

**ES 細胞由来未分節中胚葉様組織誘導法の開発と
それを用いた分節時計遺伝子の発現振動解析**

松宮 舞奈

目次

要旨	3
略語表	4
第一章：序論	5
第二章：実験材料と方法	
<i>Hes7</i> レポーターベクターを持つマウス ES 細胞の作製	9
マウス ES 細胞から iPSM への分化誘導法	
<未分化状態の維持>	9
<iPSM への分化誘導>	10
<接着+接着培養>	10
<浮遊+浮遊培養>	10
<i>in situ</i> hybridization	
<浮遊+浮遊培養 iPSM>	11
<浮遊+接着培養 iPSM>	11
RT-qPCR	12
CL24B-LIC/C を用いた <i>Hes7</i> 発光レポーター由来のルシフェラーゼ活性の測定	12
薬剤ライブラリースクリーニング	12
PSM 組織のリアルタイムイメージング	13
iPSM のリアルタイムイメージング	
<浮遊+浮遊培養によるイメージング>	13
<浮遊+接着培養によるイメージング>	14
画像解析	14
第三章：結果	
BMP 培地での分化誘導には浮遊培養が必須である	15
<i>Hes7</i> の発現量や発現パターンは細胞塊のサイズにより影響を受ける	18
iPSM において <i>Hes7</i> の発現は周囲の細胞間で同期し進行波を形成する	22
iPSM における頭尾軸は自己組織化されることで形成される	26
iPSM における阻害剤を使用した <i>Hes7</i> オシレーションに対する影響の解析	28
iPSM を用いた薬剤ライブラリースクリーニング	31
第四章：考察	
iPSM 実験系は容易かつ同期化したオシレーション解析に適している	55
iPSM の細胞培養系は薬剤ライブラリースクリーニングに応用できる	56
iPSM 培養系を使用した応用法	58

参考文献

59

謝辭

64

要旨

脊椎動物の脊椎・肋骨・骨格筋は、発生初期に形成される体節から分化する。体節は尾部先端に存在する未分節中胚葉 (presomitic mesoderm : PSM) から一定時間毎に、くびれ切れることによって神経管の両側に対で形成される。マウスの体節は約 2-3 時間周期で形成され、この周期を制御する機構の中心的役割を担っているのが分節時計と呼ばれる *Hes7* 遺伝子である。*Hes7* はネガティブフィードバック機構によって PSM 個々の細胞で発現振動 (オシレーション) しており、そのタイミングが、周囲の細胞間で同期することにより PSM 全体で尾部から頭部方向へ進行波を形成する。この進行波が PSM の頭部側にたどり着くと体節が形成されることから、体節形成には *Hes7* のオシレーションと進行波の形成が不可欠であることが分かっているが、未だ規則的な体節構造を作る遺伝子群の全貌は、分かっていない。

Hes7 の同期振動を制御する遺伝子群やシグナル系を同定するため、薬剤ライブラリーを用いたスクリーニングで網羅的に調べる方法はあったが、生きた胎仔を使用する必要があり大量のマウス個体を用意することが困難であることから、マウス個体にとって代わるツールが必要であった。そこで 2015 年に報告された胚性幹 (ES) 細胞から筋組織を分化誘導する方法を参考に、マウス ES 細胞から生体の PSM と同等の性質を持つ PSM 様組織 (induced-PSM : iPSM) への分化誘導法の開発を試みた。分化誘導後、経時的にサンプルを回収し各マーカー遺伝子の検出を行うことで、未分化細胞から中胚葉様細胞、PSM 様細胞、体節様細胞へと効率よく誘導する条件を確立した。また、iPSM のサイズが *Hes7* の発現量とオシレーションの振幅に大きな影響を与えることを明らかにした。さらに、*Hes7* プロモーターを用いた発光レポーターベクターを導入したマウス ES 細胞から分化誘導した iPSM をリアルタイムイメージングにより解析した結果、*Hes7* のオシレーションや進行波、さらには分節過程が観察出来た。したがって、本研究の分化誘導方法は、効率的に *in vivo* の発生過程を再現できる実験系であると考えられた。

次に *Hes7* オシレーションの同期機構に関わる新たな因子やシグナル経路を明らかにするため、エピゲノム関連因子、細胞周期関連因子やリン酸化関連因子などに対する阻害剤など、計 430 種類の薬剤を使用してスクリーニングを行ったところ、*Hes7* のオシレーション周期に大きく影響を与える薬剤をいくつか発見した。さらに検出した *Hes7* の発現パターンに着目し解析を行ったところ、興味深いことに BET (bromodomain and extra-terminal) ファミリータンパク質の阻害剤を使用したほぼ全ての条件で *Hes7* のオシレーションは減弱し定常状態を示した。したがって BET ファミリータンパク質が *Hes7* オシレーション機構に関与している可能性が示唆された。またこれらの薬剤を用いて *Hes7* 発光レポーターマウスの PSM 組織のリアルタイムイメージングを行ったところ、iPSM と酷似した *Hes7* 発現パターンを示した。以上から iPSM は生体 PSM と同等の性質を持ち、iPSM は生体 PSM の代替ツールになる可能性があると考えられる。

略語表

BET : Bromodomain and extra-terminal
bHLH : basic helix-loop-helix
CCD : charge-coupled device
DMSO : Dimethyl sulfoxide
Dusp4 : dual specificity phosphatase 4
ES cell : Embryonic stem cell
EZH2 : Enhancer of zeste homolog 2
Fgf : Fibroblast growth factor
HDAC : Histone deacetylase
Hes : Hairy enhancer of split
iPSM : induced-PSM
Lfng : Lunatic fringe
Mesp2 : Mesoderm posterior protein 2
MKP2 : MAPK (mitogen-activated protein kinase) phosphatase 2
mRNA : messenger RNA
PFA : Paraformaldehyde
POD : Peroxidase
PSM : presomitic mesoderm
UTR : untranslated region
RT-PCR : reverse-transcription polymerase chain reaction

第一章 序論

脊椎動物の脊椎・肋骨・体幹の筋肉は、胎生期に一時的に観察される体節から分化する。体節は胚尾部先端に存在する未分節中胚葉（presomitic mesoderm：PSM）と呼ばれる未分化な細胞集団の頭部側から、一定時間毎にくびれ切れること（分節）によって神経管の両側に対で形成される（図 1）。この周期はマウスでは約 2-3 時間、ゼブラフィッシュでは約 30 分、ヒトでは約 5-6 時間と生物種によって異なり、この周期が乱れると、先天性脊椎側弯症や脊椎肋骨異骨症などの骨系統疾患を引き起こすことが分かっている（Akiyama K. *et al.*, 2014）。

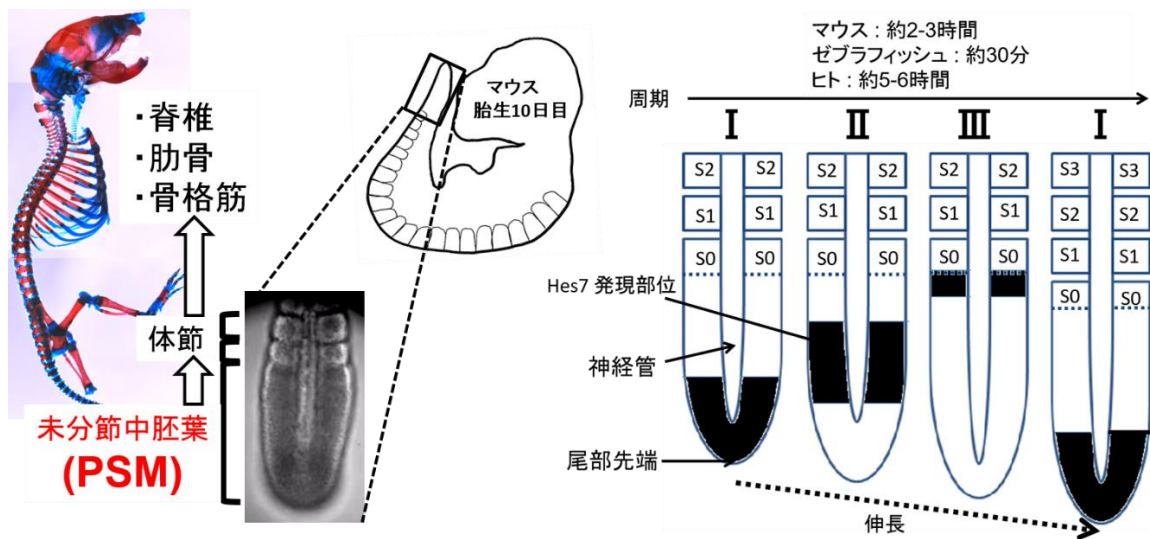


図 1. PSM からの分化過程と *Hes7* の発現変化（模式図）

PSM は胎仔尾部先端部に存在し、そこから分化した体節は脊椎や肋骨を形成する。マウスでは約 2-3 時間ごとに体節が形成される。*Hes7* の発現は体節形成の周期と一致して PSM の尾部から頭部方向へ移行する。

体節形成過程での周期性は、Notch シグナル、FGF シグナル、Wnt シグナルに属する多数の因子が、PSM において規則正しい発現振動（オシレーション）を起こすことにより制御されている（図 2; Niwa Y. *et al.*, 2007; Dequéant M. L. *et al.*, 2006）。

また、体節形成過程では Notch シグナルの下流で働く basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写抑制因子 *Hes7* が PSM で重要な役割を担っていることが分かってきた。*Hes7* 遺伝子は、ショウジョウバエの *hairy (h)* 遺伝子と *Enhancer of split (E(spl))* 遺伝子に相溶性の高い bHLH ドメインを持つ転写因子としてクローニングされた (Bessho Y. *et al.*, 2001a)。これまでに *Hes1* から *Hes7* の 7 種類の遺伝子がクローニングされてきた。そのうちのひとつ *Hes7* タンパク質は他の多くの *Hes* 因子と同様に bHLH ドメインを持ち二量体化して N-box 配列及び E-box 配列に結合してプロモーターからの転写を抑制する (Sasai Y. *et al.*, 1992; Bessho Y. *et al.*, 2001a; Ishii A. *et al.*, 2008)。*Hes* タンパク質は自身のプロモーターに存在する N-box 配列に結合して転写を抑制する作用があるため、ネガティブフィードバック調節回路を作る。マウスの PSM で発現振動する *Hes* 遺伝子及びその関連遺伝子には、*Hes1*、*Hes7*、*Hey2* があるが、正常な分節化に必須であるの

はこのうち *Hes7* のみである (Jouve C. *et al.*, 2000; Leimeister C. *et al.*, 2000; Bessho Y. *et al.*, 2001b)。

Hes7 遺伝子の発現振動は以下の要領で起こる。Notch シグナルや FGF シグナルによって誘導され、転写・翻訳された *Hes7* タンパク質は転写抑制活性により自身のプロモーター活性を抑制する。しかし、*Hes7* タンパク質は非常に不安定でユビキチン-プロテアソーム系によって素早く分解される。このため、抑制されていたプロモーターが再び活性化され、転写・翻訳が再開される。このようにして体節形成過程で *Hes7* は発現振動を繰り返す。

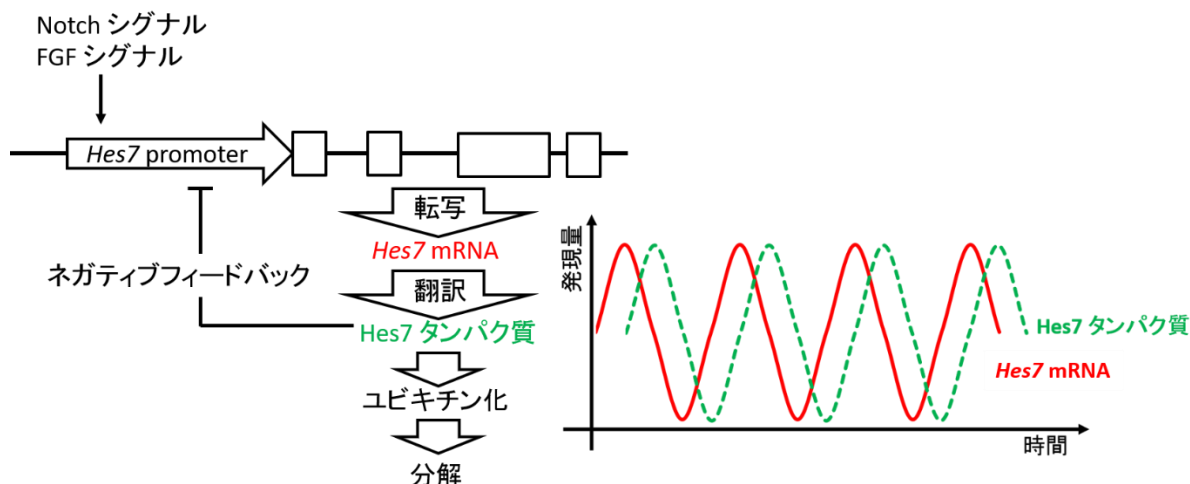


図 2. *Hes7* 遺伝子の発現振動メカニズム

Hes7 のプロモーター活性は Notch や FGF シグナルによって誘導される。転写・翻訳を経て形成された *Hes7* タンパク質は自身のプロモーター活性を抑制するネガティブフィードバック調節を行う。しかし、*Hes7* タンパク質はユビキチン化され素早く分解されるため、自身のプロモーター抑制活性が一時的に無くなり、*Hes7* の転写が再開される。

マイクロアレイを用いた研究から、Notch、FGF シグナルに属する因子と、Wnt シグナルに属する因子が PSM において逆の位相でオシレーションしていることが明らかになった (Dequeant M. L. *et al.*, 2006)。さらに、Notch タンパク質の細胞内ドメイン (Notch intercellular domain : NICD) を安定的に発現しオシレーションを抑制させた遺伝子改変マウスの PSM を解析すると Notch シグナルの下流因子である *Lfng* や FGF シグナルの下流因子である *Spry2* の発現振動は抑制されるのに対し、Wnt シグナルの下流因子である *Axin2* の発現振動は残っていることから、これらの発現は互いに独立していると考えられている (Feller J. *et al.*, 2008)。

Hes7 遺伝子欠損マウスでは重篤な分節化の異常がみられるが、*Hes7* 定常発現マウスでも同様な分節化の異常が観察される (図 3)。このことから正常な分節化には *Hes7* は単に発現するだけでなく、発現振動することが必須であることが分かっている (Takashima Y. *et al.*, 2011)。また、*Hes7* の欠損および定常発現の状態では *Lunatic fringe (Lfng)* や *Dusp4/MKP2* など多くの分節遺伝子が発現振動をしなくなるが知られている (Pourquie O. *et al.*, 2011; Oates A. C. *et al.*, 2012; Eckalbar W. L. *et al.*, 2012; Kageyama R. *et al.*, 2012; Bessho Y. *et al.*, 2001; Niwa Y. *et al.*, 2007; Sparrow D.B. *et al.*, 2012)。PSM で発現振動する多数の因子のなかでも *Hes7* は中心的な因子の一つであると考えられるが、*Hes7* 自体が分節時計のリズムを生み出す中心的なオシレーターなのか、もしくは他のオシレーターによって制御されているのかということは分かってい

ない。*Lfng*は Notch を標的とした糖転移酵素であり PSM において振動的に発現する。*Lfng*の欠損および過剰発現によっても分節化の異常は引き起こされるが、PSM における *Hes7*の発現は振動を続けている (Niwa Y. *et al.*, 2007; Serth K. *et al.*, 2003)。このことから *Lfng* は発現振動するものの分節時計のリズムを生み出す分子機構の中心にはないと考えられている。さらに数多くの分節遺伝子が分節時計の周期に関わっていることは報告されているが、周期がどのようなメカニズムで制御されているのかについても明らかになっていない。

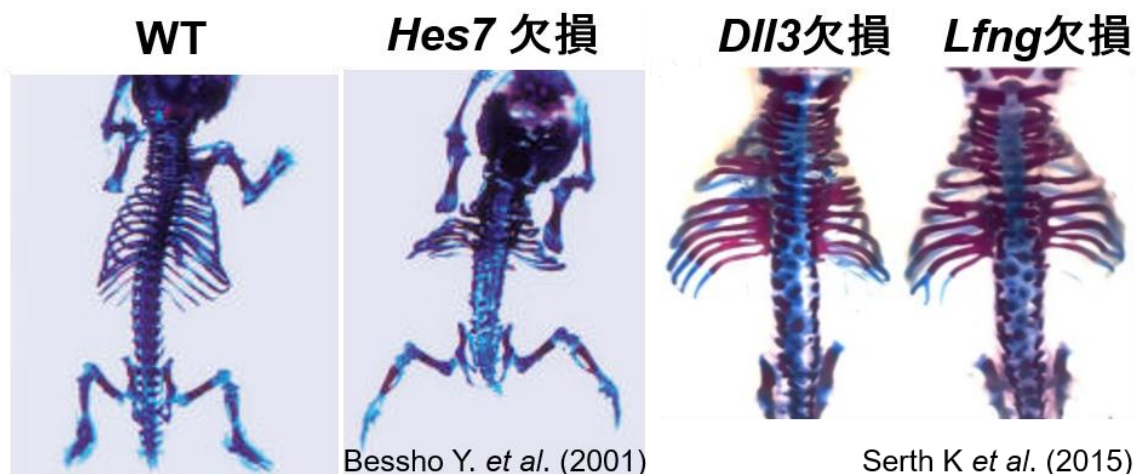


図 3. 分節遺伝子欠損マウスの骨染色

分節遺伝子である *Hes7* や Notch シグナル経路の下流に存在する *Dll3* や *Lfng* を欠損したマウスでは体節形成に異常が生じる。そのため体節から分化する脊椎や肋骨が癒合し、生後すぐに致死となる。

また、*Hes7* 遺伝子のオシレーションのタイミングは隣接した細胞間で同期することにより PSM 全体で尾部から頭部方向へ進行波を形成する (図 1. 右側パネル; Bessho Y. *et al.* 2001)。この細胞間同期機構には Delta / Notch シグナルを介した細胞間コミュニケーションの関与が示唆されている。今までに、Notch 伝達経路に異常を持つゼブラフィッシュでは、オシレーションが非同期になることが示されてきた (Jiang Y. *et al.*, 2000)。また、細胞分裂のタイミングも重要で、*Hes7* ホモログの発現がオフの時に細胞分裂が起こる事から、オシレーションに影響が出ないように分裂のタイミングが調節されていることが示唆されている (Delaune E. A. *et al.* 2012)。しかし、隣接した細胞間における *Hes7* 同期機構を制御する遺伝子群の全貌は未だ明らかになっていない。

Hes7 遺伝子の周期と発現ダイナミクスがどのようなメカニズムで制御されているのかを明らかにするためには、既知の分節時計関連遺伝子だけでなく薬剤ライブラリースクリーニング等で網羅的に調べる必要があるが、大量のマウス個体を用意する必要がある。さらに *Hes7* を含む分節時計遺伝子の発現動態をイメージングなどの方法で経時的に定量する際、PSM を組織のまま観察するのは、撮影・培養条件の最適化の難易度が高いことや、シングルセルでの初代分散培養ではオシレーションが不安定になることから (Masamizu Y *et al.* 2006)、本来の性質のまま解析をするのは難しかった。さらに、組織サンプルに対する効率の良い遺伝子導入方法がないため、発現レポーターを利用するには遺伝子改変マウスを作製する必要があることから、マウス個体にとって代わるツールが必要であった。

これまでにマウス胎仔繊維芽細胞 (MEF) やマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) とヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) から、単層状の PSM 様細胞、体節様細胞、骨格筋細胞へと分化誘導する方法は報告されている(Pourquie O. *et al.* 2014, Patent #US20140127169 A1; Chal J. *et al.*, 2015)。しかし、この報告では、PSM 様細胞への分化誘導後、*Hes7* の発現は上昇するもののオシレーションは観察できず、進行波も形成されないことから、体節の規則的な構造を作るのに必要な遺伝子や因子を調べることは出来なかった。そのため、*in vivo* の体節形成過程を再現しているとはいえ、マウス個体にとって代わる手法になるとは言い難い。この原因として、生体の PSM では細胞増殖が盛んに行われており、細胞同士が密に接しているが、先行研究では分化誘導の際、単層状の細胞培養系を用いているため、細胞間相互作用が少なくなり *in vivo* の体節過程を再現できなかったのではないかと推測した。そこで、オルガノイド形成の際に使用する 3D 浮遊培養を応用し、分化誘導することで *in vivo* の発生過程に近づけるのではないかと考え、マウス ES 細胞から PSM 様組織 (induced PSM : iPSM) へ分化誘導するために 2 種類の培地を用いて 3D 浮遊培養することにより *Hes7* オシレーションや進行波を観察できる新たな分化誘導法を確立することを目的に本研究を行った。

第二章 実験材料と方法

*Hes7*レポーターベクターを持つマウス ES 細胞の作製

マウス ES 細胞 (E14Tg2a) は RIKEN Bio Resource Center で購入した (RBRC-AES0135, Hooper M. *et al.*, 1987)。

安定発現 ES 細胞株の作製には、メダカゲノムから発見された Tol2 トランスポゾンを使用した (Kawakami K. *et al.* 1998, 2007; Yagita K. 2010)。Tol2 の転移酵素発現ベクターである pCAGGS-mT2TP と、Tol2 のシス塩基配列間に目的の DNA 配列を組み込んだベクターを同時に細胞へトランスフェクションすることで、目的の DNA 配列をゲノムに挿入した。トランスフェクション試薬には ViaFect (Promega) を使用した。

使用した *Hes7*レポーターベクターは、*Hes7*の開始コドンの上流 5393bp を *Hes7*プロモーターとして用いた (図 4)。レポーターにはホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子の N 末端に、核移行シグナル (Nuclear Localization Signal : NLS) と、ヒト由来の変異 *Ubiquitin*^{G76V}をつないだものを用いた (Ub-NLS-Luc2)。さらに中胚葉への分化をモニターするため、中胚葉マーカーである *Mesogenin1* (*Msgn*)レポーターベクターも作製した。*Msgn*の開始コドンの上流 1200bp を *Msgn*プロモーターとして用いた (Wittler L. *et al.*, 2007)。レポーターには赤色蛍光タンパク質 mCherry の N 末端に、核局在シグナル (H2B) をつないだものを用いた。トランスフェクション後、ブラストサイジン S 塩酸塩で薬剤選択を行った。

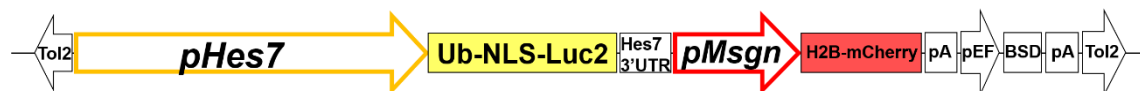


図 4. レポーターベクターのコンストラクト

Hes7 発光レポーターベクターと *Msgn* 蛍光レポーターベクターのコンストラクト。*Hes7*プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつなぎ、中胚葉マーカーである *Msgn*プロモーターの下流に mCherry cDNA をつなぐことで、iPSM へ分化誘導された細胞を可視化できるようにした。

マウス ES 細胞から iPSM への分化誘導法

ES 細胞を LIF + 2i を含む培地で培養することで grand state の未分化細胞として維持した (Qi-Long Ying *et al.*, 2008; Jose Silva *et al.*, 2008)。その後、BMP4 を含む培地 (BMP 培地) で 2 日間培養することで、Wnt シグナル経路が活性化し、原条様細胞、さらに尾側の中胚葉組織へと分化させた (図 5)。最後に 4 日間、Wnt シグナル経路を活性化する CHIR99021 と BMP シグナル阻害剤である LDN193189 を含む培地 (CL 培地) に移行し、腹側中胚葉への分化を抑制することで、PSM 様細胞へと誘導した。

<未分化状態の維持>

0.1%ゼラチン溶液 (SIGMA) を培養皿に加え、室温で 30 分間コートした。その後ゼラチン溶液を除去し ES 細胞用培地で懸濁した ES 細胞を播種し、37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で培養を行った。継代の際は、D-PBS (ナカライテスク) で洗浄後、トリプシン-EDTA (0.25%トリプシン、1mM EDTA-4Na、Gibco) で 3 分間置き、3 倍量の ES 細胞用培地を加えピペティングによって細胞を分散した。室温・1000r.p.m・5 分間遠心後、

できたペレットを ES 細胞用培地によって懸濁し、ゼラチンを用いてコーティング済みの培養皿に播種した。

培養に使用した培地は、DMEM 培地に 15% Fetal Bovine Serum (Hyclone, Gibco)、2mM L-Glutamine、1mM Nonessential Amino Acids、0.1mM β -Mercaptoethanol、1mM Sodium Pyruvate、Penicillin、Streptomycin、1500U/ml LIF、3 μ M CHIR99021、1 μ M PD0325901 を混合した。ES 細胞の未分化状態を維持するため、LIF に加えて MEK の阻害剤である PD0325901 と GSK3 β の阻害剤である CHIR99021 を使用した。これらは使用する直前に培養培地に加えた。

<iPSM への分化誘導>

サブコンフルエントになった ES 細胞を D-PBS で洗浄後、0.25%トリプシン-EDTA で 3 分間置き、3 倍量の ES 細胞用培地を加えピペティングによって細胞を分散した。室温・1000r.p.m・5 分間遠心後、できたペレットを BMP 培地によって懸濁した。BMP 培地の組成は、N2B27 培地 (DMEM / F12 培地に N2 Max supplement を加えたものと Neurobasal 培地に B27 supplement を加えたものを同量ずつ混合) に、1% KSR、2mM L-Glutamine、1mM Nonessential Amino Acids、1mM Sodium Pyruvate、Penicillin、Streptomycin、10ng / ml BMP4 を加えたものを使用した。CL 培地の組成は、DMEM 培地に、15% KSR、2mM L-Glutamine、1mM Nonessential Amino Acids、1mM Sodium Pyruvate、Penicillin、Streptomycin、1 μ M CHIR99021、0.1 μ M LDN193189 を加えたものを使用した。また、使用する培養ディッシュは培養条件によって変更した。

[接着+接着培養]

