

イヨルグ・フヴィラー (バーゼル大学薬学部 教授)

Jörg Huwyler (Professor, Pharmaceutical Technology, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Basel)



[経歴]

バーゼル大学薬学部製剤工学科長・教授。研究対象は、粒子状の薬物キャリアを利用した薬物送達および薬物ターゲティング分野。生化学で博士号を取得、薬学でのハビリテーション(大学で研究と教育を行う資格)を取得。その後、バーゼル大学病院とロサンゼルスUCLA医学部脳研究所へ任命されたことが教授の専門家としてのマイルストーンとなった。1999年から2006年、教授は製薬業界で勤務し、スイスのエフ・ホフマン・ラ・ロシュ社でDMPK(薬物代謝・薬物動態)のプロジェクトリーダーを務めた。2010年にバーゼル大学に移る。

[Curriculum Vitae / Biography]

Prof. Dr. Jörg Huwyler is full professor and head of the Division of Pharmaceutical Technology, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Basel. His research interests are in the field of drug delivery and drug targeting using particulate drug carriers. Important professional milestones after his PhD in biochemistry and a habilitation in pharmacy were appointments at the University Hospital of Basel and the Brain Research Institute, UCLA School of Medicine, Los Angeles. From 1999 to 2006 he joined the pharmaceutical industry, where he worked as DMPK project leader for F. Hoffmann-La Roche Ltd. in Switzerland. He joined the University of Basel in the year 2010.

新規医薬品賦形剤としてのテンプレートインバーテッド粒子

多くの患者、特に小児や高齢者にとって、医薬品の錠剤を飲み込むのは容易ではない。ここではマイクロメートルサイズの新規カプセル賦形剤を紹介する。これは小さな中空粒子であって、選択した医薬品有効成分を充填後、圧縮することで、薬剤の味がマスキングされた口腔内即崩性の錠剤を製造することができる。この粒子への薬剤の充填は、効率的な自動充填技術を利用して行う。経口投与後、唾液との接触で錠剤は数秒で崩壊する。この方法で、薬剤投与を容易にする経口製剤の低コストの製造が可能となる。この剤形が広く患者に受け入れられれば、コンプライアンスが向上し、治療成績の向上につながるだろう。この新技術の技術的側面について意見を交わし、POC（有用性・効果がコンセプトどおりに発現するか動物もしくはヒト投与により証明する）試験から得られた知見について報告する。

発表サイトURL:<https://doi.org/10.1002/adfm.202303333>

Templated inverted particles as a novel pharmaceutical excipient

We ask you to write your abstract within this page including charts if you will use them.

Many patients, and in particular small children or elderly, have difficulties to swallow pharmaceutical tablets. Here, a novel excipient is presented, which consists of micrometer-sized capsules. These tiny hollow particles can be loaded with drug substances of choice and subsequently compacted to form orally dispersible and taste-masked tablets. Drug loading is achieved using an efficient self-loading mechanism. After oral administration, tablets disintegrate within seconds when in contact with saliva. It is thus possible to produce oral dosage forms, which can be produced at low costs and greatly facilitate drug administration. High acceptance of this dosage form by patients will lead to improved compliance and therefore contribute to a better therapeutic outcome. We will discuss technical aspects of the new technology and report about findings from a clinical proof-of concept trial.

Publication: <https://doi.org/10.1002/adfm.202303333>

クラウス・ポリンガー (アエノバグループ 固形製剤部門 製造科学技術部長)

Klaus Pollinger (Head of Manufacturing Science and Technology, Aenova Group, Germany)



[経歴]

薬剤師の教育を受け、製薬技術の博士号を取得。製薬企業で10年以上の経験を持つ。氏は医薬品開発及び製造オペレーションで様々な指導的立場を経験。革新的な医薬品だけではなく医薬品開発製造受託機関 (CDMO) に関する幅広い専門知識を有する。

[Curriculum Vitae / Biography]

Klaus Pollinger is a pharmacist by training and holds a PhD in pharmaceutical technology. He has over 10 years experience in the pharmaceutical industry. Klaus held various leadership positions in Pharmaceutical Development and Manufacturing Operations. He has broad expertise in Contract Development and Manufacturing (CDMO) as well as innovative medicines.

イノベーションの実現 - 固形製剤 開発サービスにおける課題と戦略

革新的医薬品は患者に恩恵を与える。なぜなら、それが薬理的ターゲットへの特異性が高く、したがって、より高い治療効果があり、副作用はより少ないからだ。剤形に関しては、患者の服薬遵守や製剤の安定性、世界的流通の点で利点がある経口固形剤形が好まれる。

しかしながら、新規医薬品活性成分 (API) には、主に2つの課題がある。好ましくない毒性、即ち、高薬理活性成分 (HPAPI) であることと水溶性の低さである。そのどちらもが、経口固形剤形の製剤化を困難にする。加えて、医薬品開発は時間、コスト、リスクの軽減に重点を置いて実施されなければならない。

その結果、上記のような課題克服のための柔軟で効率的なソリューションを提供できる CDMO (医薬品開発製造受託機関) サービスプロバイダーが、医薬品開発サービスの適切な選択肢となることが多い。

水溶性が低いと、治療効果は限定的となるが、80%以上の今日の研究開発パイプラインにある医薬品がこれに該当する。時間と費用効率の高い開発を提供するために、サービスプロバイダーは柔軟なテクノロジーソリューションと実証済みの科学的アプローチを提供する必要がある。経口でのバイオアベイラビリティ (生体利用率) 向上のために好まれる技術は、脂質製剤や粒子設計、そして、共沈法やホットメルトエクストルージョン法、噴霧乾燥法などによって作成した非晶質固体分散体である。目的の薬物の放出を可能にする製剤によってバイオアベイラビリティと治療効果は向上する。

複雑な治療薬の増加と毒物学的評価の進歩により、HPAPI (高薬理活性成分) は増加傾向にある。医薬品開発製造企業は、製品と従業員の最大限の安全を提供しつつ、柔軟性と費用効率を確保してこのトレンドに適応していかななければならない。結局のところ、生産設備、工程、人員を柱とする HPAPI の取り扱いコンセプトへの強いこだわりが極めて重要となる。

Enabling innovation - challenges and strategies in solid dosage forms drug development services

Patients benefit from innovative drugs as they are highly specific to pharmacological targets and thus have higher therapeutic efficacy and less side effects. Regarding dosage forms oral solids are favored, as they offer high advantages in patient therapy adherence, stability and world-wide distribution.

Novel Active Pharmaceutical Ingredients (APIs), however, have two main challenges: unfavorable toxicology, i.e. high-potent APIs (HPAPIs), and poor solubility in aqueous environments. Both compromise formulation as oral solid dosage forms. Additionally, drug product development must be executed with a strong focus on time, cost and risk mitigation.

Consequently, CDMO service providers are often the right choice for drug product development services, as they offer flexible and efficient solutions to overcome the above-named challenges.

Poor aqueous solubility leads to limited therapeutic efficacy and is true for over 80% of drug substances in today's R&D pipeline. To offer time and cost-effective development, service providers must offer flexible technology solutions and a proven scientific approach. Preferred technologies to enhance oral bioavailability are lipid formulations, particle design and amorphous solid dispersions applying e.g. co-precipitation, hot-melt extrusion and spray drying. Therapeutic systems enabling targeted drug release can improve bioavailability and therapeutic efficacy.

Driven by an increase in complex therapeutics and growing sophistication in toxicological assessments HPAPIs are on the rise. Pharmaceutical developers and manufacturers must adapt to this trend by offering utmost product and employee safety and simultaneously ensure flexibility and cost effectiveness. Consequently, strict adherence to a holistic HPAPI handling concept based on the pillars production equipment, processes, people is essential.

井上 和博 (東亜薬品株式会社 開発研究所・所長、製剤研究部・部長)

Kazuhiro Inoue (Director, Institute of Pharmaceutical Development/ Director, Pharmaceutical Research Laboratories TOA PHARMACEUTICALS CO., LTD.)



[経歴]

1988年に京都大学大学院薬学研究科を卒業し、同年三共株式会社(現、第一三共株式会社)に入社。その後2020年まで製剤研究部門において経皮、経粘膜投与経路を活用するドラッグデリバリーシステムの研究開発に従事した。途中で1年間(2002年)、ライデン大学に留学し、イオントフォoresis技術の研究に従事した。また、2012年には経皮吸収促進技術に関する研究で城西大学薬学部より博士号を取得した。2020年、東亜薬品株式会社に入社して現在に至る。

[Curriculum Vitae / Biography]

In 1988, I finished master's degree in Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, then joined Sankyo Co., Ltd. (currently known as Daiichi Sankyo Co., Ltd.). Since then, I engaged in the research and development of drug delivery systems utilizing transdermal and transmucosal administration routes until 2020. In the middle of this period (in 2002), I studied the iontophoresis technology in Leiden University as a visiting scientist for one year. In 2012, I got my PhD from Josai University for the research about the transdermal drug absorption enhancing technologies. From 2020, I am working in Toa Pharmaceuticals Co., Ltd. to the present.

