

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonicsを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 30
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 126
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 221
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造 …… 247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光 …… 262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘 …… 286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗 …… 300
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西正孝 …… 310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一 …… 318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功 刀 浩 …… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡澄江 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方of科学的品質保証に関する研究	合田幸広 …… 373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美健彦 …… 402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里勝利 …… 417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山行雄 …… 435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎藤嘉朗 …… 449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口照英 …… 466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎ナナ …… 494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍兒 …… 566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 576

バイオフィトニクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発

所属 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部
研究者 川西 徹

研究要旨 細胞機能解析用のバイオフィトニクスプローブを開発・利用し、疾患に伴って生じる細胞組織障害を簡便かつ定量的に解析する方法の開発研究を行った：
(1) ダブル FRET 細胞組織障害解析法を用いて小胞体ストレスによる細胞障害の解析を行い、単一細胞における2種の反応の活性化状況の解析に成功した。また、その他の細胞障害解析用プローブの開発、検討を行なった；(2) ケージドペプチド核酸やケージドジアシルグリセロール等により遺伝子の機能発現の光制御、もしくはタンパク質の機能制御に成功した；(3) 内皮依存的な弛緩反応における弛緩応答、カルシウム応答およびNO産生の評価系を確立した；(4-1) ペースメーカー細胞の再構築によりK⁺チャンネル関連細胞機能障害解析細胞系を開発した；(4-2) 心筋由来H9c2細胞系と蛍光プローブにより心筋ミトコンドリア機能を検出する系を確立した；(5) 肝臓における脂肪蓄積誘発性のプロファイリング/スクリーニング系を構築した；(6) ミトコンドリア膜電位を評価することで、細胞のタンパク質産生能力を比較・推定できる可能性を示した。

分担研究者

- (1) 田辺製薬株式会社 藤村久子
- (2) 三菱ウェルファーマ株式会社 小林 薫
- (3) 東邦大学理学部 古田寿昭
- (4) 昭和大学薬学部 大幡久之
- (5) 名古屋市立大学薬学部 今泉祐治
- (6) 東邦大学薬学部 重信弘毅

A. 研究目的

治療用医薬品の多くは疾病に伴う細胞組織障害からの防御、あるいは細胞組織障害からの回復を促す作用によって効果を現す。したがって疾病による細胞組織障害の解析技術は疾病治療用医薬品の創薬において、最も重要な基盤技術の一つといえる。しかしながら細胞組織障害を細胞機能の障害（異常）という面から客観的に定量性をもって解析する手法は十分にはない。

近年、細胞機能に係る生体内パラメーターに対する感受性蛍光プローブ（バイオフィトニクスプローブ）を用いて、その変動を測定する手法が開発され、生物学・医学領域の研究に広く用いられている。この方法は、様々な細胞機能に関係するパラメーターを光の色あるいは強さに変換し、光計測によって解析するという手法である。使用するバイオフィトニクスプローブ

は通常生体内の多種多様な共存物の中で機能しなければならぬため、高い特異性が要求される。したがってプローブ開発にあたっては生体反応の特異性を巧みに利用した分子設計が必要であり、生体内での使用方法を確立させるまでには十分な検討が必要である。しかし、光という共通の物理的シグナルの計測によって種々の細胞機能の測定が可能であるため、光計測機器（分光器、蛍光光度計、顕微鏡測光、顕微鏡画像解析、プレートリーダー等）を用いた解析系を一度確立することができれば、ルーチン試験にも応用可能な簡便な細胞組織障害の客観的、定量的解析系となる。この特徴は、とりわけバイオゲノム時代の創薬においては、様々な局面で活用可能な特性である。

そこで、本研究は、細胞機能解析用のバイオフィトニクスプローブを開発・利用することにより、疾患に伴って生じる細胞組織障害を簡便かつ定量的に解析する方法を確立し、創薬シーズ探索のためのハイスループットスクリーニング、医薬品候補化合物のセレクション、医薬品候補化合物の安全性評価、タンパク質性医薬品の品質（生物活性）評価等への応用を図ることを目的として行なった。

B. 研究方法

(1) Death receptor 関連細胞内情報伝達系解析用プローブの開発

Effectene (Qiagen)を用いてイニシエーター・エフェクターカスパーゼ活性検出用プローブ発現用プラスミドを HeLa 細胞に導入した。遺伝子導入後 2-3 日に TNF- α もしくは小胞体ストレス誘起物質であるタブシガルギンにより細胞を処理し、共焦点レーザー顕微鏡によるリアルタイムイメージングを行った。また、細胞障害に関与するその他のタンパク質を蛍光タンパク質で標識し、細胞障害の解析法としての評価を行なった。

(2) ケージド化合物を用いた、タンパク質および遺伝子の機能を光制御する方法の開発

光分解性の保護基で生理活性分子を保護し、一時的にその活性を失わせたケージド化合物を用いて、組織障害に伴う細胞応答を制御する分子（例えば、細胞内シグナル分子やサイトカイン等）の機能を、高い時空間分解能で制御する手法の確立を試みた。合成が比較的容易な低分子量有機化合物のケージド化合物を合成し、哺乳動物培養細胞の系で、遺伝子の機能発現の光制御、および、タンパク質の機能制御への応用を検討した。

(3) 二光子励起観察による細胞組織障害測定法の構築

カバーガラスに、3 μ L CELL-TAK (0.92 mg/mL) を塗布し風乾させた後、マウスより摘出した脳底動脈を貼付けた。血管組織を 10 μ M fura red/AM および 10 μ M fluo-4/AM 溶液を含む KHH 溶液で 30 分間遮光しながらインキュベートした。NO 産生の測定には 10 μ M DAF-FM/DA を含む KHH 溶液中で 40 分間遮光しながらインキュベートした。共焦点レーザー顕微鏡 (RTS2000MP システム, Bio Rad) を用いて、fluo-4/AM (Ex:488 nm, Em:503-553 nm) と fura red/AM (Ex:488 nm, Em:580-700 nm) による蛍光画像を 2 チャンネル用いて取得した。また、細胞内 NO 産生は、DAF-FM/DA の蛍光画像 (Ex:488 nm, Em:503-553 nm) を取得した。

[Ca²⁺]_i 変化の解析は、画面全体の fura red/AM と fluo-4/AM 各々の平均蛍光強度を数値化し、各々のバックグラウンドを差し引いた後、fluo-4/fura red の比を求めた。30 mM KCl 適用による変化の最大値を 100%とした時の蛍光強度の変化率を [Ca²⁺]_i 変化の指標とした。一方、収縮応答の解析は、一定以上の蛍光強度を示す血管の断面積から平均血管径を求め、弛緩率を算出した。30 mM KCl 適用による血管径変化の最大値を 100%とした時の血管径

