

平成23年度 博士論文

神経医薬探索 HTA のためのポスト-シナプスモデル細胞の  
構築とその特性解析に関する研究

立石 彰人

主指導教官：春山 哲也 教授

国立大学法人 九州工業大学大学院

## 目次

第 1 章 序論.....	5
1-1. はじめに.....	6
1-2. 医薬開発の流れとハイスループット分析法 (HTA) .....	6
1-3. 細胞バイオセンシング .....	9
1-4. センサ材料としての細胞.....	11
1-5. 中枢神経医薬 HTA における解析モデルの現状 .....	11
1-6. ポスト-シナプスモデル細胞 .....	15
1-7. 本研究の目的と意義.....	20
参考文献.....	21
第 2 章 細胞応答安定化のための GFP 共発現ポスト-シナプスモデル細胞の 構築.....	25
2-1. 緒言 .....	26
2-2. 細胞のゆらぎと細胞応答.....	26
2-3. モデル細胞における細胞応答の確率的変動 .....	27
2-4. 実験方法.....	27
2-4-1. 細胞培養.....	27
2-4-2. 導入遺伝子 .....	28
2-4-3. GluR 遺伝子の Cos7 細胞への導入.....	30
2-4-4. 免疫染色法による GluR の細胞表面提示解析.....	30
2-4-5. ナトリウムイオン蛍光指示薬によるイオン流入測定 .....	31
2-5. GluR および GFP 発現確認.....	31
2-6. GluR 発現量と細胞表面提示量の関係の解析.....	33
2-7. イオン蛍光プローブによる GluR 機能解析.....	35

2-8. GluR 発現量と細胞応答の関係 .....	37
2-9. GFP 共発現モデル細胞の薬剤解析への適用性 .....	39
2-10. 結言 .....	41
参考文献.....	42
第 3 章 培養系の最適化による細胞毒性の低減と細胞応答の向上 .....	44
3-1. 緒言 .....	45
3-2. NBQX 添加培養 .....	45
3-3. 実験方法 .....	27
3-3-1. ポストシナプスモデル細胞構築と細胞培養 .....	48
3-3-2. 細胞増殖および細胞死の解析.....	48
3-3-3. GluR 機能解析 .....	48
3-4. NBQX 添加培養による細胞毒性の低減 .....	49
3-5. NBQX 添加培養の GFP 発現に対する影響 .....	53
3-6. NBQX 添加培養時の GluR 機能解析 .....	55
3-6-1. NBQX 添加培養時の細胞表面提示量の解析 .....	55
3-6-2. NBQX 添加培養時のイオン流入特性解析 .....	57
3-7. 結言 .....	62
参考文献.....	63
第 4 章 stargazin 共発現したポスト-シナプスモデル細胞の構築と細胞応答増 幅の検討.....	65
4-1. 緒言 .....	66
4-2. stargazin .....	68
4-3. 実験方法 .....	70
4-3-1. モデル細胞の構築 .....	70

4-3-2. 免疫染色法による細胞表層提示確認.....	72
4-3-3. イオン流入測定.....	72
4-4. stargazin 共発現細胞の GluR 機能解析.....	72
4-5. stargazin 共発現によるイオン流入の増幅.....	76
4-6. 結言.....	78
参考文献.....	79
第 5 章 主成分分析 (PCA) を用いた薬剤解析法の構築.....	81
5-1. 緒言.....	82
5-2. 主成分分析 (PCA).....	84
5-3. 階層的クラスター分析 (HCA).....	89
5-4. 実験方法.....	91
5-4-1. モデル細胞の構築および培養.....	91
5-4-2. イオン流入測定.....	91
5-4-3. データ解析.....	91
5-5. HCA による non-responding 細胞の同定.....	91
5-6. 各濃度グルタミン酸適用時の PCA による解析.....	94
5-7. PCA による薬剤活性解析.....	96
5-8. 結言.....	99
参考文献.....	100
第 6 章 結論.....	103
謝辞.....	107
研究業績.....	109

# 第 1 章

## 序論

## 1-1. はじめに

我々人類を含む哺乳類の体は様々な組織器官により構成され、それを構成する最小の生命機能単位は細胞である。近年、この細胞を機能性材料として利用することにより、細胞治療<sup>1</sup>や再生医療<sup>2,3</sup>、環境分析における毒性評価<sup>4,5</sup>等、様々な分野への応用が期待されている。

