

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「次世代がん研究推進のためのシーズ育成支援基盤」（革新的がん治療開発のためのハイスループットスクリーニング基盤、及び動物を用いた標的分子のPOC取得と阻害剤の薬効評価）
2. 研究開発代表者：吉田 稔（国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究センター 創薬シード化合物探索基盤ユニット 基盤ユニットリーダー）
3. 研究開発の成果
  - ① 最適な活性検出系（アッセイ系）の構築支援 指定及び公募シーズ課題からの要請に対応し、各課題で実施するハイスループットスクリーニング（HTS）に必要な新規アッセイ系の構築、あるいは課題が提案するアッセイ系のHTS化を行った。HTS化には、当研究所所有の高速高感度分光測定機器、定量的画像解析装置、自動電気泳動システム、ケミカルアレイ、多検体分注ロボットなどを活用した。
  - ② 適正なライブラリーを用いたハイスループットスクリーニング（HTS） 課題①のアッセイ系でHTSを実施し、合格基準を再現性良く満たすヒット化合物を多数同定した。HTSには、理化学研究所天然物化合物ライブラリー（約2万化合物）と東京大学創薬機構コアライブラリー（約1万化合物）を用いた。有望であることが期待される標的には、東京大学創薬機構ジェネラルライブラリー（約14万化合物）、フルライブラリー（約22万化合物）、既存薬ライブラリー（約4千化合物）などを適宜追加して用いた。
  - ③ ヒット化合物の活性確認、特異性評価 標的未知のヒット化合物を対象として、プール型shRNAライブラリーを用いる網羅的な化学遺伝学スクリーニングと、その結果に基づくパスウェイ解析を行った。また、平行して化合物アフィニティービーズ法、DNAマイクロアレイ法などによる解析も行った。その結果、それぞれの化合物の作用機構解明につながる知見を得た。
  - ④ リード候補選択のための合成 HTSのヒット化合物を合成展開によって最適化した。合成設計には、共結晶解析（課題⑤）の結果のほか、溶解性、非特異的なタンパク質への吸着なども考慮した。その結果、ヒット化合物の阻害活性を改善することに成功し、一定の基準を満たすリード候補化合物を得た。
  - ⑤ X線結晶構造解析 試験管内翻訳系を用いたタンパク質大量発現からX線結晶構造解析、化合物との共結晶構造解析に至るまで一貫した解析システムを構築し、インシリコスクリーニングやヒット化合物の合成展開などに有用な構造情報を課題代表者に提供した。また、必要に応じて、合成展開などで得られたヒット類縁体化合物との共結晶構造解析を再度実施することにより、リード候補化合物最適化のための橋渡しを行った。
  - ⑥ 構造情報を利用したインシリコスクリーニング 課題代表者からの要請に対応して標的阻害剤のインシリコスクリーニングを実施した。スクリーニングには分子動力学等を活用したドッキング（PALLAS）とりガンドの情報を活用した多面的検索（LAILAPS）を用いた。また、複合体結晶構造に基づく最適化設計も行った。その結果、それぞれの標的阻害剤についてIC50値を向上させたほか、体内動態の改善や新規骨格を持つ阻害剤の発見などにも結びついた。
  - ⑦ 各種分子標的候補のPOC取得ならびに、新規がん治療薬候補検体の薬効POC取得 指定及び公募シーズ課題の要請に対応し、新規分子標的候補遺伝子を対象としてshRNA発現株を作成し、あるいは標的遺伝子の発現を特異的に抑制するオリゴ核酸を導入後にマウス皮下に移植して候補遺伝子の発現抑制効果のPOCを評価した。また、新規がん治療薬候補検体の*in vivo*薬効POCを評価した。
  - ⑧ 新規がん治療薬候補検体の抗造腫瘍効果の評価並びに薬効メカニズムの特異性評価 指定及び公募シーズ課題から得られた新規がん治療薬候補検体について投与条件を最適化し、マウスにおける抗造腫瘍効果や毒性を試験して薬効を評価した。また、PDマーカの発現レベルの変化等を検討することにより、薬効メカニズムの特異性評価を行い、各課題代表者に提供した。