変化率を弛緩率とした。細胞内 NO レベルは、DAF-FM/DA の静止時の蛍光強度に対する変化率を指標とした。

(4-1) K⁺チャンネル関連細胞機能障害解析細胞系等の開発-1

RyR3 単独発現細胞 (RyR3-HEK) 及び SK2 チャンネルと RyR3 共発現細胞 (SK2/RyR3-HEK) を作製した。RyR3 の発現は、1 mM カフェインによる一過性の [Ca²⁺]_i 上昇によって確認した。また、SK2 チャンネルの発現は、ホールセルパッチクランプ法による薬理的解析と抗体染色法により確認した。[Ca²⁺]_i の蛍光指示薬として、10 μ M fura-2/AM を HEK 細胞に負荷した。[Ca²⁺]_i の測定には、蛍光画像解析システム ARGUS/HiSCA (浜松ホトニクス) を用いた。細胞内の生理的状态を保持するために、ナイスタチン穿孔パッチクランプ法を用いた。膜電位の記録は、膜電流固定法によって行った。実験は、室温 (24 \pm 1 $^{\circ}$ C) で行った。

(4-2) K⁺チャンネル関連細胞機能障害解析細胞系等の開発-2

心筋細胞由来細胞系である H9c2 に遺伝子導入することによりミトコンドリア移行シグナル付きタンパク性カルシウム蛍光プローブカメレオンを発見させ、蛍光強度比 (CFP/YFP) をカルシウム濃度の指標として測定した。また、tetramethyl rhodamine ethylester (TMRE) を load し、落射蛍光顕微鏡法により 488nm で励起して蛍光強度をミトコンドリアの膜電位の指標とした。ミトコンドリア外液を直接制御する目的で細胞を digitonin 処理して細胞膜を透過性にしたものを用いた。

(5) ラット初代培養肝細胞における in vitro 肝毒性検出系の開発

ラット肝細胞をコラゲナーゼ灌流法で単離、培養した。各被験物質で暴露後、培養上清中の LDH 量測定 (LDH-Cytotoxic Test, Wako) によって細胞生存率を算出した。脂肪酸のプローブには BODIPY558/568 (Invitrogen) を用い、脂肪蓄積の評価は、蛍光顕微鏡による細胞質内蛍光小体の観察 (一部は共焦点レーザー走査顕微鏡で撮影) と、fluorometry (SpectraMax M2, Molecular Devices) による蛍光強度の測定でおこなった。また、リン脂質と脂肪の蓄積を比較するために、リン脂質のプローブとして BODIPY FL DHPE (Invitrogen, 励起波長:505, 蛍光波長:511) を用い、BODIPY558/568 との二重標識を行なった。

FDSS/IMACS (浜松ホトニクス) を用いたハイコンテントスクリーニングシステム構築のためにブ

プログラムの最適化をおこなった。細胞自体の蛍光により細胞領域 (Area) を特定し、その Area 中の蛍光強度 (Intensity) を測定した (測定波長 560 nm)。丸く収縮し強い蛍光を発する細胞は死細胞であると考えられたので、Area から除外するようにプログラムを設定した。蛍光強度と同時に、測定 Area 中の蛍光小体 (Particle) をカウントした。データ取り込みは 1 well につき中央付近 12 区画についておこない、Intensity/Area ならびに Particle/Area を算出した。

(6) バイオフォトニクスプローブを用いたタンパク質生産用細胞基材のモニタリング法の開発

無血清浮遊培養に馴化した CHO-K1 SV 細胞を宿主として作成した、組換えタンパク質産生 CHO 細胞 (以下、組換え CHO 細胞) を EX-CELL 改変培地 (EX-CELL302 GS (MODIFIED 60756) w/o L-Glutamine に、D-グルコース、L-グルタミン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、炭酸ナトリウムを添加した培地) でフラスコ培養を行ない、生細胞密度、生存率、グルコース濃度、乳酸濃度、組換えタンパク質酵素活性を測定するとともに、FACS 分析を行った。同様に組換え CHO 細胞を灌流培養し上記の測定を行なった。灌流培養は EX-CELL 改変培地と自社合成培地を一定割合で混合した培地をフィード培地として上清引き抜き速度 2 L/day で、17 日間 (406 時間) の培養を行った。途中生細胞密度が $4 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cells/mL となるように培養液を引き抜いた。また培養 219 時間目に培養温度を 37°C から 33°C にシフトした。なお、グルコース濃度及び乳酸濃度はバイオテックアナライザー (サクラエスアイ, AS-210) で測定した。ミトコンドリア膜電位の測定は、ミトコンドリア膜電位が高い場合に蛍光が緑色 (527 nm) から赤色 (590 nm) にシフトする陽イオン性蛍光色素 JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzamidazolocarboxyanin iodide) を使用し、フローサイトメーター (ベックマンコールター, Cytomics FC500) により解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験については、各研究機関の動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施するものであり、倫理審査の承認を得ている。

C. 研究結果

(1) Death receptor 関連細胞内情報伝達系解析用プローブによるアポトーシスの測定

近年、小胞体における異常タンパク質の蓄積が細胞障害を引き起こすことが明らかになっており、疾患との関連が注目されている。本年度はダブル FRET (ECFP-DsRed2 エフェクターカスパーゼプローブ (CRec), EYFP-DsRed2 イニシエーターカスパーゼプローブ (YRic) の同時適用) 法を用いて小胞体ストレスと TNF- α によるアポトーシス誘導時のカスパーゼ活性化の比較検討を行った。TNF- α 処理では萎縮を起こした 20 個の細胞全てで YRic, CRec の ratio の低下が観察され (図 1), タブシガルギン処理により萎縮を起こした細胞では 17 個中 12 個で CRec のみ ratio が低下し (図 2), 残りの 5 個でどちらの ratio の低下も観察されなかった。これより、TNF- α により誘導されるアポトーシスでは IC (カスパーゼ 8/9) の活性化により EC (カスパーゼ 3) の活性化が引き起こされる経路が重要な役割を持つが、小胞体ストレス誘発物質であるタブシガルギンにより誘導されるアポトーシスでは IC (カスパーゼ 9) 活性化を経ない経路が重要な役割を持つと考えられる。

