

平成17年度

若手研究者奨励研究報告書

平成17年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

HS研究

第1分野

課題番号

KH13301	テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（総合研究報告）	西田基宏 ……	1
KH13301	テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（平成17年度報告）	西田基宏 ……	6
KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川端健二 ……	10

第2分野

KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増田智先 ……	15
KH23304	Toll様受容体（TLR3）を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中道一生 ……	22
KH23306	吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究	伊澤晴彦 ……	27
KH23307	アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発	大喜多 肇 ……	34
KH23331	寄生性原虫の生育に必要な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中野由美子 ……	39

第3分野

KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋本亮太 ……	47
KH33309	ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測	小林カオル ……	55
KH33310	薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究	田辺公一 ……	60
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディの基礎的および応用的研究	川上浩司 ……	65

第5分野

KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊豫田 淳 ……	69
KH53313	遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発	岡田直貴 ……	74
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小島伸介 ……	84

KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 89
KH53333	治療ターゲットとしてのFc γ 受容体を介したデング出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 94
エイズ研究		
第1分野		
KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の解明	藤室雅弘 …… 99

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

テラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（総合研究報告）

所 属 九州大学大学院薬学研究院 薬物中毒学分野
研究者 西田 基宏
研究期間 平成 16 年 4 月～平成 18 年 3 月

研究要旨 薬剤が不整脈を引き起こすかどうかを調べることはきわめて重要になっている。本研究は、先端的な手法を用い薬剤反応性の個人差にも適用可能な不整脈を誘起する薬剤のスクリーニング系の確立を目的とするものである。

A. 研究目的

薬剤によって引き起こされる不整脈は、しばしば心室細動へと移行し死に至る重篤な副作用である。しかしながら薬剤が不整脈を引き起こすかどうかをスクリーニングする系は、現在までのところ決定的な方法はなく、動物そのものを使ったスクリーニング系も種差や入手の困難さなどから問題があり、迅速でかつ正確な代替法が求められている。本研究では、2つのタンパク質の相互作用を検出する系として使われてきた蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）を分子内の相互作用を検出する方法として、薬剤によって引き起こされる不整脈の主要な標的と考えられているカリウムチャンネル（HERG）に適用し、薬剤誘起性不整脈のスクリーニング系を確立することを目的としている。

B. 研究方法

蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）とは、ある蛍光タンパク質（タンパク質-1）の蛍光波長が別の蛍光タンパク質（タンパク質-2）の励起波長とオーバーラップしていると、タンパク質-2がタンパク質-1の蛍光によって励起されるため、タンパク質-1を励起してもタンパク質-1の蛍光ではなくタンパク質-2からの蛍光が観察される現象である。FRETの起り易さは2つのタンパク質間の距離や向きあっている角度に依存するという問題はあるものの、FRETは2つのタンパク質の相互作用を解析する手法として近年盛んに使われている手法である。HERGに励起および蛍光波長が異なる2つのGFP蛍光分子種（CFPとYFP）を導入しキメラHERGを作製する。キメラHERGのCFPを励起すると、CFPの蛍光波長がYFPの励起波長とオーバーラップするため、蛍光がCFPからではなくYFPから生じる。すな

わち、分子内での相互作用をFRETで検出できる。HERGに励起および蛍光波長が異なる2つのGFP分子種（CFPとYFP）を導入しキメラHERGを作製する。キメラHERGのCFPを励起すると、CFPの蛍光波長がYFPの励起波長とオーバーラップするため、蛍光がCFPからではなくYFPから生じる。すなわち、分子内での相互作用をFRETで検出できる。計画方法としては以下のように進めることにした。平成16年度は、CFPとYFPを導入したキメラHERGを哺乳動物細胞に発現させ、元の（野生型の）HERGと同じ電気生理学的特性を示すことを確認する。次に、不整脈を引き起こすことが知られている薬剤を作用させFRETが生じるか検討する。CFPとYFPを導入する部位を変えたいくつかのコンストラクトを作製し、もっとも感度よく薬剤との相互作用が検出できるキメラHERGを決定する。平成17および18年度は、一塩基多型（SNP）として知られている変異をキメラHERGに導入し、薬剤によって引き起こされるFRETがどのように影響を受けるか検討する。この段階で、多くの薬剤を調べ、FRETの起り方とSNPとの関係を確立し、個人の遺伝情報と薬剤誘起性不整脈の関係を樹立することが可能となる。これを実行するため、以下のような根拠に基づいてCFPとYFPを導入したキメラHERGを作成することにした。HERGは細胞内にアミノ末端を持つ細胞膜を6回貫通する構造のモノマーが4量体を形成し、中央にカリウムイオンを通すポア（小さな穴）が存在する。そこで、チャンネルが閉じる際には、アミノ末端部分あるいは細胞膜貫通領域が移動してポアをふさぐように働くと仮定し、CFPを入れる位置はアミノ末端あるいは細胞膜近傍の細胞内領域に、一方YFPを入れる位置はポアが形成される細胞膜の近傍の細

