

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) 大戸 茂弘
(英語) Ohdo Shigehiro

補助事業担当者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 九州大学大学院薬学研究院・教授
(英語) Kyushu University, Graduate School of Pharmaceutical Science・Professor

II 補助事業の概要

九州大学では、患者に優しい創薬手法「エコファーマ」と地球環境に優しい合成技術「グリーンケミストリー」を融合した「グリーンファルマ」の方法・技術の支援と高度化を実施した。

スクリーニング支援では、本学で保有する既承認薬ライブラリーだけでなく、BINDS 内の連携で得られた東京大学創薬機構の化合物ライブラリー、北里大学の天然化合物ライブラリーそして長崎大学の海洋微生物エキス、さらには医薬基盤・健康・栄養研究所の薬用植物エキスライブラリーを利用することで、特に製薬企業では開発リスクが高すぎるもの、あるいは創薬ターゲットとするには早すぎる分子を研究対象とし、慢性疼痛、がん、心循環系の疾患、感染症等を克服できる新たな化合物を探索した。実際に学内においては医学研究院、歯学研究院、生体防御医学研究所および理学研究院、また学外研究機関には熊本大学、鹿児島大学、東京大学、群馬大学、新潟大学、山口大学、山口東京理科大学、自然科学研究機構生理学研究所など、学内外の研究者に対して 40 件のコンサルティングを通して、支援を実施した。本支援から国際誌への発表 (*Int. J. Cancer*, 2019, *Br. J. Pharmacol.*, 2019, *Scientific Reports*, 2020, *Org. Lett.*, 2020, *Cells*, 2021, *Pancreatology*, 2021, *BBRC.*, 2022, など)、特許出願さらには企業導出に成功した。

ヒット化合物の最適化に関しては、既存薬から新薬を創出するプログラム (エコファーマ) を中心に、これまでに 12 件の合成支援を行った。対象となる疾患は、癌が 3 件と最も多いが、その他に、痛み、感染症、循環器、中枢神経疾患など多岐にわたる。ドラッグリポジショニング研究における特筆すべき成果として、ミトコンドリア分裂阻害作用を持つ既承認薬であるシルニジピンのジヒドロピリジン骨格を保持しつつカルシウム拮抗作用を減弱させた誘導体を合成し、強いミトコンドリア分裂阻害作用を持つ化合物群を得ることに成功した (*Science Signal.*, 2018)。本成果について類縁体を合成後に物質特許を取得 (特願 2019-103034) した。九大独自の反応

性フラグメント化合物からなるライブラリーの構築を行った。これまでに 500 種類程度のライブラリーを構築し、数値目標の 80% 程度を達成した。グリーンファルマ研究の柱の一つである地球環境に優しい合成技術である「グリーンケミストリー」の高度化を目的とした合成技術の高度化に関しても、嵩高い置換基を有する非天然 α アミノ酸合成法の開発 (*J. Am. Chem. Soc.*, 2020, *Nature Synth.*, 2022) などに成功し、様々な特殊アミノ酸ライブラリーの構築に成功した。コバレントドラッグ開発については、標的タンパク質特異性に優れた新しいシステイン反応基として α -クロロフルオロアセタミド (CFA) やビスクロブタンアミド(BCB-amide)などを見出すことに成功した(*Nature Chem. Biol.*, 2019, *J. Am. Chem. Soc.*, 2020)。糖鎖の創薬利用を志向し、代謝されない糖鎖アナログ合成のための方法論開発にも取り組み合成法の開拓および生物活性の評価を進めた (*Org. Lett.*, 2021, *JACS Au*, 2021)。

慢性疼痛・搔痒疾患モデルを用いた薬効評価支援について、必要な投与量・期間、投与経路に関する打ち合わせを行った後、神経障害性疼痛モデルやアトピー性皮膚炎モデルを用いた支援を実施した。その結果、モルヒネに抵抗性示すアロディニア (触刺激で起こる痛み) の評価系で有効性が認められた化合物を得ることに成功し、同化合物が難治性慢性疼痛治療につながる可能性が示唆された。また、X 受容体アゴニストとして特定された薬物の行動評価を行い、同薬物によって痒み行動が誘発することを見だし、新しい搔痒モデルとなる可能性を示した。