また、新規プローブとして小胞体ストレスによる細胞死に関与するカスパーゼ 12 活性化検出プローブ、TNF- α 等の細胞死誘発物質によって引き起こされる TNFR1 の重合反応を解析するプローブ、TNF- α や小胞体ストレスによる細胞死に関与していると考えられている TRAF2 の局在を解析するプローブの作製、検討を行なった。これらのプローブについては現在作製中もしくは解析中であるが、TNFR1 重合解析用プローブに関しては、TNFR1 Δ C(1-354 a. a.) の C 末端に EYFP もしくは ECFP を融合させたタンパク質発現ベクターを作製し、同時に HeLa 細胞に導入したところ、細胞を TNF- α 処理することで FRET 効率の変化が認められた。

(2) ケージド化合物を用いた、タンパク質および遺伝子の機能を光制御する方法の開発

ペプチド核酸 (PNA) は、修飾したポリアミド骨格を持つ合成オリゴヌクレオチドであり、プラスミド DNA への結合に伴って D-ループ構造が誘起され、転写誘導能を示すことが報告されている。3 本鎖形成能を持つ 16-mer PNA (H_2N -TTCTCTCCTTCTCTT-COOH) の N 末から 8 番目のシトシンに Bmcoc 基を導入し、Caged 16-mer PNA を作製した。D-loop 形成による転写誘導を蛍光タンパク質の発現で観察するために、プラスミドベクター (*pZsGreen*) に 16-mer PNA の結合領域を含む 50 bp の DNA 断片を挿入したベクターを構築した。これ

を HeLa 細胞にトランスフェクトし、16-mer PNA あるいは Caged 16-mer PNA 存在下、紫外光照射の有無による転写誘導を観察した。その結果、16-mer PNA または光照射後の Caged 16-mer PNA を加えた細胞だけに、蛍光タンパク質の発現が観測された (図 3)。以上より、Bmcroc 基で保護したケージド PNA を用いて、光照射によって遺伝子の転写を誘導できることが明らかになった。また、PNA が ssRNA と相補鎖形成する性質を利用して、mRNA の翻訳阻害によるアンチセンス効果の光制御を試みており、1 個の Bmcroc 基の導入で相補鎖形成をある程度阻害できることを示した。さらに、タンパク質の機能を細胞内で瞬時に活性化または不活性化する技術を確認するために、これまでに合成した脂質性メッセジャー分子およびペプチド性阻害剤分子を用いて、狙った細胞内のキナーゼ活性を光制御可能か検討した。その結果、ケージドジアシルグリセロール (Bhcroc-diC8) をバルクに加えた培養細胞のうち、405 nm レーザー光を照射した近傍の細胞だけに、ePKC の細胞膜へのトランスロケーションが観測された。また、ケージドアラキドン酸 (Bhc-AA) を用いた場合は、光照射でゴルジ体へのトランスロケーションを観察することができた。

(3) 二光子励起観察による細胞組織障害の解析

平成 17 年度マウス脳底動脈の収縮弛緩応答と同時に細胞内カルシウム動態を可視化する方法を確立した。18 年度は内皮依存的な弛緩反応における弛緩応答、カルシウム応答および一酸化窒素 (NO) プローブを用いた NO 産生の評価系を確立することを目的として以下に示す検討を行った。

30 mM KCl 適用約 3 分後の安定した状態で $10 \mu\text{M}$ アセチルコリン (ACh) を適用し、血管径と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を観察した (図 4)。ACh 適用直後に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は急激に下降し 10 秒以内に最大反応を示した後、徐々に上昇し 40 秒後には ACh 適用前の値に復帰した。これに対して弛緩応答は穏やかに生じ、ACh 適用後約 30 秒で一定レベルとなった後、2 分間はそのレベルを維持した。同様の実験系を用いて 10 nM バソプレッシンの作用を観察したところ、 $10 \mu\text{M}$ ACh の場合とほぼ同様の弛緩反応とカルシウム応答が観測された。また、ACh による NO 産生の解析も行った。弛緩応答が生じることによるムービングアーチファクトを最小限にするために、静止時の血管標本に ACh を適用することにより弛緩反応を起こさずに NO 産生を評価することとした。血管標本に $10 \mu\text{M}$ ACh を適用すると、なだらかな DAF-FM 蛍光の上昇が認められ、適用後 25 分間で静止レベ

ルに対して約 10%の蛍光上昇を示した。NO 合成酵素阻害薬である *N* ω -Nitro-L-arginine (L-NA) $100 \mu\text{M}$ を前処置して同様の検討を行ったところ、DAF-FM 蛍光の上昇は観察されなかった。同様の実験系を用いて 10 nM バソプレッシンの作用を観察したところ、 $10 \mu\text{M}$ ACh の場合とほぼ同様の NO 産生と L-NA による抑制が観測された。

(4-1) K⁺チャンネル関連細胞機能障害解析細胞系等の開発-1

細胞内 Ca^{2+} 濃度変化と細胞機能の関連を仲介する K⁺チャンネルの役割と病態でのその役割の変化を光学的に解析するモデル細胞系と解析手法の確立を行なうことを目的として検討を行った。作製した SK2/RyR3-HEK 細胞において SK チャンネル開口薬である $30 \mu\text{M}$ DCEBIO によって静止時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が有意に増加した。観察された Ca^{2+} オシレーションにおいて、SK2/RyR3-HEK 細胞の静止時 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、RyR3-HEK 細胞よりも有意に増加していた。一方、頻度やピーク $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化量には変化は見られなかった。また、SK2/RyR3-HEK 細胞において、 Ca^{2+} オシレーションと同期した振動性過分極が観察されたが、RyR3-HEK 細胞ではこのような電位変化は観察されなかった。この結果は、RyR3 と Ca^{2+} 感受性を有する SK2 チャンネルが細胞内 Ca^{2+} を介して機能共役し、その Ca^{2+} シグナルを電気信号に変換したことを示唆している。

さらに、隣接した SK2/RyR3-HEK 細胞では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変動が同期していることを見出した。この同期現象は、SK2 チャンネル阻害薬 100 nM アパミンによって消失した。SK2 チャンネルの活性化による電気信号の変化が隣接する細胞に伝播した結果、その Ca^{2+} オシレーションを同期させたと推測される。この同期は、細胞間の電気的連絡を担うと想定されているギャップジャンクションの阻害薬 $30 \mu\text{M}$ 18 β -グリチルリチン酸や 1 mM ヘプタノールでも消失したことから、電気信号はギャップジャンクションを介して伝播すると考えられる。なお、HEK 細胞には、ギャップジャンクションタンパクとしてコネキシン 43 が主に発現していることが確認された。

