

GloSensorを用いたHigh Throughput Screening評価系構築及びGPR3インバーストアゴニストの探索

鮎川, 公美子

<https://hdl.handle.net/2324/4475051>

出版情報 : Kyushu University, 2020, 博士 (臨床薬学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

博士論文

**GloSensor を用いた
High Throughput Screening 評価系構築
及び
GPR3 インバーサアゴニストの探索**

令和2年度

九州大学大学院薬学府 臨床薬学専攻

薬理学分野 社会人博士課程

鮎川 公美子

指導教員 津田 誠 教授

目次

略記.....	1
序論.....	3
1. 実験方法.....	9
1-1 主な試薬及び化合物等.....	9
1-2 細胞及びプラスミド.....	10
1-3 各種受容体発現細胞株の樹立.....	11
1-4 GloSensor 試験用凍結細胞ストックの調製.....	13
1-5 HTRF cAMP 試験.....	13
1-6 培養細胞を用いた GloSensor 試験.....	14
1-7 凍結細胞ストックを用いた GloSensor 試験.....	14
1-8 PathHunter 試験.....	15
1-9 データ解析および統計処理.....	16
2. 実験結果.....	18
2-1 hGPR3 恒常活性の確認.....	18
2-2 GloSensor 発光値と細胞内 cAMP 量の相関.....	20
2-3 hGPR3 GloSensor 試験及びカウンター試験の構築.....	22
2-4 hMC4R 評価系の構築.....	27
2-5 hGPR6, hGPR12, mGPR3 一過性発現細胞の樹立.....	29
2-6 パイロットスクリーニング.....	32
2-7 プライマリースクリーニング.....	35
2-8 再現性及びカウンター試験.....	38
2-9 濃度依存性評価.....	41
2-10 β アレスチンシグナル評価.....	44
2-11 化合物プロファイリング.....	46
考察.....	51
総括.....	61
引用文献.....	65
謝辞.....	71

略記

本論文内では以下に示す略記を使用する。

35% BSA : Albumin Solution (35%) FractionV from Bovine

AGRP : agouti-related protein (Human, 86-132)

caGPCR : constitutively active G protein-coupled receptor

cAMP : cyclic adenosine monophosphate

CBD : cannabidiol

CB1 : cannabinoid receptor type 1

CB2 : cannabinoid receptor type 2

cDNA : complementary DNA

CRE : cAMP response element

%CV : % of coefficient of variation

DMEM : Dulbecco's modified eagle medium [high glucose]

DMSO : Dimethyl sulfoxide

D-PBS(-) : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

FBS : fetal bovine serum

FDA : Food and Drug Administration

GPCR : G protein-coupled receptor, Gタンパク質共役型受容体

HA : human influenza hemagglutinin

HTS : high throughput screening

hADRB1 : human adrenoceptor beta 1

hADRB1 PathHunter細胞 : PathHunter eXpress ADRB1 CHO-K1-Arrestin

HBSS : Hanks' Balanced Salt Solutions

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

hGPR3 : human GPR3

hGPR3 PathHunter 細胞 : PathHunter eXpress GPR3 CHO-K1-Arrestin

hGPR6 : human GPR6

hGPR12 : human GPR12

hMC4R : human melanocortin 4 receptor

HTRF : homogeneous time resolved fluorescence

IBMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine

mGPR3 : mouse GPR3

PBS : phosphate-buffered saline

PDE : phosphodiesterase

PKA : protein kinase A

RIA : radioimmunoassay

RFUs : relative luminescence units

SAR : structure-activity relationship

S/B 比 : signal to basal ratio

S.D. : standard deviation, 標準偏差

S.E.M. : standard error of the mean, 平均値の標準誤差

SPA : scintillation proximity assay

TR-FRET : time-resolved fluorescence energy transfer

序論

GPCRは7回膜貫通型の特徴的な構造を持つ膜受容体であり、ヒトゲノムにおいて約800種類からなる大きなスーパーファミリーを形成している(Marchese et al. 1999; Fredriksson et al. 2003)。また、様々な刺激を介した細胞間コミュニケーションにおいて主要な役割を果たしており、視覚、心機能、神経伝達、免疫といった多種多様な生理機能や疾患に関与していることが知られている(Bockaert and Pin 1999; Vassilatis et al. 2003)。実際、FDAに承認された治療薬のおよそ3分の1はGPCRをターゲットにしたものであることから、創薬においても非常に魅力的なターゲットクラスであると言える(Overington, Al-Lazikani, and Hopkins 2006; Hauser et al. 2017; Santos et al. 2017)。それゆえ、機能未知なGPCRについて、生理学的機能解析を進めることは、創薬において重要な意味を持つ。

これまでも製薬企業やアカデミアにおいて、天然あるいは合成したGPCRリガンドのスクリーニングを実施し、見出されたリガンドを用いて薬理的なGPCRの特徴づけが実施されてきた(Stadel, Wilson, and Bergsma 1997; Wilson et al. 1998; Hinuma, Onda, and Fujino 1999; Civelli et al. 2001)。しかしながら、いまだに150種類程度のGPCRが内因性リガンド不明と言われ、これらはオーファンGPCRに区分されている(Wise, Jupe, and Rees 2004)。一方で、 δ オピオイド受容体がアゴニスト非存在下においても内在活性を持つことから、caGPCRの存在について提言された(Costa and Herz 1989)。いくつかのオーファンGPCRは、内因性リガンド非存在下においても恒常活性を持ち、それによって生理機能を発揮している可能性がある。近年、オーファンGPCRに区分されるGPR21は、恒常活性を持ち、インスリン抵抗性亢進及びエネルギー恒常性に関与していることが示唆された(Leonard et al. 2016)。さらに、caGPCRの過剰発現やアミノ酸変異により恒常活性が増大したGPCRが様々な病態に関連していることも知られている。具体的には、caGPCRであるGPR18は母斑と比較してメラノーマで発現量が有意に上昇しており、アポトーシスを抑制することで腫瘍細胞生存に関与しているという報告や(Qin et al. 2011)、ロドプシン受容体における変異が網膜色素

変性症を引き起こす報告(Dryja et al. 1990), 甲状腺刺激ホルモン受容体における変異が甲状腺機能亢進症を引き起こす報告などが挙げられる (Parma et al. 1993)。

インバースアゴニストとは, アゴニスト非依存的な $caGPCR$ の恒常活性を阻害するリガンド群を指しており, アゴニストによって惹起された活性のみを相殺するニュートラルアンタゴニストとは区別されている(Milligan, Bond, and Lee 1995; Leurs et al. 1998)。例えば, ヒスタミンH1受容体は, ヒスタミンを内因性リガンドとする受容体であると同時に, ヒスタミン非存在下でも恒常活性を持つことが近年明らかとなってきた(Bakker et al. 2000; Bakker et al. 2001)。抗ヒスタミン薬の多くはインバースアゴニスト作用があると報告されており, インバースアゴニスト作用を持つ抗ヒスタミン薬はニュートラルアンタゴニスト作用のみを持つ抗ヒスタミン薬と比較して, 過敏症の原因となるヒスタミン受容体発現の増加を有意に抑制することが知られている(Das et al. 2007; Mizuguchi et al. 2012; Mizuguchi et al. 2013; Kitamura et al. 2015)。このようにインバースアゴニストは, ニュートラルアンタゴニストと異なり, 活性型 $GPCR$ を不活性型のコンフォーメーションに安定化し, 内在的活性を抑制することで治療薬としての効果を発揮する。そのため, 受容体機能未知のオーファレン $caGPCR$ に関しては, 詳細な病態生理学的機能解析を実施するうえでインバースアゴニストが非常に有用なツールとなり, その生理機能によっては最終的にインバースアゴニストが有効な治療薬となる可能性がある。

インバースアゴニスト探索のスクリーニングにおいては, アンタゴニストの探索と異なり, 一般的にアゴニストは必要としない(Chalmers and Behan 2002)。アゴニスト非依存的な恒常活性は, アゴニストにより惹起された活性よりも低いことが多く, アッセイの評価ウインドウが小さくなる。よって, インバースアゴニストのスクリーニングはアンタゴニストのスクリーニングよりも評価系のクオリティを担保することが困難であると考えられる。そのため, ひとつの選択肢として, 人工的にアミノ酸変異を導入することで恒常活性を増大させ, 評価ウインドウを大きくした状態でスクリーニングを実施するという方法がある

(Chalmers and Behan 2002)。しかし、人工的な変異を導入した受容体を用いて見出された化合物は、必ずしも野生型の caGPCR 活性を阻害するとは限らないため、本来、野生型の GPCR を使用の方が望ましい。つまり、微量の恒常活性を、いかに高感度に安定して検出できるかどうか、精度の高いインバースアゴニストスクリーニング実施可否の鍵となってくる。GloSensor は、生細胞における cAMP 量の変化をリアルタイムに検出可能なバイオセンサーであり、感度及びダイナミックレンジに優れた比較的新しい技術である (Binkowski et al. 2011)。ホタルルシフェラーゼ内部に cAMP 結合ドメインが融合した構造を持ち、 cAMP 結合ドメインに cAMP が結合し立体構造変化を引き起こすことで、ルシフェラーゼ活性を有し、可逆的に発光する (Fig. 1)。これら GloSensor の特徴を見る限り、インバースアゴニスト探索のスクリーニングに適していると考えられるが、これまでに報告されている GloSensor を使用したスクリーニングの事例は数が限られており、かつ小スケール (250 化合物から 2000 化合物) の化合物ライブラリーを用いた報告のみであった (Pantel et al. 2011; Gilissen et al. 2015; Chan et al. 2016)。そのため、GloSensor の大規模スクリーニングの実施可能性については十分に検証されていない。

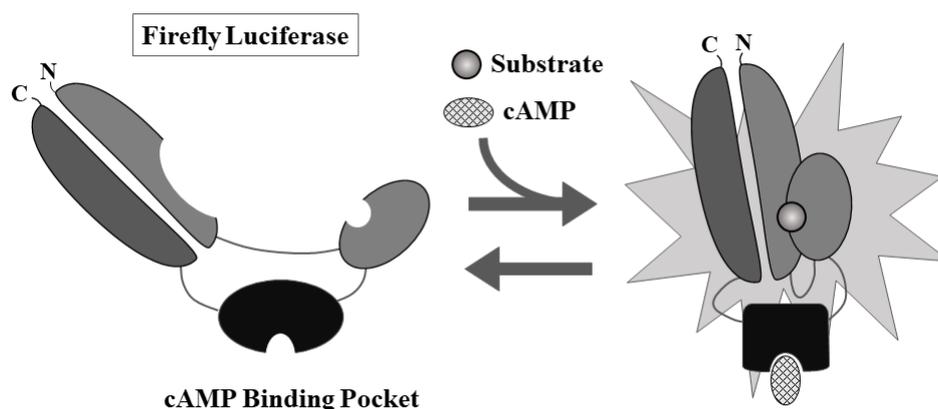


Figure 1. GloSensor 概要 (引用改変(Binkowski et al. 2011))

オーファン GPCR のひとつである GPR3 は、クラス A ファミリーに属する Gs タンパク質共役型の GPCR である(Eggerickx et al. 1995)。GPR3 発現プラスミドのトランスフェクションにより、種々の細胞において細胞内 cAMP 量を有意に増加させ(Eggerickx et al. 1995; Uhlenbrock, Gassenhuber, and Kostenis 2002), 内因性 GPR3 をノックアウトすることで、神経系における神経突起伸長といった GPR3 の機能が阻害される(Tanaka et al. 2007)。これらの知見から、GPR3 はリガンド非存在下でも活性を持つ caGPCR であると認識されている。中枢神経系、特に海馬や視床下部、大脳皮質、小脳などに高発現しており(Iismaa et al. 1994; Tanaka et al. 2007), ノックアウトマウスに基づく研究により、GPR3 はアルツハイマー病や不安障害、うつなどの神経疾患への関与が示唆されている (Thathiah et al. 2009; Valverde et al. 2009)。一般的に、うつ病のような気分障害においては、細胞内 cAMP 量の増加による PKA 活性化が深く関わっていることが知られている(Dwivedi and Pandey 2008)。また、GPR3 は β アレスチンシグナルを介してアミロイド β タンパクの産生亢進を引き起こす(Thathiah et al. 2009; Thathiah et al. 2013)。つまり、GPR3 に対するインバーサゴニストはうつ病やアルツハイマー病の治療薬となる可能性がある (Fig. 2)。

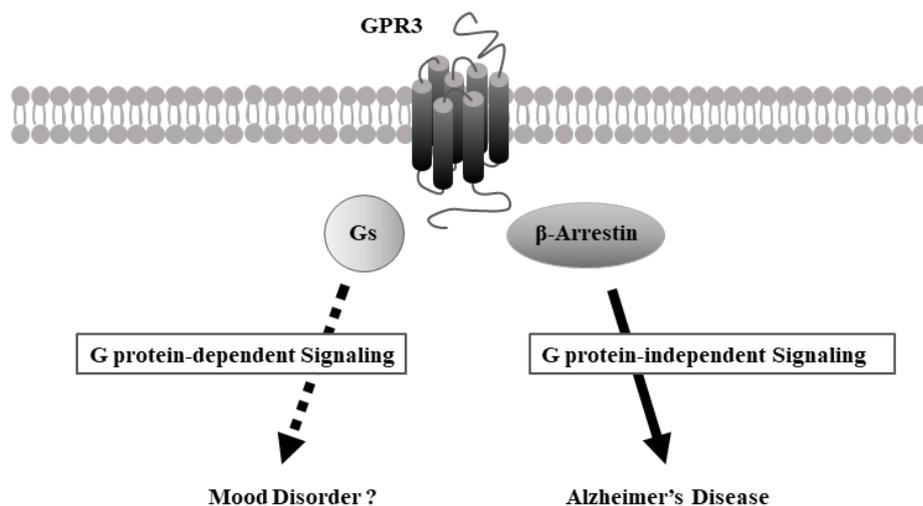


Figure 2. GPR3 下流シグナル経路の概略図

しかしながら、現状、GPR3において病態への関係性が示唆されるcAMP及びβアレスチンの両シグナル伝達経路に対して、インバースアゴニスト活性を示す確度の高いGPR3インバースアゴニストの報告はない。AF64394は、GPR3のcAMP産生に対するインバースアゴニスト活性EC₅₀値として50nMを示し、同一ファミリーであるGPR6及びGPR12に対しても30倍以上の選択性を持つ化合物であるが、βアレスチンに対するインバースアゴニスト活性の報告はない(Jensen et al. 2014)。CBDは、GPR3のβアレスチンに対するインバースアゴニスト活性EC₅₀値として1.22 μMと報告されているが、同時にGPR6に対するEC₅₀値は0.18 μMとGPR3より強い活性を持ち、かつcAMP産生に対するインバースアゴニスト活性の報告はない(Laun and Song 2017)。

このように、少なくともGPR3選択的なインバースアゴニストと言える化合物はAF64394しか存在せず、一方で、cAMPシグナル阻害の報告のみであるためTarget Engagementの観点からはGPR3インバースアゴニストとしての妥当性が十分に検証されているとは言えない。Target Engagementの確認とは、標的GPCRと化合物との直接的な相互作用を確認することを指し、ツール化合物の創出やProof of Concept研究などを含め創薬全般において非常に重要な概念である(Wagner 2008; Morgan et al. 2012)。GPR3の場合は、現時点で有用なラジオリガンドが存在しないため結合試験による直接的な確認は難しい。そのため、複数の評価系を用いてGPR3選択的な活性を確認することで、化合物のTarget Engagementの確度を間接的に上げることが現実的である。

そこで、本研究では、大規模なインバースアゴニストスクリーニングに耐えうる評価系としてGloSensor試験の構築を検討し、約30万の化合物ライブラリーを用いたスクリーニングにより、cAMP及びβアレスチンの両シグナルを阻害する新たなGPR3選択的なインバースアゴニストを見出すことを目的とした。caGPCRの恒常活性は受容体発現量依存的に増加することから、テトラサイクリンにより遺伝子発現誘導が可能なT-RExシステムが本評価に最適であると判断した。GloSensor及びT-RExシステムを併用した大規模スクリーニング

としては初めての報告であり、HTS に使用可能であれば、他の **caGPCR** に対しても十分に応用可能なスクリーニング戦略であることが示される。**GloSensor** 試験を用いて選抜された化合物は、 β アレスチンに対するインバースアゴニスト活性も確認し、また、**GPR3** と同一ファミリーに属する **GPR6** 及び **GPR12** に対する選択性を評価することで (Joost and Methner 2002)、疾患への関連性が示唆される両シグナル伝達経路を阻害する、**GPR3** 選択的な確度の高い化合物を見出すことが出来ると考えている。

1. 実験方法

1-1 主な試薬及び化合物等

スクリーニングには，日本たばこ産業株式会社が保有する化合物ライブラリーを使用した。また，本試験で使用した主な試薬を以下に記載する。

GloSensor cAMP Reagent : Promega Corporation

CO₂-independent medium : Life Technologies Corporation

Fetal bovine serum (Tetracycline-free) : Life Technologies Corporation

Fetal bovine serum : HyClone

Albumin Solution (35%) FractionV from Bovine : Sigma-Aldrich Corporation

3-isobutyl-1-methylxanthine : 和光純薬工業株式会社

forskolin : Sigma-Aldrich Corporation

Dimethyl sulfoxide : ナカライテスク株式会社

PathHunter eXpress Kit Chemiluminescence Detection : DiscoverX Corporation (現 Eurofins Scientific)

Agouti-Related Protein (Human, 86-132) : 株式会社ペプチド研究所

(-)-Isoproterenol hydrochloride : Sigma-Aldrich Corporation

ICI 118,551 : Tocris Bioscience

EndoFree Plasmid DNA Maxi Kit : QIAGEN

Competent high DH5α : 東洋紡株式会社

Lipofectamin 2000 : Life Technologies Corporation

OPTI-MEM : Life Technologies Corporation

テトラサイクリン : Life Technologies Corporation

Cell Dissociation Buffer, enzyme-free, PBS-based : Life Technologies Corporation

セルバンカー2 : 十慈フィールド株式会社

384 Well Low Flange White Flat Bottom Polystyrene TC-Treated Microplates : Corning
Incorporated

ProxiPlate-384 Plus : PerkinElmer

cAMP HiRange Kit : Cisbio Bioassays

Hanks' Balanced Salt Solutions 10× : Life Technologies Corporation

HEPES Buffer Solution (1 M) : Life Technologies Corporation

1 M 水酸化ナトリウム溶液 : 和光純薬工業株式会社

1-2 細胞及びプラスミド

日本たばこ産業株式会社において構築したプラスミドあるいは市販品を使用した。トランスフェクションに用いたプラスミド DNA は、形質転換した大腸菌を終濃度 100 µg/mL アンピシリンを添加した LB 培地で一晩培養し、EndoFree Plasmid DNA Maxi Kit を用いて精製した。以下にリストを示す。

【細胞】

HEK293 : American Tissue Culture Collection (DS ファーマバイオメディカル株式会社)

T-Rex-293 : Thermo Fisher Scientific

PathHunter eXpress GPR3 CHO-K1-Arrestin : DiscoverX Corporation (現 Eurofins Scientific)

PathHunter eXpress ADRB1 CHO-K1-Arrestin : DiscoverX Corporation (現 Eurofins Scientific)

