

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）津本 浩平

（英語）Kouhei TSUMOTO

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：

（日本語）国立大学法人東京大学・大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻・教授

（英語）Department of Bioengineering, School of Engineering, The University of Tokyo

II 補助事業の概要

（支援の成果）

物理化学的相互作用解析から、ケミカルシーズ・リード探索ユニットライブラリー・スクリーニング領域および構造展開領域、インシリコユニットへの橋渡し支援を行うために、信頼性の高いスクリーニングを目指した標的分子の物理化学評価支援、構造解析を目指したバリデーション支援、合理的リード設計を目指した物理化学的解析支援を行い、支援拠点（Biophysical-QA ハブポート）の構築を目指した。具体的な支援成果として、事業期間において41件（学内28件、外部18件、企業4件）の支援を実施し、19報の論文を発表することができた。以下に主な支援成果の概要を記す。

（主な成果その1）創薬等支援技術基盤プラットフォーム PDIS からの支援において、臨床サンプルにおける変異型 RET キナーゼの薬効評価において、DSF による RET キナーゼの熱安定性解析から薬剤に対する作用の変化を議論することに成功した（Nature Commun. 2018, 9, 625 に掲載）。

（主な成果その2）マラリア感染やがん標的として近年注目されているセリン代謝酵素（SHMT）に対する低分子阻害剤スクリーニングより選抜された化合物2種類に対して、それぞれエンタルピー駆動型とエントロピー駆動型のヒット化合物であることを明らかにした。この結果は、SHMT に対して、化合物が特異的な相互作用様式をもって結合していることを示している。構築した物理化学的解析技術によるカウンターアッセイ、ヒットバリデーションでの支援が有効に活用できた成果の1つである（Nature Commun. 2019, 10, 867 に掲載）。さらに本支援は、構造解析ユニットとの連携にもつながり、ヒット化合物の複合体構造を取得することに成功した（iScience 2021, 24, 102036 に掲載）。

(主な成果その3) HSP90 アイソフォーム選択的な阻害剤として現在フェーズ III に進んでいる低分子医薬品 TAS-116 の選択性創出メカニズムを明らかにするために、物理化的評価を行った。その結果、HSP90 α/β の第3ポケットと呼ばれる部位に、エンタルピー駆動型で結合できるフラグメント化合物が見出された。このフラグメントは低親和性にも関わらず、アイソフォーム選択性を示した。さらに HSP90 と TAS-116 に関するインシリコ解析より、TAS-116 固有の蛋白質に対する構造誘起を示すことに成功し、熱力学的解析をサポートする知見を得ることができた。このように、熱力学的特性が TAS-116 の特異的薬効を示す効果であることが見出された。以上は、創薬過程 (Hit to lead) における変遷、目指すべき方向性など、これまでである意味で経験則・感覚的に行っていた選択を、熱力学パラメータという定量的かつ可視化できることを明らかにした成果であり、産学連携の強化につながるものである (J. Med. Chem. 2021, 64, 2669-2677 に掲載)。

(主な成果その4) 環状ペプチド医薬品であるダルババンシンと血漿タンパク質であるヒト血清アルブミン HSA の複合体結晶構造を解明し、ITC 法などを駆使してその相互作用様式を精密に明らかにした。医薬品開発において薬剤の体内動態は切り離せない評価項目である。特に HSA と薬剤との複合体は常に付きまとう会合である。本研究より明らかになった相互作用に基づく環状ペプチドの設計などが期待される (J. Med. Chem., 2021, 63, 14045-14053 に掲載)。

(主な成果その5) 代謝産物のバランスをコントロールするセンサー分子 CtBP2 の代謝調節を物理化学的解析技術から明らかにし、メタボリックシンドロームの新しい治療法開発への可能性を見出した。(Nat Commun. 2021, 12, 6315 に掲載)。

(主な成果その6) 病原菌が宿主の体内で生き残っていくために利用するヘム濃度センサータンパク質のシステムへの理解を物理化学的解析技術から明らかにし、このシステムをターゲットにした新たな抗菌剤開発に貢献できることを見出した。(Commun Biol. 2021, 4, 467 に掲載)。