接着+接着培養では、ゼラチンを用いてコーティング済みの培養皿を用いて BMP 培地以降の分化誘導を行った(図 5.上)。その後、BMP 培地を取り除き CL 培地にて 4 日間培養した。

[浮遊+浮遊培養]

浮遊+浮遊培養では、100-3000 細胞/well になるよう調整し、低接着 96-well plate を用いて 2 日間培養した。その後、形成される細胞塊のみを回収し、CL 培地を加えたゼラチンでコーティング済みの培養皿にて 4 日間培養した(図 5.下)。

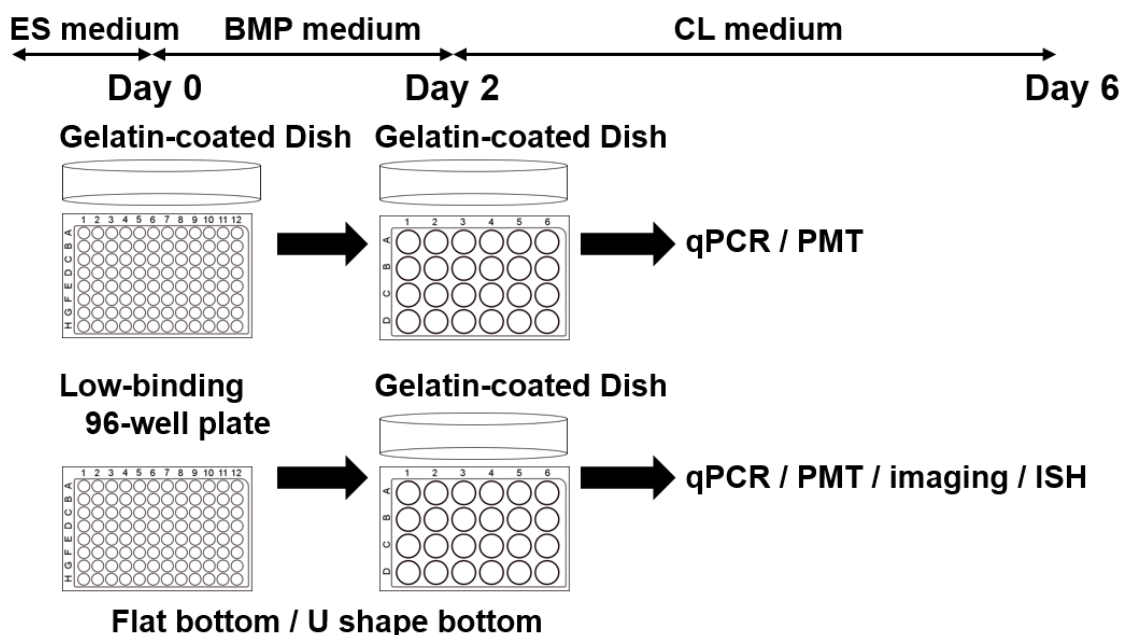


図 5. 実験のスケジュール

未分化な ES 細胞から BMP 培地へと分化誘導を行うタイミングを Day0 とし、BMP 培地で 2 日間、CL 培地で 4 日間培養した。BMP 培地での培養には接着培養（上）と浮遊培養（下）を使用した。

in situ hybridization

<浮遊＋浮遊培養 iPSM>

浮遊培養している iPSM を回収し室温・1000r.p.m・1 分間遠心後、培地を取り除いた。その後、底に溜まっている iPSM を iPGell® 細胞浮遊液ゼリー化試薬（日本ジェネティクス株式会社）を用いて固め、4% Paraformaldehyde (PFA) で 4°C において一晩固定した。PBST で洗浄後、10µg/ml ProteinaseK / PBST で室温・3 分、2mg/ml Glycine / PBST で室温・5 分処理した。PBST で洗浄後、再固定のため 4% PFA / 0.2% Glutaraldehyde / PBST で室温・20 分反応させた。RNA プローブとの反応は 65°C で一晩行った。洗浄溶液には Solution1 (50% deionized formamide / 5x SSC / 0.1% Tween20 / 20mg/ml Heparin)、Solution2 (0.5M NaCl / 10mM Tris-HCl / 0.1% Tween20)、Solution3 (50% formamide / 2x SSC / 0.1% Tween20) を用いた。サンプルはまず、65°C の Solution1、次に 37°C の Solution2、最後に 65°C の Solution3 で洗浄した。AP 標識された抗 DIG 抗体と POD 標識された抗 DIG 抗体で 4°C・18 時間以上反応させた後、BCIP と NBT により発色を行った。

<浮遊＋接着培養 iPSM>

イメージング後の iPSM を 4% Paraformaldehyde (PFA) で 4°C において一晩固定した。以下の操作は浮遊培養と同様の手法で行った。

RT – qPCR

未分化 ES 細胞から RNeasy Micro Kit (QIAGEN) を用いて total RNA の抽出を行った。RT-qPCR には ReverTra Ace (TOYOBO)、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)、StepOnePlus (Applied Biosystems)を用いた。使用したプライマーを表 1 に示す。

プライマー名	配列
Msgn1 Fwd	CTTCTGACACCGCTGGTCTG
Msgn1 Rev	GTGACTGCCGTAGCCATCG
Brachyury Fwd	CCTCAGTTTGGAGGCTCGCT
Brachyury Rev	TTGTCCGCATAGGTTGGAGAGC
Pax3 Fwd	ATAAGCCCAGGACACAGAGTTGTG
Pax3 Rev	GTCTAGTCTGTGGAGGCCGAAAC
Hes7 Fwd	CATCAACCGCAGCCTAGAAGA
Hes7 Rev	AGTATCTCCGTTTCTCCAGCTT
Nanog Fwd	CTTTCACCTATTAAGGTGCTTGC
Nanog Rev	TGGCATCGGTTTCATCATGGTAC
Actin Fwd	GGCTGTATTCCCCTCCATCG
Actin Rev	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
Uncx4.1 Fwd	ACCCGCACCAACTTTACCG
Uncx4.1 Rev	TGAACTCGGGACTCGACCA
Tbx6 Fwd	ATGTACCATCCACGAGAGTTGT
Tbx6 Rev	CCAAATCAGGGTAGCGGTAAC
Mesp2 Fwd	GACTGGACACTGGACACAATCCACT
Mesp2 Rev	GGCCATAGCCAAGCAGACCTCAAA

表 1. RT-qPCR に使用したプライマー一覧

CL24B-LIC/C を用いた *Hes7* 発光レポーター由来のルシフェラーゼ活性の測定

Hes7 発光レポーターベクターを遺伝子導入した ES 細胞を用いて分化誘導させた iPSM における *Hes7* の発現量をリアルタイムで検出するため、高感度生物発光測定装置 (CL24B-LIC/C : CHURITSU) を使用した。ゼラチンを用いてコーティングした Black 24-well plate を使用し、1 well あたりのルシフェリン濃度を 0.5mM になるよう調整した。5 分毎に 1 well 全体におけるルシフェラーゼの発光強度を 5 秒間露光することで測定し、解析には Python を使用した。周期性の発現ダイナミクスを検出するためにデータから 30 分以下のノイズパルスを除去した後、36 フレームの移動平均を差し引き、Savitzky Golay Filter でスムージングを行った。オシレーションの周期はルシフェラーゼ発光強度のピークからピークまでの時間を 1 周期とし計算を行った。

薬剤ライブラリースクリーニング

Hes7 の発現動態を検出するため、CL24B-LIC/C を用い、5 分毎に 1 well 全体における発光強度を 5 秒間露光することで測定した。Black 24-well plate を室温で 30 分ゼラチンを用いてコーティングし、使用前にゼラチン溶液を完全に取り除いた後使用した。

iPSM を各 well に 1 細胞塊になるように入れ、分化誘導後 99 時間から 121 時間の *Hes7* 発現を測定した。ライブラリースクリーニングには、エピジェネティクスライブラリー (S990043 - EP11 : Sigma-Aldrich) と、薬理活性ライブラリー (LO4200 : Sigma-Aldrich) を使用した。薬剤は終濃度 20 μ M、ルシフェリンは終濃度 0.5mM になるよう CL 培地で希釈した。

PSM 組織のリアルタイムイメージング

Hes7 レポーターマウス (pH7-UbLuc-In(-)) のマウス胎生 10 日胚の PSM 部分を取り出し、0.15% のアガロースゲルに埋め込み、3.5cm ガラスボトムディッシュ (Matsunami) の中央部に置いた。Explant culture 用の培地は、DMEM/F12 培地に 1% BSA, 1 g/l glucose, 2 mM L-glutamine, 15 mM HEPES, Penicillin, Streptomycin を加えた。倒立顕微鏡 (Olympus IX83 / Olympus IX81) で 37°C、80% O₂、5% CO₂ の状態を維持しながら一晩 CCD カメラ (iKon-M, Andor / Verse Array) で撮影を行った。

iPSM のリアルタイムイメージング

<浮遊+浮遊培養によるイメージング>

3.5cm ガラスボトムディッシュ (IWAKI) に Micro insert を貼り付け、室温で 30 分ゼラチンを用いてコーティングし、使用前に培地で数回リンスしたのち使用した (図 6)。観察する細胞は分化誘導 96 時間後の iPSM を Micro insert の中央に置き、倒立顕微鏡 (Olympus IX83 / Olympus IX81) で 37°C、5% CO₂ の状態を維持しながら一晩 CCD カメラ (iKon-M, Andor / Verse Array) で撮影を行った。撮影用の培地にはフェノールレッドを含まない DMEM 培地を使用した。また、ルシフェラーゼ検出の際は終濃度が 1mM になるようルシフェリン (ナカライテスク) を加えた。

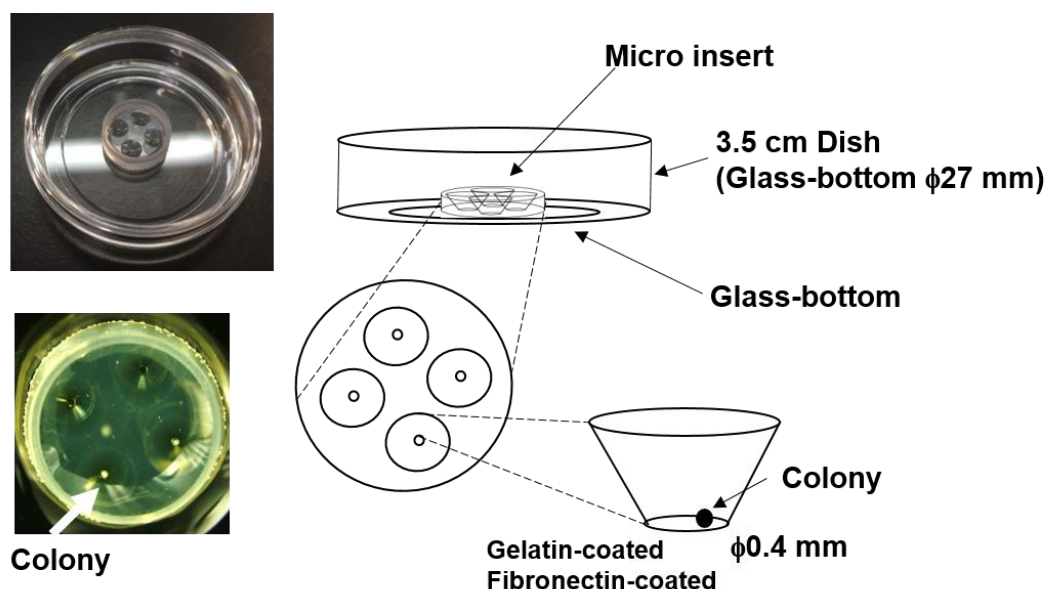


図 6. 浮遊培養リアルタイムイメージングで使用した Micro insert の模式図

ガラスボトムディッシュの中央に Micro insert を置き、直径 0.4mm の底面をコーティングした後使用した。ディッシュを培地で満たし Micro insert の中央部に細胞塊を置き撮影を行った。

<浮遊+接着培養によるイメージング>

3.5cm ガラスボトムディッシュ (IWAKI) を 37°C で 2 時間、フィブロネクチン (SIGMA, 50 μ g / ml) を用いてコーティングし、使用前に培地で数回リンスしたのち使用した。分化誘導 100 時間後の iPSM をガラスボトムディッシュの中央に置き 37°C、5% CO₂ インキュベーター内で 5 時間培養を行った。倒立顕微鏡 (Olympus IX83 / Olympus IX81) で 37°C、5% CO₂ の状態を維持しながら一晩 CCD カメラ (iKon-M, Andor / Verse Array) で撮影を行った。撮影用の培地は浮遊培養によるイメージングと同様の手法で行った。

画像解析

リアルタイムイメージングにより得られた画像の解析には Image J ソフトウェアを使用した。まず Spike-Noise Filter で処理し宇宙線を除いた。その後 Temporal Background Reduction を行った。周期性の発現ダイナミクスを検出するためにデータから 30 フレームの移動平均を差し引き、Savitzky Golay Filter でスムージングを行った。最後に Hilbert 変換を行うことで周期性を表した。

オシレーションの周期は *Hes7* プロモーター由来のルシフェラーゼ発光強度のピークからピークまでの時間を 1 周期とし計算を行った。

第三章 結果

BMP 培地での分化誘導には浮遊培養が必須である

未分化状態の ES 細胞から *Hes7* の検出が可能な PSM 様組織への分化誘導法を確立するため、BMP 培地における 2 種類の培養条件の検討を行った (図.7)。

1) 先行研究により接着培養で ES 細胞から PSM 様細胞、筋細胞へと分化誘導できることが分かっているため (Chal J. *et al.* 2015)、ゼラチンでコーティングしたディッシュを用いて接着培養により iPSM へと分化誘導した。

2) オルガノイド形成を応用し (Eiraku M. *et al.* 2011)、低接着 96-well plate で細胞塊を形成する浮遊培養により iPSM へと分化誘導した。

両条件とも、分化誘導 4 日目から CL24B-LIG/C を用いて *Hes7* 発光レポーター由来のルシフェラーゼ活性を測定した。ゼラチンでコーティングしたディッシュを用いた接着培養では、ルシフェラーゼ活性は上昇するものの、山なりの発現を示した後減弱した (図.7A)。一方、低接着 96-well plate を用いた浮遊培養では、ルシフェラーゼ活性が上昇した後、約 160 分周期のオシレーションパターンが観察された (図.7B)。

以上より、低接着 96-well plate を用いた浮遊培養による iPSM では、分化誘導 4 日目には *Hes7* のオシレーションが観察できることが明らかになった。

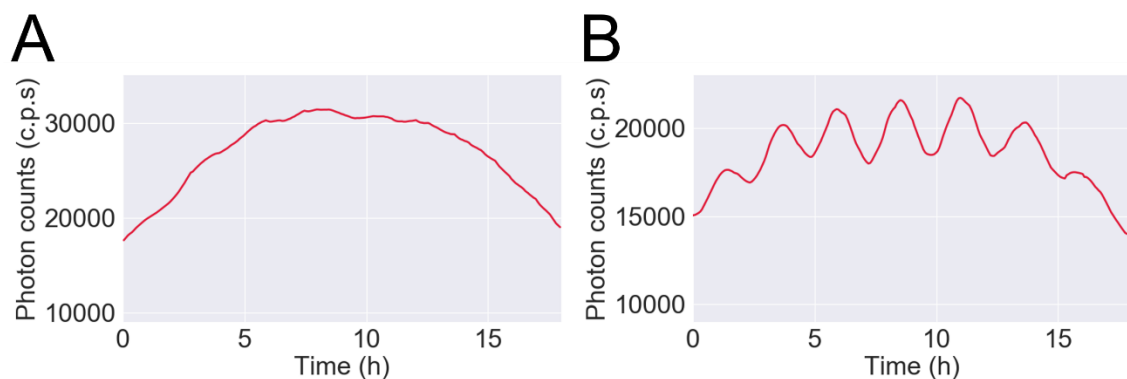


図 7. BMP 培地における培養条件の違いによるルシフェラーゼ活性

分化誘導 4 日目から BMP 培地における 2 種類の培養条件の検討を行った。*Hes7* 発光レポーターをもつ iPSM を用いて CL24B-LIG/C によりルシフェラーゼ活性を測定した。

(A) BMP 培地においてゼラチンでコーティングしたディッシュを用いた接着培養を行った後、CL 培地へと移行した。(B) BMP 培地において低接着 96-well plate を用いた浮遊培養を行った後、細胞塊を回収し、CL 培地へと移行した。

さらに未分化状態のES細胞からPSM様組織への分化誘導がどのタイミングで行われるかを確認するため、時間経過による各種体節形成関連遺伝子の発現パターンをRT-qPCRにより検出した(図.8)。未分化マーカーには *Nanog*、中胚葉マーカーには *Brachyury*、*Mesogenin1*、尾部側 PSM マーカーには *Tbx6*、頭部側 PSM マーカーには *Pax3*、PSM マーカーには *Hes7*、体節境界マーカーには *Mesp2*、体節マーカーには *Uncx4.1* を使用した。サンプルは分化誘導 48 時間後から 12 時間ごとに回収した。BMP 培地での培養には、ゼラチンでコーティングしたディッシュを用いた接着培養(図.8 青)と、低接着 96-well plate を用いた浮遊培養(図.8 オレンジ)の 2 種類で分化誘導を行い比較した。

その結果、全てのマーカー遺伝子における発現量の最大値は低接着 96-well plate を用いた浮遊培養の方がゼラチンでコーティングしたディッシュを用いた接着培養よりも高かった。また浮遊培養の条件では分化誘導 72 時間後に *Nanog* の発現はピークを迎えその後低下した。これに伴って *Brachyury*、*Mesogenin1* の発現が上昇した。分化誘導 108-120 時間後には *Hes7* や *Tbx6* の発現が上昇し、その後 120 時間を超えてからは *Mesp2* と *Uncx4.1* の一時的な発現上昇が観察された。*Mesp2* の発現が上昇した後に *Uncx4.1* の上昇が観察されることから、120 時間付近では分節が行われ、体節が分化していると考えられた。

以上のことから、ゼラチンでコーティングしたディッシュを用いた接着培養より、低接着 96-well plate を用いた浮遊培養の方が効率よく分化誘導が行われ、さらに、時間経過による遺伝子発現の推移から、低接着 96-well plate による浮遊培養を行うことで、*in vivo* における体節形成過程を再現できていると示唆された。

したがって、未分化なES細胞から *Hes7* の発現を検出可能な iPSM へと分化誘導するには、低接着 96-well plate を用いて BMP 培地で 2 日間浮遊培養し、その後細胞塊を回収して CL 培地で 4 日間培養する条件が最も高効率であるという事が分かった。

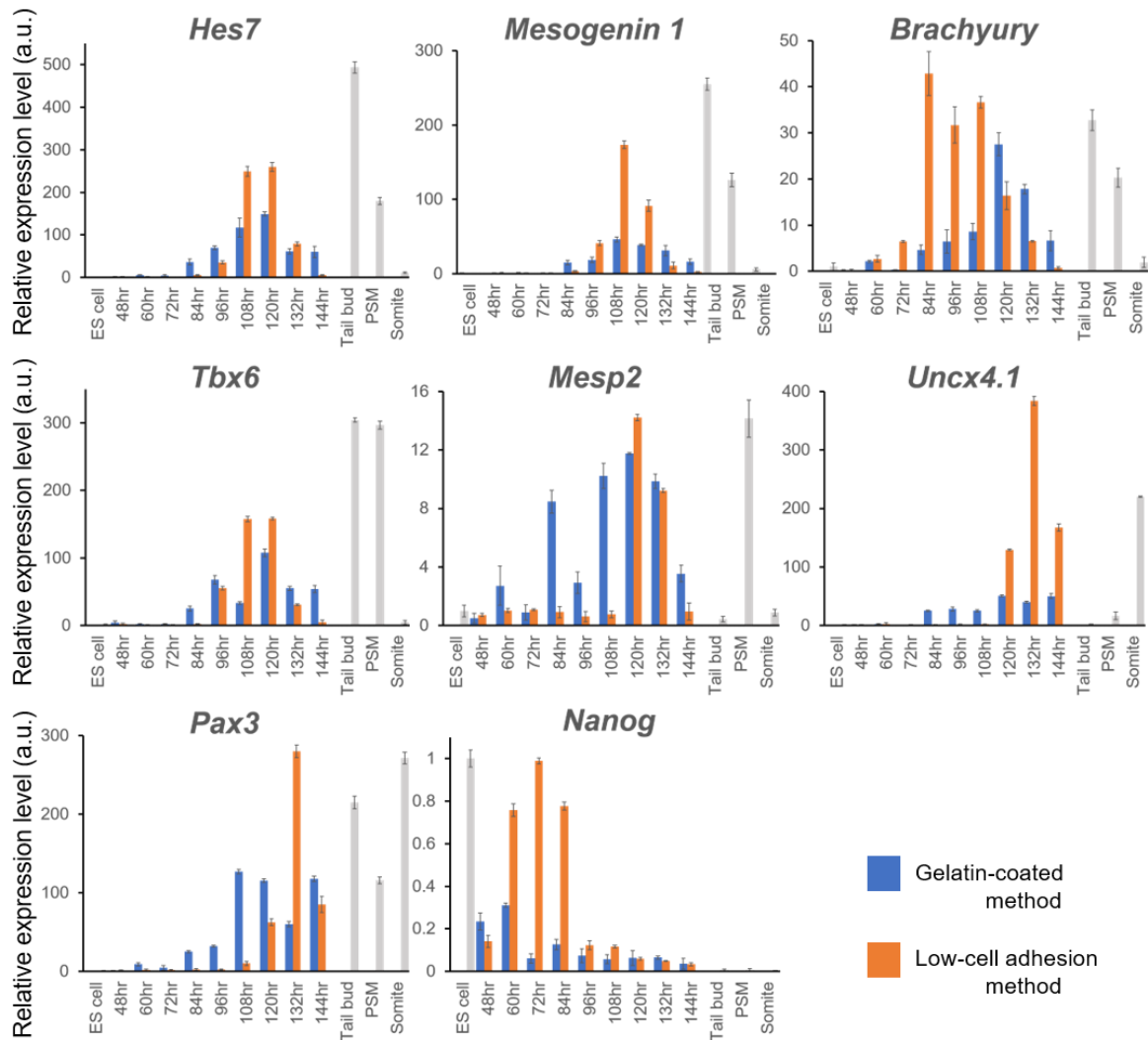


図 8. RT-qPCR を用いた各種体節形成関連遺伝子の発現パターン解析

ゼラチンでコーティングしたディッシュを用いた接着培養(青)、低接着 96-well plate を用いた浮遊培養(オレンジ)における遺伝子発現を RT-qPCR で調べた。コントロールはマウス ES 細胞、マウス胎生 10 日目の尾部先端部、PSM、体節を使用した。(n = 3)

Hes7の発現量や発現パターンは細胞塊のサイズにより影響を受ける

iPSM のサイズによる *Hes7* オシレーションの影響を検証するため、様々な大きさの iPSM を作製し分化誘導 100 時間後から *Hes7* の発現を CL24B-LIC/C で測定した(図 9)。

まず、平底低接着 96-well plate に 3000 cells/well になるよう ES 細胞を播種した(F3000)。形成される iPSM の大きさは様々なため、CL24B-LIC/C での測定前に回収した細胞塊の直径を測定し、150 μ m 以下の細胞塊を F3000-Small、150 μ m から 260 μ m の細胞塊を F3000-Medium、260 μ m 以上の細胞塊を F3000-Large に分類した(図 9A)。

F3000-Small や F3000-Large の細胞塊では共に *Hes7* のオシレーションは検出できるものの振幅が小さく、発現量の平均値はそれぞれ 319.60 ± 94.52 c.p.s.、 432.78 ± 55.02 c.p.s. であった(図 9B,C)。一方、F3000-Medium の細胞塊では振幅の大きい *Hes7* のオシレーションが観察でき、その発現量の平均値は、 543.91 ± 66.88 c.p.s. であった。

以上のことから、*Hes7* 発現量は iPSM を構成する細胞数により影響を受けていると考えられた。そこで、形成される細胞塊の大きさにばらつきの大きい平底低接着 96-well plate ではなく、播種した細胞が一つの細胞塊を形成する丸底の低接着 96-well plate を使用することで一定のサイズで細胞塊を得ることができると考えた。

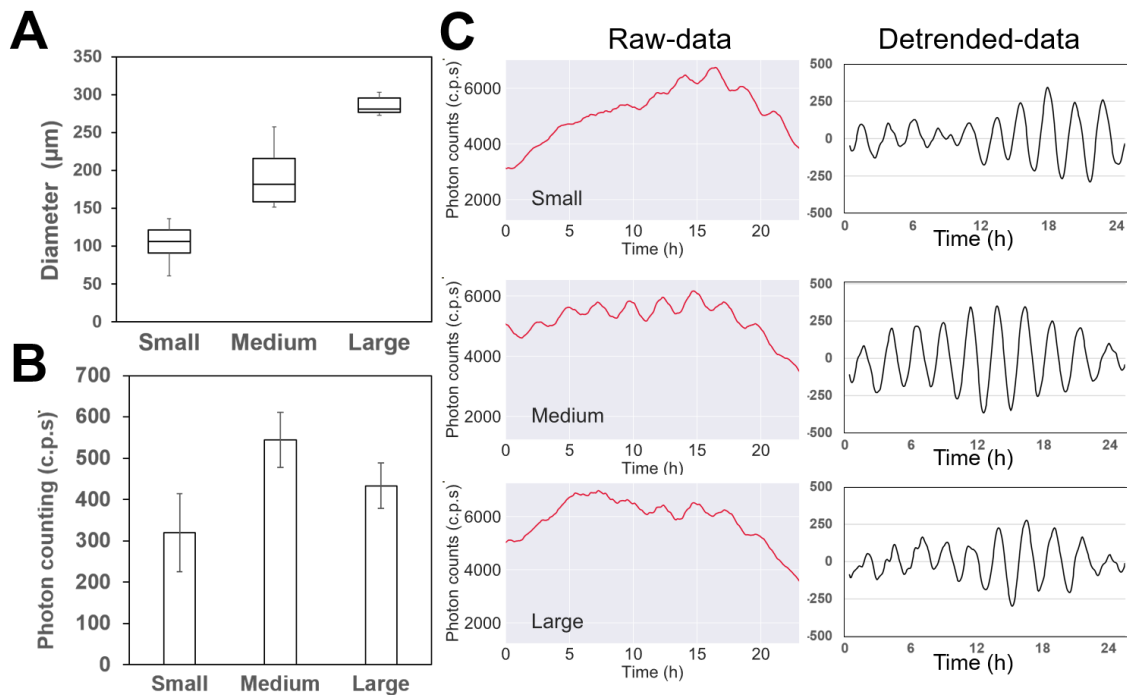


図 9. 平底低接着 96-well plate により形成される細胞塊のサイズと *Hes7* 発現量の比較

(A) 平底低接着 96-well plate により形成された細胞塊のサイズの分類。(B) CL24B-LIC/C により検出した *Hes7* 発現量の平均値。(C) CL24B-LIC/C により検出した *Hes7* 発現パターン。(n = 15)