【プラスミド】

pT-REx-DEST30/hGPR3 (NM_005281) : 日本たばこ産業株式会社

pcDNA3.1(+)-hMC4R (NM_005912) : 日本たばこ産業株式会社

pGloSensor-22F cAMP plasmid : Promega Corporation

pGloSensor-20F cAMP plasmid : Promega Corporation

pME18S-mGPR3 (NM_008154) : 日本たばこ産業株式会社

pME18S-hGPR6 (NM_005284) : 日本たばこ産業株式会社

pLHC-hGPR12 (NM_005288) : 日本たばこ産業株式会社

pcDNA3.1(+) : Life Technologies Corporation

pcDNA3.1Hygro(+) : Life Technologies Corporation

1 - 3 各種受容体発現細胞株の樹立

(1) T-REx/hGPR3/GloSensor 安定発現細胞株

T-REx/hGPR3/GloSensor 安定発現細胞株は、T-Rex-293 細胞に pT-REx-DEST30/hGPR3 及び pGloSensor-22F cAMP plasmid をトランスフェクションし、薬剤耐性細胞株を得ることで樹立した。本細胞株は、10% FBS (Tetracycline-free), 100 units/mL Penicillin-Streptomycin (Gibco, Life Technologies Corporation), 5 µg/mL Blastcidin S (Life Technologies Corporation), 250 µg/mL G418 二硫酸塩溶液 (以下 G418, ナカライテスク株式会社), 300 µg/mL hygromycin B (Life Technologies Corporation) を含む DMEM [high glucose] (Life Technologies Corporation) を用いて、37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。

まず、テトラサイクリンリプレッサータンパク質を発現している T-REx293 細胞 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、T-Rex-293/hGPR3 を樹立した。pT-REx-DEST30/hGPR3 プラスミドは、HA-tag を付加した hGPR3 cDNA を pENTR/D-TOPO ベクターに導入した後に、LR clonase II (Thermo Fisher Scientific) を用いて pT-REx-DEST30 に組み換えることで得られた。Lipofectamine2000 を用いて T-REx293 細胞に pT-REx-DEST30/hGPR3 プラスミドをトランスフェクションし、G418 耐性を示したクローンの中から、フローサイトメトリーを用いたテトラサイクリン発現誘導時の hGPR3 発現レベルを指標にして T-Rex-293/hGPR3 を選抜した。続いて Lipofectamine2000 を用いて、T-Rex-293/hGPR3 に対して pGloSensor-22F cAMP プラスミドをトランスフェクションした。hygromycin B 耐性コロニーを複数の 96 well plate にピックアップし、24 well plate, 6 well

plate へと培養をスケールアップした。評価に使用する T-REx/hGPR3/GloSensor 安定発現細胞株の選抜は、cAMP 分解作用を持つ PDE の阻害薬である IBMX 存在下にて、テトラサイクリンによるヒト GPR3 発現誘導に伴う GloSensor 発光値の上昇を指標として行った。

(2) hMC4R/GloSensor 安定発現細胞株

hMC4R/GloSensor 安定発現細胞株は、HEK293 細胞に、pcDNA3.1(+)-hMC4R 及び pGloSensor-20F cAMP plasmid をトランスフェクションし、薬剤耐性細胞株を得ることで樹立した。本細胞株の培養には、10% FBS, 100 units/mL Penicillin-Streptomycin, 250 µg/mL G418, 300 µg/mL hygromycin B を含む DMEM [high glucose]を用いた。

Lipofectamin 2000 を用いて、pcDNA3.1(+)-hMC4R 及び pGloSensor-20F cAMP plasmid を HEK293 細胞にトランスフェクションした。播種 2 日後から hygromycin B 及び G418 存在下で薬剤選抜を開始し、hygromycin B/G418 耐性コロニーを複数ピックアップした。

hMC4R/GloSensor 安定発現細胞株の選抜は、GloSensor 試験において、アゴニストである α -MSH 添加による発光値の増加及びインバーサアゴニストである AGRP 添加による発光値の低下を指標に行った。

(3) hGPR6/GloSensor, hGPR12/GloSensor, mGPR3/GloSensor 一過性発現細胞の調製

10% FBS を含む DMEM 培地にて HEK293 細胞を T-225 フラスコに播種し、CO₂ インキュベーター内で一晩培養した。翌日、10% FBS を含む DMEM 培地に再度培地交換し、Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションした。DNA は、pGloSensor-22F cAMP plasmid, 各レセプター発現プラスミド, 及び pcDNA3.1(+),あるいは pcDNA3.1Hygro(+),を合計 90 µg/フラスコとなるよう使用した。hGPR6 は 2.25 µg pME18S-hGPR6 と 65.25 µg pcDNA3.1(+),を, hGPR12 は 2.25 µg pLHC-hGPR12 と 65.25 µg pcDNA3.1(+),を, mGPR3 は 0.675 µg pME18S-mGPR3 と 66.8 µg pcDNA3.1Hygro(+),をそれぞれ 22.5 µg pGloSensor-22F

cAMP plasmid と混合した。

トランスフェクション条件の最適化の際は、6 well plate にスケールダウンしてトランスフェクションし、D-PBS(-)で洗浄後、Cell Dissociation Buffer を加えて回収した細胞を GloSensor 細胞懸濁液用培地に再懸濁して GloSensor 試験に使用した。

1 - 4 GloSensor 試験用凍結細胞ストックの調製

特に記載がない限り、GloSensor 試験には凍結細胞ストックを使用した。

hGPR3 GloSensor 試験に使用する T-REx/hGPR3/GloSensor 細胞は、0.3 µg/mL テトラサイクリン添加後、24 時間 CO₂ インキュベーターにて培養し hGPR3 の発現を誘導した。D-PBS(-)で洗浄し、PBS-based Cell Dissociation Buffer を加えて、培養フラスコから細胞を回収した。回収した細胞懸濁液はセルバンカー2 に 5×10⁶ cells/mL となるように再懸濁し、-80°C で凍結保存、hGPR3 発現誘導凍結細胞ストックとした。

カウンター試験用には、T-REx/hGPR3/GloSensor 安定発現細胞にテトラサイクリンを添加せず、同様の方法で凍結細胞ストックを調製し、hGPR3 発現非誘導凍結細胞ストックとした。選択性試験用の HEK293/hMC4R-GS20F 安定発現細胞株についても、カウンター試験用細胞と同様の方法で凍結細胞ストックを調製した。

hGPR6/GloSensor 一過性発現細胞、hGPR12/GloSensor 一過性発現細胞及び種差試験用の mGPR3/GloSensor 一過性発現細胞に関しては、トランスフェクション後、一晩培養し、カウンター試験用細胞と同様の方法で凍結細胞ストックを調製した。

1 - 5 HTRF cAMP 試験

細胞内 cAMP 量の定量は、cAMP HiRange kit (Cisbio Bioassays) を用いた HTRF 試験により実施した。T-REx/hGPR3/GloSensor 安定発現細胞株に 0.1 µg/mL テトラサイクリン添加後、24 時間 CO₂ インキュベーターにて培養し hGPR3 の発現を誘導した。翌日、培地を除いて、

化合物及びストック溶液の 80 分の 1 濃度の cAMP-d2 を含んだ 20 mM HEPES/HBSS, pH7.4 を 15 μ L/well で添加した。室温で 30 分間インキュベーション後、ストック溶液の 40 分の 1 濃度の anti-cAMP Cryptate を含む細胞溶解液を 15 μ L/well で添加した。室温、遮光下で 1 時間インキュベート後、混合液 20 μ L/well を ProxiPlate-384 Plus に移し、SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader で時間分解蛍光を測定した。測定条件は、Excitation wave length ; 340 nm, 1st Emission wave length ; 616 nm, 2nd Emission wave length ; 665 nm, Pulse length ; 50 μ s, Number of pulses ; 8, pulse delay ; 7.41 ms, measurement delay ; 30 μ s, Integration time ; 500 μ s とした。各 well の 665 nm のエミッションで得られた時間分解蛍光を A カウント (アクセプター), 616 nm のエミッションで得られた時間分解蛍光を B カウント (ドナー) とした。A カウント/B カウント \times 10000 を htrf ratio とし, X 軸に cAMP 濃度の対数, Y 軸に htrf ratio をそれぞれプロットした標準曲線からサンプルの cAMP 量を決定した。

1 - 6 培養細胞を用いた GloSensor 試験

T-REx/hGPR3/GloSensor 安定発現細胞を 5000 cells/20 μ L/well で 384 well plate (384 Well Low Flange White Flat Bottom Polystyrene TC-Treated Microplates, Corning #3570) に播種, 終濃度の 5 倍のテトラサイクリンを 5 μ L/well で添加した。CO₂ インキュベーター内で一晩培養した後, 培地を除いて 20 μ L の 2% Glosensor cAMP Reagent (Promega Corporation), 10% FBS (Tetracycline-free) を含む CO₂-independent medium を添加した。室温で遮光にて 2 から 3 時間インキュベートした後, 終濃度の 5 倍の化合物溶液を 5 μ L/well で添加し, 30 分後の発光を SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices) にて測定した。

1 - 7 凍結細胞ストックを用いた GloSensor 試験

各凍結細胞ストックは 37°C の恒温槽で 3 から 5 分間温め融解した。細胞ストック液は

10% FBS (Tetracycline-free) を含む CO₂-independent medium に懸濁して、1200 rpm で 5 分間遠心分離を行った。細胞ペレットを 10% FBS (Tetracycline-free) を含む CO₂-independent medium に再懸濁して、細胞濃度が 2.5×10⁵ cells/mL になるように調製した。細胞懸濁液に終濃度 2%となるよう GloSensor cAMP Stock Reagent を添加後、MultiDrop Combi を用いて 20 μL/well で 384 well plate に播種し、遮光下・室温で 3 時間以上インキュベーションした。終濃度の 5 倍の化合物溶液を 5 μL/well で添加し、30 分後の発光を EnVision 2104 マルチラベルプレートリーダーを用いて、Ultra Sensitive Luminescence モード、0.2 秒/well にて測定した。

1 - 8 PathHunter 試験

PathHunter 試験は、ドナーである ProLink ペプチドタグを融合させた GPCR とアクセプターである EA を融合させた β アレスチンの会合によって生じる β ガラクトシダーゼ活性を発光として測定する評価系である (Fig. 3)。

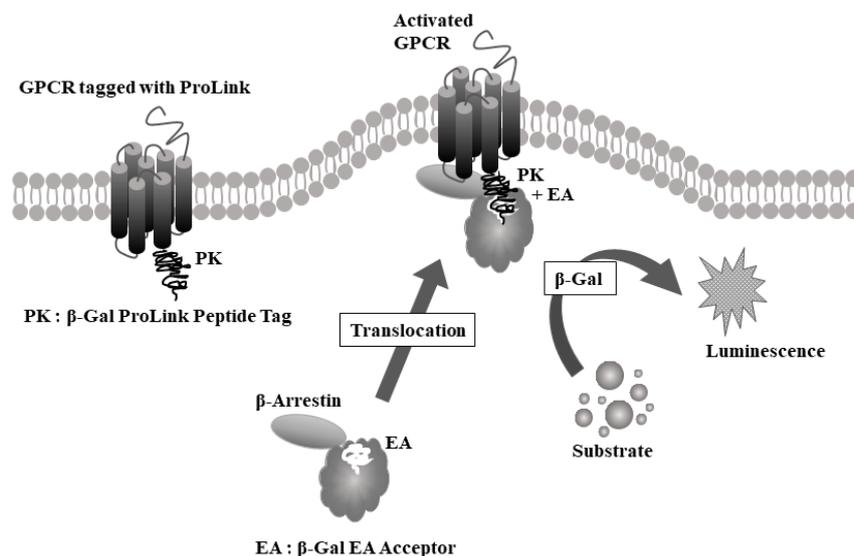


Figure 3. PathHunter 試験概要 (引用改変(Bassoni et al. 2012))

DiscoverRx 社 (現 Eurofins Scientific) のプロトコールに基づいて評価を実施した。購入した hGPR3 PathHunter 細胞の凍結細胞ストックを 37°C の恒温槽で約 1 分間温めた。融解した

細胞ストック液を1バイアル当たり10 mLのPathHunter eXpress Cell Plating 1 Reagentに懸濁した。hADRB1 PathHunter細胞は同様に、PathHunter eXpress Cell Plating 0 Reagentに懸濁した。細胞懸濁液を20 µL/wellで384 well plateに播種して、CO₂インキュベーター内で約24時間培養した。化合物溶液は、0.1% BSAを含む10 mM HEPES/HBSS, pH7.4を用いて、終濃度の5倍になるよう調製した。hADRB1 PathHunter試験の際には、終濃度の5倍濃度に相当する5 µM (-)-isoproterenol及び0.1% BSAを含む10 mM HEPES/HBSS, pH7.4を用いて化合物を希釈し、陽性対照化合物としては、ICI118,551（選択的ADRB2アンタゴニスト）を用いた。

細胞播種後約24時間で、Biomek NXを用いて化合物溶液を5 µL/wellで細胞に添加し、CO₂インキュベーター内で培養した。6時間後に、Biomek NXを用いて12.5 µL/wellのPathHunter Detection Reagentを添加して、室温で1時間インキュベート後、発光値を測定した。測定は、EnVision 2104 マルチラベルプレートリーダーを用いてUltra Sensitive Luminescenceモード、0.2秒/wellの条件で行った。hGPR3 PathHunter試験においては、ブランクは定義せずに、化合物非存在下の発光値をコントロールとして、%controlとして活性を表記した。hADRB1 PathHunter試験においては、化合物非存在下の発光値をブランク、1 µM (-)-isoproterenol存在下の発光値をコントロールとして、%controlとして表記した。

1-9 データ解析および統計処理

データ解析は、GraphPad Prism version 6.07 (GraphPad Software) 及び TIBCO Spotfire Analyst version 7.11.1 (TIBCO) を用いて行った。

濃度依存性試験及びcAMP標準曲線は、以下に示す式を用いた非線形回帰分析を実施した。

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\log EC_{50} - X) * \text{Hill Slope})}) \quad (1)$$

スクリーニングにおいて、評価系クオリティの指標である Z' factor(Zhang, Chung, and Oldenburg 1999)は以下に示す式を用いて計算された。

$$Z' = 1 - (3\sigma_{C+} + 3\sigma_{C-}) / |\mu_{C+} - \mu_{C-}|, (2)$$

μ_{C+} はコントロールのシグナル平均値、 μ_{C-} はブランクのシグナル平均値、 σ_{C+} 及び σ_{C-} はそれぞれの標準偏差を示す。具体的には、hGPR3 GloSensor 試験において、コントロールとして 0.5 mM IBMX 添加 well, ブランクとして DMSO 添加 well を使用した。hGPR3 非誘導細胞を用いたカウンター試験において、コントロールとして 0.5 μ M forskolin 及び 0.5 mM IBMX 添加 well, ブランクとして 0.5 mM IBMX 添加 well を使用した。

2. 実験結果

2-1 hGPR3 恒常活性の確認

GPR3 は恒常活性を持つ Gs タンパク質共役型オーファン GPCR として知られている。GPR3 の発現が増加するに伴い、アゴニスト非存在下においても、Gs タンパク質を介したアデニル酸シクラーゼの活性化、そして細胞内 cAMP 濃度の上昇が見られる(Eggerickx et al. 1995; Uhlenbrock, Gassenhuber, and Kostenis 2002; Tanaka et al. 2007)。本研究に用いた T-REx-293 システムには、テトラサイクリンリプレッサータンパク質及びオペレーター配列を持つ CMV プロモーターが組み込まれており、テトラサイクリンによって発現量調節が可能である。構築した T-REx/hGPR3/GloSensor 安定発現細胞株は、GloSensor-22F を常時発現し、テトラサイクリンによって hGPR3 の発現調節が可能な細胞株である。実際に、本細胞を用いて、1 mM IBMX 存在下におけるテトラサイクリン濃度依存的な cAMP 応答性が確認された (Fig. 4)。これは、アゴニスト非添加条件にもかかわらず、受容体の発現によって cAMP 応答性が惹起されていることを示しており、過去に報告されている内容と合致する (Eggerickx et al. 1995; Uhlenbrock, Gassenhuber, and Kostenis 2002; Tanaka et al. 2007)。

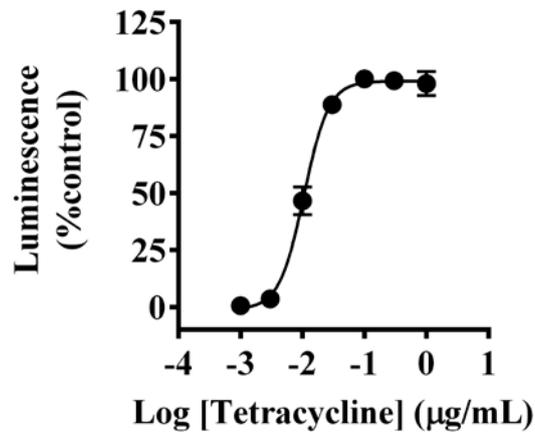


Figure 4. T-REx/hGPR3/GloSensor 安定発現細胞株におけるテトラサイクリン応答性

樹立した T-REx/hGPR3/GloSensor 安定発現細胞株の培養細胞を用いて、前日に各濃度のテトラサイクリンにてhGPR3の発現誘導を行った。1 mM IBMX 存在下で、細胞内 cAMP 量の変化を GloSensor 試験にて検出し、テトラサイクリンの EC₅₀ 値として 0.011 ± 0.0025 µg/mL (平均値 ± S.E.M.) と算出された。結果は、テトラサイクリン 0.1 µg/mL を 100% として示しており、それぞれ 2 well 以上で測定された独立した 4 回の試験の平均値 ± S.E.M. として示した。代表回の実測の RFUs (平均値 ± S.D.) は、テトラサイクリン 0.1 µg/mL 存在下で $63,200 \pm 12,600$ 、テトラサイクリン非存在下で 2590 ± 1830 であった。

2-2 GloSensor 発光値と細胞内 cAMP 量の相関

細胞内 cAMP 量と GloSensor 発光値の相関関係を確認するため、GloSensor 測定時の cAMP 量を HTRF 試験にて定量し、GloSensor における cAMP 検出可能範囲及びその S/B 比を算出した。本来は受容体リガンドを利用して cAMP 量を変化させることが一般的であるが、確度の高いリガンド報告がないことから、IBMX 濃度を変化させることで cAMP 量の調整を試みた。0.1 $\mu\text{g/mL}$ テトラサイクリンにて前処置した T-REx/hGPR3/GloSensor 細胞を用いて、IBMX 濃度依存的な細胞内 cAMP 濃度変化を HTRF 試験及び GloSensor 試験にて同時に検出した。GloSensor は遺伝子改変したホタルルシフェラーゼを使用しており、cAMP がホタルルシフェラーゼに結合することで発光する (Fig. 1)。実際に、IBMX 濃度依存的な発光値の上昇が確認され、細胞内 cAMP 量上昇が示唆された (Fig. 5A)。対して HTRF 試験は、蛍光ラベルされた cAMP と細胞内で産生された cAMP との競合法で検出するため、細胞内 cAMP 量の上昇に伴い HTRF ratio は減少する。実際に、IBMX 濃度依存的に HTRF ratio は減少したことから、細胞内 cAMP 量の上昇を示しており、GloSensor で得られた知見と合致した (Fig. 5B)。続いて HTRF 試験における cAMP 標準曲線を用いて、各 IBMX 濃度のサンプルにおける cAMP 量を換算し、対応する同一サンプルの GloSensor 発光値をそれぞれプロットした (Fig. 5C)。GloSensor 発光値と cAMP 量は、cAMP 濃度にして 0.698 pM (0.5 mM IBMX 処置) まで直線的な相関関係が確認された。しかし、cAMP 濃度にして 1.18 pM (1 mM IBMX 処置) においては発光値の飽和が確認された。このとき、S/B 比は 18.8 と十分な評価ウインドウを示した。

