次世代ゼブラフィッシュ創薬と プレジジョンメディシン

田中 利男^{1, 2)}, 小岩 純子¹⁾

要約: 21世紀の本格的ゲノム創薬時代に突入してからも、難治性疾患(アンメットメディカルニーズ)に対する画期的治療薬(First-in-Class)開発は、困難を極めてきたが、米国FDAに承認された62%の画期的新薬は、フェノタイプスクリーニングにより見出されている。次世代ゼブラフィッシュ創薬は、ハイスループット in vivo フェノタイプスクリーニングを可能にし、現在グローバルな創薬戦略にインパクトを与えている。高度免疫不全マウスに比較して、ゼブラフィッシュによる患者がん移植の生着率の高さや生着速度の速さから、抗がん薬選択のための臨床体外診断システムとして、真の個別化医療ツールになることが期待されている。従来の個別化医療のオミクス基盤に加え、患者がん移植ゼブラフィッシュによる個別化医療は、その患者の治療薬選択に活用する真の次世代プレジジョンメディシンであり、大きなパラダイムシフトが実現しつつある。

1. 21世紀ゲノム創薬時代における最重要課題

21世紀に本格的ゲノム創薬時代へ突入してから、現在もなお治療が困難なアンメットメディカルニーズの高い疾患に対する画期的治療薬(First-in-Class)開発は、依然として困難を極めている。具体的には、2008年から2010年における世界の臨床試験第Ⅱ相試験の成功率はわずか18%であり、国際的に最も深刻な問題として受け止められている。これら失敗原因の多くが、不十分な薬効であることから、従来のゲノム創薬におけるリバーサル薬理学がその役割を果たしきれていないことが、特に問題視されるようになった(1)。

新薬開発における危機的状況に対して米国NIHが、この困難性に対する研究戦略イノベーションとして

2011年10月に、定量的システムズ薬理学(Quantitative and Systems Pharmacology)白書を報告し、世界にインパクトを与えた(2)。この白書によれば、定量的システムズ薬理学とは、薬理学、ゲノム医学、情報科学が統合されたもので、多くの革新的挑戦を挙げており、中でも新しい挑戦的創薬ツールとして、ゼブラフィッシュやiPS細胞などが提案されている。ゼブラフィッシュ創薬は、脊椎動物のin vivo ハイスループットスクリーニングを有史以来初めて創薬プロセスに提供しており、グローバルな創薬戦略にインパクトを与え、明白なパラダイムシフトが実現してきている(3)。一方、1999年~2008年において米国FDAに認可された新薬を解析すると、興味深いことに62%の画期的新薬(First-in-Class)は、フェノタイプスクリーニングにより見出され確立していることが明らかとなった(4)。その結果、現状のターゲットベースなリバーサル薬理学の限界を克服するために定量的 in vivo フェノタイプスクリーニングが注目されることとなり、生体レベルでのフェノタイプやメカニズムの定量的ハイスループットスクリーニングが可能なゼブラフィッシュへの期待が大きくなっている(図1)。

2. ゼブラフィッシュ創薬によるパラダイムシフト(図1, 2)

ゼブラフィッシュの医学研究活用は、PubMedに1948年から報告されていたが、2017年は2898報になり2018年にはさらに論文が増加すると思われる。これらの研究成果は、ゼブラフィッシュ創薬に重要な基盤情報を与えている(図1)。現在までの創薬は、ハイスループットが可能なiPS細胞やES細胞などのヒト細胞や、ロースループットながら深いin vivo メカニズ

キーワード: ゼブラフィッシュ創薬, ライブ in vivo フェノタイプスクリーニング, 個別化医療, プレジジョンメディシン, 薬理フェノミクス

¹⁾ 三重大学大学院 医学系研究科 システムズ薬理学, ²⁾ 三重大学メディカルゼブラフィッシュ研究センター
(〒514-8507 三重県津市江戸橋 2-174)

E-mail: tanaka@doc.medic.mie-u.ac.jp 原稿受領日: 2019年4月5日, 依頼原稿

図1 薬理フェノミクスによるゼブラフィッシュ創薬

ム解析に活用してきた哺乳類モデルが2大モデル生物であった。そして、ゼブラフィッシュは *in vivo* ハイスクリーンングが実現する唯一のモデル脊椎動物であり、創薬モデル生物の第三極を形成し、全く新しいパラダイムを実現することになる。

