

2018年ポスター発表

P1. 疾患特異的 iPS 細胞バンク事業

中村幸夫（理化学研究所バイオリソース研究センター細胞材料開発室）

「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究（AMED プロジェクト）：2012～2016 年度」の中の樹立拠点プロジェクトは、疾患特異的 iPS 細胞の樹立そのものを目的として実施された日本初の大規模プロジェクトであった。同プロジェクトで樹立された疾患特異的 iPS 細胞は、全て例外なく理化学研究所（理研）細胞バンクに寄託されており、これまでに寄託された疾患特異的 iPS 細胞は既に膨大な数に達している。細胞提供疾患患者の臨床情報は疾患研究にとってきわめて重要であるが、樹立拠点プロジェクトで樹立された細胞株に関しては、臨床情報も一緒に寄託を受けた細胞株が多数ある。2017 年度に、臨床情報を提供するための倫理的な手続き等を整備し、臨床情報の提供も開始した。疾患特異的 iPS 細胞を活用した疾患研究が急速に普及し、様々な疾患、特に診断・治療等の技術開発が遅れている難治性疾患に関して、その基礎研究及び診断・治療・創薬等の研究が進展することを期待している。

P2. 国内最大規模植物エキストライブラリーを使用した各種スクリーニングへの応用について

淵野 裕之（国立研究会法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター）

天然物はコンビナトリアルケミストリーのみでは得られない多様性に富む構造を持ち、海外産天然資源の使用が制限される現在において、日本国内の植物資源は非常に魅力的な創薬シーズである。当センターで構築しているエキストライブラリーは、日本国内採取品を中心に生薬等様々な植物を含む上に、同じ植物でも季節や採取地を異にする多様性を重視した国内最大規模の植物エキストライブラリーとなっている。現在までに 10000 点を超えるエキスを作成し、創薬方面（抗菌・抗ウイルス等）や化粧品方面（メラニン産生抑制等）等様々なスクリーニングに活用されている。エキスサンプルはメタノール抽出物で DMSO に溶解されており、マイクロプレートに分注した形で食薬区分情報等のサンプル情報も含め、使用者へ送付される。この他に細胞毒性試験等のデータも現在付加作業を進めている。今回の発表ではこれまでのスクリーニングで得られた知見を中心に報告を行う予定である。

P3. 24,000 ヒトプロテインアレイと AlphaScreen を用いた創薬標的探索技術

竹田 浩之（愛媛大学）

プロテインアレイは数百から数万種類の組み替えタンパク質を搭載したセットである。愛媛大学プロテオサイエンスセンターでは愛媛大学発の技術で、高い合成効率を誇るコム

ギ無細胞タンパク質合成系を用いて様々なプロテインアレイを作製している。我々はこれまでプロテインキナーゼ (497 種)、転写因子 (1, 354 種)、ユビキチンリガーゼ (250 種)、自己抗原候補 (2, 181 種)、24, 000 種のヒトタンパク質を搭載した 24K ヒトプロテインアレイなどのプロテインアレイを開発した。我々はプロテインアレイと AlphaScreen を用い、疾患関連タンパク質の相互作用パートナーの探索、基質や抗原の探索、各種パスウェイ解析、バイオマーカー探索、薬剤標的タンパク質の同定などに挑戦している。本発表では 24K ヒトプロテインアレイについて主に紹介する。プロテインアレイの応用について、自由な発想によるご提案をいただけることを期待している。

P4. 日本医療研究開発機構 (AMED) の産学協働スクリーニングコンソーシアム Drug discovery Innovation & Screening Consortium (DISC) ユニット事業の取り組みについて

升村 誠 (第一三共 RD ノバーレ株式会社)

DISC は、アカデミア発の創薬の実用化を支援する、AMED 創薬戦略部 (iD3) による創薬支援推進事業の一つである。アカデミアから提案された創薬シーズを、AMED 創薬ブースターが医薬品としての実用化の可能性を判断し採択する。採択されたテーマに対し、本コンソーシアムの会員である製薬企業 22 社から提供された約 20 万の化合物ライブラリーを用いてハイスループットスクリーニング (HTS) を実施し、その結果を会員企業にフィードバックする。DISC の活動は平成 27 年度から始動し、その中で第一三共 RD ノバーレはライブラリー管理と HTS の実施の役割を担ってきたが、本年度より DISC ユニットの代表機関として、新たにアカデミアへの広報活動も加え、DISC の更なる加速化に取り組んでいる (<https://www.id3disc.jp/>)。本発表では、DISC ユニットの事業内容と、アカデミア創薬シーズの提案から採択・企業導入までのフローの概要、最近の広報活動に加え、第一三共 RD ノバーレの果たす役割についても紹介する。

P5. 京都大学・医学研究支援センター活動紹介

奥野 友紀子 (京都大学 大学院医学研究科)