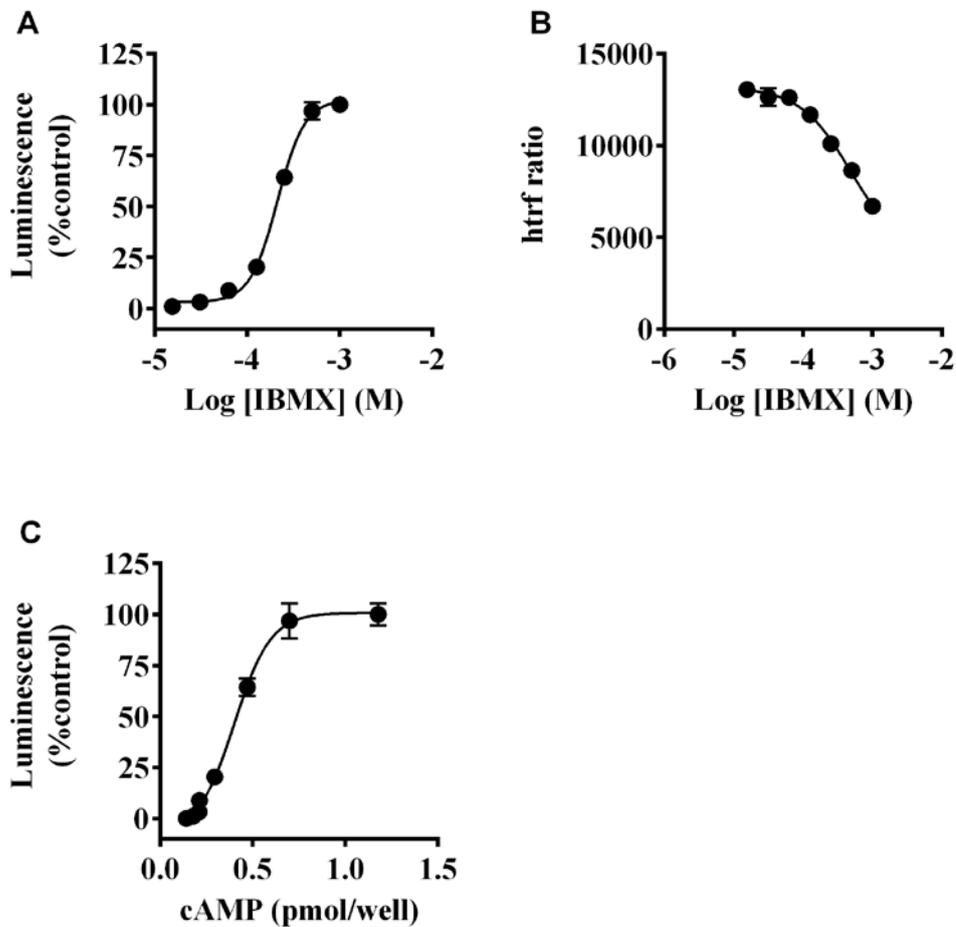


Figure 5. T-REx/hGPR3/GloSensor 安定発現細胞株における GloSensor 発光値と細胞内 cAMP 量の相関

樹立した T-REx/hGPR3/GloSensor 安定発現細胞株の培養細胞を用いて、前日に 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のテトラサイクリンにて hGPR3 の発現誘導を行った。各濃度の IBMX 存在下で細胞内 cAMP 量の変化を、GloSensor 試験 (A) 及び HTRF 試験 (B) にて同時に検出した。(C) 各 IBMX 濃度における GloSensor 試験の発光値を、HTRF 試験の cAMP 標準曲線より換算されたそれぞれの cAMP 量に対してプロットした。GloSensor 試験の結果は、1 mM IBMX を 100%として示した。結果は、独立した 2 回の試験から、それぞれ 4 well にて測定した代表回の試験の平均値 \pm S.D.として示した。代表回の実測の RFUs (平均値 \pm S.D.) は 1 mM IBMX 存在下で $67,600 \pm 3470$, IBMX 非存在下で 3600 ± 2160 だった。

2-3 hGPR3 GloSensor 試験及びカウンター試験の構築

スクリーニングに使用する目的で、hGPR3 GloSensor 試験用 T-REx/hGPR3/GloSensor 安定発現細胞は、テトラサイクリンを前処置し、凍結細胞ストックとして保管した。凍結細胞ストックは解凍後すぐに GloSensor 試験に使用し、回復培養期間は設けなかったが、IBMX 濃度依存的なシグナル上昇が確認された (Fig. 6A)。この時の IBMX の EC₅₀ 値は 166 ± 15.1 μM (平均値 ± S.E.M, 独立 4 回試験) を示し、培養細胞にて得られた IBMX の EC₅₀ 値である 187 μM (平均値, 独立 2 回試験) と同等であった (Fig. 5A)。また、保有するライブラリーの化合物はすべて DMSO 溶液であるため、hGPR3 GloSensor 試験に対する DMSO のシグナルへの影響を検討したところ、0.5 から 2.5% の範囲で特に影響がなかった (Fig. 6B)。本報告において hGPR3 のインバーサゴニスト活性は、0.5 mM IBMX 存在下の hGPR3 による cAMP 産生亢進に対する各化合物のインバーサゴニスト活性を、阻害率 (%Inhibition) として示した。本来、hGPR3 発現誘導細胞における 0.5 mM IBMX 添加時の発光値をコントロールと定義した場合、ブランクは hGPR3 非誘導細胞における 0.5 mM IBMX の発光値とすべきである。しかし、本来のブランクに相当する hGPR3 非誘導細胞における 0.5 mM IBMX の発光値に対して、hGPR3 発現誘導細胞の IBMX 非存在下における発光値がほぼ同等であったことから、HTS 時の作業の煩雑化を避けるために、hGPR3 発現誘導細胞の IBMX 非存在下の発光値をブランクと定義した。カウンター試験としては、hGPR3 に関わらず非特異的に cAMP 量を減少させる化合物を排除する目的で、テトラサイクリン非添加、つまり hGPR3 非誘導時の T-REx/hGPR3/GloSensor 安定発現細胞を用いて、アデニル酸シクラーゼ活性化薬である forskolin 刺激により亢進した cAMP 産生に対する各化合物の阻害活性を評価した。forskolin の濃度依存性評価を実施したところ、EC₅₀ 値としては、1.05 ± 0.174 μM (平均値 ± S.E.M, 独立 3 回試験) を示した (Fig. 6C)。化合物評価時の forskolin の添加濃度は、hGPR3 の評価条件における発光値と同程度の発光値となるよう、0.5 μM forskolin を選択した (Fig. 6D)。

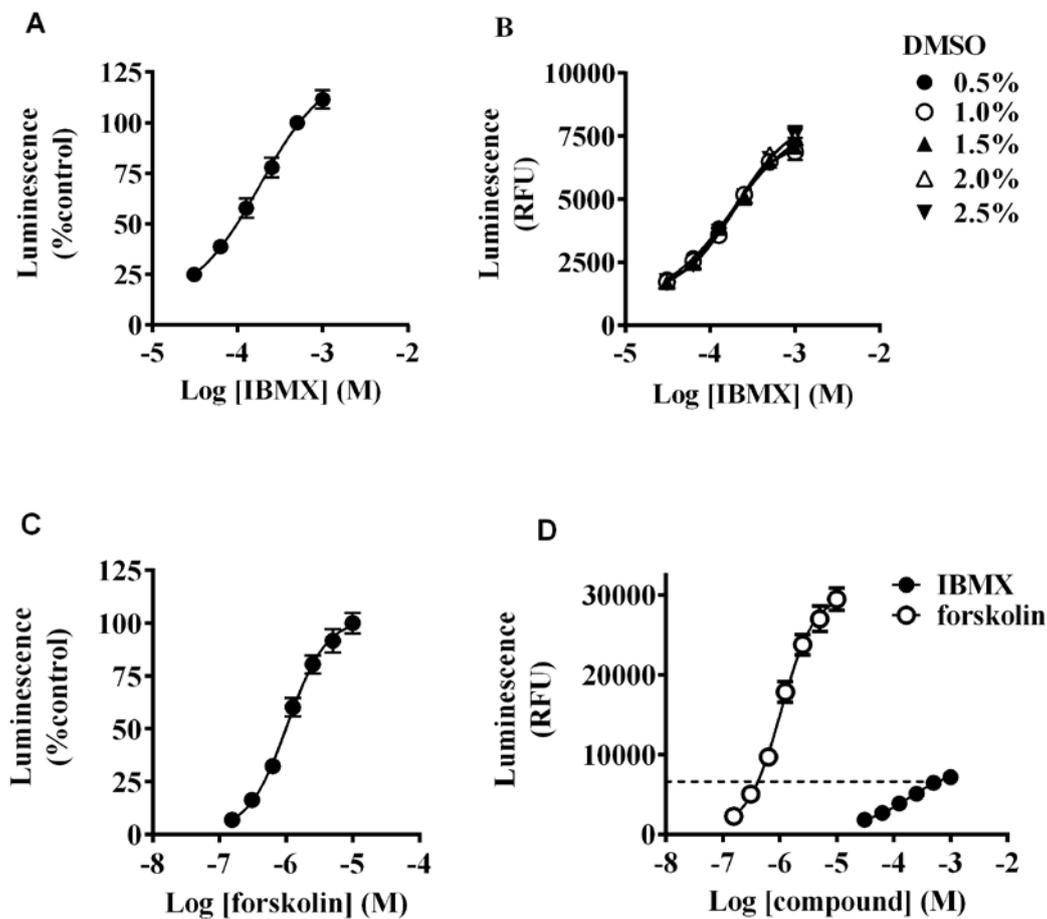


Figure 6. hGPR3 GloSensor 試験及びカウンター試験の条件検討

(A) hGPR3 GloSensor 試験用の hGPR3 発現誘導凍結細胞ストックを用いて、溶解後ただちに GloSensor 試験に供した。IBMX 濃度依存的な発光値の変化を 0.5 mM IBMX における発光値を 100%として示した。結果は、独立した 4 回の試験から、それぞれ 4 well にて測定した代表回の試験の平均値±S.D.として示した。IBMX の EC₅₀ 値は 166±15.1 μM (平均値±S.E.M, n = 4) と算出された。代表回の実測の RFUs (平均値±S.D.) は、1 mM IBMX 存在下で 7170±283, 0.5 mM IBMX 存在下で 6460±138, IBMX 非存在下で 300±37 であった。

(B) 同様に、DMSO が評価系へ与える影響を検討した。結果は、それぞれ 4 well の測定値の平均値±S.D.として示した。(C) カウンター試験用の hGPR3 発現非誘導凍結細胞ストッ

クを用いて、溶解後ただちに GloSensor 試験に供した。0.5 mM IBMX 存在下における forskolin 濃度依存的な発光値の変化を 10 μ M forskolin における発光値を 100%として示した。結果は、独立した 3 回の試験からそれぞれ 4 well にて測定した代表回の試験の平均値 \pm S.D. として示した。代表回の実測の RFUs (平均値 \pm S.D.) は 10 μ M forskolin 存在下で 29,500 \pm 1420, IBMX 非存在下で 265 \pm 34 であった。forskolin の EC₅₀ 値は 1.05 \pm 0.174 μ M (平均値 \pm S.E.M, n = 3) と算出された。(D) hGPR3 GloSensor 試験及びカウンター試験における発光値を比較した。hGPR3 の 0.5 mM IBMX における発光値 (横点線) は、カウンター試験の 0.5 μ M forskolin における発光値とほぼ同等であった。実験はそれぞれ 4 well にて測定した代表回の平均値 \pm S.D.を示す。

HTS における hGPR3 GloSensor 試験における最適な検出時間を判断するため、0, 0.125, 0.5, 1 mM IBMX 添加後 300 分まで、経時的に発光値を測定した (Fig. 7A)。30 分後の発光値が最も高く、60 分後に向かって発光値が低下したが、その後 300 分まで発光値は安定していた。各測定ポイントにおける Z' をそれぞれ算出したところ、60, 90, 120 分後に測定した場合に最も高く算出された (Fig. 7B)。一方で、300 分後においても Z' factor は 0.7 以上を示しており、非常に安定していた。また、%CV を算出したところ、15, 30 分後に関しては 10%近い値を示していたが、60 分以降は 7.5%以下に低下し、300 分後まで同様の値を維持した (Fig. 7C)。以上の結果を踏まえ、HTS では、IBMX 添加後 60 分にて測定することとした。

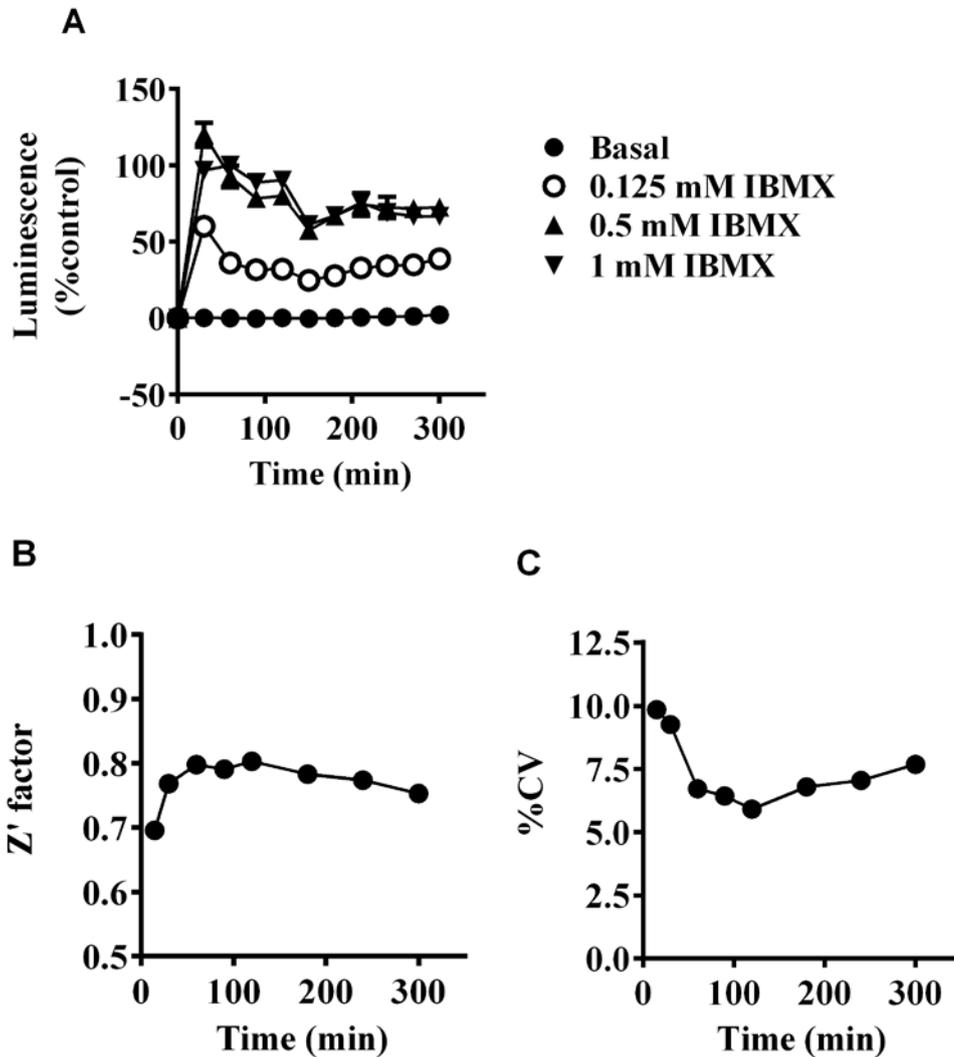


Figure 7. hGPR3 GloSensor 試験における時間依存性の検討

(A) hGPR3 発現誘導凍結細胞ストックを用いて、0 (Basal), 0.125, 0.5, 1 mM IBMX 添加後 30 分から 300 分後まで、30 分おきに発光値を測定した。60 分後の 1 mM IBMX 添加条件における発光値を 100%として示した。結果は、独立した 2 回の試験から、それぞれ 4 well にて測定した代表回の試験の平均値±S.D.として示した。実測の RFUs (平均値±S.D.) は、1 mM IBMX 存在下では 16,022±270, IBMX 非存在下では 307±50 であった。0.5 mM IBMX 添加後 15 分から 300 分後までの各ポイントにおける Z' factor (B) 及び%CV (C) を算出した。それぞれ独立した 2 回試験の代表回の結果を示した。

2-4 hMC4R 評価系の構築

選択性を評価するため、hGPR3 とアミノ酸配列の相同性は高くないが比較的近いファミリーに所属し、常時活性型の Gs 共役型 GPCR である hMC4R の活性評価系を構築した。hGPR3 と同様に 0.5 mM IBMX 条件下にて実施した。インバースアゴニストである AGRP を添加したところ、AGRP 濃度依存的に発光値を低下させ、1 μ M において阻害が飽和し、IBMX 非存在下の発光値と同程度の発光値を示した (Fig. 8A)。この結果は、AGRP がフル・インバースアゴニストであるという以前の報告(Chai et al. 2003; Tao et al. 2010)と一致することから、AGRP は 1 μ M で hMC4R の恒常活性を完全に阻害していると判断し、1 μ M AGRP の発光値をブランクと定義した。コントロールは、AGRP 非存在下の発光値と定義した。また、DMSO 濃度は 0.5%及び 1.5%でほぼ同等の発光値を示し、DMSO の発光値への影響はなかった (Fig. 8B)。

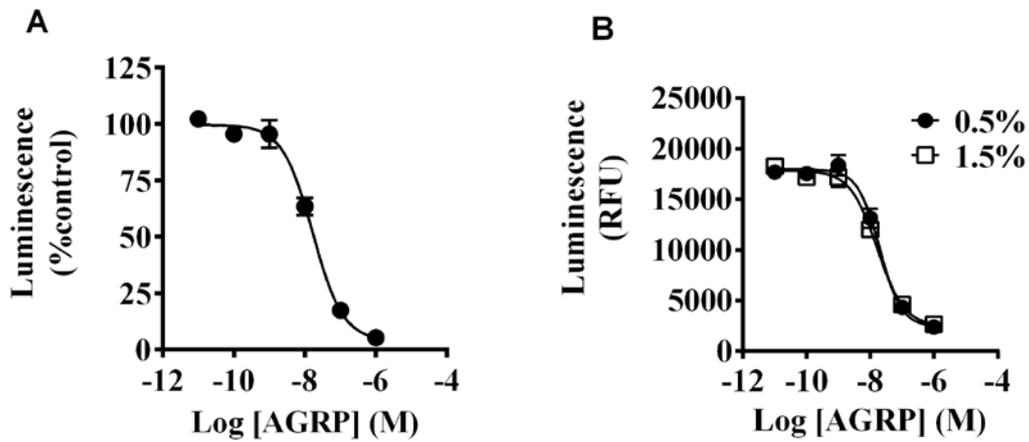


Figure 8. hMC4R GloSensor 試験の構築

(A) 選択性試験用の HEK293/hMC4R-GS20F 安定発現細胞株の凍結細胞ストックを用いて、溶解後ただちに GloSensor 試験に供した。0.5 mM IBMX 存在下におけるインバースアゴニスト AGRP の濃度依存的な発光値の減少を、AGRP 非添加時の発光値を 100%として示した。結果は、独立した 3 回の試験からそれぞれ 4 well にて測定した代表回の試験の平均±S.D.として示した。EC₅₀値は 10.7±2.98 μM (平均値±S.E.M, n = 3) と算出された。代表回の実測の RFUs (平均値±S.D.) は、0.5 mM IBMX 存在下で 17,910±619, IBMX 非存在下で 1810±68であった。(B) 同様に、DMSO濃度が評価系へ与える影響を検討した。結果はそれぞれ 4 well の測定値の平均値±S.D.として示した。

