

生細胞を使わず、 薬剤の細胞内での効果を 簡便に評価する技術

甲南大学 先端生命工学研究所 (FIBER)
准教授 建石 寿枝

2023年3月2日

ハイスループットスクリーニング (HTS) による医薬品の創製

High-throughput screening (HTS) assay: 特定の標的に対する生物学的調節因子を、大量にスクリーニングする方法。

新薬の承認までの一般的なスケジュールは10年以上かかる。



すでに別の疾患に対して、臨床段階または米国食品医薬品局 (FDA) が承認した化合物ライブラリーの中から標的の疾患に作用する化合物を見つける (repositioningする)

研究例) SARS-CoV-2(重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2)の医薬品開発

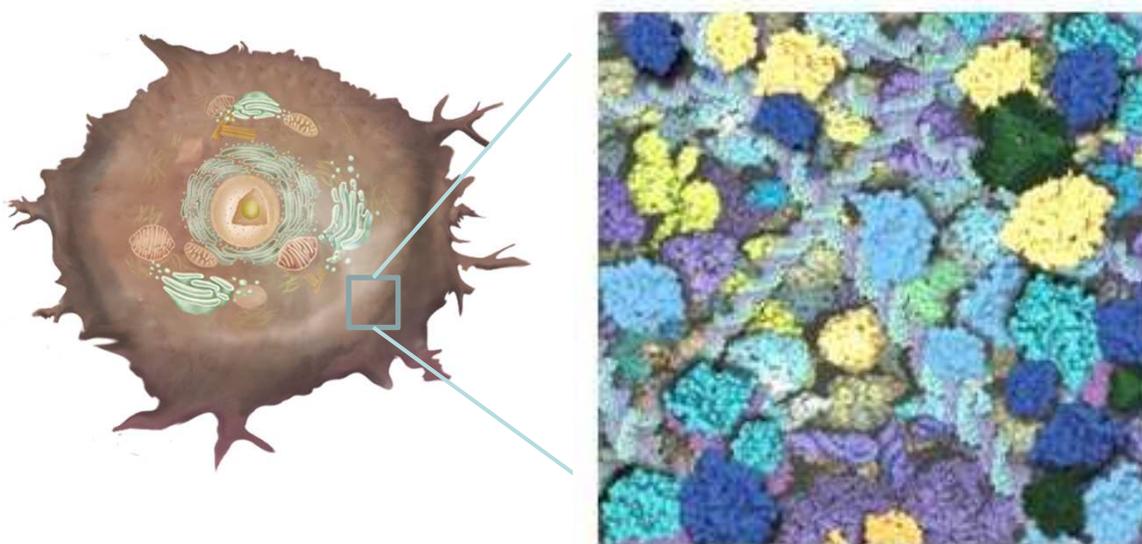
HTSによって、ウイルスの複製を阻害する3種類の化合物 (MDL-28170、ONO 5334、アピリモド) を見出した。

HIV-1プロテアーゼ阻害剤: ロピナビルやリトナビル
C型肝炎プロテアーゼ阻害剤: ダノプレビル
インフルエンザ抗ウイルス剤: ファビピラビル
ウイルスのRNAポリメラーゼ阻害剤: レムデシビル

[Nature](#), 586,
113–119 (2020)

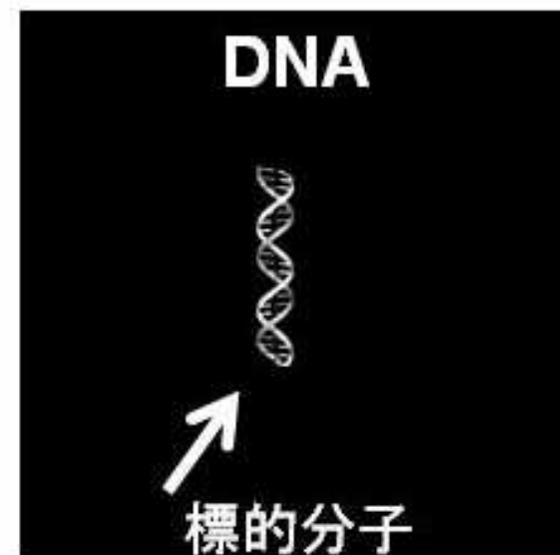
細胞内と試験管内の環境は全く異なる

細胞内



20~40wt%のタンパク質、細胞小器官
などが含まれる込み合った環境
(分子クラウディング環境)

試験管内



100 mM NaClなどの
中性水溶液

細胞内と試験管内の環境の違いが 生体分子の相互作用を大きく変化させる

SARS-CoV-2
のRNA



Science 368, 1499–1504 (2020)



薬剤 標的部に正しく相互作用(結合)することで、効果を発揮する

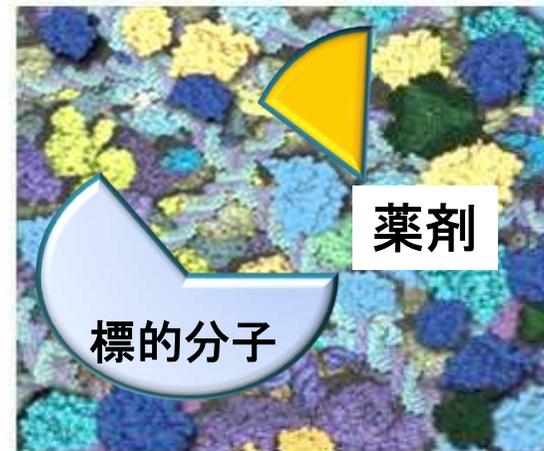
薬剤と標的分子の親和性:
相互作用パラメータを使って、正確に評価する
 ΔG_{37}° (結合の際の自由エネルギー変化)
 K_a (結合定数)