東亜薬品株式会社における産学連携活動の紹介

東亜薬品株式会社（以下、東亜と略）におけるインターンシップ活動を紹介する。

東亜は医薬品の自社開発と製造受託を業とし、自社開発では主に点眼剤、吸入剤、点鼻剤など投与経路が特殊な医薬品を扱い、製造受託では主に経口固形剤や経口液剤の多種多様な製品を扱っている。今後こうした業態で成長を続けるにはニッチな領域で研究能力を発揮できる人材や業務効率化に資するイノベーション創出能力のある人材が必要であり、そうした人材を発掘／育成する手段としてインターンシップ活動を利用している。

インターンシップは企業が学生に就業体験を提供する活動であるが、「採用と大学教育の未来に関する産学協議会」が2020年に公表した検討報告書ではインターンシップのあるべき姿を「その仕事に就く能力が備わっているか見極める場」、若しくは「自らの専門性を実践で活かし向上させる場」と定義しており、東亜はその提言に基づき、6つの部門（信頼性保証、製造、製剤開発、臨床試験、分析、代謝薬理）で毎年夏と冬に各グループ約10名（合計約100名）の学生を対象とする座学、施設ツアー、座談会、体験実習からなるプログラムを用意している。特に研究開発部門の体験実習では製剤調製、非臨床薬物動態試験、分析評価に関わる実務を実際の資材、設備を用いて実体験することができる。事後のアンケート調査では、業務や職場の雰囲気や事前に把握できる点、会社と自分の適性を事前評価できる点に高評価を頂いており、インターンシップは期待通りに機能していると思われる。

Academia/Industry Collaboration in Toa Pharmaceuticals Co., Ltd.

The internship program of Toa Pharmaceuticals Co., Ltd. (referred to as TOA) is introduced as one of the academia/industry collaborative activities.

TOA is a pharmaceutical company conducting research and development of drug products which utilizes special administration routes such as eye, inhalation, nasal and so on. In addition, TOA is manufacturing a variety of oral drug products as a contract manufacture. To assure the continuous growth by this business schemes, TOA needs human resources with high research capability in niche fields of pharmaceutical science and with high capability to create innovation to improve work efficiency. TOA is conducting the internship program with the expectation that it will be a good way to find and educate talents to match TOA's needs.

Internship is the activity to provide the work experience to students. In a report from 'the academia-industry council about the future of the employment and university education' in 2020, the internship is defined as the opportunity for students to confirm if they have sufficient capabilities to perform the job or as the opportunity for students to improve their skills through practice. According to this opinion, six divisions of TOA (Regulatory Compliance and Assurance, Production, Pharmaceutical Research, Analytical Research and Metabolic Pharmacological Research) are preparing their own program consisting of classroom lecture, tour of facilities, roundtable, and practices twice a year (summer and winter) for a group of about ten students (about 100 students per year). In the practice of research and development divisions, students can experience the preparation of drug formulations, non-clinical ADME studies and analytical tests with actual materials and equipment. Feedback from the students by a questionnaire after the program suggests that students put high rating on TOA's internship program firstly because students can understand TOA's business and atmosphere of working environment in advance, and secondly because students can evaluate the suitability between their capabilities and TOA's business in advance. This suggests that TOA's internship program is working as expected.

村上 達也 (富山県立大学 教授 / 京都大学物質-細胞統合システム拠点 客員教授)

Tatsuya Murakami (Professor, Dept. Pharm. Eng., Toyama Pref. Univ., Visiting Prof., iCeMS, Kyoto Univ.)



[経歴]

1998年に京都大学で博士学位(工学)を取得し、その後2003年まで協和発酵株式会社に勤務した。2003-2005年の間、JST 博士研究員として(財)癌研究会癌研究所 蛋白創製研究部に所属した。その後、藤田保健衛生大学 総合医科学研究所に助教として赴任し、2007年にJST さきがけ研究員に採用された。2009年に京都大学 物質-細胞統合システム拠点(iCeMS)に特定拠点助教として異動し、2013年に特定拠点准教授(PI)に昇任した。2012年にスイス連邦工科大学チューリッヒ校 薬学研究所(Prof. Leroux)に短期滞在した。2016年から現職および京都大学 iCeMS 客員教授。

[Curriculum Vitae / Biography]

Prof. Tatsuya Murakami obtained his PhD in 1998 from Kyoto University, Japan. He was a researcher at Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. during 1998-2003, and then a JST postdoctoral fellow at the Cancer Institute, Tokyo until 2005. He was appointed as an assistant professor of the Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University. He also got a position as JST PRESTO (Sakigake) Project Researcher in 2007. Then, he moved to the Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University in 2009 and then he was promoted to iCeMS PI in 2009 and then a program-specific associate professor (PI) in 2013. He has visited Prof. Leroux Lab in EHT Zurich in 2012 to start joint research on the development of pH-responsive polymer-coated lipoprotein drug carriers. Then, he was appointed as a full professor of the Faculty of Engineering, Toyama Prefectural University as well as a visiting professor of iCeMS, Kyoto University in 2016. His research focuses on the development of therapeutically active nanomaterials using lipoproteins.

加齢黄斑変性点眼治療のための 高密度リポタンパク質工学改変

加齢黄斑変性 (Age-related macular degeneration, AMD) は世界の 60 才以上の高齢者における第 1 位の失明原因である。現在の治療方法は、血管新生を阻害するバイオ医薬品を AMD 患者の目の中 (硝子体腔) に注射することである。この治療方法は極めて有効である反面、患者の身体的負担が大きい。AMD 点眼剤が望まれるが、現時点で皆無である。

AMD の主な病態メカニズムは、脂質代謝異常、慢性炎症、酸化ストレス、血管新生であり、これらは動脈硬化のそれと類似している。脂質代謝異常は AMD と診断される前から網膜色素上皮下の蓄積物 (ドルーゼン) として可視化される。網膜色素上皮はミトコンドリアに富み、豊富な血流による高酸素濃度下にあるため、活性酸素種の主要な発生源である。こうしてドルーゼンは酸化され、その後慢性炎症を通じて網膜色素上皮が障害される。

高密度リポタンパク質 (high-density lipoprotein, HDL) は血漿中に存在する天然の脂質ナノ粒子である。HDL の生理活性は、動脈硬化の病態メカニズムと良く対抗し、実際、HDL は抗動脈硬化作用を示す。近年、より高い治療効果を示す HDL 亜集団の探索が行われている。これに対して我々は工学改変による HDL の高機能化に関する研究を行っている。

本発表では、最近我々が独自に見出した角膜吸収促進ペプチドを含む HDL 改変体の作製と、AMD モデルマウスにおける治療効果、そしてその HDL 生理活性について紹介する。

High-density lipoprotein engineering for eye drop treatment of age-related macular degeneration

Age-related macular degeneration (AMD) is a leading cause of blindness in people of 60 years old or more all over the world. Current major treatment of (wet) AMD is intravitreal injection of biopharmaceuticals that inhibit neovascularization. While they have revolutionized the AMD therapy, the route of their administration is highly invasive. Eye drops has been desired, but there are no clinically approved ones currently.

The main pathological mechanisms of AMD are dyslipidemia, chronic inflammation, oxidative stress, neovascularization, which are similar to those of arteriosclerosis. The dyslipidemia is visualized as retinal pigment subepithelial accumulations (drusen) in a pre-AMD stage. The retinal pigment epithelium is a major source of reactive oxygen species because it is rich in mitochondria and is under high oxygen concentration due to abundant blood flow. Thus, drusen is easily oxidized, and then the retinal pigment epithelium is damaged through chronic inflammation induced by its oxidized products.

High-density lipoprotein (HDL) is natural lipid nanoparticles in blood. Its physiological activities are known to well counteract the pathophysiology of arteriosclerosis, and in fact, reconstituted HDL nanoparticles exhibit anti-arteriosclerotic effects. One of the trends in HDL research is the search for HDL subpopulations that show high therapeutic effects. In contrast, we are developing engineered HDL nanoparticles (engineered lipoproteins, eLPs) to enhance its functionalities.

In this presentation, I will introduce our recent work on the preparation of two eLPs containing corneal absorption enhancer and neovascular-targeting peptides, their HDL functionalities, and, their therapeutic effects in a mouse model of AMD.

