



Tools for Compound Profile Screening

テカン社製機器を用いたハイスループットな化合物プロファイリング

By Tracy Worzella, M.S., and Brad Larson, B.A., Promega Corporation

アブストラクト

ホモジニアスなハイスループットスクリーニングアッセイと一体型の自動化機器を組み合わせることにより、新薬候補化合物を効率的にプロファイリングすることができます。被験化合物に開発を進める価値があるか否かを判定するためには、多様なアッセイにより、細胞応答（アポトーシスなど）や、標的以外の生化学システム（シトクロムP450、キナーゼ類など）に対する作用を検討する必要があります。創薬の意思決定過程においては、標的に対する薬物の作用様式を知ることに加え、細胞毒性や他の標的以外の作用を有する可能性を認識することもきわめて重要です。

ハイスループット発光スクリーニングアッセイを組み合わせた自動化機器は、新薬候補化合物の優れたプロファイリングツールとして機能します。

イントロダクション

創薬プロセスでは、多様なアッセイを用いて、化合物のさまざまな作用を評価する必要があります。標的に特異的なアッセイだけでなく、標的以外の作用および細胞毒性を評価するアッセイも、化合物の反応性を幅広くプロファイリングする上で役立ちます。多様なアッセイの結果により、前臨床試験におけるリード化合物の選定および最適化が促されることがしばしばあります。「fail fast, fail cheap（開発失敗は早期に、コストがかかる前に）」が求められる新薬開発過程での意思決定（どの化合物の開発を進めるか、あるいは中止するか）では、多様なアッセイの使用が役立ちます。また、プロファイリングの結果に基づき、化合物ライブラリーの構成を改善し、広範な毒性あるいは標的以外の活性を有する化合物を排除することもできます。

プロファイリングデータを得る際には、高度な液体分注・検出機器を利用することができます。細胞播種、化合物および試薬の添加や、シグナル検出をすべて、1台のプラットフォームに組み込めば、ユーザーはターンキー操作により、完全一体型ロボットシステムを用いて、多様なプロファイリングアッセイを実施することができます。

我々は、このことを実証するため、スクリーニング施設で384ウェルフォーマットアッセイに汎用されているテカン社製機器を使用しました。同機器に11種類の発光ホモジニアスアッセイを組み込み、化合物の活性をプロファイリングしました。表1に、本試験で用いたアッセイをまとめます。

40種の化合物を各アッセイで試験し、本試験のデータを得ました。考察を目的として、3種類の代表的な化合物PKI、H 89およびdihydropyridineを選定しました。化合物の単独添加条件および併用条件でアッセイを実施し、得られた結果からIC₅₀あるいはEC₅₀値を算出しました。IC₅₀とは、ある反応を50%阻害する化合物濃度、EC₅₀とは、あるアゴニストの最大反応の50%に相当する反応をもたらす濃度と定義されます。

表1. 発光アッセイのプロファイルパネル

アッセイ	アッセイタイプ	測定パラメータ
P450-Glo™ Screening Systems	生化学	シトクロムP450 CYP1A2, 2C9, 3A4, 2C19, 2D6に特異的な基質の酸化
Kinase-Glo® Plus Assay	生化学	キナーゼ反応後の残存ATP
MAO-Glo™ Assay	生化学	モノアミンオキシダーゼによるエステルルシフェリン基質の酸化
Pgp-Glo™ Assay System	生化学	P-糖タンパク質 ATPase 活性刺激後の溶液中残存ATP
CellTiter-Glo® Assay	細胞ベース	生存細胞の内在ATP
Caspase-Glo® 3/7 Assay	細胞ベース	Z-DEVD-luciferin基質の切断を指標としたアポトーシス細胞のカパーゼ-3および-7 活性
Dual-Glo™ Assay System	細胞ベース	ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼレポーター活性