(4-2) K⁺チャンネル関連細胞機能障害解析細胞系等の開発-2

ミトコンドリアにカメレオンを発現させた H9c2 細胞を用いて、ミトコンドリアに対する薬物作用について解析を行った。蛍光プローブカメレオンは期待通りミトコンドリアに局在していることが TMRE との共染色により確認された (図 5)。透過性細胞を作成し、細胞外液、すなわちミトコンドリア外液

の Ca^{2+} 濃度を段階的に上昇させるとミトコンドリア内の Ca^{2+} 濃度も上昇していることがカメレオンの蛍光強度比 (CFP/YFP) の変化から明らかになった。ミトコンドリアの膜電位を消失させる FCCP によりミトコンドリア内の Ca^{2+} 濃度は減少した。また、 Ca^{2+} 濃度上昇はミトコンドリア内膜の Ca^{2+} uniporter の阻害薬である ruthenium red により抑制された。またミトコンドリア内膜の $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ 交換機構阻害作用を有するとされる CGP37157 により Ca^{2+} 濃度上昇は増強された (図5)。

(5) ハイコンテントスクリーニングシステムを用いた毒性プロファイリング・スクリーニング系の開発

薬剤性肝障害は医薬品に起因する毒性で最も重篤なもののひとつであるが、その中に脂肪蓄積症: **microvesicular steatosis** が含まれている。薬物の脂肪蓄積誘発性を *in vitro* において検出する目的で、蛍光標識脂肪酸である BODIPY558/568 (蛍光プローブ) 存在下で各種対照化合物をラット初代培養肝細胞に暴露し、脂肪滴 (蛍光小体) の検出を試みた。In vivo で脂肪蓄積を誘発することが報告されている Cyclosporine A (CsA), Clofibrate (CFR), Tetracycline (TC), Valproic acid (VPA), Carbon tetrachloride (CCl4) および Tamoxifen (TMX) とリン脂質症誘発性を有する Amiodarone (AMD) を 24 時間暴露し蛍光顕微鏡で観察した結果、AMD 以外のすべての化合物によって蛍光小体が増加し、プレートリーダーで蛍光強度を測定したところ、CsA, CFR, TC および VPA を暴露した細胞においては溶媒対照の 2.2~3.2 倍に増加していた。次に脂肪蓄積をより精度を上げて数値化するために、FDSS/IMACS を用いたハイコンテントスクリーニング法を検討した (図6)。細胞領域面積当たりの蛍光小体数を指標にして各化合物の作用を比較した結果、CsA, CFR, TC および VPA を暴露した細胞では溶媒対照の 2.6~5.6 倍の上昇が認められ、顕微鏡観察像と相関性がみられた。なお、BODIPY558/568 の特異性を確認するために蛍光標識リン脂質の BODIPY FL DHPE を同時に添加したところ、それぞれの蛍光プローブに由来する小体は異なる分布パターンを示した。遺伝子の発現変動を検討した結果、PPAR agonist 作用を有する CFR および VPA と AMD では脂肪酸の β 酸化に関わる遺伝子の発現が上昇していたのに対し、他の 4 化合物では減少していた。また、AMD 以外のいずれの化合物暴露においても脂肪酸合成酵素の発現が抑制されていた。

(6) バイオフィトニクスプローブを用いたタンパク質生産用細胞基材のモニタリング法の開発

培養細胞が継代を重ねるに連れてそのタンパク質生産性が落ちるという現象がミトコンドリア膜電位の指標から説明できるかどうかを検討した。継代数の少ない組換え CHO 細胞 (以下 young 細胞) として種起こしから 2 継代 (Population doubling level=PDL として 4.8 PDL), 継代数の多い組換え CHO 細胞 (以下 old 細胞) として同 14 継代 (同 41.9 PDL) 経過した細胞を、37°C で 4 日間振とう培養を行ったところ、young 細胞がグルコース消費速度 (GCR), 乳酸生成速度 (LPR), 組換えタンパク質生産速度 (SPR) および FACS 分析による FL2/FL1 ratio すべてにおいて old 細胞より高い値となった。これより、継代を重ねた細胞は、組換えタンパク質の生産性が落ちるとともに、ミトコンドリア膜電位も低下することが明らかとなり、ミトコンドリア膜電位を評価することで、細胞のタンパク質生産能力を比較・推定できることが示唆された。

一方灌流培養では、培養温度が 37°C の期間 (培養 219 時間目まで) 中は、フラスコ培養と同様に GCR, LPR, SPR は、経時的に緩やかに低下していた。このことは灌流培養中 PDL が増えることと連動していることを示すものである。しかし、培養温度を 33°C に下げたからは FACS 分析による FL2/FL1 ratio が徐々に低下しつつある状態にも関わらず、組換えタンパク質生産速度が顕著に上昇した。

D. 考察

(1) Death receptor 関連細胞内情報伝達系解析用プローブによるアポトーシスの測定

小胞体ストレスによる細胞死には複数の経路が関与していることが示唆されているが、詳細は不明な点が多い。タブシガルギン処理時のイニシエーター・エフェクターカスパーゼ活性化の同時解析を行った本研究の結果より、小胞体ストレスによるアポトーシス誘導ではカスパーゼ 9 を介さない経路が重要な役割を持つことが明らかになった。本解析方法は単一の細胞においてどのような反応経路を経て細胞死に至るかを解析する上で非常に有効な手法である。細胞組織障害解析法としてさらに他の反応を解析するプローブを開発することでより広範な細胞障害解析が可能になると共に細胞死誘導の各反応の関連性を解析することが出来ると考えられるため、新規プローブを作製中もしくは解析中である。TNFR1 重合解析用プローブに関しては、導入した細胞で FRET 効率の変化が認めら

れており、重合反応を解析する上で有効な解析ツールとなる可能性がある。これらのプローブにより多くの要因から引き起こされる細胞組織障害のモニターを可能とすると共に、不明な部分が多い小胞体ストレスからの細胞死へのメカニズムの解析を可能にし、医薬品開発へ応用する。