試験管内



標的分子と薬剤の相互作用を解析できる
細胞内での標的分子の構造や薬剤との相互作用を再編できていない場合がある

細胞内

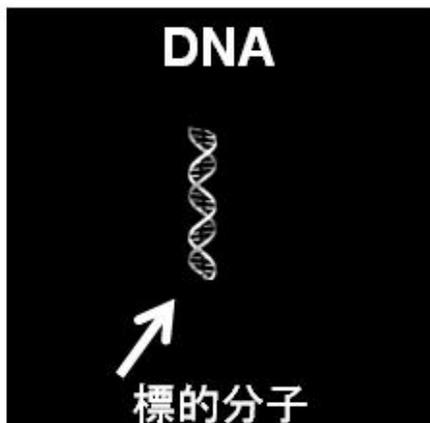


細胞内での分子の活性評価ができる
標的分子や薬剤が想定と異なる構造(機能をもつ)の場合があり、周辺の生体分子との思わぬ相互作用がある

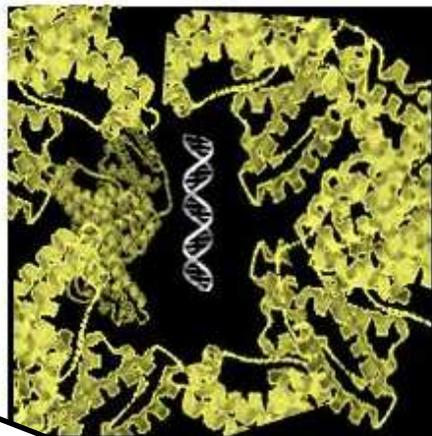
試験管内で最適化された薬剤でも細胞内では効能を示さない場合がある

試験管内で細胞内環境を模倣する

希薄な
溶液環境



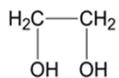
中性高分子
などを添加



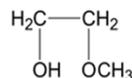
20~40wt%の
共存溶質を含む
分子クラウディング
環境

これまでに細胞内環境を
模倣するために使われて
いたクラウディング分子

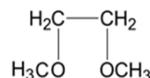
Small cosolutes



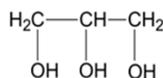
Ethylene glycol



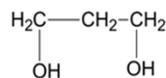
2-Methoxyethanol



1,2-Dimethoxyethane

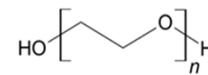


Glycerol

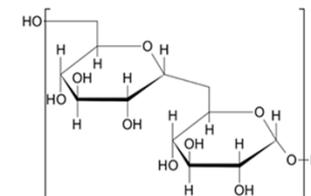


1,3-Propanediol

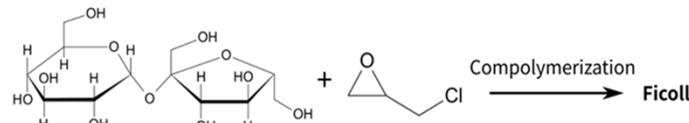
Large cosolute



PEG (polyethylene glycol)



Dextran



分子クラウディング環境下での生体分子の挙動は、試験管内の希薄溶液と大きく異なった。(例、分子クラウディング環境における親和性の増大)

→分子環境の重要性が明らかになったが、試験管内の分子クラウディング環境下がどの程度、細胞内を模倣できているかは未だわからない。

従来技術とその問題点

HTSなどにおいて、相互作用パラメータによって試験管内で最適化された薬剤が、細胞内では効能を示さないことがある。

→ 細胞内の特殊な環境下における標的分子の構造変化や、薬剤の標的以外の分子との相互作用が原因。

→ 細胞内の環境を模倣した分子クラウディング環境が試験管内で構築され、ある程度細胞内の環境効果を知ることができたが、試験管内の分子クラウディング効果が、細胞内での現象と必ずしも一致しない。

(細胞内は複雑であるため、薬剤の効能を最適化する相互作用パラメータを算出できない)

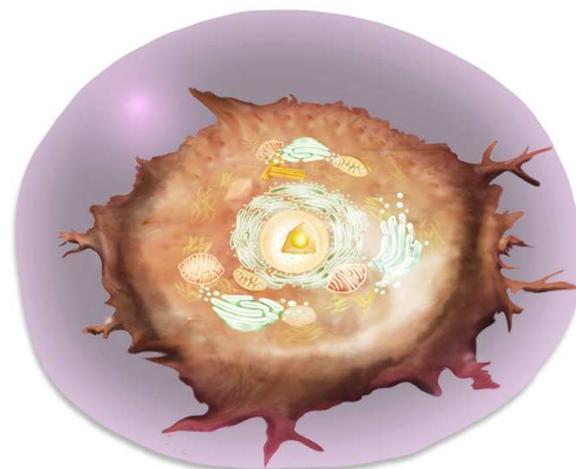
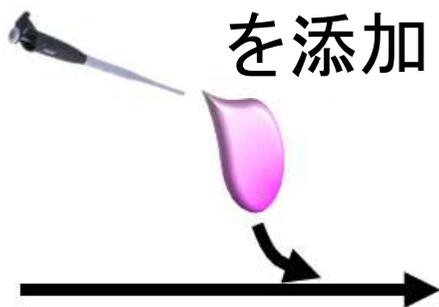
本研究