自動化液体分注・ハイスループット検出

本試験で実施したプロファイリングアッセイはすべて、テカン社 Freedom EVO® 200システムを用いて実施しました。同システムは、拡張可能な8チップリキッドハンドラー、RoMaグリッパーアーム、Te-Mo™ マルチチャンネルピペティングシステムおよび多機能GENios Pro™ プレートリーダーからなります。このテカン社のシステムを、細胞の播種、化合物の希釈およびプレートへの分注、試薬添加およびプレートの分析に使用しました。

各アッセイで液体分注およびプレート移動を実行させるためのスクリプトは、テカン社 Freedom EVOware®の標準ソフトウェアを用いて作成しました。GENios Pro™ プレートリーダーの操作には、Tecan Magellan™ ソフトウェアを使用し、結果の生データをMicrosoft® Excelにエクスポートしました。表2に、この自動化システムを用いたセルベースアッセイおよび生化学的アッセイの両方に使用した一般的なアッセイ手順を示します。

セルベースアッセイ

細胞生存性、アポトーシスおよびデュアルレポーターシステムのセルベースアッセイには、2種類の細胞株を使用しました。CellTiter-Glo® およびCaspase-Glo® 3/7 Assay用には、Jurkat細胞を384ウェルプレートに密度5,000個/ウェルで播種しました。続いて、表2に示すように、希釈した被験化合物をウェルに添加し、4または18時間インキュベートしました（37℃、5% CO₂）。2種類のインキュベーション時間を設定したのは、短時間および長時間の細胞毒性をモニターするためでした。細胞毒性をモニターするため、4または18時間インキュベートしたプレートに、CellTiter-Glo® Reagentを添加し、その10分後の発光値を記録しました。Caspase-Glo® 3/7 Reagentも同様のプロセスで添加しましたが、試薬添加から発光値測定までのインキュベーション時間を30分としました。

表2. 発光アッセイのプロファイルパネル

生化学アッセイ	セルベースアッセイ
1. 深底96ウェルアッセイプレートに水およびDMSOを添加	1. Te-Mo™ Systemで384ウェルプレートに細胞を播種*
2. Freedom EVO® 200上でTe-Mo™ Systemを用いてテスト化合物を1:3で段階希釈	2. 深底96ウェルプレートに培地とDMSOを添加
3. Te-Mo™ Systemで384アッセイプレートにテスト化合物**を分注 (quadruplicate)	3. Freedom EVO® 200上でTe-Mo™ Systemを用いてテスト化合物を1:3で段階希釈
4. Te-Mo™ Systemで酵素、基質、その他のアッセイ構成成分を分注	4. Te-Mo™ Systemで384アッセイプレートにテスト化合物**を分注 (quadruplicate)
5. RoMa armでプレートをシェーカーへ移動	5. RoMa armでプレートをシェーカーへ移動
6. インキュベーション: 備考: Pgp-Glo™ およびP450-Glo™ CYP2C9アッセイ (37℃) を除き22℃でアッセイ	6. プレートを37℃、5% CO ₂ (Jurkat) または37℃、10% CO ₂ (HEK 293) でインキュベーション
7. Te-Mo™ Systemでプレートに検出試薬を分注	7. Te-Mo™ Systemでプレートに検出試薬を分注
8. RoMa armでプレートをシェーカーへ移動	8. RoMa armでプレートをシェーカーへ移動
9. RoMa armでプレートをGENios Pro™ プレートリーダーへ移動	9. RoMa armでプレートをGENios Pro™ プレートリーダーへ移動

