

High-throughput screening における
高質な医薬品候補化合物選抜のための
生物物理評価に関する研究

2021 年 1 月

判谷 理恵

High-throughput screening における
高質な医薬品候補化合物選抜のための
生物物理評価に関する研究

筑波大学大学院
理工情報生命学術院
生命地球科学研究群
生命農学学位プログラム
博士（生命農学）学位論文

判谷理恵

目次

目次	ii
略語	ii
序論	1
第一章 HTS による Phospholipid transfer protein 新規阻害剤の探索	1 8
第一節 背景	1 9
第二節 実験項	2 2
第三節 結果	2 7
第四節 考察	3 0
第二章 HTS による Interleukin-2-inducible T-cell kinase 阻害剤の探索と機構解 明	4 8
第一節 背景	4 9
第二節 実験項	5 1
第三節 結果	5 7
第四節 考察	6 4
総括	9 3
参考文献	9 8
謝辞	1 1 2

略語

ADP: adenosine diphosphate

apoB: apolipoprotein B

apoE: apolipoprotein E

ATP: adenosine triphosphate

BSA: bovine serum albumin

CETP: cholesteryl ester transfer protein

DMSO: dimethyl sulfoxide

FBDD: fragment-based drug discovery

FL: full length

GPCR: G protein-coupled receptor

HDL: high-density lipoprotein

HDX-MS: hydrogen deuterium exchange mass spectrometry

HTS: high throughput screening

ITC: isothermal scanning calorimetry

ITK: interleukin-2-inducible T-cell kinase

KD: kinase domain

LDH: lactate dehydrogenase

LDL: low-density lipoprotein

NMR: nuclear magnetic resonance

MST: microscale thermophoresis

PLTP: phospholipid transfer protein

RCT: reverse cholesterol transport

RI: Radioisotope

SA: streptavidin

SHG: second-harmonic generation

SPR: surface plasmon resonance

TSA: thermal shift assay

VLDL: very low-density lipoprotein

序論

現在の創薬活動において、様々な細胞外あるいは細胞内の分子ターゲットに対して、多種類の化合物ライブラリーをスクリーニングする high-throughput screening (HTS) は創薬の重要な手段となっている (図 1-1)。

最近、コンビナトリアル合成や、天然物単離の自動化技術の発達、また、化合物ライブラリーの市販によって、多くの製薬会社が保有する化合物は数十万から 100 万化合物にまで増大し、化合物構造の多様性も高まっている。一方、ヒトや微生物、ウイルス等のゲノムの塩基配列解析により、数千の新規分子ターゲットが明らかとなり、過去 20 年ほどの間に創薬プロセスが変化している。

微量化やロボットの利用により、化合物のスクリーニングがハイスループットやウルトラハイスループットで実施できるようになり、現在では 1 日に 1 万から 10 万データポイントのデータを取得できるようになっている (図 1-2)。

リード化合物 (創薬標的タンパク質に対して高活性を示す医薬品候補化合物) を創出するには時間、コスト、質の 3 つの要素が重要である¹。HTS では多数のサンプルをアッセイするため、1 ウェル当たりの測定時間が重要なパラメーターとなる。これにより 1 日当たりの化合物評価数や 1 年に実施できる HTS の数が決まる。近年、アッセイの自動化や測定の高速化によって、スクリーニングにかかる期間は短縮される一方で、アッセイ系構築やデータの解釈に時間を要する傾向にある。化合物が原因の偽陽性を排除するためには、異なる複数のアッセイを実施する必要がある。

20 年前の第 1 期の HTS では、主として天然の生成物や抽出物のスクリーニングが行われた²。1990 年代初めから半ばまでは、ターゲットの数も化合物の数も限られており、多くの製薬会社が 96 ウェルプレートを用いて 5 万から 35 万程度の化合

物ライブラリーをスクリーニングした (図 1-3)。アッセイ系構築とスクリーニング、その後のフォローアップまで、全て同じフォーマットで化合物評価が行われ、大掛かりな自動化はなされず、HTS を専門に実施するグループも存在しなかった。

その後、主要な企業で化合物ライブラリーは 100 万化合物を超えるようになり、またターゲット数も増えたため、アッセイの微量化やスクリーニングの自動化が行われるようになった。標識した材料や組換え細胞株を用いたスクリーニングが実施され、ツール作製やアッセイ系構築がスクリーニング過程の多くを占めるようになった (図 1-3, HTS 第 2 期)。アッセイ系に干渉する偽陽性化合物を除くため、カウンタースクリーニングが実施されるようになり、ターゲット以外の分子に対する作用を調べるため、選択性試験が行われるようになった。標識体のようなツールの作製とアッセイ系構築に力が注がれる一方で、選抜した化合物の質に着目することで、ヒット選抜以降の創薬活動 (hit to lead やリード最適化の段階) (図 1-1) の成功率が高まるよう工夫している。

現在の HTS ではプロジェクトに応じた手法が採られている。1 つの標的分子に対して 100 万化合物以上の全化合物をスクリーニングするプロジェクトや、ツール作成から hit to lead の段階までを HTS グループが担うプロジェクトがある (図 1-3, HTS 第 3 期)。

最新のスクリーニング技術の中には、求める作用機序の化合物を取得する精度はあっても、高コストや低スループットのものもあるため、全ライブラリーでなく、フォーカストライブラリーをスクリーニングするプロジェクトもある。しかしこれを実施するには、化合物あるいは標的分子の構造に基づいたコンピューター予測により、サブライブラリーの化合物を精度良く選抜する必要がある。フォーカストラ

イブラリーを用いると試薬代は節約されるが、化合物プレートの作成に時間がかかるため、プロジェクトの状況に応じて使用を判断する。良質なヒット化合物が一定数得られるまで、フォーカストライブラリーのスクリーニングを繰り返す方法もある。

HTS のスクリーニングヒット化合物には、合成展開しても阻害活性を向上できず、標的以外のタンパク質も阻害する化合物が含まれてしまう。ヒット化合物選抜過程において、特に重要なのは **promiscuous binder**³ の識別である。化合物の中には特定の pH, 温度, バッファー条件において、水溶液中でコロイド状態の凝集体を形成し、ターゲット分子の活性を阻害するものがある。これらの化合物の干渉は、カウンタースクリーニングによって排除し易い自家蛍光化合物の干渉とは異なる。凝集化合物は、種類の異なるタンパク質を幅広く、そして強く阻害し、本来選抜すべきやや弱いながらも分子認識する化合物を埋没させてしまう^{4,5}。これらの干渉は、生化学アッセイ以外に細胞アッセイにおいても問題となることが知られている。**Promiscuous binder** の作用は、化合物およびタンパク質の性質とアッセイ条件に依存して起こるため対処が難しい。そのため標的分子に対する化合物の結合を量論的に測定できる SPR や ITC のような手法、その他、**nuclear magnetic resonance (NMR)** や **thermal shift assay (TSA)**, **microscale thermophoresis (MST)**, **mass spectrometry** を用いたバリデーショナルスクリーニングが推奨される (表 1-1)。1 次スクリーニングとは別の方法で、化合物が単量体でターゲット分子に特異的に結合することを確認することが重要である。リード創生部門の専門知識と経験が、特異性の高い化合物のヒット選抜を確実なものとする。ヒット化合物のバリデーショナルに重きを置いて、適

切なリード探索ストラテジーを考案することが HTS キャンペーンの成功の鍵となる。

生物物理技術の中で、SPR 法はサンプル消費量が少なくスループットが高いため、化合物評価によく用いられる。方法は、標的タンパク質をセンサー表面に固定し、化合物溶液を添加する⁶。タンパク質に化合物が結合すると、センサー表面近傍の屈折率が変化して、リアルタイムに検出できる (図 1-4)。化合物の添加が終わるとランニングバッファーが流れ、タンパク質からの化合物の解離が観測される。SPR 法は 1990 年代にバイオセンサーとして実用化が始まり、主として低分子化合物とタンパク質の親和性の決定に用いられている⁷。他方、ターゲットタンパク質に対する結合比や、結合の可逆性、高濃度における結合挙動の変化についての情報も得られるため⁸、生化学スクリーニングのヒット化合物を SPR 評価すると、その阻害が特異的かどうかの情報を得ることができる (図 1-5)。この結果から hit to lead のステージに進めるべき化合物を決定する。

また、年々創薬の難易度が高まる中で、より選択性の高い化合物を取得するためにターゲット分子の構造に着目した評価を行う等の工夫が求められる。代表的な構造変化検出技術には蛍光バイオセンサー法、second-harmonic generation (SHG), hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS), NMR, X 線結晶構造解析がある (図 1-6)。蛍光バイオセンサー法や SHG は、スループットは比較的高いが情報量は少ない。一方、HDX-MS, NMR, X 線結晶構造解析は、スループットは低いが情報量は比較的多い特徴がある。蛍光バイオセンサー法は、環境変化を感知する蛍光団でタンパク質を標識し、化合物によって誘起されるタンパク質の構造変化を検出する (図 1-7)⁹⁻¹²。測定機は広く普及している蛍光プレートリーダーを用

いるため、比較的簡便に行える。SHG アッセイは蛍光標識したタンパク質を固定化し、蛍光分子の角度変化を測定することでタンパク質の構造変化を検出する方法 (図 1-8)¹³⁻¹⁵ であり、化合物の自家蛍光の影響を受けにくい利点があるが、測定には専用機が必要となる。

これまでに述べた SPR 結合評価系や構造変化検出系を HTS フローに組み込むことは、高質な医薬品候補化合物の効率的な探索に有用と考えられる。本研究においては、phospholipid transfer protein (PLTP) および interleukin-2-inducible T-cell kinase (ITK) に対する HTS キャンペーンの中でこれらの評価を行った。

PLTP については、これまで HTS の報告はなく、高質な医薬品候補化合物を見出すため、通常 HTS では用いない血漿を酵素源として用い、スクリーニングを実施した。血漿中には複数のタンパク質が存在するため、ターゲットに対するヒット化合物の特異的な結合の確認は重要と考えられた。そこで新たに SPR 評価系を確立し、陽性対照化合物とスクリーニングヒット化合物の compound 1 および 2 が精製 PLTP に 1:1 結合することを明らかにした。本実験は第一章で記載する。

ITK は選択性取得が困難なキナーゼであり、スクリーニングの 1 次ヒット化合物の中から、キナーゼを不活性型に安定化する高質な医薬品候補化合物を見出すことが重要と考えられた。1 次スクリーニングに脱リン酸化 ITK を用い、阻害化合物を見出した後に、化合物の SPR 結合評価を行い、非特異的に作用する化合物を排除した。タンパク質の構造変化を高速で検出する蛍光バイオセンサーおよび SHG 評価系を新たに構築した。これらの評価系でヒットした代表化合物は ITK キナーゼパネル評価において高い選択性を示した。本内容は第二章に記載する。

PLTP については通常の HTS では用いない血漿を酵素源とした HTS を行い、さらに SPR 結合評価を実施して、短期間に高質な医薬品候補化合物を見出した。ITK については精製酵素を用いた HTS に、SPR 結合評価とタンパク質の構造変化検出系を組み入れることで、高選択的な高質な医薬品候補化合物を見出した。このように SPR 結合評価やタンパク質の構造変化の検出を行うことによって、効率の良い高質な医薬品候補化合物探索が可能であることを示した。

表 1-1 タンパク質-化合物相互作用解析の生物物理学的的手法

手法	利点	不利点	必要な材料	親和性範囲	スループット/日
SPR	<ul style="list-style-type: none"> 幅広い条件で相互作用をリアルタイムに検出 	<ul style="list-style-type: none"> 固定化が必要 シグナルが溶媒効果の影響を受ける 	<ul style="list-style-type: none"> アッセイ系構築と100化合物の評価にタンパク質5 nmol (30 kDaのタンパク質で0.2 mg) タンパク質の機能を評価する陽性対照化合物 	1 pM- 10 mM	200化合物
ITC	<ul style="list-style-type: none"> 2分子間の熱力学パラメータを直接測定 	<ul style="list-style-type: none"> 高濃度のタンパク質と高溶解性の化合物が必要 	<ul style="list-style-type: none"> 1化合物当たりタンパク質4 nmol (30 kDaのタンパク質で1 mg) 	1 nM- 100 μ M	10化合物
NMR (リガンド観測)	<ul style="list-style-type: none"> 非標識タンパク質 (サイズの制限なし) に対する化合物の結合を検出 	<ul style="list-style-type: none"> タンパク質が多く必要 	<ul style="list-style-type: none"> 1化合物当たりタンパク質1.2 nmol (30 kDaのタンパク質で0.24 mg) 	100 nM- 10 mM	100化合物
NMR (タンパク質観測)	<ul style="list-style-type: none"> 化合物が結合したタンパク質の化学シフトを検出 	<ul style="list-style-type: none"> 同位体標識した大量のタンパク質が必要 タンパク質のサイズに制限あり (< 40 kDa) 	<ul style="list-style-type: none"> 1化合物当たり同位体標識タンパク質30 nmol (30 kDaのタンパク質で1 mg) 	100 nM- 1 mM	100化合物

表 1-1 (続き) タンパク質--化合物相互作用解析の生物物理学的手法

手法	利点	不利点	必要な材料	親和性範囲	スループット/日
MST	<ul style="list-style-type: none"> 液相中の測定 可溶化膜タンパク質の評価が可能 	<ul style="list-style-type: none"> 蛍光標識の必要 	<ul style="list-style-type: none"> 1化合物当たりタンパク質7 nmol (60 nMのタンパク質が50 μL) 	<ul style="list-style-type: none"> 1 pM-1 mM 	<ul style="list-style-type: none"> 100化合物
Native MS	<ul style="list-style-type: none"> 複合体形成を直接検出 タンパク質の消費は少ない 非標識 	<ul style="list-style-type: none"> 脱塩する必要がある タンパク質は低濃度のアンモニウムバッファーで安定である必要 界面活性剤は使用できない 	<ul style="list-style-type: none"> 10-100 pmol (5-20 μMのタンパク質が2-5 μL) 	<ul style="list-style-type: none"> -500 μM 	<ul style="list-style-type: none"> 100化合物
AS-MS	<ul style="list-style-type: none"> 膜タンパク質に適用可能 	<ul style="list-style-type: none"> 低親和性の化合物はゲルろ過の段階で分離するため検出が難しい 	<ul style="list-style-type: none"> 1化合物当たりタンパク質50 pmol (5 μMのタンパク質が10 μL) 	<ul style="list-style-type: none"> -0.1 μM 	<ul style="list-style-type: none"> 50化合物
TSA	<ul style="list-style-type: none"> アッセイ構築が迅速に行える 	<ul style="list-style-type: none"> 蛍光クエンチや凝集によるアッセイへの干渉がある 疎水性タンパク質には不向き 	<ul style="list-style-type: none"> 1化合物当たり400 pmol (2 μMのタンパク質が200 μL) 	<ul style="list-style-type: none"> 1 nM-100 μM 	<ul style="list-style-type: none"> 400化合物



図 1-1 創薬研究の流れ 標的分子を選定した後，HTS を行い，ヒット化合物を合成展開し，最適化した後，臨床試験に進む。

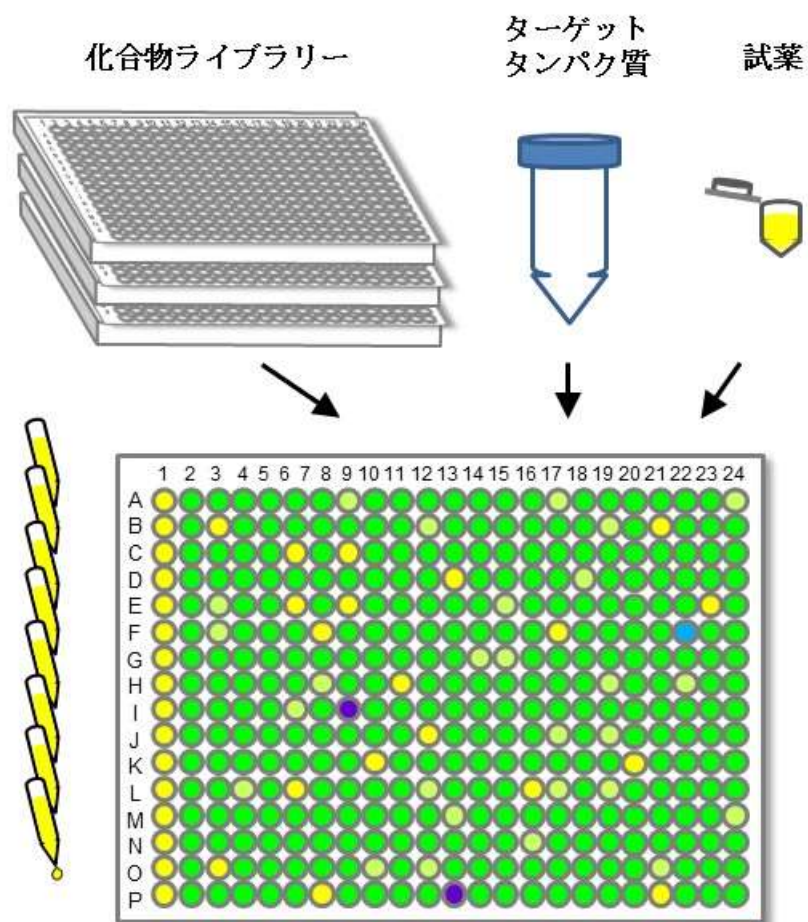


図 1-2 HTS の概要 プレートに化合物溶液，ターゲットタンパク質および試薬を添加して反応後に測定を行う。

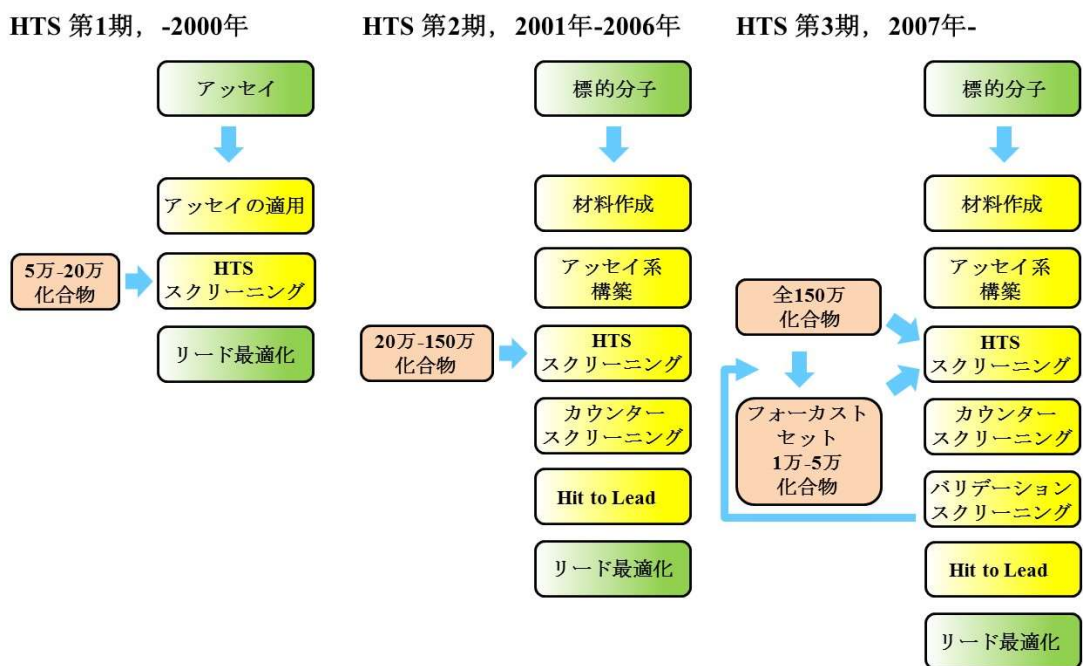


図 1-3 過去 20 年間の HTS の進展 第 1 期では、アッセイ系構築とスクリーニング、リード最適化まで、同じフォーマットで化合物評価が行われた。第 2 期では標識した材料や組換え細胞株を用いたスクリーニングが実施され、自家蛍光化合物を除くため、カウンタースクリーニングが実施されるようになった。第 3 期では promiscuous binder による偽陽性を排除するバリデーションスクリーニングが重視されている。

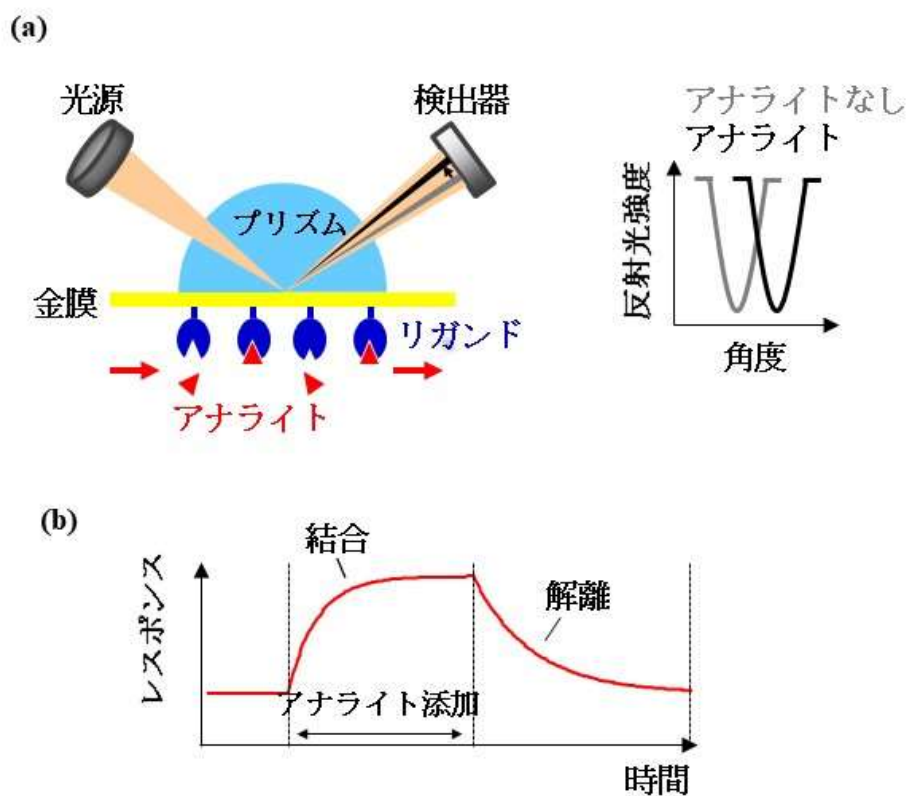


図 1-4 SPR のシグナル検出システム (a) 光をプリズムで集光してセンサーチップに照射すると、金膜側でプラズモン共鳴が起こり、反射光の一部の強度が減衰する。反射光の消失角度はセンサーチップ表面近傍の屈折率に依存して変動する。この現象を利用して、2 分子の結合・解離を測定する。(b) 反射光の消失角度の移動度をセンサーグラムとよぶグラフに変換することで、分子間の相互作用を経時的に観測する。

