

博士論文

論文題目 難治性希少疾患である肺高血圧症の
新規治療薬開発研究

氏 名 鈴木 聡文

目次

第 1 章	肺高血圧症と創薬研究	
第 1 節	肺高血圧症とは	4
第 2 節	Unmet medical need としての肺高血圧症	8
第 3 節	肺高血圧症に対する現行の治療法とその課題	10
第 4 節	プロスタサイクリンと現行療法の限界	11
第 5 節	肺高血圧症治療薬の新規創薬コンセプト	12
第 6 節	アロステリックモジュレーターと創薬研究	13
第 2 章	大規模スクリーニング	
第 1 節	1st スクリーニング	16
第 2 節	2nd スクリーニング	21
第 3 節	3rd スクリーニング	33
第 4 節	周辺化合物（既存ライブラリー）の評価	64
第 5 節	周辺化合物（新規購入 90 種）の評価	89
第 6 節	Binding Assay	127
第 7 節	キラリティーと薬理活性の関係	130
第 8 節	PathHunter assay	132
第 9 節	タンパク質結合率と薬理活性	143
第 10 節	Supplementary data	146
第 3 章	構造活性相関	
第 1 節	合成展開	165
第 2 節	新規化合物の評価	166
第 3 節	Supplementary data	176
第 4 章	標的細胞・組織における評価化合物の有効性	
第 1 節	ヒト大動脈血管平滑筋細胞での評価	216
第 2 節	種差の検討	219
第 3 節	マグヌス試験	226
第 4 節	血小板凝集試験	228
第 5 章	総括	
第 1 節	結論	232
第 2 節	参考文献	233
第 3 節	実験の部	237
第 4 節	謝辞	241

第 1 章

肺高血圧症と創薬研究

第1節 肺高血圧症とは

肺高血圧症（Pulmonary Hypertension）とは、肺動脈圧の上昇を認める病態の総称で、その原因は様々である。特に心臓や肺に疾患がなく、原因不明の肺高血圧症は原発性肺高血圧症（PPH：Primary Pulmonary Hypertension）といわれる。肺高血圧症は呼吸困難や心不全を起こし、適切な治療をしない場合には発症からの生命予後が平均3年の致死性の希少疾患である。本疾患の定義は1950年代にWHOによって「収縮期肺動脈圧が30mmHg以上、平均肺動脈圧20mmHg」と定められており、原発性肺高血圧症の場合は平均肺動脈圧25mmHg以上と定められている。初発症状として、労作時の息切れが現れることが最も多く、診断確定時にはほぼ全例に認められる。しかしながら、こうした症状が出現する時点ではすでに病気は進行した状態にあり、肺動脈圧はかなり高くなっていることが多い。その他、易疲労感や倦怠感、胸痛、失神などを症状として訴えることが多い。身体所見としては、頻脈・手足の冷感・チアノーゼなどに加え、右心不全が合併すると、下腿浮腫、肝腫大などの所見がみられる。胸部聴診上では、II音の肺動脈成分の亢進が最も高率に認められ、この他、右心性のIII音、IV音も聞かれる場合がある。また三尖弁逆流が生じると収縮期雑音が、肺動脈弁逆流がおこると拡張期雑音も聞かれるようになる。また、肺高血圧症が著明になると、第2肋間胸骨左縁にて肺動脈の拍動が触診さらには視診にて確認できるようになる。

肺高血圧症はすべての年代に発症するが、成人では30歳代をピークに女性に多くみられる。これに対して小児では男性に多い（Figure 1-1-1, 1-1-2）。一般に肺高血圧症は稀な疾患であるが、一部の基礎疾患を有する群においては、極めて高率に発症する。膠原病はその代表的なものの一つである。厚生労働省の全国疫学調査結果によると、肺高血圧症の合併率は、それぞれ混合性結合組織病7.0%、全身性エリテマトーデス1.7%、強皮症5.0%であり著しく高いことがわかる（Figure 1-1-3）。

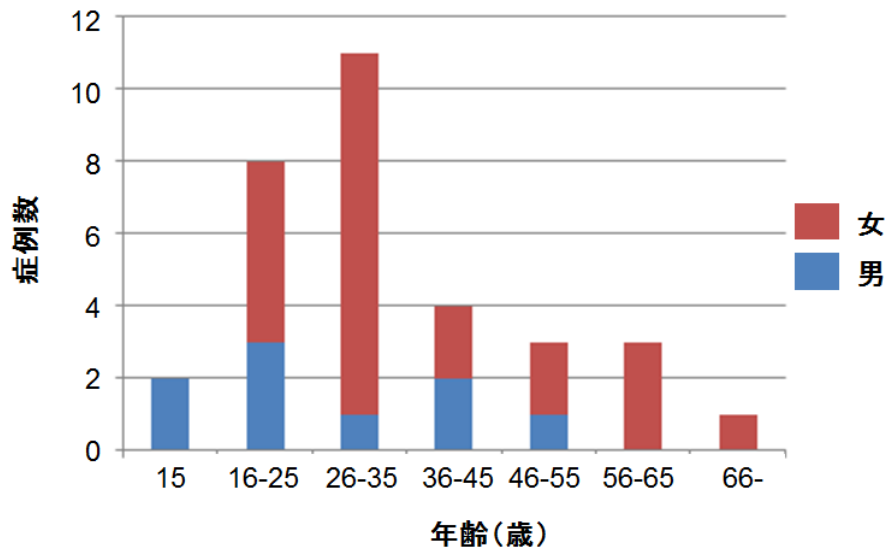


Figure 1-1-1 Age distribution and sex difference in PPH

肺高血圧症情報サイト PAH.jp から一部引用

	症例数(男:女)	年齢(範囲)
成人PPH	32 (9:23)	33.3±14.6 (15~74歳)
小児PPH	4 (3:1)	10.5±3.5 (7~14歳)

Figure 1-1-2 PPH comparison between adult and child.

肺高血圧症情報サイト PAH.jp から一部引用

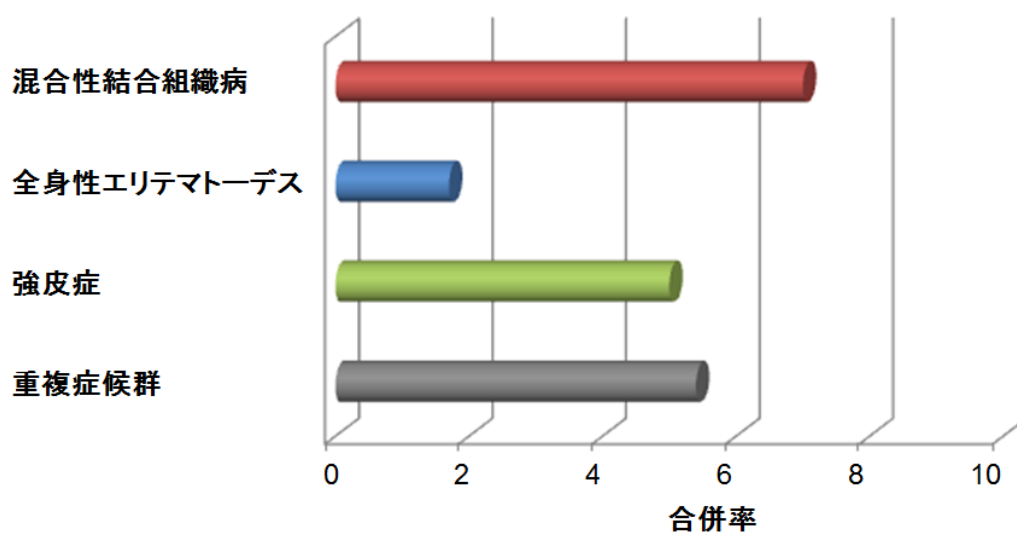


Figure 1-1-3 Rate of pulmonary hypertension associated with connective tissue disease. 肺高血圧症情報サイト PAH.jp から一部引用

肺高血圧症は、WHO 肺高血圧症機能分類によると重症度分類 I～IV度の四つに分類され、IV度が最も重症度が高い²。

I. 身体活動に制限のない肺高血圧症患者

普通の身体活動では過度の呼吸困難や疲労、胸痛や失神などを生じない。

II. 身体活動に軽度の制限がある肺高血圧症患者

安静時には自覚症状がない。普通の身体活動で過度の呼吸困難や疲労、胸痛や失神などが起きる。

III. 身体活動に著しい制限のある肺高血圧症患者

安静時に自覚症状がない。普通以下の軽度の身体活動で過度の呼吸困難や疲労、胸痛や失神などが起きる。

IV. どんな身体活動も全て苦痛となる肺高血圧症患者

これらの患者は右心不全の症状を呈している安静時にも呼吸困難及び疲労が見られる。どんな身体活動でも自覚症状の増悪がある。

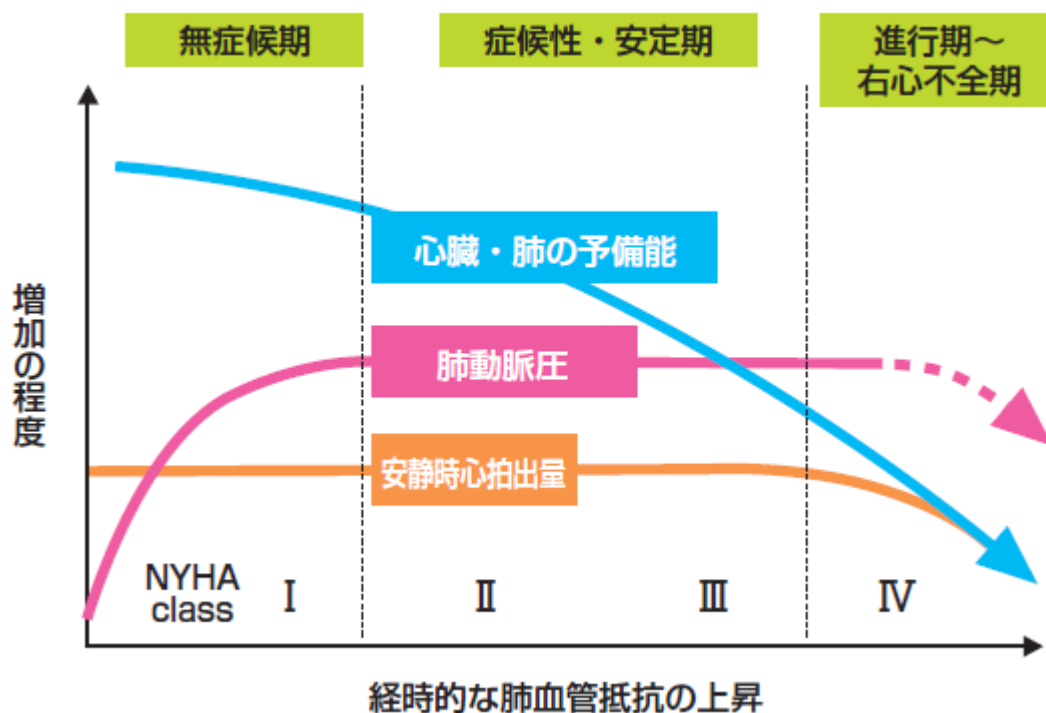


Figure 1-1-4 Time course of ingravescence of PPH

肺高血圧症情報サイト PAH.jp から一部引用

原発性肺高血圧症では、血管収縮因子であるトロンボキサン A₂ (TXA₂) やエンドセリン-1 の産生亢進、セロトニンの産生増加や血管拡張因子であるプロスタサイクリン (PGI₂) の産生低下、内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) の発現低下が報告されている。つまり血管収縮因子の増加と内因性血管拡張因子の相対的な低下が起こり、この不均衡により引き起こされる肺血管攣縮が器質的な肺動脈中膜筋層の肥大へとつながると考えられている。

肺高血圧は右心系にとっては後負荷の増大を意味する。後負荷の増大に対して右心は拡張あるいは肥大して対応しようとするが、高度の肺高血圧が維持した場合、上昇した肺動脈圧によって右心のポンプ機能は破綻し、心拍出量の低下と静脈系の血液鬱滞が生じ肝臓の腫大や全身の浮腫が生じる³。

第2節 Unmet medical need としての肺高血圧症

日経メディカルが臨床医師を対象に実施した調査で、「新たな治療薬の登場を望む疾患は？」という問いに対して、肺高血圧症はトップ10にランクインしていることから、臨床の現場で、この疾患の治療薬開発が強く切望されていることが伺える(Figure 1-2-2)

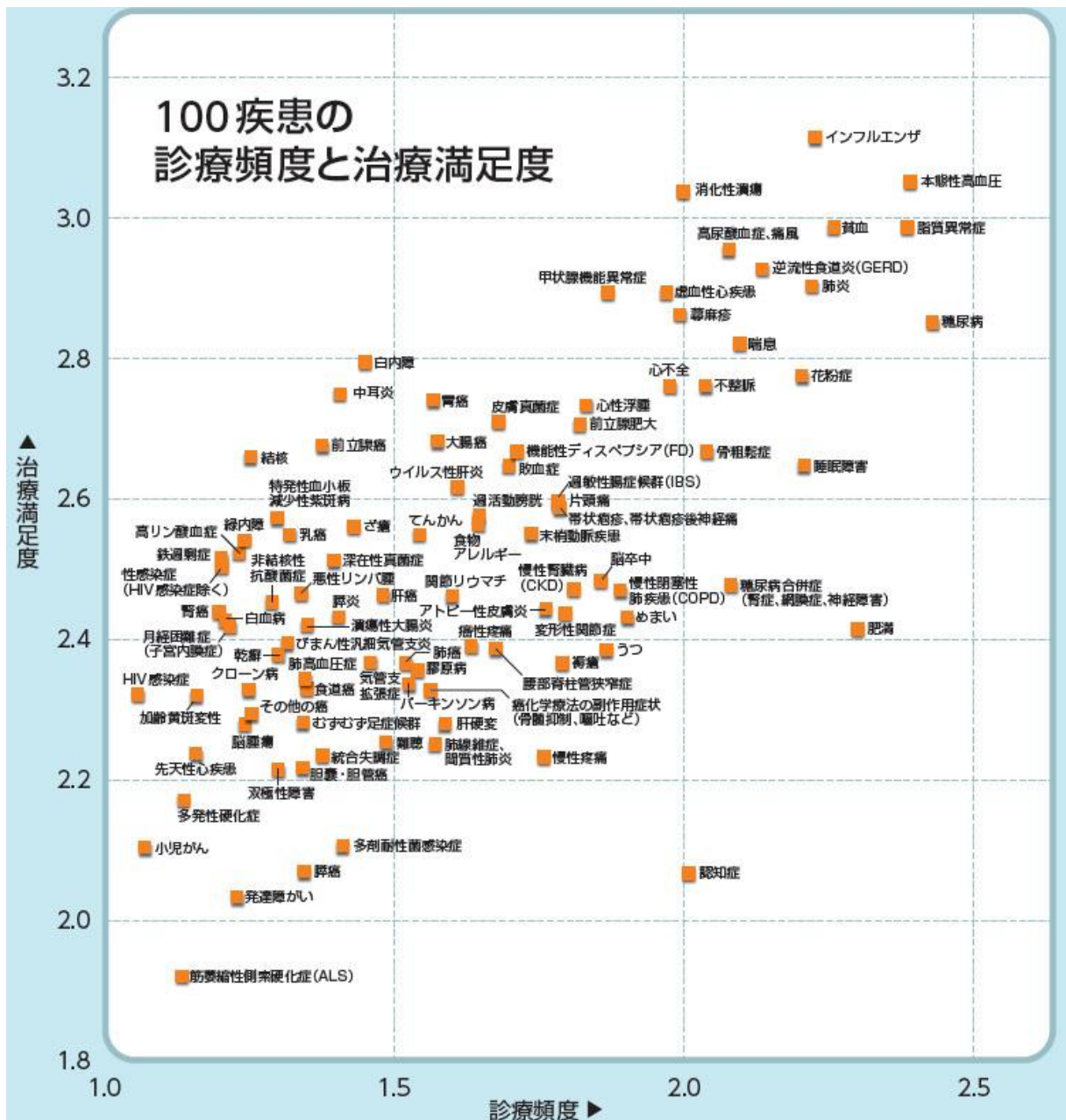


Figure 1-2-1 Frequency of therapy and satisfaction with treatment.

日経メディカル Vol.16, 2011 から引用

新たな治療薬の登場を望む疾患は？

1. 多剤耐性菌感染症
2. アルツハイマー病
3. HIV感染症
4. 降癌
5. 筋萎縮性側索硬化症
6. 拡張型心筋症
7. 肺癌
8. ウイルス性肝炎
9. 肺線維症、間質性肺炎
10. 肺高血圧症
11. うつ病
12. 敗血症
13. 統合失調症
14. パーキンソン病
15. 胃癌

Figure 1-2-2 Unmet medical needs. 日経メディカル Vol.16, 2011 から一部引用

第3節 肺高血圧症に対する現行の治療法とその課題

Table 1-3-1 Therapy for Pulmonary hypertension

重症度	推奨される血管拡張薬
初期 (WHOクラス I)	Ca拮抗薬
軽症 (WHOクラス II)	ET受容体拮抗薬 PDE5阻害薬
中等症 (WHOクラス III)	ET受容体拮抗薬 PDE5阻害薬 PGI₂持続静注
重症 (WHOクラス IV)	PGI₂持続静注

ET: endothelin, PDE: phosphodiesterase, PGI₂: prostacyclin

本疾患の初期には、カルシウム拮抗薬、軽症から中等症では、エンドセリン受容体拮抗薬やホスホジエステラーゼ5阻害薬、重症例には、PGI₂製剤の持続静注療法が有効性の高い治療法として適用されている。PGI₂が有する強力な血管拡張作用が有効である一方で、PGI₂は非常に不安定であるため²³（生体内半減期が約5分）、有効血中濃度を下回ることがないように投与量を増やすと低血圧や出血傾向などの副作用を起こす問題点がある。そのため、本来、初期の段階から使用したいけれども、重症例に限定される。背景から、臨床現場では経口投与可能で血中半減期が長い新規治療薬の開発が強く切望されている。

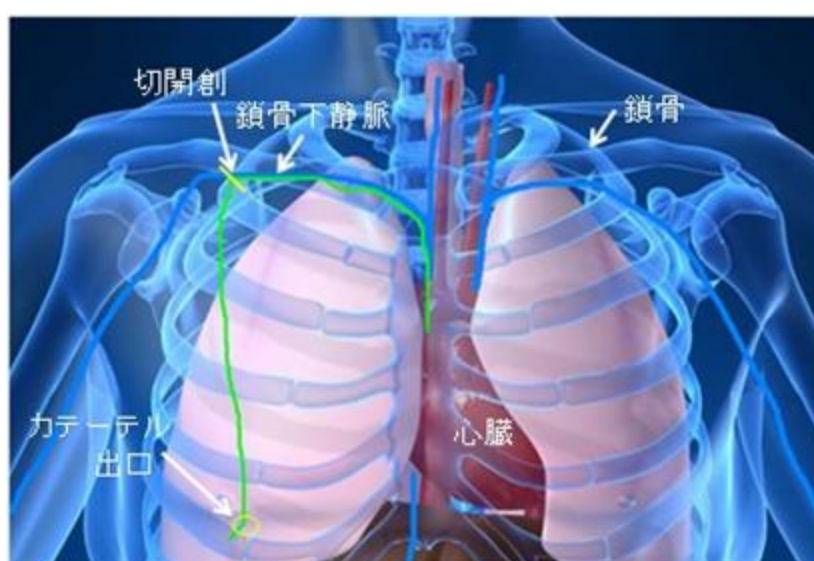


Figure 1-3-1 Continuous infusion therapy for pulmonary hypertension

第4節 プロスタサイクリン(PGI₂)と現行療法の限界

PGI₂⁴とは、リン脂質に存在するアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (COX) を介して産生されるプロスタノイドと呼ばれる活性代謝物の1つである (Figure 1-4-1)。プロスタノイド受容体は、IP (PGI₂受容体)、TP、FP、DP、EP という5種類の受容体に分類され、すべて7回膜貫通型のGPCRである。これまでのPGI₂受容体のアゴニスト探索研究の知見から、PGI₂以外に新規母核発見の可能性は極めて低く、プロスタノイド受容体間でその構造が類似しているため、受容体間で選択性を有する化合物を取得することは困難であると考えられる。そのうえ、PGI₂受容体のアゴニストである以上、その不安定性から上記のような投与法が限界であり、既存の治療法を凌駕する新たな薬理作用を有する治療薬の創出が求められる。

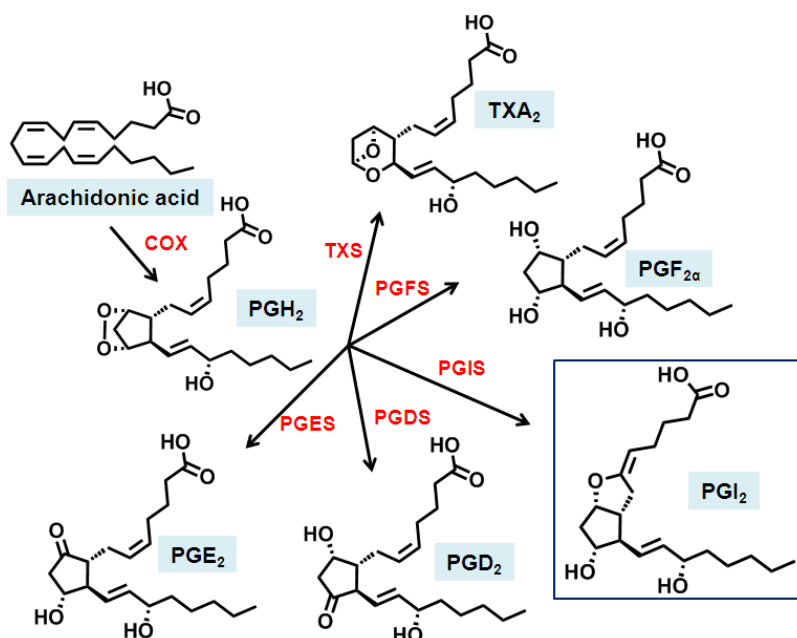


Figure 1-4-1 Synthesis of prostanooids

第5節 肺高血圧症治療薬の新規創薬コンセプト

本研究ではPGI₂受容体のアロステリックモジュレーターを開発することを目指した。これは肺高血圧症治療薬開発の新たなコンセプトである。

アロステリックモジュレーターとは、受容体上で内因性アゴニストとは異なる部位に結合し、内因性アゴニストの受容体感受性を調節（本研究では、増強）する薬理作用を有した化合物である^{8,9}。アロステリックモジュレーターは、PGI₂とは別の部位に結合するので、PGI₂アナログ化合物ではなく、新規母核を有した化合物を取得できる可能性がある。すなわち、高い安定性で、経口投与可能な血中半減期の長い新薬が期待できる。これにより、不安定なPGI₂製剤を投与することなく、あるいは少量投与と併用すれば、副作用の軽減及び病態の改善が期待される。本コンセプト検証の流れをFigure 1-5-1に示す。

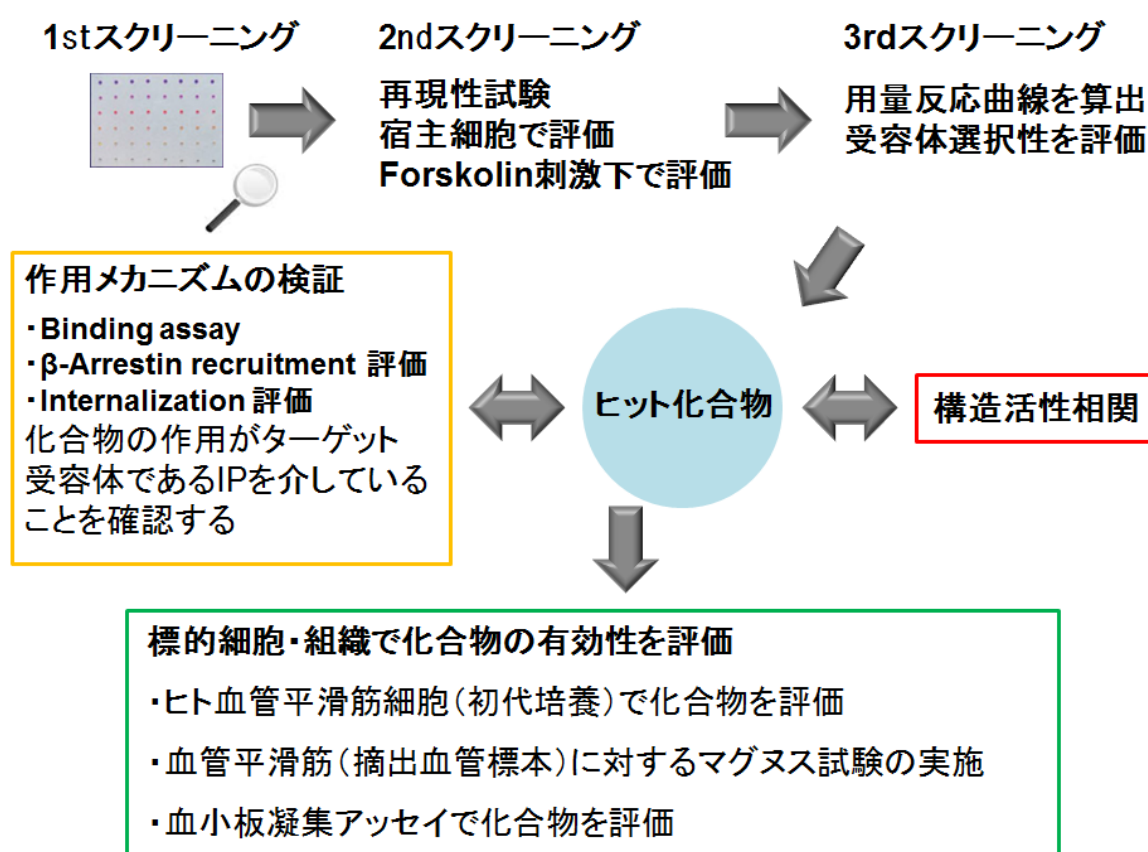


Figure 1-5-1 Overview chart in the development process of allosteric modulator of IP.

第6節 アロステリックモジュレーターと創薬研究

アロステリックモジュレーターは機能の点で3種類に分類される⁸ (Figure 1-6-1)。アゴニストの結合サイトに影響を及ぼし、アゴニストの受容体への親和性 (Affinity) を変化させることでアゴニストの用量反応曲線を左シフトさせるもの (赤色)、アゴニストの有する受容体への刺激強度 (Efficacy) を増強させるもの (上シフト)、あるいは Affinity と Efficacy の両方を増強させるものである (左シフトかつ上シフト)。アロステリックモジュレーターは、アゴニストが低濃度の時にその反応性を増大させるため、PGI₂ 産生が低下している肺高血圧症において有効な治療薬となることが期待される。

Table 1-6-1 に示すように、これまでにアセチルコリン受容体、GLP-1 受容体やグルタミン酸受容体などでアロステリックモジュレーターが報告されているが (研究開始時には、アセチルコリン受容体及びグルタミン酸受容体のみ)、プロスタノイド受容体のアロステリックモジュレーターはこれまで報告がない^{12, 13, 14, 15, 16, 17}。しかし、上記の利点を求めて新規の薬理作用を有する肺高血圧症治療薬として開発を目指し、本研究を実行した。

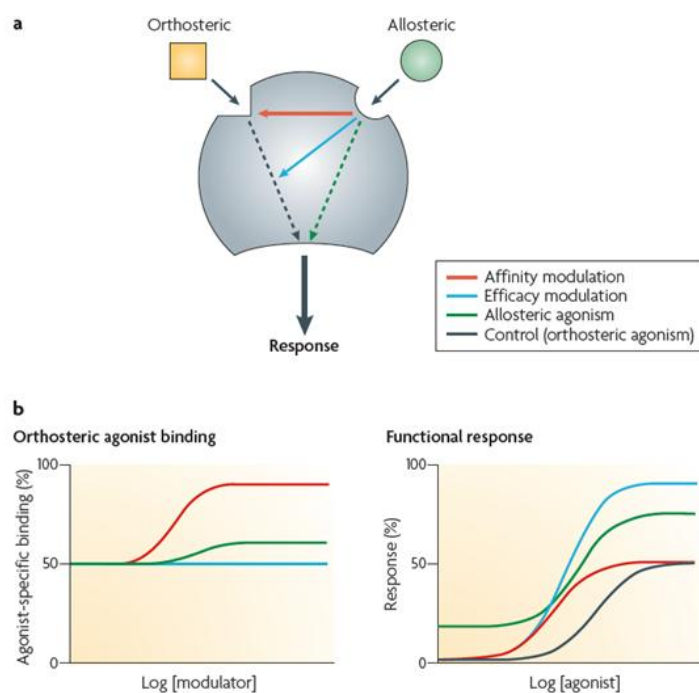


Figure 1-6-1 Modes of action of allosteric modulators

Nature Rev. Drug Discov. 2009, 8, 41-54 より転載

Table 1-6-1 Reported allosteric modulators of G-protein-coupled receptors

Family	GPCR	Allosteric ligand
Class A	mAChR	BQCA ¹² , LY2033298 ¹³
	CB	Org27569 ¹⁴
	GalR2	CYM2503 ¹⁵
	IP	報告されていない
Class B	GLP-1R	Compound 2 ¹⁶
Class C	mGluR	CDPPB ¹⁷

Ref.12) *PNAS* **2009**, *106*, 15950-15955; 13) *PNAS*, **2008**, *105*, 10978-10983
 14) *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 12070-12082; 15) *PNAS*, **2010**, *107*, 15229-15234
 16) *PNAS*, **2007**, *104*, 937-942; 17) *Neuropharmacology*, **2012**, *62*, 1453-1460

第 2 章

大規模スクリーニング

第 1 節 1st スクリーニング

大規模スクリーニングを実施するにあたり、詳細な条件検討を実施した。本研究では、Corning 社 Low volume の 384well plate を使用し、測定機器として plate reader で蛍光を測定した後、plate1 枚ごとに調整した cAMP の検量線から、評価対象 well 内で産生された cAMP を定量した。検討項目として、1well 当たりの細胞数、incubation 時間、incubation 時の温度、DMSO の細胞への影響（評価化合物は、DMSO 溶液としてストックされているため、384 plate への評価化合物の分注の際には、DMSO 溶液として分注され、一般に DMSO が 1%以上であると、細胞毒性やタンパク質毒性が生じるため、そのような現象の確認）、384 plate 内に分注ムラがないか、384 plate の端と中央とで測定値に差がないか、などが挙げられる。こうした詳細な条件検討については、本研究の流れを俯瞰すると、本章第 6 節 supplementary data にすべて掲載することが適切であると判断した。そこで、本節及び次節以降において、論旨を補完するデータ及び考察は、すべて本章第 6 節 supplementary data にすべて記載した。

【実験目的】

東京大学創薬オープンイノベーションセンターは約 15 万種の化合物ライブラリーを所有しており、修士課程の成果はその約半分である 7 万種の化合物の中から見出したものである。そのため、さらに約 7 万種の化合物を対象にスクリーニングすることで、左シフトタイプを含めた新規アロステリックモジュレーターを見出すことを目的として、1st スクリーニングを実施した。

【実験方法】

CHO-K1 細胞を宿主に、ヒト IP 受容体 (hIP) を安定的に発現させた細胞株を選択した。IP アゴニストである Iloprost を EC40 となるよう 300nM (Final) で添加すると同時に、被検化合物を 5 μ M (Final) で添加、40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した。Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で蛍光を測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。(1st スクリーニングでは、すべて n=1 でアッセイしている。)

【プロトコール】

1. Iloprost + 被検化合物 5 μ l をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. hIP 安定発現細胞を、8000cells/well となるように 5 μ l/well で分注し反応開始
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5 μ l/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5 μ l/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より産生された cAMP 濃度を計算する。
7. Iloprost 300nM で誘導される cAMP 濃度を 100%とした際の、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を T/C(treated/control)%で表記する。

【結果】

69118 種類の評価化合物を対象に 1st スクリーニングを実施したところ、671 種が HTS 陽性として得られた。(1st スクリーニングでは、対象化合物数の約 1%が陽性と判断された場合、妥当であると言われることが多い。)このアッセイの活性評価基準は、コントロール (n=16) で産生された cAMP 濃度を 100 %として、その C.V.値の 3 倍以上 cAMP を産生増強させた評価化合物を HTS 陽性としている^{*}。プレートごとに「コントロールのばらつき」が異なるため、アッセイを実施した 216 枚すべてのプレートごとに、評価化合物を 1 つ 1 つ判断した。このように時間と手間をかけ丁寧に評価化合物を判断することにしたのは、ターゲット受容体である IP のアロステリックモジュレーターの探索は、難易度が高いこと及び、先に実施した約 7 万種の中で、ヒット化合物が 1 つ (上シフト) しか得られていなかったため、今回のアッセイで対象にした 69118 種類の評価化合物の中に、ヒット化合物が存在する可能性はほとんどないと推測されたからである。

アッセイ成立か否かを確認する指標として、コントロール (DMSO 添加した well。n=16) の cAMP 濃度(Figure 2-1-1)と C.V 値 (ばらつきの指標) (Figure 2-1-2)、評価化合物が添加された 320well すべての cAMP 濃度 (Figure 2-1-4) と T/C%値 (Figure 2-1-5) や 2 波長の蛍光比を cAMP 濃度に換算する検量線 (data not shown) などが挙げられ、アッセイしたプレート 216 枚すべて精査した上で、陽性化合物を判断した。C.V 値(Figure 2-1-2)は、Cell-based assay の場合、12 以下とする水準が要求され、本研究ではすべての plate で 1 枚 1 枚確認した。上記の指標に関して、もし他の plate と比較して、特定の plate で値が大きくはずれていた場合、アッセイをやり直した。

※) HTS の評価基準について¹⁰

一般的に、HTS の評価基準として、平均値 $\pm 3s.d.$ が適用され、すなわちコントロールの平均値より、その $s.d. \times 3$ 以上あるいは以下の値を HTS 陽性と考える。コントロールの平均値を 100 %とすると、その $c.v. \times 3$ 以上あるいは以下の値が HTS 陽性となる。本研究では、cAMP 産生増強させる化合物を見出したいため、コントロール (DMSO 添加した well) の平均値 $+3s.d.$ 以上 cAMP 産生増強させた化合物を HTS 陽性と判断した。

Assay Guidance Manual Version 5.0, 2008,

Eli Lilly and Company and NIH Chemical Genomics Center. Available online at:

http://www.ncgc.nih.gov/guidance/manual_toc.html

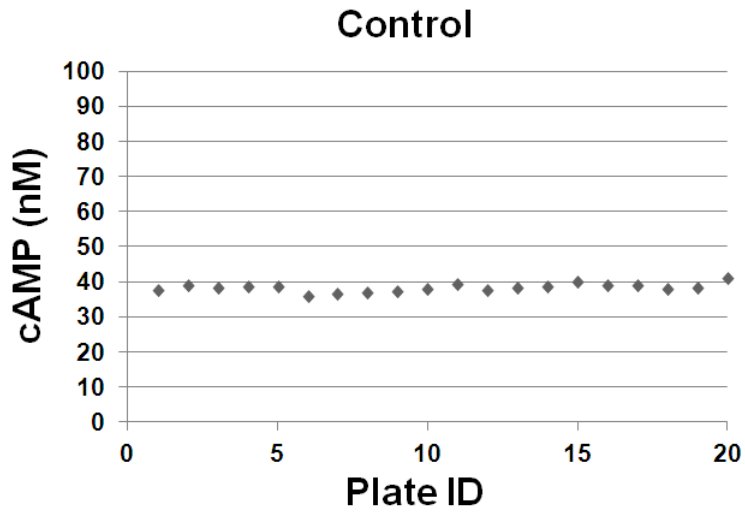


Figure 2-1-1 Average of cAMP (nM) in control wells by assay plates.

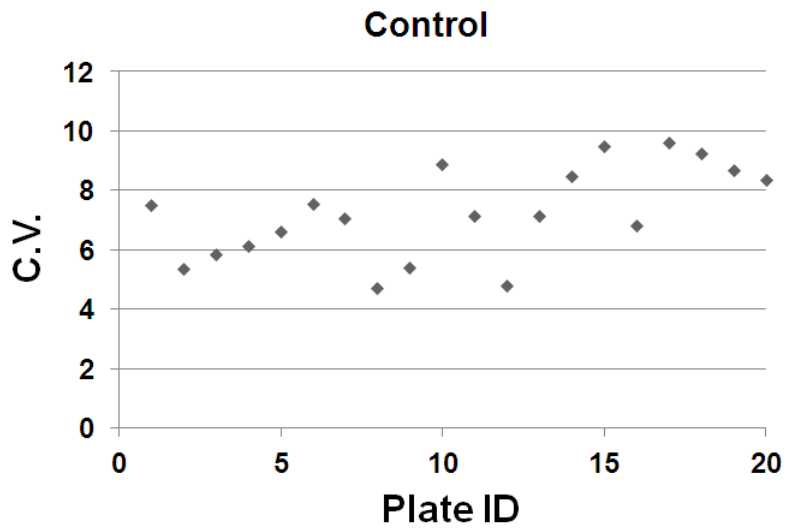


Figure 2-1-2 C.V. in control wells by assay plates.

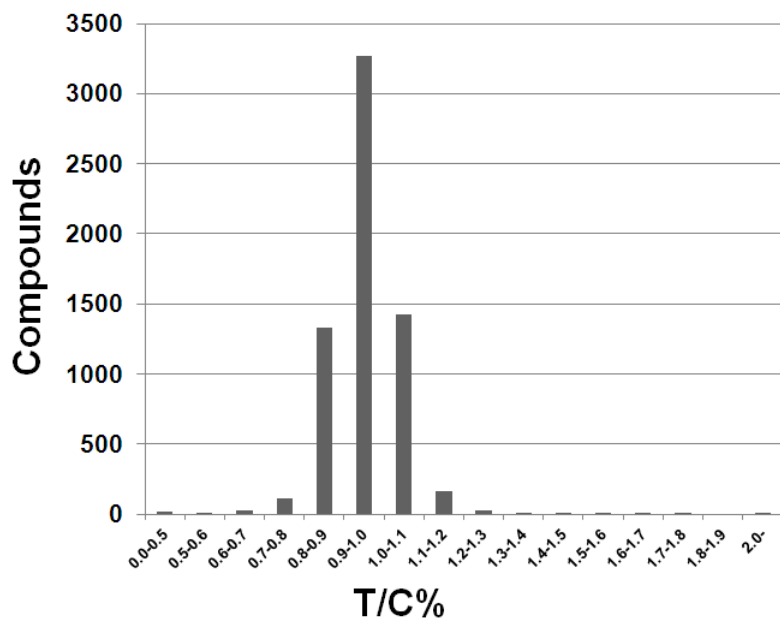


Figure 2-1-3 Histogram by 20 assay plates in 1st screening.

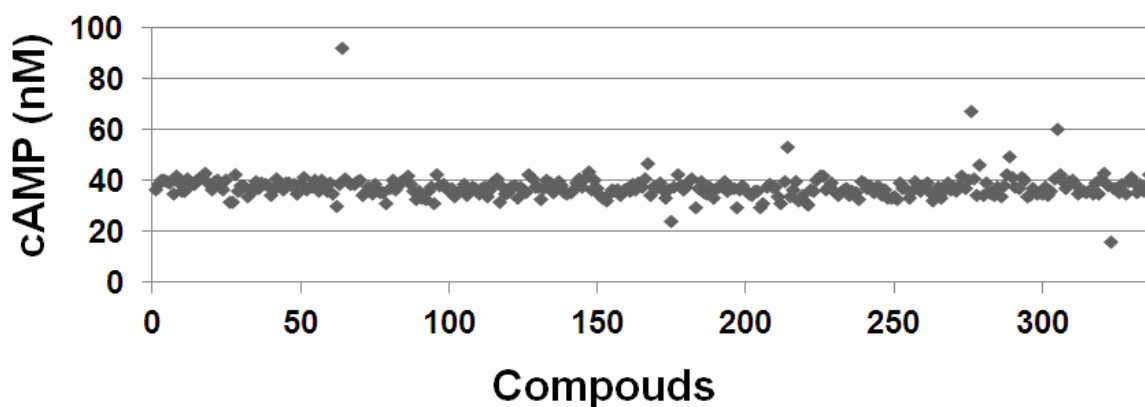


Figure 2-1-4 cAMP concentration produced by compounds in a plate.

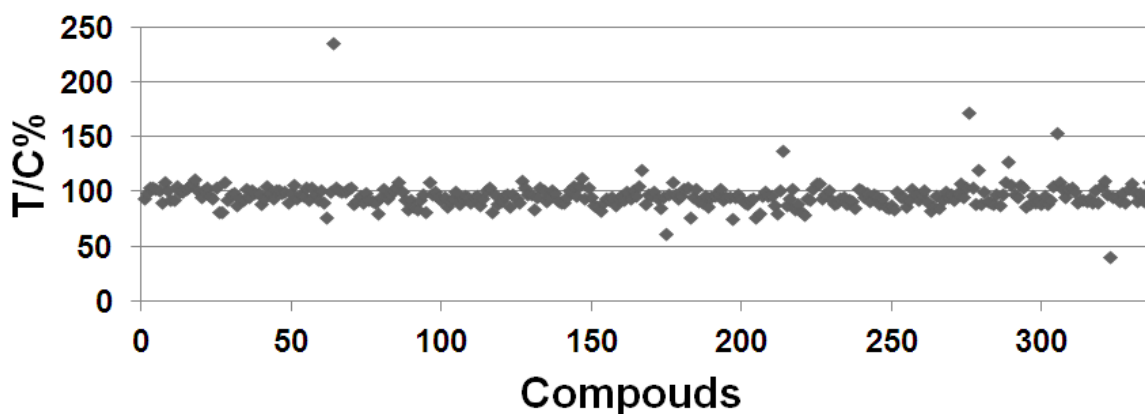


Figure 2-1-5 T/C% of compounds in a plate.

第 2 節 2nd スクリーニング

【実験目的】

1st スクリーニングで得られた 671 種の評価化合物を対象に、それらの結果が再現すること及び IP 非特異的に cAMP 産生増強させる化合物を排除することを目的として、以下の 3 つのアッセイを実施した。2nd スクリーニングは、すべて n=4 でアッセイしている。

- ①再現性試験（1st と同じ条件だが、n=4 で cAMP Cell-Based Assay した）
- ②宿主細胞（IP 未発現細胞）で、cAMP Cell-Based Assay
- ③宿主細胞（IP 未発現細胞）で、Forskolin 刺激下における cAMP Cell-Based Assay
→②と③のアッセイで陽性と判断された評価化合物は、IP 非特異的に cAMP 産生増強させるため、排除する。

【実験方法】 再現性試験

CHO-K1 細胞を宿主に、ヒト IP 受容体 (hIP) を安定的に発現させた細胞株を選択した。IP アゴニストである Iloprost を EC40 となるよう 300nM (Final) で添加すると同時に、被検化合物を 5uM (Final) で添加、40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した。Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で蛍光を測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。

【プロトコール】

1. Iloprost + 被検化合物 5ul をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. hIP 安定発現細胞を、8000cells/well となるように 5ul/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5ul/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5ul/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. 各プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より産生された cAMP 濃度を計算する。

7. Iloprost 300nM で誘導される cAMP 濃度を 100%とした際の、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を T/C%で表記する。

【結果】

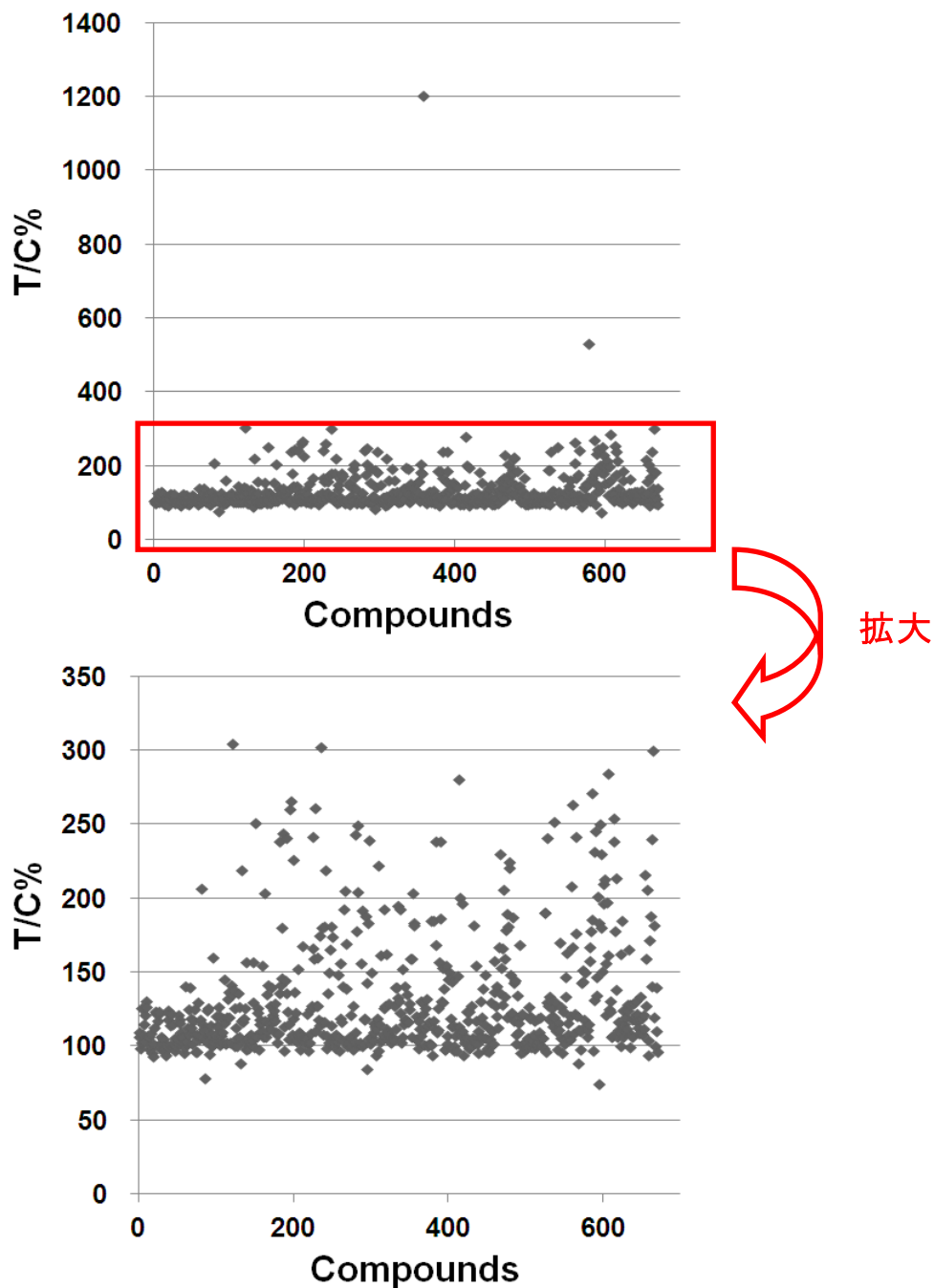


Figure 2-2-1 T/C% of compounds in confirmation assay.

1st スクリーニングで得られた 671 種の評価化合物を対象に再現性試験を実施したところ、293 種類の評価化合物が陽性と判断された。このアッセイの活性評価基準は、1st スクリーニングと同じである。

【実験方法】 宿主細胞（IP 未発現細胞）で cAMP Cell-Based Assay

1st スクリーニングで選択した hIP 安定発現株の宿主である CHO-K1 を用いて、1st スクリーニングで得られた 671 種の評価化合物を対象に、それらの作用が hIP を介していないものを排除することを目的として、下記のアッセイを実施した。被検化合物を 5 μ M (Final) で添加し、40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した。Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で測定。被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。

【プロトコール】

1. 被検化合物 5 μ l をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677)に分注。
2. 宿主である CHO-K1 を、8000cells/well となるように 5 μ l/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5 μ l/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5 μ l/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より反応 cAMP 量を計算する。
7. 上記条件で、誘導される cAMP 濃度を nM で表記する。

【結果】

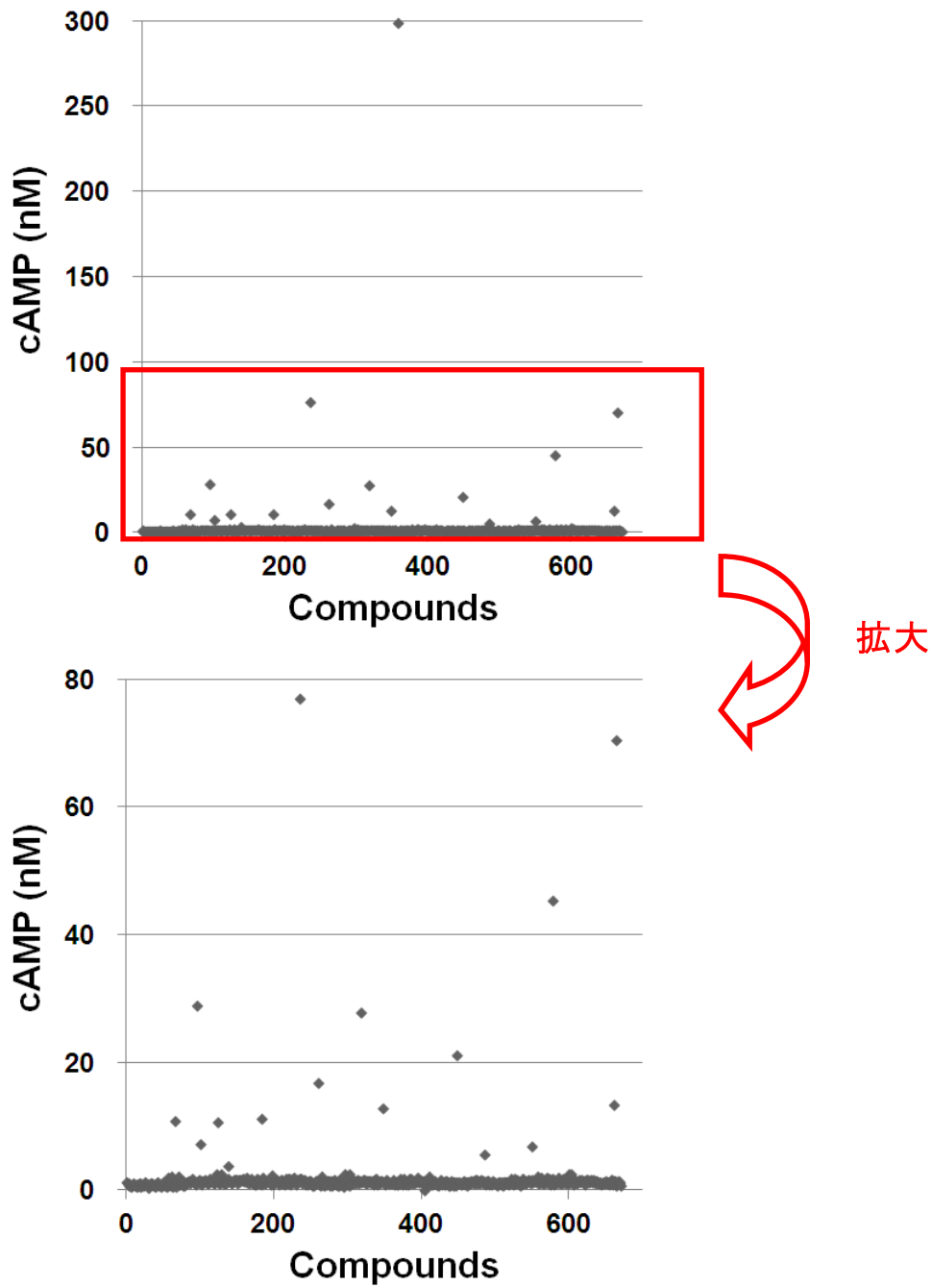


Figure 2-2-2 cAMP concentration produced by compounds in the assay (hIP(-)).

1stスクリーニングで得られた 671 種の評価化合物を対象に cAMP アッセイ (hIP(-)) を実施したところ、17 種類の評価化合物が IP 非特異的に cAMP 産生増強させる化合物と判断された。これらは、宿主である CHO-K1 細胞で、cAMP 産生に関与する内在性受容体あるいは因子を刺激する化合物であるといえる。このアッセイでは、4nM 以上 cAMP 産生増強させた評価化合物を IP 非特異的に cAMP 産生増強させる化合物と判断した。その活性評価基準を採用した理由として、無刺激の場合、cAMP は検出限界以下であること及び 15000cells/well (今回のアッセイ条件の約 2 倍の細胞数) でアッセイしても、無刺激の場合、cAMP は検出限界以下であるため (data not shown)、4nM 以上の cAMP 濃度は、有意な上昇であると判断した。

【実験目的】

宿主細胞（IP 未発現細胞）で Forskolin 刺激下における cAMP Cell-Based Assay

1st スクリーニングで選択した hIP 安定発現株の宿主である CHO-K1 を用いて、1st スクリーニングで得られた 671 種の評価化合物を対象に、それらの作用が hIP を介していないものを排除することを目的として、下記のアッセイを実施した。

【実験方法】

Forskolin（Adenylate cyclase を直接刺激して cAMP を産生させる作用をもつ）を 1uM（Final）で添加すると同時に、被検化合物を 5uM（Final）で添加し、40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した。Cisbio 社の cAMP アッセイキット（cAMP HiRange Jumbo）を用いた HTRF 法で測定。被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。

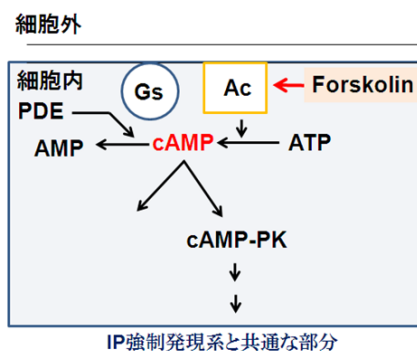


Figure 2-2-3 Mechanism of cAMP production stimulated by Forskolin

【プロトコール】

1. Forskolin + 被検化合物 5ul をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. CHO-K1 を、5000cells/well となるように 5ul/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5ul/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5ul/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より反応 cAMP 量を計算する。
7. Forskolin 1uM で誘導される cAMP 濃度を 100%とした際の、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を T/C%で表記する。

【結果】

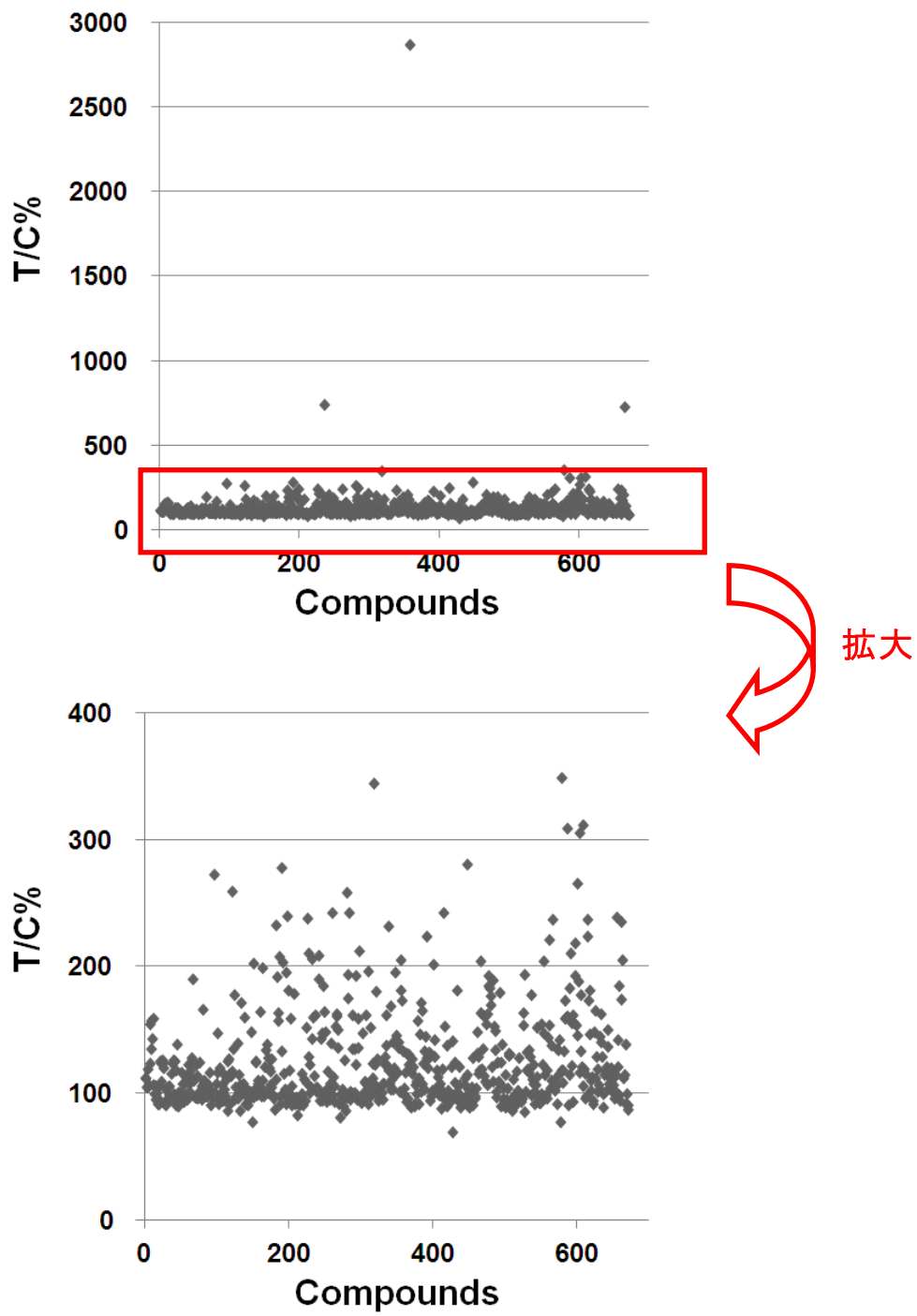


Figure 2-2-4 T/C% of compounds in Forskolin (+) assay.

1stスクリーニングで得られた671種の評価化合物を対象にcAMPアッセイ(hIP(-)、Forskolin(+))を実施したところ(Figure 2-2-4)、260種類の評価化合物がIP非特異的にcAMP産生増強させる化合物と判断された。このアッセイでは、PDE(cAMP分解酵素)阻害作用を有する化合物やAC(Adenylate cyclase)に結合して、Forskolinの作用を増強させる作用を有する化合物を排除することが可能である。このアッセイは、1stスクリーニングと同様の活性評価基準を採用した。

【考察】

Figure 2-2-6に、「宿主細胞(IP未発現細胞)でのcAMPアッセイ(hIP(-))」と「IP強制発現細胞系でのcAMPアッセイ(hIP)」の関係を示した。「cAMPアッセイ(hIP(-))」で、cAMP産生増強させた17種の評価化合物は、すべて「cAMPアッセイ(hIP)」で陽性と判断された化合物群の中に含まれていることがわかる。また、「cAMPアッセイ(hIP(-))」の結果と「宿主細胞(IP未発現細胞)でForskolin刺激下におけるcAMPアッセイ(Forskolin(+))」の結果(Figure 2-2-7)から、上記17種の評価化合物は、「cAMPアッセイ(Forskolin(+))」においてもcAMP産生増強させる化合物として判断されていること、及び比例関係にあることから、今回実施したアッセイ系は、IP非特異的にcAMP産生させる化合物を排除するのに十分workしているといえる。

次に、Figure 2-2-5に示した「cAMPアッセイ(Forskolin(+))」の結果と「cAMPアッセイ(hIP)」の関係性を考察すると、「cAMPアッセイ(hIP)」で有意なcAMP産生増強作用を有し、「cAMPアッセイ(Forskolin(+))」で有意なcAMP産生増強作用が認められない化合物群(赤色のボックスで囲んだ)は、アロステリックモジュレーターとして機能している可能性が高いと判断した。そのような評価化合物は、59種類あることがわかった。

ところで、PDE(cAMP分解酵素)阻害作用を有する化合物は、どちらのアッセイ系においてもcAMP産生増強が認められ、理論的に比例関係となる。Figure 2-2-5で比例関係にある大部分の化合物群は、PDE(cAMP分解酵素)阻害作用を有する化合物である可能性が高いと考えられる。

一方、Figure 2-2-5では、「cAMPアッセイ(hIP)」で有意なcAMP産生増強作用が認められないが、「cAMPアッセイ(Forskolin(+))」で有意なcAMP産生増強作用を有する化合物群の存在が示唆された(青色の円で囲んだ)。これらの化合物は、Forskolin存在下で初めてcAMP産生増強させる化合物であるため、ACのアロステリックモジュレーターとして機能していると考えられる。つまり、ACに結合し、Forskolin存在下でその作用を増強させる化合物である。Table 2-2-1にそれらの化合物構造を示した。構造類似体が含まれているため、それらの化合物は、「ばらつき」ではなく、真にForskolin存在下でcAMP産生増強作用を有しており、このアッセイ系が十分機能して

いるといえる。

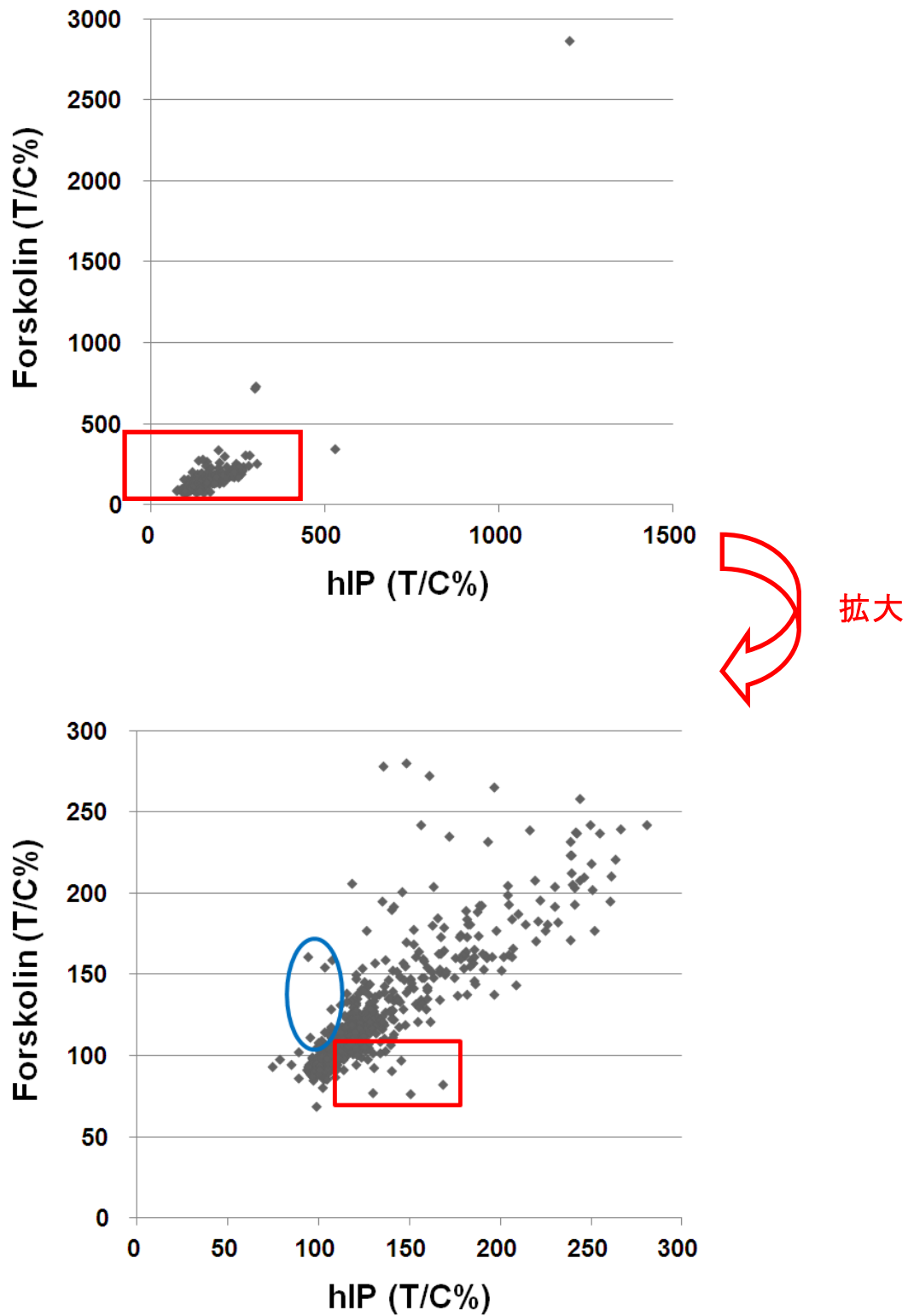


Figure 2-2-5 Relationship between Forskolín (+) assay and confirmation assay.

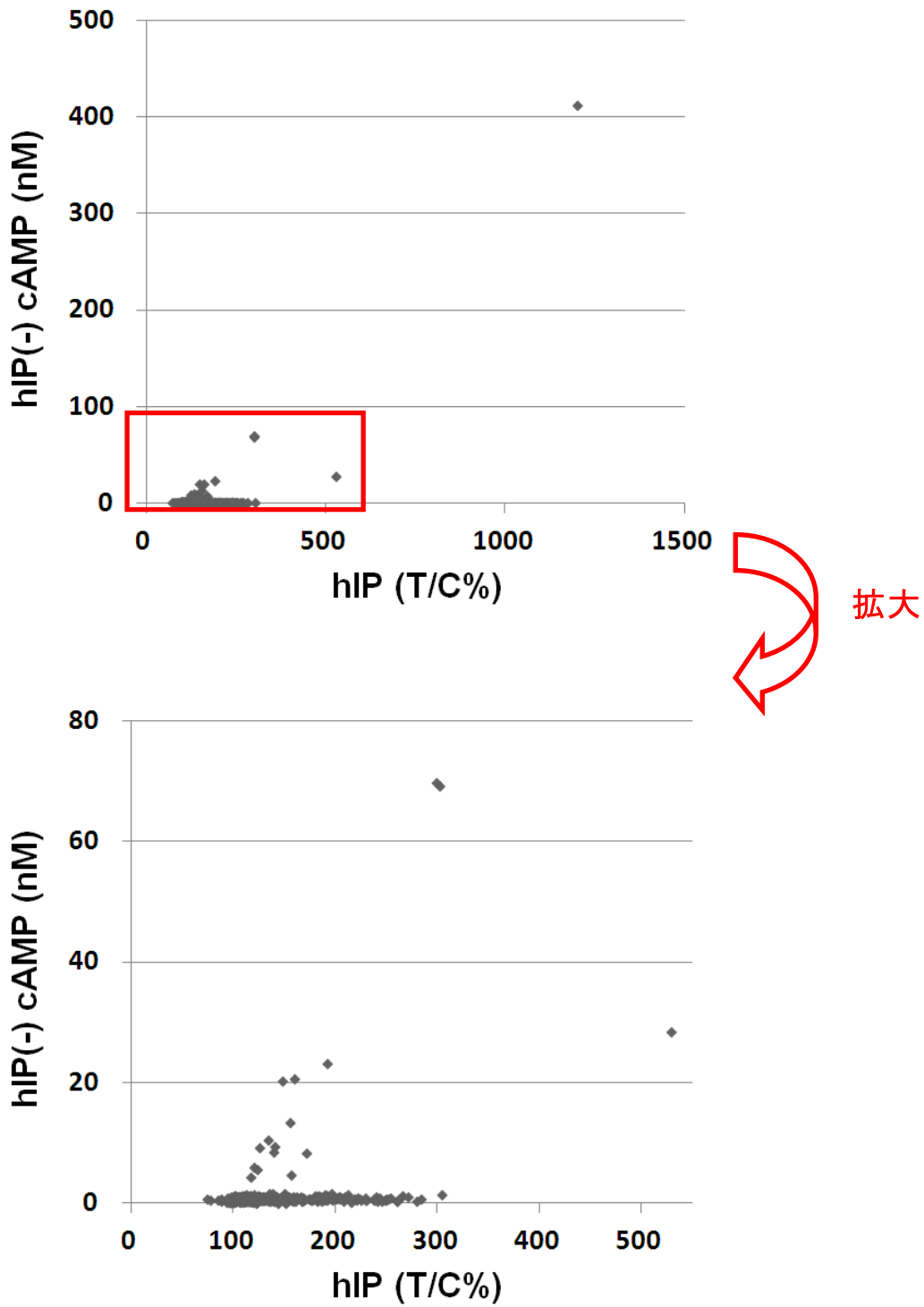
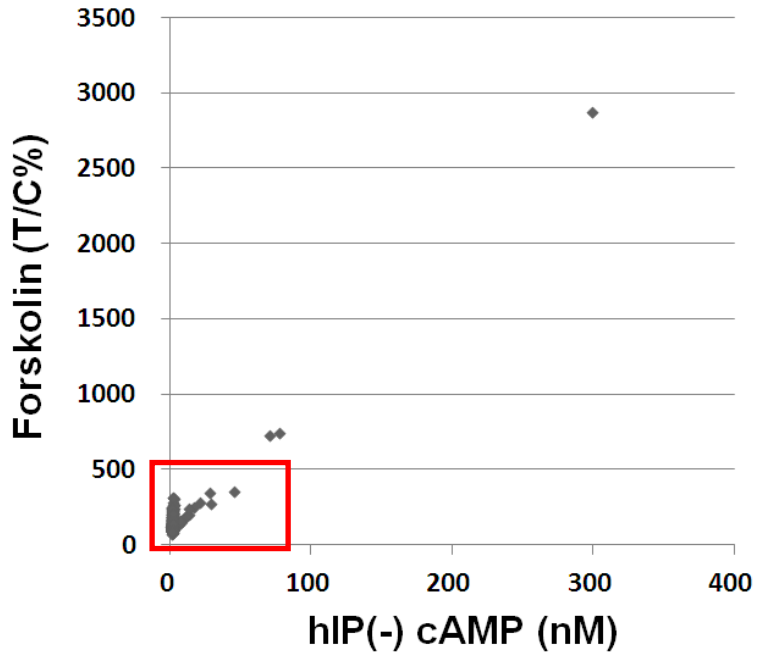


Figure 2-2-6 Relationship between hIP (-) assay and confirmation assay.



拡大

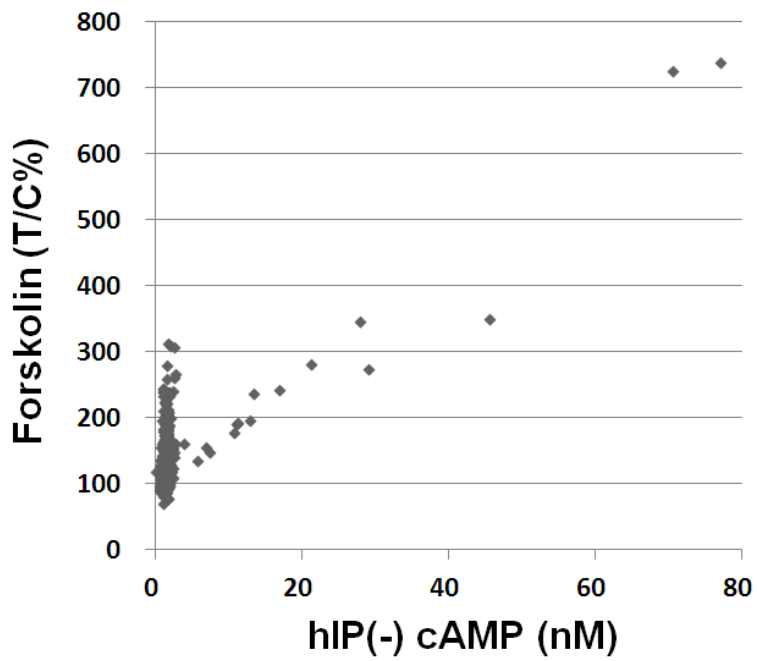
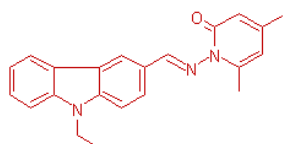
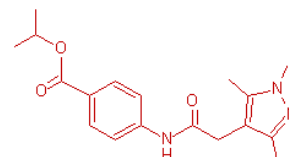
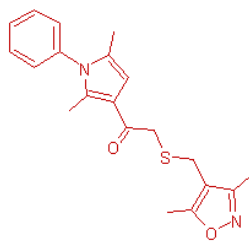
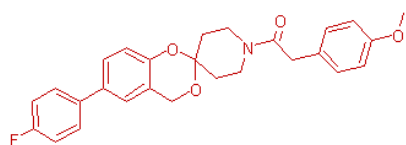
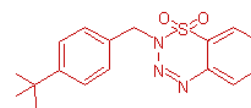
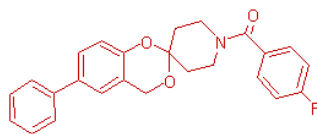
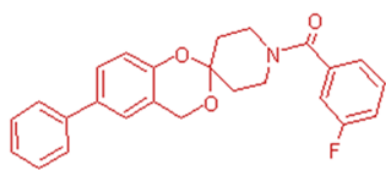


Figure 2-2-7 Relationship between Forskolin (+) assay and hIP (-) assay.

Table 2-2-1 Chemical structures of compounds that do not raise cAMP production except in Forskolin (+) assay.



第3節 3rd スクリーニング

【実験目的】

2nd スクリーニングで陽性と判断した 59 種の評価化合物を対象に、IP 特異的に作用して、Iloprost の用量反応曲線をシフトさせる化合物を見出すことを目的として、4 種類のアッセイを実施した。

① IP 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay ←ターゲット

コントロールと評価化合物との間で Iloprost (IP のアゴニスト) の用量反応曲線を比較することで、化合物の薬理特性を解析する。

② EP2 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay ←選択性

コントロールと評価化合物との間で Butaprost (EP2 のアゴニスト) の用量反応曲線を比較することで、化合物の薬理特性を解析する。

③ H2 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay ←選択性

コントロールと評価化合物との間で Histamine (H2 のアゴニスト) の用量反応曲線を比較することで、化合物の薬理特性を解析する。

④ mIP 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay ←ターゲット (種差)

コントロールと評価化合物との間で Iloprost (mIP のアゴニスト) の用量反応曲線を比較することで、化合物の薬理特性を解析する。

それぞれのターゲット受容体強制発現細胞系で、用量反応曲線を算出する理由を挙げる。 これまでは、Iloprost が EC40 という 1 点のアゴニスト濃度における cAMP 産生量を定量することで、化合物を評価してきた。このアッセイの活性評価基準は、コントロール (n=16) で産生された cAMP 濃度を 100%として、その C.V.値の 3 倍以上 cAMP を産生増強させた評価化合物を HTS 陽性としている。それでもなお用量反応曲線を描くことで、たとえそれぞれのターゲット受容体強制発現細胞系において、それぞれのアゴニスト濃度における cAMP 産生量がコントロールの C.V.値の 3 倍以下であっても、ばらつきがある中で、常に 110%あるいは 120%の cAMP 産生増強活性を有するものは弱いながらも間違いなく IP 非特異的に cAMP 産生増強させていると考えられ、排除する必要があるからである。

【実験方法】

① IP 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay

CHO-K1 細胞を宿主に、ヒト IP 受容体 (hIP) を安定的に発現させた細胞株を選択した。IP アゴニストである Iloprost を 1fM (Final)、1pM (Final)、10pM (Final)、100pM (Final)、1nM (Final)、10nM (Final)、100nM (Final)、1 μ M (Final) で添加すると同時に、被検化合物を 5uM (Final) で添加し、hIP 安定発現細胞を 5ul/well で分注し反応開始させた。40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した後、Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で蛍光を測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。

【プロトコール】

1. Iloprost + 被検化合物 5ul をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. hIP 安定発現細胞を、8000cells/well となるように 5ul/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5ul/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5ul/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より産生された cAMP 濃度を計算する。
7. それぞれの濃度の Iloprost で誘導される cAMP 濃度を 100%とした際の、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を T/C%で表記する。

② EP2 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay

CHO-K1 細胞を宿主に、ヒト EP2 受容体 (hEP2) を安定的に発現させた細胞株を選択した。EP2 アゴニストである Butaprost を 10pM (Final)、100pM (Final)、1nM (Final)、10nM (Final)、100nM (Final)、1 μ M (Final)、10 μ M (Final)、50 μ M (Final) で添加すると同時に、被検化合物を 5 μ M (Final) 添加し、hEP2 安定発現細胞を 5ul/well で分注し反応開始させた。40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した後、Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で蛍光を測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。

【プロトコール】

1. Butaprost + 被検化合物 5ul をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. hEP2 安定発現細胞を、14000cells/well となるように 5ul/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5ul/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5ul/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より産生された cAMP 濃度を計算する。
7. それぞれの濃度の Butaprost で誘導される cAMP 濃度を 100%とした際の、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を T/C%で表記する。

③ H2 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay

CHO-K1 細胞を宿主として、ヒト H2 受容体 (hH2) を一過性に遺伝子導入させて得られた細胞株を選択した。H2 アゴニストである Histamine を 10pM (Final)、100pM (Final)、1nM (Final)、10nM (Final)、100nM (Final)、1 μ M (Final)、10 μ M (Final)、100 μ M (Final) で添加すると同時に、被検化合物を 5 μ M (Final) 添加し、hH2 強制発現細胞を 5ul/well で分注し反応開始させた。40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した後、Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で蛍光を測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。

【プロトコール】

1. Histamine + 被検化合物 5ul をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. hH2 強制発現細胞を、15000cells/well となるように 5ul/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5ul/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5ul/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より産生された cAMP 濃度を計算する。
7. それぞれの濃度の Histamine で誘導される cAMP 濃度を 100%とした際の、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を T/C%で表記する。

④ mIP 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay

CHO-K1 細胞を宿主に、マウス IP 受容体 (mIP) を安定的に発現させた細胞株を選択した。IP アゴニストである Iloprost を 1fM (Final)、1pM (Final)、10pM (Final)、100pM (Final)、1nM (Final)、10nM (Final)、100nM (Final)、1 μ M (Final) で添加すると同時に、被検化合物を 5uM (Final) で添加し、mIP 安定発現細胞を 5ul/well で分注し反応開始させた。40分後に試薬に含まれる TritonX-100にて反応を停止した後、Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で蛍光を測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。

【プロトコール】

1. Iloprost + 被検化合物 5ul をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. mIP 安定発現細胞を、7000cells/well となるように 5ul/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5ul/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5ul/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より産生された cAMP 濃度を計算する。
7. それぞれの濃度の Iloprost で誘導される cAMP 濃度を 100%とした際の、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を T/C%で表記する。

【結果】

2nd スクリーニングで陽性と判断した 59 種の評価化合物を対象に、上記 4 種類のアッセイを実施することで、評価化合物の有する薬理特性を 1 つ 1 つ解析した。ここでは、TS00001-14 の 14 種の化合物について報告する。残り 45 種の評価化合物は、受容体非特異的に cAMP 産生増強作用を有している化合物や特筆すべき薬理特性を有していなかった化合物である。

TS000001 – TS000005 の 5 種の化合物は、いずれも hIP 特異的に Iloprost の用量反応曲線を左へシフトさせる傾向を有する化合物である。これらの 5 種の化合物に対しては、化合物の濃度を 0.6 μ M、2 μ M、6 μ M、20 μ M とした時の Iloprost の用量反応曲線への影響を精査した。

TS000006 – TS000008 の 3 種の化合物は、いずれも Iloprost の用量反応曲線を上へシフトさせる傾向を有する化合物である。

TS000009 – TS000014 の 6 種の化合物は、ヒット化合物ではないが、いずれも興味深い薬理特性をもっているため、参考までに **Supplementary data** として紹介する。また、hIP、hEP2 及び mIP 強制発現細胞系において、それぞれのアゴニストの用量反応曲線を上シフトさせる化合物の一部を **Supplementary figure 9-3-S-7** に掲載した。これらの化合物は、H2 受容体への作用は認められない、あるいは認められても極めて軽微であるため、合成展開により構造を変化させることで、それぞれの受容体特異的な作用を獲得する可能性がある。

TS-000001

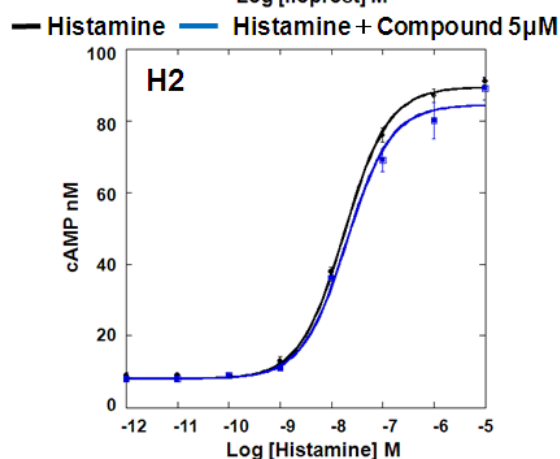
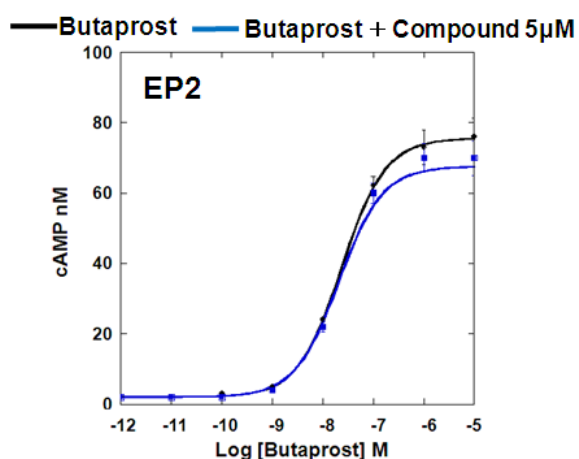
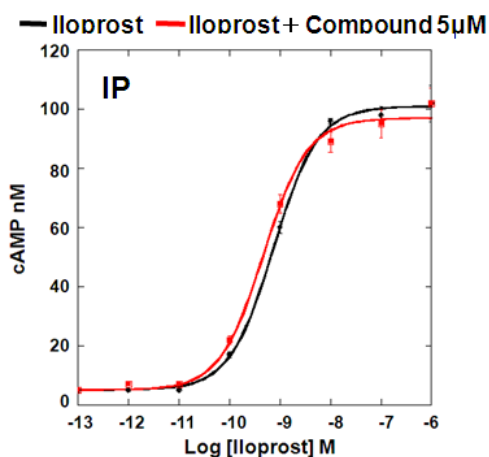
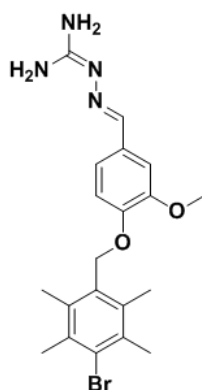


Figure 2-3-1 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in H2 transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

TS000001 は、hIP 特異的に Iloprost の用量反応曲線を左へシフトさせる化合物であるが、その作用は、極めて軽微である (Fig 2-3-1, Fig 2-3-3)。化合物の濃度依存性を確認するため、化合物の濃度を $0.6 \mu\text{M}$ から $20 \mu\text{M}$ まで変化させると、コントロール (DMSO) と比較して用量反応曲線の乖離が認められた (Fig 2-3-2)。Fig 2-3-3 にある Dose ratio とは、例えば、 $[A]_0$ をある一定の大きさの反応をアゴニスト単独時に引き起こすアゴニスト濃度 (今回の場合は、Iloprost) とし、 $[A]$ をある化合物 (例えば、競合的アンタゴニストなど) 存在下で、同じ大きさの反応を引き起こすアゴニスト濃度とすると、 $[A]_0/[A]$ を dose ratio という。つまり、ある化合物が競合的アンタゴニストであった場合、 $[A]_0/[A]$ は競合的アンタゴニストによって、アゴニストの用量反応曲線が何倍右へ平行移動するかを表した値である。今回は、コントロールの最大反応の半分の cAMP を産生させるのに必要なアゴニスト濃度で用量比を算出した。 $20 \mu\text{M}$ の

TS000001 の用量比が 1.6 ということは、用量反応曲線は左へ 1.6 倍左シフトしたといえる。

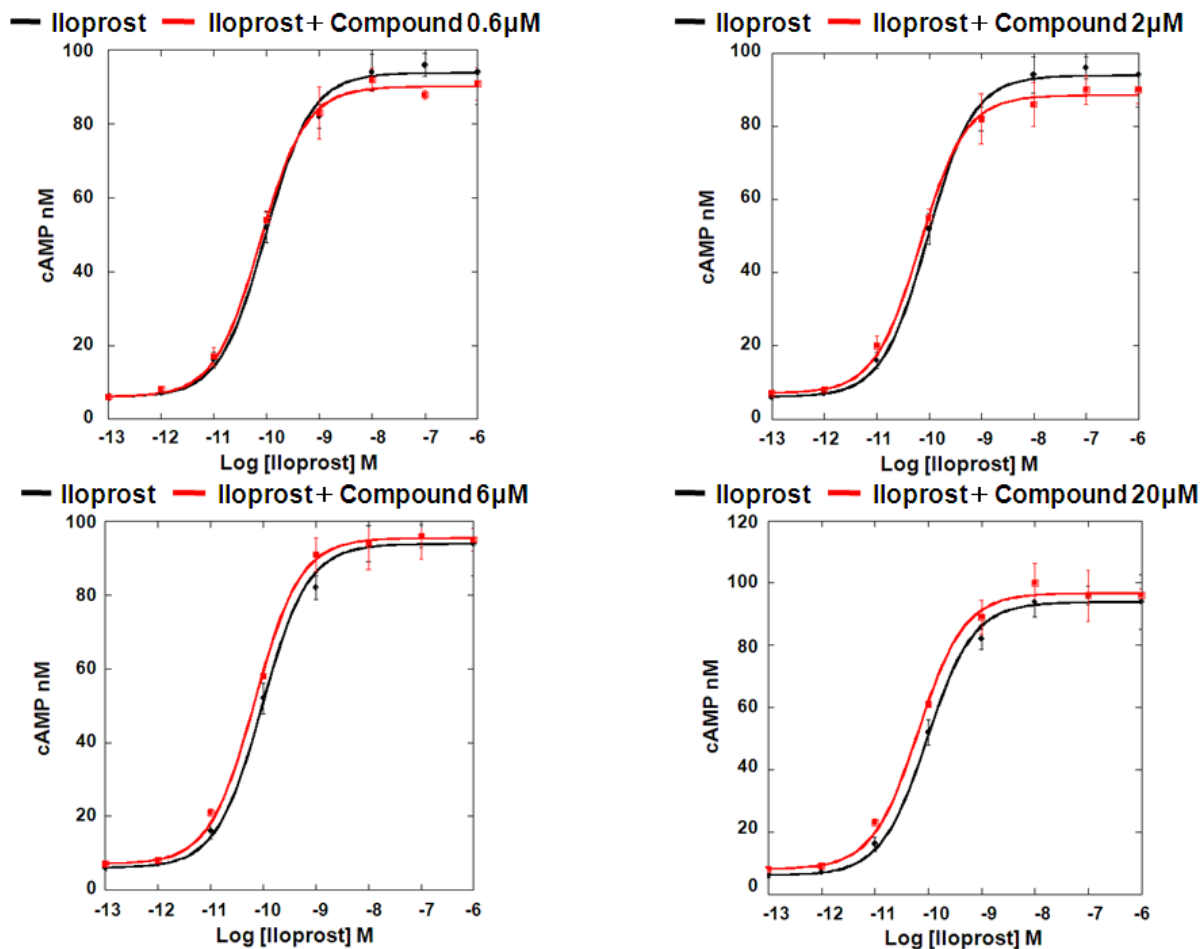


Figure 2-3-2 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell.