胞内領域あるいはカルボキシル末端に入れることにした。次に、作成したキメラ HERG が野生型 HERG と同様の電気生理学的性質を保持しているかどうか調べるため、非興奮性動物細胞株 HEK293 または興奮性心室筋細胞の2つに発現させることで評価した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いる動物(ラット、マウスなど)は、本大学大学院の動物実験を行う際の指針(正式名称「九州大学大学院薬学研究院、大学院薬学府及び薬学部における動物実験に関する指針」)に沿って行うため倫理面の問題はないと判断している。ヒトの一塩基置換の遺伝情報はすでに報告されている変異を使用するため、ヒトに対する倫理面での問題はない。

C. 研究結果

ヒト cDNA library から HERG 遺伝子をクローニングした。方法に示した理論に基づき、いくつかのキメラ HERG コンストラクトを作製した(図1)。これらをヒト胎児腎臓由来の細胞株(HEK293)に一過的発現させたところ、キメラ HERG タンパクは野生型 HERG と同様に形質膜に存在することが確認された(図2)。

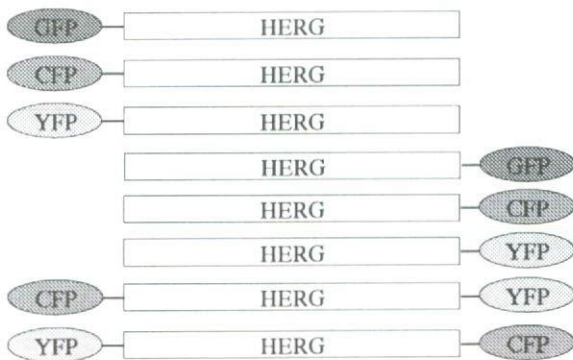


図1 作成したキメラHERGコンストラクト

HERG 発現細胞に高カリウム刺激を与えても、HERG チャンネルタンパクの局在に変化はなかった。次に、作成したキメラ HERG が野生型 HERG の電気生理学的性質を保持しているかどうかパッチクランプ法を用いて調べた。初年度は電気生理機器のセットアップおよび測定系を確立させることに尽力した。通常のトランスフェクション(Fugene 6; Roche 社)法により、野生型 HERG チャンネルを一過的に発現させた HEK293 細胞を用いて、脱分極パルス刺激により惹起される電流量を測定し、HERG の電気的特性を解析した。GFP だけをコードしているコントロールプラス

ミドを発現させた HEK293 細胞と比べて、HERG 発現細胞では脱分極刺激により顕著な外向き電流が観察された。これは、他のグループがすでに論文として報告されている HERG の電気的特性と一致していた。

