

## 日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 事後評価報告書



### I 基本情報

補助事業課題名：（日本語）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業

（プログラム名）（英語）Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

実施期間：平成29年4月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：（日本語）武田 弘資

（英語）Kohsuke Takeda

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：

（日本語）国立大学法人長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

（英語）Nagasaki University・Graduate School of Biomedical Sciences・Professor

### II 補助事業の概要

長崎大学では、得意とする研究分野である新興・再興感染症および放射線障害に関わる創薬テーマを学内だけでなく、全国の大学・研究機関からも広く収集し、創薬シーズの発掘、育成、その後の化合物スクリーニングや最適化合成の支援を行ってきた。そのような支援活動に加え、長崎県の豊富な海洋資源を創薬に活用することを目的に、平成30年度（2018年度）より長崎大学オリジナルの海洋微生物抽出物ライブラリー（NU-MME Library; Nagasaki University Marine Microbial Extract Library）の構築を開始した。我が国で最も島嶼の多い長崎県は、本土側にも複雑な海岸線を多く有し、その総延長は北海道について全国第2位である。それは海洋生物の多様性が高いことを物語っており、広いケミカルスペースを持つ天然化合物の源泉が豊富に存在することを意味している。

各地から収集してきた様々な海洋動物や海藻などのサンプルを細断し、海水寒天培地に塗布することで、海洋サンプルに付着したり、共生したりしている様々な微生物を比較的容易に単離することができる。長崎大学では、過去2度（平成8～11年度、平成14～15年度）にわたって県内各地で海洋微生物の大規模なサンプリングを行い、その際に単離された18,000種類を越える微生物株が現在も保存されている。まずはその保存株を順次、再培養して新規保存株を作製する一方、新たな微生物の収集活動も行って新規保存株の拡充を図った。

各微生物株からの抽出物の調製については、いくつかの方法で調製した抽出物を複数の創薬スクリーニン

グ系で評価し、もっとも有効性および汎用性が高いと思われる方法を決定した。具体的には、菌体培養液をアセトンで処理した後、酢酸エチルで分配して回収した有機層をエバポレーションし、得られたサンプルをDMSOに溶解してアッセイ用抽出物とするという比較的簡便な方法を採用した。当初は抽出物調製作業の効率化のため有機層からのサンプリングのみを進めていたが、事業期間半ばより合成吸着剤（ダイヤイオンHP20）を用いて水層からのサンプリングも行ってきた。その結果、2022年3月末までに、1,767株の新たな微生物ストックを作製し、1,137種の抽出物を調製した。そのうちの640種の抽出物を96穴プレート8枚に分注したものを、NU-MMEライブラリーとしてBINDS事業における支援メニュー（D3-2）での創薬スクリーニング支援に供してきた。

本ライブラリーを用いたスクリーニングでは、通常の化合物ライブラリーのスクリーニングとは異なり、目的の活性を有する化合物を直接得ることはできず、サンプルごとに微生物の再培養や大量培養およびその後の抽出物の調製が何度か必要になり、さらに最終段階として抽出物からの活性化化合物の単離・同定が必要となる。そこで本ライブラリーの活用を推進するため、1次ヒットが得られてから化合物同定に至るまでの効率化を目指したワークフローの検討を行った。その結果、

- ① 1次ヒット抽出物が得られた場合、追加のサンプル（スクリーニング用サンプルと同一ロット）を使って再現性と濃度依存性を確認する
- ② その確認が済んだサンプルについては、再度、スクリーニング用サンプルと同じ方法で培養、調製を行い、そのサンプル（再調製サンプル）でも活性が維持されていることを確認する
- ③ さらにそれでも活性が維持されていた場合は、中規模培養サンプル（培養液 1.6 リットルより調製）での活性確認を経て、大量培養（培養液 20 リットル程度）ならびに抽出物の大量調製を行い、その活性を確認する
- ④ 大量調製サンプルからの活性化化合物の単離・同定に進む