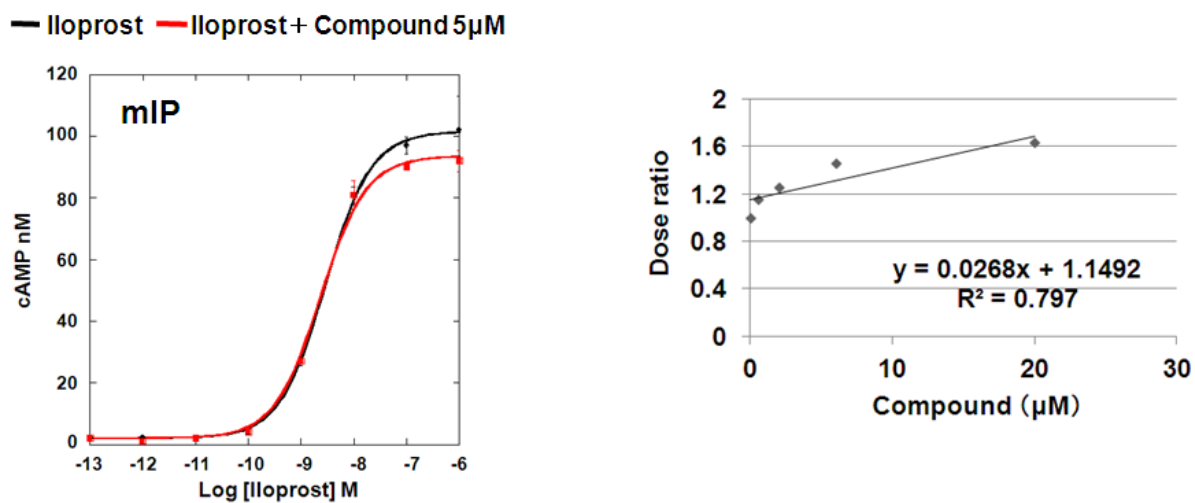


Figure 2-3-3 Pharmacological profile of the compound. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell(left). Effect of the compound on dose ratio(right).

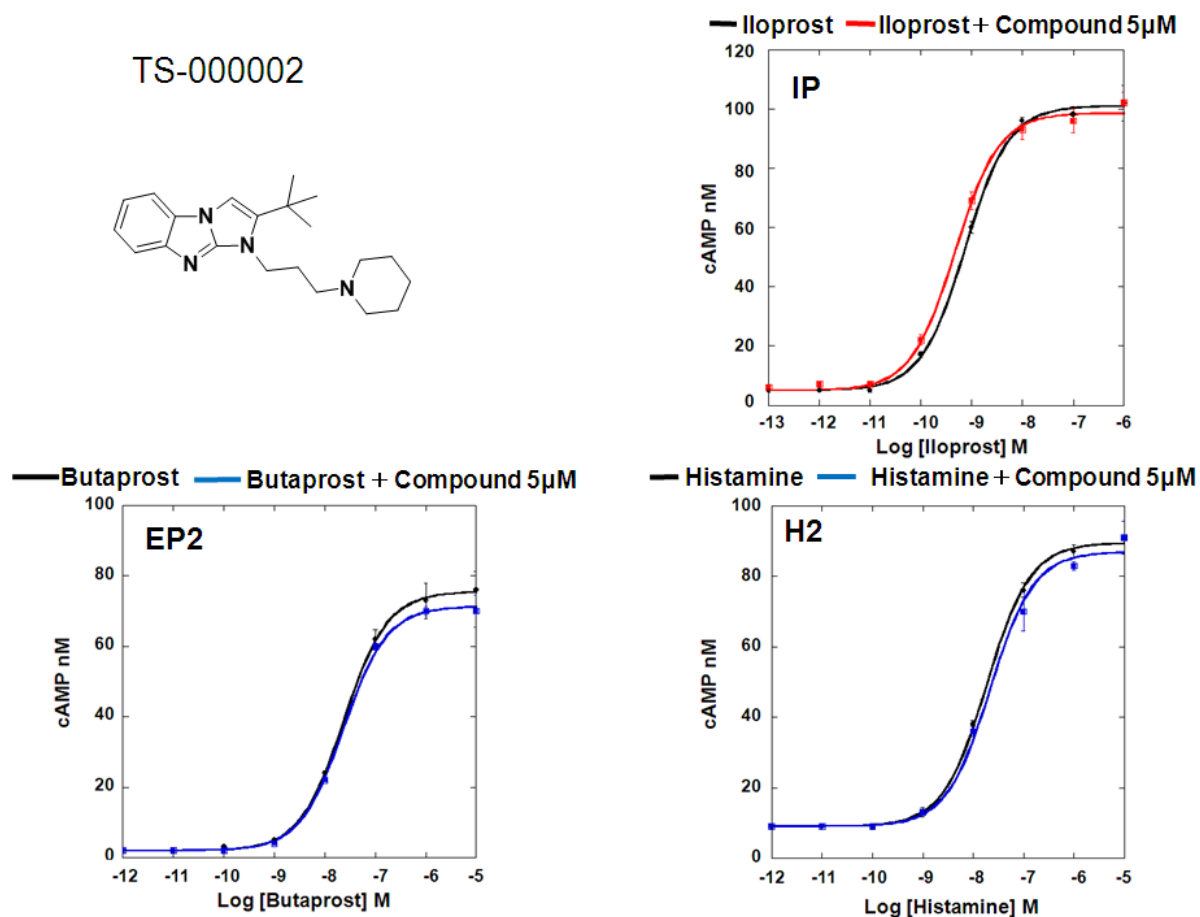


Figure 2-3-4 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in H2 transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

TS000002 は、hIP 特異的に Iloprost の用量反応曲線を左へシフトさせる化合物であるが、その作用は、極めて軽微である (Fig 2-3-4, Fig 2-3-6)。化合物の濃度依存性を確認するため、化合物の濃度を $0.6 \mu\text{M}$ から $20 \mu\text{M}$ まで変化させると、コントロール (DMSO) と比較して用量反応曲線の乖離が認められた (Fig 2-3-5)。

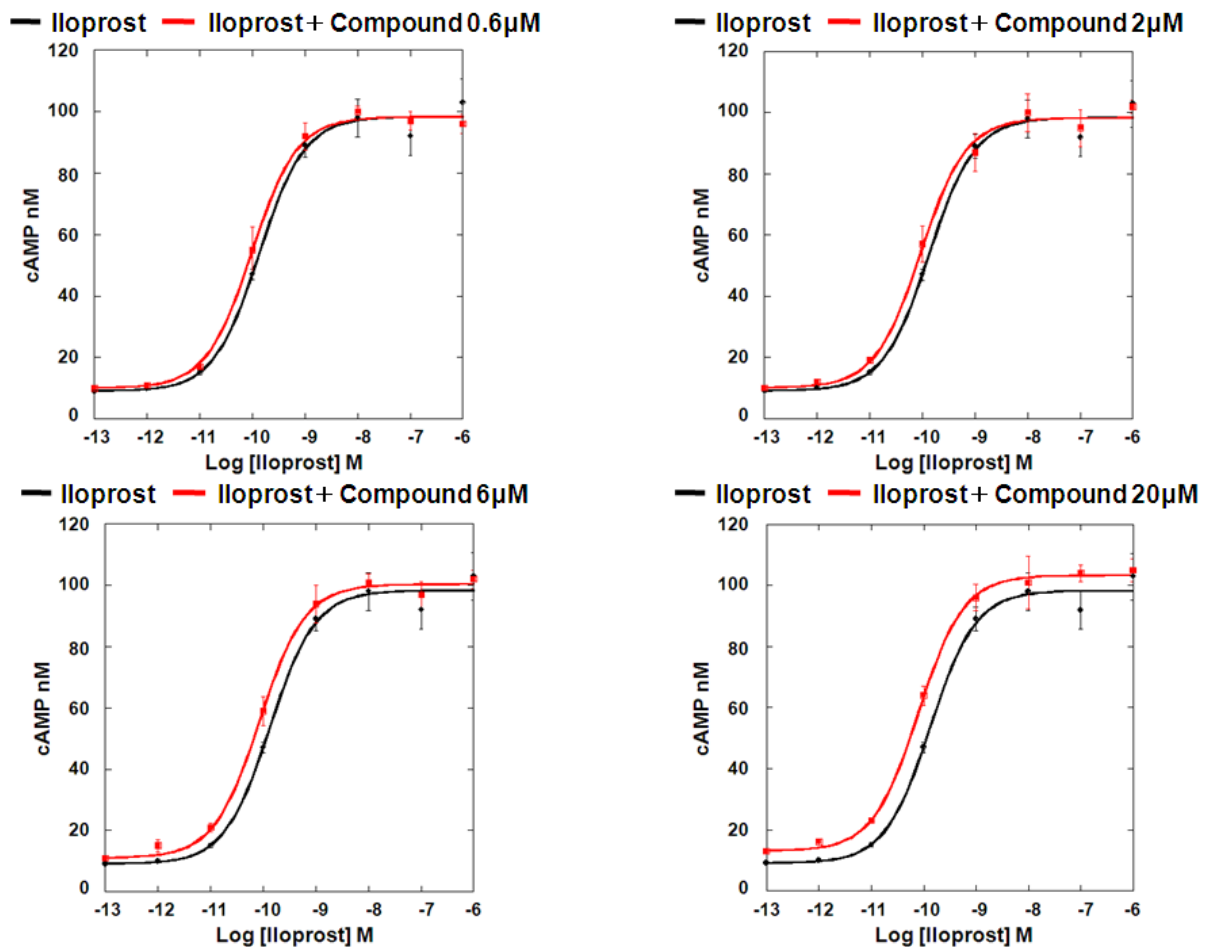


Figure 2-3-5 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell.

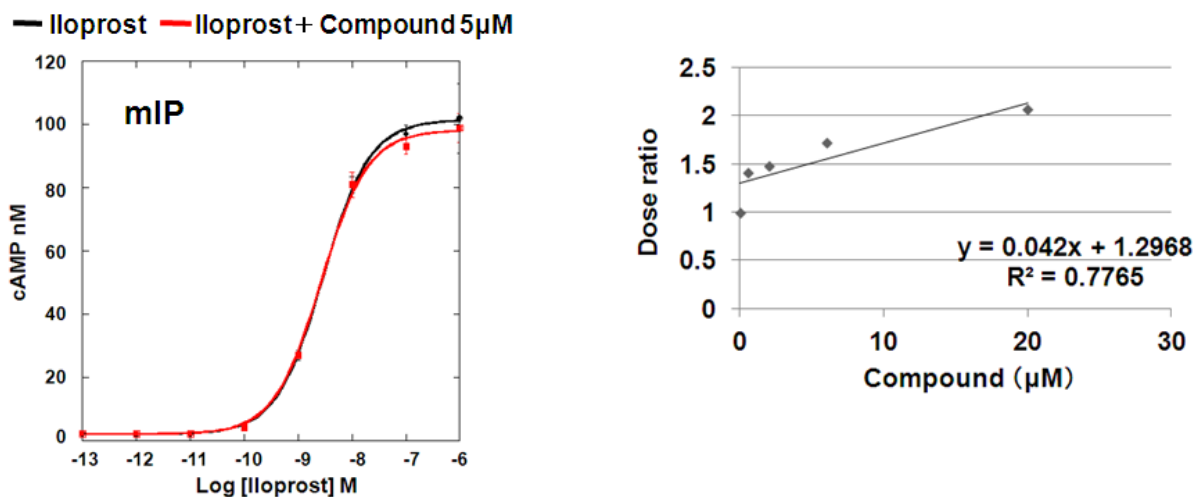


Figure 2-3-6 Pharmacological profile of the compound. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell(left). Effect of the compound on dose ratio(right).

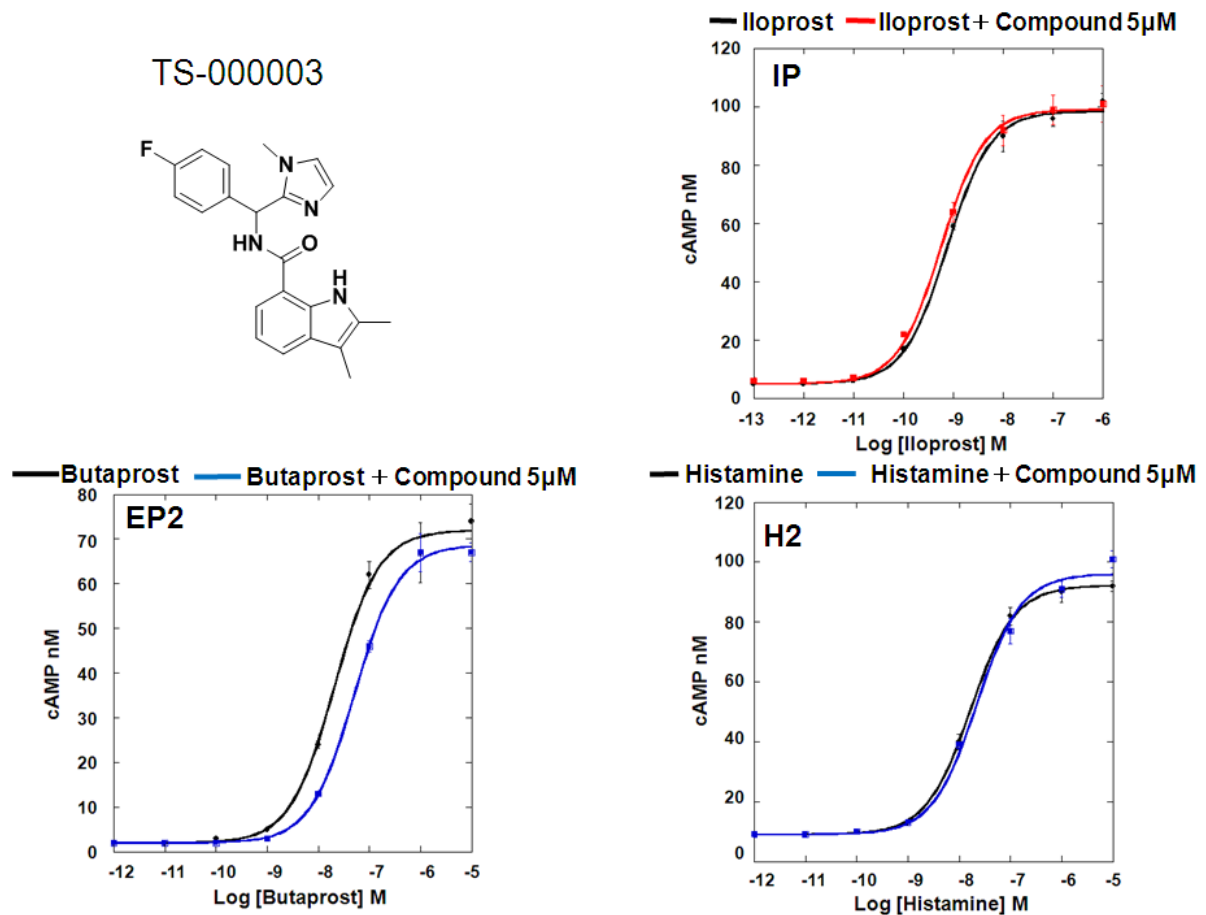


Figure 2-3-7 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in H2 transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

TS000003 は、hIP 特異的に Iloprost の用量反応曲線を左へシフトさせる化合物であるが、hEP2 強制発現細胞系において、Butaprost の用量反応曲線を右へシフトさせた (Fig 2-3-7, Fig 2-3-9)。化合物の濃度依存性を確認するため、化合物の濃度を $0.6 \mu\text{M}$ から $20 \mu\text{M}$ まで変化させると、コントロール (DMSO) と比較して用量反応曲線の乖離が認められた (Fig 2-3-8)。

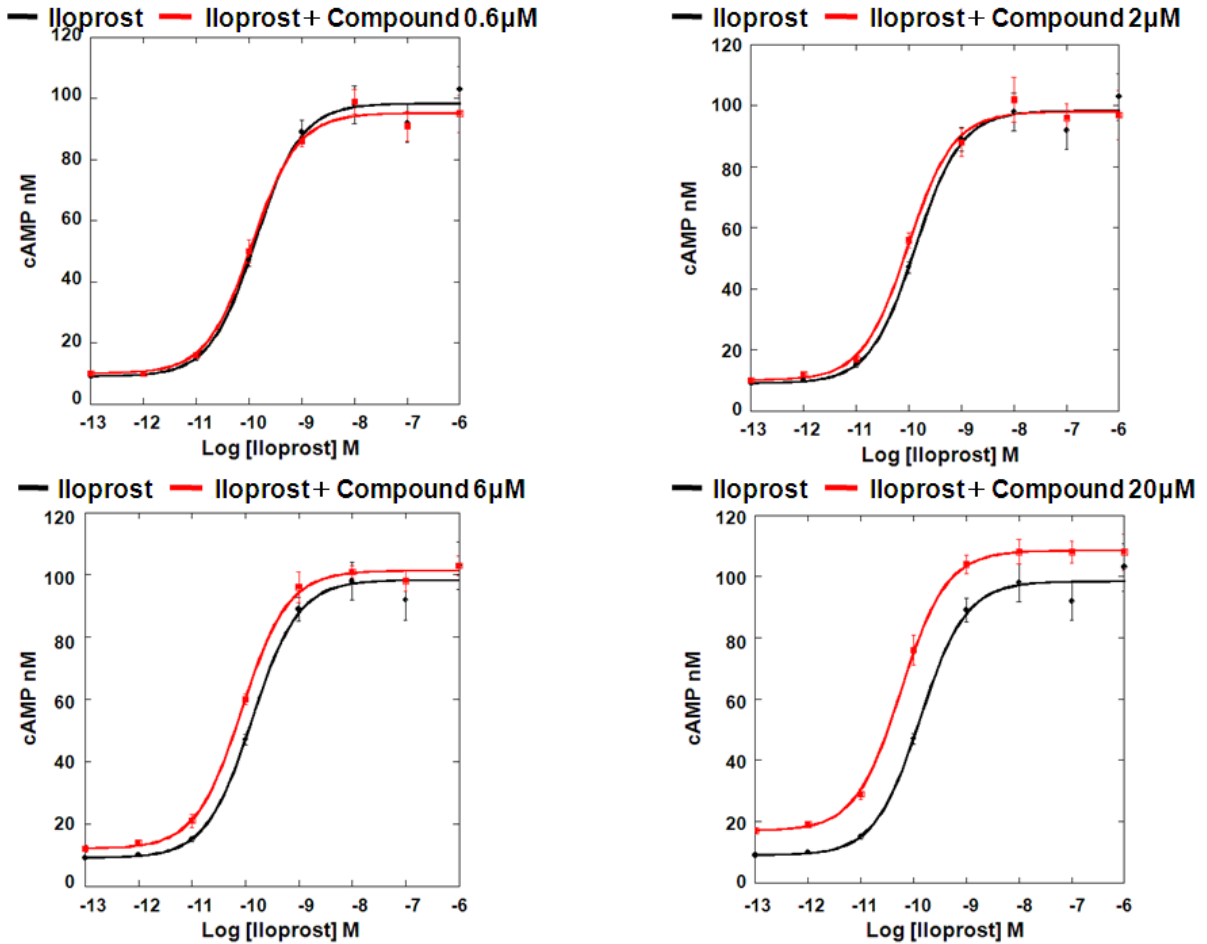


Figure 2-3-8 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell.

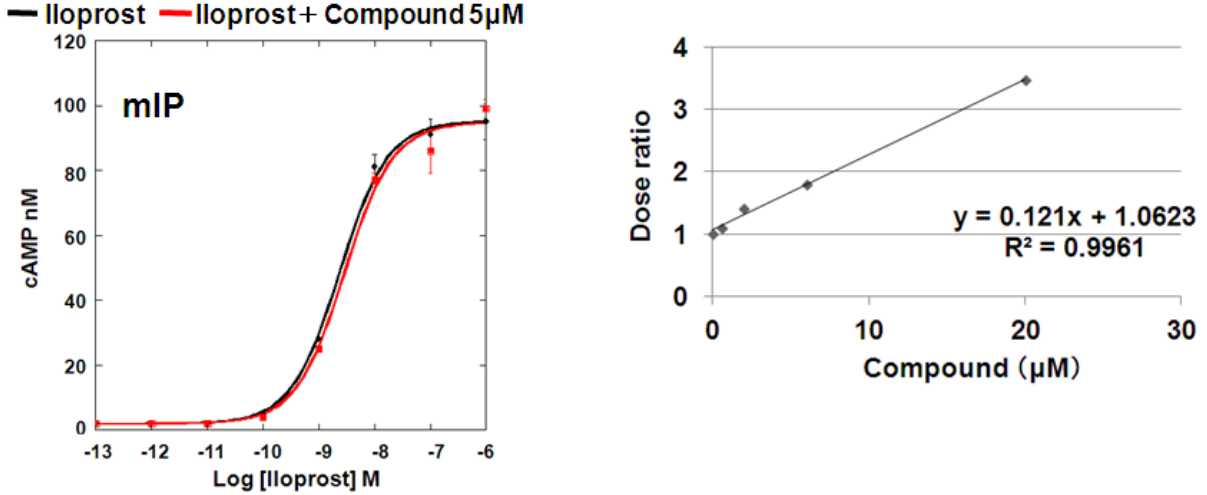


Figure 2-3-9 Pharmacological profile of the compound. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell(left). Effect of the compound on dose ratio (right).

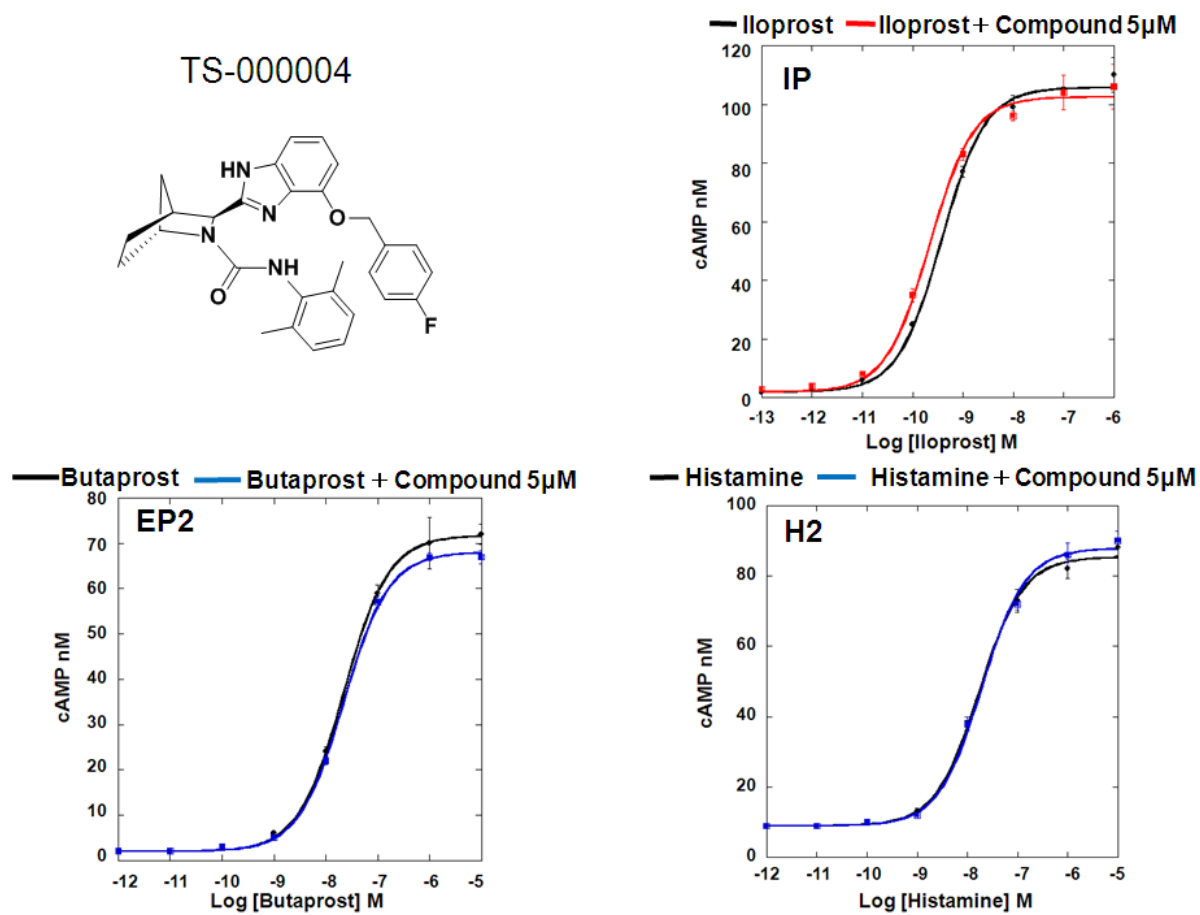


Figure 2-3-10 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in H2 transiently expressing CHO-K1 cell (lower right).

TS000004 は、hIP 特異的に Iloprost の用量反応曲線を左へシフトさせる化合物であるが、その作用は、極めて軽微である (Fig 2-3-10, Fig 2-3-12)。化合物の濃度依存性を確認するため、化合物の濃度を $0.6 \mu\text{M}$ から $20 \mu\text{M}$ まで変化させると、コントロール (DMSO) と比較して用量反応曲線の乖離が認められた (Fig 2-3-11)。

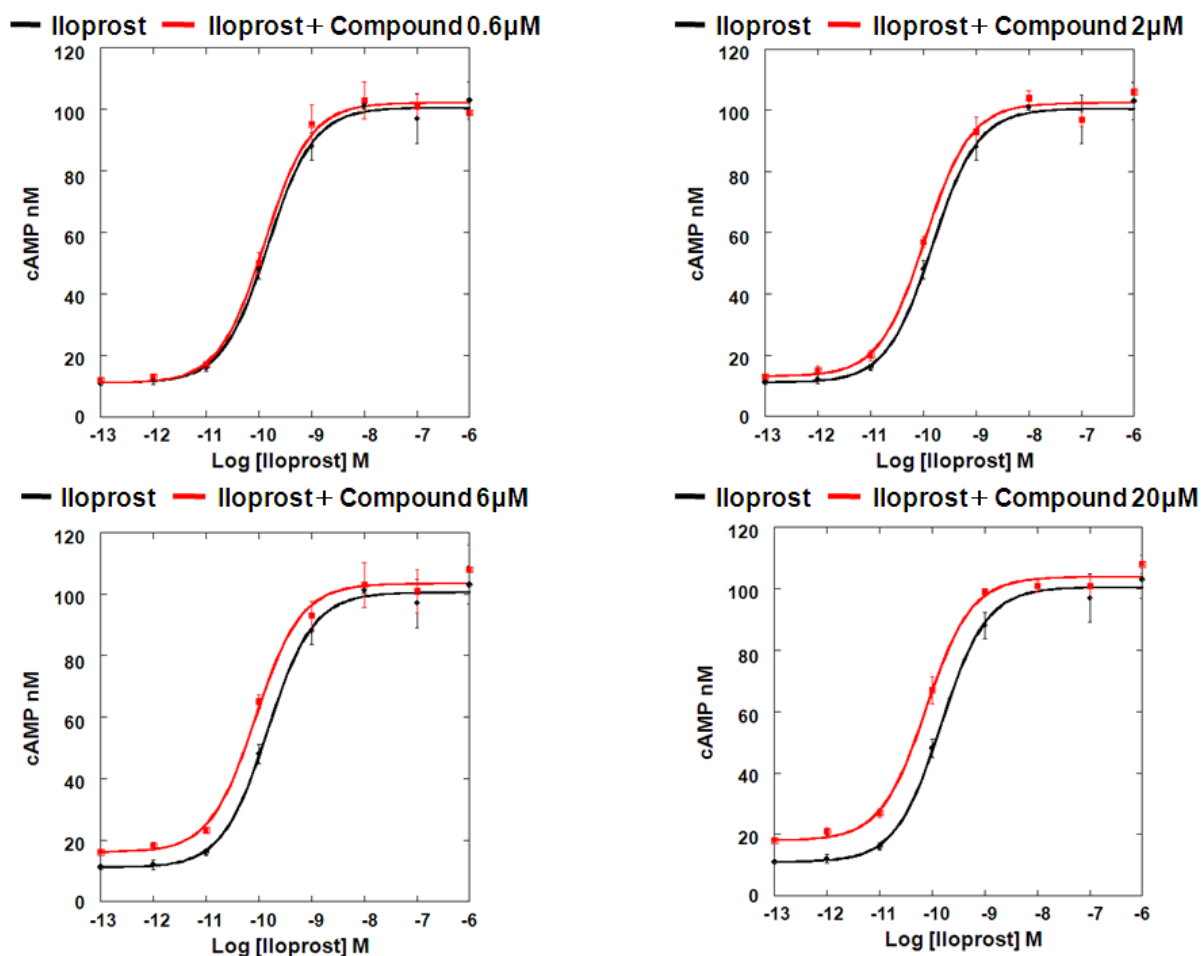


Figure 2-3-11 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell.

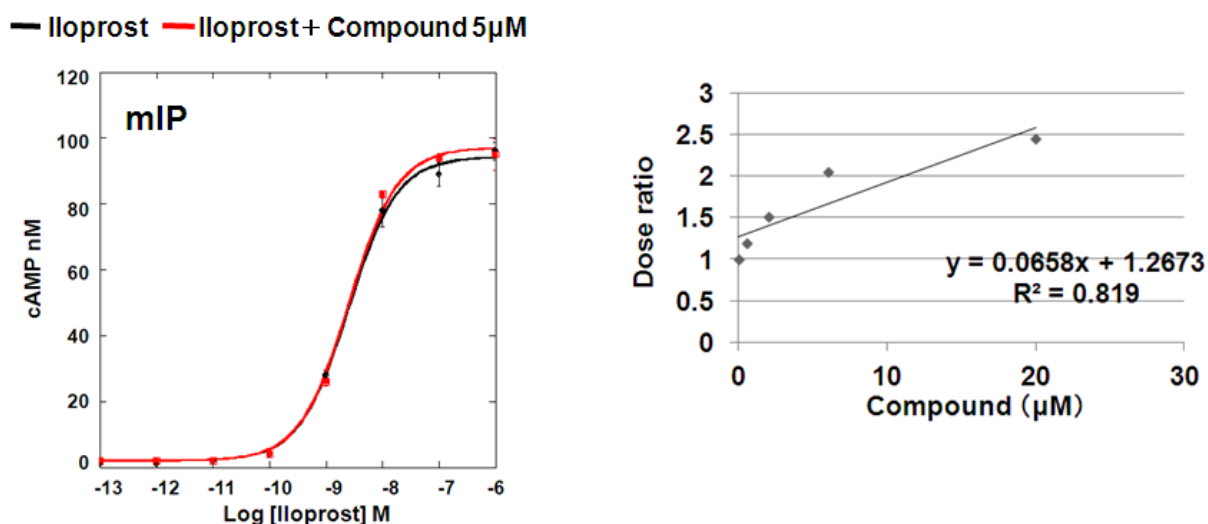


Figure 2-3-12 Pharmacological profile of the compound. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell(left). Effect of the compound on dose ratio(right).

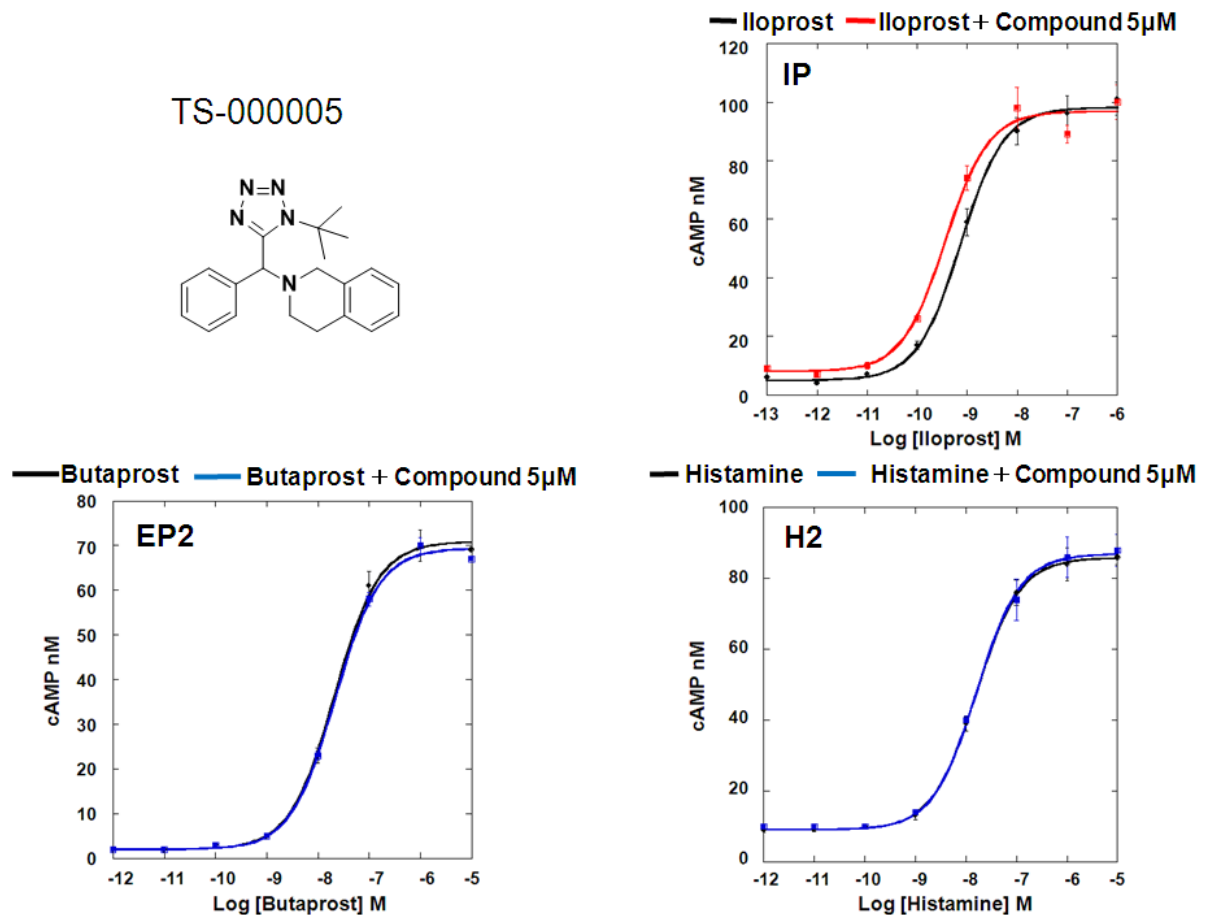


Figure 2-3-13 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in H2 transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

TS000005 は、hIP 特異的に Iloprost の用量反応曲線を左へシフトさせる化合物であるが、hIP 特異的にベースが上昇していることから、極めて弱いアゴニスト活性を有していることが示唆される (Fig 2-3-13, Fig 2-3-15)。化合物の濃度依存性を確認するため、化合物の濃度を 0.6 μM から 20 μM まで変化させると、コントロール (DMSO) と比較して用量反応曲線の乖離が認められた (Fig 2-3-14)。但し、化合物濃度 20 μM において、用量反応曲線の最大反応が大きく上へシフトしたのは、DMSO による影響とノイズ (非特異的な cAMP 産生) であると考えている。その原因に DMSO の影響を挙げた理由として、TS000005 は化合物の物性により、DMSO への溶解性が悪く、Source plate に 2 mM で供給される化合物であるため、20 μM まで濃度を上昇させると、Final の DMSO 濃度が 1%となる。コントロールと Final の DMSO 濃度が 1%とした時の用量反応曲線を比較すると、本来 2つの曲線は一致するはずであるが、Final の DMSO

濃度が 1%の方では、最大反応が上へシフトしたためである (data not shown)。

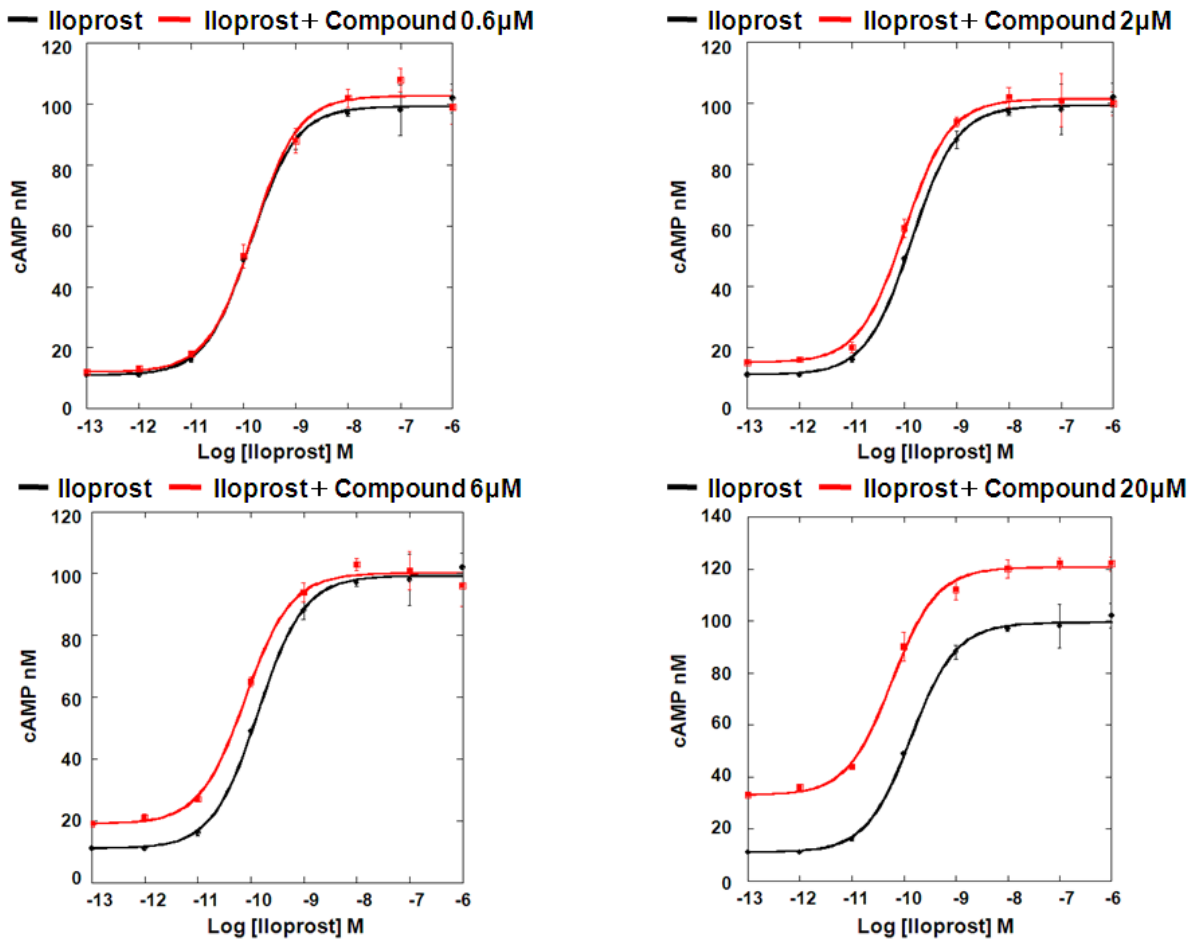


Figure 2-3-14 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell.

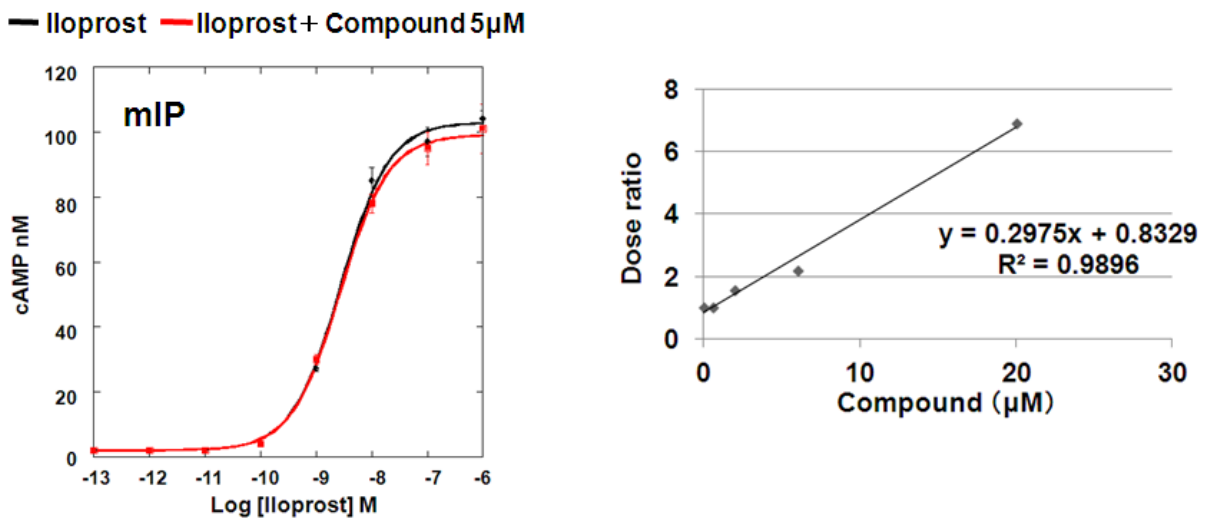
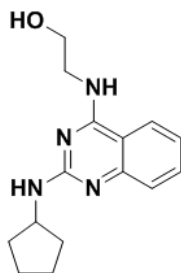
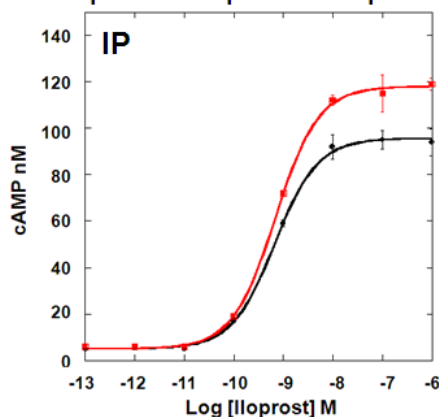


Figure 2-3-15 Pharmacological profile of the compound. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell(left). Effect of the compound on dose ratio(right).

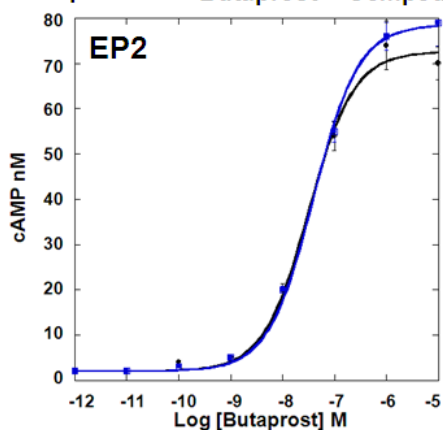
TS-000006



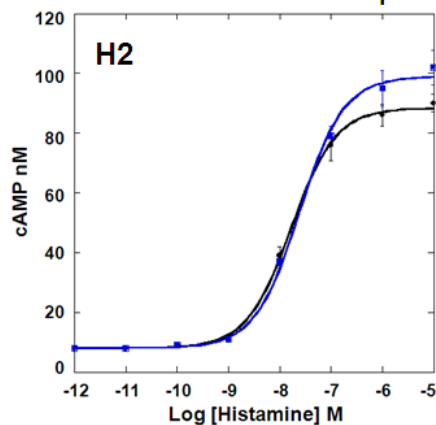
— Iloprost — Iloprost+ Compound 5 μ M



— Butaprost — Butaprost + Compound 5 μ M



— Histamine — Histamine + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost+ Compound 5 μ M

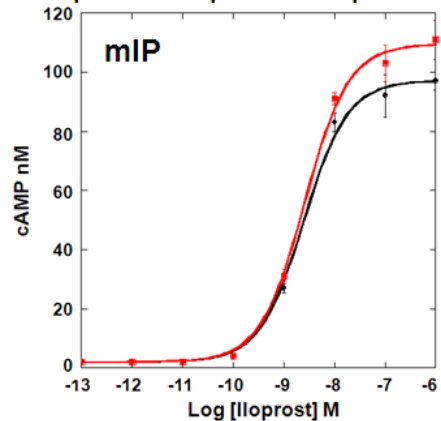


Figure 2-3-16 Compound chemical structure and pharmacological profile.

Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left side in the middle). Effect of the compound on Histamine dose response curve in H2 transiently expressing CHO-K1 cell(right side in the middle). Effect of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell(lower left).

TS000006 は、他の受容体と比較して hIP でより大きく上シフトさせた化合物である。

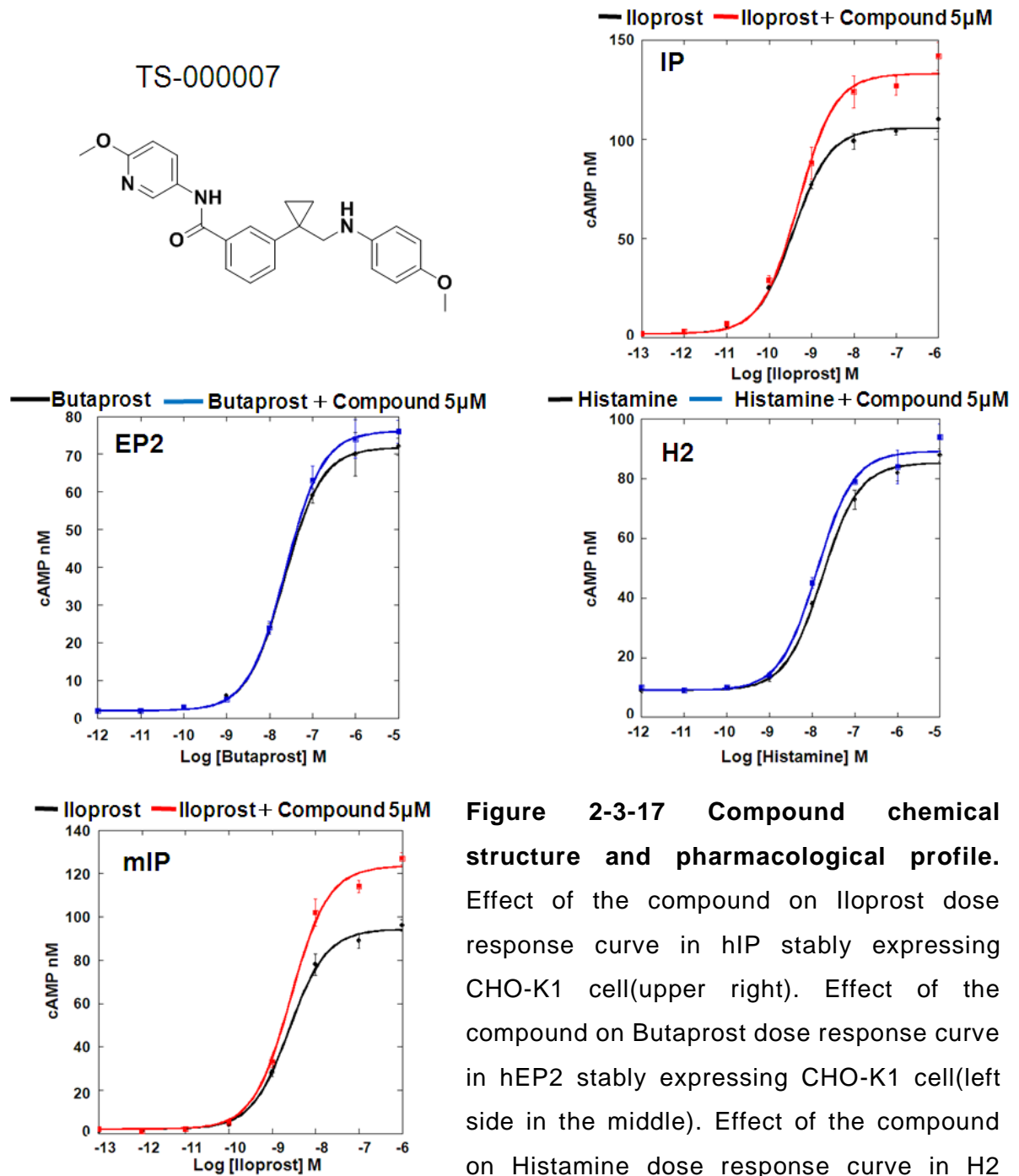


Figure 2-3-17 Compound chemical structure and pharmacological profile.

Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left side in the middle). Effect of the compound on Histamine dose response curve in H2 transiently expressing CHO-K1 cell(right side in the middle). Effect of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell(lower left).

TS000007 は、他の受容体と比較して hIP と mIP でより大きく上シフトさせた化合物である。

TS-000008

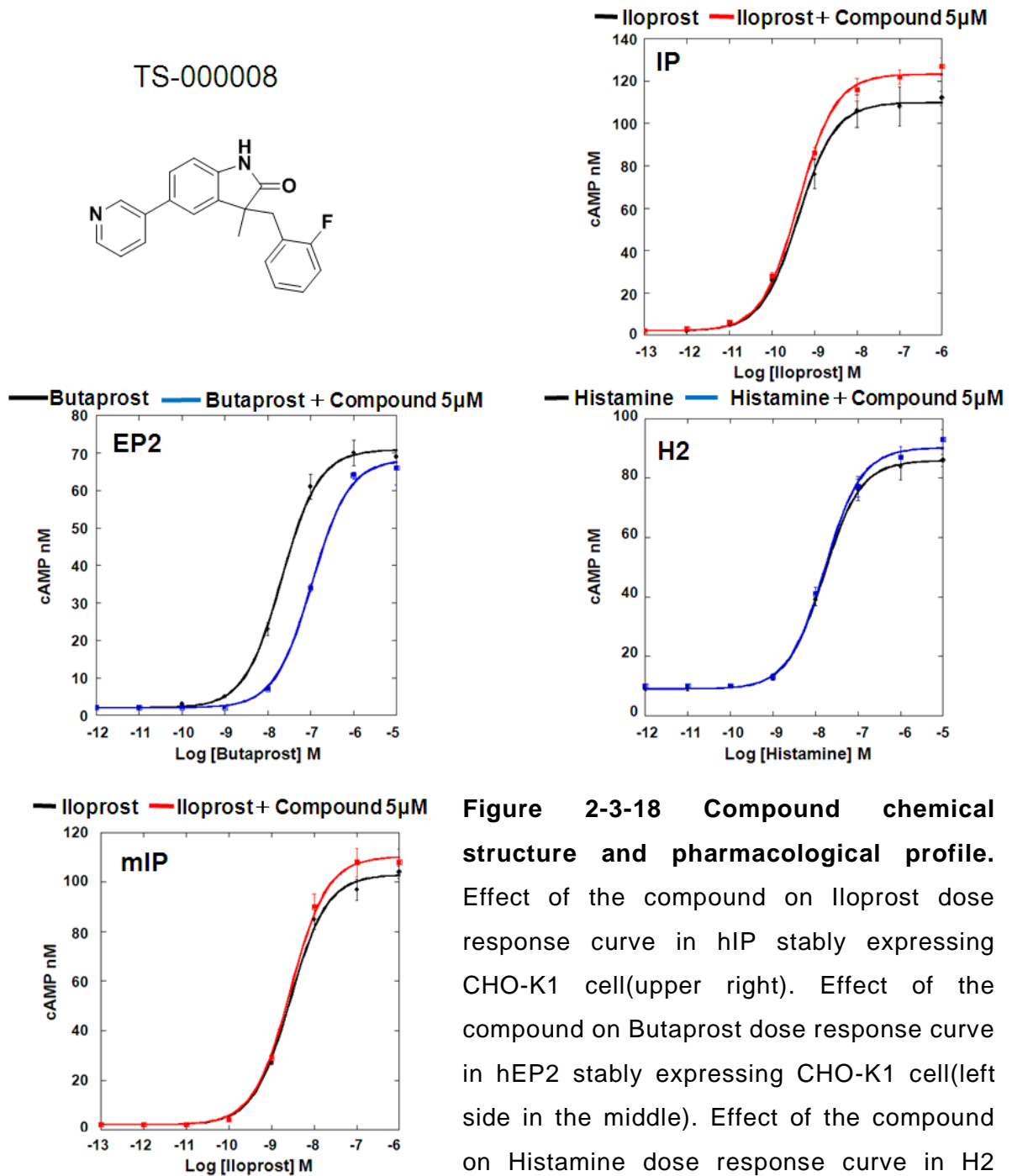
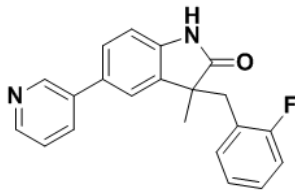


Figure 2-3-18 Compound chemical structure and pharmacological profile.

Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell (upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell (left side in the middle). Effect of the compound on Histamine dose response curve in H2 transiently expressing CHO-K1 cell (right side in the middle). Effect of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell (lower left).

TS000008 は、hIP で Iloprost の用量反応曲線を右シフトさせ、hEP2 で Butaprost の用量反応曲線を右シフトさせる化合物である。

【考察】

Supplementary figure 2-8-S-7 は、hIP、hEP2、H2 及び mIP 強制発現細胞系で cAMP アッセイを実施した中で、同様の薬理活性を有している化合物群であるが、その中に構造類似体が含まれていることがわかる。このことから、1st スクリーニングから今回の高次評価までに実施されたすべての評価系が十分機能しているといえる。

次に、今回得られた TS000001 – TS000005 の 5 種類の化合物について、それぞれ米国立衛生研究所のデータベースに掲載されている情報を収集したところ、非常に興味深い情報が得られた。

データベースの情報によれば、TS000001 はこれまでに 3 種類のアッセイが実施されており、そのうち 2 種のアッセイで **Active** と判断されていた。但し、ここでいう「**Active**」とは、あくまでも、ある任意の評価系において陽性であると判断された化合物であるということにすぎず、具体的には 1st スクリーニングやそれより高次の評価系で陽性と判断された数百種類の化合物の中に、T-000001 が含まれていることを意味する。TS000002 は、4 種類のアッセイが実施されていたが、いずれも **inactive** であった。TS000003 は、データベースに含まれているが、実施されたアッセイに関するデータは皆無である。TS000004 は、データベースに含まれていなかった。TS000005 は、651 種類のアッセイが実施されており、そのうち 8 種類のアッセイで **Active** と判断され、631 種類のアッセイで **inactive** であり、1 種のアッセイで **Unspecified**、11 種のアッセイで **inconclusive** であることがわかった。重要なことは、実施された 651 種類のアッセイのうち、631 種類のアッセイで **inactive** であったという知見である。スクリーニングされる化合物の中には、アッセイ非特異的に陽性と判断される化合物が存在するが、TS000005 は実施されたアッセイの中で陽性と判断された割合は、3%であり、陰性と判断されたアッセイの割合が 97%であることから、アッセイ非特異的に陽性と判断される化合物ではないといえる。また、1 つの研究室で実施できるアッセイの数には、限りがあるため、このような大規模なデータベースの情報からある特定の化合物に関する知見、特に **off target** を得ることは非常に重要であり、構造活性相関を研究する際にも活用可能である。さらに、**Active** と判断された 8 種類のアッセイのうち、6 種類のアッセイは、特定のタンパク質をターゲットにしたものであった。それらのタンパク質は、short transient receptor potential channel 4 isoform 2 (ラット) (TRPC4 と呼ばれるカチオンチャンネルで非選択的に Ca^{2+} を透過させる)、short transient receptor potential channel 6 (ラット) (TRPC6 と呼ばれるカチオンチャンネルで、 Na^+ や Ca^{2+} を透過させる)、ムスカリン受容体 M4 (ラット)、ムスカリン受容体 M1 (ラット)、thioredoxin glutathione reductase (寄生虫) や cytochrome P450 2C19 precursor (ヒト) である。**Active** と判断されたアッセイのうち、特定のタンパク質をターゲットにしたもののみで考えると、陽性判断されたアッセイの割合は、1%未満である。また、

実施されたこれらのアッセイでは、添加された化合物濃度は、数十 μM である。これらのアッセイでは、その濃度域で陽性と判断されており、今回、私が実施したスクリーニングでは、 $5\ \mu\text{M}$ で十分に化合物の薬理作用が認められることから、TS000005 の IP への薬理作用は、濃度という点において、他の off target への作用との間に有意な差があると考えられる。

ところで、今回得られた化合物は、いずれも hIP に対して高い受容体選択性を有しているが、hIP、hEP2 と mIP のホモロジー解析を実施したところ、hIP と mIP 間の identity は 79 %、hIP と hEP2 間の identity は 58 %、hEP2 と mIP 間の identity は 55 % であった。種差の違いを考慮しても、79 % という hIP と mIP 間の identity は、低いと考えられる。また、hIP と hEP2 は全体の構造が非常に類似している（ループの部分の類似性が相対的に低いのだが・・・）にも関わらず、hIP 特異的に Iloprost の用量反応曲線をシフトさせた TS000001 – TS000005（TS000003 を除く）の構造、及び hEP2 に作用し Butaprost の用量反応曲線をシフトさせた化合物の構造 (TS000003、TS000008、TS000010 や TS000011 など) を精査することで、構造活性相関の知見を得られると考えた。

そこで、TS000003 と TS000005 の構造に着目すると、どちらも不斉炭素を中心に共通の分子骨格を有していることがわかる (Figure 2-3-19)。もちろん、イミダゾールとテトラゾールや酸性プロトンの有無などの化学的特性の違いはあるが、現時点での考察として、ヒット化合物の中に共通な分子骨格の存在を伺い知ることができる。

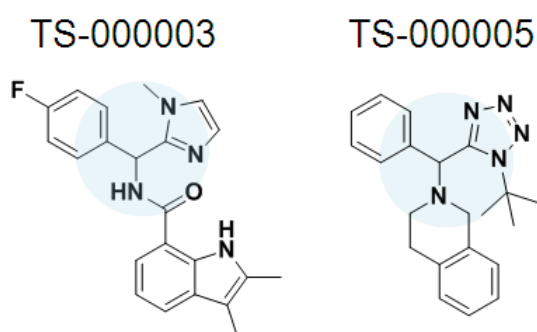


Figure 2-3-19 Constitutional similarity between TS000003 and TS000005. The same molecular frame between them is highlighted in pale blue.

ヒット化合物(粉末提供)を対象にしたアッセイ

【実験目的】

ヒット化合物の DMSO への溶解性が低いため、DMSO 中で保管されている化合物が Pod でアッセイプレートを調製する際に結晶化していた。そのため創薬イノベーションセンターから粉末提供されたヒット化合物を DMSO に溶解させ、IP 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay、EP2 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay と mIP 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay の 3 種類のアッセイを実施し、化合物を再評価することを目的として実験を行った。

【実験方法】

A) IP 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay

CHO-K1 細胞を宿主に、ヒト IP 受容体 (hIP) を安定的に発現させた細胞株を選択した。IP アゴニストである Iloprost を 1 fM (Final)、1 pM (Final)、10 pM (Final)、100 pM (Final)、1 nM (Final)、10 nM (Final)、100 nM (Final)、1 μM (Final) で添加すると同時に、被検化合物を 5 μM (Final) で添加し、hIP 安定発現細胞を 5 μl/well で分注し反応開始させた。40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した後、Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で蛍光を測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。

【プロトコール】

1. Iloprost + 被検化合物 5 μl をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. hIP 安定発現細胞を、7000 cells/well となるように 5 μl/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5 μl/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5 μl/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎にスタンダード cAMP の検量線より産生された cAMP 濃度を計算する。
7. それぞれの濃度の Iloprost で誘導される cAMP 濃度を 100%とした際の、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を T/C%で表記する。

B) EP2 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay

CHO-K1 細胞を宿主に、ヒト EP2 受容体 (hEP2) を安定的に発現させた細胞株を選択した。EP2 アゴニストである Butaprost を 10 pM (Final)、100 pM (Final)、1 nM (Final)、10 nM (Final)、100 nM (Final)、1 μM (Final)、10 μM (Final)、25 μM (Final) で添加すると同時に、被検化合物を 5 μM (Final) 添加し、hEP2 安定発現細胞を 5 μl/well で分注し反応開始させた。40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した後、Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で蛍光を測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。

【プロトコール】

1. Butaprost + 被検化合物 5 μl をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. hEP2 安定発現細胞を、14000 cells/well となるように 5 μl/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5 μl/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5 μl/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎にスタンダード cAMP の検量線より産生された cAMP 濃度を計算する。
7. それぞれの濃度の Butaprost で誘導される cAMP 濃度を 100%とした際の、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を T/C%で表記する。

C) mIP 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay

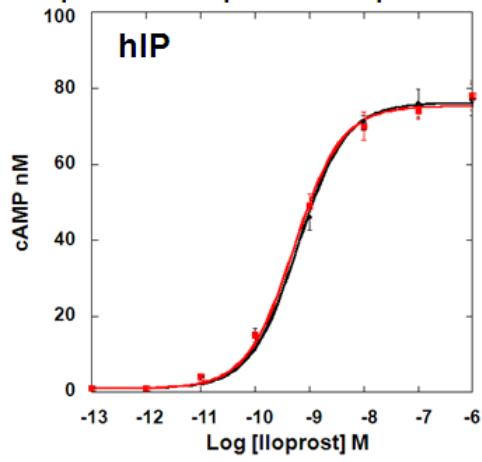
CHO-K1 細胞を宿主に、マウス IP 受容体 (mIP) を安定的に発現させた細胞株を選択した。IP アゴニストである Iloprost を 1 fM (Final)、1 pM (Final)、10 pM (Final)、100 pM (Final)、1 nM (Final)、10 nM (Final)、100 nM (Final)、1 μ M (Final) で添加すると同時に、被検化合物を 5 μ M (Final) で添加し、mIP 安定発現細胞を 5 μ l/well で分注し反応開始させた。40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した後、Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で蛍光を測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。

【プロトコール】

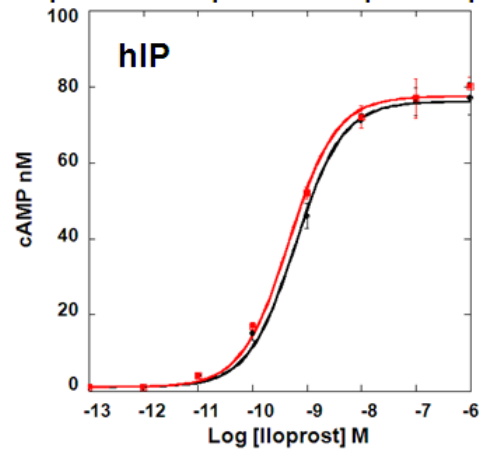
1. Iloprost + 被検化合物 5 μ l をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. mIP 安定発現細胞を、7000 cells/well となるように 5 μ l/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5 μ l/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5 μ l/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎にスタンダード cAMP の検量線より産生された cAMP 濃度を計算する。
7. それぞれの濃度の Iloprost で誘導される cAMP 濃度を 100%とした際の、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を T/C%で表記する。

【結果】

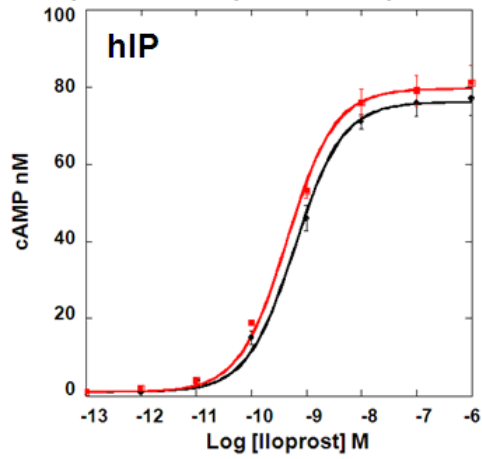
— Iloprost — Iloprost+ Compound 0.5 μ M



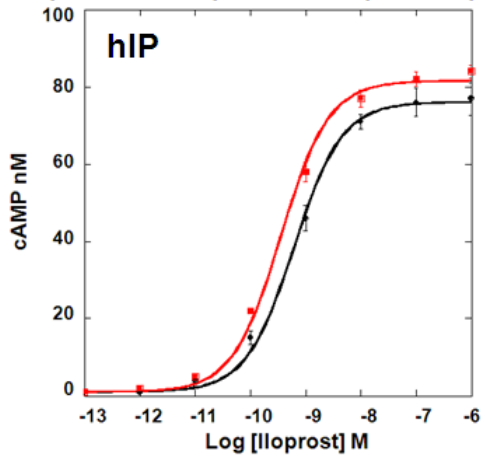
— Iloprost — Iloprost+ Compound 1 μ M



— Iloprost — Iloprost+ Compound 2 μ M



— Iloprost — Iloprost+ Compound 3 μ M



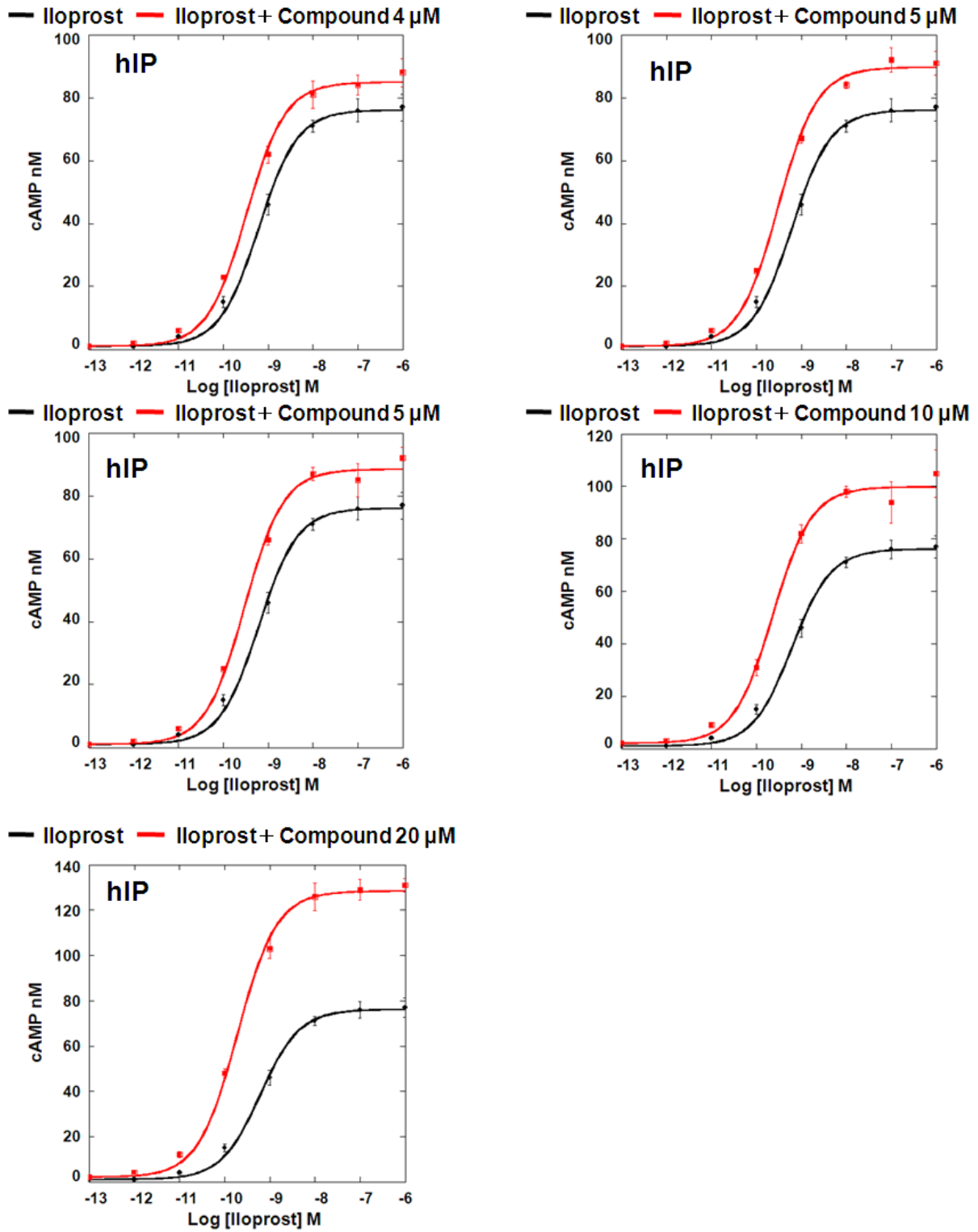
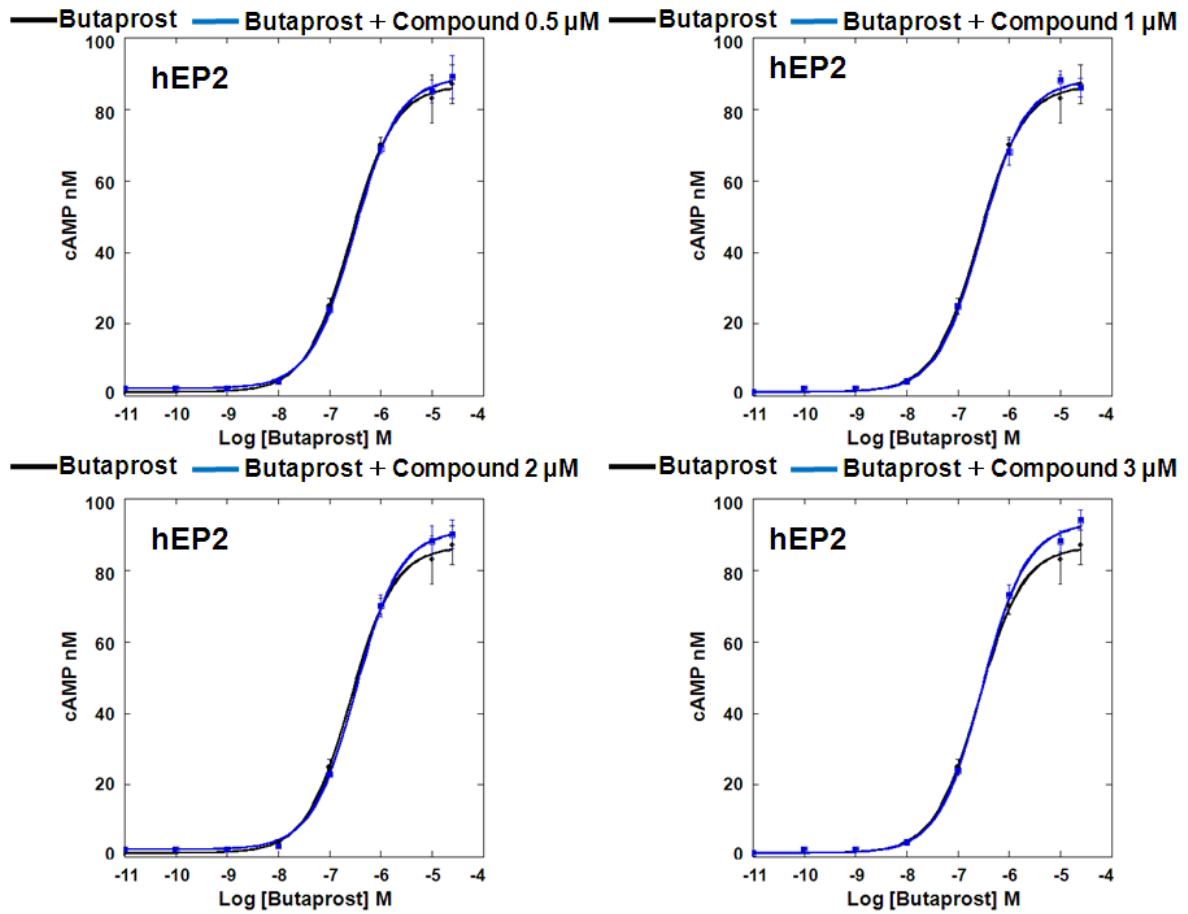


Figure 2-3-20 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell.



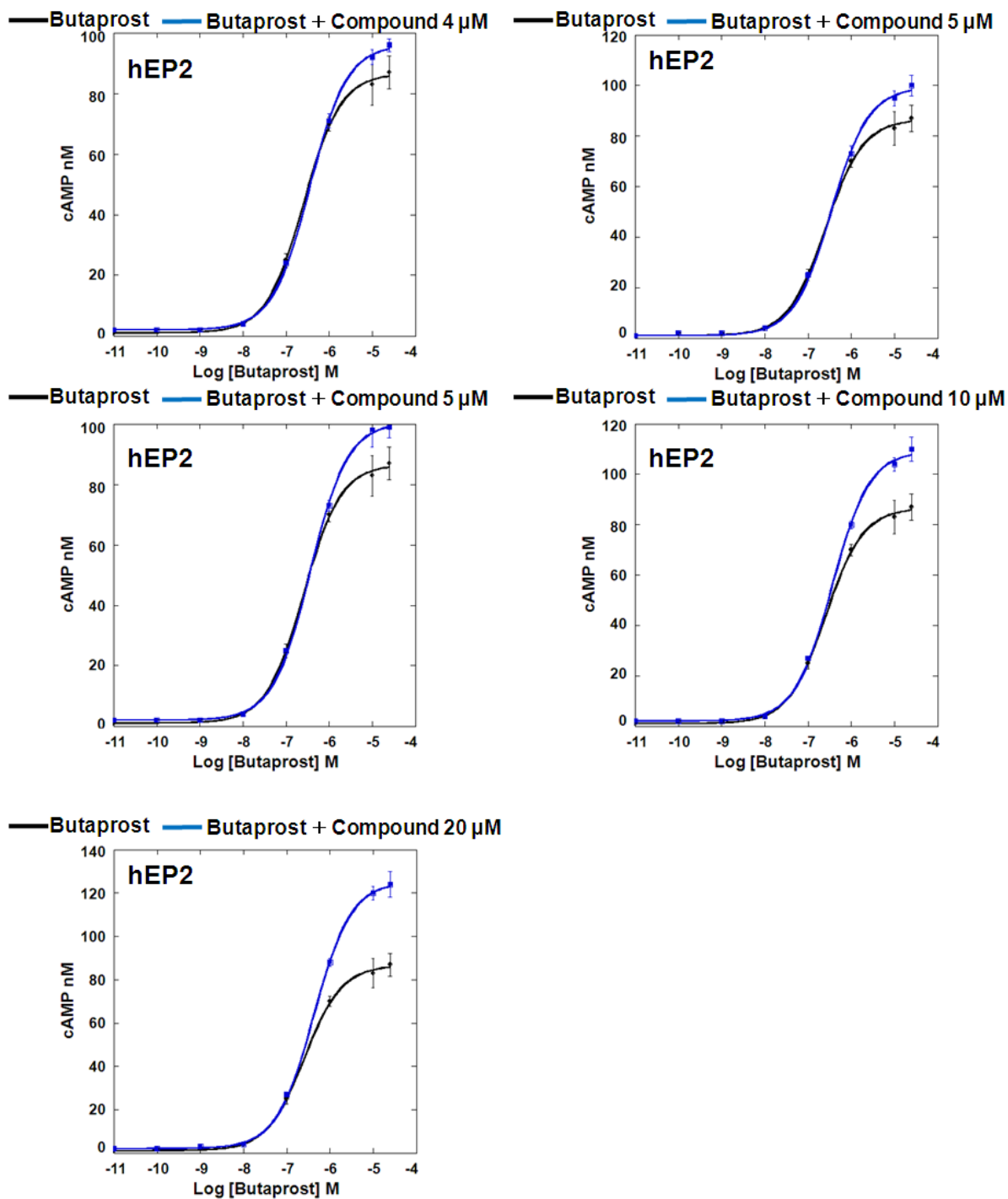
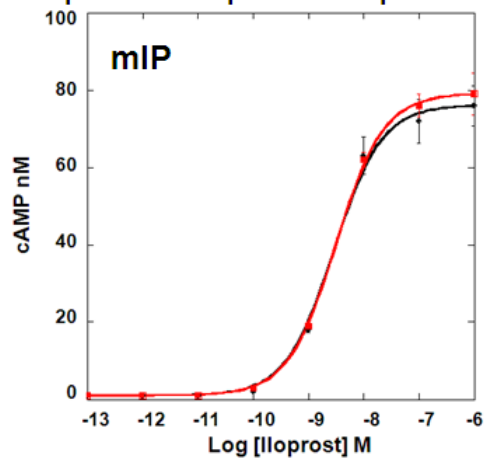
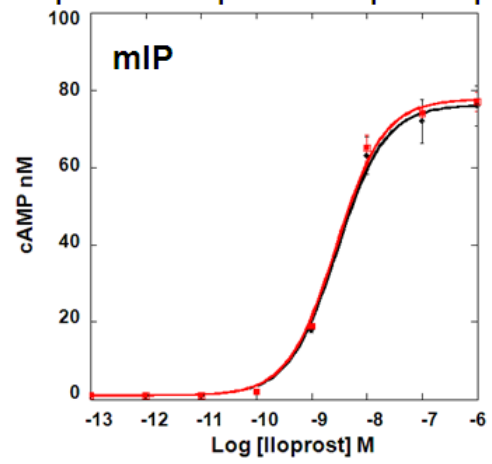


Figure 2-3-21 Effect of change in concentration of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell.

