

微生物バイオものづくりによる 非天然型天然物の創出と医薬品開発への展開

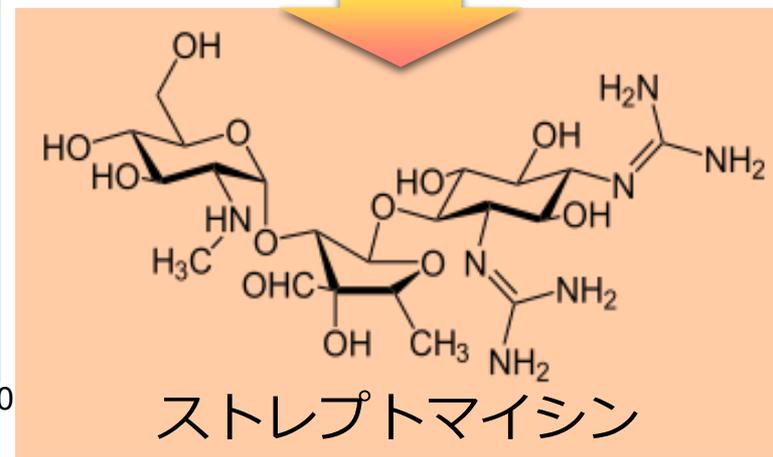
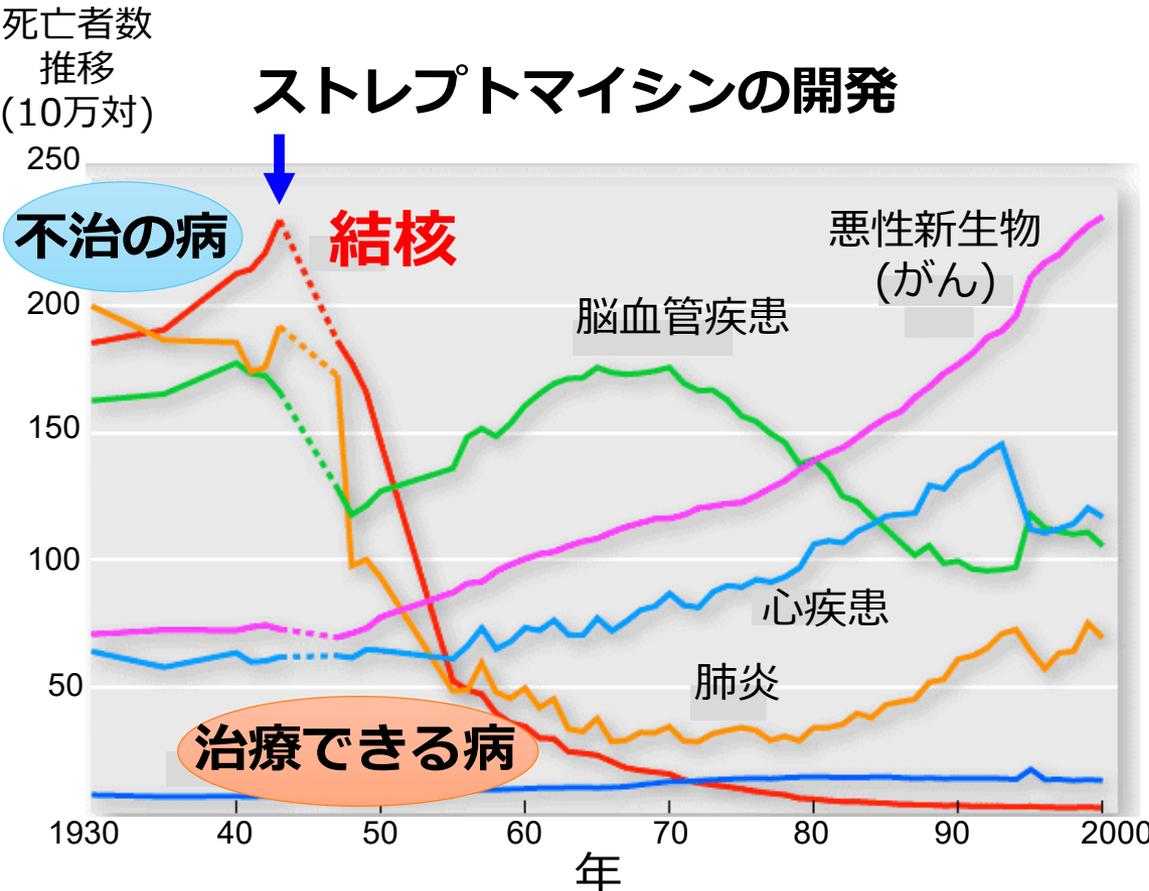
東海国立大学機構 名古屋大学
大学院生命農学研究科
准教授 恒松 雄太

技術開発の背景

天然有機化合物(天然物)の発見は 社会を変える！

自然の生み出す有機分子が

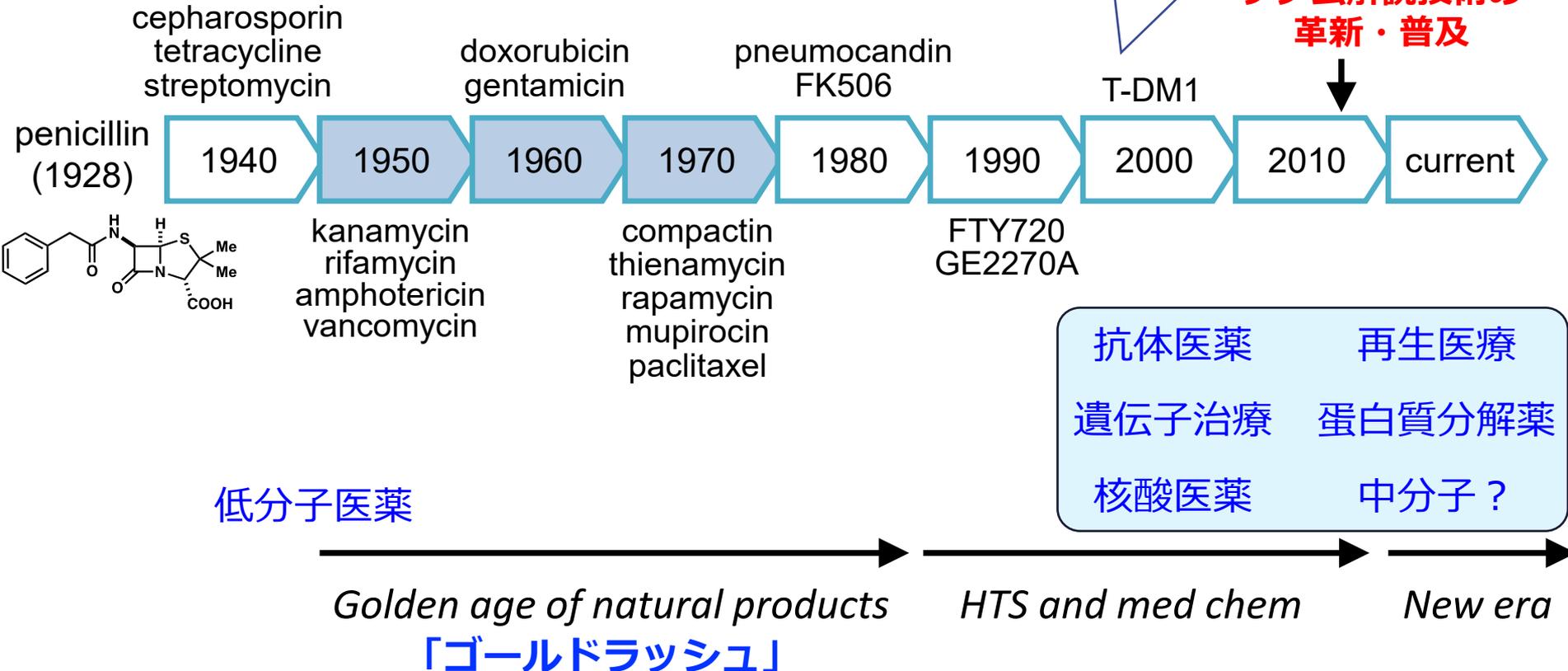
1. 切れ味鋭く生体に作用する(薬・毒)
2. 医薬品開発として社会還元
3. 作用機序解析 → 生命現象の理解



