

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）山本雅之
（英語）Masayuki Yamamoto

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立大学法人東北大学 大学院医学系研究科 教授
（英語）Tohoku University, Graduate School of Medicine, Professor

II 補助事業の概要

本事業の前身である、最先端研究基盤事業「化合物ライブラリーを活用した創薬等最先端研究・教育基盤の整備」(2011年度)によりハイスループット・スクリーニング (HTS) 装置群を導入し、さらに、これらの装置の利用を一括管理・運営するシステムを構築して、研究者が化合物スクリーニングに参入しやすい環境を整えた。また、2012年度からの「創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業」において、東北大学薬学研究科の歴代合成化学者が構築、あるいは天然物化学者が単離・構造決定してきた化合物を結集し、7,000あまりの化合物からなる東北大学独自の「東北大学薬学研究科化合物ライブラリー」を樹立し、学内外の創薬シーズ探索研究に提供できる環境を整えた。本補助事業では、農学研究科や生命科学研究科などの東北大学内に散在している化合物を集約するとともに、それらの構造データをもとにライブラリーには不適切であると判明した化合物を削除し、ライブラリーの整備を行った。さらに、後述する高度化研究の成果として得られた新規骨格を有する化合物を加えて、より広いケミカルスペースを有する化合物ライブラリーとして充実させると共に、最終的には、すべての化合物について構造データを連結し、インシリコスクリーニング用に活用できるデータベースを備えた7,335化合物からなる化合物ライブラリーを構築し、創薬研究者に供与できる環境を整えた。依頼者の希望に応じて384-wellプレートまたは96-wellプレートに分注できる体制を整え、20課題に化合物を提供すると共に、クリーニング機器の使用に関する講習会を適時行った。東北大学ライブラリーはヒット率が高く、HTSを行った20課題中16課題でヒット化合物を得た。さらに、ヒットが得られた課題については、二次スクリーニングに供する化合物の追加供与や動物投与に十分な量の化合物を供与するなどの支援を適時行い、特許出願に至ったケースが1件あった。また、構造展開への橋渡し支援を5課題行った。一方、2020年度の追加予算で導入したハイエンドクライオ電子顕微鏡を設置し、東北メディカルメガバンク機構 (ToMMo) 内のスーパーコンピューター (スパコン) とアクセスして、データストレージサーバーに自動転送・保管するシステム、および外部ユーザーがスパコンにアクセスして構造解析できるシステムを構築した。また、電顕を操作できる研究者の育成を行うことで、外部利用者の受入体制を構築した。2021年9月にハイエンドクライオ電顕による支援開始をプレスリリースするとともに利用説明会を開催し、300名以上の参加者に本装置の紹介を行った。本事業期間中にコンサルテーションを含めて、12課題のクライオ電顕を用いた構造解析支援を行った。内訳として、4課題のクライオ電顕構造解析支援を行い、3.4Å や 1.9Å の高分解能で立体構造の決定に寄与し、6課題についてはクライオ電顕構造解析支援に向けての基礎実験を支援した。2課題についてはコンサルティングを開始し、今後の解析方針について討議した。その他、成果占有1件の構造解析支援を行った。クライオ電顕を用いた解析支援をさらに発展するために、ToMMo が有するゲノムデータ、メタボロームデータ、表現型を統合して、創薬のターゲットになり得るタンパク質と個別化創薬に関わる遺伝子・アミノ酸変異の選択を行うと共に、変異がタンパク質構造に与える効果について系統的解析を開始した。さらに東北大学発の創薬開発を目指した構造生命科学研究基盤の構築と推進を図るため、細胞内のタンパク質品質管理、金属イオン恒常性維持、ストレス応答に関わる種々の重要因子、さらには新規抗菌薬とリボソームの複合体等のハイエンドクライオ電顕による高分解能構造解析を開始した。

本事業では化合物合成技術の高度化を進め、天然資源の抽出物に対して直接、化合物の分子骨格を変化させる反応を行うことで得られる多様性拡大抽出物を利用して、ポリケチドとテルペノイドの骨格を併せ持つメロテルペノイド型化合物群を生み出す技術、非天然型モノテルペンインドールアルカロイド型化合物群を生み出す技術、新規ピアリアル型化合物群を生み出す技術、歪んだアザパラシクロファン骨格を有する天然物の合成法を開発し、他の手法では得ることのできない N,0-メチレンアセタール連結型ペプチドを持つ化合物やメロテルペノイド型化合物群、多様な新規非天然型骨格を有するインドールアルカロイド型化合物群を取得することを可能とした。また、これらの技術を用いて、スピロ環骨格を有する天然物骨格をもつ化合物、非天然型のアミノ酸を含有する環状ペプチド化合物、アザパラシクロファン骨格を有する天然物とその類縁体合成を行い、化合物ライブラリーに供与した。