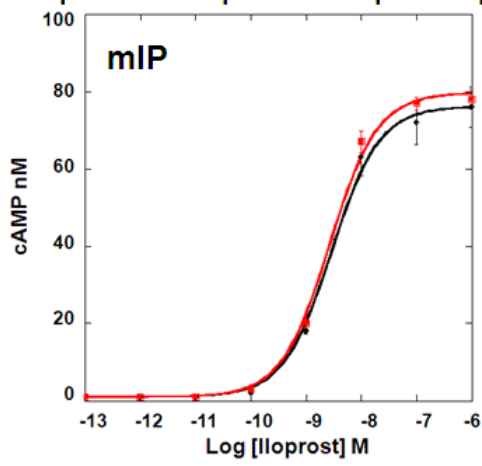
— Iloprost — Iloprost+ Compound 0.5 μ M



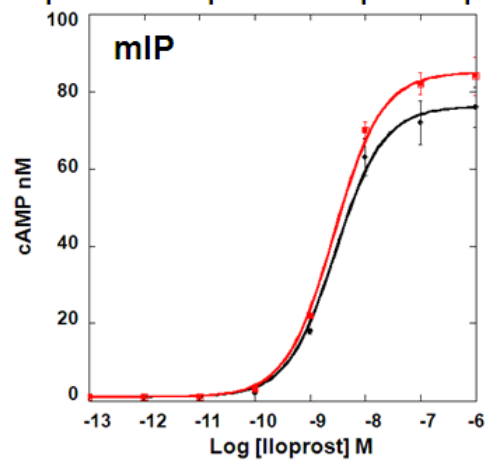
— Iloprost — Iloprost+ Compound 1 μ M



— Iloprost — Iloprost+ Compound 2 μ M



— Iloprost — Iloprost+ Compound 3 μ M



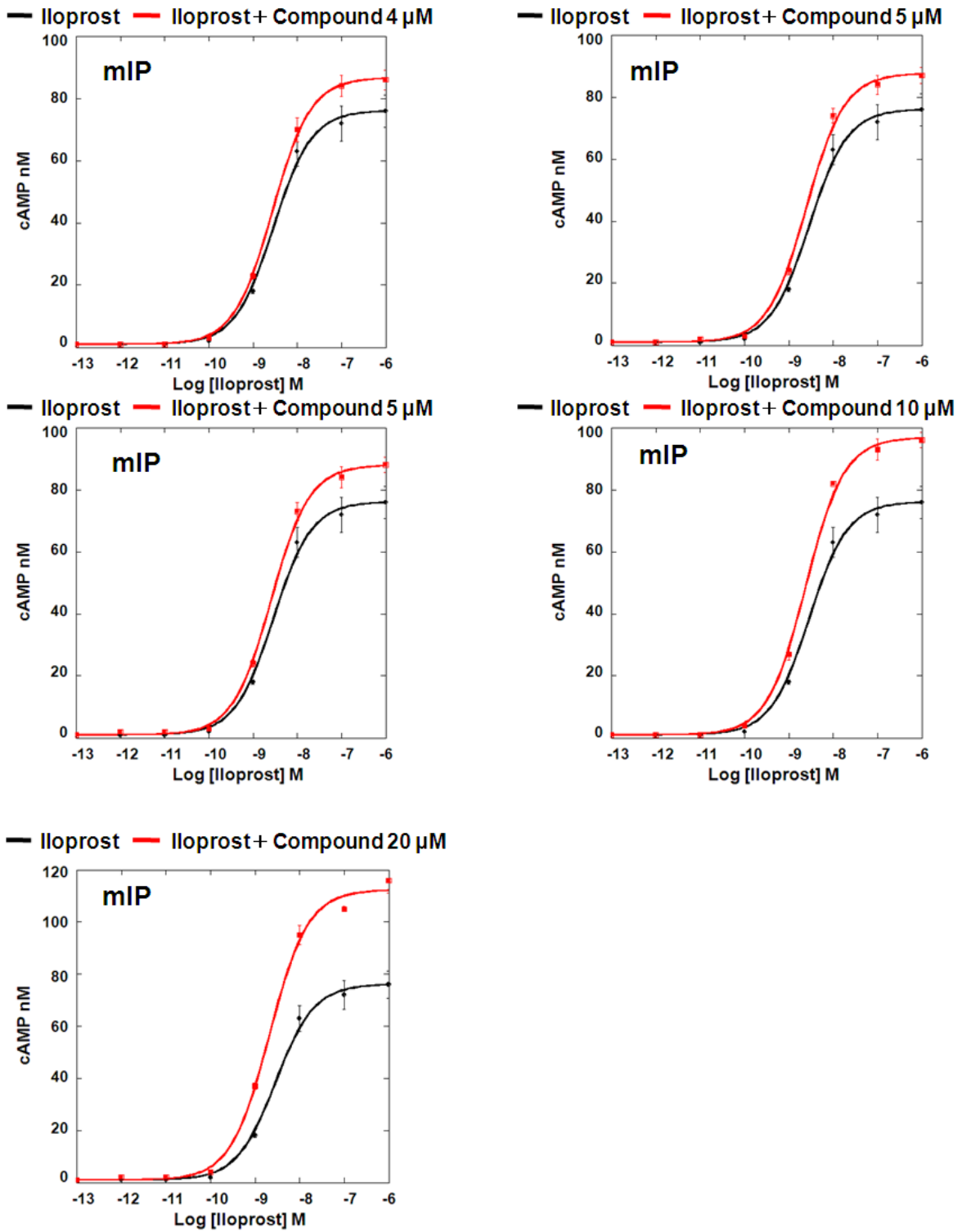


Figure 2-3-22 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell.

上記のアッセイから、hIP と mIP 強制発現細胞では、粉末提供の TS-000005 (ヒット化合物)は、濃度依存的に Iloprost の用量反応曲線を大きく上シフトさせる作用を有しているおり、hEP2強制発現細胞では、100 nM 以上の Butaprost 濃度域では、Butaprost の用量反応曲線を上シフトさせる作用を有していることがわかる。

【考察】

これまで得られた結果から、TS-000005 (ヒット化合物)は、DMSO 保存されていた場合 (一部結晶している) は、左シフトさせる作用が認められ、粉末保存されていた場合では、上シフトさせる作用が認められた。もし、TS-000005 が左シフトタイプのアロステリックモジュレーターであると仮定すると、DMSO 中で結晶化していたものは、TS-000005 とは異なる別の化合物が存在し、それが粉末提供の場合に Iloprost の用量反応曲線を上シフトさせた一因ではないかと考えられる。一方、TS-000005 が上シフトタイプのアロステリックモジュレーターであると仮定すると、DMSO 中で結晶化していたものが TS-000005 で、DMSO に溶解していた別の化合物が Iloprost の用量反応曲線を左シフトさせたと考えられる。いずれにせよ、この相反する結果の背景として、不純物が存在する可能性があり、それがアッセイに影響を及ぼしていることが示唆される。

第4節 周辺化合物（既存ライブラリー）の評価

【実験目的】

Figure 2-3-19 からわかるように、hIP に対して薬理活性を有しているものとして見出された化合物には、骨格として不斉炭素を中心に共通な構造を有していることがわかった。そこで、その共通な構造を有しているという条件で、創薬オープンイノベーションセンターが所有しているライブラリーの中から周辺化合物を検索した。それらを対象に、ヒット化合物よりも優れた化合物を見出すことを目的として、hIP、hEP2 と mIP それぞれの強制発現細胞系で cAMP Cell-based assay を実施した。

【実験方法】

① ヒット化合物（粉末提供）を対象にしたアッセイの時と同一である。

【周辺化合物をアッセイした結果】

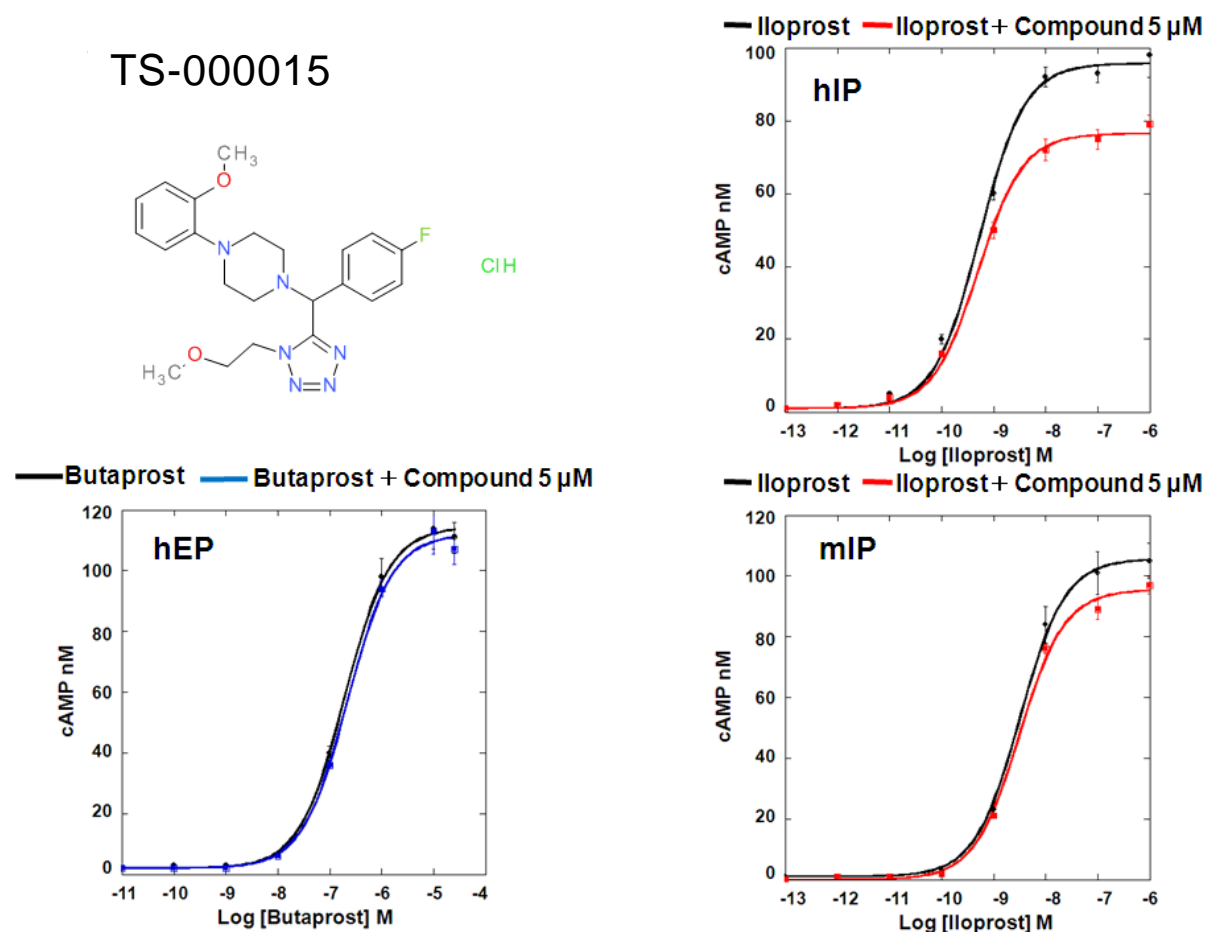


Figure 2-4-1 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

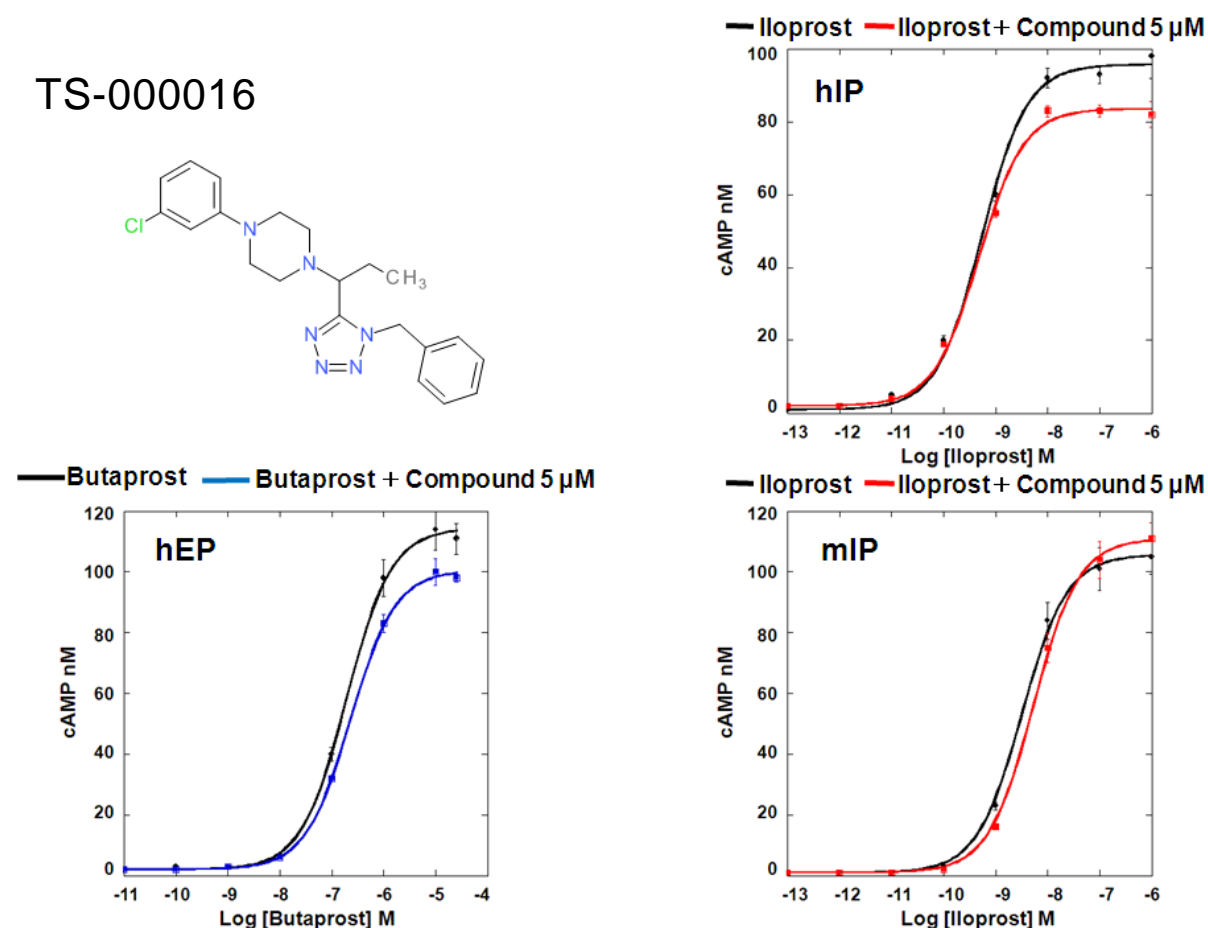


Figure 2-4-2 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

TS-000017

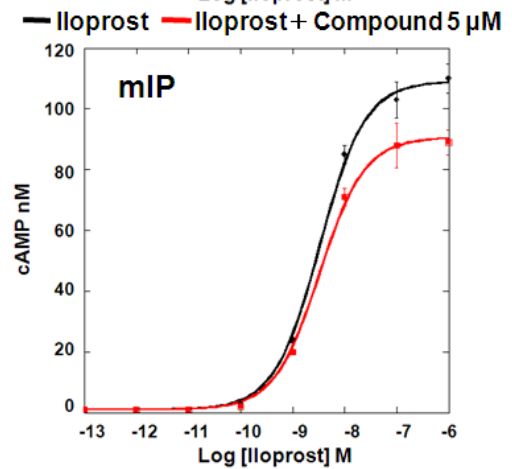
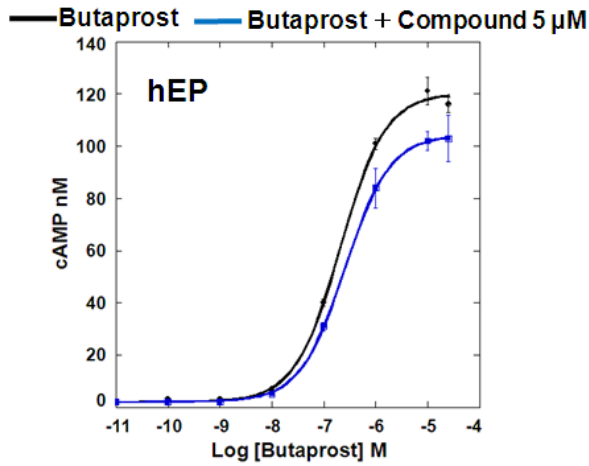
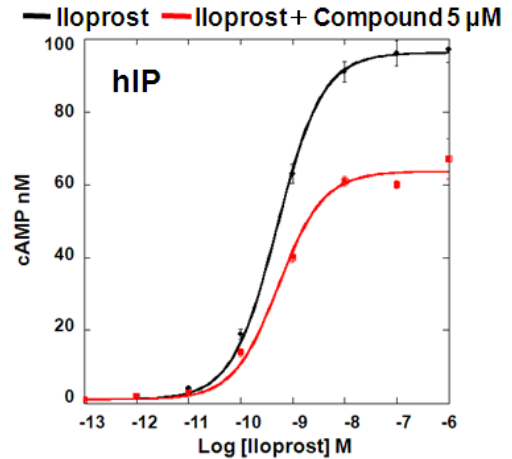
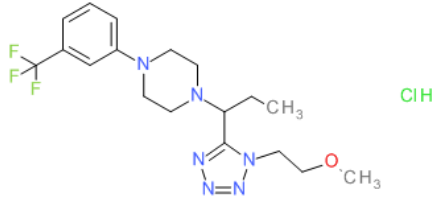


Figure 2-4-3 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

TS-000018

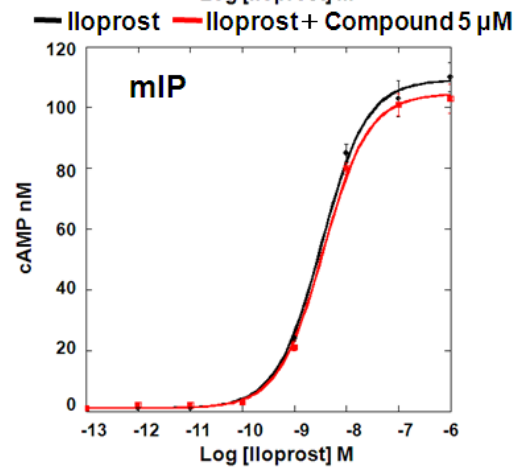
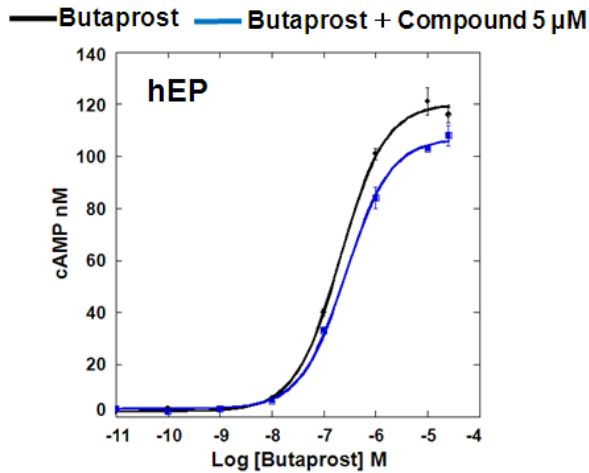
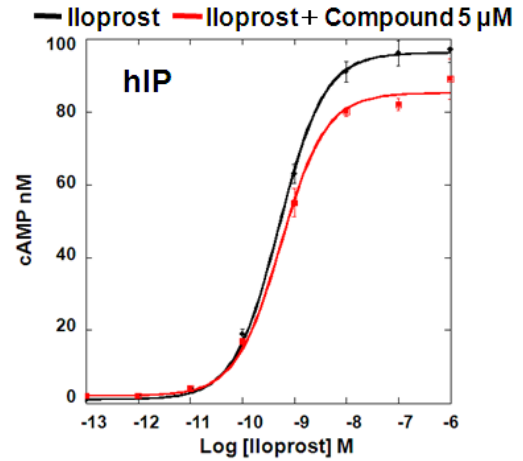
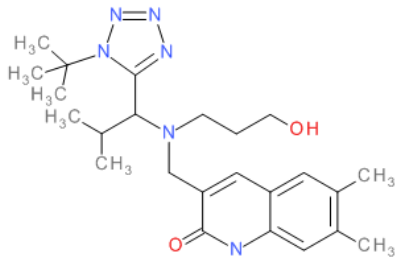
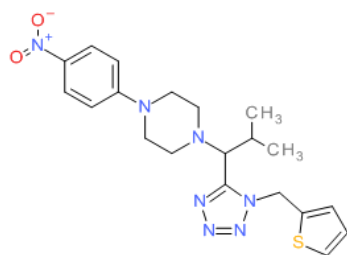
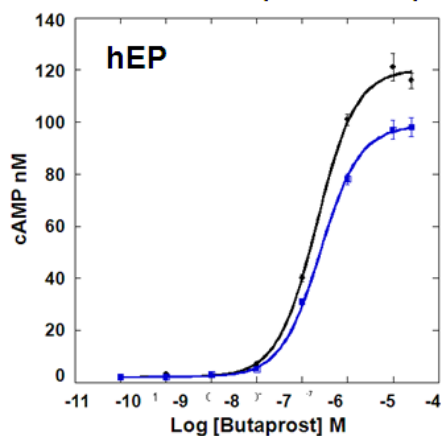


Figure 2-4-4 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

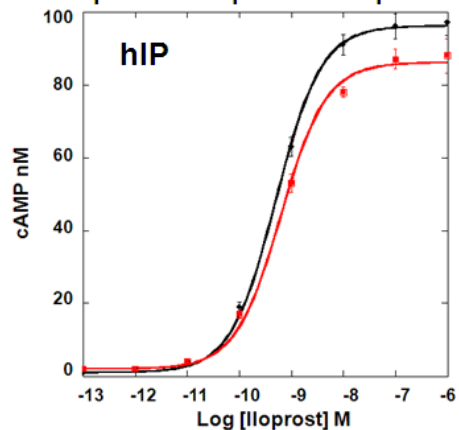
TS-000019



— Butaprost — Butaprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M

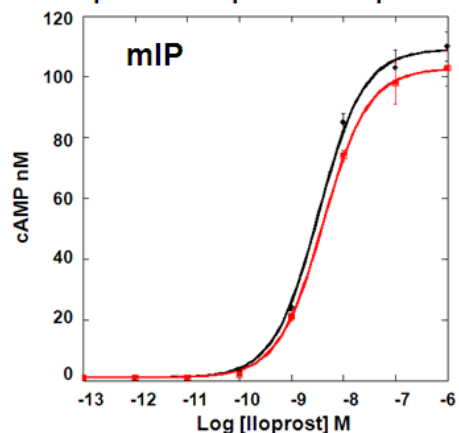


Figure 2-4-5 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

TS-000020

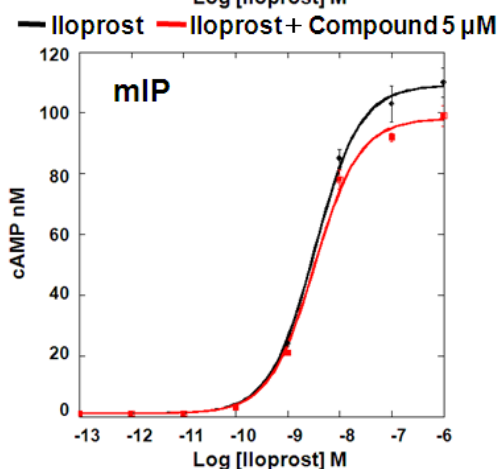
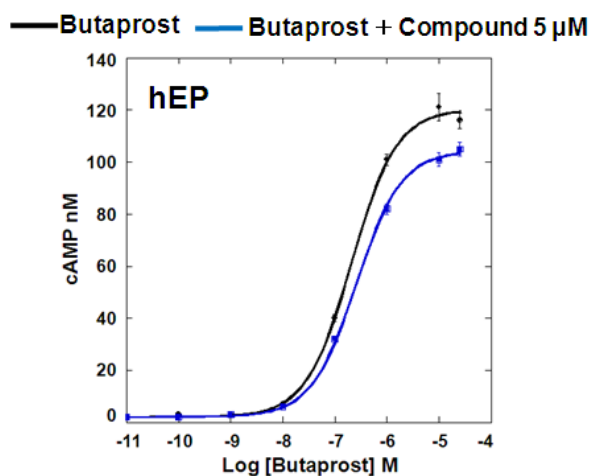
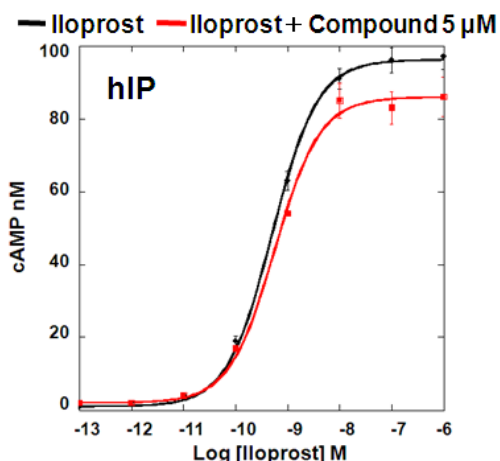
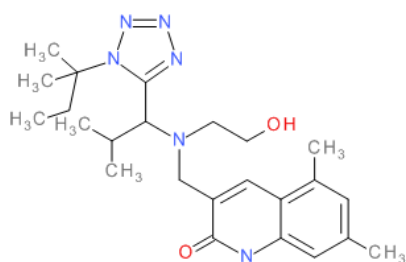
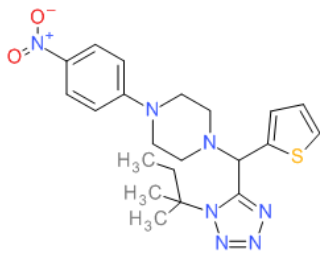
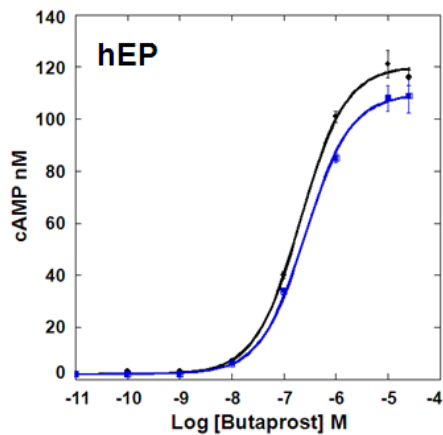


Figure 2-4-6 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

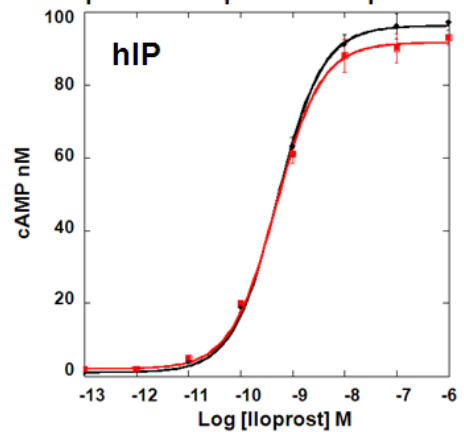
TS-000021



— Butaprost — Butaprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M

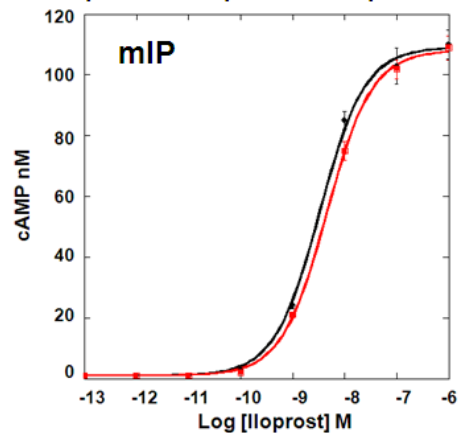
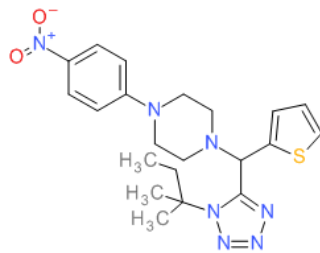
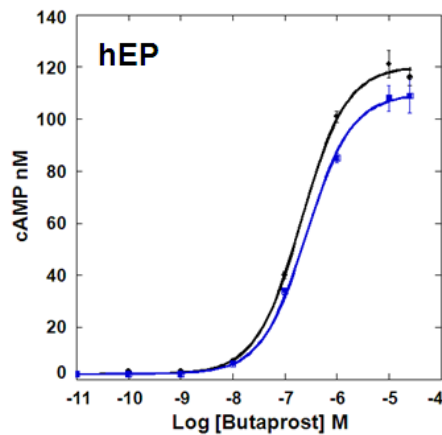


Figure 2-4-7 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

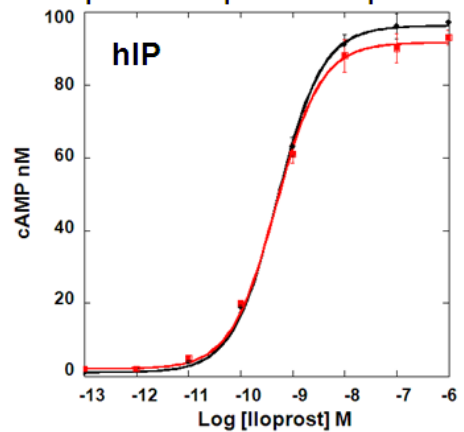
TS-000022



— Butaprost — Butaprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M

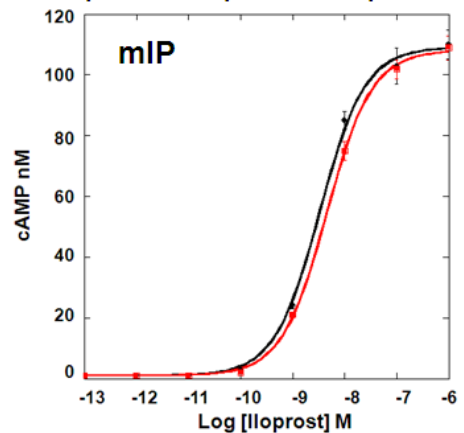
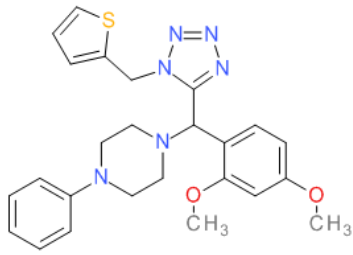
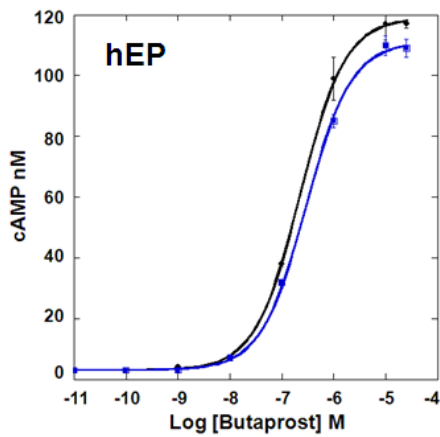


Figure 2-4-8 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

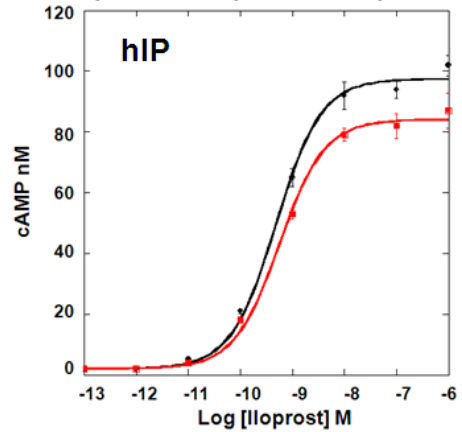
TS-000023



— Butaprost — Butaprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M

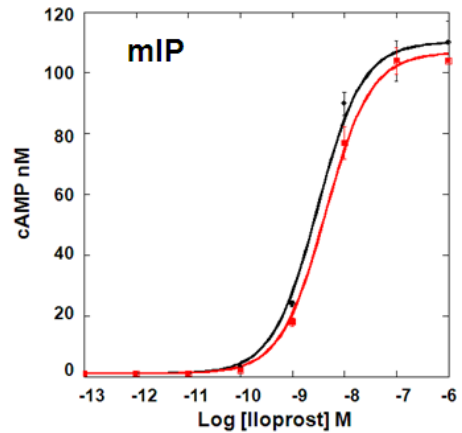
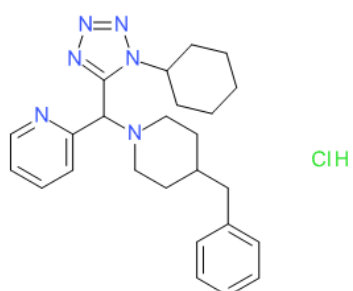
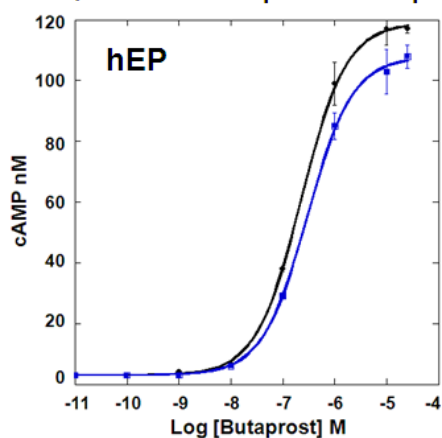


Figure 2-4-9 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

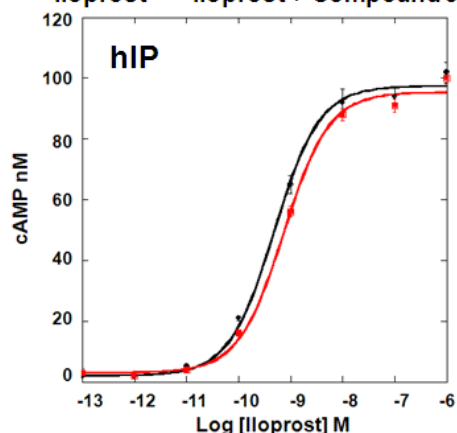
TS-000024



— Butaprost — Butaprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M

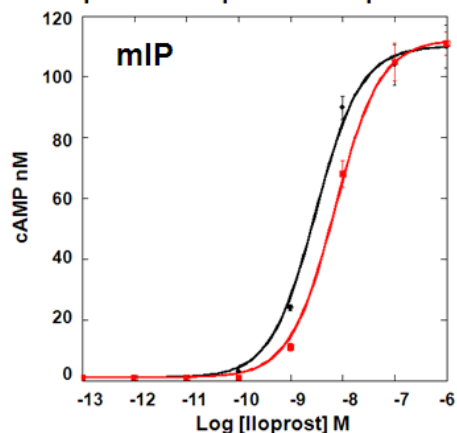


Figure 2-4-10 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

TS-000025

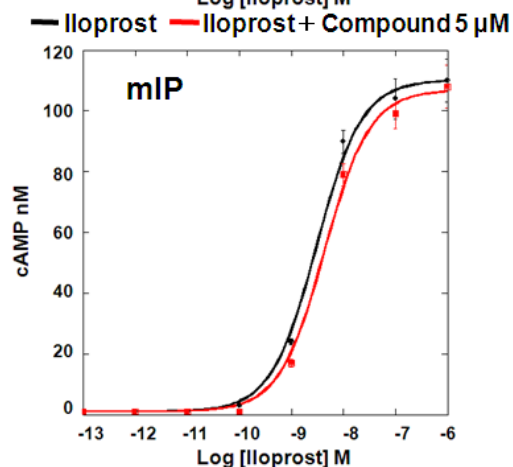
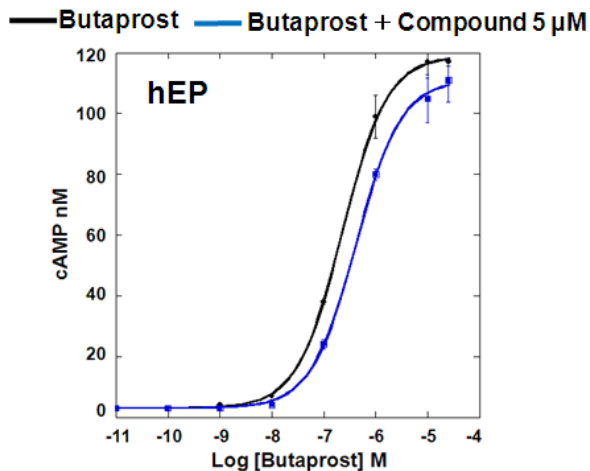
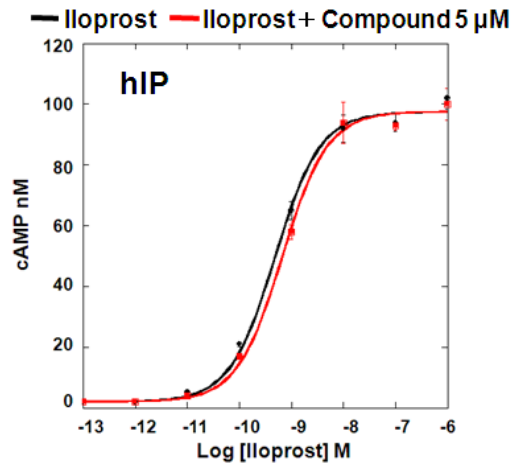
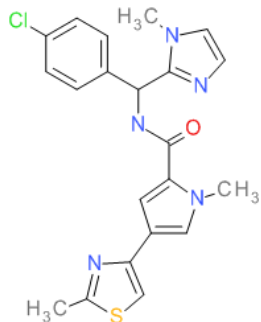
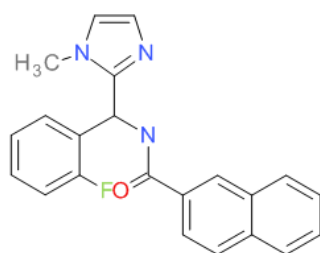
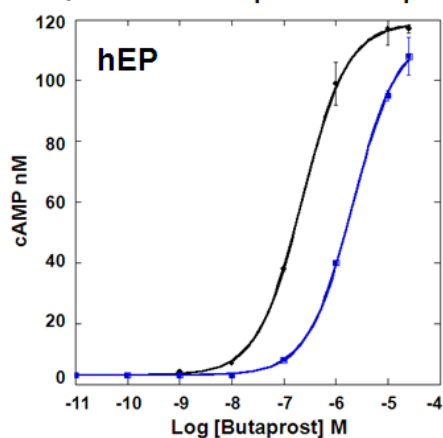


Figure 2-4-11 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

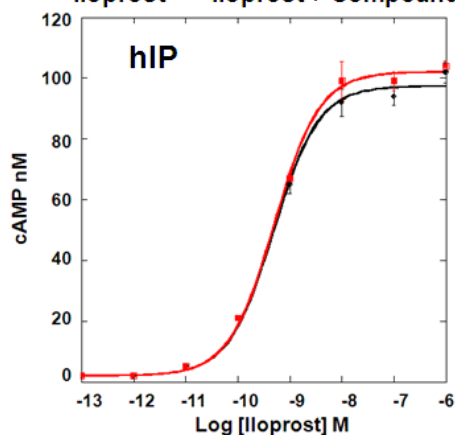
TS-000026



— Butaprost — Butaprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M

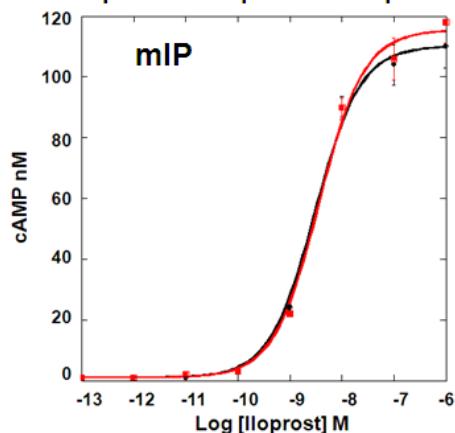
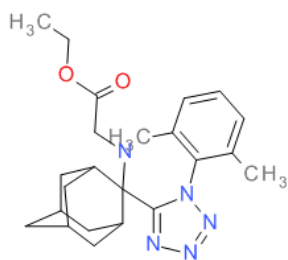


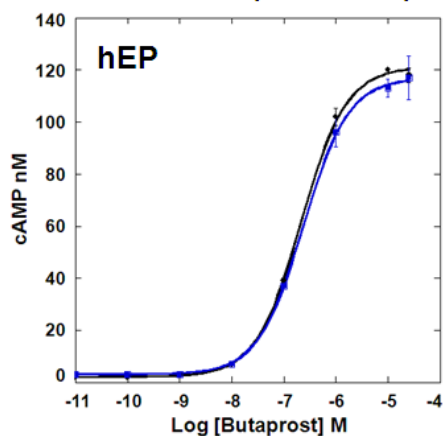
Figure 2-4-12 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

hEP2 強制発現細胞系で Butaprost の用量反応曲線を大きく右シフトさせた。

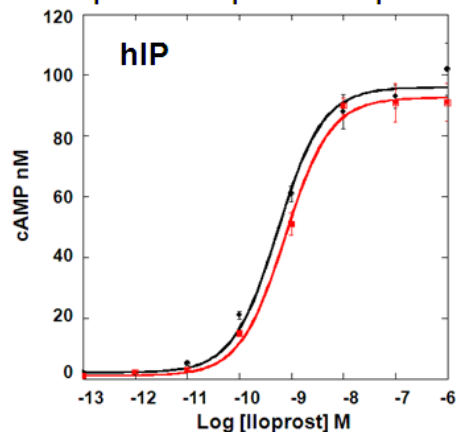
TS-000027



— Butaprost — Butaprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M

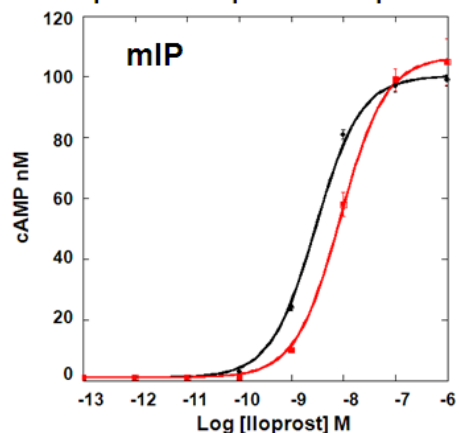
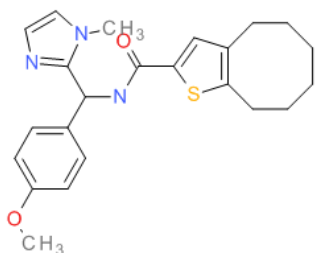


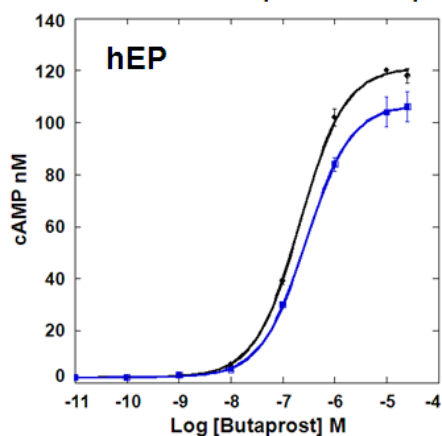
Figure 2-4-13 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

hIP 強制発現細胞系と mIP 強制発現細胞系で Iloprost の用量反応曲線を右シフトさせた。mIP 強制発現細胞系の方がより大きく右シフトしている。

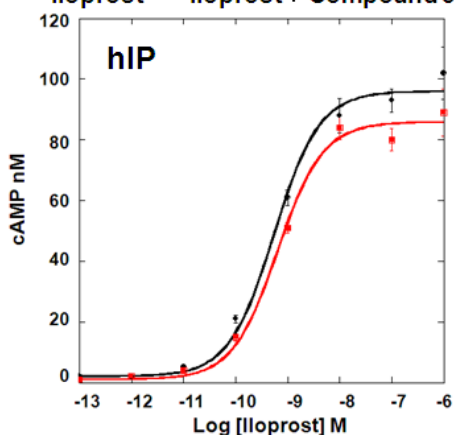
TS-000028



— Butaprost — Butaprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M

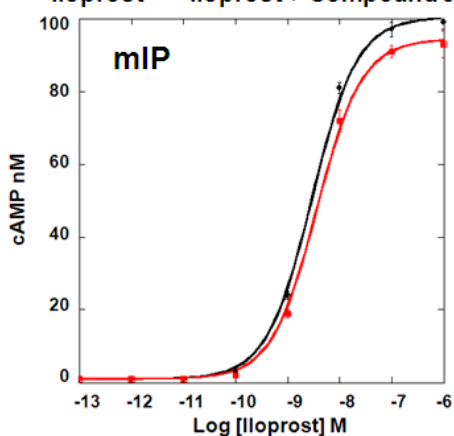
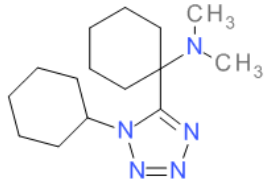
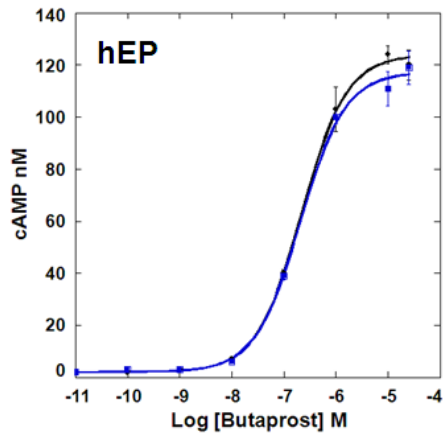


Figure 2-4-14 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

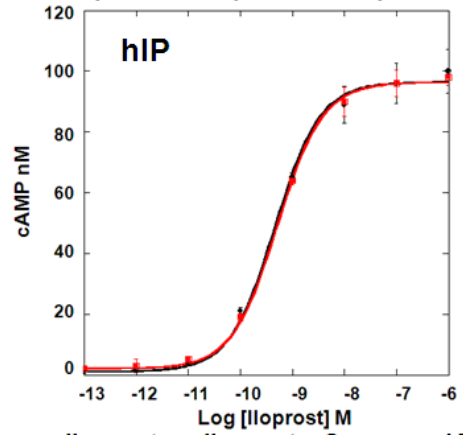
TS-000029



— Butaprost — Butaprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M

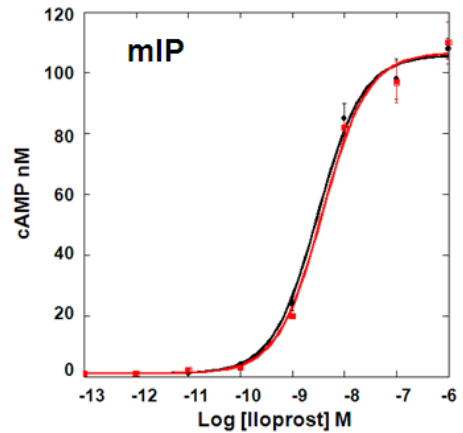
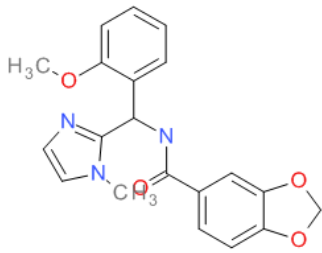
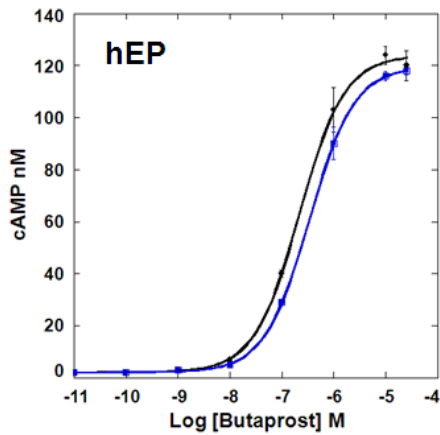


Figure 2-4-15 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

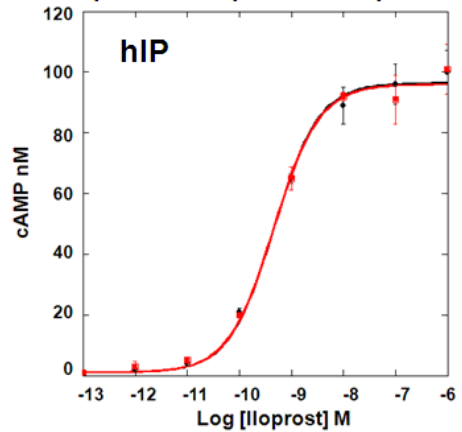
TS-000030



— Butaprost — Butaprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M

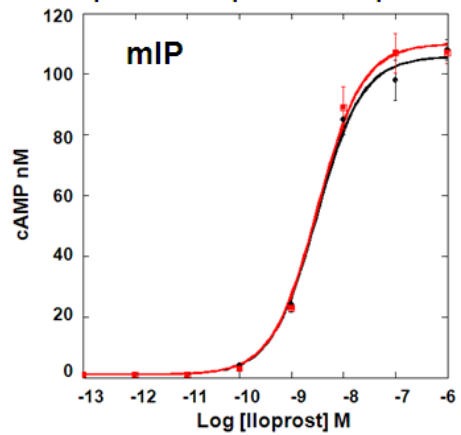
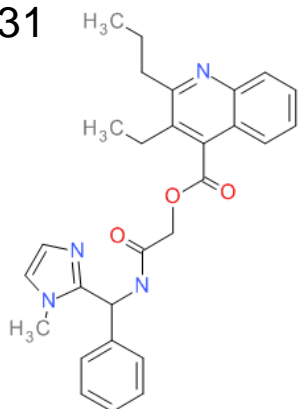
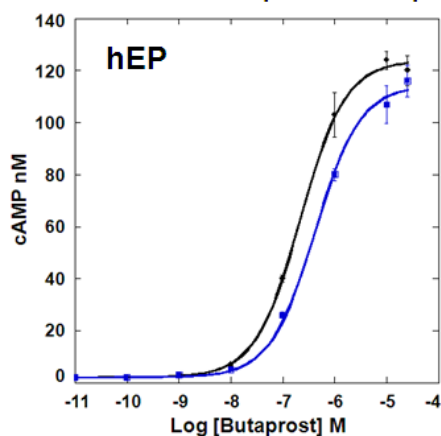


Figure 2-4-16 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

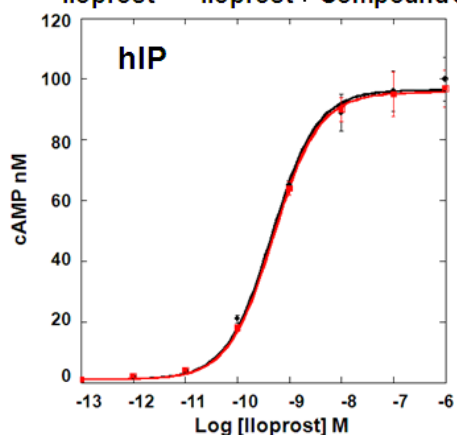
TS-000031



— Butaprost — Butaprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M

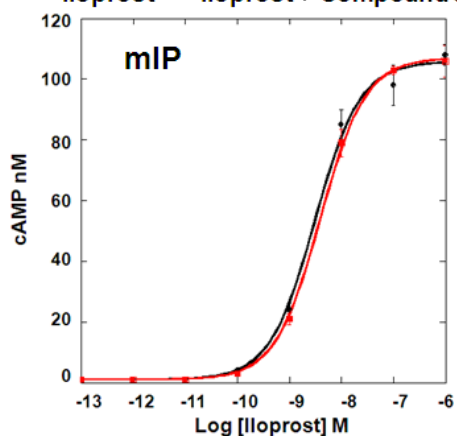
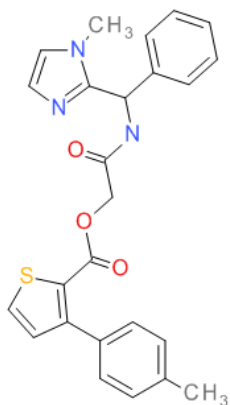


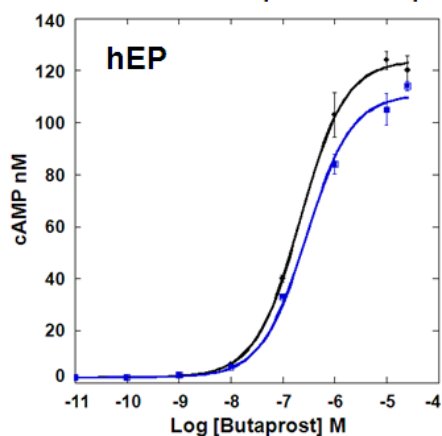
Figure 2-4-17 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

hEP2 強制発現細胞系で Butaprost の用量反応曲線を右シフトさせた。

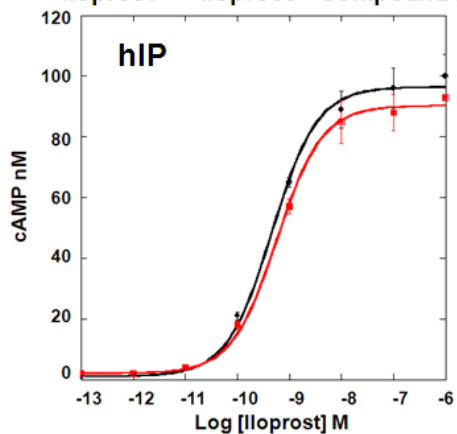
TS-000032



— Butaprost — Butaprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M

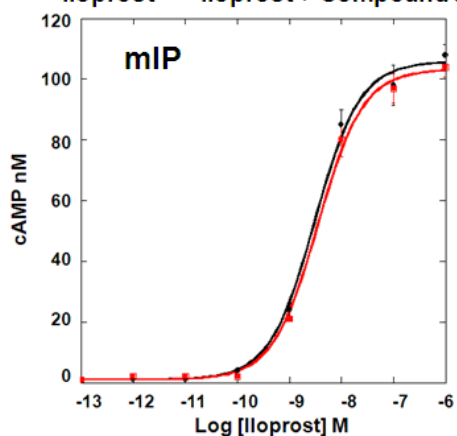
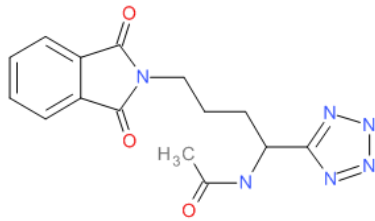
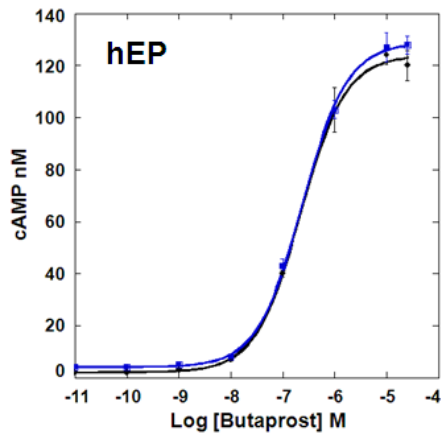


Figure 2-4-18 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

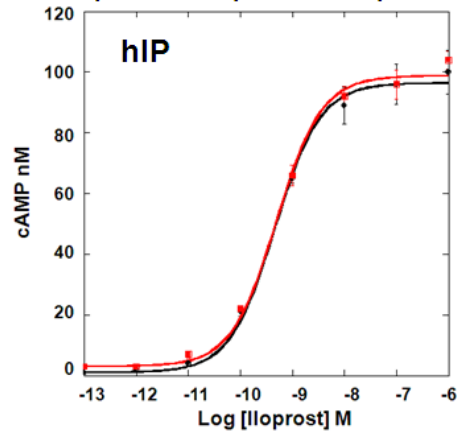
TS-000033



— Butaprost — Butaprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M

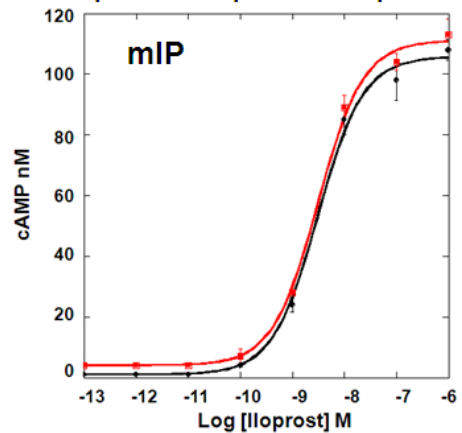
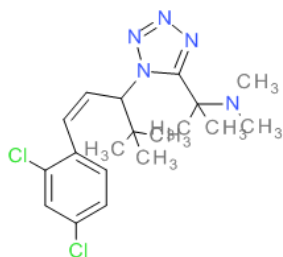
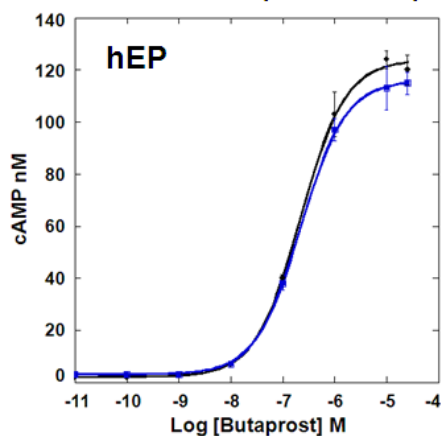


Figure 2-4-19 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

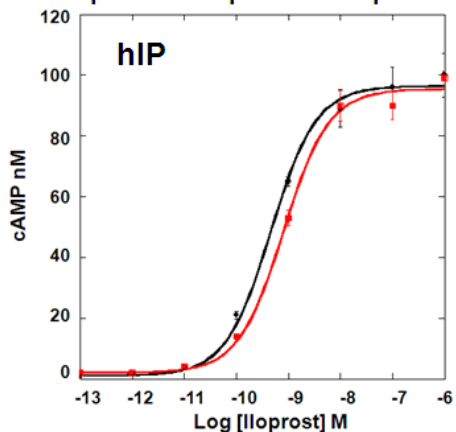
TS-000034



— Butaprost — Butaprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M

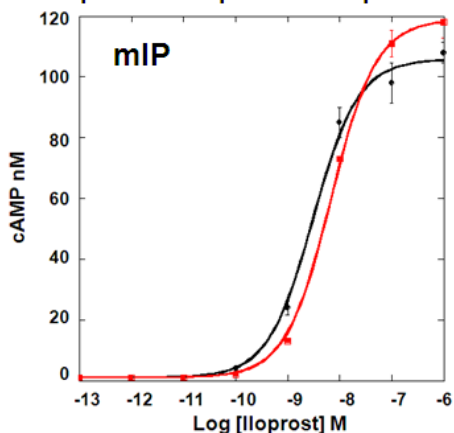


Figure 2-4-20 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

hIP 強制発現細胞系と mIP 強制発現細胞系で Iloprost の用量反応曲線を小さく右シフトさせた。

TS-000035

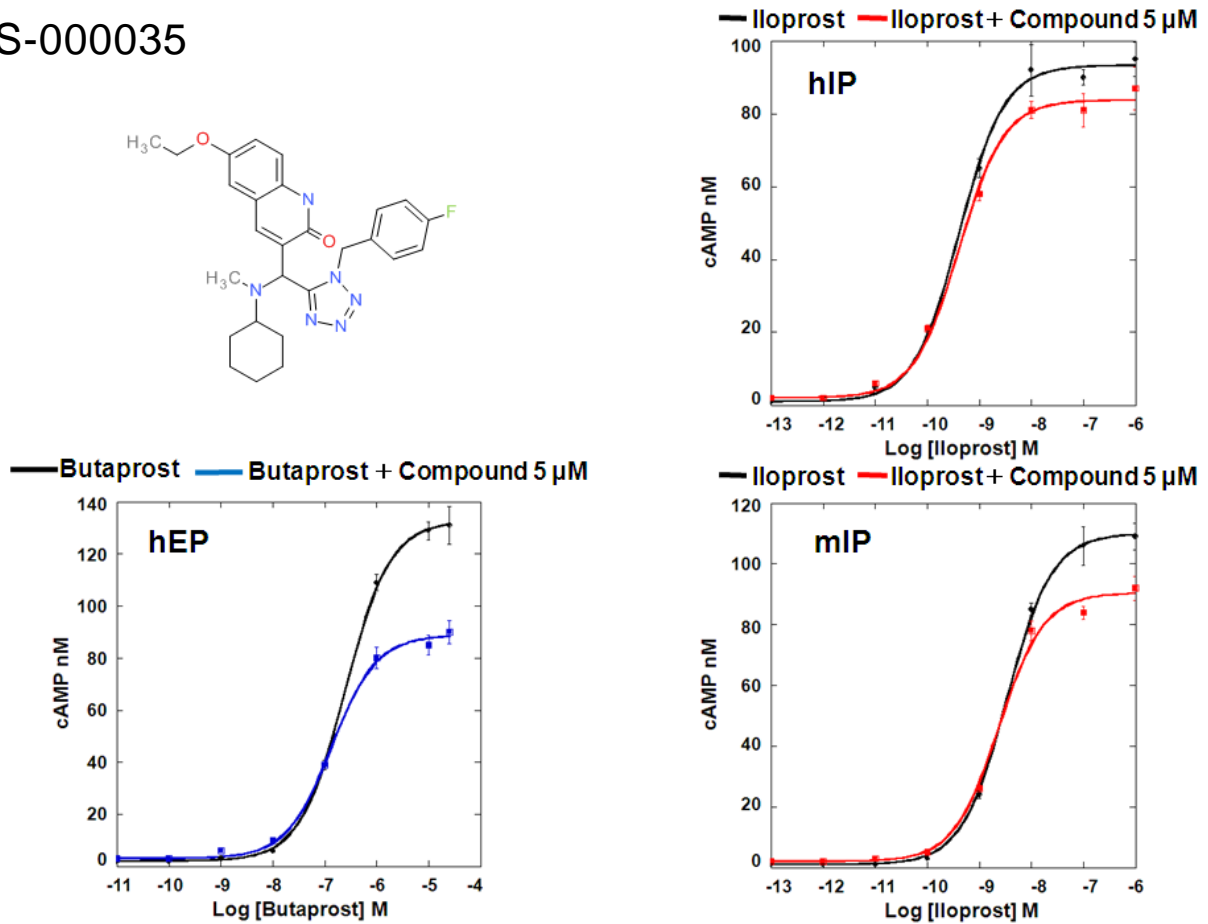


Figure 2-4-21 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

TS-000003

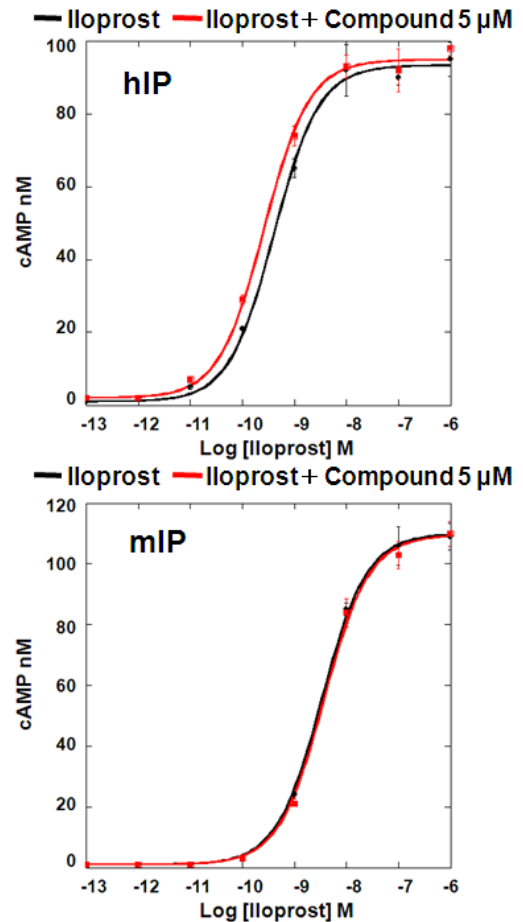
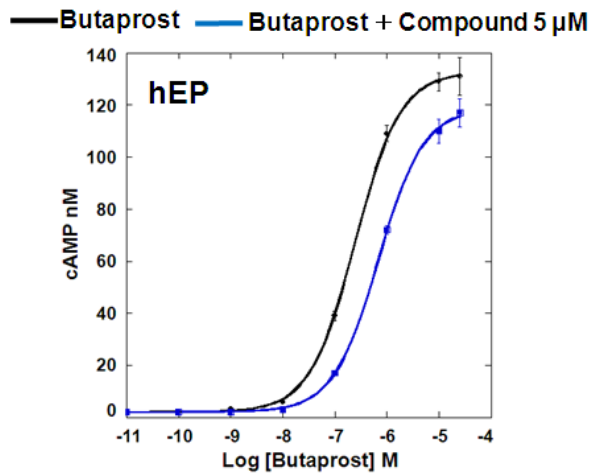
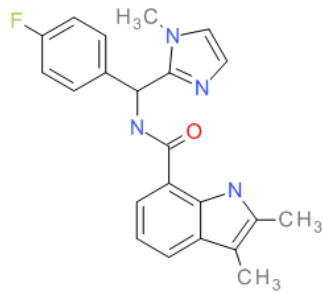
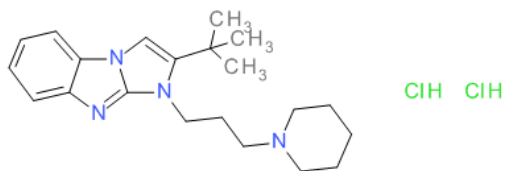


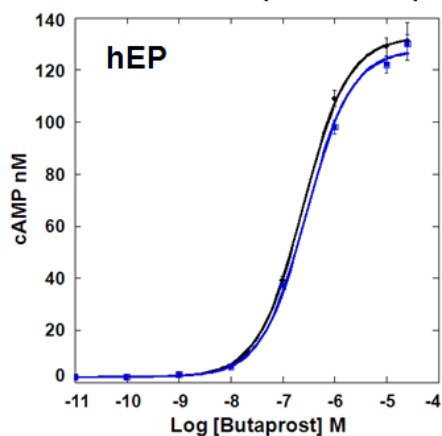
Figure 2-4-22 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

hIP 強制発現細胞系で Iloprost の用量反応曲線を小さく左シフトさせ、hEP2 強制発現細胞系で Butaprost の用量反応曲線を大きく右シフトさせた。

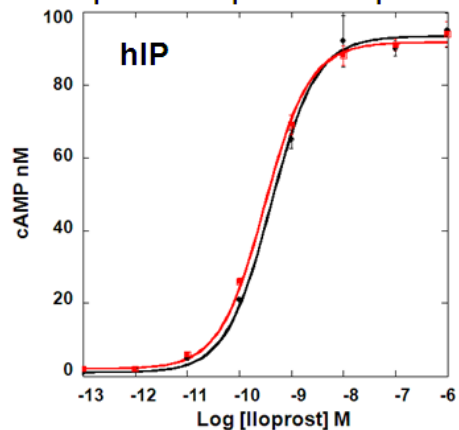
TS-000002



— Butaprost — Butaprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 5 μ M

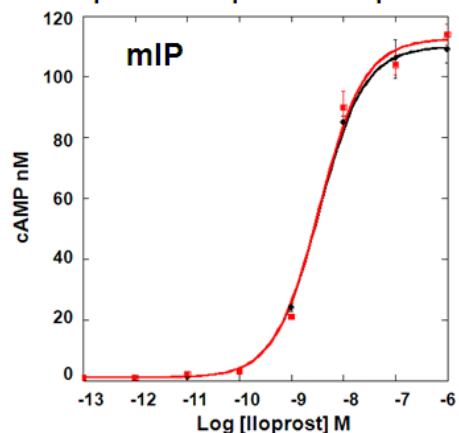


Figure 2-4-23 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

TS-000005

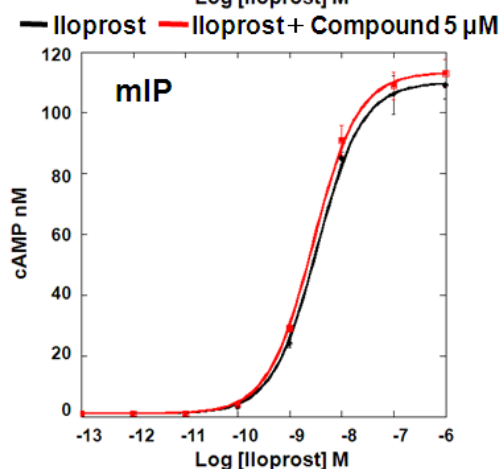
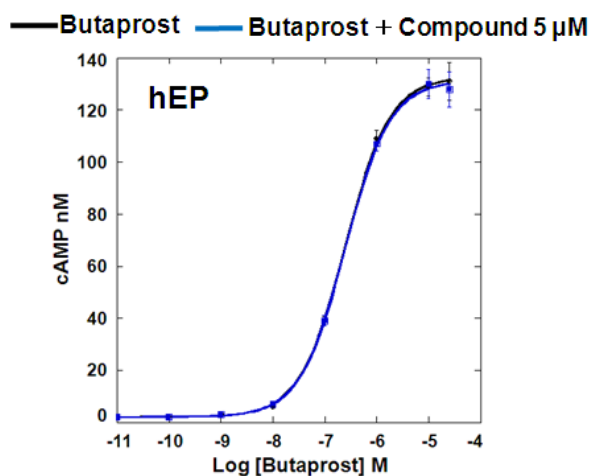
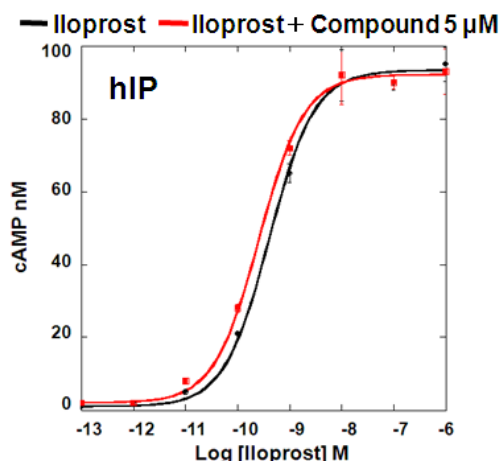
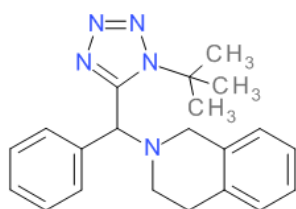


Figure 2-4-24 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

【考察】

結果をまとめると、周辺化合物を対象にしたアッセイでは、**Iloprost** の用量反応曲線を大きく左シフトさせる化合物は見つからなかった。**TS-000026** や **TS-000031** のように **hEP2** 強制発現細胞系において、**Butaprost** の用量反応曲線を大きく右シフトさせる化合物が存在し、それらと **TS-000005** に共通する化学構造として、不斉炭素を介したイミダゾールと芳香環が挙げられる。今後その作用メカニズムを詳細に解析する必要があるが、これらの化合物が **hEP2** の **Negative allosteric modulator** であるかもしれない。

また、**TS-000027** のように **mIP** 強制発現細胞系において、**Iloprost** の用量反応曲線を右シフトさせた化合物を見出すことができた。

今回のアッセイで対象にした化合物は、一度 **1st** スクリーニングの際にアッセイした化合物であるため、**TS-000005** より良い化合物がなかったということは、これまで実施した評価系が十分機能しているといえる。

第5節 周辺化合物（新規購入90種）の評価

【実験目的】

structure-activity relationship(SAR)を得ることを目的として、ヒット化合物の構造類似体を対象にアッセイを実施した。創薬オープンイノベーションセンターはヒット化合物の構造類似体を保有していないため、構造類似体90種を新たに購入した。

【実験方法】

ヒット化合物（粉末提供）を対象にしたアッセイの時と同一である。

【類似化合物をアッセイした結果】

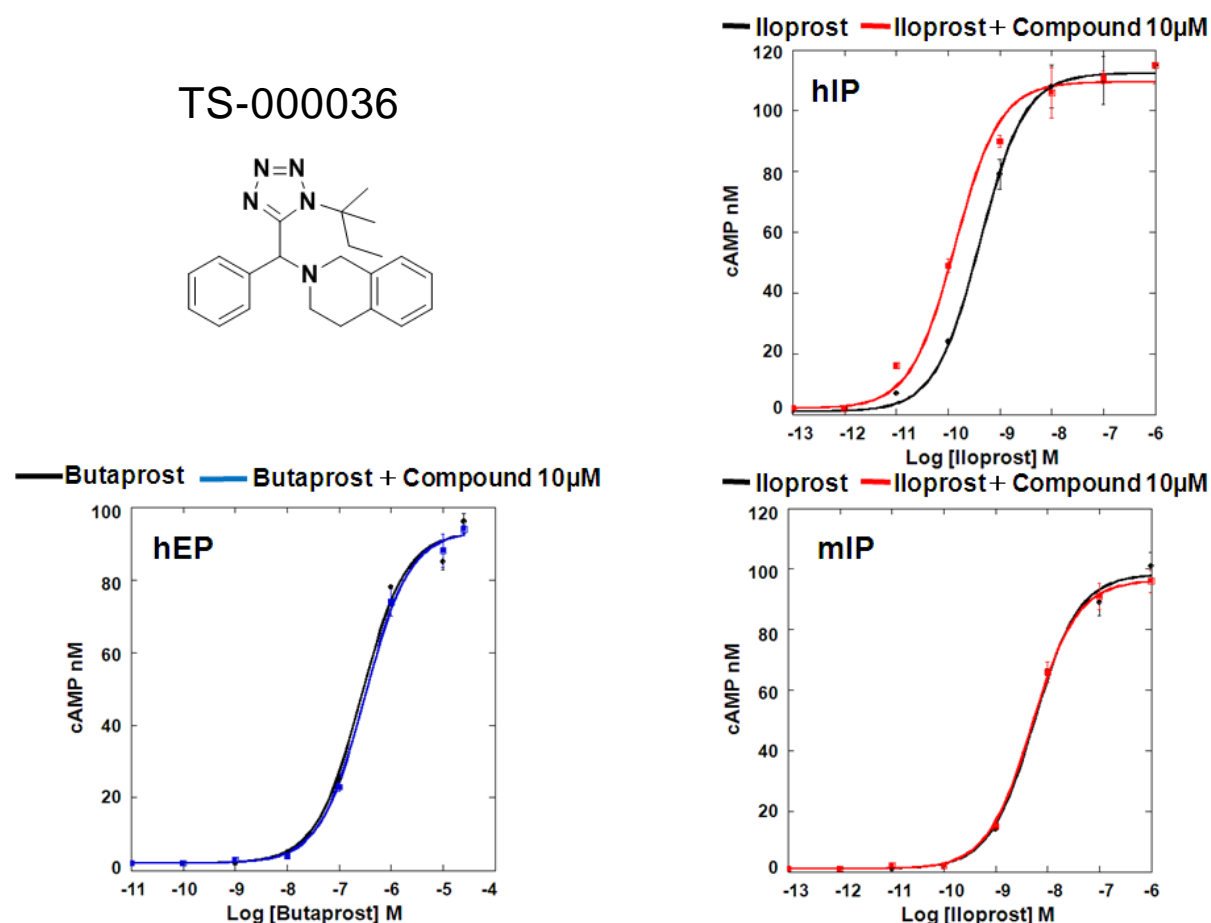
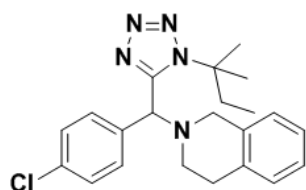


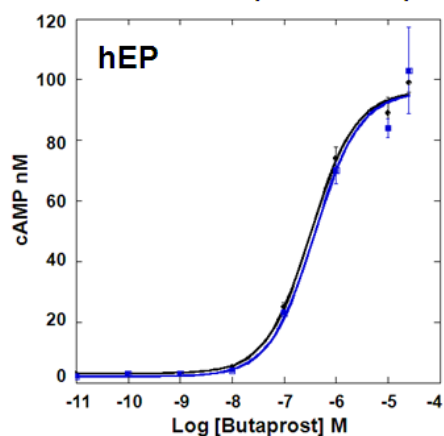
Figure 2-5-25 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

hIP 強制発現細胞系で Iloprost の用量反応曲線を左シフトさせた。しかし、mIP 強制発現細胞系では、左シフト作用が認められない。

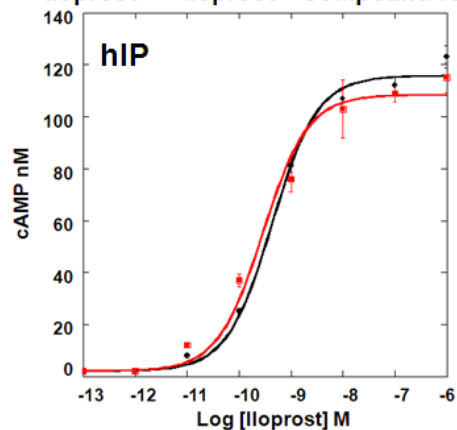
TS-000037



— Butaprost — Butaprost + Compound 10 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 10 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 10 μ M