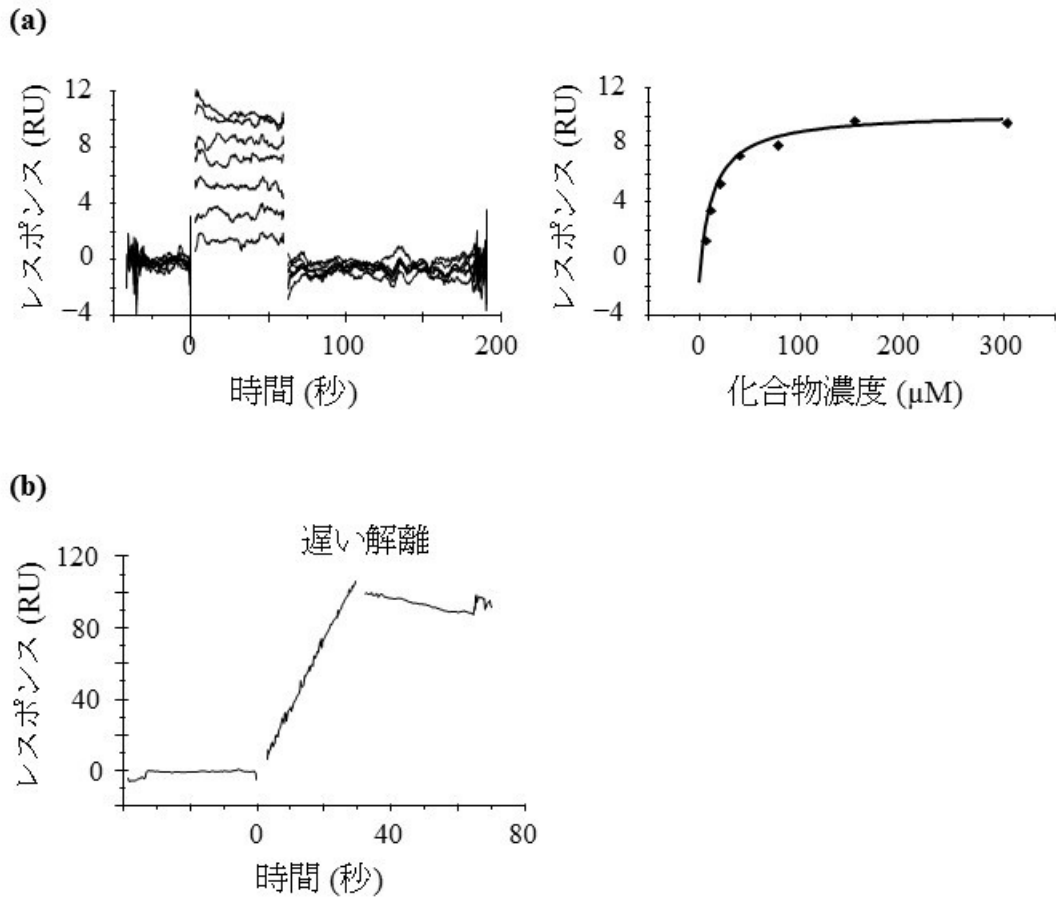
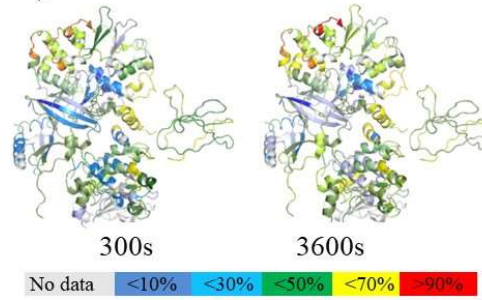


図 1-5 SPR 法による化合物の結合検出 (a) 陽性対照化合物は標的蛋白質に対して飽和性で可逆的な結合を示す。(b) promiscuous inhibitor は表的タンパク質に対する結合・解離が遅い。ストイキオメトリーが 1 を超えていることから、凝集体が結合していると考えられる。

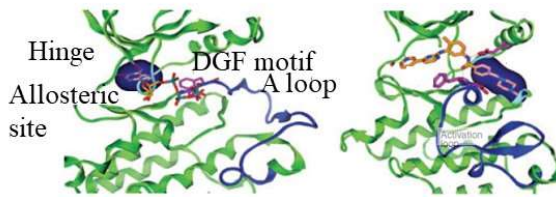
a) NMR



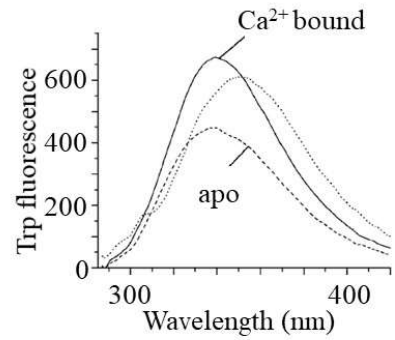
b) HDX-MS



c) X線結晶構造解析



d) 蛍光バイオセンサー法



e) SHG

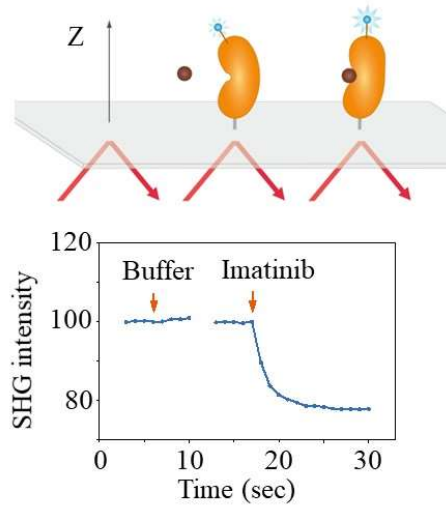


図 1-6 代表的な構造変化検出技術 (a) NMR, (b) HDX-MS, (c) X 線結晶構造解析, (d) 蛍光バイオセンサー法, (e) SHG

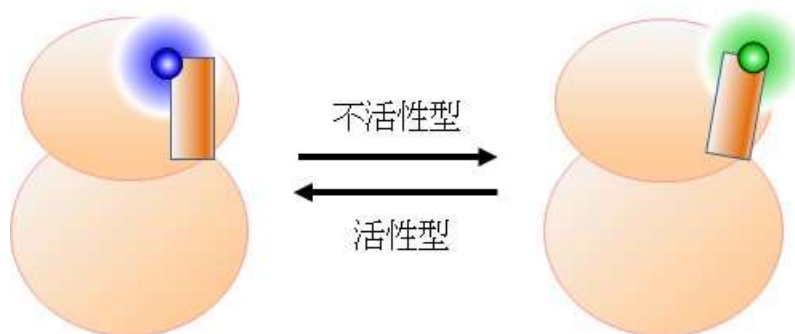


図 1-7 蛍光バイオセンサー法の模式図 タンパク質を部位特異的に蛍光標識し，構造を変化させる化合物を添加すると，蛍光物質の環境が変化して，最大蛍光波長がシフトする。

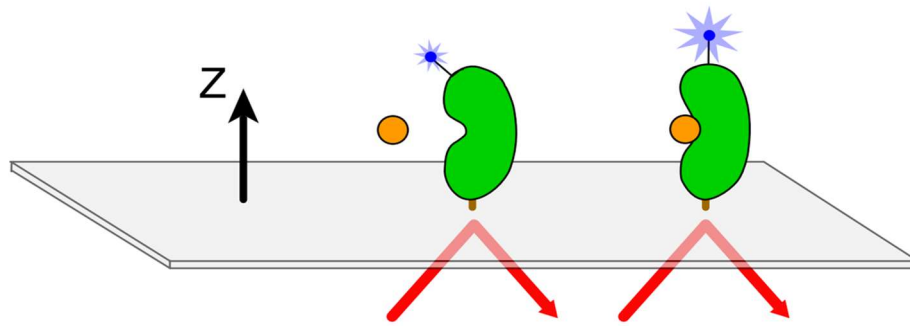


図 1-8 SHG 法の模式図 固相化した蛍光標識タンパク質に赤色の超短パルス光を入射すると、周波数が 2 倍（波長が半分）の青色パルス光が発生する。蛍光団が Z 軸に平行に移動すると SHG シグナルが増強する。

第一章

HTS による Phospholipid transfer protein 新規阻害剤の探索

第一節 背景

アテローム性動脈硬化は、しばしば糖尿病や肥満による脂質異常症に伴って発生し、米国および世界の多くの国で疾患発生の主な原因となっており、この発生を防ぐことが重要な課題と考えられる¹⁶。Apolipoprotein B (apoB) を含む low-density lipoprotein (LDL) が高値になると、very low-density lipoprotein (VLDL) のアセンブリーや分泌の調節に影響して、アテローム性動脈硬化や心血管イベントの危険因子となる^{17,18}。

Phospholipid transfer protein (PLTP) は 80 kDa の疎水性の糖タンパク質で、血漿中で apoA- I と結合することで VLDL 表面のリン脂質を high-density lipoprotein (HDL) へ転送する。その結果、より大きくて密度の低い HDL ができる。PLTP は脂質転送/LPS 結合タンパク質遺伝子ファミリーのメンバーで、この中には cholesteryl ester transfer protein (CETP) も含まれる¹⁹。PLTP は動物細胞や組織にユビキタスに発現しており、中でもマクロファージやアテローム性動脈硬化病変に多く発現している¹⁹。血漿中の PLTP 活性の 25%は、肝臓由来である¹⁹。PLTP の遺伝子発現は peroxisome proliferator-activated receptor²⁰, farnesoid X receptor²¹, liver X receptor^{22,23}, sterol regulatory element binding protein 1c²⁴ といった、脂質合成やリポタンパク質生成、コレステロール逆転送 (RCT) に関わる転写因子によって調節されている。また、Jiang の報告では、高脂肪および高コレステロール食を負荷して高脂血症を誘導したマウスでは、PLTP の発現と活性が顕著に増加した¹⁹。これと同様に、肥満あるいはⅡ型糖尿病患者で血漿中の PLTP 量が高いとの報告がある²⁵。さらに、アテローム性動脈硬化のマーカーとして用いられている内膜中膜複合体の肥厚と血

漿中 PLTP 活性とは正の相関を示す²⁶。これらのことから、PLTP は脂質異常症やアテローム性動脈硬化治療のターゲットと考えられる。

PLTP は、リン脂質以外にジアシルグリセロール、 α -トコフェロール、セレブロシドおよびリポポリサッカライドを転送する²⁷。ApoE 欠損を背景にした粥腫モデルマウスにおいて、PLTP を欠損あるいは過剰発現したマウスの解析結果から、詳細な機構は明らかではないが、PLTP が肝細胞からの VLDL の分泌に関与して、粥腫を進展させると考えられる^{28, 29}。PLTP 欠損マウスの肝臓において、脂質の蓄積の程度に違いはみられなかった²⁸。これらの結果に加えて、ヒト肝細胞の PLTP 活性を阻害すると、apoB 分泌が減少することが明らかとなっている³⁰。これらの知見から、PLTP 活性を阻害することで、ヒトの粥腫の発生を阻害できると考えられる。

Luo らの研究で示されているとおり³⁰、PLTP 阻害化合物の探索に PLTP リコンビナントタンパク質を用いることは適切と考えられる。一方で、PLTP は血漿中タンパク質であるので、酵素源としてヒト血漿を用いることで、より生理的な状態で化合物を評価できると考えた。そこで PLTP の酵素源として、ヒト血漿を用いて 1 次スクリーニングを実施し、その後、精製した組換え PLTP タンパク質を用いて、ヒット化合物の阻害活性を確認した。SPR 法にて、ヒット化合物が精製 PLTP に対して特異的に結合することを明らかとした。これらの結果から、1 次スクリーニングにおいて、血漿を用いることで promiscuous inhibitor が除外できた可能性が高いと考えられる。今回のスクリーニングによって、新規ケモタイプの PLTP 阻害剤 (compound 1 と 2) を見出し、それらが HepG2 細胞で apoB 分泌を阻害することを確認した。既知化合物と異なるケモタイプの化合物の阻害剤を得たことにより、

PLTP を創薬ターゲットとすることの妥当性が確認され、また、高脂血症や関連疾病の予防および治療の新たな戦略の進展に貢献できると考える。

第二節 実験項

1) ヒト血漿と HDL₃の調製

健康人ボランティア（血中脂質正常）から得たヒト血液をヘパリン含有チューブに採取した。1,500 × g, 4°Cで20分遠心して血漿を分離し、小分けして-80°Cに保存した。HDL₃画分は岡本らの報告³¹に従って、ヒト血液から単離した。

2) ヒト PLTP クローニング, 発現および精製

PLTP

N末にFLAGタグを付加したヒト PLTP cDNA (TOYOBO) を, pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific) に組み込んでクローニングした。この発現プラスミドを, 293fectin 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を使用して HEK293F に導入した。培養液中に分泌発現された PLTP を, 抗 FLAG M2 アフィニティゲル (Sigma-Aldrich) に添加し, FLAG ペプチド (Sigma-Aldrich) と拮抗させて溶出した。溶出画分はプールし, 透析バッファー (25 mM Tris-HCl [pH 7.4], 137 mM NaCl, 26.8 mM KCl) で透析して -80°Cで保存した。抗 PLTP 抗体 (R&D SYSTEMS) を用いたウエスタンブロッティングにより, 精製されたタンパク質が PLTP であることを確認した。

ビオチン化 PLTP

N末にFLAGタグ, C末に biotin acceptor protein タグを付加したヒト PLTP cDNA を, pcDNA3.1 に組み込んでクローニングした。この発現プラスミドと, 部位特異的なビオチン化を目的としたビオチンリガーゼ BirA をコードする発現プラスミド

を HEK293F 細胞に共発現した。非ビオチン化 PLTP と同様の方法でビオチン化 PLTP を精製した。

3) 蛍光標識ドナー粒子を用いた PLTP 活性測定

Roar PLTP 活性キット (Roar Biomedical) を用いて PLTP 活性を測定した。このアッセイは蛍光標識されたリン脂質 (消光状態) のドナー粒子からアクセプター粒子への転送を検出する (図 2-1)。希釈した 5 μ L の血漿と 2 μ L の化合物をドナーおよびアクセプター粒子とインキュベート (最終ボリューム 18 μ L) して, PLTP の蛍光リン脂質の転送による蛍光強度の増加をプレートリーダーの SpectraMax Paradigm (Molecular Devices) で測定した。

4) RI 標識ドナー粒子を用いた PLTP 活性の測定

ドナー粒子からアクセプター粒子 (HDL₃ 画分) への radioisotope (RI) 標識ホスファチジルコリンの転送 (PLTP 活性) を測定した。5 μ mol の卵黄ホスファチジルコリンと 20 nmol のジブチルヒドロキシトルエンに 10 μ Ci の [³H]ホスファチジルコリン (L- α -dipalmitoyl [cholinemethyl-³H]) (PerkinElmer) を添加し, 窒素ガスで乾固した後, 1 mL のアッセイバッファー (10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% BSA) を添加した。ソニケーターを用いて 30 分超音波処理を行ってリン脂質を分散し, ドナーの [³H]ホスファチジルコリンで標識されたリポソームを調製した。アッセイバッファーで調製した 30 μ L の酵素源 (希釈血漿あるいは精製 PLTP), 10 μ L の化合物溶液, RI 標識ホスファチジルコリン粒子 (リン脂質 20 μ g) および HDL₃ (リン脂質 20 μ g) を混和して 100 μ L とし, プレートに添加し

て室温でインキュベートした。その後、反応液に 70 μ L の分離溶液 (500 mM NaCl, 215 mM MnCl₂, 450 U/mL ヘパリン) を添加してボルテックスで混和した。そのプレート を 10 分放置してから 1,000 回転で 1 分遠心した。上清をマルチスクリーン (Merck KGaA) に添加し、オプティプレート (PerkinElmer) に回収して、得られたろ液に 200 μ L のマイクロシンチ 40 (PerkinElmer) を添加した。プレートをシェーカーで振盪した後、マイクロプレートシンチレーションカウンターのトップカウンター (PerkinElmer) を用いて放射活性を測定した。

5) データ解析

アッセイ系のバリデーション

HTS のクオリティは以下の式で算出される Z'-factor を用いて評価した³²。

$$Z'\text{-factor} = 1 - \frac{3SD_{\text{control}} + 3SD_{\text{blank}}}{\text{Mean}_{\text{control}} - \text{Mean}_{\text{blank}}}$$

control: 化合物非添加の蛍光値

blank: 酵素非添加の蛍光値

SD: 標準偏差

PLTP 阻害のデータ解析

各化合物の濃度に対する阻害率をプロットし、spotfire (TIBCO) を用いて、以下の式でフィッティングして IC₅₀ 値 (50%阻害濃度) を求めた。

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{max} - \text{min}}{1 + 10^{(\text{Log IC}_{50} - [\text{comp}]) \times \text{Hill}}} + \text{min}$$

6) SPR 結合アッセイ

全ての試験は Biacore4000 (GE Healthcare) を用いて 25°Cで行った。Streptavidin (SA) センサーチップ (GE Healthcare) に 50 mM NaOH, 1 M NaCl を 3 回連続添加して洗浄した。ランニングバッファー (25 mM Tris [pH 7.4], 137 mM NaCl, 26.8 mM KCl, 0.1% Tween 20) でビオチン化 PLTP (150 µg/mL) を調製して SA チップに 10 分間添加した。固定化量は 4,500-4,700 RU であった。化合物は 2% DMSO 含有バッファーで段階希釈した。PLTP 固定化チップに化合物を 25°C, 30 µL/min で 1 分添加し, 3 分解離をモニターした。ランニングバッファーを化合物添加の前後に添加してブランクとした。Biacore4000 ソフトを使用し, 全てのセンサーグラムは, 解析時にリファレンスセル (未処理の表面) に対するレスポンスとブランクインジェクションのレスポンスを差し引いた (ダブルレファレンス)。得られたセンサーグラムはマストランスポートを考慮した 1:1 モデルでフィッティングし, 結合速度定数 k_a と解離速度定数 k_d を算出した。また, 以下の式により解離定数 K_D を求めた (キネティクス解析)。

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{1}{K_a}$$

7) HepG2 細胞からの apoB 分泌

HepG2 細胞を 1% BSA 含有 DMEM で 24 時間培養した。その後, 0.4 mM オレイン酸/BSA を含む培地で希釈した化合物を添加して 24 時間培養した。培養上清中

の apoB 測定には HTRF キット (Cisbio) を使用した。培養上清中の LDH 測定には、LDH 細胞毒性アッセイキット (Cayman Chemical) を使用し、細胞毒性を評価した。

8) 蛍光標識ドナー粒子を用いた CETP 活性測定

CETP 活性測定には Roar CETP 活性キット (Roar Biomedical) を使用した。希釈血漿 5 μ L と化合物 2 μ L を混和した後、ドナーおよびアクセプター粒子を添加 (最終ボリュームは 22 μ L) して、37°C で 2 時間インキュベートした。CETP の中性脂質転送による蛍光強度の増大をマルチプレートリーダーの EnVision (PerkinElmer) を用いて測定した。

第三節 結果

1) PLTP アッセイ系構築

蛍光法と RI 法によるヒト血漿を用いた PLTP 活性測定ダイナミックレンジを確認した。血漿量依存的な PLTP 活性が確認され (図 2-2) , 5%血漿の条件で十分な S/B 比 (シグナルとバックグラウンドの比) が得られた。次に選択的 PLTP 阻害剤として報告のある Compound A³⁰ の評価を行った (図 2-3) 。Compound A は濃度依存的に PLTP 活性を抑制し (図 2-4) , 算出された IC₅₀ 値は 1.3 μM (蛍光法) と 0.7 μM (RI 法) で, Luo らの報告³⁰ と同様であった。このことから, 蛍光法と RI 法のいずれでも PLTP 活性は測定可能と判断した。

2) HTS と Hit 同定

上記の結果に基づき, 自社化合物ライブラリーから新規 PLTP 阻害剤を見出すため HTS を実施した。このフローを図 2-5 に示す。1 次スクリーニングには, 分離操作不要でハイスループットな蛍光法を用いた。評価化合物の濃度は 10 μM とし, また化合物の溶媒である dimethyl sulfoxide (DMSO) の濃度は, 耐性試験で PLTP 活性にほとんど影響しなかった 1.5%として, PLTP 阻害活性を評価した (図 2-6) 。1 次スクリーニングの平均 Z'-factor は 0.83 と良好であった (図 2-7) 。IC₅₀ 値 10 μM 以下の化合物を選抜するため, CV 値 10%を考慮して, 40%以上の阻害活性を示した 87 化合物を選抜した (図 2-8) 。これらの化合物の再現性および濃度依存性試験 (n = 4) を実施して, IC₅₀ 値が 10 μM 以下の 39 化合物を選抜した。化合物の自家蛍光によって, PLTP 活性の蛍光シグナルを妨げる化合物を除外するため, RI 試験を実施し, 阻害を示した 6 化合物を選抜した。この内の 2 化合物 (compound 1 と 2)

の構造は類似しており (図 2-9), これらは蛍光法と RI 法で同様の活性を示した (図 2-10)。さらにこれらの化合物は HepG2 細胞で apoB 分泌を阻害した (図 2-11)。Compound 1 と 2 は細胞毒性を示さず, また, これらの化合物は CETP に対しても阻害活性を示さなかった (図 2-12)。

3) 精製ヒト PLTP を用いた compound 1 と 2 の阻害および結合評価

上記の評価に加え, 化合物が類似のタンパク質や, 未知のタンパク質によるドナー粒子から HDL₃ アクセプターへのホスファチジルコリン転送を阻害する可能性について調べるため, 酵素源として, ヒト血漿でなく精製ヒト PLTP を用い, RI 法による阻害評価を行った。PLTP を HEK293F 細胞に発現し, 抗 FLAG 抗体ゲルを用いてアフィニティ精製した (図 2-13)。次に, 精製 PLTP の濃度に依存して PLTP 活性が上昇することを確認した (図 2-14)。精製 PLTP に対する Compound A の IC₅₀ 値は 0.24 μM, compound 1 と 2 の IC₅₀ 値はそれぞれ 4.2 μM と 4.3 μM であり (図 2-15), ヒト血漿を用いた場合と同様の値であった。これらの結果から, 血漿中で PLTP がホスファチジルコリンを転送することが示された。さらに PLTP に compound 1 と 2 が特異的に結合することを確認するため, SPR 解析を行った。SA チップにビオチン化 PLTP をキャプチャーし, 陽性対照化合物の Compound A を用いて, 評価条件の最適化を行った。ストイキオメトリ 1:1 モデルで kinetics 解析を行ったところ, Compound A のカーブフィッティングは良好で (図 2-16), 算出された結合速度定数 k_a 値は $1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 解離速度定数 k_d 値は $4.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 解離定数 K_D 値は 0.024 μM であった。得られた K_D 値は IC₅₀ 値 (0.24 μM) (図 2-15) と近い値であり, アッセイ系の妥当性が確認された。決定した評価条件で compound 1 と 2 の結

合評価を実施し、1:1 モデルで kinetics 解析を行った。Compound **1** の k_a 値は $1.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, k_d 値は $5.3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, K_D 値は $3.0 \mu\text{M}$, compound **2** の k_a 値は $1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, k_d 値は $3.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, K_D 値は $2.7 \mu\text{M}$ であった (図 2-16)。これらの K_D 値も IC_{50} 値と近い値を示し、Compound **A** と同様に PLTP に特異的な結合を示した。

第四節 考察

本研究において、新規 PLTP 阻害剤を見出すため、蛍光標識ホスファチジルコリンをドナー粒子とし、ヒト血漿を酵素源として HTS を実施した。図 2-5 に示したスクリーニングフローに従って化合物の絞り込みを行い、新規の PLTP 阻害剤 compound 1 と 2 を見出すことに成功した。これらの化合物は HepG2 細胞の apoB 分泌を阻害した。今回新たに、PLTP に対する SPR 結合評価系を確立し、compound 1 と 2 が精製 PLTP に対して特異的に結合することを明らかにした。PLTP 阻害剤として先に報告があった Compound A と異なるケモタイプの compound 1 と 2 が、Compound A と同様に apoB 分泌を阻害する結果を得たことから、PLTP が粥腫発生を促進する因子で、脂質異常症治療の標的と考えられる。HepG2 細胞は apoB 分泌のモデルとして一般的に用いられるが、主として脂質の少ない未成熟な VLDL 粒子を分泌する³³ことから、PLTP の阻害がトリグリセリドの合成および分泌を含む VLDL 代謝にどのように影響するかについては、ヒトの脂質代謝をより反映する生理的なモデルを用いて明らかにする必要がある。

1 次スクリーニングにヒト血漿を用いることで、PLTP が機能する生理的状态に近い条件で化合物を評価することができ、また、血漿は PLTP 以外にも多くのタンパク質を含むことから promiscuous inhibitor の排除にも効果があると考えられた。このアプローチは、crude な混合物中で化合物をスクリーニングし、その後、ターゲットの確認を行うという点で、フェノティピックスクリーニング（疾患と関連する細胞の性質を変化させる化合物の探索）に似ており、血漿中タンパク質をターゲットとする場合には、このスクリーニング戦略を適用可能である。