医学・生命科学分野の研究発展のためには、日々高度化する先端研究技術をオンデマンドで導入することが必要である。しかし、多様化・複雑化した多数の研究機器の適切な管理更新を小規模研究単位で担うのが、近年極めて困難になってきた。そのため京都大学医学研究科では、機器共用・高度技術支援環境である医学研究支援センターを平成 23 年 11 月に発足させた。現在 DNA シークエンス解析室、ドラッグディスカバリーセンター、質量分析室、蛍光生体イメージング室、マウス行動解析室、小動物 MRI 室、合成展開支援室の 7 室で構成され、種々の受託解析・機器共用を拡大させている。これらは一部を除き、企業を含む学内外の研究者に公開されている。本発表ではこれら医学研究支援センターの活動を紹介します。

医学研究支援センターHP : <http://support-center.med.kyoto-u.ac.jp/SupportCenter>

P6. 化合物入出庫管理システムの構築

澤田 仁（アステラスリサーチテクノロジー株式会社）

P7. ディープラーニングによるラベルフリー・非侵襲的な細胞の生死識別・計数技術の開発

宮木 明朗（長浜バイオ大学）

現在用いられているヒト培養細胞の生死識別・計数技術は、染色試薬等の細胞への添加が必要であり、侵襲的に培養を中断せざるを得ないという短所がある。そこで我々は、ディープラーニングにより構築した 2 種の学習モデルの利用により、ラベルフリー・非侵襲的なヒト細胞の生死識別・計数技術を考案し、完成させた。第 1 のモデルの利用により、明視野細胞画像から正解性の高い擬似的な蛍光細胞画像の予測・生成が可能となった。また第 2 のモデルの利用により、疑似蛍光細胞画像から細胞の核位置が打点された画像の予測・生成が可能となった。別途作成したプログラムにより、打点数を自動的に計数し、細胞数を精度高く計測することができた。本法は、明視野顕微鏡による細胞の撮像画像から、蛍光ラベリング等の実験作業なしに、ラベルフリー・非侵襲・リアルタイムの細胞の生死識別・計数が可能であるという長所を有し、次世代技術として今後の汎用が期待される。

P8. ディープラーニングにより開発されたラベルフリー・非侵襲的な細胞の生死識別・計数技術の肝細胞毒性評価への応用

小野 公輔（長浜バイオ大学）

我々はこれまでに、ディープラーニングにより構築した学習モデルの利用により、ラベルフリー・非侵襲的なヒト細胞の生死識別・計数技術を開発した。本研究では、本技術の有用性検証として、肝細胞毒性評価系への応用を報告する。実験には、肝毒性評価で汎用されるヒト肝がん細胞株の HepG2 とプロテアソーム阻害剤の MG132 を用いた。生細胞数は Calcein 染色細胞数、もしくは Hoechst 33342 染色細胞数を Propidium Iodide 染色細胞数で減じて得た数値より求めた。本法により計数した生細胞数より求めた生存率と生細胞数の代替指標である ATP 値により求めた生存率の薬剤濃度依存曲線はほぼ重なり、両者は極めて高い相関を示した。本技術は、ラベルフリー（蛍光ラベリング等の実験作業不要）・非侵襲・リアルタイム・高速・自動の長所をもつことから、今後、新たな肝細胞毒性評価法として広く普及することが期待される。

P9. タンパク質結晶構造解析を用いたペプチドヒット化合物の構造生物学的研究

曾我部 智（Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社）

創薬ターゲットとなりうるタンパク質のなかで、タンパク質間相互作用に参与するタンパク質や明確なりガンド結合ポケットが少ないタンパク質は、一般的に“Undruggable”な

タンパク質と呼ばれている。一方、ターゲットタンパク質の構造学的知見を得ることは、スクリーニング後の” Hit to Lead” の段階でリガンド化合物を設計する際に大変有用である。特にヒット化合物がペプチドの場合、コンフォメーションがフレキシブルなため、結合様式や結合サイトを計算化学的手法などで推定することが難しく、ターゲットタンパク質との複合体の構造情報はヒット化合物の構造活性相関を理解する上で大変重要である。今回は昨年度に論文発表した BCL6、KEAP1、GPX4、K-Ras とそのペプチドヒット化合物に関する結晶構造解析の成果を報告する。

P10. Multi-head 分注機を用いた 24well plate から複数枚 96well plate への分注操作の紹介

竹内 明彦(アステラスリサーチテクノロジー株式会社 スクリーニング研究部)

薬物動態試験や安全性試験等の middle throughput の評価系では 24well plate を用いる場合があるが導入コストや処理スピードから必ずしも自動化は進んでいない。また、使用する場合でも大型の自動機器を用いる場合が多い。今回 24well plate から 96well plate へ複数枚分注する工程において Benchtop 型の Multi-head 自動分注機を用いてプログラムを作成した。96 Multi-head にチップの装着する方法を変えた 2 つの方法を用いその処理時間や分注精度などの比較を行った。また、実試験としてはハイスループット型の遺伝毒性評価である「FAT 試験」を用いて Manual 操作との比較検証を行ったので紹介する。

P11. HTS データに挑む! -HTS データ解析ツールの紹介-

古賀 浩伸(アステラスリサーチテクノロジー(株))