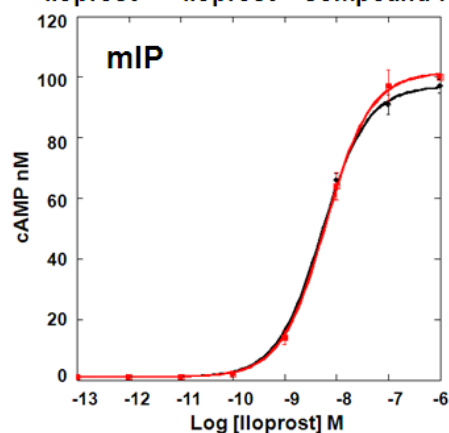


Figure 2-5-26 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

hIP 強制発現細胞系で Iloprost の用量反応曲線を左シフトさせたが、上記の位置に Cl があると活性が低下すると考えられる。

TS-000038

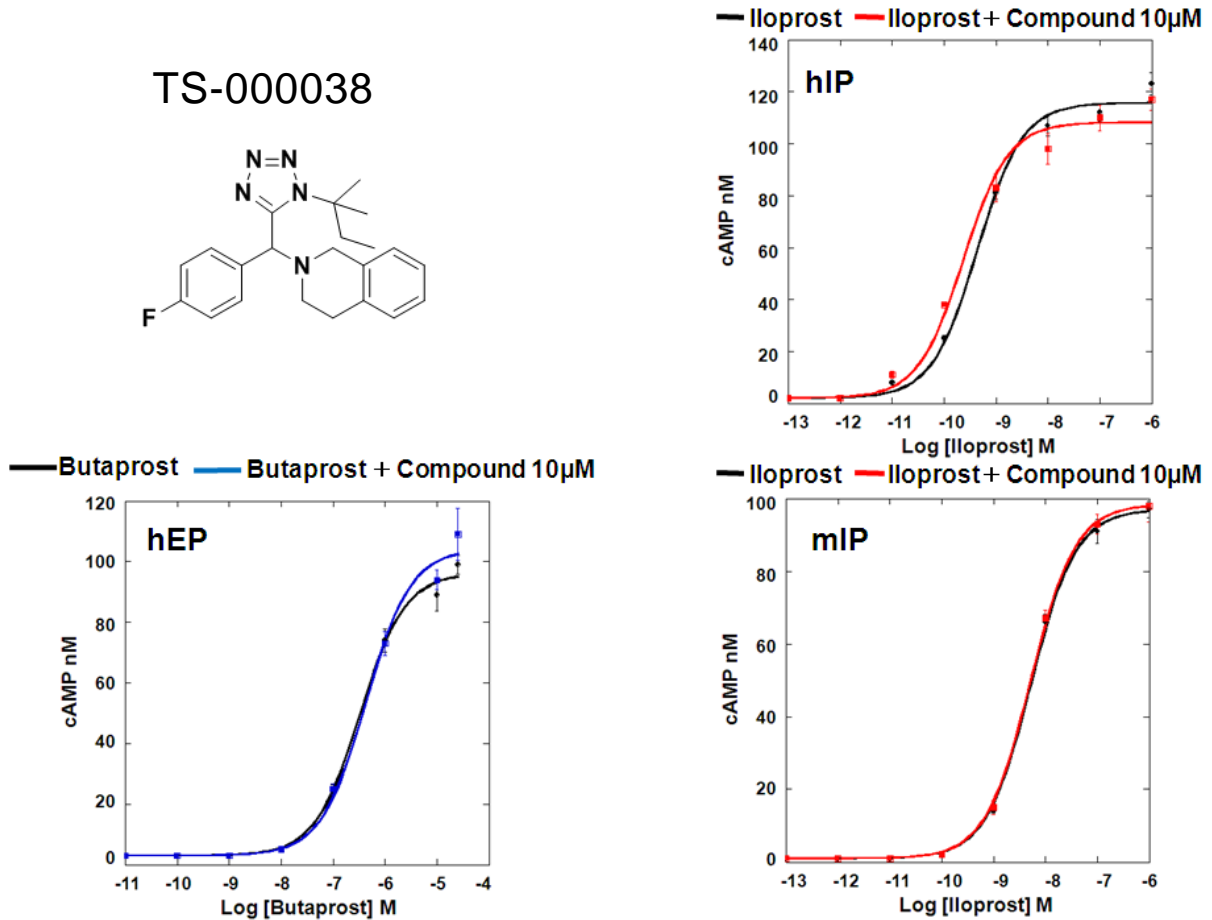
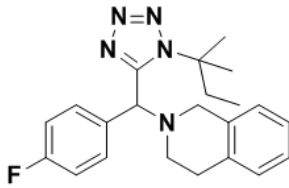


Figure 2-5-27 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

hIP 強制発現細胞系で Iloprost の用量反応曲線を左シフトさせたが、上記の位置に F があると、活性が低下すると考えられる。

TS-000039

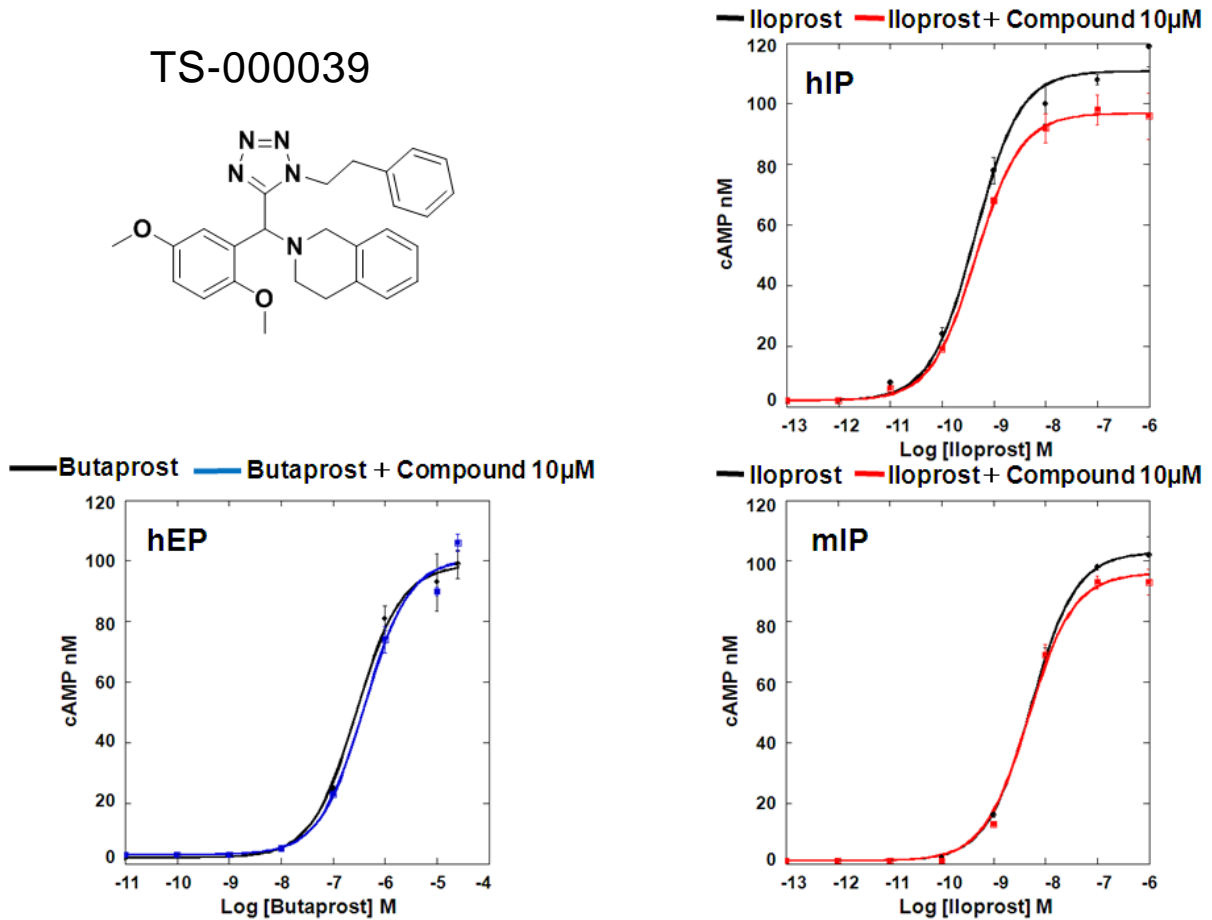
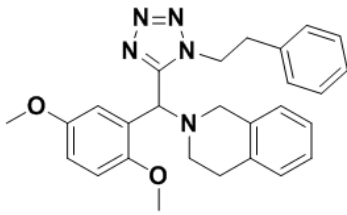
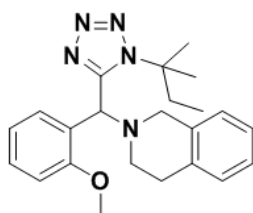
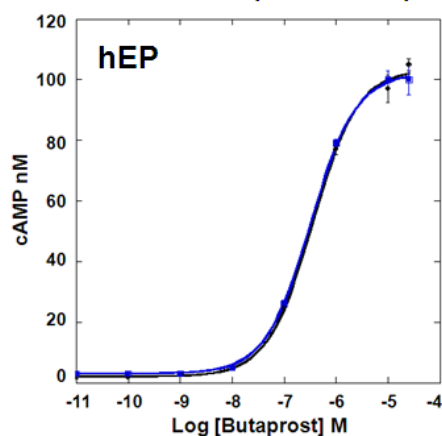


Figure 2-5-28 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

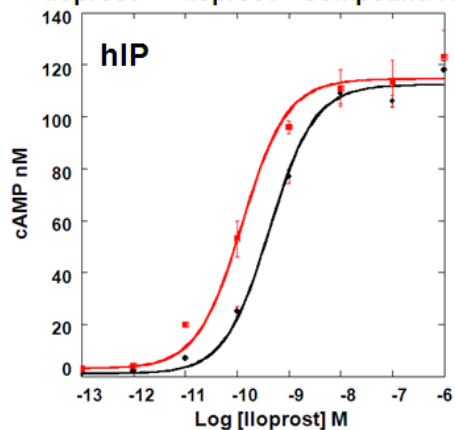
TS-000040



— Butaprost — Butaprost + Compound 10 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 10 μ M



— Iloprost — Iloprost + Compound 10 μ M

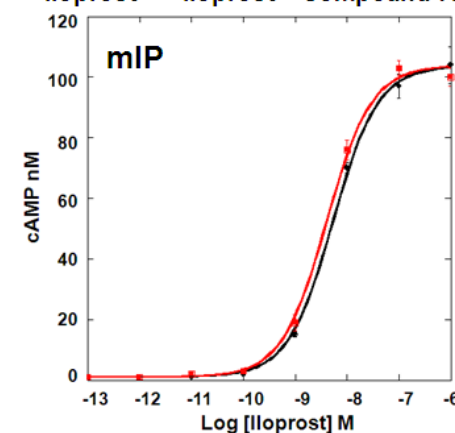


Figure 2-5-29 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell(lower right).

hIP 強制発現細胞系で Iloprost の用量反応曲線を左シフトさせた。上記の位置に OCH_3 があると、活性が向上すると考えられる。

TS-000005

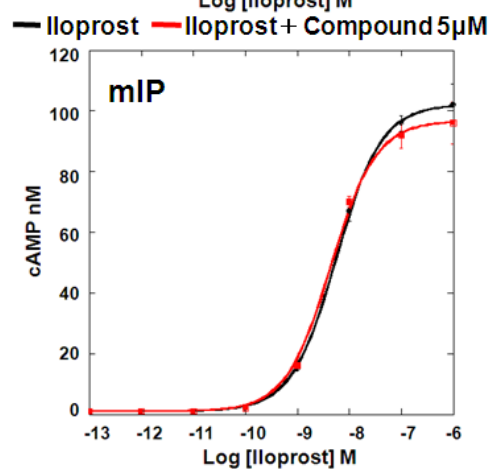
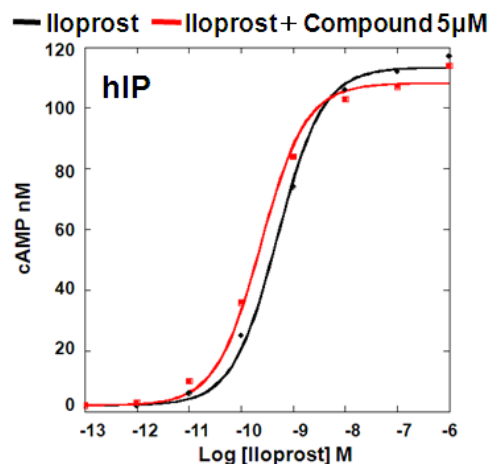
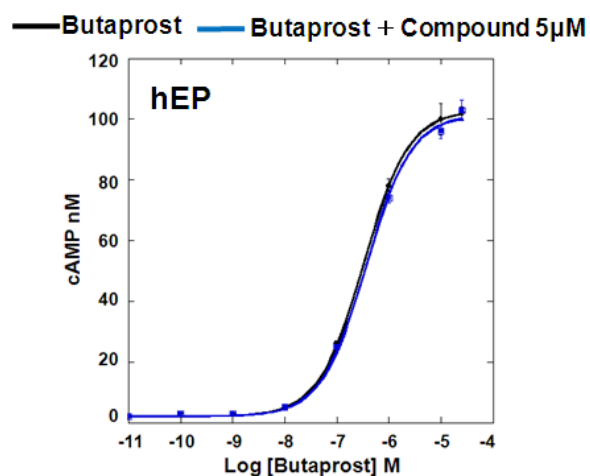
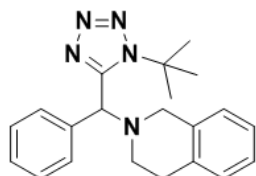


Figure 2-5-30 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell (left below). Effect of the compound on Histamine dose response curve in mIP transiently expressing CHO-K1 cell (lower right).

類似化合物 90 種をアッセイしたうち、なんらかの活性が認められた 6 種を記載した。残り 84 種は、それぞれのアゴニストの用量反応曲線に変化を引き起こさなかったため割愛した。

【考察】

構造類似体の中に、TS-000005 より活性が高いもの及び低いものが存在するため、化合物の構造と活性に何らかの相関関係を見出すことは可能ではないかと考えられる。

しかし、DMSO 溶液保存していた化合物と粉末保存していた化合物間で異なる薬理活性を示す可能性（化合物に薬理活性はあるが、溶解性が悪いため DMSO 保存中で結晶化し、活性がないと判断される可能性）もあるため、活性の高い化合物を抜粋して、粉末提供された条件で、再度アッセイした。

活性の高い類似化合物(粉末提供)を対象にしたアッセイ

【実験目的】

前項のアッセイで活性の高かった化合物を、創薬イノベーションセンターから粉末提供していただき、及びヒット化合物(粉末)を新規購入し、それらを DMSO に溶解させ、上記と同様のアッセイを実施したところ、ヒト IP 及びマウス IP 強制発現細胞系で Iloprost の用量反応曲線を大きく左あるいは上シフトさせた。

【実験方法】

ヒット化合物(粉末提供)を対象にしたアッセイの時と同一である。

【活性の高い類似化合物(粉末提供)をアッセイした結果】

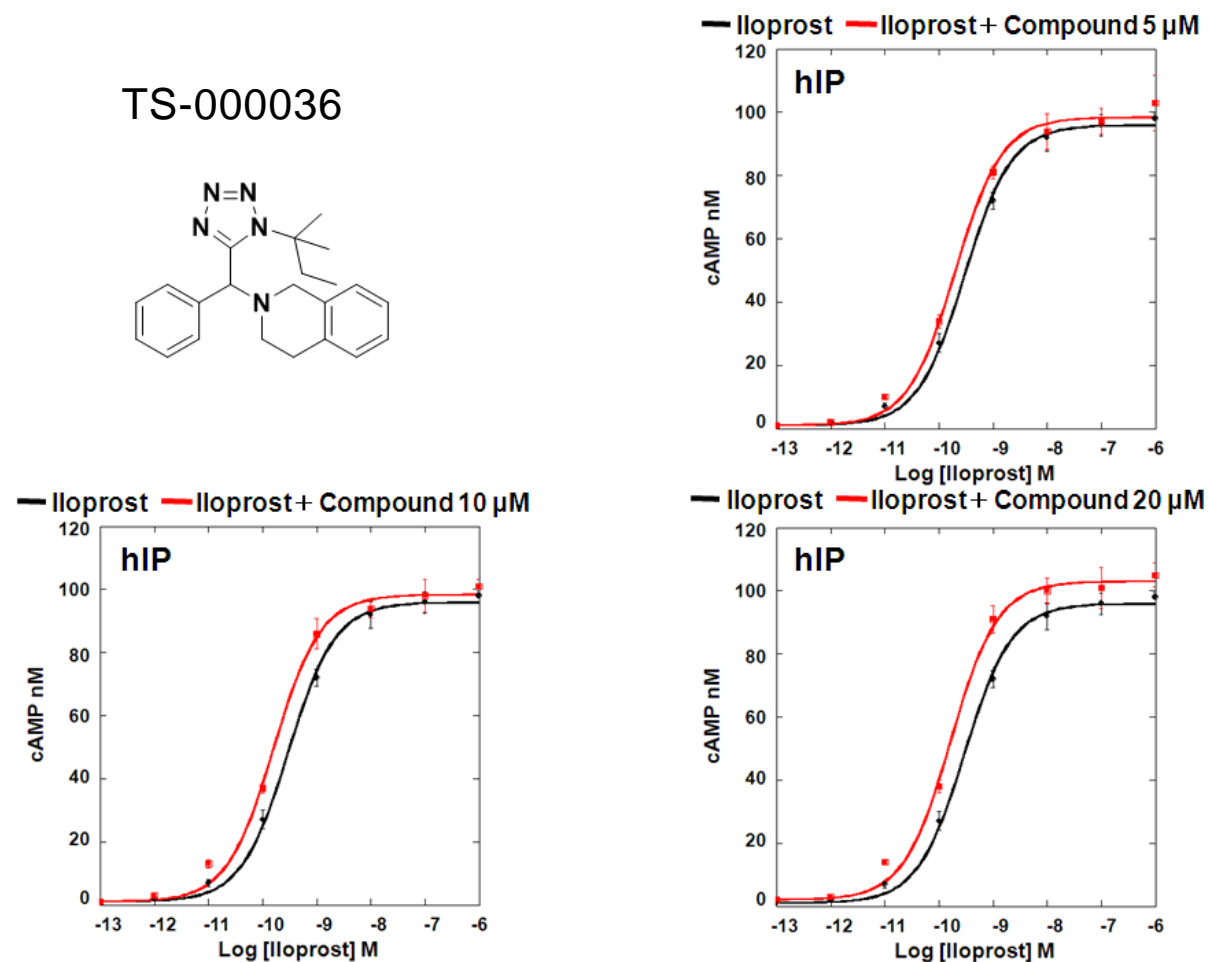


Figure 2-5-31 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell.

hIP 強制発現細胞系で Iloprost の用量反応曲線をシフトさせた。

TS-000036

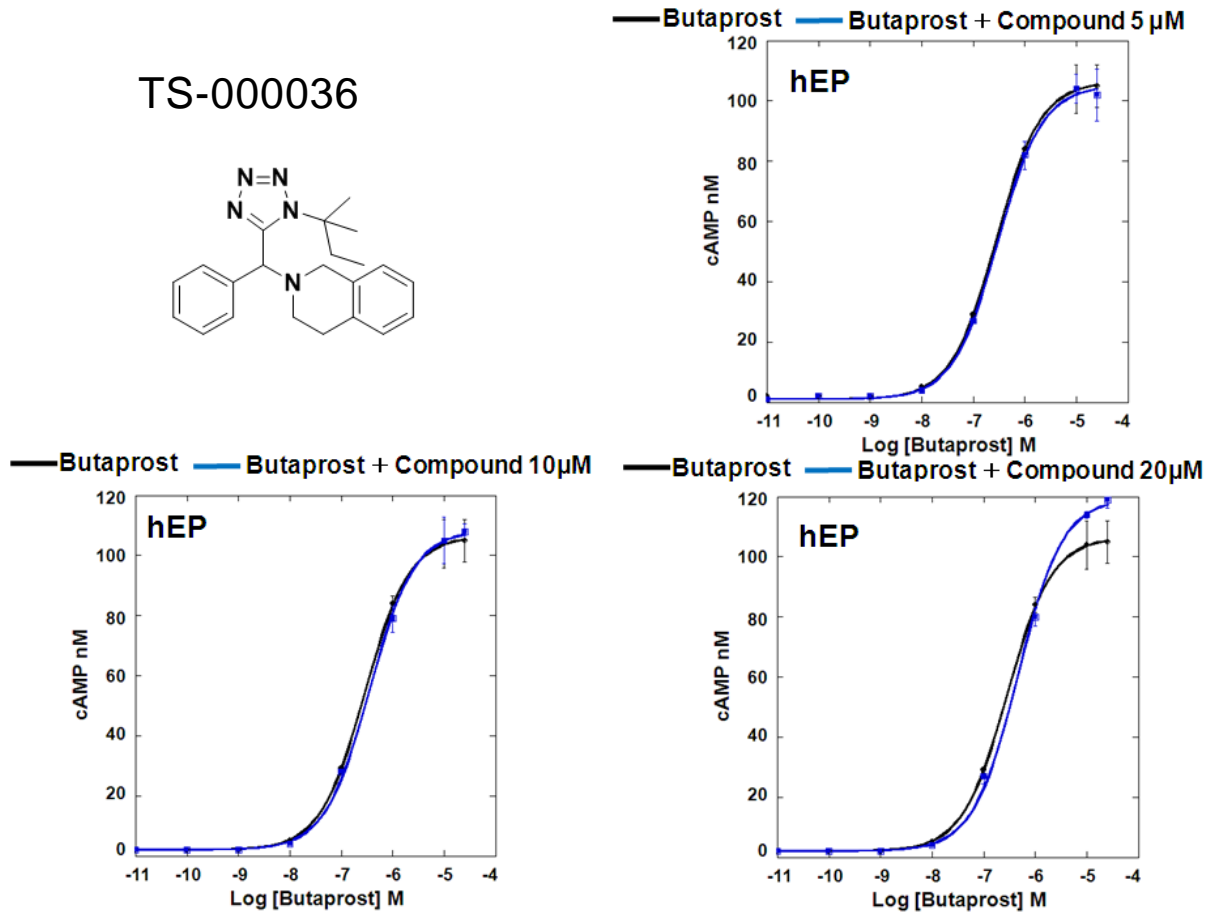
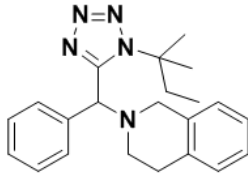


Figure 2-5-32 Effect of change in concentration of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000036

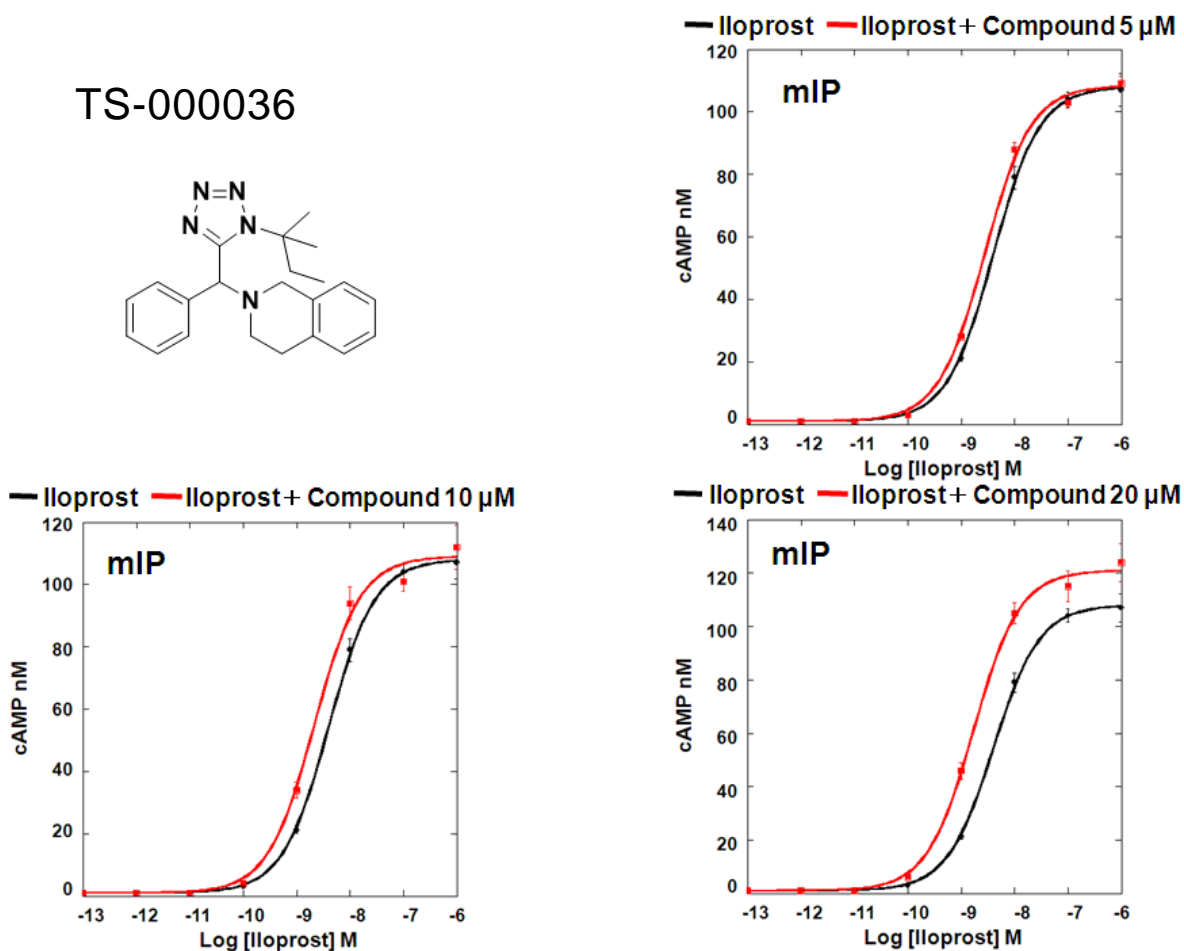
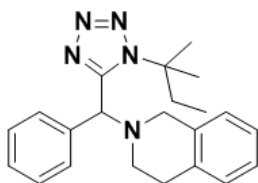


Figure 2-5-33 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell.

mIP 強制発現細胞系で Iloprost の用量反応曲線をシフトさせた。

TS-000038

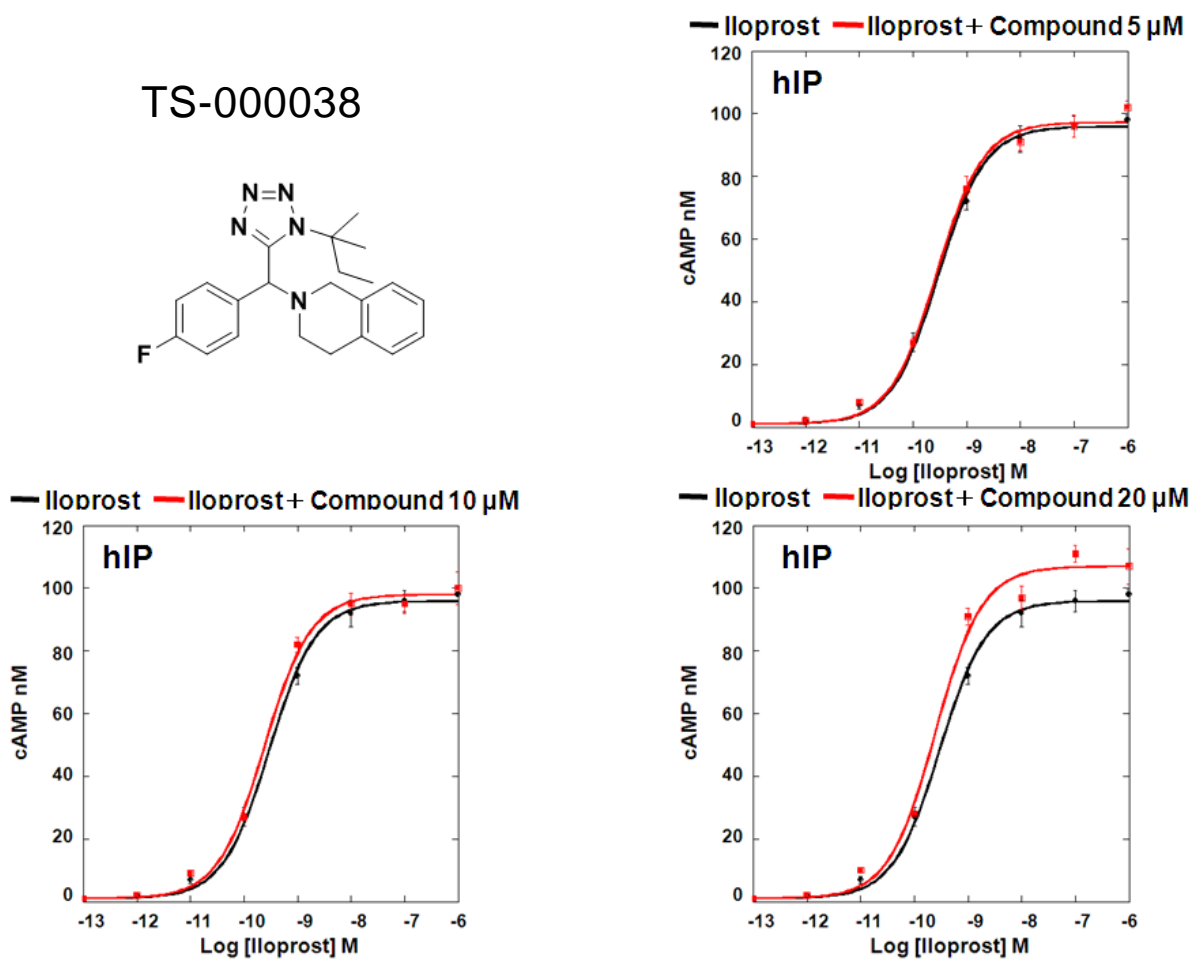
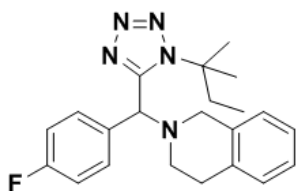


Figure 2-5-34 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell.

Fがあると、左シフト活性が消失する結果となった。CIが存在する T-207413 は、粉末がなかったため、アッセイできなかった。

TS-000038

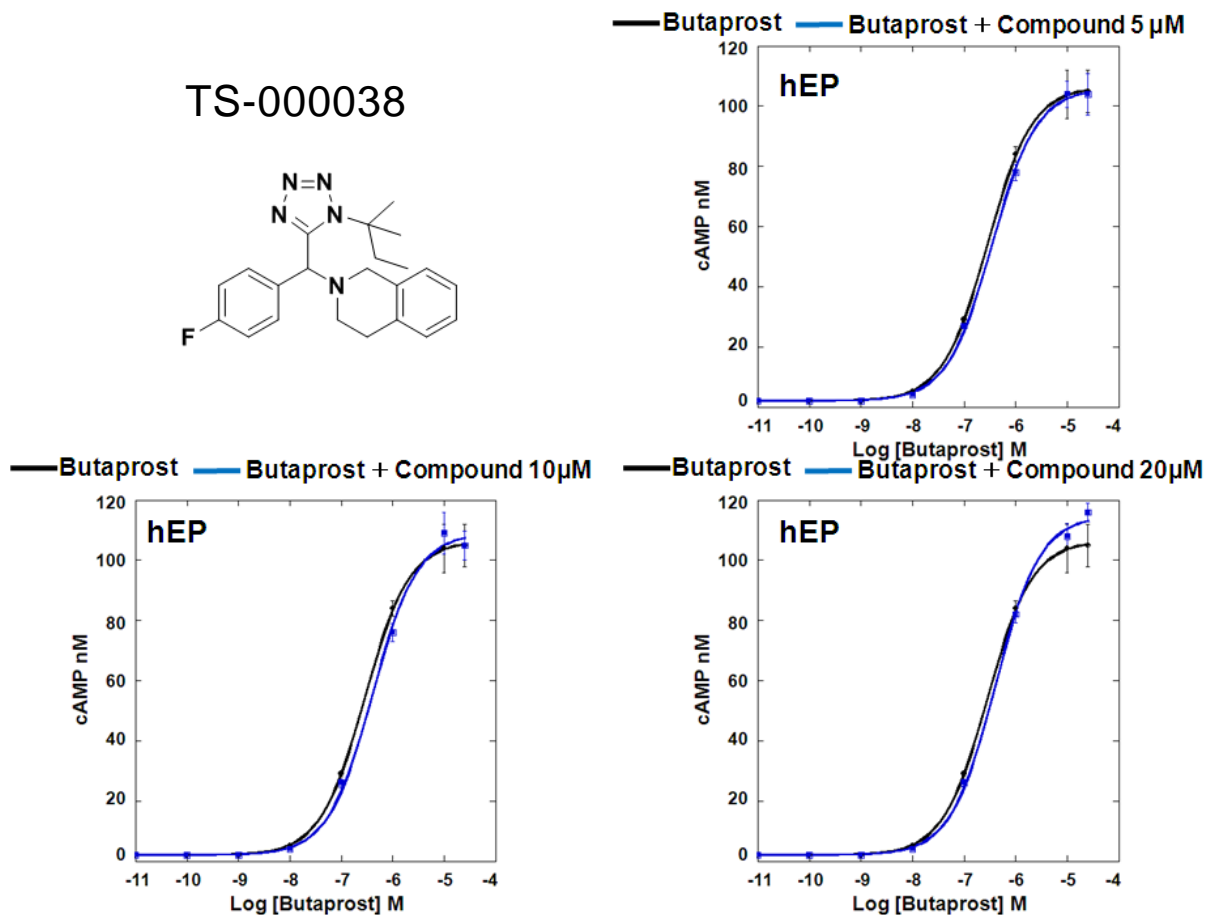
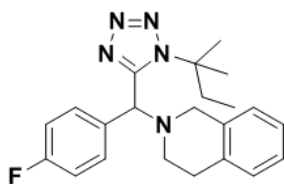


Figure 2-5-35 Effect of change in concentration of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000038

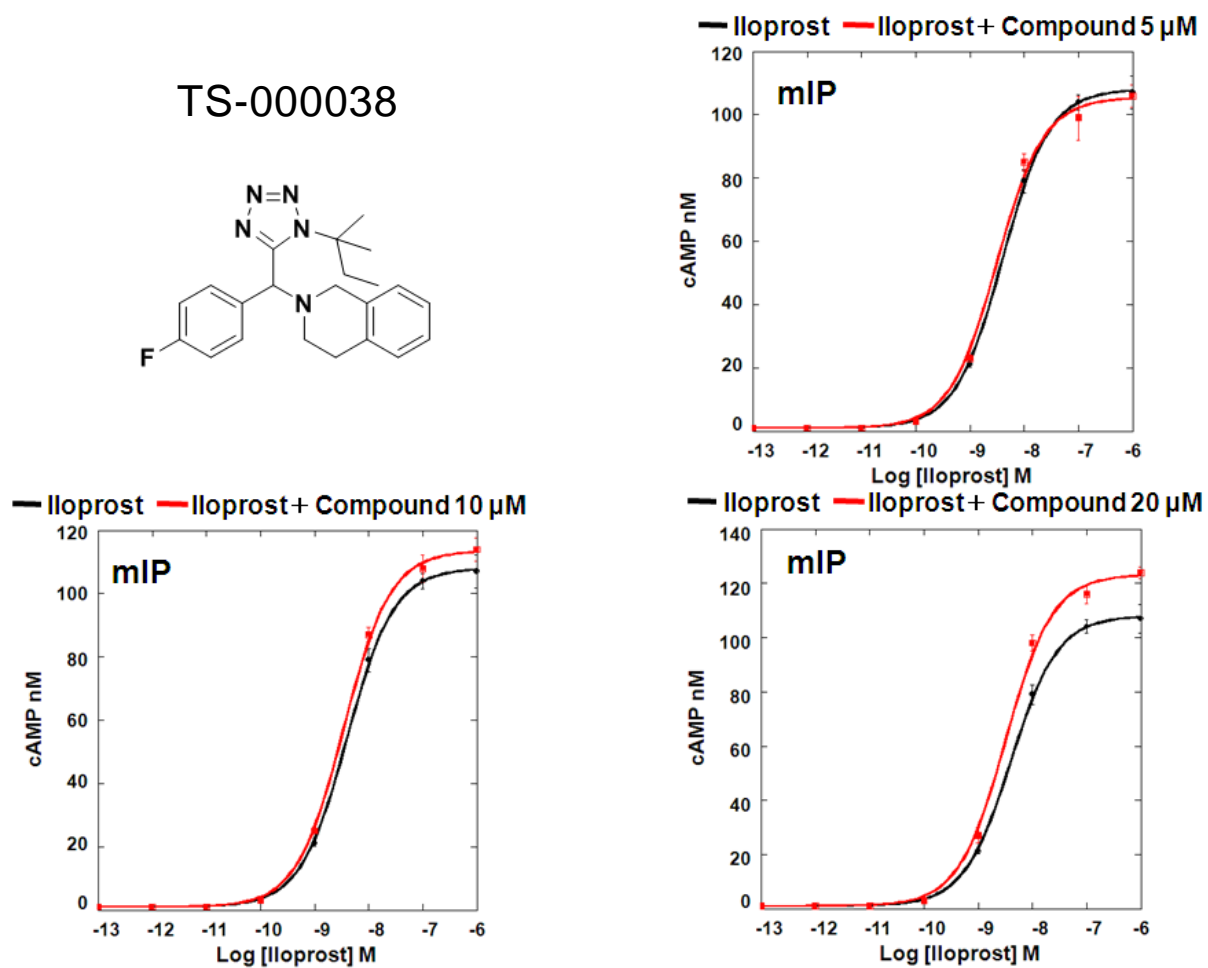
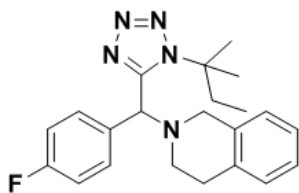


Figure 2-5-36 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell.

化合物の濃度が高くなるにつれ、mIP 強制発現細胞系で Iloprost の用量反応曲線を上シフトさせる作用が認められる。

TS-000041

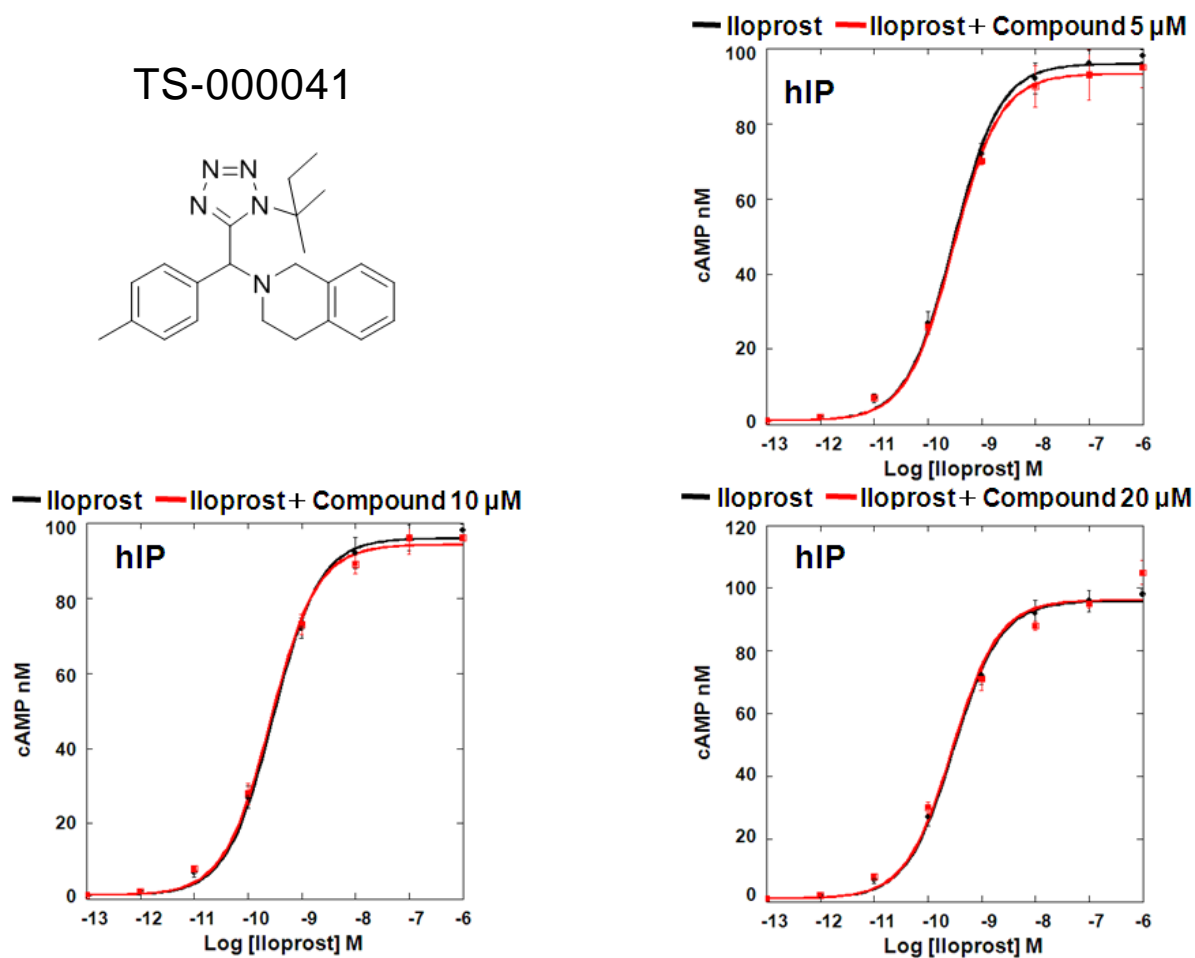
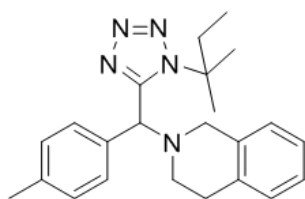


Figure 2-5-37 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000041 は、DMSO に溶けなかったため、アッセイしても薬理活性が認められない。

TS-000041

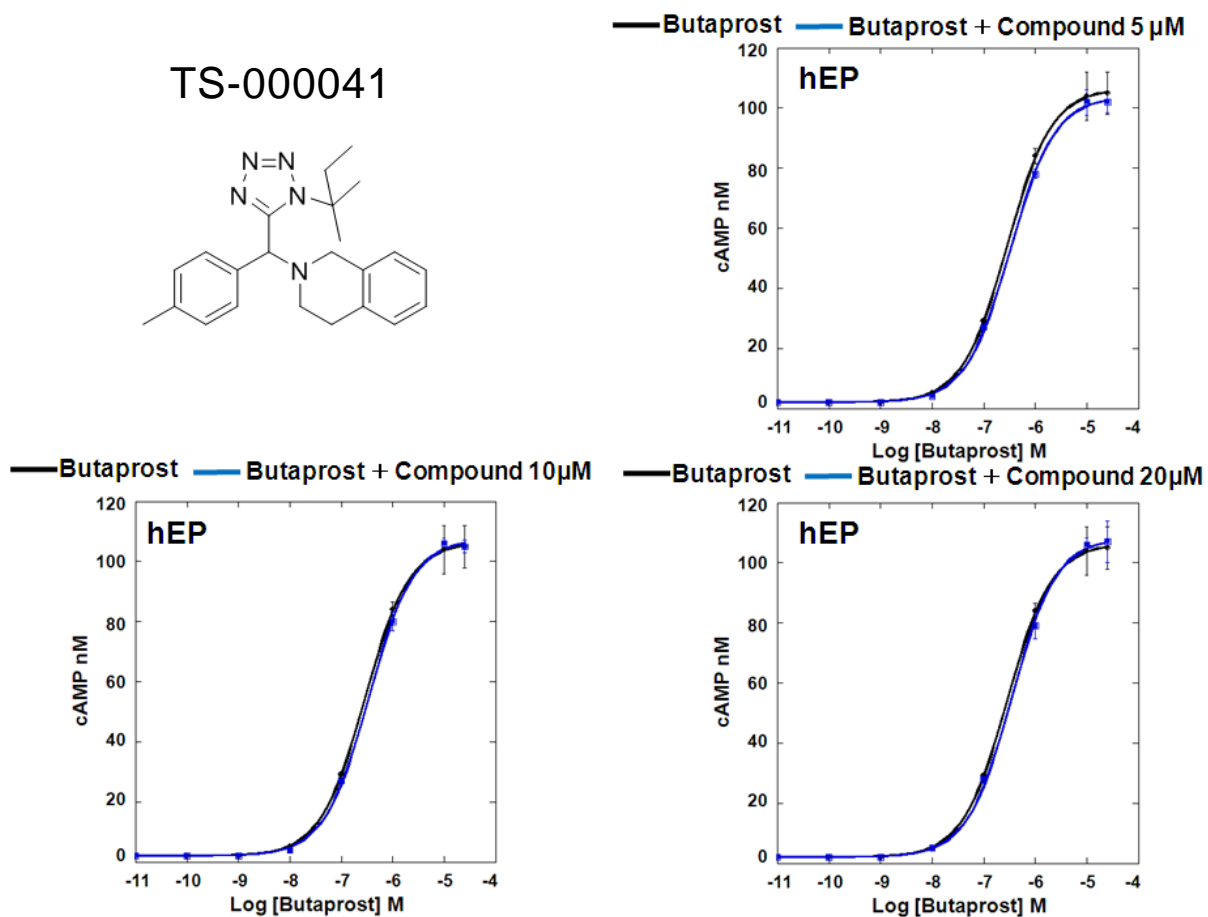
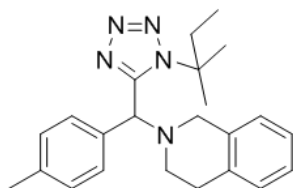


Figure 2-5-38 Effect of change in concentration of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000041

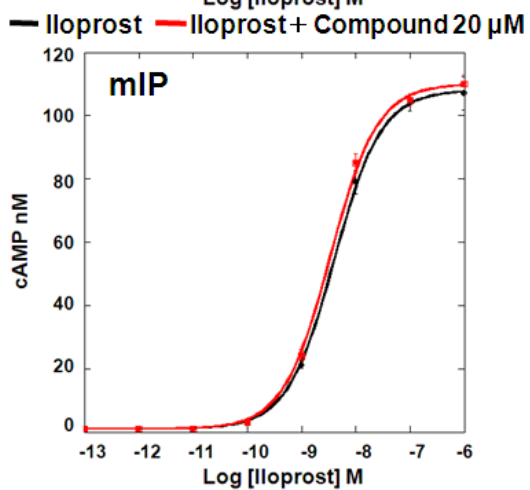
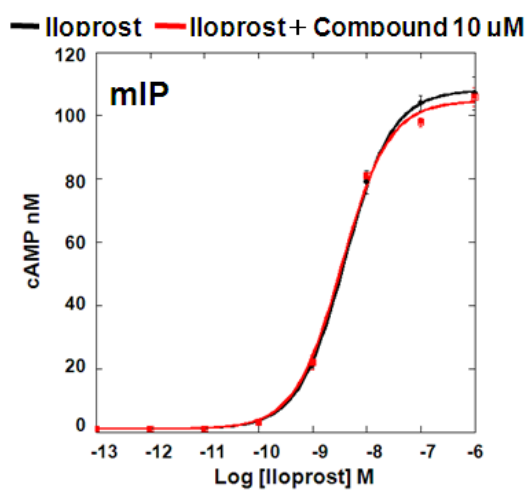
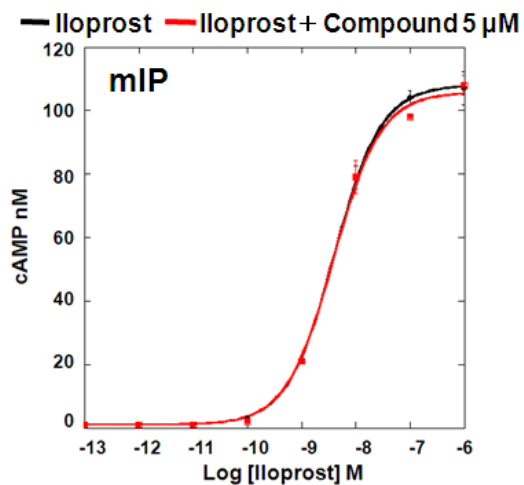
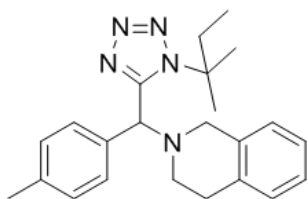


Figure 2-5-39 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000040

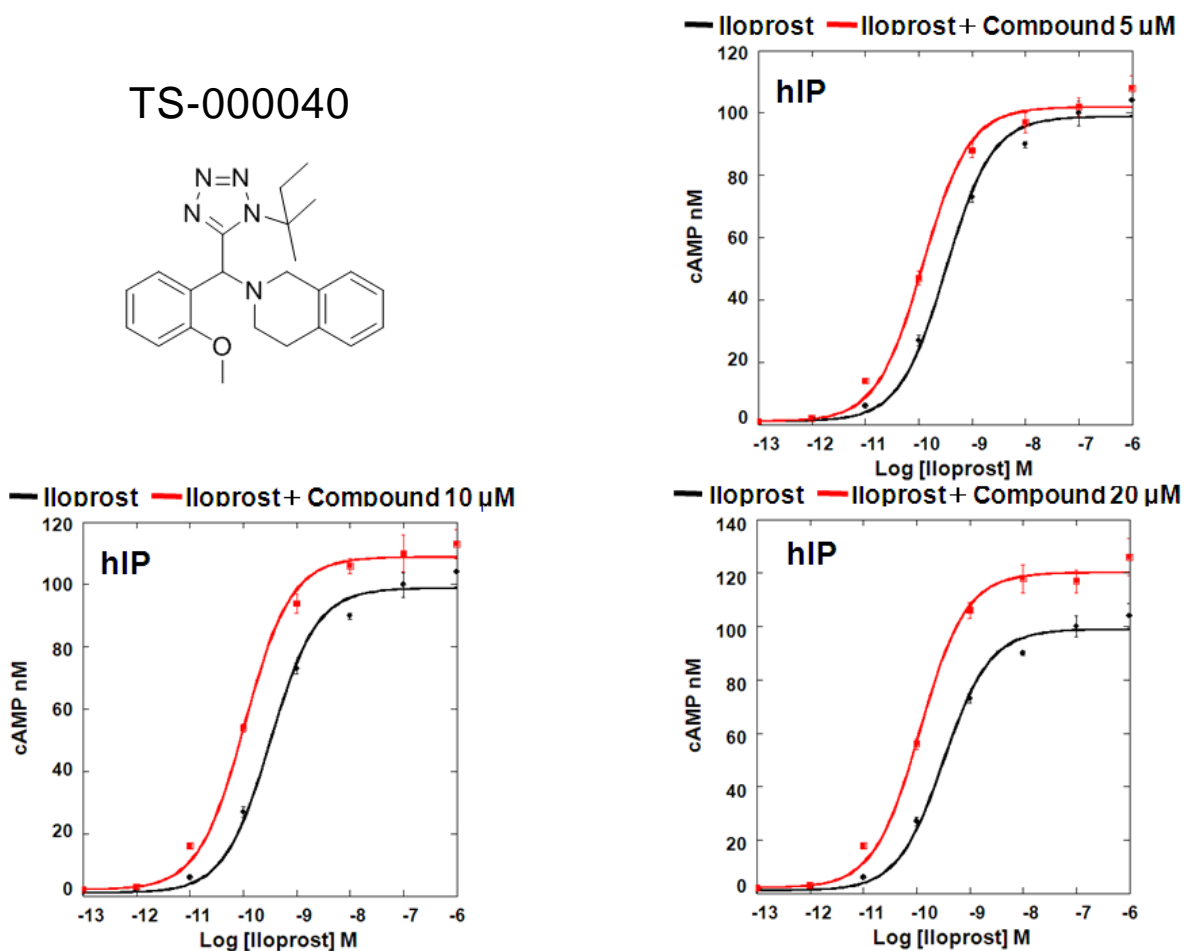
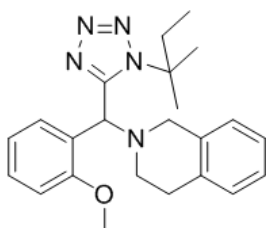


Figure 2-5-40 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell.

hIP 強制発現細胞系で Iloprost の用量反応曲線をシフトさせた。化合物 5 μM では、左シフトしているが、それ以上化合物濃度を上昇させると、左シフトへの作用と比較すると軽微ではあるが、上シフトの作用が認められる。

TS-000040

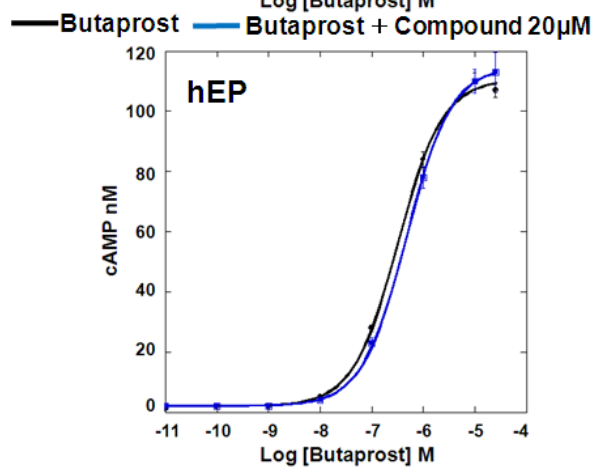
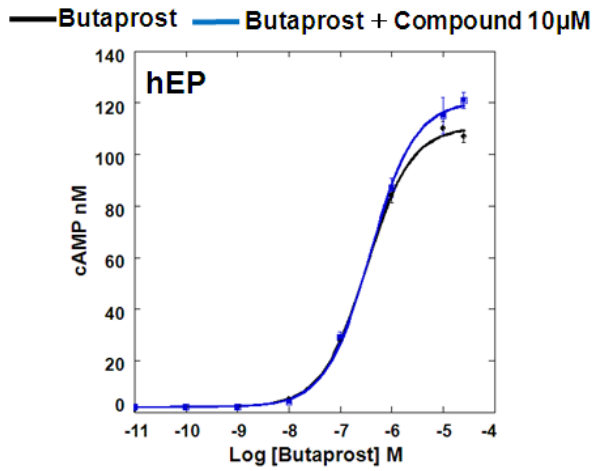
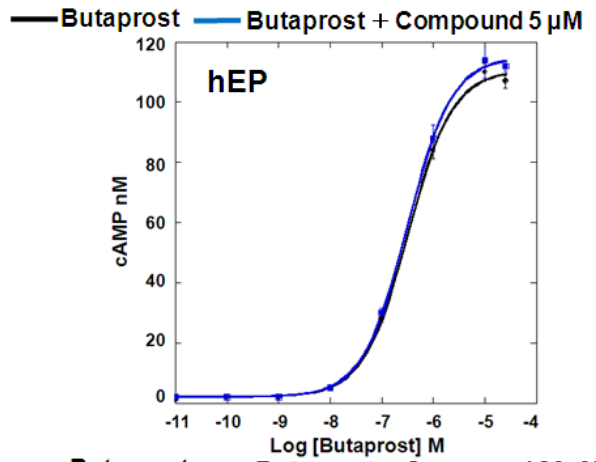
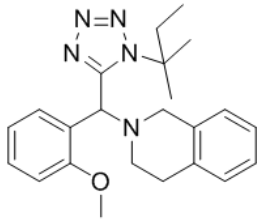


Figure 2-5-41 Effect of change in concentration of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000040

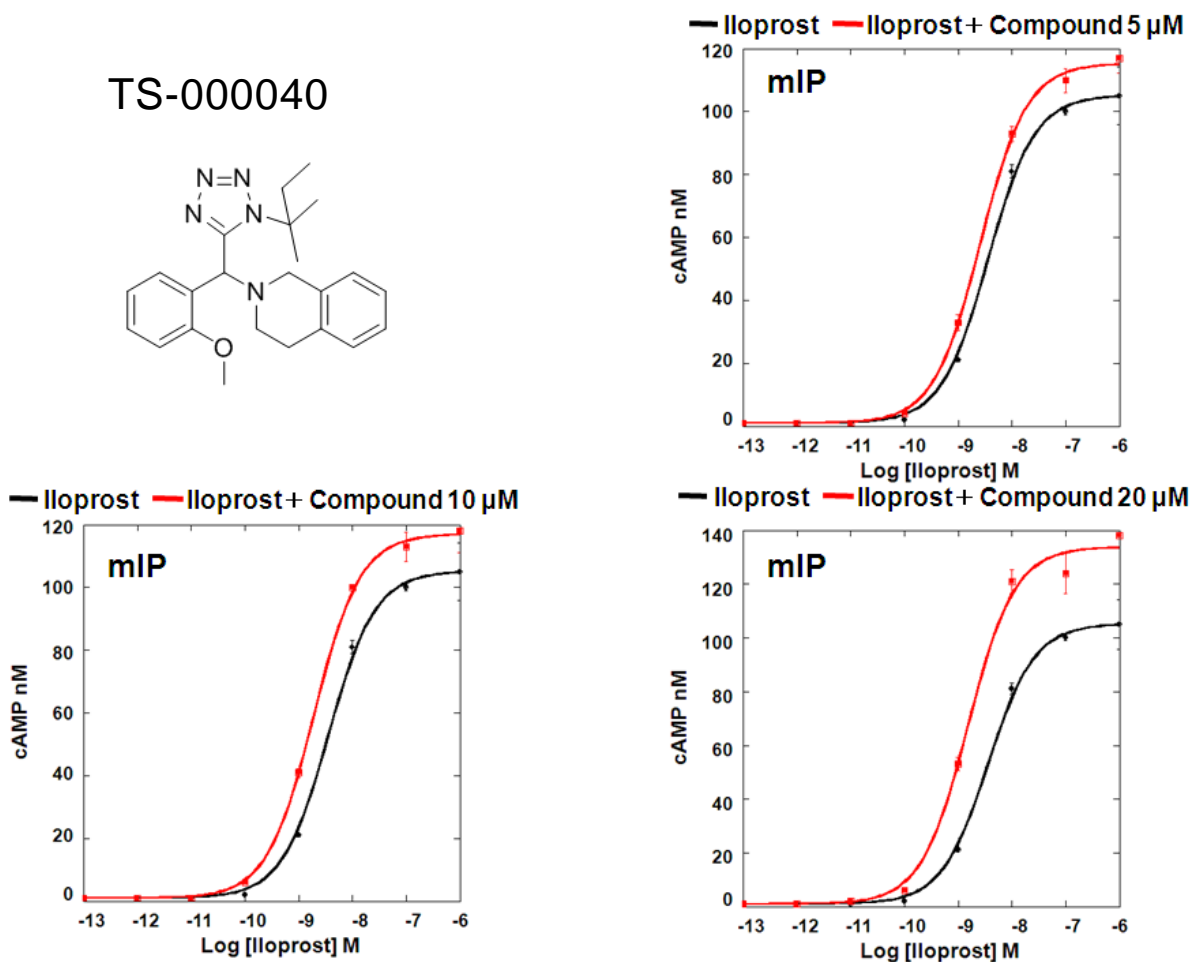
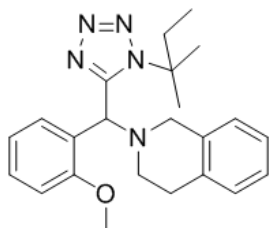


Figure 2-5-42 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell.

mIP 強制発現細胞系で Iloprost の用量反応曲線を上シフトさせた。hIP の時とは、Iloprost の用量反応曲線への作用が異なる。

TS-000005

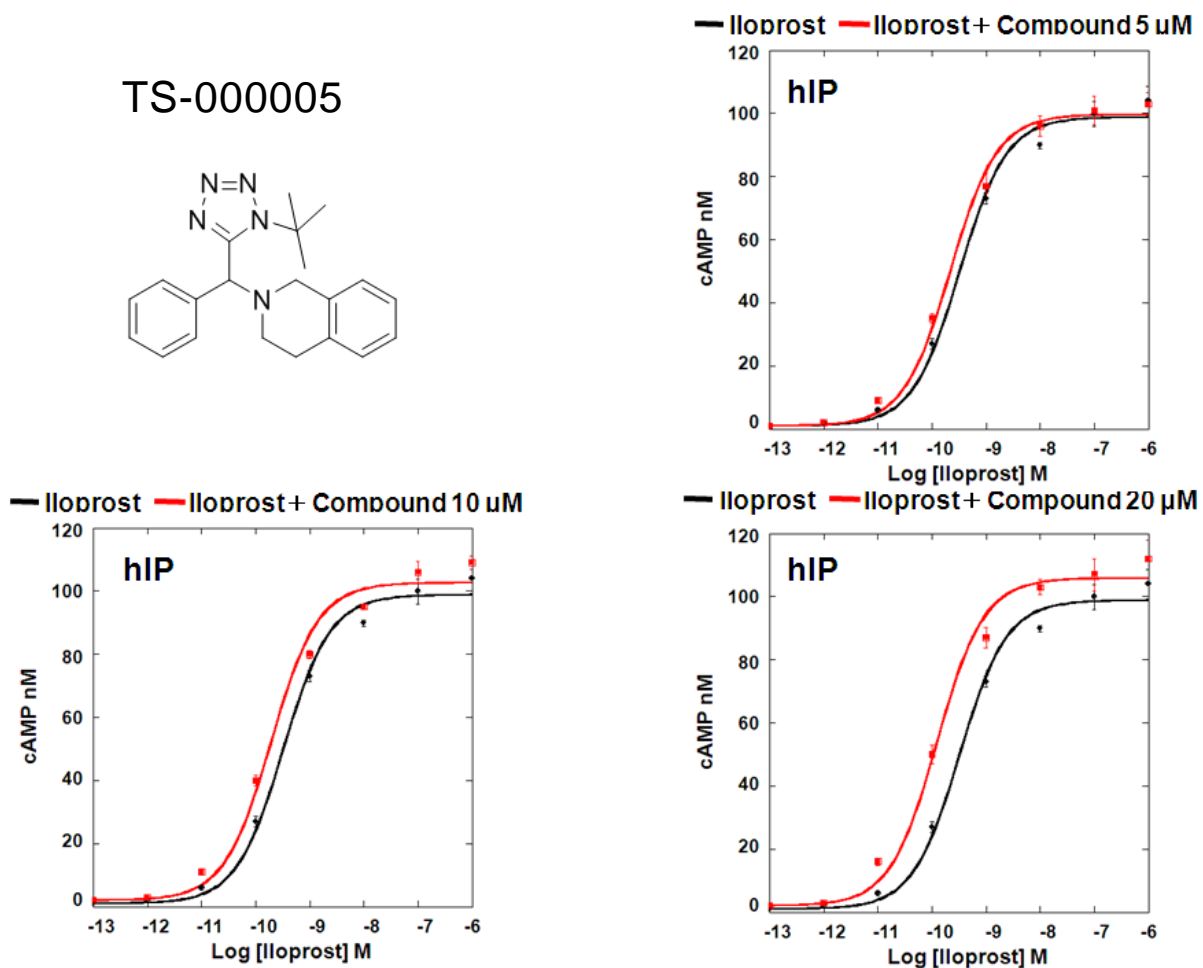
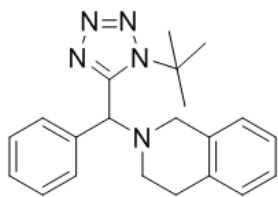


Figure 2-5-43 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell.

hIP 強制発現細胞系で Iloprost の用量反応曲線をシフトさせた。

TS-000005

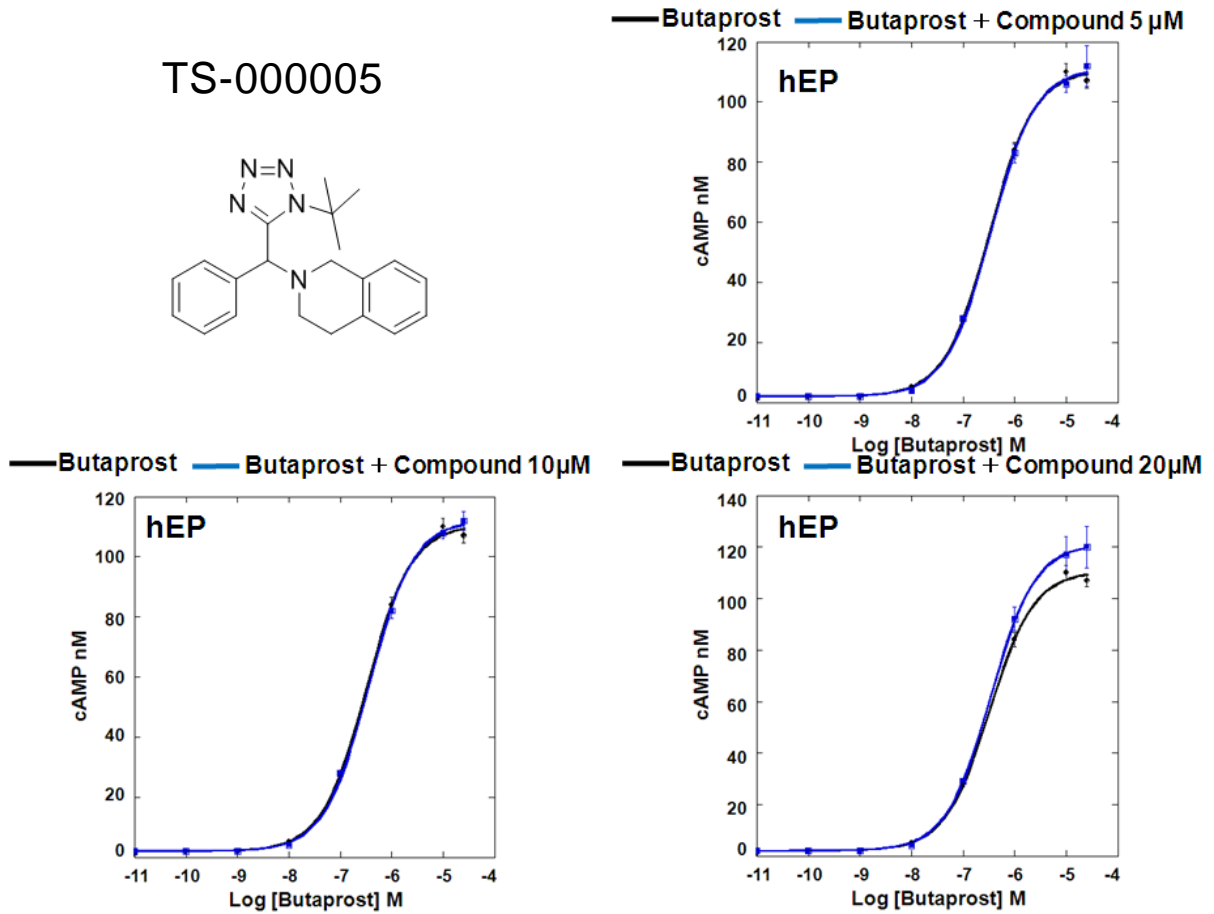
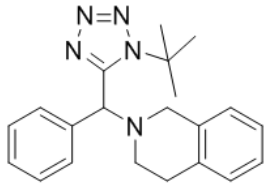


Figure 2-5-44 Effect of change in concentration of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000005

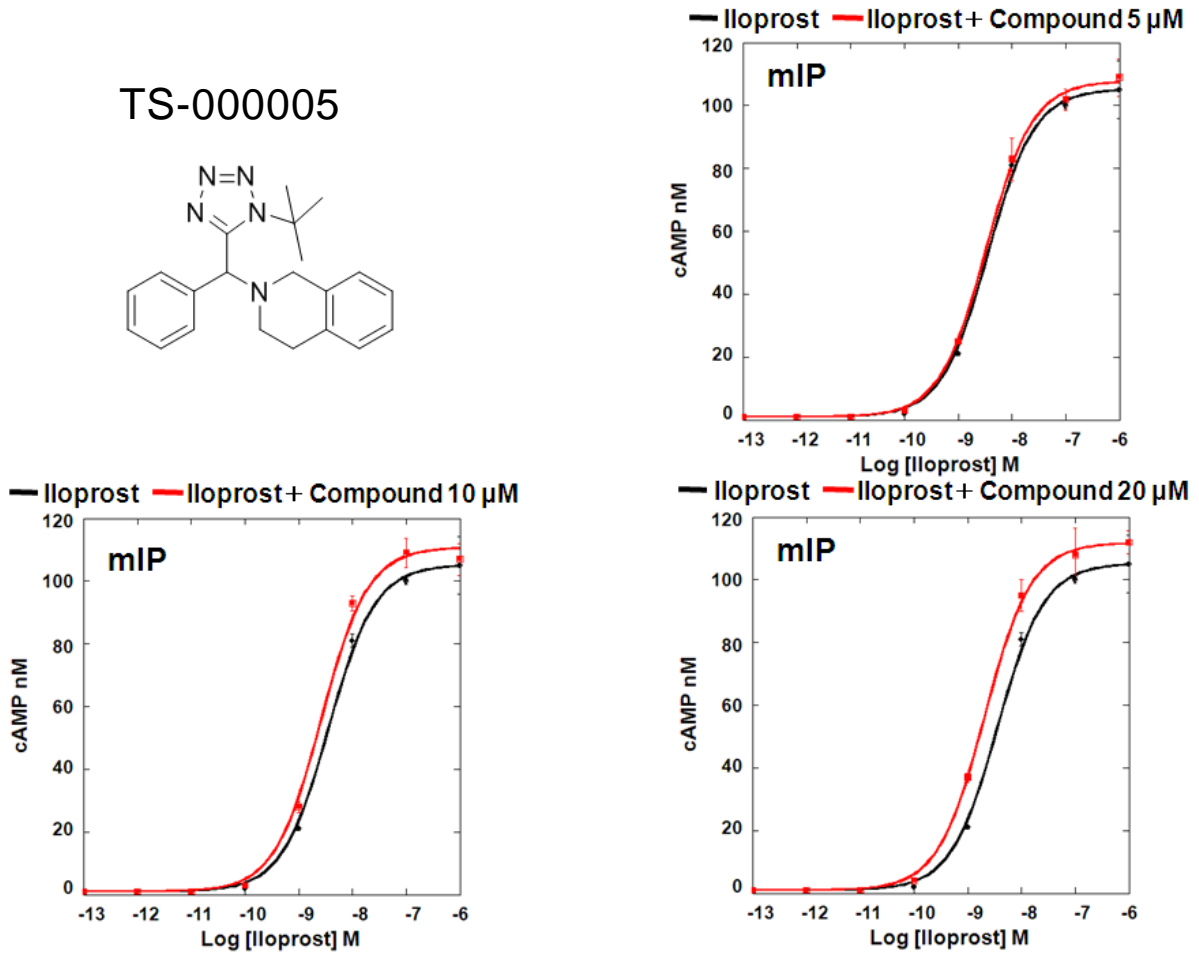
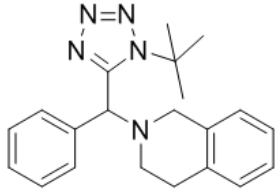


Figure 2-5-45 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell.

mIP 強制発現細胞系で Iloprost の用量反応曲線をシフトさせた。

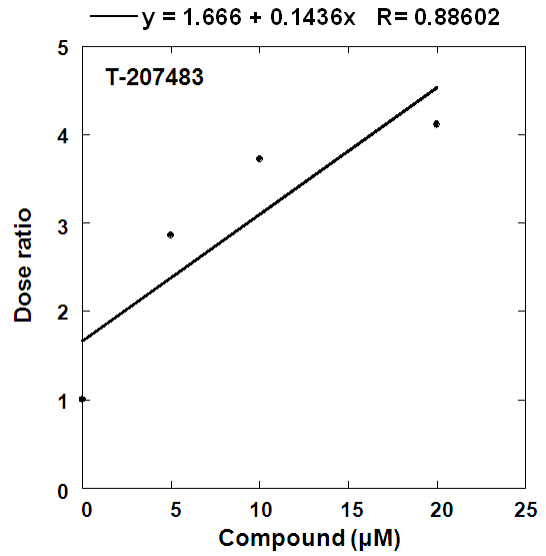
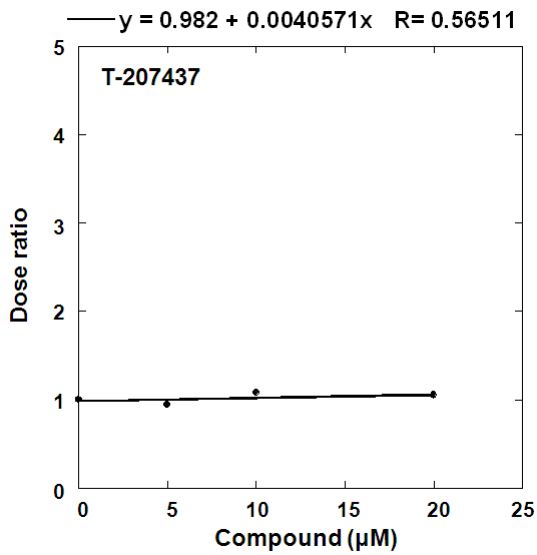
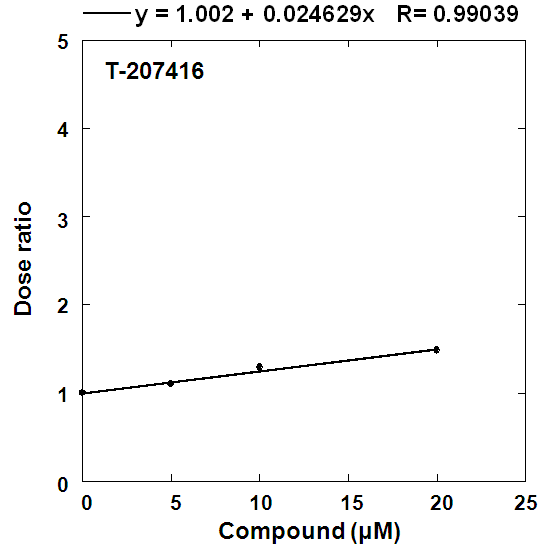
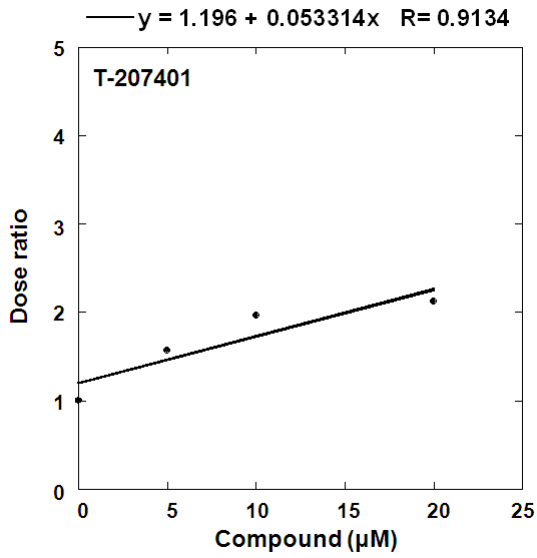
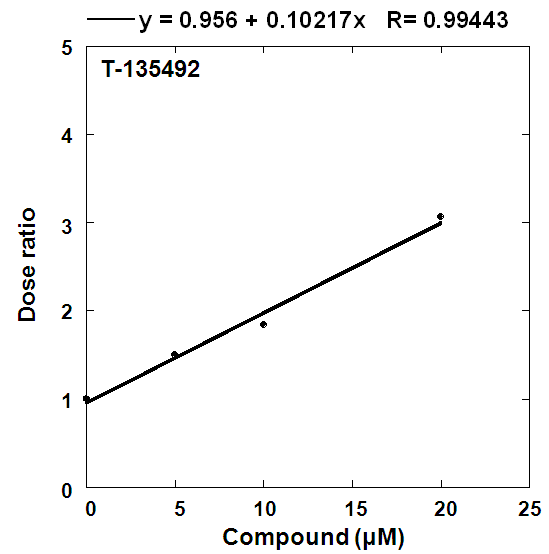


Figure 2-5-46 Effect of change in concentration of the compounds on dose ratio in hIP stably expressing CHO-K1 cell.



【考察】

TS-000005 の類似化合物 90 種を対象にアッセイを実施したところ、ヒット化合物よりも薬理活性が向上した化合物として TS-000040 を見出すことができた。TS-000040 濃度 20 μM 存在下では、Iloprost の用量反応曲線を約 4 倍以上左へシフトさせる活性を有している

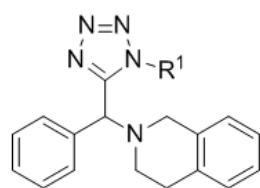
また、新規購入した TS-000005 の粉末を DMSO に溶解させアッセイしたところ、過去に購入した粉末から調整した TS-000005 の薬理 profile とは異なる結果が得られた。具体的には、過去に創薬オープンイノベーションセンターが購入し、粉末で保存していた TS-000005 は、Iloprost の用量反応曲線を極めて大きく上シフトさせる一方で、今回新規購入した TS-000005 をアッセイすると、上シフトというよりむしろ左シフトの作用の方が強く認められる。製造年月日が異なるとはいえ、TS-000005 という全く同一の化合物を同じ供給会社から購入しているにも関わらず、アッセイ結果が異なる可能性の 1 つとして、化合物に含まれる不純物の影響が考えられる。そこで、新規購入した TS-000005 を HPLC で精製した後、アッセイを実施した。その結果は、別の節に記載したため、これ以上についてはそちらで考察する。

ところで、左シフト活性を有している TS-000005 や TS-000040 は不斉炭素を中心にテトラゾール、芳香環やイソキノリン骨格からなる。現時点において、薬理活性を呈するのに必要な化学構造について考察する。

まず、芳香環とイソキノリンを固定し、テトラゾールの置換基を構造変化させると、*tert*-Butyl のような嵩高い構造が薬理活性に必要であることが示唆された (Table2-5-1)。Table2-5-2 で、R4 に Cl や F があると薬理活性が低下することがわかる。さらに、OCH₃ 基の置換位置が重要であり、薬理活性保持にイソキノリン骨格である必要がある。

これまでの結果からヒット化合物が薬理活性を保持するのに必要な化学構造上の制約条件が厳しいように思われる。しかし、R2 に OCH₃ 基があると活性が向上することから、R2 はさらなる構造修飾可能な置換部位であることが示唆される。そこで、R2 を OH、CH₃、CH₂CH₃ や芳香環などに置換した場合や、イソキノリンではなくキノリンに置換した場合の構造活性相関の知見が必要であると考えられる。

Table2-5-1 Structure-activity-relationship of the compound for hIP

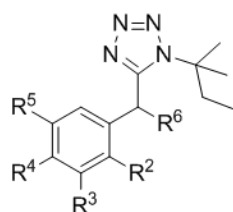


使用したアゴニスト: Iloprost

Compound	R ¹ =	左シフト値	Compound	R ¹ =	左シフト値
TS-000005		11.1 μM	TS-000044		N.D.
TS-000036		10.0 μM	TS-000045		N.D.
TS-000042		N.D.	TS-000046		N.D.
TS-000043		N.D.			

cAMP 産生曲線よりアゴニストの EC₅₀ 値を算出し、アゴニスト単独の場合に比べ、2 分の 1 の濃度にする被検化合物濃度を求め、「左シフト値」と定義した。以後、アロステリックモジュレーター活性の表現方法とする。N.D.は not detected の略。

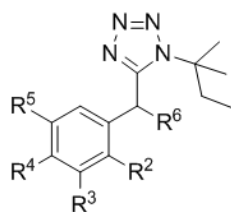
Table2-5-2 Structure-activity-relationship of the compound for hIP



使用したアゴニスト : Iloprost

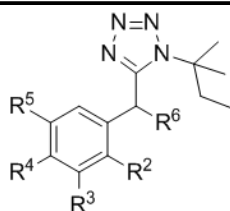
Compound	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	左シフト値
TS-000047	H	H	OCH ₃	OCH ₃		N.D.
TS-000037	H	H	Cl	H		15.3 μM
TS-000038	H	H	F	H		15.3 μM
TS-000048	H	H	OH	OCH ₃		N.D.
TS-000049	OCH ₃	H	H	OCH ₃		N.D.
TS-000040	OCH ₃	H	H	H		5.4 μM

Table2-5-3 Structure-activity-relationship of the compound for h1P



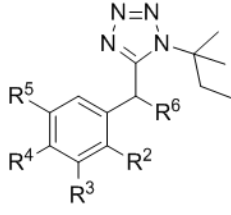
使用したアゴニスト : Iloprost

Compound	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	左シフト値
TS-000050	OCH ₃	H	H	OCH ₃		N.D.
TS-000051	H	H	Cl	H		N.D.
TS-000052	H	H	F	H		N.D.
TS-000053	H	H		H		N.D.
TS-000054	H	H	H			N.D.



使用したアゴニスト : Iloprost

Compound	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	左シフト値
TS-000055	OCH ₃	OCH ₃	H	H		N.D.
TS-000056	OCH ₃	H	H	OCH ₃		N.D.
TS-000057	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃		N.D.
TS-000058	H	H	F	H		N.D.
TS-000059	F	H	H	H		N.D.
TS-000060	H	H	Cl	H		N.D.



使用したアゴニスト: Iloprost

Compound	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	左シフト値
TS-000061	Cl	H	H	H		N.D.
TS-000062	H	H	CH ₃	H		N.D.
TS-000063	OCH ₃	H	H	H		N.D.
TS-000064	H	H	F	H		N.D.