2-5 hGPR6, hGPR12, mGPR3 一過性発現細胞の樹立

プロファイリング評価に使用する hGPR6 (相同性 58%) 及び hGPR12 (相同性 56%), 種差評価に使用する mGPR3 (相同性 94%) はそれぞれ一過性発現細胞を用いるため, 各受容体の発現量に依存して cAMP 量が増加するトランスフェクション条件の検討を行った。6 well plate 当たり 0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 $\mu\text{g}/\text{well}$ の hGPR6, hGPR12, mGPR3 発現プラスミドを 1 $\mu\text{g}/\text{well}$ pGloSensor-22F cAMP と共に一過性に導入した HEK293 細胞を用いて, IBMX 添加/非添加の両条件にて GloSensor 試験を行った。その結果, いずれの受容体においても, IBMX 添加時に少なくとも 1 $\mu\text{g}/\text{well}$ のプラスミド添加条件までは, プラスミド DNA 量依存的な発光値の上昇が確認された (Fig. 9A, 9B, 9C)。hGPR3 GloSensor 試験と受容体発現時の発光値がほぼ同等となるよう, 10000 程度の発光値を示すトランスフェクション条件として, hGPR6 及び hGPR12 はそれぞれ 0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$, mGPR3 は 0.03 $\mu\text{g}/\text{well}$ の条件を採用した。また, hGPR3 GloSensor 試験時と同様に, 本来は, 一過性発現細胞における 0.5 mM IBMX 添加時の発光値をコントロールと定義した場合, ブランクは mock 細胞における 0.5 mM IBMX の発光値とすべきである。しかし, それぞれの一過性発現細胞における 0.5 mM IBMX 添加時の発光値が 10000 程度に対して, 一過性発現細胞における IBMX 非添加時の発光値は, いずれも 1000 以下であった。また, mock 細胞における 0.5 mM IBMX の発光値と比較しても大きく差がないことから, 同じ一過性発現細胞を用いて, IBMX 非添加時の条件をブランク, IBMX 添加時の条件をコントロールと定義した。

それぞれのトランスフェクション条件にて作製した凍結ストック細胞を用いて, IBMX 濃度依存性評価を実施したところ, いずれも濃度依存的な発光値の上昇が確認された (Fig. 10A, 10B, 10C)。

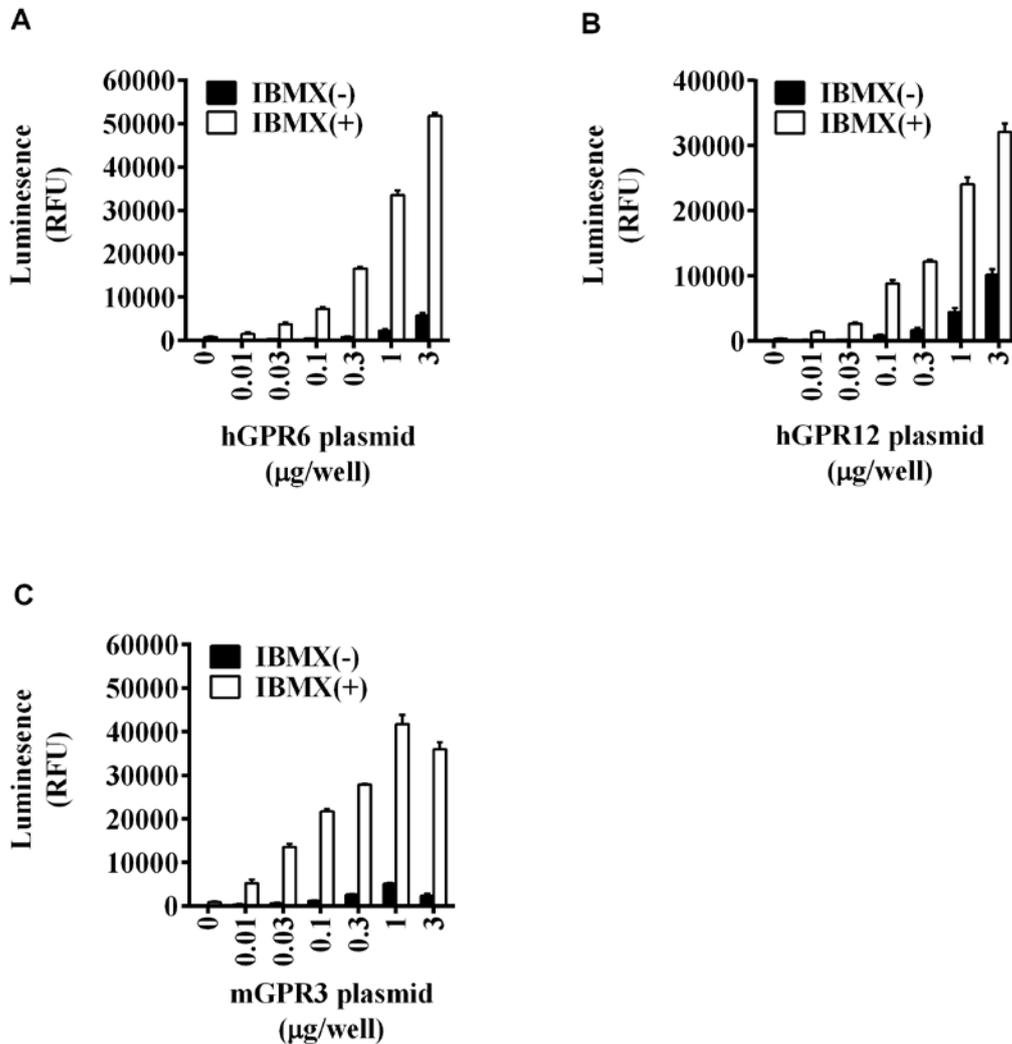


Figure 9. hGPR6, hGPR12 及び mGPR3 一過性発現細胞のトランスフェクション条件検討

6 well plate にて HEK293 細胞を一晩培養し、各濃度に調製した hGPR6, hGPR12 あるいは mGPR3 プラスミドと pGloSensor-22F cAMP plasmid をトランスフェクションし、回収した細胞を用いて GloSensor 試験を実施した。0.5 mM IBMX 存在下 (□) 及び IBMX 非存在下 (■) における hGPR6 プラスミド (A), hGPR12 プラスミド (B) あるいは mGPR3 プラスミド (C) 濃度依存的な発光値を示す。結果はそれぞれ 3 well の測定値の平均値±S.D.として示した。

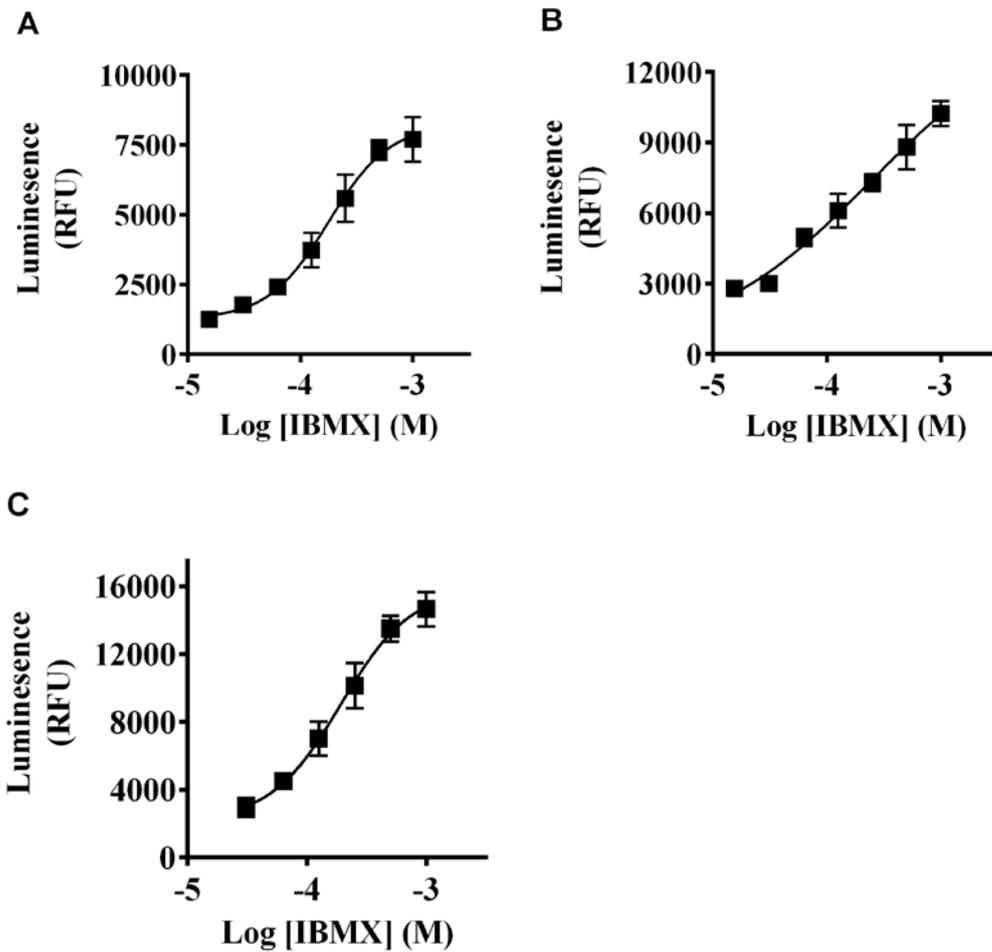


Figure 10. 一過性発現細胞の IBMX 濃度依存性

6 well plate にて HEK293 細胞を一晩培養し、hGPR6 及び hGPR12 はそれぞれ 0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$ 、mGPR3 は 0.03 $\mu\text{g}/\text{well}$ の条件にてトランスフェクションした細胞を用いて、GloSensor 試験にて IBMX 濃度依存性を確認した。hGPR6 (A)、hGPR12 (B) 及び mGPR3 (C) はいずれも濃度依存的な発光値の上昇が見られ、それぞれの EC_{50} 値は順番に 179 μM 、251 μM 、192 μM であった。結果はそれぞれ 3 well の測定値の平均値 \pm S.D. として示した。

2-6 パイロットスクリーニング

全化合物の HTS を実施する前に、GloSensor 試験の HTS 実行可能性、ヒット率の見積もりや化合物絞り込みの可否を判断するため、小スケールでのパイロットスクリーニングを実施した。評価には、384 プレート全 12 枚に 4218 化合物が搭載された化合物セットを使用した。本化合物セットは、約 30 万の全化合物ライブラリーより構造や化合物の物性に基づき代表化合物をピックアップしており、全化合物評価時のヒット率を反映するよう設計されている。hGPR3 GloSensor 試験及びカウンター試験をそれぞれ 3 well ずつ、化合物終濃度 10 μ M (0.5% DMSO) にて評価した。hGPR3 GloSensor 試験及びカウンター試験それぞれの Z' factor は、 0.84 ± 0.04 及び 0.85 ± 0.03 (平均値 \pm S.D.) であった (Fig. 11A, 11B)。S/B 比に関しては、それぞれ 25.0 ± 2.2 及び 37.6 ± 2.4 (平均値 \pm S.D.) であった。各化合物の %Inhibition は、3 well の測定値よりそれぞれ阻害活性値を算出し、その平均値を使用した。hGPR3 に対する全評価化合物における活性分布は Fig. 11C に示した。hGPR3 GloSensor 試験及びカウンター試験の相関図を作成したところ、ほとんどの化合物が両評価系において同等の活性を示した (Fig. 11D)。Fig. 11D において、Non-hit1 は hGPR3 の %Inhibition が 30%未満の化合物であり、Non-hit2 は hGPR3 の %Inhibition が 30%以上であるがカウンター試験においても同等の阻害を示した非特異的な化合物である。Hit は hGPR3 の %Inhibition が 30%以上かつカウンター試験にて有意な阻害が見られなかった化合物を示している。仮に hGPR3 GloSensor 試験におけるヒットクライテリアを 30%以上とした場合、Hit および Non-hit2 として示す 76 化合物が選抜され、ヒット率は 1.8%であった。そのうち、カウンター試験の阻害率がばらつきの範囲内 (DMSO の活性値の平均値 + 3S.D. = 15.4%以下) であった化合物は Hit として示す 1 化合物のみであった。

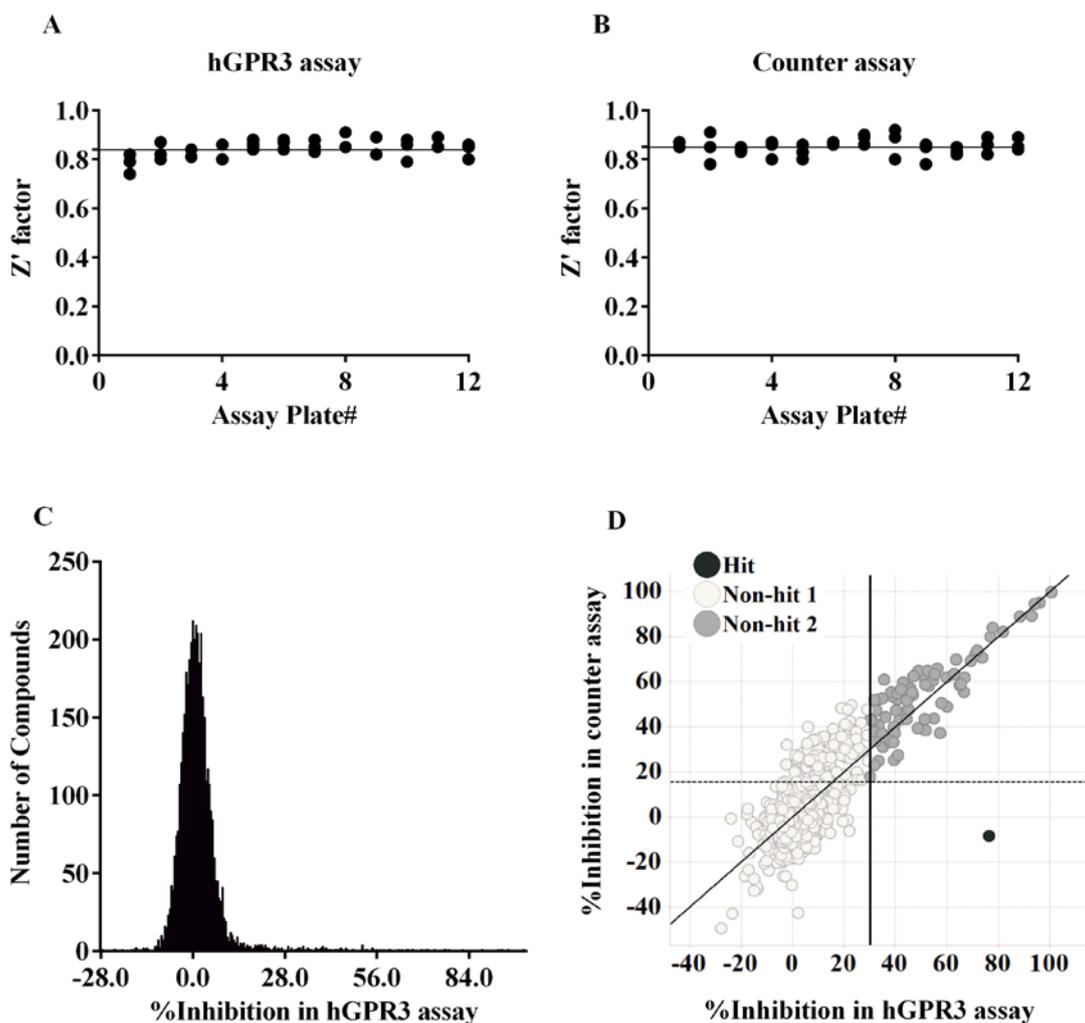


Figure 11. パイロットスクリーニング

4218 化合物を含む 12 枚の 384 化合物プレートを使用し、hGPR3 Glosensor 試験及びカウンター試験を化合物終濃度 10 μ M にて実施した。12 枚のプレートはそれぞれ 3 回ずつ評価され、hGPR3 GloSensor 試験 (A) 及びカウンター試験 (B) の Z' factor をプロットした。横線はそれぞれ Z' factor の平均値、0.84 (A) 及び 0.85 (B) を示す。(C) 全 4218 化合物の hGPR3 GloSensor 試験の結果を、横軸に %Inhibition、縦軸に化合物数としてヒストグラムにて示した。(D) 各化合物の活性相関図を、横軸に hGPR3 GloSensor 試験の %Inhibition、縦軸にカウンター試験の %Inhibition としてプロットした。縦線は、hGPR3 GloSensor 試験に

おける 30%阻害を示し、斜線は $y = x$ 、横破線は $y = 15.4$ (カウンター試験 DMSO 添加 well の平均値 + 3S.D.) を示す。Non-hit1 は hGPR3 の %Inhibition が 30%未満の化合物、Non-hit2 は hGPR3 の %Inhibition が 30%以上であるがカウンター試験においても同等の阻害を示した化合物 (Nonspecific)、Hit は hGPR3 の %Inhibition が 30%以上かつカウンター試験にて有意な阻害が見られなかった化合物を示す。

2-7 プライマリースクリーニング

パイロットスクリーニングの結果、GPR3 GloSensor 試験が非常に安定しており、カウンター試験が非特異的な化合物を排除するフィルターとして機能すると判断し、Fig. 12 に示す通り、スクリーニングフローを設定した。ヒットクライテリアとしては、hGPR3 GloSensor 試験において EC₅₀ 値が 10 μM 以下を示し、選択性 hMC4R に対して 10 倍以上選択性がある化合物、かつ hGPR3 PathHunter 試験において EC₅₀ 値が 10 μM 以下を示し、選択性 hADRB1 に対して 10 倍以上選択性がある化合物とした。選抜したヒット化合物は、hGPR3 と同一ファミリーの hGPR6 及び hGPR12 との選択性を確認する。まず、約 30 万の化合物ライブラリーを用いて終濃度 10 μM (0.5% DMSO) にて hGPR3 GloSensor 試験を用いてプライマリースクリーニングを実施した。プライマリースクリーニングにおける全化合物プレートの Z' factor は 0.84±0.04 (平均値±S.D.) (Fig. 13A), S/B 比は 19.7±2.7 (平均値±S.D.) であった。ヒットクライテリアはパイロットスクリーニングと同様に 30%以上とし、5124 化合物が選抜された (Fig. 13B)。

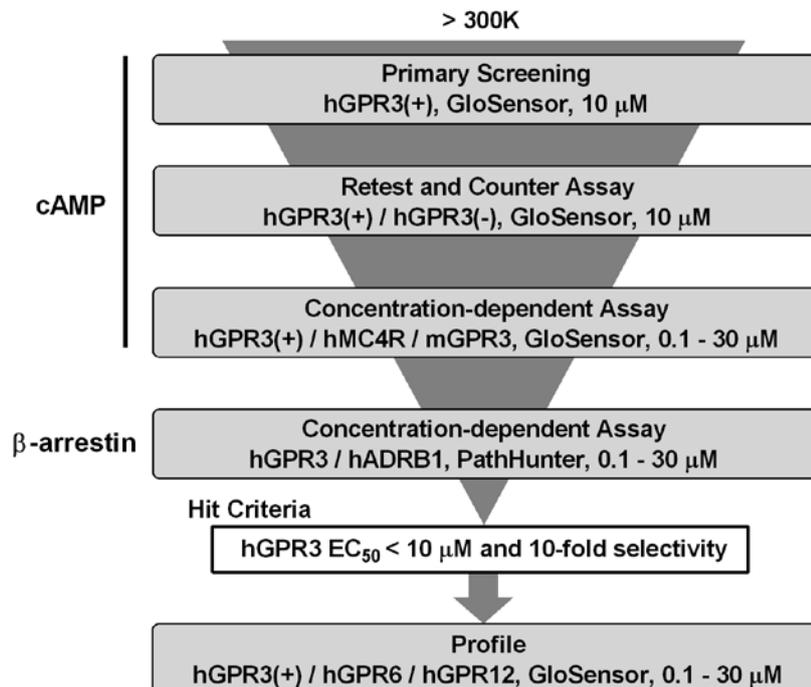


Figure 12. スクリーニングフロー

hGPR3 選択的インバースアゴニスト選抜のためのスクリーニングフローを示す。ヒットクライテリアは、hGPR3 GloSensor 試験において EC₅₀ 値が 10 μM 以下を示し、hMC4R に対して 10 倍以上選択性がある化合物、かつ hGPR3 PathHunter 試験において EC₅₀ 値が 10 μM 以下を示し、選択性 hADRB1 に対して 10 倍以上選択性がある化合物とした。hGPR3(+)は hGPR3 発現誘導凍結細胞ストック、hGPR3(-)は hGPR3 発現非誘導凍結細胞ストックを使用した試験を示す。

