

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム セットアップスキーム (ACT-MS)
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 呼吸鎖を標的とした新規抗結核剤の開発
(英語) Development of a novel anti-tuberculosis drug by targeting the electron transport chain

研究開発実施期間：2018年9月1日～2020年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 新谷 泰範
(英語) Yasunori Shintani

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 国立循環器病研究センター・分子薬理部・部長
(英語) National Cerebral and Cardiovascular Center, Molecular Pharmacology, Director

II 研究開発の概要

呼吸鎖を標的とした新規抗結核剤の開発

研究開発の目的

- 結核菌は、年間 150 万人以上の死者をうみだす世界保健における最重要課題である。多剤耐性菌の出現、マクロファージ内で潜伏感染を成立させた菌に対する有効な治療法の欠如など、克服にむけた課題は多い。また罹患率の高さ、ケア施設での集団感染例の報告など、高齢者結核は今後の大きな問題である。細胞内寄生から潜伏感染を成立させる結核菌の性格上、多剤併用は治療の原則であり、治療期間の大幅な短縮を可能にする新規メカニズムによる薬剤の開発が強く求められている。
- 呼吸鎖複合体は呼吸をするすべての生物に共通かつ必須の分子機構である。近年のタンパク質構造情報の蓄積により特異的な阻害剤の創出が可能となり、創薬標的として注目を集めている。40 年ぶりに上市された新規抗結核薬ベダキリンは、呼吸鎖複合体の 1 つである ATP 合成酵素の阻害剤であり、抗結核剤の標的としての呼吸鎖複合体の妥当性を立証する一方で、強い心毒性が問題であり使用が制限されている。
- 電子伝達により運搬される還元当量は、呼吸鎖複合体の最後に位置する終末オキシダーゼにより酸素の還元を利用される。本研究では結核菌の終末オキシダーゼを標的とした新規抗結核剤の開発を目的とした。

独創性・新規性

- 今回新谷らが見いだした阻害部位は独自であり新規である。呼吸鎖終末オキシダーゼに対する従来の阻害剤は基質結合部位が作用点であり、アロステリック阻害剤は報告がなく First in class の抗菌剤となる。ストレス環境下で重要な標的オキシダーゼは潜伏期結核菌に対する創薬ターゲットとして注目されており、重要なシーズである。また標的オキシダーゼはヒトには存在せず、その阻害剤は副作用の少ない新規の抗菌薬として期待できる。
- 呼吸鎖複合体はほとんどすべての生物の根源的な活動に必須の分子群である。しかし 50 年以上の研究の歴史があるにもかかわらず、その活性調節機構については多くが未解明である。本研究の成果は、生物進化とあわせてエネルギー代謝の新たな分子メカニズムの解明につながることを期待できる。

研究開発の概要

(1) ヒット化合物の評価と有望なリード化合物の創出

- まず結核菌終末オキシダーゼの発現精製に取り組み、コドン最適化と菌株の選択により、異所発現による精製オキシダーゼの調整に成功した。このオキシダーゼを用い、独自に構築したカスタム化合物ライブラリに対して活性阻害試験をおこない、終濃度 50 μ M で 30%以上の酵素阻害活性をもつ 24 個のヒット化合物を同定した。同時に真核生物のオキシダーゼに対する阻害活性も検討し、クロスしない特異的な化合物の取得に成功した。このヒット化合物は複数の類縁グループに分類が可能であった。同定した有力なヒット化合物について、理化学研究所 幸先生との共同研究により、類縁化合物の検索、絞り込みをおこない市販化合物の入手をすすめた。

- 入手化合物に対し、結核菌オキシダーゼに対する活性阻害試験をおこない、妥当性のあるヒットであることを確認したのち、セットアップ企業の有機化学チームにより 2 ケモタイプ (N2186 系統, N586 系統) について新規合成を開始した。新規合成により活性の顕著な上昇を認めたが、うち 1 つのケモタイプ (N2186 系統) については基質であるメナキノンに構造が類似していったため、当初のコンセプトからはずれていくと判断し、これ以上の合成を断念した。さらに 1 つのケモタイプ (P328 系統) を加え、2 ケモタイプについて、合成展開、類縁体取得をすすめた。
- 終了時にセットアップ企業により新規合成している化合物は、構造活性相関がみえてきており、特異性についても目標を達成できているが、活性値が十分でなく、到達目標には達していない。1 つのケモタイプ (N2186 系統) はマイルストーンが達成できたが、基質であるメナキノンに構造が類似していったため、当初のコンセプトからはずれていくと判断し、これ以上の合成を断念したことが開発を遅らせた原因と考えている。ただ (2) の結核菌に対する薬効もみられており、コンセプトについて確立できていることより、セットアップ企業とは ACT-MS 終了後も共同研究を継続することで合意している。
- また結核菌ターゲット酵素の構造解析の前段階として、その大腸菌ホモログをもちいて、リコンビナント酵素の精製を完了、クライオ電顕によるデータ取得、構造解析を進めている。また結核菌ターゲット酵素の構造解析の前段階として、その大腸菌ホモログをもちいて、リコンビナント酵素の精製を完了、クライオ電顕によるデータ取得、構造解析を進めた。