試験管内で生細胞の環境の相互作用解析ができる 実験系 (SHELL) を構築した

生細胞に穴をあけ、
中身を抜き取る

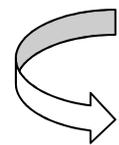


標的分子
を添加

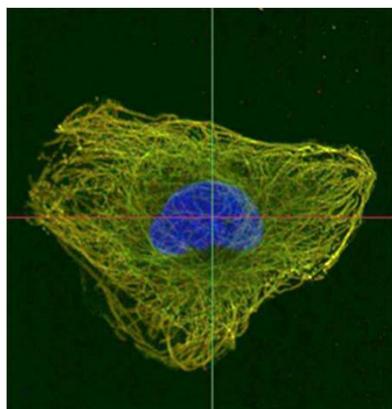


SHELL (殻)

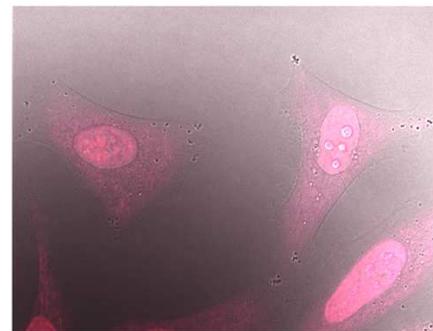
SHELLの内部を
共焦点顕微鏡で
観察した



クラウディングを
誘起する
タンパク質は保持
されている



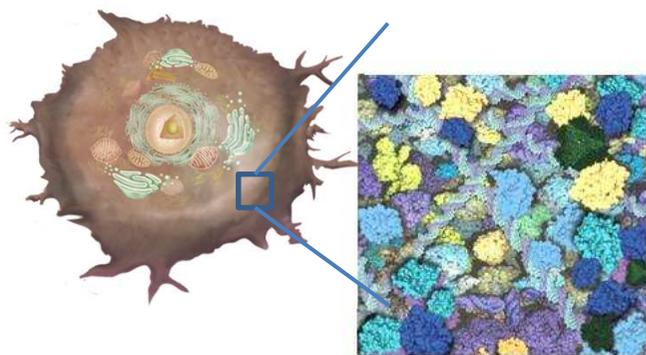
SHELL内に
蛍光ラベル化した
DNAを導入した
様子



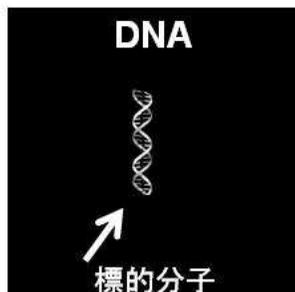
SHELL内に解析したい分子を導入し、細胞内の環境での相互作用を解析できる

実験環境と細胞内環境の比較

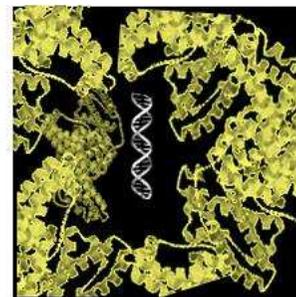
細胞内



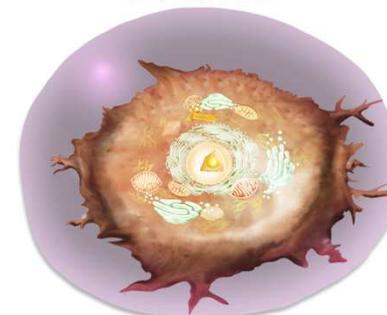
試験管内 (標準水溶液)



試験管内 (クラウディング溶液)



SHELL内 (本発明)



クラウディング分子

生細胞のタンパク質など

なし

中性高分子など

固定化された生細胞のタンパク質など

細胞内環境を模倣できているか

Yes

No

In part

Yes

細胞内の相互作用を再現できるか

Yes

No

No

Yes

定量的解析に適しているか

No

Yes

Yes

Yes

簡便に実験できるか

No

Yes

Yes

Yes

想定される用途

核酸やタンパク質に結合する薬剤のスクリーニング

- *Myc*遺伝子などのがんを活性化する遺伝子に対する発現阻害剤のスクリーニング
- 新型コロナウイルスや免疫不全ウイルスなどウイルスの複製阻害剤のスクリーニング
- がんや細胞寿命に関わるテロメラーゼ阻害剤のスクリーニング
- 既存の薬剤の相互作用やメカニズム解析
- 核酸医薬品(アンチセンス核酸、miRNA)などの配列の最適化
- アプタマーの親和性解析また親和性を向上させる変異などの最適化