本研究室では細胞を高度な分子認識素子として利用した細胞バイオセンサの構築を推進している<sup>6-8</sup>。細胞は、細胞外からの刺激に対し特定の細胞応答を示す。この細胞応答を指標とすることにより、細胞外刺激が生体に与える影響・効果を分析することができる。そのため、この細胞を分子認識素子として利用することにより、医薬開発や環境分析への応用が期待されている<sup>9,10</sup>。細胞バイオセンサにおいて、その目的に応じて適切な解析モデル細胞を構築することが重要である。

本章では、医薬開発における細胞バイオセンサの有用性とその課題について論じ、本論文の位置づけを明らかにする。

## 1-2. 医薬開発の流れとハイスループット分析法 (HTA)

図 1-1 に医薬開発の大まかな流れを示す。医薬開発は主に創薬研究と開発研究とに大きく分けられる<sup>11</sup>。開発研究では、開発候補物質の前臨床試験や実際に人体での作用や安全性を評価する臨床試験を行う。その後、厚生省に申請を行い、承認されたものが新薬となる。この開発物質を生み出すのが創薬研究である。創薬研究は様々な医薬候補物質の中から活性のある物質（リード化合物）を得ることから始まる<sup>12</sup>。そこで得られたリード化合物を様々な構造に修飾した誘導体作成する。この誘導体をスクリーニングし、活性が高く毒性が少ない物質が開発候補物質として開発研究へと回される。

リード化合物の獲得方法は大きく二つに分けられる。一つ目は、新しく発見された、又はつくり出された化合物の有効性を幅広く調べる方法である。この方法は様々な試験を行うことで何らかの病気に対して効果のある物質を探索する方法であり、ランダムスクリーニング法と呼ばれている。この方法により生体への作用メカニズムは分からないが、病気や疾患に何らかの効果のある物質を獲得することができる。ここで得られた物質はヒット化合物と呼ばれ、その後更に詳細な生体への効果や安全性が確認された後にリード化合物として同定される。二つ目は、一定の目標を設定し、その作用をもつ化合物を探す方法である。この方法はターゲット・オリエンテッド・スクリーニング法と呼ばれる。近年、分子生物学の発展により、病気や疾患の原因となる生体内の部位や生体物質が次々と明らかになってきている。この様な生体内の部位や生体物質を標的（分子ターゲット）として、作用する物質を設計する方法である。これらのいずれの方法でもリード化合物を同定するには、生体への実際の作用を評価する必要があり、分子生物学的な評価が求められる。まず試験管レベルでの反応実験<sup>13,14</sup>や細胞・組織レベルでの評価<sup>15</sup>が行われ（1次スクリーニング）、その後活性がある化合物については動物個体レベルでの評価<sup>16</sup>（2次スクリーニング）が行われる。

以上の流れを踏まえると、医薬開発の初期の段階でいかに優れたリード化合物を獲得できるかが、製品の成功を最も左右する。しかしながら、医薬候補の中からリード化合物を発見できる確立は0.005%以下とも言われており、リード化合物の発見は非常に困難な作業であるといえる。そのため、膨大な医薬候補物質の中からリード化合物を高効率に見出すためのハイスループット分析法（HTA）の需要は高い。