慢性疼痛モデルの高度化を以下の通り行い複数の新規モデルを確立した。神経障害性疼痛の主症状であるアロディニアは、触刺激で誘発される痛みであるため、オプトジェネティクス法を利用して触覚情報伝達神経の A β 線維を選択的に刺激する評価系を確立した。本モデルの特記すべき点は、モルヒネが無効であることであり臨床でのエビデンスと一致することである (*eNeuro*, 2018)。さらに、同モデルを用いて神経障害性 A β 線維由来アロディニアに重要な脊髄後角神経の新しいサブセット (ニューロペプチド Y プロモーター (NpyP) で制御される神経) を発見し、同サブセットの活動を抑制するだけで A β 線維性アロディニアを発症するという結果を得た。したがって、同サブセットの活動抑制ラットは新しい疼痛モデルとなる (*PNAS*, 2021)。さらに、神経だけでなく、脊髄後角表層に存在する新しいアストロサイトサブセット (Hes5 陽性アストロサイト) の刺激による新しい疼痛評価モデルも開発した (*Nat Neurosci*, 2020) (群馬大学・畑田出穂教授のバイオリジカルシーズ探索ユニット「次世代型疾患モデル動物作出」との連携)。

西田グループは、熊本大学、京都大学、大阪大学、東京大学、国立循環器病センター、自然科学研究機構生命創成探究センター、タイ Mahidol 大学、英国 Queen Mary 大学、韓国 Dongguk 大学からの依頼を受入れ、in vivo 薬効評価支援を行った。具体的には、病的な心臓リモデリングを仲介するタンパク質間相互作用を標的とする独自のドラッグ・リポジショニング (エコファーマ) 研究を展開し、以下の結果を得ました。1) ジヒドロピリジン誘導体 Ca^{2+} チャネル阻害薬 (降圧薬) のシルニジピンが、Drp1-フィラミン複合体形成を阻害することで、慢性心不全や他の難治性疾患の主な原因となるミトコンドリア過剰分裂を抑制することを見出した (*Science Signal.*, 2018)。2) ホスホジエステラーゼ阻害薬 (抗喘息薬) のイブジラストが、TRPC3-Nox2 複合体形成を阻害することで、抗がん剤投与や COVID-19 で起こる酸化ストレスと心毒性を軽減しうることをマウスで実証した (*JCI insight*, 2017; *Br J Pharmacol.*, 2019; *bioRxiv.*, 2021)。3) 求電子性イソチオシアネートを含む機能性食品成分スルフォラファンが、プリン作動性 P2Y6R 受容体の Cys-SH とコバレントに結合し、P2Y6R の内在化と分解を通じて P2Y6R-AT1R 複合体形成を妨害することにより、抗炎症と加齢性高血圧の予防をもたらすことを見出した (*Science Signal.*, 2022)。その他、共同研究成果として、抗がん剤誘発性心毒性を阻害する抗酸化ペプチド製剤 (HSA-Trx)、末梢循環障害の改善に働く TRPC6 阻害薬の同定にも貢献した (*Pharmaceutics*, 2022)。

本学の支援の特色の一つである概日(生体)リズムに着目した時間創薬研究 (クロノ創薬) により、体内時計の側面より難治性乳癌の癌幹細胞の性質、腫瘍免疫の新たな機構、また慢性腎臓病に関する様々な病態を明らかにした。これら支援成果は *Cancer Res*, *eLife*, *Nature Commun*, *Mol Cancer Res* などの国際誌で報告された。ま

た支援の成果を高度化して、難治性乳癌、腫瘍免疫、また慢性腎臓病に関する様々な病態に対する新機能治療薬の探索と同等につながり、これらの成果の多くは特許出願や共同研究に至った。また、生体リズムを調節する医療機器の開発を支援し、ベンチャー企業の設立に至り、産学連携を促進する成果に至った。

薬物治療の個別化は主に血中薬物濃度をモニターすることをベースに行われてきた。そのため、医薬品の投与量は薬物動態の個人差に基づいて調節されている。しかしながら、薬物の吸収・分布・代謝・排泄の各過程は24時間周期の概日変動を示すため、薬物の体内動態は投薬時刻によっても変化する。本研究の成果によって、ヒトの細胞内において様々な薬物輸送トランスポーターや代謝酵素の発現が概日変動を示すことを明らかにした (*Sci Rep*, 2018, 2020; *J Biol Chem*, 2021)。また、既存薬のスクリーニングによって、スルファサラジンは髄腔内投与によって脊髄内の SGK-1 活性を阻害し、神経障害性疼痛を緩和できることを見出したが、本剤を経口投与した場合は薬物排泄型のトランスポーターである BCRP によって吸収や脊髄移行が妨げられるため効果を発揮できなかった。しかし、BCRP の輸送活性を阻害できるフェブキシソスタットを併用することにより、スルファサラジンの吸収と脊髄移行性が改善し、有意な疼痛緩和効果が認められた (*Biochem Pharmacol*, 2021)。このことから、複数の既存薬を併用することで単剤では期待できなかった効果の発現や投与経路の簡便化が可能になることが示唆された。

