

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）横島 聡
（英語）YOKOSHIMA Satoshi

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立大学法人東海国立大学機構・名古屋大学大学院創薬科学研究科基盤創薬学専攻・教授
（英語）Tokai National Higher Education and Research System・Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Nagoya University・Professor

II 補助事業の概要

ランダムスクリーニングから得られるヒット化合物は、医薬品開発候補化合物として備えていなければならない機能・性質を完全に満たしているわけではない。そのためヒット化合物の構造展開を行って、目的とする生物活性の向上だけではなく、副作用の低減、生体内での代謝安定性・吸収効率などの改善が必要になる。また、未知の生体内標的分子の同定およびその機能解析に、活性を示す化合物を基盤とした分子プローブの利用は有効である。以上の背景のもと、本事業において「多彩な天然物合成と反応開発が加速させる創薬研究」という補助事業課題名により、(A) スクリーニングヒット化合物および生物活性天然物の構造展開、(B) 構造改変を可能とする効率的合成経路開拓に立脚した分子プローブの開発、(C) 生体内標的分子同定、(D) 化合物ライブラリーの拡充、に関して支援を実施した。以下にその成果の概略を記す。

(A) スクリーニングヒット化合物および生物活性天然物の構造展開

- ・骨芽細胞への分化促進能をもつ化合物のスクリーニングにより、majusculamide A および B が見出された。これら二つの化合物は β -ケトアミド部位の α 位置換基の立体化学のみが異なる異性体であるが、MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞への分化促進能が大きく異なることが確認された。そこで本化合物の β -ケトアミド部位を改変した類縁体を系統的に合成した。活性評価の結果、 β -ケトアミド部位の不斉中心およびケトンカルボニル基の存在が活性発現に必須であることが明らかとなった。また類縁体の配座解析により、 β -ケトアミド部位がもつ「1,3-アリル歪」「2つのカルボニル基の双極子反発」が協働することで化合物の配座が固定化され、高い活性発現につながっていることが示唆された。〔論文1〕Natsume, N.; Ozaki, K.; Nakajima, D.; Yokoshima, S.; Teruya, T. Structure-Activity Relationship Study of Majusculamides A and B and Their Analogues on Osteogenic Activity. *Journal of Natural Products* 2020, 83, 2477-2485. doi: 10.1021/acs.jnatprod.0c00441. 〔論文2〕Nakajima, D.; Sueyoshi, K.; Orihara, K.; Teruya, T.; Yokoshima, S. Synthesis of Majusculamides A and B. *Synlett* 2019, 30, 924-927. doi: 10.1055/s-0037-1611805.
- ・酵母に対して寿命延長効果を示すことが良く知られているカロリー制限とは独立の機構で作用を示すモノテルペンベンゾエートの類縁体約 30 種を合成した。活性評価の結果、毒性が問題となっていた天然物と比較して、より高濃度で毒性を示さない誘導体の取得に成功し、その作用機序解明に向け化合物の量的供給を行った。その結果、それらの寿命延長効果がストレス応答を引き起こすタンパク質リン酸化酵素 Sty1 の活性化を経る機構であることが明らかとなった。〔論文3〕Hibi, T.; Ohtsuka, H.; Shimasaki, T.; Inui, S.; Shibuya, M.; Tatsukawa, H.; Kanie, K.; Yamamoto, Y.; Aiba, H. Tschimganine and its derivatives extend the chronological life span of yeast via activation of the Sty1 pathway. *Genes to Cells* 2018, 23, 620-637. doi: 10.1111/gtc.12604.
- ・オーファン G タンパク質共役受容体 GPR85 に対するスクリーニングヒット化合物の構造展開により、高活性 ($EC_{50} = 1 \mu\text{M}$ 程度) な化合物を見出しており、GPR85 を発現した小脳プルキンエ細胞を用いる電気生理学的な実験により、GPR85 がカリウムチャネルの開閉に関与することが示唆された。〔論文4〕Sakai, A.; Yasui, T.; Watanabe, M.; Tatsumi, R.; Yamamoto, Y.; Takano, W.; Tani, Y.; Okamura, I.; Hirai, H.; Takeda, S. Development of novel potent ligands for GPR85, an orphan G protein-coupled receptor expressed in the brain. *Genes to Cells* 2022, Early View. doi: 10.1111/gtc.12931.
- ・「臓器・部位特異的かつ局所的に、前駆体化合物を生物活性化合物へと変換する手法」すなわち「生体内合成化学」に関する支援研究を実施した。生体内で代謝的に酸化を受け活性化合物へと変換された後、強力な求電子種（アルキル化剤）を発生させる天然物が知られており、生体内でタンパク質や核酸等と共有結合を形成する。この作用をもとに抗がん剤としての開発も試みられてきたが、肝臓での酸化に起因する肝機能障害が問題となり、開発は断念された。本事業においてこの天然物に対して「生体内合成化学」を適用し検討を行ったところ、酸化反応を経ることなく、生体内で直接活性化合物へと変換可能な前駆体と触媒を見出