医薬品開発における天然物創薬の功績 ～創薬モダリティの変遷

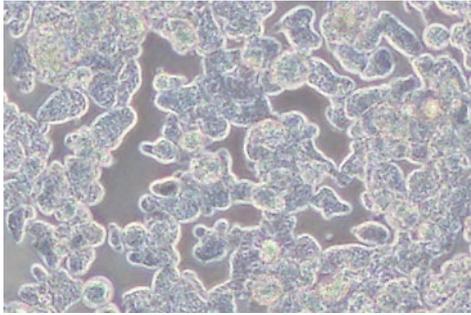
天然物創薬の産業的衰退
…天然物は取り尽くされてしまったのか？

ゲノム解読技術の
革新・普及



福田大介(第一三共RDノバーレ), 微生物からの薬剤生産 天然物創薬, 微生物の創薬への応用とGMPに対応した環境微生物管理, 2014. を一部改変

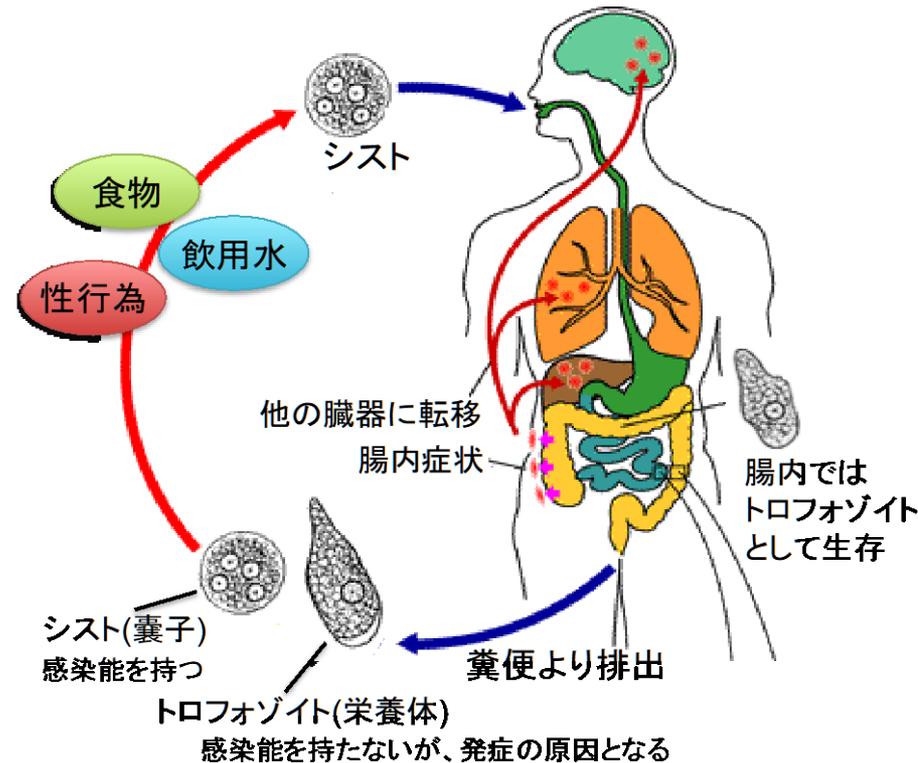
赤痢アメーバ症とは？



赤痢アメーバ
Entamoeba histolytica

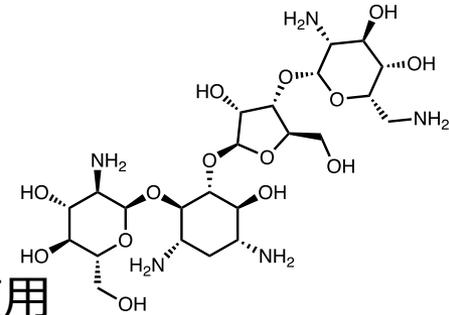
- 赤痢アメーバ原虫 *Entamoeba histolytica* が大腸に寄生して起こる寄生虫症
- 主な症状: 腹痛、下痢、血便
- 大腸から他臓器(肝、肺、脳)にも移行し病態発生

- 全世界に感染者は存在、**5,000万人が感染、毎年4万~11万人が死亡**していると推定される (WHO)。
- 発展途上国では不衛生な水や生野菜と一緒にシストを摂ってしまうことにより感染する。
- 日本でも年々患者が増加、現在年間1,000件を超える感染報告がある。



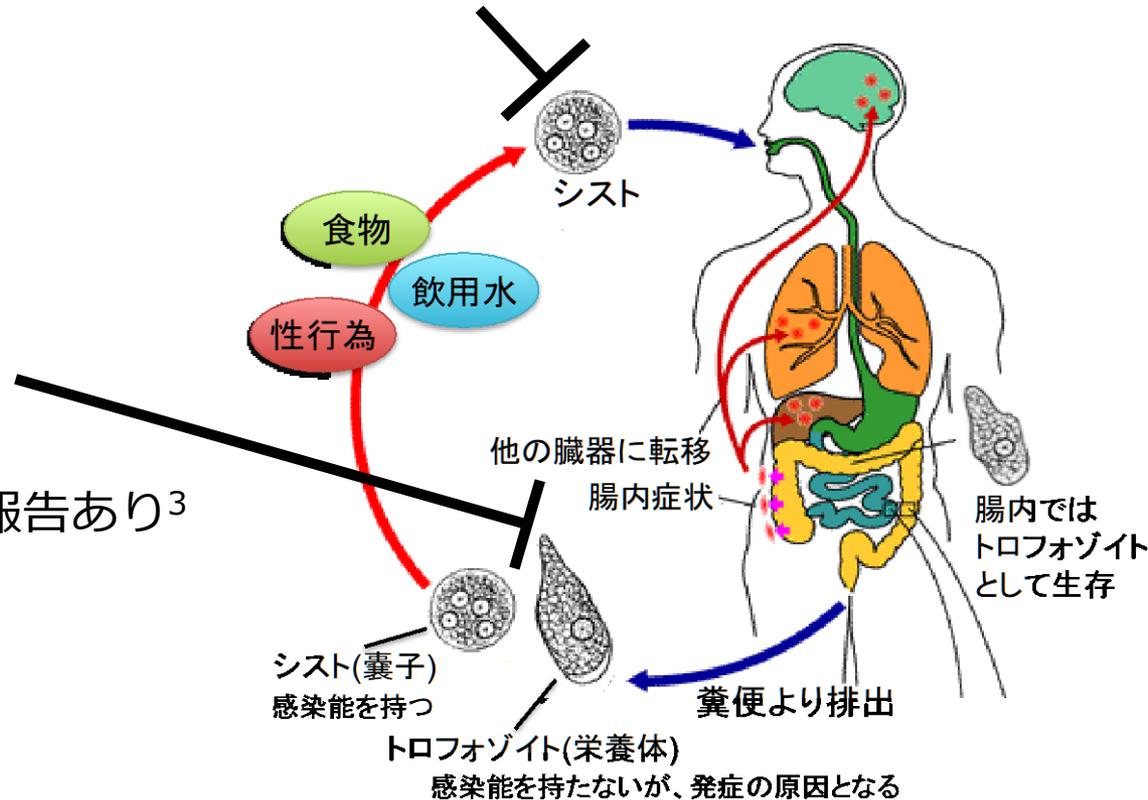
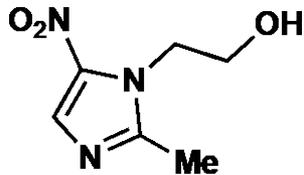
パロモマイシン

タンパク質合成阻害剤
シスト(嚢子)に効くため、
便中シストの孵化防止に使用



第一選択薬: メトロニダゾール¹

ニトロ基が代謝され生成するラジカルがDNAを切断。
トロフォゾイト(栄養体)に作用。
ヒトに対して遺伝毒性を示す²
薬剤耐性を持つ赤痢アメーバの報告あり³



1) 寄生虫薬物治療の手引き -2020-, 改訂第 10.2 版, AMED熱帯病治療薬研究班
2) 動物用医薬品評価書 メトロニダゾール, 食品安全委員会, 府食389号, 2014
3) D. Leitsch, *Parasitology* 2019, 146, 1167.

赤痢アメーバ治療薬候補： フマギリン／オバリシン

微生物培養液
(北里大・大村ライブラリ*)

15,000 被験サンプル



抗赤痢アメーバ成分の探索

共同研究者

野崎(東京大学)、森(北里大, 当時)

*2015年 ノーベル医学・生理学賞

大村 智 教授 (北里大学)

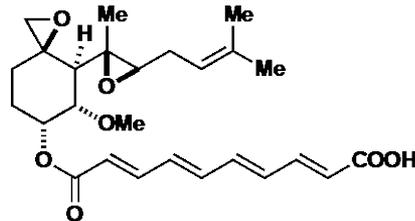
「アフリカにおける河川盲目症の撲滅」

化合物名・構造

抗赤痢アメーバ活性
in vitro ED₅₀ (μM)

動物試験
(ハムスター肝膿瘍モデル)

フマギリン
(FM)



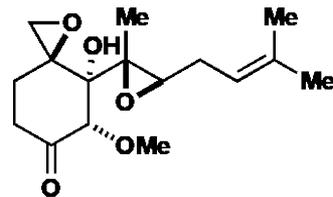
0.072

10 mg/kg
(経口投与)



膿瘍縮小

オバリシン
(OV)



0.020

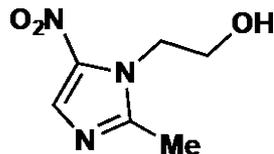
1 mg/kg
(皮下投与)



膿瘍治癒

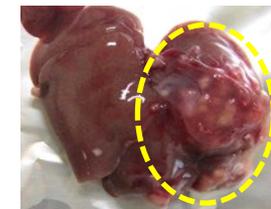
既存薬

メトロニダゾール



2.5

10 mg/kg
(経口投与)

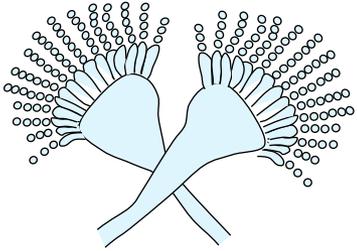


膿瘍縮小

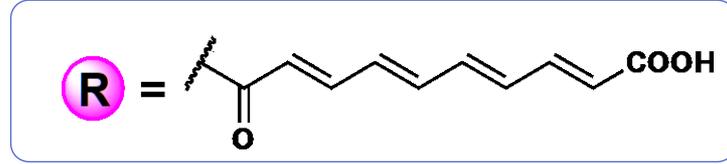
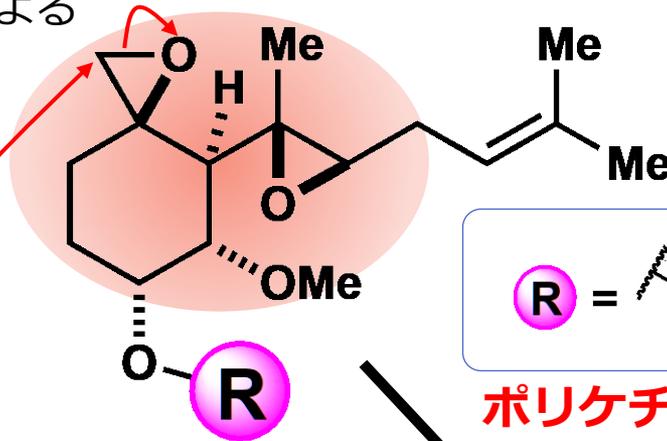
フマギリンの生体内標的分子 メチオニンアミノペプチダーゼ2(MetAP2)

テルペン部:
ファーマコフォア

微生物培養による
醗酵生産

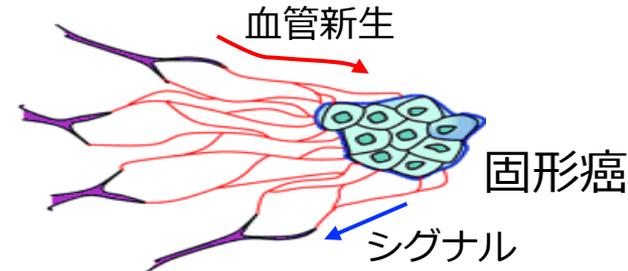


Aspergillus fumigatus (カビの一種)



ポリケチド部: 構造展開が容易

ヒト臍帯静脈内皮細胞HUVEC
などに強い増殖阻害をもたらす



血管新生阻害剤など
として開発

求核攻撃

メチオニン
アミノペプチダーゼ2
(MetAP2)