HTS データから最大限に情報を導き出すことを目的とした解析ツールの概要と計算事例を紹介する。①データ俯瞰ツール：主活性と選択性の XC50 値の 95%信頼区間の重なりを基準とした活性分類指標 (DRP Index) と Scaffold 様の共通部分構造を基準とした構造分類法 (Scaffold-based clustering) を用いたデータ俯瞰環境。②SAR 解析ツール：構造活性相関 (SAR) 解析を指向した化合物フラグメント (Pharmacofragment) を用いた網羅的 SAR Table 作成とインタラクティブな解析環境。③類縁体検索ツール：一般的な構造類縁体検索に加え、ヒット化合物での出現頻度が高い部分構造やメディシナルケミスト的な着想を模倣して自動発生させた仮想化合物を使用した複合的類縁体検索。

P12. Cell Voyager 7000S におけるヒト多能性幹細胞由来心筋様細胞を用いた細胞内カルシウムおよび膜電位のイメージング測定

早田 憲司 (第一三共 RD ノバーレ株式会社)

ヒト誘導多能性幹細胞 (hiPS 細胞) 由来心筋細胞の解析方法としては電気生理学的な手法が一般的であるが、細胞内カルシウム濃度変動を指標とする手法も確立されつつある。今回、我々は高速タイムラプスイメージングが可能な Cell Voyager7000S を用いて hiPS 細

胎由来心筋細胞の細胞内カルシウム濃度変動を指標にした評価系を構築した。さらに、Cell Voyager7000S のインジェクター機能を用いてイソプロテレノール (β 作用薬) やソタロール (K⁺チャンネル阻害薬) を投与すると、頻脈や徐脈といった反応をライブイメージング画像として取得することができた。さらに、細胞内カルシウム濃度と膜電位の同時測定にも成功した。得られた画像データを CellPathFinder および WAVE Finder を用いて解析を行うことで定量化することができた。

P13. 共焦点レーザー走査顕微鏡システムを用いた高解像3次元構造解析による薬物評価

杉山 崇 (オリンパス株式会社)

腫瘍組織の微小環境は、腫瘍の成長、転移および薬剤耐性獲得のプロセスにおいて重要な役割を果たしており、それを *in vitro* で再現するために3D 腫瘍組織モデルが開発されている。一方で、サイズや体積変化など、3D 腫瘍組織の特徴を分析するための強力なツールとしてイメージング技術が開発されているが、従来のイメージングの空間分解能は3D 腫瘍組織における細胞の挙動を分析するのに十分ではない。本研究では、共焦点レーザー走査顕微鏡で得られた高解像度画像に基づいて、3D 腫瘍スフェロイドにおける細胞の挙動を分析するための新しいアプローチを紹介する。高解像度画像による3次元構造解析は、腫瘍細胞と間質細胞の立体配置を保ったまま各細胞種の細胞数を明らかにし、さらにはスフェロイドの細胞分裂能や細胞外マトリックスへの腫瘍細胞の遊走および浸潤の極性の解析など、創薬ステップにおいて薬物の薬理学的作用を評価するためのツールとして有用である。

P14. ヒト iPS 細胞由来神経細胞とラット初代培養神経細胞からの Ca²⁺オシレーションの検出とスクリーニングへの試み 2 ヒト iPS 由来ドーパミン神経細胞とアストロサイトの共培養系の検討

久田 素 (浜松ホトニクス株式会社)

近年、様々なヒト iPS 細胞由来の神経細胞が各社から販売されてきており、疾患メカニズムの解析、創薬への応用展開だけでなく、様々な、毒性予測への展開が期待されております。昨年度の本学会で、我々は初代培養神経細胞の 384 データを示すとともに、iPS 由来 Mixed Cortical 神経の結果を示しました。今回、我々は、ヒト iPS 細胞由来神経細胞の Ca²⁺変動の検出を目的として、GPCR の HTS で利用される、FDSS システムを用いて、共培養系に対する条件検討を行いました。まず、ラット初代培養神経細胞に、よく使用される 10 数種類の化合物を加えて 384well で変化を見るとともに、CDI 社のヒト iPS 細胞由来 dopamine neuron/Astrocytes の共培養系に K⁺チャンネルの阻害剤などを加え、その応答性を見て、違いを比較しました。本手法は、既存の FDSS を使用して、ヒト iPS 細胞由来神経細胞の各種イオンチャンネルに応答する化合物の創薬、あるいは、痙攣てんかん等を予測する副作用検出・毒性スクリーニングに利用できる可能性があると考えられます。

P15. 各種ヒト iPS 細胞由来心筋細胞と Ca²⁺感受性蛍光色素を用いた心毒性スクリーニング

加藤 なつみ(浜松ホトニクス株式会社)

