

## 生細胞内でのキナーゼ：阻害剤の結合解析（ターゲットエンゲージメント）

## 概要

- カルナバイオサイエンス社でプロメガの NanoBRET™ 技術を利用したキナーゼ：阻害物質結合解析受託サービスを開始
- 細胞内でのタンパク質：化合物結合解析は生体内での挙動を正確に反映
- IC<sub>50</sub> だけでなく結合時間 (residence time) も測定可能

## イントロダクション

キナーゼについては、創薬ターゲット分子としてこれまで数多くの研究がされてきており、癌の標的分子治療薬としてのチロシンキナーゼ阻害剤研究のブームは一段落した感があるものの、癌以外の疾患の治療薬のターゲットとしても依然として高い注目を集めています。特に最近のがん免疫研究の盛り上がりにあわせて、併用療法の一角を多くのキナーゼ阻害剤が担っており、WHO の臨床試験データベースでチェックポイント阻害薬と低分子化合物の組み合わせで進められている臨床試験を検索すると、数百を超える試験が現在進行中であることが分かります。また、キナーゼは創薬ターゲットとしての魅力もさることながら、副作用回避の観点から、オフターゲットとしてのキナーゼ阻害を調べておくこともとても重要です。

## 細胞内でのキナーゼ：阻害剤結合解析受託サービス

カルナバイオサイエンス社は 2003 年からキナーゼタンパクの提供、キナーゼプロファイリングサービスなどを通じて、お客様のキナーゼ創薬研究を主に生化学的アッセイを中心に支援し続けてきております。この度、プロメガ社の NanoBRET™ Target Engagement (TE) テクノロジーを用いて細胞内でのキナーゼ阻害剤の作用を評価するサービスを開始することになりましたので、本稿ではその内容を中心にご紹介させていただきます。

NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay は、NanoBRET™ System を生細胞内での化合物とキナーゼとの結合の解析に応用した技術で、NanoLuc® ルシフェラーゼ-キナーゼ融合タンパク質に可逆的に結合する NanoBRET™ トレーサーを用いることにより、細胞内での化合物の見かけの親和性が測定できます (図 1)。

図 2 には本テクノロジーを用いて BTK に対するキナーゼ阻害剤の効果を検討した結果を示しています。また、本テクノロジーでは化合物の特徴づけの指標として、最近注目されている residence time 測定にも応用が可能です。図 3 に BTK に対する Dasatinib, Ibrutinib の residence time 測定を行ったデータを示しています。Ibrutinib は BTK の ATP 結合部位付近のシステインに共有結合して BTK を不活性化させる化合物で、residence time を測定すると、ターゲット分子に強く結合して、tracer を添加しても剥がれてこない様子が見て取れます。一方、Dasatinib は非共有結合型の阻害剤ですので、経時的にシグナルが回復して来る様子が観察できます。標的酵素に対する IC<sub>50</sub> が同じでも、ターゲット分子に結合している時間が長い化合物の方が、生体内で強い阻害を示すことが期待できるため、化合物の residence time を測定することは、化合物の特徴づけ、差別化が可能になるのみならず、*in vivo* に投与した際の効果の予測にも役立つと考えられます。カルナバイオサイエンス社では、本テクノロジーを用いた受託試験の準備を進めており、まずは 30-40 種のセリンスレオニンキナーゼから着手し、徐々にその数を増やしていく計画をしています。

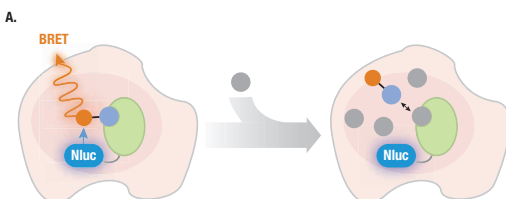


図 1. NanoBRET™ を用いた細胞内キナーゼアッセイの原理

標的キナーゼに NanoLuc® luciferase を融合させたタンパク質を細胞に発現させ、BRET acceptor となる蛍光標識した膜透過性 tracer を添加する。Tracer が標的分子に結合すると BRET が起こり、acceptor が蛍光を発するが、化合物が tracer の結合を阻害すると蛍光が起こらない。この化合物の結合 / 非結合を BRET で検出する。



カルナバイオサイエンス株式会社  
創業支援事業本部  
副本部長  
川瀬 裕介様

## カルナバイオサイエンス社のご紹介

弊社では NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay 以外にも、アメリカのパートナー企業の細胞におけるキナーゼアッセイの代理店サービスを行っております。一つはシアトルにある Advanced Cellular Dynamics (ACD) 社の Ba/F3 細胞を用いるアッセイです。Ba/F3 細胞は IL-3 刺激依存的に増殖するマウスのプロ B 細胞ですが、細胞内にチロシンキナーゼの遺伝子を導入すると、増殖に対する IL-3 非依存性を獲得し、導入したチロシンキナーゼのシグナルのみで増殖するように変化します。この細胞にキナーゼ阻害剤を作用させると、導入した一つのチロシンキナーゼの作用を阻害することで細胞の増殖抑制が起こるため、細胞の生死を指標にキナーゼ阻害剤の評価が可能になります。なお、このアッセイにおきましては、生細胞数の定量に細胞内の ATP 濃度を測定するプロメガ社の CellTiter-Glo® を使用しております。ACD 社では現在変異体を含む全 95 種類のチロシンキナーゼ導入細胞を保有しており、プロファイリングや細胞レンタルなどのサービスを実施しております。

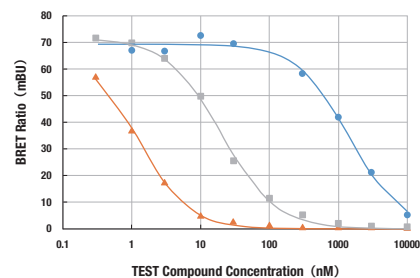


図 2. BTK に対する阻害剤の効果の検討

BTK-NanoLuc® Fusion Vector を HEK293 細胞に強制発現させ、NanoBRET™ Tracer を添加、Staurousporine, Ibrutinib, Dasatinib を添加して各化合物の BTK に対する結合の IC<sub>50</sub> を算出した。

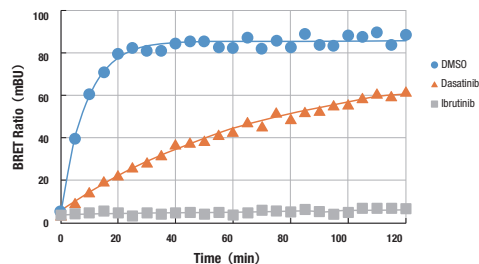


図 3. BTK 阻害剤の residence time の測定

BTK-NanoLuc® Fusion Vector を HEK293 細胞に強制発現させた後、Ibrutinib, Dasatinib とインキュベートし、未反応の化合物を wash out 後、NanoBRET™ Tracer を添加、反応を経時的に測定した。Residence time については、非線形回復にて算出する。

本サービスの詳細、お問合せ、見積依頼は以下までお寄せください。

[info@carnabio.com](mailto:info@carnabio.com)