(2) ケージド化合物を用いた、タンパク質および遺伝子の機能を光制御する方法の開発

Bmcroc 基で保護したケージド PNA を用いて、光照射によって遺伝子の転写を誘導できることが明らかになった。今後ケージド PNA を細胞内に導入する工夫をし、細胞内に導入後に光誘導することにより組織障害時に誘導される炎症性サイトカインやケモカイン等を組織特異的に、しかも狙った時期に発現する技術に発展させることを目指す。また、mRNA の翻訳阻害によるアンチセンス効果の光制御に関しては、今後光照射による相補鎖形成能の回復を確認するとともに、大腸菌内での *lacZ* 遺伝子の発現を指標にして、PNA のアンチセンス効果を光制御可能か確かめる。タンパク質の機能制御に関しては、今後用いる細胞の状態による細胞応答にばらつきを抑え、加えるケージド化合物の濃度を最適化し、照射する光の強度と時間の検討等を行ない、組織障害に伴う細胞応答に関与するシグナル伝達、および、細胞死等に関わる因子の局所動態をケージド化合物で光制御する方法の確立を目指す。

(3) ニ光子励起観察による細胞組織障害の解析
マウス脳底動脈は非常に細く脆弱であるため従来の張力測定による収縮弛緩反応の評価は困難であり、内皮依存的弛緩反応の測定例は見当たらない。昨年度に引続きマウス脳底動脈を用いて、特に内皮依存的弛緩反応を評価すること目的として検討を行った結果、 $10\ \mu\text{M}$ ACh の適用により組織全体としての $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の一過性の下降とそれに引続く弛緩反応が可視化することができた。また、NO はほぼ一定の速度で産生されることが示唆された。現時点では平滑筋細胞での変化のみを捉えられていると考えられたため、今後は内皮細胞での変化も検出できるように改良を試みたい。

弛緩反応、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 及び NO 産生の関係は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の下降が一過性であったという点で持続的な弛緩反応を維持するには $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 以外の要因が大きく寄与する可能性を示唆するものである。今後、細胞レベルの解析を含めてその他の要因についても明らかにする必要がある。NO 産生の測定については、単一プローブを用いた評価系が確立できたため、

NO 産生と弛緩反応あるいは $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 応答との同時測定の検討を行なう。

(4-1) K⁺チャンネル関連細胞機能障害解析細胞系等の開発-1

RyR3 によって惹起される Ca^{2+} オシレーションが SK2 チャンネル共発現下では、細胞膜電位の過分極という律動性の電位変化に変換されることが示された。また、この電気シグナルがギャップジャンクションを介し隣接細胞に伝播し、細胞内 Ca^{2+} 動態の同期化を促すと示唆された。つまり、 Ca^{2+} 感受性イオンチャンネルの発現導入によって、細胞間に電氣的共役が発生し、細胞内 Ca^{2+} 動態を同期させる機構が構築されたと考えられる。これらの性質は、末梢組織におけるペースメーカー細胞である ICCs と非常に類似しており、その再構築系モデル作成の一步として考えることができる。本研究成果は、生命現象の根幹であるペースメーカー機構の生理機能解明や、ペースメーカーの異常に伴う各種疾患に向けた創薬スクリーニング系を確立する上で非常に意義があると考えられ、今後の薬物治療戦略に大いに貢献することが期待できる。

(4-2) K⁺チャンネル関連細胞機能障害解析細胞系等の開発-2

細胞膜を透過性にした心筋細胞株 (H9c2) を用いてミトコンドリア上のチャンネルやトランスポーターの活性を画像化によって検出する系を構築し、正常時および虚血時のミトコンドリア Ca^{2+} 動態について薬理的に検討した。虚血時に上昇した細胞質内 Ca^{2+} はミトコンドリア内に蓄積し、ミトコンドリアの膜電位の低下を起し、ミトコンドリアの傷害を引き起こすことが判明した。またミトコンドリア $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構 (NCX) は正常時および虚血時共にミトコンドリアから Ca^{2+} を排出する方向に働くことが示唆された。これらのことから心筋虚血-再灌流傷害時にはミトコンドリア上の NCX に作用せずに、細胞膜上の NCX を選択的に抑制する薬物が心保護薬として有用であると推測される。今回構築した細胞膜透過性 H9c2 細胞はカリウムチャンネルを含むミトコンドリア内膜上の各種トランスポーターの機能解析に有用である。

(5) ハイコンテックススクリーニングシステムを用いた毒性プロファイリング・スクリーニング系の開発

ラット初代培養肝細胞と特異性の高い蛍光プローブを用いることにより、化合物の肝臓における脂肪蓄積誘発性を評価できる可能性が見出された。特に精度の点では、ハイコンテックススクリーニン

グ法が有用であると考えられた。また、脂肪蓄積に関連する多数遺伝子の発現解析を併用することにより、脂肪蓄積のメカニズムを化合物ごとに特徴付けられる可能性が見出された。

(6) バイオフォトリクスプローブを用いたタンパク質生産用細胞基材のモニタリング法の開発

組換えCHO-K1 SV細胞のミトコンドリア膜電位をFACSで2色レシオメトリック分析した。37°Cで培養した細胞を分析して得られたFL-2/FL-1比の値は、細胞の継代を重ねるにつれて低下し、同時に細胞の組換えタンパク質生産速度も低下していることを確認した。しかし、培養温度を37°Cから33°Cに下げた後ではFL-2/FL-1比の値は、37°Cの時と同様に細胞の継代を重ねるにつれて低下していたが、細胞の組換えタンパク質生産速度は逆に増加した。今回ミトコンドリア膜電位と組換えタンパク質生産速度には密接な関係があることが強く示唆されたが、温度が変化した時のミトコンドリア膜電位の挙動などまだ解明されていない点もあり、ミトコンドリア膜電位をプロセスの安定化かつ効率化に生かせるかどうか今後の課題である。

E. 結論

(1) ダブルFRET細胞組織障害解析法を用いて小胞体ストレスによる細胞障害の解析を行い、他の手法では確認が困難な単一細胞における2種の反応の活性化状況の解析に成功した。また、細胞組織障害の詳細な解析を可能にするために、カスパーゼ12活性検出用プローブ、TNFR1重合解析プローブ、TRAF2局在解析プローブの作製を行った。

(2) ケージドPNAやケージドジアシルグリセロール等により遺伝子の機能発現の光制御、もしくはタンパク質の機能制御に成功した。

(3) 張力測定等、従来の方でその反応性を評価することが困難であった微小血管の内皮依存的な弛緩反応をカルシウム動態とともに評価することに成功した。また、NO産生も評価可能であった。本法は種々の微小血管組織の反応性を構造的・機能的側面から解析するのに有用であるとともに、血管障害性物質の評価および障害機序の検討にも応用可能である。

(4-1) 生命現象の根幹であるペースメーカー機構の生理機能解明や、ペースメーカーの異常に伴う各種疾患に向けた創薬スクリーニング系を確立する上で有用な再構築系モデルを作製した。