一方で、PLTP 阻害がコレステロール逆転送系に与える影響については議論がある¹⁹。HDL の総量の増加は、脂質異常症や心血管系の疾患の治療に直接はつながらないとの報告がある^{34, 35}。これについては、親和性および阻害活性の強い PLTP 阻害剤を用いて HDL の代謝を変化させた場合に、上記疾患の治療が可能かを調べることで明らかになると考えられる。PLTP を介した免疫反応については、相反する報告が複数あり³⁶⁻³⁹、これらについても、特異的な阻害剤を用いることによって解明できる可能性がある。しかし、ヒトとマウスでリポタンパク質の代謝が異なる点には注意が必要である。例えばマウスは CETP 活性を欠くために HDL 値が高い⁴⁰。これらを考慮し、実験に用いる動物モデルの選択に注意を払うべきである。

以上より、ヒト血漿を酵素源とした HTS を実施し、新規ケモタイプの PLTP 阻害剤を見出した。さらに SPR 解析により、PLTP に対する阻害剤の結合を評価し、特異的阻害剤であることを明らかにした。本研究により、リポタンパク質代謝および脂質異常症の病因の理解が深まり、動脈硬化症の治療の進展につながることを期待する。



図 2-1 蛍光標識ドナー粒子を用いた PLTP アッセイ ドナー粒子に
 蛍光標識ホスファチジルコリンが消光状態で含まれている。ホスファ
 チジルコリンがドナー粒子からアクセプター粒子へ移動すると蛍光
 強度が増加し，ホスファチジルコリンの転送（PLTP 活性）を測定で
 きる。

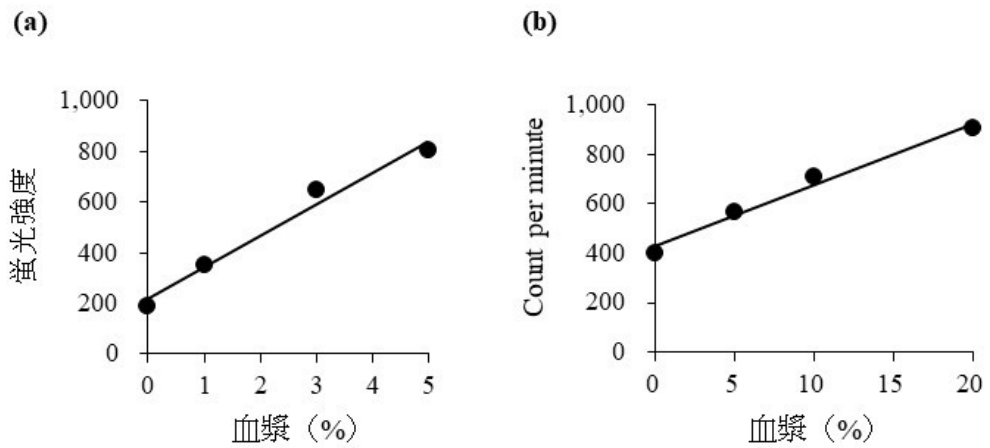


図 2-2 ヒト血漿を用いた PLTP 活性測定 (a) 蛍光法にて血漿濃度を 1, 3, 5% として, 30 分インキュベーション後に PLTP 活性を測定した。データは duplicate の平均値を示す。(b) RI 法にて血漿濃度を 5, 10, 20% として, 15 分インキュベーション後に PLTP 活性を測定した。データは duplicate の平均値を示す。

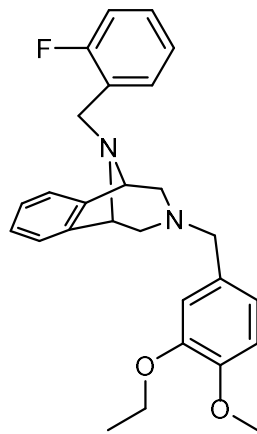


図 2-3 Compound A (陽性対照化合物) の化学構造

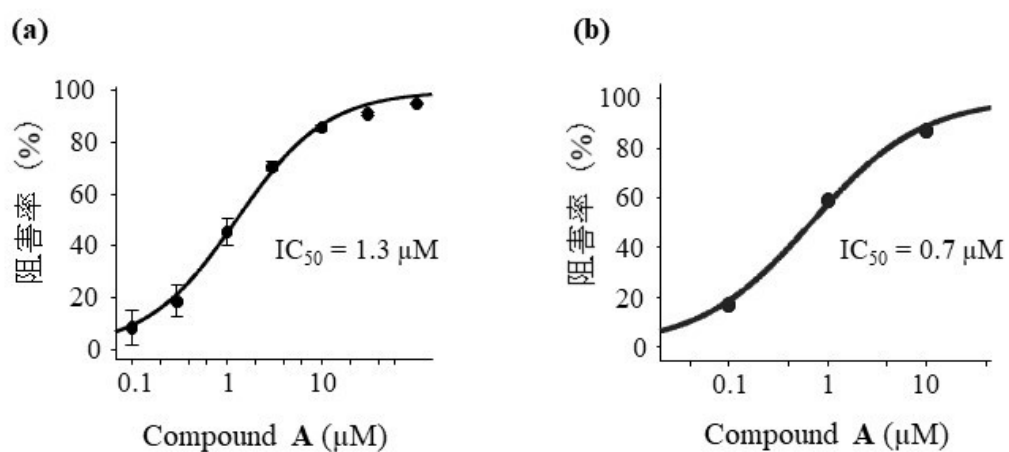


図 2-4 Compound A の濃度依存的な血漿中 PLTP 活性阻害 (a) 蛍光法にて Compound A (化合物濃度 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 μM) 存在下の PLTP 活性を測定した。データは quadruplicate の平均値と標準偏差を示す。(b) RI 法にて Compound A (化合物濃度 0.1, 1, 10 μM) 存在下の PLTP 活性を測定した。データは duplicate の平均値を示す。

HTSヒット選抜フロー

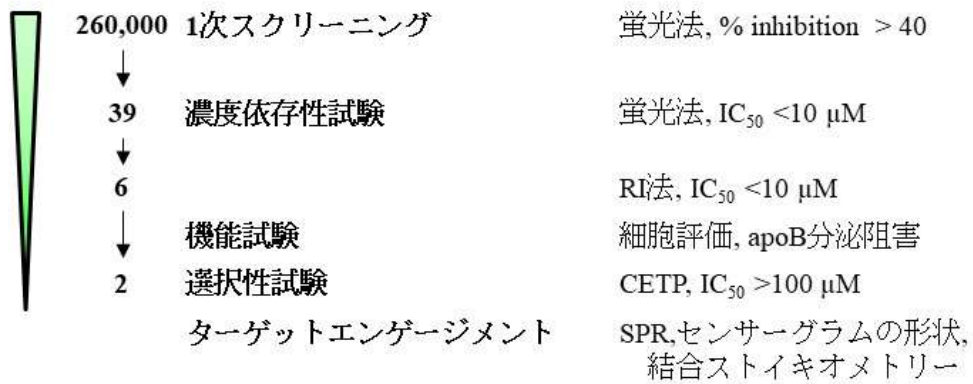


図 2-5 PLTP 阻害剤探索のための HTS の概要

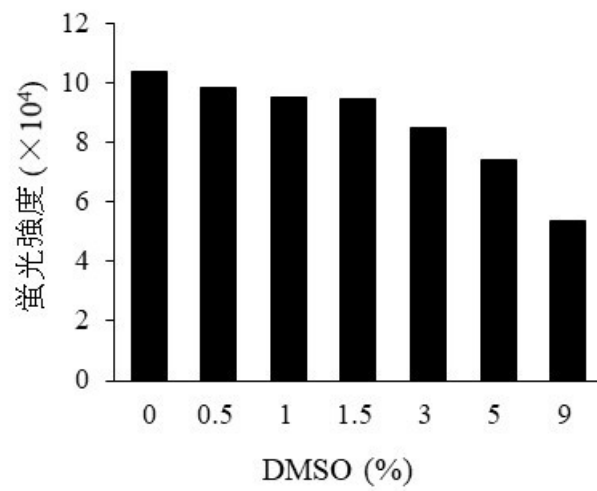


図2-6 PLTP活性に対するDMSO濃度の影響 蛍光法にてDMSO (0.5, 1, 1.5, 3, 5, 9%) 存在下のPLTP活性を測定した。データは duplicate の平均値を示す。

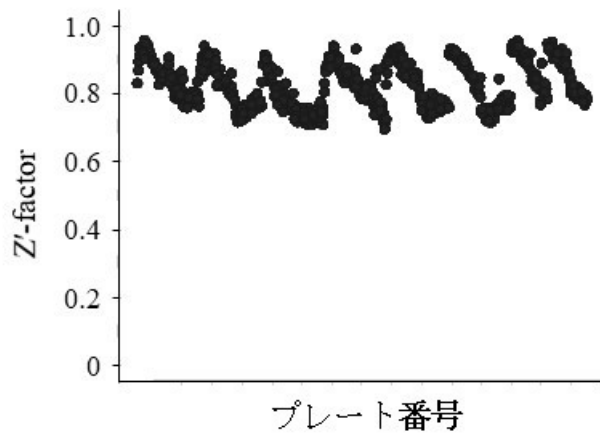


図 2-7 PLTP 1 次スクリーニングの Z'-factor 各プレート 12 ウェルの DMSO コントロールと 12 ウェルの血漿非添加コントロールウェルの値を用いて Z'-factor を算出した。

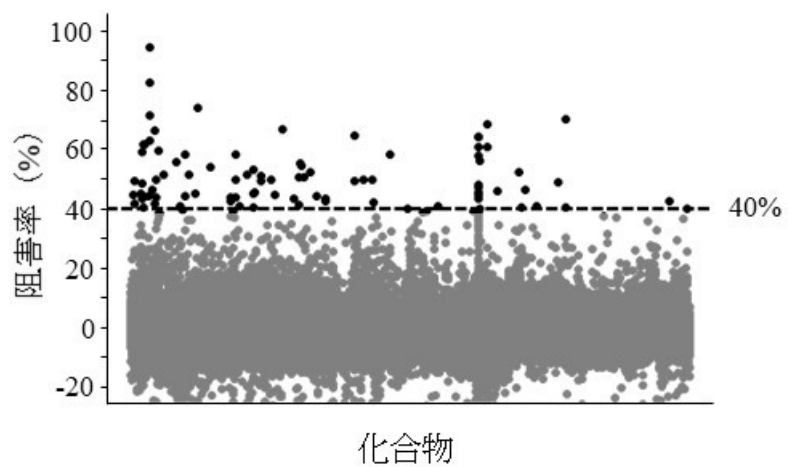


図 2-8 1 次スクリーニングにおける化合物の血漿中 PLTP 阻害活性分布 蛍光法にて, 化合物濃度を $10\ \mu\text{M}$ とし, 26 万化合物のスクリーニングを実施した。阻害率 40%以上の化合物をヒット選抜した。

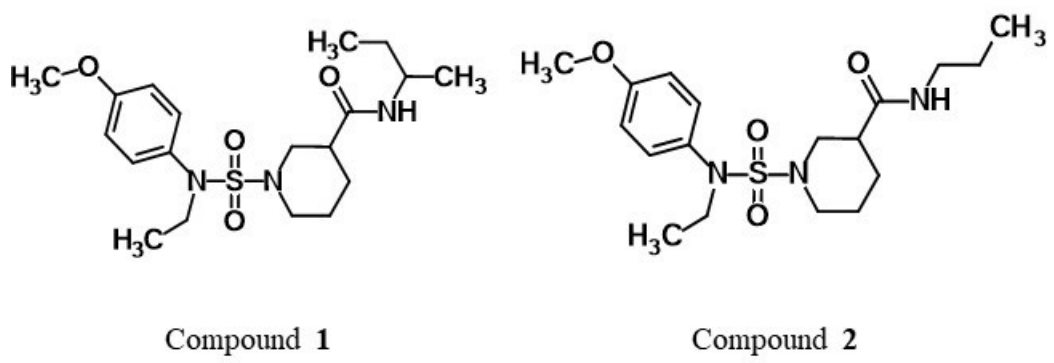


図 2-9 Compound 1 と 2 の化学構造

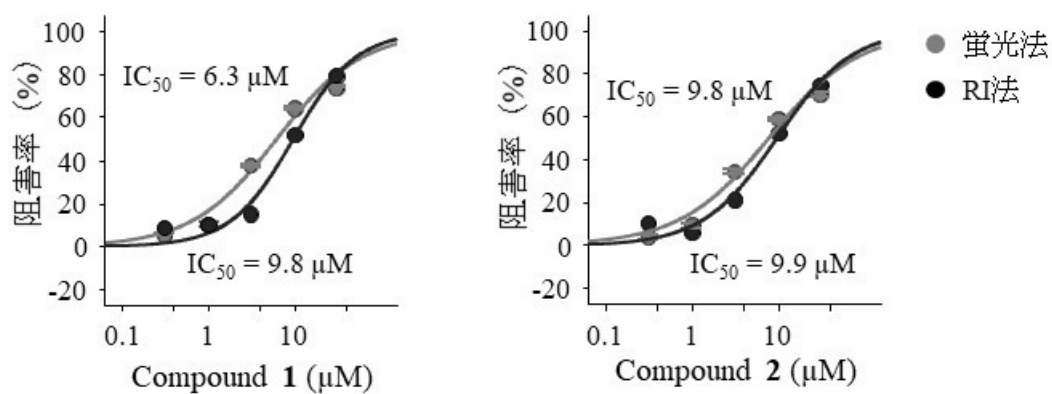


図 2-10 蛍光法および RI 法による compound 1 と 2 の濃度依存的な血漿中 PLTP 活性阻害 蛍光法にて compound 1 と 2 (0.3, 1, 3, 10, 30 μM) 存在下の PLTP 活性を測定した。データ (灰色丸) は quadruplicate の平均値と標準偏差を示す。 RI 法にて compound 1 と 2 (0.3, 1, 3, 10, 30 μM) 存在下の PLTP 活性を測定した。データ (黒丸) は duplicate の平均値を示す。

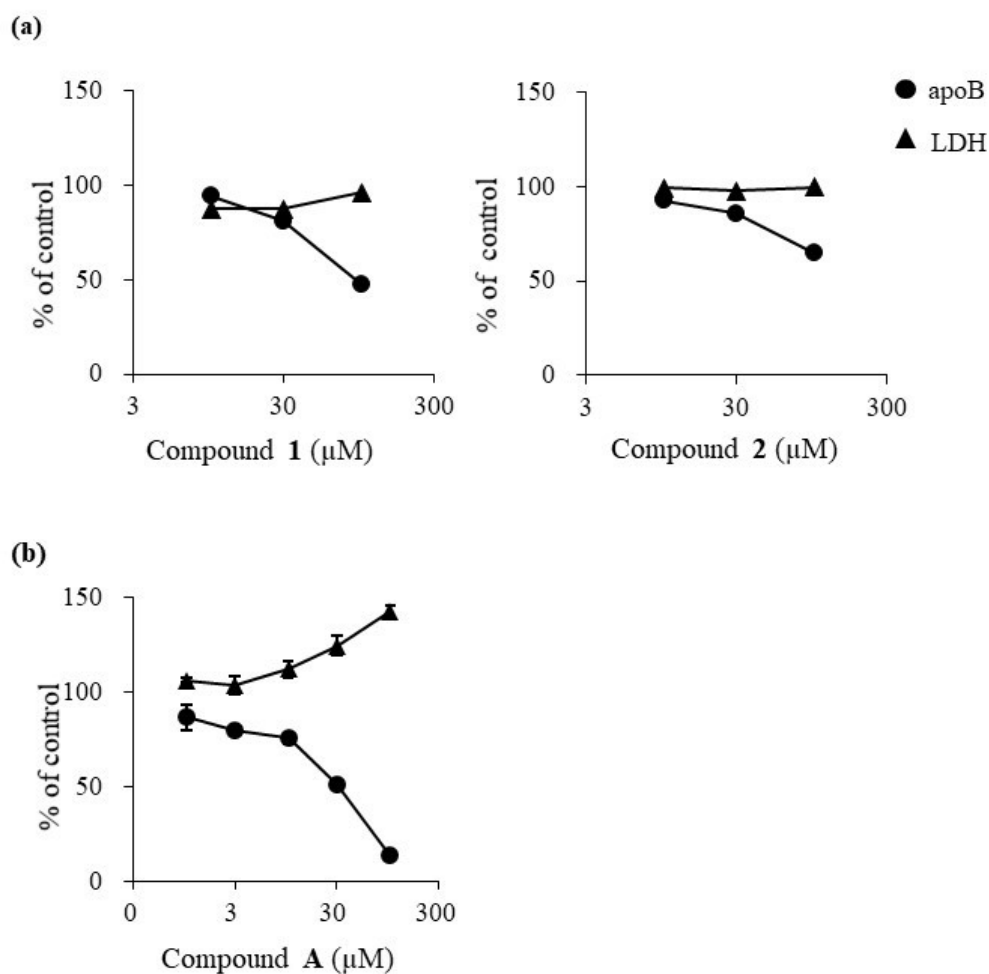


図 2-11 化合物による HepG2 細胞の apoB 分泌阻害と LDH 阻害活性
 (a) HepG2 細胞にオレイン酸と共に compound 1 と 2 (化合物濃度 10, 30, 100 μM) を添加し, 24 時間後に培養上清を回収して, VLDL の指標である ApoB 量と, 細胞毒性の指標である LDH 活性を測定した。化合物非添加を 100 とした相対値を示す (duplicate の平均値)。 (b) Compound A の濃度を 1, 3, 10, 30, 100 μM として, 同様に評価を行った。データは triplicate の平均値と標準偏差を示す。

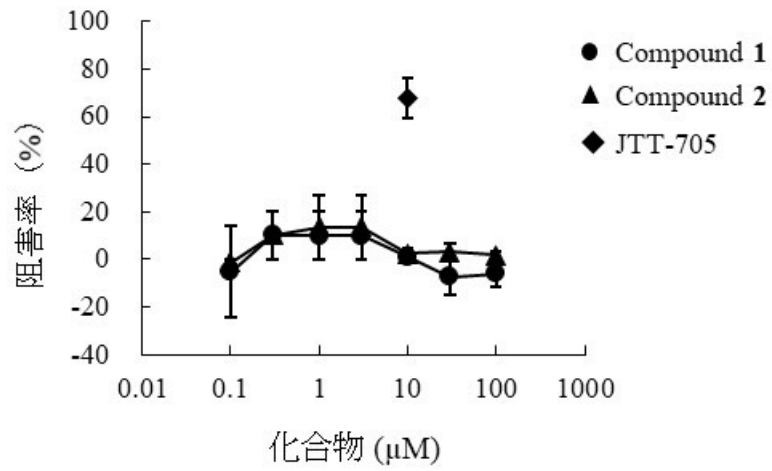


図 2-12 Compound 1 と 2 (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 μM) および JTT-705 (10 μM) の血漿中 CETP 活性阻害 蛍光法にて compound 1 と 2 (化合物濃度 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 μM) あるいは JTT-705 (化合物濃度 10 μM) 存在下の CETP 活性を測定した。データは quadruplicate の平均値と標準偏差を示す。

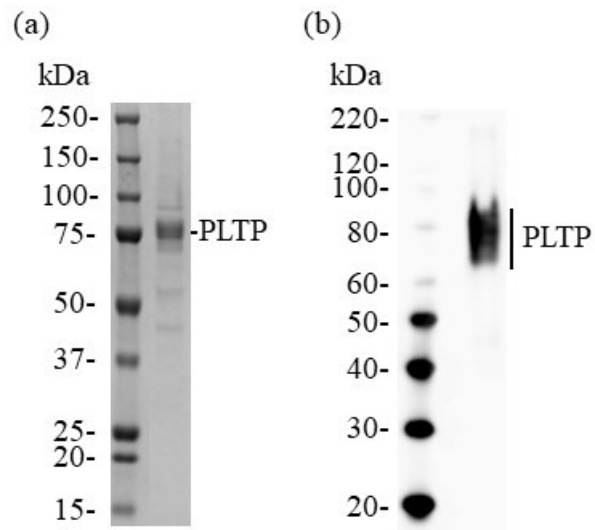


図 2-13 PLTP の精製 (a) HEK293F 細胞を用いて発現した PLTP をアフィニティ精製した。精製 PLTP を SDS-PAGE に供し、CBB 染色した。(b) 精製 PLTP を、PLTP に対する抗体を用いてウェスタンブロット解析した。

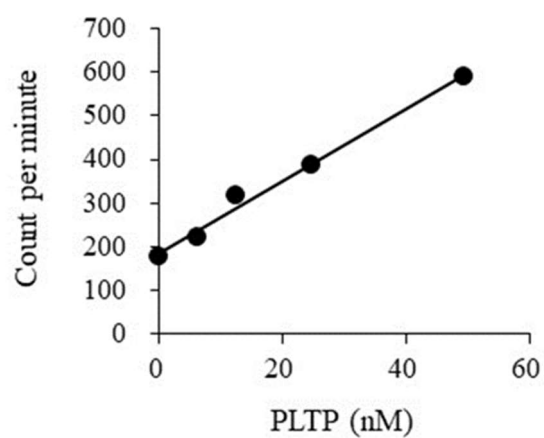


図 2-14 精製 PLTP の濃度依存的な PLTP 活性 RI 法にて、精製 PLTP 濃度を 6.3, 13, 25, 50 nM として、15 分インキュベーション後に PLTP 活性を測定した。データは duplicate の平均値を示す。

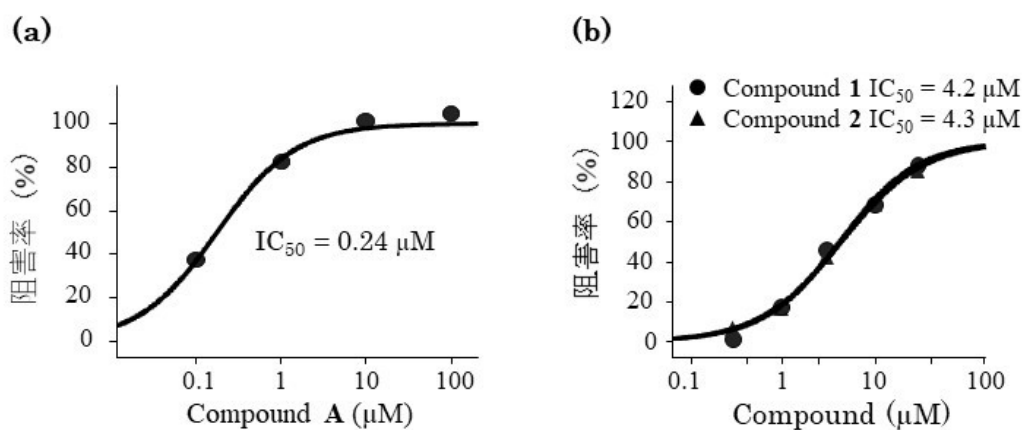


図 2-15 精製 PLTP に対する化合物濃度依存的な PLTP 活性阻害
 (a) RI 法にて Compound A (0.1, 1, 10, 100 μM) 存在下の PLTP 活性を測定した。データは duplicate の平均値を示す。 (b) RI 法にて compound 1 と 2 (0.3, 1, 3, 10, 30 μM) 存在下の PLTP 活性を測定した。データは duplicate の平均値を示す。