(主な成果その7) エピジェネティック変化に関する DNA メチル化制御因子 UHRF1 に対する阻害剤探索において、フラグメントレベルの化合物が標的分子の酵素ポケットに結合し、蛋白質の熱安定性を向上させ、エンタルピー駆動型の結合様式を有する有望なヒット化合物を取得することに成功した (Bioorg Med Chem. 2021, 52, 116500 に掲載)。

(主な成果その8) 成長因子受容体に関する非リガンド型受容体二量体制御に関する研究においては、受容体の異常な活性化およびシグナル伝達を抑制するアプタマーが二量体の形成を特異的に阻害することを物理化学的解析より明らかにした (JACS Au. 2021, 1, 578-585 に掲載)。

(主な成果その9) 細胞内のタンパク質間相互作用 (PPI) を阻害剤する新規なモダリティ開発のために、ペプチドと呼ばれるオリゴ (N-置換グリシン) (オリゴ NSG)、およびその骨格を剛直化するためのオリゴ (N-置換アラニン) (オリゴ NSA) に着目した分子動力学計算を行った。その結果、オリゴ NSA は剛直な構造をしているため、骨格の形状を維持したまま、各 N-置換基を独立して最適化し、結合親和性と膜透過性を向上させることが可能であることが見出された (Chem Sci. 2021, 12, 13292-13300、Angew Chem Int Ed Engl. 2022, 61, e202200119 に掲載)。

この他にも、本支援では新たな機能性リガンドの創出へつながる標的タンパク質の機能解析および創薬に展開可能な分子メカニズムの解明にも成功し、それぞれ論文として発表した (J Phys Chem B. 2022, 126, 1004-1015、Commun Biol. 2021, 4, 1093、Commun Biol. 2021, 4, 467 等に掲載)。

(高度化の成果)

我々は、分子標的創薬におけるリード創出を目指して、in vitro の物理化学的相互作用パラメータによる in cell や in silico での化合物活性を評価し、Hit to Lead や構造最適化における物理化学的解析の拡張とその品質評価技術を開発することを目指してきた。さらに低分子化合物では undruggable と言われている蛋白質-蛋白質間相互作用

用 PPI に対する低分子制御剤の探索および開発に物理化学的アプローチを適応させることを試みた。以下の主な成果を記す。

(成果その 1) 細胞接着因子の 1 つである P-cadherin は、複数種の癌細胞にて高発現しており、増殖や転移に深く関与していることで標的分子の有望な候補として注目されている。物理化学スクリーニングとして SPR を採用することで、新規なホモダイマー阻害剤探索技術の開発に成功し、さらにカウンターアッセイとして濃度依存性を確認することにより、フラグメントライブラリーから P-cadherin ホモダイマーを阻害する低分子化合物を取得した。得られたヒット候補化合物は、E-cadherin と N-cadherin を用いた選択性を評価することにより、P-cadherin のみ結合活性を示すヒット化合物の選抜に成功した (Chem. Commun. 2018, 54, 5350-5353 に掲載)。さらにリガンド設計の多様性をもたせるために、東大創薬機構 DDI のフラグメントライブラリーでもスクリーニングも行った。その結果、細胞アッセイでの阻害活性と E-cadherin との選択性を有する 1 つのヒット化合物を取得することにも成功した。得られた化合物は構造解析ユニットと連携し、X 結晶構造解析へと進めた。その結果、化合物と P-cadherin との共結晶構造情報を得ることに成功した。P-cadherin ホモダイマー阻害剤の探索においては、SPR を活用して速度論的なアプローチから PPI を阻害できる可能性を見出した。このアプローチでは、低親和性にも関わらず、細胞レベルで PPI を阻害できる活性を示すことが明らかとなった。この技術を活用して、ヒット化合物からの構造展開から、さらに阻害活性の高い化合物を設計することにも成功した (Commun Biol. 2021, 4, 1041 に掲載)。