(4-2) 心筋由来H9c2細胞系と蛍光プローブに

より心筋ミトコンドリア機能を検出する実験系を確立し、K⁺チャンネル作用薬を含めた各種心筋保護薬物の作用の検討に有用であることを示した。

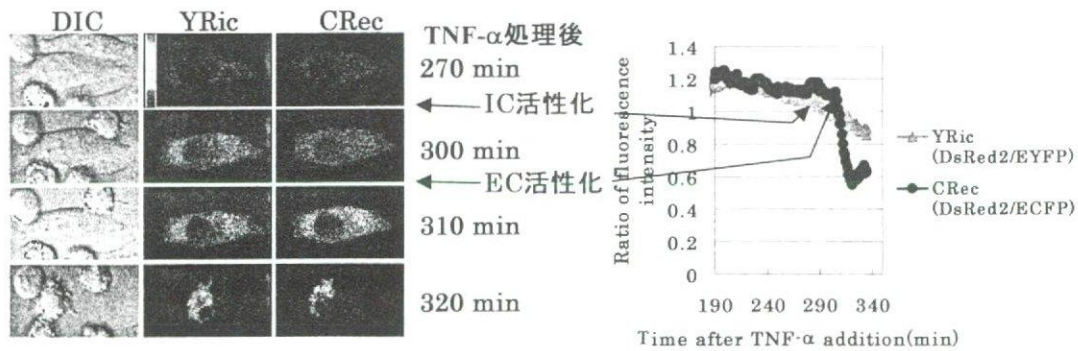
(5) ラット初代培養肝細胞を用いて脂肪酸蛍光プローブの集積と遺伝子発現変動を指標として、各種化合物の脂肪蓄積誘発性をプロファイリング/スクリーニングする系を開発した。

(6) ミトコンドリア膜電位を評価することで、組換えタンパク質生産細胞のタンパク質生産能力を比較・推定できる可能性を示した。

F. 研究発表

- (1) T. Suzuki, T. Nishimaki-Mogami, H. Kawai, T. Kobayashi, Y. Shinozaki, Y. Sato, T. Hashimoto, Y. Asakawa, K. Inoue, Y. Ohno, T. Hayakawa, and T. Kawanishi, Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using GFP derivatives (2006) *Phytomedicine*, **13**, 401-411
- (2) H. Kawai, T. Suzuki, T. Kobayashi, A. Ishii-Watabe, H. Sakurai, H. Ohata, K. Honda, K. Momose, T. Hayakawa, T. Kawanishi, Caspase cascade proceeds rapidly after cytochrome c release from mitochondria in TNF- α -induced cell death (2007) *J. Pharmacol. Sci.*, **103**, 159-167
- (3) A. Specht, J. S. Thomann, K. Alarcon, W. Wittayanan, D. Ogden, T. Furuta, Y. Kurakawa, M. Goeldner, New Photoremovable Protecting Groups for Carboxylic Acids with High Photolytic Efficiencies at Near-UV Irradiation. Application to the Photocontrolled Release of L-Glutamate. *ChemBioChem*, **7**, 1690-1695 (2006).
- (4) 西垣卓也, 古田寿昭, ケージド化合物による細胞応答の観察, 「実験医学別冊 染色・バイオイメージング実験ハンドブック」高田邦昭, 斎藤尚亮, 川上速人編集, 羊土社, pp. 228-236 (2006年7月1日)
- (5) 古田寿昭, 細胞のリモートコントロール, *ファルマシア*, **42**, 446-450 (2006)
- (6) 古田寿昭, 光で細胞機能をあやつるケージド化合物, *バイオインダストリー*, **23**, 58-64 (2006)
- (7) Hashimoto, T., H. Ohata and K. Honda. (2006) Lysophosphatidic acid induces plasma exudation and histamine release in mice via LPA. *J. Pharmacol. Sci.* **100**, 82-87.
- (8) 橋本光正, 大幡久之 (2006) リゾホスファチジン酸のアレルギー疾患への関与, 喘息, **19**, 53-58