* Jurkat細胞は分注後、直ぐに使用した。HEK 293細胞は分注した後、平衡化、付着させるために一晩置いてから使用した。

** dihydrexidineおよびH 89化合物の終濃度の幅は100μM～0μM。PKI では1μM～0μM。

Dual-Glo™ Luciferase Assay System用には、ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を安定的に導入したHEK 293細胞株を用いて、Gタンパク質共役受容体 (GPCR) であるドーパミン受容体D1 (DRD1) に対する、Gαsシグナル伝達経路を介する標的以外の作用を評価しました。2種類のプラスミドを用いて、安定細胞株を確立しました。一方のプラスミドからは、cAMP response element (CRE) /プロモーターの制御下にあるホタルルシフェラーゼ遺伝子およびハイグロマイシン選択性マーカーが発現します。もう1種類のプラスミドからは、GPCRであるDRD1と、ウミシイタケルシフェラーゼとネオマイシン選択性マーカーの融合タンパク質が発現します。化合物の作用は、ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼの発光シグナルを測定することにより求め、ホタルシフェラーゼの発光シグナルは、ウミシイタケルシフェラーゼの発光シグナルを用いて標準化しました。被験化合物がGPCRであるDRD1のアゴニストである場合には、添加濃度の上昇に伴い、ホタルルシフェラーゼの発光値が上昇します。被験化合物がアンタゴニストである場合には、同じ濃度範囲で反対の結果が認められます。

384ウェルプレートに細胞を密度5,000個/ウェルで播種後、37℃、10% CO₂で一晩インキュベートし、プレートに付着させた後、化合物を添加しました。アゴニストをアッセイする際には、化合物添加後、細胞を37℃、10% CO₂で4時間インキュベートしました。続いて、Dual-Glo™ Luciferase Reagentを添加し、10分間インキュベーション後、ホタルルシフェラーゼの発光値を測定しました。ホタルルシフェラーゼの発光値を測定後、Dual-Glo™ Stop & Glo® Reagentを同一ウェルに添加し、10分間インキュベーション後、ウミシイタケルシフェラーゼの発光値を記録しました。DRD1アンタゴニストをアッセイする際には、化合物添加後、15分間インキュベートしました。SKF 38393 (DRD1アゴニスト) 1μMを各ウェルに添加後、上記のようにプレートを4時間イン

ンキュベートしました。続いて、Dual-Glo™ Luciferase Reagentを添加し、上記の手順でアゴニストアッセイを実施しました。

生化学的アッセイ

P450-Glo™ Assayを実施し、シトクロムP450酵素に対する被験化合物の阻害作用を評価しました。Technical Bulletin #TB340に従って、CYP1A2、2C9、2C19、2D6および3A4アッセイを実施しました。被験化合物を添加後、シトクロムP450酵素およびP450-Glo™ Substrateを各ウェルに添加し、384ウェルプレートを室温で10分間、インキュベートしました。続いて、NADPH再生溶液の添加により、反応を開始させ、プレートをさらに室温で60分間、インキュベートしました。2回目のインキュベート後、Luciferin Detection Reagentを添加し、発光値を記録しました。

Kinase-Glo® Plus Assayを実施し、プロテインキナーゼA (PKA) に対する標的活性を検討しました。キナーゼ反応の構成成分は、PKA、Kemptide Peptide Substrate (カタログ番号 V5601) および10μM ATPとしました。10分間の反応後、Kinase-Glo® Plus Reagentを添加し、発光値を記録しました。

MAO-Glo™ Assayを実施し、モノアミンオキシダーゼA (MAO A) 活性に対する化合物の作用を評価しました。MAO Aに被験化合物および基質を添加後、室温で60分間インキュベートしました。Luciferin Detection Reagentを添加後、発光値を記録しました。

Pgp-Glo™ Assayを用いて、薬物輸送を担う酵素であるP-糖タンパク質 (Pgp) に対する化合物の作用を評価しました。Pgpによる輸送の基質となる化合物は、PgpのATPアーゼ活性を刺激します。Technical Bulletin #TB341に記載の指示に従って、被験化合物をP-糖タンパク質、ATPおよび基質の共存下、37℃で40分間インキュベーション後、ATP Detection Reagentを添加し、発光を検出しました。

IC₅₀およびEC₅₀値は、GraphPad Prism® version 4.0ソフトウェアを用いて算出しました。表3では、データパターンを視覚的にとらえやすいよう、結果を色分け表示しました。以上の結果から、10μM未満でPKA酵素活性を阻害する被験化合物は3個でしたが、3化合物の細胞毒性および標的以外の活性プロファイルには差異が認められることが明らかになりました。例えば、PKAを薬物の標的とし、リード化合物の開発および最適化に最も適した化合物を探索していたと仮定すれば、標的 (PKA) に対する特異性を示した化合物はPKIのみであったため、本試験のプロファイリング結果は、PKIが最善の選択肢であることを示します。PKIはH 89およびdihydrexidineとは異なり、セルベースアッセイシステムにおける細胞毒性、アポトーシス誘導作用とも示しません。また、PKIはシトクロムP450を阻害しない一方、H 89は数種類のシトクロムP450を10μM未満で阻害します。また、PKIはGPCRであるDRD1のアッセイで全く作用を認めなかったことから、標的外作用が無いことが示されました。