非臨床試験における催不整脈作用の予測は最重要課題の 1 つである。近年、薬物誘発性心毒性の予測に有望なツールとしてヒト iPS 細胞由来心筋細胞（以下、hiPS 心筋）が期待されており、様々な hiPS 心筋が各社から販売されている。それらの hiPS 心筋は、心筋細胞の純度や心室筋の割合、培養手法等にそれぞれ特徴を有しているものの、各種 hiPS 心筋の薬剤応答性について、網羅的に比較した結果は報告されていない。そこで、各社から市販されている hiPS 心筋 7 種を用いて、ヒト iPS 細胞応用安全性評価コンソーシアム(CSAHi)で使用されている薬剤 11 種に対する薬剤応答性を測定した。測定には、ハイスループットな測定が可能な、Ca²⁺蛍光色素を用いた Ca²⁺トランジェンアッセイを用いた。

P16. 超多検体 RNA-seq 法の表現型スクリーニングへの応用

笹川 洋平(理化学研究所バイオインフォマティクス研究開発ユニット)

First-in-class 医薬の多くは表現型スクリーニングで発見された。近年、iPS 細胞やオルガノイドにより、様々な疾患で PS が可能になった。しかし、表現型ごとにアッセイ系を構築するのは困難である。また、表現型スクリーニングでは、複数の生体分子を標的とする化合物が得られる場合もある。そのため標的分子や作用機序を解明するには、様々な実験検討が必要となる。そこで、表現型変化に関わる複数の生体パスウェイを網羅的に一度にアッセイでき、かつ、数万検体のサンプルを高速に安価に計測できる技術が必要となる。RNA-seq は、同時に複数の生体パスウェイを同じサンプルから計測すると捉えられる。ところが、数万の検体を RNA-seq するには、数十億円かかる。そこで、これを数百分の 1 のコストで実施できる bulk Quartz-Seq2 を開発した。発表では、提案法の原理と性能を示し、創薬分野への応用を議論する。

P17.

P18. MEA システムを用いたヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける薬剤性痙攣毒性の検出および作用機序推定を目指した主成分分析

石橋 勇人(東北工業大学大学院工学研究科)

我々は神経ネットワークの機能(電気活動)を評価できる平面微小電極アレイ(MEA)を用いた細胞外記録法によって、中枢神経系の重篤な毒性の指標となり得る痙攣様発火を指標とした医薬品の毒性評価系の構築を行っている。これまで、作用機序の異なる既知の痙攣誘発薬剤を用いて、痙攣様発火の検出に成功してきたが、毒性予測および、作用機序推定を可能とする評価パラメータの同定には至っていない。本研究では主成分分析を用いる

ことで既知の痙攣誘発薬剤と陰性対照薬剤の分離、および、薬剤の作用機序の推定を可能とする解析パラメータの導出と解析法の構築を目指した。また、導出されたパラメータセットを用いて PTZ、および Linopirdine を未知薬剤と見立てた作用機序推定を行った結果、それぞれ作用機序の推定に成功した。本研究で行った主成分分析を用いた解析法の有効性が示唆されると共に未知薬剤への応用が期待される。

P19. 薬効・毒性評価試験に用いる 3次元配向性細胞デバイスの開発

木下 耕史（株式会社幹細胞&デバイス研究所）

ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞や神経細胞の入手手段が増えた一方で、成熟性と機能性の低さという iPS 細胞由来分化細胞特有の問題は未解決のままである。今回、我々は、弊社独自の配向性ファイバー足場を用いて心筋細胞、神経細胞および骨格筋芽細胞等を培養することで各細胞の成熟性と機能性が向上するという知見を得たので報告する。心筋細胞においては、SCN5A、KCNJ2、MYH7、MYL2 等、心室筋への成熟化の指標となる遺伝子発現量の大幅な上昇が認められた。多電極アレイを用いた薬物応答試験についても、E-4031、ベラパミル、モキシフロキサシン等の薬剤について、良好な薬剤応答性を確認している。神経細胞の場合、細胞塊の発生や凝集を防ぐことで長期培養が可能となる。また、プローブ直播に対して有意にスパイク数が増加するなど早期成熟化効果を示唆する結果を得ている。その他、凍結ラット大脳皮質由来神経細胞を用いた薬剤応答評価に関するデータもあわせて紹介する。

P20. 人工 Bystander FRET によるタンパク質間相互作用の検出

井上 健（株式会社医学生物学研究所）

P21. Fluoppi: a cell based assay for evaluating PPI modulators and/or targeted protein degraders such as PROTACs

渡部 拓（株式会社医学生物学研究所）

Even successful PPI modulators (PPIM) have been discovered by cell free methods, thier validation with cell based assay is essential because; (1) Pseudo PPI modulating compounds such as surfactant-like or assay specific ones should be removed, (2) Penetration of PPIMs including peptides or macrocyclic compounds into living cells is often hampered by the plasma membrane and (3) PPIMs should have activity in the complicated intracellular environment where various substances are concentrated at high density. To provide a solution, we developed a very robust functional readout method called Fluoppi (Fluorescent Protein-Protein Interaction-visualization). Results of visualizing the effect of existing PPIMs for several targets such as KRAS(G12C)-Raf, cMyc-MAX, Keap1-p62(SQSTM1), Bcl family-BH3, p53-MDM2 and p53-MDM4

are presented here. In addition to them, recently we have visualized the effect of targeted protein degradation compounds such as PROTACs using Fluoppi.