「タンパク質との相互作用技術の高度化」グループは、膜タンパク質をターゲットとして、創薬に連結する相互作用解析技術の開発を実施している。抗菌薬のターゲットの一つである大腸菌由来の膜タンパク質 MsbA をベルトタンパク質である MSP1D1 を用いてナノディスクに包埋し、均一な MsbA ナノディスクの調製条件の取得を確認した。東京大学津本教授との拠点間連携により、膜蛋白質 (MsbA) を表面プラズモン共鳴 (SPR) チップに固定し、津本研究室所有の 352 個の低分子ライブラリーを用いて阻害剤のスクリーニングを実施した。化合物の濃度変動に伴う MsbA 包埋ナノディスクへの結合量を評価し、3つの候補化合物を選別した。それら3つの候補化合物を用いて、MsbA 包埋ナノディスクを用いた ATPase 阻害実験を行ない、カエリスメンテンプロット ($v \sim [s]$ プロット) による阻害様式の解析を行ったところ、1つの化合物が競合的に MsbA の ATPase 活性を阻害しているという結果を得た (*bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2021.06.15.448612>)。また、痛みの標的化合物であるヒト P2X4 受容体の細胞外ドメインを3量体で得ることに成功した。

SARS-CoV-2 ウイルス表面 Spike (S) タンパク質を模倣する人工三量体 S タンパク質 (S 抗原) をアラムアジュバンドを用いてマウスに複数回免疫したところ、抗血清の中に新型コロナウイルスが細胞に侵入することを防ぐ抗体が産生していることがわかった (*Frontiers in Immunology*, 2022)

ケミカルシーズ・リード探索ユニットの東京大学津本浩平教授の研究室にある表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置にて、膜タンパク質と低分子化合物の相互作用解析を連携して実施した。東京大学津本研究室との拠点間共同研究により、MsbA 包埋ナノディスクを SPR チップに固定する至適条件を検討した後、津本研究室所有の 352 個の低分子ライブラリーからスクリーニングを実施した結果、3つのヒット化合物が得られた。その中の1つはミカエリスメンテンプロットにおいて、MsbA の ATPase 活性を阻害することを示した (*bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2021.06.15.448612>)。

At Kyushu University, we supported and advanced the method and technology of “Green Pharma”, a novel approach merging the concepts of “Eco Pharma” seeking new effects of existing drugs, and “Green chemistry” aiming at the development of eco-friendly pharmaceuticals.

In drug screening support, we hoped to discover drugs to overcome chronic pain, itch, cardiovascular disease, cancer, and infectious diseases using not only the library of approved drugs, but also various other compound libraries provided by BINDS. After discussing 40 research projects, we have successfully published papers (Int. J. Cancer, 2019, Br. J. Pharmacol., 2019, Scientific Reports, 2020, Org. Lett., 2020, Cells, 2021, Pancreatology, 2021, BBRC., 2022, etc.), applied for patents, and out-licensed to companies.

Regarding the optimization of hit compounds, we have provided synthetic support in 12 instances. A notable achievement in drug repositioning research was the development of cilnidipine derivatives that attenuate calcium antagonism while retaining their mitochondrial division inhibitory activities (Science Signal., 2018). We constructed a compound library consisting of 500 different reactive fragment derivatives for covalent drug discovery. Regarding the sophistication of synthetic technology based on “green chemistry” approach, we have established new synthetic methods for the preparation of unnatural α -amino acids with bulky substituents (J. Am. Chem. Soc., 2020, Nature Synth., 2022). Regarding the development of covalent drugs, we have found new cysteine reactive warheads based on α -chlorofluoroacetamide (CFA) and bicyclobutane amide (BCBamide) moieties (Nature Chem. Biol., 2019, J. Am. Chem. Soc., 2020). For the development of sugar-based drugs, we have established new synthetic routes to prepare metabolism-resistant sugar chain analogs (Org. Lett., 2021, JACS Au, 2021).

Regarding the support for evaluating the pharmacological effect of drugs in vivo, after discussion of the dose, period, and administration route of testing drugs, we evaluated the effect of drugs on nerve injury-induced chronic pain and atopic dermatitis-induced chronic itch. We successfully obtained one compound that suppressed neuropathic allodynia (pain caused by tactile stimuli) that is known to be resistant to morphine, suggesting that this compound may be effective for treating intractable chronic pain. We also found that a drug that has an agonistic effect on the receptor X inducing scratching behavior.

