



構造活性相関部会・ニュースレター <1 October, 2017>

SAR News No.33

「目次」

//// 藤田稔夫先生 追悼 ////

中川 好秋 … 1

//// Cutting Edge ////

疾患特異的 iPS 細胞の表現型を利用した創薬スクリーニング

本間 謙吾、井上 治久 … 3

非染色細胞画像を用いたフェノタイプスクリーニングの可能性

藤谷 将也、河合 駿、加藤 竜司 … 9

ケミカルスペースネットワーク (CSN) を用いた SAR 解析

国本 亮 … 16

//// Activities ////

<報告>

構造活性フォーラム 2017

「PPI 阻害をターゲットとする中分子医薬開発戦略」開催報告 … 24

<会告>

第 45 回構造活性相関シンポジウム プログラム

… 26

藤田稔夫先生追悼



ACS Award 受賞 (1995/8/22)



Hansch-Fujita法 50周年(2012/8/25)

京都大学名誉教授藤田稔夫先生は、2017年8月22日（火）に肺炎のため永眠されました。藤田先生は1929年（昭和4年）1月26日に京都でお生まれになり、京都三中、第三高等学校を経て京都大学に進まれました。1951年（昭和26年）に京都大学農学部農芸化学科を卒業後、直ちに助手として勤務され、農産製造学研究室の三井哲夫教授の下、植物ホルモンの研究に取り組まれ、「1-ナフトエ酸誘導体の植物生長活性に関する研究」で学位を授与されておられます。この研究が、1961年（昭和36年）からのアメリカ合衆国カリフォルニア州ポモナ大学への留学（Corwin Hansch先生との出会い）と、その後の研究の発展につながりました。最終的に”Hansch-Fujita法”と呼ばれる世界的に有名な”定量的構造活性相関解析（Quantitative Structure Activity Relationship ; QSAR）”が誕生することになりました。その後3-D QSARなど様々なQSAR手法が提唱され、今はHansch-Fujita法はClassical QSARとも呼ばれるようになりました。2012年には、Hansch-Fujita法50周年を記念して、京都において、シンポジウムを開催することができました。残念なことにHansch先生は2011年5月8日に92年の生涯を閉じられており、この記念シンポジウムに参加して頂くことはかねませんでした。

藤田先生は、アメリカから帰国後の1966年（昭和41年）から農薬化学研究室の助教授として研究室を運営していく中、先代の武居三吉、中島稔両教授が手がけてこられた殺虫活性化合物を材料にして、Hansch-Fujita法の応用に着手され、多くの論文を学術雑誌に発表されました。その

後、1981年（昭和56年）に教授に昇任され、就任後しばらくしてから研究室の名前を農薬化学から、生物調節化学に改名されました。農薬のみならず医薬、生理活性化合物全般を研究対象とする姿勢を明確に打ち出され、QSARとそれに基づいた分子設計に関する研究を精力的に展開されました。1992年（平成4年）に定年退職された後も、自宅から離れたところにオフィスを構えられ、最近まで一貫してさまざまな医薬、農薬の構造活性相関の研究を行ってこられました。

学会関係では、日本農薬学会の設立（1975年）当初からその運営に尽力され、1983-1985年副会長、1985-1987年には会長を務められました。日本農芸化学会における功績も大きく、1989-1991年の2年間に亘り関西支部の支部長を務められました。学会活動としては、何と言っても構造活性相関シンポジウムの開催と構造活性相関部会の設立あります。1975年5月10日に、京都商工会議所集会室で懇話会を開催されましたが、これが、その後毎年開催されている構造活性相関シンポジウムの第1回になります。数回は懇話会として藤田先生が実施されていましたが、1977年に北里大学の森口郁夫先生が実行委員長として、はじめて東京の薬学会館ホールでシンポジウムを開催されました。これが、第4回構造活性相関懇話会シンポジウムでした。再度、森口先生が薬学会館ホールにおいて第8回を開催されたましたが、この時から『構造活性相関シンポジウム』となり、今に至っています。第9回は豊橋技術科学大学において、第5回情報化学討論会と合同で開催され、その後はずっと共同で開催されてまいりました。2002年（平成14年）に構造活性相関部会として薬学会の部会として認められ、ここ数年は構造活性相関シンポジウムとして単独で開催しておりましたが、2016年の第44回は日本農薬学会の第30回デザイン研究会と共同で開催いたしました。その時は、藤田先生が米寿を迎えることから、それをお祝いするセッションを設けました。今年は茨城県の土浦で第45回のシンポジウムが開催され、日本薬学会功労賞をお祝いする藤田先生の記念講演が予定されておりましたが、残念なことにそのお話を拝聴することはかないませんでした。日本薬学会功労賞は、近年では平成21年度-24年度、同26年度、同27年度は該当者がなく、前年度にノーベル賞受賞者大村智先生が受賞されたという大変重みのある賞です。

1964年以降、QSARは薬物の分子設計や作用メカニズム解析、化学物質の生体内や環境中の動態解析と予測の分野における新しい学問領域の創成に貢献し、藤田先生の業績が国内外から高い評価を受け、日本農芸化学会奨励賞（1967年）、日本農薬学会業績賞（1979年）、日本農芸化学会功績賞（1989年）、アメリカ化学会農薬化学部会特別賞（1992年）アメリカ化学会農薬化学研究国際賞（1995年）などの受賞の栄誉に浴され、すでに述べましたように、本年3月にも日本薬学会から功労賞が授与されました。

最後になりましたが、この世界的に大きな研究業績をあげられた先生の下で研究を行えたことを誇りに思いますとともに、叱咤激励に加えて誰にでも優しく接して頂きましたことに感謝しております。また、亡くなられる前に『須窮構効』（誰でもみんな構造活性相関をしっかりとやりましょう。）という4文字熟語を残してくださいましたことにも感謝し、この言葉を頭に焼き付けて、今後も構造活性相関研究に精進していきたいと思っています。構造活性相関部会会員を代表して、ここに、藤田稔夫先生のご冥福をお祈りいたします。

日本薬学会構造活性相関部会 部会長 中川好秋

//// Cutting Edge ////

疾患特異的 iPS 細胞の表現型を利用した創薬スクリーニング

理化学研究所バイオリソースセンター 創薬細胞基盤開発チーム
 京都大学 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門 幹細胞医学分野

本間 謙吾
 井上 治久

1. はじめに

創薬研究の進め方には、大別して 2 通りの手法が存在する。標的に基づいた target-based drug discovery と、細胞や臓器・個体の表現型 (phenotype) に着目した phenotypic drug discovery である。近年、幹細胞研究、特に iPS 細胞研究の発展により、これまで入手が困難であったヒト患者由来の細胞を手に入れることができたことから、フェノタイプスクリーニング (phenotypic screening) を利用した phenotypic drug discovery に注目が集まっている。

細胞を利用したフェノタイプスクリーニングでは、病態と関連する細胞の性質を改善する低分子化合物、核酸、タンパク質（ペプチド）などを探索する。ハイコンテンツイメージアナライザといった測定・解析技術の発展により、単純な細胞の生死だけでなく、細胞の形態の変化や各細胞小器官の異常など、複雑な生命現象をハイスループットに解析することが可能となっている。新たな薬を生み出すことが難しくなっている昨今の創薬環境の中で、新規の薬効により治療効果を発揮するファーストインクラスの薬剤候補がこのフェノタイプスクリーニングで見つかっており、フェノタイプスクリーニングは非常に魅力的な創薬スクリーニング方法として注目されている [1]。本稿では、筆者らが着目している iPS 細胞を利用した神経変性疾患の創薬研究に焦点を当て、これまでの研究状況と今後の課題について紹介したい。

2. 標的スクリーニングとフェノタイプスクリーニング**2.1 標的スクリーニングとその課題**

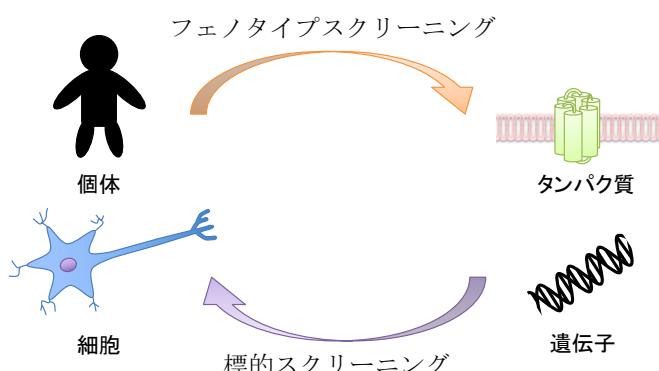
かつての抗菌薬やがん治療薬の発見にみられるように、元来、創薬研究は個体や細胞を利用した表現型に基づいた発展が中心であった。しかし、遺伝子情報の解析が進み、遺伝子からタンパク質、そして疾患へと繋がる詳細な分子機構の研究が発展したことにより、近年の創薬研究は標的に基づいたスクリーニングが中心となった。これは、着目している疾患で見られる遺伝子の変異や欠失、タンパク質レベルでの異常を標的として、その機能を補うもしくは阻害するような化合物を得ることを目指す（図 1）。標的が明らかになると、得られた低分子化合物の治療対象となる患者群や、投与量、標的由来の副作用が予測しやすいなどの利点もある。しかしながら、標的分子が対象疾患の病態に大きく貢献しているという仮説に基づいた創薬探索であり、その根拠が確かであることが非常に重要である。そのため創薬スクリーニングの前に、標的遺伝子・タンパク質と病態について、患者の症状との相関解析やモデル動物の解析、生体内反応を反映する適切な *in vitro* 実験など、詳細な検討が必要となる。こうして、確かなターゲットであると判断されると、*in vitro* でのハイスループットスクリーニング系の樹立を経て、標的タンパク質に対する効果的な化合物の探索が行われる。その後得られた低分子化合物が実際に細胞で効果を発揮するためには、*in vitro* 活性の向上、さらに、細胞膜の透過性や、細胞内局在、代謝等の問題をクリアする必要がある。これらの課題をクリアできたとしても、細胞内の応答機構は非常に複雑であり、代替経路の存在や、予期せぬ副作用などによって予想した効果が十分に得られないこともある。また、ほとんどの場合、臨床試験前にモデル動物を利用した *in vivo* 実験を行うが、ここで良好な結果が得られても、種差などによりヒトで十分な効果が得られないことがあり、多くの治療薬候補が臨床試験で脱落する原因となっている。

2.2 フェノタイプスクリーニングと iPS 細胞

フェノタイプスクリーニングでは、病態と関係する細胞死や細胞の形態変化、細胞内小器官の異常などの表現型を改善する低分子化合物の探索を、細胞や組織・個体に対して行う(図1)。つまり、標的分子に対するバイアスを一切かけることなく化合物を探索することできる。また、モデル動物や細胞を用いてアッセイを行うため、化合物の膜透過性や、細胞内局在、細胞毒性、他の代償経路による効果の喪失や副作用なども含めた総合的な作用を評価することができる。一方で、フェノタイプスクリーニングにおいては、病態を反映するような評価可能なアウトプットを見出す必要があり、そのアウトプットを指標にできる安定的なアッセイ系の樹立が課題となる。神経疾患を対象とした研究を例にとると、一般的に培養細胞を使用した実験系では表現型が弱いことが多く、初代培養神経細胞を利用した場合にはスループット性や安定性に問題が生じることが多かった。

2006年に山中伸弥博士らによって報告された induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) 技術は、そのような課題を解決し、創薬研究を発展させることができると期待されている技術である[2]。iPS 細胞は人の皮膚や血球細胞に少数の因子を導入することで得られ、様々な細胞種に分化する能力と極めて高い増殖能力をもつ細胞である。この iPS 細胞は再生医療だけでなく、創薬研究においても非常に魅力的な存在となっている。難治性疾患患者の体細胞から iPS 細胞を作製し、それを神経や筋肉、肝臓などの各疾患の病因となる細胞種に分化誘導させることで、原因が未解明な疾患であっても、疾患患者の体内を模した病態モデルを培養皿上で再現できるためである。これにより、病気が発症した後の解析ではわからなかつたような、病気の発症に至るまでに各細胞内でどのようなイベントが起きているかの継続的な解析や、患者数が非常に少なく病因の解析が難しかった希少疾患などについても病態解析が可能になった。また、標的に基づいた創薬探索では不可能であった、病態発症機構が全く未知の疾患についても、疾患患者由来 iPS 細胞を利用した細胞病態モデルを作製し、その表現型に着目することで創薬探索を行うことが可能になった。

そこで、次章では我々の取り組んでいる神経変性疾患に着目して、iPS 細胞の表現型を利用したスクリーニングの実例と現状を紹介する。



	フェノタイプスクリーニング	標的スクリーニング
特徴	特定の表現系を指標に生物学的アッセイ系でのスクリーニング	特定のターゲット（分子）に対する化合物の活性を評価するスクリーニング
メリット	<ul style="list-style-type: none"> あらかじめ想定した標的分子や分子メカニズムは無く、詳細な発症機構が不明であっても創薬スクリーニングを行うことができる 様々な関連分子やpathwayを同時に評価できる 	<ul style="list-style-type: none"> 副作用や投与用量の予測が可能である 比較的安定なアッセイ系が樹立しやすい
デメリット	<ul style="list-style-type: none"> ヒット化合物に対してターゲット同定のステップが必要 安定なアッセイ系の樹立が困難 	<ul style="list-style-type: none"> 病態発症機構の分子機構が明確になっていることが必要 ヒット化合物に対して生物学的アッセイにおける化合物の活性評価が必要