Ilprostではなく、内因性アゴニストである PGI₂ を用いたアッセイ

【実験目的】

内因性アゴニストである PGI₂ は、その半減期の短さから HTS 不適であったため (Figure 2-5-47)、代替アゴニストとして Ilprost を使用していた。Ilprost の時と同様に、PGI₂ の用量反応曲線を左シフトさせることを確認することを目的として、ヒット化合物及び活性の高い化合物を対象に、cAMP アッセイを実施した。

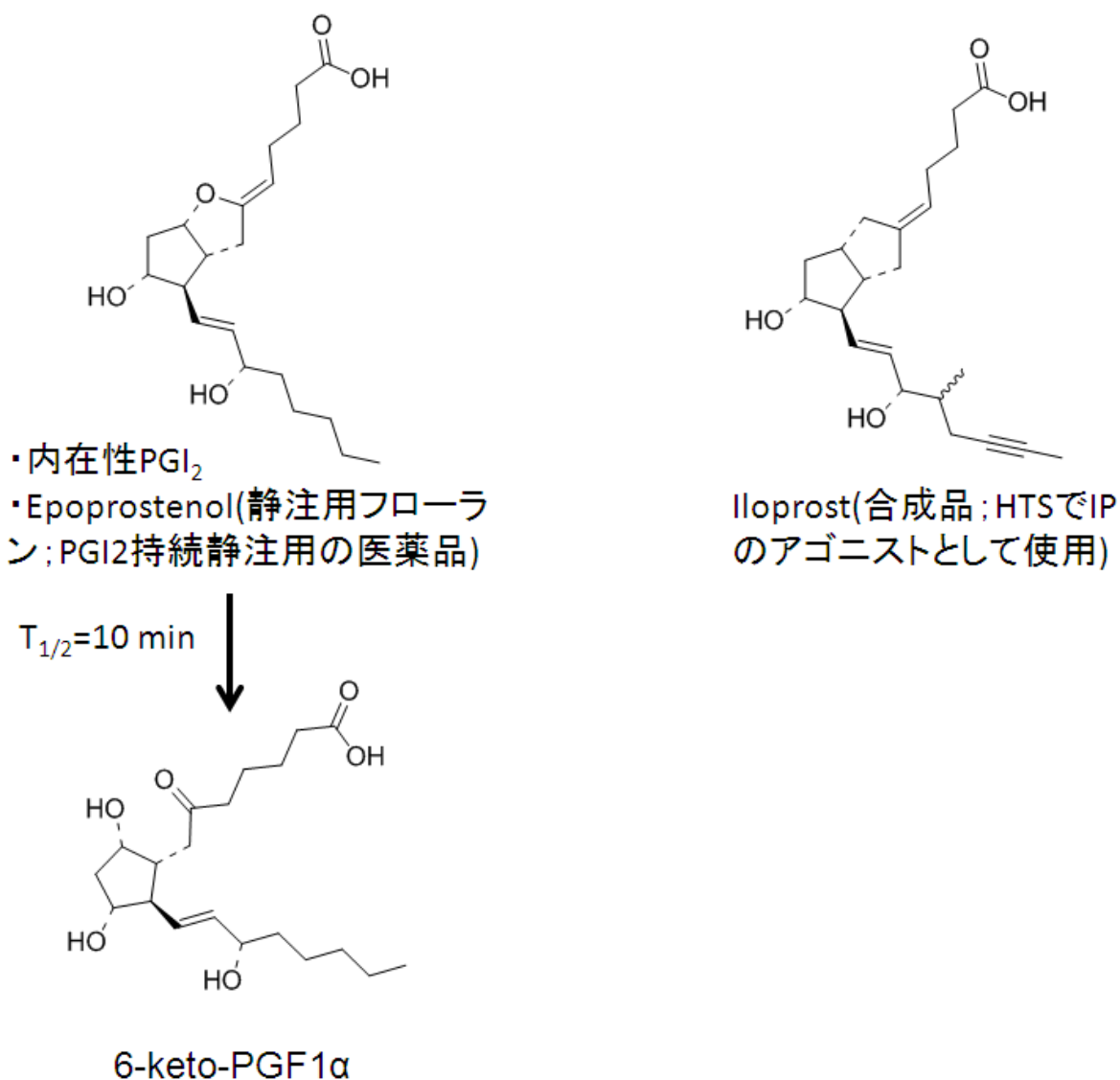


Figure 2-5-47 Chemical structure of PGI₂ (Epoprostenol), 6-keto-PGF1 α and Ilprost.

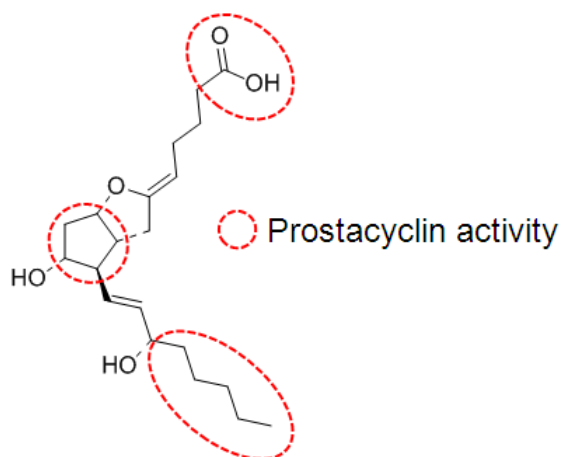


Figure 2-5-48 Prostacyclin activity region in PGI₂ (Epoprostenol).

過去に実施されたアゴニスト開発研究の知見から、PGI₂は Figure 2-5-48 に示すようにカルボン酸、5員環及びアルキル直鎖部位の3つがアゴニスト活性保持に重要な化学構造であることが知られていた。Iloprost はアゴニスト活性に重要な部位の一つであるアルキル直鎖に構造修飾を加えたアゴニストである。アッセイに使用するアゴニストの選択は Allosteric modulator 探索研究に極めて重要であるため、PGI₂と Iloprost の構造の違いが薬理活性に影響を及ぼすことが知られている。

T-000005
(HPLC 精製していない)

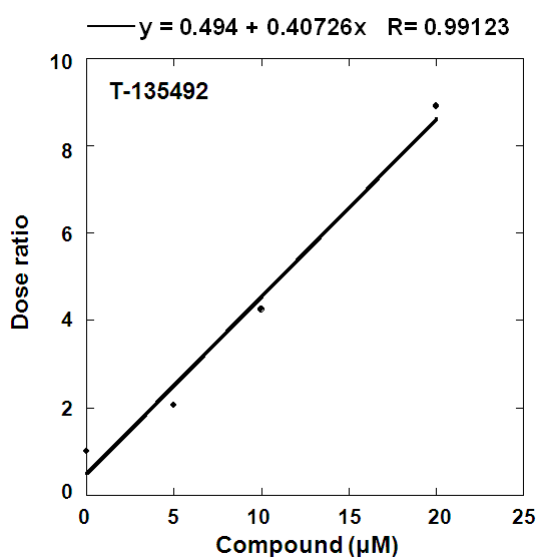
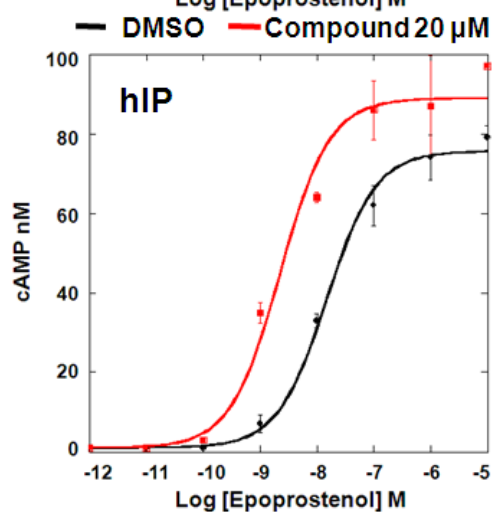
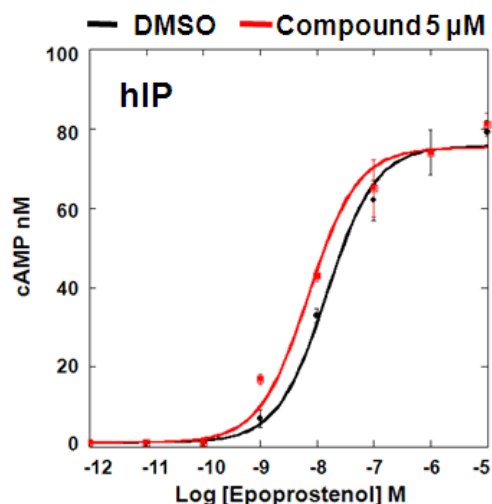
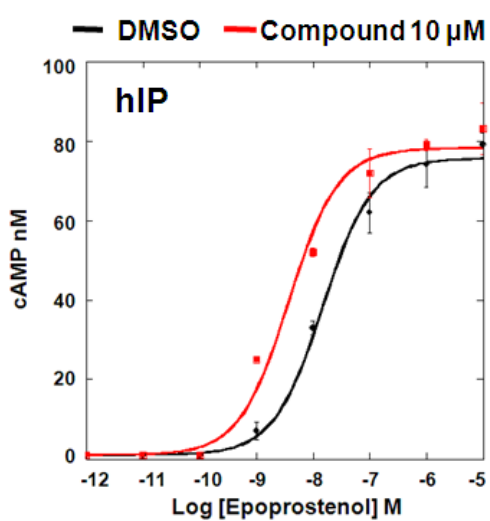
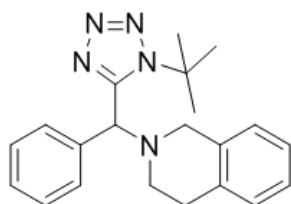


Figure 2-5-49 Effect of change in concentration of the compound on PGI₂ Eporostenol) dose response curve and dose ratio in hIP stably expressing CHO-K1 cell.

HPLC 精製していない TS-000005 は 20 μM 添加時、PGI₂ の用量反応曲線を上シフトさせた。また、Iloprost をアゴニストとして使用するよりも、内因性アゴニストである PGI₂ の方が、大きく左シフトしていることがわかる。

T-000040

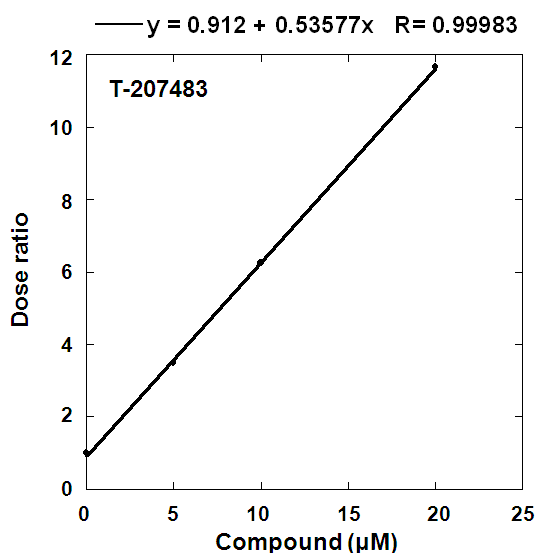
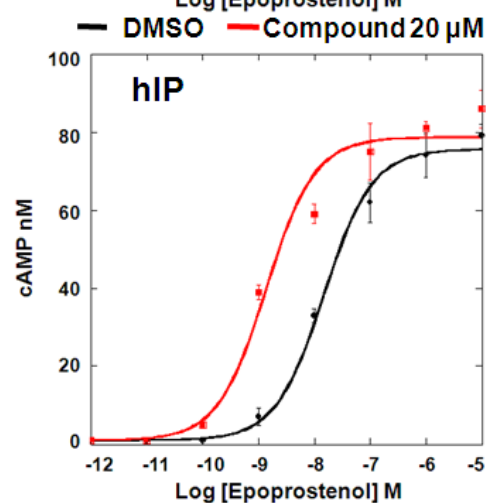
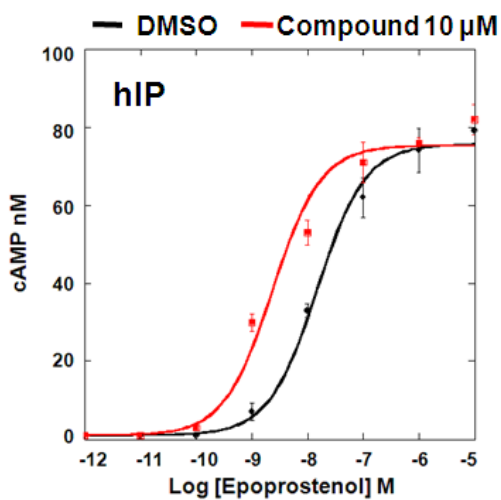
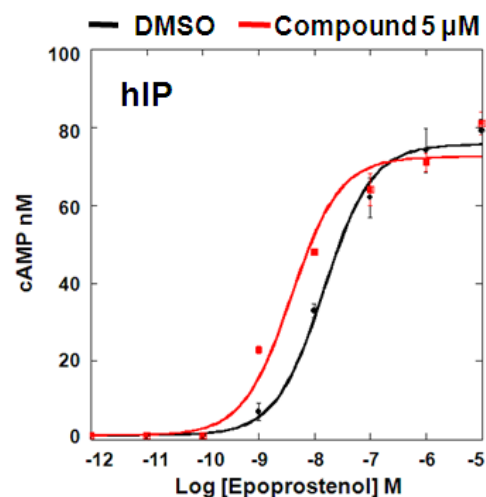
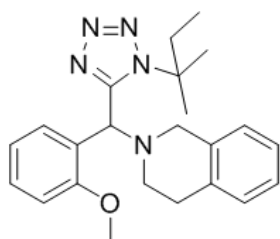


Figure 2-5-50 Effect of change in concentration of the compound on PGI₂ Eporostenol) dose response curve and dose ratio in hIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000040 20 μM で、PGI₂ の用量反応曲線を約 12 倍左シフトさせた。この化合物がラセミ体であり、一方の不斉のみ薬理活性を有しているならば、一方の不斉化合物をアッセイすれば極めて強い活性を有していることが示唆される。

T-000005
(HPLC 精製済み)

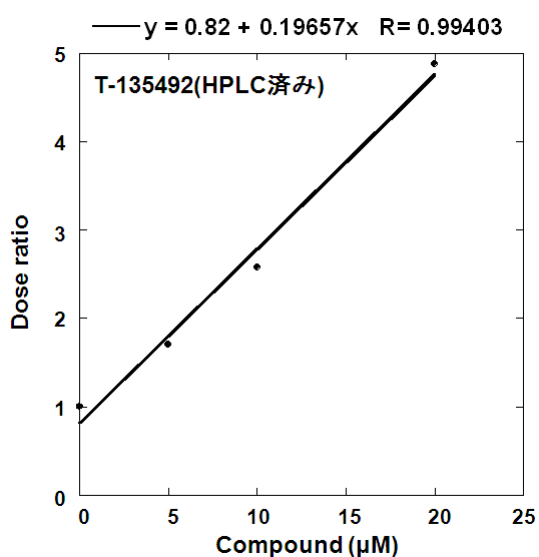
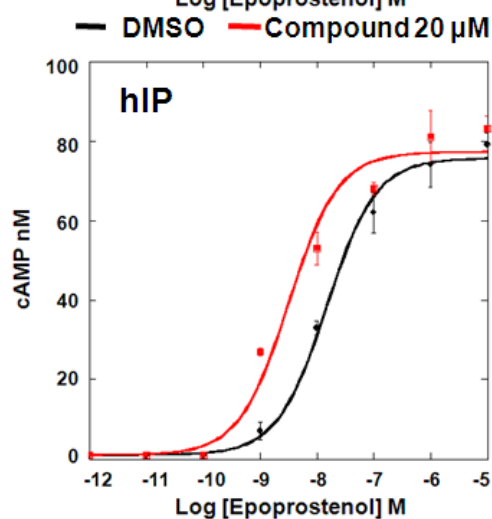
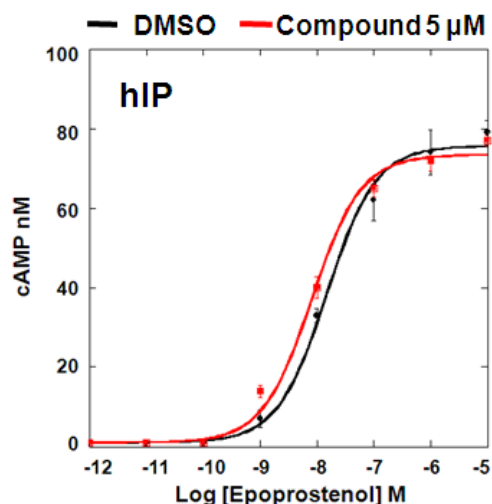
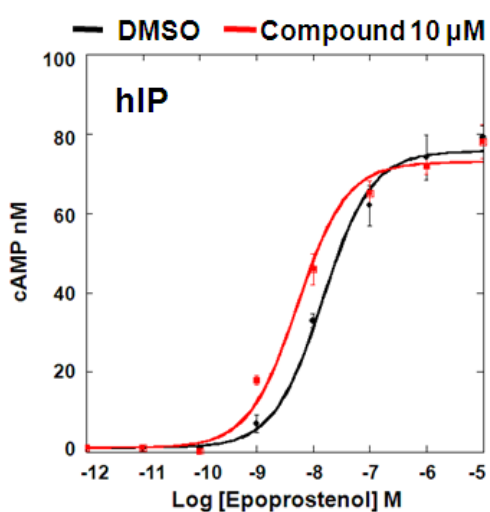
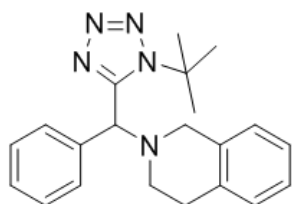


Figure 2-5-51 Effect of change in concentration of the compound on PGI₂ Eporostenol) dose response curve and dose ratio in hIP stably expressing CHO-K1 cell.

HPLC 精製した TS-000005 は、上シフト活性は認められなかった。これは、30 μM でアッセイしても PGI₂ の用量反応曲線を上シフトさせることはなかった (data not shown)。HPLC 精製した TS-000005 20 μM で PGI₂ の用量反応曲線を約 5 倍左シフトさせている。

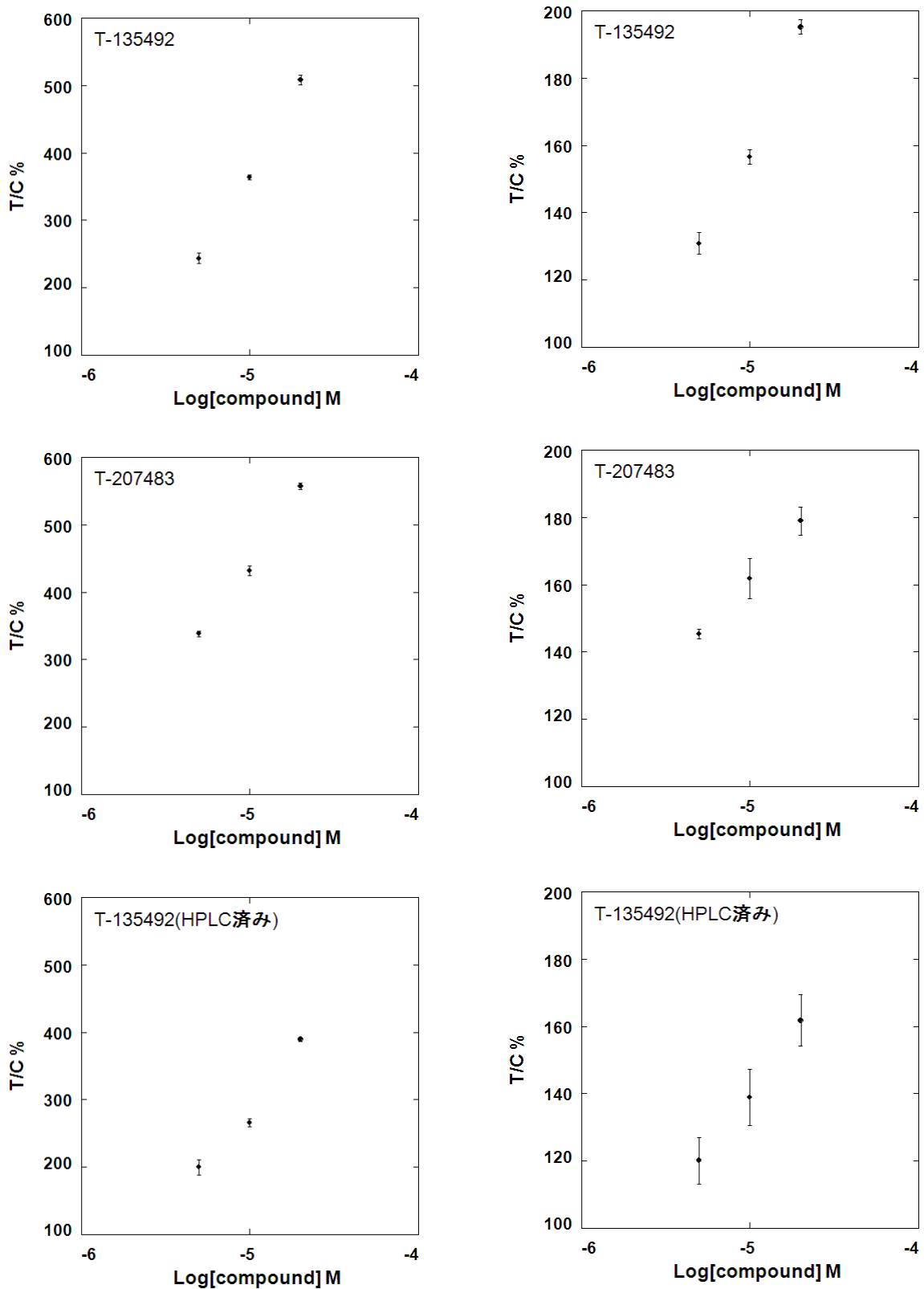


Figure 2-5-52 Effect of change in concentration of the compound on % of control cAMP production (T/C %) stimulated by PGI₂ (Epoprostenol) 10⁻⁹ M (Left side) or PGI₂ (Epoprostenol) 10⁻⁸ M (right side) in hIP stably expressing CHO-K1 cell.

アゴニストである PGI₂ 濃度を 10⁻⁹ M あるいは 10⁻⁸ M で固定し、化合物濃度を変化

させたときのデータである。左側はアゴニスト濃度が 10^{-9} M の時であり、右側は 10^{-8} M の時である。

【考察】

TS-000040はTS-000040 20 μ Mで、 PGI_2 の用量反応曲線を約12倍左シフトさせた。これまでのアロステリックモジュレーター探索研究の論文で報告されている化合物は、30 μ Mで約5倍シフトであったり、50 μ Mで約10倍シフトであったりする。それらと比較すると、TS-000040はかなり活性の高い化合物であると考えられる。それに加え、TS-000040はキラルであるため、もしこの化合物がラセミ体であり、一方の不斉のみが薬理活性を有しているならば、その不斉化合物は極めて強い活性を有していることが示唆される。

今回の実験では、アッセイに使用するアゴニストとして Iloprost より内因性アゴニストである PGI_2 を選択した方が、用量反応曲線を大きく左シフトさせることがわかった。これは、これまでに報告されている他の受容体のアロステリックモジュレーター探索研究において得られた「アゴニストの構造を変化させると、dose ratio も変化する」という知見¹¹ (*Proc. Natl Acad. Sci...* 2010, 107, 4746–4751) と一致する。そもそもアロステリックモジュレーターというものは、それが受容体に結合すると、受容体の構造変化を引き起こし、アゴニストと受容体の親和性が向上すれば左シフトするわけである。 PGI_2 のアゴニスト活性保持に重要な部位に修飾を加え、半減期が多少長いアゴニストとして開発されたのが Iloprost である。そのため、Iloprost をアゴニストとして使用したアッセイの時と PGI_2 をアゴニストとして使用した時とでは、左シフト値が一致しないということは不思議なことではない。定性的に考えると、内因性アゴニストである PGI_2 がよりフィットするように、受容体のコンフォメーションが変化しているのではないだろうか。

また、Iloprost をアゴニストとして使用してアッセイした場合と PGI_2 をアゴニストとして使用した時を比較すると、 PGI_2 をアゴニストとして使用した時の薬理活性の方が、化合物の濃度との間に高い線形性が認められた。つまり、化合物の濃度依存的に薬理活性が増強されていると考えられる。

それに加えて、Figure 2-5-52 からわかるように、アゴニスト濃度を固定して評価化合物の濃度を変化させたとき、コントロールに対して評価化合物の濃度が高くなればなるほど cAMP 産生増強されているといえる。 PGI_2 濃度を 10^{-9} M に固定した時、TS-000040 濃度 20 μ M では、コントロール（コントロールを 100%としている）に対して約 6 倍（600%）も cAMP 産生増強作用を有していることがわかった。

ところで、TS-000005 の純度による薬理活性への影響のことであるが、HPLC 精製していない TS-000005 (Figure 2-5-49)と HPLC 精製した TS-000005 (Figure 2-5-51)の結果を比較すると、HPLC 精製した TS-000005 は、化合物を高濃度添加しても上シ

フトすることはなかった。HPLC 精製していない TS-000005 も 20 μM まで濃度を高くすると上シフトの影響が認められることから、10 μM までは検出限界以下であるが、化合物の濃度をさらに高くすれば、それに比例して不純物の反応系における濃度も高くなるため、上シフトの影響が認められたと結論付けられる。製造年月日が異なれば、つまり Lot が異なれば、含まれる不純物の存在量も異なるため、同一化合物でも Lot の違いが、これまで得られた結果に大きく影響を与えていたと考えられる。

ここで補足として、hIP と mIP のホモロジー解析をすると、identity は 79 % であり、種差を考慮に入れても、他の受容体と比較して低いと考えている。補足データとして、受容体のホモロジー解析のデータや、Ach 受容体のアロステリックモジュレーター結合部位が 2012 年の 2 月に nature に掲載されたので、それぞれの論文からデータを引用し、それも合わせて考察する。

hIPとmIPの膜貫通ドメインとループ領域のホモロジー解析

	<u>I</u>	
human IP	-----MADSCRNLTYVRGSVG PATSTLMFVAGVVG	30
mouse IP	MKMMASDGHPGPPSVTPGSPLSAGGREWQ G**W*I***QD*****	60
	<u>II</u>	<u>III</u>
	NGLALGILSARRPARPSAFAVLVTGLAATDLLGTSFLSPAVFVAYARNSSLLGLARGGPALCDAPAFAMT	100
	*****G**RSH*****V*****C*****H**TM**T*****	130
	<u>IV</u>	
	FFGLASMLILFAMAVERCLALSHPYLYAQLDGPRCARLALPAIYAFCVLFCALPLLGLGQHQQYCPGWSW	170
	*****T*****F**S*****C**S*****E*****	200
	<u>V</u>	<u>VI</u>
	FLRMRAWQPGGAAPSLAYAGLVALLVAAIFLCNGSVTLSSLCRMVYRQQRHQSLSGPRPRTGEDEVDDLIL	240
	*I**S**C*****S*M**TS**F*****YH*****R**H**FV*TS*AR**Y**	270
	<u>VII</u>	
	LALMTVVMVAVCSLPLTIRCFTQAVAPDSSSEMDDLAFRFYAFNPILDPWVFI LFRKAVFQRLKLWVCCL	310
	*****I*****M**G**I**-*R*****N*****F*L**	339
	CLGPAHGDSQTPLSQLASGRRDPRAPSAPVKGEGSCVPLSAWEGEGVEPL--PPTQQSSGSAVGTSSKAE	378
	*ARSV**L*A**RP*****P**TSLQA**W**S**T**A**TAV*LTGGD*CS**MP**S*	409
	ASVACSLC 386	
	*IA***** 417	

Figure 2-5-53 Deference of identity between human IP and mouse IP. The positions of the putative transmembrane segments, I-VII, are underlined above the amino acid sequences. This figure is quoted from *FEBS Letters*. 1994, 344, 74-78.

hIP、hEP1、hEP2、hEP3、hFPとhTP間における膜貫通ドメインとループ領域のホモロジー解析

	<u>I</u>	<u>II</u>	
hIP	(13) SVGPATSTLMFVAGVVGNGLALGIL--SARRPAR-PS--AFAVLVTGLAATDLDLQTSFSLSPAIVFVAYARNSSLLGL		84
hEP2	(17) NSPVTIPAVMFIQGVVGNLVAIVVL--CKSRKEQKET--TFYTLVCGLAUTDLDLQTLVSPVTIATYMKG-QWPGG		88
hEP3	(48) SVSVAFPIITMLLTGFVGNALAMLLVSRSYRRRESKRKK-SFLLCIGWLALTDLVGQLLTPVIVVYLSKQRWEHI		123
hEP1	(32) GASPALPIFSMTLGAVSNLLALALLAQAAGRLRRRSATTFLLFVASSLLATDLAGHVIIPGALVLRLYTAGRA-PAG		107
hFP	(26) RLSVFFSVIFMTVGIILSNLAIAILMKAYQRFQKSKA-SFLLLASGLVITDFFQHLINGAIAVFFVYASDKEWIRF		101
hTP	(24) IASPWFAAASFCVVGSLASNLLALSVLAGA--RQGGSHTRSSFLTFCLGLVLTDFLGLLVGTIVVVSQHAALFEWHAV		98
	<u>III</u>	<u>IV</u>	
hIP	ARGGPALCDAFAMTFFGLASMLILFAMAVRCLALSHFYLYAQLDGP-RCARLALPA-IYAFCVLFCALPLLGLGQHQ		162
hEP2	QP----LCEYSTFILLFFSLSGLSIIICAMSVERYLAINHAYFYSHYVDK-RLAGLTLFA-VYASNVLFCALPNMGLGSSR		162
hEP3	DPSGR-LCTFFGLTMTVFGLSLFIASAMOVERALAIRAPHWYASHMKT-R-ATRAVLLGVWLAVLAFALLPVLGVGQYT		200
hEP1	GA----CHFLGGCMVVFGLCPLLGGCMAVERCVGVTRPPLHAARVSVAR-ARLALAA-VAVALAVALLPLARVGRYE		180
hFP	DQSNV-LCSIFGICMVFSGLCPLLGSVMAIERCIGVTKPIFHSTKITSKH-VKMMLSG-VCLFAVFIALLPILGHRDYK		178
hTP	DPGCR-LCRFMGVVMIFFGLSPLLGAAMASERYLGITRPF SRPASQ-RRWATVGL-VWAAALALGLLPLLGVGRYT		175
	<u>V</u>	<u>VI</u>	
hIP	QYCPGSWCFL-RMR--WAQ----PGGAAPSLAYAGLVALLVAAIFLCNGSVTLSLCRM(13)RPRTEGEVDHLILLAL		243
hEP2	LQYPTWCFIDWTT--NVT-----AHAAYSIMYAGFSSFLILATVLCNVLVCGALLRM(46)FRRIAGAEIQMVILLIA		276
hEP3	VQYPTWCFISTGRGGNGTSSSHNWNLFASAFAPLGLLALVTTFSCNLTATIKALVSR(11)AQWGRI-TTETAIQLMG		286
hEP1	LQYPTWCFIQLGPPG-----GWR-QALLAGLFAFLGLVALLAALVCMNTLSGLALHRA(52)ARRARAHDMVMVQQLVG		301
hFP	IQASRTWCFYNTEDIK-----DWE-DRFYLLLFSLGLLALGVSLLCNAITGITLLRV(6)HROGRSHHLEMVIQLLA		253
hTP	VQYPTWCFITLGA-----ESGDVAFGLLFSMLGLSVGLSFLNLTVSV-ATL--(10)QQRPRDSEVEMMAQLLG		249
	<u>VII</u>		
hIP	MTVVMVAVCSLPLTIRCFQAVA-PDSSSE--MG-----DLLAFRFYAFNPILDPPWFILFRKAVFQRKLW(80)		386
hEP2	TSLVVLICSIPLVVRVFNQLYQPSLER---EVSKNP---DLQAIRIASVNPILDPPWYIILLRKTVLSKATEK(145)		488
hEP3	IMCVLSVCWSPLLIMMLKMIFNQTSVEHCKTHTTEKQKCNFPLIAVRLASLWQILDPPWYILLRKLILRKFQCI(30)		390
hEP1	IMVVSICWSPMLV--LVALAVGGWS-STSLQ--R-PL--FL-AVRLASWQILDPPWYILLRQAVLRQLLRL(37)		402
hFP	IMCVSICWSPFLV--TMANIGINGN-HSLET--C-ET--TLFALRMATWQILDPPWYIILLRKAVALKNLYKL(41)		358
hTP	IMVVASVCWLPFLVFIQTVLRNPPAMSPAQLSRTPE-KELLIYLRVATWQILDPPWYILFRRAVLRRLQPR(21)		343

Figure 2-5-54 Deference of identity among human IP, human EP1, human EP2, human EP3, human FP and human TP. The positions of the putative transmembrane segments, I-VII, are underlined above the amino acid sequences. This figure is quoted from *FEBS Letters*. 1994, 344, 74-78

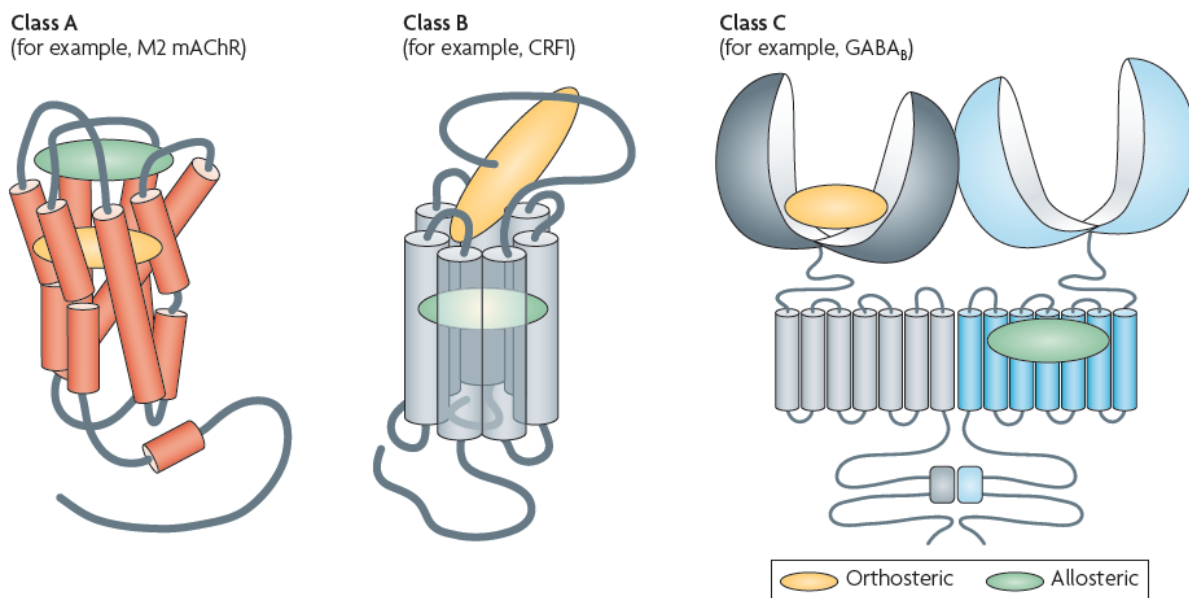


Figure 2-5-55 Structural biology of GPCR orthosteric and allosteric sites. GPCR is classified into class A, class B and class C. Putative orthosteric and allosteric binding sites of each class GPCR. This figure is quoted from *Nature Rev. Drug Discov.* 2009, 8, 41-54.

Figure 2-5-56 Identified orthosteric Binding site and putative allosteric site of Ach receptor M2. This figure is quoted from *Nature Rev. Drug Discov.* **2012**, 482, 547-552.

hIP と mIP の構造を比較すると、膜貫通ドメインの相同性が高く、ループの部分の相同性は相対的に低いことがわかる¹⁹。

Ach の受容体のアロステリックモジュレーターは、ループの部分に結合部位（アロステリック部位）があり、アゴニストの結合部位（オルソステリック部位）の真上に位置している²⁰。これは、あくまでも一例にすぎないが、今回得られたヒット化合物の結合部位がループに存在しているならば、hIP と mIP 間に存在するループ領域のアミノ酸の違い及びそれに起因するコンフォメーションの違いが、mIP に対する薬理活性の低さの原因かもしれない。

それに加えて、*Br. J. Pharmacol.* **1989**, 97, 657-668 では、human、pig、horse の IP は similar であるが、rat の IP は異なっていると結論付けられていることから²¹、マウスでコンセプトを検証するのは困難であるかもしれない。また、Iloprost ではなく、6a-carba PGI₂ や Cicaporst などの別のアゴニストでもアッセイしてみる必要があると考えている。

第 6 節 Binding Assay

【実験目的】

これまでは、2nd メッセンジャーである cAMP を活性測定の指標としてきた。しかし、この評価系では、化合物と受容体間の相互作用を評価することはできない。そこで、放射性物質で標識された Iloprost を用いて、評価化合物存在下でアゴニストの受容体への親和性が向上すること、及び評価化合物とアゴニストが競合しないこと（評価化合物とアゴニストの結合部位が同一であると競合する）を確認することを目的として、Binding Assay を実施した。

【評価系の補足】

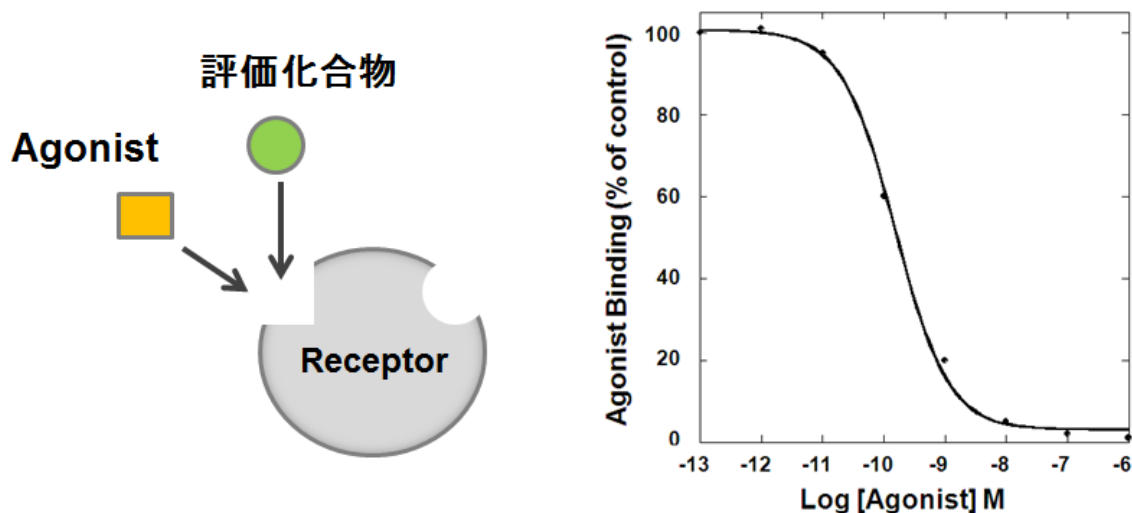


Figure 2-6-1 RI labeled agonist is displaced by non-labeled agonist

もしヒット化合物がアゴニスト結合部位に結合するならば、アゴニストと競合するため、アゴニストは **displace** され、figure 2-6-1 に示すように評価化合物の濃度依存的に **agonist binding** は低下する²²。アロステリックモジュレーターであれば、アゴニストとは別の部位に結合するため、アゴニストとは競合することなく、アゴニストの受容体感受性を高める。すなわち、**agonist binding** は低下しない。

【実験方法】

Cell membrane homogenates (40 μg protein) are incubated for 60 min at 22°C with 6 nM [^3H]iloprost in the absence or presence of the test compound in a buffer containing 10 mM HEPES/KOH (pH 7.4), 1 mM EDTA and 10 mM MnCl_2 . Nonspecific binding is determined in the presence of 10 μM iloprost. Following incubation, the samples are filtered rapidly under vacuum through glass fiber filters (GF/B, Packard) and rinsed several times with ice-cold 50 mM Tris-HCl using a 96-sample cell harvester (Unifilter, Packard). The filters are dried then counted for radioactivity in a scintillation counter (Topcount, Packard) using a scintillation cocktail (Microscint 0, Packard). The results are expressed as a percent inhibition of the control radioligand specific binding. The standard reference compound is iloprost, which is tested in each experiment at several concentrations to obtain a competition curve from which its IC_{50} is calculated.

Reference: *Biochem. Biophys. Acta*, **2000**, 285, 1483

【結果】

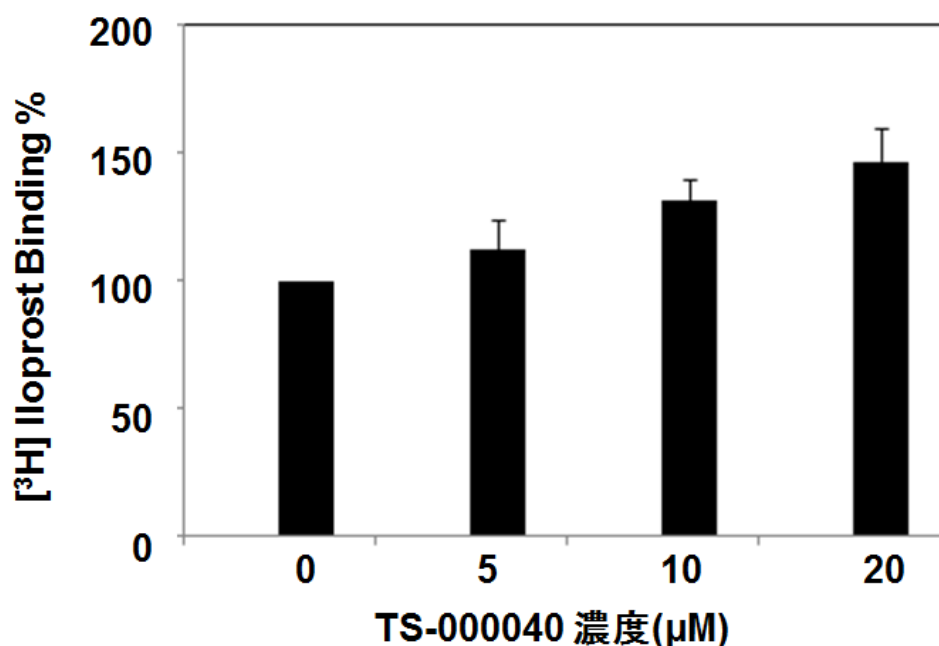


Figure 2-6-2 Effect of change in concentration of TS-000040 on % of control specific Binding. RI labeled agonist is not displaced by TS-000040. IC_{50} value not calculable.

[³H] Iloprost の濃度を固定して、評価化合物の濃度を 5 μM、10 μM、20 μM と上昇させていくと、コントロールに対して [³H] Iloprost の受容体への結合が増加していることがわかった (Fig 2-6-2)。本データでは、評価化合物不添加をコントロールとし、その時の Binding を 100 %としているため、化合物添加すべての条件化で、Agonist Binding の向上が示唆された。

それに加え、TS-000040 は [³H] Iloprost と競合していないことが示唆された。もし、TS-000040 がアゴニストと同じ結合部位に結合するならば、前頁のように、Specific Binding は低下していくはずである。

【考察】

本アッセイの知見として、TS-000040 は [³H] Iloprost と競合していないことが極めて重要である。競合していないことから、オルソステリック部位とは異なる部位に結合していることが示唆される。すなわち、TS-000040 が存在することで、 [³H] Iloprost と競合することなく、コントロールに対する [³H] Iloprost の受容体への感受性が向上していることが明らかとなり、これは、アロステリックモジュレーターの定義（定義：内因性アゴニスト結合部位とは異なる部位に結合し、アゴニスト存在下でその受容体への感受性を向上させる化合物）を満たしているといえる。

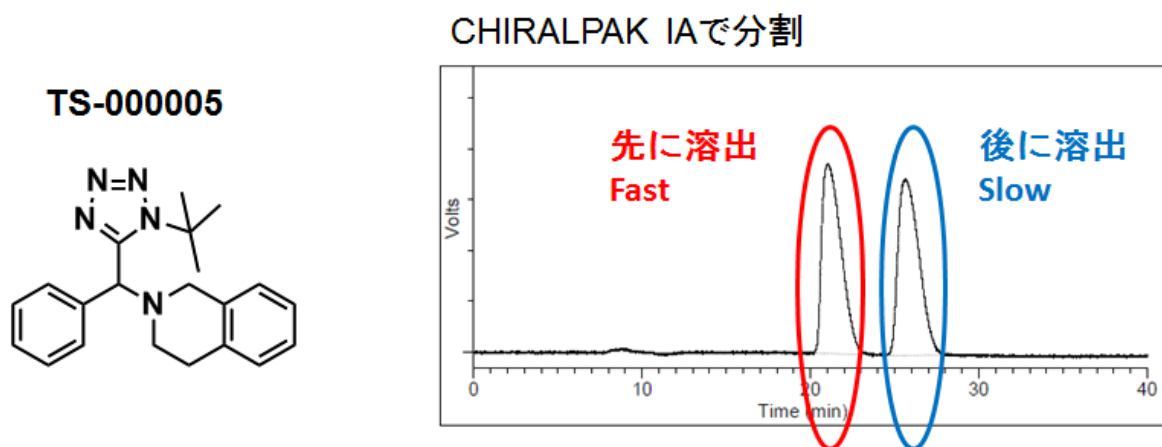
第7節 キラリティーと薬理活性の関係

【実験目的】

これまでアッセイして得られた薬理活性は、すべて評価化合物がラセミ体としての値である。そこで、光学分割することによって、キラリティーの違いによる薬理活性を評価した。

【実験方法 ・ 結果】

Table 2-7-1 Chirality-activity-relationship of Hit compound in cAMP assay



使用したアゴニスト : Epoprostenol

Compound	左シフト値
TS-000005	6.9 μM
TS-000005-F	3.9 μM
TS-000005-S	171.9 μM

<CASE1 : 1cmI.D.X25cmL>

Column :	CHIRALPAK IA
Size :	1 cmI.D. x 25 cmL
Elunet :	n-ヘキサン / エタノール / ジエチルアミン = 90 / 10 / 0.1
Flow rate :	1.9mL/min
Temperature :	25°C
Detection :	254nm
Sample conc. :	500mg/L
Injection :	2.36mL
Interval :	28.0min

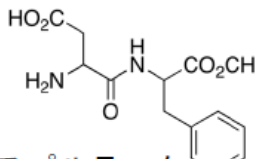
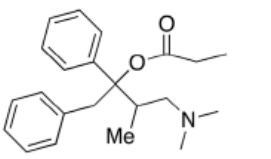
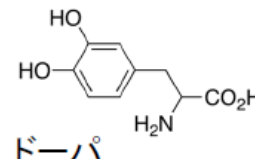
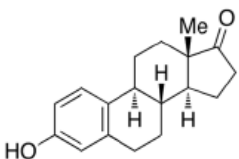
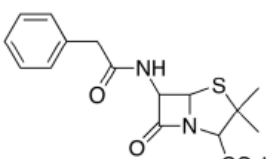
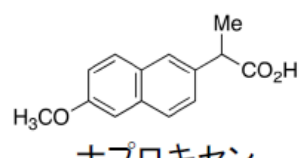
これまで使用していた化合物はラセミ体であったため、上記のようにキラルカラムの HPLC で光学分割し、cAMP アッセイを実施したところ、キラル化合物のうち片方のみ左シフト活性を有していたことが明らかとなった。本研究で見出した TS-000005 はキラリティーが薬理活性に影響するアロステリックモジュレーターである。

【考察】

Table 2-7-2 に示すように、これまでに開発された医薬品及び食品添加物の中には、キラリティーが薬理活性に大きく影響しているものがある。本研究で得られた化合物も片方のキラリティーのみアロステリックモジュレーター作用を有していることが明らかとなった。今回、得られた知見は今後の臨床応用を見据え、極めて重要であると考えている。

Table 2-7-2 Importance of chirality

エナンチオマーの認識

 <p>アスパルテーム</p> <p>(S,S)体 砂糖の200倍甘い (R,R)体 苦い</p> <p>逆の味覚</p>	 <p>プロポキシフェン</p> <p>(+)体 鎮痛作用 (-)体 鎮咳作用</p> <p>異なる作用</p>	 <p>ドーパ</p> <p>(L)体 抗パーキンソン病 (D)体 活性なし</p> <p>一方にのみ活性</p>
 <p>エストロン</p> <p>(+)体 女性ホルモン作用 (-)体 活性なし</p> <p>一方にのみ活性</p>	 <p>ペニシリンG</p> <p>(+)体 抗菌活性あり (-)体 抗菌活性ありなし</p> <p>一方にのみ活性</p>	 <p>ナプロキセン</p> <p>(S)体 鎮痛・抗炎症作用 (R)体 副作用あり</p> <p>一方は薬、他方は副作用</p>

【実験目的】

評価化合物が標的タンパク質である IP に直接作用していることを確認することを目的として実施した。例えば、これまでの cAMP アッセイでは、PDE への影響でも検出されてしまい、IP へのアロステリック作用ではなくとも見かけ上は目的の結果が得られる。

【実験方法】

1. PathHunter Cell を 5000 cells/well となるように 20 μ l/well で分注し、37 $^{\circ}$ C、overnight、incubation。Assay Buffer; Cell plating 0(serum:1 %)
2. 被検化合物を 2.5 μ l/well で分注し、30 分間、37 $^{\circ}$ C で incubation
3. Beraprost を 2.5 μ l/well で分注し、90 分間、37 $^{\circ}$ C で incubation
4. Detection Reagent Working Solution を 12 μ l/well で分注し、60 分間、室温で incubation
5. Plate reader で測定

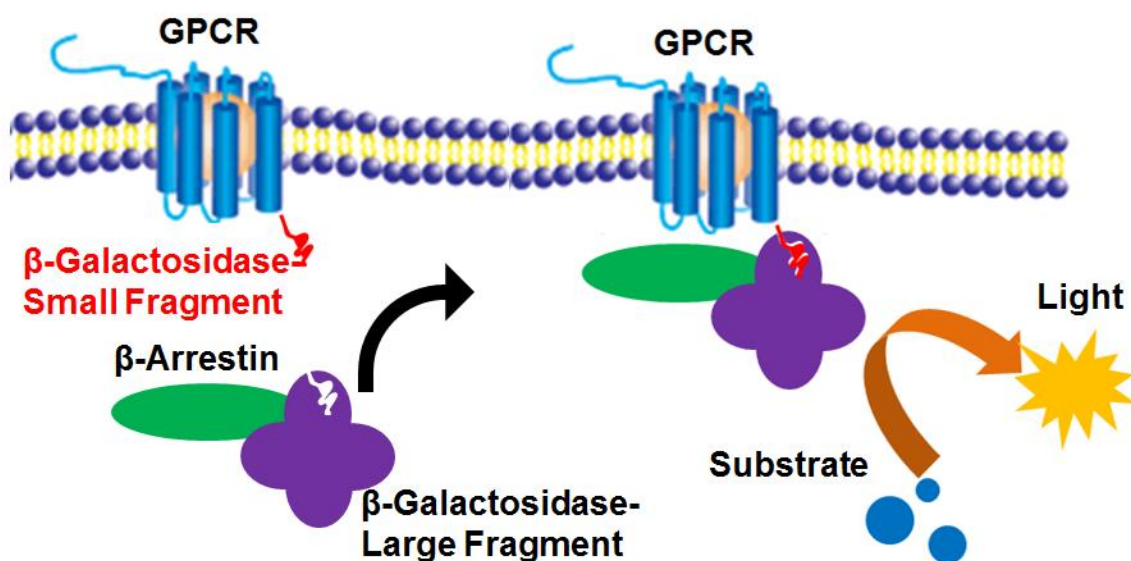


Figure 2-8-1 Assay principle of PathHunter β - Arrestin assay.

※)PathHunter β - Arrestin アッセイについて(Figure 2-8-1)

一般に、GPCR にリガンドが結合することにより β -arrestin がリクルートされ、続いて下流のシグナル伝達が誘導される。本アッセイでは、アゴニストの受容体への結合によって β -arrestin がリクルートされると、GPCR の C 末端側に結合した β -galactosidase の Small fragment (ED)と、 β -arrestin に付加された β -galactosidase の Large fragment (EA)とが再構成されて活性型酵素となる。この β -galactosidase 活性により加水分解された基質の化学発光シグナルを測定することにより、GPCR に対する化合物の作用を同定可能となる。

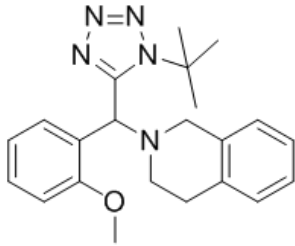
【結果】

Table 2-8-1 Activity of TS-000065 and chirality-activity-relationship of Hit compound(TS-000005) in PathHunter β -Arrestin assay.

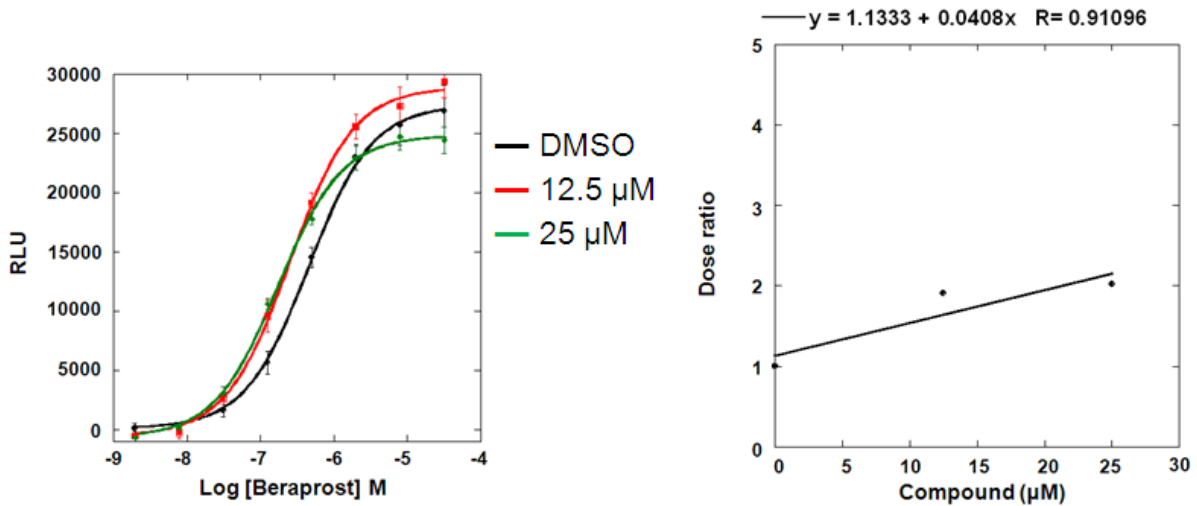
使用したアゴニスト : Epoprostenol	
Compound	左シフト値
TS-000065	21.2 μM
TS-000005-F	10.7 μM
TS-000005-S	N.D.

N.D. indicates not detected

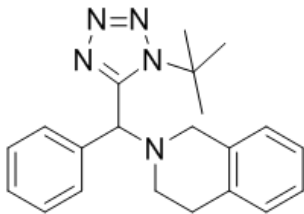
TS-000065
(ラセミ体)



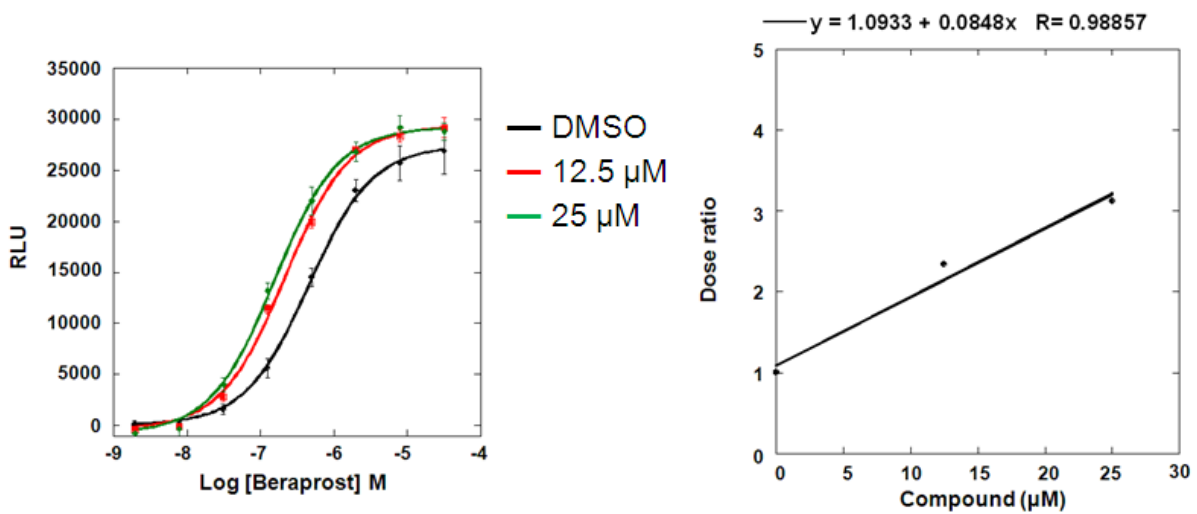
アゴニストの用量反応曲線を2倍左シフトさせるのに必要な化合物濃度
21.2 uM



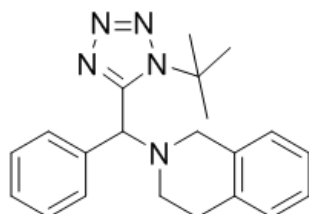
TS-000005-F



アゴニストの用量反応曲線を2倍左シフトさせるのに必要な化合物濃度
10.7 uM



TS-000005-S



アゴニストの用量反応曲線を2倍左シフトさせるのに必要な化合物濃度
- uM

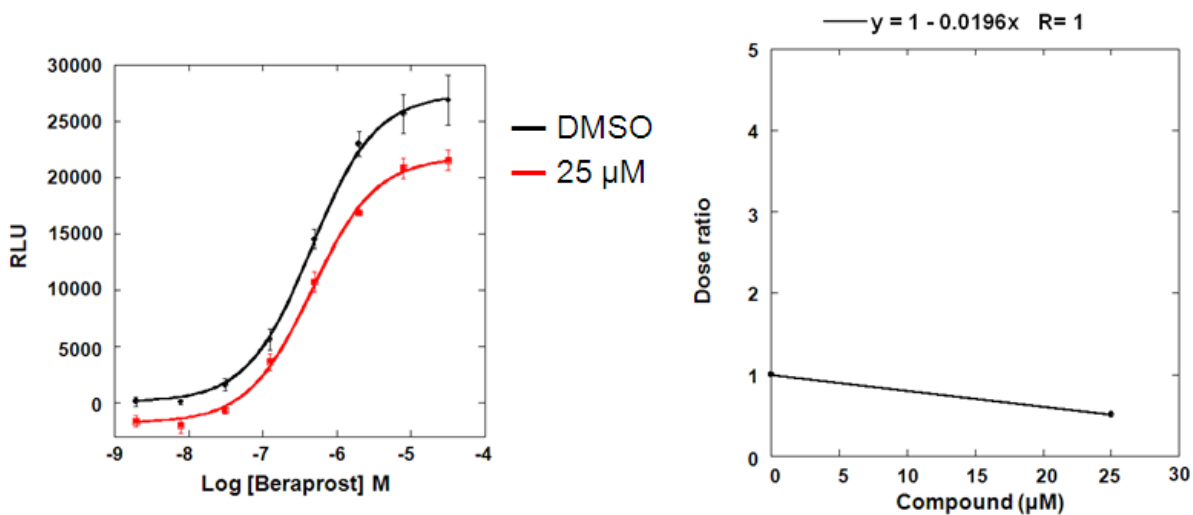


Figure 2-8-2 Effect of change in concentration of TS-000065, TS-000005-F and TS-000005-S on Beraprost dose response curve in PathHunter β -Arrestin assay.

これまで cAMP アッセイ及び Binding アッセイで評価化合物の IP 受容体への作用を確認してきたが、今回の結果により評価化合物が IP に直接作用していることを確認できた。ラセミ体、キラル化合物いずれもこれまでの cAMP アッセイで得られたデータと同様に、キラル化合物の片方のみ左シフト活性を有しており、その活性値もラセミ体の 1/2 であることが確認できた。

◇補足◇

β -Arresitin を指標として、評価化合物によるアロステリックモジュレーター作用が標的タンパク質である IP を直接介していることを確認したが、その PathHunter β -Arrestin アッセイで使用した細胞（宿主は CHO-K1 でこれまで私が使用してきた宿主と同じである）で cAMP アッセイしてみた。

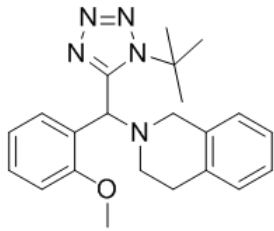
【実験目的】

本アッセイでは、GPCR（つまり IP 受容体）の C 末端側に β -galactosidase の Small fragment が結合しているため、native な IP 受容体とは異なるが、そもそもこの受容体を発現した細胞で、この IP を介して cAMP が産生されるかどうか確認することを目的として実施した。

【実験方法】

IP アゴニストである Epoprostenol を 10^{-12} ~ 10^{-7} M で添加すると同時に、被検化合物を 12.5 μ M (Final)、25 μ M (Final)、50 μ M (Final)、100 μ M (Final) で添加し、PathHunter β -Arresitin Cell を、7000 cells/well となるように 5 μ l/well で分注し反応開始させた。40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した後、Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で蛍光を測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。Assay Buffer は、Cell Plating 0(serum;1 %)を使用した。

TS-000065
(ラセミ体)



アゴニストの用量反応曲線を2倍左シフトさせるのに必要な化合物濃度
8.4 μM

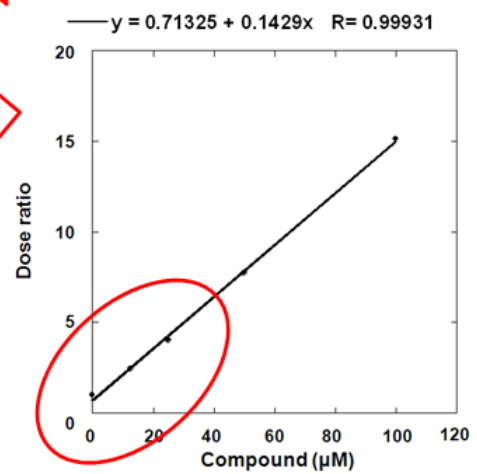
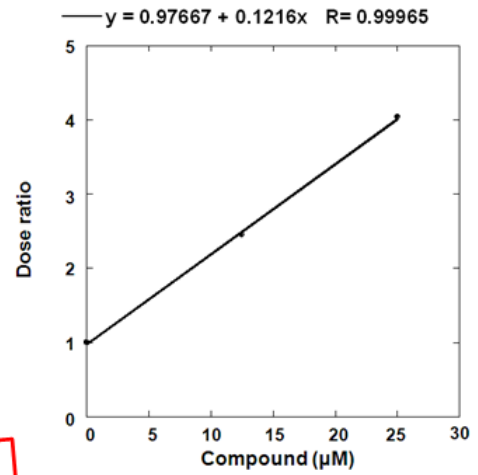
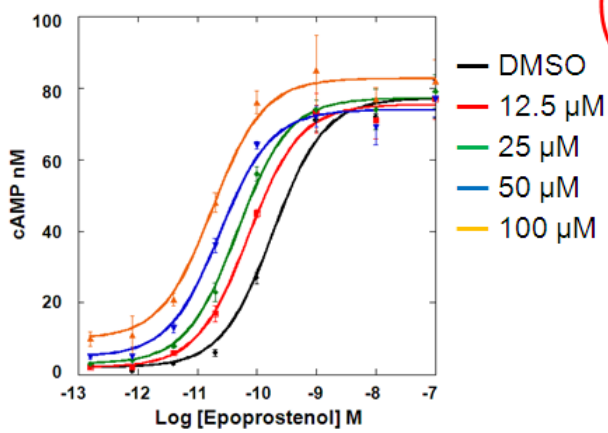
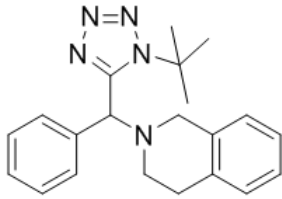


Figure 2-8-3 Effect of change in concentration of TS-000065 on Epoprostenol dose response curve in PathHunter β -Arresitn assay.

TS-000005-F



アゴニストの用量反応曲線を2倍左シフトさせるのに必要な化合物濃度
4.2 μM

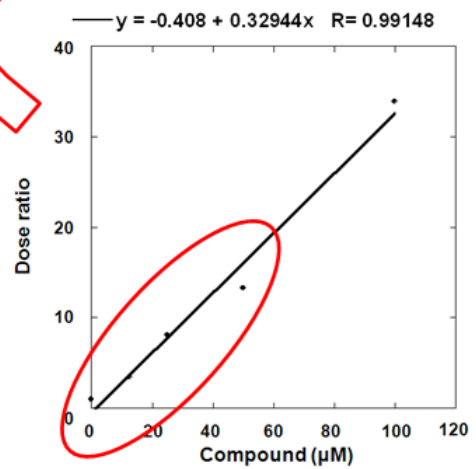
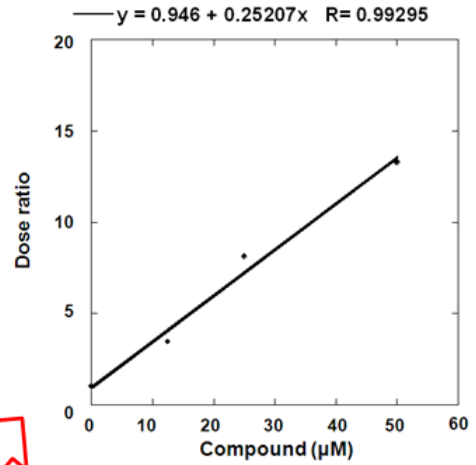
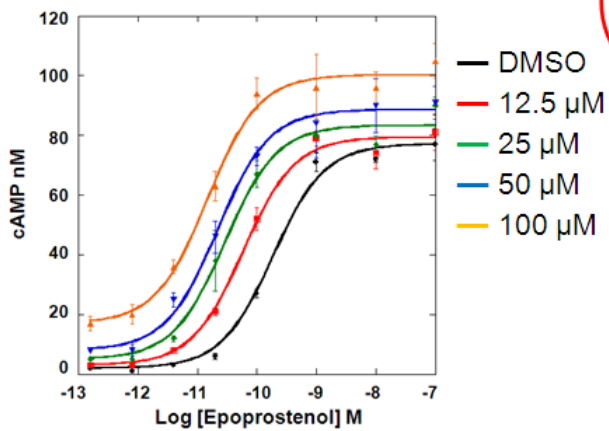


Figure 2-8-4 Effect of change in concentration of TS-000005-F on Epoprostenol dose response curve in PathHunter β -Arresitn assay.

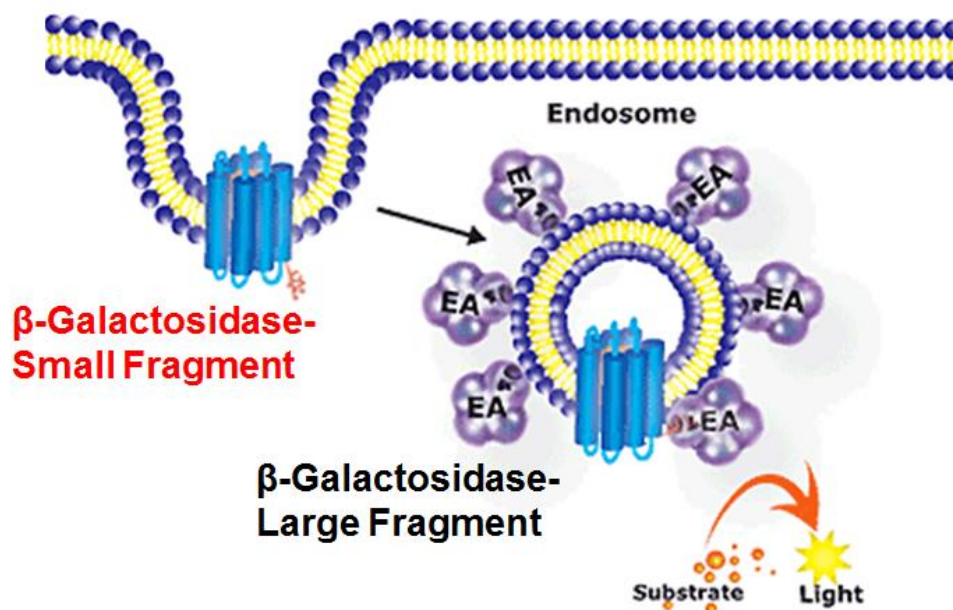
TS-000065 も TS-000005-F いずれも左シフト活性が確認できた。

【実験目的】

評価化合物が標的タンパク質である IP に直接作用していることを確認することを目的として実施した。例えば、これまでの cAMP アッセイでは、PDE への影響でも検出されてしまい、IP へのアロステリック作用ではなくとも見かけ上は目的の結果が得られる。

【実験方法】

1. PathHunter USOS Cell を 5000 cells/well となるように 20 μ l/well で分注し、37°C、overnight、incubation。Assay Buffer; Cell plating 5 (serum: 約 1 %)
2. 被検化合物を 2.5 μ l/well で分注し、30 分間、37°C で incubation
3. Beraprost を 2.5 μ l/well で分注し、180 分間、25°C で incubation
4. Detection Reagent Working Solution を 12 μ l/well で分注し、60 分間、室温で incubation
5. Plate reader で測定



※)PathHunter Internalization アッセイについて

本アッセイも、PathHunter β arrestin recruitment アッセイの時と同様に、フラグメントアッセイを利用したものである。細胞のエンドソーム表面に局在化した β -Galactosidase の Large fragment と、ターゲット受容体の C 末端に付加された相補的な β -Galactosidase の small fragment が、アゴニストの刺激によりターゲット受容

体が細胞内に取り込まれ、エンドソームへの輸送が起こった時に、アレスチンに依存せずに2つの酵素断片の補完が起こることで、酵素活性の増加を化学発光検出試薬により評価可能となる。

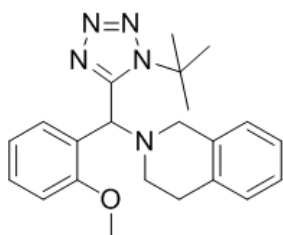
【結果】

Table 2-8-2 Activity of TS-000065 and chirality-activity-relationship of TS-000005 in PathHunter U2OS Internalization assay.

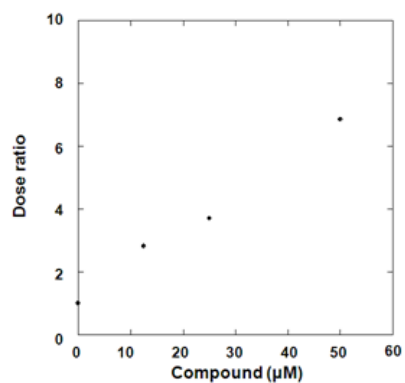
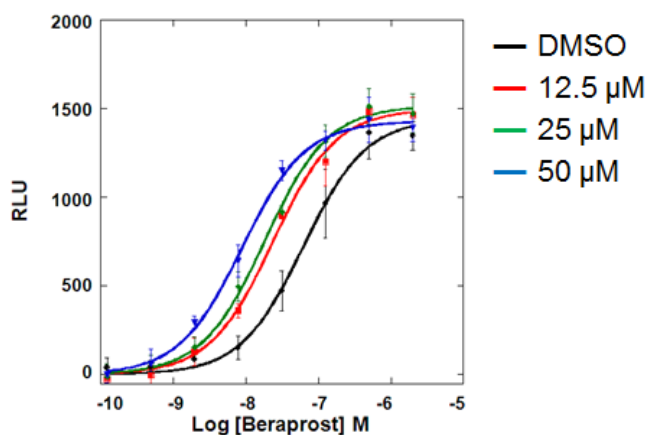
使用したアゴニスト : Epoprostenol

Compound	左シフト値
TS-000065	9.2 μM
TS-000005-F	8.7 μM

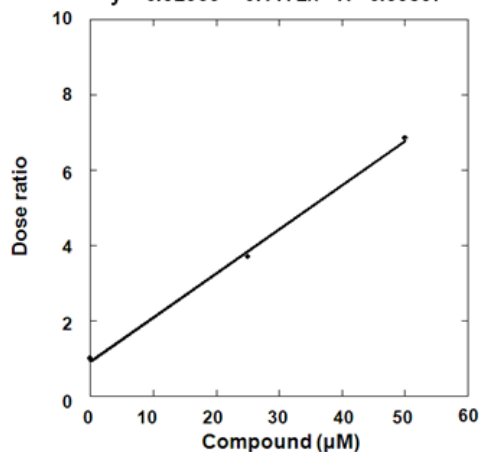
TS-000065



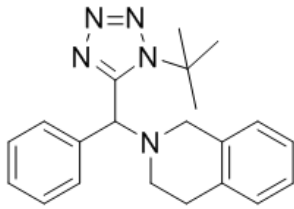
アゴニストの用量反応曲線を2倍左シフトさせるのに必要な化合物濃度
9.2 μM



$$y = 0.92333 + 0.1172x \quad R = 0.99897$$



TS-000005-F



アゴニストの用量反応曲線を2倍左シフトさせるのに必要な化合物濃度
8.7 μ M

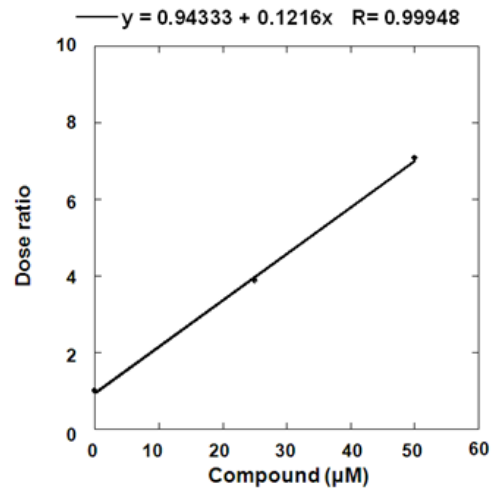
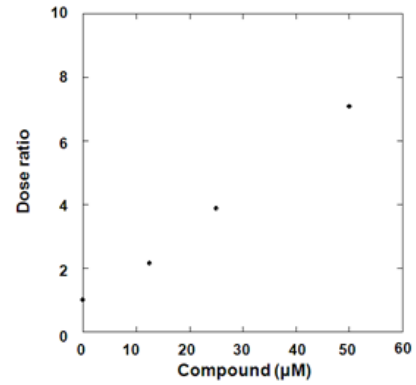
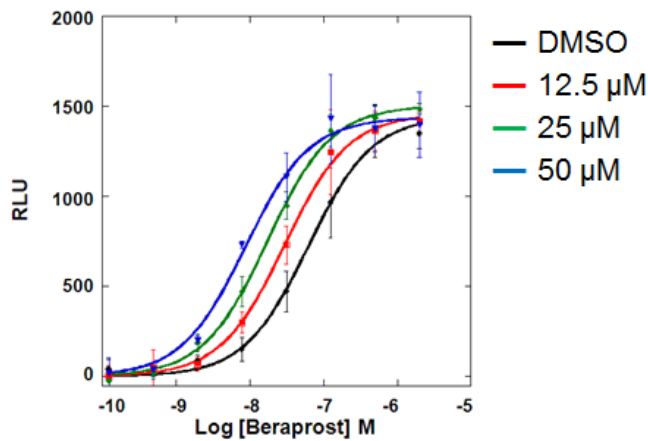


Figure 2-8-5 Effect of change in concentration of TS-000065 and TS-000005-F on Beraprost dose response curve in PathHunter U2OS Internalization assay.

これまで cAMP アッセイ及び Binding アッセイで評価化合物の IP 受容体への作用を確認してきたが、今回の結果により評価化合物が IP に直接作用していることを確認できた。ラセミ体、キラル化合物いずれもこれまでの cAMP アッセイで得られたデータと同様に、アロステリックモジュレーター活性が認められた。

【考察】

PathHunter β -Arresitin アッセイ及び PathHunter Internalization アッセイの実施によって、評価化合物の IP 受容体に対するアロステリックモジュレーター作用が直接受容体を介していることが確認できた。前者の細胞で、cAMP アッセイを実施した結果では、これまでの結果より活性値が約 1/2 になっていたが、これは使用したアッセイバッファーに含まれる血清が 1 %であったため、これまで実施してきたアッセイバッファーでは 0.1 % BSA であることから、評価化合物のタンパク質への吸着が活性値の低下を招いた原因であると考えられる。実際に、評価化合物のタンパク質結合率は 99.9 % であり、4 % BSA 条件下での cAMP アッセイでは、その左シフト活性は顕著に低下した（第 2 章、第 9 節参照）。

ところで、PathHunter β -Arresitin アッセイで得られた左シフト比は、cAMP アッセイで得られた左シフト比と比較すると、活性値は低い。これは、内在性の β -Arresitin-1 と β -Arresitin-2、及び遺伝子導入した β -Arresitin-2- β -Gal 間で、アゴニストのシグナルを奪い合うためであると考えられる。DiscoverX 社では、そもそも β -Arrestin-1- β -Gal や β -Arrestin-2- β -Gal を導入して安定発現株にしており、ターゲットにする GPCR やホスト細胞により、良いデータの取れる方を使っているようである。 β -Arrestin-2- β -Gal は、刺激前に GPCR 近傍に移行することが多いのか、ベース活性が高いため、S/N 比が出にくく、高発現株にしていけないよである。その為、 β -Gal の結合していない野生型 β -Arrestin との競合が起こり、反応性が低下していると考えられる。

第9節 タンパク質結合率と薬理活性

【実験目的】

今後の *in vivo* 評価を見据え、TS-000065 のタンパク質結合率を評価した。

【実験方法】

透析手法と LC/MS/MS を組み合わせて、測定した。

Protein binding (plasma, human)

Test concentration :10 μ M

Source: human plasma

Technique :Equilibrium dialysis Incubation 4 hr / 37 °C

Detection method :HPLC-MS/MS

Reference: Acebutolol, Quinidine, Warfarin

Assay included in: Bioavailability Acebutolol, Quinidine, Warfarin

参考文献 : Banker, M.J et al.(2003) J. Pharm. Sci., 92: 967-974.

【結果】

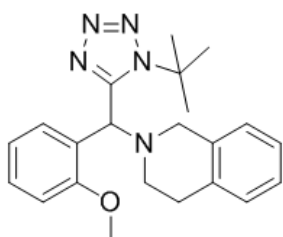
human plasma を対象にしたタンパク質結合率は 99.9%であることがわかった。

【実験目的】

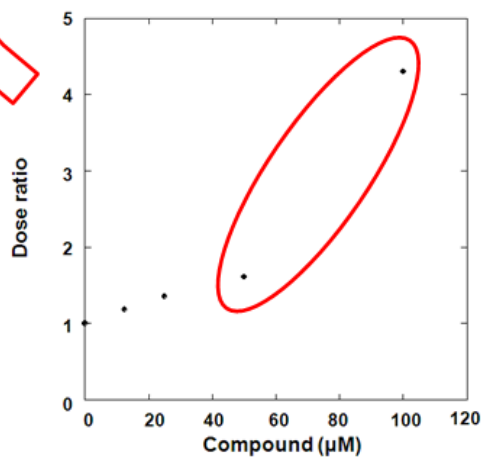
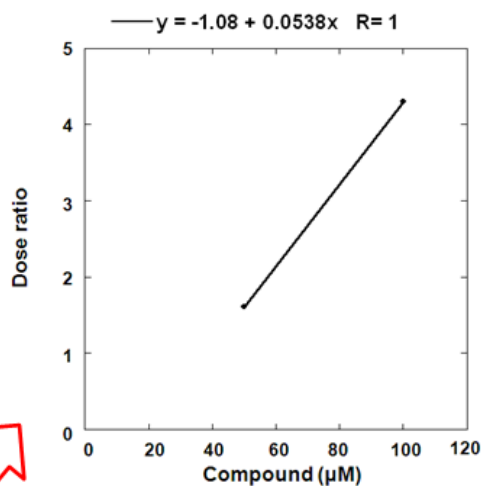
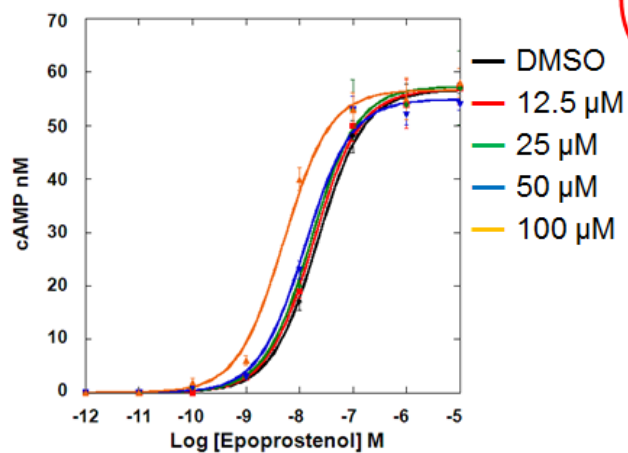
ここまでの評価化合物の活性値は、すべて 0.1 % BSA の Buffer で cAMP アッセイを実施した結果である。今後、*in vivo* でコンセプトを検証する上で、評価化合物のタンパク質結合率を把握する必要がある。そこで評価化合物のタンパク質結合による薬理活性への影響を評価することを目的として、4% BSA の条件で cAMP アッセイを実施した。

【結果】

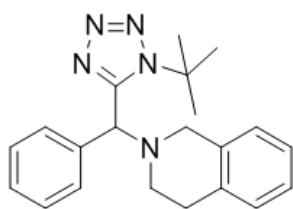
TS-000065



アゴニストの用量反応曲線を2倍左シフトさせるのに必要な化合物濃度
57.2 μ M



TS-000005-F



アゴニストの用量反応曲線を2倍左シフトさせるのに必要な化合物濃度
39.3 μ M

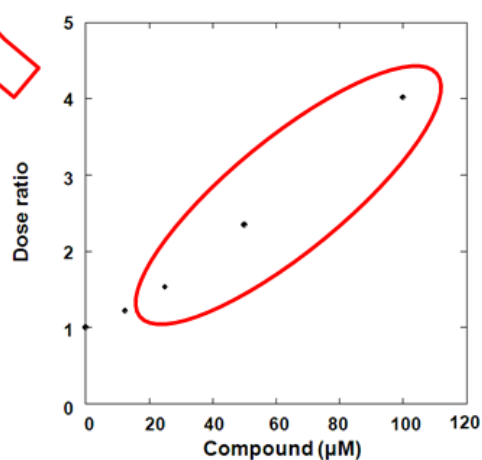
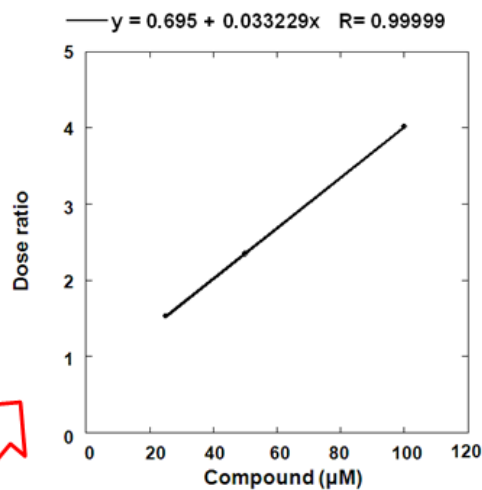
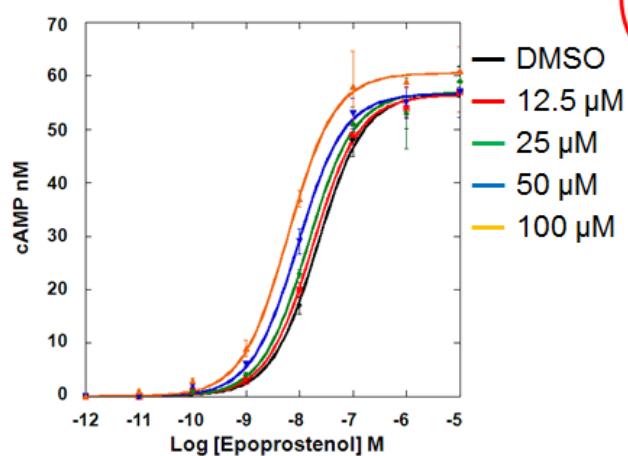


Figure 2-9-1 Effect of change in concentration of TS-000065 and TS-000005-F on Epoprostenol dose response curve in Cell based cAMP assay.