井 城 綸 沙 (富山大学大学院 医学薬学教育部 博士後期課程3年)

Tsukasa Iki (Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Science, Ph.D. Program Third year, University of Toyama)



骨格筋萎縮により正常マウスの認知機能は低下する

我々はこれまでに、若齢のアルツハイマー病 (AD) モデルマウスの後肢を不動化すると記憶障害の発症が早まることと、萎縮した骨格筋で増加する因子ヘモペキシンを明らかにした。そこで本研究では、筋萎縮による記憶障害がADとは無関係のマウスでも起こりうるかどうかと、そのメカニズムを解明することを目的とした。

12週齢の正常マウスの後肢を不動化すると骨格筋が萎縮し、物体認知記憶が低下した。萎縮した骨格筋ではヘモペキシン発現量が増加した。現在は骨格筋ヘモペキシンのノックダウンにより記憶障害を予防できるかを検討している。以上、AD素因とは関係なく骨格筋萎縮が若齢マウスの記憶障害を発症させることを初めて見出した。

Skeletal muscle atrophy reduces cognitive function in normal mice

Our previous study revealed that muscle atrophy shifted the onset of memory dysfunction earlier in young mice model of Alzheimer's disease (AD). The atrophied muscles secreted hemopexin, and i.c.v. infusion of hemopexin induced cognitive impairment in young AD and wild-type mice. This indicates the possibility that hemopexin is directly involved in the onset of cognitive impairment. This study aimed to elucidate the onset of the skeletal muscle atrophy-driven memory impairment and establish a new strategy to prevent cognitive impairment by approaching skeletal muscle hemopexin. Normal mice (ddY, 11-13 weeks old) were used. To investigate effects of skeletal muscle atrophy specifically, we used young mice rather than aged or accelerated senescence mice. The hindlimbs were immobilized by cast-attachment for 14 days. After the cast immobilization, wet weights of hindlimb muscles were significantly lower in cast-attached mice than those in non-cast mice. Object recognition memory in the cast-attached mice was impaired. Hemopexin levels in the skeletal muscle and hippocampus were increased in cast-attached mice. We are investigating prevention of memory deficit by hemopexin antisense oligo injection to muscle.

These indicate that skeletal muscle atrophy induces cognitive impairment in young mice independently of AD pathology.

ラムヤ・ディープティ・プリギラ (バーゼル大学薬学部)

Ramya Deepthi Puligilla (PhD student, Department of Pharmaceutical Technology, University of Basel)



脊椎動物スクリーニングモデルとしてのゼブラフィッシュ稚魚

ゼブラフィッシュは、毒物学、創薬等の研究分野においてモデル生物として広く用いられ、疾患特性、分子メカニズム、臨床的関連性がヒトと類似していることから前臨床モデルとしても用いられている。ゼブラフィッシュは自然免疫と獲得免疫の両方を持つが、胚発生の初期においては、自然免疫に依存している。マクロファージやスカベンジャー内皮細胞のようなゼブラフィッシュ胚の自然免疫因子は、形態や機能において哺乳類と類似している。ゼブラフィッシュ稚魚モデルは、様々な薬物の循環動態や、腎臓及びマクロファージクリアランスのような薬理的側面を研究するための初期段階のスクリーニングツールとして使用されている。このモデルを用いて行われたミトコンドリア毒性、腎毒性、神経毒性、行動解析などの薬効及び毒性研究が報告されている。ゼブラフィッシュは、透明度が高く、低コストであり、大規模な産卵が容易であるため、薬物スクリーニングに用いられる他の動物モデルと比較して、費用対効果の高いモデルといえる。

Zebrafish larvae as a vertebrate screening model

Zebrafish (*Danio rerio*) is widely used as a model organism in research fields like toxicology, drug discovery, and disease modeling. Zebrafish is used as a preclinical model for human diseases due to the similarity in disease characteristics, molecular mechanisms, and clinical relevance. Zebrafish have both innate and adaptive immune responses. However, during early embryonic development, it relies upon innate immunity for its defense. Zebrafish embryo's innate immune elements, like macrophages and scavenger endothelial cells, mirror the mammalian system in morphology and function. The zebrafish larvae model is used as an early-stage screening tool for studying pharmacological aspects like the circulation behavior and the renal and macrophage clearance of a variety of drugs. Drug effects and toxicity studies such as mitochondrial toxicity, nephrotoxicity, neurotoxicity, and behavior analysis were reported using this model. Optical transparency, low cost, and easy spawning on large scales make zebrafish a cost-effective model compared to other animal models used in drug screening.

松田 康佑 (富山大学大学院 医学薬学教育部 博士後期課程1年)

Kosuke Matsuda (Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Science, Ph.D. Program First year, University of Toyama)



自然発症アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いたミロガバリンの作用解析

アトピー性皮膚炎 (AD) は代表的な難治性掻痒疾患であり、新規治療薬の開発及び探索が急務である。そこで我々は新規ガバペンチノイドであるミロガバリンに着目し、自然発症 AD モデルマウスを用いた作用解析を行った。

AD モデルマウスにミロガバリンを経口投与すると、マウスの自発的掻き動作数は有意に抑制された。また、健常マウスを用いたロタロッド試験では、同用量のミロガバリンはマウスの協調運動機能に影響を及ぼさなかった。最後に AD モデルマウスに対しミロガバリンを大槽内投与すると、マウスの自発的掻き動作は有意に抑制された。

以上より、ミロガバリンは主に中枢に作用し AD モデルマウスに対し鎮痒作用を示すことが示唆される。

Behavioral analysis of effects of mirogabalin using a mouse model of atopic dermatitis

Atopic dermatitis (AD) is one of chronic itch diseases. Itch caused by AD is intractable, so that it reduces the quality of life of AD patients. In this study, we investigated whether a novel gabapentinoid, mirogabalin, attenuated AD pruritus using spontaneous AD model mice.

When mirogabalin (10 mg/kg) was orally administrated, spontaneous scratching behaviors of AD model mice were significantly reduced. Then we examined whether mirogabalin affected locomotor function in healthy mice by Rotarod test. When mirogabalin (10 mg/kg) was orally administrated, locomotor function did not change. Furthermore, intracisternal injection of mirogabalin (10 μ g/site) in AD model mice also significantly suppressed scratching behavior.

These results indicate mirogabalin has antipruritic effect via central nervous system for AD model mice.

マニユエル・セルナー (バーゼル大学薬学部)

Manuel Sellner (Computational Pharmacy, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Basel)



小さな分子、大きな可能性：オフターゲット解析のための多目的プラットフォーム

医薬品開発における安全性の問題は、開発が失敗する最も一般的な理由である。従って、早期に副作用を特定することは、医薬品開発を成功させる上で非常に重要であり、開発期間、前臨床試験に使用する動物および関連する総コストの大幅な削減につながる。コンピュータによる立体構造に基づいた化合物デザインは効率的な手法であり、ここ数年の間に飛躍的な進歩を遂げてきた。分子ドッキングやスコアリングのような古典的手法と最先端のディープラーニングモデルを組み合わせることで、ヒトにおける多くのオフターゲット化合物との結合によって引き起こされる毒性を予測できるオンラインプラットフォームを開発した。さらに、このプラットフォームは、望ましくないリガンド-タンパク相互作用に関する構造的知見を示し、それを回避するヒントも提供する。質の高い構造データに焦点を当て、複数の計算プロトコルとモデルから得られた結果をまとめ、コンセンサスを得られた予測を導き出すことで高い信頼性が得られる。

Small Molecules, Big Opportunities: A Multi-Purpose Platform for Off-Target Analysis

Safety issues are the most common reason for the failure of drug candidates. Thus, the early identification of adverse effects is of major importance for successful drug development and can lead to a significant reduction of development time, animals used in preclinical studies, and the total associated costs. Computational structure-based design methods are often time and resource efficient and have experienced immense improvement during the past years. By combining classical methods such as molecular docking and scoring with state-of-the-art deep learning models, we develop an online platform that enables us to predict potential toxicity triggered by compound binding to a large number of known human off-targets. In addition, the platform offers structural insight into unwanted ligand-protein interactions providing potential hints on how to avoid them. Focusing on high quality structural data and combining results from several computational protocols and models into a consensus prediction provides a high degree of confidence.

齊 藤 元 弥 (富山県立大学大学院 工学研究科 生物・医薬品工学専攻 博士前期課程1年)

Motoya Saito (First-year master's student, Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Toyama Prefectural University)



大腸菌 L-form 細胞内での Penicillin 特異的な ROS, RNS の産生

薬剤耐性 (AMR) は深刻な問題である。抗生物質の標的である細胞壁を持たない L-form 細胞は、過去には抗生物質を投与した再帰性尿路感染症患者から単離されている。L-form 培養は嫌気条件が必要であり、これは細胞壁阻害に付随した酸素呼吸からの活性酸素種 (ROS) の発生が原因だと考えられている。一方、我々の結果では嫌気条件下において硝酸呼吸の亢進による大腸菌 L-form の生育阻害がペニシリン特異的に確認された。この結果から L-form 化に伴う既存の ROS 発生経路以外の存在が示唆された。抗生物質の作用機序の解明は重大な課題だが、その多くは未解明である。今回は L-form 細胞を利用して明らかになった抗生物質の致死性と抗生物質開発に関する新たな知見を提供する。

Penicillin specifically leads to ROS & RNS generation in E.coli L-form

Antimicrobial resistance (AMR) is a major concern within clinical settings. Bacterial L-form has no cell wall that is a target for antibiotics. In the past, L-form was isolated from recurrent urinary patients, suggesting the possibility of L-form as AMR. L-form typically requires anaerobic condition for cultivation. In previous research, it is thought that inhibition of cell wall synthesis causes reactive oxygen species (ROS) generated from aerobic respiration. On the other hand, from our result, the growth of L-form cells is inhibited by adding nitrate as a substrate for nitrate respiration even under anaerobic condition. However, growth inhibition of nitrate could be confirmed using only Penicillin as a cell wall inhibitor, using Fosfomycin could be not. It indicates that the production of ROS resulting in antibiotics is just not only caused by stimulated central carbon metabolism through inhibition of cell wall synthesis. It is crucial to understand how antibiotics kills bacteria, but even these traditional antibiotics remains unclear. Our research provides new insights into the lethality of antibiotics in ROS production and the possibility of developing novel antibiotics.