His231

トリミング

Met

+



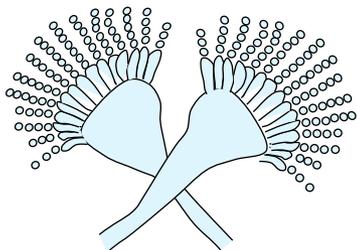
成熟型タンパク質
(機能あり)



翻訳された新生タンパク質
(機能不全)

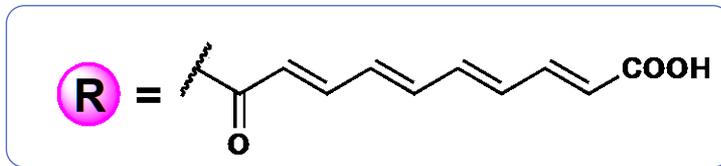
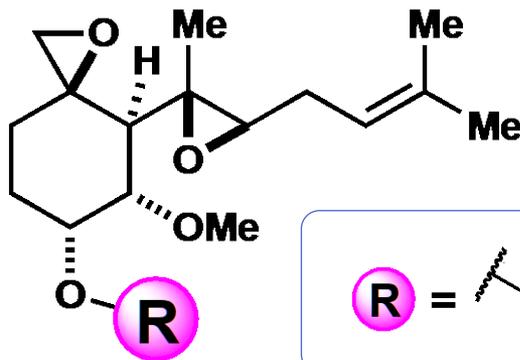
(原虫, 血管内皮細胞など)
細胞内

MetAP2阻害に基づく フマギリン創薬研究～実例～



Aspergillus fumigatus (カビの一種)

微生物培養による
醗酵生産



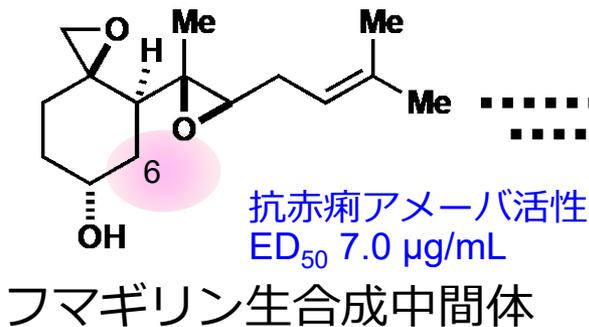
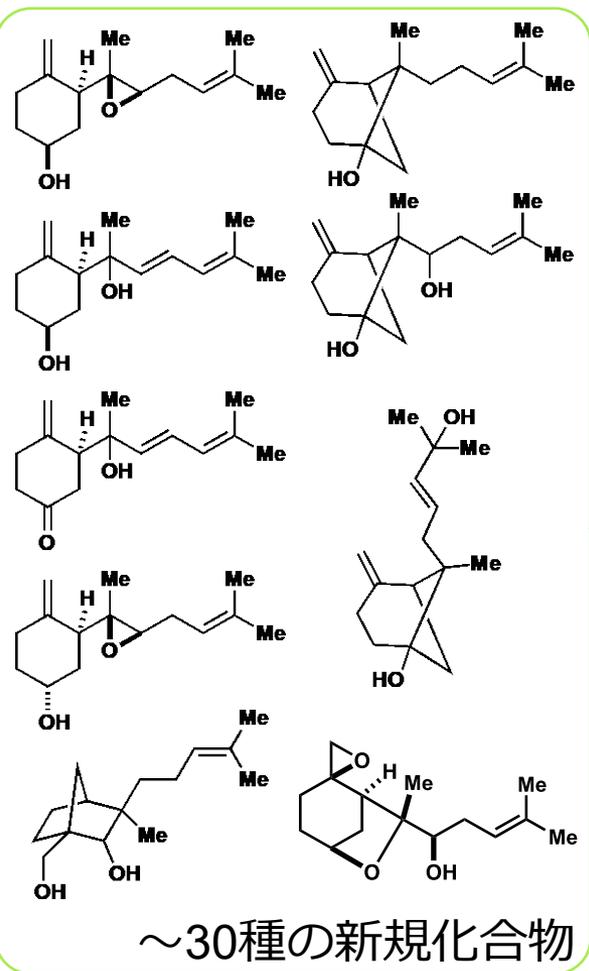
ポリケチド部: 構造展開が容易



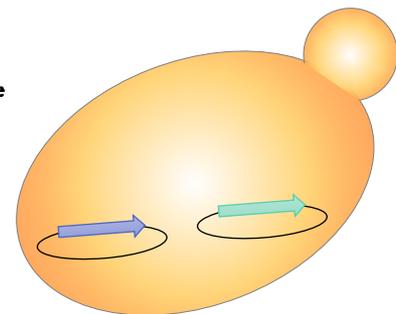
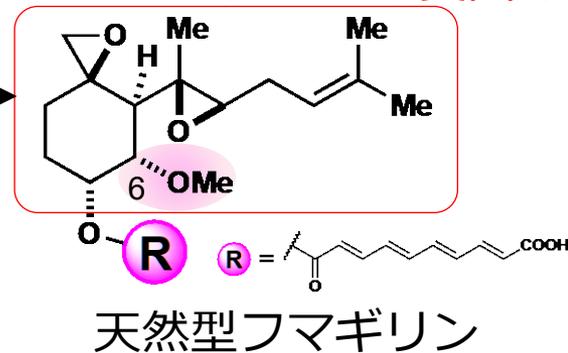
加水分解、化学合成

構造式	薬剤名・年	対象疾病	成果
	TNP-470 (武田薬品) 2000年頃	各種がん (メラノーマ, カポジ肉腫, 乳がん, 肺がん等)	Phase II → 中断 (神経毒性など)
	beloranib (Zafgen) 2015年頃	肥満症 (Prader-Willi症候群など)	Phase III → 中断 (被験者死亡)
	ZGN-1061 (Zafgen) 2018年頃	肥満症 (2型糖尿病など)	Phase II → 中断 (心臓血管にリスク)

合成生物学技術は 多様なFM関連分子を創出できる

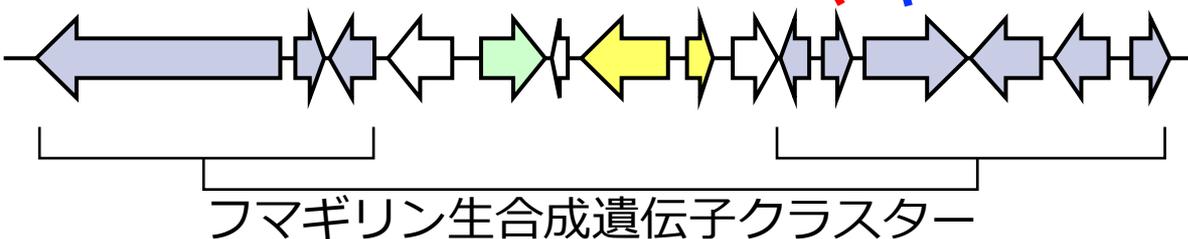


テルペン部: 合成改変困難



遺伝子組換え出芽酵母
(2つの遺伝子の強制発現)

遺伝子	機能
<i>fma-TC</i>	テルペン環化酵素
<i>fma-P450</i>	シトクロムP450
⋮	⋮



赤痢アメーバ治療薬候補： フマギリン／オバリシン

微生物培養液
(北里大・大村ライブラリ*)

15,000 被験サンプル

抗赤痢アメーバ成分の探索

共同研究者

野崎(東京大学)、森(当時北里大)

*2015年 ノーベル医学・生理学賞

大村 智 教授 (北里大学)

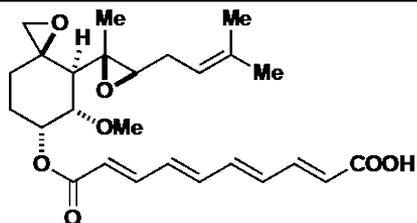
「アフリカにおける河川盲目症の撲滅」

化合物名・構造

抗赤痢アメーバ活性
in vitro ED₅₀ (μM)

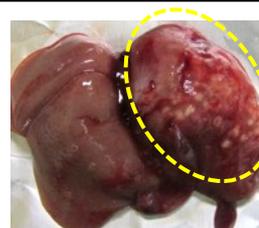
動物試験
(ハムスター肝膿瘍モデル)

フマギリン
(FM)



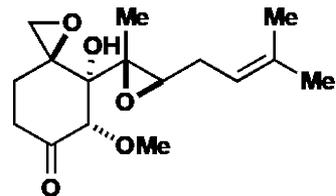
0.072

10 mg/kg
(経口投与)



膿瘍縮小

オバリシン
(OV)



0.020

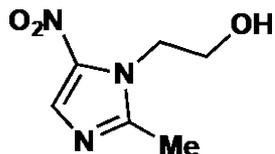
1 mg/kg
(皮下投与)



膿瘍治癒

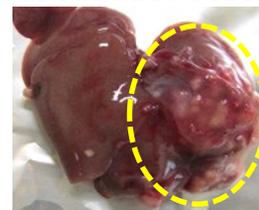
既存薬

メトロニダゾール



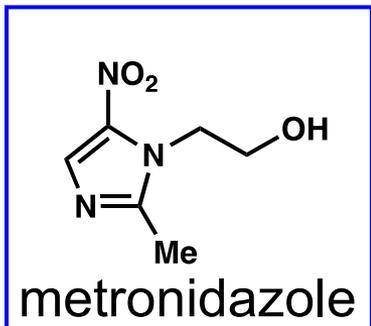
2.5

10 mg/kg
(経口投与)



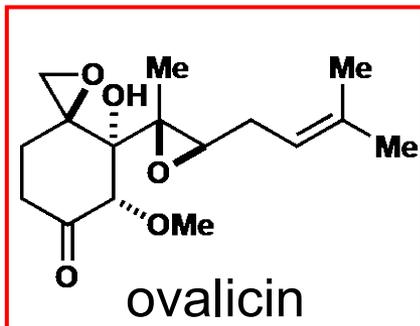
膿瘍縮小

OVの弱点：経口投与で治療効果なし

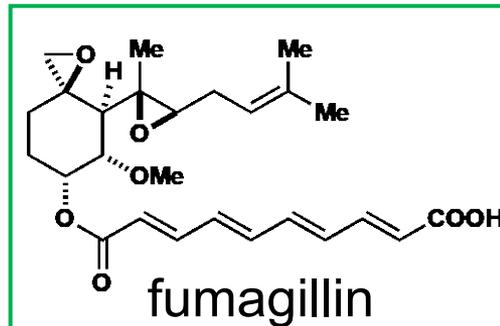


(赤痢アメーバ
培養細胞系)

in vitro ED₅₀ 2500 nM



20 nM



72 nM

in vivo
(ハムスター
肝膿瘍モデル)