の段階を経ることとし、さらにそれぞれの段階での効率の良い作業プロトコルを確定させた。その際、事業内連携として、北里大学・岩月正人先生のグループより技術指導を受けると同時に、一部の課題については活性化化合物の単離・同定を同グループに依頼した。最終段階の④では、1次分画として中圧液体クロマトグラフ分取システムを用いた分画プロトコル、2次分画として高速液体クロマトグラフ（HPLC）分析・分取システムを用いた分画プロトコルをそれぞれ完成させた結果、多くのサンプルの2次分画までをほぼ一定の条件で進めることができるようになった。ただし、その後の3次分画以降はそれぞれの活性物質の性状に応じて個別の条件で単離する必要があるため、今後も作業の効率や正確性の向上を目指した検討が必要である。

BINDS 事業における支援では、スクリーニング用サンプルの提供だけではなく、被支援者にサンプルの評価を適宜依頼しつつ、各ステップにおける培養ならびに抽出物調製から最終段階の活性化化合物の単離・同定までを我々が担当した。実際には30課題に対して本ライブラリーを活用した創薬支援を行った。その結果、22課題で1次ヒット抽出物が得られ、順次、再調製サンプルの評価へと進めた。さらに大量調製サンプルで活性の確認された10課題において、それぞれの活性成分の単離・同定を進めた。その結果、「抗歯周病菌活性を有する化合物の探索」、「う蝕に対する予防薬の開発」、「タンパク質複合体の破壊を指標とした抗癌剤スクリーニング」、「抗重症熱性血小板減少症候群ウイルス剤の探索」、「肺線維症治療薬の開発」、「シャーガス病治療薬の開発」の6課題で、それぞれ活性を有する化合物の同定に至った。加えて、各課題の状況や被支援者の要望に合せ、アッセイ系の構築、インシリコスクリーニング、化合物スクリーニング等の支援も行った。その際には事業内の連携として、化合物スクリーニング支援で用いるライブラリーおよびデータベースについては東京大学創薬機構（5課題）ならびに京都大学医学研究支援センター（10課題）よりそれぞれ供与を受けた。また、アッセイ系の構築支援として東北大学よりGPCRアッセイシステムについてのマテ

リアル提供および技術指導を受けた。

高度化研究としては、上述の通り、NU-MME ライブラリーの構築、拡充ならびにその活用方法の確立を進めてきたことに加え、補助事業参加者の独自創薬課題の推進も行ってきた。そのうち「マラリア治療薬の開発」および「ミトコンドリア局在プロテインホスファターゼの活性阻害剤の探索」の2課題においてNU-MME ライブラリーのスクリーニングを行った。前者においては、事業期間内に最終的な化合物の同定には至らなかったものの、90%以上のマラリア原虫増殖阻害効果を示す抽出物が複数得られ、その一部については大量調製サンプルの2次分画での活性画分の取得まで至っている。後者についても進捗状況はほぼ同じであるが、支援課題の一つに別のプロテインホスファターゼに対する阻害剤探索の課題があったため、両者のスクリーニング経過を比較してみた。どちらの課題においても *in vitro* での活性阻害を指標にスクリーニングを行ったが、阻害活性を示す1次ヒット抽出物は互いに異なるもののみで、オーバーラップするヒット抽出物は得られなかった。この結果は、互いに分子構造の異なる2つのプロテインホスファターゼを対象としているために予想通りではあったが、化合物の混合物である抽出物の状態であってもそれぞれが特異性を有しており、ライブラリーとしての質が保たれていると考えられた。