(成果その 2) がん関連/パーキンソン病関連/ミトコンドリア病関連蛋白質に対するヒット化合物の阻害活性と物理化学的パラメータとの相互関係を精査し、特に阻害活性における熱力学パラメータ (結合エンタルピー、結合エントロピー) の寄与について指針を提案することを目標とした。結果としてパーキンソン病/ミトコンドリア病関連蛋白質 DJ-1 に対する、エンタルピー駆動型の低分子阻害剤を取得した (ACS Chem. Biol., 13, 2783-2793, 2018)。

(成果その 3) 乳がんにおいて特異的に観察される PPI に対する阻害剤探索を行った。DDI のフォーカスライブラリーを用いてスクリーニングを実施し、構築した物理化学的アッセイ方法よりヒット化合物が同定された。これらのヒット化合物は、試験管内だけでなく乳がん細胞株においても当該 PPI を阻害することが示された。同化合物濃度では正常な乳腺細胞株に対する細胞傷害活性は極めて低く、乳がんモデルマウスに対する投与実験でも大きな有害事象を伴うことなく乳がん細胞塊の縮小・消失が認められたことから、2 種の化合物は当該 PPI の阻害を通じた乳がん特異的な抗増殖活性をもつことが示唆された。これらのヒット化合物を起点に、構造展開ユニットとの連携よりさらに高い阻害活性を示す化合物の探索を行った。その結果、モデル乳がん細胞による阻害アッセイにおいて nM レベルの阻害活性が確認された。本高度化は、BINDS 重点項目である“質の向上”、“創薬を意識した明確な目標の設定”、“各ユニット間連携”が融合した、極めて重要な成果である。

(成果その 4) 化膿レンサ球菌の感染は急性リンパ管炎のような重篤な疾患を引き起こす。宿主感染経路のような選択圧の低い標的を選ぶことで耐性菌の出現リスクを抑えた新規抗菌剤の取得を期待し、鉄獲得機構の最初のステップとなる PPI を阻害する薬剤の探索を行った。SPR 法より阻害活性を示すヒット化合物を選抜した。その結果マウスに対する化膿レンサ球菌の感染が、ヒット化合物によって抑えられることが確かめられた。癌疾患と共に、感染症に対してもフラグメント化合物のような低親和性ヒット化合物でも、物理化学的なアプローチから in vivo でも十分な薬効を示す低分子化合物の取得が可能であることが示された重要な成果である。

(成果その 5) 高活性を示す阻害剤の構造最適化とその物理化学的パラメータとの相互関係を精査し、特に阻害活性における速度論パラメータ (会合速度定数、解離速度定数) の寄与についての指針を提案することを目標としていた。その結果、膜蛋白質 GPCR に対するアゴニストとアンタゴニストにおいて、速度定数が異なる可能性が示唆された。さらに蛋白質のダイナミクスを計算科学から明らかにし、リガンド活性との相関関係を明らかにすることを試みた。その結果、GPCR のリガンド活性は、脂質二重膜の流動性に影響を受けることが分かり、流動性の低い脂質二重膜よりも、適度に流動性のある脂質二重膜の方が GPCR のリガンド活性が高いことが示さ

れた (Biochemistry, 2019, 58, 504-508 に掲載)。この流動性は分子動力学計算 MD でも再現することができ、今後のシミュレーションにおける分子状態や分子環境に対応した物理化学的パラメータに関する議論や、計算科学によるリガンド設計につながると考えられる。

(成果その6) 新興感染症 (特に COVID-19) に対する候補薬剤の物理化学的解析を実施した。本事業で整備された分析機器を活用し、標的分子と候補薬剤間の結合に関する結合親和性、相互作用様式、構造安定性、フォールディング状態、分子ダイナミクスについて、作用機序に関する多角的な相互作用パラメータを取得した。また SARS-CoV-2 由来プロテアーゼ Mpro に関するミリ秒レベルの分子動力学計算を実施した。その結果、変異型 P108S はプロテアーゼの触媒部位のダイナミクスとの関連を示唆するものであった。P108S では、触媒部位が基質に対してかなりアクセスしにくくなっていた。この結果は、実験的手法や、静的な結晶構造に基づいて変異の影響を予測するタンパク質設計計算などの他の計算手法を補完する、分子動力学シミュレーションの可能性を示すものでもあった (Biophys Physicobiol. 2021, 18, 215-222 に掲載)。