アレクサンドラ・ブラゴジェヴィッチ (バーゼル大学薬学部)

Aleksandra Blagojevic (Molecular Pharmacy, University of Basel)



自然から学ぶ：ヒルに由来するタンパク質が、新しい宿主免疫調節物質としてどのように機能するか

補体系は、病原体に対する初期防御系であるが、宿主細胞に反応して臨床症状を引き起こすこともある。補体を標的とした治療薬への関心も高まっており、天然物の中には補体阻害剤として作用するリード化合物が見出されている。例えば、アマゾンヒル由来のギガスタシンは、補体や凝固反応に不可欠なセリンプロテアーゼを阻害する。治療薬としてのギガスタシンの可能性を探るため、このタンパク質を大腸菌で発現させ、その分子的・機能的特性を明らかにした。ギガスタシンは10個のジスルフィド結合を持つにも関わらず、可溶性タンパク質として高い収量と純度で発現させることができた。ギガスタシンの優れた熱安定性により、HPLC精製によってエンドトキシンを除去し、凍結乾燥と長期保存を可能にした。発色基質アッセイにより、ギガスタシンが補体 (C1s、MASP2) および凝固系 (XIIa) のプロテアーゼを阻害することが確認され、SPR分析により標的特異性が裏付けられた。ここで重要なのは、ギガスタシンはヒト、サルおよびマウスの血清中で、補体の古典経路およびレクチン経路に対して強力な阻害活性を示したことである。我々の研究は、ギガスタシンは前臨床候補としてあるいはPK/PD特性を向上させた誘導体の分子鋳型として、補体を介する疾患の治療薬の有望な選択肢であることを証明した。

Learning from nature: How a leech derived protein can act as lead structure for novel host defense modulation strategies

The complement system is a first-line-of-defense barrier against pathogens, yet can turn against host cells to cause clinical conditions. To address the growing interest in complement-targeted therapeutics, nature can provide valuable lead structures for complement inhibitors. Owing to their intricate host defense evasion strategies, parasites are particularly interesting; e.g., gigastasin from the giant Amazon leech impairs serine proteases that are vital for complement and coagulation responses.

To explore the therapeutic potential of gigastasin, we expressed the protein in *E. coli* and characterized its molecular and functional properties. Despite containing 10 disulfide bridges, gigastasin could be expressed as soluble protein at good yield and purity. Given its exceptional thermal stability, gigastasin could be subjected to HPLC purification to remove endotoxins and enable lyophilization and long-term storage. Chromogenic substrate assays confirmed that gigastasin inhibits proteases of the complement (C1s, MASP2) and coagulation system (FXIIa), and the target selectivity was corroborated by SPR analysis. Importantly, gigastasin showed potent inhibitory activity towards the classical and lectin pathway of complement in human, monkey, and mouse serum.

Our studies establish gigastasin as promising option for the treatment of complement-mediated diseases, either as preclinical candidate or as molecular template for derivatives with enhanced PK/PD properties.

大 沼 逸 美 (富山大学大学院 医学薬学教育部 博士課程1年)

Iimi Onuma (Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Science, Ph.D. Program First year, University of Toyama)



Src による TAB1 チロシンリン酸化の分子機構

TAK1 binding protein 1 (TAB1) と p38 は、炎症応答キナーゼ TAK1 の活性化制御に関わる重要な分子である。TAB1 は TAK1 と直接会合して TAK1 を活性化する。その下流で活性化した p38 は TAB1 の Ser/Thr 残基をリン酸化することで TAK1 をフィードバック阻害する。これまでは上記の Ser/Thr 残基リン酸化が研究されてきたが、我々は TAB1 の TAK1 ドメイン内に存在する Tyr-481 に着目した。

本研究では、p38 とがん原遺伝子産物 Src が協調して TAB1 Tyr-481 のリン酸化を促進することを明らかにした。

Molecular mechanism of Src-mediated tyrosine phosphorylation of TAB1

TAK1 binding protein 1 (TAB1) and p38 are the key factors that regulate TAK1 activation. TAB1 directly binds to TAK1 and facilitates its activation. p38 which is Ser/Thr kinase activated downstream of TAK1 feedback inhibits TAK1 activation via phosphorylation of TAB1. While the above-mentioned Ser/Thr residue phosphorylation has been studied previously, we are focusing on TAB1 Tyr-481 in its TAK1 binding domain.

In this study, we clarified the mechanism by which p38 and proto-oncogene product Src cooperatively phosphorylate TAB1 Tyr-481.

マリア・カルポウチ (バーゼル大学薬学部)

Maria Karpouchtsi (PhD candidate, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Basel)



メラノーマにおける発がん性 MAPK/PI3K シグナル伝達を標的と する天然物: 標的分子の同定の試み

悪性メラノーマ (悪性黒色腫) は、最も致命的な皮膚癌である。メラノーマでは MAPK/ERK および PI3K/AKT のシグナル伝達経路での変異発現割合が他には類を見ないほど高い。これらの経路に特異的な阻害剤は、臨床では特に標的治療薬との併用において素晴らしい初期結果を示している。しかし、ほとんどの患者は僅か数か月で薬剤耐性を獲得してしまう¹。従って、メラノーマにおける発癌性 MAPK/PI3K シグナル伝達を標的とした新たな阻害剤が早急に必要とされている。

この問題への取り組みには、汎用的なアプローチが用いられた: MAPK 及び PI3K レベルでの下流経路に対する阻害活性を定量化する画期的なハイコンテンツスクリーニング (HCS) アッセイが開発された。阻害物質探索のために、大学のライブラリーの 2,576 種の粗植物抽出物² と 25,696 種の純粋な天然および合成化合物をスクリーニングした。合計 46 種の活性化化合物が、低マイクロモル領域の IC₅₀ 値を持つ MAPK および / または PI3 経路下流に対する阻害物質として見出された。現在の取り組みは、最有力のヒット化合物のターゲット同定に向けられている。私たちの戦略は、ターゲット分子との結合特性とともに発現タンパク質を用いた酵素阻害に対する類似性検索と評価である。最終的には、これらの新規阻害物質を将来の医薬品開発のリード化合物として開発する事を目指している。

Natural products targeting oncogenic MAPK/PI3K signaling in melanoma: The challenge of identifying the targets

Malignant melanoma is the deadliest type of skin cancer. It harbors an unmatched rate of mutations which frequently arise in the MAPK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways. Specific inhibitors of these pathways and especially combination of targeted therapies show spectacular initial results in the clinic. However, most patients acquire drug resistances within just a few months.¹ Novel inhibitors targeting oncogenic MAPK/PI3K signaling in melanoma are therefore urgently needed.

To tackle this issue, a generic approach was used: An innovative high-content screening (HCS) assay was developed that quantifies downstream inhibitory activity at the MAPK and PI3K levels. To this end, we screened our in-house library of 2,576 crude plant extracts² as well as additional 25,696 pure natural and synthetic compounds. A total of 46 active compounds were confirmed as downstream inhibitors of MAPK and/or PI3K with IC₅₀ values in the low micromolar range. Current efforts aim towards target identification of the most promising hits. Our strategy includes similarity searches and assessment of physical binding as well as enzymatic inhibition with heterologously produced pathway proteins. Ultimately, we envisage to develop these newly discovered inhibitors into lead compounds for future drug development.

[1] Lim, S.Y., *et al.* Mechanisms and strategies to overcome resistance to molecularly targeted therapy for melanoma. *Cancer* **2017**; 123: 2118-2129.

[2] Dürr, L., Hell, T., *et al.* High-Content Screening Pipeline for Natural Products Targeting Oncogenic Signaling in Melanoma. *J Nat Prod* **2022**; 85: 1006-1017.