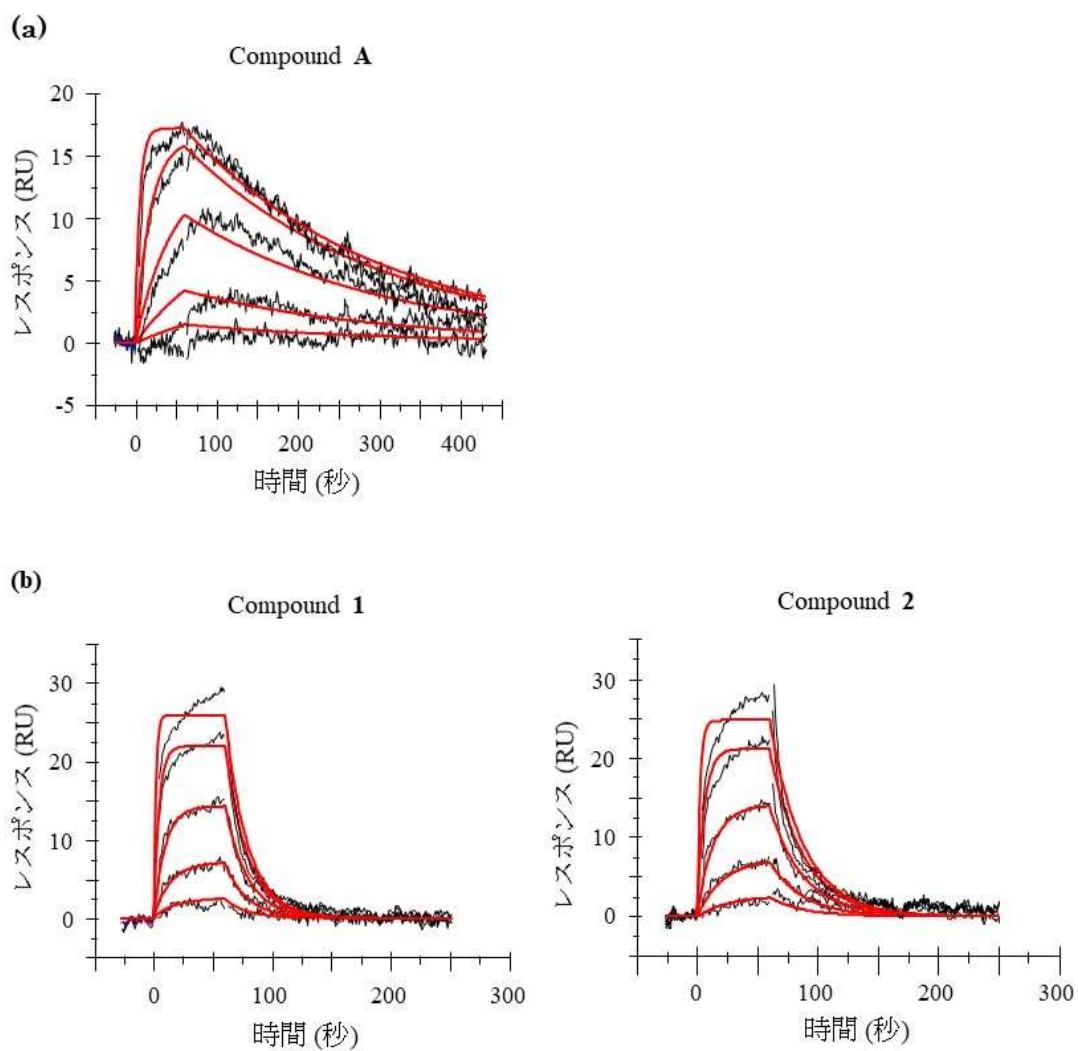


図 2-16 固定化した PLTP に対する化合物の結合 (a) PLTP に Compound A (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 μM) を添加した際のレスポンス (黒線) と理論曲線 (赤線) を示す。 (b) Compound 1 と 2 (0.3, 1, 3, 10, 30 μM) の結合レスポンス (黒線) と理論曲線 (赤線) を示す。

第二章

HTS による Interleukin-2-inducible T-cell kinase 阻害剤の探索と機構解明

第一節 背景

Interleukin-2-inducible T-cell kinase (ITK) は非受容体型チロシンキナーゼの TEC ファミリーのメンバーである。主に T 細胞に発現し、ヘルパー T (Th) 2 細胞のシグナル伝達に重要な役割を果たしている⁴¹。また ITK は、Th17 細胞の分化や炎症性サイトカイン IL-17A の産生を介して免疫疾患に関わる分子である^{41, 42}。ITK ノックアウトマウスの研究結果から、ITK 阻害剤は炎症および自己免疫疾患の治療薬となることが期待される^{41, 43}。

プロテインキナーゼの触媒部位は構造類似性が高く⁴⁴、選択的なキナーゼ阻害剤のデザインは特に難しい⁴⁵。多くのキナーゼは生理的条件下において活性構造と不活性構造の 2 つの構造の平衡状態にある⁴⁶。不活性体は活性体に比較して構造が多様であるために、不活性構造をターゲットとすると、選択性の獲得に有利である⁴⁷。キナーゼ阻害剤をスクリーニングする一般的な手法は、構造情報に基づかない、活性を指標としたものである^{48, 49}。選択性の高い化合物を得るためには、1 次ヒットの中から不活性構造を安定化する化合物を選抜することが重要となる。これまで、不活性構造に優先的に結合する阻害剤を探索する方法がいくつか報告されている。Probe displacement assay は、adenosine triphosphate (ATP) 拮抗の蛍光プローブの置換を測定する手法である⁵⁰。アッセイにリン酸化されていない不活性体の標的キナーゼを用いることで、不活性体に結合する化合物を選抜可能であるが、ATP 非拮抗化合物を逃してしまう。Cascade assay は不活性体の標的キナーゼを、評価化合物とプレインキュベーションした後に、上流キナーゼによって活性化する方法である⁵¹。このアッセイでは、不活性体を安定化して活性化を阻害する化合物以外に、上位キ

ナーゼを阻害する化合物や、活性化された標的キナーゼを阻害する化合物も選抜されるため、活性化キナーゼを用いた確認試験が必要となる。

今回、ITK の阻害剤を探索するため、タンパク質の構造変化を高速で検出する蛍光バイオセンサーおよび SHG 評価系⁵²を新たに構築した。まず、脱リン酸 ITK を用いて化合物ライブラリーの阻害活性スクリーニングを実施し、その後、FLT3 (D835Y)に対して選択性を有する化合物を選抜し、SPR 法で選抜化合物の ITK に対する特異的結合を確認した。これらのヒット化合物の中から蛍光バイオセンサーあるいは SHG 評価によって選抜した化合物はキナーゼパネル評価において高い選択性を示した。今回、ITK の不活性構造阻害剤を選抜した手法は、他のキナーゼの構造変化検出にも有用と考える。

第二節 実験項

1) タンパク質のクローニング, 発現および精製

全長 ITK

N 末に FLAG タグを付加した全長ヒト ITK (ITK-FL) の cDNA (OriGene) をバキュロウイルス用トランスファーベクター pVL1393 (Thermo Fisher Scientific) に組み込んでクローニングした。また, Myc タグを付加したヒト YopH (チロシンホスファターゼ) (GenScript) の cDNA を pVL1393 に組み込んでクローニングし, バキュロウイルス用プラスミドを調製した。BaculoGold Transfection kit (BD Biosciences) を使用し, Sf9 細胞にバキュロウイルス DNA と ITK-FL あるいは YopH 発現バキュロウイルス調製プラスミドを共導入し, 組換えバキュロウイルスを調製した。ITK-FL 発現バキュロウイルスと YopH 発現バキュロウイルスを Sf9 細胞に共感染し, 48 時間培養した後に回収して -80°C で保存した。

凍結保存した細胞は, バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 500 mM NaCl, 10% グリセロール, EDTA フリープロテアーゼ阻害剤カクテル) に懸濁し, ホモジナイザーを用いて破碎した。破碎液は $39,000 \times g$ で 30 分遠心した。抗 FLAG M2 アフィニティゲル (Sigma-Aldrich) にこの上清画分を添加し, FLAG ペプチド (Sigma-Aldrich) と拮抗させて溶出した。この溶出液をバッファー (50 mM HEPES [pH 8.0], 500 mM NaCl, 10% グリセロール, 1 mM DTT) を用いて Superdex 200 10/300 GL カラム (GE Healthcare) でゲルろ過精製した。得られたタンパク質は液体窒素で急速凍結して -80°C で保存した。

YopH による ITK-FL の脱リン酸の程度は、チロシンリン酸化を検出するモノクローナル抗体の 4G10 (Merck Millipore) を用いたウエスタンブロッティングによって確認した。

ITK-KD

N 末に His タグを付加したヒト ITK kinase domain (ITK-KD) cDNA を pVL1393 に組み込んでクローニングし、バキュロウイルス用プラスミドを調製した。また、変異型ヒト ITK-KD (ITK-KD Mutant A) cDNA は、PCR をベースにした部位特異的変異導入によって、ITK-KD の α C-helix の溶媒に露出するアミノ酸をシステインに置換し、2 つのシステイン (C442, C477) をセリンに置換して pVL1393 に組み込み、バキュロウイルス用プラスミドを調製した。ITK-FL と同様に、BaculoGold Transfection kit を使用して、組換えバキュロウイルスを調製した。ITK-KD あるいは ITK-KD Mutant A 発現バキュロウイルスと YopH 発現バキュロウイルスを Sf9 細胞に共感染し、72 時間培養した後に回収して、 -80°C で保存した。

凍結保存した細胞は、バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 7.0], 150 mM NaCl, EDTA フリープロテアーゼ阻害剤カクテル) に懸濁し、ホモジナイザーを用いて破碎した。破碎液は $39,000 \times g$ で 30 分遠心した。Ni-NTA Superflow (QIAGEN) にこの上清画分を添加し、溶出バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 7.0], 150 mM NaCl, 500 mM イミダゾール) を用いて溶出した。この溶出液を Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) に添加し、溶出バッファー (50 mM HEPES [pH 7.0], 200-600 mM NaCl) を用いて段階的に溶出した。溶出液は ITK-FL と同様に Superdex 200 10/300 GL カラムでゲルろ過精製した。得られたタンパク質は液体窒素で急速凍結し、 -80°C で保存した。

YopH による ITK-KD および ITK-KD Mutant A の脱リン酸の程度は、ITK-FL と同様に、モノクローナル抗体の 4G10 を用いたウエスタンブロッティングによって確認した。

SLP-76

基質タンパク質の GST-SLP-76 は Lin らの報告⁵³に従って、発現および精製した後に、HiLoad 26/600 Superdex 200 カラム (GE Healthcare) を用いてゲルろ過精製した。

2) キナーゼ活性測定

ITK-FL, ITK-KD および FLT3 (D835Y) (Promega) の活性測定には ADP-Glo キナーゼアッセイ (Promega)⁵⁴を用いた (図 3-1)。アッセイバッファー (25 mM HEPES [pH 7.5], 25 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.005% Tween20, 0.1% BSA) で ITK-FL (2.5 nM), GST-SLP-76 (250 nM) および ATP (30 μM) を調製した。3 μL の基質 (GST-SLP-76, ATP) と 2 μL の酵素 (ITK-FL) をプレートに添加し、室温で 1 時間インキュベートした。その後、5 μL の ADR (ADP-Glo Reagent: キナーゼ反応を停止し、残存 ATP を分解する試薬) を添加して 40 分インキュベートし、10 μL の KDR (Kinase Detection Reagent: ADP を ATP に変換する試薬) を添加して 30 分インキュベートした後に、プレートリーダーの SpectraMax Paradigm (Molecular Devices) を用いて発光値を測定した。FLT3 (D835Y) の活性測定は、5 nM FLT3 (D835Y), 4 μM myelin basic protein および 54 μM ATP を用いて ITK と同様に行った。

3) SPR 結合アッセイ

試験は Biacore T200 と 4000 (GE Healthcare) を用いて 10°C で行った。キャプチャーカップリングのため、NTA センサーチップ (GE Healthcare) に 0.1 M *N*-hydroxysuccinimide と 0.4 M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride を添加して活性化した。His タグ付加 ITK-KD (10 µg/mL) はランニングバッファー (25 mM HEPES [pH 7.5], 25 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.005% Tween20) で調製し、活性化した NTA チップに 10 分間添加した。ITK-KD の固定化量は 2,900~4,900 RU であった。化合物は 5% DMSO 含有バッファーで段階希釈した。ITK-KD 固定化チップに化合物を流速 30 µL/min で 1 分添加し、化合物の解離速度によって 1-3 分、解離をモニターした。拮抗試験における化合物の結合評価は、ランニングバッファーで希釈した ADP 1 mM 存在下で行った。

データは Biacore T200 および 4000 の evaluation ソフトを使用して解析した。解析には溶媒補正およびダブルリファレンスした値を用いた。キネティクス解析はマストランスポートを考慮した 1:1 モデルでフィッティングした。平衡値解析は各化合物濃度において平衡状態の結合量をプロットし、以下の式により解離定数 K_D を求めた。

$$K_D = \frac{C (R_{\max} - R_{\text{eq}})}{R_{\text{eq}}}$$

C: 化合物濃度

R_{eq} : 化合物濃度 C に対する平衡値

R_{\max} : 最大結合量

4) 蛍光バイオセンサーアッセイの構築・バリデーションとスクリーニング

ITK-KD Mutant A と蛍光分子の 6-acryloyl-2-dimethylaminonaphthalene (アクリロダ
ン) (和光純薬) をラベリングバッファー (50 mM HEPES [pH 7.5], 200 mM NaCl,
10%グリセロール) で希釈して, 1:5 で混和し, 4°Cで5時間インキュベートした。
アクリロダン標識ITK-KD Mutant Aは10-MWCO アミコンウルトラ (0.5 mL) 遠心
式フィルターを用いてバッファーで3回洗浄した後, -80°Cで保存した。

アクリロダン標識ITK-KD Mutant Aはアッセイバッファー (50 mM HEPES [pH
7.5], 25 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.005% Tween20) で400 nMに希釈した。化合物
はDMSOで調製した後, アッセイバッファーで終濃度の2倍の濃度に希釈した。
黒色384ウェルプレートに化合物と蛍光標識ITK-KD Mutant Aをそれぞれ10 µL添
加して混和し, 室温で15分インキュベートした。プレートリーダーの EnVision
(PerkinElmer) を用いて, 励起波長 386 nm, 測定波長 410-560 nm で蛍光強度を測
定した。

スクリーニング化合物のうち, 阻害活性が弱い化合物 (IC₅₀ 値 ≥ 1 µM) は終濃度
を 2.5, 10 および 40 µM とし, 強い化合物 (IC₅₀ 値 < 1 µM) は 0.25, 1 および 4 µM
とした。DMSOの終濃度を5%として反応を行った。

5) SHG アッセイの構築・バリデーションとスクリーニング

ITK-KD Mutant A と蛍光分子の SHG2-maleimide (チオール反応性) をラベリング
バッファー (50 mM sodium phosphate [pH 6.5], 150 mM NaCl, 10%グリセロール)
で希釈して, 1:5 で混和し, 室温で90分インキュベートした。蛍光標識ITK-KD
Mutant A (ITK-KD Mutant A-SHG2) は Zeba column (Thermo Fisher) を用いてバッ

ファー置換 (50 mM sodium phosphate [pH 8.0], 500 mM NaCl, 10%グリセロール, 1 mM DTT) することで過剰な蛍光分子を除去して, -80°C で保存した。

ITK-KD Mutant A-SHG2 はアッセイバッファー (25 mM HEPES [pH 7.5], 25 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 0.005% Tween20) で $5\ \mu\text{M}$ に希釈し, $20\ \mu\text{M}$ 化合物と混和し, 室温で 60 分インキュベートした。Ni/NTA bilayer surface に $10\ \mu\text{L}$ のアッセイバッファーを添加した後に, $10\ \mu\text{L}$ のタンパク質/化合物混合液を添加し, 室温で 90 分インキュベートしてタンパク質を固定化し, SHG シグナルを測定した (図 3-2a-d)。

拮抗試験では, SHG 測定#1 (図 3-2d) の後, 非結合タンパク質と過剰な化合物を洗浄し, ベースラインのシグナルを測定した (図 3-2f)。次に洗浄したウェルに $20\ \mu\text{L}$ の評価化合物を添加し, SHG シグナルを測定した (図 3-2h)。以下の式を用いて SHG の変化率 ($\%\Delta\text{SHG}$) を算出した。

$$\%\Delta_{\text{SHG}} = \frac{\text{Int}_{\#3} - \text{Int}_{\#2}}{\text{Int}_{\#2}}$$

スクリーニング化合物は $500\ \text{nM}$ の ITK-KD Mutant A-SHG2 と混和し, 室温で 1 時間インキュベートした。タンパク質/化合物混合液を, 予め $10\ \mu\text{L}$ アッセイバッファーを添加した 384 ウェルプレートの Ni/NTA bilayer surface に $10\ \mu\text{L}$ 添加した。

阻害活性が弱い化合物 (IC_{50} 値 $\geq 1\ \mu\text{M}$) は終濃度を 2.5, 10 および $40\ \mu\text{M}$ とし, 強い化合物 (IC_{50} 値 $< 1\ \mu\text{M}$) は 0.31, 1.3 および $5\ \mu\text{M}$ とした。タンパク質/化合物混合液は室温で 90 分, bilayer surface に固定化し, SHG シグナルを測定した (図 3-2 d)。

SHG シグナルは photon counts per second (cps) で表す。

第三節 結果

1) HTS と阻害剤のキャラクタリゼーション

キナーゼの不活性化状態に結合して阻害する化合物を取得するために、ITK-FL、ITK-KD および ITK-KD Mutant A タンパク質は、バキュロウイルスを用いてチロシンホスファターゼの YopH と共発現し、脱リン酸した。脱リン酸の程度は、チロシンリン酸化を検出するモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析により確認した (図 3-3, 3-4)。また、ITK-KD Mutant A の酵素活性は変異導入により変化しないことを確認した (図 3-5)。

次に ITK 阻害剤探索のため、ADP-Glo アッセイの条件を最適化した。ITK-FL に対する ATP の見かけの K_m 値は 120 μM であった。アッセイ系の確認のため、3 つの既知阻害剤の ITK と FLT3 (D835Y) に対する阻害プロファイルと比較した。ITK 阻害剤が FLT3 に対して高い選択性を達成するのは難しいと考えられることから⁵⁵、⁵⁶、既知化合物が FLT3 (D835Y) (FLT3 の恒常的な活性型) に対して選択性を示すか調べた。ITK の不活性構造に作用する既知阻害剤の BMS-509744⁵³ と Pfizer compound 9⁵⁷ は選択的に ITK-FL を阻害し、活性構造阻害剤の staurosporine は ITK-FL と FLT3 (D835Y) の両方を強く阻害した (表 3-1)。

上記の結果に基づき、自社化合物ライブラリーから新規 ITK 阻害剤を見出すため、HTS を実施した。このフローを図 3-6 に示す。1 次スクリーニングには、ADP-Glo アッセイを用い、384 プレートで 390,000 化合物の ITK-FL の阻害活性スクリーニングを行った。1 次スクリーニングの平均の Z' -factor は 0.88 であった (図 3-7)。化合物濃度 10 μM で 30%以上の阻害を示した 2,754 化合物を次の試験に進めた (図 3-8)。不活性体に結合する阻害剤を選抜する確率を高めるため、FLT3 (D835Y)に

対する選択性試験を行った。2,754 化合物のうち、阻害活性の弱い化合物（1 次スクリーニングの阻害率が 30–80%）は、ITK に対しては化合物濃度を 10 μM として再現性試験を行い、FLT3 (D835Y) に対しては化合物濃度を 30 μM として阻害評価を行った。阻害活性の強い化合物（1 次スクリーニングの阻害率が 80%以上）は、ITK に対しては化合物濃度を 1 μM 、FLT3 (D835Y) に対しては化合物濃度を 3 μM として $n = 3$ で阻害評価を行った。選択性の指標として、ITK-FL の阻害%を FLT3 (D835Y) の阻害%で除した値が 1 以上の化合物を選抜した。950 化合物を次の試験に進め、ADP-Glo アッセイを用いた濃度依存試験 ($n = 3$) を行った。259 化合物が ITK-FL に対して IC_{50} 値 10 μM 以下の阻害活性を示し、FLT3 (D835Y) に対して 5 倍以上の選択性を示した。

2) SPR 法を用いたヒット化合物の結合評価

ITK に対して阻害活性が確認されたヒット化合物のストイキオメトリーを調べるため、SPR 評価を行った。陽性対照化合物の ADP は固定化した ITK-KD に対して飽和性の結合を示し、 K_D 値は 13 μM で (図 3-9) , Navratilova らの報告と同様の値であった⁵⁸。阻害活性試験で選抜した 259 化合物を SPR 法にて予備スクリーニングし、ストイキオメトリーを越えて結合 (陽性対照化合物の飽和結合量の 3 倍以上) か、あるいは非特異的な結合挙動のセンサーグラム⁸を示した 106 化合物を promiscuous binder として排除した (図 3-10) 。次に、promiscuous binder を除いた 153 化合物について、SPR 試験を行い、陽性対照化合物の飽和結合量の 25%以上結合した 116 化合物を選抜した。116 化合物について濃度依存性試験を実施し、

ITK-KD に対して濃度依存的に結合し、ストイキオメトリーが陽性対照化合物の 3 倍以下の 105 化合物を選抜した。

3) 蛍光バイオセンサーアッセイ系構築とバリデーション

蛍光標識 ITK-KD Mutant A を用いて、活性構造阻害剤と不活性構造阻害剤が判別可能か調べるため、ツール化合物と標識タンパク質をインキュベーションした後、蛍光スペクトルを測定した。全てのスペクトルは、化合物の自家蛍光を補正するため、標識タンパク質非添加の化合物毎のスペクトルを測定し、これを差し引いた。不活性構造阻害剤 (BMS-509744, Pfizer compound 9) によってアクリロダンのスペクトルは長波長側へシフト (最大蛍光波長が 488 から 508 nm へシフト) した (図 3-11)。これに対して、活性構造阻害剤の saurosporine 存在下では最大蛍光波長はほとんど変化しなかった (図 3-11)。

次に様々な既知 ITK 阻害剤について、ITK-KD に対する阻害活性および親和性を評価し (図 3-12a), これらの化合物の蛍光バイオセンサー評価を実施した。測定波長 508 nm と 456 nm の蛍光強度の比 ($R = FI_{508}/FI_{456}$) を算出し、最大蛍光波長のシフトを定量化した (図 3-12b)。不活性構造阻害剤の添加で、この値は濃度依存的に増加した。一方、活性構造阻害剤の添加では、蛍光強度の比は変わらないかわずかに低下した。これらの結果から、このレスポンスは不活性構造阻害剤に特異的と考えられた。

4) 蛍光バイオセンサー法によるヒット化合物の選抜

ツール化合物による蛍光標識 ITK-KD Mutant A のレスポンスが確認できたことから、SPR 試験のヒット化合物 (105 化合物) を蛍光バイオセンサー法で評価した。化合物のみを添加したプレートで化合物自家蛍光の補正に用いた。蛍光バイオセンサーアッセイの陽性対照化合物 (BMS-509744) と DMSO コントロールの 2 波長の蛍光強度の比 ($R = FI_{508}/FI_{456}$) から算出した Z'-factor は 0.65 と良好であった。105 化合物のうち、R 値が DMSO コントロールの平均+3SD を越えた 35 化合物を次の試験に進めた (図 3-13)。各化合物濃度でスペクトルを測定し、測定波長 508 nm と 456 nm の蛍光強度の比を算出してこれがカットオフ値 (DMSO control の平均値 + 3SD) を超えた 34 化合物を不活性構造阻害剤としてヒット選抜した。代表として J-13 (ITK-FL に対する IC₅₀ 値 9.9 μM, FLT3 (D835Y) に対する IC₅₀ 値 >80 μM) の蛍光スペクトルを図 3-14 に示す。化合物濃度依存的に蛍光強度が減少し、最大波長は 508 nm にシフトした。

5) SHG アッセイ系構築とバリデーション

ITK-Mutant A-SHG2 をツール化合物 (図 3-12a) とインキュベーションして SHG シグナルを測定した。活性構造阻害剤の化合物 VI, VIII, IX, X は高値を示した (図 3-15)。化合物 VII はやや低い値を示したが、これは溶解性が低いと考えられた。不活性構造阻害剤は DMSO コントロールと同様のシグナル値を示した (図 3-15)。不活性構造阻害剤と活性構造阻害剤とは判別可能であった。

次に ITK Mutant A-SHG2 が固定化表面で活性を保持していることを確認するため、ITK Mutant A-SHG2 を固定化した後に化合物を添加する試験を行った。アッセ