P22. Fucci 蛍光画像から細胞動態を解析するシステムの提案

庄田 恵子（国立研究開発法人理化学研究所 脳神経科学研究センター 細胞機能探索技術研究チーム）

細胞の増殖と分化とが絡み合うことで、組織、器官、そして個体が形成される。階層的に働く“生命動態システム”において、細胞周期進行はどのような時空間パターンで制御されるのか？ この問いに答えるために、我々は細胞周期をリアルタイムに可視化する蛍光プローブ Fucci (Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) の開発を進めている。Fucci の多様化を展開するなかで、本研究会においては、Fucci (SA)5 および Fucci (CA)5 を安定発現するヒト各種培養細胞株を用いた薬剤評価解析システムについて紹介する。古典的な抗がん剤である etoposide で処理した細胞の反応は、細胞種や密度、またその細胞がいた細胞周期状態によって多様であり、薬効を細胞周期制御の観点で再評価する必要性を示唆する。Fucci シリーズを用いて、生命動態システムをより包括的に理解することを提案していく。

P23. Wnt シグナルを抑制する物質探索のための新たなスクリーニング戦略

山口 貴世志（東京大学医科学研究所・臨床ゲノム腫瘍学分野）

Wnt/ β -catenin シグナルの異常な活性化は、大腸がんをはじめとする多くのがんの発生や進展に関与している。Wnt シグナルを阻害する低分子や生物学的製剤は抗がん剤として有望であるが、現在までに医薬品として実用化されたものはない。Wnt 阻害物質探索のための新たなスクリーニング戦略として、我々は Wnt/ β -catenin シグナル活性を測定するための新しいレポーターアッセイを開発した。本アッセイ系を阻害剤キットで評価したところ、従来の TOPFLASH と FOPFLASH を用いたレポーターアッセイで問題となっていた高い偽陽性率を顕著に抑制し、特異性の高いアッセイ法であることが示された。本アッセイ法を用いたライブラリスクリーニングは、効果的な新規 Wnt シグナル阻害剤探索に有用であるものと期待される。

P24. Identification of Nafamostat as a Potent Inhibitor of MERS-CoV S Protein-Mediated Membrane Fusion Using the Split-Protein-Based Cell-Cell Fusion Assay

山本 瑞生（東京大学医科学研究所分子発癌分野）

Middle East respiratory syndrome (MERS) is an emerging infectious disease and caused by MERS coronavirus (MERS-CoV) infection, and no specific drugs or vaccines are currently available to prevent MERS-CoV infection. MERS-CoV is an enveloped virus,

and its envelope protein (S protein) mediates membrane fusion at the plasma membrane or endosomal membrane. TMRSS2, which is localized to the plasma membrane, is a serine protease responsible for the proteolysis of S in the post-receptor-binding stage. Here, we developed a cell-based fusion assay for S in a TMRSS2 dependent manner using cell lines expressing Renilla luciferase (RL)-based split reporter proteins. The assay was optimized for a 384-well format, and nafamostat, a serine protease inhibitor, was identified as a potent inhibitor of S-mediated membrane fusion in a screening of about 1,000 drugs approved for use by the U. S. FDA. Nafamostat also blocked MERS-CoV infection in vitro. Our assay has the potential to facilitate the discovery of new inhibitors of membrane fusion of MERS-CoV.

P25. がん細胞のマルチカラーイメージングを目指した GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブの開発

森 雅矢 (東京薬科大学 生命科学部)

薬物代謝酵素の一つとして知られる GSTP1 は、がん細胞の悪性化や多剤耐性に関与していることが報告されているが、そのメカニズムは明確でない。我々は、細胞内酵素活性のライブセルイメージングという新しいアプローチで GSTP1 の機能を解明するために、GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブの開発を行っている。これまでに、蛍光団として TokyoGreen (緑) を用いた蛍光プローブ Ps-TAc を開発し、細胞内 GSTP1 活性を選択的に検出することに成功している。この Ps-TAc は GSTP1 によりグルタチオン抱合反応を受けることで緑色蛍光を発する蛍光プローブである。本研究では、GST 以外の因子に対する蛍光プローブを併用した多次元的な解析を行うために、種々の異なる蛍光特性を示す GSTP1 活性検出蛍光プローブの開発を行った。蛍光団としては、ナフタルイミド (青) およびロドール (赤) を用いた。本学会では、これらを用いたライブセルイメージングについて発表する。

P26. 安価で簡便な ADP 検出蛍光法を用いたキナーゼ阻害剤探索

今村 理世 (東京大学)

プロテインキナーゼは生体内で重要な役割を担い、様々な疾患との関連が指摘される魅力的な創薬ターゲットである。そのため様々な活性測定法が開発されてきたが、一般的に HTS に使用される市販のキットは高価であり、特にアカデミアで大規模 HTS をする際の障壁となっている。我々創薬機構では 3 種類の酵素カップリング反応を用いた ADP 蛍光検出法 (熊谷法) を開発した。プロトコールが簡単 (キナーゼ反応液に検出試薬を等量添加するだけ) で、かつ使用するのは全て市販されている試薬であるため、本方法を用いれば安価で簡便にキナーゼ活性を指標とした HTS が可能である。本発表では、この ADP 検出蛍光法を用いて、実際に創薬機構ライブラリー約 215,000 化合物に対して行ったキナーゼ HTS の結果を報告する。また、現在キナーゼ活性評価によく使用されている ADP-Glo (Promega)