Hes7 発現量とオシレーションの振幅が最も大きい条件を決定するため、丸底低接着 96-well plate に 100-3000 cells/well になるよう ES 細胞を播種し (U100-U3000)、BMP 培地で 2 日間培養した。その後細胞塊を回収し CL 培地で培養後、分化誘導 100 時間後から *Hes7* の発現を CL24B-LIC/C で測定した(図 10)。測定には 1 細胞塊を使用した。

CL24B-LIC/C での測定前に直径を測定したところ、U100 の直径は 105.26 μ m から 131.58 μ m、U200 の直径は 116.98 μ m から 190.73 μ m、U300 の直径は 149.26 μ m から 235.29 μ m、U400 の直径は 153.85 μ m から 230.77 μ m、U500 の直径は 185.54 μ m から 307.69 μ m、U1000 の直径は 181.82 μ m から 363.64 μ m、U3000 の直径は 257.90 μ m から 445.61 μ m であった (図 10A)。つまり、平底低接着 96-well plate と比較すると、U100 と U200 の細胞塊が F3000-Small に分類され、U300 から U1000 までの細胞塊が F3000-Medium に、U3000 の細胞塊が F3000-Large に分類された。

さらに、CL24B-LIC/C により *Hes7* の発現量と発現パターンを測定したところ、すべての条件のうち U1000 での培養条件で *Hes7* の発現量が最も高く、最も振幅の大きなオシレーションが観察された (図 10B, C)。さらに、安定したオシレーションが 10 回程度続き、その平均周期は 167.2 \pm 2.2 分と生体マウス PSM における周期に近かった。以上のことから、U1000 で形成される細胞塊は最も効率よく ES 細胞から iPSM に分化誘導されていると示唆された。

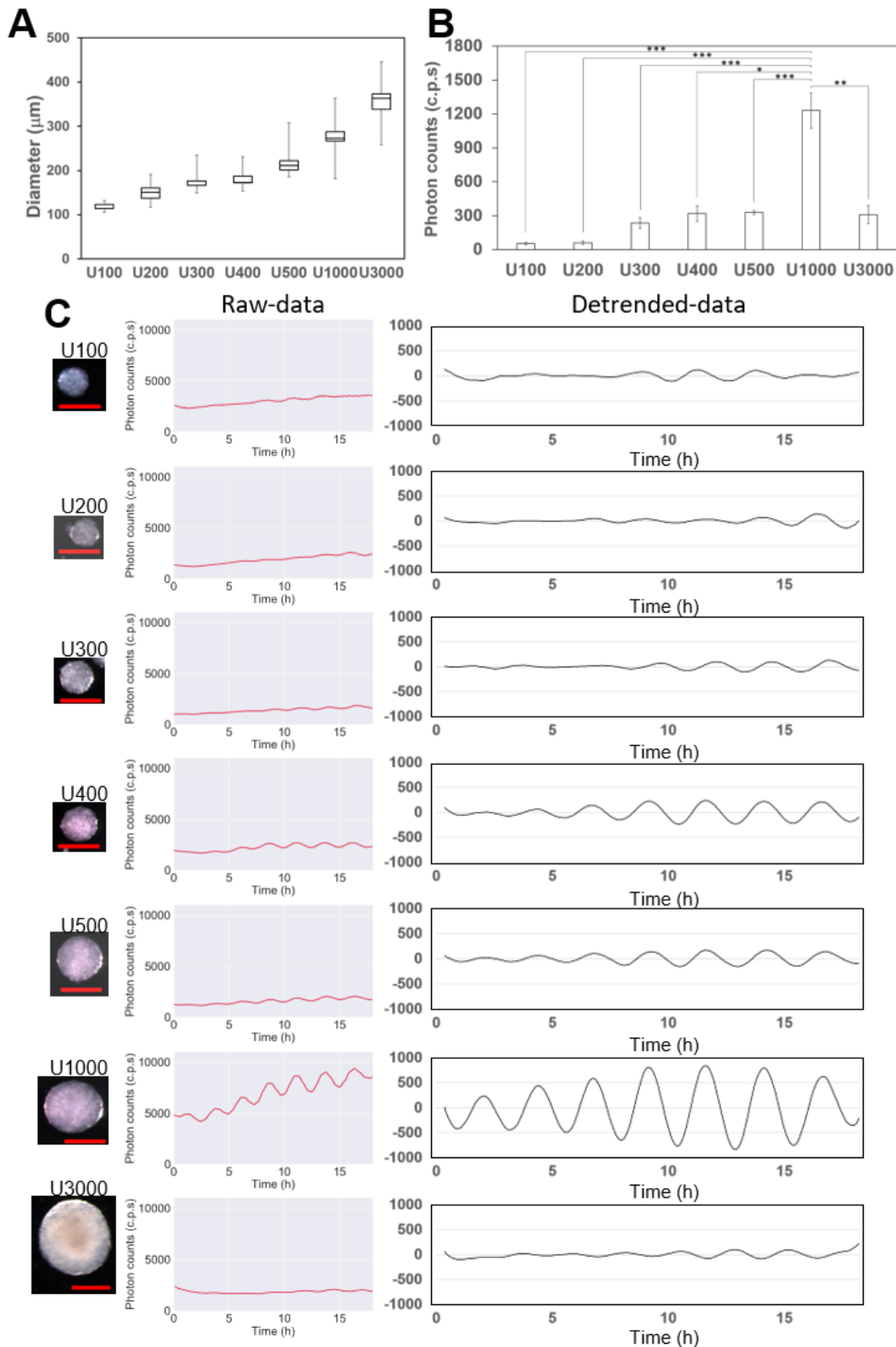


図 10. 丸底低接着 96-well plate で形成される細胞塊のサイズと *Hes7* 発現量の比較 (A)丸底低接着 96-well plate により形成された細胞塊の直径。(B) CL24B-LIC/C により検出した *Hes7* 発現量の平均値。(C) CL24B-LIC/C により検出した *Hes7* 発現パターン。U100 (n = 16), U200 (n = 3), U300 (n = 15), U400 (n = 9), U500 (n = 16), U1000 (n = 22), U3000 (n = 3)

また、BMP 培地での培養時間が iPSM への分化誘導に影響を与えるかどうかを確認するため、BMP 培地での培養時間を、24 時間、36 時間、42 時間、48 時間と条件を変えたサンプルを用意した。CL 培地に移行したタイミングで 2 日間 *Hes7* の発現を測定した (図 11A)。

BMP 培地での培養時間が 36 時間以上であれば *Hes7* は一定の発現量を示すが、24 時間の培養条件では *Hes7* オシレーションの振幅が小さく、iPSM への分化が不十分である可能性が示唆された(図 11B)。しかし、*Hes7* の発現パターンを確認すると 24 時間の培養条件下でも *Hes7* のオシレーションは観察できた。そこで *Hes7* の発現が上昇するタイミングを比較すると、48 時間、42 時間、36 時間、24 時間と BMP 培地での培養時間が短いほど *Hes7* の発現は遅いタイミングで上昇する事が分かった(図 11C)。

以上のことから、iPSM への分化誘導における BMP 培地での培養時間は、その後の *Hes7* 発現量に大きな影響を与え、36 時間以上必要であることが明らかになった。

そこで、以降の実験では、丸底低接着 96-well plate に ES 細胞を 1000 cells/well になるよう播種し、BMP 培地で 48 時間培養後細胞塊を回収し CL 培地に移す分化誘導法を使用した。

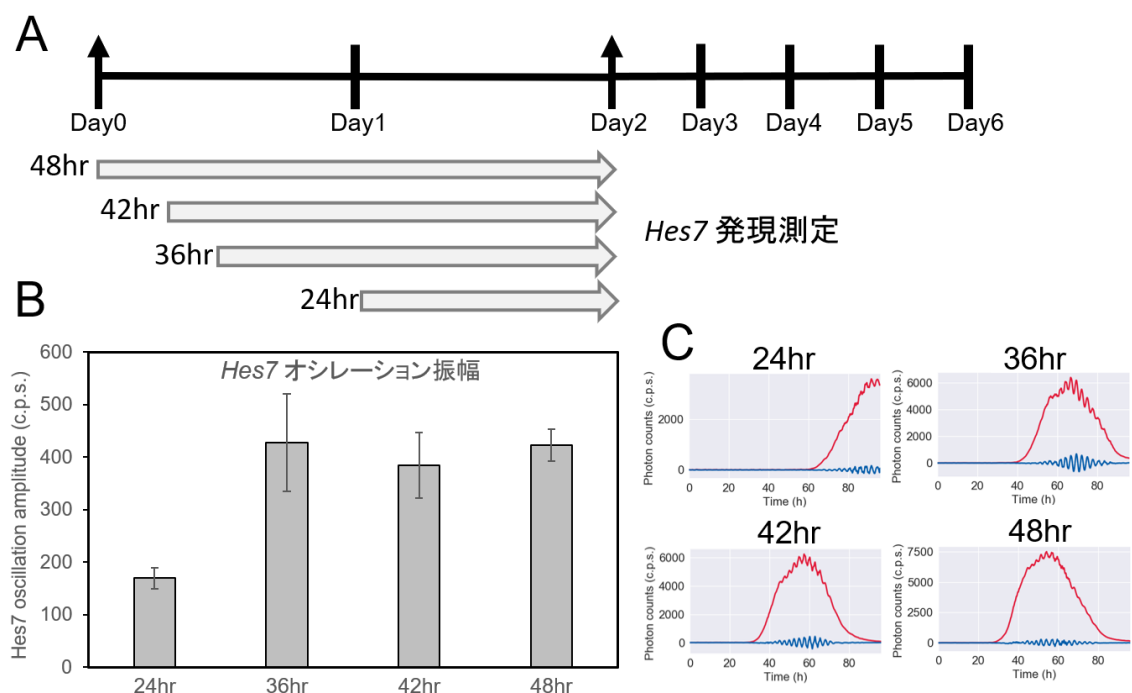


図 11. BMP 培地での培養時間による *Hes7* の発現量の比較

(A) 未分化状態の ES 細胞を BMP 培地で分化誘導を行うタイミングを変えることで培養時間を調整した。(B) 各培養時間における *Hes7* オシレーションの振幅比較。(C) 各培養時間における *Hes7* の発現パターン。全ての条件で *Hes7* のオシレーションが観察される。Raw データ(赤)と移動平均を差し引いた Detrended データ(青)を示した。(n = 6)

iPSMにおいて *Hes7*の発現は周囲の細胞間で同期し進行波を形成する

リアルタイムイメージングに使用した iPSM は、丸底低接着 96-well plate に 1000 cells/well で ES 細胞を播種した U1000 の条件で作製した。3.5cm ガラスボトムディッシュに Micro insert を置き、その内部をゼラチンでコーティングした。中央部に iPSM を置き分化誘導 100 時間後から浮遊培養によるイメージングを行った(図 12A, B)。*Hes7* の発現は撮影開始後著しく上昇し、その後 *Hes7* のオシレーションが観察された(図 12C)。*Hes7*のオシレーション周期を測定したところ、140-210 分とばらつきがあったが、大部分の iPSM は 150-180 分の周期を示していた(図 12D)。さらに、iPSM の中心から *Hes7*の進行波のような波状の *Hes7*発現ダイナミクスが観察された。

今回使用した浮遊培養によるイメージングは、iPSM 全体における *Hes7*発現の定量には適した方法であるといえる。しかし iPSM は回転し移動しており、この波状の発現ダイナミクスに方向性があるかどうかは確認できず、さらに分節過程は明瞭ではなく体節形成が起こっている事を断定することは出来なかった。

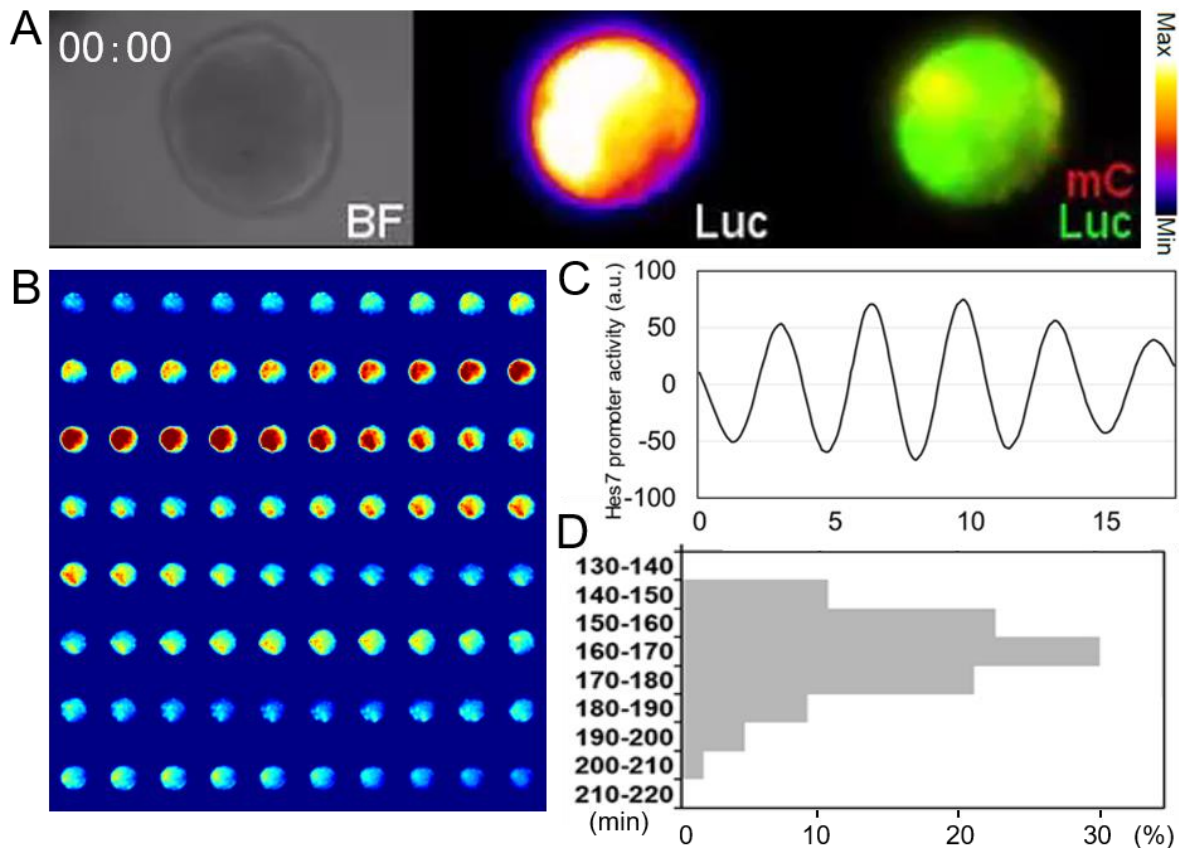


図 12. 浮遊培養によるタイムラプスイメージング

(A) 撮影開始時の iPSM は球状をしており、*Hes7* と *Msn* の発現部位は一致する。明視野 (BF)、*Hes7* の発現 (Luc)、*Msn* の発現 (mC) を示す。(B) *Hes7* 発現パターンを 10 分ごとに並べた。(C) iPSM 全体で観察される *Hes7* オシレーションパターン。(D) C で検出したオシレーション周期の分布を示す。(n = 66)

そこで、*Hes7*の進行波が観察可能な撮影条件を確立するため、CL培地での培養は細胞外マトリクスを構成する糖タンパク質であるフィブロネクチンでコートしたガラスボトムディッシュを用いて、接着させてリアルタイムイメージングを行った(図 13)。

iPSM はガラスボトム部分に接着し、接着面から細胞が移動し広がった(図 13A, B)。この扁平な iPSM は、浮遊培養によるイメージングと同様 *Hes7*の発現は著しく上昇し、進行波を形成した。この進行波は放射状に広がった後、二方向さらにはその片方が優位になることで一方向への進行波となった。

この進行波のオシレーションタイミングを解析したところ、オシレーションピークのタイミングは中心部と比較すると iPSM 辺縁部に進むにつれて少しずつ遅くなっていることから、進行波が形成されていることが示された(図 13C, F)。カイモグラフによる解析を行ったところ、中央部から開始した *Hes7*の進行波は、辺縁部へと波状に進行し最辺縁部に到達すると高い発現レベルを示した(図 13D, D', E)。これは頭部側 PSM に存在する次期体節の形成予定領域である S-1 で *Hes7*の発現が一時的に上昇するという生体の PSMでの現象と一致している。さらに、この最辺縁部では何回か *Hes7*の進行波がたどり着いた後、分節境界線が現れた(図 13G, H)。この結果から iPSM は *Hes7*のオシレーションや進行波だけでなく、分節過程も再現可能であることが示唆された。

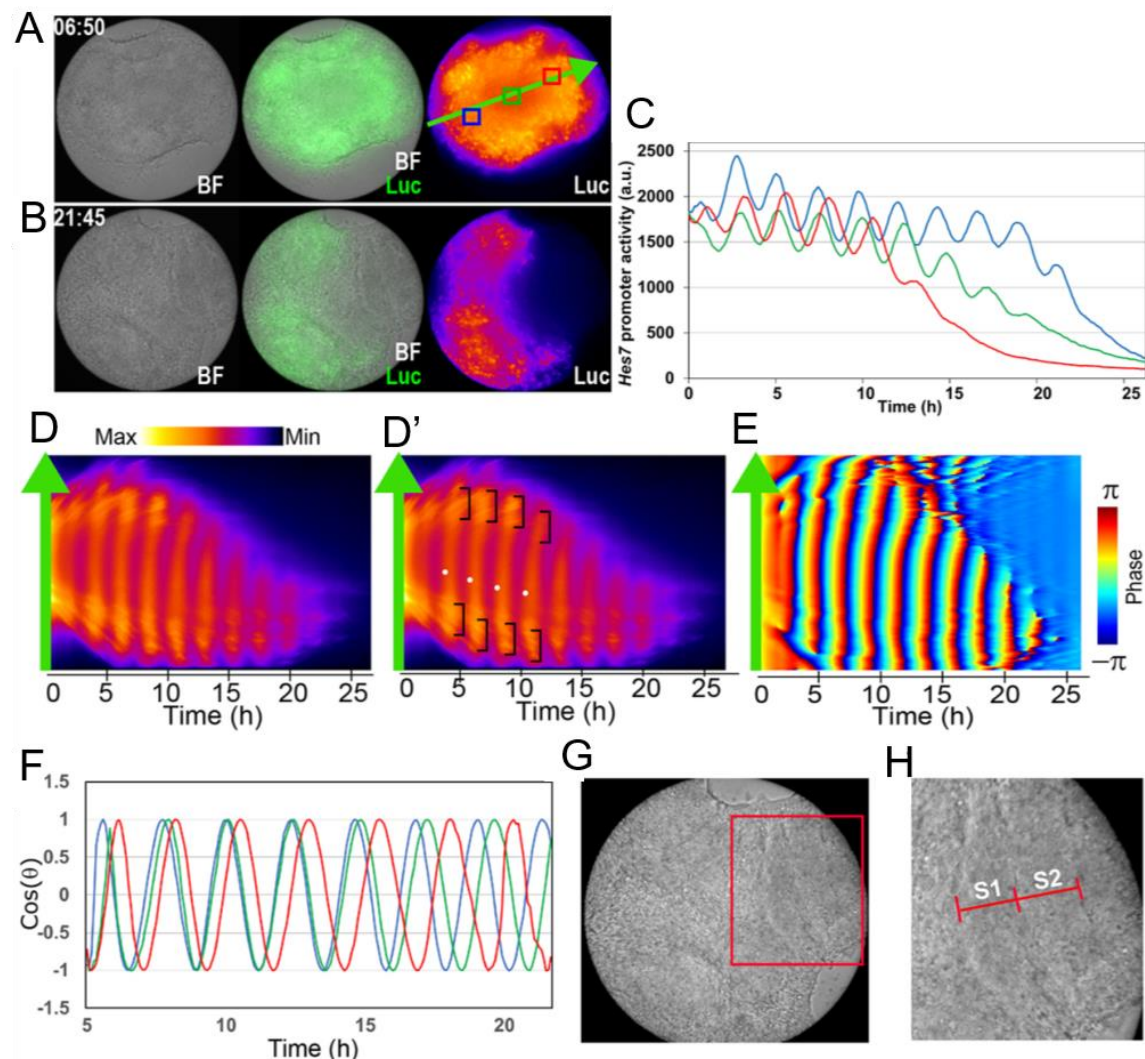


図 13. 接着培養によるタイムラプスイメージング (次ページに続く)

球状の iPSM は数時間後には扁平な形になる。(A,B) 撮影後の異なる時間における iPSM の全体像。明視野(BF)とルシフェラーゼ活性 (Luc) を示す。(C) A の図で進行波に沿って示した青色・緑色・赤色で囲まれたエリアにおける *Hes7* の発現パターン。(D, D') A の図で示した矢印部分における *Hes7* プロモーター由来のルシフェラーゼ活性を測定したカイモグラフ。進行波が 10 回程度起きていることが確認できる。また *Hes7* 進行波の起点 (白丸) と分節前の一過性発現上昇 (鍵括弧) を D' に示した。(E) D で検出した *Hes7* の発現量をヒルベルト変換し、オシレーション周期として示した。(F) C で検出した 3 か所のエリアにおける *Hes7* のオシレーション周期を示す。(G) iPSM で形成された分節境界部分の明視野。(H) G で示した赤枠の拡大図。S1、S2 は体節様組織を示しており、S2 は S1 の一つ前に形成された体節様組織であることを示している。全てのサンプルで同様のパターンを確認した。(n=13)

さらに、シングルセルレベルで *Hes7* の発現を観察するため、ES 細胞から BMP 培地での分化誘導を起こす際に、*Hes7* 発光レポーターベクターを持つ ES 細胞と持たない ES 細胞を 1:150 の割合で混合した(図 14)。リアルタイムイメージングの解析の結果、シングルセルレベルで *Hes7* レポーターの発現を検出できたが、iPSM 内での細胞移動が多く長時間の追跡が困難であった。しかし、いくつかの細胞で長時間の追跡が可能であり、8 時間以上の追跡が可能であった 20 個のシングルセルのうち 18 個でオシレーションパターンを認められた(図 14B, C)。以上の結果から iPSM における大部分の細胞は個々にオシレーションパターンを持つことが示唆された。

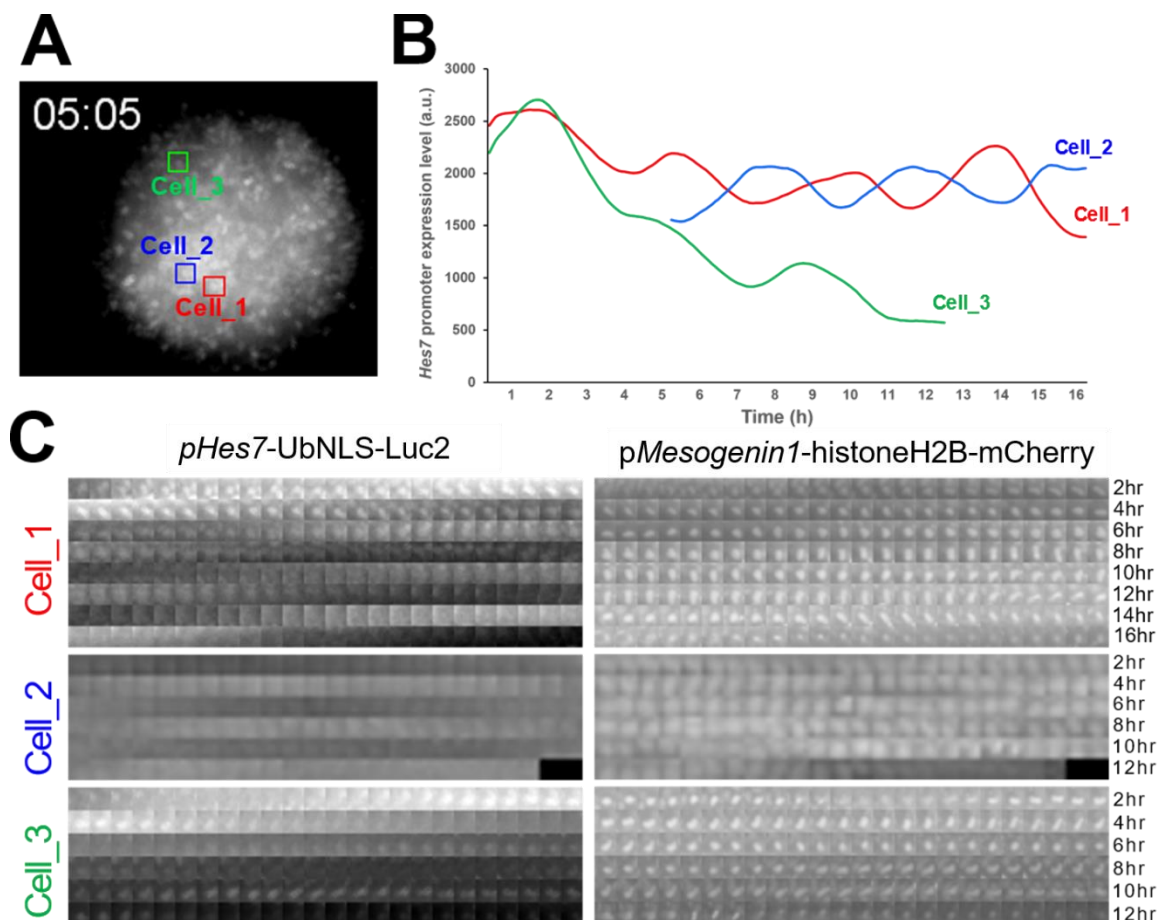


図 14. シングルセルイメージング (次ページに続く)