(2) 結核菌を用いた薬効評価

結核菌 bd オキシダーゼ阻害活性が認められた化合物のうち、再入手可能であったもの 20 個について、国立感染研田村研により結核菌 (H37RV 株) を用いたバイオアッセイを行い、呼吸鎖の完全遮断による好気増殖条件での増殖抑制効果を 15 個の化合物について認めた。次にヒトマクロファージ感染モデルで結核菌の増殖抑制効果を検討したところ、注目する 3 ケモタイプについて菌数の減少を認め、コンセプトの妥当性を確認できた。

(3) インシリコ検索のサポートと MD 計算による最適化

結核菌終末オキシダーゼに対する阻害活性測定により取得したヒット化合物について、ヒットの妥当性と活性の向上、構造活性相関をえるために、ligand based のインシリコ検索 (理研創薬 G の独自開発アルゴリズム使用) により類縁体を効率よく検索し、化合物入手を行い、阻害活性を評価した。本研究計画で標的とする終末酸化酵素はヘム鉄や金属を酵素内に含み、また反応サイクルにおいて金属原子や配位するアミノ酸残基の価数が変化するため、MD シミュレーションを動かすためのパラメーター設定が非常に困難であると予想された。そのため、第一段階としてミトコンドリアチトクロム C オキシダーゼの酸化型についてパラメーター設定を試みた。アポ体で 200ns までの MD シミュレーションをエラーなく動作させることに成功し、次に結晶構造解析により阻害剤の結合部位が明らかとなっている阻害剤との複合体の MD シミュレーションを検討中である。

終了時に計画当初の目標を達成することができなかったが、コンセプトを満たすヒット化合物が入手できていること、結核菌を用いた薬効については検証できていることより、ACT-MS 終了後もセットアップ企業と共同研究を継続し、リード化合物の創製を目指す。

Development of a novel anti-tuberculosis drug by targeting the electron transport chain

[Background]

- Tuberculosis (TB) is a leading cause of death worldwide, kills more than 1.5 million people a year. The rise of multidrug-resistant (MDR) and extremely drug-resistant (XDR) strains of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtu*) represents a serious health challenge. The length of the standard treatment is a major cause for emergence of resistant strains. Lack of effective treatment for dormant *Mtu*, effective vaccination, and outbreak in healthcare facilities for the elder people cause tuberculosis treatment make current TB treatment more alarming. Therefore, **there is pressing need to develop an anti-tuberculosis drug that has a novel mechanism of action. And a novel drug has to shorten the length of treatment.**
- Electron transport chain (ETC) is composed of multiple membrane protein complex, which has a fundamental machinery conserved in not only mammals but also microbes. Recently, ETC has draw attention as a prospect drug target, because bedaquiline, a first new anti-tuberculosis drug in 40 years, targets ATP synthase that is one of ETC enzyme complexes. The approval of bedaquiline has verified the concept of targeting ETC, however, its strong cardiotoxicity limits its use.

[Aim]

The aim of this study is to develop an anti-tuberculosis drug which has a novel mechanism of action by targeting terminal oxidases in the electron transport chain. We identified an allosteric site for heme-copper oxidase after successful X-ray co-crystallography. With combination of structural analysis of cytochrome oxidase and *in-silico* compound screening, we aim to establish a proof of concept and develop a first-in-class anti-tuberculosis drug.

[Summary]

We succeeded exogenous expression of *Mtu* oxidase and effective purification with activity. We screened the custom compound library with this *Mt* oxidase, and found 24 hit compounds. Among them, there was the hit compounds that did not cross react with mammalian terminal oxidases.

With ligand based derivative search and newly synthesis of the prospect hits, we focused/developed 3 core compound structures. All 3 hits successfully inhibited the growth of *Mtu* strain, H37Rv, in oxygen-rich condition. In addition, they inhibited the growth of H37Rv in human macrophages, thereby we verified the concept of our project. Unfortunately, the most effective compound turned out to be a competitive inhibitor and was eliminated from further development, however, we reached an agreement that we will continue this collaboration with the set-up company in order to develop a lead compound with successful in-vivo POC.

III 事後評価総合所見

結核菌の呼吸鎖を創薬標的として結核治療薬の開発を目指す挑戦的な課題であり、分子設計技術を活用してリード探索が展開され、細胞内感染をミミックする *in vitro* 系で活性が検証されています。開発中の薬剤との併用を前提に開発計画が練られ、シード化合物の耐性菌に対する先行他社開発化合物 Q203 との併用効果も確認されています。その中で、目標とする活性値を有する化合物を見出していることは評価できます。

しかし、特異性については目標値に達しておらず、最終的な候補化合物の創出には至っていません。さらに、マウス感染モデル系での検証にも至りませんでした。

なお、セットアップ企業からの化合物探索法に関する助言、化合物の合成などが行われており、今後セットアップ企業との共同研究体制をさらに確立し、より実用化に向けた検討を進められることを期待します。