イの流れを図 3-2 に示した。まず、ITK Mutant A-SHG2 を低親和性 (ITK-KD に対する K_D 値 $1.3 \mu\text{M}$) の化合物Vとプレインキュベーションした。次にこのタンパク質/化合物混合物を Ni/NTA bilayer surface に添加して固定化し、結合しなかったタンパク質/化合物を洗い流し、高親和性の不活性構造阻害剤(化合物I (K_D 値 1.3nM)), 高親和性の活性阻害剤 (化合物X (K_D 値 3.5nM)) あるいはバッファーを添加した。化合物Iの添加により、SHG シグナルは24%減少し、より不活性構造にシフトしたことを示唆した (図 3-16)。化合物Xの添加により SHG シグナルは49%増加し、不活性構造から活性構造への転換を示した (図 3-16)。この変化は化合物をプレインキュベーションした時の結果 (図 3-15) と同様に、SHG シグナルは不活性構造で低く、活性構造で高かった。これらの結果から、固定化されたタンパク質は活性を保持していることが明らかとなった。バッファーを添加した場合には SHG シグナルは1.7%減少した (図 3-16)。

ハイスループットの SHG スクリーニング系を構築するため、ラベルタンパク質の濃度を低減する検討を行った。アッセイ系構築の初期には $5 \mu\text{M}$ ITK Mutant A-SHG2 と $20 \mu\text{M}$ の化合物を 1:1 で混和して、アッセイバッファーで 1:1 に希釈し、タンパク質の終濃度は $2.5 \mu\text{M}$ 、化合物の終濃度は $10 \mu\text{M}$ とした。化合物濃度は $10 \mu\text{M}$ としたままで、タンパク質濃度を 500nM あるいは 250nM に低減した。いずれのタンパク質濃度でも、活性構造化合物は同様の SHG シグナルを示し、不活性構造化合物である化合物Vの SHG シグナルの平均値 + 3SD ($5,300 \text{ cps}$) 以上であった (図 3-17)。この結果から、化合物評価試験のタンパク質濃度は 250nM (160 ng/ ウェル) とし、ツール化合物の中で最も親和性が弱い不活阻害剤である化合物Vのシ

グナルの平均値 + 3SD を不活性構造化合物と活性構造化合物を見分ける基準値とした。

6) SHG 法によるヒット化合物の選抜

最適化した条件で、SPR 試験のヒット化合物 (105 化合物) を評価した。最高濃度でコントロール化合物である化合物Vのシグナルの平均値 + 3SD (7,000 cps) 以上のシグナルを示した化合物は活性構造化合物, 7,000 cps 未満の化合物は不活性構造化合物と判断した (図 3-18)。105 化合物のうち, 22 化合物は不活性構造化合物であった。例として J-31 (ITK-FL に対する IC₅₀ 値 5.5 μM, FLT3 (D835Y) に対する IC₅₀ 値 >80 μM) と J-95 (ITK に対する IC₅₀ 値 3.3 μM, FLT3 (D835Y) に対する IC₅₀ 値 47 μM) を図 3-19 に示す。これらの化合物の SHG シグナルは化合物 I および化合物Vと同程度であったことから, 不活性阻害剤と考えられた。

7) SPR 法によるヒット化合物の結合部位の決定

ITK に対する J-13, J-31 および J-95 の結合部位を調べるため, Biacore を用いて, ADP との拮抗試験を行った。J-13 は ADP 添加, 非添加の両条件において, ITK-KD に結合を示した (図 3-20a-d)。J-13 のセンサーグラムを 1:1 結合モデルでキネティクス解析した (図 3-20a, c)。フィッティングは良好で, ADP 非存在下で k_a 値は $7.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, k_d 値は $1.4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, K_D 値は 1.8 μM, ADP 存在下で k_a 値は $2.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, k_d 値は $8.4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, K_D 値は 3.0 μM であった。J-13 は ADP 非存在下でも存在下でもアロステリックポケットに同様の K_D 値を示し, 顕著な協同性はみられなかった。J-31 と J-95 は ADP 非存在下で ITK に結合した (図 3-20e, f, h, i)。J-31 および J-95

の各化合物濃度の結合量のプロットを平衡値解析した (図 3-20f, i)。 K_D 値はそれぞれ $3.4 \mu\text{M}$ と $1.0 \mu\text{M}$ で、これらの化合物は ADP 存在下では ITK に結合しなかった (図 3-20g, j)。J-31 および J-95 は ATP 結合部位に結合し、不活性構造を安定化すると考えられた。

8) ヒット化合物のキナーゼ選択性

J-13, J-31 および J-95 のキナーゼ選択性を KINOMEscan (Eurofin) の競合法による結合試験で評価した。54 種類のキナーゼについて評価したところ、J-13 と J-31 は 1 種類のキナーゼのみ (それぞれ, NEK3, CLK1), J-95 は 2 種類のキナーゼ (HCK と LCK) を $>65\%$ で阻害し、良好な選択性を示した (表 3-2)。

第四節 考察

キナーゼの選択的阻害剤をデザインする場合、不活性構造は魅力のあるターゲットである。本研究においては、脱リン酸した ITK-FL を用いて、390,000 化合物に対してハイスループットの活性スクリーニングを実施した。ITK はアッセイ中に自己リン酸化によって活性化する。活性スクリーニングによって、ITK-FL に対して IC₅₀ 値が 10 μM 以下で、FLT3 (D835Y) に対して 5 倍の選択性を示した 259 化合物を選抜した。その後、SPR 法を用いて脱リン酸した ITK-KD に対する化合物の結合を評価した。次に蛍光バイオセンサーアッセイを構築し、ITK-KD を不活性構造に安定化する 34 化合物を選抜した。また SHG アッセイを構築し、ITK-KD を不活性構造に安定化する 22 化合物を選抜した。代表化合物の J-13 は ATP ポケット以外の部位に、また、J-31 および J-95 は ATP 結合部位に特異的に結合し、キナーゼパネル評価において高い選択性を示した。

PERK 阻害剤の GSK-2656157⁵⁹、CSF1R 阻害剤の GW-2580⁶⁰、BTK 阻害剤の CGI-1746⁶¹ のような、キナーゼの不活性構造に優先的に結合する阻害剤は高い選択性を示すとの報告がある。このような化合物を選抜するためにはタンパク質の構造変化を高速で検出する必要がある。今回、ITK の不活性構造を安定化する阻害剤を見出すため、液相中でタンパク質と化合物の相互作用を評価できる蛍光バイオセンサー法を用いた。構築した蛍光バイオセンサー法は 384 ウェルプレートを用いたハイスループットアッセイが可能で、良好な Z'-factor を示したことから、よりサイズの大きな化合物ライブラリーのスクリーニングに適応可能である。一方、蛍光バイオセンサー法の不利点は化合物の自家蛍光が検出に干渉することである。蛍光バイオセンサー法で化合物をスクリーニングした際、測定波長 508 nm と 456 nm の蛍

光強度の比が選抜基準値に満たなかった 70 化合物のうち 10 化合物は、アクリロダンの蛍光値より高い自家蛍光値を示した。これらの化合物では、タンパク質の構造変化による最大蛍光波長のシフトが、化合物の自家蛍光でマスクされた可能性がある。このようなケースでは、最大蛍光波長が赤色側にある蛍光分子を使用することで、化合物干渉の影響を小さくできる可能性がある⁶²。

これまでに 2 種類の ITK に対する高活性阻害剤についての論文報告がある。1 つ目は I 型阻害剤で、ITK の活性構造の ATP ポケットに結合することが明らかとなっている。2 つ目は ITK の不活性構造をターゲットとする阻害剤である。後者には、選択的な ITK 阻害剤の BMS-509744⁵³ と、ファイザー社の ATP 部位とアロステリックポケットの両方に結合する dual binder (Pfizer compound 9)⁵⁷ がある。他のキナーゼで報告のある DFG-out 構造をターゲットとする II 型阻害剤は、ITK では知られていない⁶³。不活性体の ITK の結晶構造 (PDB code: 3MJ2⁶⁴, 4M14⁵⁷, 4HCU⁶⁵) と、活性体の結晶構造 (PDB code: 4L7S⁶⁶, 4MF1⁶⁷, 4PQN⁶⁸) とを比較すると、不活性構造の ITK は、 α C-helix が触媒中心から外向きに回転していることがわかる。そこで α C-helix の動きが阻害剤選択性の重要な要素と考えた。ITK の α C-helix を蛍光分子のアクリロダンでラベルして、不活性構造阻害剤の結合を検出可能なキナーゼバイオセンサーを構築した。BMS-509744, Pfizer compound 9 と Pfizer compound 40 は最大蛍光波長を高波長側に変化させた (深色シフト)。この最大蛍光波長の高波長側へのシフトは、極性溶媒への露出の増大を示唆しており、これは α C-helix の外向きの回転と一致する。

タンパク質の構造変化を高速で検出する別の方法に SHG 法がある。SHG 法では、タンパク質に標識した蛍光団の角度変化を検出し、化合物の自家蛍光の影響を受け

にくい利点がある。一方、不利点は、タンパク質を固定化する必要があることと、専用の測定器が必要なことである。

蛍光バイオセンサーアッセイで使用した ITK-KD Mutant A を SHG アッセイでも使用した。SHG アッセイでは BMS-509744⁶⁴, Pfizer compound 9⁵⁷ および Pfizer compound 40⁶⁵ は低いシグナル値を示し, staurosporine, GSK compound 13⁶⁶, Genentech compound 19⁶⁷, Genentech GNE-9822⁶⁸ および Sanofi US compound⁶⁹ は高いシグナルを示した。これらの結果は、活性構造阻害剤が α C-helix-in 構造を誘導して、 α C-helix 上の SHG dye の向きを Z 軸に対して平行にしたことを示唆した。蛍光バイオセンサーアッセイと同様に、SHG アッセイによって不活性構造化合物と活性構造化合物を見分けることができた。このようにタンパク質の構造変化を検出できる蛍光バイオセンサーおよび SHG 法は、他のキナーゼ¹⁰ やホスファターゼ⁷⁰, 核内レセプター⁷¹ や GPCR¹¹ にも適用することができる。

ヒット化合物の SPR 結合評価と拮抗試験を実施することによって、J-13 が ADP に非拮抗であることを明らかにした。1:1 結合モデルに一致することと、結合試験で得られた Rmax が理論的 Rmax (固定化したタンパク質に 100% 結合活性があると仮定した場合の理論上の化合物の最大結合量) の 36 RU を越えないことから、J-13 は特異的なアロステリック阻害剤と考えられた。一方、J-31 と J-95 は ADP と拮抗したことから、ATP 結合部位に結合し、不活性構造を安定化すると考えられた。

54 キナーゼパネルでこれらのヒット化合物の選択性を評価したところ、良好な選択性を有することが明らかとなり、これらの化合物を合成展開の起点とすることができる。今後、ITK との複合体結晶構造が得られると、化合物が標的にどのように結合しているかについての理解を深めることができる。

このように、脱リン酸したキナーゼを用いた生化学アッセイ、SPR アッセイ、蛍光バイオセンサーアッセイおよび SHG アッセイを組み合わせることで、ITK を不活性構造に安定化する阻害剤を見出すことに成功した。本研究で示したプラットフォームは、キナーゼの選択的な阻害剤の取得に有用と考えられ、副作用の少ない抗癌剤などの開発に応用可能である。

表 3-1 ITK-FL と FLT3 (D835Y)に対する既知化合物の阻害活性

社名	阻害剤	IC ₅₀ (nM)	
		ITK-FL	FLT3 (D835Y)
BMS	BMS-509744	1.6 ± 0.035	>10,000
Pfizer	Compound 9	220 ± 26	>10,000
	Staurosporine	3.6 ± 0.55	0.61 ± 0.11

データは 3 回の実験の平均値と標準偏差を示す。

表 3-2 KINOMEscan を用いた J-13, J-31 および J-95 のキナーゼ選択性評価

DiscoveRx 遺伝子名	プローブ化合物の結合%		
	J-13	J-31	J-95
AKT1	90	100	85
ASK1	100	100	100
AURKB	87	80	96
BMPR1B	92	72	74
BRAF	46	88	100
BRK	100	100	100
CAMK1	79	84	86
CAMK2A	82	97	100
CDK2	88	90	100
CDKL2	100	100	100
CLK1	92	21	100
CSNK1D	85	79	98
DAPK3	76	98	96
DRAK2	88	100	100
DYRK2	100	68	100
EGFR	67	100	47
EPHA3	100	86	92
EPHB4	92	83	100
FES	100	89	100
FGFR1	93	95	80
GRK4	91	91	84
HCK	69	86	33
IKK-beta	100	63	100
IRAK4	100	79	87
JAK2 (JH1 domain-catalytic)	72	53	61
KIT	89	41	100
LCK	68	98	29
MAP4K5	100	95	99
MARK2	86	82	82
MAST1	88	47	90
MEK6	91	97	95

表 3-2 (続き) KINOMEScan を用いた J-13, J-31 および J-95 のキナーゼ選択性評価

DiscoverX 遺伝子名	プローブ化合物の結合%		
	J-13	J-31	J-95
MERTK	72	90	100
MRCKA	100	98	100
NEK3	10	63	79
p38-alpha	68	87	97
PAK4	87	100	94
PCTK1	93	84	98
PKAC-alpha	91	93	97
PKMYT1	100	93	96
PLK2	97	69	93
PRKCH	100	100	100
PRKD1	100	100	100
RSK1 (Kin.Dom.1-N-terminal)	98	92	99
RSK4 (Kin.Dom.2-C-terminal)	82	76	95
SGK3	98	72	90
SLK	74	100	100
SYK	95	100	61
TAOK1	89	100	91
TEC	99	100	86
TIE2	99	100	100
TRKC	89	100	97
TSSK1B	95	100	100
ULK1	81	75	97
YANK1	90	92	94

KINOMEScan の値は, J-13 (50 μ M) , J-31 (50 μ M) および J-95 (20 μ M) 存在下の各キナーゼに対するプローブ化合物の結合%を示す (プローブ結合%が<35%の場合, 結合阻害が>65%で, 阻害あり)。

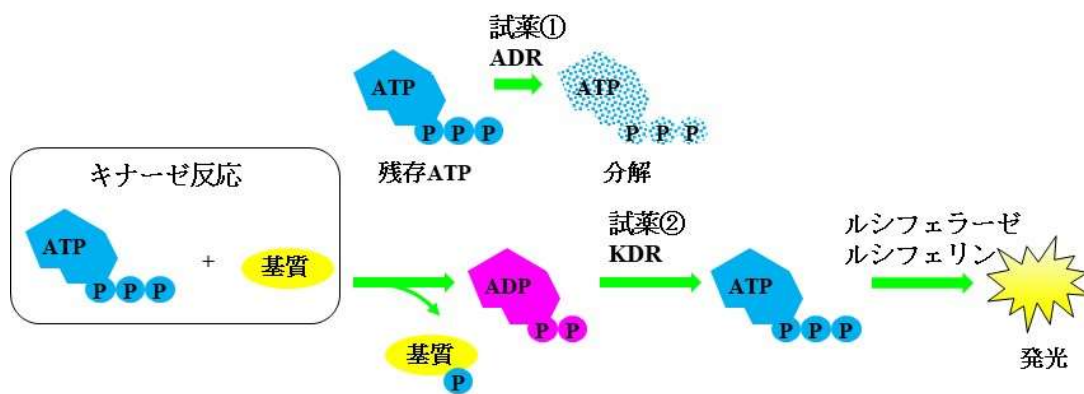


図 3-1 ADP-Glo キナーゼアッセイの原理 キナーゼ反応後に試薬① (ADR) を加えて残存 ATP を分解する。次に試薬② (KDR) を加えて ADP を ATP に変換し、ルシフェラーゼ/ルシフェリンによる発光を測定する。

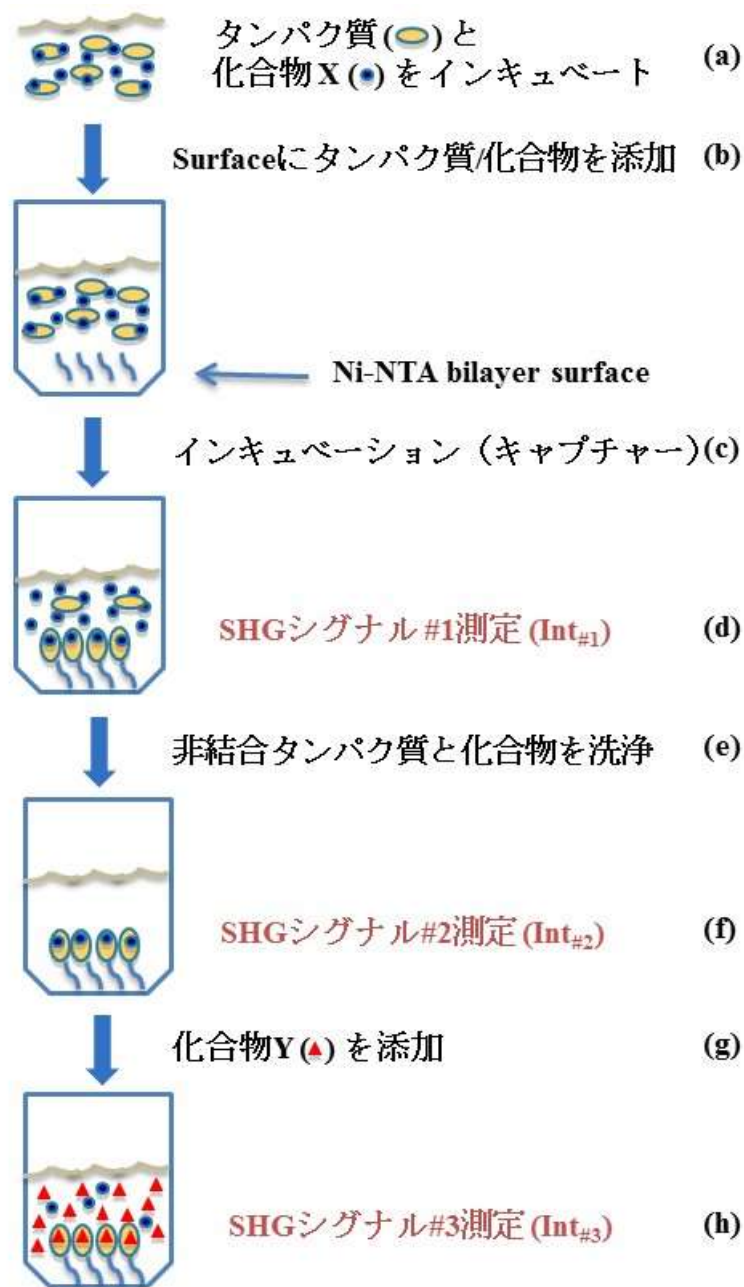


図 3-2 SHG アッセイの原理 (a) His タグを付加したラベルタンパク質を室温で化合物とインキュベーションし、平衡化した。(b) タンパク質/化合物混合液を 384 プレートの Ni-/NTA bilayer surface に添加した。(c) タンパク質/化合物を Ni-/NTA His₆ タグ相互作用でキャプチャーした。(d) SHG シグナルを測定した。(e) 非結合タンパク質/化合物を洗浄した。(f) SHG シグナルを測定した。(g) 次の化合物を添加した。(h) SHG シグナルの変化を測定した。

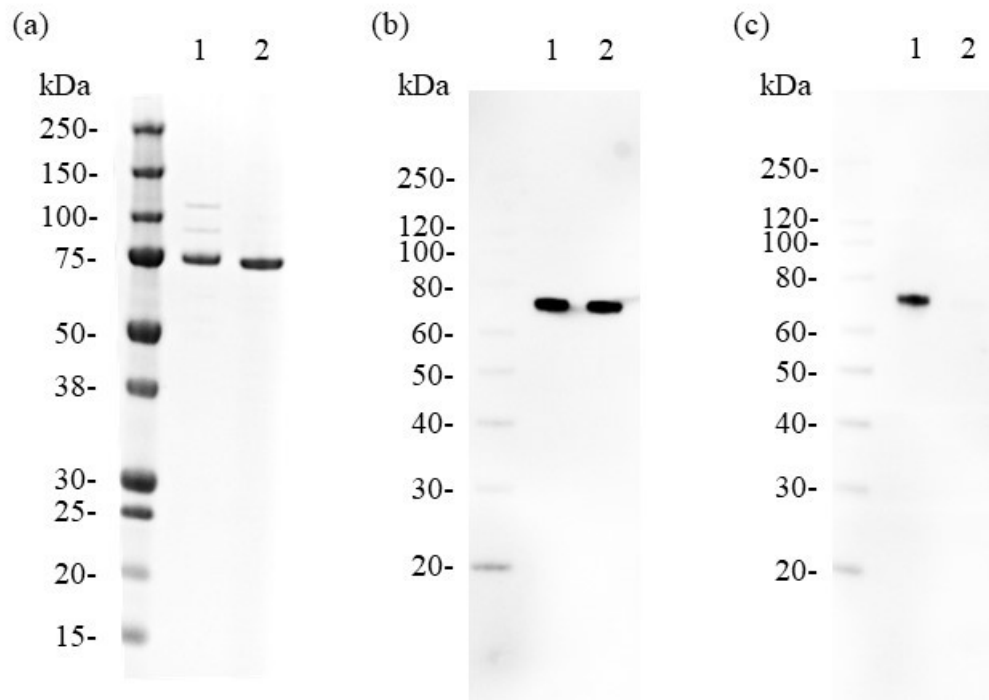


図 3-3 YopH と共発現した ITK-FL の精製 (a) YopH の共発現あり，なしの条件で Sf9 細胞を用いて発現した ITK-FL を精製した。精製 ITK-FL を SDS-PAGE に供し，CBB 染色した。(b) 精製した ITK-FL を，Flag タグに対する抗体を用いてウェスタンブロット解析した。(c) 精製した ITK-FL を，抗チロシンリン酸化抗体を用いてウェスタンブロット解析した。レーン 1: YopH の共発現なしで発現・精製した ITK-FL，レーン 2: YopH を共発現して発現・精製した ITK-FL

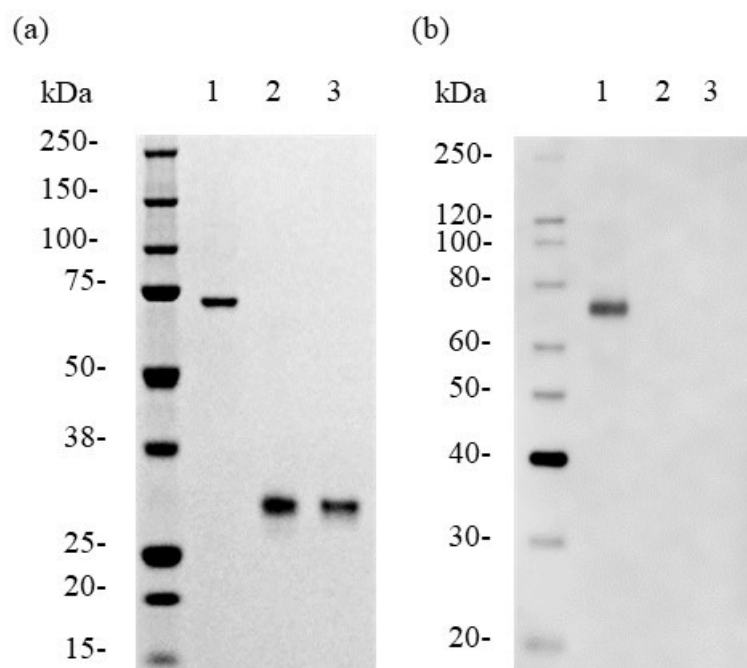


図 3-4 YopH と共発現した ITK-KD および ITK-KD Mutant A の精製
 (a) YopH の共発現あり,なしの条件で Sf9 細胞を用いて発現した ITK-KD および IKT-KD Mutant A を精製した。精製 ITK-KD および IKT-KD Mutant A を SDS-PAGE に供し, CBB 染色した。(b) 精製した ITK-KD および IKT-KD Mutant A を, 抗チロシンリン酸化抗体を用いてウェスタンブロット解析した。レーン 1: YopH の共発現なしで発現・精製した ITK-FL, レーン 2: YopH を共発現して発現・精製した ITK-KD, レーン 3: YopH を共発現して発現・精製した ITK-KD Mutant A