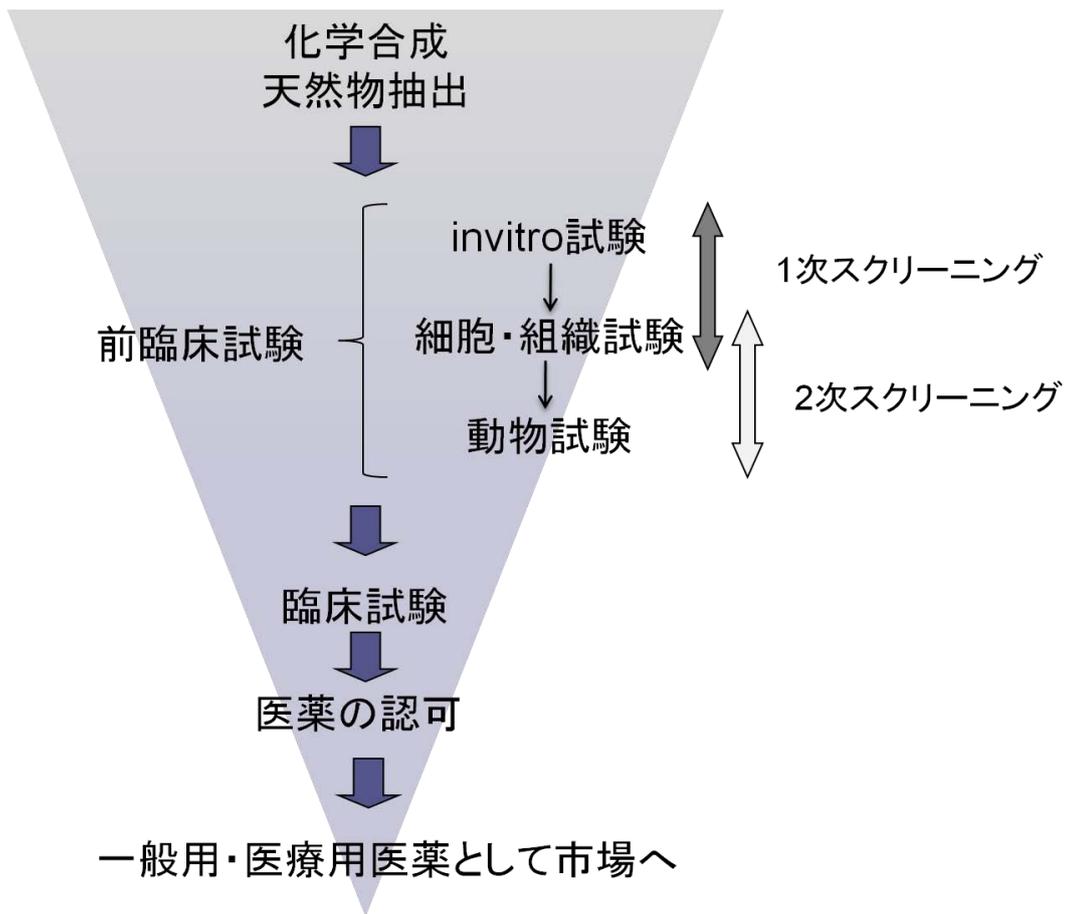


図 1 - 1 医薬開発の流れ

### 1-3. 細胞バイオセンシング

本研究室ではこのような背景を基に、薬剤 HTA への応用を目指したバイオセンサ開発の構築を推進している。バイオセンサは抗体や酵素・細胞等の生体材料が高度な分子特異性を利用し、in situ で薬剤や化学物質を分析・定量が可能であり、非常に優れた分析ツールである<sup>17,18</sup>。特に生命体の最小単位である細胞を分子認識素子として利用した細胞バイオセンサは、薬剤や化学物質などの細胞外刺激が生体に与える影響を解析することが可能である。この手法は連続的なモニタリングが可能であり、またハイスループットな分析法であるため、HTA 化が可能な技術として期待されている<sup>9</sup>。

このような細胞バイオセンサを用いて、外部刺激が生体に与える影響を解析するためには、適切な解析細胞モデルを選択または設計構築する必要がある。また、細胞から放出される様々な分子応答の中から適切に特定の信号を検出する必要があり、適切な検出系の構築も重要となる (図 1-2)。更に細胞は接着する基板や状態によって、その機能が変化する<sup>19</sup>。また細胞からの信号を高感度に検出するためには、細胞と検出系との距離や接着は非常に重要である。そのため、細胞-センサ間の制御も細胞バイオセンサ構築において重要な要素となる。このように細胞バイオセンサ構築においては (1) 解析モデル細胞の構築 (2) 検出系の構築 (3)細胞—検出系間の制御のそれぞれのアプローチが必要となる。本研究では特に解析モデル系における課題に着目し、神経医薬 HTA のための解析モデル細胞の設計構築を行った。