*Hes7*プロモーター発光レポーターを持つES細胞と野生型のES細胞を1:150の割合で混合し分化誘導させた。形成したiPSMをフィブロネクチンでコーティングしたガラスボトムディッシュに置き *Hes7* の発現をリアルタイムイメージングにより観察した。100 - 150 細胞が *Hes7* の発現を示していたが細胞移動が多く追跡が困難であった。8 時間以上追跡可能であった細胞は20細胞でそのうちの18細胞がオシレーションパターンを示した。(A) iPSMにおける *Hes7* の発現を示す。また8時間以上追跡可能であった細胞のうち3細胞を示した。(B) Aで示した3細胞における *Hes7* の発現パターン。全ての細胞でオシレーションが観察できた。(C) *Hes7* プロモーター由来のルシフェラーゼ活性と *Msgn* プロモーター由来の mCherry 発現の推移。

iPSMにおける頭尾軸は自己組織化されることで形成される

*Hes7*の進行波はiPSMの中央から辺縁部へと起こっていることから、進行波の方向を規定する頭尾軸が形成されているのではないかと考えられた。そこで、これを明らかにするため、頭尾軸で異なる部位に発現する遺伝子を*in situ* hybridizationにて検出した(図15)。iPSMはU1000の条件で作製し、誘導4日目からフィブロネクチンでコーティングしたディッシュを用いて接着培養したもの(図15A - D')と、ゼラチンでコーティングしたディッシュを用いて浮遊培養したもの(図15E - M)の両方を用意し、誘導5日目のiPSMを使用した。

生体のPSMにおける*Fgf8*は尾部PSMで高く発現しており(Dubrulle J and Pourquie O. *et al.*, 2004)、*Dusp4 / MKP2*(MAP kinase phosphatase 2)も*Fgf*シグナルの下流で制御されることによって尾部PSMで高く発現する(Niwa Y. *et al.*, 2007, 2011)。

iPSMでは*Fgf8*も*Dusp4 / MKP2*も共に辺縁部より中央部で高い発現がみられた(図15A, E, I)。また内因性*Hes7*の発現もiPSMの中央部で高い発現がみられた(図15B, F)。

一方、生体のPSMにおける*Mesp2*は分節境界に特異的に発現する遺伝子でPSMの頭部側でバンド状に発現する(Saga Y. *et al.*, 1997)。iPSMでは辺縁部において*Mesp2*の発現がバンド状にみられた(図15C, G)。これらの結果は、iPSMの中央—辺縁部の軸が生体PSMの頭尾軸に相当する事を示しており、iPSMにおけるこの頭尾軸は*Wnt*や*Fgf*シグナルの人為的な濃度勾配の必要なく自己組織化されると推測された。さらに体節マーカー遺伝子である*Uncx4.1*の発現を確認した(図15D, H)。*Uncx4.1*は体節の後側でのみ発現することが分かっている(Mansouri A. *et al.*, 1997; Neidhardt L. M. *et al.*, 1997)。iPSMでは辺縁部にバンド状の*Uncx4.1*の発現がみられ分節境界と一致した(図15D')。さらに*Hes7*の発現領域より外辺部に存在していた(図15J - M)。大部分のiPSMにおいて*Uncx4.1*は二領域で発現がみられた。この理由として*Hes7*の進行波が双方向へ進行し、その二領域で*Mesp2*の発現を誘導し、さらに*Uncx4.1*の発現も誘導したと推測できた。しかし、iPSMでは分節境界における*Uncx4.1*の発現領域は体節の後側に限局して発現するわけではなく、分節境界全域での発現が観察された。これらの結果からiPSMにおいて生体PSMの頭尾軸と類似の軸形成が認められるものの、体節における頭尾軸は形成されない可能性が示唆された。

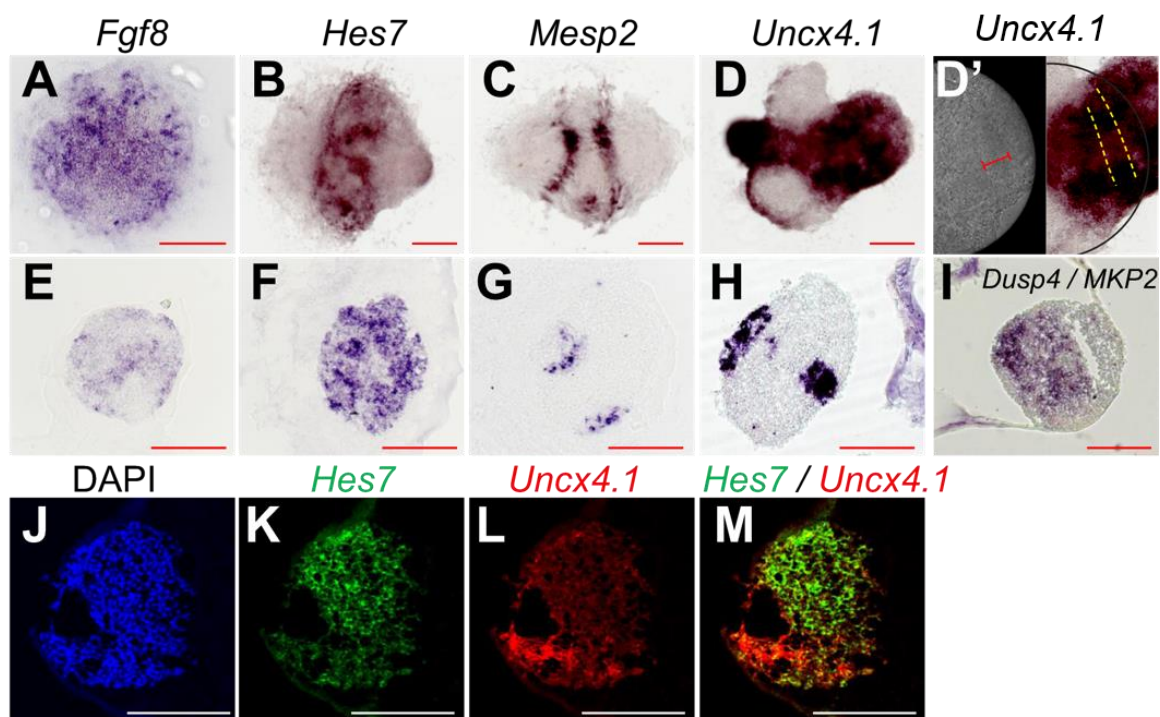


図 15. iPSM における生体の PSM や体節特異的な遺伝子の発現

U1000 の条件下で作製した iPSM を分化誘導 4 日目以降からフィブロネクチンを用いてコーティング (A - D') またはゼラチンを用いてコーティング (E - M) したディッシュで培養した。これらのサンプルは分化誘導 5 日目に *in situ* hybridization を行った。プローブは *Fgf8* (A, E)、*Hes7* (B, F)、*Mesp2* (C, G)、*Uncx4.1* (D, D', H)、*Dusp4* / *MKP2* (I) を使用した。D' は D の拡大図 (右) とその明視野像 (左) を示した。(J - M) *Hes7* (K, M) と *Uncx4.1* (L, M) の蛍光プローブで *in situ* hybridization を行い、DAPI による核染色を行った。スケールバーは 200 μ m を示す。

iPSMにおける阻害剤を使用した *Hes7* オシレーションへの影響の解析

この細胞培養系における PSM 様組織への分化誘導法は簡易的で再現性が高く、同様に作製した iPSM ではほぼ全ての細胞塊で *Hes7* オシレーションのタイミングが同期していた。そこで、分節過程に必須である Notch、Fgf、Wnt シグナル経路に対する阻害剤を使用し iPSM における *Hes7* の発現パターンを観察した。

これまでの研究により、DAPT (γ -secretase inhibitor, Davey H. F. *et al.*, 2001) は Notch シグナル経路を、U0126 (MEK inhibitor, Favata M. F. *et al.*, 1998) は Fgf シグナル経路を阻害し、これらはともに生体の PSM において *Hes7* オシレーションを阻害することが分かっている (Niwa Y. *et al.*, 2011)。また、Wnt のパルミトイル化に必須である膜結合型 O-acyltransferase の阻害剤である C59 と *Axin2* の不安定な性質を安定化させる IWR1 を Wnt シグナル経路の阻害剤として使用した。さらに、ゼブラフィッシュの PSM において PI3K の阻害剤である LY294002 が Wnt シグナル経路に拮抗的な作用を示すことが分かっている (Wang J. *et al.*, 2007) ため、この薬剤の効果も調べた。

薬剤を分化誘導 4 日目の iPSM に作用させ *Hes7* の発現を CL24B-LIC/C によって検出し定量したところ、全ての薬剤において、*Hes7* のオシレーションパターンは減弱または消失した(図 16A-F)。また、*Hes7* の発現量とオシレーションの振幅は共にコントロール条件下と比較して DAPT、U0126、C59、IWR1、LY294002 の全ての薬剤で減少していた(図 16G, H)。

この結果は、分節時計遺伝子のオシレーションパターンを示す発現には Notch、Fgf、Wnt シグナル経路が重要である (Aulehla A. *et al.*, 2003; Dale J. K. *et al.*, 2003; Niwa Y. *et al.*, 2007; Wahl M. B. *et al.*, 2007) という研究結果を支持しており、さらに、iPSM を用いることにより、生体の PSM では困難であった大規模薬剤ライブラリースクリーニングが可能であることが示された。

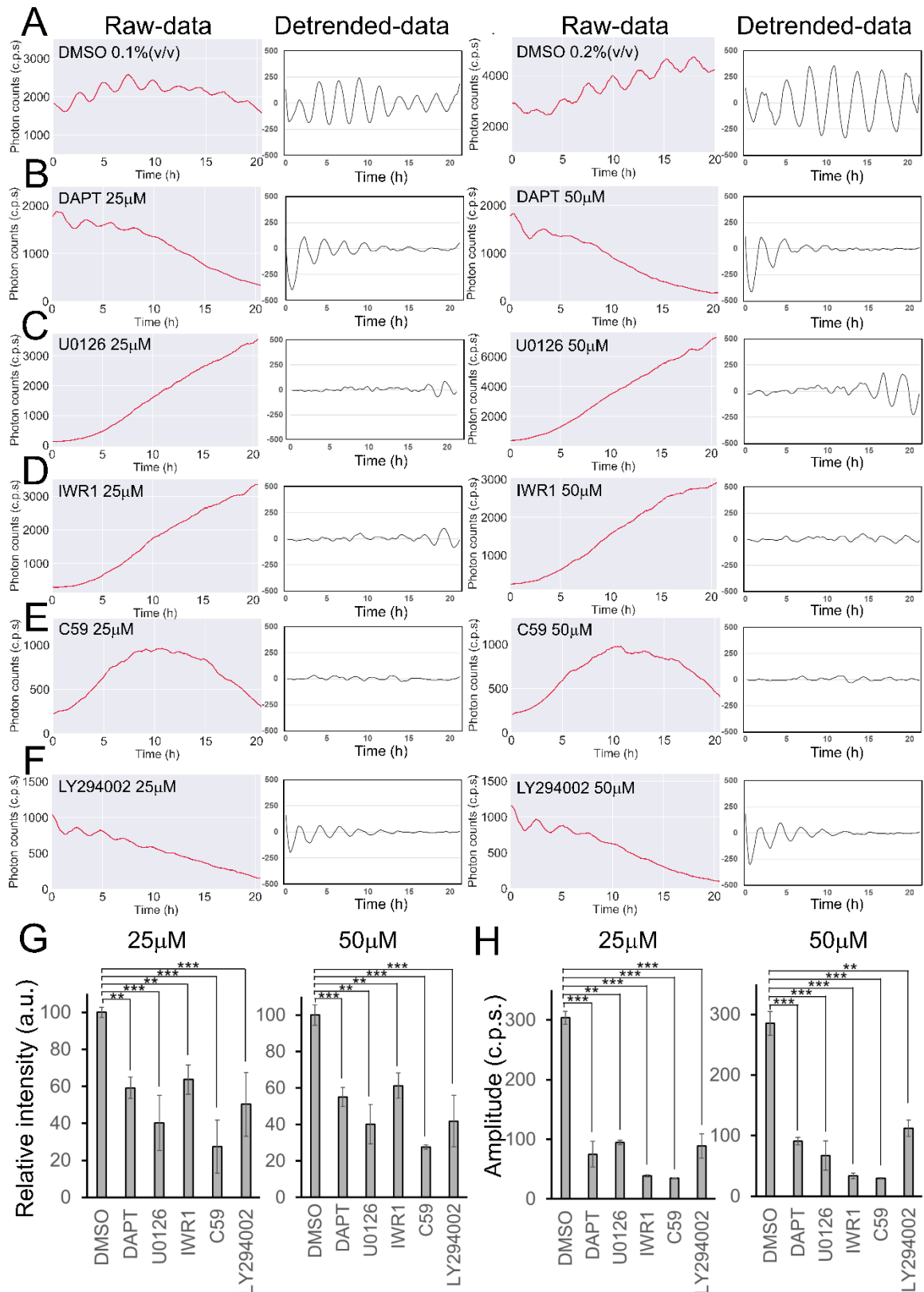


図 16. iPSM における *Hes7* オシレーションに対する阻害剤の影響

(A-F) U1000 の条件下で作製した iPSM に 0.1% (n = 6) と 0.2% (n = 6) DMSO (A)、25µM (n = 7) と 50µM (n = 7) の DAPT (B)、25µM (n = 10) と 50µM (n = 10) の U0126 (C)、25µM (n = 7) と 50µM (n = 7) の IWR1 (D)、25µM (n = 7) と 50µM (n = 7) の C59 (E)、25µM (n = 7) と 50µM (n = 7) の LY294002 (F) を添加し、分化誘導 4 日目以降から CL24B-LIC/C による *Hes7* プロモーター由来のルシフェラーゼ活性を測定した。
 (次ページに続く)

Raw データ(左)と移動平均を差し引いた Detrended データ(右)を示した。(G, H) DMSO を基準とした相対的な発現量 (G)とオシレーションの振幅(H)を示す。**P<0.01、***P<0.001 (Student' s t-test)

iPSM を用いた薬剤ライブラリースクリーニング

そこで、*Hes7* オシレーションの同期機構に影響を与える新たな因子やシグナル経路を発見するため、ライブラリースクリーニング用試薬(S990043-EPI1 ; Sigma)を購入し実験を行った。S990043-EPI1 はエピジェネティクスライブラリーであり 80 種類のエピゲノム関連阻害剤が含まれている。ゼラチンを用いてコーティングした 24-well plate に 1 well あたり 1 細胞塊になるよう iPSM を入れ、*Hes7* プロモーター由来のルシフェラーゼ活性を CL24B-LIC/C にて測定した。使用した薬剤は全て 20 μ M になるよう培地で希釈し使用した(図 17)。

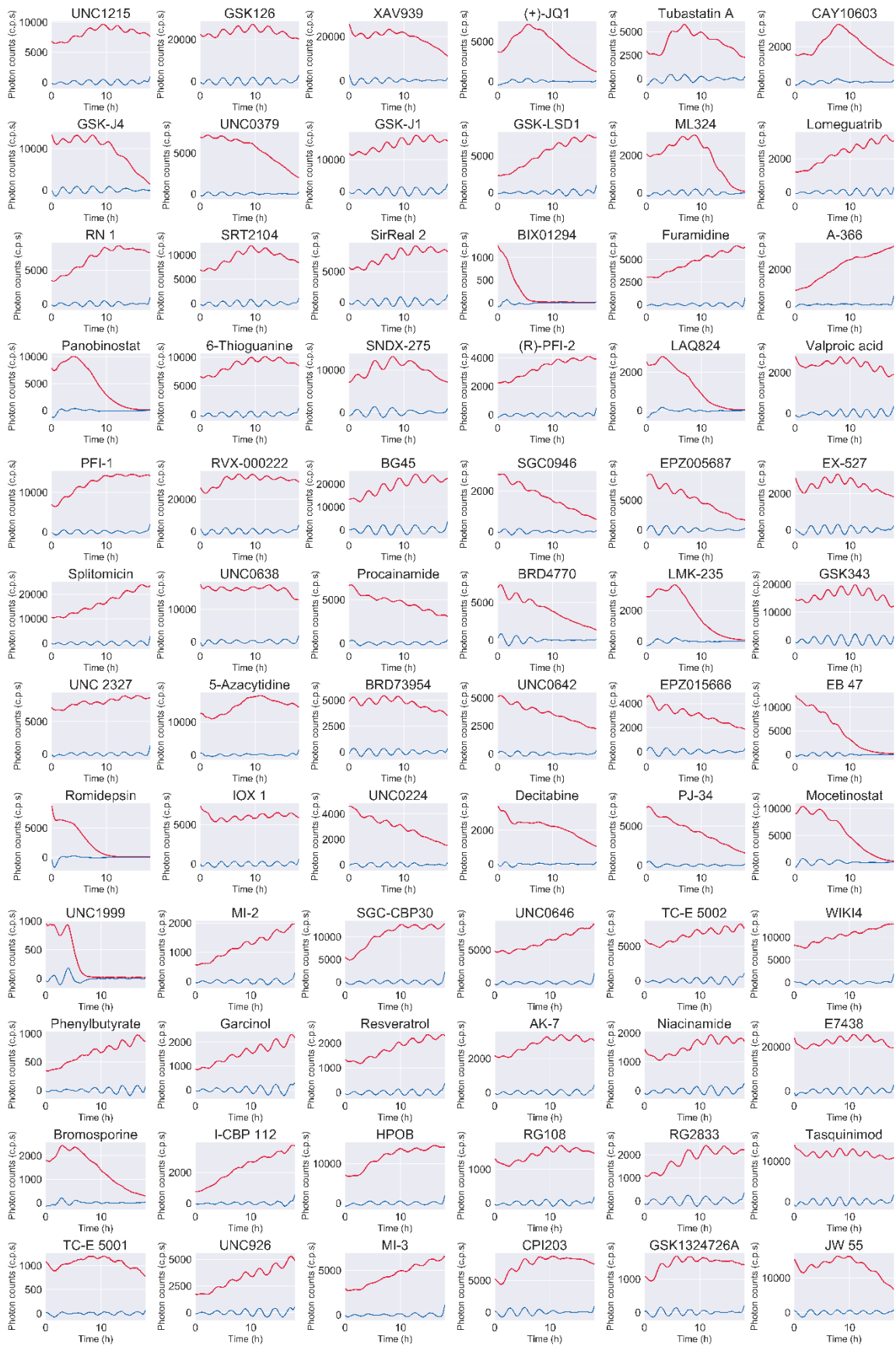


図 17. エピジェネティクス関連阻害剤を使用した薬剤ライブラリースクリーニング
(次ページに続く)

全ての薬剤は 20 μ M になるよう調整し、分化誘導 4 日目以降から CL24B-LIG/C を用いて *Hes7* プロモーター由来のルシフェラーゼ活性を測定した。Raw データ (赤) と移動平均を差し引いた Detrended データ (青) を示した。

SGI-1027 など DNA メチル化に関与する阻害剤では *Hes7* のオシレーションに影響はなく、コントロールで使用した DMSO と同様の発現パターンを示した(図 18)。一方、ヒストンメチル化阻害剤である EPZ004777 や 3-DZNeP、ヒストンの脱アセチル化阻害剤である SRT1720 や VORINOSTAT では *Hes7* の発現自体無くなることから、*Hes7* のプロモーター活性を抑制すると考えられた。

しかし同じヒストンの脱アセチル化阻害剤であっても SGC707 の場合には *Hes7* オシレーションは減弱するものの発現は維持されることから、プロモーター活性は抑制されないと考えられた。

同様に、OF-1 や I-BET 151 など Bromodomain and Extra-Terminal (BET) ファミリータンパク質の阻害剤でも *Hes7* のオシレーションは減弱するものの発現自体は維持された。興味深いことに他の BET ファミリータンパク質の阻害剤である PFI-1 や CPI203、RVX-000222 や GSK1324726A についても同様に、*Hes7* のオシレーションは減弱するものの発現自体は維持される発現パターンを示した(図 17)。以上のことから、分節時計の制御に BET ファミリータンパク質が関与している可能性が考えられた。

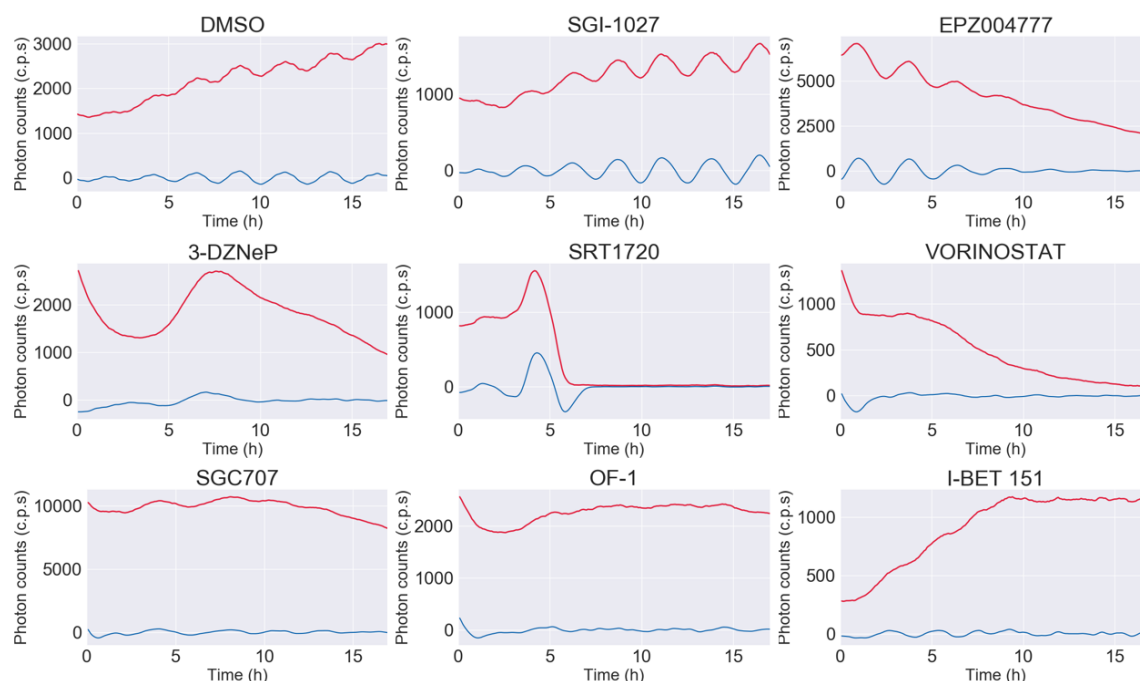


図 18. iPSM を用いた薬剤ライブラリースクリーニング

全ての薬剤は 20 μ M になるよう調整し、分化誘導 4 日目以降から CL24B-LIG/C による *Hes7* プロモーター由来のルシフェラーゼ活性を測定した。Raw データ (赤) と移動平均を差し引いた Detrended データ (青) を示した。

さらに *Hes7* オシレーションに対する I-BET 151 の効果を明らかにするため、フィブロネクチンを用いてコーティングしたガラスボトムディッシュに iPSM を置きリアルタイムイメージングを行った(図 19A)。I-BET 151 を加えた iPSM では *Hes7* の発現を抑制することなく *Hes7* の進行波を抑制した。これは *Hes7* の発現が安定した状態になることで同期せず、iPSM 全体で測定すると *Hes7* が定常発現する状態になったと考えられた。さらに I-BET 151 を添加した iPSM では体節形成は起こらなかった。また *Hes7* プロモーター発光レポーターマウスの胎生 10.5 日胚を使用し I-BET 151 の影響をリアルタイムイメージングにて観察した(図 19B,C)。コントロールの PSM では *Hes7* のオシレーションと進行波、体節形成が観察されたが、I-BET 151 を添加した PSM では *Hes7* の発現はオシレーションせず安定状態になった。さらに体節形成は観察されなかった。

これらの結果から、薬剤ライブラリースクリーニングにより同定された阻害剤は、ES 細胞由来の iPSM における *Hes7* 発現パターンとマウス胎仔 PSM における *Hes7* 発現パターンの両者において同様の結果を示すことが明らかになった。従って iPSM を使用した薬剤ライブラリースクリーニングは、分節時計に影響を与える新たな薬剤の同定に効率の良い方法であることが考えられた。