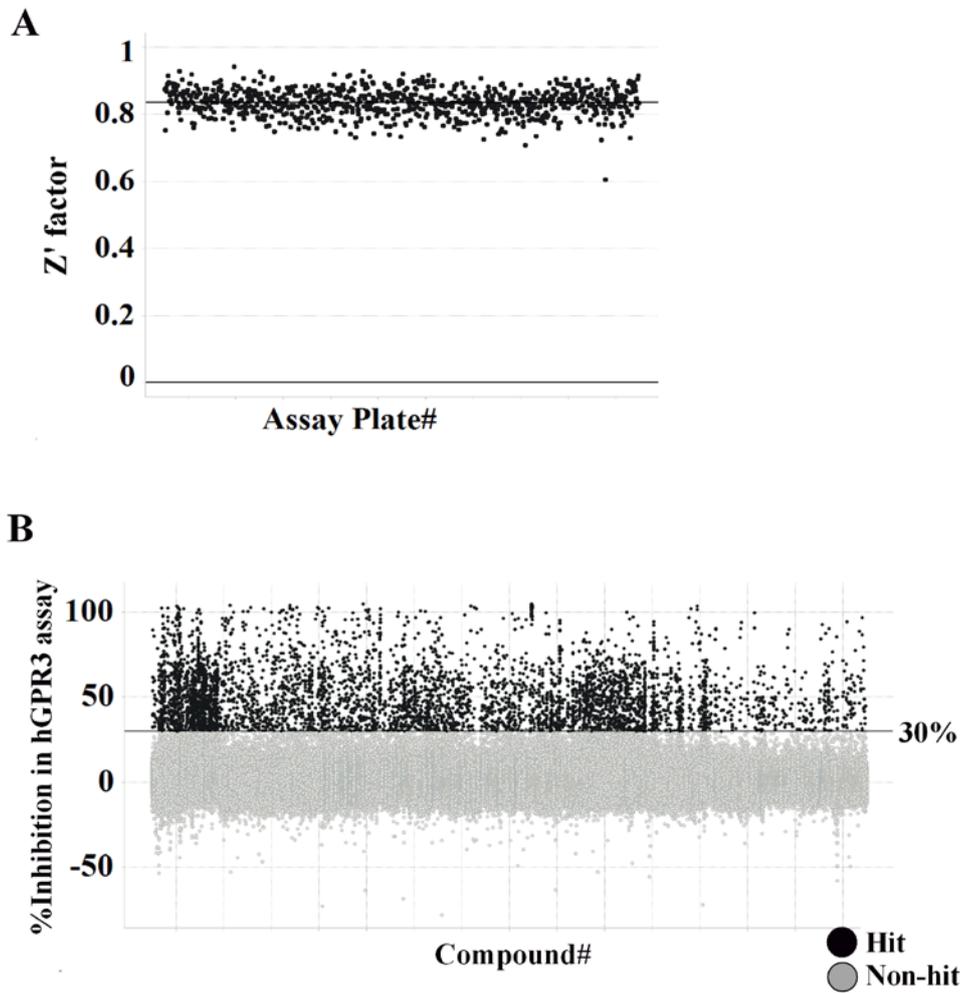


Figure 13. プライマリースクリーニング結果

(A) プライマリースクリーニングとして、約 30 万の化合物が搭載されたおよそ 900 枚の化合物プレートを用いて、化合物終濃度 10 μ M にて hGPR3 GloSensor 試験を実施し、Z' factor をプロットした。横線は平均値である 0.84 を示す。(B) 全化合物の%Inhibition をプロットした。横線はクライテリアである 30%を示し、黒丸で示した 5124 化合物を選抜した。

2-8 再現性及びカウンター試験

選抜した 5124 化合物に対して、活性の確認及び非特異的化合物の排除を目的として、終濃度 10 μ M (0.5% DMSO) にて hGPR3 GloSensor 試験及びカウンター試験をそれぞれ 3 well ずつ実施した。hGPR3 GloSensor 試験及びカウンター試験それぞれの Z' factor は、0.85 \pm 0.03 及び 0.81 \pm 0.04 (平均値 \pm S.D.) であった (Fig. 14A, 14B)。S/B 比に関しては、それぞれ 17.0 \pm 1.1 及び 27.0 \pm 1.3 (平均値 \pm S.D.) であった。プライマリースクリーニング時の阻害率と再現性試験時の阻害率を比較したところ、4981 化合物 (全体の 97.2%) の化合物が活性差 20% 以内に収まっており、非常に再現性が良好であった (Fig. 14C)。一方で、再評価時の hGPR3 とカウンター試験結果と比較したところ、パイロットスクリーニングで示唆されていた通り、多くの化合物が両評価系において同等の活性を持つ非特異的阻害化合物であった (Fig. 14D)。最終的なヒット化合物として、EC₅₀ 値が 10 μ M 以下、選択性 10 倍以上をクライテリアとしており、評価のばらつきを考慮して hGPR3 再評価時の阻害率が 40% 以上かつカウンター試験がばらつきの範囲内 (DMSO 添加 well の平均値 + 3S.D. である 20% 以内) であった 48 化合物を選抜した。また、hGPR3 再評価時とカウンター試験の活性差が 40% 以上であった 2 化合物については、10 倍の選択性があるかどうかを次の濃度依存試験で判断することとし、併せて 50 化合物を選抜した。

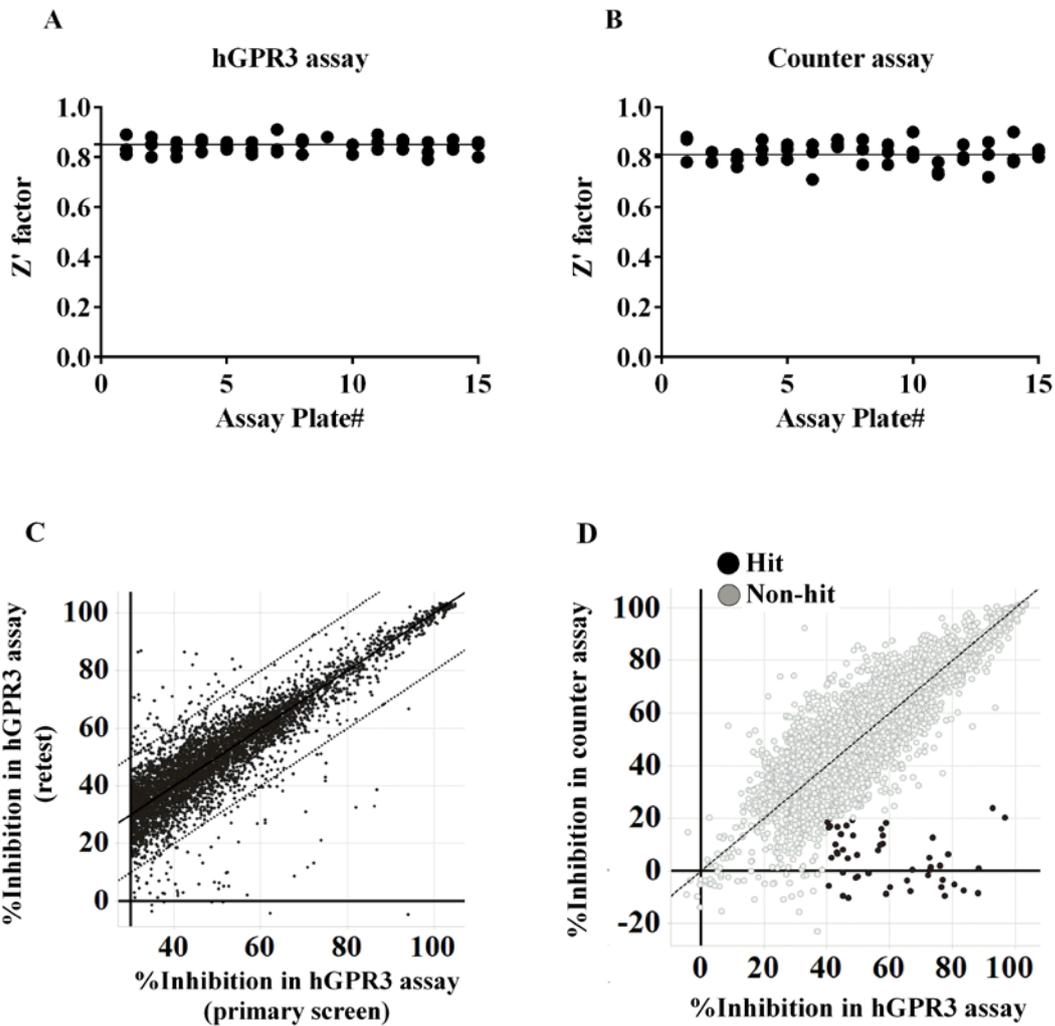


Figure 14. 再現性及びカウンター試験

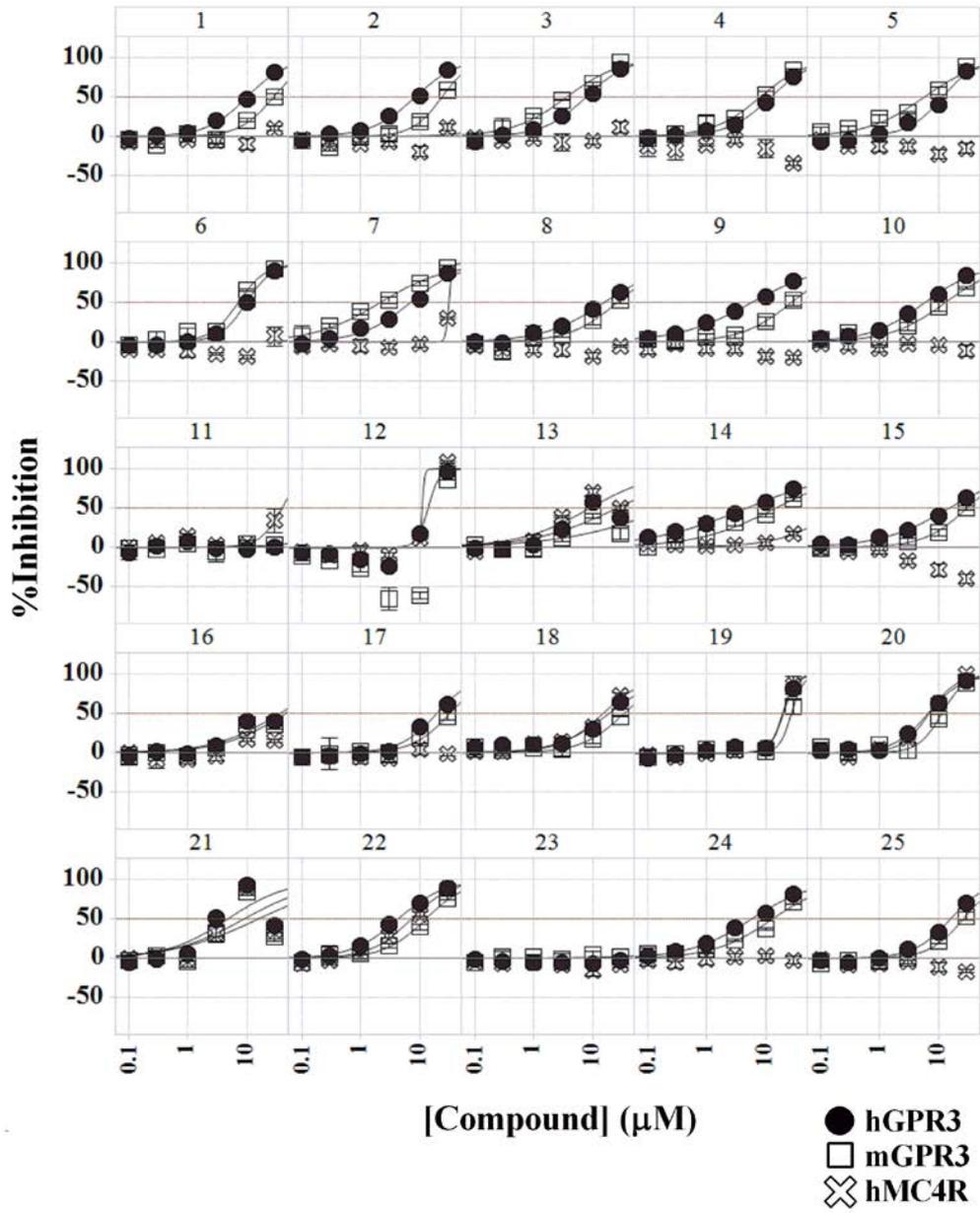
選抜した 5124 化合物に対して、化合物終濃度 10 μM にて hGPR3 GloSensor 試験及びカウンター試験を実施した。15 枚の化合物プレートのセットをそれぞれ 3 回ずつ評価し、計 45 プレートから計算した hGPR3 GloSensor 試験 (A) 及びカウンター試験 (B) の Z' factor をプロットした。横線はそれぞれ Z' factor の平均値, 0.85 (A) 及び 0.81 (B) を示す。(C) 横軸にプライマリースクリーニング時の %Inhibition, 縦軸に再現性試験時の平均 %Inhibition として活性相関図を示した。斜線 (実線) は $y = x$, 斜線 (点線) は $y = x \pm 20\%$ を示す。(D) 横軸に再現性試験時の hGPR3 の平均 %Inhibition, 縦軸にカウンタ

一試験の平均%Inhibitionとして活性相関図を示した。斜線は $y = x$ を示し、hGPR3の平均%Inhibitionが40%以上かつカウンター試験にて有意な阻害が見られなかった化合物として黒丸で示した50化合物を選抜した。

2-9 濃度依存性評価

選抜した 50 化合物に関して、hGPR3, mGPR3, hMC4R に対する濃度依存性評価を GloSensor 試験にて実施した。化合物濃度は、0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 μM の 6 点とし、各濃度 3 well ずつ評価した (Fig. 15A, 15B)。ばらつきを考慮して、hGPR3 に対する EC_{50} 値が 20 μM 以下かつ選択性 10 倍以上の化合物として 35 化合物 (Compound 1 から Compound 10, Compound 14, Compound 15, Compound 17, Compound 24 から Compound 40, Compound 46 から Compound 50) を選抜した。また hGPR3 に対する EC_{50} 値と mGPR3 に対する EC_{50} 値の乖離は最大でも 5 倍程度で、問題となるほど大きな種差はなかった。そこで、化合物の骨格をもとに、構造分類を実施し、5 系統の代表化合物として 5 化合物 (Compound 2, Compound 8, Compound 9, Compound 28, Compound 50) を選抜した。

A



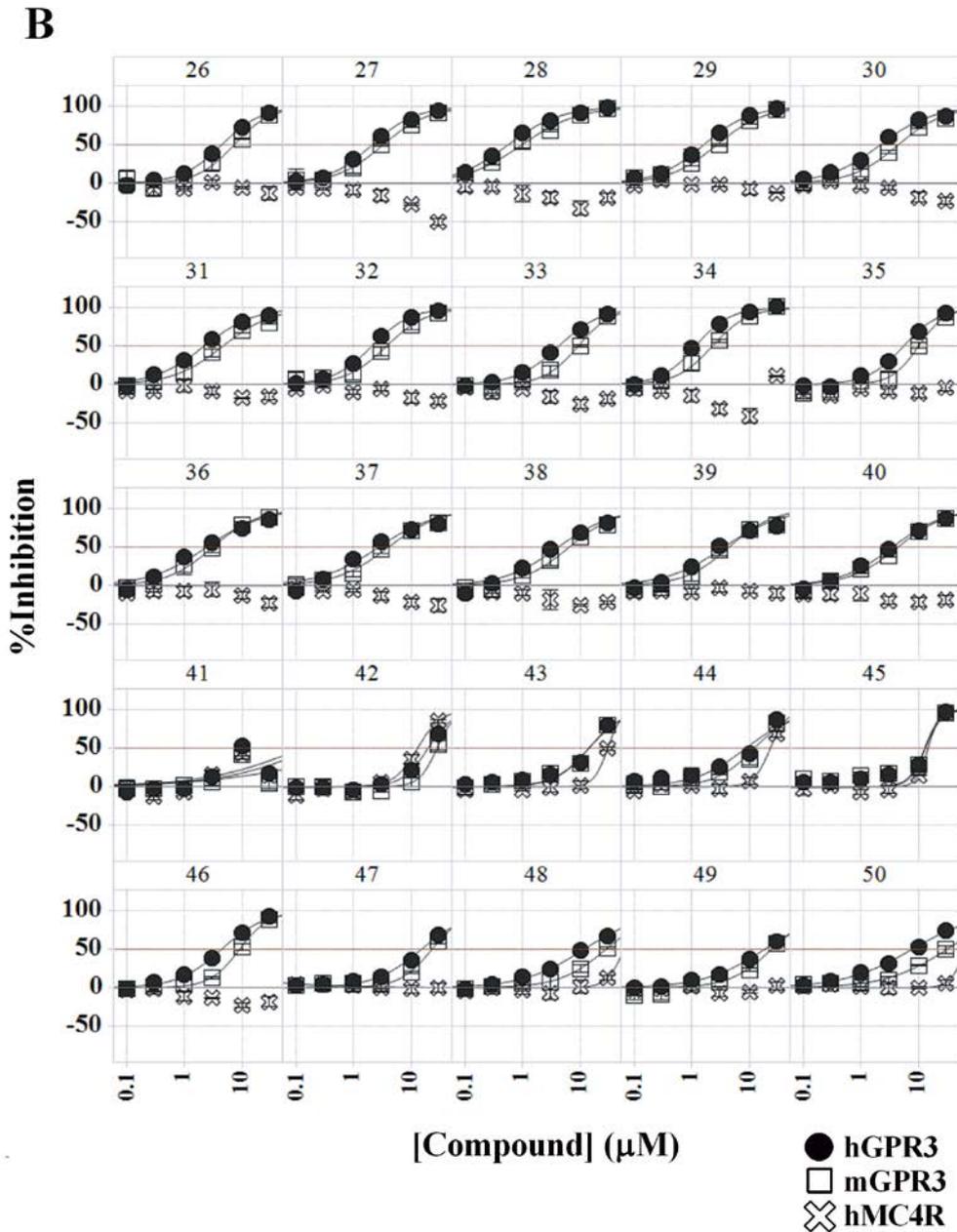


Figure 15. 濃度依存性評価

選抜した 50 化合物に対して、hGPR3、種差 mGPR3、選択性 hMC4R の濃度依存性評価を Glosensor 試験にて実施した (A ; Compound 1 から Compound 25, B ; Compound 26 から Compound 50)。化合物終濃度は、0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 μM の 6 点で評価した。結果は 3 well の測定値の平均値 \pm S.D. として示した。