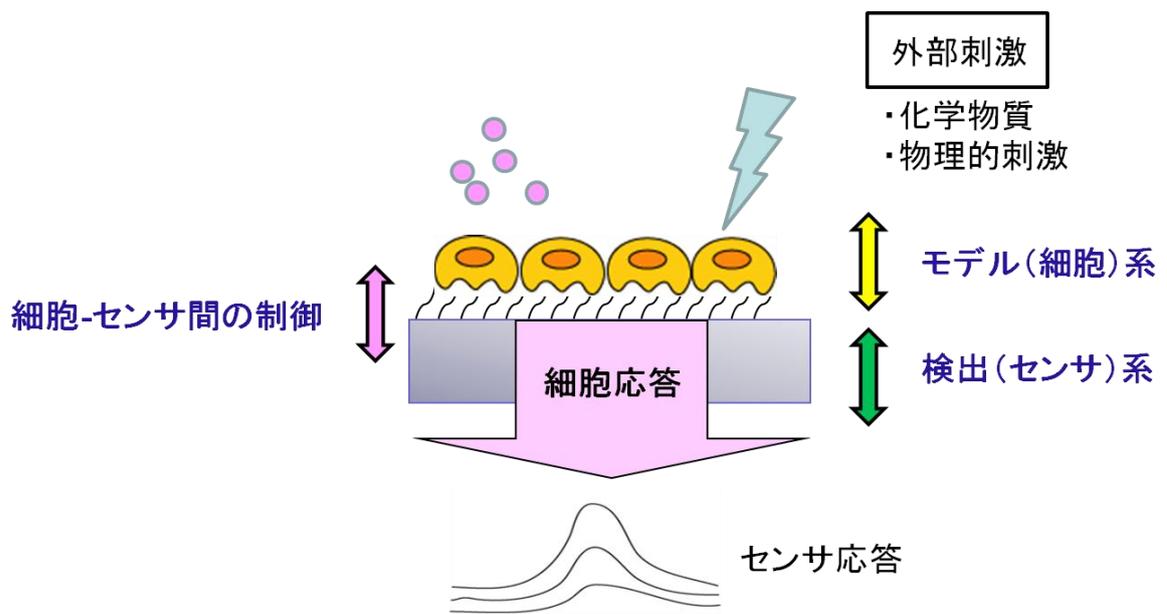


図 1-2 細胞バイオセンシング

#### 1-4. センサ素子材料としての細胞

医薬探索において薬剤解析を行うためには、操作が容易であり、再現性やシグナル／ノイズ (S/N) 比の高い測定が可能な細胞バイオセンサの構築が求められる。そのため、細胞をセンサ材料として利用するためには、大きく以下の 3 点が求められる。一点目に扱いが容易なことである。培養が煩雑であったり、機能や活性維持が難しかったりする細胞では HTA のための解析モデルとして適さない場合が多い。そのため、扱いが容易で安定な培養な細胞の構築することが重要となる。2 点目に細胞間の応答の差異を少なくすることである。細胞は第 2 章で説明するように同じ遺伝背景・環境であっても本質的に細胞内の生体分子の量にゆらぎを持っている。それに起因して細胞の応答は確率的変動を示す。そのため、再現性の高い測定を行うためには、細胞間の応答をいかに低減できるかは重要な課題となる。3 点目に細胞の応答を大きくすることである。細胞の応答は微弱であることが多く、その検出が難しい。そのため、S/N 比に優れた細胞バイオセンサを構築するためには、細胞の応答を増幅する事が重要となる。近年、様々な遺伝子工学・細胞工学的技術が発展してきており、これらの技術を駆使し、目的に併せ、上記の条件を満たした細胞を戦略的に設計構築していくことが、細胞バイオセンサを構築していくうえで重要となる。

#### 1-5. 中枢神経医薬 HTA における解析モデルの現状

本研究では近年需要や開発熱が高まっている中枢神経医薬に着目した。近年、うつ病<sup>20</sup>や認知症<sup>21</sup>、てんかん<sup>22</sup>といった中枢神経系疾患の病気が社会問題になっており、中枢神経医薬の開発意欲は非常に高い。2005 年における中枢神経医薬の市場は 415 億ドルで、中心神経医薬は創薬現場において重要なターゲットとなっている。中枢神経における興奮伝達を担うのが細胞膜上にあるレセプ