図1. フェノタイプスクリーニングと標的スクリーニング

3. 疾患特異的 iPS 細胞の表現型を利用した創薬スクリーニング

3.1 疾患患者由来 iPS 細胞を利用した病態モデルの作製と薬効評価

疾患患者由来 iPS 細胞を用いた病変細胞の作出は、2008 年の Dimos らによって初めて報告された [3]。彼らは、*Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1)* 遺伝子に変異を持つ家族性筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis; ALS) 患者由来の線維芽細胞より iPS 細胞を作製し、病態と関連した表現型についての記述はないものの、病変細胞である運動神経細胞に分化誘導できることを示した。そして 2009 年には、脊髄性筋萎縮症 (Spinal muscular atrophy; SMA) 患者由来の iPS 細胞から作製した運動神経細胞を既存の治療薬候補の評価に利用した報告がなされており、iPS 細胞を利用した疾患モデルが薬効の評価に有用であることが示された [4]。我々の研究室も TAR DNA-binding Protein-43 (TDP-43) をコードする *TARDBP* 遺伝子に変異を持つ ALS 患者由来の iPS 細胞を樹立した。そこから運動神経細胞を分化誘導したところ、患者剖検で観察されるような TDP-43 の細胞質凝集体など、いくつかの ALS 病態との関連が報告されている表現型を再現することに成功した [5]。さらに、この異常な表現型を改善できる化合物の同定に成功し、疾患特異的 iPS 細胞由来の病変細胞が薬効評価に有用であることを報告した。

また、疾患特異的 iPS 細胞を利用した表現型による薬効評価を取り入れた規模の大きな創薬スクリーニングも、様々な神経変性疾患で報告されている。Barmada らは、ALS 病態改善効果を示す化合物を、患者由来 iPS 細胞から分化させた運動神経細胞を用いて見出した [6]。彼らは、TDP-43 変異体のタンパク量が神経細胞毒性と相關すること、ならびに、TDP-43 の寿命が比較的長いことに着目し、第一段階としてオートファジーを促進する化合物の獲得を目指した。神経細胞でオートファジーを促進することが知られているファーマコフォアに基づいた *in silico* スクリーニングを 100 万を超える化合物に対して行い、オートファジー促進化合物を同定した。第二段階として、TDP-43 変異体による神経細胞毒性に対するこれらの化合物による軽減効果を、*TARDBP* 遺伝子変異を持つ患者由来 iPS 細胞から分化した運動神経細胞を利用して評価し、オートファジー促進化合物が TDP-43 変異体の毒性を抑制できることを示した [6, 7]。2013 年に Ryan らが行ったパーキンソン病の治療薬候補の探索では、 α -synuclein 遺伝子に変異を持つ患者由来の iPS 細胞から分化したドパミン神経細胞を利用している [8]。彼らはゲノム編集の技術を利用して変異を修復したコントロールの細胞と比較して、パーキンソン病患者由来の神経細胞がミトコンドリア傷害ストレスに対して脆弱であることを見出し、翻訳後修飾による myocyte enhancer factor 2C (MEF2C) の不活性化がその原因の一端であることを明らかにした。さらに、約 2,000 の化合物ライブラリーから *MEF2C* 遺伝子の転写を誘導する化合物を探索し、ヒット化合物が実際にパーキンソン病患者由来 iPS 細胞から作製したドパミン神経細胞のミトコンドリア障害ストレスに対する脆弱性を改善することを示した。この研究は、病態発症機構の解明と化合物の評価の両方に疾患特異的 iPS 細胞を利用しておらず、疾患特異的 iPS 細胞が薬効評価だけでなく、病態機構の解析においても非常に魅力的な病態モデリングツールであることを示している。

3.2 疾患患者由来 iPS 細胞を利用したフェノタイプスクリーニング

iPS 細胞は、上に示したようなヒット化合物の薬効評価のためのアッセイにとどまらず、最近では化合物スクリーニングにおいても活用できるようになってきた。例えば、疾患特異的 iPS 細胞から分化させた神経細胞の表現型を指標とした、規模の大きな低分子化合物スクリーニングも報告されている。

2012 年に Lee らは、家族性の自律神経失調症患者由来の iPS 細胞から分化させた神経堤細胞を利用して、約 7000 化合物に対する治療薬候補の探索スクリーニングを行ったことを報告した [9]。この疾患は、神経の発達異常と変性を特徴とする。*IkB kinase complex associated protein (IKBAP)* 遺伝子の変異によるスプライシング異常により、正常な IKAP タンパク質が産生されなくなることが原因であると考えられている。彼らは、患者由来の iPS 細胞から分化させた神経堤細胞は IKAP の発現が低く、遊走性が低下しているなど、いくつかの疾患特異的な表現型を示すことを明らかにしていた [10]。そこで、iPS 細胞から分化させた神経堤細胞の *IKBAP*mRNA の発現量に着目し、野生型 *IKBAP* mRNA の発現上昇を指標とした低分子化合物スクリーニングを行った。その結果、変異によるスプライシング異常を軽減する化合物の同定に成功し、さらにはそのターゲット分子を解析することで IKAP の発現制御機構の一端を明らかにした [9]。

アルツハイマー病については、毒性の高い A β 42 の產生を制御する化合物のスクリーニングが行われている。Brownjohn らは、A β ペプチドを多く発現する 21 番染色体をトリソミーで持つ患者由来の iPS 細胞から分化させた大脑皮質神経細胞を利用して、1200 化合物の中から細胞培養液中の A β 38 または A β 40 に対して A β 42 の產生比率を小さくする化合物の探索を行った [11, 12]。その結果、 γ -secretase 活性に大きな影響を与えることなく、A β 42 の產生比率を制御する化合物の同定に成功した。この化合物の薬効は、既存の薬物標的ではそのメカニズムを説明できず、直接のターゲットは core γ -secretase complex でもなかった。著者らはターゲット分子を同定していないが、このような標的・分子機構が未知の薬物が治療薬候補として得られる点もフェノタイプスクリーニングの魅力である。

これらの例は、原因遺伝子が特定されている患者由来の iPS 細胞を利用した研究であるが、責任遺伝子の分からぬ孤発性の神経変性疾患モデルを用いたフェノタイプスクリーニングも行われている。Burkhardt らは、孤発性 ALS 患者由来の iPS 細胞から運動神経細胞を誘導し、患者剖検で観察されるものと非常によく似た TDP-43 の凝集体形成が、疾患特異的 iPS 運動神経細胞において観察されることを見出した [13]。約 1,800 の化合物に対してハイコンテントイメージング解析技術を利用したスクリーニングを行い、この TDP-43 凝集体の形成を抑制する化合物の探索を行った。これにより、これまで病態モデルの樹立ならびに発症機構の解析が困難であった孤発性の神経変性疾患に対しても、疾患特異的 iPS 細胞を利用したフェノタイプスクリーニングが利用できることが示された。

このように、疾患特異的 iPS 細胞の表現型を利用したフェノタイプスクリーニングの有用性は明らかである。しかしながら、多くの場合 iPS 細胞から目的細胞に分化させ、化合物の活性を評価するためには 1 ヶ月以上を要するうえに、バッチ間での安定性にも不安が残る(図 2)。これは数万種類以上の化合物を取り扱う大規模化合物スクリーニングを実施する上では大きな問題となる。一方で、神経幹細胞に 3 つの転写因子 neurogenin 2 (Ngn2), islet-1 (Isl-1) と LIM/homeobox protein 3 (Lhx3) を発現させることにより、短時間かつ安定的に運動神経細胞を分化誘導できることが報告されている [14]。そこで我々の研究室では、この分化誘導系を利用したスループット性の高いスクリーニング系の樹立を試みた(図 2) [15]。iPS 細胞に上記の 3 つの遺伝子を薬剤依存的に発現誘導したところ、7 日で電気生理学的な活性を示す運動神経細胞に分化させることができた。この方法により作製した家族性 ALS の原因遺伝子である SOD1 遺伝子に変異を持つ患者 iPS 由来の運動神経細胞は、健常者由来または CRISPR-Cas9 を利用したゲノム編集により変異を修復した isogenic control 由来の運動神経細胞では見られない、異常構造 SOD1 の蓄積や生存率の低下といった ALS 病態と関連した表現型を示した。そこで、この SOD1 遺伝子変異依存的な運動神経細胞の生存率低下を指標として、約 1,400 化合物についてフェノタイプスクリーニングを行った。SOD1 変異体を発現する iPS 細胞に、上述の 3 つの転写因子を発現することにより分化誘導した 7 日目の運動神経細胞に各化合物を添加し、14 日目の生存率を評価することで 27 個のヒット化合物を同定した。このうち 14 化合物が Src/c-Abl 経路の阻害剤であったことから、この経路に着目して解析を進めたところ、疾患運動神経細胞ではコントロールの運動神経細胞と比較して Src/c-Abl のリン酸化が亢進していることが明らかとなった。ヒット化合物の 1 つであるボスチニブに焦点をあて、運動神経細胞の生存率を改善する作用機序の解析を行った。その結果、ALS 患者 iPS 細胞から誘導した運動神経細胞で低下しているオートファジー活性を、ボスチニブが改善することを見出した。さらに、TARDBP 遺伝子に変異を持つ ALS 患者 iPS 細胞や C9orf72 遺伝子のイントロン領域に繰り返し配列を保有する ALS 患者 iPS 細胞、孤発性 ALS 患者 iPS 細胞から作製した運動神経細胞に対しても、同様に細胞生存率の改善効果があるか検討を行ったところ、ボスチニブは SOD1 遺伝子変異による運動神経細胞だけでなく、これらの異なる原因で起る運動神経細胞の生存率低下も改善することがわかった。最後に、in vivo での病態改善効果を検討するため、ALS モデルマウスである変異型 SOD1 トランスジェニックマウスにボスチニブの投与を行った。その結果、対照群と比較して、ボスチニブ投与群では異常構造の SOD1 の蓄積が抑制され、発症時期の遅延と寿命の延長が確認でき、in vivo における ALS 病態の改善効果を示した。

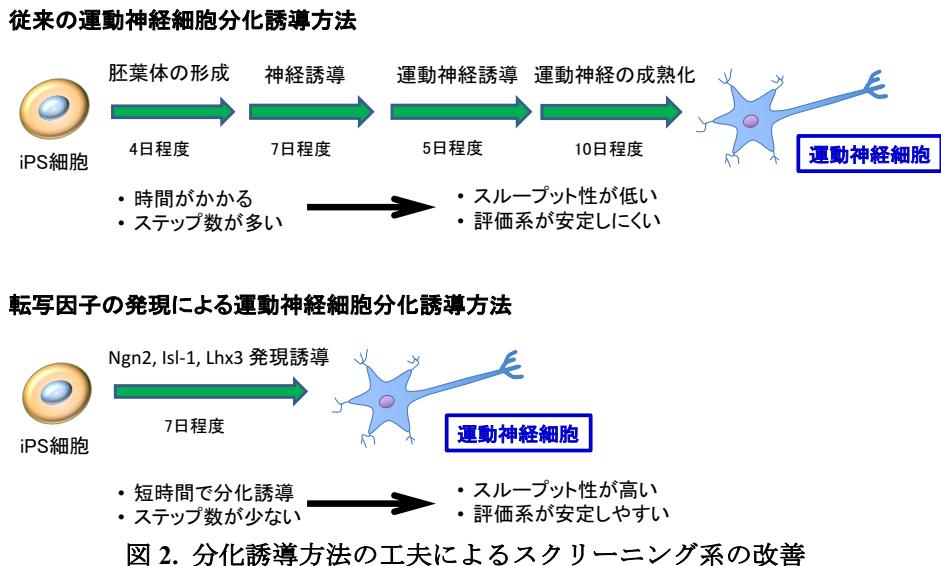


図 2. 分化誘導方法の工夫によるスクリーニング系の改善

4. おわりに

本稿で紹介したように、疾患特異的 iPS 細胞の表現型を利用した化合物の評価実験は、大規模なスクリーニングにも適用できる実現性が高まり、ヒット化合物の効果が実際に *in vivo* で確認されるなど、非常に魅力的な創薬ツールとなっている。しかしその一方で、多くの課題も残されている。分化誘導法の効率化と安定化は、日々改善がなされているものの、多くの細胞種については依然として十分なレベルとは言えない。また、iPS 細胞のクローニング間のバリエーションも今後の大きな課題である。CRISPR-Cas9 を利用したゲノム編集技術の発展に伴い、原因遺伝子を修復したコントロール iPS 細胞の設定が可能となったが、孤発性の疾患など、単一の原因遺伝子変異に依らない疾患においては対照とすべきコントロール iPS 細胞の設定が問題となる。また、フェノタイプスクリーニングにおいて障壁となるヒット化合物の標的同定や、作用機序の解明においては、各 well の中に存在する標的細胞の存在比率が問題となる可能性が考えられる。iPS 細胞からスクリーニング用に大量に調整した細胞は、必ずしも単一の標的細胞ではなく、未分化である細胞や標的細胞とは異なる細胞に分化した細胞が一定数混在すると考えられる。このような細胞の存在下でアッセイを行うことは、標的細胞とは異なる細胞に作用することで細胞非自律的に病態を改善している影響を想定する必要がある。また、標的細胞とは別に代謝酵素発現するような細胞が存在する場合には、代謝された化合物が活性を獲得する可能性もあり、iPS 細胞を利用したフェノタイプスクリーニングでは、化合物の標的分子の探索と作用機序解明はより複雑になると予想される。