2-10 β アレスチンシグナル評価

GPR3 の G タンパク質非依存的なシグナル伝達経路である β アレスチン経路に対するインバーサゴニスト活性を評価するため、選抜した代表 5 化合物に対して PathHunter 試験を実施した。主活性として hGPR3, 非特異的結合化合物の排除及び選択性として hADRB1 を評価した。化合物濃度は 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 μ M とし, 3 well 又は 4 well の測定値を使用した (Fig. 16A から 16E)。各化合物は, hGPR3 に対して有意にシグナルを低下させたが, その下限値は未知であるため, カーブフィッティングは下限値を設定せずに行い, 変曲点を EC₅₀ 値として算出した。また, 選択性として評価した hADRB1 に対する陽性対照化合物として, ICI 118,551 も同様の条件にて評価した (Fig. 16F)。ICI 118,551 は hADRB1 と β アレスチンの結合を濃度依存的に阻害し, hGPR3 に対して阻害は確認されなかった。一方, 選抜した代表 5 化合物は, hGPR3 と β アレスチンの結合を濃度依存的に阻害し, 選択性 hADRB1 は阻害しない, あるいは 10 倍以上選択性を示した。ばらつきを考慮して, hGPR3 に対する EC₅₀ 値が 20 μ M 以下を示した化合物として, 全 5 系統代表 5 化合物をヒットとして選抜した。

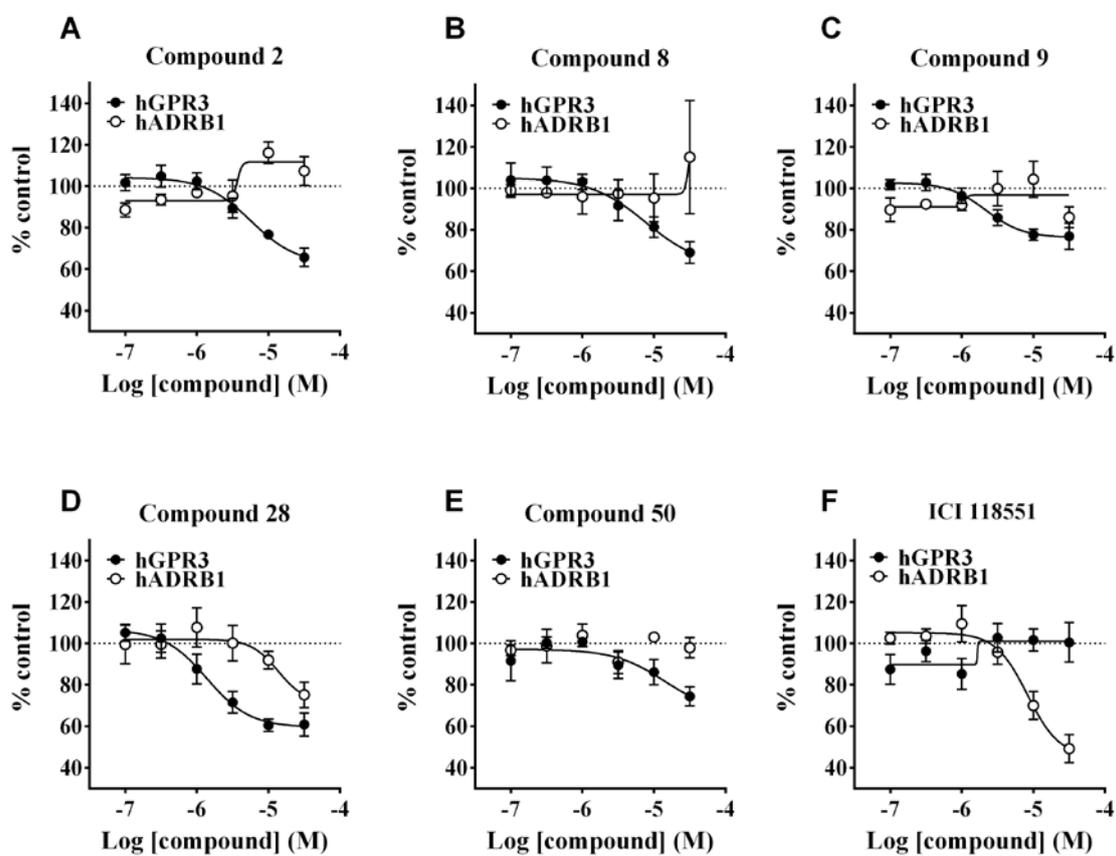


Figure 16. PathHunter 評価

各系統代表 5 化合物及び hADRB1 の陽性対照化合物である ICI 118,551 に対して、hGPR3, hADRB1 の濃度依存性評価を PathHunter 試験にて実施した。化合物終濃度は、0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 μ M の 6 点で評価した。結果は、それぞれ 3 well あるいは 4 well の測定値の平均値 \pm S.D. として示した。

2-1-1 化合物プロファイリング

選抜したヒット化合物のプロファイリング評価として、hGPR3 と同一ファミリーに属し (Joost and Methner 2002), アミノ酸配列の相同性が高い hGPR6 (相同性 58%) 及び hGPR12 (相同性 56%) に対する選択性評価を GloSensor 試験にて実施した。化合物濃度は、0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 μM の 6 点とし、各濃度 3 well ずつ評価した (Fig. 17A から 17E)。Compound 2 の hGPR6 に対する EC_{50} 値は 23 μM , Compound 28 の hGPR6 及び hGPR12 に対する EC_{50} 値はそれぞれ 23 μM 及び 30 μM と算出されたが、そのほかの化合物は、すべて EC_{50} 値が 30 μM 以上であった。

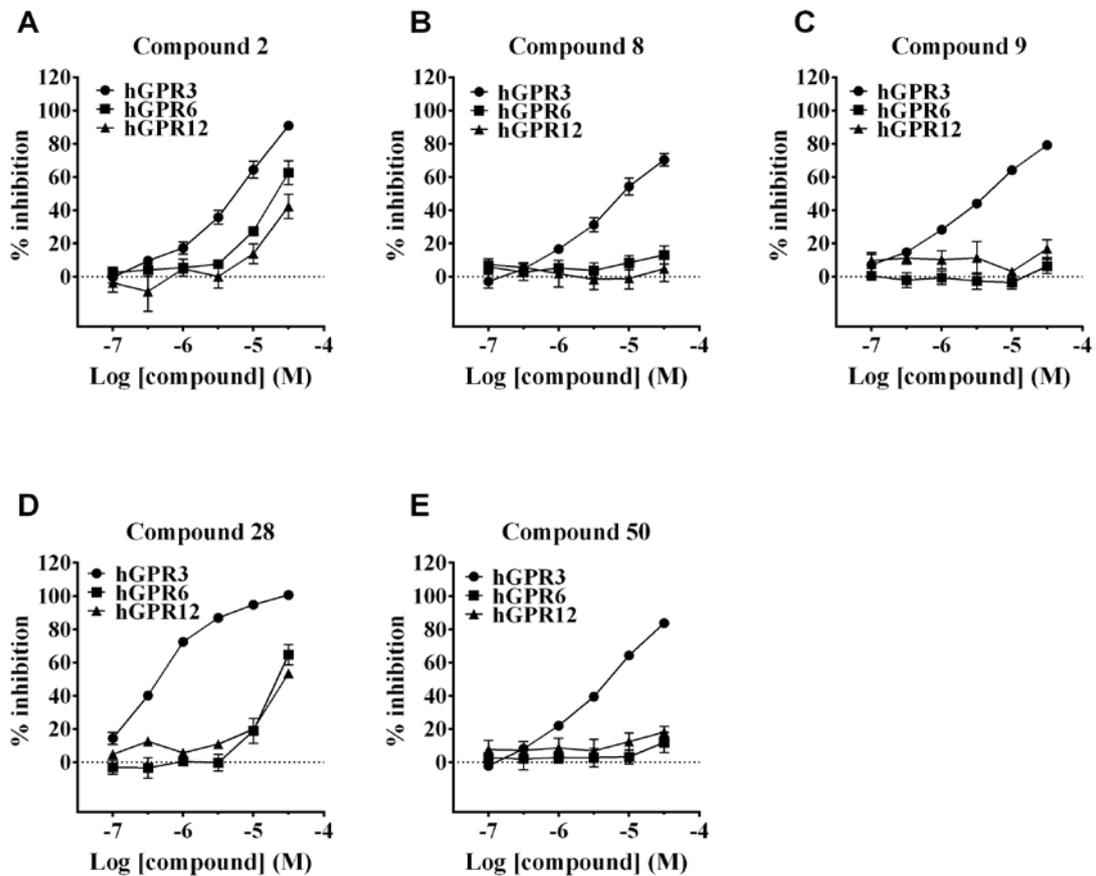
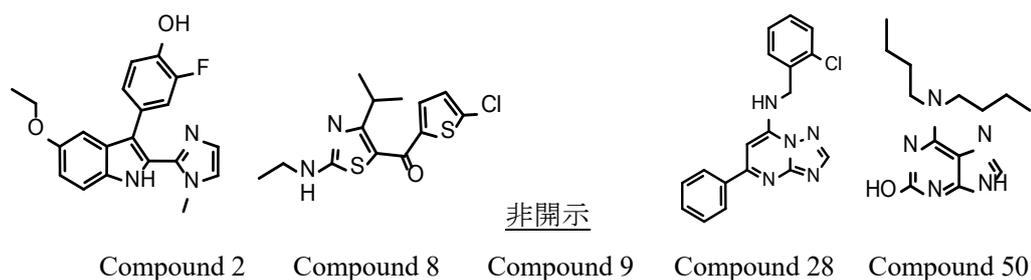


Figure 17. hGPR6 及び hGPR12 に対する選択性評価

各系統代表 5 化合物に対して、hGPR3, hGPR6, hGPR12 の濃度依存性評価を Glosensor 試験にて実施した。化合物終濃度は、0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 μM の 6 点で評価した。結果はそれぞれ 3 well あるいは 4 well の測定値からなる独立した 3 回あるいは 4 回の試験の平均値 \pm S.E.M. として示した。

本スクリーニングにて見出されたこれら代表 5 化合物に関して、それぞれの構造及び EC₅₀ 値あるいは IC₅₀ 値を Table.1 に示した。Compound 2 は、4-(5-ethoxy-2-(1-methyl-1H-imidazol-2-yl)-1H-indol-3-yl)-2-fluorophenol, Compound 8 は , (5-chlorothiophen-2-yl)(2-(ethylamino)-4-isopropylthiazol-5-yl)methanone, Compound 9 は構造非開示, Compound 28 は, N-(2-chlorobenzyl)-5-phenyl-[1,2,4]triazolo[1,5- α]pyrimidin-7-amine, Compound 50 は , 6-(dibutylamino)-9H-purin-2-ol である。



GloSensor					
hGPR3	5.5 ± 1.1	9.7 ± 2.3	4.4 ± 0.67	0.46 ± 0.039	5.2 ± 0.69
mGPR3	25	27	29	0.96	>30 (50%)
hMC4R	>30 (21 ± 10%)	>30 (0.57 ± 8.6%)	>30 (-17 ± 1.9%)	>30 (-17 ± 13%)	>30 (5.1 ± 4.2%)
hGPR6	23 ± 3.7	>30 (13 ± 5.5%)	>30 (6.2 ± 4.4%)	23 ± 3.9	>30 (12 ± 6.9%)
hGPR12	>30 (42 ± 7.4%)	>30 (4.8 ± 7.8%)	>30 (17 ± 5.4%)	30 ± 1.3	>30 (18 ± 3.4%)
PathHunter					
hGPR3	5.7	7.7	2.2	1.4	14
Max%Ctrl	38%	38%	24%	40%	34%
hADRB1	>30	>30	>30	>30	>30

Table 1. 選抜した 5 化合物の構造及び活性プロファイル

Compound 9 は構造非開示。hGPR3, hMC4R, hGPR6 及び hGPR12 の GloSensor 試験は、それぞれ独立 3 回以上の結果の平均値 ± S.E.M. で示した。GloSensor 試験は EC₅₀ 値, PathHunter 試験は EC₅₀ 値 (hGPR3) または IC₅₀ 値 (hADRB1) を記載し、単位は μM である。GloSensor 試験において、EC₅₀ 値が 30 μM 以上を示す際は、30 μM 評価時の %Inhibition を括弧内に示した。hGPR3 PathHunter 試験において、インバースアゴニスト活性の下限値が設

定できないため、カーブフィッティングは下限値を設定せずに実施し、変曲点を EC_{50} 値とした。その際の最大阻害活性を $Max\%Ctrl$ として記載した。

考察

Gs あるいは Gi タンパク質によって制御されるアデニル酸シクラーゼによって産生される cAMP は、重要な細胞内情報伝達物質、セカンドメッセンジャーとして知られている (Simonds 1999)。そのため、RIA (放射免疫測定法) や ELISA (酵素免疫測定法)、SPA (シンチレーション近接アッセイ)、CRE-Luc レポーターアッセイ、HTRF に代表される TR-FRET (時間分解蛍光共鳴エネルギー移動) など、さまざまな細胞内 cAMP 量を測定する実験技術が開発されてきた (Post, Ostrom, and Insel 2000; Gabriel et al. 2003; Williams 2004; Glickman, Schmid, and Ferrand 2008; Hill, Williams, and May 2010; Zhang and Xie 2012)。この中でも RIA 法は長く使用されてきた評価法であるが、放射性同位体が必要となり取り扱いが慎重にならざるを得ない。RIA に代わる方法として確立されたのが抗原抗体反応を使用した ELISA である。しかしながらこれら 2 つの方法は、いずれも複数回にわたる well 洗浄作業といった実験手順が必須であり、評価系のスループットは必然的に低くなる。SPA 法は、RIA や ELISA と異なり well 洗浄作業を必要とせず、反応溶液をそのまま測定可能なホモジニアスアッセイである。ハイスループットに評価可能であるが、大規模 HTS に使用するにはコストが高く、また放射性同位体を必要とするため、特に大量のスクリーニングをする場合には環境や安全面での懸念が残る。CRE-Luc レポーターアッセイは、プラスミドを導入することが出来れば比較的评价系の構築が容易であり、セルベースの HTS として用いられている。しかし、cAMP 下流シグナルから遺伝子発現までのいずれかに作用する化合物すべてを検出してしまうため、一般的に擬陽性率が高い評価系として認識されている。また、ルシフェラーゼ発現まで時間を要するため長時間化合物を暴露させる必要があり、それにより細胞毒性を示した化合物も擬陽性として検出されてしまう。一方で、HTRF のように混ぜて測定するのみのホモジニアスアッセイかつ放射性同位体を使用しない評価法は、簡便で安全性も高い。さらに、より直接的に cAMP 量を検出する評価法であり、CRE-Luc レポーターアッセイと比較して化合物の暴露時間も短く済む。そのため、HTRF に代表さ

れる TR-FRET 技術は cAMP をリードアウトした HTS の評価法として現在も広く用いられている(Degorce et al. 2009)。

GloSensor は感度及びダイナミックレンジに優れたルシフェラーゼ改変型のバイオセンサーを使用しており、cAMP を基質として可逆的にバイオセンサーへ結合し発光することで、生細胞内の cAMP 量をリアルタイムに検出することができる比較的新しい実験技術である(Binkowski et al. 2011)。これまでに研究グループ内での使用実績がなく、また、生細胞内の cAMP 量を検出する GloSensor 試験では、標準物質を用いた cAMP 定量性の確認が直接的に出来ない。そのため、過去に使用実績があり標準物質を用いた絶対定量が可能な HTRF 試験と GloSensor 試験を並行して実施し、各データを比較することで、今回樹立した T-REx/hGPR3/GloSensor 細胞における GloSensor 試験の発光値が細胞内の cAMP 量に依存して変化しているかどうかを確認した。その結果、0.5 mM IBMX 処置までは、GloSensor 試験の発光値と cAMP 量は直線的な相関関係が確認され (Fig. 5C)、この範囲内において GloSensor の発光値は cAMP 量の変化を定量的にとらえられていることを示唆している。つまり、GloSensor の発光値を用いて阻害率を算出することが可能であると判断した。

この Glosensor 試験は前述した細胞内 cAMP 検出法と比較して、多くの利点が挙げられる。まず、評価系構築の際には、試薬添加後 300 分まで経時的な測定によって、容易に最適な測定条件を見出すことができた (Fig. 7A)。HTRF のように cAMP 測定に細胞の溶解が必須となる評価系で時間依存性を確認する場合、各測定時間に対するサンプルをそれぞれ準備する必要があり、サンプルごとのばらつき等も考慮しなくてはならない。それに引き換え、GloSensor のように細胞にダメージを与えずにリアルタイムな cAMP 測定が可能な評価法では、同一サンプルのシグナルを継続的に検出することが可能である。次に、ダイナミックレンジが広く、同一条件の hGPR3 発現誘導細胞を用いて cAMP 量を測定した際、HTRF 試験では S/B 比 2 倍程度であったのに対し、GloSensor 試験では 18 倍程度と、HTS 実施に十分な S/B 比を示した (Fig. 5A, 5B)。HTS 評価クオリティの観点から、Z' factor が 0.5

を超えるには、ばらつきが約 10%と仮定すると、S/B 比 5 倍以上が目安となる(Zhang, Chung, and Oldenburg 1999)。つまり、GloSensor 試験であれば HTS 評価クオリティを担保するために十分な S/B 比を示していることがわかる。最後に、一般的な細胞評価系において 1%を超える DMSO 濃度は、検出シグナルに著しく影響を与える場合が多くあるが(Suzuki, Kawamoto, and Ohta 2010), hGPR3 GloSensor 試験においては、2.5%までほぼシグナルに影響がなく、非常に DMSO 耐性が高かった (Fig. 6B)。以上より、他の手法と比べて、GloSensor が hGPR3 インバースアゴニスト探索により適していると考えられる。

期待していた通り、約 30 万化合物の大規模 HTS の結果、すべてを通して高い S/B 比及び安定した Z' factor を示した (Fig. 13A)。今回の化合物スクリーニングにおいて、最終的なヒットクライテリアとして hGPR3 GloSensor 試験の EC₅₀ 値が 10 μ M 以下と設定した。EC₅₀ 値 10 μ M をヒットクライテリアとする場合、10 μ M 評価時に 50%の活性を示す化合物を選抜することになるが、評価のばらつきを考慮して、1 well の測定値から化合物を選抜するプライマリースクリーニングでは 30%、3 well の測定値の平均値から化合物を選抜する再現性試験では、40%をカットオフ値とした。さらに、カウンター試験において、DMSO 添加 well における平均阻害率+3S.D.は 18.9%と算出され、阻害率がおおよそ 20%以下であれば有意な阻害ではないことを示している。そのため、カウンター試験におけるカットオフ値は 20%と設定した。また、ヒット化合物の再現率を「プライマリースクリーニングにおけるヒット化合物のうち、再現性試験においてもヒットとして選抜された化合物の割合」と定義すると、5142 化合物のうち 4595 化合物がヒットとして選抜され、再現率は 89%であった。この数値は再現率としては非常に高く、大規模スクリーニングの手段として有用であることを示唆している。

GPR3 のようなオーファン GPCR における恒常活性は、細胞膜上にある受容体の発現レベルと関連している(Lowther et al. 2013)。本研究においては、発現誘導が可能な T-REx システムが非常に有用であった。実際、テトラサイクリン添加のみで、容易に GPR3 の活性調節