五十嵐 直 哉 (富山県立大学大学院 工学研究科 生物・医薬品工学専攻 博士前期課程2年)

Naoya Igarashi (Graduate school of engineering · second-year master's student, Toyama Prefectural University)



非アルコール性脂肪性肝炎の病態形成におけるマクロファージサブセットの研究

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は生活習慣病を起因として発症する疾患である。また、有効な治療薬は未承認であり、ヒトの病態を正確に反映したモデルマウスも未確立であった。

近年、ヒト NASH に似た病態を呈する新規 NASH モデルマウスが確立された。我々は当該マウスを用いて、NASH 病態における免疫細胞の役割を解析した。その結果、発症早期から異なる2つのマクロファージサブセットが肝臓に集積することを見出した。詳細な解析の結果、一方は線維化誘導に、もう一方は抗炎症・組織修復に関与することが示唆された。

以上から、両マクロファージサブセットの機能やバランスが NASH 病態進展に関わることが示唆された。

Roles of macrophage subsets in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is caused by lifestyle-related disease such as type 2 diabetes and frequently involves obesity and metabolic syndrome. NASH develops from steatosis and progresses to fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Nevertheless, an effective drug against NASH has not been approved. Furthermore, an animal model that precisely reflects human NASH pathogenesis has not been established.

Recently, a novel NASH model mouse resembled human NASH pathology was established by Ichimura-Shimizu et al. (*Biosci Biotechnol Biochem.* ;85(4):941-94, 2021). Using this model, we investigated roles of immune cells in the development of NASH. We found that two types of differential macrophage subsets, CD11c⁺ and Ly6C⁺ macrophages, accumulated in the liver at the early phase of NASH development. Fluorescent immunohistochemistry analysis revealed that CD11c⁺ macrophages colocalized with collagen, suggesting that this subset might promote advanced liver fibrosis. In addition, we performed comprehensive gene analysis to elucidate the function of Ly6C⁺ macrophages. This macrophage subset upregulated anti-inflammatory- and tissue repair-related genes, indicating that this subset might have a suppressive effect on NASH development (*Int J Mol Sci.* ;23(21):13251, 2022).

Taken together, our data suggest that function and dynamics of two macrophage subsets may play a key role in the progression of NASH.

高岡 裕 (富山大学先端抗体医薬開発センター バイオインフォマティクス部門 教授)

Yutaka Takaoka (Professor, Division of Bioinformatics, Center for Advanced Antibody Drug Development, University of Toyama)



[経歴]

明治鍼灸大学卒業後、徳島大学大学院栄養学研究科博士前期課程で生化学を学び、母校附属病院で臨床研修の後、九州大学大学院医学系研究科分子生命科学系専攻博士後期課程進学。翌年東京大学へ転学し、熊本大学発生医学研究所へ国内留学。東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻単位取得退学(1997)後、東大医科研/理化学研究所横浜研究所 GSC ポスドク(～1999)、理化学研究所播磨研究所研究員(～2001)、岩手医科大学口腔生化学講座助手(～2004)、神戸大学大学院医学研究科 CGI センター特命講師(～2007)、同 特務准教授(～2009)、同 小児科学分野特命准教授(～2011)、神戸大学医学部附属病院准教授(～2021)を経て、富山大学学術研究部医学系教授(2021.5～)。

[Curriculum Vitae / Biography]

Yutaka Takaoka is Professor in Bioinformatics Division, Center for Advanced Antibody Drug Development, University of Toyama from 2021 and a also visiting Professor in Kobe University Graduate school of Medicine, Kobe Tokiwa University, and Kumamoto University, too. In 1999, his PhD degree was obtained from the University of Tokyo for the investigation of molecular mechanisms of amyloid pathology by using mouse models. His specialties are based on both wet (molecular cell biology) and dry experiment (molecular simulation, data science, and AI). His research is focused on the computational drug design and in silico pathology from 2007. He has a national qualification for the Practitioner of Acupuncture and Moxibustion (PAM) in 1988.

分子動力学シミュレーションによる薬物有害反応と薬効の予測

創薬プロセスと疾患の分子メカニズム研究における計算機利用は、計算機の性能が向上したことでアカデミアでの利用が現実的になって久しい。またアカデミアでの創薬に際しては、ニッチな疾患を対象とした新しい計算創薬法の創出といった、製薬会社とは異なるアプローチも重要となる。これは製薬会社と異なり、用意できる研究費やマンパワーの制限が大きいことに起因する。

実際、我々の研究チームは3人程度と貧弱な体制である。しかし、計算機に投げた後に待ち時間ができることを利用し、複数の研究を同時並行的に進めていくことが可能である。解析には、研究室のワークステーションを使う場合もあるが、計算規模が大きい場合は富嶽のようなスーパーコンピュータを利用することで解析時間の短縮も図ってきた。そして、計算機を用いた解析では、*in vitro*での結果と併せて研究を進めることも重要である。

今回の講演では、①核酸医薬の評価 [1]、②計算DR（ドラッグリパーポージング）の研究開発 [2]、③疾患病態の予測 [3]、④分子シミュレーション解析と数理モデル導出による将来予測（副作用予測と治療予後の予測 [4]、コロナウイルス亜種の感染力予測 [5,6]）、等について、これまでの研究成果を基に紹介したい。

1. Nature Communications 11:2777., 2020
2. Biomedicines 9(3):249., 2021
3. Nature Genetics 55: 1009–1021, 2023
4. PLOS ONE 14(1): e0225244., 2019
5. Microbial Risk Analysis 22: 100227., 2022
6. Microorganisms 10(10): 2090., 2022

Prediction for the adverse reaction and efficacy of medicine by molecular dynamics simulation

In the last 10-15 years, computational drug discovery and the research for molecular mechanisms of diseases has become realistic in academia due to improvements in computer performance. In the research of drug discovery in academia, it is important to take a different approach from that of pharmaceutical companies, such as creating new computational drug discovery methods for niche diseases. This is because, academia has limitations in terms of research funding and manpower and cannot do as same as pharmaceutical companies.

Our research team is small, consisting of only three members, but it is possible to conduct multiple studies in parallel by taking advantage of the latency after starting the data analysis such as MD simulation in the computer. For analysis, we sometimes use workstations in our laboratory, but when the scale of computation is large, we have also tried to shorten the analysis time by using supercomputers. Then, it is also important to proceed the research together with *in vitro* results for the computational analysis.

I introduce four outcomes in this session: (1) evaluation of nucleic acid drugs [1]; (2) research and development of computational DR (drug repurposing) [2]; (3) prediction of disease pathology [3]; (4) future prediction by molecular simulation analysis and mathematical model derivation (prediction of side effects and treatment prognosis [4]; prediction of infectivity of coronavirus subspecies [5, 6].

1. Nature Communications 11:2777., 2020
2. Biomedicines 9(3):249., 2021
3. Nature Genetics 55: 1009–1021, 2023
4. PLOS ONE 14(1): e0225244., 2019
5. Microbial Risk Analysis 22: 100227., 2022
6. Microorganisms 10(10): 2090., 2022

黒澤 信幸 (富山大学学術研究部工学系 教授)

Nobuyuki Kurosawa (Professor, Faculty of Engineering, University of Toyama)



[経歴]

1991年 富山医科薬科大学大学院薬学研究科 (博士後期課程) 修了 (薬学博士) (第1種放射線取扱主任者)
1991年-1992年 理化学研究所 研究員 アクチビン-フォリスタチン-インヒビンに関する研究
1992年-1997年 理化学研究所 研究員 糖鎖転移酵素に関する研究
1997年-2000年 名古屋大学医学部 助手 硫酸化糖鎖及びミッドカインに関する研究
2000年-2001年 富山大学工学部 助教授 成人T細胞白血病原因遺伝子に関する研究
2001年-2013年 富山大学大学院理工学研究部 (工学) 准教授 抗体工学に関する研究
2013年-2019年 富山大学大学院理工学研究部 (工学) 教授 抗体工学に関する研究
2019年-現在に至る 富山大学学術研究部工学系 教授 抗体工学に関する研究

[Curriculum Vitae / Biography]

2013-Present, Professor, Faculty of Engineering, University of Toyama
Antibody Engineering and Technology for Application

2000-2013, Associate Professor, Faculty of Engineering, University of Toyama
Research on the gene responsible for adult T-cell leukemia

1997-2000, Assistant Professor, School of Medicine, Nagoya University
Research on sulfated glycans and midkine

1992-1997, Researcher, RIKEN
Research on glycosyltransferase

1991-1992, Researcher, RIKEN
Research on activin, inhibin and follistatin

1991 PhD, Toyama Medical and Pharmaceutical University

SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の鼻腔内投与により誘導される鼻腔内 IgA 抗体の網羅的解析