まだ改善すべき課題はあるものの、iPS 細胞の登場により、神経変性疾患をはじめとしたこれまで解析が困難であった疾患の創薬研究は大きく前進している。今後さらに技術発展することにより、iPS 細胞技術は神経変性疾患に限らず、多くの疾患研究において重要な役割を担っていくと考えられる。

参考文献

- [1] Swinney, D. C., Anthony, J. How were new medicines discovered? *Nature Rev. Drug Discov.*, 10, 507–519 (2011).
- [2] Takahashi, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-676 (2006).
- [3] Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., Wichterle, H., Henderson, C.E., Eggan, K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 321, 1218-1221 (2008)

- [4] Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F. Jr., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., Svendsen, C.N. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 457, 277-280 (2009).
- [5] Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Adachi, F., Kondo, T., Okita, K., Asaka, I., Aoi, T., Watanabe, A., Yamada, Y., Morizane, A., Takahashi, J., Ayaki, T., Ito, H., Yoshikawa, K., Yamawaki, S., Suzuki, S., Watanabe, D., Hioki, H., Kaneko, T., Makioka, K., Okamoto, K., Takuma, H., Tamaoka, A., Hasegawa, K., Nonaka, T., Hasegawa, M., Kawata, A., Yoshida, M., Nakahata, T., Takahashi, R., Marchetto, M.C., Gage, F.H., Yamanaka, S., Inoue, H. Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci. Transl. Med.*, 4, 145ra104 (2012)
- [6] Barmada, S.J., Serio, A., Arjun, A., Bilican, B., Daub, A., Ando, D.M., Tsvetkov, A., Pleiss, M., Li, X., Peisach, D., Shaw, C., Chandran, S., Finkbeiner, S. Autophagy induction enhances TDP43 turnover and survival in neuronal ALS models. *Nat. Chem. Biol.*, 10, 677–685 (2014).
- [7] Bilican, B., Serio, A., Barmada, S.J., Nishimura, A.L., Sullivan, G.J., Carrasco, M., Phatnani, H.P., Puddifoot, C.A., Story, D., Fletcher, J., Park, I.H., Friedman, B.A., Daley, G.Q., Wyllie, D.J., Hardingham, G.E., Wilmut, I., Finkbeiner, S., Maniatis, T., Shaw, C.E., Chandran, S. Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 109, 5803–5808 (2012).
- [8] Ryan, S.D., Dolatabadi, N., Chan, S.F., Zhang, X., Akhtar, M.W., Parker, J., Soldner, F., Sunico, C.R., Nagar, S., Talantova, M., Lee, B., Lopez, K., Nutter, A., Shan, B., Molokanova, E., Zhang, Y., Han, X., Nakamura, T., Masliah, E., Yates, J.R., Nakanishi, N., Andreyev, A.Y., Okamoto, S., Jaenisch, R., Ambasudhan, R., Lipton, S.A. Isogenic human iPSC Parkinson's model shows nitrosative stress-induced dysfunction in MEF2-PGC1 α transcription. *Cell*, 155, 1351–1364 (2013)
- [9] Lee, G., Ramirez, C.N., Kim, H., Zeltner, N., Liu, B., Radu, C., Bhinder, B., Kim, Y.J., Choi, I.Y., Mukherjee-Clavin, B., Djaballah, H., Studer, L. Large-scale screening using familial dysautonomia induced pluripotent stem cells identifies compounds that rescue IKBKAP expression. *Nat. Biotechnol.*, 30, 1244–1248 (2012).
- [10] Lee, G., Papapetrou, E.P., Kim, H., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., Fasano, C.A., Ganat, Y.M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., Tabar, V., Sadelain, M., Studer, L. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*, 461, 402–406 (2009).
- [11] Brownjohn, P.W., Smith, J., Portelius, E., Serneels, L., Kvartsberg, H., De Strooper, B., Blennow, K., Zetterberg, H., Livesey, F.J. Phenotypic Screening Identifies Modulators of Amyloid Precursor Protein Processing in Human Stem Cell Models of Alzheimer's Disease. *Stem Cell Reports* 11, 870–882 (2017)
- [12] Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., MacLean, G., Orkin, S.H., Livesey, F.J. A human stem cell model of early Alzheimer's disease pathology in Down syndrome. *Sci. Transl. Med.*, 4(124):124ra129 (2012).
- [13] Burkhardt, M.F., Martinez, F.J., Wright, S., Ramos, C., Volkson, D., Mason, M., Garnes, J., Dang, V., Lievers, J., Shoukat-Mumtaz, U., Martinez, R., Gai, H., Blake, R., Vaisberg, E., Grskovic, M., Johnson, C., Irion, S., Bright, J., Cooper, B., Nguyen, L., Griswold-Prenner, I., Javaherian, A. A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.*, 56, 355–364 (2013).
- [14] Hester, M. E., Murtha, M.J., Song, S., Rao, M., Miranda, C.J., Meyer, K., Tian, J., Boulting, G., Schaffer, D.V., Zhu, M. X., Pfaff, S.L., Gage, F.H., Kaspar, B. K. Rapid and efficient generation of functional motor neurons from human pluripotent stem cells using gene delivered transcription factor codes. *Mol. Ther.*, 19, 1905–1912 (2011).
- [15] Imamura, K., Izumi, Y., Watanabe, A., Tsukita, K., Woltjen, K., Yamamoto, T., Hotta, A., Kondo, T., Kitaoka, S., Ohta, A., Tanaka, A., Watanabe, D., Morita, M., Takuma, H., Tamaoka, A., Kunath, T., Wray, S., Furuya, H., Era, T., Makioka, K., Okamoto, K., Fujisawa, T., Nishitoh, H., Homma, K., Ichijo, H., Julien, J.P., Obata, N., Hosokawa, M., Akiyama, H., Kaneko, S., Ayaki, T., Ito, H., Kaji, R., Takahashi, R., Yamanaka, S., Inoue, H. The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Transl. Med.*, 9, eaaf3962 (2017).

//// Cutting Edge ////

非染色細胞画像を用いたフェノタイプスクリーニングの可能性

名古屋大学 創薬科学研究科 藤谷将也、河合駿、加藤竜司

1. はじめに

ご存知のとおり、スクリーニングプロセスは、創薬研究において新薬開発の成功率に大きく影響を及ぼす重要な創薬プロセスである。このプロセスは、化学、生物学、分子生物学、構造生物学などの多種類の学術分野の知識が集結した評価系で成り立っており、さらに機器やソフトウェアのスペックや機能性との組合せによって飛躍的に全体をデザインする「総合芸術」であると捉えられている。

また、そもそもスループットが従来のラボレベルの研究に比べて高いため、ここからは「超」膨大なアッセイデータが得られる。これはまさに近年注目されているビッグデータが量産される現場であり、スクリーニング技術の研究はシミュレーション（演繹的解析）とデータ処理（帰納的解析）という、最新のデータサイエンスが最も要求される分野でもある。まさにスクリーニング手法の研究は、異分野融合の結晶的なものであると言えよう。

スクリーニングは、標的ベースの手法 (target-based screening) と表現型ベースの手法 (phenotype-based screening) に大きく区分できる。前者は、タンパク質の構造やドッキングシミュレーションなどを含む、創薬標的のタンパク質との相互作用に基づいて化合物評価を行う技術であり、後者は細胞を用いたセルベースアッセイをメインとし、そこから得られる様々な細胞の応答を表現型として評価し、これに基づいて化合物評価を行う技術である。

Target-based screening による創薬は 1980 年代から分子生物学的技術と組み換えタンパク質の利用が広まるに従って可能となり、ハイスループットに実験できる技術も開発され、膨大な化合物がスクリーニングされることで、近年までの創薬を長らく牽引してきている。また target-based screening の創薬における効果的な貢献には実績が多く、特に臨床的にその作用機序 (MMOAs: molecular mechanism of actions) が示されている標的に対して、薬の機能性を高く改良する創薬に長けている。しかし一方で、このスクリーニングでは計算環境が理想化・単純化されているため、*in vitro* や *in vivo* での効果や機能性と乖離する場合があり、創薬開発プロセスの後段階に進んだ際、候補化合物に予期しない副作用が確認されてしまうリスクもある。

一方で近年、phenotype-based screening は、その画期的新薬 (First-in-class) の創出率が高いことが注目されつつある。Swinney らの分析[1]では、1999～2008 年の間に行われた創薬開発において、phenotype-based screening では 28 個の first-in-class が見つかっており、target-based screening と比較しても多いことが報告されている。また phenotype-based screening は、実際のヒト細胞やモデル組織などの生体材料を用いた複雑系において、*in vitro* や *ex vivo* と限定的ではあるがスクリーニング段階から有効性や毒性、および代謝能までを含めて評価できることは大きな魅力である。さらに、まだシミュレーションを行うには機構や現象が不明である場合にも、スクリーニングを実施できる。近年では、iPS (induced pluripotent stem) 細胞などの幹細胞技術や CRISPR-Cas9 などの遺伝子編集技術、高度な細胞培養技術 (organ on a chip、organoid、patient-derived xenograft など) の細胞制御の技術革新によって、様々な細胞レベル・組織レベルでの疾患モデルをスクリーニング段階から導入できる可能性が広がりつつある[2-5]。このため、モデルとなる細胞や組織入手することの困難さによって細胞ベースの評価があきらめられていた疾患対象においても、新規なスクリーニング系が構築できる期待が持たれている。

どちらのスクリーニング方法にも長所と短所が存在する。特に、phenotype-based screening には、まだいくつかの解決しなければならない課題が存在すると考えられている。

第 1 に、target-based screening と比較した場合、phenotype-based screening を行う現状の技術の多くはスループットの規模が小さい。細胞培養を伴う phenotype-based screening には、培養容器の極小化が及ぼす培養環境の変化による細胞への悪影響の問題がある。長く安定な培養を行った

めの評価に、384 プレートやこれ以上のスループット性を生むマルチタイアプレートを利用することについてはまだあまり成功していない。

第 2 に、phenotype-based screening はコスト高になりがちである。細胞培養は基本的に、細胞の維持と管理に大量の消耗品を必要とする。細胞によっては、極めて高いタンパク質や因子を用いた培養が必要とされる。また、これを評価するためのキットや蛍光試薬などもコストが高い。さらに、細胞を維持する施設環境の維持、セルバンクの構築と検査のコストは極めて高額である。

第 3 としては、phenotype-based screening の安定性の確保の難しさが挙げられる。細胞の維持と分注、化合物試薬などの維持と分注に比べて、予期せぬバラツキや制御しきれない因子が多く存在する。特に、株化と訓化によって安定な細胞株ではない、初代細胞や幹細胞、または 3 次元組織を用いた評価では、均質な評価材料を大量に準備することはまだ難しい。多くの正常細胞は、維持培養自体ができないものもまだ多く、ロット間の差が大きいのが現状である。

最後に、phenotype-based screening の多くが現状では、限定的なタイムポイントにおけるエンドポイントアッセイであることが挙げられる。細胞の評価は、特定の 1 時点だけの評価数値では、判断しきれない場合が多く存在する。特に、安全性や副作用の評価では、長期曝露の影響などを評価できるかは、その後の動物実験への負担を大きく削減できる可能性を秘めているが、市販されている phenotype-based screening 用装置は、長期培養が想定されていないことが多い。

近年、スループット性や精密な評価を目指して High Content Analysis (HCA) によるアプローチが強力な研究ツールとしてスクリーニングにも多用されている[6]。HCA では、培養細胞の評価として「表現型」の最たるものである顕微鏡画像から高次元の情報を抽出し、その計測データを用いてスクリーニング用の評価を行う。HCA は特に、ハードウェアとソフトウェアのデザインの性能のかけ算によって、従来の分子生物学的手法では取得することができなかつた細胞機能を示唆するビッグデータを生み出すことができる。しかし、HCA で現在活用されているのは、シグナル強度の強い「蛍光染色画像」である。これは、極めて高解像度かつ安定なデータを取得できるが、上記に挙げた課題 4 点を全て解消できるまでには至っていない。

本稿で取り上げるのは、「非染色の細胞画像」を用いた、ハイコンテンツなデータ収集とデータ処理による細胞評価技術『細胞形態情報解析技術』(図 1) である。細胞を一切破壊せず、培養中の画像を撮影するだけで細胞を評価することが可能な本手法は、上記課題を全てクリアし、phenotype-based screening の 1 手法として大きなポテンシャルを有していると考えている。