ここで、ゼブラフィッシュについて簡単に述べておこう。脊椎動物であるゼブラフィッシュは、ヒト疾患ゲノムにおける相同性が約80%ある。ゼブラフィッシュ胚は、受精後1日で心拍動が認められる等、臓器形成が著しく早く、また、交配時には1組1回で約200個の受精卵を得ることができる。そして、受精卵も含め、体長3mmの稚魚は透明で、精密なフェノタイプ解析を可能にし、96穴プレートを用いれば、1mg以下の各化合物で *in vivo* における薬効と安全性の大規模スクリーニングが完了できる。また、動物愛護との調和性が高く、欧米では早くから活用されている。

実際ヨーロッパでは2008年からはラットを抜いて、ゼブラフィッシュがマウスの次に頻用されているモデル生物となっている。さらに、世界中で多数のゼブラフィッシュ創薬ベンチャーが創業しており、また、国際的メガファーマが、薬効・安全性研究でゼブラフィッシュを積極的に活用している。ここでは初期にゼブラフィッシュフェノタイプスクリーニングが新薬開発に著効した成功5例を紹介する。

①ゼブラフィッシュスクリーニングによりプロスタグランジン E2 安定誘導体が造血幹細胞を増加させる化合物として2007年に報告された(5)。これはゼブラフィッシュ創薬のフロントランナーであり、2014年の臨床試験第Ⅱ相においては、白血病とリンパ腫における臍帯血移植前の *ex vivo* 調製薬として使用

されている(6)。

② ORC-13661 は、米国ワシントン大学(シアトル)においてゼブラフィッシュにおけるアミノグリコシド性難聴に対する予防薬として開発され、アミノグリコシドによる有毛細胞死を防止する化合物として臨床試験に突入している(7)。

③ゼブラフィッシュ創薬によるオーファンドラッグの典型例としてのEPX-300は、Dravet症候群の希少疾病用医薬品として米国FDAから指定を受けた。

④2009年に、ゼブラフィッシュ急性骨髄性白血病モデルによる既存薬スクリーニングから、シクロオキシゲナーゼ(COX)2阻害薬の有効性が発見された(8)。そして、急性骨髄性白血病と骨髄異型性症候群のCOX阻害薬による臨床試験が開始されている(9)。

⑤ *kcnh2* 遺伝子変異によるゼブラフィッシュ LQType2 症候群モデルによる1200の既存薬スクリーニングの結果、糖質コルチコイド flurandrenolide に強力な薬効が見出された(10)。

特筆すべきことに、これら5例はすべてヒト病態モデルゼブラフィッシュによるフェノタイプスクリーニングがスタート点になっている。すなわち従来のオミクス解析から決定した創薬ターゲットによるリバース薬理学が、現状ではあまりに確率が悪い状況にあり、画期的新薬の62%がフェノタイプ創薬で見出されていること、つまり現代オミクス医学において、ヒト臨床病態情報から臨床的に有効な創薬ターゲットにたどり着く分子還元主義の確率が低いことを明確に示唆していることになる。この苦境を打破する創薬戦略として、ヒト臨床病態を可能な限り正確に面(フェノタイプ)として写し取るヒト病態モデルゼブラフィッシュによるフェノタイプスクリーニングが注目され、リード化合物の発見に利用されてきている(全体像: 図2)。

以上の実績から、ゼブラフィッシュ創薬は、単なる安価なマウスや追加的薬理試験ではなく、フォワード薬理学とリバース薬理学を統合したものであり、最終的には強力なPK/PDモデルとして構築され、真に21世紀的システムズ薬理学戦略であることが明らかである。特にゼブラフィッシュ創薬の原理的な特徴は、ヒト臨床病態を正確に写し取ったヒト病態モデルゼブラフィッシュによるフェノタイプスクリーニングから開始することであり、薬理フェノミクスを創薬エンジンとする新世代フォワード薬理学として確立されつつある。またゼブラフィッシュ創薬は、単なる遺伝子やタンパク質ネットワークの相互作用の変化をシュミレーションするといったシステムズ生物学の薬理応用で

図2 従来のリバース創薬プロセスとゼブラフィッシュ創薬プロセスのパラダイム比較

はなく、全く新しい創薬パラダイム（図1，図2）を、我々に提示してくれている。そして、ゼブラフィッシュ創薬は確実に第三極の開発戦略を提供しており、今後創薬全体への影響が明らかになると思われ、わが国でも先進的な製薬や食品おける取り組みがなされ、発展が期待されている。