との比較も行い、同等の精度を確認したのであわせて報告する。

P27. 有機小分子蛍光プローブを用いた高感度 SAM 検出系の開発とその応用

荻原 洲介 (東京大学大学院)

【Backgrounds and purposes】 S-adenosylmethionine (SAM) is a metabolite that acts as a universal cofactor in methyl group-transferring reactions such as DNA, RNA, and histone methylations. In recent years, it is suggested that changes in intracellular SAM concentration directly regulates the intracellular methylome, and therefore, SAM has been considered as an important epigenetic regulatory factor. In this study, we tried to develop a peptide-based fluorescent probe that can monitor the changes of cellular SAM levels, and to establish the screening system to search for compounds that modulate cellular SAM levels. 【Methods and Results】 We have previously synthesized the FRET-based fluorescent probe ISOp-2 which can detect the activity of the enzyme protein L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) by the coupled assay with caspase-3 (Angew. Chem. Int. Ed. 2017). This probe employs the mechanism that the methylation of the probe by PIMT makes it as a good substrate of caspase-3, so the activity of PIMT can be monitored by increased hydrolysis by caspase-3. Since the methylation of the probe consumes one equivalent of SAM, we considered that it can be applied to the detection of SAM, and we re-designed probes to improve the sensitivity against SAM by decreasing the background hydrolysis by caspase-3. After synthesizing 16 candidates, we acquired the novel probe that showed the best S/N, and enabled the detection of 20 nM of SAM just by mix-and-read manner. By using this detection system, we established a screening system to monitor the alternation of cellular SAM levels with high throughput.

P28. 小胞体カルシウムモニタリングを利用した 2 型リアノジン受容体阻害薬の探索

呉林 なごみ (順天堂大学医学部薬理学)

2 型リアノジン受容体 (RyR2) は心筋筋小胞体の Ca^{2+} 遊離チャネルである。生理的な興奮収縮連関において RyR2 は活動電位発生時に開口し収縮に必要な Ca^{2+} を細胞質に遊離するが、心不全や遺伝子変異により RyR2 活性が異常亢進すると自発的 Ca^{2+} 遊離が起こり異所性興奮による不整脈を惹起する。従って RyR2 活性を阻害する薬は抗不整脈効果を有すると期待される。我々はこれまでに HEK293 細胞発現系を用いた研究から、小胞体の Ca^{2+} シグナルが RyR1 および RyR2 の Ca^{2+} 遊離活性を反映することを示してきた (Murayama et al., Mol Pharmacol 2018)。今回は小胞体 Ca^{2+} モニタリングを利用し RyR2 抑制薬の探索を行った。ヒットした化合物の一部については、マウス心筋細胞の Ca^{2+} 動態に対する効果を検証した。得られた結果から、小胞体 Ca^{2+} モニタリングは RyR2 阻害薬・活性化薬の探索に有用である

事と、RyR2 の阻害薬が抗不整脈効果を持つ可能性が示された。

P29. 小胞体内カルシウム濃度測定によるリアノジン受容体阻害薬探索システムの開発

村山 尚（順天堂大学医学部薬理学講座）

リアノジン受容体 (RyR) は骨格筋および心筋筋小胞体の Ca^{2+} 遊離チャネルで、その遺伝子変異は Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離 (CICR) を亢進して、さまざまな筋疾患や不整脈性心疾患を引き起こす。したがって、亢進した CICR を阻害する薬物はこれらの疾患の治療薬となり得るが、現在、特異的な RyR 阻害薬はほとんどなく、新たな薬物の開発が望まれている。われわれは、小胞体内 Ca^{2+} 濃度を指標とした新しい RyR1 阻害薬探索システムを開発した (Murayama et al., Mol Pharmacol, 94: 722–730, 2018)。このシステムを用いて既知化合物ライブラリのスクリーニングを行い、新しい RyR1 阻害化合物を発見した。本手法は簡便で再現性が高く RyR 阻害薬を効率的に探索することが可能であり、RyR 関連疾患治療薬の開発を加速することが期待される。

P30. HBV カプシド阻害剤の探索

小川 健司（理化学研究所創薬シード化合物探索基盤ユニット）

我々は、B 型肝炎ウイルス (HBV) のカプシド阻害剤の探索を目的として、カプシドの主要成分である Core タンパク質 (HBc) のタンパク質間相互作用を、分割ルシフェラーゼの再構成による化学発光で測定する評価系を構築し、東京大学創薬機構の化合物ライブラリー約 14 万化合物の大規模探索を実施した。その結果、HBc 同士の相互作用による分割ルシフェラーゼの再構成を濃度依存的に阻害する 30 化合物が得られた。次に、我々が独自に開発した HBV 複製評価系を用いて、これら化合物の HBV のゲノム複製に及ぼす影響を検討した結果、濃度依存的に HBV の逆転写を阻害する 4 化合物が得られた。これらの化合物は、薬剤耐性変異型 HBV-ポリメラーゼによるゲノム複製をも濃度依存的に阻害し、核酸アナログ複製剤とは作用機序が異なることが確認された。我々の構築した評価系は、カプシド阻害剤のスクリーニングに適した技術であることが明らかとなった。