投与量	投与方法		経口		皮下	
	経口	皮下	経口	皮下	経口	皮下
1 mg/kg				縮小/ 治癒		
5 mg/kg	縮小			縮小/ 治癒	効果 なし	効果 なし
10 mg/kg	縮小/ 治癒				縮小	
20 mg/kg			効果 なし			

従来技術とその問題点

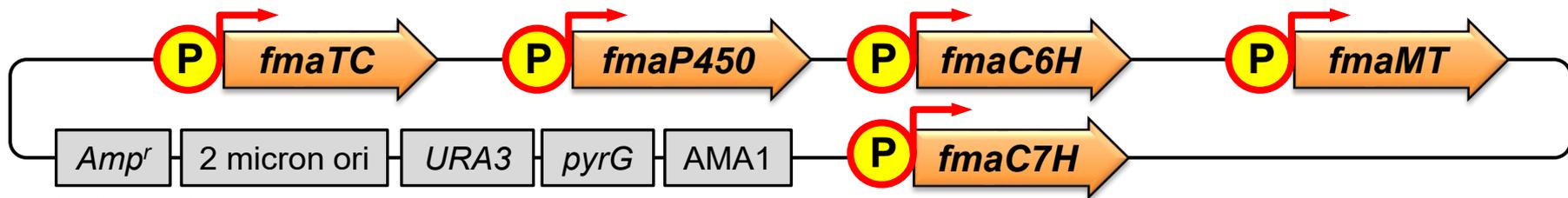
微生物発酵生産により医薬品開発された例は多い(昔)

- **天然型の構造体のみしか得られない**
- **化合物生産量は多くない (育種が必要)**
- **多くの「開発失敗品」の例がある**
…有機化学技術上の、構造展開の制限に起因する。

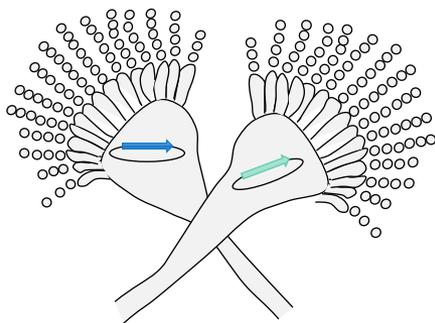
新技術の紹介

強制発現に基づく 構造指向型の非天然型化合物生産

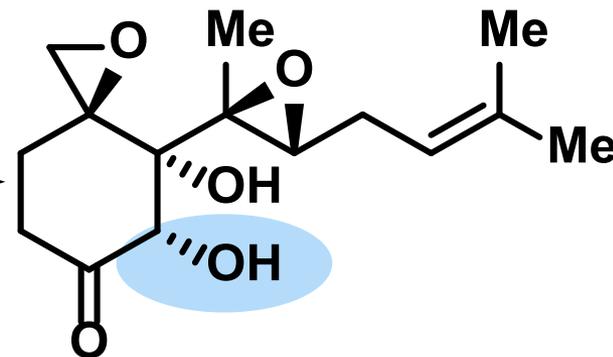
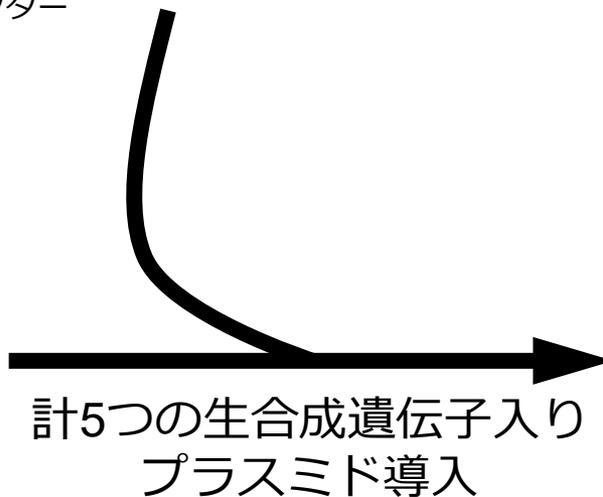
P: 強制発現プロモーター



大腸菌-酵母-糸状菌トリプルシャトルベクター



Aspergillus nidulans



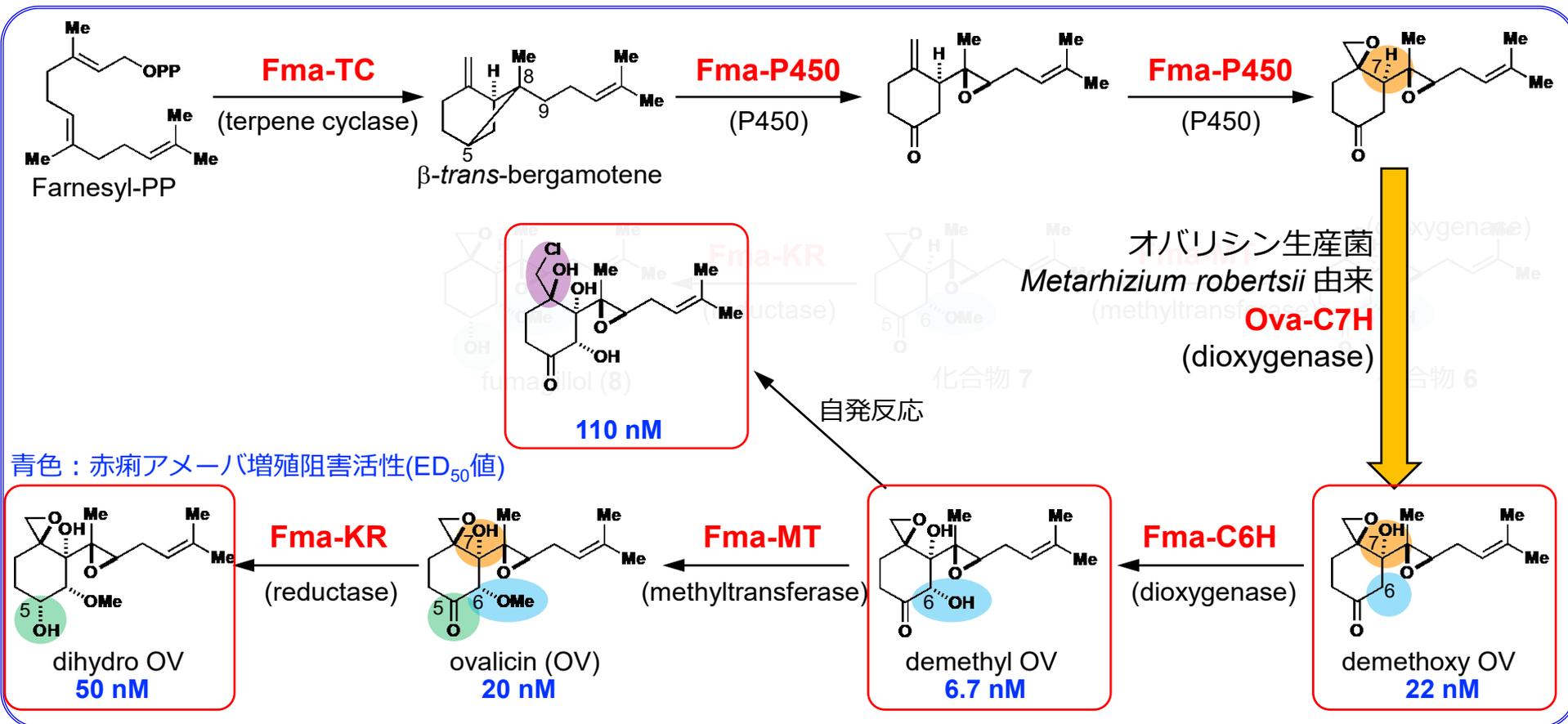
非天然型化合物

deMeOV

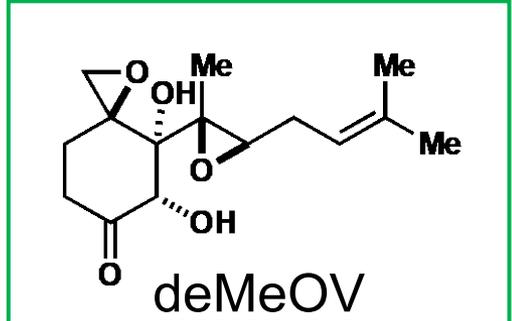
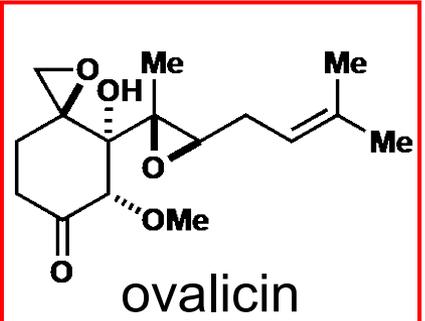
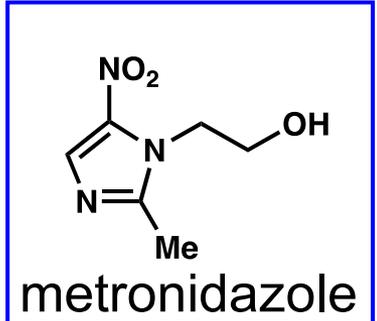
赤痢アメーバ増殖阻害活性: ED₅₀ 6.7 nM