結論

多様なアッセイからなるパネルを使用することにより、化合物の一般的な活性パターンを明らかにすることができます。シングルポイントスクリーニングとは異なり、用量反応を示す IC₅₀あるいはEC₅₀を測定することにより、セルベースおよび生化学的アッセイシステムの両方でより正確な薬物活性データを得ることができます。標的的特異的な作用のみならず、標的以外の作用および細胞毒性イベントも観察することができます。

このような多量のデータの取得は、ハイスループット機器（本稿で報告したテカン社Freedom EVO®システムなど）と、適切にデザインされたアッセイのいずれが欠けても実現できません。プロメガの試薬とテカン社製機器の組み合わせは、多量の被験化合物プロファイリングデータ取得を目指すハイスループットユーザーに統合的なソリューションを提供します。

表3. PKI、H 89およびDihydropyridineのセルベースおよび生化学的アッセイプロファイルの概要

以下に示すセルベースおよび生化学的アッセイデータは、本文中に示す通りに測定した。データの凡例を表の下部に示す。

Assay	PKI	H 89	Dihydropyridine
P450-Glo™ Assay: CYP1A2			
P450-Glo™ Assay: CYP2C9			
P450-Glo™ Assay: CYP3A4			
P450-Glo™ Assay: CYP2C19			
P450-Glo™ Assay: CYP2D6			
Pgp-Glo™ Assay: P-glycoprotein			
MAO-Glo™ Assay: monoamine oxidase A			
Kinase-Glo® Plus Assay: PKA			
CellTiter-Glo® Assay: 4 hours cell viability			
CellTiter-Glo® Assay: 18 hours cell viability			
Caspase-Glo® 3/7 Assay: 4 hours apoptosis			
Caspase-Glo® 3/7 Assay: 18 hours apoptosis			
Dual-Glo™ Assay: GPCR DRD1 agonist			
Dual-Glo™ Assay: GPCR DRD1 antagonist			

No Effect
IC ₅₀ < 10 μM
EC ₅₀ > 0.1 μM
Stimulation > threefold

プロトコル

- ◆ *Caspase-Glo® 3/7 Assay Technical Bulletin #TB323*, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb323/tb323.html
- ◆ *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Technical Bulletin #TB288*, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb288/tb288.html
- ◆ *Dual-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual #TM058*, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tm058/tm058.html
- ◆ *Kinase-Glo® Plus Luminescent Kinase Assay Technical Bulletin #TB343*, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb343/tb343.html
- ◆ *MAO-Glo™ Assay Technical Bulletin #TB345*, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb345/tb345.html
- ◆ *P450-Glo™ Screening Systems Technical Bulletin #TB340*, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb340/tb340.html
- ◆ *Pgp-Glo™ Assay Systems Technical Bulletin #TB341*, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb341/tb341.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Caspase-Glo® 3/7 Assay	10ml	G8091	60,000
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10ml	G7570	12,000
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	E2920	30,000
Kinase-Glo® Plus Luminescent Kinase Assay	10ml	V3771	19,800
MAO-Glo™ Assay	200 assays	V1401	22,000
P450-Glo™ Screening Systems			
CYP1A2	1,000 assays	V9770	130,000
CYP2C9	1,000 assays	V9790	130,000
CYP3A4	1,000 assays	V9800	130,000
CYP2C19	1,000 assays	V9880	130,000
CYP2D6	1,000 assays	V9890	130,000
Pgp-Glo™ Assay System	10ml	V3591	58,000
Pgp-Glo™ Assay System with P-glycoprotein	10ml	V3601	96,000