- (9) Namekata I., Kawanishi T., Iida-Tanaka N., Tanaka H., Shigenobu K.: Quantitative fluorescence measurement of cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger inhibition by kinetic analysis in stably transfected HEK293 cells. *J. Pharmacol. Sci.* **101**: 356-360 (2006)
- (10) Namekata I., Shimada H., Kawanishi T., Tanaka H., Shigenobu K.: Reduction by SEA0400 of myocardial ischemia-induced cytoplasmic and mitochondrial Ca^{2+} overload. *Eur. J. Pharmacol.* **533**:108-115 (2006)
- (11) Kamata K., Satoh T., Matsumoto T., Noguchi E., Taguchi K., Kobayashi T., Tanaka H., Shigenobu K.: Enhancement of methoxamine-induced contractile responses of rat ventricle in streptozotocin-induced diabetes is associated with $\alpha 1$ Adrenoceptor upregulation. *Acta. Physiol. Scand.* **188**:173-183 (2006)
- (12) Matsuda T., Ito M., Ishimaru S., Tsuruoka N., Saito T., Iida-Tanaka N., Hashimoto N., Yamashita T., Tsuruzoe N., Tanaka H., Shigenobu K.: Blockade by NIP-142 of carbachol-induced action potential shortening and GIRK 1/4 channel. *J. Pharmacol. Sci.* **101**:303-310 (2006)
- (13) Kato K., Nouchi H., Ishikura K., Takaishi S., Motodate S., Tanaka H., Okudaira K., Mochida T., Nishigaki R., Shigenobu K., Akita H.: A facile access to spiro furanone skeleton based on Pd(II)-mediated cyclization-carbonylation of propargylic esters. *Tetrahedron* **62**: 2545-2554 (2006)
- (14) Tanaka Y., Tang G., Takizawa K., Eghbali M., Nishimaru K., Shigenobu K., Koike K., Stefani E., Toro L.: Kv channels contribute to nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-induced relaxation of a rat conduit artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **317**:341-354 (2006)
- (15) Somei M., Noguchi K., Yoshino K., Mori K., Asada M., Yamada F., Tanaka Y., Shigenobu K., Koike K.: 1-Hydroxy-yohimbine and its derivatives: new potent $\alpha 2$ -blockers for the treatment of erectile dysfunction. *Heterocycles* **69**: 259-269 (2006)
- (16) Takahara A., Nakamura H., Nouchi H., Tamura T., Tanaka T., Shimada H., Tamura M., Tsuruoka N., Takeda K., Tanaka H., Shigenobu K., Hashimoto K., Sugiyama A.: Analysis of arrhythmogenic profile in a canine model of chronic atrioventricular block by comparing In vitro effects of the class III antiarrhythmic drug nifekalant on the ventricular action potential indices between normal heart and atrioventricular block heart. *J. Pharmacol. Sci.* **103**: 181-188 (2007)
- (17) Nouchi H., Kaeriyama S., Muramatsu A., Sato M., Hirose K., Shimizu N., Tanaka H., Shigenobu K.: Muscarinic receptor subtypes mediating positive and negative inotropy in the developing chick ventricle. *J. Pharmacol. Sci.* **103**:75-82 (2007)
- (18) Tanaka H., Shimada H., Namekata I., Kawanishi T., Iida-Tanaka N., Shigenobu K.: Involvement of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in ouabain-induced inotropy and arrhythmogenesis in guinea-pig myocardium as revealed by SEA0400. *J. Pharmacol. Sci.* **103**:241-246 (2007)
- (19) Kiyoshi H., Yamazaki D., Ohya S., Kitsukawa M., Muraki K., Saito SY, Ohizumi Y, Imaizumi Y. Molecular and electrophysiological characteristics of K^+ conductance sensitive to acidic pH in aortic smooth muscle cells of WKY and SHR. *Am J Physiol*, **291**, H2723-H2734 (2006).
- (20) Yamazaki D, Aoyama M, Ohya S, Muraki K, Asai K, Imaizumi Y. Novel functions of small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel in enhanced cell proliferation by ATP in brain endothelial cells. *J Biol Chem*, **281**, 38430-38439 (2006).
- (21) Hotta S, Yamamura H, Ohya S, Imaizumi Y. Methyl- β -cyclodextrin prevents Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in smooth muscle cells of mouse urinary bladder. *J Pharmacol Sci*, **103**, 121-126 (2007).
- (22) Morimoto T, Sakamoto K, Sade H, Ohya S, Muraki K, Imaizumi Y. Voltage-sensitive oxonol dyes are novel large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel activators selective for $\beta 1$ and $\beta 4$ but not for $\beta 2$ subunits. *Mol Pharmacol*, **71**, 1075-1088 (2007).
- (23) Hotta S, Kozo M, Ohya S, Muraki K, Takeshima H, Imaizumi Y. Ryanodine receptor type 2 deficiency changes excitation-contraction coupling and membrane potential in urinary bladder smooth muscle. *J Physiol*, in press (DOI: 10.1113/jphysiol.2007.130302).
- (24) Fujimura et al. (2007) Cell-based fluorescence assay for evaluation of new drugs potential for phospholipidosis in an early stage of drug development. *Exp and Toxicol Pathol* (in press).



DIC: 微分干渉像

図1. 腫瘍壊死因子TNF- α 処理時の IC, EC活性化の検出

YRicとCRecを同時にHeLa細胞に発現させ、TNF- α (100 ng/mL)/Cycloheximide(10 μ g/mL) 処理を行なった。IC活性化の後にECの活性化が引き起こされた。グラフには細胞のDsRed2/EYFPとDsRed2/ECFPの蛍光比の時間変化を示した。

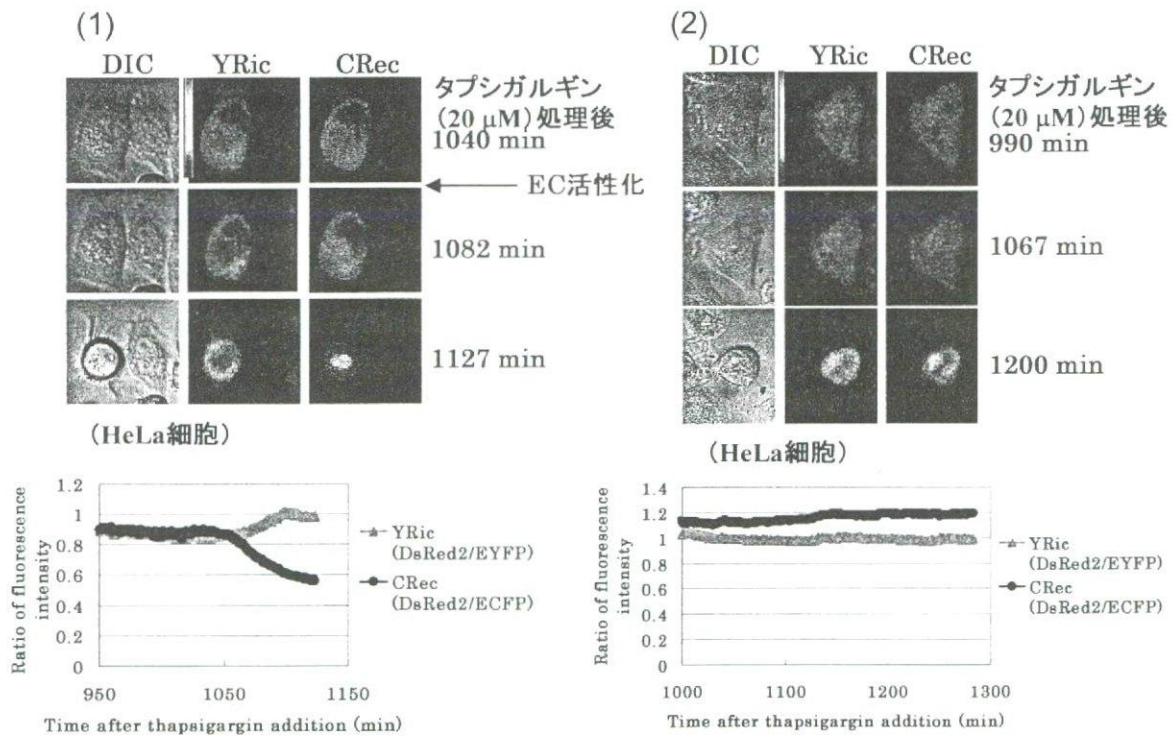


図2. 小胞体ストレス誘発物質であるタプシガルギン処理時のIC, ECの活性化の検出

YRicとCRecを同時にHeLa細胞に発現させ、タプシガルギン20 μ Mで処理を行なった。YRicの蛍光比変化を起こさずにCRecの蛍光比変化を起こす細胞(1)とYRic, CRec共に変化しない細胞(2)が観察された。