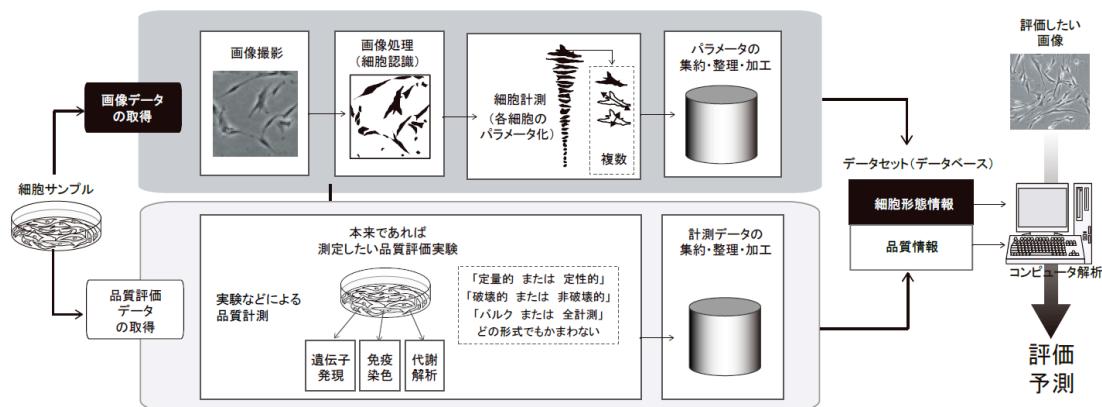


図 1. 細胞形態情報解析を用いた細胞品質評価のコンセプト図

細胞形態情報解析技術のコンセプトは、経時的に得られる「細胞の形」のリアルタイム計測データと、形を計測した細胞を実際に評価したときの「実測状態」を、コンピュータの機械学習によってモデル化し、細胞の形の履歴という非破壊的に得られるデータだけを用いて、撮影された状態を「予測的に評価する」ものである。

もともと、本技術は「細胞そのものの状態や品質」を非破壊的かつ定量的に評価する技術として構築された[8-9]。これは、細胞を医薬品と捉えるとき、近年発展しつつある細胞性医薬品（再生医療等製品や細胞加工物）などのスクリーニングや評価に用いることができる。

我々はこの細胞の形を計測する技術をさらに「細胞の形をインジケータとして細胞の置かれた環境を評価する手法」として応用し、phenotype-based screeningとしての可能性も検証している。

本稿ではその実例をいくつか紹介することで、創薬スクリーニングにおける非染色細胞画像を用いた phenotype-based screening としての可能性についてご紹介したい。

2. 細胞形態情報解析の基礎

「細胞を観察する」という作業は、細胞培養の歴史においては 1907 年の Ross Granville Harrison による組織培養における観察を源流として、現在でも欠かすことのできない細胞評価技術の 1 つである。細胞画像として記録される顕微鏡下における細胞の形状は、細胞品質の一端を反映する情報として重要であることが広く認知され、現在も世界中のどのような細胞培養の現場においても、細胞培養を成功させるための重要なスキルとして、細胞の形の観察が用いられている。日々の細胞の形の観察は、マーカー染色に勝る評価法だ、という声すら少なくないのである。

実際「生物の状態を目で見る」という行為自体は、細胞に限らず様々な生物を使った多くのバイオ製品の製造（醸造製品の発酵や生物製剤の製造）において行われており、品質管理において重要かつ有効な技術・スキルであることが広く知られている。

しかし現状として、細胞培養画像を定量的な数値データとして細胞品質の安定化や、細胞培養プロトコルの最適化に活用している例は極めて少ない。未だテクノロジーが、熟練者を超えることができていない、極めて難しい判定が「細胞の形を見た判定」であるとも言える。

一方で、近年の画像を用いてコンピュータが行える作業は、人工知能などの高度なデータ解析・機械学習のテクノロジーの発展と共に飛躍的に現実社会を変えている。将棋や碁において人に勝利するコンピュータや、自動運転を可能にするコンピュータも、全ては画像情報をインプットとして活用している。このため人の顔判定はおろか、写真や動画の撮影場所やセリフの判定まで、画像処理を活用したコンピュータ解析は、人間には不可能な作業を現実に実現している。

我々は、このような現状にヒントを受け、伝統的な実績と有効性を誇る「細胞の形」という情報と、発展著しい「コンピュータによる学習」という技術融合によって、細胞品質を非破壊的に予測できる技術を構築してきた[10-11]（図 2）。

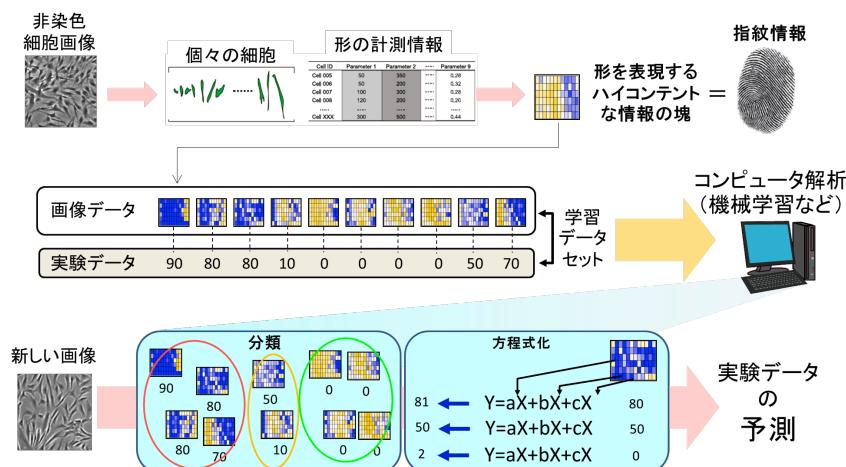


図 2. 細胞形態情報解析による細胞品質予測のイメージ

細胞形態情報解析の基盤技術は、「機械学習」「データ処理」「画像処理」「撮影」の4つに大きく区分して考えることができる[10] (図3)。

人間を超えるためには、人の作業量を上回る頻度と精度で、細胞の情報収集を行うことが第一の必須技術である。我々は株式会社ニコンとの共同研究により、全自动細胞観察装置 BioStationCT を活用した大量の位相差顕微鏡画像をデータベースとする技術を構築した。結果、得られる大量の画像からは、リアルタイムな細胞の変化を内包する経時的な計測情報をビッグデータとして得られることがわかった。また、得られる画像から様々な細胞形態特徴量を抽出することによって、1枚の細胞画像を記述する高次元データを出力することに成功した。現状我々は、細胞1個1個の形態の情報と共に、リアルタイムに得られる大量画像によって経時的な細胞集団の数値情報を取得し、これらを組み合わせることで様々な細胞品質を予測評価できることがわかっている[7-10]。

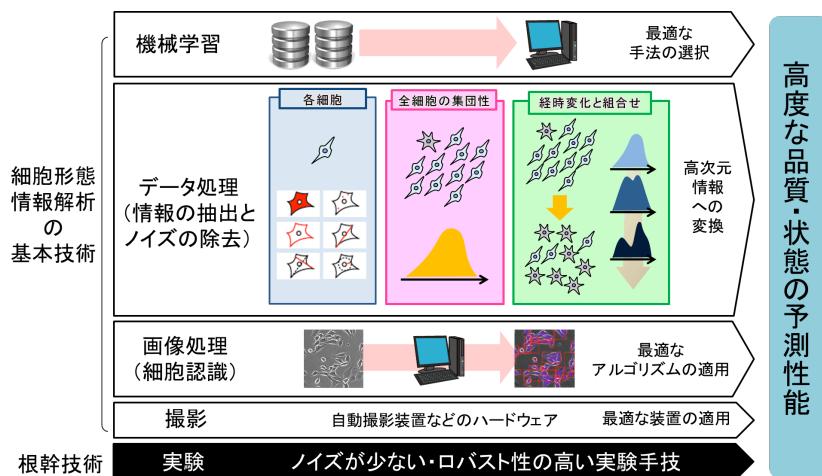


図3. 細胞画像情報解析を成立させる技術融合

細胞から何かしらの数値情報を引き出すことは、実は既に市販されている多くの装置やツールが実現している。しかし、細胞形態情報解析で重要なのは、大量の画像の取得と画像処理によって得られた「ビッグデータ」をいかに処理するかというデータ解析技術と、これをコンピュータに機械学習させる技術である。

近年の人工知能に対する過剰な期待の膨らみは、「とにかくデータがたくさん取得できれば、あとはコンピュータがなんとかしてくれるだろう」という感覚を生みがちであるが、これは大きな誤解である。人工知能などの機械学習で重要なのは、データの量と質である。量だけでは、実はコンピュータ解析は「何も生み出すことはできない」。特に、細胞評価で得られるデータにおいて、将棋や碁のデータのように「計算すれば最後に答えが必ず出る」というような課題は極めて少ない。実際にどうなるかは、「実験データ」で実証するしかない。このため、この実験データが少ないと、もしくは悪ければ、どんなに高度な機械学習でも、その実用性は極めて低い。

筆者らは、データ解析には遺伝子解析やバイオデータ解析などのバイオインフォマティクス解析のノウハウを用いることで、細胞画像から得られるビッグデータにおけるノイズデータ等の最小化を行い、シミュレーションなどを活用した実験手技の改善によって学習データとしての「実測データ」のクオリティを上げることを実現している。言い換えれば、これらが精錬されていなかった時期には、どんなに画像を取得しても細胞評価を安定に予測することは難しかった。

このため、細胞形態情報解析技術は、スクリーニング手法のための研究と似ており、手法そのものだけでなく、ハードウェア・ソフトウェアとの技術融合と総合デザインが鍵を握る。

3. 細胞形態情報解析を用いた神経細胞制御因子のスクリーニング

近年、神経変性疾患は医薬品のアンメットメディカルニーズを満たすための新規マーケットとして、大きな期待を持たれている。しかし、神経細胞を用いた評価系にはまだ効率的なものは少ない。そもそも神経細胞はデリケートな細胞であり、株化されたモデル細胞であってもその培養や品質維持にはスキルが必要とされる。また、株化細胞を含め、初代細胞やiPS細胞由来の神経細胞などは特に、表現型として薬剤等への応答を示す細胞は存在割合が限定的である。即ち、神経細胞集団の中で、一定の割合以下の細胞しか顕著な表現型を示さないことが多い。このため、細胞集団をbulkで評価するようなqPCRやELISAなどでは、細胞応答にバラツキが大きいときや検出限界となってしまうことが多い。このため、「局所的な表現型」を感度よく検出できる画像による評価系は有効である。我々は、このような神経細胞に対する薬剤評価系として、我々の行う「高次元の細胞形態情報」を用いた解析を導入することを試みた。

モデル対象として評価した分子は、ニューロンにおいてNGF活性増大効果が知られる天然有機化合物Lyconadin Bである。天然有機化合物は、複雑な骨格によって創薬分子としての合成経路の構築が難しいとされ、多くの天然物ライブラリは企業内スクリーニングでは優先順位が高くなりにくい。しかし、一方で歴史的には、天然有機化合物に見られるような骨格を持つ分子は、副作用や治験での脱落数が少ないシーズ候補分子であることも知られている。我々は、この全合成経路を達成した名古屋大学創薬科学研究科・横島聰教授、福山透特任教授との共同研究を行うことで、合成経路が解明された有力なシーズ候補天然有機化合物モデルの一つとしてこれを選択した。

Lyconadin BのようにニューロンのNGF発現能を制御する分子のスクリーニングでは、現在HCAのようなエンドポイントの蛍光染色アッセイが多く用いられる。非破壊的な方法としては、NGF産生細胞(第一細胞)へと分子を作らせた後、その上清をPC12細胞のような応答細胞(第二細胞)へと興じ、神経突起伸長を画像計測などで計測する方法が採られる。しかし、大きな伸長を見せる神経細胞の割合は全てではなく、計測方法や画像数によってはバラツキが生じてしまう。また、PC12細胞などの培養には、器材のコラーゲンコーティングが必須であるが、網羅的なスクリーニングとするにはコスト的に高く、ロットによる影響も否めない。さらに、神経突起伸展に数日間の培養が必要なことも知られている。そこで我々は、第一細胞(ヒトアストロサイトマトーマ1321N1細胞)の細胞形態情報解析を行うことで、経時的な細胞集団の「形態変化プロファイル」を数値化し、いかに効率的かつ迅速に、Lyconadin Bの薬効を事前評価予測できるかを検証した(図4)。