*A. nidulans*内にて人工的に構築した経路

恒松雄太, オバリシン型非天然物を産生する改変細胞, 出願番号: 2023-133681



- 天然物OVに近い構造をもつ非天然型化合物はいずれも**高活性**
- 最も強力なdemethyl OVについて大量取得後、動物試験を実施
⇒ しかし、**治療効果が認められなかった。**



in vitro ED₅₀ 2500 nM

20 nM

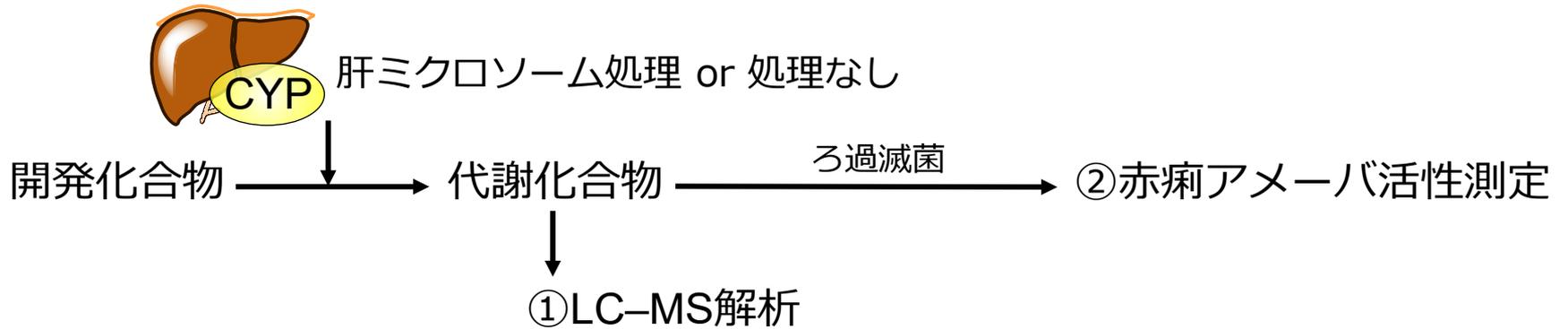
6.7 nM

in vivo
(ハムスター
肝膿瘍)

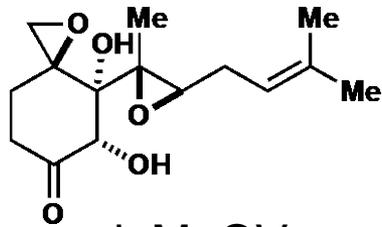
投与方法 投与量	経口		皮下		経口		皮下	
	1 mg/kg				縮小/ 治癒			
5 mg/kg	△ 縮小			縮小/ 治癒				✕ 効果 なし
10 mg/kg	○ 縮小/ 治癒							✕ 効果 なし
20 mg/kg								✕ 効果 なし

なぜ、*in vitro*で強力な活性を示すOV類が、**経口投与**で効果を示さないのか？
→動物個体における、**吸収・分布・代謝・排泄(ADME)**に問題？

開発化合物における 薬物代謝に対する脆弱性の評価



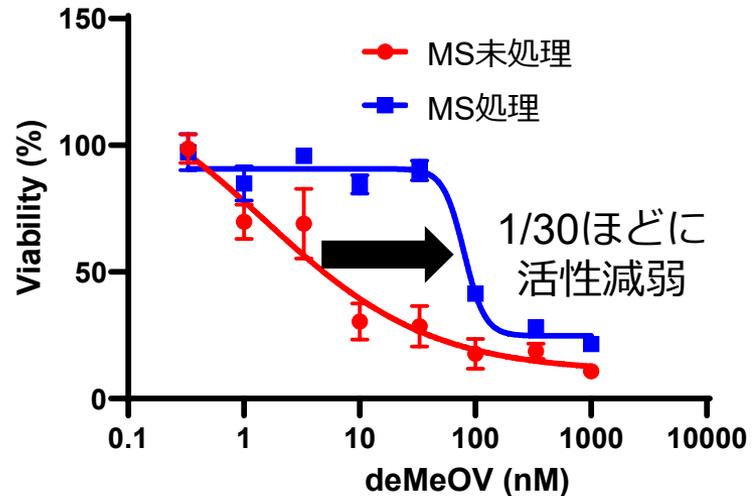
① LC-MS解析



deMeOV
ED₅₀ = 6.7 nM

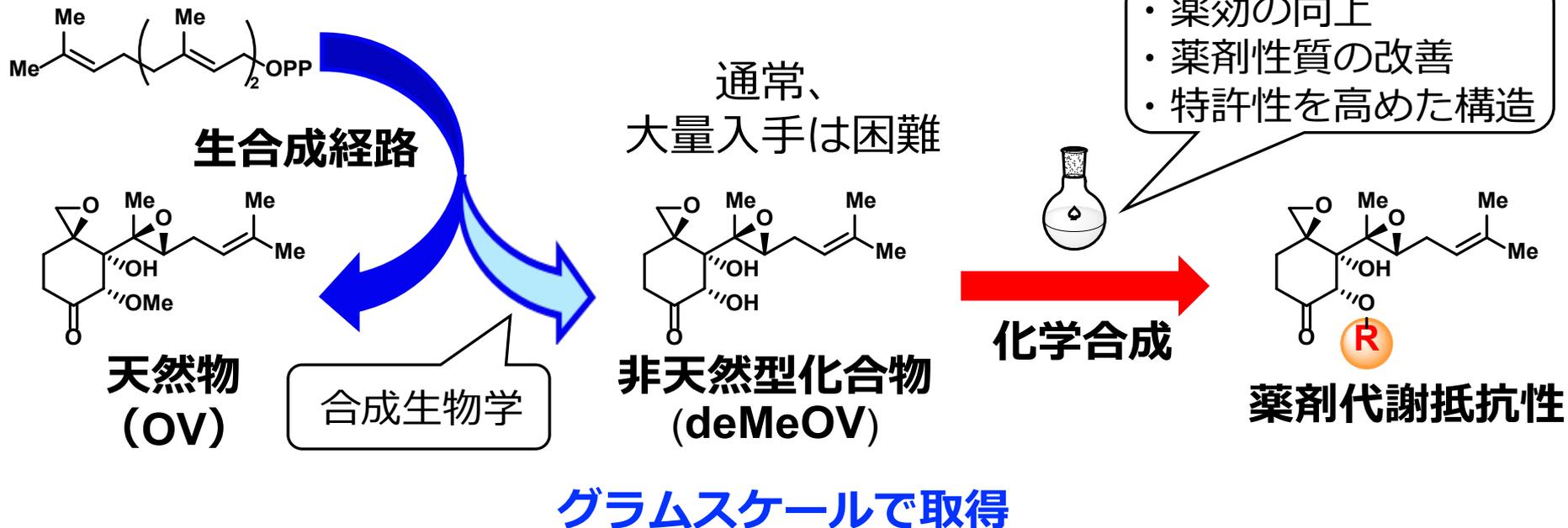
ミクロソーム処理後30分で
化合物は完全に分解された

② 赤痢アメーバ増殖阻害試験



- OV類は肝臓由来ミクロソームにて顕著に分解を受け、活性減弱化
- 特定のシトクロムP450が分解に寄与していた。

ケム・バイオハイブリッド合成

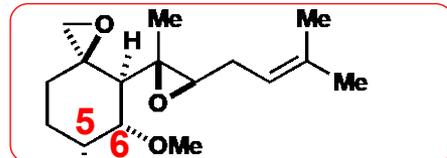
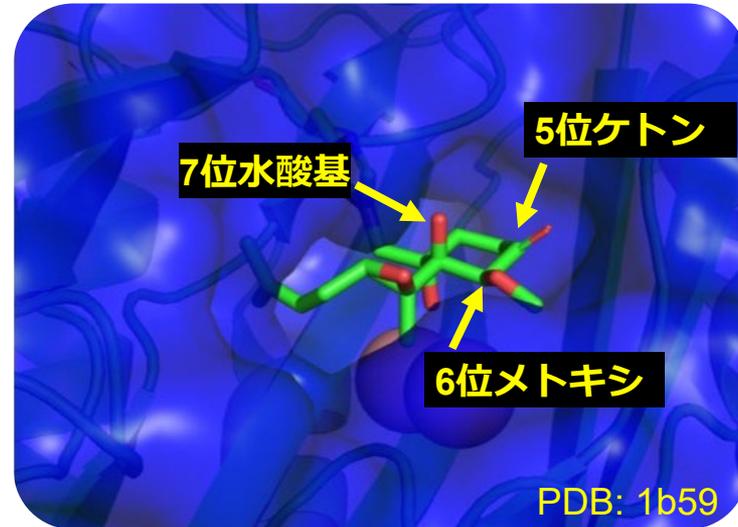
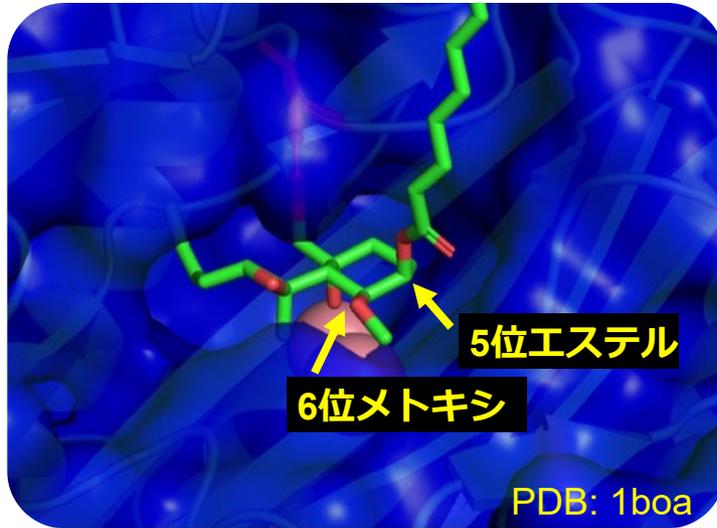


生合成工学 + 有機合成化学 → ケム・バイオハイブリッド合成

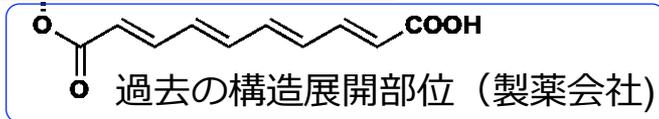
- 異種発現法による非天然型化合物の大量取得
- 化学誘導化による薬物代謝耐性能の付与

タンパク質立体構造解析に基づく 合理的薬剤設計

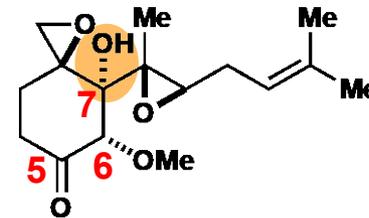
ヒトMetAP2タンパク質-リガンドの共結晶構造



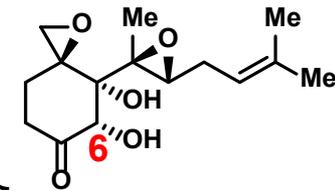
ポケット内部
(ファーマコフォア)



過去の構造展開部位 (製薬会社)



創出した
非天然型化合物



- オバリシンは過去の臨床開発例がない(薬剤代謝脆弱性のため?)
- FM/OV天然型 = 6位は必ず **-OMe** ...構造展開が不可能
→ (活性ポケット外側を向いた)
オバリシン6位の構造展開で新規な化合物開発をデザイン

