九州大学学術情報リポジトリ Kyushu University Institutional Repository

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

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 インバースアゴニストの探索

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
谢辞	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学的な 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、 る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 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 を使用する方が望ましい。つまり、微量の恒常活性を、いかに高感度に安定して検 出できるかどうかが、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 に対するインバースア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 50 nM 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 μ M と報告されているが,同時に GPR6 に対する EC₅₀値は 0.18 μ M 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 選択的インバー スアゴニスト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 ー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 DH5a: 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

1M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スアゴニストである 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 細胞縣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 µL/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 µL/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 µL/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 Emissionwave length; 616 nm, 2nd Emission wave length; 665 nm, Pulse length; 50 µs, Number of pulses; 8, pulse delay; 7.41 ms, measurement delay; 30 µs, Integration time; 500 µs 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 B カウ ント (ドナー) とした。A カウント/B カウント×10000 を httf ratio とし,X 軸に cAMP 濃度 の対数,Y 軸に httf 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 µL/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 µL/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 µL 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 µL/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℃ 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 2.5×10^5 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))

DiscoveRx 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℃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 μ L/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 μ M (-)-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 μ L/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 μ L/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 μ M (-)-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。

$$Y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + 10^{((logEC50 - X) * Hill Slope)}) (1)$$

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 っ 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±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 μg/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。

20



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 μ g/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±S.D.として示した。代表回の実測の RFUs(平均値±S.D.)は1 mM IBMX 存在下で 67,600±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 のインバースアゴニスト活性は,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スアゴニスト活性を, 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)。

22



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±S.D. として示した。代表回の実測の RFUs (平均値±S.D.) は 10 μ M forskolin 存在下で 29,500± 1420, IBMX 非存在下で 265±34 であった。forskolin の EC₅₀ 値は 1.05±0.174 μ M (平均値 ±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±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。





(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 添加条加後 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 µM 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 µM で hMC4R の恒常活性を完全に阻害していると判断し、1 µM 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 μ M (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 µg/well の hGPR6, hGPR12, mGPR3 発現プ ラスミドを1µg/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 µg/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 μg/well, mGPR3 は 0.03 μg/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 µg/well, mGPR3 は 0.03 µg/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 EC₅₀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±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 µM (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±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±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。

32



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 μ M 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 μ M 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 μ M (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 μM 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 μM (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± 0.03 及び 0.81±0.04 (平均値±S.D.) であった (Fig. 14A, 14B)。S/B 比に関しては。それぞ れ 17.0±1.1 及び 27.0±1.3 (平均値±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 μM 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 μ M 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 x±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 ー試験の平均%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 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 μ M 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 EC₅₀ 値が 20 μ M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 EC₅₀ 値と mGPR3 に対する EC₅₀ 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。





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±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スア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 hADRBI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 EC₃₀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、 kGPR3 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、 場択性を示した。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 µM の 6 点で評価した。結果は, それぞれ 3 well あるいは 4 well の測定値の平均 値±S.D. として示した。

2-11 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 EC₅₀ 値は 23 μM, Compound 28 の hGPR6 及び hGPR12 に対 する EC₅₀ 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 EC₅₀ 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 ±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-1Himidazol-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。

ОН	
F	,
Ó	N Ls
	~N~S~b
	п



CI	
•	

	Compound 2	Compound 8	Compound 9	Compound 28	Compound 50
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	>30	>30	>30	>30
	(21±10%)	(0.57±8.6%)	(-17±1.9%)	(-17±13%)	(5.1±4.2%)
hGPR6	23±3.7	>30	>30	23±3.9	>30
		(13±5.5%)	(6.2±4.4%)		$(12\pm 6.9\%)$
hGPR12	>30	>30	>30	30±1.3	>30
	(42±7.4%)	(4.8±7.8%)	(17±5.4%)		(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

非開示

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 EC₅₀ 値とした。その際の最大阻害活性を Max%Ctrl として記載した。

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は 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評価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 μM 以下と設定した。EC₅₀ 値 10 μM をヒットクライテリアとする場合,10 μM 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相関している(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

 $\mathbf{54}$

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 インバース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 µM 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しうる化合物結合 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 選択的インバース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イ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±

0.039 µM と HTRF での報告値と同等の EC₅₀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,EC₅₀値10 µM以 下を示す新規 hGPR3 インバースアゴニストを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 選択的なインバース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 インバース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、インバースアゴニスト探索に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 EC₅₀ 値が 1.4 μ M 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スアゴニスト活 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、 単ー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も、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スア 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 ンバース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 選択的インバース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,評価ウインドウが広く,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,Ζ' 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。このことからも,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 μM 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 μM 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±0.039 μM 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

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

<u>Kumiko Ayukawa</u>, 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. Denef, 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-proteincoupled 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. 'Forskolinfree cAMP assay for Gi-coupled receptors', *Biochem Pharmacol*, 98: 381-91.
- Glickman, J. F., A. Schmid, and S. Ferrand. 2008. 'Scintillation proximity assays in highthroughput 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. 'Agonistindependent 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-proteincoupled 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 proteincoupled 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-proteincoupled 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 betaarrestin 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 究院グローカルヘルスケア分野 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に深く感謝 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。