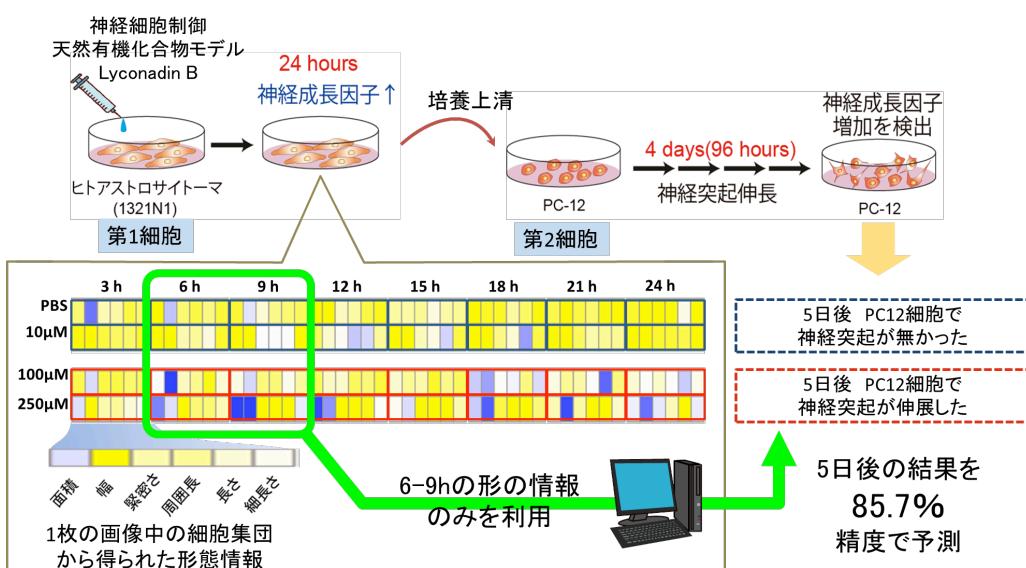


図4. 細胞形態情報解析を用いた神経突起伸長を制御する薬剤スクリーニング

結果、たった6~9時間の間の細胞形態情報のみを用いて、第二細胞であるPC12の神経突起伸長の有無を85.7%という高精度で将来予測できることがわかった。従来、第一細胞・第二細胞の二つを用いて行っていた評価に5日間かかっていた手法に対し、本手法は薬剤曝露後9時間という約13倍のスクリーニングの効率化ができたと言える[11]。

これは即ち、従来は表現型の存在が認識されていなかったような細胞や、培養時期であっても、経時的な形態変化のプロファイルを充分量取得し、有効なコンピュータによる学習モデルを構築すれば、薬剤効果を非染色の画像のみから、時間的にもコスト的にも効率的なスクリーニングが可能であることを示している。

4. 細胞形態情報解析を用いた幹細胞制御因子のスクリーニング

近年、幹細胞は様々な細胞培養技術の発展により、極めて簡単に入手することが可能となった。また、幹細胞を細胞源として、多種多様な疾患のモデルとなるような評価用細胞を、自在に分化培養して得ることも現実味を増している。即ち、かつて「希少で入手困難なもの」や「特定の患者のみに限定されたロット差の大きな材料」と認識されていたヒト細胞は、「ロットや個体をも選定可能な、安定かつ大量に供給可能な材料」と大きく変わり、細胞を用いたin vitro評価系のバリエーションとポテンシャルは大きなパラダイムシフトを迎えている。

しかし、現実的には幹細胞の未分化維持や分化培養は、まだ発展途上であり、数多くのプロトコルが乱立している。さらにその培養コストは極めて高い。このような培養プロトコルの標準化やコストダウンのため、近年細胞培養用の培地や添加因子を明らかにした(defineした)培地開発が加速している。即ち、古くから用いられてきた血清や動物由来成分のような正体不明かつ精製コストの高いタンパク質因子を、合成方法が確立しており、低価格で安定的に供給できる化学物質へと置換した培地の開発である。このための小分子化合物ライブラリからは、現在では様々な疾患の治療薬候補と考えられる分子も見つかりつつあり、その幹細胞を制御する化合物分子のスクリーニング研究は一つの重要な研究となりつつある。

幹細胞の分化プロトコルの多くは長く複雑である。このため、添加因子の探索で最も難しいのは、「どの時期に」「どれだけの量を」「どんな組合せで」加えるべきかという、爆発的な条件数を検証しなければならない煩雑性である。このような膨大な条件の探索では、「迅速性」と「コスト」が極めて大きな影響力を持つ。

我々は、骨隨由來の間葉系幹細胞(hBMSM)を幹細胞の一つのモデルとして、hBMSMの脂肪分化誘導を促進する分子の探索に、細胞形態情報解析を応用する検証を行った(図5)。評価対象としたのは、幹細胞のシグナルカスケードへの影響が知られる阻害剤5種である。この阻害剤を幹細胞の維持培養初期に添加し、その後約2週間の脂肪分化誘導を行った。

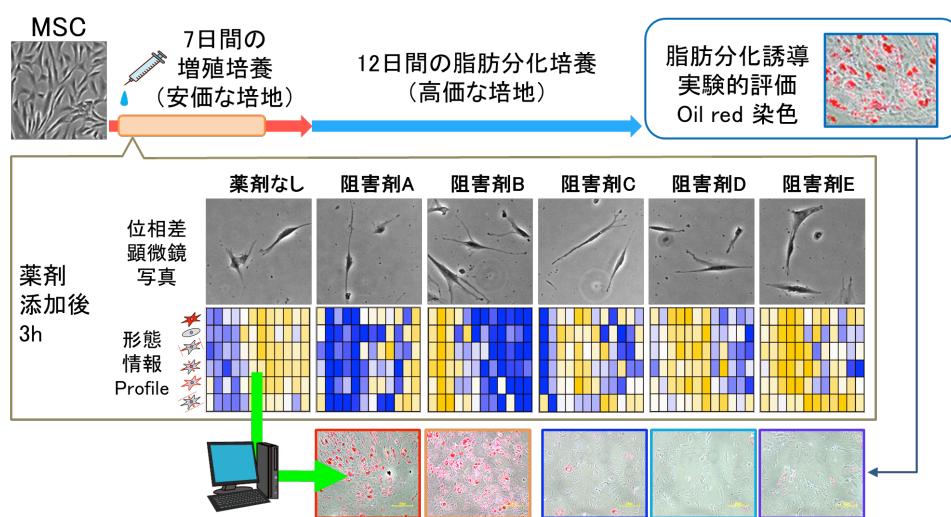


図5. 細胞形態情報解析を用いた間葉系幹細胞の分化促進薬剤スクリーニング

結果、阻害剤の添加直後から数日間の経時的な細胞画像と、約 20 日後の脂肪分化誘導の染色確認結果とのデータを蓄積したところ、まずたった 3 時間で、約 20 日後の脂肪分化傾向と相關する細胞形態情報のプロファイルが得られることがわかった。さらにこれらのデータを機械学習することによって、非染色画像から得られた細胞形態情報のみを用いて、高精度で 20 日後の脂肪分化傾向を定量的に予測できることがわかった。

即ち、従来であれば約 20 日かかる分化誘導結果を約 160 倍早く予測することができ、余計な分化培養を省略できる時間・コスト共に効率的なスクリーニングが可能であると言える。

5. まとめ

本稿では、スクリーニング技術の可能性を有する「非染色細胞画像の画像情報解析」の全貌と、フェノタイプスクリーニング技術としての可能性について紹介させて頂いた。現在本技術は、実際の創薬ライブラリや独自の天然物ライブラリへの展開に向けて精度および頑強性の向上中であるが、近い将来、他国に負けない独自性と効率性をもって国内の創薬スクリーニングの現場において貢献できることを強く願っている。

謝辞

本研究の成果の一部は、株式会社ニコンとの共同研究において支援を受けて遂行されました。本研究を支えて下さいましたシステムセル事業開発室・清田泰次郎氏、魚住孝之氏、紀伊宏明氏に深く御礼申し上げます。また、本研究の成果の一部は、NEDO 若手グラント 09C46036a (H21～H25)、JST S-イノベ(H22～H25)、科研費挑戦的萌芽 23650286(H23～H25)、26630427(H26～H27)、野口遵研究助成金(H26)の支援のもとで遂行されました。この場を借りて感謝申し上げます。また、本研究のモデル化合物として Lyconadin B を提供して下さいました名古屋大学創薬科学研究所・天然物化学分野・横島聰教授、福山透特任教授に深く御礼申し上げます。また、本研究の解析基盤の構築に尽力してくれた名古屋大学創薬科学研究所・細胞分子情報学分野・岡田法大氏に深く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] DC, Anthony J: How were new medicines discovered? *Nat. Rev. Drug Discov.* 10 (7): 507-519. (2011)
- [2] Kaufmann M, et al.: High-Throughput Screening Using iPSC-Derived Neuronal Progenitors to Identify Compounds Counteracting Epigenetic Gene Silencing in Fragile X Syndrome. *J. Biomol. Screen.* 20 (9): 1101-1111. (2015)
- [3] Horvath P, et al.: Screening out irrelevant cell-based models of disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15 (11): 751-769. (2016)
- [4] Phan DT, et al.: A vascularized and perfused organ-on-a-chip platform for large-scale drug screening applications. *Lab on a chip.* 17(3):511-520. (2017)
- [5] Pamies D, Hartung T: 21st Century Cell Culture for 21st Century Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 30 (1): 43-52. (2017)
- [6] Giuliano KA, Haskins JR, Taylor DL: Advances in high content screening for drug discovery. *Assay Drug Dev. Technol.* 1 (4): 565-577. (2013)
- [7] Matsuoka F., et al.: Morphology-based prediction of osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*, 8(2), e55082 (2013)
- [8] Sasaki, H., et al.: Label-free morphology-based prediction of multiple differentiation potentials of human mesenchymal stem cells for early evaluation of intact cells. *PLoS ONE*, 9(4):e93952 (2014)
- [9] 加藤竜司、蟹江慧：「画像を用いた細胞加工物および培養工程の評価 第 10 章 再生医療・細胞治療のための細胞加工物評価技術」、CMC 出版、ISBN-13: 978-4781311852 (2016)
- [10] 加藤竜司：「再生医療の細胞培養技術と産業展開 第 2 章 細胞品質のモニタリング評価・モデル化」CMC 出版、ISBN 978-4-7813-0948-4 (2014)
- [11] Kawai S, et al.: Morphological evaluation of non-labeled cells to detect stimulation of nerve growth factor expression by Lyconadin B., *J. Biomol. Screen.* 21, 795-803. (2016)

//// Cutting Edge ////

ケミカルスペースネットワーク（CSN）を用いた SAR 解析

アスピオファーマ株式会社 国本 亮

1. はじめに

低分子創薬の一般的なプロセスは、まず標的分子（あるいは疾患フェノタイプ）を同定し、スクリーニングによってヒット化合物の探索を行う。その後、構造最適化を行うことで開発化合物を獲得し、臨床試験へと進む。膨大なスクリーニングライブラリーを用いたリード化合物の探索や、無限に広がる構造変換の中から化合物の構造最適化を行うには、インシリコによる構造活性相関（Structure-Activity Relationship: SAR）解析が必要不可欠である。

化学空間（ケミカルスペース）は、全ての存在する低分子を一つの空間に投影する概念である[1]。ケミカルスペースを適切に表現し、解析することは、スクリーニングデータの解析や化合物の構造最適化などに大きく寄与すると考えられている。ケミカルスペースの可視化方法として、仮想的な多次元空間に投影する方法が用いられるが、未だにその表現方法は一律ではない。グラフ理論に基づき推定された化合物の総数は10の60乗以上と考えられており[2,3]、この膨大な数がケミカルスペースの可視化を困難にする最大の原因と言える。このことから、ケミカルスペースは限定された領域、すなわち目的に合わせた一部の化学的特徴を有する化合物群に限定した解析が行われてきた。最も一般的な可視化手法は、分子の位置を特徴ベクトルによって決定する座標に基づいた方法である[4]。特徴ベクトルは、化学的特徴や分子のトポロジーによって算出される記述子を用いて作成される。この特徴ベクトルに基づく手法は、空間上での距離が直接分子の類似度を表現しているため、直感的に理解しやすい。一方で、このような手法を用いた場合の特徴ベクトルは多次元になることが多い。そのため、可視化する場合は、主成分分析などの次元削減手法によって二次元、あるいは三次元空間に写像されるが[5]、情報の著しい欠損という大きな問題を伴う。

特徴ベクトルの写像とは異なる観点から、視覚的に明確な化合物間の関係性を表現する方法としてケミカルスペースネットワーク（Chemical Space Network: CSN）がMaggioraらによって提案された[6]。CSNは、全ての分子ペアについて関係性を明示的に説明することによって構築される。最も一般的なCSNは、分子の類似性に基づいており、ネットワークの頂点は化合物を示し、辺は二つの化合物間の類似関係を表現する。本稿では、創薬研究に有用なCSNを用いたSAR解析について、最新の研究動向を紹介する。

2. CSNに用いられる化合物類似度指標

化合物間の類似関係を定義する指標は、CSN を設計する上で重要な因子の一つである。本章では、一般的に用いられてきた類似度指標と、最近提案された類似度指標について紹介する。

2.1 従来の化合物の類似度指標

代表的な化合物の類似度指標は、化学記述子を用いた手法と部分構造を用いた手法の二種類がある。

化学記述子を用いた手法は、化合物の類似性を比較する一般的な手法である[7]。化合物ごとの特徴ベクトルとして、多次元の数値記述子あるいはフィンガープリントを算出し、それらの比較を行う。一般的に特徴ベクトルの比較には、数値記述子の場合は相関係数、フィンガープリントの場合は Tanimoto 係数をそれぞれ用いる[4,8,9]。この手法は、類似度を数値化することが可能であり、用途やデータセットによって類似関係の閾値を変更することが可能である。一方で、類似度の尺度が記述子に依存するため、創薬化学研究者の直感にそぐわない類似化合物が導き出されることもある。一般的に SAR 解析や構造最適化はアナログ化合物を中心に行われるため、直感にそぐわない類似化合物は解析に適さない。