すに至り、細胞実験において、前駆体および触媒が共存するときに限り、がん細胞の増殖を阻害する結果を得た。これらの結果は、医薬品としては不安定で取り扱いが困難な分子を、生体内合成化学治療を介して臓器・部位特異的かつ局所的に発生させるものであり、新規モダリティとしての可能性を示す結果である。(論文投稿中)

その他、キナーゼ阻害剤の開発、タンパク質間相互作用阻害剤の開発、スプライシング異常を正常化させる化合物の探索、チャンネル阻害剤の開発、幹細胞増殖因子代替低分子化合物の構造展開、抗ウイルス薬の開発、酵母寿命延長因子の探索、ステロイドホルモン生合成酵素阻害剤の開発等に関する支援を実施し、新規類縁体の設計・合成を行った。支援の実施にあたっては、化合物の設計に関してインシリコユニットと、化合物の物性改善に関しては東京大学構造展開ユニットと連携し、その研究を進めた。

(B) 構造改変を可能とする効率的合成経路開拓に立脚した分子プローブの開発

- ・治療薬 A の生体内標的分子を同定するため、独自に実施した構造活性相関研究に基づき治療薬 A のジアジドプローブを設計・合成した。生体内標的の同定に向けた検討が実施されている。
 - ・エピガロカテキンガレート (EGCG) の A 環部分にアミノペンチル基を有するプローブ前駆体 (アミノペンチル化 EGCG) を用いた EGCG 標的探索方法を確立した。
 - ・天然物 B にビオチンタグを導入したプローブ分子を合成し、心筋細胞の肥大化を抑制するタンパク質をスクリーニングした結果、代謝制御に関与するタンパク質の同定に成功した。
- その他、カテキンと親和性を有する微量標的分子の同定、寿命延長因子の探索、天然有機化合物の結合タンパク質の同定等に関する支援として、分子プローブの設計・合成を実施した。

(C) 生体内標的分子同定

表現型スクリーニングは、独特な活性を示す生物活性分子の取得に有効な手段であるが、表現型スクリーニングだけでは必ずしも生体内標的分子 (タンパク質や核酸) は明らかとはならず、標的分子の構造情報に基づいた論理的な構造展開が困難である。遺伝学的手法を用いた生体内標的分子同定を専門とする研究者による生体内標的分子同定について支援を進めた。