ターである<sup>23</sup>。図 1-3 に中枢神経における興奮伝達の仕組みを示す。興奮伝達を行うニューロンはシナプスを介して情報伝達を行う。情報を与える側をプレシナプス・情報を受け取る側をポストシナプスという。活動電位がプレシナプス末端に伝わると、神経伝達物質をシナプス間隙に放出する。この神経伝達物質を後シナプスにあるレセプターが結合することにより細胞内へのイオン流入を引き起こされる。それにより細胞膜が脱分極され、活動電位が発生することにより、次のニューロンへと情報が伝わっていく。シナプス膜状にあるレセプターは主にイオンチャネル型レセプターと G タンパク型レセプターに大別される。これらのレセプターが活性化または不活性化することにより、神経伝達は調節される。近年、脳神経科学の発達により、中枢神経系疾患の原因が、このシナプスにおける情報伝達の異常であることが明らかになりつつある。神経伝達においてポストシナプス膜状の様々なレセプターは重要や役割を果たしている。そのためこのポストシナプス膜状のレセプターを分子ターゲットとして、神経医薬開発は行われている。

中枢神経医薬は開発意欲が高いにも関わらず、中枢神経医薬評価の HTA 化は進んでいない。その大きな要因は、適切なアッセイモデルの構築が難しいという点にある。レセプターのほとんどは膜貫通型であり、細胞膜上で構造が保持されることによって機能を有する。また、いくつかのレセプターは複数のサブユニットが会合すること機能構造を形成している。そのため、レセプターを単離・精製してきたとしても、機能を維持できていない場合が多い。また、機能を維持できたとしても、評価できるのはレセプターとリガンドとの結合のみであり、薬剤の実際の作用を評価することができない。そのため、レセプターの評価には native 細胞である神経細胞を用いたアッセイが採用されてきた<sup>24</sup>。神経細胞を用いた評価を行うためには分化誘導を行う必要がある。神経細胞は分化

誘導後、樹状突起を介して他の細胞とシナプスを形成する。しかしながら分化した神経細胞は不安定であり、その機能維持が難しい。また、樹状突起数や伝達物質放出量等、複数の要因が細胞応答に影響を与えるため、再現性という点でも課題がある。このような問題により、神経細胞を用いた HTA 化は難しい。