本ライブラリーの特徴の一つは、昨今の創薬で求められている、いわゆる中分子を豊富に含んでいることで、今後の中分子創薬における基盤となることが期待される。もう一つの特徴は、一つ一つのサンプルが多種多様な化合物を含んでいるため、スクリーニングに供するサンプル数自体は少なくとも結果的に多くの化合物を効率良くスクリーニングすることになり、比較的スループット性の低いアッセイ系でもヒットを得られる可能性があることである。特にアカデミア創薬に多い、細胞をベースとしたアッセイ系などでも比較的気軽に創薬スクリーニングを行えるため、アカデミアにおける創薬研究の裾野を広げることにつながると考えられる。一方で、ヒットした抽出物から実際に活性を示す化合物を単離・同定する必要があり、その過程に多くの時間と労力が求められる点が難点である。しかし、その点については今後さらに技術向上と効率化を目指すことで克服していきたい。また、現有の微生物株の遺伝子解析による分類も今後さらに進めていくことで、抽出物の多様性を考慮しつつライブラリーを拡充していくことが可能となる。よって、今後も本ライブラリーのより一層の拡充と運用方法の効率化を進めることで、中分子創薬を目指した新たな創薬基盤を構築していきたい。

We have been collecting unmet medical needs on the fields of emerging and re-emerging infectious diseases and radiation injuries, on which we have focused since the foundation of Nagasaki University, from clinical laboratories of our university hospital as well as other university hospitals and national institutes. In addition, we have helped clinicians and researchers identify drug targets, develop assay systems, conduct high throughput screening, and optimize hit compounds. Besides conventional chemical compound libraries, we have been preparing an original marine microbial extract library, designated as a Nagasaki University Marine Microbial Extract (NU-MME) library. Nagasaki Prefecture has many islands and is surrounded by seas, straits, gulfs, bays, and coves, giving it the second longest coastline in Japan after Hokkaido. It is thus blessed with natural resources, such as marine animals, seaweeds, and marine microbes.

To efficiently collect marine microbes, we set out to isolate marine microbes along the coasts of Nagasaki Prefecture. Although we initially attempted to isolate marine microbes from seawater, the efficiency of microbial colony formation was too low. As such, we collected sea animals and isolated marine microbes mainly from the alimentary canal. Many kinds of sea animals, such as sea urchin, crab, lobster, sea cucumber, sea anemone, oyster, and shrimp, were collected from the coasts of various districts in Nagasaki Prefecture. The shredded samples were streaked out onto marine agar and seawater agar plates, which were incubated at 26°C for several days. After colonies were isolated based on colony morphology and pigmentation, the marine microbes were cultured in liquid media, and their extracts were prepared. Finally, the extracts were dispensed into multi-well plates and stored at -30°C. In this project, we isolated and stored 1,767 marine microbes and prepared 1,137 extracts from which 640 extracts were dispensed into eight 96-well plates and distributed to researchers on request.

The most prominent feature of this library is that it includes many mid-size molecules, which have recently attracted much attention as drug candidates. Another feature of this library is that each extract includes a variety of compounds, enabling us to screen many compounds efficiently even if the number of the compounds in the library is limited. This library can thus be applied to relatively low throughput screening systems and is useful for researchers in academia who have difficulty in establishing sophisticated high throughput screening systems. This library may eliminate impediments to drug screening and provide user-friendly drug discovery systems to researchers. One drawback of this library is that it takes much time and effort for the purification and identification of the active compounds from hit extracts. However, we have established a comprehensive drug discovery system that could increase the efficiency for the purification and identification of the active compounds, through which we have supported many research themes seamlessly by providing the library in this project.

In this project, we have supported 30 drug discovery themes using the NU-MME library. Among them, primary hit extracts were identified in 22 themes, and the responsible active compounds have been purified and identified in 6 themes as follows; “Search for compounds against periodontal disease bacteria”, “Discovery and development of preventive medicine for dental caries”, “Screening for anti-cancer drugs using a disruption of protein complexes as an indicator”, “Search for compounds against severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus”, “Discovery and development of drugs for pulmonary fibrosis”, and “Discovery and development of drugs for Chagas disease, also known as American trypanosomiasis”.

To develop and support mid-size molecule drug discovery using the NU-MME library, we would like to further develop the technology and improve the efficiency in the purification and identification of active compounds from hit extracts, as well as to expand and refine the library itself.