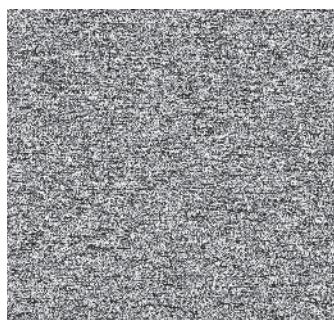
ウイルスに対する生体防御には、ワクチン接種が有効である。注射型ワクチンは血中 IgG 抗体を誘導することで感染後の重症化予防が可能であるが、インフルエンザやコロナウイルスなどの呼吸器系ウイルスに対する感染防御に重要な鼻粘膜への分泌型 IgA 抗体の誘導力が乏しいという欠点を有する。このため鼻粘膜において分泌型 IgA 抗体を誘導できる経鼻ワクチンが感染症対策の強力な武器になると期待されている。しかし現在まで、経鼻免疫により誘導される個々の分泌型 IgA 抗体がどのように感染防御に寄与しているか明らかにされていない。本研究では、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質を経鼻免疫したマウスの鼻粘膜及び非粘膜組織から多数のモノクローナル IgA 抗体を取得し、それらの遺伝子配列解析を行なった。その結果、鼻粘膜組織に由来する分泌型 IgA 抗体と非粘膜組織に由来する単量体 IgA や IgG 抗体が共通の B 細胞に由来する抗原特異的形質細胞から産生されることを見出し、経鼻ワクチンが粘膜と全身の両方に防御免疫を誘導することを分子レベルで明らかにした。更に我々は、中和活性を持たない抗原特異的単量体 IgA 抗体であっても、これらが多量体化して分泌型 IgA 抗体となることでウイルス中和活性を獲得することを見出し、経鼻免疫により鼻粘膜組織に誘導される様々なエピトープを認識する分泌型 IgA 抗体がウイルス中和活性を有することを明らかにした。これらの結果は、効果的な粘膜免疫応答を誘導するための粘膜アジュバントや粘膜抗原デリバリー法の開発など今後の経鼻ワクチン開発に大きく貢献するものと思われる。

Comprehensive analysis of nasal IgA antibodies induced by intranasal administration of the SARS-CoV-2 spike protein

Intramuscular vaccines are recognized as capable of eliciting antigen-specific systemic humoral immune responses but are generally recognized as incapable of inducing mucosal immune responses, which is important for protection against respiratory viruses such as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and influenza virus. The emergence of such highly infectious viruses may undermine the therapeutic efficacy of the intramuscular vaccines, requiring more effective vaccination to prevent the viral transmission through the upper respiratory tract. Immunoglobulin A (IgA) is differentially distributed between the systemic and mucosal immune systems. Monomeric IgA (M-IgA) is predominantly present in serum, whereas multimeric secretory IgA (S-IgA) is the most prevalent IgA in mucous secretions. Since nose epithelial cells are a primary target for airborne viruses, intranasal vaccination that induces S-IgA in the upper respiratory tract is desirable for protection against the infection and transmission of the viruses. To understand the precise contribution and molecular nature of S-IgA induced by intranasal vaccination with respect to its antiviral function, we developed over one hundred antigen-specific monoclonal M-IgAs from mice that were intranasally immunized with a SARS-CoV-2 spike protein. Antibody phylogenetic analysis revealed that antibodies obtained from nasal mucosa and non-mucosal tissues originated from common ancestral B cells, suggesting that intranasal vaccination can elicit a systemic antibody response. Analysis of the reactivity and functionality of the antibodies revealed that non-neutralizing M-IgAs recognizing various epitopes on SARS-CoV-2 spike protein can protect against SARS-CoV-2 infection when expressed as S-IgAs, indicating that IgA multimerization contributes to efficient virus neutralization on upper respiratory mucosa. Our investigation is the first to demonstrate the function of nasal S-IgA at monoclonal level, which will contribute to future intranasal vaccine development, including the improvement of mucosal adjuvants and mucosal antigen delivery methods to induce effective mucosal immune responses.

ロビン・トイフェル (バーゼル大学薬学部 教授)

Robin Teufel (Associate Professor, Pharmaceutical Biology Department of Pharmaceutical Sciences, University of Basel)



[経歴]

フライブルク大学（ドイツ）で微生物学を中心に生物学を学び、2008年に学位を取得した。引き続き、2011年まで、同大学の博士課程研究で、細菌による芳香族の異化に関する酵素学を研究し、その後、2014年12月までカリフォルニア大学サンディエゴ校（米国）で博士研究員として、細菌によるメロテルペノイドとポリケチド天然物の生合成を研究した。その後、2015年にフライブルク大学にグループリーダーとして戻り、様々な細菌による芳香族天然物の生合成に関する酵素学研究に取り組んだ。2020年フライブルクにて、微生物学の大学教授資格を修了、2022年にバーゼル大学（スイス）薬学部 生物薬学科長に就任。

[Curriculum Vitae / Biography]

Robin Teufel studied Biology at the University of Freiburg (Germany) with a focus on Microbiology and obtained his Diploma in 2008. During his succeeding PhD studies in the same place, he investigated the enzymology of bacterial aromatic catabolism until 2011. He then pursued postdoctoral research at the University of California San Diego (USA) until December 2014, where he explored the biosynthesis of bacterial meroterpenoid and polyketide natural products. He then returned to the University of Freiburg in 2015 as independent research group leader working on the biosynthesis and enzymology of various bacterial aromatic natural products. He completed his habilitation in Microbiology in Freiburg in 2020, before taking on his current position as head of the division "Pharmaceutical Biology" at the Department of Pharmaceutical Sciences, University of Basel (Switzerland) in 2022.

His current work centers on the identification of natural products from plants and microorganisms as possible drug candidates. In addition, biosynthetic pathways and involved enzymes are being investigated and engineered to generate novel bioactive natural product derivatives, e.g. with antibiotic or anticancer activity.

生物活性天然物の生合成と生物工学

微生物や植物に含まれる天然化合物は、それらを生合成を制御するコミュニケーション（例：クオラムセンシング信号）、防御（例：フィトアレクシン、毒素）、栄養獲得（例：シデロフォア）、または、相互的または対立的共生相互作用（例：保護抗生物質として）などに順応している。一方、しばしばその生合成は部分的、または全く不明であることが多い。我々の研究グループでは、植物や微生物から得られる天然物の同定と構造的特徴の解明により、それら天然物から主に感染症やがん治療などに対する医薬品候補化合物やリード化合物の探索に関して研究に取り組んでいる。独自の植物エキストラライブラリーを利用して、生化学的アッセイ系やハイコンテンツスクリーニング系による生理活性物の探索（共同研究：Dr. Eliane Garo & Maria Karpouchtsi）や、天然物生合成に関わる経路や生合成酵素の解明にも取り組んでいる。これらの知見は天然物誘導体の生物工学に合成するために応用できる。

現在、植物から得られるセスキテルペンラクトンと共に、細菌産生のトロポンやポリケチド天然物にも注目して研究を進めている。トロポンの生合成は、細菌内での通常とは異なる一次代謝と二次代謝の連関によるもので、その初期段階は様々なトロポンで同一であり、フェニル酢酸の異化により得られる酵素に依存している。この経路では、反応性の高い開鎖アルデヒド中間体が形成され、それがさらに異化されて中心代謝物となるか、トロポン生合成の場合は環化されて特徴的なトロポン足場が生成される。そして、この共通する天然物前駆体の構造の多様化は、各トロポン天然物や生産株に特異的なテーラリング酵素により媒介される。芳香族ポリケチドは、ポリβ-ケトン鎖を生成するII型ポリケチド合成によって生成されるもう一つの主要な化合物クラスである。この反応性の高い部位を環化し芳香族化した後、この経路に特異的なテーラリング酵素が炭素骨格をさらに修飾する。本発表では、芳香族ポリケチドと様々なトロポンの生合成後期において、構造的にも機能的にも異なるフラビン依存性酸化還元に関わるテーラリング酵素がどのようにトロポン足場を機能させるために利用されているかを紹介する。

さらに、アルテミシア種において、構造的にも多様なセスキテルペンラクトン誘導体の生成解明の取り組みについても紹介する。私達の得た結果は、驚くべき幅広さの生理活性天然物を生成する現在まで未知のDiels-Alderaseのような酵素を示唆している。私たちは、この酵素を同定し、潜在的な医薬品のリード化合物として、天然および非天然のセスキテルペン誘導体の生産に利用することを目指している。

Biosynthesis and Bioengineering of Bioactive Natural Products

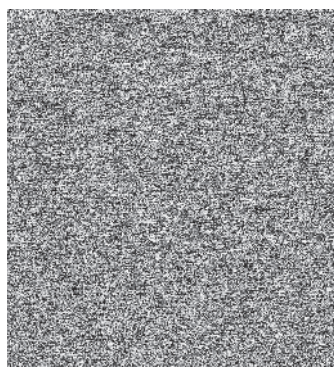
Natural products of microorganisms and plants typically adopt important roles for their producer, e.g. for communication (e.g. quorum sensing signals), defense (phytoalexins, toxins etc.), nutrient acquisition (siderophores etc.) or mutualistic/antagonistic symbiotic interactions (e.g. as protective antibiotics). Often, their biosynthesis is only partially understood or remains entirely cryptic. The Teufel group seeks to identify and structurally characterize natural products from plants and microorganisms and investigate their potential as possible drug candidates or lead compounds, e.g. for the treatment of infectious diseases or cancer. While our in-house library of plant extracts is utilized to directly screen for desired bioactivities in combination with biochemical assays or high-content screens (talks Dr. Eliane Garo & Maria Karpouchtsi), our efforts also aim to unravel complex biosyntheses of natural products and the underlying enzymology. This knowledge is then applied for the bioengineering of natural product derivatives.