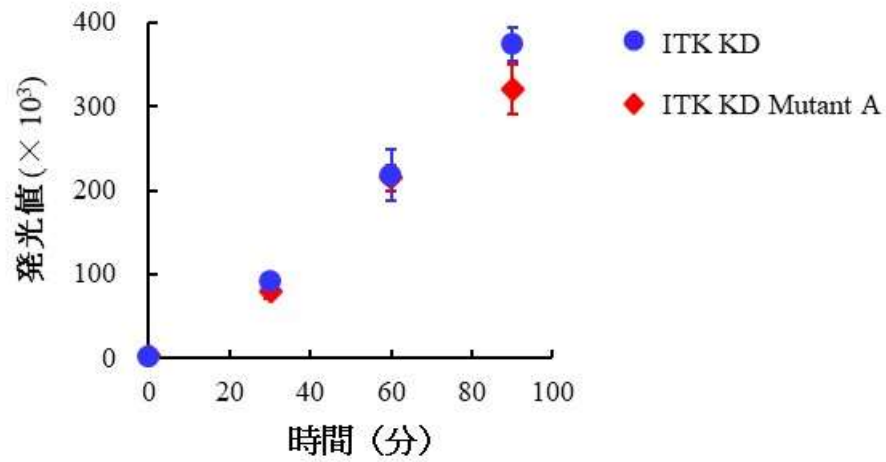


図 3-5 ITK-KD と ITK-KD Mutant A を用いたキナーゼ活性測定
ADP-Glo アッセイにて、ITK-KD あるいは ITK-KD Mutant A 濃度を 10 nM として、30, 60, 90 分インキュベーション後にキナーゼ活性を測定した。データは triplicate の平均値と標準偏差を示す。

HTSヒット選抜フロー

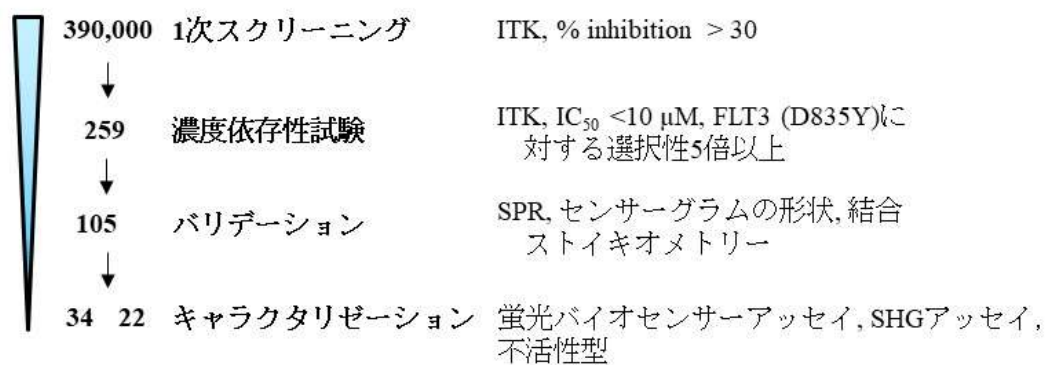


図 3-6 ITK 阻害剤探索のための HTS の概要

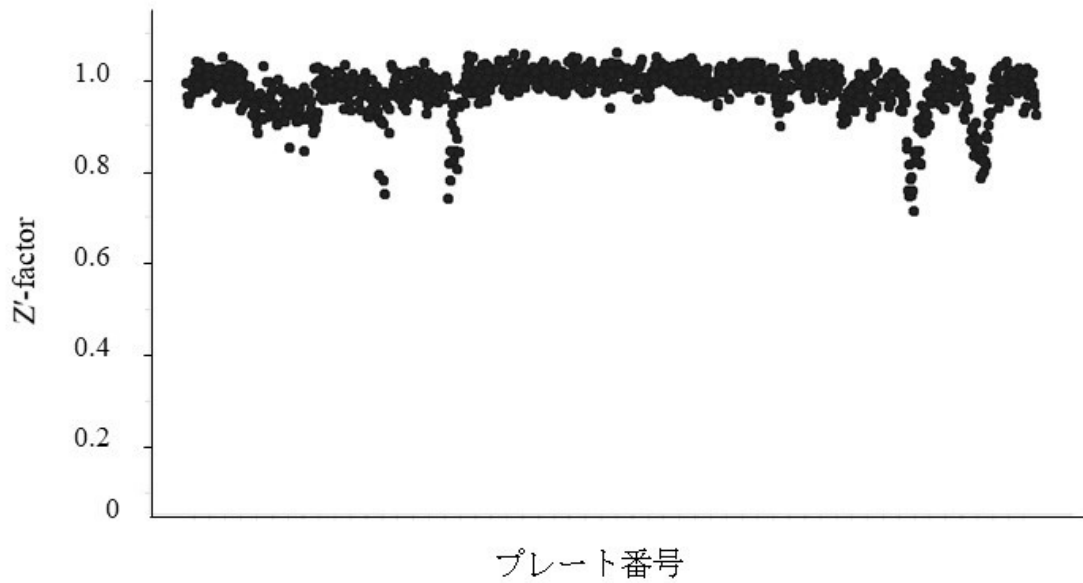


図 3-7 ITK 1 次スクリーニングの Z'-factor 各プレート 12 ウェルの DMSO コントロールと 12 ウェルの酵素非添加コントロールウェルの値を用いて Z'-factor を算出した。

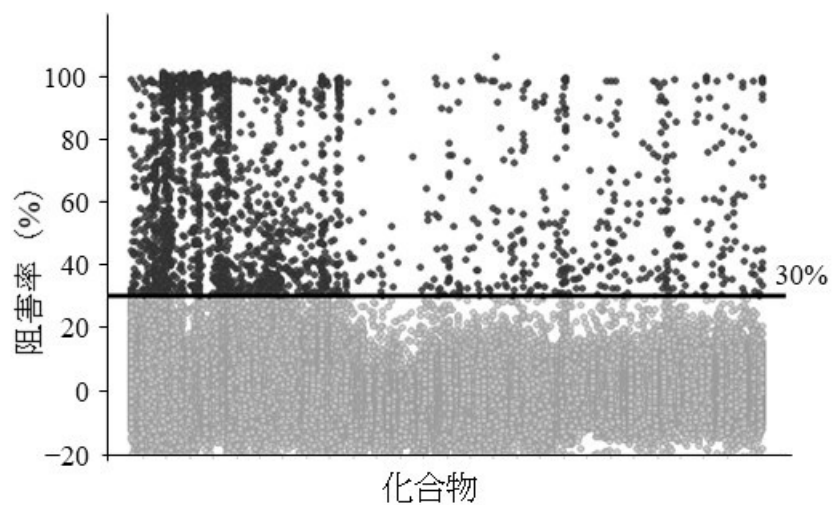


図 3-8 1 次スクリーニングにおける化合物の ITK 阻害活性分布
ADP-Glo アッセイにて、化合物濃度を 10 μ M とし、39 万化合物
のスクリーニングを実施した。阻害率 30%以上の化合物をヒッ
ト選抜した。

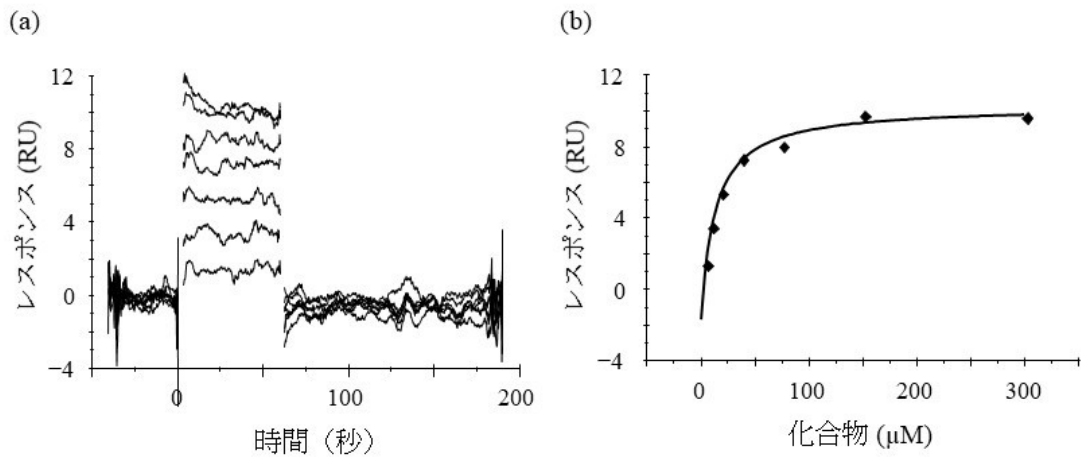


図 3-9 固定化した ITK-KD に対する ADP の結合 (a) ITK-KD に ADP (4.7, 9.4, 19, 38, 75, 150, 300 μM) を添加した際のレスポンスを示す。 (b) ADP の濃度 (横軸) とレスポンス (縦軸) のプロットを示す。

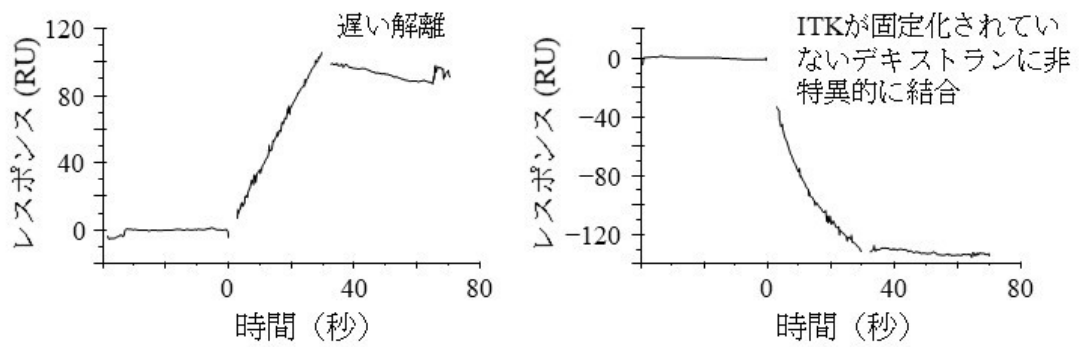


図3-10 SPR アッセイで排除した化合物センサーグラムの場合 ITK-KD に化合物 (20 μ M) を添加した際のレスポンスを示す。

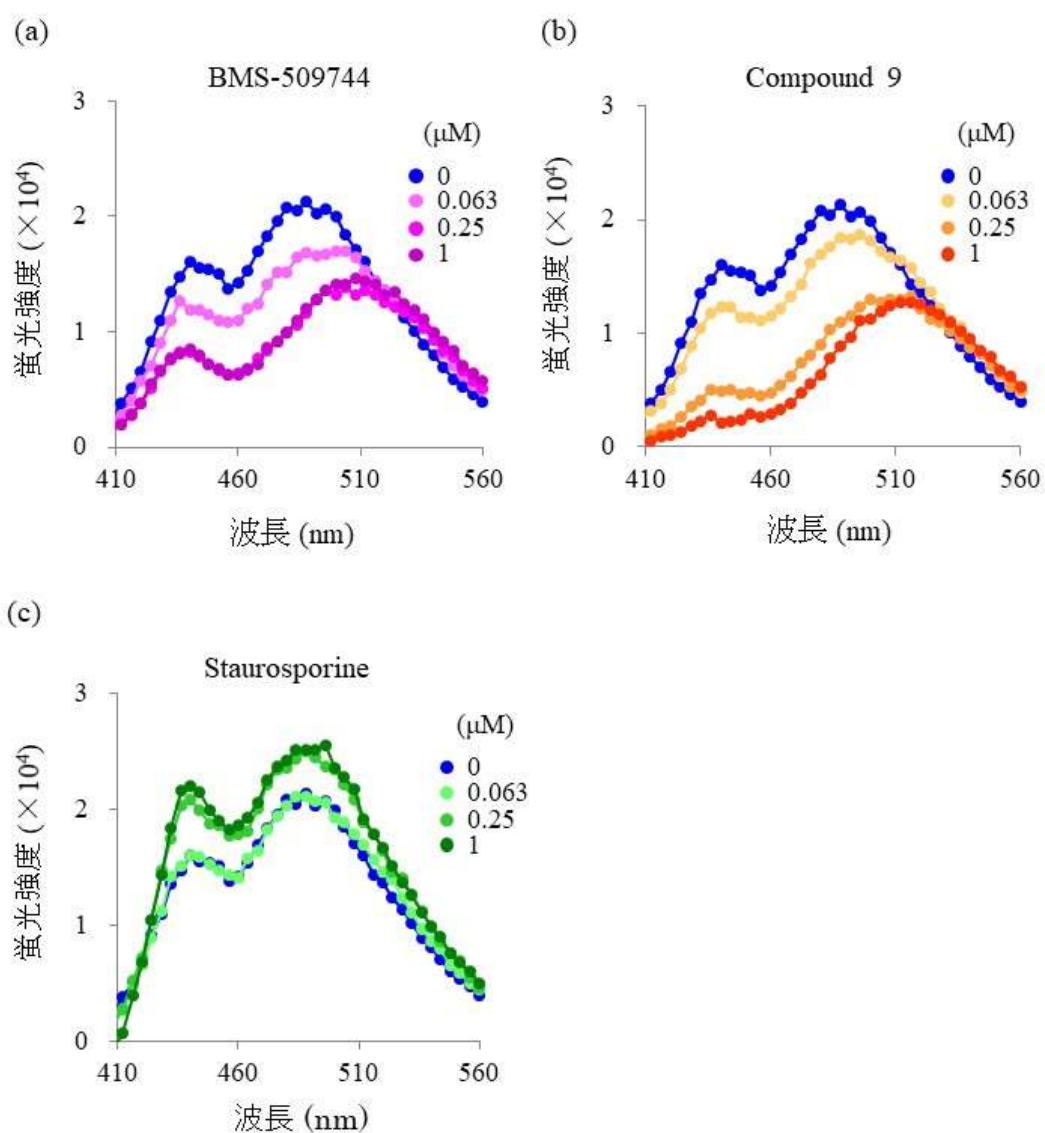


図 3-11 蛍光標識 ITK-KD Mutant A を用いた蛍光バイオセンサー評価
 蛍光標識 ITK-KD Mutant A 濃度を 200 nM とし, (a) BMS-509744, (b)
 Compound 9, (c) staurosporine (化合物濃度はそれぞれ 0.063, 0.25, 1 μM)
 と混和して, 15 分インキュベーション後に蛍光スペクトルを測定した。

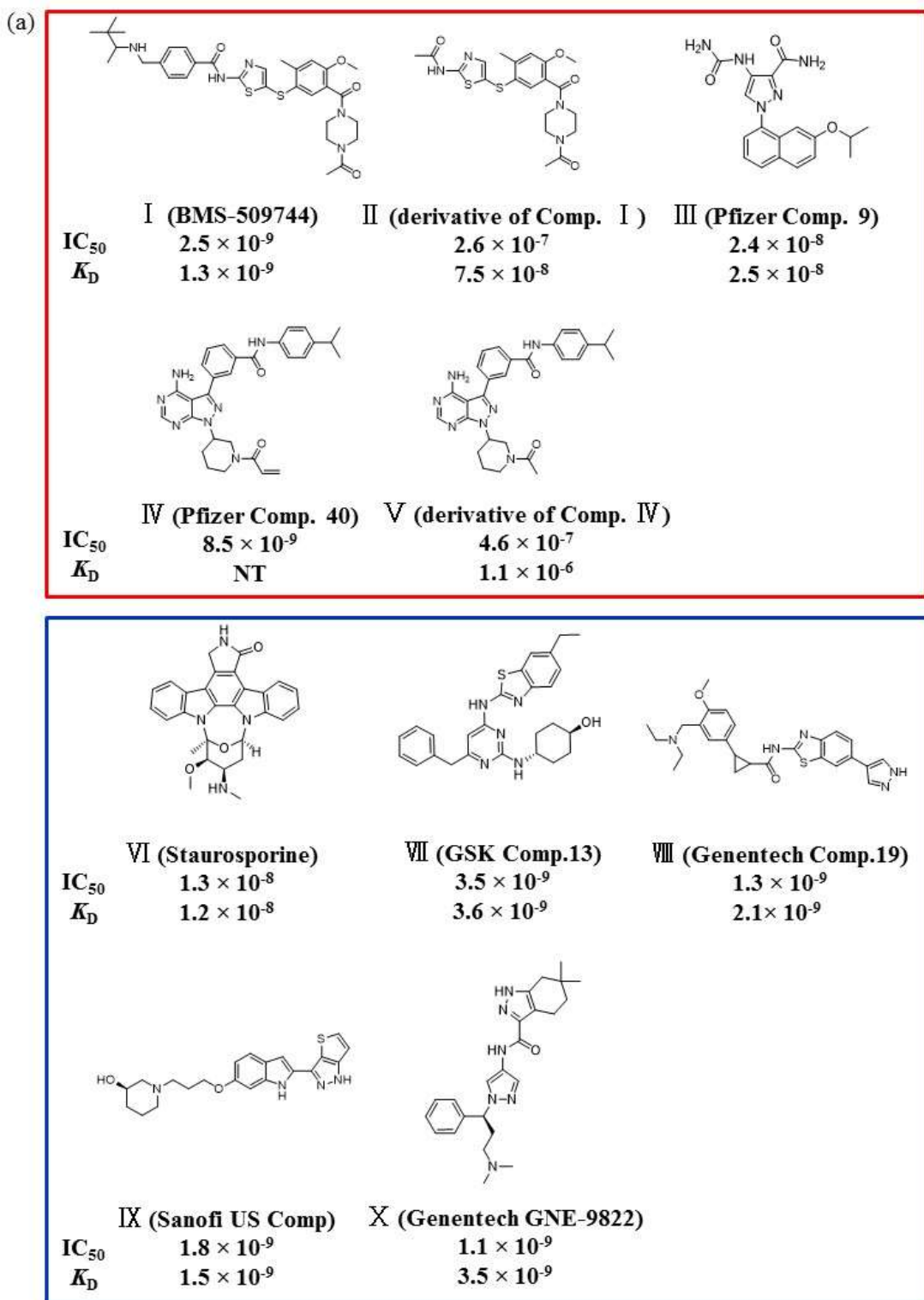


図 3-12 次ページの説明文を参照

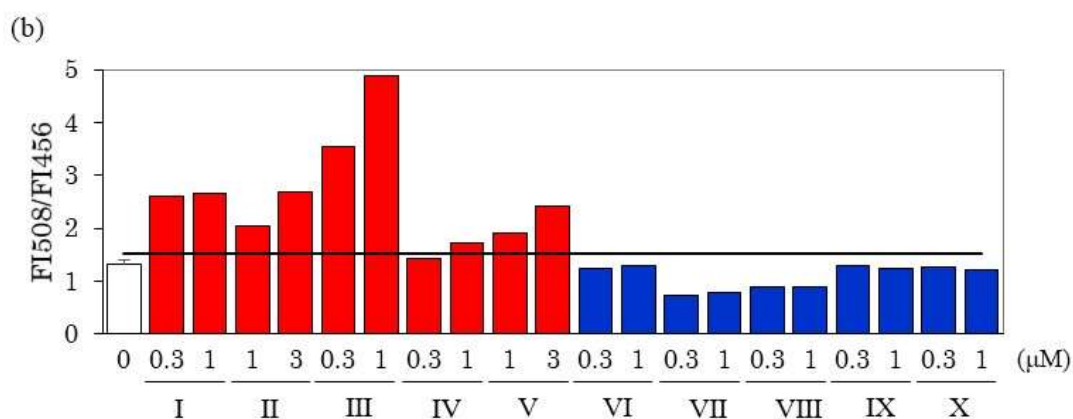


図 3-12 蛍光バイオセンサー法によるツール化合物の評価 (a) ツール化合物の化学構造，阻害活性と親和性を示す。化合物IIは化合物Iの溶媒露出部位を除いた化合物である。化合物Vは化合物IVのアクリロイル基をアセチル基に変換し，共有結合性をなくした化合物である。(b) 蛍光標識 ITK-KD Mutant A 濃度を 200 nM とし，ツール化合物と混和し，15 分インキュベーション後に蛍光測定を行った。508 nm と 456 nm の蛍光強度の比を示す。データは，DMSO コントロールは triplicate の平均値と標準偏差，それ以外は singleton の値を示す。化合物I-Vは不活性型阻害剤，化合物VI-Xは活性型阻害剤である。黒線は DMSO コントロール（化合物非添加）の平均値 + 3SD を示す。

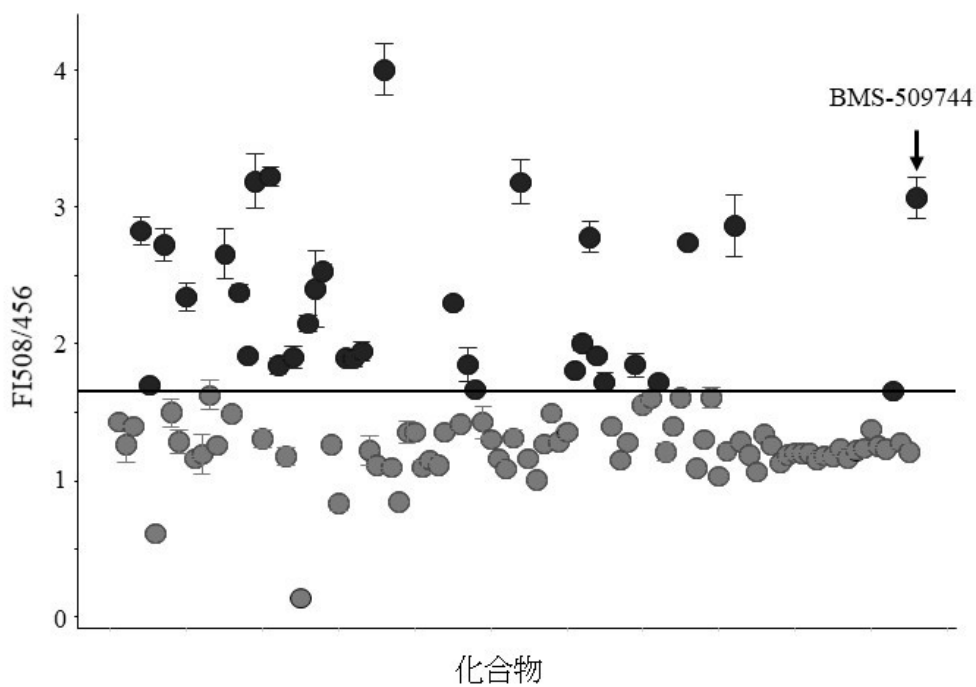


図 3-13 蛍光バイオセンサー法による化合物評価 蛍光標識 ITK-KD Mutant A 濃度を 200 nM とし、化合物 (化合物濃度 4 あるいは 40 μ M) と混和し、15 分インキュベーション後に蛍光測定を行った。508 nm と 456 nm の蛍光強度の比を示す。データは triplicate の平均値と標準偏差を示す。蛍光強度の比が DMSO コントロール (化合物非添加) + 3SD の 1.65 以上の化合物をヒット選抜した。

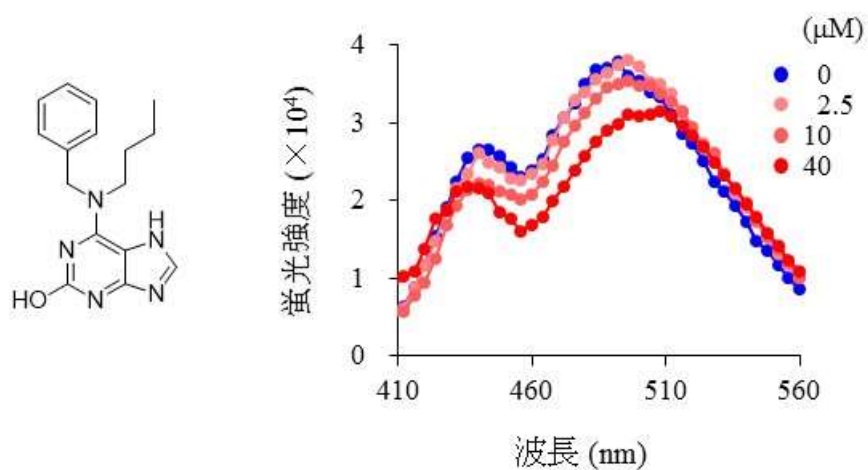


図 3-14 J-13 の化学構造と蛍光スペクトル 化合物濃度は 2.5, 10, 40 μM として蛍光標識 ITK-KD Mutant A (200 nM) と混和し, 15 分インキュベーション後に蛍光スペクトルを測定した。