P31. Nanodisc-GPCR を用いた物理化学的アプローチによる低分子薬剤探索

吉田 浩平（東京大学大学院工学系研究科）

低分子創薬の主要な標的である G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) は流動的な脂質二重膜中で機能しているため、in vitro での薬剤探索においては周辺の膜環境を適切に調節する必要があると考えられる。そこで本研究では、Nanodisc 技術を活用し、膜環境を考慮した GPCR-低分子薬剤間相互作用の解析手法を確立する。その上で、物理化学的アプローチを駆使した新規分子標的薬剤の取得を目指す。まず、モデル GPCR としてヒト由来セロトニン受容体 2B (5-HT_{2B}R) を種々のリン脂質で構成した Nanodisc に埋包し、膜環境の最適化を行った。表面プラズモン共鳴 (SPR) 法、マイクロスケール熱泳動法を用いたリガンド結合評価におい

て、流動性の高いリン脂質膜環境で 5-HT₂BR のリガンド結合活性が高く維持されることが明らかとなった。上記の環境下で SPR によるスクリーニングを行った結果、352 種の低分子化合物の中から 5-HT₂BR に特異的に結合する 3 種の化合物を選抜することができた。

P32. SPR を用いた化膿連鎖球菌の宿主感染関連 PPI を阻害する天然物化合物の探索

妹尾 暁暢（東京大学大学院工学系研究科）

化膿連鎖球菌は溶連菌とも呼称されるグラム陽性細菌である。ヒトの表皮や咽頭粘膜から感染し、軽度なものから致死に至る劇症型感染症など様々な症状を引き起こす。既存の抗菌剤に対する耐性菌の出現が深刻な問題となっており、耐性菌の出現リスクを抑えた新規抗菌剤の取得が期待されている。本研究では菌の宿主感染経路の一つであるヘモグロビン (Hb) を介した鉄獲得機構に着目し、細胞壁表層蛋白質 Shr と Hb の PPI を阻害する薬剤の開発を目指した。まず、大腸菌発現系を用いて Shr の発現・調製を行った。続いて、SPR 法を用いて Shr-Hb 間 PPI を阻害する化合物を天然物ライブラリーより探索した。擬陽性の化合物を排除するため、PPI 阻害活性の濃度依存性も確認した。これにより IC₅₀ が数百 μ M 程度の阻害活性を示す化合物を複数選抜することに成功した。ヒット化合物の構造から PPI 阻害に向けた有効な戦略を考察した。

P33. ユビキチンリガーゼを標的とした新規血管新生阻害化合物の探索

坂上 倫久（愛媛大学プロテオサイエンスセンター細胞増殖・腫瘍制御部門/心臓血管・呼吸器外科学）

P34. パーキンソン病バイオマーカーを指標とする新規治療薬シーズの探索

片浦 哲志（慶應義塾大学理工学部生命情報学科）

パーキンソン病 (PD) は高齢者の約 1% に発症する神経変性疾患だが、未だ根本的治療法は開発されていない。最近、ヘム代謝の最終産物であるビリルビン (BR) が、PD 患者で有意に減少していることが報告された。抗酸化物質である BR の減少は、ミトコンドリア異常に伴う酸化ストレスに暴露される PD の病態を反映していると考えられる。そこで、新規 PD バイオマーカー BR を指標とするスクリーニング系を構築し、PD 治療薬シーズの探索を行った。まず、BR 依存性緑色蛍光タンパク質である UnaG を細胞に発現させ、蛍光強度から細胞内 BR 量を評価する系を構築した。ここに PD 模倣薬であるミトコンドリア呼吸鎖阻害剤ロテノン (RTN) を処理すると、細胞内 BR が有意に低下した。そこで、RTN による BR 量低下を回復させる薬剤を 15,000 化合物から探索した結果、顕著な神経保護活性を示す PD 治療薬リード 7 化合物の同定に成功した。

P35. β カテニン変異がん細胞に合成致死性を示す化合物の探索

池田 拓慧（慶應義塾大学 理工学研究科）

細胞増殖に関わる β カテニンの変異は大腸がんの約 10%を含め様々ながん種で認められる。しかしながら、このようながんに対する有効な治療薬は未だ開発されていない。そこで β カテニン変異がん治療薬の開発を目的に、変異 β カテニンと合成致死性を示す化合物を探索した。まず既存の抗がん剤に対して同じような感受性を示す β カテニンヘテロ変異型 HCT116 細胞と野生型 A375 細胞を用いて、変異型 HCT116 細胞選択的に細胞死を誘導する化合物を探索した。その結果、第一三共株式会社より供与された約 25,000 化合物より 8 化合物がヒットした。続いて二次探索系として、この 8 化合物による細胞死の変異 β カテニン依存性を調べた。その結果、DS37262926 (DS37) は β カテニン変異アレルを欠損した HCT116 細胞に細胞死を誘導しないことが分かった。これらの結果より、DS37 は β カテニン変異がん細胞に合成致死を誘導する新規治療薬シードとなり得ることを示唆した。