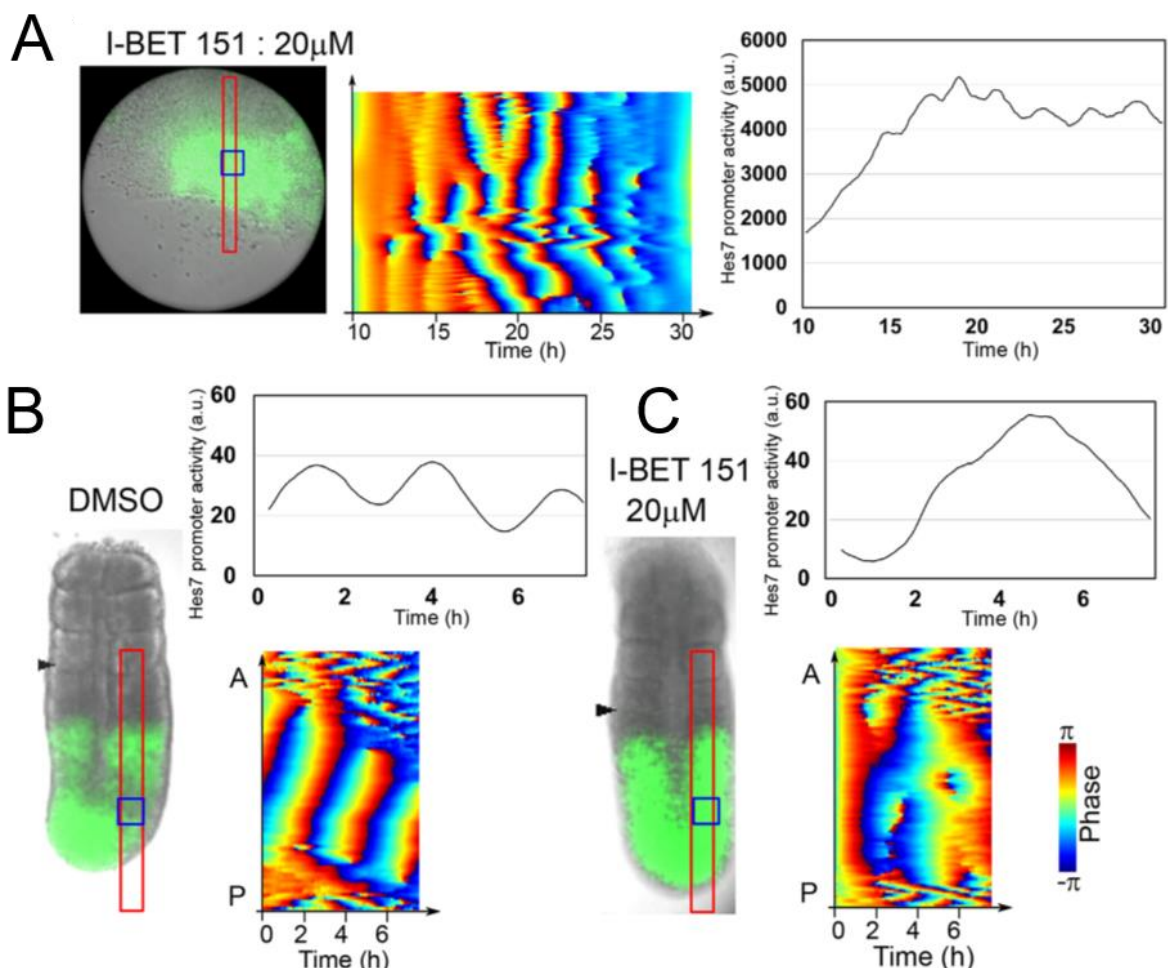


図 19. iPSM と組織 PSM における *Hes7* 発現パターンに対する I-BET 151 の影響
I-BET 151 の影響を観察するため、分化誘導 4 日目に 20 μ M になるよう培養液に添加し、*Hes7* プロモーター由来のルシフェラーゼ活性をリアルタイムイメージングによって測定した。

(次ページに続く)

(A) U1000 の条件下で作製した iPSM をフィブロネクチンでコーティングしたガラスボトムディッシュに置き撮影を行った。(左)明視野像と緑色のシグナルは *Hes7* 発現部位を示す。(中央)赤枠で囲まれた領域における *Hes7* の発現パターンを定量しオシレーション周期を示した。(右)青枠で囲まれた領域における *Hes7* 発現量の推移。(B, C) マウス胎生 10.5 日胚の PSM において DMSO を使用したコントロールでの *Hes7* 発現パターン(B)と I-BET 151 での *Hes7* 発現パターン(C) (左)明視野像。緑色のシグナルは *Hes7* 発現部位を示す。(右上) 青枠で囲まれた領域における *Hes7* 発現量の推移。(右下) 赤枠で囲まれた領域における *Hes7* の発現パターンを定量しオシレーション周期を示した。

Hes7 のオシレーション周期に影響を与える新たな薬剤を発見するため、さらに大規模のライブラリースクリーニング用試薬 (LO4100 ; Sigma) を購入し実験を行った。LO4100 には 1280 種類の阻害剤や活性剤が含まれており、そのうちの神経やホルモンに対する薬剤を除いた 350 種類の薬剤を使用した。ゼラチンを用いてコーティングした 24-well plate に 1 well あたり 1 細胞塊になるよう iPSM を入れ、*Hes7* プロモーター由来のルシフェラーゼ活性を CL24B-LIC/C にて測定した。使用した薬剤は全て 20 μ M になるよう培地で希釈し使用した。得られたデータから *Hes7* オシレーション周期を測定し、エピジェネティクスライブラリーで得られたデータと合わせて 430 種類の薬剤に対する *Hes7* のオシレーション周期の解析を行った (表 2)。いくつかの薬剤では *Hes7* の発現自体が無くなるため (表 2, 灰色)、オシレーションが安定して観察されるもののみ周期を測定した。コントロールで使用した DMSO (表 2.No.121) では *Hes7* のオシレーション周期の長さは 159.58 ± 1.76 分であった。

ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1/3 の阻害剤である RG2833 (表 2.No.1) では 203.33 ± 4.51 分と最も長い *Hes7* のオシレーション周期を示した。また、周期を長くする薬剤のうち上位 3 種全てが HDAC 阻害剤に分類されていた。

一方、Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) の阻害剤であり、ヒストン H3 の 27 番目リジンのメチル化阻害剤である GSK343 (表 2.No.198) や E7438 (表 2.No.199) では、それぞれ *Hes7* のオシレーション周期が 145.83 ± 2.18 分、 145.00 ± 2.04 分と DMSO における *Hes7* オシレーション周期より 10 分以上短い周期を示した。

これらの薬剤は *Hes7* オシレーションが安定して観察され、かつ 10 分以上 *Hes7* のオシレーション周期を短く、または長くすることから、これらの因子やその標的が *Hes7* のオシレーションを制御する新たな因子やシグナル経路となる可能性が示唆された。

No.	Name	Class	Action	Selectivity	Description	Amplitude (c.p.s.)	Amplitude / Raw_SD (c.p.s.)	Period (min)	Period_SD (min)
1	RG2833	Gene Regulation	Inhibitor	HDAC	RG2833 is a brain-penetrant HDAC inhibitor	0.1936	0.0193	203.33	4.5134
2	SNDX-275	Gene Regulation	Inhibitor	HDAC	Potent and long-lasting histone deacetylase (HDAC) inhibitor; undergoing clinical trials for treatment of various cancers; Entinostat inhibits class I HDAC1 and HDAC3	0.1697	0.0107	201.67	2.2667
3	Mocetinostat	Gene Regulation	Inhibitor	HDAC	Mocetinostat is a potent isotype-selective HDAC inhibitor	0.1300	0.0082	195.00	2.0000
4	GSK-J4	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Demethylase	GSK-J4 is a potent H3K27me3 demethylase inhibitor	0.1145	0.0224	183.33	15.1688
5	KT185	Cell Signaling and Neuroscience	Agonist	P2	KT185 is a very potent, selective inhibitor of <i>alpha</i> -Hydroxylase Domain Containing 6 (ABHD6)	0.1151	0.0578	181.67	4.8113
6	Pentamidine isethionate	Glutamate	Antagonist	NMDA	NMDA glutamate receptor antagonist; neuroprotective agent; antimicrobial agent prescribed for the treatment of AIDS-associated Pneumocystis carinii pneumonia	0.2029	0.0355	177.50	1.0206
7	NNC 55-0396	Ca2+ Channel	Inhibitor	T-type	Selective T-type calcium channel inhibitor.	0.2642	0.0192	177.00	3.3466
8	Nifedipine	Ca2+ Channel	Antagonist	L-type	L-type Ca2+ channel blocker; vasodilator	0.1629	0.0028	176.67	2.5459
9	HI-TOPK-032	Kinase inhibitors	Inhibitor	TPOK	HI-TOPK-032 is a specific TOPK (T-LAK cell-originated protein kinase) inhibitor both in vitro and in vivo. HI-TOPK-032 suppressed tumor growth in a colon cancer xenograft model.	0.1389	0.0128	176.67	4.8113
10	Nicardipine hydrochloride	Ca2+ Channel	Antagonist	L-type	L-type Ca2+ channel antagonist; antihypertensive	0.1651	0.0288	175.83	2.1784
11	Chloroquine diphosphate	DNA	Intercalator	DNA	Antimalarial; anti-amoebic; anti-inflammatory; binds strongly to double-stranded DNA	0.1120	0.0071	175.83	3.6164
12	Rosuvastatin calcium	Cell Signaling and Neuroscience	Inhibitor	HMG-CoA	Rosuvastatin calcium is a competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase	0.1062	0.0158	175.83	5.1930
13	K145 hydrochloride	Kinase Phosphatase	Inhibitor	SphK2	K145 (3-(2-amino-ethyl)-5-[3-(4-butoxyphenyl)propylidene]-thiazolidine-2,4-dione) is a selective inhibitor of sphingosine kinase-2 (SphK2) and an anticancer agent.	0.1944	0.0027	173.33	6.7358
14	AMN082	Glutamate	Agonist	mGluR7	Selective allosteric mGluR7 receptor agonist.	0.2591	0.0004	172.50	1.5590
15	EPZ015666	Epigenetic Regulation	inhibitor	Histone Methyltransferase	EPZ015666 is an orally available inhibitor of PRMT5 enzymatic activity in biochemical assays	0.1159	0.0229	172.50	3.0619
16	SB-525334	Phosphorylation	Inhibitor	AK5	A potent activin receptor-like kinase (ALK5)/type I TGF-receptor kinase inhibitor .	0.1112	0.0425	172.50	3.2808
17	Felodipine	Ca2+ Channel	Blocker	L-type	L-type calcium channel blocker	0.1600	0.0117	171.67	1.9245
18	SU1498	Tyrosine Kinase	Inhibitor	VEGFR	SU1498 is a selective inhibitor of the VEGFR2; inhibits Flk-1	0.1275	0.0080	171.67	0.9623
19	Tazarotene	Cell Biology	Inducer	TIG3	Tazarotene induces the expression of tazarotene-induced gene 3 (TIG3), a tumor suppressor gene	0.1240	0.0128	171.67	3.0429
20	1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride	Phosphorylation	Inhibitor	PKA / PKC	Inhibitor of cyclic nucleotide dependent protein kinase (PKA) and protein kinase C (PKC)	0.1793	0.0040	171.67	4.1944
21	Norcantharidin	Phosphorylation	Inhibitor	PP2A	Demethylated form of cantharidin with antitumor properties; potent inhibitor of the serine/threonine protein phosphatase 2A (PP2A)	0.1023	0.0078	171.67	6.8381

22	SP600125	Phosphorylation	Inhibitor	c-JNK	Selective c-Jun N-terminal kinase (c-JNK) inhibitor.	0.2453	0.0069	170.83	0.7607
23	D-Serine	Glutamate	Agonist	NMDA-Glycine	Glycine mimic active at the strychnine-insensitive glycine binding site associated with the NMDA glutamate receptor as well as the inhibitory post-synaptic glycine receptor	0.1037	0.0050	170.83	3.4190
24	MI-3	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Methyltransferase	MI-3 is a Menin-MLL interaction inhibitor	0.1135	0.0248	170.83	3.4190
25	NBQX disodium	Glutamate	Antagonist	AMPA/kamate	Neuroprotective AMPA/kamate glutamate receptor antagonist; water soluble salt of NBQX	0.2149	0.0212	170.00	2.3570
26	Kenpaullone	Phosphorylation	Inhibitor	CDK1, CDK2, CDK5	Potent inhibitor of CDK1/cyclin B, CDK2/cyclin A, CDK2/cyclin E, and CDK5/p25	0.1077	0.0032	170.00	3.3333
27	6-Nitroso-1,2-benzopyrone	Gene Regulation	Inhibitor	GLUT1	STF-31 selectively inhibits the glucose transporter GLUT1 and selectively impairs cancer cell growth of kidney and other types of cancer cells that lack the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor protein.	0.2736	0.0177	169.17	1.8321
28	(+)-MK-801 hydrogen maleate	Glutamate	Antagonist	NMDA	Highly potent and selective non-competitive NMDA glutamate receptor antagonist	0.2329	0.0303	168.33	1.9245
29	NS8593 hydrochloride	Ca2+ Channel	Blocker	SK(Ca)	Blocks small conductance Ca2+ activated K+ channels	0.1118	0.0189	168.33	2.8054
30	MDL 28170	Cell Cycle	Inhibitor	Calpain I / II	Cell permeable calpain I and II inhibitor	0.1446	0.0136	168.33	3.4694
31	GSK-J1	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Demethylase	GSK-J1 is a potent inhibitor of H3K27me3/me2-demethylases JMJD3/KDM6B and UTX/KDM6A	0.1268	0.0338	168.33	3.8490
32	MI-2	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Methyltransferase	MI-2 is a Menin-MLL interaction inhibitor	0.1339	0.0073	168.33	4.1944
33	KU-55933	Kinase/Phosphatase	Inhibitor	(A-T) mutated (ATM) kinase	KU-55933 is a very potent, specific inhibitor of Ataxia telangiectasia (A-T) mutated (ATM) kinase	0.1216	0.0085	168.33	5.8531
34	L-Methionine sulfoximine	Glutamate	Inhibitor	Glutamine synthase	Ornithine decarboxylase activator; glutamine synthetase inhibitor	0.1524	0.0018	168.33	9.4771
35	7-Cyclopentyl-5-(4-phenoxyphenyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-ylamine	Phosphorylation	Inhibitor	Ick	Potent and selective Ick (src family tyrosine kinase) inhibitor.	0.2115	0.0366	167.86	2.1640
36	Cyclophosphamide monohydrate	DNA	Intercalator		Cancer chemotherapeutic; cross-links DNA	0.1515	0.0099	167.50	1.9543
37	Stattic	Gene Regulation	Inhibitor	STAT3	Irreversible STAT3 activation inhibitor.	0.2818	0.0194	167.50	1.9543
38	Ro 25-6981 hydrochloride	Glutamate	Antagonist	NMDA-NR2B	NR2B-selective, NMDA glutamate receptor antagonist	0.1248	0.0007	167.50	3.2808
39	AS605240	Biochemistry	Inhibitor	P13K	AS605240 is a potent and selective P13K inhibitor	0.1159	0.0464	167.50	10.1892
40	Ezatiostat	Cell signaling	Inhibitor	GSTP1-1	Ezatiostat is an inhibitor of glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1)	0.2352	0.1595	167.50	2.5685
41	Pyridostatin trifluoroacetate salt	Gene Regulation	Stabilizer	G-quadruplex	Pyridostatin stabilizes G-quadruplexes, targeting the proto-oncogene SRC and telomeric G-quadruplexes, inducing DNA damage and cell-cycle arrest. MW given as free base.	0.1822	0.0118	166.67	1.9245
42	GW2974	Phosphorylation	Inhibitor	EGFR / ErbB-2	Dual EGFR and ErbB-2 receptor tyrosine kinase inhibitor	0.2338	0.0121	166.67	1.9245

43	trans-(±)-ACPD	Glutamate	Agonist	Metabotropic	Metabotropic glutamate receptor agonist	0.1108	0.0218	166.67	1.9245
44	Eliprodi	Glutamate	Antagonist	NMDA-polyamine	NR2B selective NMDA receptor antagonist (polyamine site); potential clinical use to treat both acute and chronic pain.	0.1452	0.0364	166.67	5.8531
45	BG45	Gene Regulation	Inhibitor	HDAC	BG45 is an HDAC class I inhibitor with selectivity for HDAC3	0.2552	0.0784	166.67	1.9837
46	Lamotrigine isethionate	Cell Signaling and Neuroscience			Lamotrigine isethionate is an anticonvulsant, water soluble salt of Lamotrigine	0.1210	0.0286	166.25	2.7717
47	Nifedipine	Ca2+ Channel	Antagonist	L-type Histone Methyltransferase	Ca2+ channel blocker; antihypertensive	0.1206	0.0248	166.11	1.8885
48	EPZ004777	Epigenetic Regulation	inhibitor		EPZ004777 is a potent, selective DOT1L inhibitor	0.1675	0.0090	165.83	2.7428
49	Memantine hydrochloride	Glutamate	Antagonist	NMDA	Antagonist of NMDA glutamate receptors; stimulates dopamine release	0.2158	0.0261	165.83	2.7428
50	Imatinib mesylate	Tyrosine Kinase	Inhibitor	Bcr-Abl	Imatinib mesylate is a tyrosine kinase inhibitor with antineoplastic activity. Imatinib is a potent inhibitor of the Bcr-Abl kinase encoded by the bcr-abl oncogene as well as receptor tyrosine kinases encoded by c-kit and platelet-derived growth factor	0.1232	0.0092	165.83	3.6164
51	Benztropine mesylate	Cell Signaling and Neuroscience	Antagonist	muscarinic acetylcholine receptor / DAT	Benztropine mesylate is a centrally acting muscarinic acetylcholine receptor antagonist and dopamine transporter (DAT) inhibitor	0.1756	0.0193	165.56	1.5158
52	T0070907	Gene Regulation	Antagonist	PPAR gamma	T0070907 is very similar in structure and activity to the PPARgamma antagonist GW9662. T0070907 is more potent and has higher selectivity for PPAR-gamma over all other subtypes (about 800-fold)	0.2633	0.0327	165.42	2.7925
53	CR 2249	Glutamate	Agonist	NMDA-Glycine	Facilitates glycine action at NMDA glutamate receptors	0.2424	0.0341	165.00	2.0412
54	Imperatorin	Phosphorylation	Modulator	p38 / ERK	A modulator of p38, ERK pathway. Imperatorin increases BMP-2 expression (mRNA) and increases bone density/volume and mineralization in vivo.	0.2019	0.0002	165.00	2.3570
55	O-Phospho-L-serine	Glutamate	Antagonist	NMDA	Competitive NMDA glutamate receptor antagonist with close structural similarity to L-glutamate	0.2059	0.0114	165.00	2.3570
56	SB 202190	Phosphorylation	Inhibitor	p38 MAPK	Highly selective, potent and cell permeable p38 MAP kinase inhibitor.	0.2750	0.0170	165.00	2.6352
57	Aniracetam	Glutamate	Agonist	AMPA	Increases ion conductance through AMPA glutamate receptors; reported to display anti-amnesic activity	0.1283	0.0213	165.00	2.0412
58	1-Aminocyclopropane carboxylic acid hydrochloride	Glutamate	Agonist	NMDA-Glycine	NMDA glutamate receptor agonist acting at the glycine site	0.1098	0.0230	165.00	1.7678
59	(-)-MK-801 hydrogen maleate	Glutamate	Antagonist	NMDA	Less active enantiomer of (+)-MK-801 hydrogen maleate, anticonvulsant, NMDA glutamate receptor antagonist.	0.1809	0.0346	165.00	3.3333
60	PD 169316	Phosphorylation	Inhibitor	p38 MAP kinase	Potent, cell permeable and selective p38 MAP kinase inhibitor; nM potency	0.1452	0.0082	164.50	2.5533
61	Cyclosporin A	Phosphorylation	Inhibitor	Calcineurin phosphatase	Calcineurin phosphatase inhibitor; immunosuppressant	0.1864	0.0061	164.17	1.8321
62	CNOX disodium	Glutamate	Antagonist	AMPA/Kainate	Potent, competitive AMPA/kainate glutamate receptor antagonist	0.1398	0.0148	164.17	1.4027
63	TCPOBOP	Transcription	Agonist	CAR	Constitutive androstane receptor (CAR) agonist; most potent known member of the phenobarbital-like class of CYP-inducing agents	0.1252	0.0182	164.17	2.4767
64	Fenobam	Glutamate	Antagonist	mGluR5	Potent, selective, noncompetitive glutamate mGluR5 receptor antagonist	0.2214	0.0027	164.17	3.2095
65	Minocycline hydrochloride	Cell Cycle	Inhibitor		Basement membrane protease inhibitor; inhibits endothelial cell proliferation and angiogenesis.	0.1085	0.0157	164.17	6.2823
66	Myricetin	Phosphorylation	Inhibitor	Casein Kinase II	Casein Kinase II inhibitor	0.1099	0.0223	163.75	2.5769

67	Aurothioglucose	Phosphorylation	Inhibitor	rac1	Potent PKC- ι - Par6 interaction inhibitor; Disrupts a rac1 signaling pathway required for growth of a cancer cell line.	0.2698	0.0004	163.33	1.5215
68	LY-294,002 hydrochloride	Phosphorylation	Inhibitor	PI3K	Specific phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor.	0.2646	0.0126	163.33	1.9245
69	D-ribofuranosylbenzimidazole	Transcription	Inhibitor		Inhibitor of RNA synthesis; chain terminator	0.1940	0.0140	163.33	2.2567
70	Garcinol	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Acetyltransferase	Inhibitor of PCAF and p300 histone acetyltransferase (HAT) activity	0.2080	0.0097	163.33	2.5459
71	GSK126	Epigenetic Regulation	inhibitor	Histone Methyltransferase	GSK126 is a potent, highly selective inhibitor of EZH2 methyltransferase activity	0.1434	0.0016	163.33	2.8054
72	Bepiridil hydrochloride	Ca ²⁺ Channel	Blocker		Non-selective Ca ²⁺ channel blocker which stimulates the binding of 1,4-dihydropyridine-based drugs to Ca ²⁺ channels; anti-anginal	0.1197	0.0159	163.33	2.5459
73	Furafylline	Biochemistry	Inhibitor	P4501A2	Cytochrome P4501A2 inhibitor	0.2064	0.0080	163.33	3.2632
74	SGC0946	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Methyltransferase	SGC0946 is a highly potent and selective DOT1L methyltransferase inhibitor	0.1100	0.0120	163.33	4.5134
75	Acetazolamide	Biochemistry	Inhibitor	Carbonic anhydrase	Carbonic anhydrase inhibitor; diuretic	0.1190	0.0276	163.00	3.0332
76	Hispidin	Phosphorylation	Inhibitor	PKC-beta	Potent protein kinase C-beta inhibitor	0.1261	0.0286	162.92	1.0958
77	Zoledronic acid monohydrate	Kinase	Inhibitor	FPP synthase	Zoledronic acid (zoledronate) is a bisphosphonate bone resorption inhibitor, an inhibitor of farnesyl diphosphate (FPP) synthase	0.1217	0.0287	162.92	5.4153
78	L2-b	Cell Biology	Chelator		L2-b is a bifunctional A β -interacting, metal-chelating molecule that modulates ROS production in, and improves survival of neuroblastoma cells incubated in the presence of A β along with Copper or Zinc.	0.1626	0.0047	162.50	1.0206
79	SirtReal2	Epigenetic Regulation	inhibitor	SIRT	Selective inhibitor of SIRT2	0.1854	0.0055	162.50	1.5590
80	M-110	Kinase/Phosphatase	inhibitor	PIM-3	M-110 is a highly isoform-selective, cell permeable and potent ATP-competitive inhibitor of the PIM kinase family that prefers PIM-3	0.1610	0.0073	162.50	2.8260
81	BRD4770	Epigenetic Regulation	inhibitor	Histone Methyltransferase	G9a inhibitor and S-adenosyl methionine (SAM) mimetic.	0.1325	0.0157	162.50	2.8260
82	Nimodipine	Ca ²⁺ Channel	Antagonist	L-type	Potent L-type Ca ²⁺ channel antagonist	0.1288	0.0220	162.50	2.5685
83	EPZ005687	Epigenetic Regulation	inhibitor	Histone Methyltransferase	EPZ005687 is a potent and selective inhibitor of EZH2	0.1246	0.0337	162.50	2.8260
84	Diltiazem hydrochloride	Ca ²⁺ Channel	Antagonist	L-type	Ca ²⁺ channel antagonist selective for slow, or L-type, channels; stimulates 1,4-dihydropyridine binding to Ca ²⁺ channels; coronary vasodilator	0.1082	0.0082	162.50	2.5685
85	AZ191	Cell Cycle	Inhibitor	DYRK1B	AZ191 is a cell permeable, potent and selective inhibitor of DYRK1B that promotes a G1 cell cycle arrest	0.1069	0.0128	162.50	1.5590
86	UNC926	Epigenetic Regulation	Inhibitor		UNC-926 is a methyl-lysine (Kme) reader domain inhibitor; inhibits L3MBTL1	0.2108	0.0129	162.50	3.2808
87	DFB	Glutamate	Modulator	mGluR5	Positive allosteric modulator of the mGluR5 metabotropic glutamate receptor.	0.2235	0.0137	162.50	3.4861
88	Mibefradil dithydrochloride	Ca ²⁺ Channel	Blocker	T-type	T-type Ca ²⁺ channel blocker	0.1330	0.0504	162.50	8.3956
89	Genistein	Phosphorylation	Inhibitor	Tyrosine kinase	Cytotoxic inhibitor of tyrosine kinase and topoisomerase II kinase	0.1069	0.0247	161.67	1.3608
90	D(-)-2-Amino-5-phosphopentanoic acid	Glutamate	Antagonist	NMDA-glycine	Potent and selective antagonist for NMDA receptors	0.1033	0.0147	161.67	2.5459
91	SB 415286	Phosphorylation	Inhibitor	GSK-3	Competitive glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitor.	0.1012	0.0245	161.67	1.1111