疾患のメカニズム解明

- 核酸の構造と疾患進行の関連性の解析

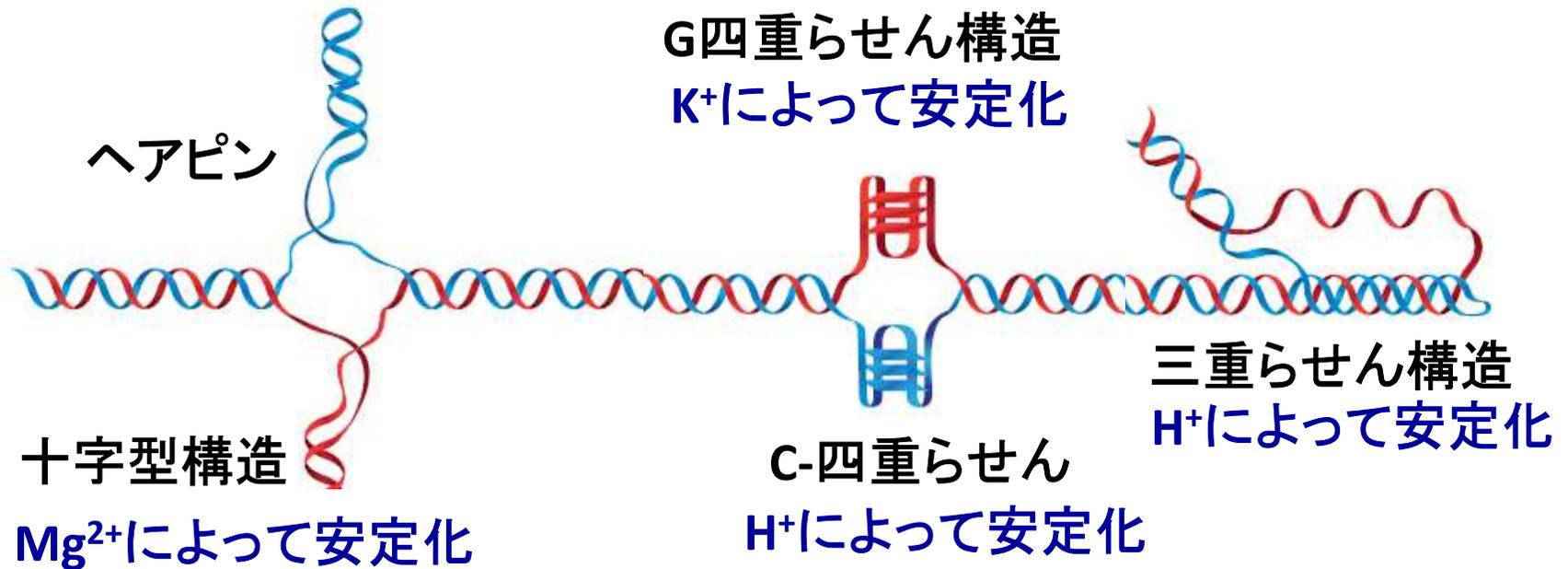
核酸の構造変化

二重らせん構造 (標準的な核酸構造)

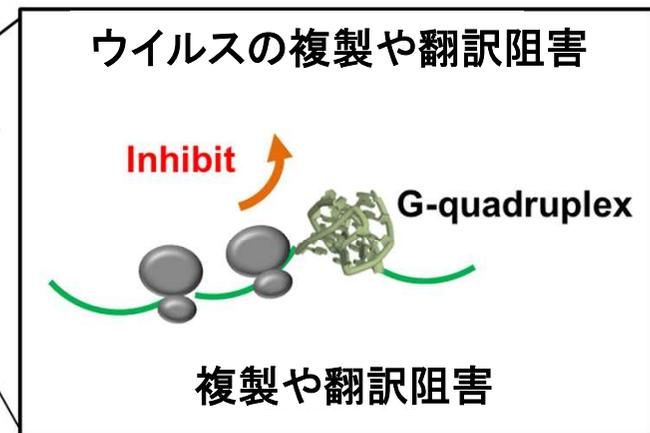