P36. がん幹細胞に対する治療薬創出を目指したシード化合物の探索

巻田 彩季 (慶應義塾大学 理工学部 生命情報学科 井本研究室)

がん幹細胞 (CSC) は既存の化学放射線療法に抵抗性を示す細胞として知られており、CSC を標的とした治療法が開発が期待されている。本研究では CSC に有効な化合物を取得し、新しい制がん剤シードを開発することを目的とした。まずヒト結腸腺がん細胞を CSC に特徴的な“スフェア”を形成する培養条件で 7 日間培養した。このスフェアは通常の 3 次元培養に比べて結腸腺がん幹細胞マーカー Lgr5 の発現量が著しく高く、実際に幹細胞性を有することが示唆された。そこでこの幹細胞培養条件で CSC を標的としたスクリーニング系を構築し、本研究室が保有する放線菌培養液ライブラリーからそのスフェア形成を阻害する化合物を探索した。その結果、K240 株の培養液中に、通常の 3 次元培養条件下でのがん細胞の増殖には影響を与えず、幹細胞培養条件下においてのみスフェア形成を阻害する物質が含まれていた。現在は本株中の活性物質の単離精製を行っている。

P37. 去勢抵抗性前立腺がんの新規治療薬の開発

濱村 祐輝 (慶應義塾大学理工学部生命情報学科井本研究室)

前立腺癌は年々罹患数が増加している。この一次療法である精巣の摘出は一定の効果を示すものの、次第に再燃し去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) が生じることが大きな問題となっている。そこで本研究では、CRPC に対する新規治療薬シードの探索を行った。探索には慶大・医の大家教授、小坂講師が LNCaP 細胞を男性ホルモン不含条件で長期間培養することで樹立した CRPC モデル細胞を用いた。親株である LNCaP 細胞に比べて、この CRPC 細胞に選択的に細胞死を誘導する化合物を探索したところ、化合物ライブラリーからはサバイビン阻害剤 YM155 がヒットした。また放線菌培養液を用いたスクリーニングからは化合物 X (既知物) を単離した。特に化合物 X は、マウスを用いた動物試験においても経口投与で顕著な抗 CRPC 腫瘍効果を示した。以上より、化合物 X は CRPC の新規治療薬シード化合物として期待される。

P38. 亜硝酸型硝化脱窒法に用いるための、亜硝酸酸化細菌の活性を選択的に阻害する化合物の探索

松岡 真生（東京大学大学院農学生命科学研究科）

P39. in vivo ハイスループットスクリーニングによる 膵島 β 細胞機能を亢進する低分子化合物の同定

松田 大樹（立命館大学生命科学部）

培養細胞による化合物の表現型スクリーニングは、新たな薬剤の発見に多大な寄与をしてきた。しかしながら培養条件下は生体と大きく環境が異なるため、培養細胞を用いたスクリーニングでは、本来生体では有効な多くの薬剤が見落とされている。96 穴プレートなどで飼育が可能な小型動物を用いた in vivo スクリーニングは、これまで in vitro では見つからなかった新たな薬剤の発見や、in vitro では行えなかった新たなスクリーニングの実行を可能にする。今回我々は、ゼブラフィッシュを用いた in vivo ハイスループットスクリーニングにより、糖尿病モデルマウスのインスリン分泌能を向上させ、血糖値を下げる新たな化合物を見つけてきた。本研究会ではこれらの研究成果に加え、ゼブラフィッシュの in vivo スクリーニングの今後の可能性についても議論したい。

P40. 新規 GSTP1 選択的阻害剤の開発およびその作用メカニズム解析と細胞内活性評価

南保 泰希（東京薬科大学 生命科学研究科）

がんマーカーとして知られる Pi クラスグルタチオン S-転移酵素（GSTP1）は、がん細胞の増殖や生存に関与する。GSTP1 阻害剤は、がん細胞の抗がん剤耐性や細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することから、新たながん治療薬となり得る。しかしながら、既存の GSTP1 阻害剤は選択性・特異性が低く実用性に乏しい。そこで本研究では、GSTP1 を標的とする新たな阻害剤の開発を目指している。まずリコンビナントタンパクを用いてスクリーニングを行い、GSTP1 活性を阻害する化合物 1 を得た。また類縁体を合成し、化合物 1 に比べ GSTP1 選択性が高い化合物 2 を得た。種々の解析から、化合物 2 は可逆的に GSH と複合体を形成することが示唆された。さらに、この複合体は GSTP1 に結合し、安定化されることが明らかとなった。現在、GSTP1 活性検出蛍光プローブを用いて生細胞イメージングにより化合物 2 の GSTP1 酵素活性阻害能を評価している。この結果についても併せて報告したい。