We have established a new model for evaluating neuropathic allodynia by showing an optogenetic stimulation of primary afferent A β fibers producing pain-like behavior in rats with nerve injury. Notably, this pain behavior was ineffective to morphine (eNeuro, 2018). Using this model, we identified a subset of dorsal horn neurons that is important for the A β fiber-derived neuropathic allodynia (PNAS, 2021). Interestingly, inhibiting activity of this subset was sufficient to produce allodynia (PNAS, 2021), suggesting that this could be useful as a model of allodynia. Furthermore, we have also developed a new model of pain in mice (an astrocyte subset (Hes5-positive astrocytes) in the spinal dorsal horn is stimulated (Nat Neurosci, 2020): collaboration with Prof. Izuho Hatada (Gunma University)).

Nishida's group has developed an original drug repositioning (Eco-pharma) approach targeting protein-protein interactions that mediate pathological cardiac remodeling, and obtained the following results: 1) cilnidipine, a dihydropyridine-derivative Ca²⁺ channel blocker (anti-hypertensive drug), inhibits Drp1-filamin complex formation-mediated mitochondrial hyperfission that is a major cause of chronic heart failure and other intractable diseases. 2) ibudilast, a phosphodiesterase inhibitor (anti-asthma drug), inhibits TRPC3-Nox2 complex formation-mediated oxidative stress and cardiotoxicity caused by anti-cancer drug and COVID-19. 3) Sulforaphane, an electrophilic isothiocyanate-containing functional food ingredient, targets Cys-SH of pro-purinergic P2Y6R receptor, leading to anti-inflammation and prevention of age-dependent hypertension by disrupting P2Y6R-AT1R complex formation through P2Y6R internalization and degradation.

Through time-based drug discovery research (chrono-drug discovery) focusing on circadian (biological) rhythms, which is one of the features of BINDS's support at Kyushu University, the function of cancer stem cells in triple negative breast cancer, new mechanisms of tumor immunity, and various pathological conditions related to chronic kidney disease (CKD) were clarified based on the circadian clock machinery. These supported results were reported in international journals such as *Cancer Res*, *eLife*, *Nature Commun*, and *Mol Cancer Res*. The results of these support have also led to the discovery and identification of new functional therapeutic compounds for various pathological conditions related to refractory breast cancer, tumor immunity, and chronic kidney disease. These compounds have resulted in patent applications and collaborative research. In addition, we supported the development of medical devices that regulate biological rhythms, leading to the establishment of a venture company and promoting industry-academia collaboration.

The individualization of pharmacotherapy has been mainly achieved by monitoring the drug concentration. Consequently, dosage adjustment of medicines has been based on interindividual differences in drug pharmacokinetics; however, intraindividual as well as interindividual variability should be considered for further improving rational pharmacotherapy because the pharmacokinetics of many drugs also vary, depending on the rhythm of absorption, distribution, metabolism, and elimination. The present study demonstrated diurnal expression of several xenobiotic transporters and drug metabolism enzymes in human renal cells and hepatocytes, which underlies the dosing time-dependent differences in drug disposition (Sci Rep, 2018, 2020; J Biol Chem, 2021). By screening a clinically approved drug library, we also found that sulfasalazine (SSZ) has preventive action on neuropathic pain through inhibiting SGK-1 activity in the spinal cord. However, no significant anti-neuropathic pain effects of SSZ were detected after oral administration due to its low bioavailability, which were associated with efflux by the xenobiotic transporter BCRP. Concomitant oral administration of SSZ with febuxostat (FBX), which is an approved drug to inhibit BCRP, improved the distribution of SSZ to the spinal cord. The concomitant oral administration with FBX also increased the anti-neuropathic pain effects of SSZ (Biochem Pharmacol, 2021).

The group in charge of the "Sophisticated technologies in protein interaction analysis" is focused on the development of technological solutions for interaction analysis in drug discovery involving membrane proteins. MsbA is a model membrane protein from the bacterium *Escherichia coli*, and a target to develop innovative antibacterial compounds. The key technological advance was the preparation of MsbA in a lipid nano-environment termed nanodiscs, significantly stabilizing the protein, which was then subjected to a compound screening using a biophysical approach in collaboration with Prof. Tsumoto of the University of Tokyo, identifying three candidate compounds. Inhibition assays showed one of these compounds competitively inhibited the activity of MsbA (bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2021.06.15.448612>).

Immunization of mice with a recombinant trimetric protein corresponding to the surface spike protein (S-protein) of the virus SARS-CoV-2 was carried out using Alum Adjuvant. The immunization resulted in antiserum containing anti-S-protein neutralizing antibodies (antibodies that prevented SARS-CoV-2 from entering human cells) (Frontiers in Immunology, 2022).