標的タンパク質の機能制御によるライフサイエンスの発展、さらには診断・予防・治療に至る医療応用に対する社会的意義は大きい。そのためには多様な標的タンパク質を特異的にコントロールできる制御分子の設計が不可欠である。そのために最適なモダリティは、低分子に留まらず、中分子から抗体等の高分子と多岐にわたる。さらにはその機能制御分子が示す戦略も様々である。これら創薬モダリティの各 POC を確固たるものにするためには、標的タンパク質に対する機能制御分子の特異性の担保は極めて重要な位置づけにあると考えられる。我々は、本事業において、物理化学的解析手法を駆使して低分子スクリーニングに関する技術開発、低分子化合物と標的タンパク質間の結合における特異性評価のための相互作用様式の物理化学的な精密解析、そしてこれらの技術を基盤として低分子化合物のヒット確定やリード創出への橋渡し等に関する支援を行ってきた (Yakugaku Zasshi. 2018;138(8):1033-1041 に掲載)。その結果、物理化学的解析が標的タンパク質に対する低分子化合物の特異性/非特異性に関して重要な知見を与えることを立証した。本支援体制は、唯一、医薬品開発およびライフサイエンス研究に関する精密な *in vitro* 評価が可能な、国内のモダリティを加速させる物理化学プラットフォームとしての役割を果たすことが期待できる。

(Outcome of the support)

To provide supports for bridging physicochemical interaction analysis to the Library and Screening area and Structure development area of the Chemical Seeds Lead Discovery Unit, and *in silico* unit, we have provide following supports to establish Biophysical-QA hub port; physicochemical evaluation supports for target molecules aimed at reliable screening, validation supports for structure analysis, and supports for physicochemical analysis aimed at rational lead design. As specific results, 41 projects (28 intramural, 18 external, and 4 corporate projects) were supported during the project period, and 19 papers were successfully published. Following is the summary of the representative projects of the supports.

(Major outcome #1) In the drug efficacy evaluation of mutant RET kinase in clinical samples, we succeeded in discussing the change in the drug's action based on the thermal stability analysis of RET kinase using DSF (published in Nature Commun. 2018, 9, 625).

(Major outcome #2) We found that two enthalpy-driven and entropy-driven compounds selected from a small molecule screening against serine metabolizing enzyme (SHMT), which has recently attracted attention as a malaria infection and cancer target hits. The result indicates that the compounds bind to SHMT with a specific mode of interaction (published in Nature Commun. 2019, 10, 867). Furthermore, this assistance also led to

collaboration with the Structural Analysis Unit, which succeeded in obtaining the complex structure of the hit compound (published in *iScience* 2021, 24, 102036).

(Major outcome #3) To clarify the mechanism of selectivity creation of TAS-116, a small molecule drug currently in Phase III as a selective inhibitor of HSP90 isoforms, physicochemical evaluation was conducted using ITC. As a result, we found a fragment compound that can bind to the site called the third pocket of HSP90 α/β with enthalpy-driven manner. Thus, thermodynamic properties were revealed to be the specific drug effect of TAS-116 (published in *J. Med. Chem.* 2021, 64, 2669-2677).

(Major outcome #4) We have revealed the metabolic regulation of CtBP2, a sensor molecule that controls the balance of metabolites, using physicochemical analysis techniques using DSF, and have identified the possibility of developing a new treatment for metabolic syndrome. (published in *Nat Commun.* 2021, 12, 6315).