3. 次世代ゼブラフィッシュ創薬への革新

ゼブラフィッシュ創薬は、創薬戦略にパラダイムシフトを確実に起こしているが、まだ国際的に10年余の歴史しかなく技術的にも経験的にも未熟な部分を多く残しているため、本来持っているポテンシャルを引き出せていない可能性がある。そこでまず、ゼブラフィッシュ創薬のプロセスの強化が必須であると考え、特に①広範なヒト病態モデルの拡充と高度化、②ゼブラフィッシュ病態フェノミクス解析の先端技術、③in vivo ハイスクリーニングの自動化、定量化、高速化、高度化は、ゼブラフィッシュ創薬の成否を決める最重要技術革新であり、それら課題についての現状と取るべき対策について述べる。ただし、これらの実現には、膨大な情報を必要とし、IoTのゼブラフィッシュ版であるInternet of Zebrafish (IoZ) 展開によるビッグデータのAI創薬への発展が不可欠となるのは想像に難くない。

①ヒト病態モデル創生には、ヒト化などの高度化と種類の多様性が必要条件となっている。まず他の種でも可能となったゲノム編集技術（ZFN, TALEN, CRISPR など）により、ゼブラフィッシュでも広範なヒト疾患遺伝子のノックアウトやノックインが容易に

なされ、多様な単一遺伝子疾患モデルが開発されている。一方、ゼブラフィッシュ薬物動態遺伝子のノックアウトおよびヒト薬物動態遺伝子のノックインなどにより全身の薬物動態をできるだけヒト化することが可能になりつつあり、さらにヒトiPS細胞などの移植によるヒト化キメラゼブラフィッシュの創生により組織レベルでのヒト化ゼブラフィッシュが実現しつつある（図2）。

②ゼブラフィッシュ病態フェノミクス解析技術は、ゼブラフィッシュ創薬のコアテクノロジーの一つで、ゼブラフィッシュ創薬において定量的フェノタイプ解析がスタート点であることからすべてを決定する重要な基盤技術となる（図1，図2）。脊椎動物であるゼブラフィッシュは、多くの場合ヒト臨床フェノタイプとの類似性やそのオミクス機構における相同性も期待されている。すなわち、ゼブラフィッシュ病態モデルの定量的フェノタイプスクリーニングの新しいポテンシャルとしてスループットとフェノタイプ外挿性を同時に実現していることから、ヒト臨床オミクスに外挿した薬効定量解析が可能となる。しかしながら、現時点ではオミクス基盤における外挿性が保証された疾患フェノタイプモデル（すなわちゼブラフィッシュ疾患モデルフェノミクス）が不十分であり、その先端化と拡充が、緊急課題となっている（11-15）。

③脊椎動物でライブin vivo スクリーニングがハイスクループットで実現することが、ゼブラフィッシュ最大の特徴であることは明らかである。国際的に2000年から、96ウェルプレートによるゼブラフィッシュスクリーニングが開始されたが、現在我々は1536ウェ

ルプレートゼブラフィッシュスクリーニングシステムなどを目的別に開発している。具体的には、ゼブラフィッシュ創薬の成否を決める受精卵品質管理プロトコルを、世界で初めて1536ウェルプレート受精卵タイムラプス共焦点イメージングにより確立してきている。このシステムは、サリドマイドなどの発生毒性メカニズム解析(16–21)に、新しい洞察を可能にしている。ゼブラフィッシュ疾患ゲノム全体はヒトと約80%の相同性があるとされているが、この差異はむしろヒト臨床がん細胞移植部位の宿主ゼブラフィッシュ微小環境とヒト移植がん細胞の次世代DNAシーケンサー(RNAseq)などによる相互作用解析に有利な点ともいえる(22–24)。TALENやCRISPRによるゲノム編集がゼブラフィッシュにも高効率に応用できることなどから、創薬ターゲットバリデーションや新薬作用機構の解明におけるスループットを圧倒的に高くしている。これまでも我々は、Dravet症候群や筋ジストロフィーなどの単一遺伝子疾患モデルに加えメタリックシンドロームや心不全などの生活習慣病モデルを多数創生し、メカニズムや化合物のスクリーニングを展開している(25–37)。さらに、種々の色素欠損ラインと細胞選択的蛍光タンパク質トランスジェニックゼブラフィッシュとの交配などにより、各ヒト病態モデルのライブin vivoイメージング用ゼブラフィッシュを現時点で64種類(MieKomachiシリーズ)開発し、定量的フェノタイプスクリーニングに活用してきている(22, 23, 30, 32)。一方で、トランスジェニックゼブラフィッシュでカバーできない生体内細胞ライブin vivoイメージング用プローブを多数創製し、各病態