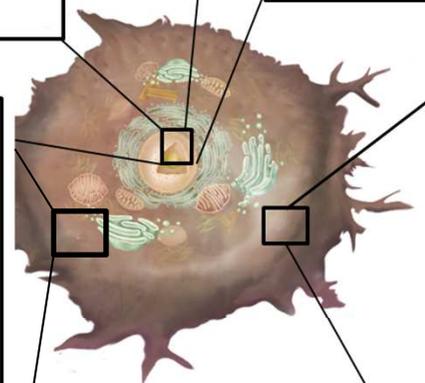
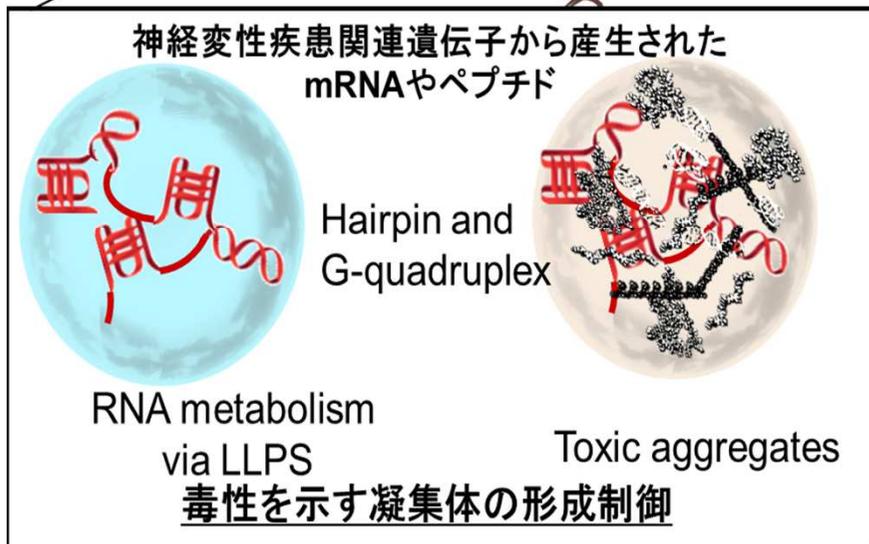
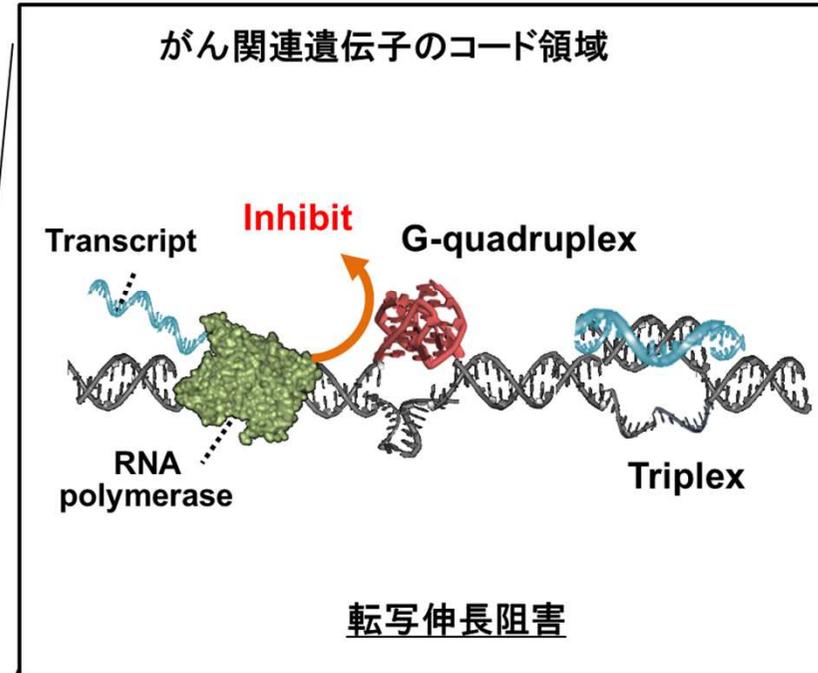
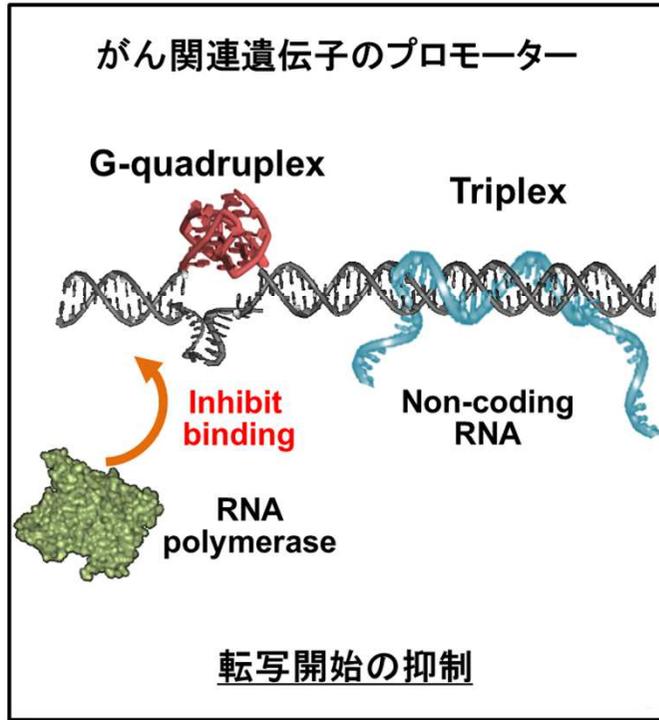