培養条件の最適化と化合物精製



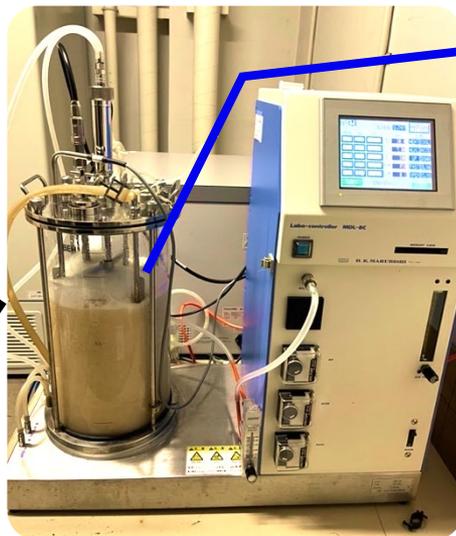
植菌

種培養



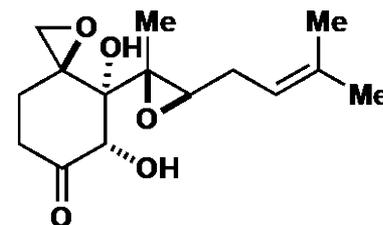
500 mlスケール
CDT培地

本培養 (30°C, 450 rpm)



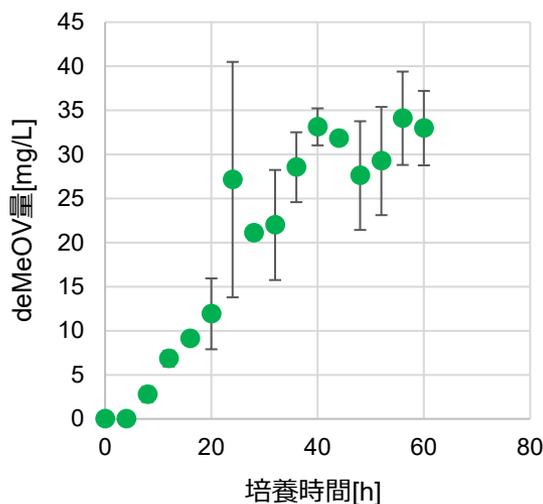
6.0 Lスケール
CDST培地(発現誘導)

HPLCにて随時生産性を確認



deMeOVの生産量
約200 mg/6 L
(本培養開始後48時間)

deMeOV生産株
(*fma-TC*, *-P450*,
-C6H, *-MT*,
ova-C7H)
計5遺伝子を導入)



6.0 L培養 x 10回分

HP20 吸着, Acetone溶出
分配 (H₂O/EtOAc)
SiO₂クロマト
SiO₂フラッシュクロマト x 2

学部4年生が
2週間で実施

deMeOV
単離収量 約 2.0 g



(名古屋大
農学部内にて
稼働準備中)