部分構造を用いた手法は、化合物ペアが共通の部分構造を有しているか否かに基づく[10]。Matched Molecular Pair (MMP) の概念をこの部分構造に基づいた類似度解析に用いることが可能である[5]。一般的な部分構造検索は、共通部分構造を予め指定する必要があるが、MMP は一つの分子内の一つの置換基が変換された別の化合物を類似化合物ペアとして定義する。MMP による類似化合物ペアは、創薬化学研究者にとって直感的に分かりやすいものが導き出される。しかし、部分構造を用いた類似度指標は、共通部分構造を有しているか否かのバイナリーの関係性しか導くことができない。

2.2 共通部分構造検索を用いた化合物類似度指標

前項にて化合物の類似度指標の従来法について利点と欠点を説明した。本項では、記述子計算と部分構造検索の両者の利点を組み合わせた Maximum common substructure-based Tanimoto coefficient (Tc_{MCS}) について、紹介する[11]。2つの化合物 A と B の間の Tc_{MCS} の計算方法は、分子構造（あるいは部分構造） S の有する共有結合の数 $|S|_b$ を用いて以下の式で定義した。

$$Tc_{MCS}(A, B) = \frac{|\text{MCS}(A, B)|_b}{|A|_b + |B|_b - |\text{MCS}(A, B)|_b}$$

$\text{MCS}(A, B)$ は、分子構造 A と B の最大共通部分構造を示す。 Tc_{MCS} は分子骨格を表現する化学グラフに基づいた共通部分構造の共有結合の数の割合によって算出される。グラフとしての部分構造に基づいた類似度となり、創薬化学研究者にとって直感的に理解しやすく、かつ、類似度を数値化することが可能となり、目的や条件に応じて閾値を調整できる指標を実現した。具体的な Tc_{MCS} の計算例を図 1 に示す。

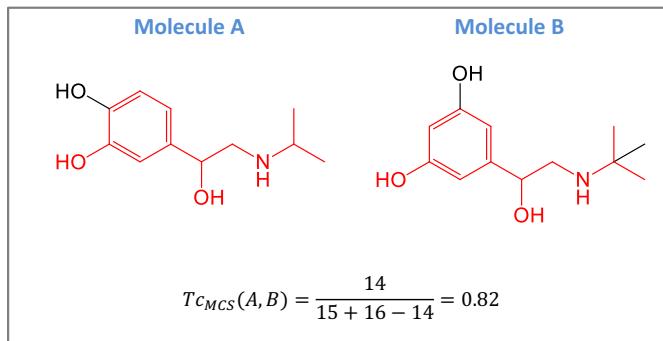


図 1. MCS を基にした化合物の類似度計算手法

Zhang, B. et. al.; *J Comput-Aided Mol Des* **29**, 937-950 (2015) [11]より抜粋

2.3 非対称な化合物類似度指標

前項までに紹介した類似度指標は全て対称的な類似度指標であり、どちらをクエリ・検索対象にしても、同一の類似度が得られる。本項では、非対称性の類似度計算手法である Tversky Index (Tv) について紹介する[12]。Tv では、2つの化合物 A と B のフィンガープリントの重なりを以下の式にて定義する。

$$Tv(A, B, \alpha, \beta) = \frac{c}{\alpha(a-c) + \beta(b-c) + c}, \alpha, \beta \geq 0$$

a と b は、化合物 A と B のフィンガープリントのビット数を示し、c は化合物 A と B の共通するフィンガープリントのビット数を示す。 $a-c$ および $b-c$ は、それぞれ化合物 A および B 固有のフィンガープリントのビット数を示す。パラメータ α および β はそれぞれ化合物 A および B に対する重みづけ因子である。 $\alpha \neq \beta$ の場合、化合物 A と化合物 Bを入れ替えて Tv を計算すると異なる類似度が得られる。一方で $\alpha = \beta = 1$ の場合、Tv は Tanimoto 係数と一致する。また、 $\alpha = 1$ 、 $\beta = 0$ の場合、重みづけは全て化合物 A の特徴となり、 $Tv(A, B, 1, 0) = c/a$ は、化合物 A の特徴を化合物 B の中から探索することになる。このことから、Tv の重みづけを変更することにより、化合物間の非対称性の類似度指標を算出することが可能になる。

前項で示した MCS に基づいた類似度指標と Tv を組み合わせた Maximum common substructure-based Tversky index (Tv_{MCS}) を以下の式にて定義する[15]。

$$Tv_{MCS}(A, B, \alpha, \beta) = \frac{|MCS(A, B)|_b}{\alpha(|A|_b - |MCS(A, B)|_b) + \beta(|B|_b - |MCS(A, B)|_b) + |MCS(A, B)|_b}, \alpha, \beta \geq 0$$

$|A|_b - |MCS(A, B)|_b$ は化合物 A のみが有する部分構造、 $|B|_b - |MCS(A, B)|_b$ は化合物 B のみが有する部分構造を示す。Tv と同様に、 $\alpha = \beta = 1$ の場合、本スコアは対称性な Tc_{MCS} と一致する。一方で、 $\alpha = 2$ 、 $\beta = 0$ の場合、 Tv_{MCS} の式は

$$Tv_{MCS,2}(A, B, 2, 0) = \frac{|MCS(A, B)|_b}{2|A|_b - |MCS(A, B)|_b}$$

となる。さらに、 $Tv_{MCS,2}(A, B, 2, 0) = 1$ を示す化合物 A と化合物 B の関係は、 $|A|_b = |MCS(A, B)|_b$ となることから、化合物 A は化合物 B の部分構造であることを示す。以上のことから、 Tv_{MCS} は、従来の類似度指標では困難だった分子サイズが異なる化合物に対しても、部分構造の観点から類似性を導くことを可能にした[13]。

3. CSN を用いた SAR 解析

CSN は、化合物の類似度に基づいてネットワークを構築することで、ケミカルスペースを可視化する。前章で示した類似度指標に基づいた CSN の概略を表 1 に示す[13,14]。類似度指標ごとにそれぞれ特徴があることが分かる。それぞれの CSN について、その理論的な傾向や統計量については議論が行われてきたが、具体的なスクリーニングデータを用いた SAR 解析研究については、多くの事例が存在するわけではない。本章では、CSN を用いた SAR 解析について 2 つの事例を紹介する。

表 1. ケミカルスペースネットワーク (Chemical Space Network: CSN) の種類

類似度指標	略称	特徴
Tanimoto similarity threshold (THR) score	THR-CSN	Tanimoto係数を用いた化学記述子によるCSN ネットワーク密度、あるいは類似度の閾値を設定してCSNを構築 数値により全ての化合物間の類似度を算出することが可能
Matched Molecular Pairs (MMPs)	MMP-CSN	部分構造に基づいたCSN 共通骨格を有しているか否かのバナリの関係でCSNを構築 直感的に理解しやすい類似性関係
Maximum common substructure-based (MCS) Tanimoto similarity threshold score	MCS-CSN	部分構造とTanimoto係数を組み合わせた類似度によるCSN ネットワーク密度、あるいは類似度の閾値を設定してCSNを構築 直感的に理解しやすい類似性関係
Tversky Index (Tv) score	Tv-CSN	Tversky Indexを用いた化学記述子によるCSN 化合物間で非対称な類似度を有するため、有向グラフ ネットワーク密度、あるいは類似度の閾値を設定してCSNを構築 ネットワークにおけるスケールフリー性の増加
Maximum common substructure-based (MCS) Tversky Index score	Tv _{MCS} -CSN	部分構造とTversky Indexを組み合わせた類似度によるCSN 化合物間で非対称な類似度を有するため、有向グラフ ネットワーク密度、あるいは類似度の閾値を設定してCSNを構築 直感的に理解しやすい類似性関係 ネットワークにおけるスケールフリー性の増加

3.1 MCS-CSN を用いた SAR 解析

CSN の有用な活用方法として、単一創薬標的の活性化合物に関するケミカルスペースの可視化が挙げられる。具体例として、既知の Glucocorticoid receptor (GR) 阻害活性化合物について作成した CSN を図 2 に示す。CSN におけるノードの色は、青色が上市薬を示し、その他の色は赤色から黄色を経て緑色に変化するにしたがって活性値の高い化合物を示す。図 2 における左図 (MCS-CSN) は Tc_{MCS} 、右図 (THR-CSN) はフィンガープリントの一種である ECFP4[15]による Tanimoto 係数を用いている。なお、ネットワーク密度 2.5% の閾値で CSN は構築された。ネ

ネットワーク密度とは、ネットワークに含まれる関係性の緊密さを示す指標である。図から、MCS-CSN、THR-CSN とともに高いモジュール性（ネットワークをサブクラスターに分割する精度）と次数相関（リンクの両端のノードの結合次数の相関性）を有していることが分かる。本稿では省略するが、MMP-CSN についても同様の傾向が見られる[16,17]。その中でも MCS-CSN は、化合物クラスターを最も明確に導くことが示された。これを裏付けるように、MCS-CSN は他の CSN と比較して高いクラスター相関を有していることが明らかになっている[11]。以上のことから、MCS-CSN は、活性化合物群の局所的な類似関係や骨格サブグループを把握することに適した手法であると言える。

また、図 2 で示した MCS-CSN では、上市薬が一つの大きなサブグループを形成していることが分かる。このことから、単一標的に対する上市薬は、同じ標的に活性を有する他の化合物群と比較して、部分構造を共有している可能性が高いと考えられる。実際に、今回示した GR の例だけでなく、39 種類の創薬標的に対して同様の解析を行った結果、MCS-CSN が他の CSN に比べて上市薬が同じクラスターを形成しやすいことが分かった[11]。以上のことから、MCS-CSN を用いた SAR 解析を通して、ドラッグライクな骨格を探索することも可能と考えられる。

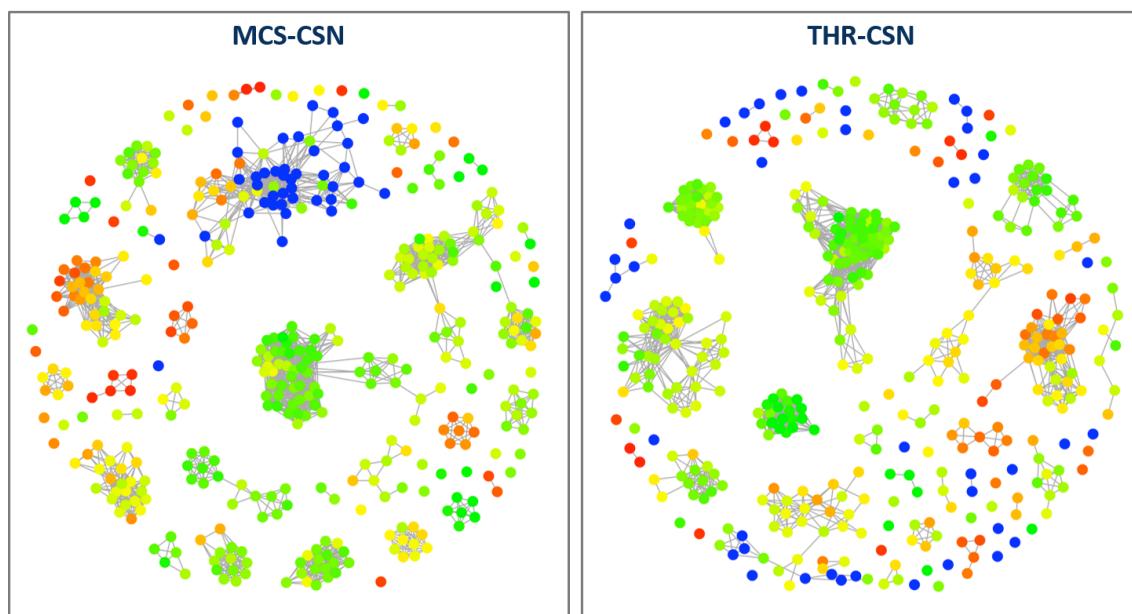


図 2. Glucocorticoid receptor 阻害活性化合物の CSN

Zhang, B. et. al.; *J Comput-Aided Mol Des* **29**, 937-950 (2015) [11]より抜粋

3.2 CSN を用いた構造展開の可視化

CSN は活性化合物のケミカルスペースの可視化だけでなく、構造展開を可視化することもできる。本項では、2.3 項で紹介した非対称性の類似度指標、 $T_{v_{MCS}}$ による CSN ($T_{v_{MCS}}\text{-CSN}$) を用いて、化合物の構造最適化の道のり（パスウェイ）を解析した事例について示す。図 3 は、Melanocortin receptor 4 (MC4R) の活性化合物について、 $T_{v_{MCS}}\text{-CSN}$ ($T_{v_{MCS,2}}(A, B, 2) > 0.7$) を

用いた化合物パスウェイである[18]。図3左は T_{MCS} -CSN の全体像であり、図3右は左図の赤線上にある 10 個の化合物を示した。矢印上の数値は共通構造を有する化合物 A から化合物 B への T_{MCS} の値である。また、化合物横のドットは活性値を表し、赤色から白色を経て緑色に変化するにしたがって高い活性値であることを示す。パスウェイ上の化合物群は一貫して部分構造を共有しており、起点となっている化合物から類似化合物のステップが進むにつれて構造が大きくなっていることが分かる。さらに、化合物の構造が大きくなるにしたがって、活性値が上昇し、構造が最適化されていく様が観測できる。構造展開がある程度進むと急激な活性の低下（Activity cliff）が見られるが、その後また展開が進み構造が大きくなるにつれて活性が上昇する。以上のことから、 T_{MCS} -CSN のパスウェイの追跡は、構造展開の可視化に利用可能であると考える。