- ・天然物 C を元に合成した類縁体 D が高い抗腫瘍活性を示した。類縁体 D は多剤超感受性出芽酵母に対しても強い増殖阻害活性を示したことから、複数の顕性耐性変異株を取得し、それらの株の全ゲノム解析を行ったところ、複数の遺伝子変異が見出された。そこで顕性耐性変異株でそれぞれの変異遺伝子を破壊した株を作製したところ、DNA 損傷シグナルに関連する遺伝子が類縁体 D 耐性に関わることが明らかとなった。このことから類縁体 D は DNA 損傷を引き起こすことで増殖阻害を引き起こしている可能性が示唆された。
- ・多剤超感受性酵母に対して化合物 E が何らかの形質変化を誘導するかを予備検討したが、形質変化や増殖阻害活性を見られなかったことから、本支援の手法では標的分子の同定は困難だと判断した。本格的な検討には移ることができなかったが、「予備検討を行うことで実施可否を判断することが可能である」ことを示すものであり、限られたリソースの有効活用という観点において、本支援技術の有用性を示している。

(D) 化合物ライブラリーの拡充

天然物の全合成研究、新規反応開発などの高度化研究において取得した独自の骨格・構造を有する 272 化合物を、東京大学創薬機構の化合物ライブラリーへと提供した。

また高度化研究として、(A) 特異な骨格をもつ天然物の合成およびプローブ化研究、(B) 分子触媒を用いた物質変換法の高度化、(C) ハロゲン官能基導入法の高度化、(D) 環状・非環状核酸と核酸ミメティクスの合成、(E) オリゴペプチド誘導体の合成、(F) マイクロフロー自動合成プロセスを駆使する創薬プロセスの迅

速化、(G) 標的分子同定の方法論の高度化、について研究を行い、得られた知見を支援へと活用した。

Through this research project, we supported a broad range of biologists by means of techniques of synthetic organic chemistry according to the following menus:

(A) Structural development of screening hit compounds and biologically active natural products. Structural development of hit compounds is essential for drug development to improve the activity and the ADME properties, and to reduce the side effects and the toxicity. Our research group is constituted with a broad range of chemists, whose research fields include natural products synthesis and development of novel reactions. Research projects we conducted include following molecules: majusculamides A and B which induced osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells (Natsume, N.; Ozaki, K.; Nakajima, D.; Yokoshima, S.; Teruya, T. Structure-Activity Relationship Study of Majusculamides A and B and Their Analogues on Osteogenic Activity. *Journal of Natural Products* 2020, 83, 2477–2485. doi: 10.1021/acs.jnatprod.0c00441. Nakajima, D.; Sueyoshi, K.; Orihara, K.; Teruya, T.; Yokoshima, S. Synthesis of Majusculamides A and B. *Synlett* 2019, 30, 924–927. doi: 10.1055/s-0037-1611805), tschimganine which extend the chronological life span of yeast (Hibi, T.; Ohtsuka, H.; Shimasaki, T.; Inui, S.; Shibuya, M.; Tatsukawa, H.; Kanie, K.; Yamamoto, Y.; Aiba, H. Tschimganine and its derivatives extend the chronological life span of yeast via activation of the Sty1 pathway. *Genes to Cells* 2018, 23, 620–637. doi: 10.1111/gtc.12604), novel ligands for an orphan G protein-coupled receptor (Sakai, A.; Yasui, T.; Watanabe, M.; Tatsumi, R.; Yamamoto, Y.; Takano, W.; Tani, Y.; Okamura, I.; Hirai, H.; Takeda, S. Development of novel potent ligands for GPR85, an orphan G protein-coupled receptor expressed in the brain. *Genes to Cells* 2022, Early View. doi: 10.1111/gtc.12931), and so on.

(B) Design and synthesis of molecular probes based on establishing efficient synthetic routes of the ligands including biological active natural products. Identifying physiological targets of biologically active compounds is essential for drug development, and molecular probes based on the biologically active compounds become good tools for this purpose. We supported target identification by genetic approach or by creation of molecular probes on the basis of establishment of efficient synthetic routes.

(C) Expansion of compound library. Our synthetic researches produced a variety of compounds having diverse skeletons, which included natural products and their related compounds, or which were synthesized via our original methods. We deposited 272 structurally-original compounds in the compound libraries.