が可能であった (Fig. 4)。また、パイロットスクリーニングでは、Fig. 11D に示した通り、76 化合物が hGPR3 に対して 30%以上の阻害活性を示したにも関わらず、カウンター試験との活性差が認められた化合物は 1 化合物のみであった。再現性及びカウンター試験においても、hGPR3 に対する阻害率とカウンター試験における阻害率を比較すると、ほとんどの化合物においてこれら 2 つの評価間で同等の活性値を示していた (Fig. 14D)。このような化合物は hGPR3 の発現に関係なく GloSensor の活性を阻害することから、GloSensor のルシフェラーゼ活性を阻害している、あるいは cAMP 産生を促すアデニル酸シクラーゼを阻害する化合物であると推察される。また、短時間の処置にも関わらず化合物が強い細胞毒性活性を持ち、結果として GloSensor の活性を阻害した可能性も考えられる。ルシフェラーゼは GloSensor には必須であり、GloSensor を使用する以上、ルシフェラーゼの活性阻害に基づく擬陽性を取り除くことは不可能である。それゆえ、最適なカウンター試験を設定することが重要になる。本研究においては、発現誘導可能な安定発現細胞株を樹立したことで、hGPR3 非誘導型の細胞を用いたカウンター試験が設定できた。つまり、hGPR3 GloSensor 試験とカウンター試験の差が、同じ細胞のシグナル伝達の誘発点 (hGPR3 かアデニル酸シクラーゼ) の違いのみに帰結でき、細胞株や細胞クローンの違いによる影響を排除することが可能となった。結果として、非誘導型の細胞株を用いたカウンター試験は、非特異的な化合物排除の効果的なフィルターとして機能したと考える。

今回、化合物の選択性を評価するために、hMC4R, hGPR6, hGPR12 の 3 ターゲットを選んだ。GPR6 及び GPR12 は、GPR3 と同一ファミリーに属する caGPCR として知られている (Joost and Methner 2002)。hGPR3 との相同性は、それぞれ hGPR6 が 58%、hGPR12 が 56% である。この数値は、内因性アゴニストが同一である GPCR ファミリーと同程度であり、非常に高い。例えば、ヒトにおいて、ドパミンを内因性アゴニストとするドパミン受容体 1 型から 5 型のサブタイプ間の相同性が 20%から 52%、アセチルコリンを内因性アゴニストとするムスカリン作働性アセチルコリン受容体 1 型から 5 型のサブタイプ間の相同性が

42%から 52%, グルタミン酸を内因性アゴニストとする代謝型グルタミン酸受容体 1 型から 8 型のサブタイプ間の相同性は 33%から 75%である。そして, 上記の GPCR において, 共通の内因性リガンドと競合的に結合し, 高いサブタイプ選択性を示す化合物は, ほとんど得られていない(Suzuki et al. 2007; Conn, Christopoulos, and Lindsley 2009; Conn, Jones, and Lindsley 2009; Lei Ma 2009)。GPR3 の結晶構造情報はなく, 選択性が期待できるアロステリック様な結合サイトの有無は不明である。そのため, これら GPR6 及び GPR12 に対して高い選択性をもつ化合物がライブラリー内に存在していない可能性も十分にあると考え, 化合物絞り込みの指標となる選択性対照には, 別のターゲットを使用することとした。GPR6 や GPR12 の次に近い GPCR ファミリーとしては, メラノコルチン受容体ファミリー, カンナビノイド受容体ファミリー, EDG 受容体ファミリーが挙げられる(Joost and Methner 2002)。この中から, GPR3 と同様に Gs タンパク質共役型で恒常活性を示し, 既にアゴニスト及びインバーシアゴニストが入手可能な MC4R を選択した(Chai et al. 2003; Tao et al. 2010)。以上より, hMC4R は選択性 10 倍以上が必須のクライテリアとして, hGPR6 及び hGPR12 は選択性を必須としない化合物プロファイリングとして設定した (Fig. 12)。最終的に, hGPR6 及び hGPR12 に対する選択性が十分でない場合は, スクリーニング後のヒット化合物の合成展開によって選択性向上を目指すこととした。

ほとんどの擬陽性化合物はカウンター試験にて排除されたにも関わらず, いくつかの化合物は hMC4R に対して阻害活性を示した (Fig. 15)。hGPR3 と hMC4R のアミノ酸相同性は 19%程度と低いことを考慮すると, これらの化合物が直接両受容体に結合し活性を示す可能性は極めて低いが, 様々な GPCR に結合する GPCR frequent hitter の可能性も否定できない(Schann, Bouvier, and Neuville 2013)。あるいは, カウンター試験において, Gs タンパク質非依存的にアデニル酸シクラーゼを直接活性化する forskolin を刺激剤として用いていることから, アデニル酸シクラーゼよりも上流に位置する因子, つまり Gs タンパク質に作用する化合物が, 非選択的化合物として同定された可能性も考えられる。この場合は, 細胞

に Gs タンパク質を過剰発現させ、化合物の阻害活性が減弱するかどうか確認することで検証可能であると考えている。また、hMC4R に対する選択性 10 倍以上を満たす 5 系統の代表化合物は、GPR6 及び GPR12 に対する選択性も評価した (Fig. 17)。合成展開前のライブラリー化合物の段階で、相同性の高い同一ファミリーに対する選択性を示すことは難しいと予想していたが、hGPR6 及び hGPR12 に対して Compound 8, Compound 9, Compound 50 はいずれも 30 μ M 以上の EC₅₀ 値を示し、10 倍以上の選択性が想定される結果であった。GPR3 に対する活性が最も強かった Compound 28 は 50 倍以上の選択性が確認された。唯一 Compound 2 のみ、選択性が 10 倍以内ではあったが、全体的に想定以上の選択性が確認できた。理由として、GPR3, GPR6, GPR12 はいずれもオーファン GPCR に分類されており、共通の内因性リガンドが存在しないと仮定すると、潜在的に活性を制御する化合物結合ポケットのアミノ酸配列が進化的に保存されておらず、多様性があったと考えられる。あるいは、これらの受容体にまだ同定されていない共通の内因性リガンドが存在していたと仮定すると、リガンド結合部位は同一ファミリー内で高度に保存されていることが想定されるため、化合物がその未同定のリガンドの結合部位に対してアロステリックな部位に結合している可能性を考えている。

5 系統の代表化合物は、cAMP シグナルに加えて、 β アレスチンの評価も実施した (Fig. 16)。クライテリアとして両シグナルを阻害する化合物とした理由として、期待する薬効が両シグナル伝達経路を介している可能性があったことに加え、Target Engagement の確度を上げる目的があった。GPCR のような膜受容体は単離することが難しく、未だに GPR3 は結晶構造の報告がないこと、またオーファン GPCR であり、競合的に結合を評価可能なラジオリガンドもないため、直接的に化合物の GPR3 への作用を確認することは難しい。しかし、標的 GPCR の生理機能解析のためのツール化合物開発を含めて創薬全般において、Target Engagement は非常に重要である (Wagner 2008; Morgan et al. 2012)。そこで、複数の評価系を用いて GPR3 選択的インバーシアゴニスト活性を確認することで、化合物が標的で

ある GPR3 に作用している確度を間接的に上げることが可能であると考えた。GPCR への β アレスチン結合を指標としたハイスループットな評価系としては、PathHunter 試験が多くの GPCR において利用されている(van Der Lee et al. 2008; McGuinness et al. 2009; van Der Lee et al. 2009; Yin et al. 2009; Bassoni et al. 2012)。PathHunter 試験におけるインバースアゴニストの活性評価として、カンナビノイド受容体である CB1 及び CB2 について報告されていたが、標準的な化合物インキュベーション時間である 1.5 時間において、コントロール値からの低下は最大でも 14%から 25%程度であった(McGuinness et al. 2009; van Der Lee et al. 2009)。実際、hGPR3 PathHunter 試験において、化合物処置時間を 1.5 時間として評価した場合の最大阻害活性は 10%程度であり、正確に化合物評価を行うには評価ウィンドウが不十分であると判断した。要因として、caGPCR は恒常活性を示すことから、化合物添加前から GPCR と β アレスチンの複合体が存在し、分解と複合体形成がある一定の平衡状態にあることが考えられる。インバースアゴニストは、その化合物添加後に生じる複合体形成を阻害できるが、添加前のすでに生じている複合体のシグナルは残ってしまうため、短時間ではシグナルの有意な低下が検出しにくい。つまり、すでにある複合体の分解が進む時間が必要と考え、化合物処置時間を 6 時間まで延長したところ、化合物の最大活性が 10%から 40%程度まで増加し、この条件にて化合物評価することとした。選抜した代表 5 化合物はいずれも β アレスチンに対する阻害を示し、24%から 40%の最大阻害活性を示した (Fig. 16)。既報の CBD においても、最大阻害活性値は 40%程度であり、妥当な数値と考える(Laun and Song 2017)。

最終的に見出された代表化合物の構造及び活性プロファイルは Table.1 に示した通りである。既報のトリアゾロピリミジン骨格の代表化合物である Compound 28 は、Thomas らの論文における Compound 9d と同一構造である。彼らは、HTRF を用いて細胞内 cAMP 量を指標に SAR を実施しており、Compound 9d の EC₅₀ 値として 0.794 μ M と報告している(Jensen et al. 2014)。本報告にて実施した GloSensor 試験による cAMP 阻害評価において、0.46 \pm

0.039 μM と HTRF での報告値と同等の EC_{50} 値が算出されており、GloSensor を用いた評価の妥当性が示唆された (Table.1)。加えて、今回のスクリーニングによって、 EC_{50} 値 10 μM 以下を示す新規 hGPR3 インバーシアゴニストを 4 系統見出すことができた。トリアゾロピリミジン骨格化合物のように強い活性を持つ化合物は言うまでもなく、活性が弱いながらも hGPR3 選択的なインバーシアゴニストを複数同定することが可能となったのは、GloSensor 試験の特徴である広い S/B 比とシグナル安定性の寄与が大きい。これらの結果は、GloSensor 試験が多種多様な hGPR3 インバーシアゴニストを同定する効果的な評価系であることを示唆している。また、インバーシアゴニスト探索に GloSensor を用いるというアプローチは、これまでに十分な S/B 比が確保できない、評価ウインドウが小さい、評価系のばらつきが大きい、再現性が悪いなどの理由で HTS に耐えうる評価系構築に至らなかった、他のオーファン caGPCR に対しても適用できる可能性が十分にある。

これまで β アレスチンに対する阻害に関しての報告はなかったトリアゾロピリミジン骨格に関して、Compound 28 の hGPR3 PathHunter 試験における EC_{50} 値が 1.4 μM と算出され、両シグナルに対して阻害活性を持つ化合物であることがわかった (Table.1)。Compound 28 と同様に、cAMP に対する阻害と比較して β アレスチンに対する阻害が 3 倍程度弱かった化合物として Compound 50 が挙げられる。逆に、cAMP に対する阻害と比較して β アレスチンに対する阻害が同等の化合物として Compound 2, Compound 8, Compound 9 が挙げられる。このように 2 つの独立した細胞内シグナルに対して異なるインバーシアゴニスト活性を示す化合物が見出されたことは、非常に魅力的である。GPR3 に対する化合物結合様式は現時点で不明だが、下流シグナルへの影響が異なることから化合物結合部位が異なる可能性が示唆される。化合物の合成展開を進める上で、異なる化合物ポケットに結合する化合物、あるいは同一ポケット内であっても異なるアミノ酸残基と相互作用する化合物を複数選ぶことは、リード化合物創生及び最適化の失敗リスクの分散に繋がる。合成展開により最終的に得られる化合物の最大活性は、化合物ポケットごとに固有のものであり、す

べてが十分な阻害活性を発揮する化合物ポケットとは限らない。また、化合物と GPCR の結合において重要なアミノ酸が選択性を必要とする GPCR と同一であった場合、合成展開によって活性を向上させても選択性を拡大していくことは困難を極める。以上より、機能解析を目的としたツール化合物探索や低分子化合物の創薬において、合成展開の出発点として異なる結合様式が想定される化合物を複数見出すことは重要なポイントとなる。

近年、GPCR リガンドの中には、G タンパク質依存的なシグナル伝達経路と β アレスチンシグナル伝達経路のうち、いずれか一方のシグナル伝達経路に対して相対的に強く作用するバイアスドリガンドが存在することが明らかとなってきた(Rajagopal, Rajagopal, and Lefkowitz 2010)。現時点で代表 5 化合物はいずれも、有意にバイアスドリガンドと呼べる化合物ではないが、合成展開によってバイアスドリガンドが得られる可能性も考えられる。GPR3 のように、2 つの独立したシグナル伝達経路をもつ GPCR の機能解析を実施する際、単一シグナルのみに作用するバイアスドリガンドが存在すると、よりシグナル選択的な機能解析が可能となる。また、すでに上市されている治療薬の中にもバイアスドリガンドはいくつか存在し、作用と副作用を分けることができることから、治療薬開発において注目されている(Kenakin 2011; Correll and McKittrick 2014; Violin et al. 2014)。それぞれのシグナル伝達経路に依存した機能が解明されれば、将来、必要な作用のみを持つ治療薬を開発することが可能となるだろう。今後、これらのヒット化合物から合成展開を実施し、活性の向上した化合物を用いての細胞レベルでの機能解析及び病態モデルにおけるインバーサアゴニストの作用を調査したい。

結論として、発現誘導可能な細胞株を用いた、GloSensor によるオーファン caGPCR のインバーサアゴニスト探索のための大規模スクリーニングを成功させ、cAMP 及び β アレスチンの両シグナルを阻害する新たな GPR3 選択的インバーサアゴニストを複数見出すことが出来た。GloSensor 試験の構築は簡便で、評価ウィンドウが広く、再現性も非常に良好であった。それゆえ、GloSensor が様々な caGPCR のスクリーニングを促進し、caGPCR のリ

ガンド探索に役立ち、そのツールをもって機能解析が活発化することを期待する。本スクリーニングで見出された 5 系統代表 5 化合物は、いずれも GloSensor 評価だけでなく、PathHunter 試験においても GPR3 選択的インバースアゴニスト活性を示す、target engagement の確度が高い化合物であると考えられる。今後はヒット化合物の合成展開を実施し、GPR3 に対するインバースアゴニスト活性向上及び最適化を経て、GPR3 の病態への関与を明らかにするツールとして活用したい。最終的には、これら GPR3 インバースアゴニストが、アルツハイマー病やうつ病など中枢神経系疾患の新規治療薬となることを目指し、開発を進めたい。

総括

本研究では、大規模なインバースアゴニストスクリーニングに耐えうる評価系として GloSensor 試験を検討し、約 30 万の化合物ライブラリーを用いたスクリーニングにより cAMP 及び β アレスチンの両シグナルを阻害する GPR3 選択的な確度の高いインバースアゴニストを見出すことを目的とした。

発現誘導可能な T-REx システムを用いた hGPR3/GloSensor 安定発現細胞株を樹立し、GloSensor 試験の条件検討により HTS に耐えうる評価系を構築した。cAMP シグナル検出方法として一般的に HTS にて広く使用されている HTRF では、S/B 比が 2 倍程度であったのに対し GloSensor では、S/B 比が 18 倍程度確保でき、発光値も試薬添加後 300 分まで安定していた。HTS 評価系のクオリティを担保する指標である Z' factor は 0.7 を超え、Excellent Assay とされる Z' factor が 0.5 以上という基準を十分に満たしていた(Zhang, Chung, and Oldenburg 1999)。以上より、GloSensor 試験が hGPR3 インバースアゴニスト探索のための HTS に適していることが示唆された。

構築した GloSensor 試験にて、約 30 万の化合物ライブラリースクリーニングを実施した。プライマリースクリーニングでは、Z' factor の平均値は 0.83 と算出され、900 枚程度の全化合物プレートにおいて高品質な評価を維持することが出来た。その結果、再現性試験を実施した化合物に関して、プライマリースクリーニングとの再現率を計算したところ 89% と非常に高い数値であった。このことから、GloSensor 試験がいかに安定した評価系であるかが示唆された。評価系の擬陽性を排除する際には、hGPR3 発現非誘導細胞をカウンター試験とし、シグナル惹起点の違いにのみ帰結出来る条件で、効率的に選抜可能であった。続いて hMC4R を選択性対照として濃度依存性試験を実施し、hGPR3 に対する EC₅₀ 値が 10 μ M 以下を示し、hMC4R に対する選択性が 10 倍以上を示した 35 化合物を見出した。これらの化合物は、構造情報に基づき系統分類された。5 系統の代表化合物に対して、G タンパク質非依存的な β アレスチンシグナル伝達経路に対する作用を PathHunter 試験にて評価し

たところ、いずれの化合物もインバースアゴニスト作用を有しており、ヒット化合物として選抜された。また、これら 5 系統の代表化合物は、同一ファミリーである GPR6 及び GPR12 に対する活性も確認し、4 系統は 10 倍以上の選択性を持ち、1 系統は 4~5 倍の選択性ではあったが、少なくとも GPR3 に対して強い化合物であった。このように、GPR3 選択的かつ cAMP 及び β アレスチンの両シグナルを阻害するインバースアゴニストの報告は初めてである。

ヒット 5 系統のうち 1 系統はトリアゾロピリミジン骨格化合物であり、これまでに cAMP 産生阻害は報告されていたが β アレスチンシグナル阻害の報告はなかった(Jensen et al. 2014)。見出したヒット化合物と同一構造の化合物もその論文内に含まれており、HTRF 試験にて cAMP 産生阻害の EC₅₀ 値が 0.794 μ M と報告されている。一方、本スクリーニングにて実際に Glosensor 試験を用いて算出した EC₅₀ 値は 0.46 \pm 0.039 μ M とほぼ同等の値を示しており、GloSensor 試験の妥当性が示された。その他、4 系統代表化合物はいずれもこれまでに報告のない新規骨格の hGPR3 インバースアゴニストであり、GloSensor を用いることで、多様な骨格を持つ化合物を見出すことが出来た。これは、ダイナミックレンジが広く高感度で安定した発光値を示していた Glosensor の特徴が多分に寄与している。これまでに、ダイナミックレンジが狭い、安定しないなどの理由でスクリーニング実施をあきらめていた GPCR にも応用可能な技術である。今回の発見が、他の様々な GPCR のスクリーニングに応用されて多くのリガンドが見出され、GPCR の生理機能解析が推進されていくことを期待する。

2 つの独立したシグナル伝達経路を持つ GPCR においては、バイアスドリガンドという一方のシグナル伝達経路のみを阻害する化合物がいくつか存在する(Kenakin 2011; Correll and McKittrick 2014; Violin et al. 2014)。今回見出された代表 5 化合物はいずれも cAMP 及び β アレスチンの両シグナルを同程度に阻害しており、バイアスドリガンドと呼べる化合物はなかった。GPR3 は、 β アレスチンシグナルがアルツハイマー病と関係していることが

示唆されている(Thathiah et al. 2013)。今後の合成展開によって、 β アレスチン選択的に阻害活性を示す化合物が見出されると、作用と副作用の切り分けが適った魅力的な治療薬となるかもしれない。

GPR3 はノックアウトマウスやノックダウンの検討から、アルツハイマー病やうつ病への関与が示唆されているが、低分子化合物を用いて病態への関与を示した報告はない(Thathiah et al. 2009; Valverde et al. 2009)。今回見出した化合物はヒットレベルの化合物であり、*in vivo* 評価に使用可能な薬理活性や脳内移行性も含めた薬物動態プロファイルを有するツール化合物かどうかは、さらなる検討が必要である。しかし、病態への関係性が示唆されている cAMP 及び β アレスチンの両シグナルを阻害する GPR3 選択的インバースアゴニストとして多様な骨格を見出すことができ、ツール化合物の開発の成功確率はこれまでと比較して上がったと考えている。また、複数の評価系で GPR3 選択的なインバースアゴニスト作用が確認できたことで、化合物が GPR3 に作用しているという Target Engagement の確度も上がったと考えている。今後、ヒット化合物のさらなる評価を行うとともに合成展開を実施し、活性、選択性、薬物動態プロファイルが最適化された化合物創出を目指したい。さらに、創出した化合物をツールとして GPR3 と各種病態との関係性について詳細に解明していきたい。最終的には *in vivo* 病態モデルなどの評価を実施し、アルツハイマー病やうつ病などの疾患に対する新たな治療薬となる可能性を探っていきたい。

尚，本論文の一部は，以下のように公表した。

論文発表

1. Development of a High-Throughput Screening-Compatible Assay for Discovery of GPR3 Inverse Agonists Using a cAMP Biosensor

Kumiko Ayukawa, Chie Suzuki, Hiroyuki Ogasawara, Tomomi Kinoshita, Masahiro Furuno,
Gentaroh Suzuki

SLAS Discov. 2020 Mar;25(3):287-298.

