

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 :

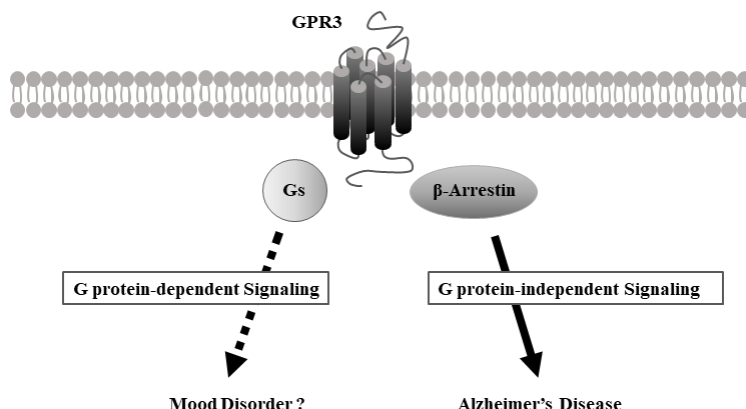
氏 名 : 鮎川 公美子

論文題名 : 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

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

G タンパク質共役型受容体 (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、大きなスーパーファミリーを形成し、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いる。その中には、リガンド非存在下においても活性を持つ **constitutively active GPCR (caGPCR)** が存在し、その生理機能解析が進められている。caGPCR の生理機能解析のツールとして、アゴニスト非依存的な恒常活性を抑制するインバースアゴニストが有用である。しかし、インバースアゴニスト探索のための化合物スクリーニングは、微量の恒常活性を検出する必要があるため、評価ウインドウが小さくなり一般的に難易度が高い。GPR3 は Gs 共役型の caGPCR と認識されており、下流シグナル伝達経路として cAMP シグナル及び β アレスチンシグナルの 2 つが知られている。ノックアウトマウスの検討からうつ病やアルツハイマー病への関与が示唆されているが、GPR3 選択的に両シグナルを阻害する化合物の報告はない。



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リアルタイムバイオセンサーである GloSensor 試験を構築し、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 High Throughput Screening (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 Homogeneous Time Resolved Fluorescence (HTRF) では、Signal to Basal (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。以上より、GloSensor 試験が hGPR3 インバーサ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活性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。非特異的化合物排除を目的としたカウンター試験は、プライマリースクリーニングにて使用した細胞と同一の細胞を hGPR3 の発現誘導をさせずに用い、forskolin 刺激による cAMP 産生阻害を指標として実施した。そのため、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 Gs 共役型の caGPCR である 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サ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 hGPR6 及び hGPR12 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 hGPR3 に対してより活性が強い化合物であった。

本研究において、Glosensor を用いた大規模化合物スクリーニングを実施し、新規骨格を含む GPR3 のインバーサゴニストを複数見出した。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た Glosensor 試験の構築に成功したこと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と考えている。また、見出したヒット化合物はいずれも GPR3 において重要な 2 つのシグナル伝達経路を阻害するインバーサゴニストである。今後の合成展開によって、GPR3 に対するインバーサゴニスト活性向上及び最適化を経て、GPR3 生理機能解析のツールとして活用したい。最終的にこれらの化合物は、うつ病やアルツハイマー病と GPR3 との関係性解明に貢献し、新規治療薬になりうると考えている。