(Outcome of the advancement)

We have aimed to evaluate compound activity in cells and in silico by in vitro physicochemical interaction parameters for lead generation in molecular targeted drug discovery. We have also aimed to extend the physicochemical analysis in Hit to Lead and structural optimization, and to develop quality assessment techniques. We have attempted to apply physicochemical approaches to discovering and developing small molecule modulators of protein-protein interactions (PPIs), which have been considered undruggable in small molecule compounds. The representative projects are as follows.

(Major outcome #1) P-cadherin, a cell adhesion factor, is highly expressed in several cancer cells and has been attracting attention as a promising candidate target molecule, because it is involved in proliferation and metastasis. By using SPR as a physicochemical screening method, we succeeded in developing a novel homodimer inhibitor discovery technique, and by confirming concentration dependence as a counter assay, we obtained small molecule compounds that inhibit P-cadherin homo-dimerization from a fragment library (published in *Chem. Commun.* 2018, 54, 5350-5353). Furthermore, we succeeded in obtaining a one-hit compound with inhibitory activity in cellular assays and selectivity for E-cadherin. X-crystal structure analysis using the target protein and the compound has been performed in collaboration with the Structural Analysis Unit. As a result, we succeeded in obtaining co-crystal structure of the compound and P-cadherin. In the search for P-cadherin homodimer inhibitors, we found the possibility of inhibiting PPI from a kinetic approach utilizing SPR (published in *Commun Biol.* 2021, 4, 1041).

(Major outcome #2) We investigated the interrelationships between physicochemical parameters and inhibitory activity of hit compounds against a cancer-related/Parkinson's disease-related/mitochondrial disease-related protein DJ-1, focusing on the thermodynamic parameters (binding enthalpy and binding entropy) for the inhibitory activity. As a result, we obtained enthalpy-driven small molecule inhibitors for DJ-1 (published in *ACS Chem. Biol.*, 13, 2783-2793, 2018).

(Major outcome #3) We searched PPI inhibitors specifically observed in breast cancer, and hit compounds were identified through screening with DDI's focused library and a constructed physicochemical assay method. These hit compounds were shown to inhibit the PPI in vitro as well as in breast cancer cell lines. The two compounds were shown to have breast cancer-specific anti-proliferative activity through inhibition of the PPI, since they showed low cytotoxic activity against normal mammary cell lines at the same compound concentrations and showed reduction and disappearance of breast cancer cell without major adverse events when administered to a mouse model of breast cancer. The two compounds were suggested to have breast cancer-specific anti-proliferative activity through inhibition of the PPI. Using these hit compounds as a starting point, we searched for compounds that exhibit even higher inhibitory activity than in conjunction with the structure expansion unit. As a

result, inhibition activity at the nM level was confirmed using model breast cancer cells in an inhibition assay. This advancement is a significant achievement, namely a fusion of three BINDS priority items: 1) improvement of quality, 2) setting clear goals with an awareness of drug discovery, and 3) collaboration among the units.

The social significance of the development of life science through the functional regulation of target proteins, as well as for medical applications ranging from diagnosis, prevention, and treatment, would be emphasized. For this purpose, it is essential to design regulatory molecules that can specifically control a variety of target proteins. The optimal modality for this purpose is not only small molecules, but also a wide range of molecules, from medium-sized molecules to macromolecules such as antibodies. Furthermore, the strategies which these functional control molecules exhibits are also varied. To establish the POC of each of these drug discovery modalities, it is considered important to ensure the specificity of the functional control molecules to the target protein. In this project, we have been supporting the development of small molecule screening technologies using physicochemical analysis methods, precise physicochemical analysis of interaction patterns to evaluate the specificity of binding between small molecule compounds and target proteins, and the establishment of small molecule compounds as hits and the creation of leads based on these technologies. (published in *Yakugaku Zasshi*. 2018;138(8):1033-1041). As a result, this support system has provided important insights into the specificity/nonspecificity of small-molecule compounds for target proteins. Our methodology developed in this project is the only one that allows precise in vitro evaluation of drug development and life science research, and is expected to serve as a physicochemical platform for accelerating domestic modalities for accurate in vitro evaluation for drug development and life science research.