4 % BSA 条件下での cAMP アッセイを実施した結果では、評価化合物の左シフト値が大きく低下した。これは、評価化合物のタンパク質への吸着が活性値の低下を招いたと考えられ、評価化合物のタンパク質結合率は 99.9 %であることが、この結果を裏付けている。

第 10 節 Supplementary data

High Throughput Screening 評価系の構築

PGI₂の受容体である IP は Gs 共役の GPCR であるため、IP 刺激により産生される cAMP を活性測定の指標とした。IP と相互作用することでアゴニスト存在下における cAMP 産生を増強させる化合物を探索するために、cAMP 検出系として HTRF システムを採用し、高感度 High Throughput Screening を行った。IP 強制発現細胞にアゴニストである Iloprost と共に評価化合物を添加し、cAMP を定量することで化合物を評価した。具体的には、FRET のドナーとして Eu³⁺錯体を、アクセプターとして近赤外蛍光物質 d₂ を用いた。通常の有機化合物は蛍光寿命がナノ秒と非常に短いですが、Eu³⁺錯体の蛍光はサブミリ秒と長寿命であるため、パルス励起光照射後、一定時間後に蛍光測定を実施することで、夾雑する蛍光の妨害を除くことができ、長寿命蛍光のみを特異的に検出できる利点がある。この時間分解蛍光測定法と FRET を組み合わせることで、自家蛍光等の background 蛍光を除去でき、S/N 比を大きく向上させることが可能となる。

この cAMP 評価系は、抗 cAMP 抗体-cryptate に対する、細胞で産生された cAMP と評価試薬である cAMP-d₂ との競合アッセイである。抗体-cryptate が d₂ と相互作用した場合には FRET を起こし、d₂ の蛍光波長である 665nm の蛍光が観察され、一方、抗体-cryptate が細胞で産生された cAMP と相互作用した場合には FRET は起こらず、cryptate の蛍光波長である 620nm の蛍光が観察される。この二波長の蛍光の比から d₂ と cryptate の FRET 効率を計算し、Delta F を求め標準試薬から作成した検量線に従い cAMP 濃度を算出する。

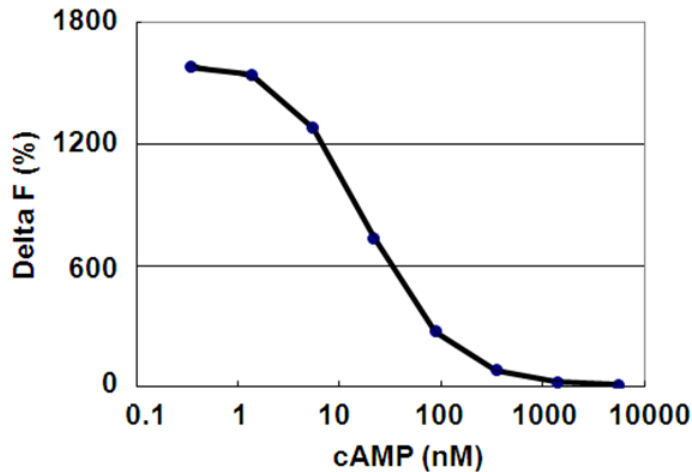
$$\text{Delta F} = (\text{Standard or sample Ratio}) - \text{Ratio}_{\text{neg}} / \text{Ratio}_{\text{neg}} \times 100$$

測定におけるバックグラウンドの補正のために算出している

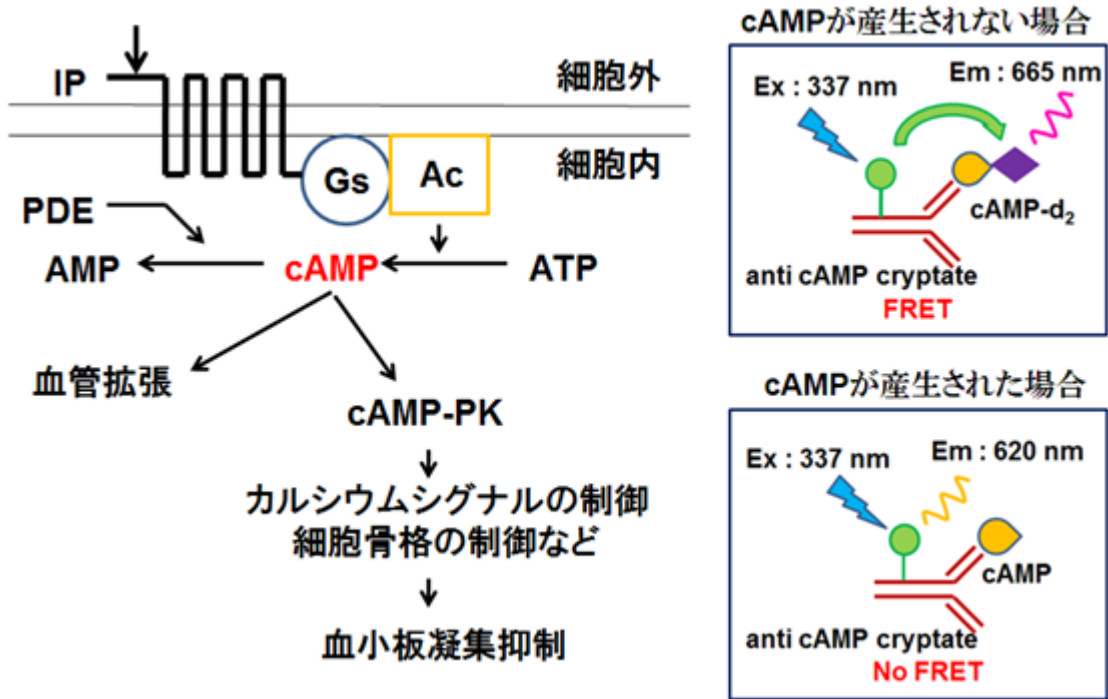
$$\text{Ratio} = A_{665\text{nm}} / B_{620\text{nm}} \times 10^4$$

FRET 効率の算出

Ratio_{neg} は negative control (Assay buffer と anti cAMP 抗体-cryptate のみ混合) の Ratio であり、d₂ 由来の 665nm の蛍光を持たないため、観測される蛍光は cryptate 由来となる。



Supplementary figure 2-10-1 Standard curve of detection for cAMP.



Supplementary figure 2-10-2 Assay principle of cAMP Cell-Based Assay

Delta F 値に対する cAMP の検量線を見ると、1 nM から 100 nM の濃度域で、最も高感度に cAMP を検出可能であるとわかった。そこで、384 plate の 1 well あたりの細胞数を 2000 cells/well から 10000 cells/well まで濃度をふり、IP アゴニストの用量反応曲線が、その検出感度が良好な領域に収まるように条件を検討した。その結果、約 7000 cells/well でアッセイを実施することにした。

High Throughput Screening の条件検討

【実験目的】

スクリーニングを実施するにあたり、ばらつきの程度を把握する必要がある。そこで評価化合物の代わりに DMSO を用いて、Iloprost を EC40 の濃度でアッセイを実施した。その際に、反応させている間に温度や湿度管理したものとそうでないものを用意し、アッセイへの影響（プレートの端と中央の部分の値の差に影響を及ぼすか否かを検討する）を把握する。

【実験方法】

CHO-K1 細胞を宿主に、ヒト IP 受容体 (hIP) を安定的に発現させた細胞株を選択した。Pod システムで、DMSO を分注した後、IP アゴニストである Iloprost を 300pM (Final) (EC40 濃度) で添加し、40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した。Cisbio 社の cAMP アッセイキット (cAMP HiRange Jumbo) を用いた HTRF 法で測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を算出した。

S1105112~S1105114 は厳密な温度・湿度管理なし (プレート重ねた)

S1105115~S1105117 は厳密な温度・湿度管理あり (引き出しにいれ、プレート重ねなかった)

【プロトコール】

1. Iloprost + 被検化合物 5ul をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. hIP 安定発現細胞を、8000cells/well となるように 5ul/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5ul/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5ul/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. Pheraster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より反応 cAMP 量を計算する。
7. Iloprost で誘導される cAMP 濃度を 100%とした際の、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を T/C%で表記する。

Table 2-10-1 アッセイフォーマット

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	Negative																						Std 1	Std 5
B	Control																							
C	-d2																							
D																								
E																								
F																							Std 2	Std 6
G																								
H																								
I																								
J																								
K																							Std 3	Std 7
L																								
M																								
N																								
O																								
P																								

reference n=16 Lane3 – Lane22 は n=320
Edge n=40
Center n=40

プレートを使用したアッセイでは、しばしばプレートの端と中央部分で値に差が生じることがある。一般に、端の方が、中央に比べて相対的に高く（あるいは端に比べて中央は相対的に低く）なることが見受けられる。このようにプレートの真ん中が低い原因は、可能性が高い順から下記のように考えられる。

- 1) 温度ムラ（細胞サスペンションは室温で行っているか、低温で行っているかなど）
- 2) Iloprost 分注ムラ（Iloprost リザーバーの液量は十分かどうか、ノズル外周液まで含めた分注量のムラはないか）
- 3) プレート素材（生産時の不純物混入、細胞応答に不利）
- 4) plate reader の不具合（PMT 検出管と液面の距離が一定でない、プレートステージの動作不良など）

従来は、40 分反応させている間、室温でプレートを重ねて静置させていたが（HTS 室は年中 25℃に保たれているため、ある程度温度と湿度は管理されていると考えられる条件）、引き出しにプレートを重ねることなく敷き詰めて、かつキムワイプを濡らして湿度管理をした場合（より厳密に温度・湿度管理した条件）とで、端と中央の値の差に影響を及ぼすのか否かを検討すべく上記アッセイを実施した。

【結果】

Table 2-10-2 プレートごとの評価項目の比較

		Average	s.d.	Max	Min	C.V.	T/C%
S1105112	reference	66.6	4.47	76	61	6.71	100.0
	Lane3 - 22	63.7	3.92	77	54	6.16	95.6
	Edge	64.6	3.10	71	56	4.81	97.0
	Center	62.2	3.92	72	56	6.31	98.4
	Difference	2.4					3.6
S1105113	reference	63.2	4.30	70	56	6.80	100.0
	Lane3 - 22	60.5	3.91	72	46	6.46	95.7
	Edge	61.3	3.49	70	54	5.70	97.0
	Center	59.3	3.96	68	48	6.68	98.8
	Difference	2.1					3.3
S1105114	reference	62.9	4.68	71	56	7.44	100.0
	Lane3 - 22	61.1	3.71	70	50	6.07	97.1
	Edge	62.9	2.99	70	57	4.76	100.0
	Center	60.0	3.76	68	51	6.26	95.5
	Difference	2.8					4.5

		Average	s.d.	Max	Min	C.V.	T/C%
S1105115	reference	62.8	3.76	70	56	5.98	100.0
	Lane3 - 22	60.5	3.87	73	52	6.39	96.2
	Edge	62.5	4.16	73	55	6.66	99.5
	Center	59.2	3.47	67	52	5.86	94.2
	Difference	3.3					5.3
S1105116	reference	61.1	4.00	67	54	6.55	100.0
	Lane3 - 22	61.3	3.50	72	51	5.72	100.3
	Edge	62.9	2.85	68	55	4.52	103.1
	Center	59.9	3.94	71	53	6.57	98.1
	Difference	3.0					4.9
S1105117	reference	60.7	4.09	68	54	6.74	100.0
	Lane3 - 22	57.8	3.30	68	48	5.71	95.3
	Edge	59.3	3.11	68	52	5.23	97.8
	Center	57.3	2.67	64	51	4.66	94.4
	Difference	2.1					3.4

CV 値は 6 前後であることから、ばらつきの程度は問題になるレベルではないことがわかった。反応の間の温度・湿度管理の仕方を変えても、特に端と中央の値の差の違いは見られなかった。端と中央の値の差は、T/C% 値として約 4% 前後であることがわかった。実際に、この差が今後約 8 万化合物を用いてアッセイをした際に、化合物を評価する上で問題となるレベルなのか、問題となるレベルではないのかを考察したい。

そこで、すでに取得したヒット化合物をポジティブコントロールとして、現在のアッセイ条件で再現よく化合物が評価可能か否かを確認するために、下記の実験を実施した。

【実験目的】

MQ0800010 (Lane3~Lane22 までの 320well それぞれに異なる評価化合物が入って

いるプレートで、TS-006900(評価化合物)は K13 に入っている) のプレートを用いて、Iloprost を EC40 の濃度でアッセイを実施した際に、同日内で再現すること及び異なる日においても同様に再現することを確認する目的で、アッセイを実施した。

【実験方法】

CHO-K1 細胞を宿主に、ヒト IP 受容体 (hIP) を安定的に発現させた細胞株を選択した。Pod システムで、MQ0800010 (TS-006900 (評価化合物) が K13 に入っている) を Final 5uM となるように分注した後、IP アゴニストである Iloprost を 300pM(Final) (EC40 濃度)で添加し、40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した。Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を算出した。同一プレートを 3 枚調製し、再現性を確認した。

S110518~S110520 は同じ日にアッセイ

S110606_1~S110606_3 は同じ日にアッセイ

【プロトコール】

1. Iloprost + 被検化合物 5ul をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. hIP 安定発現細胞を、8000cells/well となるように 5ul/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5ul/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5ul/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. Pheraster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より反応 cAMP 量を計算する。
7. Iloprost で誘導される cAMP 濃度を 100%とした際の、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を T/C%で表記する。

【結果】

Table 2-10-3 再現性チェック

S1105118 T/C%表示

3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
96	104	113	96	96	99	107	97	119	94	88	96	95	97	97	99	105	96	92	90	
105	102	100	102	103	96	109	104	90	99	102	80	92	104	99	99	108	106	95	108	
96	83	95	99	93	91	92	91	94	94	96	95	80	111	103	101	102	94	88	87	
104	103	102	105	105	90	92	112	104	85	94	104	102	93	106	105	101	93	94	109	
98	81	101	103	103	99	101	112	100	94	93	109	107	93	92	99	100	103	94	97	
101	102	103	109	110	100	102	97	90	148	94	99	96	96	105	104	114	79	109	107	
93	98	95	90	94	91	89	81	92	97	103	89	94	90	94	87	94	97	102	92	
108	90	94	94	87	106	95	98	93	147	106	96	98	97	101	100	105	104	95	99	
100	88	101	104	81	99	94	94	96	106	94	91	90	96	100	103	101	97	92	111	
110	101	106	143	100	88	93	95	99	114	90	111	95	102	100	94	95	119	105	100	
103	95	132	90	91	93	100	95	90	95	137	92	105	99	115	101	97	108	99	106	
101	105	92	92	99	105	105	105	98	93	104	101	101	101	100	107	93	106	97	102	
111	99	93	105	99	94	98	91	93	92	91	89	102	105	104	90	98	99	104	86	
97	90	105	102	99	91	84	97	93	95	90	103	106	90	101	95	106	90	108	94	
101	101	97	98	98	94	95	89	95	92	107	94	100	99	98	100	93	98	95	91	
103	108	96	96	87	88	100	100	100	107	100	109	106	98	100	108	104	101	98	94	103

S1105119 T/C%表示

3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
93	101	90	90	101	113	107	98	101	102	103	100	106	95	101	103	89	103	99	106
95	96	91	99	95	92	107	101	104	102	114	99	96	102	94	106	100	96	93	91
100	89	87	94	101	96	93	95	99	107	96	107	80	95	101	108	86	96	94	105
97	99	109	105	101	95	94	100	104	90	100	98	99	86	98	104	84	107	101	104
89	81	101	99	107	97	106	91	95	101	91	96	96	97	100	104	95	105	100	95
95	96	99	107	99	100	94	91	94	161	101	102	97	104	99	105	122	101	104	110
92	90	111	115	100	101	98	102	98	95	88	88	86	91	114	88	94	93	94	100
93	93	79	100	102	100	92	92	87	142	100	90	93	112	100	102	104	80	103	101
101	114	107	94	92	92	105	96	99	101	101	101	94	91	96	95	105	105	109	102
107	108	98	188	84	108	98	99	104	117	95	99	100	94	91	101	94	124	97	100
96	106	118	98	106	107	109	95	95	101	145	89	91	92	113	109	87	100	95	109
92	93	100	101	91	101	102	102	84	109	99	105	107	107	93	103	93	105	106	102
84	95	102	93	95	91	87	97	100	95	99	93	96	90	94	102	99	100	105	88
105	104	99	100	93	86	84	85	97	94	97	106	90	102	104	95	95	94	111	97
86	94	102	99	103	102	100	95	94	88	103	93	91	96	97	102	96	97	98	99
100	104	105	106	103	88	99	102	111	102	104	99	89	126	92	94	102	103	103	98

S1105120 T/C%表示

3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
97	118	105	100	115	112	98	99	98	107	96	100	109	115	110	109	101	101	96	104	
105	112	100	99	109	99	92	108	108	114	111	109	106	104	97	124	118	101	100	96	
102	92	95	103	104	105	97	95	119	95	107	107	82	107	98	103	107	101	107	104	
103	107	101	115	116	98	80	99	115	93	115	124	108	104	115	103	100	95	104	117	
107	81	109	116	107	102	108	101	120	125	98	96	108	108	105	104	100	108	107	90	
107	110	121	104	110	104	110	110	92	134	102	118	102	96	111	119	134	106	106	107	
98	102	105	116	101	110	97	101	94	105	102	95	106	104	109	95	105	98	100	82	
99	103	112	101	117	104	88	100	121	156	106	99	105	111	85	99	108	103	116	105	
107	116	113	111	91	96	94	96	111	106	113	107	112	98	101	97	113	117	95	98	
108	95	105	146	101	88	102	106	101	122	98	111	90	101	103	109	105	126	119	111	
101	95	100	99	91	99	96	94	106	99	135	97	102	109	137	112	103	104	107	97	
104	110	101	108	112	99	105	98	101	92	103	103	107	108	102	95	107	97	102	108	
112	95	114	99	100	96	99	103	92	106	95	99	96	98	92	104	103	98	116	97	96
105	89	97	93	93	88	88	95	112	95	106	100	110	107	108	104	95	109	99	106	
104	103	102	102	104	105	103	93	109	102	97	100	93	96	98	95	101	101	103	110	
100	102	108	110	114	98	111	114	101	91	113	109	106	102	114	104	102	107	112	115	

	S1105118	S1105119	S1105120	Average	s.d.
T-006900	137	146	135	139.3	5.9

S110606_1 T/C%表示

3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
93	95	103	95	102	101	94	91	91	90	82	98	87	104	105	100	102	95	98	93
98	104	94	92	89	91	104	95	97	109	98	92	95	97	95	101	92	95	94	87
97	94	92	88	95	95	97	100	92	87	93	92	89	90	87	90	93	112	96	89
92	89	94	91	95	95	94	101	91	84	94	94	107	82	90	95	94	108	95	100
89	84	85	103	93	112	95	80	100	92	92	90	90	93	104	95	106	105	103	101
95	94	95	103	97	91	81	108	107	132	88	102	88	94	105	110	97	102	100	95
91	92	85	98	91	89	95	88	97	89	92	90	100	89	102	90	99	92	97	104
95	95	87	93	90	101	89	101	89	107	101	91	92	97	91	81	93	92	90	94
100	95	86	88	88	99	96	92	97	92	104	90	107	94	98	101	103	95	94	97
107	93	90	101	89	93	98	98	105	118	91	99	97	92	90	99	94	99	103	95
94	102	115	110	103	104	106	102	96	100	132	95	98	99	95	95	96	105	103	109
95	93	95	110	102	102	87	104	110	102	83	110	101	108	98	95	95	106	87	96
95	87	98	92	100	102	91	96	90	95	98	99	95	92	93	110	87	107	97	106
105	86	104	106	102	94	72	102	110	83	94	98	106	100	110	94	95	103	109	105
105	103	96	94	102	90	93	87	97	102	94	96	101	109	94	93	97	106	95	99
108	99	104	102	103	106	102	113	104	104	121	107	112	104	102	105	114	99	102	121

S110606_2 T/C%表示

3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
101	90	92	88	108	97	98	101	88	90	91	95	87	108	96	106	96	104	92	97
94	89	96	98	95	100	91	98	101	96	95	90	97	95	91	101	96	98	93	102
99	91	90	92	98	89	90	97	84	98	94	95	74	100	92	102	100	89	90	96
95	101	94	91	94	92	94	104	95	84	98	88	91	92	97	100	92	99	105	92
86	82	95	89	88	93	101	97	91	90	92	94	105	95	102	92	92	91	102	106
98	91	101	96	97	96	84	95	95	129	80	96	90	98	98	95	107	104	92	105
95	93	90	81	83	90	94	91	90	91	93	87	86	88	96	97	104	90	92	94
90	98	87	94	99	93	82	86	88	117	106	87	97	88	93	97	91	90	97	101
99	93	85	93	85	89	89	90	89	89	94	98	101	93	93	93	100	95	101	100
101	101	96	110	100	92	94	102	94	117	95	96	92	90	87	87	104	97	101	109
97	97	124	94	99	100	86	90	93	10	146	97	100	96	89	95	96	94	106	102
91	102	84	104	96	91	88	93	95	9	95	103	98	101	92	105	100	99	98	108
90	92	97	87	100	90	93	87	87	103	97	97	97	98	97	91	114	99	97	102
92	96	107	96	101	84	86	97	92	95	105	104	95	88	91	106	106	94	95	97
108	98	102	95	94	94	95	86	97	93	101	100	100	104	90	92	93	88	97	95
104	100	103	109	101	101	108	110	100	99	116	110	100	113	108	113	103	102	103	113

S110606_3 T/C%表示

3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
97	113	95	102	101	98	101	97	104	98	99	98	106	102	106	101	113	108	99	93
106	103	103	102	94	101	103	95	93	95	109	104	100	95	94	91	104	100	92	116
97	82	87	90	100	96	101	101	89	95	103	84	75	96	100	87	97	94	94	101
101	100	98	94	102	87	92	94	101	93	92	87	92	96	93	98	103	110	101	101
90	91	95	101	94	101	95	101	97	95	95	103	99	84	104	103	105	102	119	108
106	93	97	94	99	93	97	93	94	142	92	104	108	92	102	104	112	106	102	109
91	94	97	103	94	96	99	91	99	93	107	92	100	96	93	91	98	99	93	94
103	95	92	95	99	90	84	88	91	125	97	88	89	108	94	98	100	107	94	105
100	99	101	94	94	88	96	89	96	94	95	96	100	103	103	93	94	98	103	92
107	101	95	109	97	97	90	98	99	110	100	96	89	101	100	91	97	96	110	103
104	96	127	105	103	105	100	98	100	10	138	98	92	98	95	93	99	100	106	97
107	102	100	105	88	103	100	92	99	99	104	99	105	103	99	104	103	111	101	102
109	98	93	96	95	100	97	95	88	97	102	102	103	104	96	100	92	100	106	107
104	98	105	105	91	94	73	93	100	101	99	90	96	102	98	104	98	105	98	98
102	107	99	95	104	95	97	96	106	112	106	103	99	105	100	116	106	101	105	97
112	99	112	106	103	102	104	111	112	110	124	105	114	112	108	113	107	106	102	124

	S110606_1	S110606_2	S110606_3	Average	s.d.
T-006900	132	146	138	138.7	7.0

ある任意の日におけるアッセイの結果は、TS-006900 はコントロールを 100%とした時に、 139.3 ± 5.9 %その活性を増強させる作用をもつことが示唆された。別の日でも同様にアッセイしたところ、TS-006900 はコントロールを 100%とした時に、 138.7 ± 7.0 %その活性を増強させる作用をもつことが示唆された。

以上の結果から、ある任意の日内で再現することが確かめられ、また、別の日でも再現することが確かめられたため、現在のアッセイ条件であれば、評価化合物を評価可能であると考えられる。

【考察】

今回のアッセイ条件下では、Reference、つまり control (評価化合物の代わりに DMSO を添加した well で、Iloprost が EC40 の時の cAMP 濃度 (nM)) の s.d. が約 4 (C.V. が約 6) であったことから、アッセイを実施した時の陽性化合物基準 (criteria) は、NIH で推奨している基準 (mean \pm 3s.d.) に従うと、Control に比べ、約 118%以上 cAMP 産生増強作用を示した化合物は、陽性と判断することになる。

本研究では、Control に比べ約 130%以上 cAMP 産生増強作用を有している化合物を最低でも取得したいと考えている。先の実験で、プレートの端と中央の差は T/C%として約 4%であることから、仮に、Control に比べ約 130% cAMP 産生増強作用を有している化合物が、プレートの中央に位置していた場合、中央に位置していることで見かけ上の薬理活性が約 4%低下した 126%という結果であったとしても、今回のアッセ

イ条件であれば、約 118%以上 cAMP 産生増強作用を示した化合物は、陽性と判断するため、陽性化合物として評価可能である。

以上のことから、本アッセイ条件は、問題点としてプレートの端と中央とで約 4%の差があるが、Control の C.V.を約 6 にまで抑えていることで、その問題点を克服できていると結論づけられる。今後、さらに約 8 万種の化合物を用いてアッセイをする際も、今回と同程度ばらつきを抑えることで、十分評価可能である。

【実験目的】

これまで、東京大学創薬オープンイノベーションセンターから化合物を提供していただく際、384 プレートはシールを貼付された状態で譲渡されていたが、プレートの端はシール貼付の際に溶けてしまい(150℃近い温度で加熱してシールを貼っているため)、well の大きさが小さくなるという現象が見られた。そこで、評価化合物の代わりに DMSO を用いて、Iloprost を EC40 の濃度でアッセイを実施し、シール貼付によるアッセイ結果への影響を把握することを目的として、アッセイを実施した。

【実験方法】

CHO-K1 細胞を宿主に、ヒト IP 受容体 (hIP) を安定的に発現させた細胞株を選択した。Pod システムで、DMSO を分注した後、IP アゴニストである Iloprost を 300pM (Final) (EC40 濃度)で添加し、40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した。Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を算出した。

S110606_4~6 はシール貼付あり。

S110606_7~9 はシール貼付なし。

【プロトコール】

1. Iloprost + 被検化合物 5ul をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. hIP 安定発現細胞を、8000cells/well となるように 5ul/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5ul/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5ul/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. Pheraster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より反応 cAMP 量を計算する。
7. Iloprost で誘導される cAMP 濃度を 100%とした際の、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を T/C%で表記する。

Table 2-10-4 プレートごとの評価項目の比較

シール貼付あり

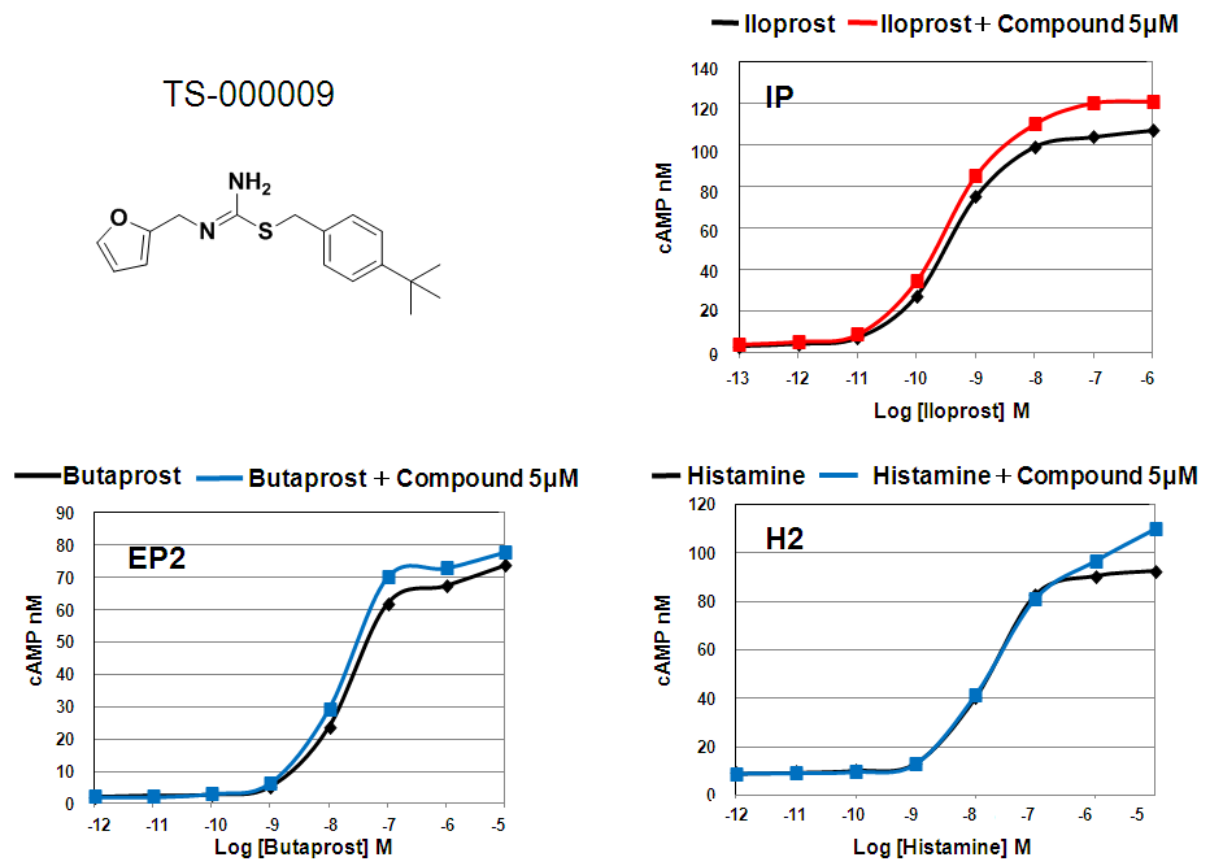
		Average	s.d.	Max	Min	C.V.	T/C%
S110606_4	reference	60.5	3.29	68	56	5.43	100.0
	Lane3 - 22	58.2	3.99	77	49	6.86	96.1
	Edge	61.9	5.32	77	54	8.60	102.3
	Center	55.7	3.06	61	49	5.50	92.0
	Difference	6.3					10.4
S110606_5	reference	58.3	3.46	66	53	5.94	100.0
	Lane3 - 22	55.6	3.57	68	47	6.43	95.4
	Edge	58.2	4.20	68	48	7.22	99.8
	Center	53.6	2.65	61	47	4.95	91.9
	Difference	4.6					7.8
S110606_6	reference	60.8	3.21	67	55	5.29	100.0
	Lane3 - 22	56.9	3.24	66	47	5.69	93.7
	Edge	59.9	2.90	66	52	4.84	98.5
	Center	55.3	3.42	61	47	6.19	91.1
	Difference	4.5					7.5

シール貼付なし

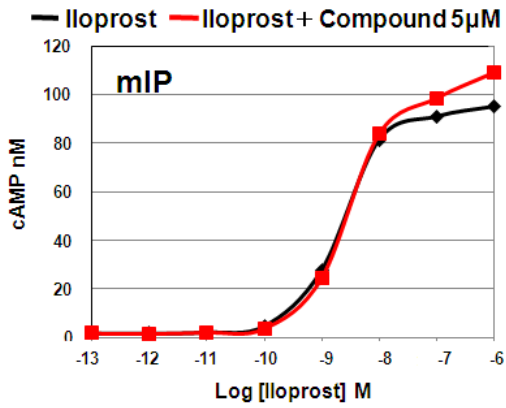
		Average	s.d.	Max	Min	C.V.	T/C%
S110606_7	reference	56.5	4.62	62	48	8.17	100.0
	Lane3 - 22	54.4	3.32	66	44	6.10	96.3
	Edge	56.9	4.29	66	49	7.54	100.7
	Center	52.7	2.43	58	48	4.61	93.3
	Difference	4.2					7.4
S110606_8	reference	58.2	5.17	66	46	8.87	100.0
	Lane3 - 22	56.4	4.01	72	29	7.10	96.9
	Edge	58.6	4.13	72	50	7.05	100.5
	Center	55.7	2.78	61	51	5.00	95.6
	Difference	2.9					4.9
S110606_9	reference	57.9	4.69	64	49	8.10	100.0
	Lane3 - 22	56.7	3.64	68	46	6.42	98.0
	Edge	58.5	4.30	68	50	7.34	101.1
	Center	56.1	2.84	62	51	5.05	97.0
	Difference	2.3					4.0

シールを貼付しなかったプレートの3枚のうち1枚も、シールを貼付したプレートの端と中央値の差を超えるプレートはなかったことから、シールを貼ることで well が溶けたことは、アッセイの結果に少なからず影響を及ぼしているのかもしれない。しかし、本結果はすべてのプレートでシール貼付していただいたものを使用しているのだが、そのときは、プレートの端と中央値の差は約4%であったことを考えると、端と中央値の差に与える影響は、別の要因の寄与がより大きいなのかもしれない。

高次評価の **Supplementary data**



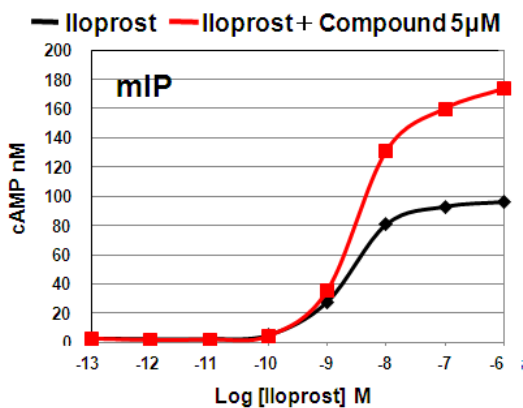
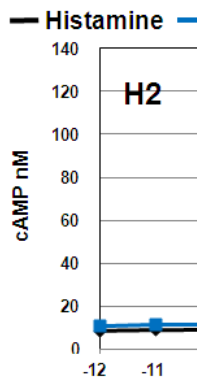
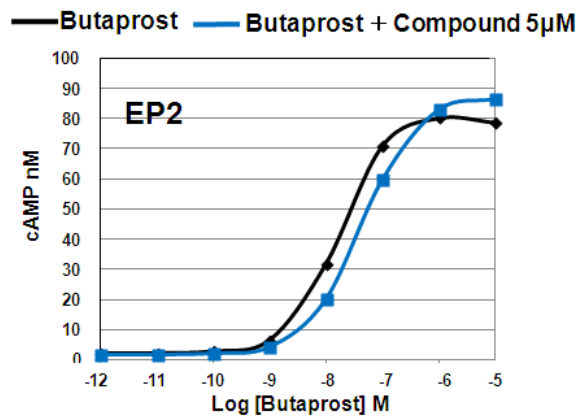
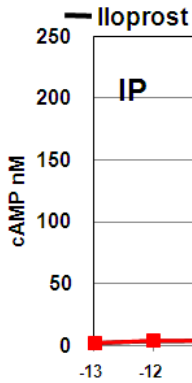
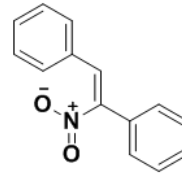
Supplementary figure 2-10-S-1 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left side in the middle). Effect of the compound on Histamine dose response curve in H2 transiently expressing CHO-K1 cell(right side in the middle). Effect of the compound on Iloprost dose



response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell(lower left).

hIP と hEP2 で軽微に上シフト

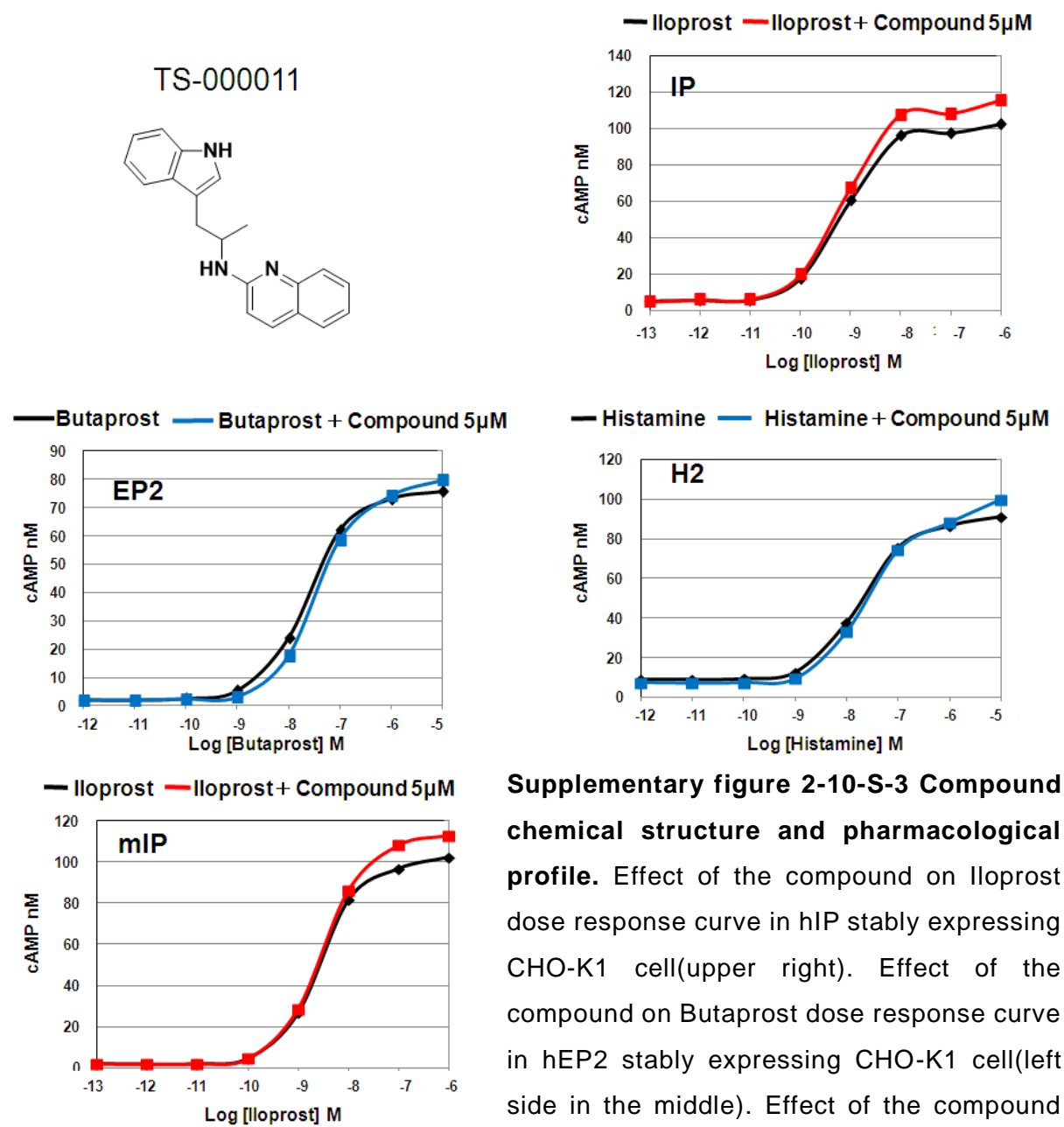
TS-000010



Supplementary figure 2-10-S-2
Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left side in the middle). Effect of the compound on Histamine dose response curve in H2 transiently expressing CHO-K1 cell(right side in the middle). Effect of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell(lower left).

Histamine dose response curve in H2 transiently expressing CHO-K1 cell(right side in the middle). Effect of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell(lower left).

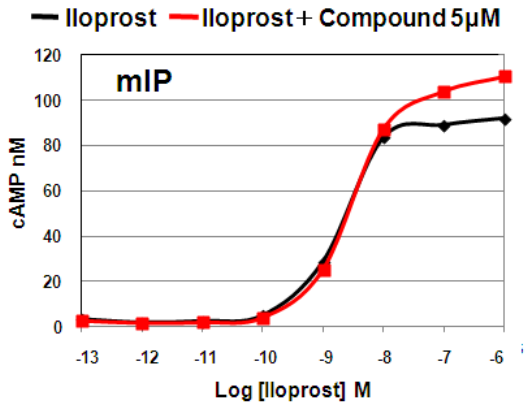
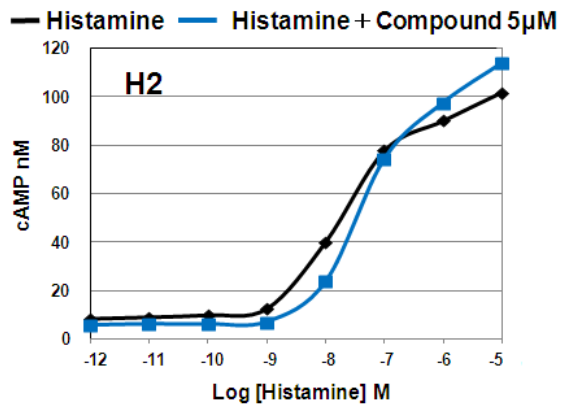
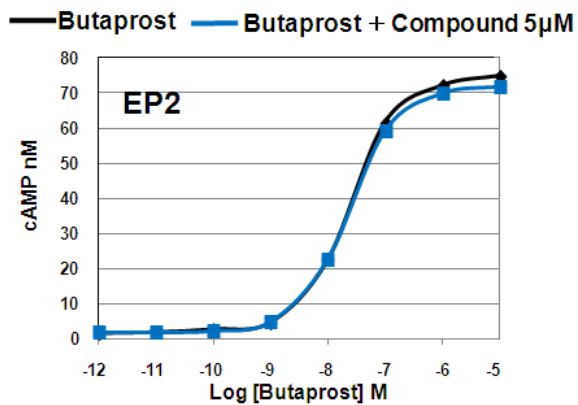
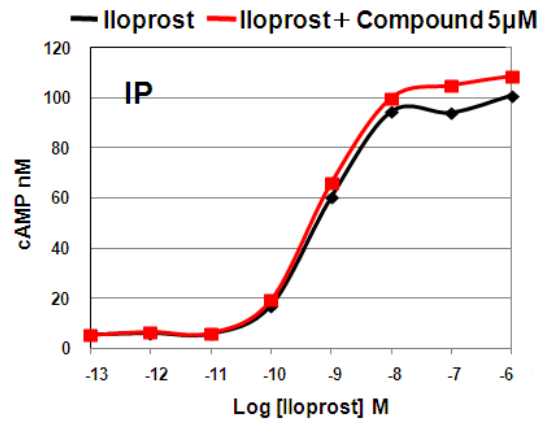
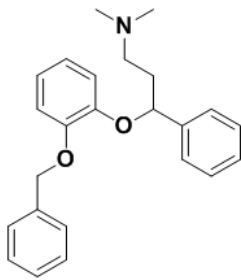
hEP2 で右シフトだが、その他の受容体では、2 倍程度上シフト。この上シフトは、受容体非特異的な作用。



Supplementary figure 2-10-S-3 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left side in the middle). Effect of the compound on Histamine dose response curve in H2 transiently expressing CHO-K1 cell(right side in the middle). Effect of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell(lower left).

hEP2 で軽微に右シフト

TS-000012



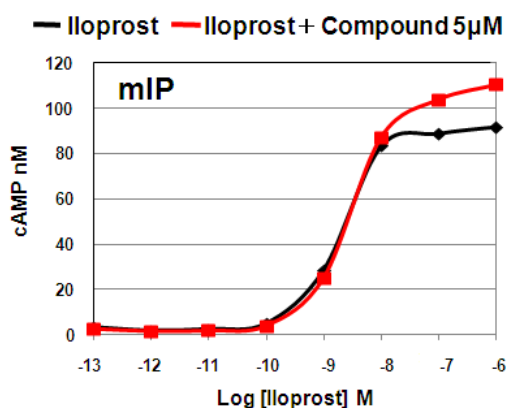
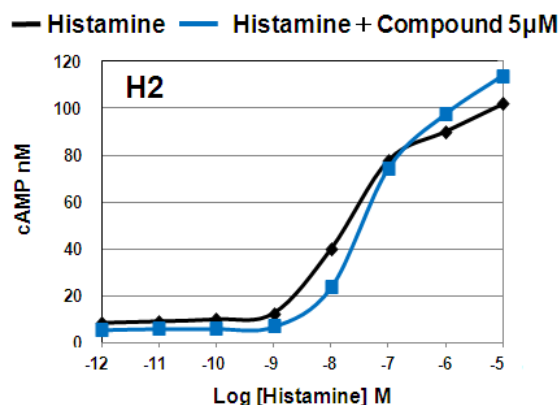
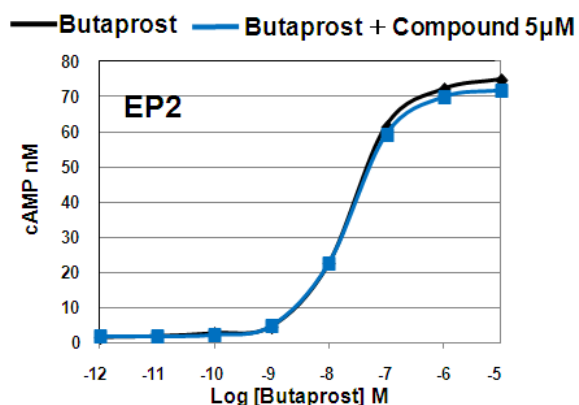
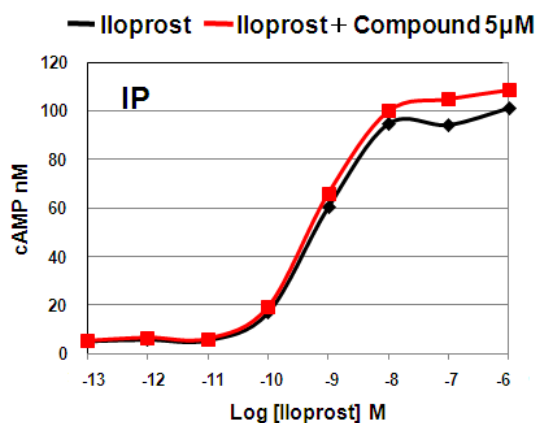
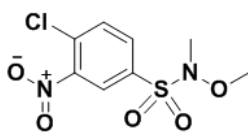
Supplementary figure 2-10-S-4

Compound chemical structure and pharmacological profile.

Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell (upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell (left side in the middle). Effect of the compound on Histamine dose response curve in H2 transiently expressing CHO-K1 cell (right side in the middle). Effect of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell (lower left).

H2 で右シフト

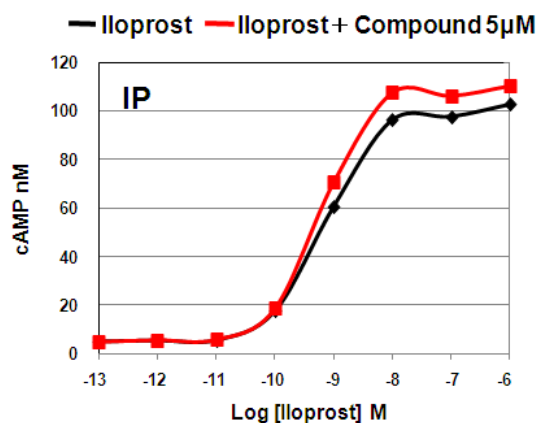
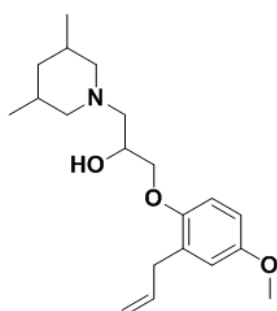
TS-000013



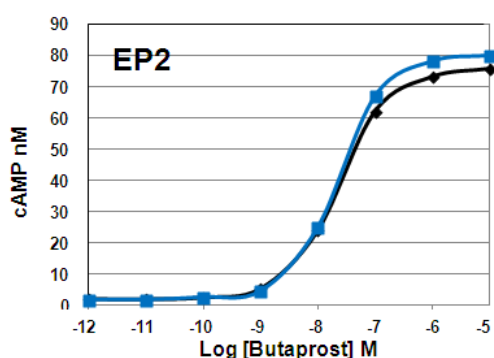
Supplementary figure 2-10-S-5 Compound chemical structure and pharmacological profile. Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left side in the middle). Effect of the compound on Histamine dose response curve in H2 transiently expressing CHO-K1 cell(right side in the middle). Effect of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell(lower left).

H2 で軽微に右シフト

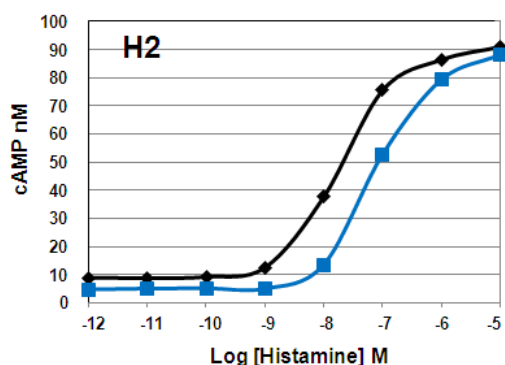
TS-000014



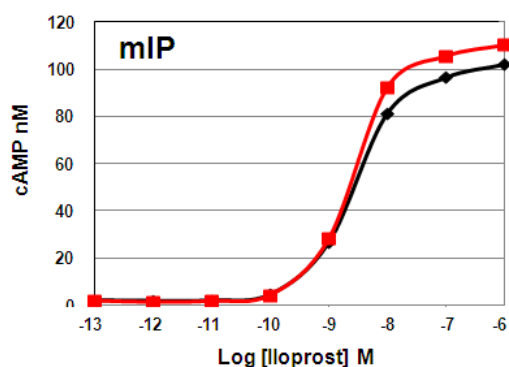
Butaprost Butaprost + Compound 5µM



Histamine Histamine + Compound 5µM



Iloprost Iloprost + Compound 5µM



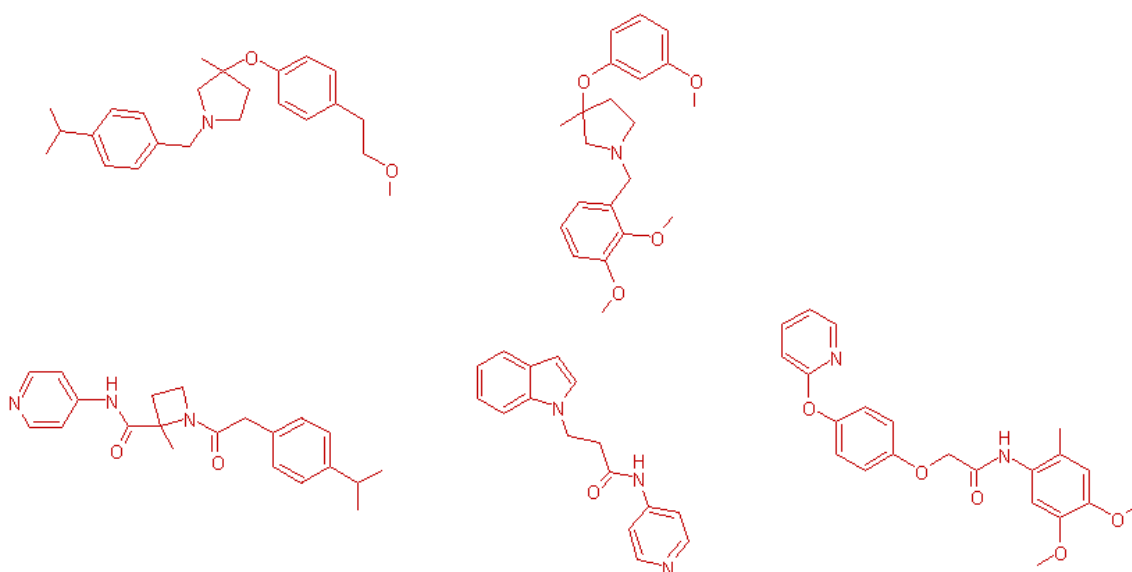
Supplementary figure 2-10-S-6

Compound chemical structure and pharmacological profile.

Effect of the compound on Iloprost dose response curve in hIP stably expressing CHO-K1 cell(upper right). Effect of the compound on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell(left side in the middle). Effect of the compound on

Histamine dose response curve in H2 transiently expressing CHO-K1 cell(right side in the middle). Effect of the compound on Iloprost dose response curve in mIP stably expressing CHO-K1 cell(lower left).

H2 で右シフトだが、但し、ベースを低下させている。



Supplementary figure 2-10-S-7 Chemical structures of the compounds that can induce upward shift in each agonist dose response curve in hIP, hEP2 or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

第 3 章

構造活性相関

第 1 節 合成展開

【実験目的】

SAR を取得することを目的として、ヒット化合物を合成展開した。(これまで得られている化合物では、ヒトとマウスの IP 間でその活性に種差が認められる。合成展開することでヒト以外の種でもヒト IP と同様の薬理活性を持つ化合物を得ることができるのではないかという期待も込めて合成を行った。)

【実験方法】

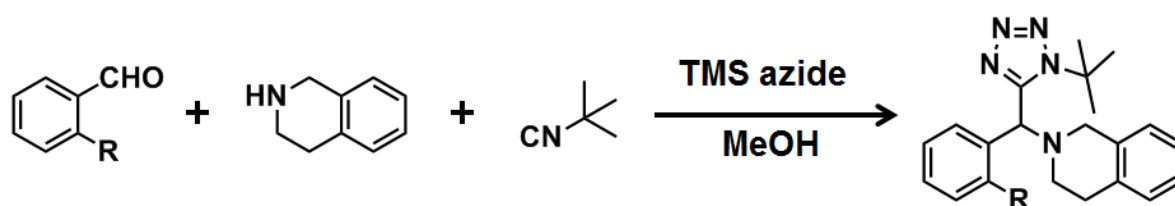
合成は、Scheme 3-1-1 に従った³¹ (参考 : *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2010**, *20*, 5165–5169)。他にもさまざまな合成方法があると思うが、今回の合成方法

が、たとえ収率が低かったり、美しくない合成方法であったとしても、短期間で効率良く目的の化合物を取得することを優先した。

この合成の留意点は、爆発性のある **azide** を用いていることと、**tert-butyl isocyanide** の異臭が尋常ではないため、実験はすべてドラフト内で実施した。

反応は、4つのコンポーネント（すべて1当量での反応である）を反応させるのだが、実際に合成を始めた当初は、考えていたように合成できなかった。すべて1当量ずつ試薬を反応させても原料がかなり残っていたことから、十分に反応を進行させることができなかったことが主な原因と考えられる。

ところで、TLCのスポットを観察すると、**benzaldehyde** は溶媒先端付近に存在し、**Isoquinoline** は、原点付近に存在することがわかった。つまり、**Isoquinoline** を多量に加えてもカラム精製の際にそれほど問題とならないと考えられる。そこで、反応を十分に進行させることを目的として、**Isoquinoline** を1.5当量、それ以外の3種の試薬はすべて1当量添加したところ、合成することができた。



Scheme 3-1-1 Synthesis of Hit compound and its derivatives.

第2節 新規化合物の評価

【実験目的】

合成した新規化合物を対象に、**SAR** を取得することを目的として **cAMP** アッセイを実施した。

【実験方法】

前章の知見から、**Iloprost** より内因性アゴニストである **PGI2** を選択した方が、用量反応曲線を大きく左シフトさせることがわかった。これは、これまでに報告されている他の受容体のアロステリックモジュレーター探索研究において得られた「アゴニストの構造を変化させると、**dose ratio** も変化する」という知見 (*Proc. Natl Acad. Sci...*

2010, 107, 4746–4751) と一致する。それを踏まえ、今回、hIP 及び mIP 強制発現細胞系で cAMP アッセイした時は、4 種の IP アゴニスト(Figure 3-2-1)を用いた。

A) IP 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay

CHO-K1 細胞を宿主に、ヒト IP 受容体 (hIP) を安定的に発現させた細胞株を選択した。IP アゴニストである Epoprostenol、Iloprost、Cicaprost と Beraprost をそれぞれ 10^{-12} ~ 10^{-5} M、 10^{-13} ~ 10^{-6} M、 10^{-13} ~ 10^{-6} M、 10^{-12} ~ 10^{-5} M で添加すると同時に、被検化合物を 5 μ M (Final)、10 μ M (Final)、20 μ M (Final) で添加し、hIP 安定発現細胞を 5 μ l/well で分注し反応開始させた。40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した後、Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で蛍光を測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。

【プロトコール】

1. Epoprostenol + 被検化合物 5 μ l をコーニング 384PS、Black、LV プレート (#3677)に分注。
2. hIP 安定発現細胞を、7000 cells/well となるように 5 μ l/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5 μ l/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5 μ l/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より産生された cAMP 濃度を計算する。
7. それぞれの濃度の Iloprost で誘導される cAMP 濃度を 100%とした際の、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を T/C%で表記する。

B) EP2 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay

CHO-K1 細胞を宿主に、ヒト EP2 受容体 (hEP2) を安定的に発現させた細胞株を選択した。EP2 アゴニストである Butaprost を 10 pM (Final)、100 pM (Final)、1 nM (Final)、10 nM (Final)、100 nM (Final)、1 μ M (Final)、10 μ M (Final)、25 μ M (Final) で添加すると同時に、被検化合物を 5 μ M (Final)、10 μ M (Final)、20 μ M (Final) で添加し、hEP2 安定発現細胞を 5 μ l/well で分注し反応開始させた。40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した後、Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で蛍光を測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。

【プロトコール】

1. Butaprost + 被検化合物 5 μ l をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. hEP2 安定発現細胞を、14000 cells/well となるように 5 μ l/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5 μ l/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5 μ l/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より産生された cAMP 濃度を計算する。
7. それぞれの濃度の Butaprost で誘導される cAMP 濃度を 100%とした際の、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を T/C%で表記する。

C) mIP 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay

CHO-K1 細胞を宿主に、マウス IP 受容体 (mIP) を安定的に発現させた細胞株を選択した。IP アゴニストである Epoprostenol、Iloprost、Cicaprost と Beraprost をそれぞれ $10^{-12} \sim 10^{-5}$ M、 $10^{-13} \sim 10^{-6}$ M、 $10^{-13} \sim 10^{-6}$ M、 $10^{-12} \sim 10^{-5}$ M で添加すると同時に、被検化合物を 5 μ M (Final)、10 μ M (Final)、20 μ M (Final) で添加し、mIP 安定発現細胞を 5 μ l/well で分注し反応開始させた。40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した後、Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で蛍光を測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。

【プロトコール】

1. Epoprostenol + 被検化合物 5 μ l をコーニング 384PS、Black、LV プレート (#3677)に分注。
2. mIP 安定発現細胞を、7000 cells/well となるように 5 μ l/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5 μ l/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5 μ l/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より産生された cAMP 濃度を計算する。
7. それぞれの濃度の Iloprost で誘導される cAMP 濃度を 100%とした際の、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を T/C%で表記する。

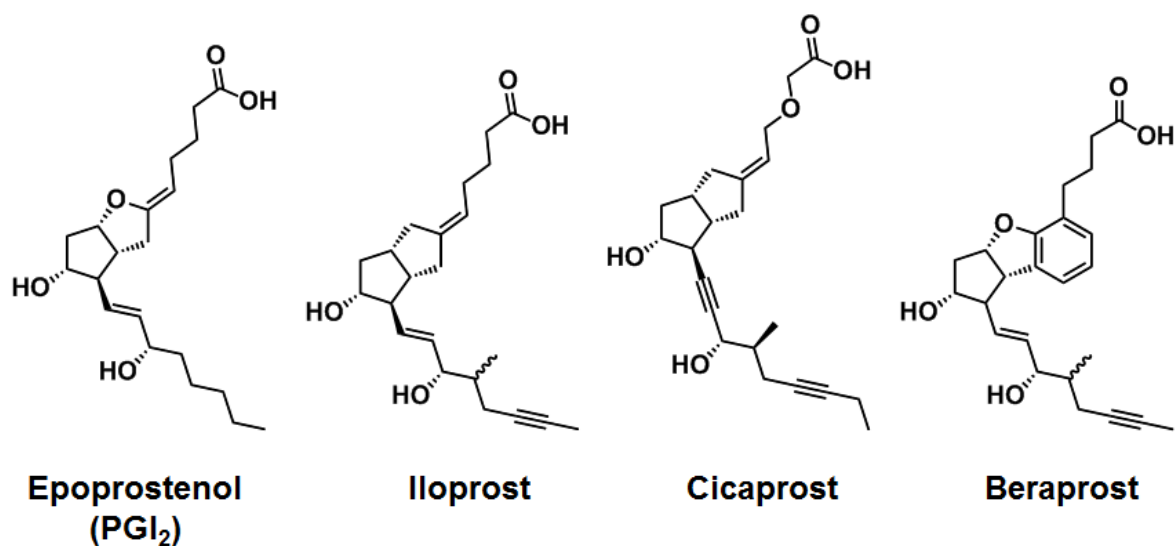


Figure 3-2-1 Agonists of IP.

【結果】

第一として、これまでは購入した化合物でアッセイを実施していたが、実際に自身で合成した化合物で同様の薬理活性が確認できた。

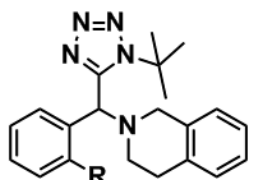
hIP 及び mIP で実施した cAMP アッセイ を **Supplementary figure 3-3-1** から **Supplementary figure 3-3-35** としてまとめた。H 基の時と比較して、OCH₃ 基や F 基で薬理活性が向上し、CH₃ 基ではほとんど薬理活性が認められなかった。このことから、仮説の通り R の位置をさまざまな官能基で置換したところ、化合物の薬理活性に大きな変化をもたらしたことから、本研究で見出した評価化合物にとって、R の位置は IP のアロステリックモジュレーター活性を発揮する上で、極めて重要であるといえる。

次に、アゴニストを **Epoprostenol** (内因性アゴニスト)、**Iloprost**、**Cicaprost**、**Beraprost** の 4 種類を用いてアッセイしたところ、それぞれのアゴニストによって薬理活性は異なることが明らかとなった (**Supplementary table 3-3-1** から **Supplementary table 3-3-4**)。本研究で見出した評価化合物は、**Epoprostenol** (内因性アゴニスト) との組み合わせの時、最も強い薬理活性を発揮し、次に **Beraprost** との組み合わせが良いことが

わかった。臨床現場において、持続静注療法で使用されているのは、Epoprostenol(内因性アゴニスト)であり、Beraprost も承認された医薬品であることから、これらのアゴニストとの組み合わせが良いことは、極めて望ましい。今回の結果から、仮説通り、アロステリックモジュレーターはアゴニストとの組み合わせが重要であることが示唆され、これは、他の受容体のアロステリックモジュレーター研究において得られた「アゴニストの構造を変化させると、dose ratio も変化する」という知見 (*Proc. Natl Acad. Sci...* **2010**, *107*, 4746–4751) と一致する。

ところで、上記 R の位置とは別に、化合物 TS-000072(Supplementary figure 3-3-6 から Supplementary figure 3-3-10 の構造と薬理活性について、TS-000072 は Isoquinoline 骨格ではなくで、quinoline 骨格にしたものであるが、こちらは、全く薬理活性が認められなかった。この位置も quinoline 骨格に限らず、別の官能基で置換すると薬理活性を消失することから、Isoquinoline 骨格は重要であるといえる。

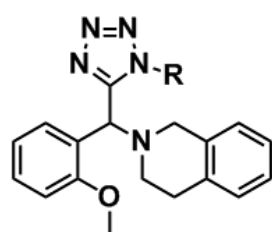
Table 3-2-1 Structure-activity-relationship of novel compounds



使用したアゴニスト: Epoprostenol

Compound	R=	Epoprostenol	Iloprost	Cicaprost	Beraprost
TS-000005	H	6.9 μM	11.1 μM	13.9 μM	10.7 μM
TS-000065	OCH ₃	4.3 μM	6.5 μM	8.0 μM	4.2 μM
TS-000066	OCH ₂ CH ₂ CH ₃	4.3 μM	12.6 μM	8.8 μM	5.8 μM
TS-000067	F	4.7 μM	11.0 μM	9.3 μM	6.0 μM
TS-000068	Cl	7.2 μM	18.7 μM	14.3 μM	9.5 μM
TS-000069	CH ₃	34.8 μM	56.7 μM	44.1 μM	54.7 μM

Table 3-2-2 Structure-activity-relationship of novel compounds

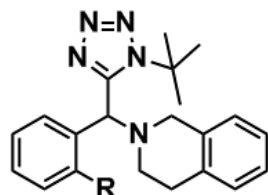


使用したアゴニスト: Epoprostenol

Compound	R=	左シフト値
TS-000070	CH ₃	N.D.
TS-000071		22.0 μM
TS-000065		4.3 μM

N.D. indicates "not detected"

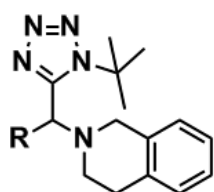
Table 3-2-3 Structure-activity-relationship of novel compounds



使用したアゴニスト: Epoprostenol

Compound	R=	左シフト値	Compound	R=	左シフト値
Okayama 11	Br	15.5 μM	Okayama 36		12.3 μM
Okayama 13		24.9 μM	Okayama 37	OH	1.4 μM
Okayama 23	NO ₂	N.D.	Okayama 41		163.7 μM
Okayama 25	SCH ₃	3.1 μM	Okayama 42	NH ₂	78.3 μM
Okayama 26	OCH ₂ CH ₃	5.5 μM			

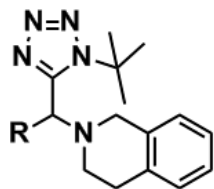
Table 3-2-4 Structure-activity-relationship of novel compounds



使用したアゴニスト: Epoprostenol

Compound	R=	左シフト値	Compound	R=	左シフト値
Okayama 46		3.5 μ M	Okayama 47		8.4 μ M
Okayama 56		1.2 μ M	Okayama 71		72.2 μ M
Okayama 57		7.7 μ M	Okayama 53		N.D.
Okayama 69		N.D.	Okayama 50		5.7 μ M

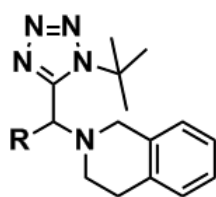
Table 3-2-5 Structure-activity-relationship of novel compounds



使用したアゴニスト: Epoprostenol

Compound	R=	左シフト値	Compound	R=	左シフト値
Okayama 68		38.4 μ M	Okayama 3		4.3 μ M
Okayama 70		N.D.	Okayama 67		71.1 μ M
Okayama 48		11.7 μ M	Okayama 65		119.6 μ M

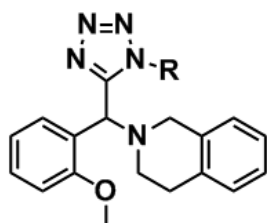
Table 3-2-6 Structure-activity-relationship of novel compounds



使用したアゴニスト: Epoprostenol

Compound	R=	左シフト値
Okayama 27		17.7 μM
Okayama 28		32.4 μM

Table 3-2-7 Structure-activity-relationship of novel compounds



使用したアゴニスト: Epoprostenol

Compound	R=	左シフト値	Compound	R=	左シフト値
TS-0000 35	CH ₃	N.D.	Okayama 51		2.0 μM
TS-0000 36		22.0 μM	Okayama 52		8.3 μM
TS-0000 3		4.3 μM	Okayama 58		5.7 μM
Okayama 38		11.1 μM			

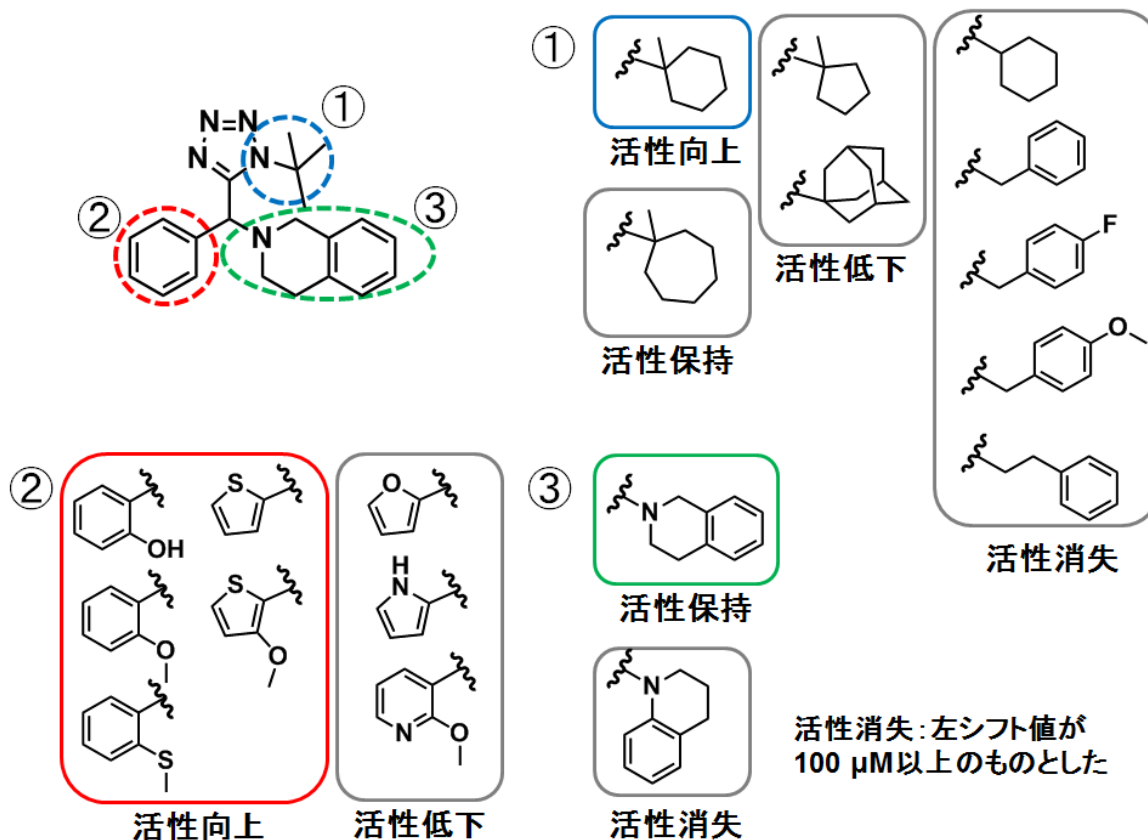


Figure 3-2-2 Summary of structure-activity-relationship of novel compounds

【考察】

本研究で見出した評価化合物が IP のアロステリックモジュレーター活性を発揮する上で、極めて重要な位置を同定したが、さらに、官能基の構造的及び化学特徴と薬理活性を一つ一つ精査すると、R が H の時と比較して、OCH₃ や F の時に薬理活性が向上したことから、R の位置で、それらの官能基が H acceptor として作用していることが推測される。また、それ以外にも化合物の構造と薬理活性との間の何らかの因果関係がある可能性がある。そこで、Hansch らの定義した「疎水的性質を予測できるパラメーターπ」、「電子的性質を表すパラメーターσ」及び「立体的性質に関与する MR」を用いて、化合物の構造と薬理活性との間の何らかの因果関係を求めることを試みた (data not shown)。しかし、そのデータから関係性を見出すことは困難であり、また π や MR を変数として、重回帰分析をしたが、相関しなかった。π に相関すると考えると、現状試みた官能基より疎水性の低い官能基 (π がより低値の官能基) で置換したら、活性が向上するかもしれない。一方、H acceptor として作用していることが重要であると仮定すれば、アミノ基を有する置換基が有効かもしれない。

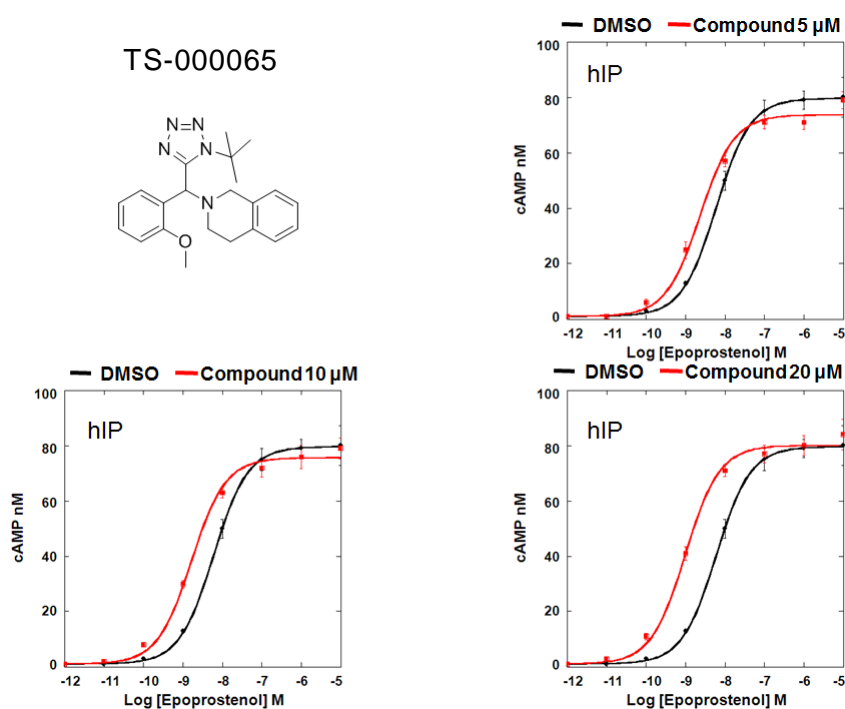
ところで、テトラゾール環の *tert*-Butyl 基は、薬理活性を発揮する上で重要であることが示唆された。そこで、これまでの結果から、薬理活性の最も強い TS-000065 のテトラゾール *tert*-Butyl 基を CH₃ 基と propyl 基に置換し、薬理活性を評価した (Table 3-2-2)

ところ、やはり *tert*-Butyl 基の時に最も薬理活性が強かった。

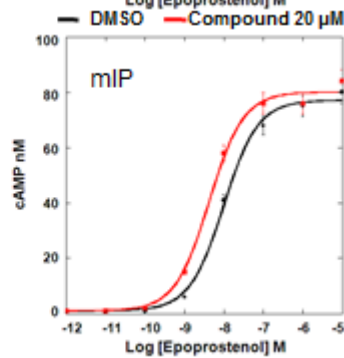
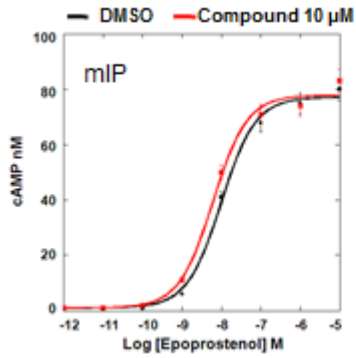
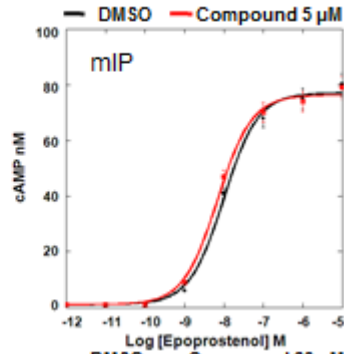
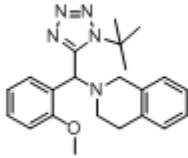
前述のように、ヒット化合物の構造と薬理活性との間になんらかの因果関係が示唆されたため、さらなる構造活性相関の知見を得るため、岡山大学との共同研究を実施した(Table 3-2-3 から Table 3-2-6)。それによって得られた知見をまとめたものが、Figure 3-2-2 である。ベンゼン環体が活性を示し、電子欠損系のピリジン環体の活性は低下した。そこで、電子欠損系と比べ、電子過剰系では活性は上昇するかどうか確かめるために、電子過剰系の複素芳香環であるチオフェン、フラン、ピロール置換体を比較したところ、チオフェンで最も活性が高く、フラン、ピロールでは、活性は低下した。この結果から、芳香環の電子密度に活性の強さは相関していることが示唆された。

第 3 節 Supplementary data

新規合成化合物の薬理 profile の詳細を記載した。

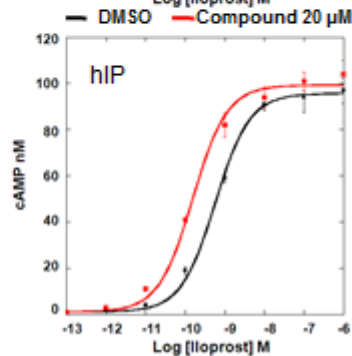
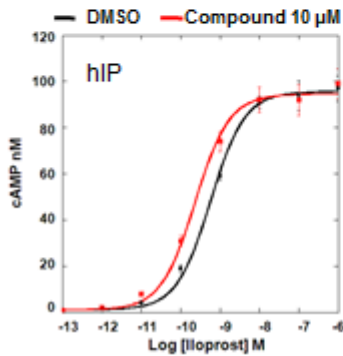
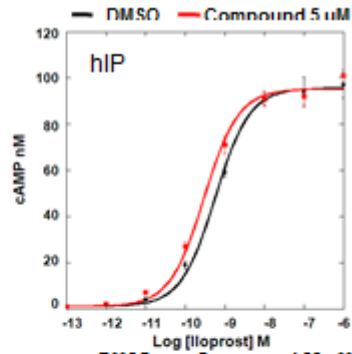
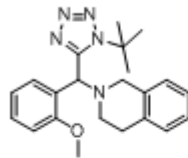


TS-000065

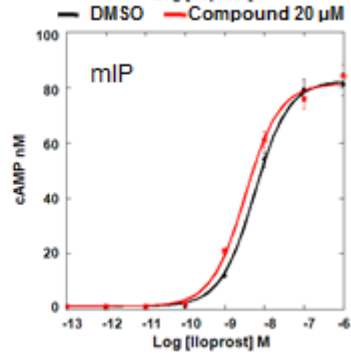
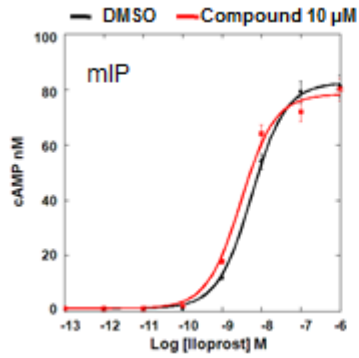
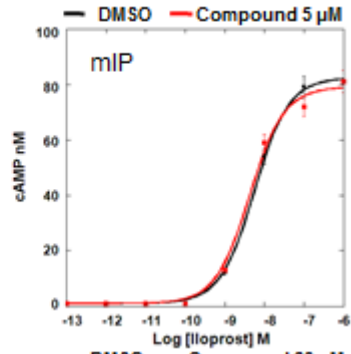
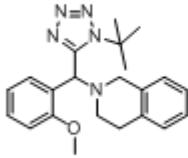


Supplementary figure 3-3-1 Effect of change in concentration of the compound on Epoprostenol dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000065