カチオン濃度, pHの変化によって構造が変わる

非二重らせん構造

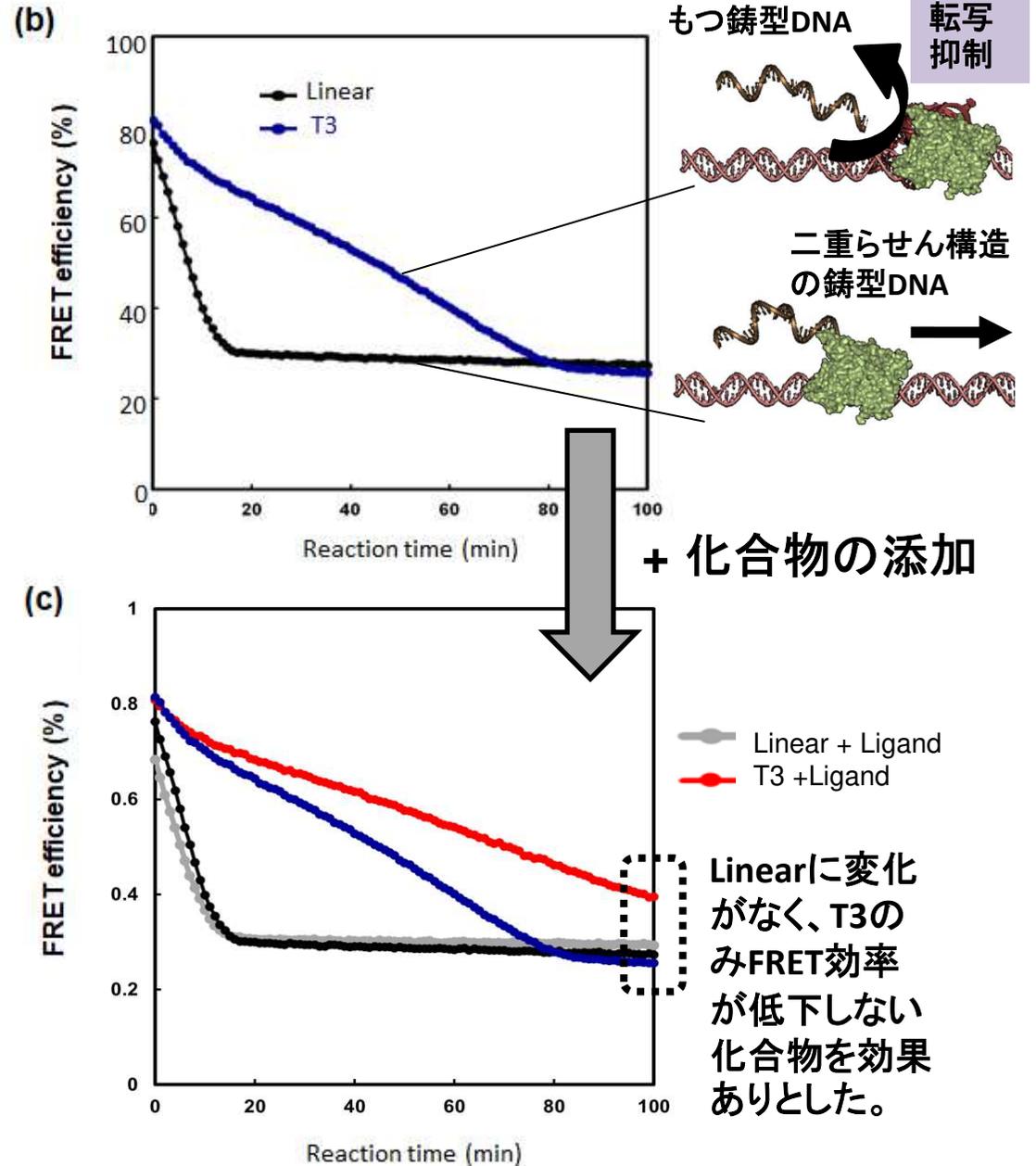
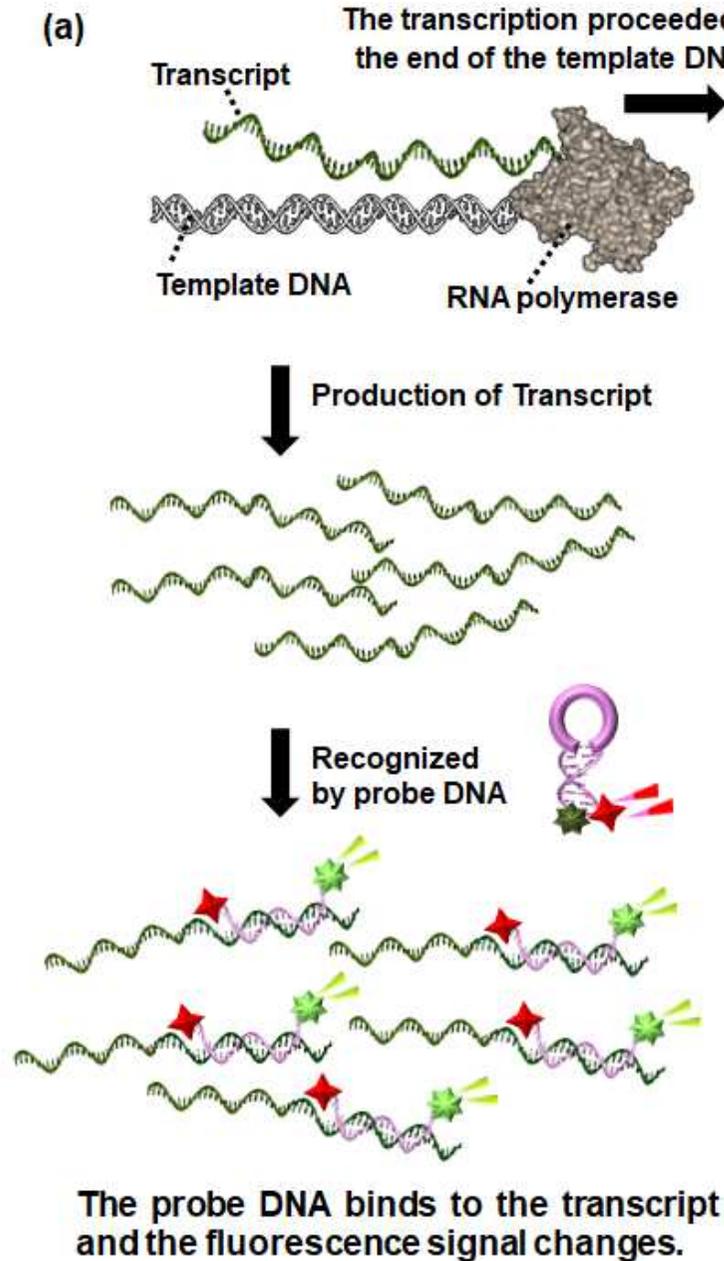


非二重らせん構造と疾患の関わり



がん遺伝子のG-四重らせん構造を標的とした 薬剤のスクリーニング

活用例 1



活用例 1

Table. Typical examples of compounds that have shown transcriptional repression of template DNA with G-quadruplexes

化合物の名前	In vitro (希薄溶液)	In SHELL (MDA-MD-231)	In cell (MDA-MD-231)
A	Yes	No	No
B	Yes	Yes	Yes
C	Yes	No	No
D	Yes	No	No
E	Yes	No	No
F	Yes	Yes	Yes
G	Yes	Yes	Yes
H	Yes	No	No
I	Yes	No	No
J	Yes	No	No
K	Yes	No	No
L	Yes	No	No
M	No	No	No
N	No	No	No
O	No	No	No
P	No	No	No
Q	No	No	No
R	No	No	No
S	No	No	No
T	No	No	No
U	No	No	No

