

## 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		
論文調査委員	主査	九州大学 教授	津田 誠
	副査	九州大学 教授	小柳 悟
	副査	九州大学 准教授	仲矢 道雄
	副査	九州大学 准教授	齊藤 秀俊

### 論文審査の結果の要旨

令和2年12月21(月)に主査および副査の計4名で鮎川公美子氏の論文審査を行った。本博士論文において鮎川氏は、GloSensorを用いたHigh Throughput Screening (HTS) 評価系を新規に構築し、同評価系を用いてGPR3 インバースアゴニストの探索を行い、候補となる化合物数種の同定に成功した。

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 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。

HEK293 細胞を用いて、発現誘導可能な T-REx システムを搭載した hGPR3/GloSensor 安定発現細胞株を樹立した。GloSensor 試験の条件検討では、細胞内 cAMP 量と発光値の直線的な相関関係が確認され、発光値も試薬添加後少なくとも300分まで安定していた。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 試験では S/B 比は約18倍程度を示し、十分なダイナミックレンジを示した。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、約900枚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 EC<sub>50</sub> 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 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。

以上のように、本博士論文では、GloSensor 試験は GPR3 インバースアゴニスト活性の検出に適していることを明らかとし、大規模化合物スクリーニングにより、新規骨格を含む複数の GPR3 インバースアゴニストを見出すことに成功した。

以上、鮎川氏の研究では、ダイナミックレンジが狭いなどの理由でこれまで化合物スクリーニングを諦めていた様々な GPCR においても GloSensor 試験が適用できる可能性、また、見出した化合物が GPR3 生理機能解析の有用なツール化合物となり、最終的には中枢神経系の新規治療薬となる可能性が期待される。本内容は学位請求論文として価値ある内容であり、最終試験での主査および副査からの試問に対しても的確な回答を得た。したがって、本論文が博士（臨床薬学）の学位に値すると認める。