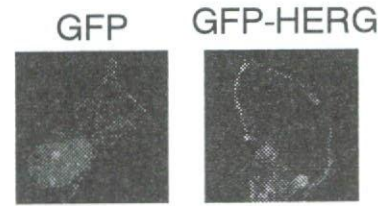


図2 HERGの局在

また、図1に示すアミノ末端またはカルボキシル末端に蛍光タンパクを付加したキメラ HERG が、野生型の HERG とチャンネルとして同じ電気生理学的性質を持つことも明らかにした。次に、キメラ HERG が実際に細胞内で FRET を起こすかどうか、fugene 6 を用いたトランスフェクション法によりラット新生仔心室筋細胞に一過的に HERG を発現させてみた。しかしながら、この方法では遺伝子導入効率が低く、1%以下の細胞にしか HERG の発現が認められなかった。この細胞に、HERG チャンネル発現細胞に脱分極(high KCl)刺激を行っても FRET 現象を観察することはできなかった。Fugene 6 により遺伝子導入された細胞は、形態にも異常が認められたことから、トランスフェクションによる細胞毒性が HERG の FRET 測定を困難にしている可能性が考えられた。この問題をクリアするため、我々がこれまで培養心筋細胞への遺伝子導入法として頻用してきた組み換えアデノウイルス法を用いて、HERG の遺伝子導入を行おうとしている。一方、非興奮性の HEK293 細胞にキメラ HERG を発現させることで FRET が起こるかどうか調べてみた。その結果、いずれのコンストラクトを用いても脱分極刺激または HERG 阻害作用を有するテルフェナジン処置によって有意な蛍光変化は認められなかった。この原因として、FRET 法では蛍光感度が低すぎる可能性が考えられたため、CFP の部分を GFP² に、YFP の部分を Luciferase に置換させた BRET² 法により測定することにした。17 年度はコンストラクト作成に従事し、全て完了した。一方、初代培養心筋細胞を用いて不整脈誘起性薬剤のスクリーニング系を確立させた。具体的には、ラット新生仔の心室筋細胞を 64 点電極付培養ディッシュ上に初代培養し、細胞外電位変化を記録することで薬剤による活動電位持続時間(action potential duration: APD)の延長作用を調べた。

64点電極付培養ディッシュおよび測定機器は、 α MED サイエンス社（松下電器）の協力を得てセットアップすることができた。この測定システムを用いることで、心電図上のQT間隔を反映する心室筋細胞のAPDを培養レベルで観察することが可能となった。培養3-4日目において心室筋細胞は自発活動を示すようになり、活動電位のパターンは成人の心室筋細胞のそれと類似した波形を示した（図3A）。いくつかの薬剤のAPDに対する効果を調べた結果、アントラサイクリン系抗癌剤アドリアマイシンの高濃度（10 μ M）投与によって速やかな陽性変時作用およびAPDの延長作用が認められた（図3B, C）。アドリアマイシンによるAPD延長効果は約1時間持続し、3時間後には自発活動が全く認められなくなった。アドリアマイシンによる陽性変時作用およびAPD延長作用が抗酸化剤処置によって部分的に抑制されたことから、アドリアマイシンによる細胞内活性酸素（ROS）量の増加がHERGチャンネルの機能抑制とそれに続くAPD延長効果を引き起こす可能性が示された。

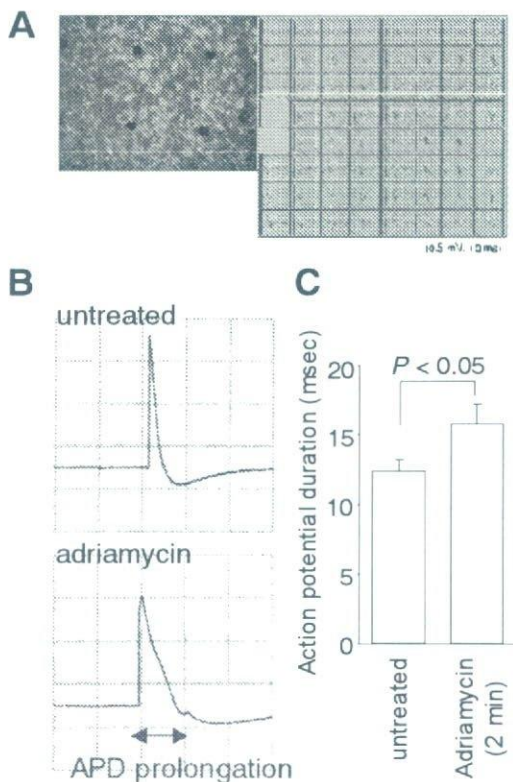


図3 64点電極付培養ディッシュを用いた細胞外電位変化記録。A. ラット新生仔培養心室筋細胞（4日目）と電気刺激で誘発される活動電位の様子。B. 自発活動として観察された心室筋細胞の活動電位パターンとアドリアマイシン処置によるAPD延長効果。C. APDを定量した結果（ $n=3$ ）。