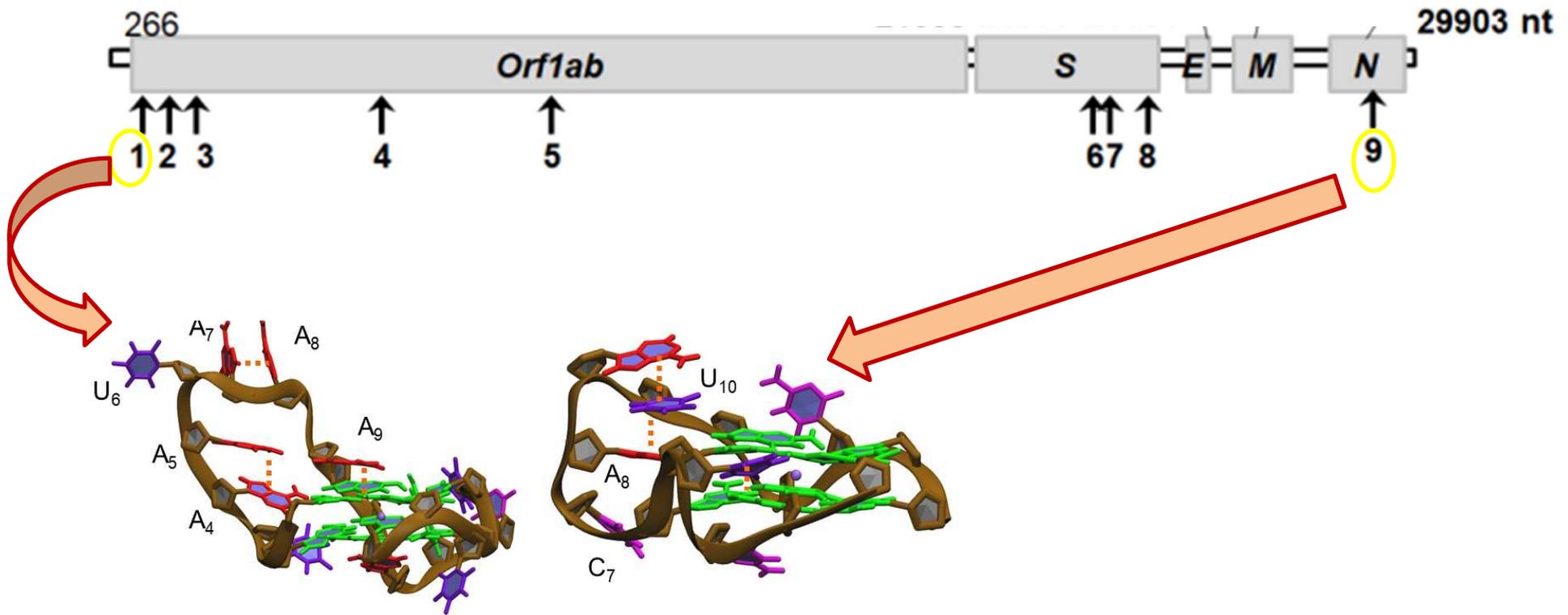
がん遺伝子に対して318化合物の転写阻害効果を評価し転写阻害能を示した化合物をYesと表示した

SHELL内で転写阻害効果を示した化合物は、細胞内でも転写を阻害した

活用例2

SARS-CoV-2中のG-四重らせん構造を安定化させ 増幅を阻害する薬剤のスクリーニング

SARS-CoV-2の遺伝子

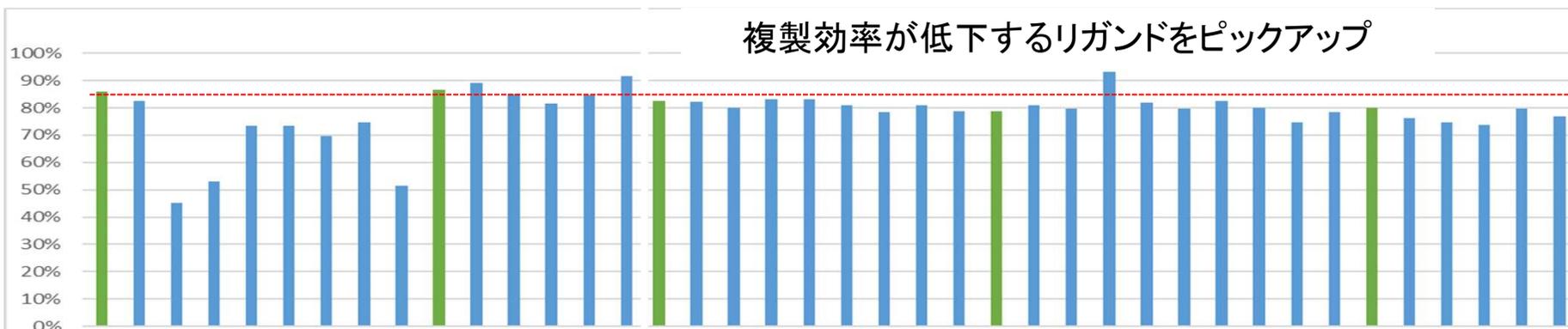
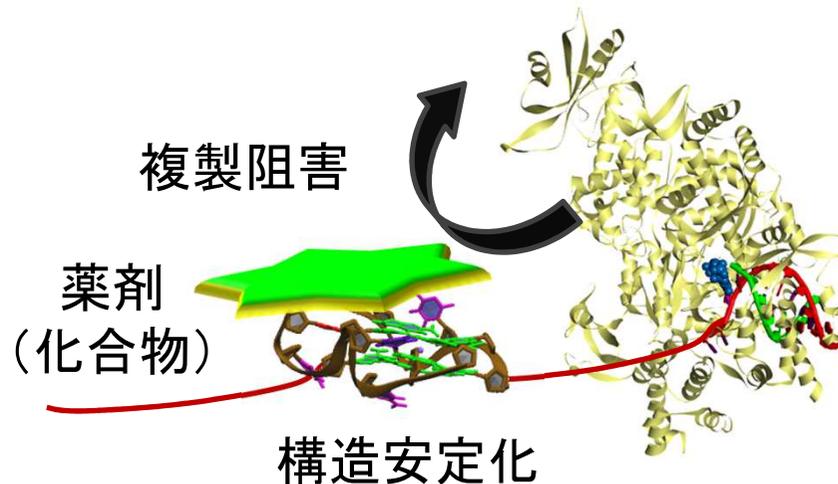
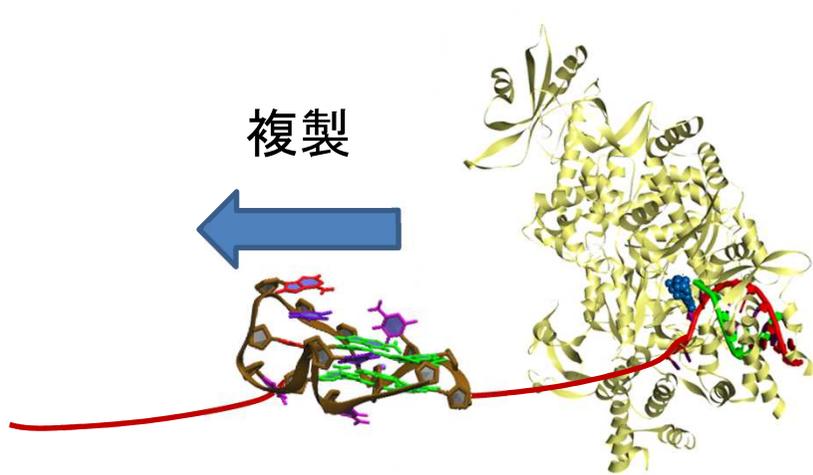