Currently, our efforts focus on bacterial tropone and polyketide natural products as well as sesquiterpene lactones from plants. Tropone biosynthesis relies on an unusual intertwining of primary and secondary metabolism in bacteria, in which the initial steps are shared for the various tropones and rely on enzymes from phenylacetic acid catabolism. In this pathway, a distinct reactive open-chain aldehyde intermediate is formed, which is either further catabolized to central metabolites, or, in the case of tropone biosynthesis, cyclized to afford the characteristic tropone scaffold. The structural diversification of this shared natural product precursor is then mediated by tailoring enzymes that are specific to each type of tropone natural product and producer strain. Aromatic polyketides represent another major compound class, which are produced by type II polyketide synthases that generate poly-β-ketone chains. Following cyclization and aromatization of this highly reactive chain, pathway-specific tailoring enzymes further modify the carbon-backbone. I will showcase how structurally and functionally distinct flavin-dependent redox tailoring enzymes are employed for the functionalization of tropone scaffolds in the late-stage biosynthesis of various tropones as well as aromatic polyketides.

In addition, I present our efforts to understand how structurally diverse sesquiterpene lactone derivatives are produced in *Artemisia* species. Our results point toward a hitherto unknown Diels-Alderase-like enzyme that generates a remarkable breadth of bioactive natural products. We seek to identify and exploit this enzyme for the production of natural and unnatural sesquiterpene derivatives as potential drug leads.

エリアン・ガロ (バーゼル大学薬学部 研究員)

Eliane Garo (Research associate, Pharmaceutical Biology, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Basel)



[経歴]

ローザンヌ大学 (スイス) で薬学を学び、1999年に Hostettmann 教授の指導の下、生薬学・植物化学研究所で博士号を取得。

カリフォルニア州サンディエゴに移り、カリフォルニア大学スクリpps海洋研究所の Fenical 教授のもとで海洋天然物の博士研究員として働く。

その後、企業での職務に就き、いろいろな天然物創薬プラットフォームで働く経験を積む。最初は Sequoia Sciences 社 (カリフォルニア州サンディエゴ) でシニア研究員として勤務した後、スイスに戻り、受託研究機関 BioFocus (スイス・バーゼル) に主任研究員として入社した。

2013年より現職のバーゼル大学薬学部薬学生物学部門の研究員および講師としてハンブルガー教授のグループにて、トイフェル教授の指導のもと研究に従事。

[Curriculum Vitae / Biography]

Eliane Garo studied pharmacy at the University of Lausanne (Switzerland) and obtained her PhD in 1999 at the institute of pharmacognosy and phytochemistry under the direction of Prof. Hostettmann.

She then moved to San Diego, CA for a postdoctoral training in marine natural products working with Prof. Fenical at the Scripps Institution of Oceanography, University of California, San Diego.

She then held several positions in industry where she gained experience working with different natural product drug discovery platforms. She was first working as a senior scientist at Sequoia Sciences (San Diego, CA). After moving back to Switzerland, she joined the contract research organization BioFocus (Basel, Switzerland) as a principal scientist.

She had the opportunity to go back to academia in 2013 (in the group of Prof. Hamburger). She is working since then as a research associate and lecturer in the division of pharmaceutical biology currently under the lead of Prof. Teufel.

天然物研究におけるリード探索アプローチ： メラノーマでのがん関連 MAPK/PI3K シグナル 伝達を標的とする新規化合物の同定

天然物は多くの新薬を生み出し、創薬のためのリード化合物を提供し続けてきている。しかし、複雑な抽出物中の生理活性化合物を同定することは、依然として大きな課題である。

我々は、2D バーコード化された液体抽出物ライブラリーや HPLC ベースの活性プロファイリング、高度なメタボローム解析等の新しいテクノロジーとツールを実装したハイスループットの天然物リード探索プラットフォームを確立した。これを利用した我々の創薬アプローチとして、メラノーマのがん関連 MAPK/PI3K シグナルを標的とする天然化合物同定プロジェクトを紹介する。

メラノーマ細胞を用いた独自のハイコンテンツスクリーニング (HCS) アッセイで、2,500 種類の植物抽出物のライブラリーをスクリーニングした。UHPLC-HRMS/MS と組み合わせた HPLC ベースの活性プロファイリングにより、植物抽出物中の活性発現に関わると考えられる化合物を同定した。このアプローチにより多様な天然物由来の構造骨格を単離した。さらに本標的に活性を示す天然化合物の chemical space を更に探索するため、アッセイのフォーマットを 384 ウェルにスケールアップして 3,500 の精製天然化合物ライブラリーのスクリーニングに用いた。このワークフローは、他のハイスループットスクリーニングにも応用可能であり、効率的に天然物からリード化合物を探索するツールとして有用であると考えている。

Lead discovery approaches in natural product research: identifying novel compounds targeting oncogenic MAPK/PI3K signaling in melanoma

Natural products have been a prolific source of new medicines and continue to provide lead compounds for drug discovery. However, identifying bioactive compounds in complex extracts remains a major challenge. We have established a platform for high-throughput natural products lead discovery that implemented new technologies and tools such as 2D-barcoded liquid extract libraries, HPLC-based activity profiling, as well as advanced metabolomic analyses. To illustrate our approach, we present a project aiming to identify natural compounds targeting oncogenic MAPK/PI3K signaling in melanoma.

A library of 2'500 plant extracts was screened in an innovative high-content assay (HCS) using melanoma cells. HPLC-based activity profiling combined with UHPLC-HRMS/MS identified compounds most likely responsible for the activity in the extracts. This approach led to the isolation of a diverse set natural products scaffolds. To further explore the chemical space of natural compounds active on our targets, the assay was upscaled to a 384-well format and used to screen a library of 3'500 pure natural compounds. Additional natural product scaffolds were discovered, complementing those initially found from crude extracts. Our workflow can be used with any modern high-throughput biological assay, emphasizing the value of state-of-the art analytical tools for efficient natural product lead discovery.

西田 康宏 (富士化学工業株式会社 LS 開発本部 LS 研究開発部 課長)

Yasuhiro Nishida (Manager, LS Development Division, Fuji Chemical Industries, Co., Ltd.)



[経歴]

2005年4月～現在
富士化学工業株式会社勤務
*途中：2007年10月～2010年8月、米国 BioReal Inc. 出向
2017年4月～2019年9月
アスタファーマシューティカルズ株式会社出向
2013年9月～2014年4月
国立大学法人富山大学大学院医学薬学研究部
出向(北陸ライフサイエンスクラスター)
2010年8月～2013年8月、2014年4月～2023年
3月、富山大学医学部第一内科協力研究員
2007年 農学博士(近畿大学)
2005年3月 近畿大学大学院農学研究科 博士後期課程
応用生命科学専攻 修了

専門分野：応用微生物学、薬効薬理学、分子生物学、内
分泌学(エネルギー代謝、糖尿病)
現在のテーマ：天然物を基にした健康補助食品等の研究
開発

[Curriculum Vitae / Biography]

Apr. 2005 to Present
Employed by Fuji Chemical Industry Co.Ltd.
Oct 2007 to Aug 2010: BioReal Inc. (U.S.A)
Apr. 2017to Sep. 2019: Asta Pharmaceuticals
Inc.
Sep. 2013 to Apr. 2014: Graduate School of
Medicine and Pharmaceutical Sciences for
Research, University of Toyama
Aug 2010 - Aug 2013, Apr 2014 - Mar 2023
Cooperative Researcher, First Department
of Internal Medicine, Faculty of Medicine,
University of Toyama
2007 Ph.D. in Agriculture (Kinki University)

ORCID: 0000-0002-6169-9930
<https://www.researchgate.net/profile/Yasuhiro-Nishida-2>

Specialty: Applied Microbiology, Medicinal Pharmacology,
Molecular Applied Biology, Endocrinology
(Energy Metabolism, T2DM)
Current interests: Research and development of
nutritional supplements and other products based on
natural products

海からの贈り物：アスタキサンチンの多彩な作用

アスタキサンチン(以下 AX)は富山湾の魚介類でよくみられるカロテノイドと呼ばれる橙～赤色の脂溶性色素で、30年ほど前に強い抗酸化活性が報告された。我々、富士化学グループでは、ヘマトコッカス藻と呼ばれる淡水性の単細胞緑藻を利用し、効率的に AX を大量生産している。我々は、当初 AX の抗酸化活性、脂質過酸化抑制作用や一重項酸素の消去活性に着目し研究を行ってきた。その結果、他のカロテノイドと対照的に様々な環境でも非常に安定的に一重項酸素を消去する事を示した。