92	GW7647	Transcription	Agonist	PPAR- alpha	Potent agonist of peroxisome proliferator-activated alpha (PPAR- alpha)	0.1046	0.0031	161.67	3.0429
93	Apigenin	Cell Cycle	Inhibitor		Arrests cell cycle at G2/M phase	0.1313	0.0062	161.67	3.2632
94	CB-1954	DNA	Intercalator		Prodrug activated by NAD(P)H quinone oxidoreductase-2	0.1309	0.0113	161.67	3.4694
95	(±)-alpha-Methyl-4-carboxyphenylglycine	Glutamate	Antagonist	Metabotropic	Competitive metabotropic glutamate receptor antagonist	0.1282	0.0277	161.67	10.8440
96	(-)-Tetramisole hydrochloride	Phosphorylation	Inhibitor		Inhibits multiple mammalian alkaline phosphatases	0.1704	0.0119	160.83	1.4027
97	N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone	Biochemistry	Inhibitor	Chymotrypsin alpha	Blocks LPS- or cytokine-induced activation of nuclear factor kappa B (NF-kappa B), which, blocks the induction of iNOS and COX-2 transcription; blocks activation of pp70s6k by all mitogens	0.2314	0.0314	160.83	1.4027
98	Cystamine dhydrochloride	Glutamate	Inhibitor	Transglutaminase	Transglutaminase inhibitor; substrate analog	0.1621	0.0025	160.83	2.1784
99	SMER28	Cell Biology	Enhancer	Autophagy	Small molecule modulator of mammalian autophagy.	0.1544	0.0104	160.83	2.1784
100	Sodium Oxamate	Biochemistry	Inhibitor	Lactate Dehydrogenase	Competitive lactate dehydrogenase inhibitor	0.1299	0.0108	160.83	1.4027
101	ZM 39923 hydrochloride	Phosphorylation	Inhibitor	JNK-3	Janus kinase 3 (JNK-3) inhibitor.	0.1071	0.0241	160.83	2.7428
102	BTO-1	Phosphorylation	Inhibitor	Plk	Polo-like kinase (Plk) inhibitor.	0.1062	0.0238	160.83	3.8036
103	TTNPB	Transcription	Ligand	RAR-alpha, beta, gamma	Selective and highly potent retinoic acid analog with affinity for retinoic acid receptors (RAR) alpha, beta, and gamma	0.1099	0.0044	160.83	3.9820
104	CID2858522	Gene Regulation	Inhibitor	NF-kB	CID2858522 specifically inhibits NF-kappa B activation downstream of protein kinase C (PKC).	0.1846	0.0108	160.83	4.3167
105	N-Methyl-1-deoxynojirimycin	Biochemistry	Inhibitor	Glucosidase	Interferes with metabolism of N-linked glycoproteins by inhibition of glucosidase	0.1318	0.0124	160.83	8.3680
106	PD153035 hydrochloride	Phosphorylation	Inhibitor	EGFR	A potent and selective ATP competitive inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase EGFR.	0.1842	0.0449	160.83	1.4027
107	CID 11210285 hydrochloride	Gene Regulation	Agonist	Wnt	CID 11210285 is a cell-permeable, potent and selective activator of Wnt signaling without inhibiting GSK-3.	0.2003	0.0070	160.00	1.1785
108	GM 6001	ECM	inhibitor	MMP broad	GM6001 is a broad spectrum matrix metalloprotease (MMP) inhibitor	0.2416	0.0344	160.00	1.1785
109	L-alpha-Methyl DOPA	Biochemistry	Inhibitor	Aromatic amino acid decarboxylase	L-aromatic amino acid decarboxylase inhibitor; antihypertensive	0.2621	0.0135	160.00	1.6667
110	2,4-Diamino-6-pyrimidinone	Phosphorylation	Inhibitor	GTP cyclohydrolase I	Inhibitor of GTP cyclohydrolase I, the rate-limiting enzyme in tetrahydrobiopterin (BH4) biosynthesis; blocks the induction of nitric oxide synthesis	0.1770	0.0375	160.00	1.6667
111	Daphnetin	Phosphorylation	Inhibitor	PK	Protein kinase (PK) inhibitor	0.2623	0.0073	160.00	2.8868
112	SB 216763	Phosphorylation	Inhibitor	GSK-3	Potent, selective, cell permeable inhibitor of glycogen synthetase kinase-3 (GSK-3).	0.1407	0.0180	160.00	1.1785
113	4-Aminodiphenylmethanesulfonyl fluoride hydrochloride	Biochemistry	Inhibitor	Serine protease	Irreversible inhibitor of serine proteases with lysine or arginine substrate specificities	0.1347	0.0321	160.00	2.8284

114	Y-27632 dihydrochloride	Phosphorylation	Inhibitor	ROCK	Highly potent, cell-permeable, and selective Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase (ROCK) inhibitor. Also inhibits ROCK-II with equal potency. The inhibition is competitive with respect to ATP.	0.1319	0.0107	160.00	2.0412
115	DNQX	Glutamate	Antagonist	Kainate/quisqualate	Potent, competitive kainate/quisqualate glutamate receptor antagonist	0.1299	0.0190	160.00	2.3570
116	Benzamide hydrochloride	Biochemistry	Inhibitor	Peptidase	Peptidase inhibitor	0.1449	0.0299	160.00	3.5355
117	N-Methyl-D-aspartic acid	Glutamate	Agonist	NMDA	NMDA glutamate receptor agonist	0.1051	0.0282	160.00	3.9087
118	CX 546	Glutamate	Modulator	AMPA	Positive-AMPA glutamate receptor modulator, more potent than 1-BCP	0.1112	0.0033	160.00	4.2492
119	Phenylbutyrate	Gene Regulation	Inhibitor	HDAC	Sodium phenylbutyrate is a histone deacetylase (HDAC) inhibitor	0.1584	0.0205	160.00	4.2492
120	Acetamide	Biochemistry	Inhibitor	Carbonic anhydrase	Carbonic anhydrase inhibitor	0.1445	0.0627	160.00	2.0000
121	DMSO					0.1504	0.0139	159.58	1.7609
122	Diacylglycerol Kinase Inhibitor II	Phosphorylation	Inhibitor	Diacylglycerol kinase	Diacylglycerol kinase inhibitor	0.1693	0.0261	159.58	2.0799
123	SANT-2	Gene Regulation	Inhibitor	SMO	SANT-2 is a potent sonic hedgehog pathway (shh) antagonist that directly inhibits by binding to the smoothened receptor.	0.1475	0.0389	159.58	2.3168
124	HA155	Cell Signaling and Neuroscience	Inhibitor	autotaxin	HA155 is a potent and selective autotaxin inhibitor, which potently blocks thrombin-induced lysophosphatidic acid (LPA) secretion in platelets	0.1549	0.0323	159.33	1.2353
125	DAPH	Phosphorylation	Inhibitor	EGFR	Protein tyrosine kinase inhibitor, specific for EGFR; Also inhibits amyloid beta fibril formation.	0.2057	0.0060	159.17	1.4027
126	1,4-Dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol	Phosphorylation	Inhibitor	Glycogen phosphorylase	Allosteric glycogen phosphorylase inhibitor	0.2112	0.0311	159.17	1.8321
127	SC-514	Phosphorylation	Inhibitor	IKK-2	SC-514 is a cell-permeable, potent and selective ATP competitive inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-2 (IKK-2).	0.1298	0.0300	159.17	1.4027
128	6(5H)-Phenanthridinone	Transcription	Inhibitor	PARP	Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) inhibitor	0.1099	0.0399	159.17	2.9853
129	Lercanidipine hydrochloride hemihydrate	Calcium Channel	Antagonist	Cav1.2b	L-type (Cav1.2b) vascular calcium channel antagonist	0.1053	0.0141	159.17	3.2095
130	SGL-1027	Epigenetic Regulation	Inhibitor	DNA Methyltransferase	SGL-1027 is a potent and selective inhibitor of DNA methyltransferase (DNMT)	0.2384	0.0052	159.17	3.4190
131	Bezafibrate	Transcription	Agonist	PPAR	Bezafibrate is a peroxisome proliferator-activated receptor agonist for PPAR-alpha PPAR-delta and PPAR-gamma Lipo protein lipase (LPL) activator.	0.1546	0.0063	159.17	5.3251
132	Cyclothiazide	Glutamate	Agonist	AMPA	Blocks the rapid desensitization of AMPA glutamate receptors	0.1402	0.0496	159.17	3.6164
133	Genipin	Cell Biology	Modulator	UCP2	Stimulates insulin secretion in UCP2-dependent manner (Uncoupling protein 2). Genipin is a protein, collagen, gelatin, and chitosan cross-linker.	0.1456	0.0468	158.89	2.4568
134	Anagrelide hydrochloride	Phosphodiesterase	Inhibitor	PDE-3	Potent cAMP PDE-3 inhibitor. Anagrelide is a phosphodiesterase inhibitor with antiplatelet activity	0.1818	0.0360	158.33	2.2567
135	KB-R7943	Calcium Channel	Inhibitor	NCX	KB-R7943 inhibits the reversed Na(+)/Ca(2+) exchanger, NCX. In cardiomyocytes	0.1288	0.0334	158.33	2.2567
136	ML-9	Phosphorylation	Inhibitor	MLCK	Myosin light chain kinase (MLCK) inhibitor	0.1085	0.0094	158.33	1.5215
137	ML-7	Phosphorylation	Inhibitor	MLCK	Selective myosin light chain kinase (MLCK) inhibitor	0.1060	0.0213	158.33	2.5459
138	Efavirenz	Gene Regulation	Inhibitor	Reverse transcriptase	Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI).	0.1137	0.0053	158.33	3.6641

139	SB3CT	ECM	Inhibitor	MMP	SB-3CT is a potent and selective inhibitor of matrix metalloproteinase (MMP-2) and MMP-9.	0.1460	0.0055	158.33	3.6641
140	Sivelestat sodium salt hydrate	Biochemistry	Inhibitor	HNE	Sivelestat is a competitive human neutrophil elastase (HNE) inhibitor. It also inhibits leukocyte elastase obtained from rabbit, rat, hamster and mouse.	0.1222	0.0045	158.33	4.3568
141	Cantharidin	Phosphorylation	Inhibitor	PP2A	Protein phosphatase 2A inhibitor	0.1251	0.0264	158.33	4.6647
142	1-Deoxynojirimycin hydrochloride	Biochemistry	Inhibitor	alpha-glucosidase	alpha-glucosidase II inhibitor	0.2458	0.0203	158.33	6.5263
143	Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate	Phosphorylation	Activator	PKA	PKA activator; second messenger	0.1100	0.0140	158.00	2.6833
144	CPCCOEt	Cell Signaling and Neuroscience	Antagonist	mGluR1	CPCCOEt is a selective non-competitive metabotropic glutamate receptor mGluR1 antagonist with no agonist or antagonist activity at mGlu2, 4a, 5a, 7b, 8a or ionotropic receptors	0.1203	0.0339	157.78	3.6265
145	Altretamine	DNA Metabolism	Inhibitor		Antineoplastic	0.1140	0.0084	157.50	2.5685
146	SRT2140	Gene Regulation	Activator	SIRT1	Sirt1 activator	0.1121	0.0116	157.50	2.5685
147	Palmitoyl-DL-Carnitine chloride	Phosphorylation	Modulator	PKC	Long-chain acylcarnitine; modulator of PKC activation; intermediate in mitochondrial fatty acid oxidation	0.1111	0.0109	157.50	2.2822
148	5,7-Dichlorokynurenic acid	Glutamate	Antagonist	NMDA-glycine	Potent excitatory amino acid receptor antagonist; active at the strychnine-insensitive glycine binding site of the NMDA glutamate receptor	0.1701	0.0139	157.50	4.5069
149	EGTA	Biochemistry	Inhibitor	Carboxypeptidase B	Carboxypeptidase B inhibitor; chelating agent useful for the determination of calcium in the presence of magnesium	0.1746	0.0047	157.50	5.6211
150	GNF-5	Phosphorylation	Inhibitor	BRC-Abl	GNF-5 is a BRC-Abl inhibitor.	0.2187	0.0685	157.50	3.4861
151	IRAK-1/4 Inhibitor I	Phosphorylation	Inhibitor	IRAK-1/4	A novel benzimidazole that is a potent inhibitor of interleukin-1 receptor-associated kinases 1/4 (IRAK 1/4).	0.1637	0.0457	157.22	2.9514
152	Camidazolium chloride	Intracellular Calcium	Inhibitor	Ca2+ATPase	Potent inhibitor of calmodulin activation of phosphodiesterase; strongly inhibits calmodulin-dependent Ca2+-ATPase	0.1244	0.0066	156.67	3.8490
153	(S)-MAP4 hydrochloride	Glutamate	Antagonist	mGluR4,6,7	Selective mGluR4,6,7 metabotropic glutamate receptor antagonist	0.1584	0.0242	156.67	6.5263
154	AGK2	Gene Regulation	Inhibitor	SIRT2	SIRT2 inhibitor. AGK2 rescues dopamine neurons from a-synuclein toxicity in Parkinson's disease models.	0.2875	0.0088	156.00	2.6077
155	Benserazide hydrochloride	Biochemistry	Inhibitor	Decarboxylase	Peripheral decarboxylase inhibitor	0.1101	0.0036	155.83	2.4767
156	2,6-Difluoro-4-[2-(phenylsulfonylamino)ethylthio]phenoxycetamide	Glutamate	Agonist	AMPA	Selective, high affinity AMPA ionotropic glutamate receptor agonist; reduces ischemia-induced performance deficits in rats.	0.1412	0.0208	155.83	3.4190
157	3,4-Dichloroisocoumarin	Biochemistry	Inhibitor	Serine Protease	Serine protease inhibitor	0.1698	0.0189	155.83	4.4747
158	Nimustine hydrochloride	DNA	Intercalator		Antineoplastic; bifunctional nitrosourea alkylating anticancer agent	0.2104	0.0232	155.00	1.1785
159	AS-252424	Phosphorylation	Inhibitor	PI3Kgamma	A potent and selective phosphoinositide 3-kinase PI3Kgamma inhibitor.	0.1329	0.0253	155.00	1.6667
160	Tetraethylthiuram disulfide	Biochemistry	Inhibitor	Alcohol Dehydrogenase	Alcohol dehydrogenase inhibitor	0.1066	0.0194	155.00	1.6667

161	4-Methylpyrazole hydrochloride	Biochemistry	Inhibitor	Alcohol dehydrogenase	Alcohol dehydrogenase inhibitor	0.1421	0.0193	155.00	3.3333
162	N-Ethylmaleimide	Biochemistry	Inhibitor	Isocitrate dehydrogenase	Sulfhydryl alkylating agent that inactivates NADP-dependent isocitrate dehydrogenase and many endonucleases	0.1850	0.0004	155.00	5.2705
163	E-64	Biochemistry	Inhibitor	Cysteine protease	Irreversible inhibitor of cysteine proteases	0.1796	0.0141	155.00	6.7700
164	Phosphoramidon disodium	Biochemistry	Inhibitor	Endopeptidase	Inhibitor of mammalian enkephalinase and some metallo-endopeptidases; potent inhibitor of thermolysin and other bacterial metallo-endopeptidases	0.1428	0.0414	155.00	2.8868
165	1,10-Diaminodecane	Glutamate	Agonist (inverse)	NMDA-polyamine	Inverse agonist at the polyamine recognition site of the NMDA glutamate receptors	0.1906	0.0432	155.00	3.9087
166	Bay 11-7082	Phosphorylation	Inhibitor	IKB-alpha	Inhibitor of cytokine-induced IKB-alpha phosphorylation	0.1760	0.0604	155.00	1.6667
167	PD 166793	ECM	inhibitor	MMP broad	Broad spectrum MMP inhibitor	0.2057	0.0288	154.17	1.5341
168	p-Benzquinone	DNA Repair	Inhibitor	G.C site	Benzene metabolite; induces mutations in DNA at G:C base pairs; induces writhing in mice; topoisomerase II inhibitor	0.1304	0.0380	154.17	2.4767
169	Benidipine hydrochloride	Ion Channel	Blocker	Calcium	Calcium Channel Blocker	0.1023	0.0172	154.17	2.1784
170	BRD73954	Gene Regulation	Inhibitor	HDAC	BRD73954 is a potent and selective HDAC inhibitor	0.1139	0.0176	154.17	3.9820
171	Diethylenetriaminepentaacetic acid	Biochemistry	Inhibitor	Zn2+-dependent protease	Zinc-dependent proteases carboxypeptidase A and aminopeptidase N inhibitor; chelating agent	0.1328	0.0028	154.17	6.0572
172	2,2'-Bipyridyl	Biochemistry	Inhibitor	Metalloprotease	Metalloprotease inhibitor	0.1139	0.0070	154.17	9.0075
173	Hydrochlorothiazide	Biochemistry	Inhibitor	Carbonic anhydrase	Carbonic anhydrase inhibitor; diuretic	0.1564	0.0225	153.33	2.8054
174	AK-7	Epigenetic Regulation	Inhibitor	SIRT	AK-7 is a selective cell- and brain-permeable SIRT2 inhibitor	0.1012	0.0071	153.33	4.5134
175	EX-527	Epigenetic Regulation	Inhibitor	SIRT	EX-527 is a potent and selective SIRT1 inhibitor	0.1766	0.0081	153.33	4.9535
176	5-fluoro-5'-deoxyuridine	DNA Metabolism	Inhibitor	MMP1 / collagenase	DNA synthesis inhibitor; antiproliferative	0.1367	0.0176	153.33	6.6319
177	Clodronic acid	Cytoskeleton and ECM	Inhibitor	MMP1 / collagenase	Matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and collagenase inhibitor	0.2080	0.0193	153.13	2.1813
178	Flupirtine maleate	Glutamate	Antagonist	NMDA	NMDA glutamate receptor antagonist; centrally acting analgesic	0.1311	0.0372	152.78	3.0542
179	OBAAs	Phospholipases	Inhibitor		OBAAs are potent inhibitors of phospholipases.	0.2236	0.0092	152.50	1.9543
180	Methazolamide	Enzyme Inhibitors	Inhibitor	Carbonic anhydrase	Methazolamide is a cell-permeable and potent carbonic anhydrase (CA) inhibitor.	0.1040	0.0034	152.50	3.4861
181	Droxinostat	Gene Regulation	Inhibitor	HDAC3, HDAC6, and HDAC8	Droxinostat is a selective inhibitor of HDAC3, HDAC6, and HDAC8	0.2574	0.0244	152.50	3.8640
182	GW9662	Transcription	Inhibitor	PPAR-gamma	Irreversible peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) inhibitor	0.1188	0.0042	152.50	4.3700
183	JW74	Transcription	Inhibitor	b-catenin/GSK-3b/AXIN/APC/Ck1	JW74 is an efficient and specific inhibitor of the canonical Wnt signaling in vitro and in vivo	0.1146	0.0126	152.08	1.4975
184	ISRIB	Serine/Threonine Kinase Inhibitors,	Inhibitor	eIF2a,PERK	ISRIB is a blood-brain barrier penetrant, potent and selective inhibitor of integrated stress response (ISR) that impairs adaptation to ER stress	0.1257	0.0064	151.67	2.2567
185	Bexarotene	Gene Regulation	Agonist	RXR	Bexarotene is a highly selective retinoid X receptor (RXR) agonist	0.1442	0.0258	151.67	4.3568

186	(R)-PFI-2	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Methyltransferase	(R)-PFI-2 is a histone-lysine N-methyltransferase (HKMT) inhibitor selective for SETD7 (also known as SET9).	0.1015	0.0176	150.83	3.2095
187	S-(-)-Carbidopa	Biochemistry	Inhibitor	L-aromatic amino acid decarboxylase	Peripherally active L-aromatic amino acid decarboxylase inhibitor; used in combination with levodopa for the treatment of Parkinson's Disease.	0.1690	0.0537	150.83	5.5798
188	TC-E 5002	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Demethylase	Selective histone demethylase KDM2/7 subfamily inhibitor	0.1057	0.0294	150.00	3.9087
189	4-Hydroxybenzhydrazide	Biochemistry	Inhibitor		Phenylalanine ammonia-lyase inhibitor; used to measure reducing sugar levels	0.1955	0.0034	149.17	2.4767
190	Felbamate	Glutamate	Antagonist		Anticonvulsant; glutamate receptor antagonist	0.1287	0.0202	149.00	2.4290
191	ML324	Gene Regulation	Inhibitor	JMJ2	ML324 is a potent JMJD2 demethylase inhibitor that is highly effective in reducing herpes simplex virus (HSV) IE gene expression.	0.1587	0.0168	148.17	1.9219
192	LY294002	Phosphorylation	inhibitor	PI3K	LY294002 is a broad-spectrum inhibitor of PI3K	0.1445	0.0331	147.50	3.0619
193	Dargilazone sodium salt	Gene Regulation	Agonist	PPAR/RXR	Dargilazone is a highly potent and selective PPAR-(peroxisome proliferator-activated receptor- gamma agonist)	0.1041	0.0250	147.50	7.0465
194	Lomeguatrib	Gene Regulation	Inhibitor	MGMT	Highly potent inactivator of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT).	0.1747	0.0232	147.08	2.1617
195	L-Glutamine	Glutamate	Agonist		Excitatory amino acid	0.1381	0.0390	147.00	5.7619
196	Oprimone hydrochloride	Phosphodiesterase	Inhibitor	PDE3	Selective phosphodiesterase 3 (PDE3) inhibitor.	0.1048	0.0126	146.67	8.5527
197	C59	Gene Regulation	Inhibitor	Wnt	Potent Wnt signaling pathway inhibitor.	0.1491	0.0530	146.25	9.0930
198	GSK343	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Methyltransferase	GSK343 is a highly potent, selective, and cell-active EZH2 inhibitor	0.1705	0.0157	145.83	2.1784
199	E7438	Epigenetic Regulation	inhibitor	Histone Methyltransferase	EPZ-6438 inhibits the activity of human PRC2-containing wild-type EZH2	0.1165	0.0011	145.00	2.0412
200	L-Glutamic acid hydrochloride	Glutamate	Agonist		Endogenous excitatory amino acid neurotransmitter	0.1722	0.0258	145.00	3.3333
201	Cambinol	Gene Regulation	Inhibitor	SIRT1/2	Sirtuin (Human Silent Information Regulator) Type 1/2 Inhibitor.	0.1591	0.0014	144.17	2.4767
202	IMS2186	Cell Cycle	Inhibition	G2	IMS2186 is an anti-proliferative and anti-angiogenic. The proposed mechanism action, under investigation, is blocking the cell cycle at G2 and inhibition of the production of PGE2/TNF- α .	0.1338	0.0785	144.17	17.5363
203	Tasquinimod	Gene Regulation	Inhibitor	HDAC4	Tasquinimod suppresses hypoxia induced decrease in histone acetylation without lowering HDAC expression or directly inhibiting HDAC activity.	0.1182	0.0283	141.67	0.9623
204	AIDA	Glutamate	Antagonist	mGluR1	Selective mGluR1 metabotropic glutamate receptor antagonist	0.1063	0.0330	141.67	14.5137
205	O-(Carboxymethyl)hydroxylamine hemihydrochloride	Biochemistry	Inhibitor	Aminotransferase	Non-selective aminotransferase inhibitor	0.1878	0.0860	138.33	13.4199
206	YS-035 hydrochloride	Ca2+ Channel	Blocker	L-type	L-type Ca2+ channel blocker; verapamil derivative	0.1242	0.0314	135.42	10.9205
207	U0126	Phosphorylation	Inhibitor	MEK1/MEK2	Specific inhibitor of MEK1 and MEK2 (MAP kinase kinase; MAPKK); also inhibits a constitutively active, mutant form of MEK	0.1478	0.0486	135.28	8.6556

208	DL-threo-beta-hydroxyaspartic acid	Glutamate	Inhibitor	Transport	Glutamate transport inhibitor	0.1263	0.0084	135.00	3.9087
209	GYKI 52466 hydrochloride	Glutamate	Antagonist	AMPA/kainate	Selective AMPA/kainate glutamate receptor antagonist; anticonvulsant; skeletal muscle relaxant	0.1076	0.0043	131.67	3.8490
210	Wortmannin from Penicillium funiculosum	Phosphorylation	Inhibitor	PI3K	Potent and specific phosphatidylinositol 3-kinase (P13-K) inhibitor	0.1104	0.0269	123.33	15.9716
211	(+)-JQ1	Epigenetic Regulation	inhibitor	Histone Methyltransferase	(+)-JQ-1 is a BET bromodomain inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
212	(+)-Quisqualic acid	Glutamate	Agonist	AMPA	Active enantiomer of quisqualic acid; excitatory amino acid at glutamate receptors; anesthetic agent	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
213	(±)-2-Amino-3-phosphonopropionic acid	Glutamate	Antagonist	NMDA	NMDA glutamate receptor antagonist	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
214	(±)-2-Amino-4-phosphonobutyric acid	Glutamate	Antagonist	NMDA	NMDA glutamate receptor antagonist	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
215	(±)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid	Glutamate	Antagonist	NMDA	NMDA glutamate receptor antagonist	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
216	(±)-Bay K 8644	Ca2+ Channel	Agonist	L-type	L-type Ca2+ channel agonist	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
217	(±)-cis-Piperidine-2,3-dicarboxylic acid	Glutamate	Agonist	NMDA	Excitatory amino acid; NMDA glutamate receptor agonist	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
218	(±)-Methoxyverapamil hydrochloride	Ca2+ Channel	Antagonist	L-type	L-type Ca2+ channel antagonist	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
219	(±)-p-Aminoglutethimide	Biochemistry	Inhibitor	P450-dependent hydroxylation	Inhibits Cytochrome P450-dependent hydroxylation reactions that are necessary for aromatization	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
220	(±)-Verapamil hydrochloride	Ca2+ Channel	Modulator	L-type	L-type Ca2+ channel modulator; adrenoceptor antagonist; antiarrhythmic; cardiac depressant; coronary vasodilator	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
221	(S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine	Glutamate	Agonist	mGluR1	Group I metabotropic glutamate receptor (mGluR1) agonist	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
222	1,10-Phenanthroline monohydrate	Biochemistry	Inhibitor	Metalloprotease	Metalloprotease inhibitor; chelates iron, zinc and other divalent metals	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
223	13-cis-retinoic acid	Transcription	Regulator	RAR-alpha, beta	Anti-inflammatory and antitumor actions mediated through RAR-beta and RAR-alpha receptors	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
224	2-Chloro-2-deoxy-D-glucose	Biochemistry	Analog	Glucose	Analog of 2-fluoro-2-deoxyglucose	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
225	3-DZNeP	Epigenetic Regulation	inhibitor	Histone Methyltransferase	EZH2 histone methyltransferase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