引用文献

- Bakker, R. A., S. B. Schoonus, M. J. Smit, H. Timmerman, and R. Leurs. 2001. 'Histamine H(1)-receptor activation of nuclear factor-kappa B: roles for G beta gamma- and G alpha(q/11)-subunits in constitutive and agonist-mediated signaling', *Mol Pharmacol*, 60: 1133-42.
- Bakker, Remko A., Kerstin Wieland, Henk Timmerman, and Rob Leurs. 2000. 'Constitutive activity of the histamine H1 receptor reveals inverse agonism of histamine H1 receptor antagonists', *European Journal of Pharmacology*, 387: R5-R7.
- Bassoni, D. L., W. J. Raab, P. L. Achacoso, C. Y. Loh, and T. S. Wehrman. 2012. 'Measurements of β -arrestin recruitment to activated seven transmembrane receptors using enzyme complementation', *Methods Mol Biol*, 897: 181-203.
- Binkowski, B. F., B. L. Butler, P. F. Stecha, C. T. Eggers, P. Otto, K. Zimmerman, G. Vidugiris, M. G. Wood, L. P. Encell, F. Fan, and K. V. Wood. 2011. 'A luminescent biosensor with increased dynamic range for intracellular cAMP', *ACS Chem Biol*, 6: 1193-7.
- Bockaert, J., and J. P. Pin. 1999. 'Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success', *EMBO J*, 18: 1723-9.
- Chai, Biao-Xin, Richard R. Neubig, Glenn L. Millhauser, Darren A. Thompson, Pilgrim J. Jackson, Gregory S. Barsh, Chris J. Dickinson, Ji-Yao Li, Yu-Mei Lai, and Ira Gantz. 2003. 'Inverse agonist activity of agouti and agouti-related protein', *Peptides*, 24: 603-09.
- Chalmers, D. T., and D. P. Behan. 2002. 'The use of constitutively active GPCRs in drug discovery and functional genomics', *Nat Rev Drug Discov*, 1: 599-608.
- Chan, J. D., J. D. McCorvy, S. Acharya, M. E. Johns, T. A. Day, B. L. Roth, and J. S. Marchant. 2016. 'A Miniaturized Screen of a Schistosoma mansoni Serotonergic G Protein-Coupled Receptor Identifies Novel Classes of Parasite-Selective Inhibitors', *PLoS Pathog*, 12: e1005651.
- Civelli, O., H. P. Nothacker, Y. Saito, Z. W. Wang, S. H. S. Lin, and R. K. Reinscheid. 2001. 'Novel neurotransmitters as natural ligands of orphan G-protein-coupled receptors', *Trends in Neurosciences*, 24: 230-37.
- Conn, P. J., A. Christopoulos, and C. W. Lindsley. 2009. 'Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders', *Nat Rev Drug Discov*, 8: 41-54.
- Conn, P. J., C. K. Jones, and C. W. Lindsley. 2009. 'Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders', *Trends Pharmacol Sci*, 30: 148-55.

- Correll, C. C., and B. A. McKittrick. 2014. 'Biased ligand modulation of seven transmembrane receptors (7TMRs): functional implications for drug discovery', *J Med Chem*, 57: 6887-96.
- Costa, T., and A. Herz. 1989. 'Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 7321-5.
- Das, A. K., S. Yoshimura, R. Mishima, K. Fujimoto, H. Mizuguchi, S. Dev, Y. Wakayama, Y. Kitamura, S. Horio, N. Takeda, and H. Fukui. 2007. 'Stimulation of histamine H1 receptor up-regulates histamine H1 receptor itself through activation of receptor gene transcription', *J Pharmacol Sci*, 103: 374-82.
- Degorce, F., A. Card, S. Soh, E. Trinquet, G. P. Knapik, and B. Xie. 2009. 'HTRF: A technology tailored for drug discovery - a review of theoretical aspects and recent applications', *Curr Chem Genomics*, 3: 22-32.
- Dryja, T. P., T. L. McGee, E. Reichel, L. B. Hahn, G. S. Cowley, D. W. Yandell, M. A. Sandberg, and E. L. Berson. 1990. 'A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa', *Nature*, 343: 364-6.
- Dwivedi, Y., and G. N. Pandey. 2008. 'Adenylyl cyclase-cyclicAMP signaling in mood disorders: role of the crucial phosphorylating enzyme protein kinase A', *Neuropsychiatr Dis Treat*, 4: 161-76.
- Eggerickx, D., J. F. Deneff, O. Labbe, Y. Hayashi, S. Refetoff, G. Vassart, M. Parmentier, and F. Libert. 1995. 'Molecular cloning of an orphan G-protein-coupled receptor that constitutively activates adenylate cyclase', *Biochem J*, 309 (Pt 3): 837-43.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin, and H. B. Schioth. 2003. 'The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints', *Mol Pharmacol*, 63: 1256-72.
- Gabriel, D., M. Vernier, M. J. Pfeifer, B. Dasen, L. Tenaillon, and R. Bouhelal. 2003. 'High throughput screening technologies for direct cyclic AMP measurement', *Assay Drug Dev Technol*, 1: 291-303.
- Gilissen, J., P. Geubelle, N. Dupuis, C. Laschet, B. Pirotte, and J. Hanson. 2015. 'Forskolin-free cAMP assay for Gi-coupled receptors', *Biochem Pharmacol*, 98: 381-91.
- Glickman, J. F., A. Schmid, and S. Ferrand. 2008. 'Scintillation proximity assays in high-throughput screening', *Assay Drug Dev Technol*, 6: 433-55.
- Hauser, A. S., M. M. Attwood, M. Rask-Andersen, H. B. Schioth, and D. E. Gloriam. 2017. 'Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications', *Nat Rev Drug Discov*, 16: 829-42.
- Hill, S. J., C. Williams, and L. T. May. 2010. 'Insights into GPCR pharmacology from the measurement of changes in intracellular cyclic AMP; advantages and pitfalls of

- differing methodologies', *Br J Pharmacol*, 161: 1266-75.
- Hinuma, S., H. Onda, and M. Fujino. 1999. 'The quest for novel bioactive peptides utilizing orphan seven-transmembrane-domain receptors', *J Mol Med (Berl)*, 77: 495-504.
- Iismaa, T. P., J. Kiefer, M. L. Liu, E. Baker, G. R. Sutherland, and J. Shine. 1994. 'Isolation and chromosomal localization of a novel human G-protein-coupled receptor (GPR3) expressed predominantly in the central nervous system', *Genomics*, 24: 391-4.
- Jensen, T., L. Elster, S. M. Nielsen, S. B. Poda, F. Loechel, C. Volbracht, I. V. Klewe, L. David, and S. P. Watson. 2014. 'The identification of GPR3 inverse agonist AF64394; the first small molecule inhibitor of GPR3 receptor function', *Bioorg Med Chem Lett*, 24: 5195-8.
- Joost, P., and A. Methner. 2002. 'Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands', *Genome Biol*, 3: RESEARCH0063.
- Kenakin, T. 2011. 'Functional selectivity and biased receptor signaling', *J Pharmacol Exp Ther*, 336: 296-302.
- Kitamura, Y., H. Nakagawa, T. Fujii, T. Sakoda, T. Enomoto, H. Mizuguchi, H. Fukui, and N. Takeda. 2015. 'Effects of antihistamine on up-regulation of histamine H1 receptor mRNA in the nasal mucosa of patients with pollinosis induced by controlled cedar pollen challenge in an environmental exposure unit', *J Pharmacol Sci*, 129: 183-7.
- Laun, A. S., and Z. H. Song. 2017. 'GPR3 and GPR6, novel molecular targets for cannabidiol', *Biochem Biophys Res Commun*, 490: 17-21.
- Lei Ma, Matthew A. Seager, Marion Wittmann, Marlene Jacobson, Denise Bickel, Maryann Burno, Keith Jones, Valerie Kuzmick Graufelds, Guangping Xu, Michelle Pearson, Alexander McCampbell, Renee Gaspar, Paul Shughrue, Andrew Danziger, Christopher Regan, Rose Flick, Danette Pascarella, Susan Garson, Scott Doran, Constantine Kreatsoulas, Lone Veng, Craig W. Lindsley, William Shipe, Scott Kuduk, Cyrille Sur, Gene Kinney, Guy R. Seabrook, and William J. Ray. 2009. 'Correction for Ma et al., Selective activation of the M1 muscarinic acetylcholine receptor achieved by allosteric potentiation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 18040-40.
- Leonard, S., G. K. Kinsella, E. Benetti, and J. B. C. Findlay. 2016. 'Regulating the effects of GPR21, a novel target for type 2 diabetes', *Sci Rep*, 6: 27002.
- Leurs, Rob, Martine J. Smit, Astrid E. Alewijnse, and Henk Timmerman. 1998. 'Agonist-independent regulation of constitutively active G-protein-coupled receptors', *Trends in Biochemical Sciences*, 23: 418-22.
- Lowther, K. M., T. F. Uliasz, K. R. Gotz, V. O. Nikolaev, and L. M. Mehlmann. 2013.

- 'Regulation of Constitutive GPR3 Signaling and Surface Localization by GRK2 and beta-arrestin-2 Overexpression in HEK293 Cells', *PLoS One*, 8: e65365.
- Marchese, Adriano, Susan R. George, Lee F. Kolakowski, Kevin R. Lynch, and Brian F. O'Dowd. 1999. 'Novel GPCRs and their endogenous ligands: expanding the boundaries of physiology and pharmacology', *Trends in Pharmacological Sciences*, 20: 370-75.
- McGuinness, D., A. Malikzay, R. Visconti, K. Lin, M. Bayne, F. Monsma, and C. A. Lunn. 2009. 'Characterizing cannabinoid CB2 receptor ligands using DiscoverX PathHunter beta-arrestin assay', *J Biomol Screen*, 14: 49-58.
- Milligan, Graeme, Richard A. Bond, and Melanie Lee. 1995. 'Inverse agonism: pharmacological curiosity or potential therapeutic strategy?', *Trends in Pharmacological Sciences*, 16: 10-13.
- Mizuguchi, H., S. Ono, M. Hattori, Y. Sasaki, and H. Fukui. 2013. 'Usefulness of HeLa cells to evaluate inverse agonistic activity of antihistamines', *Int Immunopharmacol*, 15: 539-43.
- Mizuguchi, Hiroyuki, Shohei Ono, Masashi Hattori, and Hiroyuki Fukui. 2012. 'Inverse Agonistic Activity of Antihistamines and Suppression of Histamine H1 Receptor Gene Expression', *Journal of Pharmacological Sciences*, 118: 117-21.
- Morgan, P., P. H. Van Der Graaf, J. Arrowsmith, D. E. Feltner, K. S. Drummond, C. D. Wegner, and S. D. Street. 2012. 'Can the flow of medicines be improved? Fundamental pharmacokinetic and pharmacological principles toward improving Phase II survival', *Drug Discov Today*, 17: 419-24.
- Overington, J. P., B. Al-Lazikani, and A. L. Hopkins. 2006. 'How many drug targets are there?', *Nat Rev Drug Discov*, 5: 993-6.
- Pantel, J., S. Y. Williams, D. Mi, J. Sebag, J. D. Corbin, C. D. Weaver, and R. D. Cone. 2011. 'Development of a high throughput screen for allosteric modulators of melanocortin-4 receptor signaling using a real time cAMP assay', *Eur J Pharmacol*, 660: 139-47.
- Parma, J., L. Duprez, J. Van Sande, P. Cochaux, C. Gervy, J. Mockel, J. Dumont, and G. Vassart. 1993. 'Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas', *Nature*, 365: 649-51.
- Post, S. R., R. S. Ostrom, and P. A. Insel. 2000. 'Biochemical methods for detection and measurement of cyclic AMP and adenylyl cyclase activity', *Methods Mol Biol*, 126: 363-74.
- Qin, Y., E. M. Verdegaal, M. Siderius, J. P. Bebelman, M. J. Smit, R. Leurs, R. Willemze, C. P. Tensen, and S. Osanto. 2011. 'Quantitative expression profiling of G-protein-coupled receptors (GPCRs) in metastatic melanoma: the constitutively active orphan

- GPCR GPR18 as novel drug target', *Pigment Cell Melanoma Res*, 24: 207-18.
- Rajagopal, S., K. Rajagopal, and R. J. Lefkowitz. 2010. 'Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors', *Nat Rev Drug Discov*, 9: 373-86.
- Santos, R., O. Ursu, A. Gaulton, A. P. Bento, R. S. Donadi, C. G. Bologa, A. Karlsson, B. Al-Lazikani, A. Hersey, T. I. Oprea, and J. P. Overington. 2017. 'A comprehensive map of molecular drug targets', *Nat Rev Drug Discov*, 16: 19-34.
- Schann, S., M. Bouvier, and P. Neuville. 2013. 'Technology combination to address GPCR allosteric modulator drug-discovery pitfalls', *Drug Discov Today Technol*, 10: e261-7.
- Simonds, William F. 1999. 'G protein regulation of adenylate cyclase', *Trends in Pharmacological Sciences*, 20: 66-73.
- Stadel, Jeffrey M., Shelagh Wilson, and Derk J. Bergsma. 1997. 'Orphan G protein-coupled receptors: a neglected opportunity for pioneer drug discovery', *Trends in Pharmacological Sciences*, 18: 430-37.
- Suzuki, G., H. Kawamoto, and H. Ohta. 2010. 'Development of a beta-lactamase reporter gene assay for metabotropic glutamate receptor 1 by using coexpression of glutamate transporter', *J Biomol Screen*, 15: 148-58.
- Suzuki, G., T. Kimura, A. Satow, N. Kaneko, J. Fukuda, H. Hikichi, N. Sakai, S. Maehara, H. Kawagoe-Takaki, M. Hata, T. Azuma, S. Ito, H. Kawamoto, and H. Ohta. 2007. 'Pharmacological characterization of a new, orally active and potent allosteric metabotropic glutamate receptor 1 antagonist, 4-[1-(2-fluoropyridin-3-yl)-5-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-N-isopropyl-N-methyl-3,6-dihydropyridine-1(2H)-carboxamide (FTIDC)', *J Pharmacol Exp Ther*, 321: 1144-53.
- Tanaka, S., K. Ishii, K. Kasai, S. O. Yoon, and Y. Saeki. 2007. 'Neural expression of G protein-coupled receptors GPR3, GPR6, and GPR12 up-regulates cyclic AMP levels and promotes neurite outgrowth', *J Biol Chem*, 282: 10506-15.
- Tao, Y. X., H. Huang, Z. Q. Wang, F. Yang, J. N. Williams, and G. V. Nikiforovich. 2010. 'Constitutive activity of neural melanocortin receptors', *Methods Enzymol*, 484: 267-79.
- Thathiah, A., K. Horre, A. Snellinx, E. Vandewyer, Y. Huang, M. Ciesielska, G. De Kloe, S. Munck, and B. De Strooper. 2013. 'beta-arrestin 2 regulates Abeta generation and gamma-secretase activity in Alzheimer's disease', *Nat Med*, 19: 43-9.
- Thathiah, A., K. Spittaels, M. Hoffmann, M. Staes, A. Cohen, K. Horre, M. Vanbrabant, F. Coun, V. Baekelandt, A. Delacourte, D. F. Fischer, D. Pollet, B. De Strooper, and P. Merchiers. 2009. 'The orphan G protein-coupled receptor 3 modulates amyloid-beta peptide generation in neurons', *Science*, 323: 946-51.
- Uhlenbrock, Kirsten, Hans Gassenhuber, and Evi Kostenis. 2002. 'Sphingosine 1-phosphate

- is a ligand of the human gpr3, gpr6 and gpr12 family of constitutively active G protein-coupled receptors', *Cellular Signalling*, 14: 941-53.
- Valverde, O., E. Celerier, M. Baranyi, P. Vanderhaeghen, R. Maldonado, B. Sperlagh, G. Vassart, and C. Ledent. 2009. 'GPR3 receptor, a novel actor in the emotional-like responses', *PLoS One*, 4: e4704.
- van Der Lee, M. M., M. Blomenrohr, A. A. van der Doelen, J. W. Wat, N. Smits, B. J. Hanson, C. J. van Koppen, and G. J. Zaman. 2009. 'Pharmacological characterization of receptor redistribution and beta-arrestin recruitment assays for the cannabinoid receptor 1', *J Biomol Screen*, 14: 811-23.
- van Der Lee, M. M., M. Bras, C. J. van Koppen, and G. J. Zaman. 2008. 'beta-Arrestin recruitment assay for the identification of agonists of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG1', *J Biomol Screen*, 13: 986-98.
- Vassilatis, D. K., J. G. Hohmann, H. Zeng, F. Li, J. E. Ranchalis, M. T. Mortrud, A. Brown, S. S. Rodriguez, J. R. Weller, A. C. Wright, J. E. Bergmann, and G. A. Gaitanaris. 2003. 'The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse', *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 4903-8.
- Violin, J. D., A. L. Crombie, D. G. Soergel, and M. W. Lark. 2014. 'Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress', *Trends Pharmacol Sci*, 35: 308-16.
- Wagner, J. A. 2008. 'Strategic approach to fit-for-purpose biomarkers in drug development', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 48: 631-51.
- Williams, C. 2004. 'cAMP detection methods in HTS: selecting the best from the rest', *Nat Rev Drug Discov*, 3: 125-35.
- Wilson, S., D. J. Bergsma, J. K. Chambers, A. I. Muir, K. G. Fantom, C. Ellis, P. R. Murdock, N. C. Herrity, and J. M. Stadel. 1998. 'Orphan G-protein-coupled receptors: the next generation of drug targets?', *Br J Pharmacol*, 125: 1387-92.
- Wise, A., S. C. Jupe, and S. Rees. 2004. 'The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44: 43-66.
- Yin, H., A. Chu, W. Li, B. Wang, F. Shelton, F. Otero, D. G. Nguyen, J. S. Caldwell, and Y. A. Chen. 2009. 'Lipid G protein-coupled receptor ligand identification using beta-arrestin PathHunter assay', *J Biol Chem*, 284: 12328-38.
- Zhang, J. H., T. D. Chung, and K. R. Oldenburg. 1999. 'A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays', *J Biomol Screen*, 4: 67-73.
- Zhang, R., and X. Xie. 2012. 'Tools for GPCR drug discovery', *Acta Pharmacol Sin*, 33: 372-84.

謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました九州大学大学院薬学研究院薬理学分野 津田 誠 教授ならびに日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所 鈴木 元太郎 博士に謹んで感謝いたします。

本論文を作成するにあたり，有益なご助言とご校閲を賜りました九州大学大学院薬学研究院グローバルヘルスケア分野 小柳 悟 教授，九州大学大学院薬学研究院薬効安全性学分野 仲矢 道雄 准教授ならびに九州大学大学院薬学研究院薬理学分野 齊藤 秀俊 准教授に心から深謝致します。

本論文を作成する貴重な機会をくださいました，日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 大川 滋紀 所長，医薬総合研究所生物研究所 松下 睦佳 所長，医薬総合研究所生物研究所 松崎 裕児 副所長に心より厚く御礼申し上げます。また，本実験を遂行するにあたり，ご協力を賜りました日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所の皆様へ深く感謝いたします。

最後に，本研究および本論文の作成において，温かく見守ってくれた家族に心から感謝いたします。