化合物供給量:
> 20 g/月 と想定

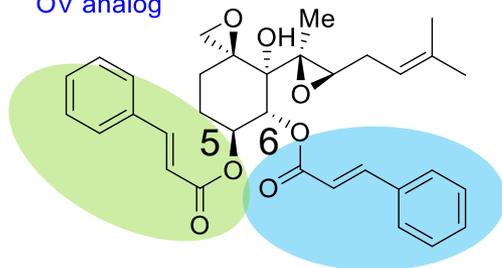
なお、800 L容器も
使用受入許可済

- ・ 誘導型プロモーター配列を用いた強制発現
→ スケールアップが容易

deMeOVをもとにした化学合成展開-1

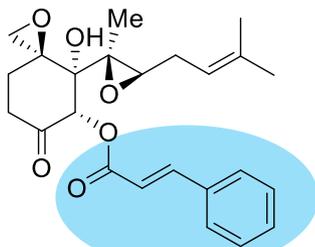
~50種の化合物を開発

OV analog



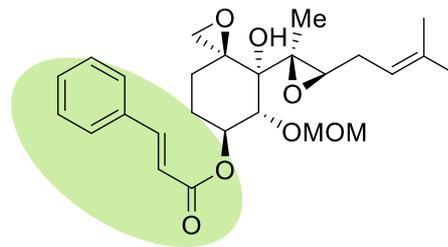
NS-171

ED₅₀ > 1000 nM



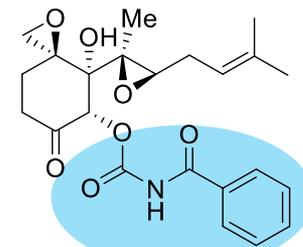
NS-172

92 nM



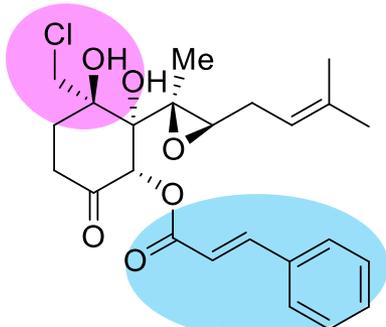
NS-173

> 1000 nM



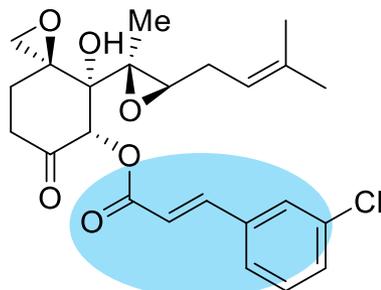
NS-174

23 nM



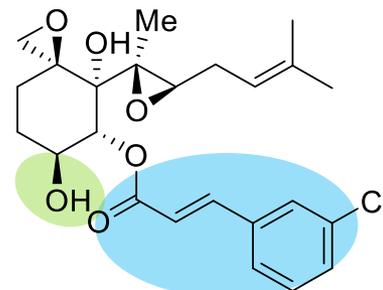
NS-175

407 nM



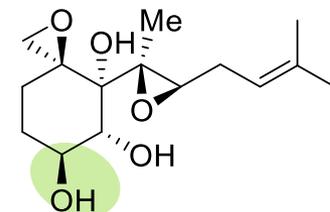
NS-176

108 nM



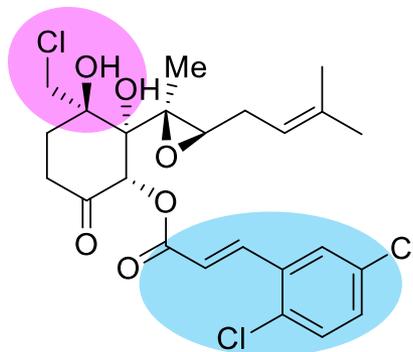
NS-177

> 1000 nM



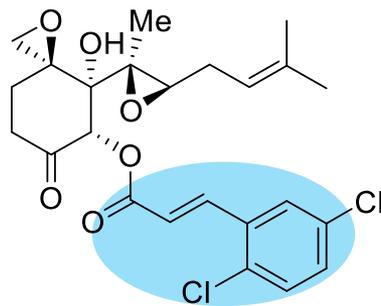
NS-178

> 1000 nM



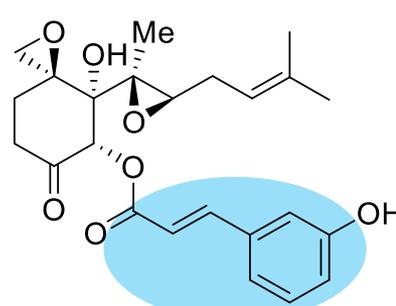
NS-179

643 nM



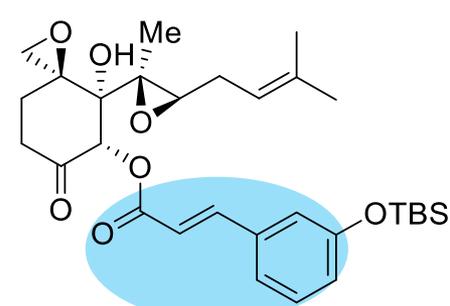
NS-180

677 nM



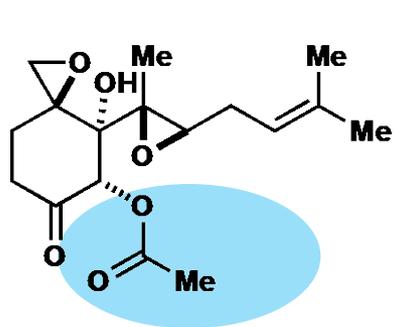
NS-181

15 nM



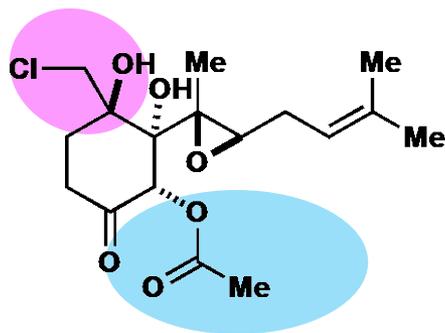
NS-182

464 nM



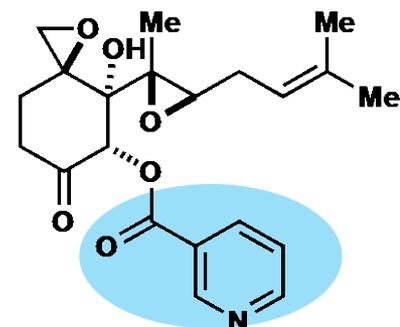
YOK24

ED₅₀ 16 nM



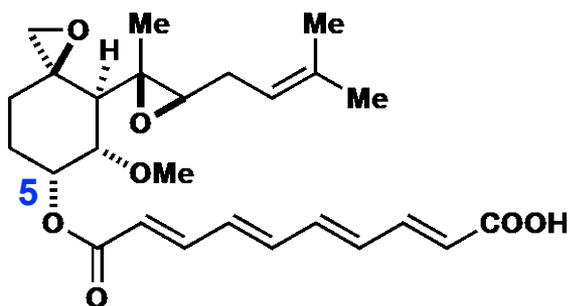
YOK25

142 nM

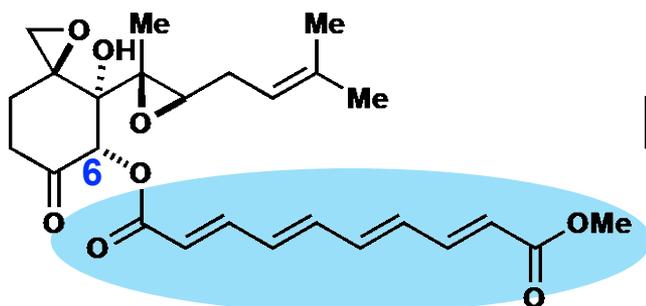


YOK26

10 nM

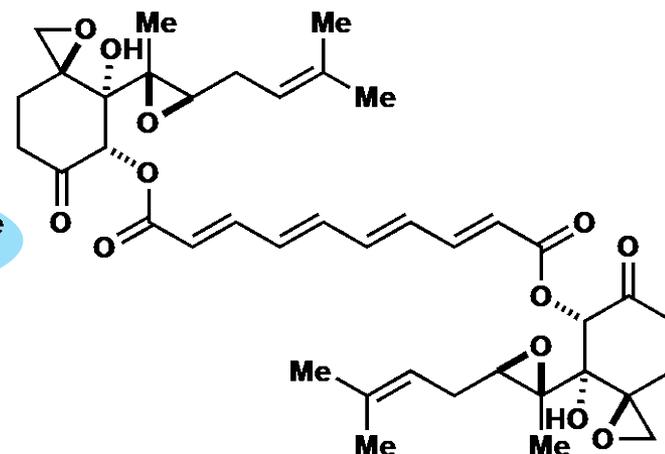


fumagillin



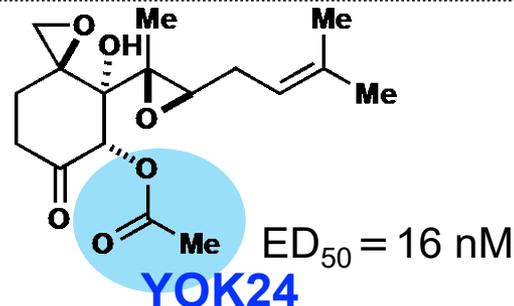
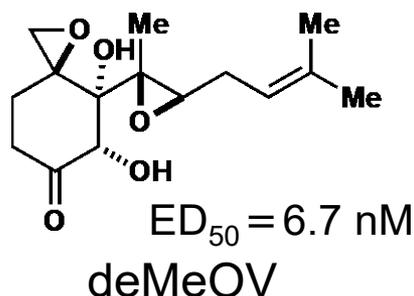
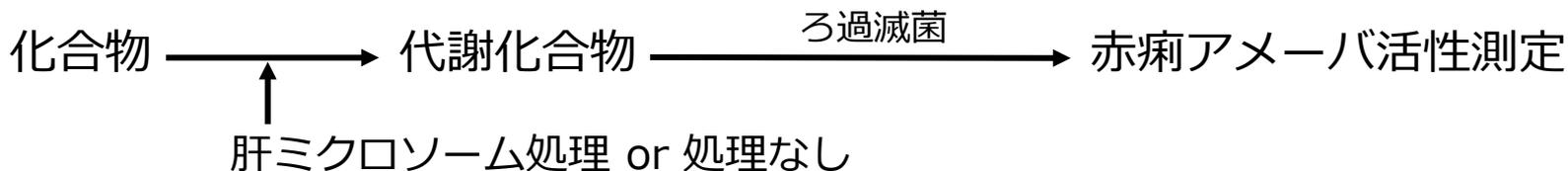
fumagillinとovalicinの
ハイブリッド型分子

834 nM

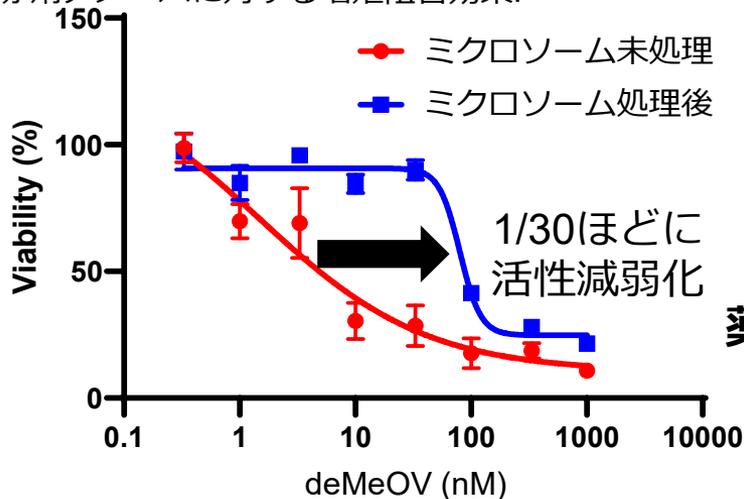


OVの二量体化合物

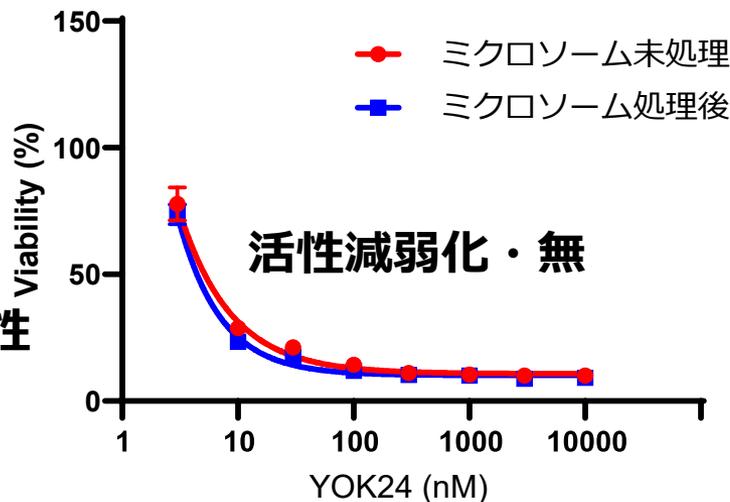
211 nM



赤痢アメーバに対する増殖阻害効果:



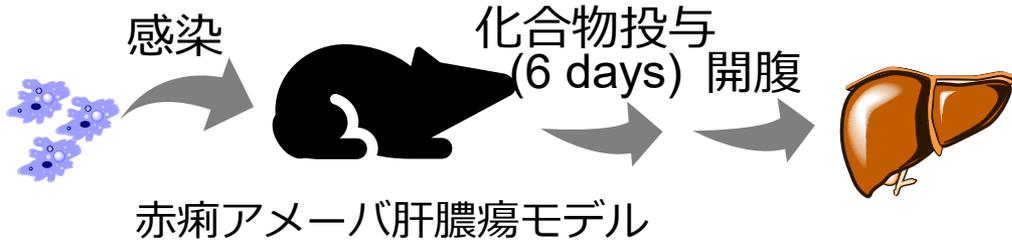
薬剤代謝抵抗性
劇的に向上



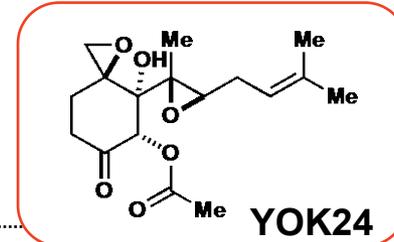
・ケムバイオハイブリッド合成にて、薬物代謝抵抗性の付与に成功した。

恒松雄太, 野崎智義, 森美穂子, 中野由美子, 志津怜太, 柴田哲男, 住井裕司,
抗赤痢アメーバ活性を有する化合物, 出願番号: 2023-133682, PCT/JP2024/029163

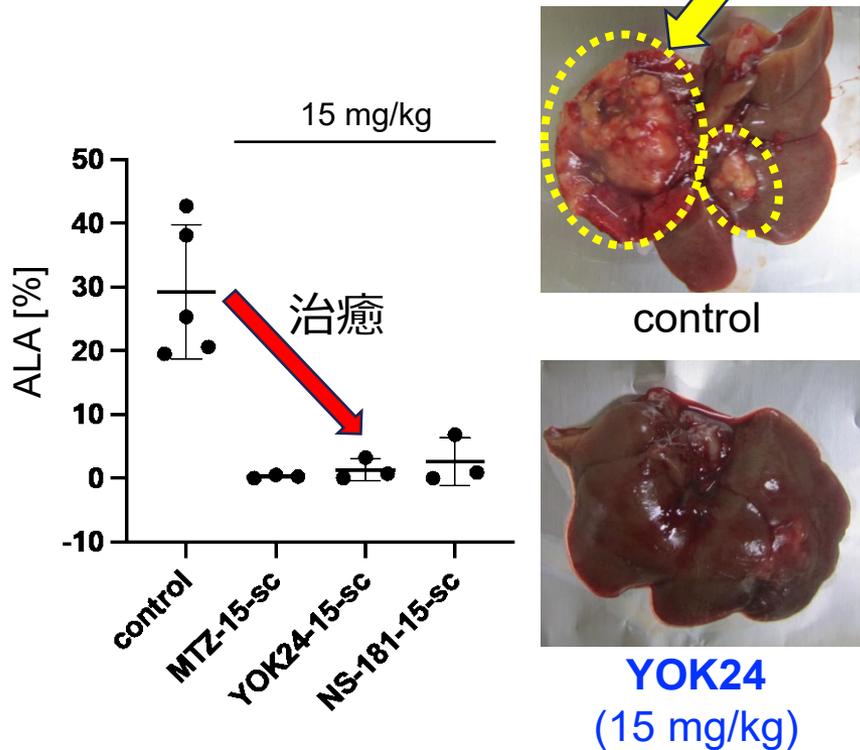
開発品の赤痢アメーバ治療効果



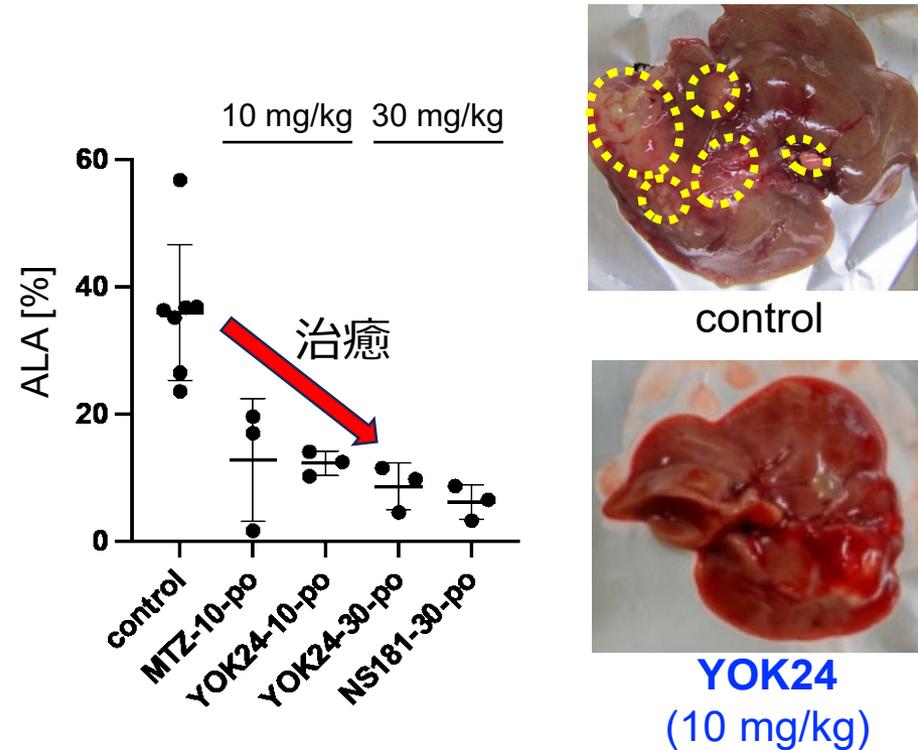
$$\text{肝膿瘍ALA (\%)} = \frac{\text{肝膿瘍重量 (g)}}{\text{全肝臓重量 (g)}}$$



皮下投与 (s.c.) 肝膿瘍



経口投与 (p.o.)