226	4-(2-Aminoethyl)benzene sulfonyl fluoride hydrochloride	Biochemistry	Inhibitor	Serine Protease	Irreversible serine protease inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
227	4-Aminobenzamide dihydrochloride	Biochemistry	Inhibitor	Trypsin	Trypsin inhibitor, competitive kallikrein inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
228	5-Azacytidine	DNA Metabolism	Inhibitor	DNA methyltransferase	DNA methyltransferase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
229	5-Bromo-2'-deoxyuridine	DNA Metabolism	Inhibitor		Thymidine analog; incorporated into DNA during S-phase of cell cycle	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
230	5-Fluorouracil	Glutamate	Antagonist	NMDA-Glycine	Competitive inhibitor of potentiation by glycine at the NMDA glutamate receptor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
231	5-Fluorouracil	Cell Cycle	Inhibitor	Thymidylate synthetase	Thymidylate synthetase inhibitor; leads to accumulation of cells in S phase	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
232	6-Methyl-2-(phenylethyl)pyridine hydrochloride	Glutamate	Antagonist	mGluR5	Highly selective, non-competitive mGluR5 metabotropic glutamate receptor antagonist	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
233	6-Thioguanine	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Methyltransferase	6-Thioguanine(6-TG) belongs to the thiopurine family of drugs that also include mercaptopurine and azathioprine, which are examples of antimetabolites; a purine analogue of the nucleobase guanine.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
234	A-366	Epigenetic Regulation	inhibitor	Histone Methyltransferase	A-366 is a peptide-competitive inhibitor of G9a/GLP	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
235	AC-55649	Gene Regulation	Agonist	RARbeta2	Subtype selective retinoic acid receptor beta2 (RARbeta2) agonist.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
236	Actinonin	Biochemistry	Inhibitor	Leucine aminopeptidase	Leucine aminopeptidase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
237	Adaphostin	Tyrosine kinase	Inhibitor	p210bcra/abl	Adaphostin is a p210bcra/abl tyrosine kinase inhibitor displaying anti-proliferative activity in leukemia models, human prostate cancer cell line PC-3 and other cancer cell lines	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
238	Amsacrine hydrochloride	DNA Repair	Inhibitor	TopoII	DNA topoisomerase II inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
239	Ancitabine hydrochloride	DNA Metabolism	Inhibitor		Antineoplastic	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
240	Arcaine sulfate	Glutamate	Antagonist	NMDA-Polyamine	Potent competitive antagonist of the polyamine site on the NMDA glutamate receptor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
241	Argatroban monohydrate	Cell signaling	Inhibitor	Thrombin	Argatroban is a potent, selective, univalent direct inhibitor of thrombin	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
242	ATPA	Glutamate	Agonist	Kainate	Selective kainate glutamate receptor agonist	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
243	Atreleuton	Cell Signaling	Inhibitor	5-lipoxygenase	Atreleuton is a reversible 5-lipoxygenase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
244	Auranofin	Phosphorylation	Inhibitor		is a potent inhibitor of selenoenzyme thioredoxin reductase (TrxR). Auranofin inhibits IKB kinase.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
245	Auraptene	Cell Signaling	Modulator/Inhibitor	ACAT	Auraptene is an estrogen receptor modulator that also acts as an ACAT inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

246	Aurora-A Inhibitor I	kinase phosphatase	Inhibitor	Aurora kinase A	Aurora-A Inhibitor I is a potent inhibitor of Aurora kinase A	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
247	Azelaic acid	DNA Metabolism	Inhibitor		Antiproliferative on melanoma cells; inhibits mitochondrial oxidoreductases of the respiratory chain and inhibits DNA synthesis	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
248	Bay 11-7085	Cell Cycle	Inhibitor	IkB-alpha	Inhibits cytokine induced IKB (inhibitor of NFkB) phosphorylation	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
249	BAY 61-3606 hydrochloride hydrate	Phosphorylation	Inhibitor	Tyrosine kinase	Spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor, anti-inflammatory	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
250	Bestatin hydrochloride	Biochemistry	Inhibitor	Aminopeptidase	Aminopeptidase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
251	Betaine hydrochloride	Biochemistry	Metabolite		Product in choline-betaine osmoregulatory pathway	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
252	Bicalutamide (CDX)	Gene Regulation	Antagonist	AR	A non-steroidal Androgen Receptor (AR) antagonist and a pure antiandrogen.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
253	BIO	Phosphorylation	Inhibitor	GSK-3alpha/beta	Potent, selective, reversible, and ATP-competitive glycogen synthase kinase 3alpha/beta (GSK-3alpha/beta) inhibitor.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
254	BIX	Cell signaling	inducer	GRP78	BIX (BIP protein inducer X) induces the expression of the endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 (glucose regulated protein 78, BIP)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
255	BIX 01294 trihydrochloride hydrate	Gene Regulation	Inhibitor	HMT	Selective histone methyl transferase inhibitor.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
256	BIX01294	Epigenetic Regulation	inhibitor	Histone Methyltransferase	BIX-01294 is an inhibitor of G9a Histone Methyltransferase	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
257	BMS-189453	Gene Regulation	Agonist/Antagonist	RAR, RARa and RAR	BMS-189453 is a potent RAR agonist that acts as an antagonist against RARa and RAR	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
258	BMS-299897	Cell Biology	inhibitor	alpha-secretase	BMS-299897 is a potent inhibitor of alpha-secretase	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
259	Brequinar sodium salt hydrate	DNA-RNA transcription regulators	Inhibitor	DHODH	Brequinar inhibits dihydroorotate dehydrogenase (DHODH), the fourth enzyme in the de novo pyrimidine biosynthesis pathway, preventing the synthesis of DNA and RNA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
260	Bromosporine	Epigenetic Reader Domain			Bromosporine is a broad spectrum inhibitor for bromodomains	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
261	Caffeic acid phenethyl ester	Cell Cycle	Inhibitor	NFKB	NFKB inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
262	Calcimycin	Intracellular Calcium		Ca2+	Ca2+ ionophore used to potentiate responses to NMDA, but not quisqualate glutamate receptors	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
263	Candesartan cilexetil	Cell Signaling	Antagonist		Candesartan cilexetil is the prodrug form of the potent angiotensin II receptor antagonist, candesartan	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
264	Cantharidic Acid	Phosphorylation	Inhibitor	PP1 / PP2A	Protein phosphatase 1 (PP1) and 2A (PP2A) inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
265	Capecitabine	Gene Regulation			Capecitabine is an anti-cancer drug, a prodrug of doxifuridine, metabolized to 5-fluorouracil at the tumor site.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
266	Carboplatin	DNA	Intercalator		Antineoplastic	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
267	Carmustine	DNA	Intercalator		DNA alkylating agent; causes interstrand crosslinks	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
268	Caroverine hydrochloride	Glutamatergics	Antagonist	NMDA/AMPA	Nonselective NMDA and AMPA glutamate receptor antagonist.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
269	CAY10603	Epigenetic Regulation	inhibitor	HDAC	CAY10603 is a potent and selective HDAC6 inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

270	CCT137690	Kinase/Phosphatase Biology	Inhibitor	Aurora A, B and C	CCT137690 is a very potent, orally bioavailable, pan aurora kinase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
271	cDPCP	Cell Cycle	Inhibitor	DNA-N7 of guanosine	cDPCP is a tumor cell permeable, potent platinum-based antineoplastic agent.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
272	Chelidamic acid	Glutamate	Inhibitor	L-glutamic decarboxylase	L-glutamic decarboxylase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
273	Chlorothiazide	Biochemistry	Inhibitor	Carbonic anhydrase	Carbonic anhydrase inhibitor; diuretic; antihypertensive	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
274	Clonidine	Ca2+ Channels	Blocker	L-type	Slow-acting Ca2+ channel blocker; antihypertensive; vasodilator. Does not inhibit PKC.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
275	Cinnarizine	Ca2+ Channel	Blocker		Ca2+ channel blocker; central and peripheral vasodilator	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
276	Ciprofibrate	Transcription	Ligand	PPAR-alpha	Peroxisome proliferator; specific ligand for the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
277	Cisplatin	DNA	Intercalator		Induces intrastrand DNA crosslinks; effects are regulated by kinases, phosphatases and Ca2+/calmodulin	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
278	CNS-1102	Glutamate	Antagonist	NMDA	Noncompetitive NMDA glutamate receptor antagonist.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
279	CP466722	Kinase/Phosphatase	Inhibitor	ATM	CP466722 is a competitive, reversible inhibitor of Ataxia telangiectasia (A-T) mutated (ATM) kinase	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
280	CP203	Epigenetic Regulation	inhibitor	BET	CP1-203 is a novel potent, selective and cell permeable inhibitor of BET bromodomain	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
281	Cytosine-1-beta-D-arabinofuranoside hydrochloride	DNA Metabolism	Inhibitor		Selective inhibitor of DNA synthesis	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
282	Daidzein	Cell Cycle	Inhibitor	Aldehyde dehydrogenase	Isoflavonoid cytosolic agent that arrests the cell cycle at G1; inhibitor of mitochondrial aldehyde dehydrogenase	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
283	Dantrolene sodium	Intracellular Calcium	Inhibitor	Release	Inhibits intracellular Ca2+ release from the sarcoplasmic reticulum; muscle relaxant.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
284	DAPT	Glutamate	Inhibitor	γ-secretase	DAPT is a γ-secretase inhibitor, reduces the total beta-amyloid peptide (Aβ) production	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
285	D-Cycloserine	Glutamate	Agonist	NMDA-Glycine	Excitatory amino acid; partial agonist at the glycine modulatory site of the NMDA glutamate receptor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
286	Decitabine	Epigenetic Regulation	inhibitor	Histone Methyltransferase	Decitabine is a cytosine analog and one potent inhibitor of DNA methyltransferase.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
287	Dihydrokainic acid	Glutamate	Blocker	Kainate	Non-transportable glutamate analog that blocks glutamate receptors	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
288	DMH4	Kinase/Phosphatase	inhibitor	VEGF	DMH4 is a potent VEGF inhibitor and an angiogenesis inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
289	EB 47	Epigenetic Regulation	Inhibitor	PARP	Potent PARP-1 inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
290	Ellipticine	Cell Cycle	Inhibitor	CYP1A1 / Topoll	Cytochrome P450 (CYP1A1) and DNA topoisomerase II inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
291	Emodin	Phosphorylation	Inhibitor	p56lck TK	p56lck Tyrosine kinase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
292	Entecavir	Cell Signaling	Inhibitor		Entecavir is an antiviral guanine analog that inhibits reverse transcription, DNA replication and transcription in the viral replication process.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
293	Epibestatin hydrochloride	Biochemistry	Inhibitor	Metalloprotease	Metallo-protease inhibitor; aminopeptidase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
294	Eupatorin	Cell Cycle		CYP1A- family	Eupatorin acts as an antiproliferative in cells expressing the CYP1A- family. It induces G2M block follow by apoptosis in cells expressing the CYP1A- family	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

295	Fenofibrate	Transcription	Agonist	PPAR-alpha	PPAR-alpha receptor agonist, lipid regulating drug	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
296	FPL 64176	Ca2+ Channel	Activator	L-type	Potent L-type Ca2+ channel activator	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
297	Furamide	Epigenetic Regulation	Inhibitor	PRMT	Furamide inhibit tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) and act as a selective protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) inhibitor.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
298	Furegrelate sodium	Phosphorylation	Inhibitor	Thromboxane synthase	Thromboxane synthetase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
299	Fusidic acid sodium	Cell Cycle	Inhibitor		Inhibits protein synthesis in prokaryotes	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
300	Ganciclovir	Cell Cycle	Inhibitor	G2-M checkpoint	Pro-drug nucleoside analog, upon thymidine kinase expression, converted to a phosphorylated active analog and incorporated into DNA, causing death of the malignant dividing cell	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
301	GSK1210151A (I-BET 151)	Epigenetic Regulation	inhibitor	BET	I-BET151 is a BET bromodomain inhibitor, inhibits BRD4, BRD2, and BRD3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
302	GSK1324726A	Epigenetic Regulation	inhibitor	BET	GSK1324726A is a novel, potent, and selective inhibitor of BET proteins with high affinity to BRD2, BRD3, and BRD4. GSK1324726A inhibits neuroblastoma tumor growth.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
303	GSK1838705A	Tyrosine Kinase	Inhibitor	IGF-IR, IR ALK	GSK1838705A is a cell penetrant anti-tumor agent that potently inhibits the insulin-like growth factor-I receptors (IGF-IR), insulin receptors (IR) and anaplastic lymphoma kinase (ALK)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
304	GSK2578215A	Phosphorylation	Inhibitor	LRRK2	GSK2578215A is a potent inhibitor of leucine-rich repeat kinase-2 (LRRK2).	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
305	GSK-650394	Cell signaling	Antagonist	SGK1	GSK-650394 is a potent and selective Serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) antagonist.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
306	GSK-LSD1	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Demethylase	GSK-LSD1 is a potent and selective inhibitor of lysine specific demethylase 1 (LSD1).	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
307	GW5074	Phosphorylation	Inhibitor	Raf1 kinase	cRaf1 kinase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
308	HPOB	Gene Regulation	Inhibitor	HDAC	HPOB is a highly potent and selective inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
309	Hydroxyurea	DNA Metabolism	Inhibitor	Ribonucleoside reductase	Antineoplastic, inactivates ribonucleoside reductase which blocks the synthesis of deoxynucleotides	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
310	IC 261	Phosphorylation	Inhibitor	CK-1 delta/epsilon	Casein kinase-1 (CK-1delta/epsilon) inhibitor.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
311	I-CBP 112	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Acetyltransferase	I-CBP112 is a specific and potent acetyl-lysine competitive protein-protein interaction inhibitor, that targets the CBP/p300 bromodomains.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
312	Idarubicin	DNA Metabolism	Inhibitor		Antineoplastic	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
313	Ifenprodil tartrate	Glutamate	Blocker	Polyamine site NMDA	Blocks the polyamine binding site associated with the NMDA glutamate receptor; neuroprotective	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
314	INDY	Kinase/Phosphatase	Inhibitor	Dyrk1A and Dyrk1B	INDY is a potent inhibitor of Dyrk1A and Dyrk1B (dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1).	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
315	Iodoacetamide	Biochemistry	Inhibitor		Alkylating reagent for cysteine and histidine residues in proteins; irreversible protein inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
316	IOX 1	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Demethylase	IOX1 is the most potent broad-spectrum inhibitor of 2OG oxygenases, including the JmjC demethylases	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
317	IPA-3	Phosphorylation	Inhibitor	Pak1	allosteric inhibitor of Pak1, binds to autoinhibitory domain of Pak1 (p21 activated kinase)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
318	IWR4	Gene Regulation	Inhibitor	Wnt	small molecule of inhibitor of Wnt/β-catenin signaling	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

319	JFD00244	Gene Regulation	Inhibitor	SIRT	A SIRT (sirtuin, human silent information regulator) inhibitor.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
320	JW55	Gene Regulation	Inhibitor	TNKS1/2	JW55 is a potent and selective inhibitor of Wnt/b-catenin signaling.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
321	Kainic acid	Glutamate	Agonist	Kainate	Excitatory amino acid receptor agonist selective for the kainate glutamate receptor subtype; conformationally restricted analog of L-glutamic acid	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
322	KRN633	Kinase	Inhibitor	VEGFR	KRN633 is a cell-permeable, reversible and ATP-competitive inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase (VEGFR)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
323	Kynurenic acid	Glutamate	Antagonist	NMDA-Glycine	Excitatory amino acid receptor antagonist; blocks kainic acid-induced neurotoxicity; metabolite of tryptophan	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
324	L-2-aminoadipic acid	Glutamate	Inhibitor	Glutamine synthetase	Glutamine synthetase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
325	L-701,324	Glutamate	Antagonist	NMDA-Glycine	Selective antagonist at the glycine site of the NMDA glutamate receptor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
326	L-allylglycine	Biochemistry	Inhibitor	Glutamic acid decarboxylase	Glutamic acid decarboxylase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
327	LAQ824	Epigenetic Regulation	inhibitor	HDAC	LAQ824(Dacnostat) is a potent HDAC inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
328	L-Aspartic acid	Glutamate	Agonist		Endogenous excitatory amino acid neurotransmitter	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
329	L-azetidine-2-carboxylic acid	Biochemistry	Inhibitor	Collagen	Inhibits collagen synthesis	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
330	L-Cysteinesulfimic Acid	Glutamate	Ligand		Putative excitatory amino acid neurotransmitter	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
331	LDN-214117	Tyrosine kinase	Inhibitor	BMP	LDN-214117 is a selective inhibitor of the bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor kinases with high selectivity for BMP versus TGFβ signaling	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
332	Leukadherin-1	Cell Signaling and Neuroscience	Agonist	CD11b/CD18	Leukadherin-1 is an agonist of integrin CD11b/CD18 that can increase the extent of CD11b/CD18-dependent cell adhesion of transfected cells and of primary human and mouse neutrophils	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
333	L-Glutamic acid, N-piithalbyl-	Glutamate	Agonist	NMDA	Selective NMDA glutamate receptor agonist	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
334	LMK-235	Epigenetic Regulation	inhibitor	HDAC	LMK-235 is a potent HDAC inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
335	Lubeluzole dihydrochloride	Glutamate	Antagonist	NMDA	Lubeluzole is an NMDA glutamate receptor antagonist.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
336	MCC-555	Cell signaling and neuroscience	Inhibitor		MCC-555 is a thiazolidinedione class anti-diabetic compound. In rodent models	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
337	Mifoxantrone	DNA Metabolism	Inhibitor		DNA synthesis inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
338	ML240	Cell Signaling and Neuroscience	Inhibitor	AAA ATPase p97	ML240 is a selective, ATP-competitive inhibitor of AAA ATPase p97, also called valosine containing protein (VCP).	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
339	MNS	Phosphorylation	Inhibitor	Src/Syk	Src and Syk kinase inhibitor; prevents phosphorylation and cytoskeletal association of GPIIb/IIIa and talin.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
340	MTEP hydrochloride	Excitatory Amino Acids	Antagonist	mGluR5	MTEP is a potent and highly selective antagonist for mGluR5.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
341	N-Acetyl-L-Cysteine	Glutamate	Antagonist		Amino acid analog that partially improves neuronal survival following transient forebrain ischemia	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
342	Nemadipine-A	Ca2+ Channels	Antagonist	L-type (alpha 1)	An L-type calcium channel alpha1-subunit antagonist.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

343	Niacinamide	Transcription	Inhibitor	PARP	Nicotinamide is a water-soluble vitamin, an active component of coenzymes NAD and NADP, and acts as poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
344	NNGH	Extracellular Matrix	Inhibitor	MMP-3	Potent and cell-permeable inhibitor of matrix metalloproteinase 3 (MMP-3,stromelysin 1, progelatinase).	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
345	NSC 617145	Gene Regulation	Inhibitor	WRN	NSC 617145 is a potent and cell-permeable inhibitor of Werner syndrome helicase (WRN) that causes accumulation of double-strand breaks (DSB) and chromosomal abnormalities in cancer cells	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
346	NSC 95397	Phosphorylation	Inhibitor	Cdc25	Selective, irreversible Cdc25 dual specificity phosphatase inhibitor.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
347	NSC405020	Extracellular Matrix	Inhibitor	MT1-MMP	NSC405020 is a PEX inhibitor targeting the PEX domain of MT1-MMP	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
348	O6-benzylguanine	DNA Repair	Inhibitor	O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase	Irreversible inhibitor of the mammalian DNA repair protein, O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
349	OF-1	Epigenetic Regulation	inhibitor	BRPF	OF-1 is a selective BRPF1B and BRPF2 bromodomain inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
350	Oleic Acid	Phosphorylation	Activator	PKC	Activates protein kinase C in hepatocytes; uncouples oxidative phosphorylation	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
351	P1,P4-Di(adenosine-5')tetraphosphate triammonium	Biochemistry	Inhibitor		Dinucleoside polyphosphate that competitively inhibits ADP-induced platelet aggregation	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
352	Panobinostat	Epigenetic Regulation	inhibitor	HDAC	Panobinostat is a novel histone deacetylase (HDAC) inhibitor with a multi-targeted profile.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
353	PD 98,059	Phosphorylation	Inhibitor	MEK2	Specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
354	PD-407824	Kinase	Inhibitor	Wee1/Chk1	PD-407824 is a Wee1/Chk1 inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
355	Perifosine	Phosphorylation	Inhibitor	PKB/Akt	Perifosine (KRX-0401) is a selective bioavailable alkyphospholipid inhibitor of protein kinase B/Akt (PKB/Akt) with anti-proliferative activity	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
356	PF-429242 dihydrochloride	Gene Regulation	Inhibitor	S1P	PF-429242 is a potent inhibitor of S1P (cellular proprotein convertase sterol regulatory element-binding protein (SREBP) site 1 protease).	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
357	PFI-1	Epigenetic Regulation	inhibitor	BET	PFI-1 is a selective BET (bromodomain-containing protein) inhibitor for BRD4. PFI-1 has antiproliferative effects on leukemic cell lines and efficiently abrogates their clonogenic growth.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
358	Phloretin	Ca2+ Channel	Blocker	L-Type	Blocks L-type Ca2+ channels	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
359	Phorbol 12-myristate 13-acetate	Phosphorylation	Activator	PKC	Activates protein kinase C in vivo and in vitro; strong NO promoter; promotes expression of iNOS in cultured hepatocytes; T lymphocyte activator	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
360	Phosphonoacetic acid	DNA	Inhibitor	DNA Polymerase	DNA Polymerase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
361	Piceatannol	Phosphorylation	Inhibitor	Syk / Lck	Non-receptor kinase Syk and Lck inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
362	Piracetam	Glutamate	Modulator	AMPA	Prototypical nootropic; modulates Na+-flux at AMPA glutamate receptors	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
363	PJ-34	Transcription	Inhibitor	PARP	PJ34 is a cell-permeable, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase. PJ34 also controls the biological activity of PARP.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
364	Procainamide				Procainamide induce a voltage-dependent open channel block on the batrachotoxin (BTX)-activated sodium channels in cardiomyocytes.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

365	Pseudoecanthandrin C	Gene Regulation	PP2A	Pseudoecanthandrin C stimulates PP2A activity up to two-fold without influencing PP1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
366	Putrescine dihydrochloride	Glutamate	NMDA-Polyamine	Binds to the polyamine modulatory site of the NMDA glutamate receptor and potentiates NMDA-induced currents; precursor of spermidine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
367	Py6	Calcium Channel Modulator	STIM1/Orai1	Membrane-permeable analog of cGMP	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
368	Pyrocatechol	Cell Cycle	Inhibitor	Carcinogen; causes DNA strand breakage	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
369	Quinolinic acid	Glutamate	Antagonist	Neurotoxin which has neuroexcitatory activity; metabolite of tryptophan	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
370	Remodelin hydrobromide	Gene Regulation	NAT10	Remodelin is an inhibitor of acetyl-transferase NAT10, a nucleolar N-acetyltransferase involved in stabilization of microtubules	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
371	Resveratrol	Gene Regulation	IKK	Resveratrol is one of the numerous polyphenolic compounds found in several vegetal sources	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
372	Retinoic acid p-hydroxyamide	Cell Cycle	Inhibitor	Vitamin A acid analog with antiproliferative activity in cultured human breast cancer cells	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
373	Retro-2	Cell Signaling and Neuroscience	Inhibitor	Retro-2 is a non-toxic inhibitor of the endosome-to-Golgi retrograde transport that selectively protect cells from ricin, cholera toxin, and Shiga-like toxins	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
374	RG108	Epigenetic Regulation	Histone Methyltransferase	RG108 is a non-nucleoside inhibitor of DNA methyltransferase	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
375	Ribavirin	Cell Cycle	IMP dehydrogenase	Antiviral agent; its metabolite, ribavirin 5'-phosphate, is an inhibitor of inosine monophosphate (IMP) dehydrogenase	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
376	Riluzole	Glutamate	Release	Glutamate release inhibitor; anticonvulsant	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
377	RN 1	Epigenetic Regulation	LSD1	RN-1 is a potent, irreversible inhibitor of LSD1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
378	Ro 8-4304	Glutamate	Antagonist	NR2B-selective, noncompetitive NMDA receptor antagonist	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
379	Romidepsin	Epigenetic Regulation	inhibitor	Romidepsin is a potent HDAC1 and HDAC2 inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
380	Roscovitine	Phosphorylation	Inhibitor	Potent, selective inhibitor of cyclin-dependent kinases (CDKs)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
381	Rottlerin	Phosphorylation	Inhibitor	PKC and CaM kinase III inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
382	RVX-000222	Epigenetic Regulation	inhibitor	RVX-000222 is an inhibitor of BET transcriptional regulators with selectivity for the second bromodomain.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
383	Sallirasib	Cell signaling and Neuroscience	Inhibitor	Sallirasib (Farnesylthiosalicylic acid) is a RAS inhibitor that acts by dislodging the farnesylated protein from the membrane, facilitating Ras degradation.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
384	SB743921 hydrochloride	Cell Cycle	inhibitor	SB743921 is an inhibitor of kinesin spindle protein (KSP)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
385	SGC707	Epigenetic Regulation	inhibitor	A potent allosteric inhibitor of PRMT3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
386	SGC-CBP30	Epigenetic Regulation	Inhibitor	SGC-CBP30 is a potent CREBBP/EP300 bromodomain inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
387	SIB 1757	Glutamate	Antagonist	Highly selective mGlu5 metabotropic glutamate receptor antagonist	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
388	SIB 1893	Glutamate	Antagonist	Selective and noncompetitive antagonist of mGlu5 metabotropic glutamate receptor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
389	Spermidine trihydrochloride	Glutamate	Ligand	Binds to the polyamine modulatory site of the NMDA glutamate receptor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

