

iHOPE スクリーニング

標準評価システム iHOPE は、動物細胞や菌類、原虫などに対して、試験サンプルが誘導する表現型を横並びにプロファイリングし、興味深い生物活性を有する小分子化合物（バイオプローブ）の発見を目指す。

1. 概要

- ・ 年に4回（1、4、7、10月上旬）サンプルを受け付け、活性評価を実施
- ・ 結果返却までの期間はおおよそ2ヶ月を予定（3、6、9、12月頃）
- ・ 抗がん活性（HeLa, HL60, MKN74, MG-63細胞）、骨分化誘導活性（C3H10T1/2細胞）、抗菌活性（*S. aureus*, *E. coli*）、抗真菌活性（*A. fumigatus*, *P. oryzae*, *C. albicans*）、抗原虫活性（*P. falciparum*）を評価
- ・ 1次評価は384プレートを用いて実施
- ・ 処理濃度やn数はサンプルの種類に応じて下表のように設定している。別の方法での評価を希望する際は要相談（より高濃度での評価を希望する場合は必要量が増えます）

Table 1. 各サンプルの評価方法について

種類	評価方法	必要量
化合物	濃度8点、n=3 最高濃度は30 µg/mL（あるいはµM）	20 mg/ml, 25 µL （粉体0.5 mg程度）
ライブラリー	1 µM、n=1	10 mM, 5 µL
ブロス	10, 100倍希釈液、n=1	10 µL
フラクション	0.1, 1, 10 µg/ml, n=1	10 mg/ml, 20 µL

- ・ 評価結果は3段階（+3：強い、+2：弱い、+1：非常に弱い）で評価
- ・ 化合物で強い活性があるものは、次のルールで2次評価（再現性、細胞形態変化観察など）を実施
- ・ ライブラリー化合物は+3を示したもの（抗菌・抗原虫は+3かつ細胞毒性のないもの）について、次のルールで2次評価を実施
- ・ ブロスは細胞形態変化を指標とした2次評価を実施して、候補株を選定

2. 各評価系の説明

(1) 抗がん活性 (HeLa, HL60, MKN74) : 抗がん剤

一次評価 ヒト子宮頸がん由来細胞 HeLa やヒト骨髄性白血病細胞 HL60 細胞、ヒト胃がん由来細胞 MKN74 に対する薬剤添加 48 時間後の増殖阻害活性を WST-8 アッセイで評価する。

二次評価 再現性を確認する。また HeLa やラット腎細胞由来正常繊維芽細胞 NRK の v-Src 温度感受性株 tsNRK 細胞を用いた形態変化誘導活性を評価する。

⇒ 高活性 ($IC_{50} < 0.5 \mu M$)、ユニークな細胞形態変化を示す化合物は高次評価へ

(2) 3D スフェロイド (MG-63) : 抗がん剤

一次評価 ヒト骨肉腫細胞 MG-63 は低栄養などの微小環境で高い生存能力を示す。本細胞をスフェロイド培養して薬剤添加 72 時間後の細胞生存率を CellTiter Glo アッセイで評価する。

二次評価 再現性を確認する。

⇒ 高活性 ($IC_{50} < 0.5 \mu M$) を示す化合物は高次評価へ

(3) 骨分化誘導活性 (C3H10T1/2) : 骨粗鬆症治療薬

一次評価 マウス胚細胞由来間葉系幹細胞 C3H10T1/2 は多分化能を有する。骨芽細胞への分化誘導活性を薬剤添加 6 日目のアルカリフォスファターゼ活性で判定する。

二次評価 再現性を確認する。

⇒ 再現性よく +3 が出れば高次評価へ

(4) 抗細菌活性 (Sa, Ec) : 抗菌剤

一次評価 黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*、大腸菌 *Escherichia coli* に対する増殖阻害活性を評価する。

二次評価 再現性を確認する。

⇒ 高活性 ($IC_{50} < 0.1 \mu M$)、高選択性 (30 倍以上) を示す化合物を高次評価へ

(5) 抗真菌活性 (Af, Ca, Po) : 抗カビ剤

一次評価 ヒト病原性真菌 2 種 (*Aspergillus fumigatus*、*Candida albicans*) およびイネいもち病菌 (*pryularia oryzae*) に対する増殖阻害活性を評価する。

二次評価 再現性を確認する。また各種真菌に対する形態変化誘導活性を評価する。

⇒ 高活性 ($IC_{50} < 0.1 \mu M$)、高選択性 (30 倍以上) を示す化合物を高次評価へ

(6) 抗原虫活性 (Pf) : マラリア治療薬

一次評価 熱帯熱マラリア (*Plasmodium falciparum*) 3D7 株に対する増殖阻害活性を LDH アッセイで評価する。

二次評価 一次評価の再現性を確認する。

⇒ 高活性 ($IC_{50} < 0.1 \mu M$)、高選択性 (30 倍以上) を示す化合物を高次評価へ

3. サンプル寄託に際して

化合物は理研天然化合物バンク NPDepo <<http://www.cbrg.riken.jp/npd/>> にご寄託いただくことをお勧めいたします。NPDepo ではご寄託いただいた化合物の精密秤量、サンプル溶液の調整、iHOPE への化合物提供を実施致します。なお、個別にご寄託される場合は、以下の注意事項を留意し、期日までに二村へサンプルをお預けください。

- ・ エッペンチューブ、あるいは 96-well deep plate (Thermo, #AB-1058 など) に入れてご提供ください
- ・ 提供形式は、溶液 (20 mg/ml, 20 mM など)、粉体は問いません
- ・ 差し障りのない範囲で化合物の構造情報やサンプルのウェル配置を電子ファイルでご提供ください (フォーマット自由)
- ・ 化合物の安定性や保存方法等について特記すべきことがあればお知らせください。可能な限り対応いたします。

● iHope での活性評価に関する問い合わせ先

CSRS ケミカルバイオロジーグループ

二村 友史

Ex. 91-5365

E-mail: futamuray[at]riken.jp