本項では、構造最適化のための可視化といった、創薬化学研究者にとって馴染みやすい CSN の利用方法について紹介した。 T_{MCS} -CSN は、分子量の小さい化合物を中心とし、その周辺に分子量が大きい化合物群がネットワークを形成する特徴を有している。そのため、化合物のサイズ増加を伴ったパスウェイを追跡することに効果を発揮し、HTS ヒット化合物から現在までに行われてきた構造最適化における SAR 情報取得に貢献することが期待できる。

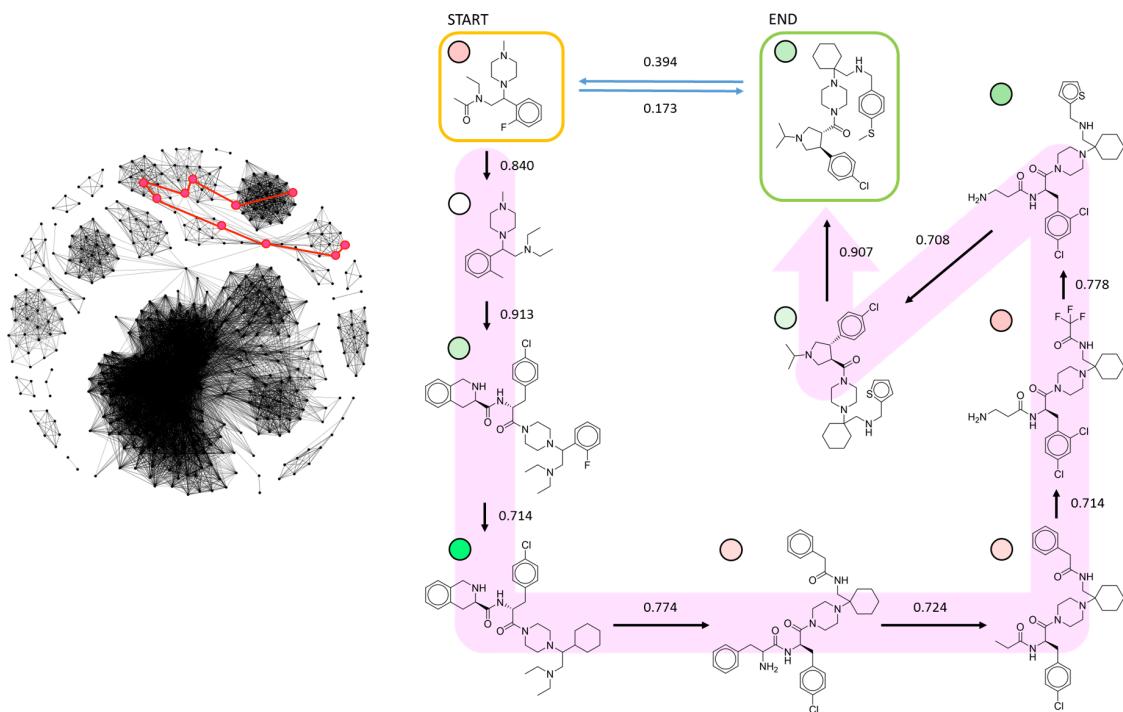


図3. MC4R 阻害剤の化合物パスウェイ

Kunimoto, R. et. al.; *Med Chem Commun* **8**, 376-384 (2017) [18] より抜粋

4. おわりに

本稿では、低分子創薬のためのケミカルスペースの解析手法として、ケミカルスペースネット

ワーク（CSN）の概念について説明した。そして、様々な化合物類似度指標を用いた CSN について紹介した。特に、記述子計算と部分構造を組み合わせた類似度手法と、非対称性の類似度指標について活用事例と共に説明した。記述子計算と部分構造を組み合わせた類似手法、 T_{cMCS} を用いた CSN は、骨格に基づいて化合物をサブグループに分類することが可能であることを示した。一方で、非対称な類似度指標、 T_v を用いた CSN は、今までに行ってきた構造最適化へのパスウェイの可視化に利用できることを示した。また、構築された CSN は、化学的に構造情報を解析するだけでなく、統計学に基づいたネットワークの性質についても解析され、共通性や特異性が明らかになっている。一例として、単一の薬理標的に対する活性化合物群を用いて構築した CSN は、どのような類似性指標を用いても、一定のスマールワールド性を有していることが示されている[12,19]。一方で、CSN を構成するサブネットワークは類似度指標によって異なることも明らかとなっている[14]。このことから、目的やデータセットに応じて、異なる類似性指標による CSN を補完的に用いることで、SAR をより正確に可視化することが可能だと考えられる。他のケミカルスペースを表現する手法と比較して、CSN を用いた手法は活用事例が少なく、未だ発展途上である。しかし、CSN には、化合物間の類似性を直感的に表現可能という強力な利点がある。そのため、CSN を用いた SAR の可視化解析が、HTS ヒット化合物解析や活性化合物の構造最適化など、創薬化学研究の代表的なアプリケーションの一つになることを期待する。

謝辞

本稿で紹介した研究は、ボン大学の Jürgen Bajorath 先生の研究室にて実施されたものです。研究室のメンバーには、本稿の執筆にあたって多くのサポートをいただいたことを感謝致します。また、執筆の機会を与えていただきました日本薬学会構造活性相関部会の関係者の方々に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Dobson, C. Chemical space and biology, *Nature* **432**, 824–828 (2004)
- [2] Lowe, D. Chemical space is big. Really big, *Med Chem Commun* **6**, 12 (2015)
- [3] Bohacek, R.S., McMurtin, C., Guida, W.C. The art and practice of structure-based drug design: a molecular modelling perspective, *Med Res Rev* **16**, 3–50 (1996)
- [4] Pearlman, R., Smith, K. Novel software tools for chemical diversity. In: Kubinyi, H., Folkers, G., Martin, Y.C. (eds) 3D QSAR in drug design: three-dimensional quantitative structure–activity relationships, vol 2. Springer, Berlin, pp 339–353 (2002)
- [5] Osolodkin, D.I., Radchenko, E.V., Orlov, A.A., Voronkov, A.E., Palyulin, V.A., Zefirov, N.S. Progress in visual representations of chemical space. *Expert Opin Drug Discov* **10**, 959–973 (2015)
- [6] Maggiora, G., Bajorath J. Chemical space networks—a powerful new paradigm for the description of chemical space, *J Comput Aided Mol Des* **28**, 795–802 (2014)
- [7] Oprea, T.I., Gottfries, J. Chemography: the art of navigating chemical space. *J Comb Chem* **3**, 157–166 (2001)
- [8] Tanaka, N., Ohno, K., Niimi, T., Moritomo, A., Mori, K., Orita, M. Small-world phenomena in chemical library networks: application to fragment-based drug discovery, *J Chem Inf Model* **49**, 2677–2686 (2009)
- [9] Harris, C.J., Hill, R.D., Sheppard, D.W., Slater, M.J., Stouten, P.F.W. The design and application of target-focused compound libraries, *Comb Chem High Throughput Screen*, **14**, 521–531 (2011)

- [10] Maggiora, G., Vogt, M., Stumpfe, D., Bajorath, J. Molecular similarity in medicinal chemistry, *J Med Chem* **57**, 3186–3204 (2014)
- [11] Zhang, B., Vogt, M., Maggiora, G., Bajorath, J. Design of chemical space networks using a Tanimoto similarity variant based upon maximum common substructures, *J Comput Aided Mol Des*, **29**, 937–950 (2015)
- [12] Wu, M., Vogt, M., Maggiora, G., Bajorath J. Design of chemical space networks on the basis of Tversky similarity, *J Comput.-Aided Mol. Des.*, **30**, 1–12 (2016)
- [13] Kunimoto, R., Vogt, M., Bajorath, J. Maximum common substructure-based Tversky index: an asymmetric hybrid similarity measure, *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **30**, 523–531 (2016)
- [14] Vogt, M., Stumpfe, D., Maggiora, G., Bajorath, J., Lessons learned from the design of chemical space networks and opportunities for new applications, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **30**, 191–208 (2016).
- [15] Rogers, D., Hahn, M. Extended-connectivity fingerprints, *J Chem Inf Model*, **50**, 742–754 (2010)
- [16] Stumpfe, D., Dimova, D., Bajorath, J. Composition and topology of activity cliff clusters formed by bioactive compounds, *J Chem Inf Model*, **54**, 451–461 (2014)
- [17] Zhang, B., Vogt, M., Maggiora, G., Bajorath, J. Comparison of bioactive chemical space networks generated using substructure-and fingerprint-based measures of molecular similarity, *J Comput Aided Mol Des*, **29**, 595–608 (2015)
- [18] Kunimoto, R., Vogt, M., Bajorath, J. Tracing compound pathways using chemical space networks, *Med Chem Commun* **8**, 376–384 (2017)
- [19] Humphries, M., Gurney, K. Network ‘small-world-ness’: a quantitative method for determining canonical network equivalence. PLoS ONE 3:e0002051 (2008)

構造活性フォーラム 2017 開催報告

実行委員長 古谷 利夫
ペプチドリーム株式会社技術顧問

構造活性フォーラム 2017 は 2017 年 6 月 16 日（金）東京渋谷の日本薬学会長井記念館において、「PPI 阻害をターゲットとする中分子医薬開発戦略」をテーマに開催されました。2016 年 5 月のある日新潟薬科大学の石黒正路教授から構造活性フォーラム 2017 の実行委員長の打診を受けた時に、構造生物学的なアプローチで創薬に関する技術として、私自身も取り組んでいて日本の製薬企業の間で関心が高く、創薬技術的な難易度が高いテーマとして、PPI（蛋白質間相互作用）阻害を取り上げるのがタイムリーなのではないかと思い、その場でお引き受けすることにしました。

2000 年以降のゲノム研究の進展に伴い、網羅的なオミックス研究の一環としてインタラクトームの研究の蓄積が進み、PPI を創薬標的とした製薬企業の研究が活発化していました。私自身にとり PPI は長年のテーマで、PPI の相互作用界面が平坦で脂溶性の高い環境であるため、経口吸収可能な化合物の開発は難しく、製薬企業の研究の中でも難しい局面を迎えていたとみていましたので、標的 PPI と阻害剤の複合体の構造に基づく創薬が必要であると考えていました。そこで、ペプチドや核酸医薬も含めた取り組みや PPI 用の中分子化合物ライブラリーの研究に加えて高感度な物理化学的なアッセイ手法などを含めた下記の 5 演題の講演と講師によるパネル討論から成るプログラム構成にしました。

講演 1 核酸アプタマーの構造解析と創薬への利用

（東京大学名誉教授・株式会社リボミック代表取締役社長）中村 義一 先生

講演 2 “ゆらぐ α -ヘリックス” を標的とした創薬

（株式会社 PRISM BioLab・研究開発部主幹研究員）廣瀬 洋一郎 先生

講演 3 物理化学解析を基盤とした蛋白質間相互作用阻害剤の開発

（東京大学大学院工学系研究科・教授）津本 浩平 先生

講演 4 特殊ペプチドがもつ PPI 中分子創薬に向けたポテンシャル

（東京大学大学院理学研究科・准教授）後藤 佑樹 先生

講演 5 Undruggable から Druggable へ

（ペプチドリーム株式会社・取締役）舛屋 圭一 先生

パネルディスカッション PPI を指向した中分子創薬の課題と展望（講演者全員）

予想通り関心は高く、定員 100 名を目標に PR に務めた結果、5 月 25 日の時点で 100 名に達しましたので、参加登録を締め切らせて頂きました。また、幾つかの企業に協賛寄付

金と広告宣伝のお願いをしたところ、5万円の協賛寄付金に3社、2万円の広告宣伝に6社が応じて頂きました。これは計画を若干上回る数で、ご協力頂きました各社様にこの場を借りて御礼申し上げます。

さて、講演に関しては、先生方がいずれも参加者の聞きたい内容を意識してわかりやすくお話を頂いたと感じました。質疑応答も活発に行われ、座長の先生方は楽をされたのではないでしょうか。また、パネル討論は、講演者間で議論して頂くことを想定していましたが、フロアからの質問が多く、PPI阻害剤の探索から研究開発までの諸問題について、研究現場からのお悩み相談的な質問が多く、それはそれで今回のフォーラムが役に立ったのではないかと思われます。PPI阻害に関する中分子医薬研究開発に関するテーマは今後もしばらくは関心が高いと思われますので、第二弾をいずれ企画しても良いのではないかと感じた次第です。ともあれ、無事に構造活性フォーラム2017を終えることができたのは、飯島洋先生、大田雅照先生、横山祐作先生、石黒正路先生に実行委員をお願いしました賜物と感謝申し上げます。また、高木達也先生にはHPと参加登録の作成をして頂きました。御礼申し上げます。年々充実してきていると感じていた構造活性フォーラムを無事に、次の実行委員長の岡島伸之先生にバトンタッチできたのではないかと思っております。