更に AX が認知されるにつれ、抗炎症作用、抗加齢作用(皮膚科領域)、抗疲労作用、認知機能改善、代謝改善作用など様々な生理活性に関する研究がなされてきた。それらの作用機序を考える上で単純に抗酸化作用によるものであると断言できない物も多くあり、その解明の為、我々は富山大学と共同研究を行ってきた。その中で AX はインスリン作用(シグナル伝達)に酸化ストレスによるインスリン抵抗性とは独立した直接的な作用を有する事を示した事を皮切りに、AX が肥満に伴う糖・脂質代謝異常を改善する作用のうちの部分的であるが抗酸化活性と独立した、『骨格筋でのミトコンドリア活性調節作用』を有する事を解明した。詳細な解析の結果、これら作用は糖尿病治療薬(ビグアナイドやイメグリミン)の標的の一つである AMPK の活性化を介した作用であり、この作用は一般的な抗酸化剤摂取で見られるような『運動抵抗性』を惹起しないユニークなものである事も明らかにした。この作用を通じ、PGC-1 α /Sirtuins 軸をも活性化し、いわゆる抗老化作用が期待される作用も明らかした。これら作用を通じ、社会的問題になりつつある慢性疾患予防に AX が貢献できる事に期待したい。

Blessing of the Sea: Pleiotropic Effects of Astaxanthin

staxanthin (AX) is an orange to red fat-soluble pigment known as a carotenoids abundant in marine products in Toyama Bay, and its strong antioxidant activity was reported about 30 years ago. We, Fuji Chemical Group, have been developing efficiently commercial-production of AX by cultivation of freshwater unicellular green alga named *Haematococcus pluvialis*. We initially focused on the antioxidant activity of AX, especially its lipid peroxidation inhibitory effect and singlet oxygen quenching activity. Our results also revealed that, in contrast to other carotenoids, AX physically quenches singlet oxygen very stably in diverse environments.

Furthermore, as AX has been recognized widely among people, numerous researches have been conducted on various physiological activities such as anti-inflammatory effect, anti-aging (especially in the field of dermatology), anti-fatigue, improvement of cognitive function, improvement of endurance performance, and amelioration of lipid/glucose metabolic dysfunction associating with obesity and type 2 diabetes mellitus. In considering the mechanism of these actions, there are many effects that cannot be simply concluded from the antioxidant effects of AX, therefore, we have conducted collaborative research with the University of Toyama to elucidate the mechanism of actions.

In the progress of this study, we found that AX has a direct effect on the regulation of the insulin signalling pathway, independent of oxidative stress-induced insulin resistance. Starting from this study, we have elucidated that AX has a "regulatory effect on mitochondrial activity in skeletal muscle," which is partially independent of its antioxidant activity in ameliorating obesity-related glucose and lipid dysregulation in diet induced obese mouse. Further analyses revealed that these effects were mediated via activation of AMPK, a target of anti-diabetic drugs such as biguanides and imeglimin, and that these unique effects did not induce the exercise resistance as commonly described in inexpertly effect with intake of antioxidant nutrients. Moreover, it was also revealed that AX activates the PGC-1 α /Sirtuins axis, which is expected to have potential anti-aging effects.

Through these actions, we believe that AX will contribute to the prevention of chronic diseases such as metabolic disorders and age related disorders, which are becoming serious social problems worldwide.

東 田 千 尋 (富山大学 和漢医薬学総合研究所 教授)

Chihiro Tohda (Professor, Institute of Natural Medicine, University of Toyama)



[経歴]

1994年3月 北海道大学大学院 薬学研究科博士後期課程薬学専攻修了、1995年3月 日本学術振興会特別研究員終了、1995年4月 富山医科薬科大学・和漢薬研究所・臨床利用部門 助手、1996年10月 富山医科薬科大学・和漢薬研究所・附属薬効解析センター 助手、2010年6月 富山大学・和漢医薬学総合研究所・附属民族薬物センター薬効解析部 准教授(研究室主宰)、2017年4月 富山大学・和漢医薬学総合研究所・病態制御研究部門・神経機能学分野 教授、2020年4月 組織改編により、富山大学・和漢医薬学総合研究所・研究開発部門・病態制御分野・神経機能学領域 教授・領域長、現在にいたる

[Curriculum Vitae / Biography]

Mar.1994; Ph.D. in pharmaceutical sciences at Hokkaido University, Japan
Oct.1993-Mar.1995; Junior Scientist, the Japan Society for the Promotion of Science
Apr.1995-Oct.1996; Assistant Professor, Department of Applied Pharmacology, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Japan
Oct.1996-Sep.2005; Assistant Professor, Research Center for Ethnomedicines, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Japan
Nov.1997-Feb.1998; Guest Researcher, National Institute of Mental Health, National Institutes of Health, USA
Oct.2005-May 2010; Assistant Professor, Division of Biofunctional Evaluation, Research Center for Ethnomedicine, Institute of Natural Medicine, University of Toyama, Japan
June 2010-Mar.2017; Associate Professor & Head, Division of Neuromedical Science, Institute of Natural Medicine, University of Toyama, Japan
Apr.2017-Mar.2020; Professor & Head, Division of Neuromedical Science, Institute of Natural Medicine, University of Toyama, Japan
Apr.2020-Present; Professor & Head, Section of Neuromedical Science, Institute of Natural Medicine, University of Toyama, Japan

Diosgeninによるアルツハイマー病脳内での軸索修復作用と臨床研究への展開

アルツハイマー病では、診断が下る20 - 30年前から、脳内のアミロイド β ($A\beta$)の蓄積が始まり神経回路の障害が進行している。そこで我々は、“神経回路網の破綻を食い止め修復することが、認知機能の維持および回復にとって決定的に重要である”、という考え研究を進めてきた。

Diosgeninはサンヤク（ヤマノイモ *Dioscorea japonica* またはナガイモ *D. batatas* の根茎）の成分として知られている。Diosgeninは、培養神経細胞において $A\beta$ が誘発する軸索と樹状突起の萎縮を元に戻すことを発見した。また記憶障害発症後のアルツハイマー病モデルマウス（5XFAD）にdiosgeninを投与すると記憶能力が回復した。Diosgeninによる脳内の神経回路の修復と、そのメカニズムを明らかにするために、マウス脳内の記憶に関与する回路を可視化し追跡した。その結果、5XFADマウスの脳内では軸索が萎縮しているが、diosgeninを経口投与すると、萎縮していた軸索が、本来繋がるべき場所まで再伸長しそれによって記憶が回復することを証明した。さらに、diosgenin投与によって軸索が再伸長する神経細胞で特異的に増加する遺伝子としてSPARCとGalectin-1を同定し、これら分子の増加により軸索が正しい方向に再伸長できる仕組みを明らかにした。

Diosgenin高濃度サンヤクエキスに記憶向上・改善作用があることをマウスで確認し、さらにヒトで、ランダム化二重盲検クロスオーバー試験により同エキスを検討した。サンヤクエキスの12週間服用によって、プラセボ群と比較して有意に健常人の認知機能が向上した。さらに我々は、軽度認知障害および軽度アルツハイマー型認知症患者に対するサンヤクエキスの効果を特定臨床研究で検討し一定の効果を確認した。

Axonal repairing by diosgenin in Alzheimer's disease and its application to clinical study

In Alzheimer's disease (AD), repairing neuronal circuits is very crucial to improve memory impairment. We have aimed to repair the neural network by natural medicines for development of a new therapeutic agent for AD. We had focused on diosgenin, which is known as a constituent of Yam (rhizome of *Dioscorea japonica* or *D. batatas*). Our studies provided solid evidence showing that administration of diosgenin to AD model mice (5XFAD) restored memory impairment. To figure out its mechanism, axon-growing neurons in the hippocampus connecting to the prefrontal cortex were selectively visualized. Diosgenin (p.o.) extended damaged axons successfully to the prefrontal cortex. The axon-growing hippocampal neurons and naïve neurons were captured by laser microdissection to serve DNA microarray. The two genes with the largest increases in expression (SPARC and Gal-1) in axon-growing neurons were focused. Overexpression of them in hippocampal neurons improved memory deficits and promoted axonal reinnervation to the prefrontal cortex in 5XFAD mice. In order to implement the results of our basic research, effects of diosgenin in humans were evaluated. Taking advantage of Borderline of Pharmaceuticals to Non-pharmaceuticals in Japan, we optioned to perform clinical studies with Yam extract as more realistic and feasible approaches than those with diosgenin itself. A randomized, double blinded, crossover clinical study for healthy subjects clarified upregulation of cognitive function by taking Yam extract for 12 weeks. Furthermore, a specified clinical trial was conducted on subjects with mild cognitive impairment and mild AD. Results suggested certain effects of the diosgenin-rich Yam extract for cognition.