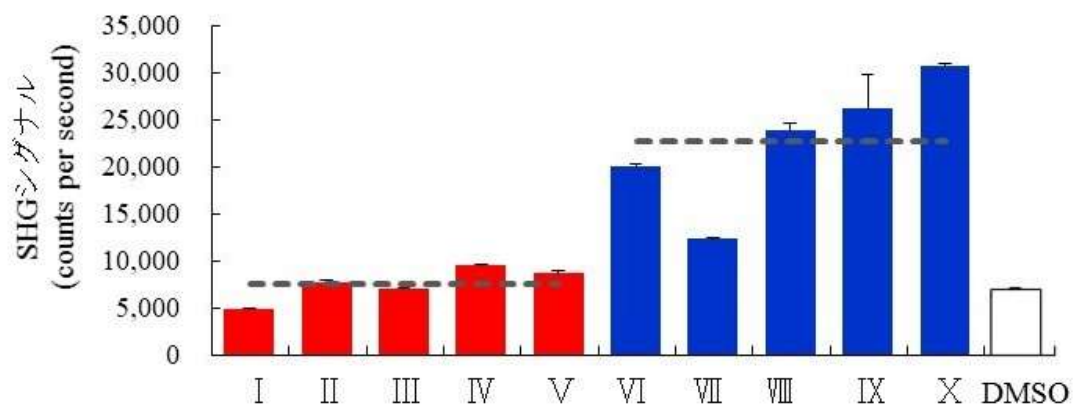


図 3-15 SHG 法によるツール化合物の評価 蛍光標識 ITK-KD Mutant A 濃度を $2.5 \mu\text{M}$ とし，ツール化合物 ($10 \mu\text{M}$) と混和し，プレートに添加してキャプチャーのため 90 分インキュベーションした後，SHG シグナルの測定を行った。化合物 I-V は不活性型阻害剤，化合物 VI-X は活性型阻害剤である。データは duplicate の平均値と標準偏差を示す。破線はそれぞれ不活性型化合物と活性型化合物の SHG シグナルの平均値を示す。

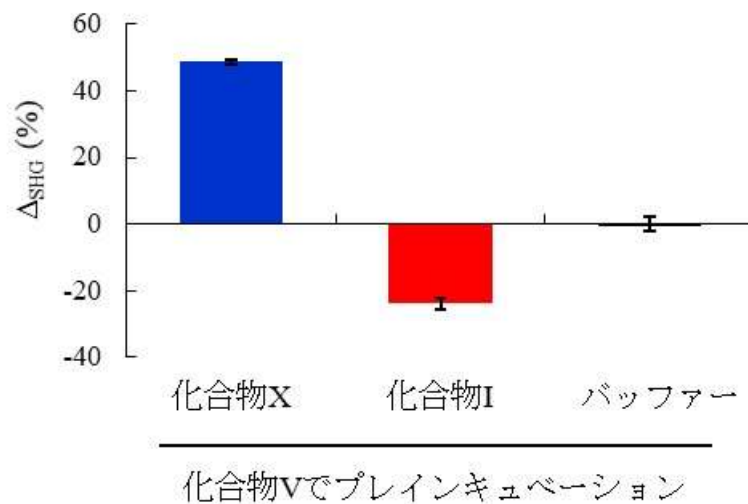


図 3-16 プレート表面に固定化した蛍光標識 ITK-KD Mutant A の構造的可変性 蛍光標識 ITK-KD Mutant A 濃度を 2.5 μM とし，不活性型化合物の化合物V (10 μM) とプレインキュベーションした。次に Ni/NTA bilayer surface に固定化し，非結合タンパク質/化合物を洗浄した後に SHG シグナルを測定し，活性型化合物の化合物X (10 μM) ，不活性型化合物の化合物I (10 μM) あるいはバッファーを固定化表面に添加して，SHG シグナルを測定した。各化合物の SHG シグナルの変化率を算出して示した。データは duplicate の平均値と標準偏差を示す。

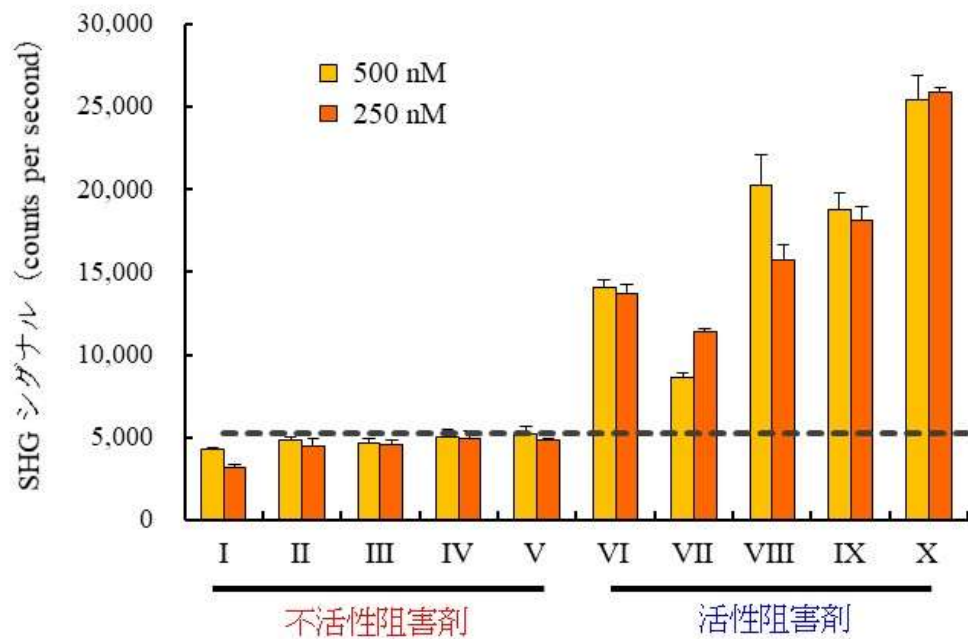


図 3-17 蛍光標識 ITK-KD Mutant A の濃度を低減したときの SHG シグナル 蛍光標識 ITK-KD Mutant A 濃度を 250 nM あるいは 500 nM とし、化合物 10 μ M を添加してキャプチャーのため 90 分インキュベーションした後、SHG シグナルの測定を行った。化合物 I-V は不活性型阻害剤、化合物 VI-X は活性型阻害剤である。データは triplicate の平均値と標準偏差を示す。破線は 250 nM の蛍光標識 ITK-KD Mutant A に化合物 V を添加したときの SHG シグナルの平均値 + 3SD を示す。

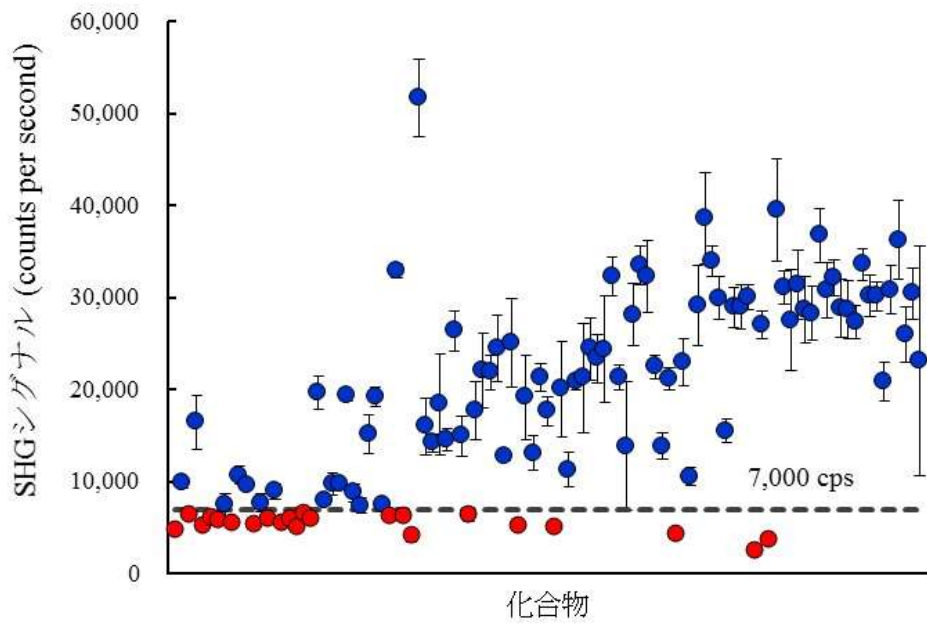


図 3-18 SHG 法による化合物評価 蛍光標識 ITK-KD Mutant A 濃度を 250 nM とし，化合物（化合物濃度 5 あるいは 40 μ M）とプレートに添加してキャプチャーのため 90 分インキュベーションした後，SHG シグナルの測定を行った。データは triplicate の平均値と標準偏差を示す。SHG シグナルが化合物Vのシグナルの平均値 + 3SD（7,000 cps）以下の化合物をヒット選抜した。

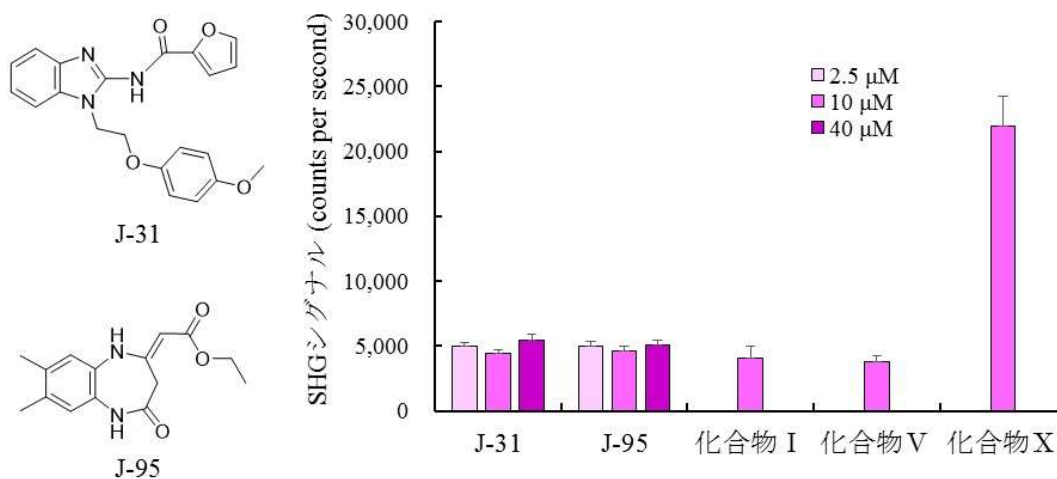
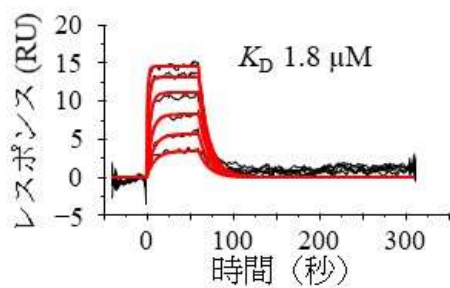
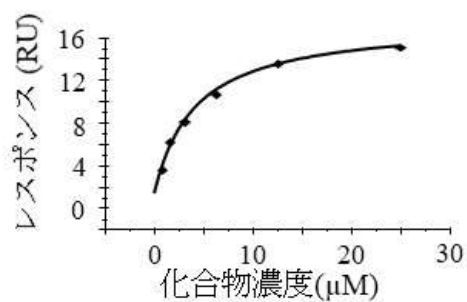


図 3-19 J-31 と J-95 の化学構造と SHG シグナル 化合物濃度は 2.5, 10, 40 μM として蛍光標識 ITK-KD Mutant A (250 nM) と混和し, プレートに添加してキャプチャーのため 90 分インキュベーションした後, SHG シグナルの測定を行った。データは triplicate の平均値と標準偏差を示す。化合物 I および V は不活性型阻害剤, 化合物 X は活性型阻害剤である。

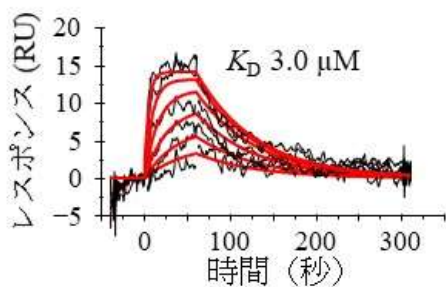
(a) J-13 ADP非存在下



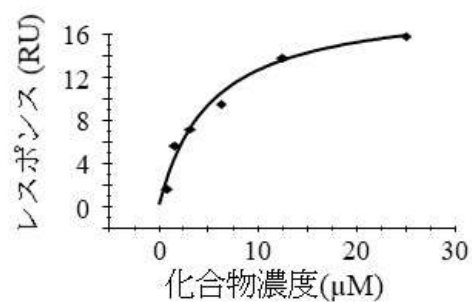
(b)



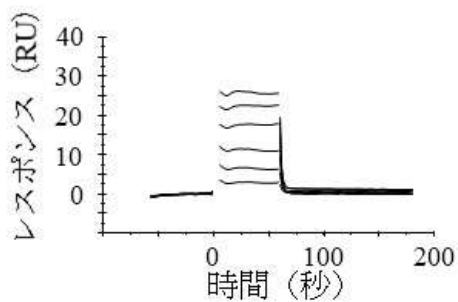
(c) J-13 ADP存在下



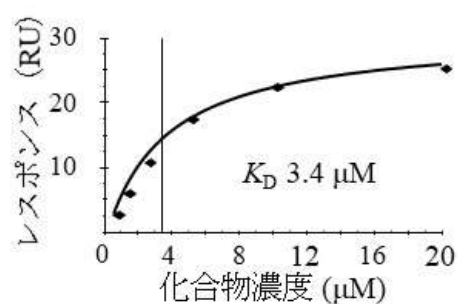
(d)



(e) J-31 ADP非存在下



(f)



(g) J-31 ADP存在下

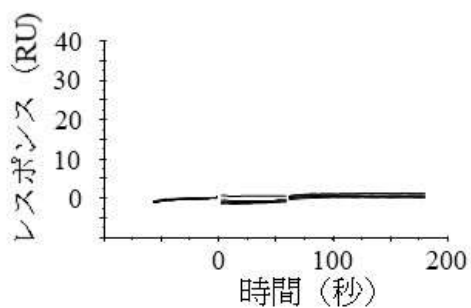


図 3-20 次ページの説明文を参照

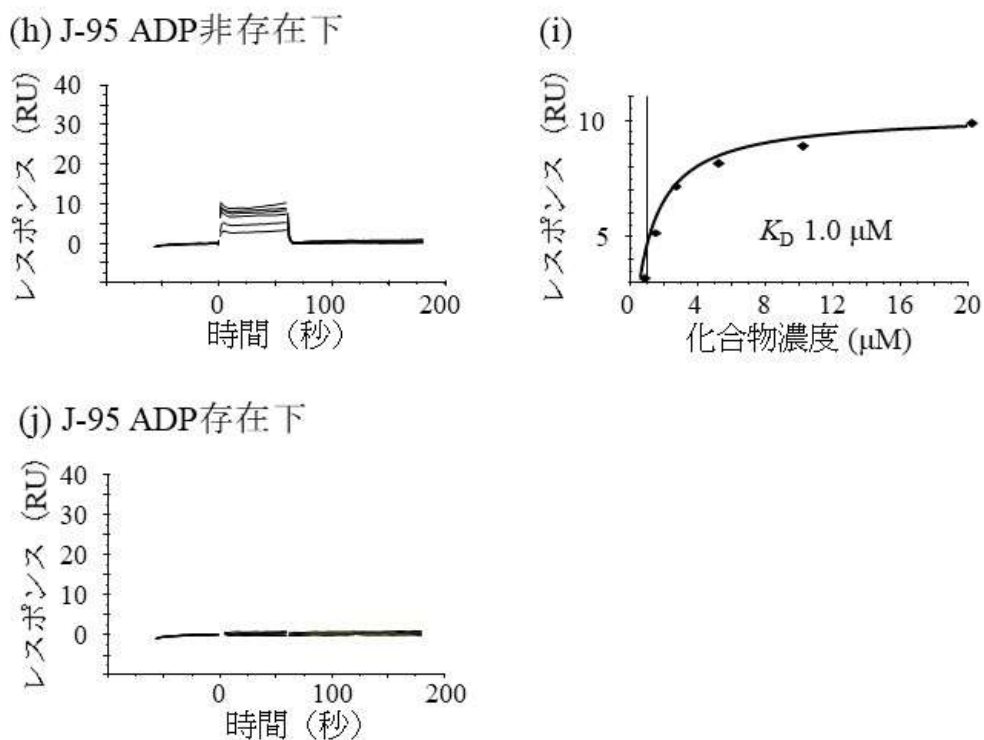


図 3-20 固定化した ITK-KD に対する化合物の結合 (a) ITK-KD に J-13 (0.78, 1.6, 3.1, 6.3, 13, 25 μM) を添加した際のレスポンス (黒線) と理論曲線 (赤線) を示す。 (b) J-13 の濃度 (横軸) とレスポンス (縦軸) のプロットを示す。 (c) 1 mM ADP 存在下で ITK-KD に J-13 (0.78, 1.6, 3.1, 6.3, 13, 25 μM) を添加した際のレスポンス (黒線) と理論曲線 (赤線) を示す。 (d) J-13 の濃度 (横軸) と 1 mM ADP 存在下のレスポンス (縦軸) のプロットを示す。 (e) ITK-KD に J-31 (0.63, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μM) を添加した際のレスポンスを示す。 (f) J-31 の濃度 (横軸) とレスポンス (縦軸) のプロットを示す。 (g) 1 mM ADP 存在下で ITK-KD に J-31 (0.63, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μM) を添加した際のレスポンスを示す。 (h) ITK-KD に J-95 (0.63, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μM) を添加した際のレスポンスを示す。 (i) J-95 の濃度 (横軸) とレスポンス (縦軸) のプロットを示す。 (j) 1 mM ADP 存在下で ITK-KD に J-95 (0.63, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μM) を添加した際のレスポンスを示す。

総括

創薬において、HTS は化合物探索の主要な方法の一つである。HTS が開始された当初には、96 ウェルプレートを用いて数万化合物をスクリーニングした後に、合成展開を行っていたが、化合物数が増えるにつれ、アッセイの微量化や自動化が行われるようになった。スクリーニングに標識した材料を用いるようになり、これに干渉する化合物を除くために、カウンタースクリーニングが実施されるようになった。また、hit to lead の成功確率を上げるため、ヒット化合物の質に注目が集まるようになった。特に水溶液中でコロイド状の凝集体を形成してターゲット分子を阻害する promiscuous binder は、化合物とタンパク質の性質やアッセイ条件に依存して作用するため、生化学アッセイでは排除が難しい。これらを除くため、生物物理手法を用いた結合プロファイルが重要で、SPR 法は他の系に比較してサンプル消費量が少なく、スループットが高いためによく用いられる。SPR 評価によって、ターゲット分子に対する化合物の結合比や結合の可逆性等の情報を得て、良質なリード候補化合物を見出すことが HTS キャンペーン成功の鍵となる。本論文においては、2つのターゲットタンパク質、PLTP および ITK に対する HTS において、SPR による結合プロファイルを導入し、良質なヒット化合物選抜法の確立に貢献した。また、年々創薬の難易度が高まる中で、より選択性の高い化合物を取得するためにターゲット分子の構造に着目した評価を行う等の工夫が求められる。そこで、ITK を不活性構造に安定化する化合物を取得するため、蛍光バイオセンサー評価と SHG 評価を行った。

第一章では PLTP に対する HTS を実施し、ヒット化合物の SPR 評価を実施した。PLTP は血中で VLDL から HDL へリン脂質を転送するタンパク質で、脂質異常症やアテローム性動脈硬化治療のターゲットである。1次スクリーニングには、タン

パク質が多く含まれ、*promiscuous binder* の排除に効果的と考えられる血漿を用い、蛍光法で阻害活性評価を行った。自家蛍光化合物を排除する目的で実施した RI 試験のヒット化合物の **compound 1** と **2** は、HepG2 細胞において apoB 分泌を阻害した。今回新たに確立した SPR 評価を用いて、**compound 1** と **2** は精製 PLTP に 1:1 結合することを明らかとした。これまで PLTP に対する低分子化合物の SPR 評価報告はなく、PLTP の阻害剤探索に有用な手法と考えられる。

過去には、生化学アッセイの阻害の強さのみで HTS ヒットとして選抜された化合物が合成展開により活性向上に至らないケースもあり、化合物の標的分子に対する飽和性結合が重要と考えられる。SPR 結合評価においてはタンパク質をセンサーチップに固定化する必要があり、低分子化合物の結合を検出するため、アミンカップリング等でタンパク質の固定化量を上げる試みがなされてきたが、この場合、タンパク質は固定化時に酸性溶液にさらされるため、失活する可能性がある。そこで本研究では、新たに PLTP の結合評価系を構築するにあたり、タンパク質を生産する段階で PLTP とビオチンリガーゼとを共発現し、部位特異的にビオチン化を行った。ビオチン化タンパク質は中性条件のままセンサーチップに固定化可能であり、SPR 評価系構築の確率を上げることができる。

第二章においては、ITK に対する HTS を実施し、HTS フローのより早い段階でヒット化合物の SPR 評価を行った。ITK は Th2 細胞のシグナル伝達や Th17 細胞の分化、IL-17A の産生に重要な役割を果たすキナーゼで、阻害剤は炎症および自己免疫疾患の治療薬となることが期待される。キナーゼの触媒部位は構造類似性が高いことから、ITK の不活性構造をターゲットとした。1 次スクリーニングでは脱リン酸した ITK-FL を用いて HTS を実施した。ITK-FL に対して IC₅₀ 値が 10 μ M 以下

で、FLT3 (D835Y)に対して 5 倍の選択性を示す化合物を選抜した。その後、SPR 法を用いて脱リン酸した ITK-KD に対する化合物の結合性評価を行い、promiscuous binder を排除した。

生物物理手法による化合物の飽和性結合の確認は HTS ヒット探索ストラテジーにおいて重要と考えられるが、選抜化合物の全てが promiscuous binder で、ヒット化合物が残らないケースもある。そこで HTS の成功確率を高めるために、HTS フローのより早期に SPR 試験を実施する必要があると考えられ、ITK に対する HTS においては、生化学アッセイの選択性試験後に SPR 評価を行った。多数の化合物を評価するにあたっては、まず、濃度 1 点で結合評価を行って挙動の悪い化合物を排除し、次に、結合が認められない、あるいは親和性の弱い化合物を除いてから濃度依存性試験を行い、ヒット選抜過程を効率化した。

次に、蛍光バイオセンサーおよび SHG 法を用いて ITK の不活性構造を安定化する化合物を選抜した。SHG 法では通常、蛍光標識タンパク質をプレートにキャプチャーし、非結合タンパク質を洗い流した後に、化合物の結合を検出するが、ITK は安定性が低く、検討初期にはアッセイの間に失活して、構造変化が検出できなかった。SPR 法も、センサーチップに固定化した標的分子に対して、多数の化合物の結合を長時間モニターすることから、不安定なタンパク質の活性保持が課題となる。活性を保持する方法の一つに化合物存在下でタンパク質を固定化する方法があり、今回、これを SHG 法に適用することで、ITK の構造変化検出系を確立することができた。

生物物理手法にて、分子認識して標的タンパク質に結合することが確認された化合物は、hit to lead の合成展開の成功確率が高い。今回、PLTP については、通常の

HTS では用いない血漿を酵素源とした HTS を行い、さらに SPR 結合評価を実施して、短期間に高質な医薬品候補化合物を見出すことに成功した。また、ITK については、精製酵素を用いた HTS に、SPR 結合評価とタンパク質の構造変化検出系を組み入れることで、高選択的で高質な医薬品候補化合物を見出すことに成功した。

PLTP と ITK の SPR を導入したヒット選抜法は、生化学アッセイのみの HTS に比較して、タンパク質を凝集させる化合物や、化合物本体以外の金属等の不純物を選抜してしまうリスクを回避できるメリットがある。また、生物物理手法によってのみ可能な構造変化検出技術を用いると、タンパク質の動きに着目した化合物探索が可能となり、これまで取得できなかった化合物を選抜可能となる。選択性の観点からも構造変化を誘起する化合物の探索は今後益々増えると考えられる。

本研究によって得られた PLTP と ITK のヒット選抜法の知見が、様々な創薬ターゲットに対する HTS ヒット探索ストラテジーの構築と治療薬の開発につながることを期待する。

参考文献

1. Mayr, L. M.; Fuerst, P. The future of high-throughput screening. *Journal of Biomolecular Screening* **2008**, *13*, 443-8.
2. Pereira, D. A.; Williams, J. A. Origin and evolution of high throughput screening. *British Journal of Pharmacology* **2007**, *152*, 53-61.
3. Shoichet, B. K. Screening in a spirit haunted world. *Drug Discovery Today* **2006**, *11*, 607-15.
4. McGovern, S. L.; Caselli, E.; Grigorieff, N.; Shoichet, B. K. A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 1712-22.
5. McGovern, S. L.; Helfand, B. T.; Feng, B.; Shoichet, B. K. A specific mechanism of nonspecific inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 4265-72.
6. Jönsson, U.; Fägerstam, L.; Ivarsson, B.; Johnsson, B.; Karlsson, R.; Lundh, K.; Löfås, S.; Persson, B.; Roos, H.; Rönnberg, I. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *BioTechniques* **1991**, *11*, 620-7.
7. Karlsson, R. SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas. *Journal of Molecular Recognition* **2004**, *17*, 151-61.