第 45 回構造活性相関シンポジウム プログラム

2017 年 11 月 29 日-30 日
茨城県南生涯学習センター（土浦駅徒歩 1 分）
両日とも 9 時 50 分から開始です。

藤田 稔夫 先生 追悼セッション -----

29 日 11:30-12:30 (オーガナイザー: 中川 好秋, 赤松 美紀)

特別講演-----

29 日 15:20-16:20 (座長: 飯島 洋)

SL ゲーム評価関数の機械学習
保木 邦仁
電気通信大学

招待講演-----

30 日 11:35-12:15 (座長: 砂田 真志)

L-1 大規模分子動力学による生命科学と創薬応用
杉田 有治
理化学研究所

30 日 13:40-14:20 (座長: 赤松 美紀)

L-2 水稲用除草剤ピリミスルファンに関する研究
中谷 昌央
ケイアイ研究所

30 日 14:25-15:05 (座長: 細谷 敏)

L-3 ヒト iPS 細胞技術と *in silico* 技術を用いた薬物誘発性不整脈の予測
黒川 淳子
静岡県立大学薬学部

30 日 15:10-15:50 (座長: 大田 雅照)

L-4 *in silico* methods for antibody developability
白井 宏樹
アステラス製薬

口頭発表 -----

11 月 30 日 9:50-11:32 (座長: 幸 瞳)

O-1 SBDD のための *in silico* フラグメント・マッピング法の開発
○ 山乙 教之, 広野 修一
北里大薬

O-2 アミノ酸残基マッピング法を用いた PPI 界面における相互作用スポット予測手法の開発

- 市村 博信, 山乙 教之, 広野 修一
北里大薬

(座長: 清田 泰臣)

O-3 Structure-based virtual screening for EcR ligands

- 幌岩 真理, 中川 好秋, 宮川 恒
京都大学農学研究科

O-4 QSAR モデルに基づいた Bioactive Scaffolds の同定

- 中川智貴¹, 宮尾知幸², 船津公人¹
¹東京大工, ²ポン大

(座長: 河合 健太郎)

O-5 機械学習手法を用いた化合物の加水分解性の予測

- 竹中 一将, 森脇 寛智, 高木 達也
大阪大学大学院薬学研究科

O-6 持続的農業を可能にする硝化抑制剤の構造ベース創農薬

- 西ヶ谷 有輝, 土屋 渉, 藤本 瑞, 藤原 孝彰,
鈴木 倫太郎, 山崎 俊正
農研機構・高度解析センター

ポスター発表

11月29日 10:00-10:40 ショートプレゼンテーション (座長: 大田 雅照)
11月29日 13:10-15:10 ポスターセッション

P-1 ファイトケミカルの分類と香りの相関に関する電子状態インフォマティクス研究

- 空閑 瞳¹, 杉本 学¹⁻³
¹熊本大学工学部物質生命化学科, ²熊本大学大学院先端科学研究部,
³東京大学先端科学技術研究センター

P-2 カイコの摂食行動を制御する生体アミン受容体アンタゴニストの薬理作用に関する電子状態インフォマティクス研究

- 森川 郁美¹, 太田 広人², 杉本 学¹⁻³
¹熊本大学大学院自然科学研究科, ²熊本大学大学院先端科学研究部,
³東京大学先端科学技術研究センター

P-3 抗炎症フラバノノールの構造活性相関

- 鈴木 祥太, 北中 進, 高宮 知子, 飯島 洋
日本大薬

P-4 がんアジュバント薬を指向した選択的 AKR1B10 阻害剤の創製

- 遠藤 智史¹, 陶山 美穂¹, 夏 爽², 胡 大イ²,
早川 芳弘³, 渡邊 友里江⁴, 合田 浩明⁴, 豊岡 尚樹²,

桑田 一夫⁵, 松永 俊之¹, 五十里 彰¹

¹岐阜薬大, ²富山大院, ³富山大和漢研, ⁴昭和大, ⁵岐阜大

P-5 アミノ酸電荷交換に関する抗原 - 抗体相互作用の物理化学解析

- 吉田 浩平¹, 木吉 真人¹, 黒田 大祐¹, 中木戸 誠¹, 長門石 曜², 曽我 真司³, 白井 宏樹³, 津本 浩平²

¹東大院・工, ²東大医科研, 東大院・工,

³アステラス製薬株式会社モダリティ研究所

P-6 結合能向上に向けた BlaR1 の構造改変

- 皆川 吉¹, 中曾 譲¹, 猪熊 貴之¹, 小松 克一郎², 梅山 秀明³、関口 哲¹

¹日本製粉(株), ²(株)インシリコサイエンス, ³中央大理工

P-7 Combining Quantum and QSAR Methods for the Prediction of Acid Dissociation Constants

Layla Hosseini-Gerami¹, ○田島 澄恵², Rasmus Leth¹, Peter Hunt¹, Matthew Segall¹

¹Optibrium Ltd., ²(株)ヒューリンクス,

P-8 D-アミノ酸を含む原始タンパク質のペプチド結合形成能についての計算化学的研究

- 福吉 修一¹, 仲吉 朝希¹, 小田 彰史²

¹金沢大院医薬保, ²名城大薬

P-9 分子動力学シミュレーションを用いた野生型 AKR1C3 及び C154Y 変異体の溶液構造解析

- 渡邊 友里江¹, 早川 大地¹, 遠藤 智史², 合田 浩明¹

¹昭和大学薬, ²岐阜薬科大

P-10 ミジンコ急性毒性値を用いた魚類慢性毒性予測モデルの提案

- 古濱 彩子, 林 岳彦, 山本 裕史
国立環境研究所

P-11 ドッキングシミュレーションと部位特異的変異導入結果を用いた hERG 阻害剤

ファーマコフォアと結合に関与するアミノ酸残基の解析

- 幸 瞳, 佐藤 朋広, 小倉 圭司, 本間 光貴
理研 CLST

P-12 In silico フラグメントマッピング法を用いたリガンド結合様式予測法の開発

- 杉山 耀司, 山乙 教之, 吉田 智喜, 広野 修一
北里大薬

P-13 In silico フラグメントマッピング法を用いた新規 PAD4 阻害剤の探索

- 片村 百々奈, 中込 泉, 山乙 教之, 広野 修一
北里大薬

P-14 イン・シリコ フラグメントマッピングに基づく新規 Rac1 PPI 阻害剤の同定

- 北村 祐万, 小澤 新一郎, 広野 修一
北里大薬

P-15 生物活性情報に基づく構造非開示での化合物ライブラリー多様性評価法の開発

- 清水 祐吾, 池田 和由, 大澤 匡範
慶應義塾大薬

P-16 Structure-Free 化合物ライブラリー解析システムの構築と検証

- 池田 和由, 清水 祐吾, 大澤 匡範
慶應義塾大薬

P-17 アクティブ QSAR モデリングを用いた TFS-PLS 法による魚毒性予測

- 泉原 拓, 石井 秀昇, 桂樹 哲雄, 高橋 由雅
豊橋技科大

P-18 スレオニル tRNA 合成酵素における天然リガンドと類似化合物との相互作用解析

- 森 義治¹, 竹田一志鷹 真由子¹, 奥村 久士^{2,3}
¹北里大薬, ²分子研, ³総研大

P-19 Atom-by-atom de novo リガンド設計法の改良のための基礎データの抽出

- 西端 芳彦, 工藤 龍希, 中山 智絵, 小滝 綾子,
足立 朋子, 中塚 優実, 山崎 広之
北里大薬

P-20 CAMKK2 阻害剤のインシリコスクリーニングとフラグメント分子軌道法による相互作用解析

- 高谷 大輔, 丹羽 英明, 三國 順子, 半田 徳子,
田仲 昭子, 横山 茂之, 本間 光貴
理研

P-21 グルタミン残基の非酵素的な脱アミド化機構の解析

- 加藤 紘一¹, 仲吉 朝希^{1,2}, 福吉 修一¹, 栗本 英治¹, 小田 彰史^{1,2,3}
¹名城大薬, ²金沢大院医薬保, ³阪大蛋白研

P-22 密度汎関数法によるグルタミン残基の非酵素的脱アミド化機構の探索

- 仲吉 朝希^{1,2}, 加藤 紘一^{1,2}, 福吉 修一², 栗本英治², 小田彰史^{1,2,3}
¹金沢大院医薬保, ²名城大薬, ³阪大蛋白研

P-23 計算機によるドッキングで得られた複合体構造候補に対する分子動力学シミュレーション

- 小田 彰史^{1,2,3,4}, 加藤 紘一¹, 仲吉 朝希^{1,2}, 福吉 修一², 栗本 英治¹
¹名城大薬, ²金沢大院医薬保, ³阪大蛋白研, ⁴東北医薬大薬

P-24 CASP12/CAPRI Round 37 にみるタンパク質複合体立体構造予測の評価と現状

- 清田 泰臣, 山本 裕大, 内藤 克哉, 竹田 - 志鷹 真由子
北里大薬

P-25 筋萎縮治療薬の開発を目指した SMAD3 阻害剤 SIS3 の結合様式の同定

- 中込 泉¹, 楠本 彩瑛¹, 飯島 瑛里香¹, 山乙 教之¹,
宮本 健史², 広野 修一¹
¹北里大薬, ²慶應大医

P-26 系列二分決定グラフによるアミノ酸配列モチーフ群表現と相同性検索システムの開発

- 大和 康平¹, 加藤 博明², 桂樹 哲雄¹, 高橋 由雅¹
¹豊橋技科大院工, ²広島商船高専

P-27 NoSQL を用いたタンパク質-遺伝子モチーフ辞書システムの開発とモチーフネットワーク解析への応用

- 大友 将宏¹, 加藤 博明², 桂樹 哲雄¹, 高橋 由雅¹
¹豊橋技科大院工, ²広島商船高専

P-28 原子フラグメント法による水溶解度 ($\log S$) の推算

- 佐藤 充, 古川 大, 桂樹 哲雄, 高橋 由雅
豊橋技科大院・工

P-29 天然由来の有機化合物"らしさ"の探索

- 高橋 みき子, 米澤 朋起, 前田 美紀
農研機構

P-30 3DMET 新リリースとデータベースキュレーションの実際

- 前田 美紀, ○駒場 朋美, 米澤 朋起
農研機構

部会役員人事

平成 29 /2017 年度 常任世話人 2017/10/1 現在

部会長	中川好秋 (京都大院農学研究科)
副部会長	岡島伸之 ((株) CAC クロア)
副部会長	本間光貴 (理化学研究所)
会計幹事	前田美紀 (農業・食品産業技術総合研究機構)
庶務幹事	竹田-志鷹 真由子 (北里大学薬学部)
広報幹事	広野修一 (北里大学薬学部)
SAR News 編集長	飯島洋 (日本大学薬学部)
ホームページ委員長	高木達也 (大阪大院薬学研究科)

構造活性相関部会の沿革と趣旨

1970年代の前半、医農薬を含む生理活性物質の活性発現の分子機構、立体構造・電子構造の計算や活性データ処理に対するコンピュータの活用など、関連分野のめざましい発展とともに、構造活性相関と分子設計に対する新しい方法論が世界的に台頭してきた。このような情勢に呼応するとともに、研究者の交流と情報交換、研究発表と方法論の普及の場を提供することを目的に設立されたのが本部会の前身の構造活性相関懇話会である。1975年5月京都において第1回の「懇話会」(シンポジウム)が旗揚げされ、1980年からは年1回の「構造活性相関シンポジウム」が関係諸学会の共催の下で定期的に開催されるようになった。

1993年より同シンポジウムは日本薬学会医薬化学部会の主催の下、関係学会の共催を得て行なわれることとなった。構造活性相関懇話会は1995年にその名称を同研究会に改め、シンポジウム開催の実務担当グループとしての役割を果すこととなった。2002年4月からは、日本薬学会の傘下組織の構造活性相関部会として再出発し、関連諸学会と密接な連携を保ちつつ、生理活性物質の構造活性相関に関する学術・研究の振興と推進に向けて活動している。現在それぞれ年1回のシンポジウムとフォーラムを開催するとともに、部会誌のSAR Newsを年2回発行し、関係領域の最新の情勢に関する啓蒙と広報活動を行っている。

本部会の沿革と趣旨および最新の動向などの詳細に関してはホームページを参照頂きたい。

(http://bukai.pharm.or.jp/bukai_kozo/index.html)

編集後記

構造活性相関という概念を広く普及させた藤田稔夫先生がご逝去されました。科学者としての御功績だけでなく、科学には厳しく、人には優しく、先生のそのお人柄の魅力は多くの人の胸に残っていると思います。ご冥福をお祈りいたします。

今号ではフェノタイプスクリーニングを、細胞実験系、測定系、データ処理系の三つの観点からご寄稿を頂戴しました。従来の生体標的分子という観点から細胞の生理的変化という観点でスクリーニングをするアプローチの魅力が感じられます。ご多忙中にも関わらず、ご執筆をいただき感謝申し上げます。

夏のフォーラムの開催報告、秋のシンポジウムのプログラムも掲載いたしましたので、ご参考になれば幸いです。(編集委員会)

SAR News No.33 平成 29 年 10 月 1 日

発行:日本薬学会 構造活性相関部会長 中川 好秋

SAR News 編集委員会
(委員長) 飯島 洋、河合健太郎、清田 泰臣、田上 宇乃、幸 瞳

*本誌の全ての記事、図表等の無断複写・転載を禁じます。