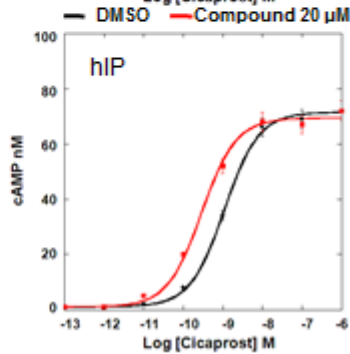
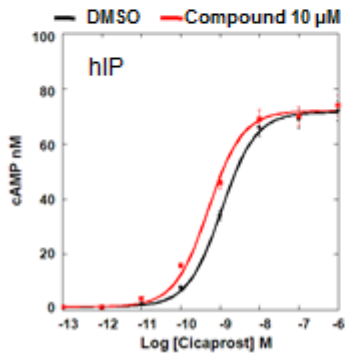
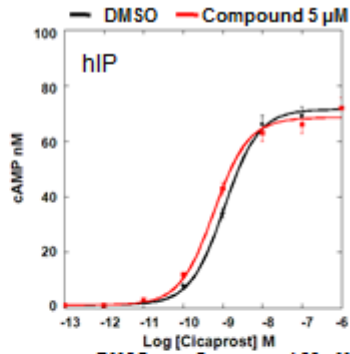
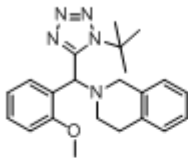


TS-000065

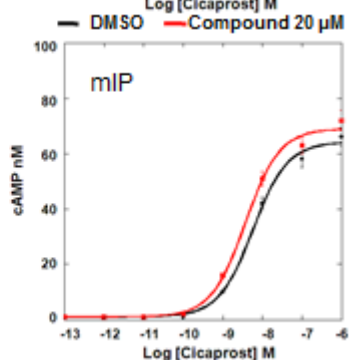
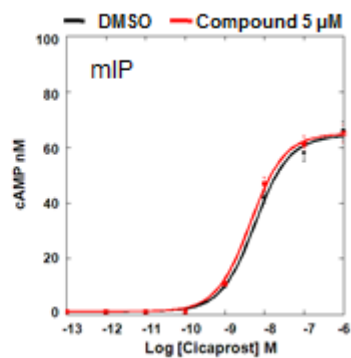
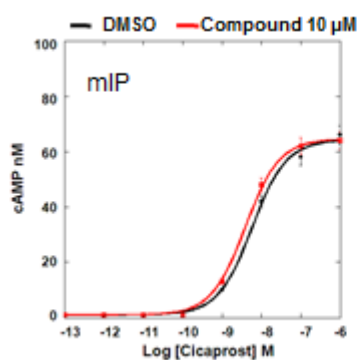
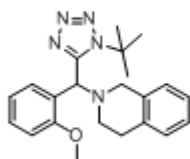


Supplementary figure 3-3-2 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000065

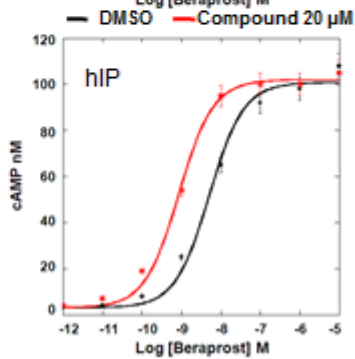
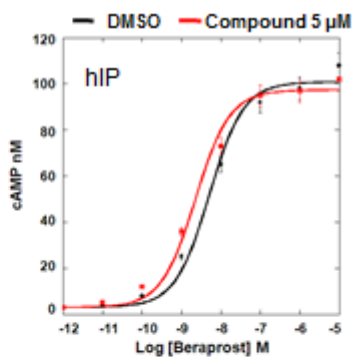
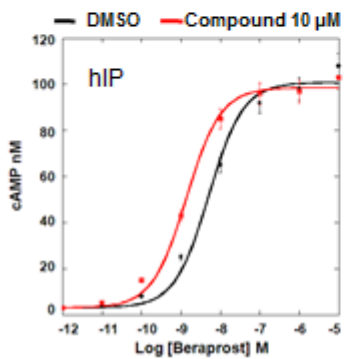
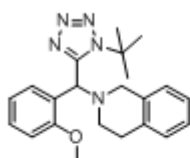


TS-000065

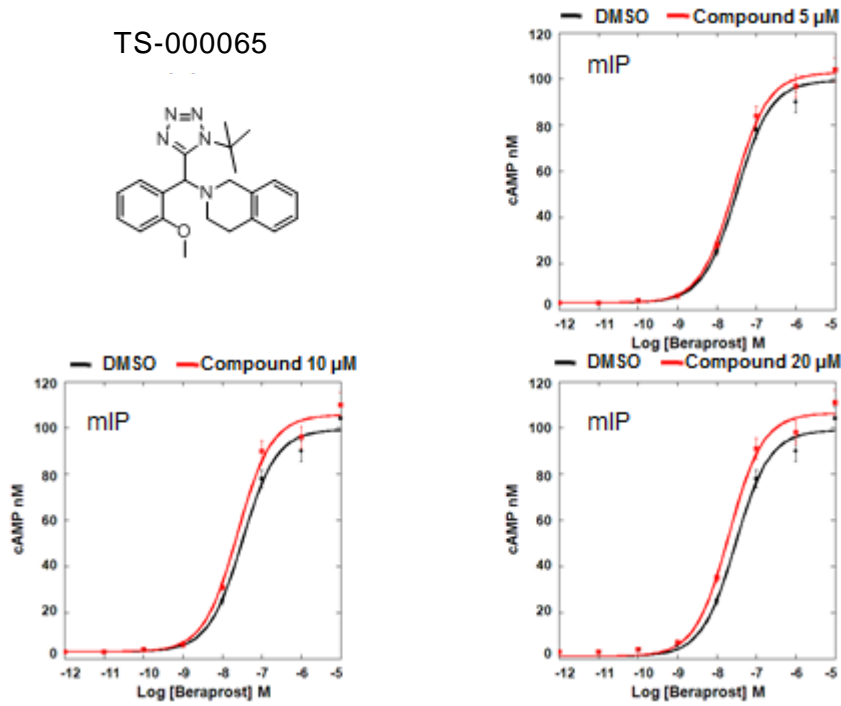
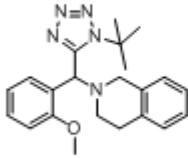


Supplementary figure 3-3-3 Effect of change in concentration of the compound on Cicaprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000065

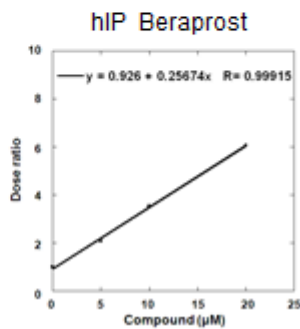
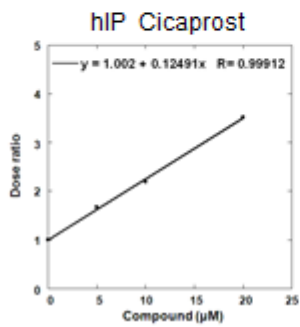
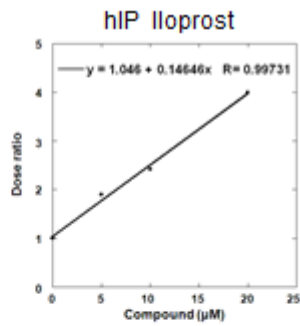
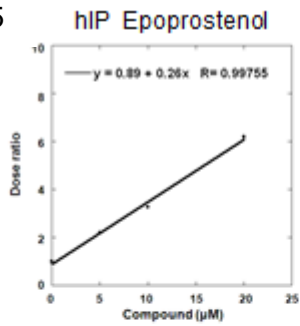


TS-000065

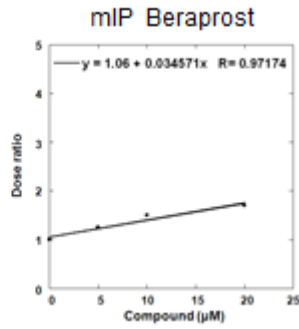
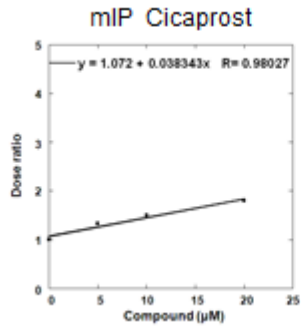
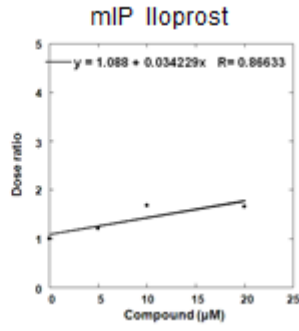
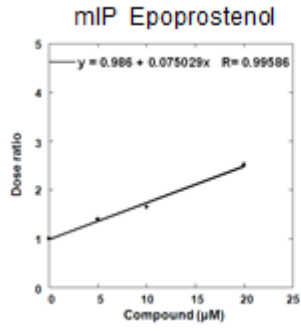


Supplementary figure 3-3-4 Effect of change in concentration of the compound on Beraprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000065

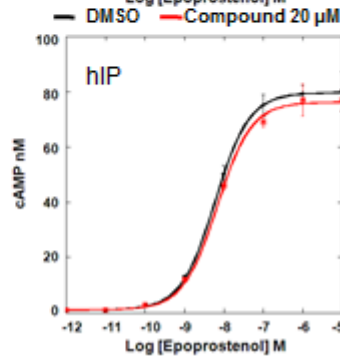
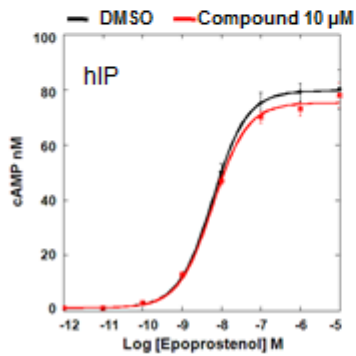
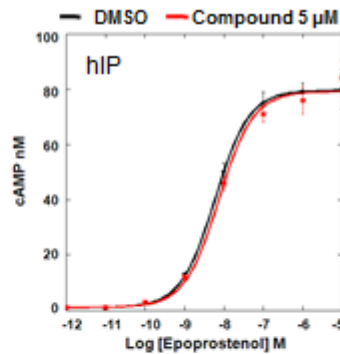
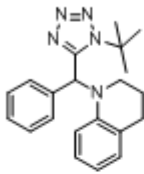


TS-000065

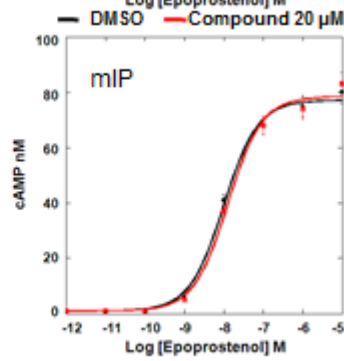
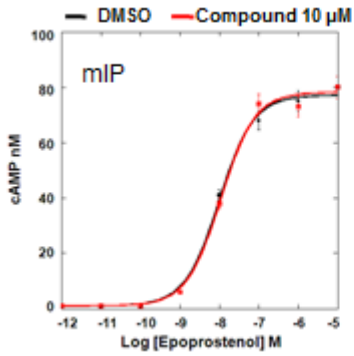
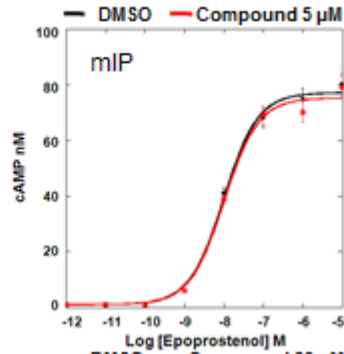
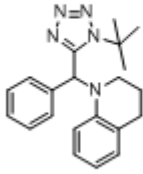


Supplementary figure 3-3-5 Effect of change in concentration of the compounds on dose ratio of Epoprostenol, Iloprost, Cicaprost or Beraprost in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000072

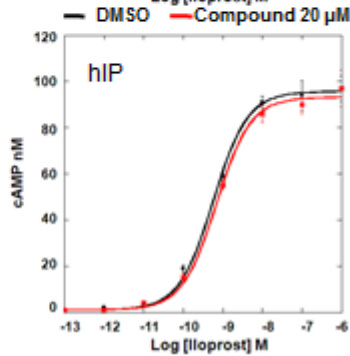
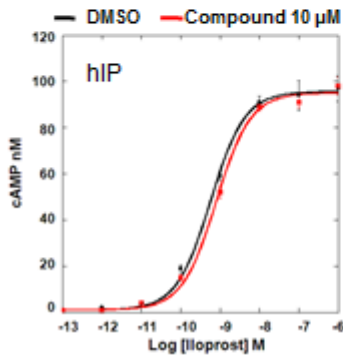
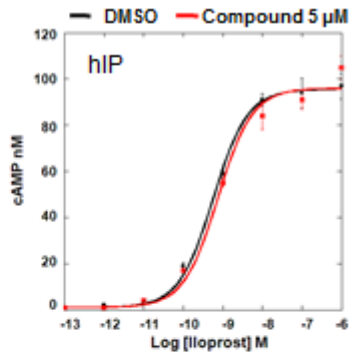
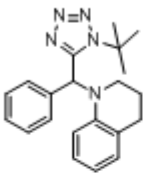


TS-000072

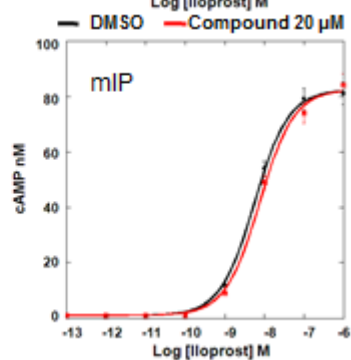
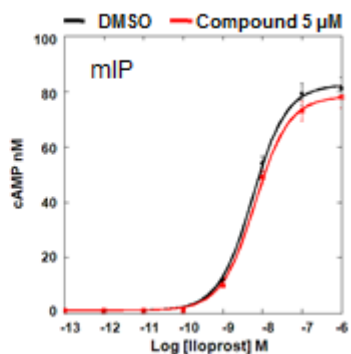
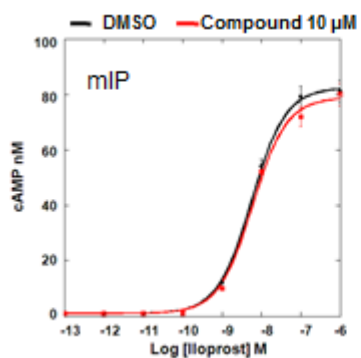
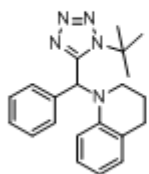


Supplementary figure 3-3-6 Effect of change in concentration of the compound on Epoprostenol dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000072

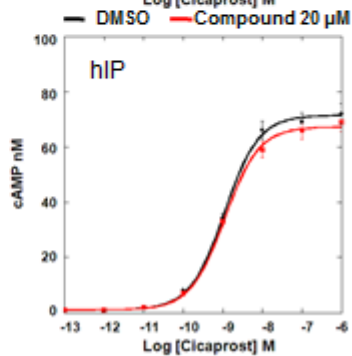
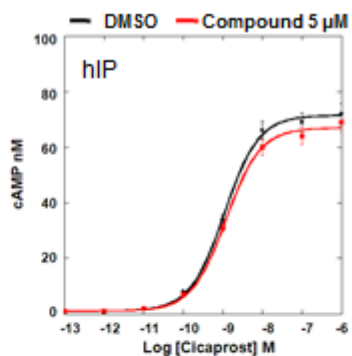
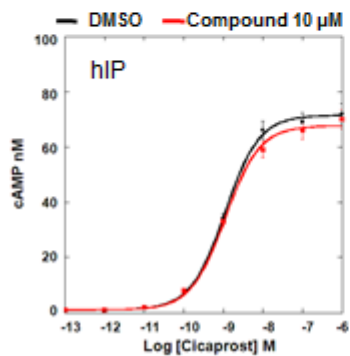
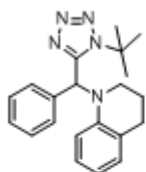


TS-000072

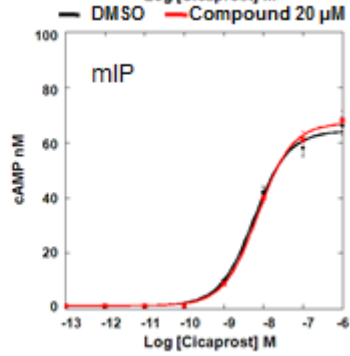
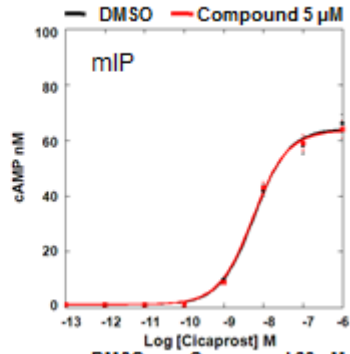
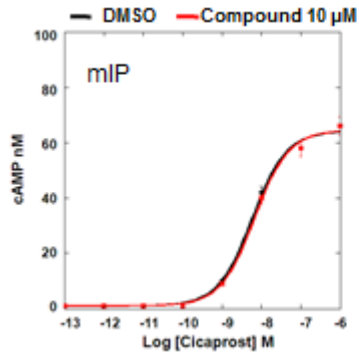
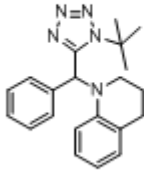


Supplementary figure 3-3-7 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000072

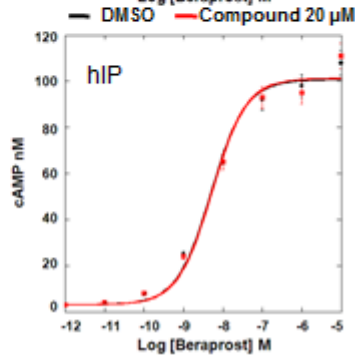
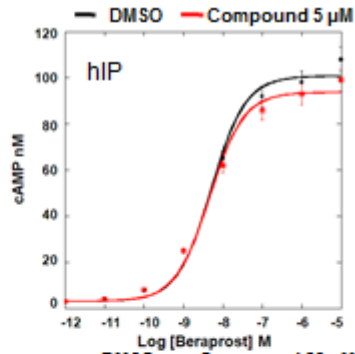
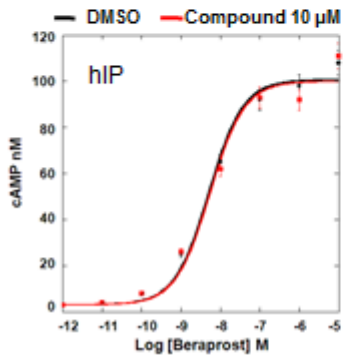
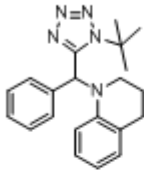


TS-000072

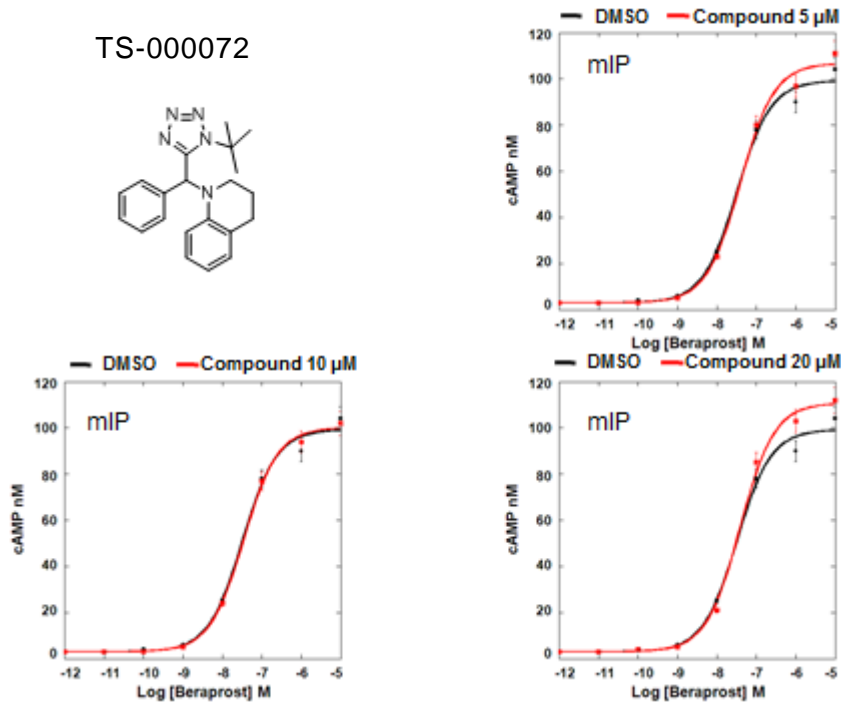
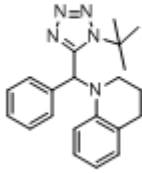


Supplementary figure 3-3-8 Effect of change in concentration of the compound on Cicaprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000072

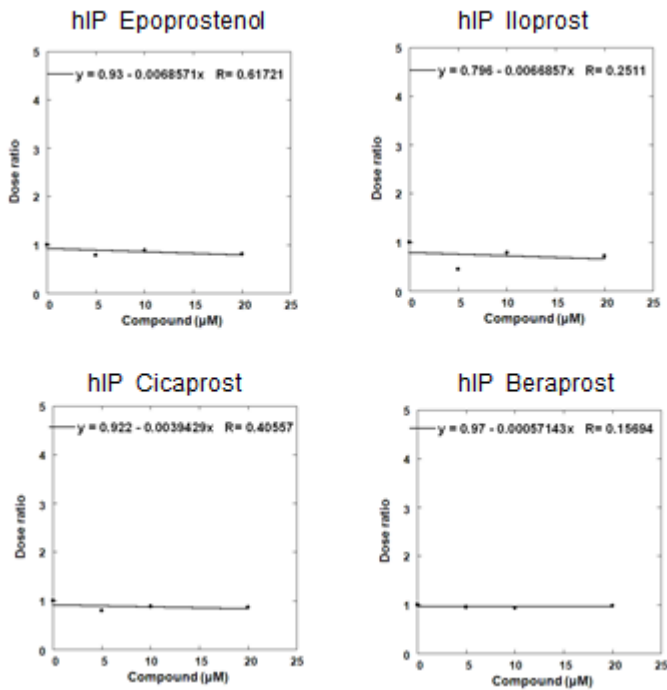


TS-000072

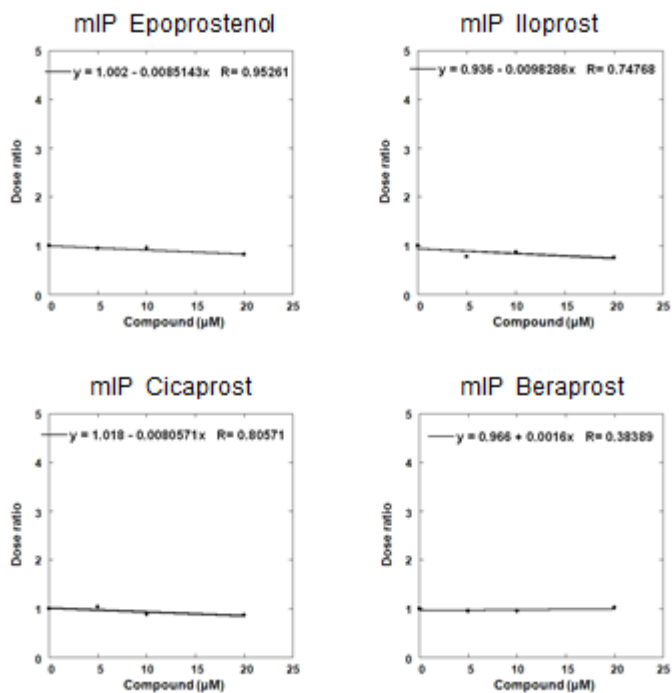


Supplementary figure 3-3-9 Effect of change in concentration of the compound on Beraprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000072



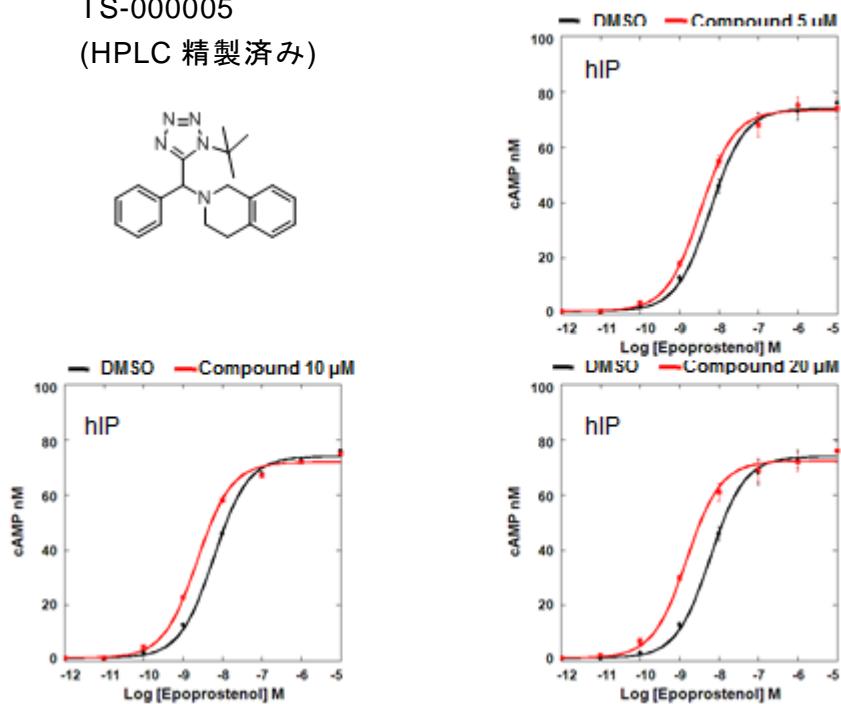
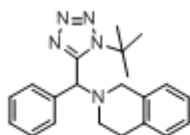
TS-000072



Supplementary figure 3-3-10 Effect of change in concentration of the compounds on dose ratio of Epoprostenol, Iloprost, Cicaprost or Beraprost in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000005

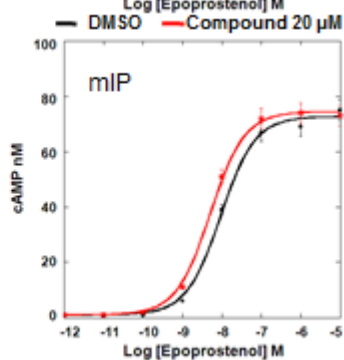
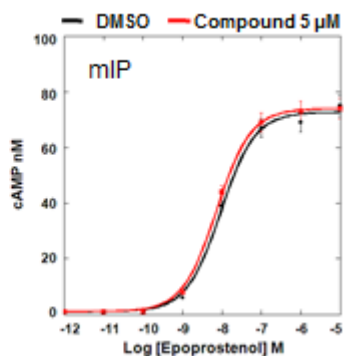
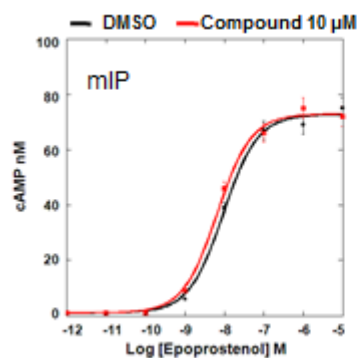
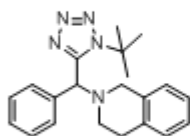
(HPLC 精製済み)



TS-000005

(HPLC 精製済み)

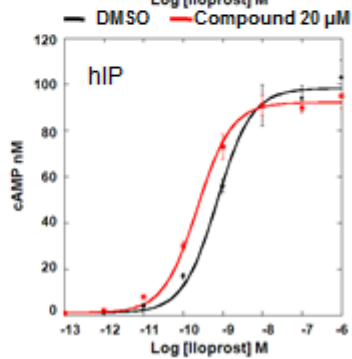
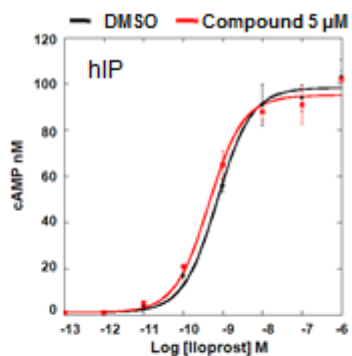
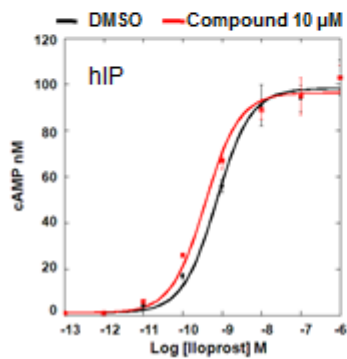
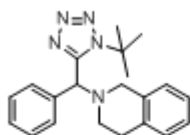
T-135492(HPLC精製)



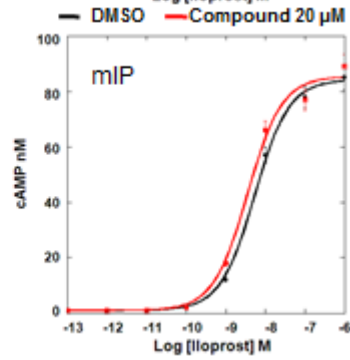
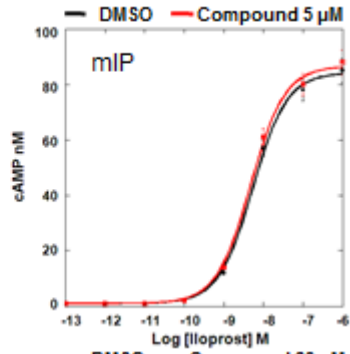
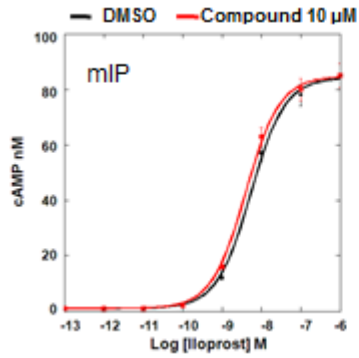
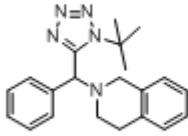
Supplementary figure 3-3-11 Effect of change in concentration of the compound on Epoprostenol dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000005

(HPLC 精製済み)

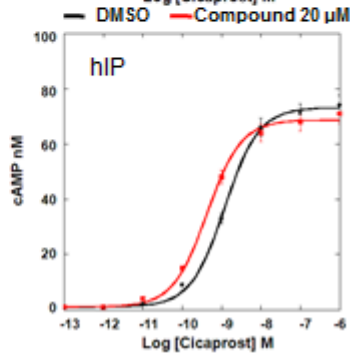
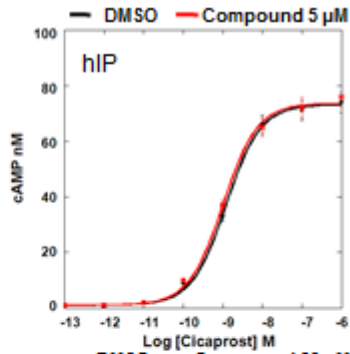
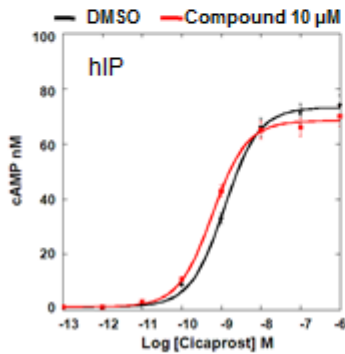
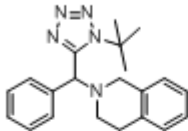


TS-000005
(HPLC 精製済み)

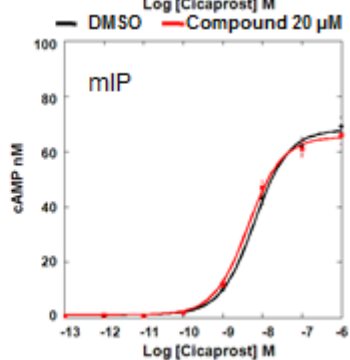
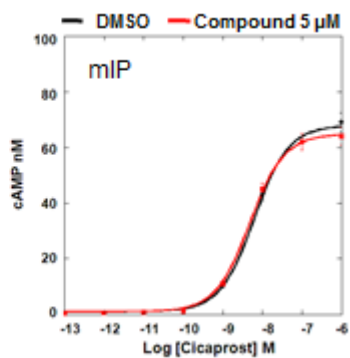
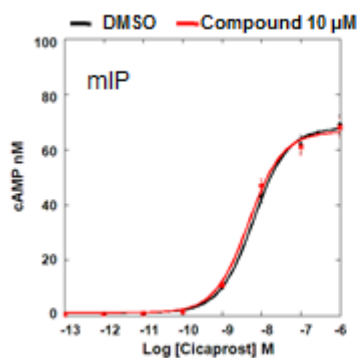
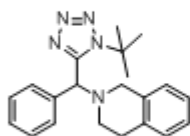


Supplementary figure 3-3-12 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000005
(HPLC 精製済み)

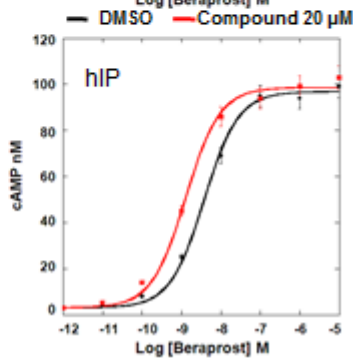
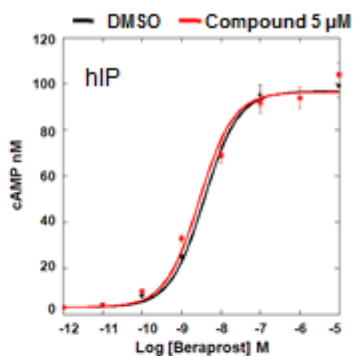
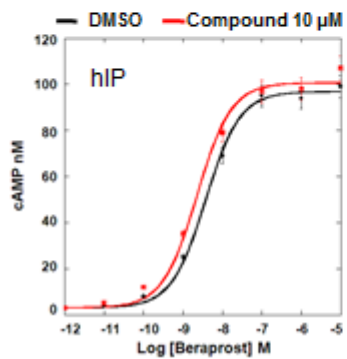
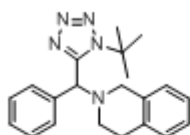


TS-000005
(HPLC 精製済み)

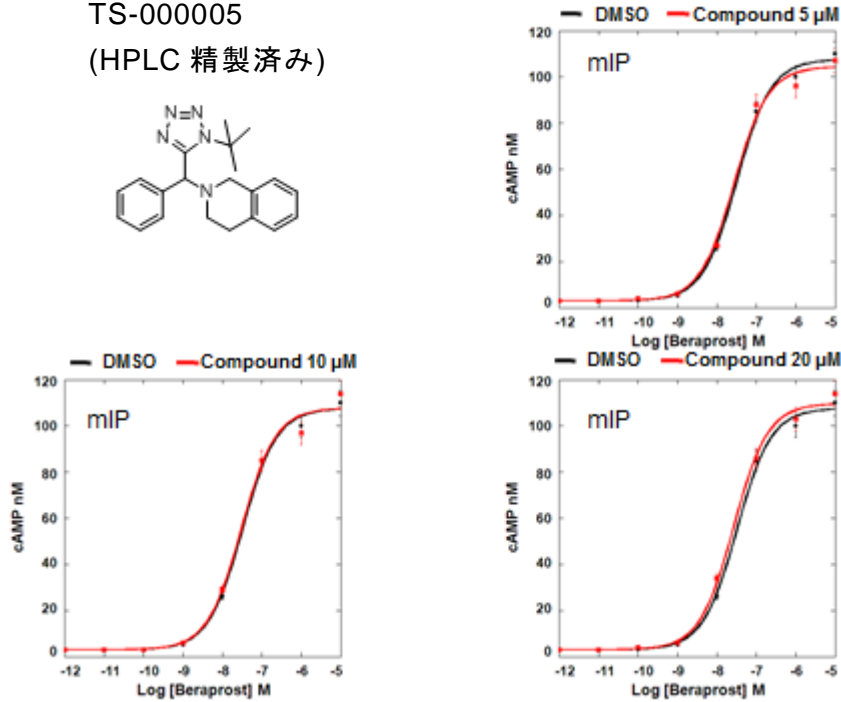
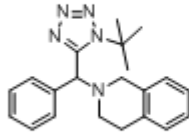


Supplementary figure 3-3-13 Effect of change in concentration of the compound on Cicaprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000005
(HPLC 精製済み)

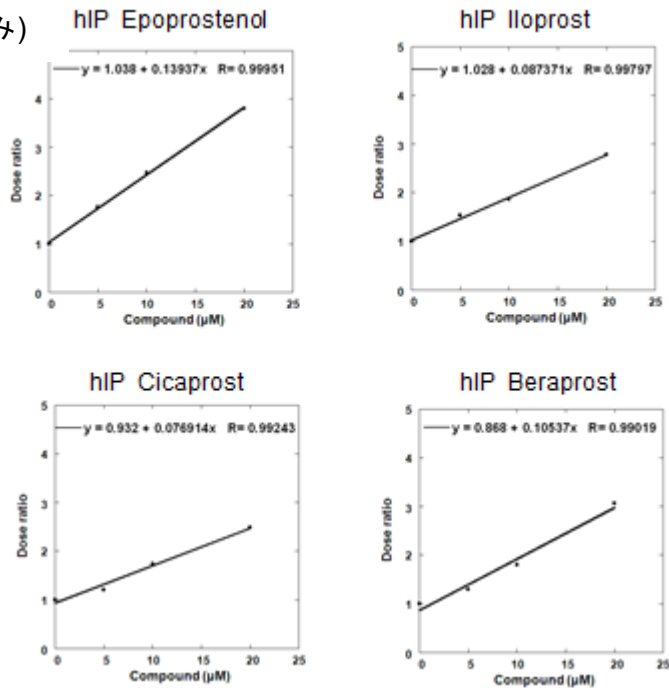


TS-000005
(HPLC 精製済み)

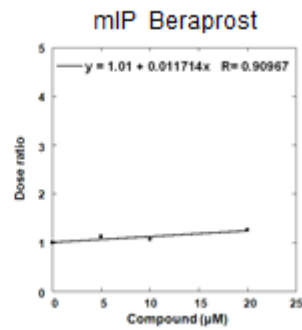
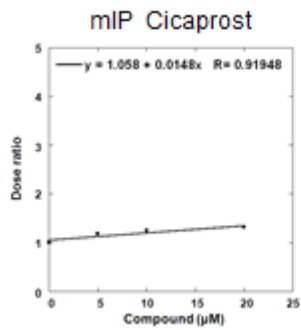
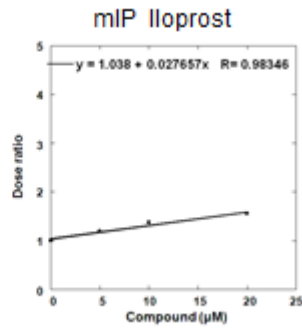
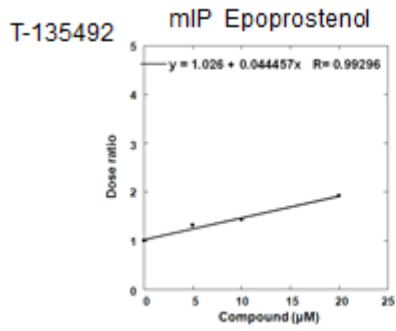


Supplementary figure 3-3-14 Effect of change in concentration of the compound on Beraprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000005
(HPLC 精製済み)

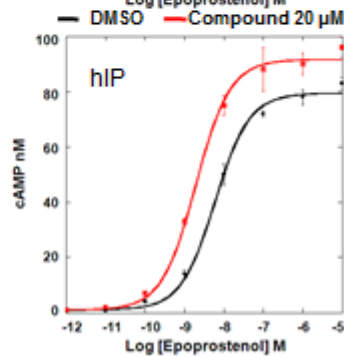
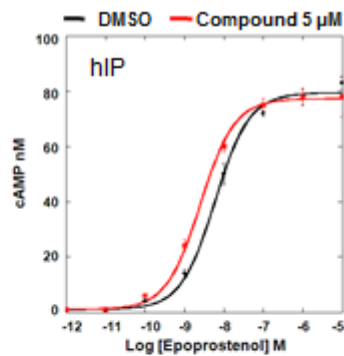
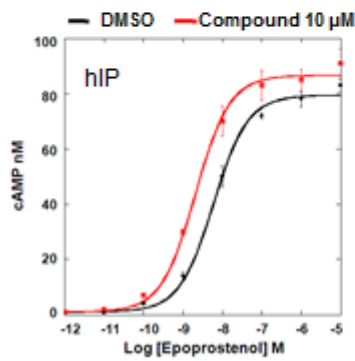
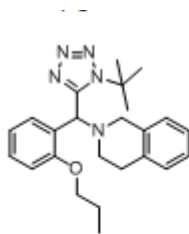


TS-000005
(HPLC 精製済み)

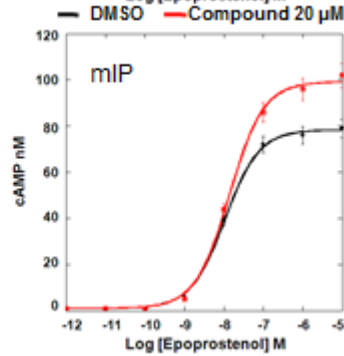
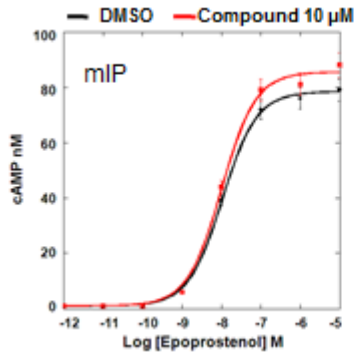
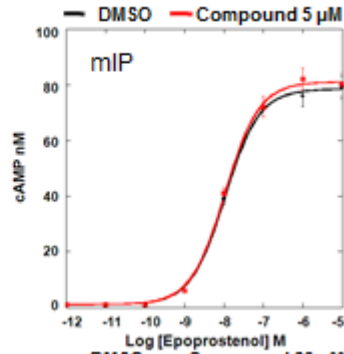
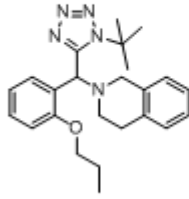


Supplementary figure 3-3-15 Effect of change in concentration of the compounds on dose ratio of Epoprostenol, Iloprost, Cicaprost or Beraprost in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000066

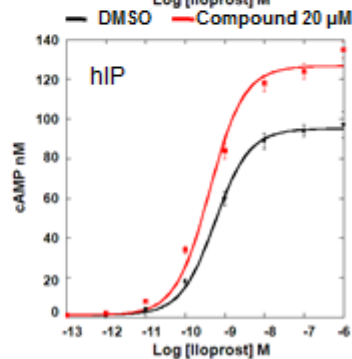
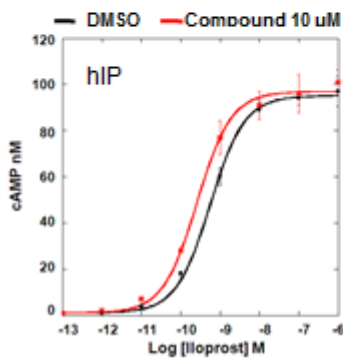
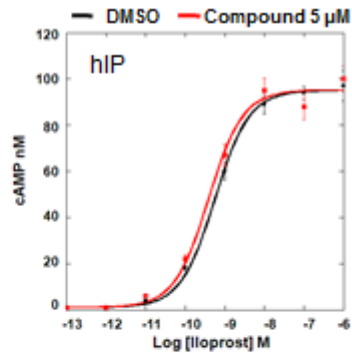
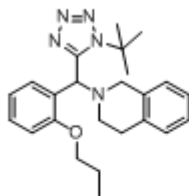


TS-000066

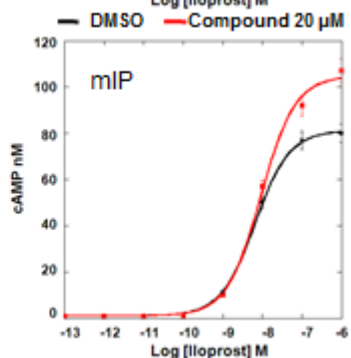
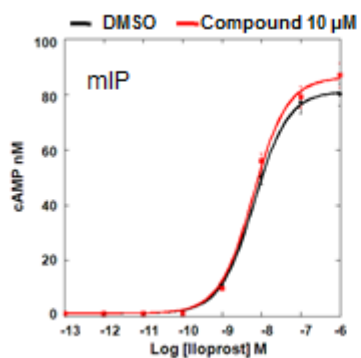
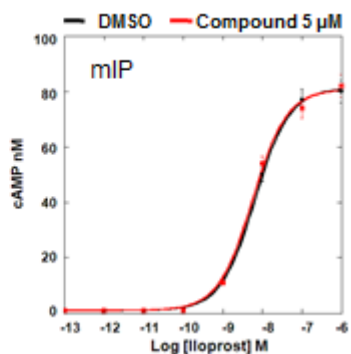
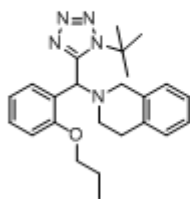


Supplementary figure 3-3-16 Effect of change in concentration of the compound on Epoprostenol dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000066

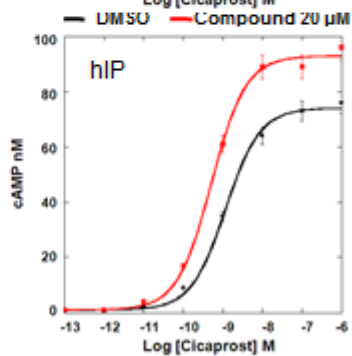
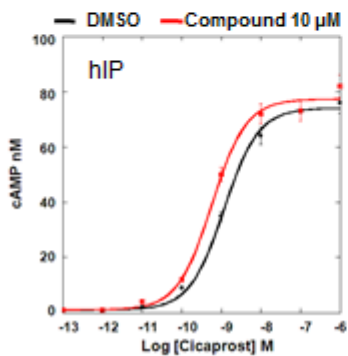
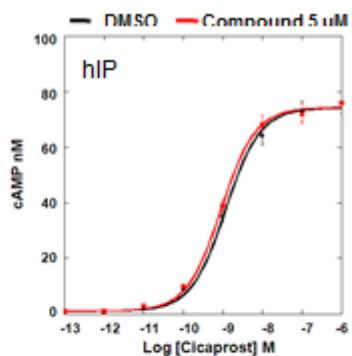
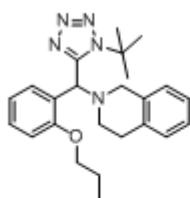


TS-000066

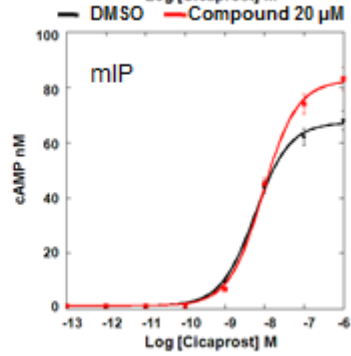
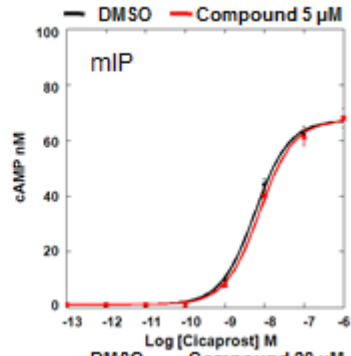
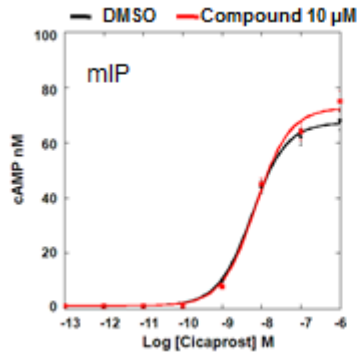
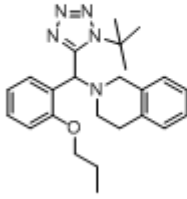


Supplementary figure 3-3-17 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000066

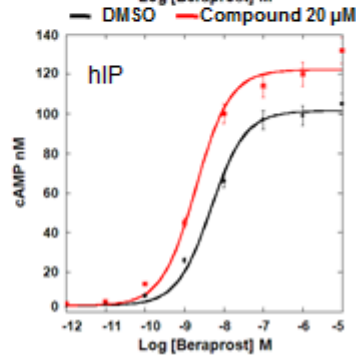
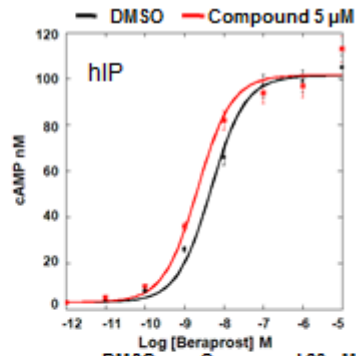
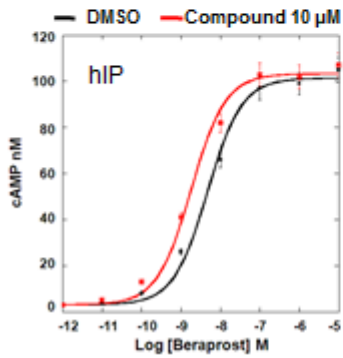
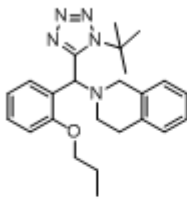


TS-000066

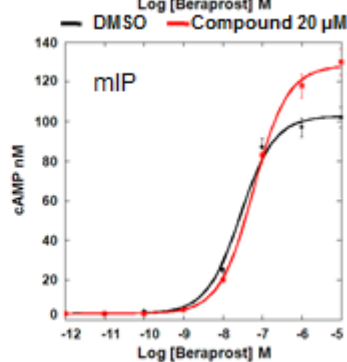
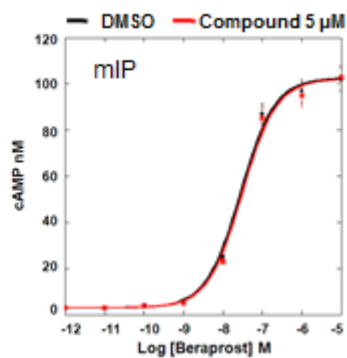
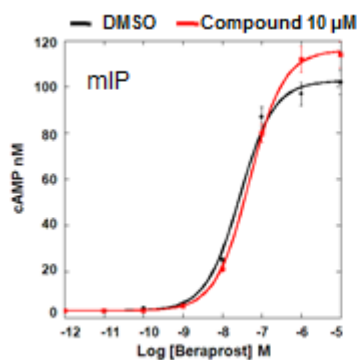
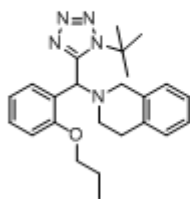


Supplementary figure 3-3-18 Effect of change in concentration of the compound on Cicaprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000066

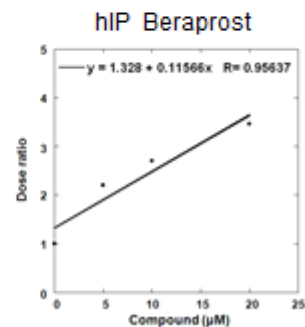
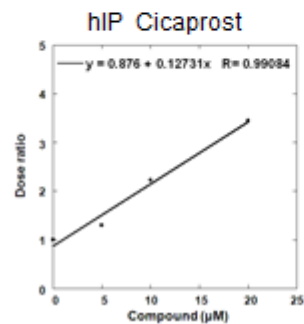
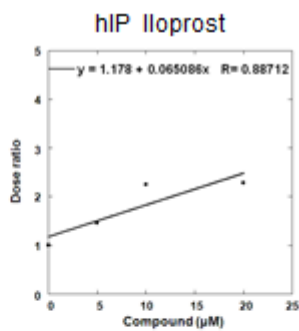
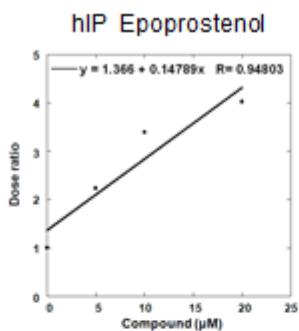


TS-000066

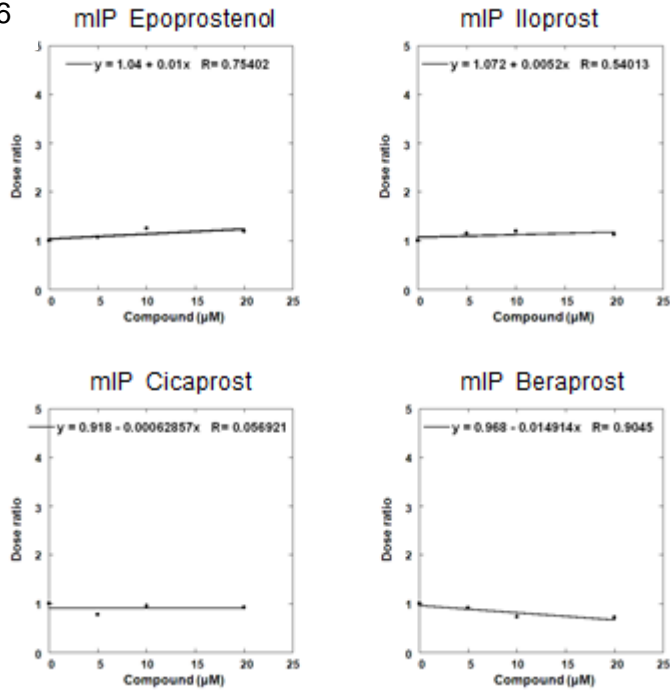


Supplementary figure 3-3-19 Effect of change in concentration of the compound on Beraprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000066

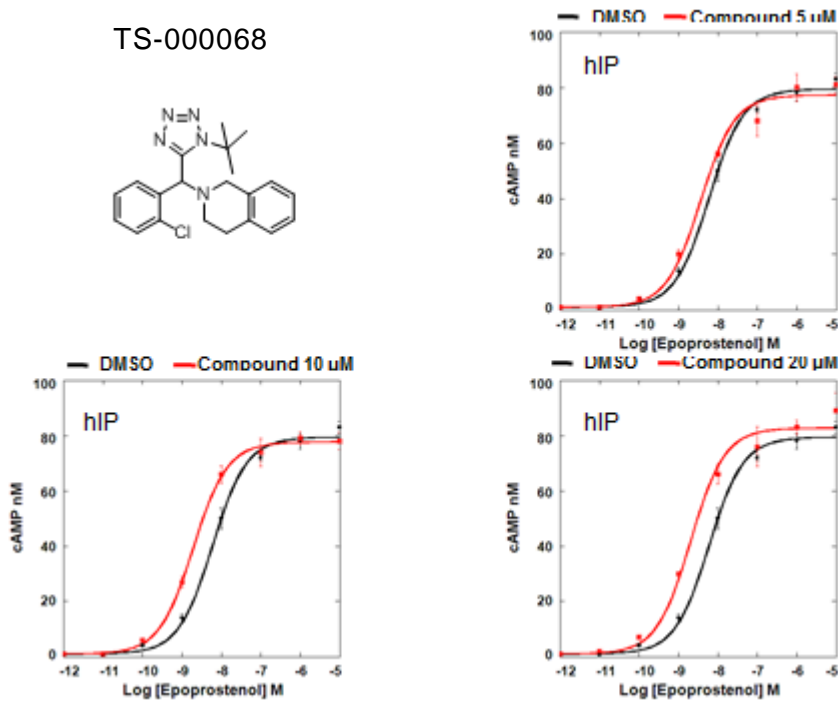
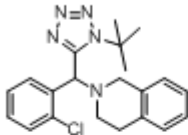


TS-000066

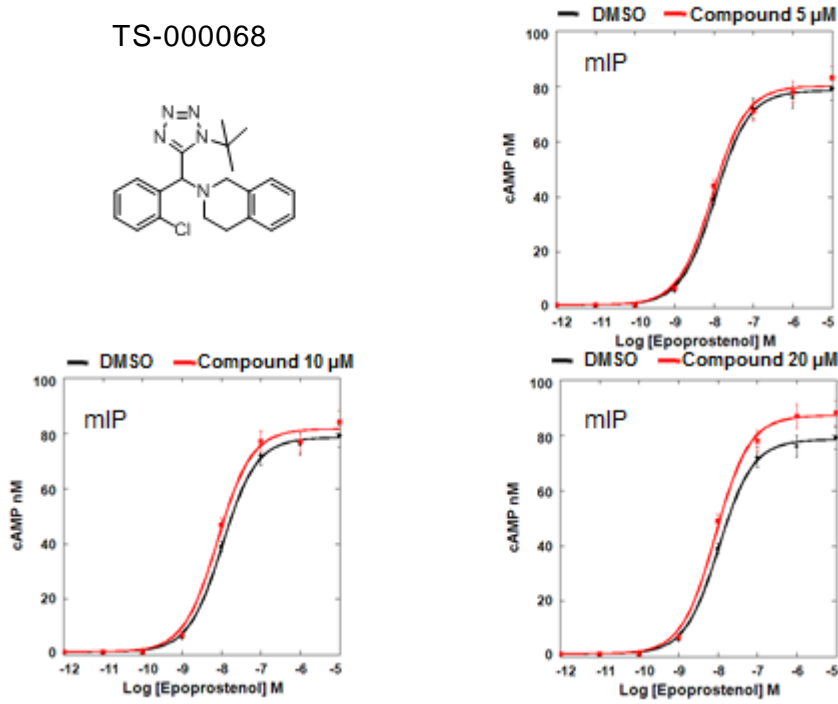
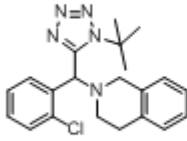


Supplementary figure 3-3-20 Effect of change in concentration of the compounds on dose ratio of Epoprostenol, Iloprost, Cicaprost or Beraprost in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000068

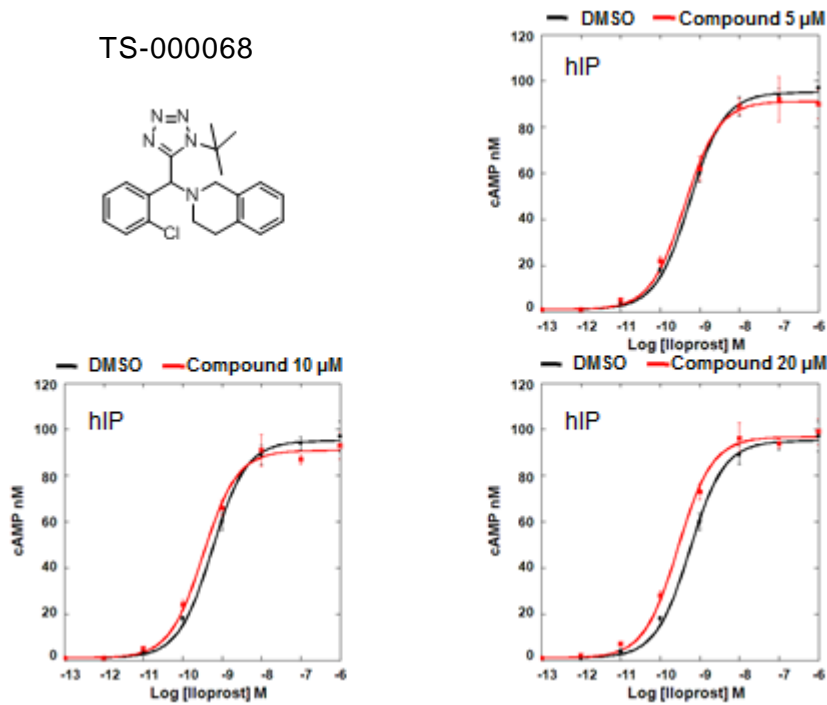
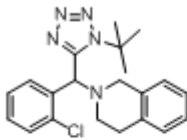


TS-000068

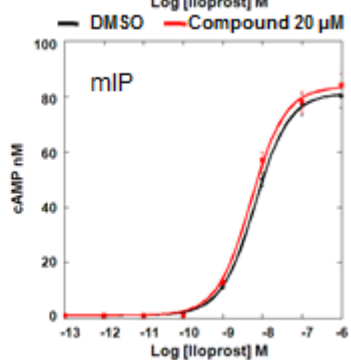
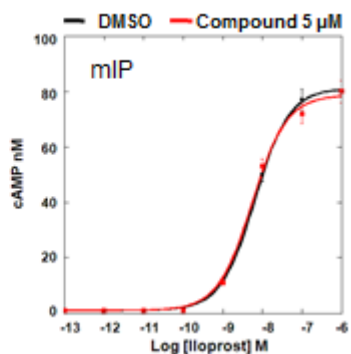
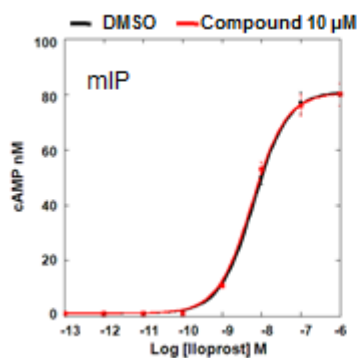
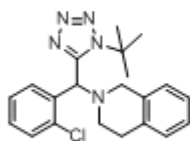


Supplementary figure 3-3-21 Effect of change in concentration of the compound on Epoprostenol dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000068

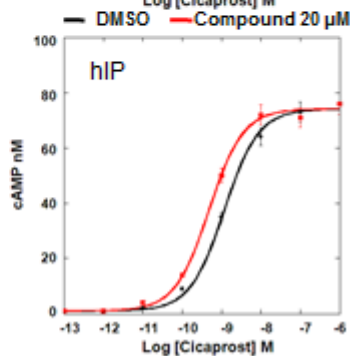
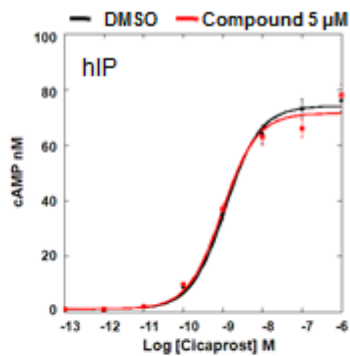
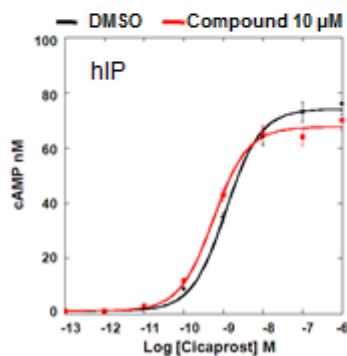
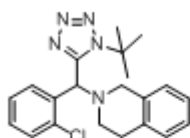


TS-000068

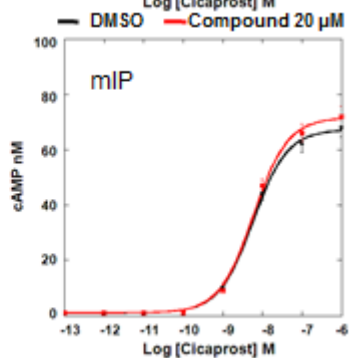
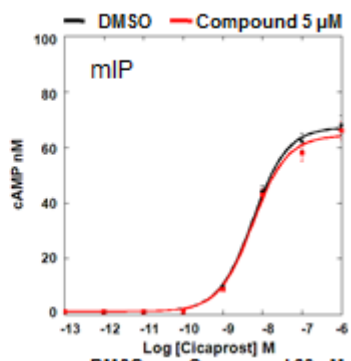
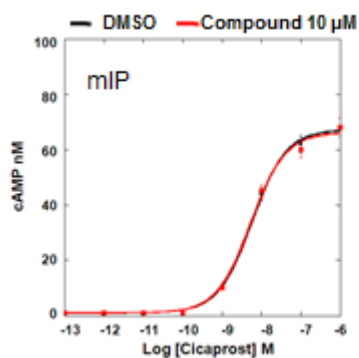
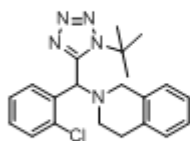


Supplementary figure 3-3-22 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000068

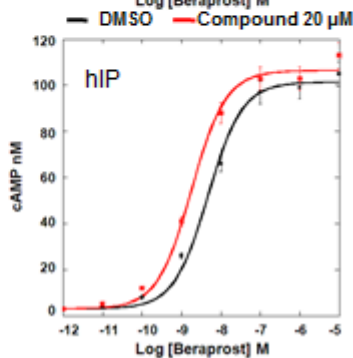
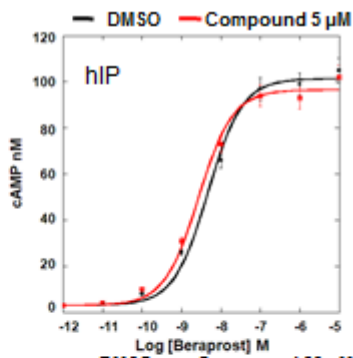
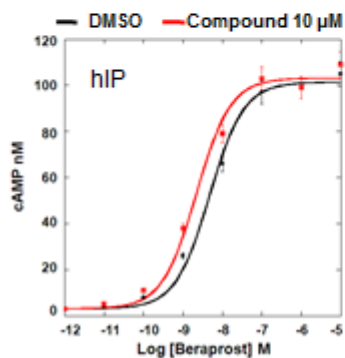
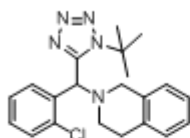


TS-000068

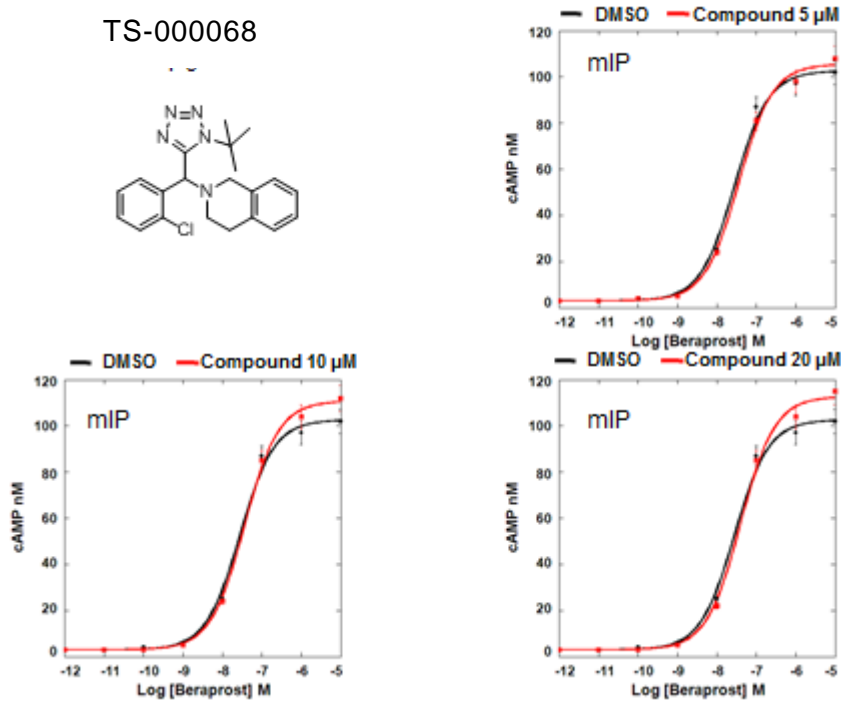
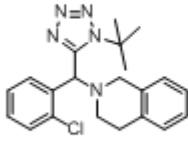


Supplementary figure 3-3-23 Effect of change in concentration of the compound on Cicaprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000068

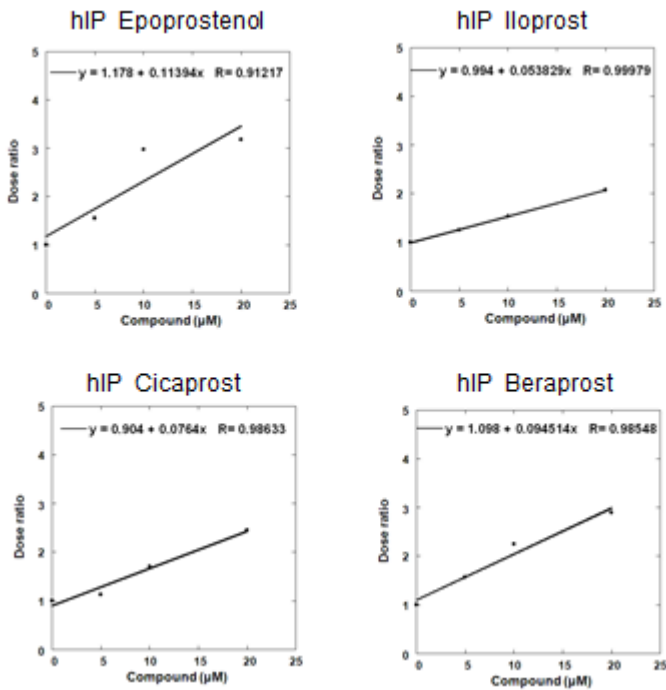


TS-000068

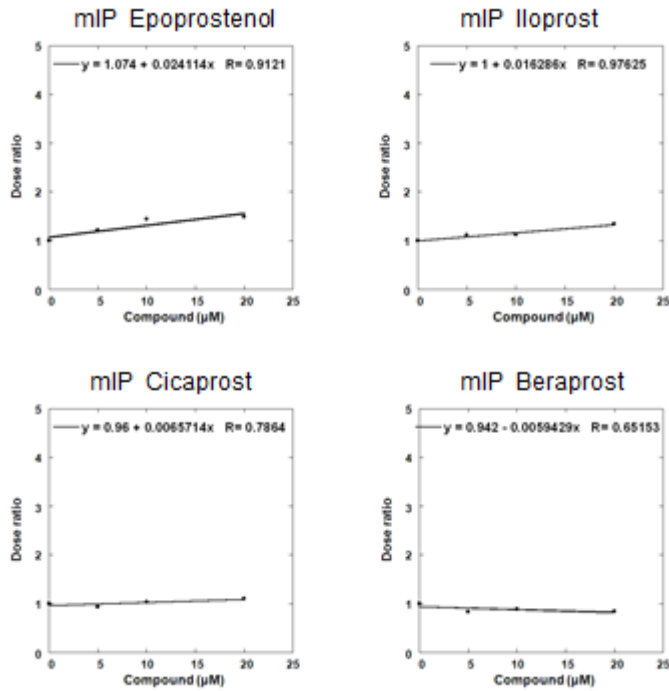


Supplementary figure 3-3-24 Effect of change in concentration of the compound on Beraprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000068

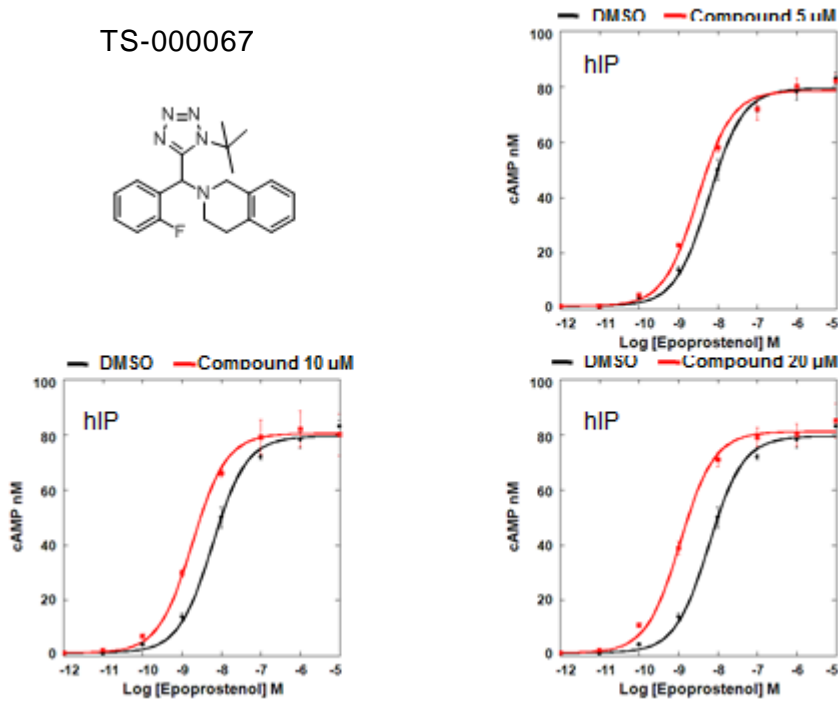
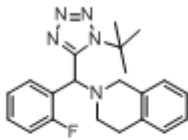


TS-000068

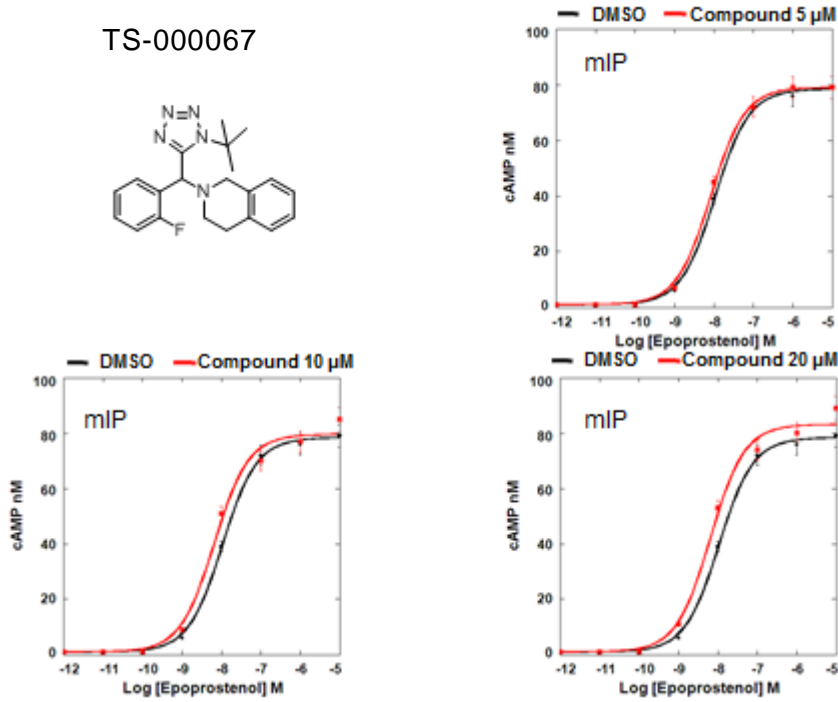
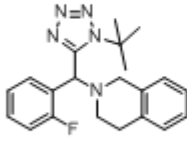


Supplementary figure 3-3-25 Effect of change in concentration of the compounds on dose ratio of Epoprostenol, Iloprost, Cicaprost or Beraprost in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000067

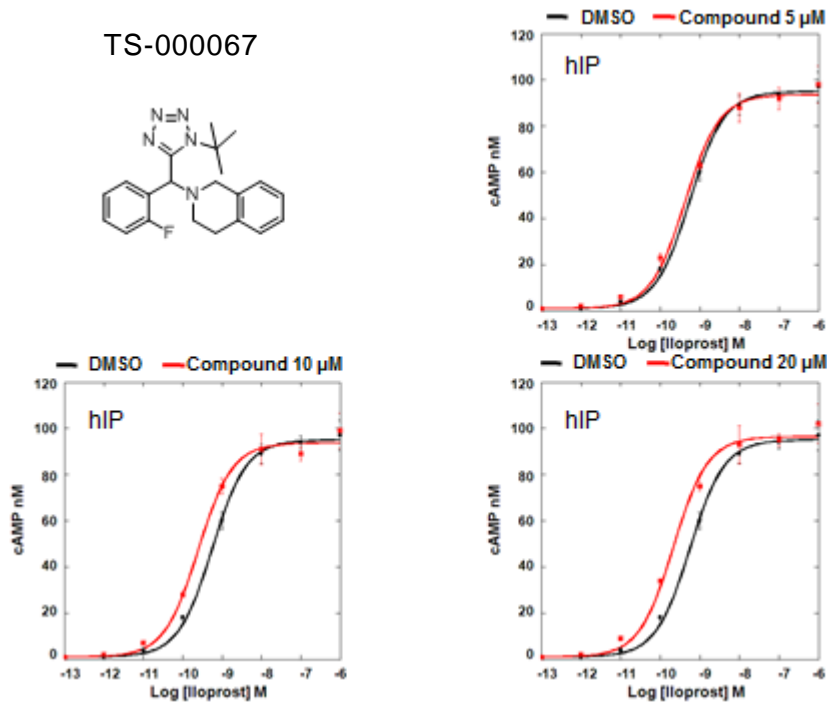
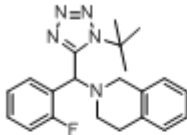


TS-000067

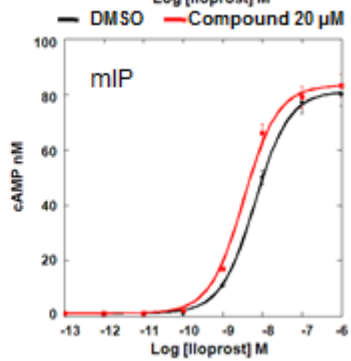
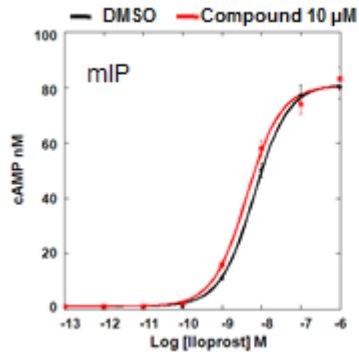
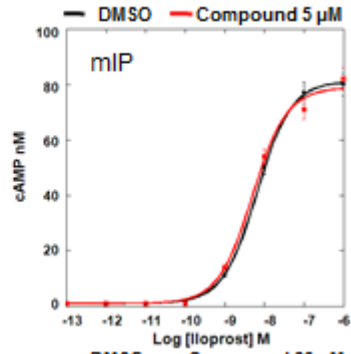
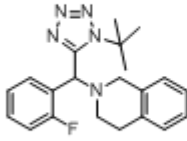


Supplementary figure 3-3-26 Effect of change in concentration of the compound on Epoprostenol dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000067

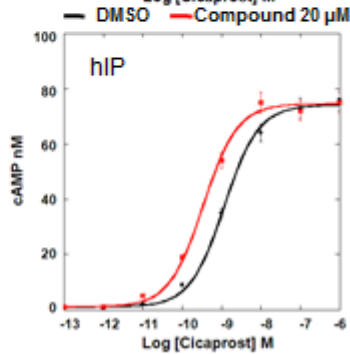
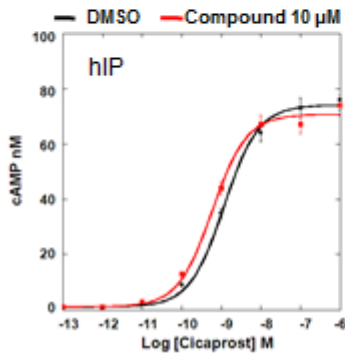
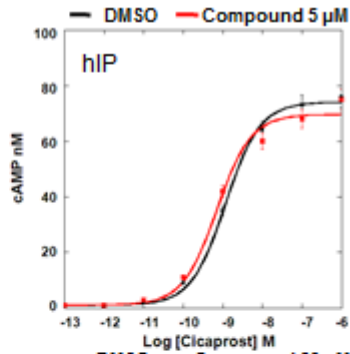
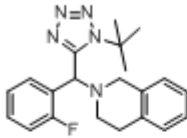


TS-000067

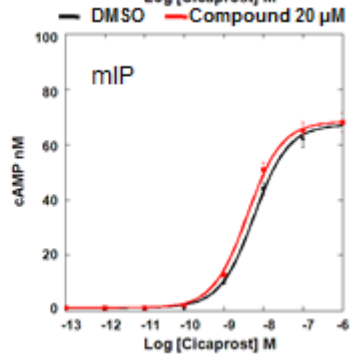
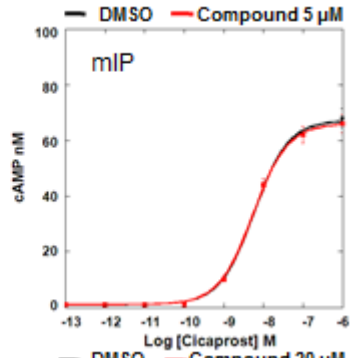
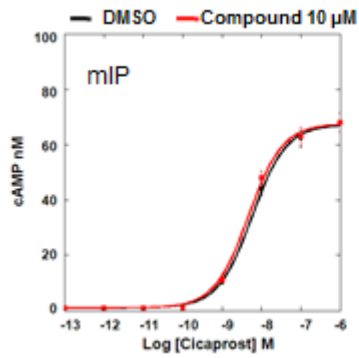
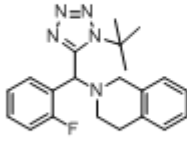


Supplementary figure 3-3-27 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000067