イメージングに活用している(37–41)。これらの基盤技術をさらに強化して、オミクス研究の急速な発展に対応できる独自に開発したZFplateを核にフェノミクス解析システムを構築するため、ライブin vivoイメージングをコアに、高速化、定量化、高度化等によるフル自動化とInternet of Zebrafish(ゼブラフィッシュ版のIoT)やAI創薬の実現を目指している。すなわち、行動やin vivoイメージングなどのフェノタイプ解析における膨大な変数項目測定を可能にし、オミクスとの相関解析を実現し、新しいメカニズム解明を実現している。さらに、ヒトがん幹細胞移植モデルを確立して(24)、新規蛍光ヒトがん幹細胞阻害薬を発見し、ヒトがん幹細胞におけるステムネス機構を解析している(42)。

4. ゼブラフィッシュ創薬とプレジジョンメディシン (図3)

2015年米国前大統領オバマによるPrecision Medicine Initiativeにより、グローバルにも先端がん個別化医療としてのプレジジョンメディシンが急速に展開されている。現在のプレジジョンメディシンの主な基盤は患者のオミクス情報であり、薬物治療応答性を予測しようとするものである。しかし、患者オミクス情報と既知の医学医療情報による個別化医療は統計学的予測に依存するため、その精度向上には、多数の患者の大量のオミクス情報が不可欠であり、膨大なコストと時間が不可欠となる。一方、ゼブラフィッシュ創薬の有効性が明らかになりつつある薬理フェノミクスとして、先端がんプレジジョンメディシンにおいては、患者が

図3 オミクス個別化医療とフェノミクス個別化医療システムの原理

ん移植モデル (Patient-Derived Xenograft Model : PDX) を活用することが国際的に急激な発展を示している. 1970 年代から米国 NCI で開始されたヒト臨床がん細胞培養による新しい治療薬開発は満足すべきものでないことから, 国際的にも患者がん移植モデルへ大きくシフトしようとしている (43, 44).

現在世界では高度免疫不全マウスによる患者がん移植モデル (PDX mouse model) が圧倒的に活用されているが, いくつかの課題があり, 正常免疫であるゼブラフィッシュによる新しい患者がん移植モデル動物 (PDX zebrafish model) として我々などが挑戦している. すなわち高度免疫不全マウスと比較して, ゼブラフィッシュへの患者がん移植の圧倒的な生着率や生着スピードが, 免疫システムが未熟な受精後 36 時間以内に移植すれば速いこと, 移植に必要なヒトがん細胞が 100 個以下であり, 2 日間で薬効が定量解析できるなどの利点から, 我々をはじめ世界で患者がん検体のゼブラフィッシュ移植が試みられている. これらヒト臨床がん細胞のゼブラフィッシュ移植システム (PDX zebrafish model) は, PDX mouse model より圧倒的に迅速な治療薬感受性試験が実現しており, 抗がん薬選択のための臨床体外診断システムとして, 次世代個別化医療ツールになることが明らかにされている (図 3). 従来の個別化医療は, 遺伝子多型 (ゲノム), 遺伝子発現レベル (トランスクリプトーム), プロテオーム, メタボロームなどのオミクスを基盤とした大規模集団統計学の予測により構築されようとしてきた. 一方, 臨床がん移植ゼブラフィッシュによる個別化医療は, 各患者がん検体のフェノミクス解析結果をその患者の治療薬選択にリアルタイムで活用することができ, 真の次世代プレシジョンメディシンであるといえよう.

著者の利益相反: 開示すべき利益相反はない.