この他に、これまでHERGチャンネルに対して抑制効果を示すことが報告されているテルフェナジン（H1 antagonist）やリチウムもまた、培養心

室筋細胞のAPD延長を引き起こした。

以上の結果から、HERGチャンネルがラット新生仔培養心室筋細胞の活動電位の時間的制御において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

D. 考察

本年度、研究者は不整脈誘発薬剤のスクリーニング系の確立に向けて、ヒトHERG遺伝子のクローニングおよび蛍光タンパクを付加したいくつかのキメラHERG遺伝子のコンストラクトを作成した。電位依存性チャンネルの中には、蛍光タンパクをアミノ末端またはカルボキシル末端に付加させることでチャンネルの特性が変わるものがあるという報告がいくつかなされている。しかし、本研究で、キメラHERGタンパクが形質膜に発現しており、電気生理学的にも野生型HERGと同様の性質を保持していることが明らかとなり、FRET定量的解析に有効なプローブとなる可能性が示された。しかし、我々の作成したHERGキメラタンパクでは、阻害剤または脱分極刺激によるチャンネルの構造変化に伴ったFRET現象を見出すことはできなかった。薬剤によるHERGチャンネルのポア閉口に伴うチャンネルの構造変化を利用してFRETを起させるというアプローチから考えると、作成したコンストラクトで十分なFRETを起させるかどうかわからない。例えば、チャンネルのポア近傍の細胞内ループに蛍光タンパクを挿入したほうがよりダイナミックな構造変化に伴うFRETを起させるのではないかと考えられる。しかし、チャンネルタンパクのアミノ末端およびカルボキシル末端にGFPを挿入した場合と違い、ポア近傍にGFPを挿入させる場合は、チャンネルそのものの構造が大きく変化する可能性が考えられる。従って、細胞内ループに蛍光タンパクを挿入したコンストラクトについては、チャンネルの電気生理学的特性が野生型のそれと一致するかどうか特に慎重に解析する必要があると考えられる。また、FRETを引き起こすための十分な発現量が得られなかったことも原因のひとつとして考えられる。HERGは膜蛋白質であるため、過剰発現系においてもタンパク量は少なく、CFPまたはYFP蛍光も十分とは言えなかった。現在は、FRETよりも効率よく定量解析を行えるBRET系を立ち上げようとしている。今後はBRET実験系の確立と並行してコンストラクションも引き続き行おうと考えている。

一方、ラット新生仔の培養心室筋細胞の細胞外電位測定法を用いて、自発的な活動電位や電気刺激で誘発される活動電位変化を測定する系を立ち上げた。この測定システムを用いて、これまで