評価解析系の高度化研究により、cAMP 発光をセンサーとした G タンパク質共役受容体活性化検出手法を構築し、企業導出した。さらに、イメージング質量顕微鏡 (iMScope) を用いた組織レベルでの代謝物イメージング検出手法技術を高度化し、グルタチオン (GSH) のイメージングに関する手法を特許出願し、企業に導出した。また、質量顕微鏡技術のさらなる改良により、GSH 合成に関連する代謝物の組織内局在を評価できる解析方法を確立し、薬剤による生体への影響をより高精度に評価できる方法を開発した。これらにより、リン脂質が脳内老化に関連するバイオマーカーとなりうることを明らかにした。また、腎性貧血治療薬として開発された転写因子 HIF 活性化剤の腎臓内分布を解析するイメージング質量分析技術を確立し、動物個体内の薬物動態を空間的に捉えることに成功した。現在、国内で5つの HIF 活性化剤が上市されているが、本手法を用いてそれらの体内動態について比較検討し、血中および尿中の濃度変化が薬剤によって大きく異なることを見出した。また、既存の HIF 活性化剤は細胞透過性が低い、エステル化によって透過性が向上することを明らかにした。その他、エリスロポエチン遺伝子の改変により慢性貧血病態を呈する腎性貧血病態モデルマウスを樹立した。これにより、健全な動物を用いての検討しかできなかったために効果評価が困難であった化合物の造血促進効果を鋭敏に評価できる系を確立することができた。この解析系を用いた共同研究を製薬会社3社と行った。さらに、iGONAD 法によるゲノム編集マウス樹立システムを確立し、難治性疾患の創薬研究に貢献できるヒト疾患モデル動物を、安価で短期間に供与できる体制を整えた。

また、オフターゲット効果が重篤化する場合があることから敬遠されがちである転写因子を標的とした創薬研究を進め、阻害剤や活性化剤の開発を試みた。その成果として、貧血治療薬として 2-OG 類似構造を保持しない HIF 活性化剤の開発に挑み、既出薬とは異なる作業機序で HIF 活性化効果を発揮する新規化合物を見いだした。この化合物を簡便かつ安価大量に誘導体を合成できる手法を確立し、物質および用途特許を出願すると共に、脂溶性を向上させることにより 50 倍程度も高い活性を有する誘導体の合成にも成功した。解糖系、脂質整合性系酵素遺伝子の発現を包括的に制御する転写因子 ChREBP を効果的に阻害し、糖尿病腎症モデルマウスの腎障害を軽減できる化合物の同定にも成功した。また、生体防御遺伝子群を制御する転写因子 NRF2 とその抑制に寄与する KEAP1 とのタンパク質間相互作用を解明した。NRF2 の活性化は、糖尿病、慢性腎臓病、アルツハイマー認知症、関節リウマチ、慢性閉塞性肺疾患などの種々の慢性疾患の病態改善薬として期待が高く、本成果は NRF2 と KEAP1 の相互作用部位を標的とした次世代型 Nrf2 活性化剤開発のための基盤となる。一方、NRF2 転写因子の活性化型変異が悪性腫瘍の治療抵抗性と直結するため臨床的に問題となっているので、健全な細胞には影響が少なく NRF2 活性化型悪性腫瘍にのみ効果がある化合物をスクリーニングする手法として Synthetic lethal アッセイ法を新たに樹立し、17-AAG を含むゲルダナマイシン誘導体およびマイトマイシン C を見出すことに成功した。いずれの薬剤も NRF2 活性化がんの治療に応用されることが期待できる。

本事業では、研究支援人材等への教育を目的とした研修やワークショップとして、PERAStar、Biomek FX、SpectraMAX Paradigm などの HTS 関連機器説明会/研修会を6回行った。ベックマンコールター社と共同で行ったワークショップでは6名の参加者が実際のスクリーニングプロトコル作成について研修した。化合物ライブラリーの再構築・登録作業の実地トレーニングを2回、精密分注装置の実地指導およびラボラトリーオートメーションシステムの実地指導を1回行った。また、若手教員4名および博士後期課程の大学院生3名を対象に、ハイエンドクライオ電顕のグリッド作製およびデータ収集用プログラムトレーニングを行うとともに、大学院生3名を対象にネガティブ染色電子顕微鏡観察の実地トレーニングを実施し、独立して試料評価を行えるように育成した。その他、技術補佐員1名と大学院生4名を対象として、ネガティブ染色電顕、クライオ電顕の取扱および構造解析のトレーニングを行った。また、本経費で5名の特任助教を雇用し、3名は化合物ライブラリーの登録・管理、スクリーニングヒット化合物の構造解析、HTS 技術、ヒット化合物から有用化合物を見出す過程を習得した。また、2021年度に雇用を開始した2名は、新たに導入されたクライオ電子顕微鏡の操作方法や得られたデータの解析方法について学び、クライオ電子顕微鏡について操作、支援業務が行えるようになった。さらに、自身の研究としてタンパク質の構造解析も進め、新規膜タンパク質の構造解析に成功すると共に、複数のタンパク質