文 献

- 1) Arrowsmith J. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10:328-329.
- 2) <http://www.nigms.nih.gov/training/documents/systemspharmawpsorger2011.pdf>
- 3) MacRae CA, et al. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14:721-731.
- 4) Swinney DC, et al. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10:507-519.
- 5) North TE, et al. *Nature.* 2007;447:1007-1011.
- 6) Hagedorn EJ, et al. *Exp Cell Res.* 2014;329:220-226.
- 7) Chowdhury S, et al. *J Med Chem.* 2018;61:84-97.
- 8) Yeh JR, et al. *Nat Chem Biol.* 2009;5:236-243.
- 9) Klimek VM, et al. *Leuk Res.* 2012;36:570-574.
- 10) Peal DS, et al. *Circulation.* 2011;123:23-30.
- 11) Kasahara K, et al. *Nat Commun.* 2018;9:758.
- 12) Ashikawa Y, et al. *Heliyon.* 2017;3:e00266.
- 13) Oka T, et al. *BMC Physiol.* 2010;10:21-33.
- 14) Hiramitsu M, et al. *Sci Rep.* 2014;4:3708.
- 15) Nishimura Y, et al. *Front Pharmacol.* 2015;6:257.
- 16) Kawabata M, et al. *Toxicol Sci.* 2015;143:374-384.
- 17) Sasagawa S, et al. *Front Pharmacol.* 2016;7:57.
- 18) Inoue A, et al. *Fundam Toxicol Sci.* 2016;3:79-87.
- 19) Nishimura Y, et al. *Congenit Anom (Kyoto).* 2016;56:18-27.
- 20) Nishimura Y, et al. *Congenit Anom (Kyoto).* 2015;55:1-16.
- 21) Nishimura Y, et al. *Front Pharmacol.* 2015;6:199.
- 22) Shimada Y, et al. *Methods Mol Biol.* 2014;1165:223-238.
- 23) Zhang B, et al. *Tumour Biol.* 2014;35:11861-11869.
- 24) Zhang B, et al. *PLoS One.* 2014;9:e85439.
- 25) Ashikawa Y, et al. *Front Pharmacol.* 2016;7:206.
- 26) Sasagawa S, et al. *Front Pharmacol.* 2016;7:162.
- 27) Sasagawa S, et al. *Front Pharmacol.* 2016;7:142.
- 28) Kawase R, et al. *Front Pharmacol.* 2016;7:126.
- 29) Sasagawa S, et al. *Front Pharmacol.* 2016;7:119.
- 30) Zhang B, et al. *Transl Res.* 2016;170:89-98.
- 31) Liu F, et al. *Stroke.* 2014;45:3698-3703.
- 32) Kuroyanagi J, et al. *FEBS Lett.* 2014;588:3409-3416.
- 33) Shimada Y, et al. *Nutr Metab (Lond).* 2015;12:17.
- 34) Hasumura T, et al. *Nutr Metab (Lond).* 2012;9:73.
- 35) Tainaka T, et al. *Nutr Metab (Lond).* 2011;8:88.
- 36) Shimada Y, et al. *Int J Obes (Lond).* 2013;38:1053-1060.
- 37) Nishimura Y, et al. *ACS Chem Neurosci.* 2013;4:1183-1193.
- 38) Watanabe K, et al. *BMC Neurosci.* 2016;11:116.
- 39) Watanabe K, et al. *BMC Neurosci.* 2012;13:101.
- 40) Shimada Y, et al. *PLoS One.* 2012;7:e52549.
- 41) Umemoto N, et al. *Mol Biotechnol.* 2013;55:131-142.
- 42) Zhang B, et al. *Biomaterials.* 2015;52:14-25.
- 43) Hidalgo M, et al. *Cancer Discov.* 2014;4:998-1013.
- 44) Letai A. *Nat Med.* 2017;23:1028-1035.

Next generation zebrafish-based drug discovery and precision medicine

Toshio Tanaka^{1, 2)}, Junko Koiwa¹⁾

¹⁾*Department of Systems Pharmacology, Mie University Graduate School of Medicine*

²⁾*Mie University Medical Zebrafish Research Center*

Abstract. Even after entering the era of genomic drug discovery in the 21st century, development of a breakthrough therapeutic drug (first-in-class) for intractable diseases (unmet medical needs) has been extremely difficult, but to the US FDA 62% of the approved first-in-class drugs are found by phenotypic screening. The next-generation zebrafish drug discovery enables high-throughput quantitative live in vivo phenotypic screening, and has been impacting global drug discovery strategies now. Compared to severe immunodeficient mice, zebrafish is expected to become a true individualized medical tool as a clinical ex vivo diagnostic system because of the high efficiency and speed of engraftment of patient-derived cancer xenotransplantation. Phenomics-based personalized medicine with the patient-derived cancer xenograft zebrafish in addition to conventional omics platform of individualized medicine is a true next-generation precision medicine to utilize for selection of therapeutic drugs and decision of their doses for the patient, and emerging paradigm shift is realizing in this century.