390	Spermine tetrahydrochloride	Glutamate	Antagonist	NMDA-Polyamine	Binds to the polyamine modulatory site of the NMDA glutamate receptor, attenuating both NMDA and quisqualate mediated responses in vivo.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
391	Splitomicin	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Acetyltransferase	Sir2p inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
392	SR 142948A	Cell signaling	Antagonist	Neurotensin	SR 142948A is a non-peptide Neurotensin receptor antagonist	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
393	SRT1720	Epigenetic Regulation	inhibitor	SIRT	SRT 1720 is a selective activator of human SIRT1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
394	SU 4312	Phosphorylation	Inhibitor	KDR	Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor protein tyrosine kinase 1/2 (KDR) and platelet derived growth factor (PDGF) receptor inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
395	SU 5416	Phosphorylation	Inhibitor	VEGFR PTK	Potent and selective VEGFR PTK inhibitor; inhibits VEGF-induced angiogenesis	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
396	Tamoxifen citrate	Phosphorylation	Inhibitor	PKC	Anti-estrogen; relatively selective protein kinase C inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
397	TBB	Phosphorylation	Inhibitor	Casein kinase 2	Highly selective, ATP/GTP-competitive inhibitor of casein kinase 2 (CK2).	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
398	TBBz	Phosphorylation	Inhibitor	CK2	Cell-permeable casein kinase 2 (CK2) inhibitor.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
399	TC-E 5001	Epigenetic Regulation	Inhibitor		Potent tankyrase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
400	Terutroban	Cell Signaling and Neuroscience	Inhibitor	TPP	Terutroban is a highly selective and long-acting thromboxane/prostaglandin endoperoxide receptor (TP) antagonist	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
401	Tetraacylthioacetic acid	Transcription	Agonist	PPAR-alpha	Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha agonist	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
402	Tetraisopropyl pyrophosphoramidate	Biochemistry	Inhibitor	Butyrylcholinesterase	Selective inhibitor of butyrylcholinesterase	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
403	Tetramisole hydrochloride	Phosphorylation	Inhibitor	Phosphatase	Inhibits various mammalian alkaline phosphatases (i.e., liver, kidney, placenta, bone and tumor)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
404	Thapsigargin	Intracellular Calcium	Releaser		Potent, cell-permeable, IP3-independent intracellular calcium releaser	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
405	Tirofiban hydrochloride monohydrate	Cell Signaling	inhibitor	glycoprotein IIb/IIIa inhibitor	Tirofiban hydrochloride is a potent non-peptide, glycoprotein IIb/IIIa inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
406	TMB-8 hydrochloride	Intracellular Calcium	Antagonist		Intracellular Ca2+ antagonist; inhibits calmodulin-sensitive Ca2+-ATPase activity; protein kinase C inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
407	Torin2	Knase/Phosphotase	Inhibitor	mTOR	Torin2 is a highly potent and selective ATP-competitive mTOR inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
408	Tubastatin A	Gene Regulation	Inhibitor	HDAC	Tubastatin A is a potent and selective HDAC6 inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
409	Tyrphostin 1	Phosphorylation	Inhibitor	EGFR	EGFR tyrosine kinase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
410	Tyrphostin 23	Phosphorylation	Inhibitor	EGFR	Protein tyrosine kinase EGFR inhibitor.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
411	Tyrphostin 51	Phosphorylation	Inhibitor	EGFR	EGFR tyrosine kinase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
412	Tyrphostin AG 112	Phosphorylation	Inhibitor	Tyrosine kinase	Protein tyrosine kinase inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
413	Tyrphostin AG 1478	Phosphorylation	Inhibitor	EGFR	Selective inhibitor of epidermal growth factor receptor (EGFR) protein	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
414	Tyrphostin AG 879	Phosphorylation	Inhibitor	TrkA	Tyrosine kinase nerve growth factor receptor (TrkA) inhibitor; inhibits 140 trk protooncogene and HER-2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

415	UK356618	Extracellular Matrix	Inhibitor	MMP-3	Potent and selective MMP-3 inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
416	UNC 2327	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Methyltransferase	Allosteric inhibitor of PRMT3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
417	UNC0224	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Methyltransferase	UNC0224 is a potent and selective G9a inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
418	UNC0379	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Methyltransferase	UNC0379 is a selective, substrate-competitive inhibitor of the lysine methyltransferase SETD8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
419	UNC0638	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Methyltransferase	UNC0638 is a potent G9a (EHMT2) and GLP (EHMT1) inhibitor in S-adenosyl-L-homocysteine hydrolyase (SAHH)-coupled assays.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
420	UNC0642	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Methyltransferase	UNC0642 is a potent, selective inhibitor of histone methyltransferases G9a (EHMT2) and GLP (EHMT1), which catalyze the mono and dimethylation of lysine 9 of histone 3 (H3K9), and other non-histone substrates such as p53 and WIZ.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
421	UNC0646	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Methyltransferase	UNC0646 is a potent and selective G9a inhibitor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
422	UNC1215	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Methyltransferase	UNC1215 is a potent and selective chemical probe for the methyllysine (Kme) reading function of L3MBTL3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
423	UNC1999	Epigenetic Regulation	Inhibitor	Histone Methyltransferase	UNC1999 is a SAM-competitive, potent and selective inhibitor of EZH2 and EZH1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
424	Valproic acid	Gene Regulation	Inhibitor	HDAC	Valproic acid is an HDAC inhibitor by selectively inducing proteasomal degradation of HDAC2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
425	VORINOSTAT	Epigenetic Regulation	Inhibitor	HDAC	Vorinostat is an inhibitor of HDAC1, HDAC2 and HDAC3 (Class I) and HDAC6 (Class II)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
426	WAY170523	ECM	Inhibitor	MMP	Potent and selective inhibitor of MMP-13	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
427	WIKI4	Gene Regulation	Inhibitor	β -catenin	WIKI4 is a potent inhibitor of Wnt/ β -catenin signaling	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
428	WWL113	Cell Signaling	Inhibitor	Mouse (Ces3)/human CES1	WWL113 is an inhibitor of mouse Carboxylesterase 3 (Ces3) and human CES1 (orthologue of mCes3)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
429	XAV939	Gene Regulation	Inhibitor	Wnt	XAV-939 is a selective Wnt pathway β -catenin-mediated transcription inhibitor and axin stabilizing agent	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
430	XCT790	Gene Regulation	Inverse Agonist	ERRalpha	Potent and selective estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) inverse agonist	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

表2. 薬剤ライブラリースクリーニングにより得られたHes7オシレーションの解析結果

全ての薬剤は20 μ Mになるよう調整し、分化誘導4日目以降からCL24B-LIC/Cを用いてHes7プロモーター由来のルシフェラーゼ活性を測定した。Hes7の発現自体が無くなるもの(灰色)とオシレーションが安定して観察されるもの(白色)に分けた後、Hes7のオシレーション周期を測定し表の上から周期の長い順に並べた。(n=2)

第四章 考察

iPSM 実験系は容易かつ同期化したオシレーション解析に適している

今回確立した iPSM への分化誘導法は、簡易的・効率的であり *Hes7* の発現動態のイメージングや定量化に適していた。浮遊培養により作製した細胞塊において *Hes7* の同期化したオシレーションパターンと進行波を共に検出できた。さらに、U1000 の条件で作製した iPSM は *Hes7* オシレーションの最大の振幅をもち、生体の PSM における頭尾軸は iPSM において中央—辺縁部への軸として再現された。ここで見られた軸の方向性は、人工的な *Wnt* や *Fgf* の濃度勾配を必要とせず自己組織化することで形成されたと考えた。したがって iPSM を用いた細胞培養系は *Hes7* 発現ダイナミクスを理解する鍵になると考えられる。今後研究を進めていくにつれて、どのように隣接した細胞間でオシレーション周期が同期するのか、どのように中央—辺縁部の軸方向が自己形成されるのか、どのようにオシレーションの進行波が形成されるのか、どのようにオシレーション周期が位置毎に推移していくのかなど詳細な解析を円滑に行うことができる。

オシレーション同期機構の解明には、これまで野生型と *Lfng* 欠損マウスの 8 細胞期胚から作製したキメラマウスを用いて *Hes7* オシレーションの内在性同期機構の乱れが研究されてきた(Okubo Y. *et al.* 2012)。しかしこのキメラマウスを用いて野生型と変異細胞の混合割合を制御するのは難しかった。本研究で確立した iPSM を用いた細胞培養系は、野生型と変異をもつ ES 細胞の混合割合を任意に変えることが可能なため、より容易に同様の解析を行うことが可能である。

また、生体の PSM において尾部方向で発現が高く頭部方向で発現の低い *Fgf* や *Wnt* の濃度勾配は、*Hes7* オシレーションの周期を調整していると言われている。そこで、iPSM 細胞の培養系において *Fgf* や *Wnt* を高発現した条件下で *Hes7* オシレーションパターンを観察することで、これらの因子が *Hes7* オシレーションの周期を調整しているかどうかを明らかにすることができる。

興味深いことに、フィブロネクチンを用いてコーティングしたガラスボトムディッシュで iPSM を培養すると細胞塊は扁平になり、*Hes7* の進行波が iPSM の辺縁部に到達するたびに分節境界が現れた。さらに分節境界マーカーである *Mesp2* も iPSM の辺縁部で観察された。このように、同期した *Hes7* のオシレーションと進行波、さらには分節境界が iPSM において観察可能であることから、iPSM 培養系は体節形成のメカニズム解明に適しているといえる。しかしながら、生体の PSM では体節の尾部側半分でのみ *Uncx4.1* の発現が観察されるものの、iPSM では *Uncx4.1* の発現部位は限局されていない。したがって iPSM 培養系において生体の PSM における頭尾軸の再現は可能であるものの、体節の頭尾軸を再現する事は出来ていない。

iPSM の細胞培養系は薬剤ライブラリースクリーニングに応用できる。

U1000 の培養条件下で作製した全ての iPSM で安定した *Hes7* オシレーションが観察された。そこで *Hes7* オシレーションの同期機構に影響を与える新たな薬剤を同定するため、U1000 の培養条件下で作製した iPSM を用いて薬剤ライブラリースクリーニングを行った。430 種類の薬剤ライブラリースクリーニングの結果、I-BET 151 や OF-1 のような BET ファミリータンパク質の阻害剤は iPSM において *Hes7* の発現を安定化させることでオシレーションを阻害した。そこで I-BET 151 の効果を確認するためマウス胎生 10.5 日胚の PSM を用いたリアルタイムイメージングを行ったところ、iPSM における I-BET 151 の結果と同様、*Hes7* の発現は定常状態になりオシレーションは阻害された。以上の結果から、iPSM を用いた薬剤ライブラリースクリーニングは *Hes7* のオシレーション同期機構に影響を与える新たな薬剤を探索するのに効率的である。

しかしながら、iPSM を用いた培養系にはいくつかの制限がある。iPSM は高い再現性を示すが、*Hes7* オシレーションの振幅や周期などに多少のばらつきがみられることから、薬剤の効果を検出するのに影響がある可能性もある。これらのばらつきには iPSM のサイズや形などが関与しており、培養におけるディッシュなどの条件を検討することで、ばらつきを小さくすることが可能であると考えられる。

薬剤ライブラリースクリーニングにより新たに発見した薬剤は *Hes7* オシレーションを制御する新たな因子やシグナル経路を特定するために重要である。興味深いことに BET ファミリータンパク質に対する阻害剤は *Hes7* の発現を抑制せずオシレーションの振幅のみ減弱させる。そのため、BET タンパク質は *Hes7* オシレーションに関与していることが考えられた。これまでに BET タンパク質である *Brd* の一つの *Brd2* 欠損マウスでは神経管が欠損し (Gyuris et al. 2009, Shang et al. 2009)、さらに *Brd4* を欠如すると胚盤胞期のマウス内部細胞塊が完全に変性する (Houzelstein et al. 2002) 事が知られている。このことから、胎仔発生期においていくつかのタイミングで *Brd* 因子の重要な役割が存在すると考えられる。しかしながら、体節形成における BET ファミリータンパク質の関与は分かっていないことから、*Hes7* オシレーションのメカニズムを解明する上で、これらの因子がどのように関与しているのかを明らかにすることが今後重要であるといえる。

さらに、*Hes7* オシレーション周期に影響を与える新たなメカニズムも発見した。EZH2 の阻害剤である E7438 や GSK343 は *Hes7* のオシレーション周期をコントロールと比較して約 14 分短縮させた。EZH2 は遺伝子発現を調節するヒストンメチル基転移酵素を構成するタンパク質の一つで、ヒストンタンパク質 (H1、H2A、H2B、H3、H4) の一つであるヒストン H3 の 27 番目のリジンをメチル化し、その領域にある遺伝子の転写を抑制する事が知られている。薬剤ライブラリースクリーニングの結果より、E7438 や GSK343 を用いてヒストンメチル化を阻害すると *Hes7* の転写活性が高まり周期が短くなったと考えられる。

転写活性が上がると転写因子や RNA ポリメラーゼが結合しやすいよう DNA とヒストンの結合が弱くなる。この巻き付きの強度を元に戻すよう働くのがヒストン脱アセチル化酵素である HDAC である。ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1/3 の阻害剤である RG2833 は *Hes7* のオシレーション周期をコントロールと比較して約 44 分延長させた。HDAC1/3 はクラス II に分類されており、ヒストンと DNA の結合を強める働きを持つ。DNA から mRNA への転写はヒストンのリジン残基におけるアミノ基をアミド基へと変換する事で始まる (ヒストンアセチル化)。これにより電荷のバランスが悪くなり、ヒストン-

DNA の巻き付きが弱くなるため転写因子や RNA ポリメラーゼが結合しやすくなり転写が活性化される。HDAC1/3 は弱くなったヒストン-DNA の巻き付きをもとの状態へと戻す役割を担っており、転写活性を阻害する方向に働くことが知られている。

E7438 や GSK343 を用いてヒストンメチル化を阻害しても RG2833 を用いてヒストン脱アセチル化を阻害しても *Hes7* の転写活性は維持されているが、*Hes7* オシレーションの周期の長さは真逆の結果を示した。そのため、*Hes7* 転写活性過程にメチル化やアセチル化が関与し制御している可能性が考えられるが、*Hes7* オシレーションの周期を制御する因子はそれ以外にも存在し、複雑な経路を持っていると推測できる。しかし、両条件共に *Hes7* のオシレーションは維持されていることから、*Hes7* の転写が常に活性化状態であるわけではなく、ネガティブフィードバック機構は維持されていると考えられる。

iPSM 培養系を使用した応用法

本研究で確立した iPSM 培養系は、他のアッセイ系にも応用可能であると考えられる。例えば同期化した Hes7 オシレーションに関与する遺伝子を解明するため RNAi スクリーニングを行うことが可能である。さらにこのシステムは分節時計の遺伝分析を行うのに遺伝子改変動物を作製する必要がないため、とても有利となる。CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子改変(Koike-Yusa H. *et al.*, 2014; Shalem O. *et al.*, 2014; Wang T. *et al.*, 2014) や遺伝子発現の時空間制御を行うオプトジェネティクスシステム(Isomura A. *et al.*, 2017) を応用した解析も短時間で容易に行える。そのほかに iPSM 培養系は iPS 細胞や ES 細胞を使用することで種間で異なる体節形成メカニズムの周期を解析する上でも最適である。例えば分節時計の周期は種間で異なっており、iPSM を用いた細胞培養系はこのような種特異的な分子メカニズムを解明することができる。これまでの研究から、スプライシングや mRNA の核内から細胞質への移行にかかる時間が種依存的に決まっていると考えられている(Hoyle N. P. and Ish-Horowicz D, 2013)。そのため、iPSM を用いた解析により直接種特異的なメカニズムを理解することが可能である。

参考文献

- Akiyama K, Katayama K, Tsuji T, Kunieda T. Characterization of the skeletal fusion with sterility (sks) mouse showing axial skeleton abnormalities caused by defects of embryonic skeletal development. *Exp Anim*. 2014;63(1):11–9.
- Aulehla A, Wehrle C, Brand-Saberi B, Kemler R, Gossler A, Kanzler B, Herrmann BG. Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Dev Cell*. 2003 Mar;4(3):395–406.
- Bessho Y, Sakata R, Komatsu S, Shiota K, Yamada S, Kageyama R. Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Genes Dev*. 2001 Oct 15;15(20):2642–7.
- Chal J, Oginuma M, Al Tanoury Z, Gobert B, Sumara O, Hick A, Bousson F, Zidouni Y, Mursch C, Moncuquet P, Tassy O, Vincent S, Miyanari A, Bera A, Garnier JM, Guevara G, Hestin M, Kennedy L, Hayashi S, Drayton B, Cherrier T, Gayraud-Morel B, Gussoni E, Relaix F, Tajbakhsh S, Pourquié O. Differentiation of pluripotent stem cells to muscle fiber to model Duchenne muscular dystrophy. *Nat Biotechnol*. 2015 Sep;33(9):962–9. doi: 10.1038/nbt.3297.
- Dale JK, Maroto M, Dequeant ML, Malapert P, McGrew M, Pourquie O. Periodic notch inhibition by lunatic fringe underlies the chick segmentation clock. *Nature*. 2003 Jan 16;421(6920):275–8
- Delaune EA, François P, Shih NP, Amacher SL. Single-cell-resolution imaging of the impact of Notch signaling and mitosis on segmentation clock dynamics. *Dev Cell*. 2012 Nov 13;23(5):995–1005. doi: 10.1016/j.devcel.2012.09.009.
- Dequéant ML, Glynn E, Gaudenz K, Wahl M, Chen J, Mushegian A, Pourquié O. A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock. *Science*. 2006 Dec 8;314(5805):1595–8.
- Dovey HF, John V, Anderson JP, Chen LZ, de Saint Andrieu P, Fang LY, Freedman SB, Folmer B, Goldbach E, Holsztynska EJ, Hu KL, Johnson-Wood KL, Kennedy SL, Kholodenko D, Knops JE, Latimer LH, Lee M, Liao Z, Lieberburg IM, Motter RN, Mutter LC, Nietz J, Quinn KP, Sacchi KL, Seubert PA, Shopp GM, Thorsett ED, Tung JS, Wu J, Yang S, Yin CT, Schenk DB, May PC, Altstiel LD, Bender MH, Boggs LN, Britton TC, Clemens JC, Czilli DL, Dieckman-McGinty DK, Droste JJ, Fuson KS, Gitter BD, Hyslop PA, Johnstone EM, Li WY, Little SP, Mabry TE, Miller FD, Audia JE. Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem*. 2001 Jan;76(1):173–81.

Dubrulle J, Pourquié O. *fgf8* mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo. *Nature*. 2004 Jan 29;427(6973):419–22.

Eckalbar WL, Fisher RE, Rawls A, Kusumi K. Scoliosis and segmentation defects of the vertebrae. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2012 May–Jun;1(3):401–23. doi: 10.1002/wdev.34.

Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, Sekiguchi K, Adachi T, Sasai Y. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*. 2011 Apr 7;472(7341):51–6. doi: 10.1038/nature09941.

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*. 1998 Jul 17;273(29):18623–32.

Feller J, Schneider A, Schuster-Gossler K, Gossler A. Noncyclic Notch activity in the presomitic mesoderm demonstrates uncoupling of somite compartmentalization and boundary formation. *Genes Dev*. 2008 Aug 15;22(16):2166–71. doi:10.1101/gad.480408.

Gyuris A, Donovan DJ, Seymour KA, Lovasco LA, Smilowitz NR, Halperin AL, Klysik JE, Freiman RN. The chromatin-targeting protein Brd2 is required for neural tube closure and embryogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2009 May;1789(5):413–21. doi: 10.1016/j.bbagr.2009.03.005.

Hooper M, Hardy K, Handyside A, Hunter S, Monk M. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature*. 1987 Mar 19–25;326(6110):292–5.

Houzelstein D, Bullock SL, Lynch DE, Grigorieva EF, Wilson VA, Beddington RS. Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4. *Mol Cell Biol*. 2002 Jun;22(11):3794–802.

Hoyle NP, Ish-Horowicz D. Transcript processing and export kinetics are rate-limiting steps in expressing vertebrate segmentation clock genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 12;110(46):E4316–24. doi: 10.1073/pnas.1308811110.

Ishii A, Kobayashi T, Kageyama R. Requirement of multiple lysine residues for the transcriptional activity and the instability of Hes7. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Jul 18;372(1):142–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.05.015.

Isomura A, Ogushi F, Kori H, Kageyama R. Optogenetic perturbation and bioluminescence imaging to analyze cell-to-cell transfer of oscillatory information. *Genes Dev*. 2017 Mar 1;31(5):524–535. doi: 10.1101/gad.294546.116.

Jiang YJ, Aerne BL, Smithers L, Haddon C, Ish-Horowicz D, Lewis J. Notch signalling and the synchronization of the somite segmentation clock. *Nature*. 2000 Nov 23;408(6811):475–9.

Jouve C, Palmeirim I, Henrique D, Beckers J, Gossler A, Ish-Horowicz D, Pourquié O. Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm. *Development*. 2000 Apr;127(7):1421–9.

Kageyama R, Niwa Y, Isomura A, González A, Harima Y. Oscillatory gene expression and somitogenesis. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2012 Sep–Oct;1(5):629–41. doi: 10.1002/wdev.46.

Kawakami K, Koga A, Hori H, Shima A. Excision of the tol2 transposable element of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in zebrafish, *Danio rerio*. *Gene*. 1998 Dec 28;225(1–2):17–22.

Kawakami K. Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol*. 2007;8 Suppl 1:S7.

Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, Velasco-Herrera Mdel C, Yusa K. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol*. 2014 Mar;32(3):267–73. doi: 10.1038/nbt.2800.

Leimeister C, Schumacher N, Steidl C, Gessler M. Analysis of HeyL expression in wild-type and Notch pathway mutant mouse embryos. *Mech Dev*. 2000 Nov;98(1–2):175–8.

Mansouri A, Yokota Y, Wehr R, Copeland NG, Jenkins NA, Gruss P. Paired-related murine homeobox gene expressed in the developing sclerotome, kidney, and nervous system. *Dev Dyn*. 1997 Sep;210(1):53–65.

Masamizu Y, Ohtsuka T, Takashima Y, Nagahara H, Takenaka Y, Yoshikawa K, Okamura H, Kageyama R. Real-time imaging of the somite segmentation clock: revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 31;103(5):1313–8.

Neidhardt LM, Kispert A, Herrmann BG. A mouse gene of the paired-related homeobox class expressed in the caudal somite compartment and in the developing vertebral column, kidney and nervous system. *Dev Genes Evol*. 1997 Nov;207(5):330–339.

Niwa Y, Masamizu Y, Liu T, Nakayama R, Deng CX, Kageyama R. The initiation and propagation of Hes7 oscillation are cooperatively regulated by Fgf and notch signaling in the somite segmentation clock. *Dev Cell*. 2007 Aug;13(2):298–304.

Niwa Y, Shimojo H, Isomura A, González A, Miyachi H, Kageyama R. Different types of oscillations in Notch and Fgf signaling regulate the spatiotemporal periodicity of somitogenesis. *Genes Dev.* 2011 Jun 1;25(11):1115–20. doi:10.1101/gad.2035311.

Oates AC, Morelli LG, Ares S. Patterning embryos with oscillations: structure, function and dynamics of the vertebrate segmentation clock. *Development.* 2012 Feb;139(4):625–39. doi: 10.1242/dev.063735.

Okubo Y, Sugawara T, Abe–Koduka N, Kanno J, Kimura A, Saga Y. Lfng regulates the synchronized oscillation of the mouse segmentation clock via trans–repression of Notch signalling. *Nat Commun.* 2012;3:1141. doi: 10.1038/ncomms2133.

Saga Y, Hata N, Koseki H, Taketo MM. *Mesp2*: a novel mouse gene expressed in the presegmented mesoderm and essential for segmentation initiation. *Genes Dev.* 1997 Jul 15;11(14):1827–39.

Sasai Y, Kageyama R, Tagawa Y, Shigemoto R, Nakanishi S. Two mammalian helix–loop–helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes Dev.* 1992 Dec;6(12B):2620–34.

Serth K, Schuster–Gossler K, Cordes R, Gossler A. Transcriptional oscillation of lunatic fringe is essential for somitogenesis. *Genes Dev.* 2003 Apr 1;17(7):912–25.

Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen T, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome–scale CRISPR–Cas9 knockout screening in human cells. *Science.* 2014 Jan 3;343(6166):84–87. doi:10.1126/science.1247005.

Shang E, Wang X, Wen D, Greenberg DA, Wolgemuth DJ. Double bromodomain–containing gene *Brd2* is essential for embryonic development in mouse. *Dev Dyn.* 2009 Apr;238(4):908–17. doi: 10.1002/dvdy.21911.

Sparrow DB, Chapman G, Smith AJ, Mattar MZ, Major JA, O’Reilly VC, Saga Y, Zackai EH, Dormans JP, Alman BA, McGregor L, Kageyama R, Kusumi K, Dunwoodie SL. A mechanism for gene–environment interaction in the etiology of congenital scoliosis. *Cell.* 2012 Apr 13;149(2):295–306. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.054.

Takashima Y, Ohtsuka T, González A, Miyachi H, Kageyama R. Intronic delay is essential for oscillatory expression in the segmentation clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Feb 22;108(8):3300–5. doi: 10.1073/pnas.1014418108.

Wahl MB, Deng C, Lewandoski M, Pourquié O. FGF signaling acts upstream of the NOTCH and WNT signaling pathways to control segmentation clock oscillations in mouse somitogenesis. *Development.* 2007 Nov;134(22):4033–41.

Wang J, Li S, Chen Y, Ding X. Wnt/beta-catenin signaling controls Mesp1 expression to regulate segmentation during *Xenopus* somitogenesis. *Dev Biol*. 2007 Apr 15;304(2):836–47.

Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR–Cas9 system. *Science*. 2014 Jan 3;343(6166):80–4. doi: 10.1126/science.1246981.

Wittler L, Shin EH, Grote P, Kispert A, Beckers A, Gossler A, Werber M, Herrmann BG. Expression of *Mesp1* in the presomitic mesoderm is controlled by synergism of WNT signalling and *Tbx6*. *EMBO Rep*. 2007 Aug;8(8):784–9.

Yagita K, Yamanaka I, Emoto N, Kawakami K, Shimada S. Real-time monitoring of circadian clock oscillations in primary cultures of mammalian cells using Tol2 transposon-mediated gene transfer strategy. *BMC Biotechnol*. 2010 Jan 22;10:3. doi: 10.1186/1472–6750–10–3.

謝辞

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Matsumiya M, Tomita T, Yoshioka-Kobayashi K, Isomura A. and Kageyama R.

ES cell-derived presomitic mesoderm-like tissues for analysis of synchronized oscillations in the segmentation clock.

Development. 2018 Feb 14;145(4). pii:dev156836. doi: 10.1242/dev.156836.

研究を行うにあたり、多大なるご指導、ご協力を頂きました影山龍一郎教授、大塚俊之准教授、小林妙子助教をはじめ、影山研究室のみなさまに心より感謝申し上げます。

副指導教員になっていただいた、松田道行教授、西田栄介教授、豊島文子教授には、面談の際様々なアドバイスを頂きました。深く感謝の意を表します。

下條博美博士、磯村彰宏博士にはこれからの研究で必要となる心構えや考え方など様々なことをご指導いただきました。

富田丈仁君には、実験のサポートをして頂きました。

特に、吉岡久美子さんには実験手法など基本的なことからすべて指導して頂きました。厚くお礼申し上げます。

そして最後に、大学院進学を許可し支えてくれた家族に深く感謝致します。