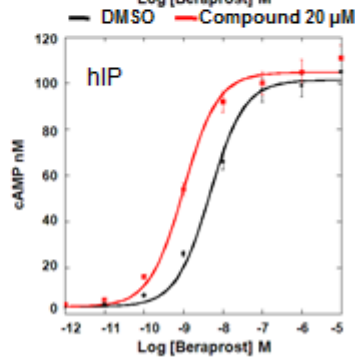
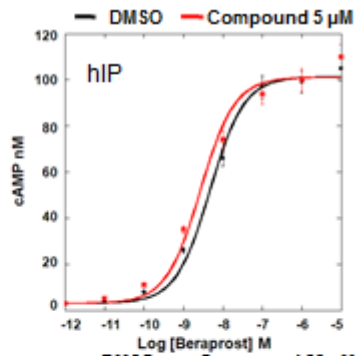
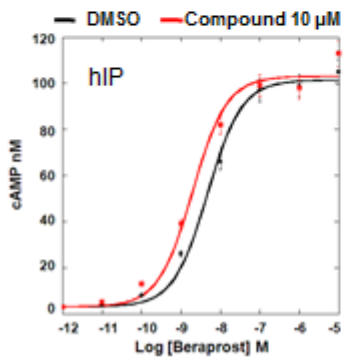
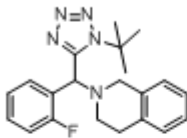


TS-000067

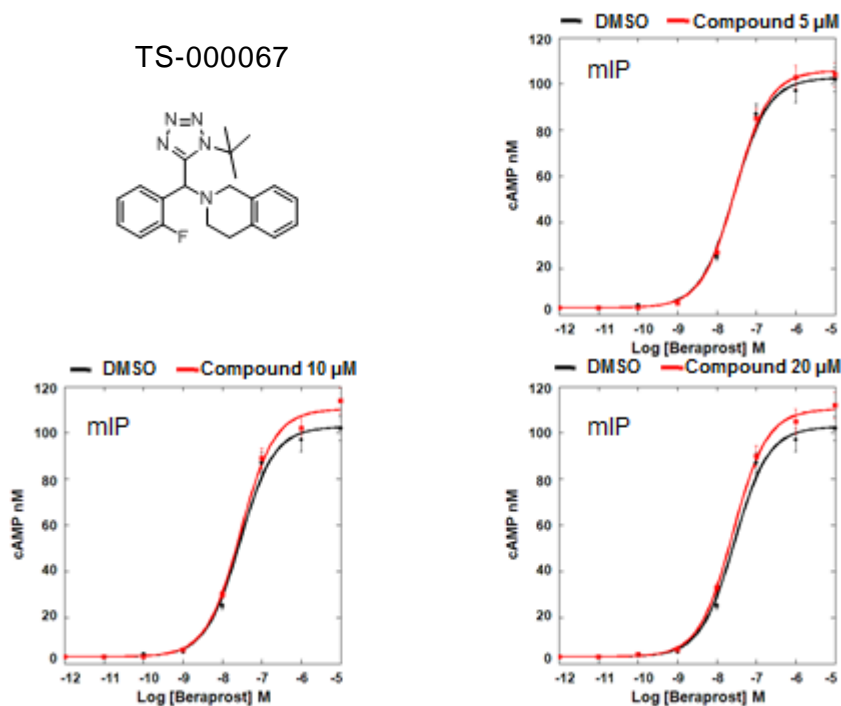
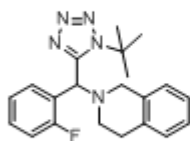


Supplementary figure 3-3-28 Effect of change in concentration of the compound on Cicaprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000067

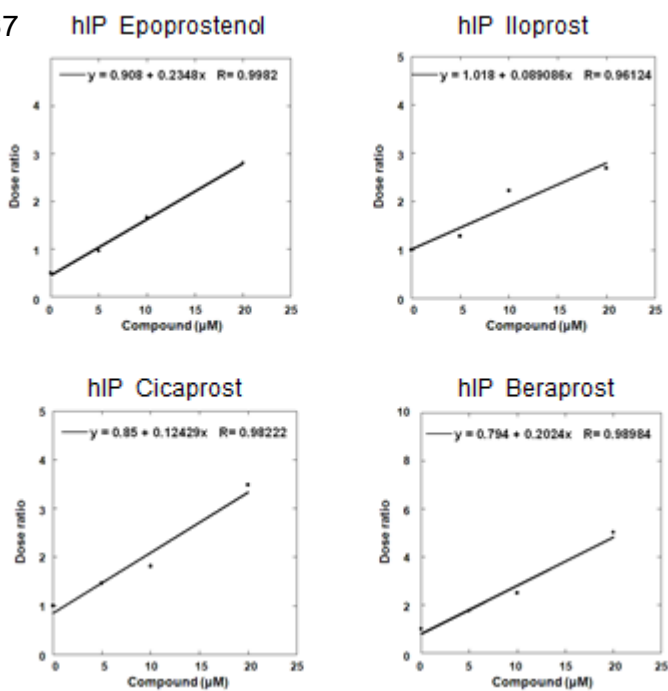


TS-000067

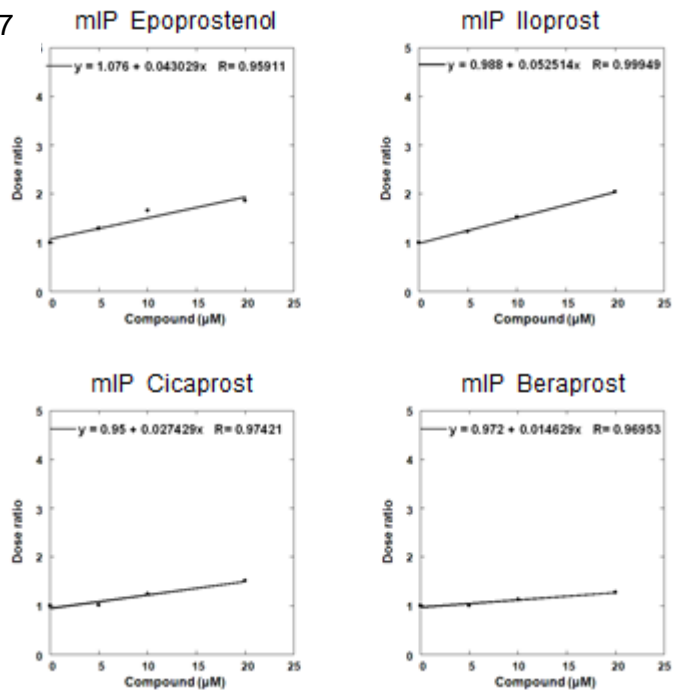


Supplementary figure 3-3-29 Effect of change in concentration of the compound on Beraprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000067

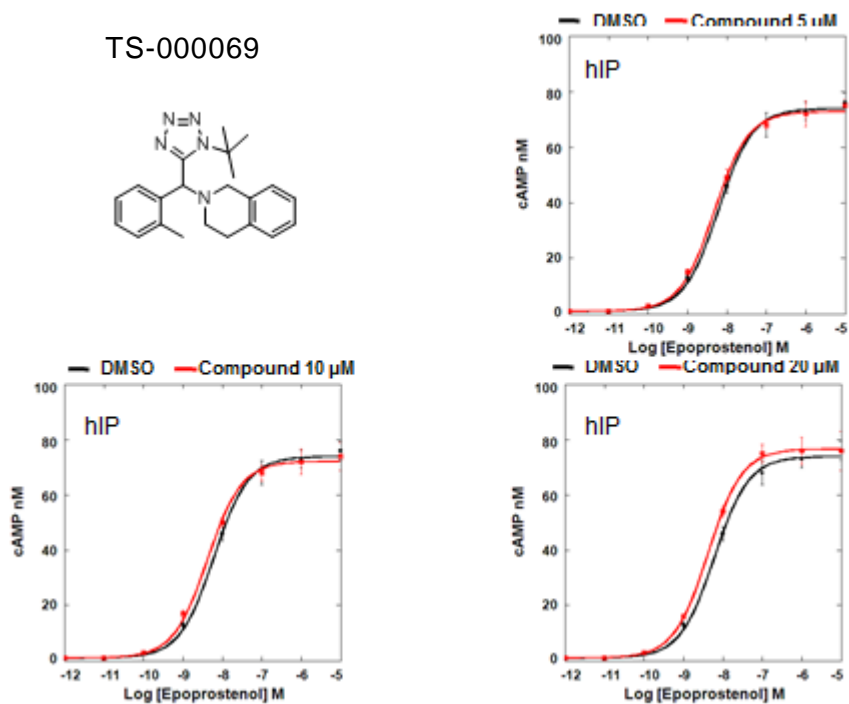
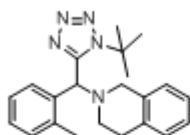


TS-000067

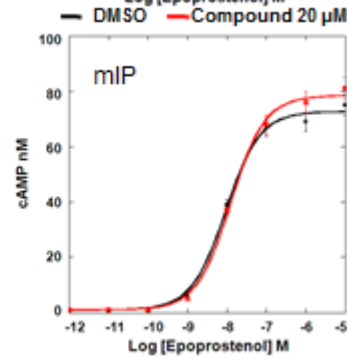
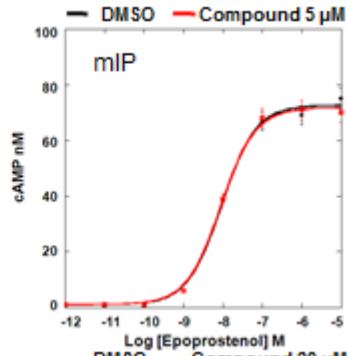
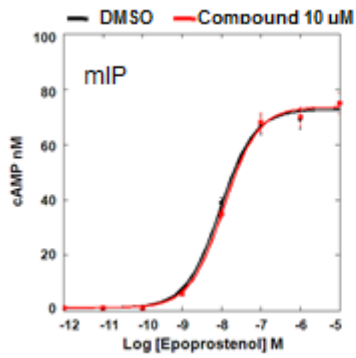
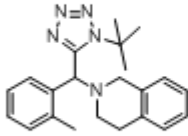


Supplementary figure 3-3-30 Effect of change in concentration of the compounds on dose ratio of Epoprostenol, Iloprost, Cicaprost or Beraprost in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000069

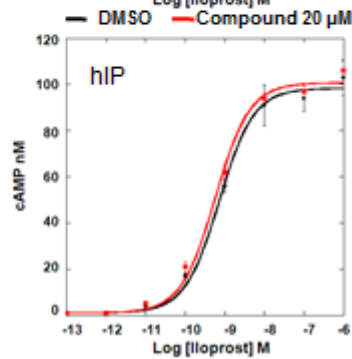
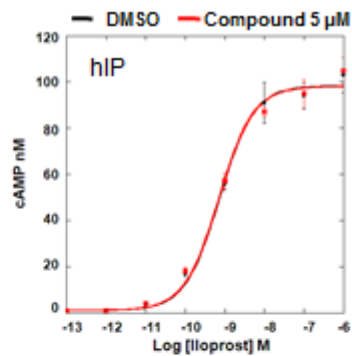
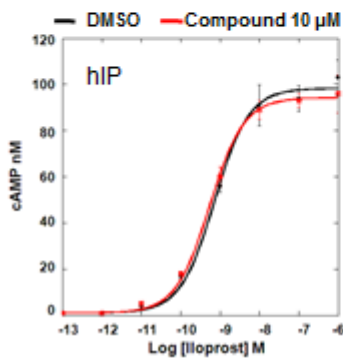
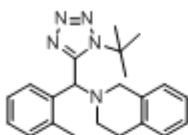


TS-000069

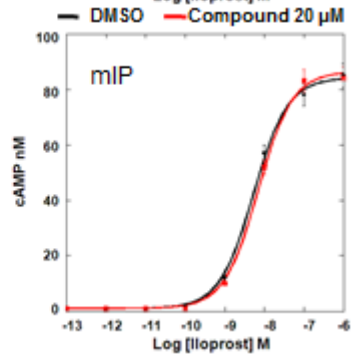
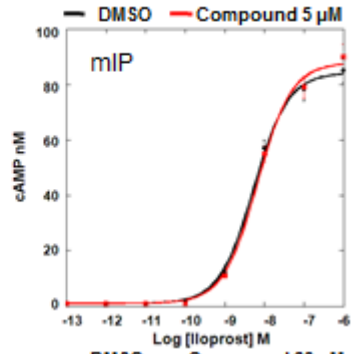
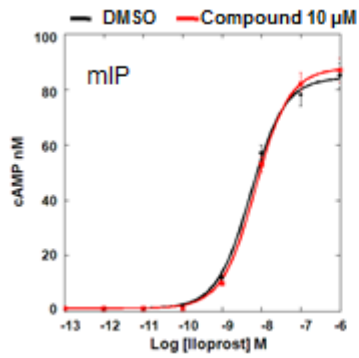
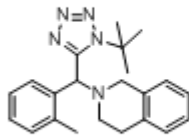


Supplementary figure 3-3-31 Effect of change in concentration of the compound on EpoprostenoL dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000069

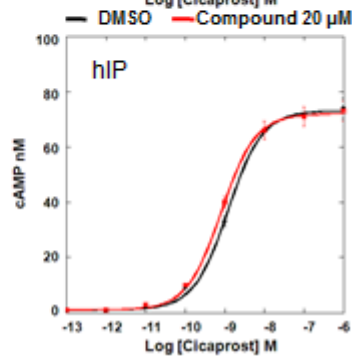
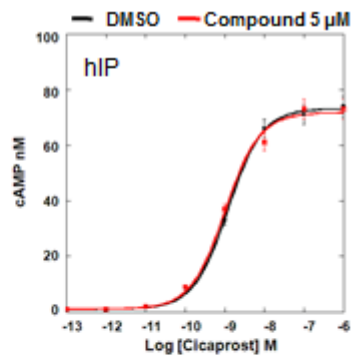
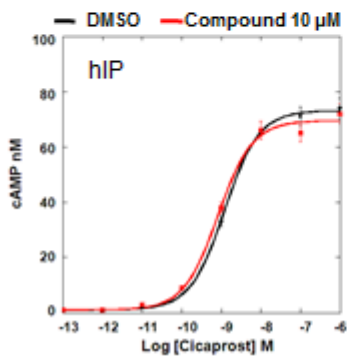
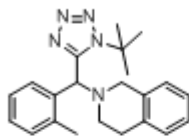


TS-000069

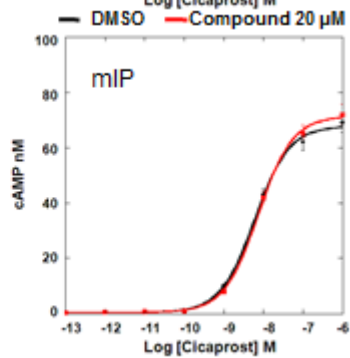
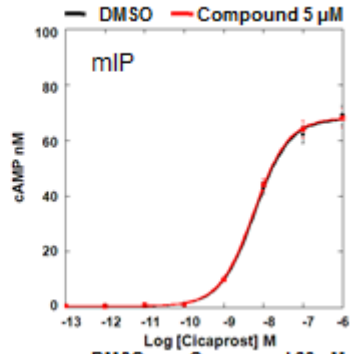
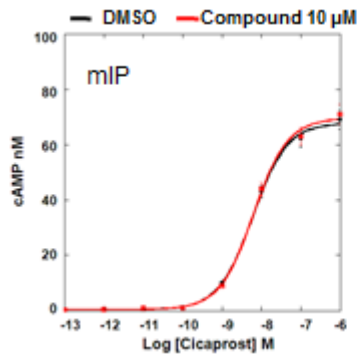
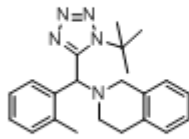


Supplementary figure 3-3-32 Effect of change in concentration of the compound on Iloprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000069

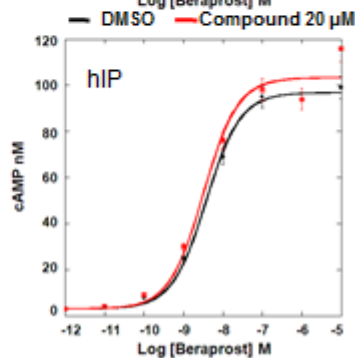
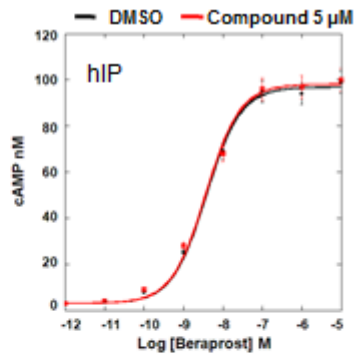
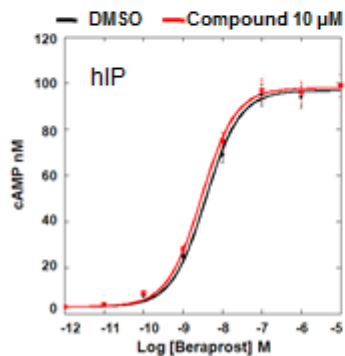
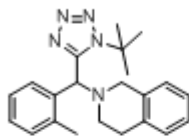


TS-000069

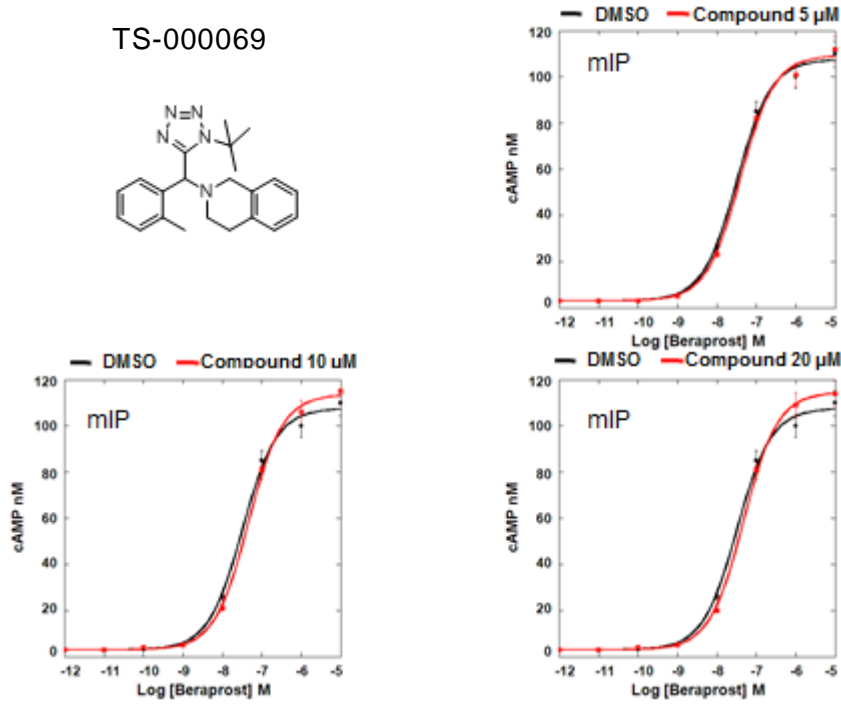
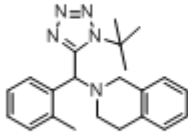


Supplementary figure 3-3-33 Effect of change in concentration of the compound on Cicaprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000069

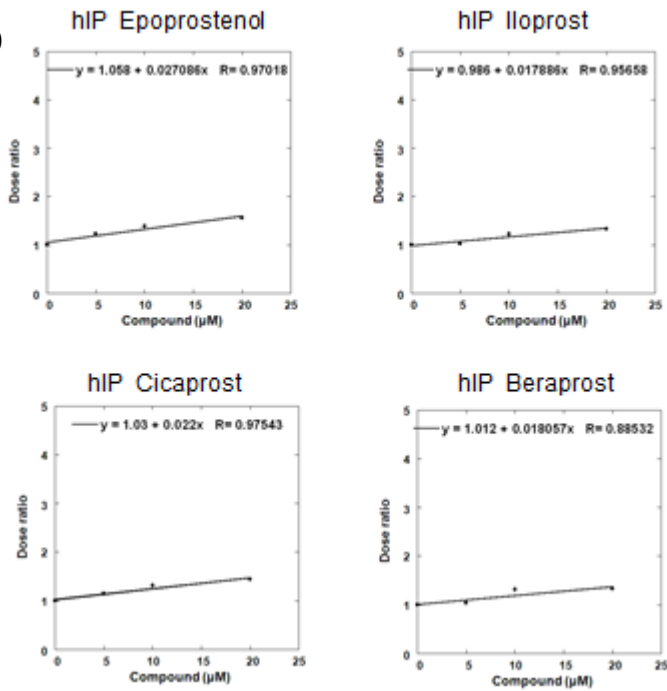


TS-000069

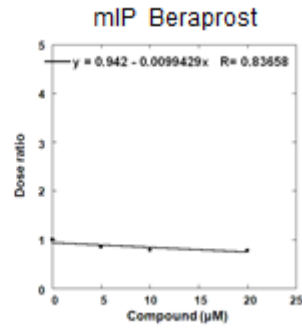
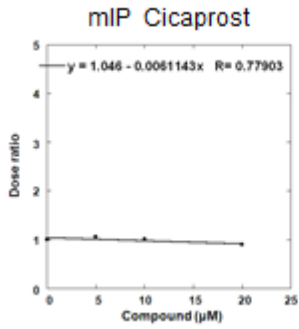
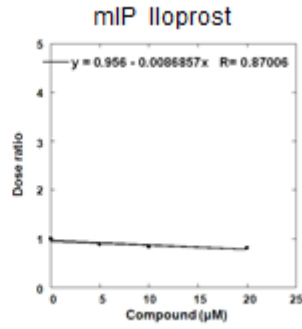
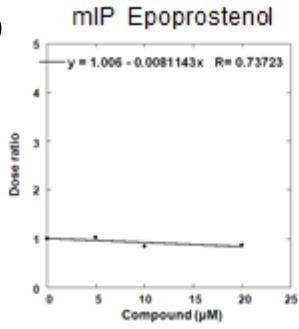


Supplementary figure 3-3-34 Effect of change in concentration of the compound on Beraprost dose response curve in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000069

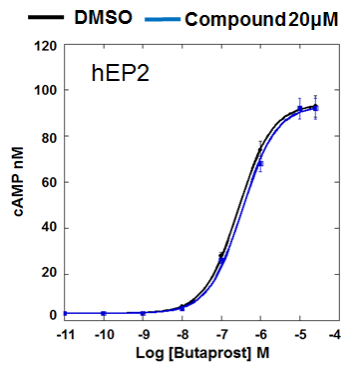
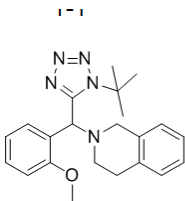


TS-000069

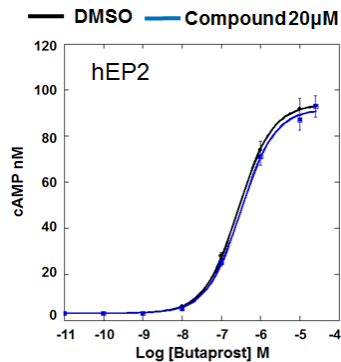
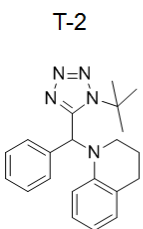


Supplementary figure 3-3-35 Effect of change in concentration of the compounds on dose ratio of Epoprostendil, Iloprost, Cicaprost or Beraprost in hIP or mIP stably expressing CHO-K1 cell.

TS-000065



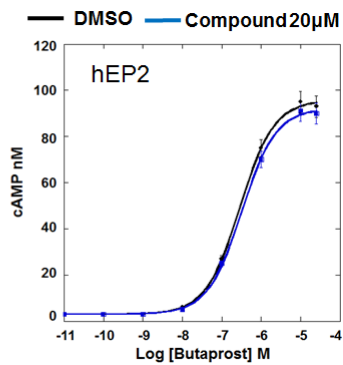
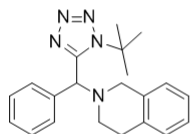
TS-000072



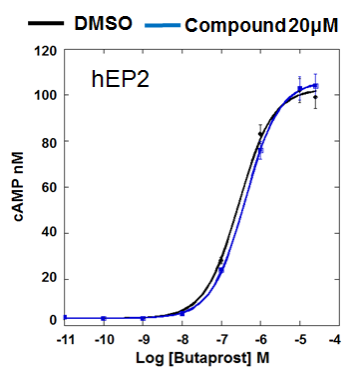
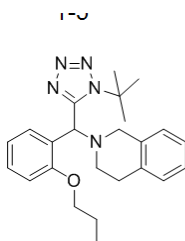
TS-000005

(HPLC 精製済)

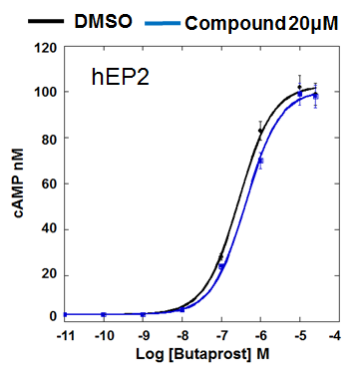
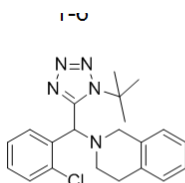
T-135492(HPLC精製)



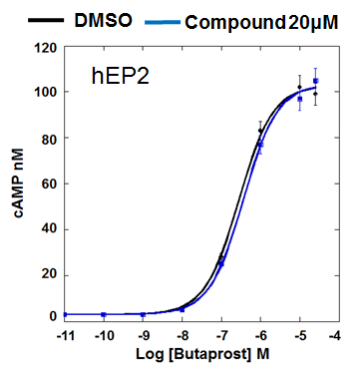
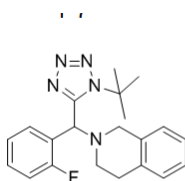
TS-000066



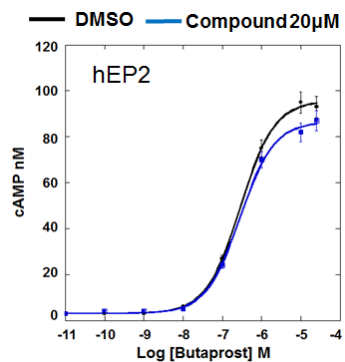
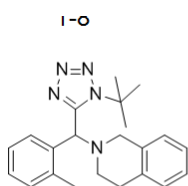
TS-000068



TS-000067

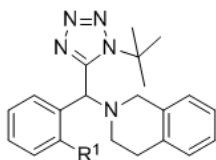


TS-000069



Supplementary figure 3-3-36 Effect of change in concentration of the compounds on Butaprost dose response curve in hEP2 stably expressing CHO-K1 cell.

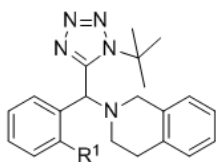
Supplementary table 3-3-1 structure-activity-relationship of novel compounds with Epoprostenol.



使用したアゴニスト : Epoprostenol

Compound	R ¹	hIP assay	mIP assay
TS-000005	H	6.9 μM	21.9 μM
TS-000065	OCH ₃	4.3 μM	13.5 μM
TS-000066	OCH ₂ CH ₂ CH ₃	4.3 μM	96.0 μM
TS-000068	Cl	7.2 μM	38.4 μM
TS-000067	F	4.7 μM	21.5 μM
TS-000069	CH ₃	34.8 μM	—

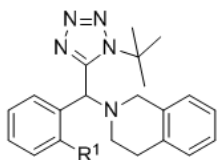
Supplementary table 3-3-2 structure-activity-relationship of novel compounds with Iloprost.



使用したアゴニスト : Iloprost

Compound	R ¹	hIP assay	mIP assay
TS-000005	H	11.1 μM	34.8 μM
TS-000065	OCH ₃	6.5 μM	26.6 μM
TS-000066	OCH ₂ CH ₂ CH ₃	12.6 μM	178.5 μM
TS-000068	Cl	18.7 μM	61.4 μM
TS-000067	F	11.0 μM	19.3 μM
TS-000069	CH ₃	56.7 μM	—

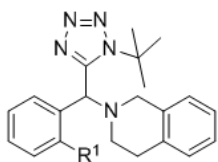
Supplementary table 3-3-3 structure-activity-relationship of novel compounds with Cicaprost.



使用したアゴニスト : Cicaprost

Compound	R ¹	hIP assay	mIP assay
TS-000005	H	13.9 μM	63.6 μM
TS-000065	OCH ₃	8.0 μM	24.2 μM
TS-000066	OCH ₂ CH ₂ CH ₃	8.8 μM	—
TS-000068	Cl	14.3 μM	158.3 μM
TS-000067	F	9.3 μM	38.3 μM
TS-000069	CH ₃	44.1 μM	—

Supplementary table 3-3-4 structure-activity-relationship of novel compounds with Beraprost.



使用したアゴニスト : Beraprost

Compound	R ¹	hIP assay	mIP assay
TS-000005	H	10.7 μM	84.5 μM
TS-000065	OCH ₃	4.2 μM	27.2 μM
TS-000066	OCH ₂ CH ₂ CH ₃	5.8 μM	—
TS-000068	Cl	9.5 μM	—
TS-000067	F	6.0 μM	70.3 μM
TS-000069	CH ₃	54.7 μM	—

第 4 章

標的細胞・組織における 評価化合物の有効性

ここまではすべて遺伝子組換え体を用いて被検化合物を評価してきた。しかし、創

薬コンセプトを検証する上で、標的細胞で同様の作用を確認する必要がある。また、PGI₂は、主に血管内皮細胞で産生され、血管平滑筋を弛緩させることで血管拡張作用をもたらす。すなわち、ある動物の摘出血管を用いて、その作用を評価化合物が増強させるかどうか試みた。本研究の標的細胞は、肺動脈血管平滑筋細胞であり、標的臓器は、肺動脈血管である。創出した新規化合物の有効性を確認するために、それぞれのモデルとして、ヒト大動脈血管平滑筋細胞及びモルモット胸部大動脈血管を使用して評価した。モルモット胸部大動脈血管を使用したマグヌス試験は、第2節以降に記載した。

第1節 ヒト大動脈血管平滑筋細胞での評価

【実験目的】

これまでのcAMPアッセイは、すべてCHO-K1細胞を宿主とし、組み換え細胞で実施してきた。しかし、本研究の標的臓器は血管平滑筋細胞である。そこで、標的細胞で評価化合物の有効性を確認するために、ヒト大動脈血管平滑筋細胞を用いてcAMPアッセイを実施した。

【実験方法】

ヒト大動脈平滑筋細胞でcAMP Cell-Based Assay

IPアゴニストであるEpoprostenolを 10^{-12} ~ 10^{-5} Mで添加すると同時に、被検化合物を12.5 μM (Final)、25 μM (Final)、50 μM (Final)、100 μM (Final)で添加し、ヒト大動脈平滑筋細胞を5 μl/wellで分注し反応開始させた。40分後に試薬に含まれるTritonX-100にて反応を停止した後、Cisbio社のcAMPアッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いたHTRF法で蛍光を測定し、被検化合物を共存させて得られたcAMP濃度をnMで表記する。

【プロトコール】

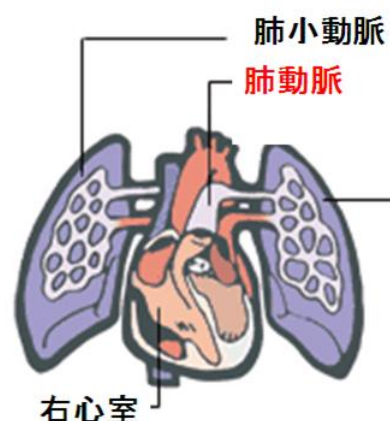
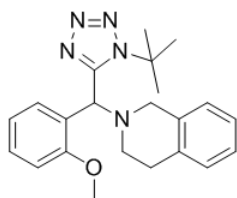


Figure 4-1-1 Therapeutic target organ for pulmonary hypertension.

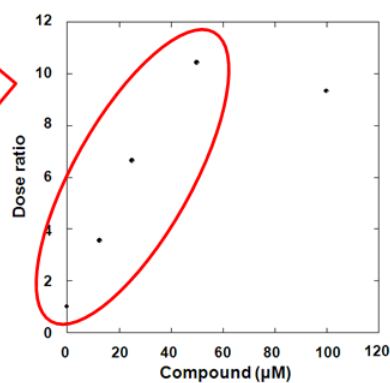
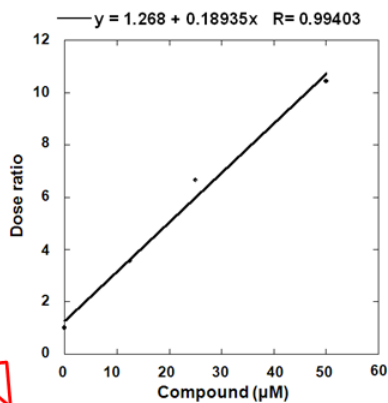
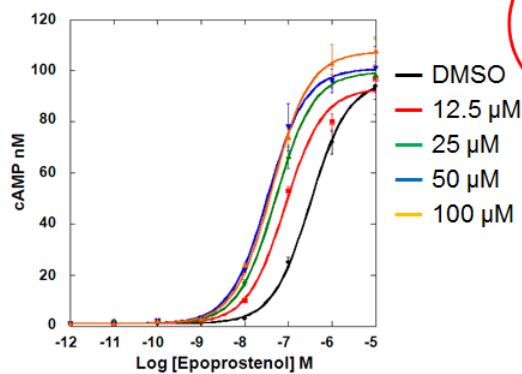
1. Epoprostenol + 被検化合物 5 μ l をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. ヒト大動脈平滑筋細胞を、7000 cells/well となるように 5 μ l/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5 μ l/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5 μ l/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. 各プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より産生された cAMP 濃度を計算する。

【結果】

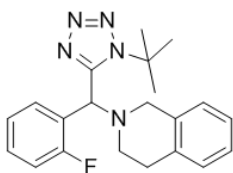
TS-000065



アゴニストの用量反応曲線を2倍左シフトさせるのに必要な化合物濃度
3.9 μ M



TS-000067



アゴニストの用量反応曲線を2倍左シフトさせるのに必要な化合物濃度
2.9 μM

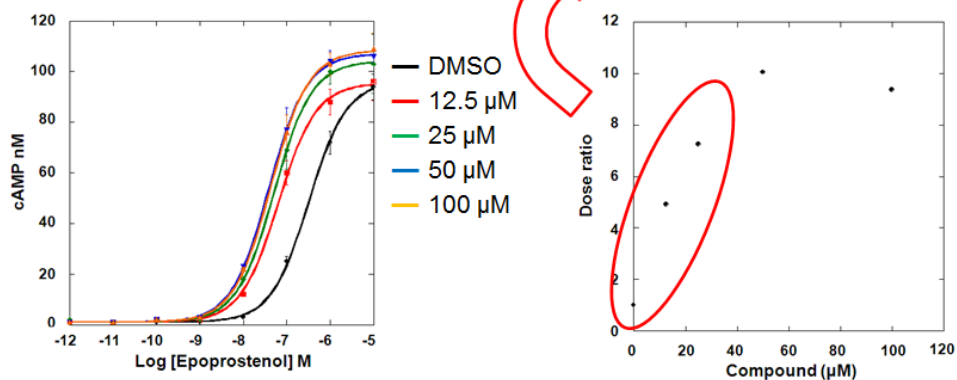


Figure 4-1-2 Effect of change in concentration of TS-000065 and TS-000067 on Epoprostenol dose response curve in cAMP assay with Human Aortic Smooth Muscle Cells

ヒト大動脈平滑筋細胞でも、これまでと同様に評価化合物によるアゴニストの用量反応曲線を左シフトさせることが確認できた。すなわち、生体内で標的臓器及び標的細胞に評価化合物が作用することができれば、仮説通りにアロステリックモジュレーター作用が認められ、さらに活性の高い化合物を創出できれば、より低濃度で有効性を確認できると考えられる。

第 2 節 種差の検討

ヒト IP とその他の種における IP の比較

【実験目的】

これまでに得られた化合物のヒト IP に対する薬理活性とマウス IP に対する活性の間には、種差が認められた。また、前回報告した際に掲載した論文では、ヒトとラット IP 間で種差が認められていたことから、今後予定している *in vivo* の実験を見据え、コンセプトを検証可能な種を見出すことを目的としてヒト IP とその他の種における IP の identity を比較した。

【実験方法】

ゲノムデータベース上に登録されている IP の配列を取得し、ホモロジー解析をした。

【結果】

ヒト IP とサル IP 間の identity は 96 %、ヒト IP とブタ IP 間の identity は 84 %、ヒト IP とウシ IP 間の identity は 83 %、ヒト IP とイヌ IP 間の identity は 83 %、ヒト IP とウサギ IP 間の identity は 82 %、ヒト IP とモルモット IP 間の identity は 82 %、ヒト IP とラット IP 間の identity は 78 %、ヒト IP とマウス IP 間の identity は 78 %である。例えば、Identity が 80 %であれば種差は認められないなどの議論はできないが、今回のホモロジー解析の結果を加味し、3 種類程度 IP 発現ベクターを構築し、実際にアッセイして種差を克服する化合物を見出したい。

また、アロステリックモジュレーターの場合、アゴニストとの組み合わせも検討する必要があるため、PGI₂ や Iloprost だけでなく他の IP アゴニストも用いてそれぞれの種における最適な組み合わせを精査する。

【実験目的】

今後、創薬コンセプトを検証する上で、動物の摘出血管及び血液を使用する必要がある。そこで、すでに取得している評価化合物の種差への影響を検討するため、マウスに加え、ラット、モルモット、イヌ、ウサギ、ブタの5種のIPの発現ベクターを構築し、cAMPアッセイを実施した。

【実験方法】

A) mIP 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay

CHO-K1 細胞を宿主に、マウス IP 受容体 (mIP) を安定的に発現させた細胞株を選択した。IP アゴニストである Epoprostenol を 10^{-12} ~ 10^{-5} M で添加すると同時に、被検化合物を 12.5 μ M (Final)、25 μ M (Final)、50 μ M (Final)、100 μ M (Final) で添加し、mIP 安定発現細胞を 5 μ l/well で分注し反応開始させた。40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した後、Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で蛍光を測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。

【プロトコール】

1. Epoprostenol + 被検化合物 5 μ l をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. mIP 安定発現細胞を、7000 cells/well となるように 5 μ l/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5 μ l/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5 μ l/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より産生された cAMP 濃度を計算する。

B) rIP、gIP、dIP、oIP と pIP 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay

CHO-K1 細胞を宿主に、ラット、モルモット、イヌ、ウサギとブタそれぞれの種の IP 受容体 (rIP、gIP、dIP、oIP と pIP) を一過性に発現させた細胞株を選択した。IP アゴニストである Epoprostenol を 10^{-14} ~ 10^{-7} M で添加すると同時に、被検化合物を 12.5 μ M (Final)、25 μ M (Final)、50 μ M (Final)、100 μ M (Final) で添加し、rIP、gIP、dIP、oIP と pIP それぞれの強制発現細胞を 5 μ l/well で分注し反応開始させた。40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した後、Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で蛍光を測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。

【プロトコール】

1. Epoprostenol + 被検化合物 5 μ l をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. mIP 安定発現細胞を、10000 cells/well となるように 5 μ l/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5 μ l/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5 μ l/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より産生された cAMP 濃度を計算する。

C) EP2 強制発現細胞系で cAMP Cell-Based Assay ←受容体選択性をチェックする目的

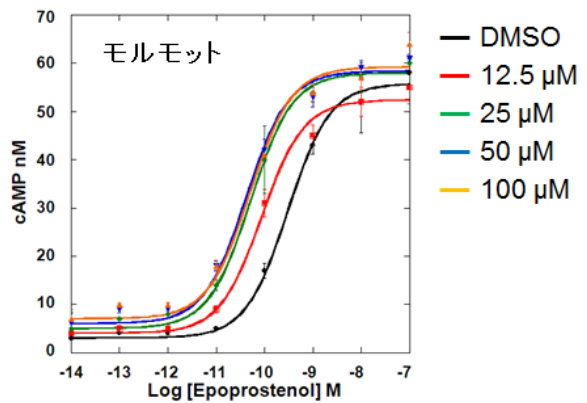
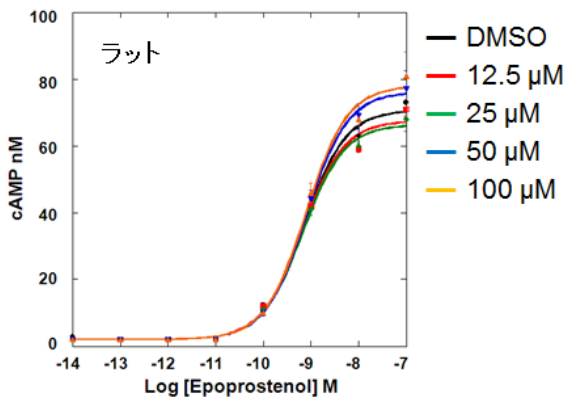
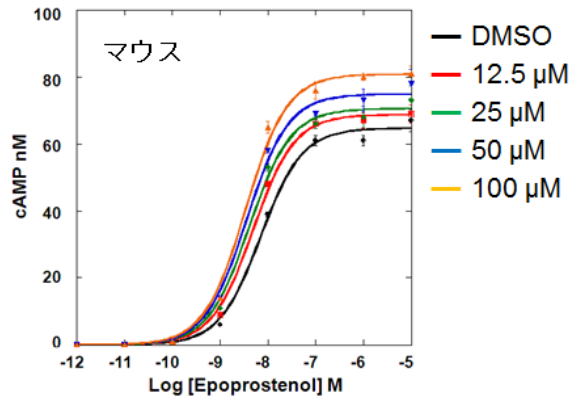
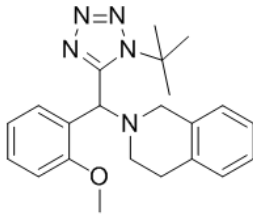
CHO-K1 細胞を宿主に、ヒト EP2 受容体 (hEP2) を安定的に発現させた細胞株を選択した。EP2 アゴニストである Butaprost を 10^{-11} ~ 10^{-5} M、 2.5×10^{-5} M で添加し、hEP2 安定発現細胞を 5 μ l/well で分注し反応開始させた。40 分後に試薬に含まれる TritonX-100 にて反応を停止した後、Cisbio 社の cAMP アッセイキット(cAMP HiRange Jumbo)を用いた HTRF 法で蛍光を測定し、被検化合物を共存させて得られた cAMP 濃度を nM で表記する。

【プロトコール】

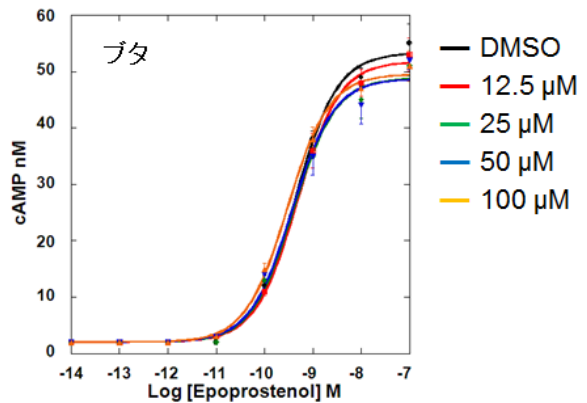
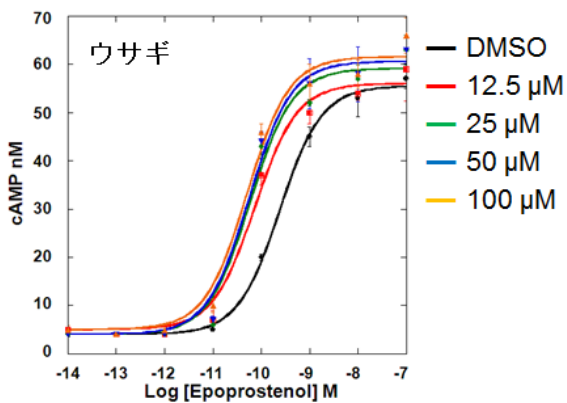
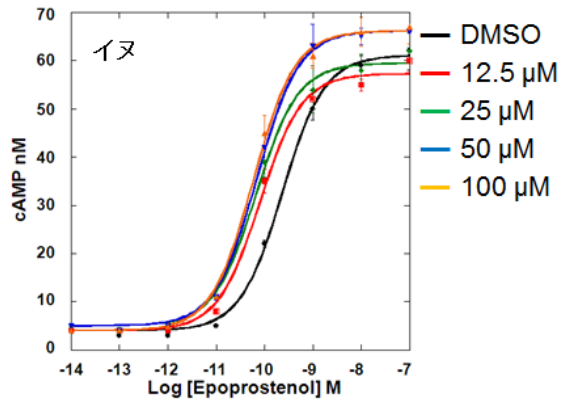
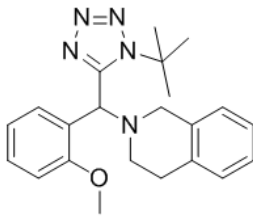
1. Butaprost + 被検化合物 5 μ l をコーニング 384PS、Black、LV プレート(#3677) に分注。
2. hEP2 安定発現細胞を、14000 cells/well となるように 5 μ l/well で分注し反応開始。
3. 室温にて 40 分間の反応後、キットの d2-cAMP 液を、5 μ l/well で分注し反応停止。
4. キットの Cryptate-抗 cAMPAb を 5 μ l/well で分注後、室温にて 1 時間反応。
5. PHERAster の HTRF モードで測定。
6. プレート毎に、スタンダード cAMP の検量線より産生された cAMP 濃度を計算する。

【結果】

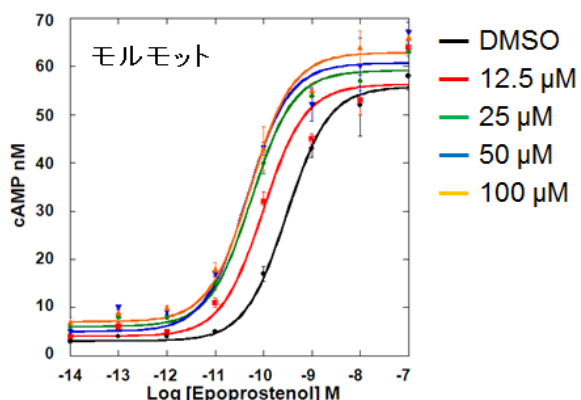
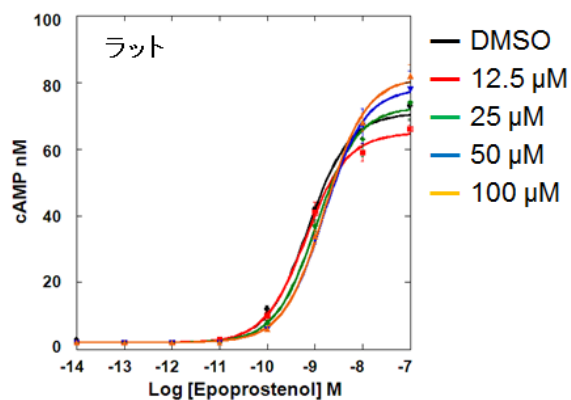
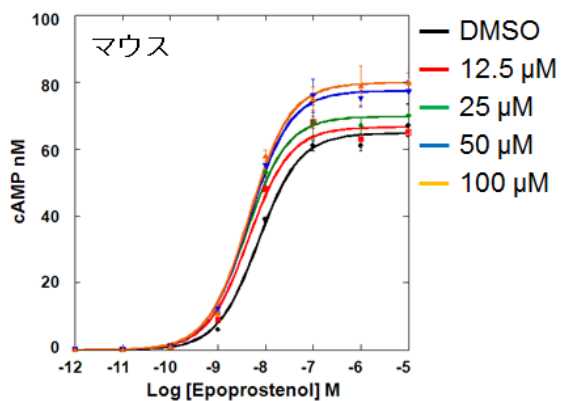
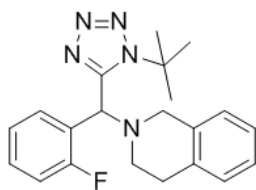
TS-000065



TS-000065



TS-000067



TS-000067

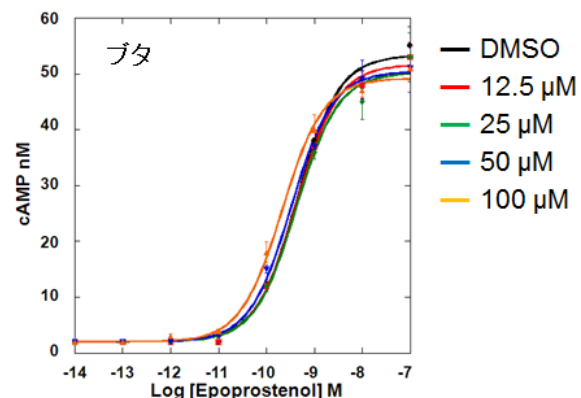
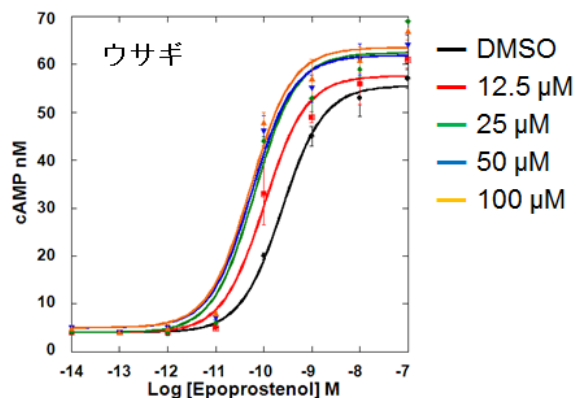
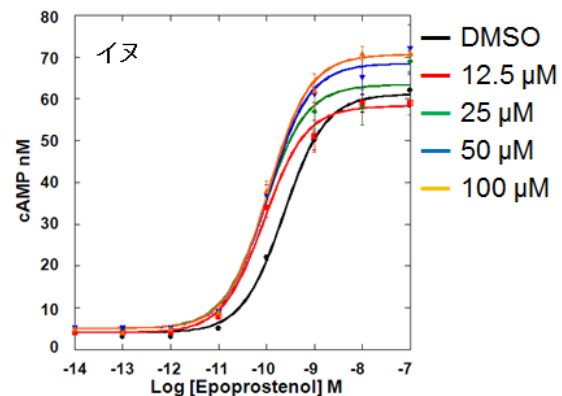
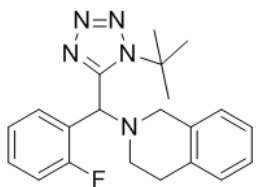


Figure 4-2-1 Effect of change in concentration of TS-000065 and TS-000067 on Epoprostenol dose response curve in mIP, rIP, gIP, dIP, oIP or pIP transiently

expressing CHO-K1 cell.

これまで取得した化合物の中で、活性が強い TS-000065 と TS-000067 を評価化合物として使用した。

どちらの化合物も、マウスとラットの IP 強制発現細胞における cAMP アッセイでは、Epoprostenol の用量反応曲線を上へシフトさせ、モルモットの IP 強制発現細胞における cAMP アッセイでは、左へシフトさせ、イヌとウサギの IP 強制発現細胞における cAMP アッセイでは、左及び上へシフトさせ、ブタの IP 強制発現細胞における cAMP アッセイでは、コントロールと比較して、有意な変化をもたらさなかった。

モルモットは、ヒト IP の時と同様に Epoprostenol の用量反応曲線を濃度依存的に大きく左シフトさせ、アッセイした動物種の中では、極めて魅力的である。特に、モルモットにおける左シフト比は、ヒト IP の時と同程度であり、今後創薬コンセプトを検証する上で使用する動物種は、モルモットが最適であることがわかった。

【考察】

得られた結果の中でどちらも化合物の IP への影響に共通なことは、マウス及びラットの IP では、どちらも上へ微小シフトしており、モルモットの IP では、ヒトと同程度左シフトし、イヌやウサギの IP では同程度左かつ上へシフトし、ブタの IP では、全くシフトしないことである。IP の動物種におけるホモロジー解析のデータと照合すると、マウスとラット IP 間のホモロジー解析における identity は 90 % 超えており、受容体としての性質はほとんど同様であることが、薬理活性の結果を裏付ける一つの根拠となるが、他の動物種の IP 間のホモロジー解析における identity は、約 80 % 程度であり、特に膜貫通ドメインの identity は極めて高いことを考えると、ループにおける identity の低さが全体の identity を低下させることに大きく寄与している。

ところで、プロスタノイドの中でアッセイしてきた受容体のうち、IP と EP2 間のホモロジー解析の結果から、膜貫通ドメインの identity が高く、ループ部分の identity が低いこと、及びそれぞれの受容体強制発現細胞における cAMP アッセイの結果から、評価化合物は、IP 特異的に cAMP 産生増強作用を有していることを考慮すると、ループに評価化合物の結合部位が存在する可能性が高いと推測される。

上記のことを考慮すると、評価化合物が IP 受容体のループに結合していると仮定すると、それぞれの動物種の IP における、ループ部位のアミノ酸の違い及びそれに伴う高次構造の違いが、今回得られた種差の原因であると考えられる。それぞれの動物種の IP におけるループ部位のアミノ酸のうち、ヒトとモルモットで保存されており、他の種では異なるアミノ酸を特定することができれば、評価化合物の IP 結合部位へのき

っかけをつかむことができるが、化合物と受容体の結合は、単一アミノ酸と結合しているわけではなく、また、一つのアミノ酸の違いがループの高次構造に大きな変化をもたらす可能性もあり、あくまでアミノ酸の違いがループやその周辺の高次構造に影響をもたらさないという仮定で、考察する必要がある。さらに、ランダムにアミノ酸変異をさせることも考えられるが、先に述べた理由及び時間とコストがかかり、現実的とは言えない。

第3節 マグヌス試験³²

【実験目的】

モルモット胸部大動脈リング標本を用いて、評価化合物がアゴニストの血管拡張作用（血管平滑筋の弛緩作用）を"増強"させることを確認することを目的として、実施した。

【実験方法】

- (1) モルモット胸部大動脈を摘出して 95%O₂/5%CO₂ 混合ガスで飽和した氷冷 Tyrode 溶液中に入れる。
- (2) 血管内皮は糸を用いて除去し、血管を約 2 mm 幅に輪切りにしてステンレスフックまたは糸により固定帽に固定し、37°C に保温、95%O₂/5%CO₂ 混合ガスで飽和した 10 mL マグヌス管内に入れて 1 g の張力を掛ける。
- (3) 張力が安定したところで KCl（最終濃度 60 mM）をマグヌス管内に添加して収縮させる。この操作を 2 回行い、3 回目の収縮高を求めたときに血管内皮が剥離されたことを確認するために Ach（最終濃度 10⁻⁵ M）を添加し、弛緩反応が見られないことを確認する。
- (4) 次に、標本の張力が安定したところで、フェニレフリン（最終濃度 3×10⁻⁶ M）を添加して収縮させ、収縮が安定したところで被験物質または溶媒を添加し、15 分後にベラプロストを最終濃度 10⁻⁹~3×10⁻⁵ M まで累積添加して弛緩反応の変化を記録する。

【結果】

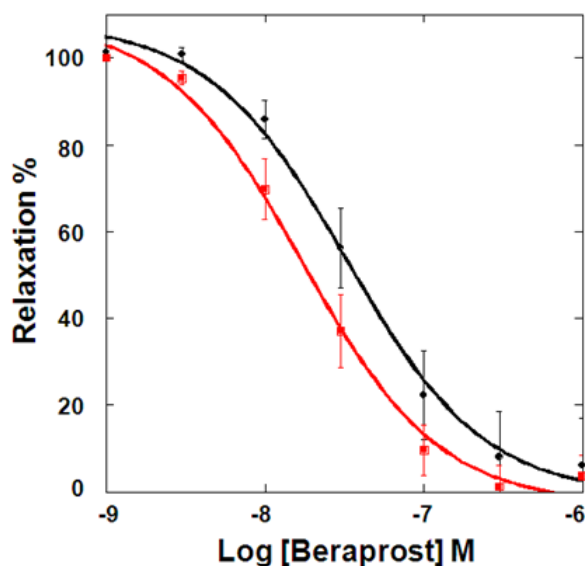


Figure 4-3-1 Concentration-response relationships for beraprost-induced relaxation in the absence (●; DMSO) and presence (■) of TS-000065 (20 μ M) . Vascular relaxation is expressed as percent relaxation against the tension elevation due to phenylephrine (3 μ M) just before addition of beraprost. Data are means \pm SEM of five to six experiments. EC₅₀ in the presence of TS-000065 is significantly lower than that in the absence of TS-000065 ($P < 0.05$).

モルモット胸部大動脈を用いたマグヌス試験によって、Beraprostの血管拡張作用をTS-000065が増強させた。このように血管の拡張というoutputでアロステリックモジュレーター作用を初めて確認することができた。Cell-basedの段階及びBindingアッセイだけでなく、より*in vivo*に近い評価系でコンセプト検証できたことで、今後*in vivo*への応用が期待される。

マグヌス試験では、使用できるアゴニストがBeraprostに限定されたため、Epoprostenol（内因性アゴニスト）存在下での左シフト活性を直接示すことはできないが、それでも、これまでのCell Basedアッセイの結果を考慮すれば、Epoprostenol存在下でも同様に、あるいはBeraprost存在下の活性値以上に、アロステリックモジュレーター作用が期待される。

第4節 血小板凝集試験

【実験目的】

モルモット血小板を用いて、評価化合物がアゴニストの血小板凝集抑制作用を"増強"させることを確認することを目的として、実施した。

【実験方法】

多血小板血漿の調製方法

1. モルモットを動物用ケタラル 50（第一三共株式会社）とセラクター 2%注射液（バイエル薬品）の 5 : 2 混合麻酔液 700 $\mu\text{L}/\text{kg}$ を筋肉内投与することによって麻酔した。
2. モルモットが鎮静化後、腹部を切開し、予め 1 mL の 3.8%クエン酸ナトリウム溶液（コクサイ、シスメックス株式会社）入れ、19G 翼付静注針を装着した 20 mL シリンジ（テルモ株式会社）にて腹大動脈から 18 mL 採血を行った。その後、1 mL の 3.8%クエン酸ナトリウム溶液を追加し、合計 20 mL とした。
3. 採取した血液を室温で 130 \times g、10 分間遠心分離して多血小板血漿（以下 PRP）を採取し、残渣をさらに 130 \times g、5 分間遠心分離して PRP を得た。
4. 1400 \times g、10 分間遠心分離して少血小板血漿（以下 PPP）を得た。

血小板凝集能測定方法

血小板凝集計（NBS ヘマトレーサー601、エムシーメディカル株式会社）を用いて以下の手順にて血小板凝集能を測定した。

1. 採取した PRP および PPP を、スターラーバー入りキュベットに 230 μL ずつ分注した。
2. 最終濃度が 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ となるように被験物質溶液（対照は 10%DMSO/PBS(-)）を添加後、1 分間インキュベートし、BERAPROST 溶液（対照は生理食塩水）を添加した。被験物質溶液および Beraprost 溶液は、最終濃度の 100 倍濃い溶液を 1/100 容量添加した。
3. 添加 1 分間後、ADP（最終濃度 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ）を添加した。ADP 添加後 5 分間の最大凝集率をチャートから読みとった。

■ 評価項目 ■

血小板凝集抑制率

対照（溶媒添加）の凝集率を 100%としたときの各凝集抑制率を算出し、評価した。

50%血小板凝集抑制濃度（IC₅₀ 値）

被検物質存在下および非存在下における BERAPROST の IC₅₀ 値を算出した。

■ データ処理およびデータ解析に使用する統計学的手法 ■

血小板凝集抑制率

測定した最大凝集率から、対照（生理食塩水添加）の凝集率を 100%とし、式 1 に従って各血小板凝集抑制率を算出した。この個別データを用いて、平均値及び標準誤差を算出した。

血小板凝集抑制率(%)= (1 - 各血小板凝集率 / 対照凝集率) × 100 (式 1)

50%血小板凝集抑制濃度（IC₅₀ 値）

グラフの縦軸を血小板凝集抑制率、横軸を BERAPROST の Log 濃度とし、13.1 項にて算出した血小板凝集抑制率をプロットして、被験物質存在下および非存在下における 50%血小板凝集抑制濃度（IC₅₀ 値）を算出した。モルモット各個体から得られた IC₅₀ 値の平均値及び標準誤差を算出した。

【結果】

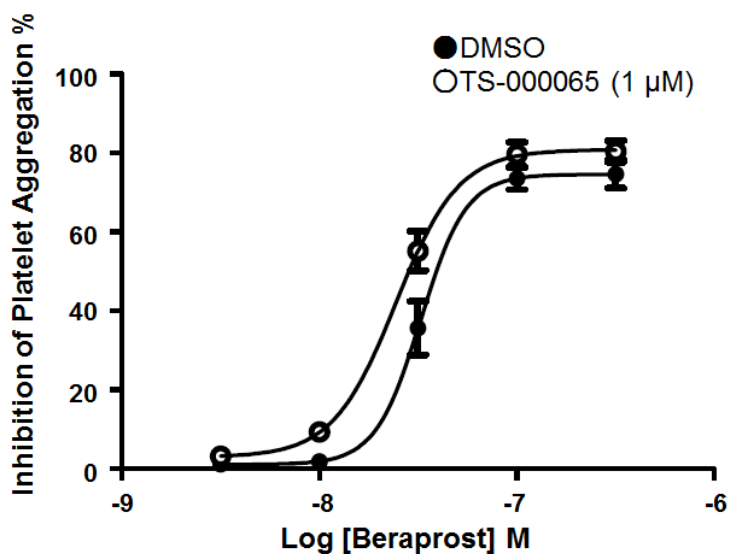


Figure 4-5-1 Concentration-response relationships for beraprost-induced inhibition of platelet aggregation in the absence (●; DMSO) and presence (○) of TS-000065(1 μM) . Data are means ±SEM of seven experiments. IC₅₀ in the presence of TS-000065 is significantly lower than that in the absence of TS-000065 (P<0.05).

実験当初、多血小板血漿を用いたところ、TS-000065 の作用が認められなかった。これは、TS-000065 が多血小板血漿に多く含まれているタンパク質へ結合してしまい、遊離型の濃度が著しく低下したことが原因として考えられた。実際に、TS-000065 のタンパク質結合率は、99.9%であることがわかっている（第2章、第9節に記載）。

そこで、タンパク質を除去した洗浄血小板を使用することにした。その洗浄血小板を用いて実施したアッセイが Figure 4-5-1 に示した。TS-000065(1 μM)は、Beraprost の血小板凝集抑制作用を増強させ、用量反応曲線を有意に左シフトさせた。

第 5 章

総括

第 1 節 結論

本研究において、IP のアロステリックモジュレーターを初めて見出すことに成功し、コンセプトを確立した。さらに、ヒット化合物の構造を基に合成展開し、構造活性相関の知見を踏まえ、高活性な新規化合物を創出することに成功した。標的細胞である肺動脈血管平滑筋細胞のモデルとして、ヒト大動脈血管平滑筋細胞で有効性を確認した。標的臓器のモデルとして、モルモット大動脈摘出血管を用いて、血管拡張作用を確認した。ヒット化合物を光学分割し、立体選択的アロステリックモジュレーターであることを見出した。

本研究で開発された IP のアロステリックモジュレーターは、**First in class** の医薬品リード化合物として位置づけられ、肺高血圧症の新規治療薬として臨床応用が期待される。

成果

特許出願番号：特願 2013-247446

第 2 節 参考文献

1. GlaxoSmithKline PAH.jp 肺高血圧症情報サイト
2. *Heart View*, **2001**, Vol.5 No1, 1398-1407
3. 国立循環器病センター 循環器病情報サービス公開情報
4. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane J.R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*. **1976**, 263, 663-665
5. Noritoshi Nagaya, Chieko Yokoyama, Shingo Kyotani, Manabu Shimonishi, Ryuichi Morishita, Masaaki Uematsu, Toshio Nishikimi, Norifumi Nakanishi, Toshio Ogihara, Masakazu Yamagishi, Kunio Miyatake, Yasufumi Kaneda, Tadashi Tanabe. Gene Transfer of Human Prostacyclin Synthase Ameliorates Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats *Circulation*. **2000**, 102, 2005-2010
6. McLaughlin VV, Genthner DE, Panella MM, Rich S. Reduction in pulmonary vascular resistance with long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy in primary pulmonary hypertension. *New England Journal of Medicine*.**1998**, 338, 273-277.
7. Arthur Christopoulos. Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. *Nature Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 198-210
8. P. Jeffrey Conn, Arthur Christopoulos and Craig W. Lindsley. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nature Rev. Drug Discov.* **2009**, 8, 41-54
9. Denise Wootten, Arthur Christopoulos and Patrick M. Sexton. Emerging paradigms in GPCR allostery: implications for drug discovery. *Nature Rev. Drug Discov.* **2013**, 12, 630-644
10. *Assay Guidance Manual Version 5.0*, **2008**
11. Servant G, Tachdjian C, Tang XQ, Werner S, Zhang F, Li X, Kamdar P, Petrovic G, Ditschun T, Java A, Brust P, Brune N, DuBois GE, Zoller M, Karanewsky DS. Positive allosteric modulators of the human sweet taste receptor enhance sweet taste. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2010**, 107, 4746–4751
12. 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 Kretsoulas, Lone Veng, Craig W. Lindsley, William

- Shipe, Scott Kuduk, Cyrille Sur, Gene Kinney, Guy R. Seabrook, and William J. Ray. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2009**, *106*, 15950-15955
13. W. Y. Chan, D. L. McKinzie, S. Bose, S. N. Mitchell, J. M. Witkin, R. C. Thompson, A. Christopoulos, S. Lazareno, N. J. M. Birdsall, F. P. Bymaster, and C. C. Felder *Proc. Natl Acad. Sci.* **2008**, *105*, 10978-10983
 14. Ahn KH, Mahmoud MM, Kendall DA. Allosteric modulator ORG27569 induces CB1 cannabinoid receptor high affinity agonist binding state, receptor internalization, and Gi protein-independent ERK1/2 kinase activation. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 12070-12082
 15. Lu X, Roberts E, Xia F, Sanchez-Alavez M, Liu T, Baldwin R, Wu S, Chang J, Wasterlain CG, Bartfai T. GalR2-positive allosteric modulator exhibits anticonvulsant effects in animal models. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2010**, *107*, 15229-15234
 16. Lotte Bjerre Knudsen, Dan Kiel, Min Teng, Carsten Behrens, Dilip Bhumralkar, Ja'nos T. Kodra, Jens J. Holst, Ilaus B. Jeppesen, Michael D. Johnson, Johannes Cornelis de Jong, Anker Steen Jorgensen, Tim Kercher, arek Kostrowicki, Peter Madsen, Preben H. Olesen, Jacob S. Petersen, Fritz Poulsen, Ulla G. Sidelmann, Jeppe Sturis, Larry Truesdale, John May, and Jesper Lau. Small-molecule agonists for the glucagon-like peptide 1 receptor. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2007**, *104*, 937-942
 17. Parmentier-Batteur S, O'Brien JA, Doran S, Nguyen SJ, Flick RB. Differential effects of the mGluR5 positive allosteric modulator CDPPE in the cortex and striatum following repeated administration. *Neuropharmacology*, **2012**, *62*, 1453-1460
 18. Feng Zhang, Boris Klebansky, Richard M. Fine, Haitian Liu, Hong Xu, Guy Servant, Mark Zoller, Catherine Tachdjian, and Xiaodong Li. Molecular mechanism of the sweet taste enhancers. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2010**, *107*, 4752-4757
 19. Feng Zhang, Boris Klebansky, Richard M. Fine, Hong Xu, Alexey Pronin, Haitian Liu, Catherine Tachdjian, and Xiaodong Li. Molecular mechanism for the umami taste synergism. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2008**, *105*, 20930-20934
 20. Katsuyama M, Sugimoto Y, Namba T, Irie A, Negishi M, Narumiya S, Ichikawa A. Cloning and expression of a cDNA for the human prostacyclin receptor. *FEBS Letters.* **1994**, *344*, 74-78
 21. Kruse, A. C. et al. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature Rev. Drug Discov.* **2012**, *482*, 547-552
 22. R. A. Armstrong, R. A. Lawrence, R. L. Jones, N. H. Wilson, and A. Collier. Functional and ligand binding studies suggest heterogeneity of platelet

- prostacyclin receptors. *Br. J. Pharmacol.* **1989**, *97*, 657-668
23. Abramovitz M, Adam M, Boie Y, Carrière M, Denis D, Godbout C, Lamontagne S, Rochette C, Sawyer N, Tremblay NM, Belley M, Gallant M, Dufresne C, Gareau Y, Ruel R, Juteau H, Labelle M, Ouimet N, Metters KM. The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochem. Biophys. Acta*, **2000**, *1483*, 285-293
 24. Bernd Rosenkranz, Christine Fischer, Kurt E. Weimer, and Jürgen C. Frolich. Metabolism of Prostacyclin and 6-Keto-prostaglandin F_{1α} in Man. *J. Biological chemistry.* **1980**, *255*, 10194-10198
 25. Sudarshan Rajagopal, Keshava Rajagopal and Robert J. Lefkowitz. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nature Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 373-386
 26. Arun K. Shukla, Jonathan D. Violin, Erin J. Whalen, Diane Gesty-Palmer, Sudha K. Shenoy, Robert J. Lefkowitz. Distinct conformational changes in β-arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Proc. Natl Acad. Sci....* **2008**, *105*, 9988–9993
 27. Fabricio A. Pamplona, Juliano Ferreir, Octávio Menezes de Lim, Jr. Filipe Silveira Duarte, Allisson Freire Bento, Stefânia Forner, Jardel G. Villarinho, Luigi Bellochiod, Carsten T. Wotjak, Raissa Lerner, Krisztina Monory, Beat Lutz, Claudio Canetti, Isabelle Matias, João Batista Calixto, Giovanni Marsicano, Marilia Z. P. Guimarães, and Reinaldo N. Takahashi. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2012**, *109*, 20620–20625
 28. Tzingounis AV, von Zastrow M, Yudowski GA. β-blocker drugs mediate calcium signaling in native central nervous system neurons by β-arrestin-biased agonism. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2010**, *107*, 21028–21033
 29. Aude Saulière, Morgane Bellot, Hervé Paris, Colette Denis, Frédéric Finana, Jonas T Hansen, Marie-Françoise Altié, Marie-Hélène Seguelas, Atul Pathak, Jakob L Hansen, Jean-Michel Sénard & Céline Galés. Deciphering biased-agonism complexity reveals a new active AT₁ receptor entity. *Nature chemical biology.* **2012**, *8*, 622-630
 30. Stefanie Blättermann, Lucas Peters, Philipp Aaron Ottersbach, Andreas Bock, Viktoria Konya, C David Weaver, Angel Gonzalez, Ralf Schröder, Rahul Tyagi, Petra Luschnig, Jürgen Gäb, Stephanie Hennen, Trond Ulven, Leonardo Pardo, Klaus Mohr, Michael Gütschow, Akos Heinemann & Evi Kostenis. A biased ligand for OXE-R uncouples Gα and Gβγ signaling within a heterotrimer. *Nature chemical*

biology. **2012**, *8*, 631-638

31. Kong KC, Butcher AJ, McWilliams P, Jones D, Wess J, Hamdan FF, Werry T, Rosethorne EM, Charlton SJ, Munson SE, Cragg HA, Smart AD, Tobin AB. M3-muscarinic receptor promotes insulin release via receptor phosphorylation/arrestin-dependent activation of protein kinase D1. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2010**, *107*, 21181–21186
32. Adam J. Davenport, Christopher C. Stimson, Massimo Corsi, Darshan Vaidya, Edward Glenn, Timothy D. Jones, Sarah Bailey, Mark J. Gemkow, Ulrike Fritz, David J. Hallett. Discovery of substituted benzyl tetrazoles as histamine H3 receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2010**, *20*, 5165–5169
33. Fumiko Yamaki, Momoko Kaga, Takahiro Horinouchi, Hikaru Tanaka, Katsuo Koike, Koki Shigenobu, Ligia Toro, Yoshio Tanaka. MaxiK channel-mediated relaxation of guinea-pig aorta following stimulation of IP receptor with beraprost via cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. **2001**, *364*, 538–550

第3節 実験の部

スクリーニングで使用した試薬類

- Assay Medium : F12 (GIBCO) is made by adding BSA (Free Fatty Acid) to 0.1%
- cAMP (SIGMA : A6885-25MG)
- Histamine dihydrochloride (SIGMA : H7250-5G)
- Forskolin (Wako : 067-02191)
- Butaprost (Cayman Chemical)
- Iloprost (Cayman Chemical)
- PHERastar (BMG LABTECH) is used as a HTRF plate reader.
- cAMP HiRange jumbo (Cisbio)
- cAMP-d2 : Each vial is reconstituted with 6mL of distilled water.
- Anti cAMP Cryptate : Each vial is reconstituted with 5mL of distilled water.
- cAMP-d2 and anti cAMP Cryptate working solution: Each conjugate is made by diluting 1 volume of reconstituted reagent in 39 volumes of conjugate & lysis buffer.

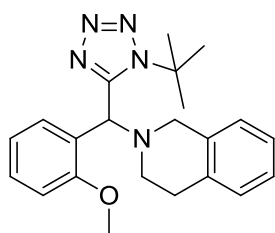
クローニングで使用した試薬類

- Human DNA was obtained from HeLa cells using QIAamp DNA Mini Kit (50) (QIAGEN Sciences)
 - PCR products of promoter region on ADAR2 were amplified from DNA of HeLa Cells. Then, those were inserted into the multiple cloning sites in the luciferase reporter vector (pGL4.15[luc2P/hygro] Vector; Promega Corporation)
 - PCR product of ADAR2R was amplified from human cDNA of Thymus. Then, it was inserted into the multiple cloning sites in the pcDNA 3.1(+) vector (Invitrogen)
 - DNA purification from Gel was conducted with Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, 250 preps (Promega Corporation)
 - Clones containing inserts were sequenced on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), using BigDyeR terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Montage™ SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit (MILLIPORE) and MultiScreen_{HTS} Vacuum Manifold (MILLIPORE)
- Human IP, human H2, human TP and human EP2 were cloned into pcDNA3.1 (+) vector from human cDNA using those kits above. Mouse IP was cloned into pcDNA3.1 (+) vector from mouse cDNA as well.

プライマー配列

hIP_F	TCCACCATGGCGGATTTCGTGCAGGAACCTCACCTACGTG
hIP_R	AAATGTCAGCAGAGGGAGCAGGCCGACGCTGG
hTP_F	TCCACCATGTGGCCCAACGGCAGTTCCTGG
hTP_R	TGTCCAATTCCTACTGCAGCCCGGAGCG
mIP_F	TCCACCATGATGGCCAGCGATGGACATCCTGGACCCC
mIP_R	GCTTAGGATGACATGCAGGACCAGCTCAGATATCAGCAG
hH2_F	TCCACCATGGCACCCAATGGCACAGCCTCTTCTTTTGGC
hH2_R	CCCAGTATTCATCATAATTCCTGGCATGTGGTGGGAATTGGATG
hH2R_R2	ACCAATGGCTAGGGCTATTACCTGTCTGTGGCTCC
hEP2_F	TCCACCATGGGCAATGCCTCCAATGACTCCCAG
hEP2_R	CTACTGACCTCAAAGGTCAGCCTGTTTACTGGCATCTGAC

機器データ

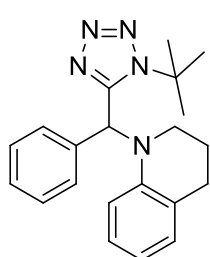


$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)

δ : 1.69 (9H, s), 2.86-2.78 (3H, m), 3.15-3.07 (1H, m), 3.75 (1H, d, $J = 14.7$ Hz), 3.90 (3H, s), 3.91 (1H, d, $J = 14.7$ Hz), 6.14 (1H, s), 7.09-6.90 (6H, m), 7.30 (1H, td, $J = 7.7, 1.5$ Hz), 7.74 (1H, dd, $J = 7.3, 1.5$ Hz).

HRMS (ESI+)

m/z Found 378.2297 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, calculated 378.2293 for $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}$ (+0.41 mmu).

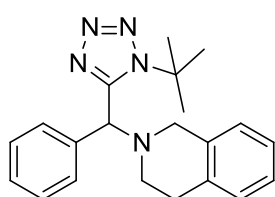


$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)

δ : 1.69 (9H, s), 1.97-1.78 (2H, m), 2.75 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 3.35-3.20 (2H, m), 6.47 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 6.58 (1H, s), 6.65 (1H, t, $J = 7.3$ Hz), 7.00 (2H, t, $J = 7.3$ Hz), 7.09 (2H, q, $J = 3.2$ Hz), 7.37-7.33 (3H, m).

HRMS (ESI+)

m/z Found 370.2057 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, calculated 370.2007 for $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{Na}$ (+4.96 mmu)

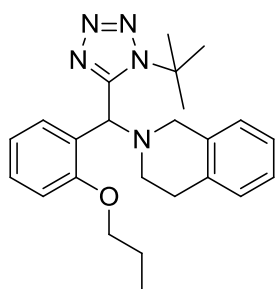


$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)

δ : 1.70 (9H, s), 2.91-2.77 (3H, m), 3.13-3.02 (1H, m), 3.66 (1H, d, $J = 14.7$ Hz), 3.95 (1H, d, $J = 14.7$ Hz), 5.56 (1H, s), 6.92-6.88 (1H, m), 7.12-7.03 (3H, m), 7.39-7.30 (3H, m), 7.47-7.43 (2H, m).

HRMS (ESI+)

m/z Found 370.1981 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, calculated 370.2007 for $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{Na}$ (-2.60 mmu).

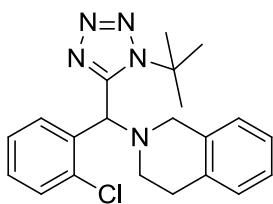


$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)

δ : 1.14 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.60 (9H, s), 1.97-1.90 (2H, m), 3.37-3.15 (3H, m), 4.19-4.02 (4H, m), 4.50 (1H, d, $J = 14.7$ Hz), 4.87 (1H, d, $J = 14.7$ Hz), 7.19-6.95 (6H, m), 7.46-7.40 (2H, m)

HRMS (ESI+)

m/z Found 406.2557 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, calculated 406.2606 for $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}$ (-4.91 mmu)

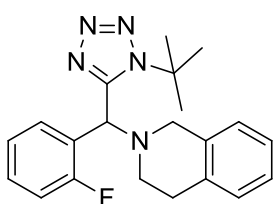


$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)

δ : 1.72 (9H, s), 2.93-2.74 (3H, m), 3.17-3.09 (1H, m), 3.78 (1H, d, $J = 14.7$ Hz), 3.99 (1H, d, $J = 14.7$ Hz), 6.19 (1H, s), 6.93 (1H, t, $J = 4.0$ Hz), 7.07 (3H, dq, $J = 12.5, 4.0$ Hz), 7.31-7.27 (2H, m), 7.45 (1H, td, $J = 6.6$ Hz, 3.7 Hz), 7.77 (1H, td, $J = 6.6, 3.2$ Hz).

HRMS (ESI+)

m/z Found 404.1663 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, calculated 404.1617 for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ClN}_5\text{Na}$ (+4.51 mmu).

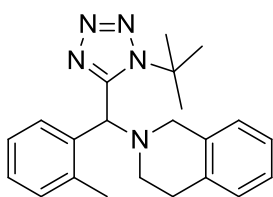


$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)

δ : 1.74 (9H, s), 2.83 (3H, m), 3.17-3.10 (1H, m), 3.75 (1H, d, $J = 14.7$ Hz), 3.88 (1H, d, $J = 14.7$ Hz), 6.00 (1H, s), 6.93 (1H, dd, $J = 7.7$ Hz, 5.5 Hz), 7.21-7.04 (5H, m), 7.34 (1H, m), 7.92 (1H, td, $J = 7.7, 1.5$ Hz).

HRMS (ESI+)

m/z Found 388.1903 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, calculated 388.1913 for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{FN}_5\text{Na}$ (-1.01 mmu).



$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)

δ : 1.60 (9H, s), 2.53 (3H, s), 2.85-2.64 (2H, m), 3.02-2.95 (1H, m), 3.24-3.16 (1H, m), 3.69 (1H, d, $J = 14.7$ Hz), 4.22 (1H, d, $J = 14.7$ Hz), 5.89 (1H, s), 6.92-6.85 (2H, m), 7.14-7.03 (4H, m), 7.23-7.22 (2H, m).

HRMS (ESI+)

m/z Found 384.2207 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, calculated 384.2164 for $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{Na}$ (+4.29 mmu)

第 4 節 謝辞

本成果は、文部科学省創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業の支援により得られました。

本研究を遂行するにあたり、創薬コンセプトの検証に関して御指導並びに御教授を賜りました東京大学創薬オープンイノベーションセンターの岡部隆義教授、東京大学大学院薬学系研究科グローバル COE 化合物スクリーニング支援室の下西学特任准教授に深く感謝申し上げます。化合物の構造活性相関の知見を取得するにあたって、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科の宮地弘幸教授、松野研司准教授、脇稔助教授と共同研究をさせていただきましたこと、御礼申し上げます。

研究を実施するにあたり、お世話になりました東京大学創薬オープンイノベーションセンターの皆様、共に研究に励んだ薬品代謝化学教室の仲間感謝致します。

長い学生生活を支え、常に励ましてくれた家族と友人に心より感謝申し上げます。

2014 年 1 月
東京大学大学院 薬学系研究科
薬品代謝化学教室
鈴木 聡文