8. Giannetti, A. M.; Koch, B. D.; Browner, M. F. Surface plasmon resonance based assay for the detection and characterization of promiscuous inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 574-80.
9. Simard, J. R.; Grütter, C.; Pawar, V.; Aust, B.; Wolf, A.; Rabiller, M.; Wulfert, S.; Robubi, A.; Klüter, S.; Ottmann, C.; Rauh, D. High-throughput screening to identify inhibitors which stabilize inactive kinase conformations in p38alpha. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 18478-88.
10. Simard, J. R.; Rauh, D. FLiK: a direct-binding assay for the identification and kinetic characterization of stabilizers of inactive kinase conformations. *Methods in Enzymology* **2014**, *548*, 147-71.
11. Cohen, B. E.; Pralle, A.; Yao, X.; Swaminath, G.; Gandhi, C. S.; Jan, Y. N.; Kobilka, B. K.; Isacoff, E. Y.; Jan, L. Y. A fluorescent probe designed for studying protein conformational change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 965-70.
12. Hibbs, R. E.; Talley, T. T.; Taylor, P. Acrylodan-conjugated cysteine side chains reveal conformational state and ligand site locations of the acetylcholine-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 28483-91.
13. Salafsky, J. S. Detection of protein conformational change by optical second-harmonic generation. *Journal of Chemical Physics* **2006**, *125*, 074701.

14. Moree, B.; Connell, K.; Mortensen, R. B.; Liu, C. T.; Benkovic, S. J.; Salafsky, J. Protein conformational changes are detected and resolved site specifically by second-harmonic generation. *Biophysical Journal* **2015**, *109*, 806-15.
15. Butko, M. T.; Moree, B.; Mortensen, R. B.; Salafsky, J. Detection of ligand-induced conformational changes in oligonucleotides by second-harmonic generation at a supported lipid bilayer interface. *Analytical Chemistry* **2016**, *88*, 10482-189.
16. Hendrani, A. D.; Adesiyun, T.; Quispe, R.; Jones, S. R.; Stone, N. J.; Blumenthal, R. S.; Martin, S. S. Dyslipidemia management in primary prevention of cardiovascular disease: Current guidelines and strategies. *World Journal of Cardiology* **2016**, *8*, 201-10.
17. Ohashi, R.; Mu, H.; Wang, X.; Yao, Q.; Chen, C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM : Monthly Journal of the Association of Physicians* **2005**, *98*, 845-56.
18. Yazdanyar, A.; Yeang, C.; Jiang, X. C. Role of phospholipid transfer protein in high-density lipoprotein- mediated reverse cholesterol transport. *Current Atherosclerosis Reports* **2011**, *13*, 242-8.
19. Jiang, X. C. Phospholipid transfer protein: its impact on lipoprotein homeostasis and atherosclerosis. *Journal of Lipid Research* **2018**, *59*, 764-71.
20. Tu, A. Y.; Albers, J. J. Glucose regulates the transcription of human genes relevant to HDL metabolism: responsive elements for peroxisome

- proliferator-activated receptor are involved in the regulation of phospholipid transfer protein. *Diabetes* **2001**, *50*, 1851-6.
21. Urizar, N. L.; Dowhan, D. H.; Moore, D. D. The farnesoid X-activated receptor mediates bile acid activation of phospholipid transfer protein gene expression. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 39313-7.
 22. Cao, G.; Beyer, T. P.; Yang, X. P.; Schmidt, R. J.; Zhang, Y.; Bensch, W. R.; Kauffman, R. F.; Gao, H.; Ryan, T. P.; Liang, Y.; Eacho, P. I.; Jiang, X. C. Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 39561-5.
 23. Mak, P. A.; Kast-Woelbern, H. R.; Anisfeld, A. M.; Edwards, P. A. Identification of PLTP as an LXR target gene and apoE as an FXR target gene reveals overlapping targets for the two nuclear receptors. *Journal of Lipid Research* **2002**, *43*, 2037-41.
 24. Okazaki, H.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S.; Liang, G. LXR-SREBP-1c-phospholipid transfer protein axis controls very low density lipoprotein (VLDL) particle size. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 6801-10.
 25. Riemens, S. C.; van Tol, A.; Sluiter, W. J.; Dullaart, R. P. Plasma phospholipid transfer protein activity is related to insulin resistance: impaired acute lowering by insulin in obese type II diabetic patients. *Diabetologia* **1998**, *41*, 929-34.

26. de Vries, R.; Dallinga-Thie, G. M.; Smit, A. J.; Wolffenbuttel, B. H.; van Tol, A.; Dullaart, R. P. Elevated plasma phospholipid transfer protein activity is a determinant of carotid intima-media thickness in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* **2006**, *49*, 398-404.
27. Jiang, X. C.; Jin, W.; Hussain, M. M. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on lipoprotein metabolism. *Nutrition & Metabolism* **2012**, *9*, 75.
28. Jiang, X. C.; Qin, S.; Qiao, C.; Kawano, K.; Lin, M.; Skold, A.; Xiao, X.; Tall, A. R. Apolipoprotein B secretion and atherosclerosis are decreased in mice with phospholipid-transfer protein deficiency. *Nature Medicine* **2001**, *7*, 847-52.
29. Yang, X. P.; Yan, D.; Qiao, C.; Liu, R. J.; Chen, J. G.; Li, J.; Schneider, M.; Lagrost, L.; Xiao, X.; Jiang, X. C. Increased atherosclerotic lesions in apoE mice with plasma phospholipid transfer protein overexpression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2003**, *23*, 1601-7.
30. Luo, Y.; Shelly, L.; Sand, T.; Reidich, B.; Chang, G.; Macdougall, M.; Peakman, M. C.; Jiang, X. C. Pharmacologic inhibition of phospholipid transfer protein activity reduces apolipoprotein-B secretion from hepatocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2010**, *332*, 1100-6.
31. Okamoto, H.; Iwamoto, Y.; Maki, M. Sotani, T.; Yonemori, F.; Wakitani, K. Effect of JTT-705 on cholesteryl ester transfer protein and plasma lipid levels

- in normolipidemic animals. *European Journal of Pharmacology* **2003**, *466*, 147-54.
32. Zhang, J. H.; Chung, T. D.; Oldenburg, K. R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Journal of Biomolecular Screening* **1999**, *4*, 67-73.
33. Meex, S. J.; Andreo, U.; Sparks, J. D.; Fisher, E. A. Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion? *Journal of Lipid Research* **2011**, *52*, 152-8.
34. Rader, D. J.; Tall, A. R. The not-so-simple HDL story: Is it time to revise the HDL cholesterol hypothesis? *Nature Medicine* **2012**, *18*, 1344-6.
35. Tariq, S. M.; Sidhu, M. S.; Toth, P. P.; Boden, W. E. HDL hypothesis: where do we stand now? *Current Atherosclerosis Reports* **2014**, *16*, 398.
36. Shelly, L.; Royer, L.; Sand, T.; Jensen, H.; Luo, Y. Phospholipid transfer protein deficiency ameliorates diet-induced hypercholesterolemia and inflammation in mice. *Journal of Lipid Research* **2008**, *49*, 773-81.
37. Brehm, A.; Geraghty, P.; Campos, M.; Garcia-Arcos, I.; Dabo, A. J., Gaffney, A.; Eden, E.; Jiang, X. C.; D'Armiento, J.; Foronjy, R. Cathepsin G degradation of phospholipid transfer protein (PLTP) augments pulmonary inflammation. *FASEB Journal* **2014**, *28*, 2318-31.
38. Yu, Y.; Cui, Y.; Zhao, Y.; Liu, S.; Song, G.; Jiao, P.; Li, B.; Luo, T.; Guo, S.; Zhang, X.; Wang, H.; Jiang, X. C.; Qin, S. The binding capability of plasma

- phospholipid transfer protein, but not HDL pool size, is critical to repress LPS induced inflammation. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 20845.
39. Audo, R.; Deckert, V.; Daien, C. I.; Che, H.; Elhmioui, J.; Lemaire, S.; Pais de Barros, J. P.; Desrumaux, C.; Combe, B.; Hahne, M.; Lagrost, L.; Morel, J. PhosphoLipid transfer protein (PLTP) exerts a direct pro-inflammatory effect on rheumatoid arthritis (RA) fibroblasts-like-synoviocytes (FLS) independently of its lipid transfer activity. *PloS One* **2018**, *13*, e0193815.
40. Hogarth, C. A.; Roy, A.; Ebert, D. L. Genomic evidence for the absence of a functional cholesteryl ester transfer protein gene in mice and rats. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* **2003**, *135*, 219-29.
41. Kaur, M.; Bahia, M. S.; Silakari, O. Inhibitors of interleukin-2 inducible T-cell kinase as potential therapeutic candidates for the treatment of various inflammatory disease conditions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2012**, *47*, 574-88.
42. Gomez-Rodriguez, J.; Kraus, Z. J.; Schwartzberg, P. L. Tec family kinases Itk and Rlk/Txk in T lymphocytes: cross-regulation of cytokine production and T-cell fates. *FEBS Journal* **2011**, *278*, 1980-9.
43. Bryan, M. C.; Rajapaksa, N. S. Kinase inhibitors for the treatment of immunological disorders: recent advances. *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *61*, 9030-58.

44. Knighton, D. R.; Zheng, J. H.; Ten Eyck, L. F.; Ashford, V. A.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **1991**, *253*, 407-14.
45. Karaman, M. W.; Herrgard, S.; Treiber, D. K.; Gallant, P.; Atteridge, C. E.; Campbell, B. T.; Chan, K. W.; Ciceri, P.; Davis, M. I.; Edeen, P. T., Faraoni, R.; Floyd, M.; Hunt, J. P.; Lockhart, D. J.; Milanov, Z. V.; Morrison, M. J.; Patel, H. K.; Pritchard, S.; Wodicka, L. M., Zarrinkar, P. P. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnology* **2008**, *26*, 127-32.
46. Kornev, A. P.; Haste, N. M.; Taylor, S. S.; Eyck, L. F. Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 17783-8.
47. Vijayan, R. S.; He, P.; Modi, V.; Duong-Ly, K. C.; Ma, H.; Peterson, J. R.; Dunbrack, R. L. Jr.; Levy, R. M. Conformational analysis of the DFG-out kinase motif and biochemical profiling of structurally validated type II inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58*, 466-79.
48. Imamura, M.; Kumagai, K.; Nakano, H.; Okabe, T.; Nagano, T.; Kojima, H. Inexpensive high-throughput screening of kinase inhibitors using one-step enzyme-coupled fluorescence assay for ADP detection. *SLAS Discovery* **2019**, *24*, 284-94.

49. Ahmad, S.; St Hilaire, V. R.; Dandepally, S. R.; Johnson, G. L.; Williams, A. L.; Scott, J. E. Discovery and characterization of an iminocoumarin scaffold as an inhibitor of MEKK2 (MAP3K2). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2018**, *496*, 205-11.
50. Lebakken, C. S.; Riddle, S. M.; Singh, U.; Frazee, W. J.; Eliason, H. C.; Gao, Y.; Reichling, L. J.; Marks, B. D.; Vogel, K. W. Development and applications of a broad-coverage, TR-FRET-based kinase binding assay platform. *Journal of Biomolecular Screening* **2009**, *14*, 924-35.
51. Wang, W.; Krosky, D.; Ahn, K. Discovery of inactive conformation-selective kinase inhibitors by utilizing cascade assays. *Biochemistry* **2017**, *56*, 4449-56.
52. Hantani, Y.; Iio, K.; Hantani, R.; Umetani, K.; Sato, T.; Young, T.; Connell, K.; Kintz, S.; Salafsky, J. Identification of inactive conformation-selective interleukin-2-inducible T-cell kinase (ITK) inhibitors based on second-harmonic generation. *FEBS Open Bio* **2018**, *8*, 1412-23.
53. Lin, T. A.; McIntyre, K. W.; Das, J.; Liu, C.; O'Day, K. D.; Penhallow, B.; Hung C. Y.; Whitney, G. S.; Shuster, D. J.; Yang, X.; Townsend, R.; Postelnek, J.; Spergel, S. H.; Lin, J.; Moquin, R. V.; Furch, J. A.; Kamath, A. V.; Zhang, H.; Marathe, P. H.; Perez-Villar, J. J.; Doweiko, A.; Killar, L.; Dodd, J. H.; Barrish, J. C.; Wityak, J.; Kanner, S. B. Selective Itk inhibitors block T-cell activation and murine lung inflammation. *Biochemistry* **2004**, *43*, 11056-62.

54. Zegzouti, H.; Zdanovskaia, M.; Hsiao, K.; Goueli, S. A. ADP-Glo: A bioluminescent and homogeneous ADP monitoring assay for kinases. *Assay and Drug Development Technologies* **2009**, *7*, 560-72.
55. Charrier, J. D.; Miller, A.; Kay, D. P.; Brenchley, G.; Twin, H. C.; Collier, P. N.; Ramaya, S.; Keily, S. B.; Durrant, S. J.; Knegt, R. M.; Tanner, A. J.; Brown, K.; Curnock, A. P.; Jimenez, J. M. Discovery and structure-activity relationship of 3-aminopyrid-2-ones as potent and selective interleukin-2 inducible T-cell kinase (Itk) inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 2341-50.
56. Pastor, R. M.; Burch, J. D.; Magnuson, S.; Ortwine, D. F.; Chen, Y.; De La Torre, K.; Ding, X.; Eigenbrot, C.; Johnson, A.; Liimatta, M.; Liu, Y.; Shia, S.; Wang, X.; Wu, L. C.; Pei, Z. Discovery and optimization of indazoles as potent and selective interleukin-2 inducible T cell kinase (ITK) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24*, 2448-52.
57. Han, S.; Czerwinski, R. M.; Caspers, N. L.; Limburg, D. C.; Ding, W.; Wang, H.; Ohren, J. F.; Rajamohan, F.; McLellan, T. J.; Unwalla, R.; Choi, C.; Parikh, M. D.; Seth, N.; Edmonds, J.; Phillips, C.; Shakya, S.; Li, X.; Spaulding, V.; Hughes, S.; Cook, A.; Robinson, C.; Mathias, J. P.; Navratilova, I.; Medley, Q. G.; Anderson, D. R.; Kurumbail, R. G.; Aulabaugh, A. Selectively targeting an inactive conformation of interleukin-2-inducible T-cell kinase by allosteric inhibitors. *Biochemical Journal* **2014**, *460*, 211-22.

58. Navratilova, I.; Macdonald, G.; Robinson, C.; Hughes, S.; Mathias, J.; Phillips, C.; Cook, A. Biosensor-based approach to the identification of protein kinase ligands with dual-site modes of action. *Journal of Biomolecular Screening* **2012**, *17*, 183-93.
59. Axten, J. M.; Romeril, S. P.; Shu, A.; Ralph, J.; Medina, J. R.; Feng, Y.; Li, W. H.; Grant, S. W.; Heerding, D. A.; Minthorn, E.; Mencken, T.; Gaul, N.; Goetz, A.; Stanley, T.; Hassell, A. M.; Gampe, R. T.; Atkins, C.; Kumar, R. Discovery of GSK2656157: An optimized PERK inhibitor selected for preclinical development. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *4*, 964-8.
60. Uitdehaag, J. C.; Sünnen, C. M.; van Doornmalen, A. M.; de Rouw, N.; Oubrie, A.; Azevedo, R.; Ziebell, M.; Nickbarg, E.; Karstens, W. J.; Ruygrok, S. Multidimensional profiling of CSF1R screening hits and inhibitors: assessing cellular activity, target residence time, and selectivity in a higher throughput way. *Journal of Biomolecular Screening* **2011**, *16*, 1007-17.
61. Di Paolo, J. A.; Huang, T.; Balazs, M.; Barbosa, J.; Barck, K. H.; Bravo, B. J.; Carano, R. A.; Darrow, J.; Davies, D. R.; DeForge, L. E.; Diehl, L.; Ferrando, R.; Gallion, S. L.; Giannetti, A. M.; Gribbling, P.; Hurez, V.; Hymowitz, S. G.; Jones, R.; Kropf, J. E.; Lee, W. P.; Maciejewski, P. M.; Mitchell, S. A.; Rong, H.; Staker, B. L.; Whitney, J. A.; Yeh, S.; Young, W. B.; Yu, C.; Zhang, J.; Reif, K.; Currie, K. S. Specific Btk inhibition suppresses B cell- and myeloid cell-mediated arthritis. *Nature Chemical Biology* **2011**, *7*, 41-50.

62. Schneider, R.; Gohla, A.; Simard, J. R.; Yadav, D. B.; Fang, Z.; van Otterlo, W. A.; Rauh, D. Overcoming compound fluorescence in the FLiK screening assay with red-shifted fluorophores. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 8400-8.
63. Bamborough, P.; Brown, M. J.; Christopher, J. A.; Chung, C. W.; Mellor, G. W. Selectivity of kinase inhibitor fragments. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 5131-43.
64. Kutach, A. K.; Villaseñor, A. G.; Lam, D.; Belunis, C.; Janson, C.; Lok, S.; Hong, L. N.; Liu, C. M.; Deval, J.; Novak, T. J.; Barnett, J. W.; Chu, W.; Shaw, D.; Kuglstatter, A. Crystal structures of IL-2-inducible T cell kinase complexed with inhibitors: insights into rational drug design and activity regulation. *Chemical Biology & Drug Design* **2010**, *76*, 154-63.
65. Zapf, C. W.; Gerstenberger, B. S.; Xing, L.; Limburg, D. C.; Anderson, D. R.; Caspers, N.; Han, S.; Aulabaugh, A.; Kurumbail, R.; Shakya, S.; Li, X.; Spaulding, V.; Czerwinski, R. M.; Seth, N.; Medley, Q. G. Covalent inhibitors of interleukin-2 inducible T cell kinase (Itk) with nanomolar potency in a whole-blood assay. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 10047-63.
66. Alder, C. M.; Ambler, M.; Campbell, A. J.; Champigny, A. C.; Deakin, A. M.; Harling, J. D.; Harris, C. A.; Longstaff, T.; Lynn, S.; Maxwell, A. C.; Mooney, C. J.; Scullion, C.; Singh, O. M.; Smith, I. E.; Somers, D. O.; Tame, C. J.; Wayne, G.; Wilson, C.; Woolven, J. M. Identification of a novel and

- selective series of Itk inhibitors *via* a template-hopping strategy. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *4*, 948-52.
67. MacKinnon, C. H.; Lau, K.; Burch, J. D.; Chen, Y.; Dines, J.; Ding, X.; Eigenbrot, C.; Heifetz, A.; Jaochico, A.; Johnson, A.; Kraemer, J.; Kruger, S.; Krülle, T. M.; Liimatta, M.; Ly, J.; Maghames, R.; Montalbetti, C. A.; Ortwine, D. F.; Pérez-Fuertes, Y.; Shia, S.; Stein, D. B.; Trani, G.; Vaidya, D.; G.; Wang, X.; Bromidge, S. M.; Wu, L. C.; Pei, Z. Structure-based design and synthesis of potent benzothiazole inhibitors of interleukin-2 inducible T cell kinase (ITK). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 6331-5.
68. Burch, J. D.; Lau, K.; Barker, J. J.; Brookfield, F.; Chen, Y.; Chen, Y.; Eigenbrot, C.; Ellebrandt, C.; Ismaili, M. H.; Johnson, A.; Kordt, D.; MacKinnon, C. H.; McEwan, P. A.; Ortwine, D. F.; Stein, D. B.; Wang, X.; Winkler, D.; Yuen, P. W.; Zhang, Y.; Zarrin, A. A.; Pei, Z. Property- and structure-guided discovery of a tetrahydroindazole series of interleukin-2 inducible T-cell kinase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57*, 5714-27.
69. McLean, L.; Zhang, Y.; Zaidi, N.; Bi, X.; Wang, R.; Dharanipragada, R.; Jurcak, J. G.; Gillespy, T. A.; Zhao, Z.; Musick, K. Y.; Choi, Y. M.; Barrague, M.; Peppard, J.; Smicker, M.; Duguid, M.; Parkar, A.; Fordham, J.; Kominos, D. X-ray crystallographic structure-based design of selective thienopyrazole

inhibitors for interleukin-2-inducible tyrosine kinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 3296-300.

70. Schneider, R.; Beumer, C.; Simard, J. R.; Grütter, C.; Rauh, D. Selective detection of allosteric phosphatase inhibitors. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 6838-41.
71. Mayer-Wrangowski, S. C.; Rauh, D. Monitoring ligand-induced conformational changes for the identification of estrogen receptor agonists and antagonists. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2015**, *54*, 4379-82.

謝辞

本論文の作成にあたり、終始懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました筑波大学生命環境系 繁森英幸教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、御指導ならびに御助言を賜りました筑波大学生命環境系 山田小須弥准教授, 春原由香里准教授, 宮前友策准教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究の機会を与えていただきました日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所長 大川滋紀博士, 同生物研究所所長 松下睦佳博士, 同生物研副所長 松崎裕児博士に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多大なご協力をいただきました日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 生物研究所 判谷吉嗣博士, 高橋裕博士 (現 東京大学), 曾谷智裕研究員, 塙紗也研究員, 大家祥平博士, 梅谷佳代研究員, 佐藤俊宏研究員, 化学研究所 飯尾清誠博士, Biodesy, Inc. Dr. Tracy Young (現 Amunix Pharmaceuticals, Inc.), Dr. Katelyn Connell, Dr. Sam Kintz (現 EnLiven Therapeutics), Dr. Joshua Salafsky (現 University of California, San Francisco) に深く感謝致します。

最後に、本論文の作成を常に励ましてくれた家族に感謝します。

論文リスト

- 1) Hantani R.; Hanawa S.; Oie S.; Umetani K.; Sato T.; Hantani Y. Identification of a new inhibitor that stabilizes interleukin-2-inducible T-cell kinase in its inactive conformation. *SLAS Discovery* **2019**, *24*, 854-62.
- 2) Hantani R.; Takahashi Y.; Sotani T.; Hantani Y. Identification of novel phospholipid transfer protein inhibitors by high-throughput screening. *SLAS Discovery* **2019**, *24*, 579-86
- 3) Hantani Y.; Iio K.; Hantani R.; Umetani K.; Sato T.; Young T.; Connell K.; Kintz S.; Salafsky J. Identification of inactive conformation-selective interleukin-2-inducible T-cell kinase (ITK) inhibitors based on second-harmonic generation. *FEBS Open Bio* **2018**, *8*, 1412-23.