HERG を抑制することが報告されているテルフェナジンやリチウムが心室筋の APD を延長させることを明らかにした。この結果は、新生仔の培養心筋細胞の電気的活動においても、HERG が APD の時間的制御に重要な役割を果たしていることを明らかにするものである。高濃度のアドリアマイシンは、培養心室筋細胞の APD 延長を引き起こした。アドリアマイシンによる心毒性は、主にミトコンドリアからの活性酸素生成に依存することがわかっている。さらに、HERG は活性酸素によってメチオニン残基の酸化修飾を受け、機能抑制を引き起こすことも報告されている。アドリアマイシンによるミトコンドリアからの活性酸素生成が HERG チャネルの不活性化を引き起こし、心室筋の APD 延長を引き起こすという仮説が考えられる。今後、アドリアマイシンの HERG 構造変化や APD 延長作用に対する活性酸素依存性を検討することで、アドリアマイシンによる不整脈誘発作用の分子メカニズムを解明することが可能となろう。また、心室筋における APD 延長は、心電図上の QT 区間の延長を反映することから、培養心筋細胞を用いた活動電位持続時間測定系もまた不整脈誘発薬剤のスクリーニングに有効な手法になりうると考えられる。電極付培養ディッシュを用いたスクリーニング系は、HERG の FRET システムに比べてコスト上の問題が大きいものの、薬剤のもつ不整脈誘発作用を HERG チャネル分子の構造変化のみならず、ネイティブな心室筋細胞の自発性の活動電位に与える効果の両方で評価することによって、より正確に評価することが可能になると考えている。特に、第二次世界大戦後、感染症に対する抗生物質をはじめとする多くの薬剤が治療に使われるようになった。治療に用いられる薬剤の数が増加するにつれ、薬剤によって引き起こされる副作用も頻度を増してきた。近年薬剤の投与により、心臓の再分極過程を表す心電図の QT 間隔を延長させる多形性の心室頻拍を示す症例が目立ってきた。理由は心室頻拍が心室細動に移行し死につながる病態であると認識されるようになったこと、また心臓に作用する薬剤でなくても QT 間隔を延長させ心室頻拍から心室細動を経て突然死を引き起こすことからである。これらにより、開発の際に薬剤が薬剤誘起性の不整脈を引き起こすかどうか調べる必要性が認識されるようになった。この目的のために、*in vitro* および *in vivo* のスクリーニング系が開発されてきた。しかし、ラットなどの動物を使ったスクリーニングは、ヒトと心臓の再分極過程が異なるため、得られた結果をそのまま適用できないという問題があること、サルやイヌなどを使ったスクリーニン

グは不整脈の出現が心拍数に依存するという心拍数の問題があること、あるいはこれらの動物を入手する困難さなどから、いずれもベストの方法とはいいがたい。ヒトの遺伝子を使った場合も定量性の点で問題があるとされている。本研究は、個人差の遺伝情報をスクリーニング系に取り込むことのできる評価系である。すなわち、薬剤によって引き起こされる不整脈の出現をスクリーニングする方法であると共に、個人の遺伝情報を用いる副作用の軽減へ向けた一歩となる評価法でもある。遺伝情報の違いによって薬剤誘起性不整脈の出現頻度が異なる可能性を検討するために、HERG の SNP としてすでに報告されている一塩基置換をデータベースより得て、CFP と YFP をすでに導入しているキメラ HERG に変異を導入する。このチャネルは、HERG に作用する薬剤による不整脈の誘起、すなわち薬剤による副作用発現の個人差を反映するはずである。SNP の変異を導入した変異型キメラ HERG を用いて、さまざまな薬剤を作用させ FRET がどのように影響を受けるか検討する。薬剤により不整脈が生じる時の特徴的な変化が観察されることを SNP の変異を導入した変異型キメラ HERG にて電気生理学的に確認する。これにより、特定の遺伝子型を持つヒトには、どのような薬剤を用いるべきか明らかになると期待される。

E. 結論

本年度は、FRET システム確立のために必要なキメラ HERG タンパクの作成を行った。また、これらキメラ HERG は形質膜に発現すること、および野生型 HERG と同様のチャネル特性を保持していることを明らかにし、FRET 解析可能なコンストラクトであることがわかった。しかしながら、現段階でスクリーニングに発展できる程度の FRET 現象を見出す事は出来ておらず、今後より詳細な検討が必要と考えられる。本システムの開発は、ただ動物を使わないスクリーニングの代替法の確立のみならず、薬剤による副作用を軽減するという患者への直接的な効果、新規薬剤を開発する際のスクリーニングコストを下げる効果、あるいは副作用により生じる個人の社会活動の喪失からくる社会的生産性の低下を防ぐ効果といった成果につながると期待できる。また、FRET 実験系の立ち上げと並行して、ネイティブなラット新生仔心室筋の初代培養細胞の活動電位測定系を立ち上げることに成功した。新生仔の心室筋細胞においても、これまでに HERG チャネル抑制作用があると報告されているいくつかの薬剤が APD を延長させることを示した。電極付培養ディッシ

ユを用いたネイティブ心筋細胞の活動電位測定系は、コストがかかることや、ネイティブな細胞の準備に技術を要するなど、実用化までにいくつかの問題を抱えているものの、不整脈誘発薬剤のスクリーニングとしては有用なシステムとなりうる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社