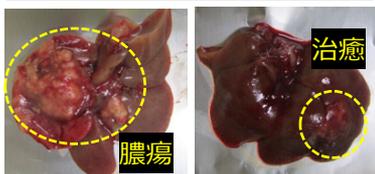


将来展望: 合成生物学技術を基盤とし、 他の疾患治療薬開発へと波及化させる

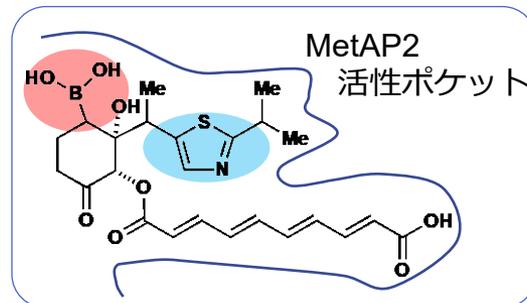
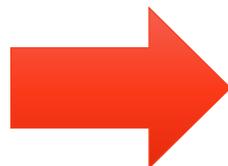
天然物骨格の改築



ハムスター肝臓癌モデル



non-treat



- ・ 高選択性
- ・ 毒性回避

天然型骨格を拡張した化合物開発

合成生物学・MetAP2創薬

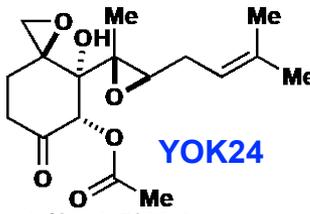
波及効果

構造式	薬剤名・年	対象疾病	成果
<p>R = </p>	<p>TNP-470 (武田薬品) 2000年頃</p>	<p>各種がん (メラノーマ, カポジ肉腫, 乳がん, 肺がん等)</p>	<p>Phase II → 中断 (神経毒性など)</p>
<p>R = </p>	<p>beloranib (Zafgen) 2015年頃</p>	<p>肥満症 (Prader-Willi症候群など)</p>	<p>Phase III → 中断 (被験者死亡)</p>
<p>R = </p>	<p>ZGN-1061 (Zafgen) 2018年頃</p>	<p>肥満症 (2型糖尿病など)</p>	<p>Phase II → 中断 (心臓血管にリスク)</p>

その他、マラリア、ジアルジア症など

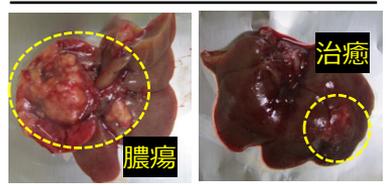
ヒト細胞に対する薬効も検証中

天然物骨格の改築

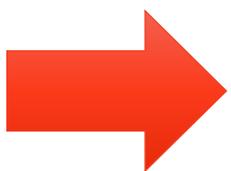


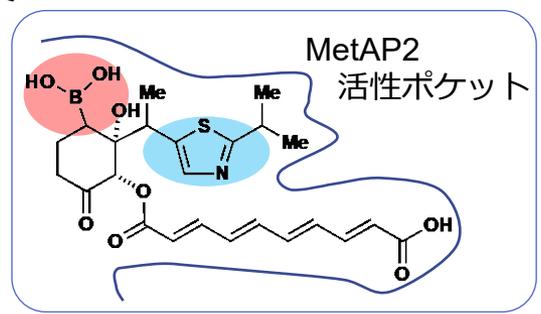
YOK24
薬物代謝抵抗性OV
ED₅₀ 16 nM

ハムスター肝臓瘍モデル



non-treat 治癒





MetAP2 活性ポケット

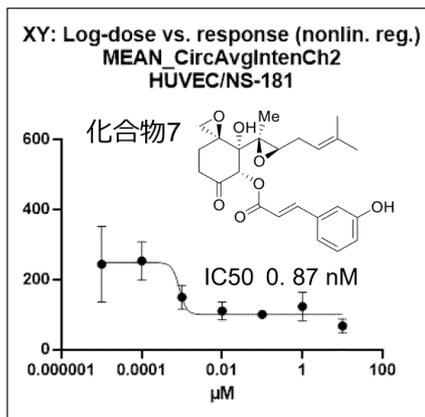
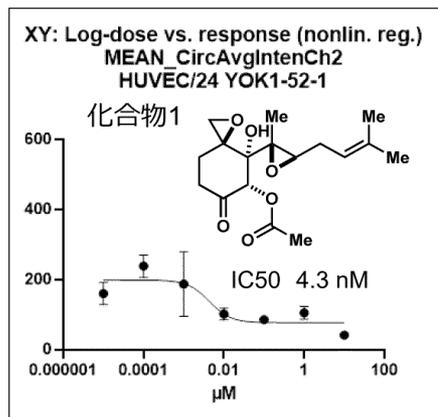
- 高選択性
- 毒性回避

天然型骨格を拡張した化合物開発

合成生物学・MetAP2創薬

波及効果

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)細胞
に対する増殖阻害活性 (血管新生阻害作用)



対象疾病	成果
各種がん (メラノーマ, カポジ肉腫, 乳がん, 肺がん等)	Phase II → 中断 (神経毒性など)
肥満症 (Prader-Willi 症候群など)	Phase III → 中断 (被験者死亡)
肥満症 (2型糖尿病など)	Phase II → 中断 (心臓血管にリスク)

その他、マラリア、ジアルジア症など

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点、化合物の構造展開上の制約を取り除き、新規性高い化合物を創出できる
- 開発品は発酵生産により大量に供給可能である。スケールアップも容易
- 未利用資源の利用化等により、生産コストをより一層下げることが可能
- 今回紹介した化合物以外だけでなく、遺伝子資源を用いて多様な化合物創出が可能

想定される用途

- 医薬品・健康成分・疾病予防剤の開発
- 上記にともなう原薬・原材料の製造
- 抗体薬物複合体のペイロード、タンパク質分解薬への応用化
- 生分解性プラスチック、バイオ燃料等への応用化

実用化に向けた課題

- 今後の臨床開発を志向し、開発化合物について各種毒性試験等を実施している。共同開発企業、協力企業を探している。
- 今後、別の疾病(がん、肥満等)について実験データを取得し、臨床適用していく場合の条件設定を行っていく。
- 実用化に向けて、構造展開・薬理活性評価のスピードを向上できるように、技術を確立する必要もある。

企業への期待

- MetAP2に限らず、非天然型天然物で新薬創製、有用物質創出に興味がある企業との連携による、特許性の高い化合物開発
- MetAP2創薬を実施している企業、または原薬供給を担う企業との連携
- 安定的な発酵生産を実現するための設備、経済的、人的なリソースの共有
- 顧みられない熱帯病に対する治療薬開発への理解と社会問題解決への貢献

企業への貢献、PRポイント

- 本技術は様々な非天然型天然物への適応が可能である。各企業の現行開発品に合わせ、本技術を適応させることにより、各事業へ貢献できると考えている。
- 本技術の基礎は構築できている。より利便性の高い技術開発を構想・開発中である。
- 本格導入にあたっての技術指導等
(代謝経路デザイン、遺伝子組換え、大量培養法など)

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : オバリシン型非天然物を産生する改変細胞
- 出願番号 : 特願2023-133681
- 出願人 : 国立大学法人東海国立大学機構
- 発明者 : 恒松雄太

- 発明の名称 : 抗赤痢アメーバ活性を有する化合物
- 出願番号 : 特願2023-133682, PCT/JP2024/029163
- 出願人 : 国立大学法人東海国立大学機構,
国立大学法人東京大学, 静岡県公立大学法人,
国立大学法人名古屋工業大学
- 発明者 : 恒松雄太, 野崎智義, 森美穂子, 中野由美子,
志津怜太, 柴田哲男, 住井裕司

産学連携の経歴 (恒松 雄太)

- 2014年-2015年 □ート製薬株式会社と共同研究実施(分担)
- 2019年- 自身の開発技術(分担)をもとに所属研究室
渡辺教授が大学発ベンチャー、
株式会社アデノプリベント社を設立
【発明の名称】 コリバクチンおよびコリバクチン産生菌の検出方法および検出プローブ
【登録番号】 日本国: 特許第7219473号(2023年1月31日登録)
 米国: US11,667,945B2(2023年6月6日登録)
【特許権者】 静岡県公立大学法人
【発明者】 渡辺 賢二、恒松 雄太、佐藤 道大
- 2019年-2021年 A-STEP機能検証フェーズ 試験研究タイプ(分担)
「大腸がん予防健診のための簡便法の確立」
- 2021年-2022年 米国Empress Therapeutics社コンサルタント
- 2021年-2022年 A-STEP令和2年度追加公募(トライアウトタイプ)
(分担)
「抗新型コロナウイルス効果を有する機能性食品の開発」
- 2024年 JST知財活用支援事業に採択

お問い合わせ先

名古屋大学 学術研究・産学官連携推進本部
メディカルイノベーション推進室

TEL: 052-744-2189

e-mail: miu2@t.mail.nagoya-u.ac.jp