四重らせん構造を安定化させウイルスの複製を阻害する

活用例2

SARS-CoV-2由来の
RNA依存型RNAポリメラーゼ

SARS-CoV-2由来の
RNA依存型RNAポリメラーゼ

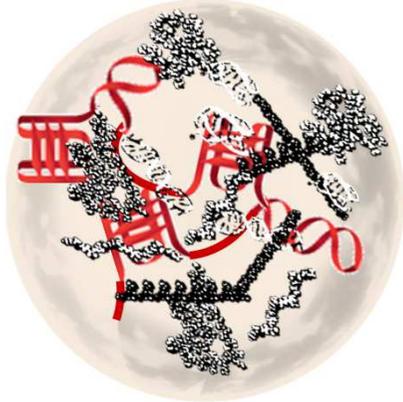


リガンド

活用例3

神経変性疾患の細胞毒性の原因となる 凝集体を解離させる化合物のスクリーニング

Toxic aggregates



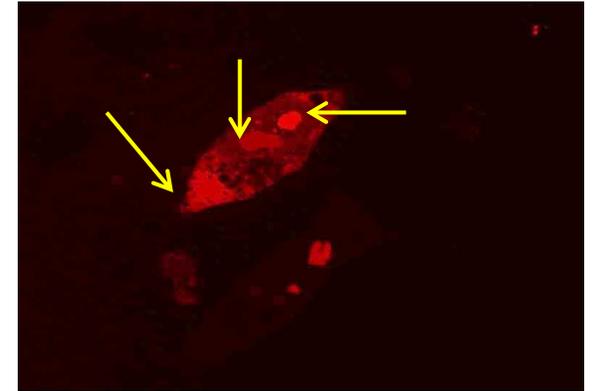
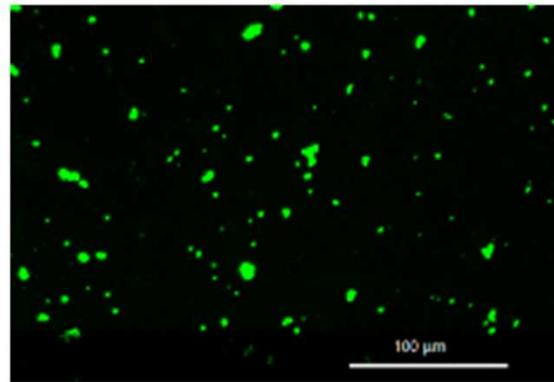
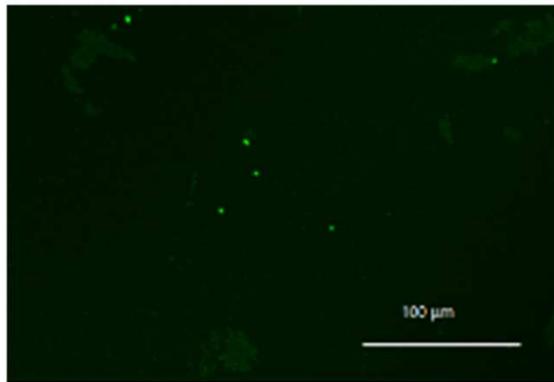
細胞の毒性を示す凝集体。ペプチドやRNAが含まれる。
四重らせん構造が形成されると業種体の形成が加速される。

G-四重らせんが不安定化する条件

G-四重らせんが安定化する条件

G-四重らせんが安定化する条件

r(GGGGCC)₈



四重らせん構造を不安定化させる薬剤(化合物)をクリーニングする

実用化に向けた課題

- 解析したい薬剤ごとにSHELL内で解析できるように実験系を最適化する必要がある。
- 現在は核酸を標的とした化合物をスクリーニングしているが、タンパク質を標的としても実験を最適化する必要がある。

企業への期待

- 薬剤を開発したい標的を教えていただき、薬剤のスクリーニングにSHELLを活用できるか検討していただきたい。

本技術に関する知的財産権

発明の名称:

核酸の立体構造を制御する方法及びその用途、
並びに、細胞内分子クラウディング環境を再現す
るための組成物

出願番号: 特願2022-189538

出願人 : 学校法人甲南学園

発明者 : 建石 寿枝、川内 敬子、
高橋 俊太郎、杉本 直己

お問い合わせ先

甲南大学
フロンティア研究推進機構

TEL 078-441-4547

FAX 078-435-2324

e-mail sangaku@ml.konan-u.ac.jp