6 including researchers from Kyoto University and the University of Tokyo, and the total participants was 20 or more.