において、従来より高分解能な解析データを得ることができた。

Tohoku University successfully installed two high-throughput screening (HTS) systems that provide a setup for academia scientists, both intramural and extramural, to conduct efficient HTS screening of chemical libraries and established an original chemical library, referred to as the “Tohoku School of Pharmacy Library”, through the support of the predecessor project during 2010-2016. Through the support of the Platform for Drug Discovery, Informatics, and Structural Life Sciences by AMED during 2017-2021, we have updated the “Tohoku University Library” bearing a wide chemical space by not only integrating chemicals that were dissipated on our campus but also adding original chemicals, especially focusing on natural product analogs synthesized by newly developed synthetic methods. In this project, the “diversity-enhanced extracts” methodology, which constitutes an approach for increasing the chemical diversity of natural-product-like compounds by combining natural product chemistry and diversity-oriented synthesis, can provide various compounds based on natural products, such as meroterpenoids, monoterpene-indole alkaloids, and biaryl compounds. Additionally, we also achieved syntheses of N,O-methylene acetal connected peptide compounds, meroterpenoid-like compounds, indole-alkaloid compounds, and natural product like-aza-paracyclophanes. Analog synthesis of natural products, such as spiro ring-containing natural products, peptides possessing unnatural amino acids, and compounds possessing an aza-paracyclophane skeleton, enabled the construction of a library of various compounds. We finally established the chemical library of 7,335 compounds, accompanying structural data that are feasible for use in *in silico* screening. We also installed a high-end cryo-electro microscope (EM) system that interlines with supercomputer systems in Tohoku Medical Megabank Organization (ToMMo), which enables the recorded images to automatically be transferred into the supercomputer. We further updated the cryo-EM system to enable researchers to externally access the supercomputer for the users’ convenience.

To develop a high-quality evaluation analysis system, we developed a cAMP biosensor assay system as a method for the detection of G-protein-coupled receptor activation signals and licensed it to a company. Furthermore, we advanced the method of mass spectrometry imaging to determine the tissue distribution of glutathione (GSH) and applied for a patent of the method. We also established a strategy of spectrometry imaging to visualize GSH synthesis-related metabolites. Using the advanced technology of spectrometry imaging, we successfully determined that phospholipids, such as plasmalogen ethanolamines, are biomarkers for brain senescence. We also established an imaging mass spectrometry strategy to detect tissue distributions of chemical activators of hypoxia-inducible factors (HIFs) in mice and successfully found differences in pharmacokinetics in mice among 5 types of commercially available HIF activators. Through this strategy, we further found that the cell-membrane permeability of HIF activators is ameliorated by esterification. Thus, these newly developed imaging systems are considered to be beneficial for evaluating the pharmacokinetics of chemicals with high accuracy. Moreover, genetically modified mouse lines suffering from erythropoietin deficiency anemia were generated and used to estimate the efficacies of HIF activators and erythropoietin reagents in collaboration with 3 pharmaceutical companies.

We also identified the protein–protein interaction (PPI) mechanism of NRF2 and KEAP1 molecules; the former is important for prophylaxis and immune systems by comprehensive regulation of a group of cytoprotective genes, and the latter directly interacts with NRF2 molecules and adjusts NRF2 function. Since NRF2 activators are expected to improve the pathology of chronic diseases, such as diabetes mellitus, chronic kidney disease, Alzheimer’s disease, rheumatoid arthritis and chronic obstructive pulmonary disease, developing novel drugs targeting the PPI has the potential to be an innovative area of next-generation NRF2 activator discovery for various types of chronic diseases. There is an interesting contrast; however, inhibitors targeting NRF2 function are predicted to be “cancer drugs” since mutations in NRF2 activation lead to poor prognosis in cancer-bearing humans. Through the support of the Platform for Drug Discovery, Informatics, and Structural Life Sciences, we generated a synthetic lethal assay method to identify NRF2 inhibitors that specifically work on NRF2-activating malignant cells but not on NRF2-normal cells and successfully found that geldanamycin derivatives and mitomycin C were candidate chemicals for NRF2-activating malignancies.