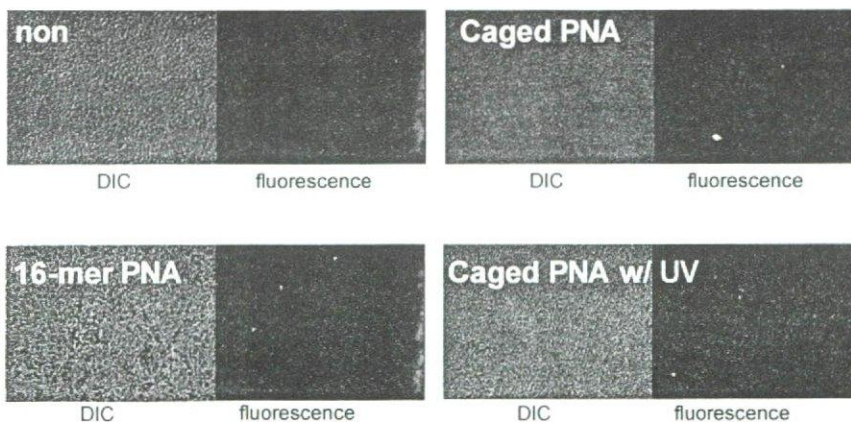


図3. ケージドPNAによる転写光制御
PNA結合領域を導入したpZsGreenベクターをHeLa細胞にトランスフェクトし、16-mer PNA、caged PNA、照射後のcaged PNAによる蛍光タンパク質の発現の観察を行なった(倍率100倍)。

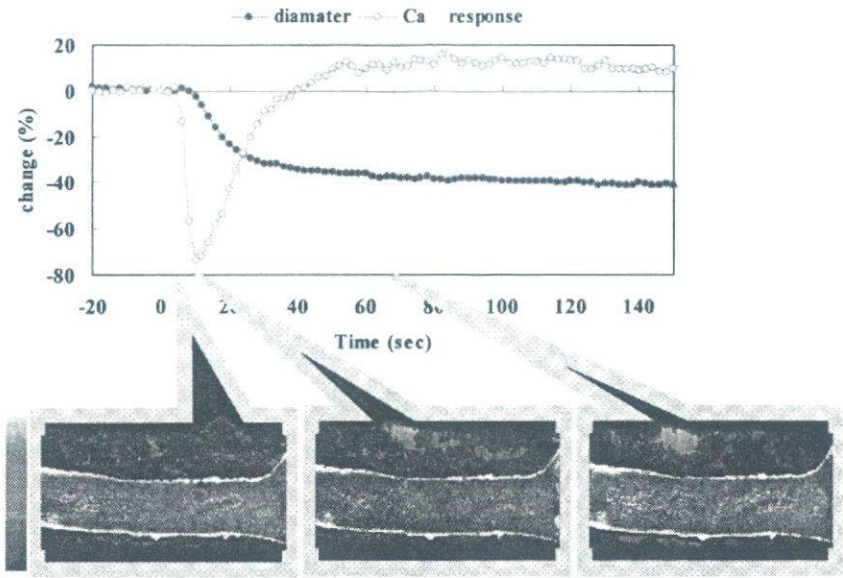


図4. KCl収縮10 μ M ACh による反応の典型

30 mM KCl適用により軽度収縮させた後、10 μ M ACh を適用した時のマウス脳底動脈の弛緩反応及びカルシウム応答の典型例を示した。縦軸は30 mM KCl適用によるそれぞれの応答の最大反応を100%として標準化した値で示す。一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 下降とそれに続く持続的な弛緩反応が観察された。下の画像はpseudo color画像(fluo-4 / fura-red)である。

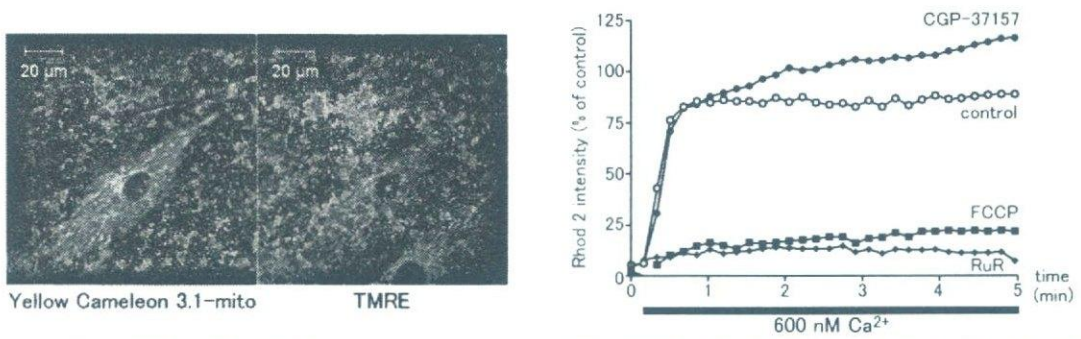


図5. (1)H9c2細胞の蛍光画像、(2)permeabilized H9c2細胞におけるミトコンドリアカルシウム測定

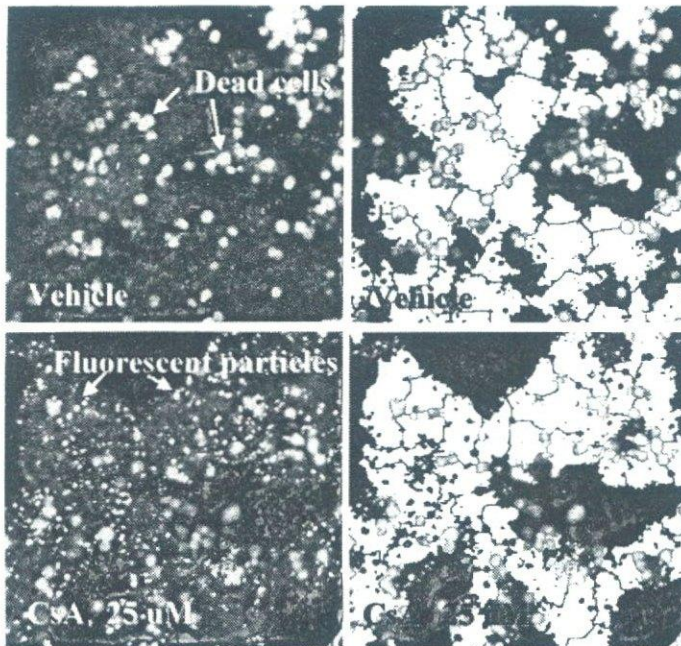


図6. FDSS/IMACSを用いたハイコンテンツスクリーニング法-細胞領域および蛍光小体の解析イメージ 左図の白色部分は細胞領域:Areaを示している。

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19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