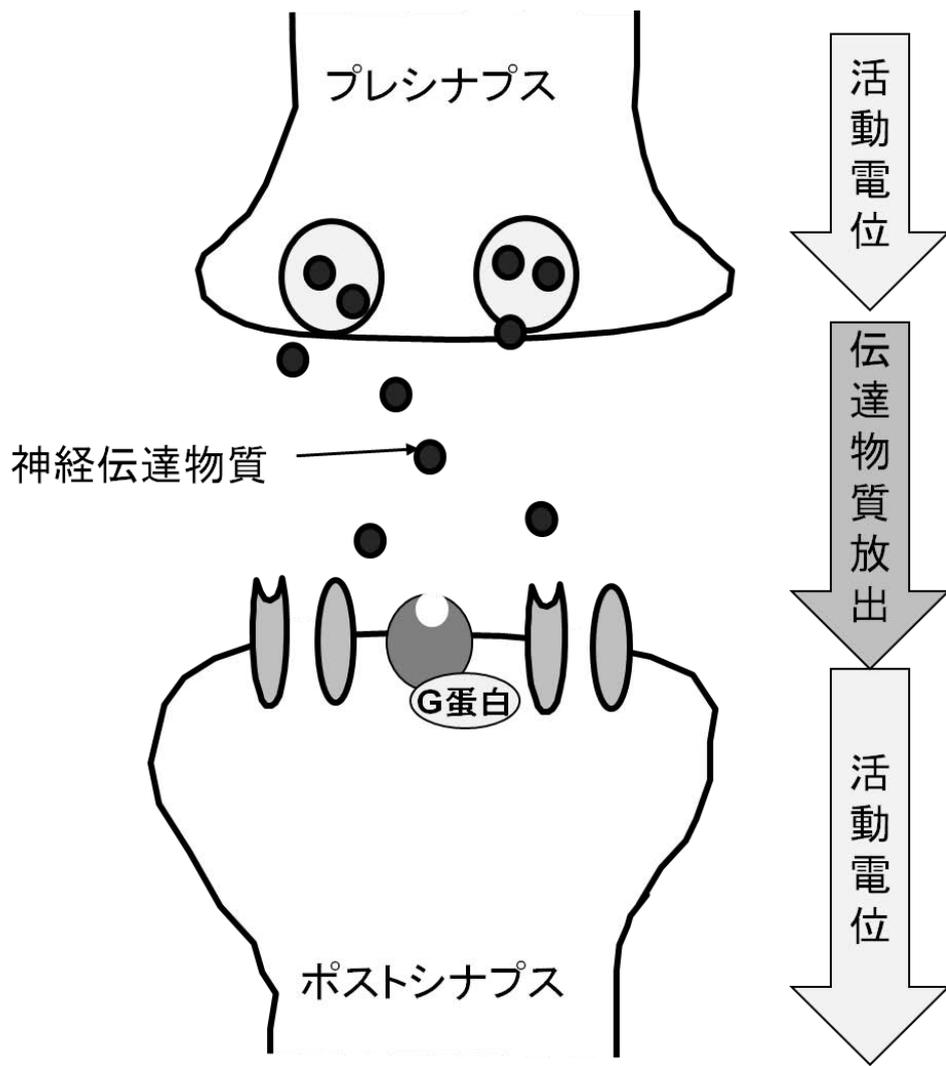


図 1-3 神経伝達の仕組み

## 1-6. ポスト-シナプスモデル細胞

本研究では中枢神経医薬 HTA における解析モデルとして、ポストシナプス膜上のレセプター機能を培養が容易な異種細胞に発現させたポスト-シナプスモデル細胞の構築を企画した (図 1-4)。中枢神経医薬が作用する分子ターゲットの一つはポストシナプス膜上のレセプターである。モデル細胞を用いることで中枢神経医薬のターゲットとなるレセプターへの薬剤の作用を解析することができ、中枢神経医薬におけるリード化合物探索において有効になると考えた。モデル細胞はレセプター機能研究に従来用いられてきた神経細胞と比べて培養が容易であり、かつ分化誘導や形成したシナプスの維持などの測定上の不安定要因が少ない。またレセプター機能のみに着目しているため、細胞応答に関わる因子を特定しやすく、細胞応答制御が容易であると考えられる。そのため、中枢神経医薬 HTA のための解析モデルとして優れた特性が期待される。

本研究ではモデルケースとしてグルタミン酸レセプター (GluR) に着目した。GluR 中枢神経において、興奮性神経伝達を司る<sup>25</sup>のみならず、記憶・学習<sup>26</sup>などの高次脳機能、てんかん<sup>22</sup>や神経細胞死を伴う脳神経疾患に深く関わりと考られている。そのため中枢神経医薬開発における重要な分子ターゲットとなっている。

GluR はイオンチャネルを形成して速いシナプス伝達を担うイオンチャネル型レセプターと G タンパク質と共役してシグナル伝達を行う代謝調節型受容体の二つに大別される。イオンチャネル型レセプターはさらに アゴニストに対する受容体親和性の違いから、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) レセプター、 $\alpha$ -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾール (AMPA) レセプターおよびカイニン酸レセプターの 3 つのサブタイプに分類されている<sup>27</sup> (図 1-5)。この中で特に AMPA レセプターは神経伝達における活動電位の発生に重要な役割を

担っており、中枢神経伝達の中心的な役割を果たしているといえる。

AMPA レセプターは 4 回膜貫通型のタンパク質であり、4 つのサブユニットが集まってレセプターとしての機能を有する (図 1-6)。生体内では同種のサブユニットから構成されるホモメリック受容体と異種のサブユニットから構成されるヘテロメリック受容体の両方の存在が確認されている<sup>28</sup>。このレセプターは主に Na イオン、K イオンを流入するが、いくつかのサブユニットでは Ca イオンの流入を引き起こすことが知られている。現在既知のものではアゴニストではグルタミン酸や AMPA、アンタゴニストでは CNQX、NBQX、DNQX などが知られている<sup>29</sup>。

GluR については基本的な構造と機能がほぼ解明されており<sup>30</sup>、前述したようにリガンドのグルタミン酸以外にも GluR に結合するアゴニストとアンタゴニストが発見されている。このように基本的な構造や機能が解明されている点は、レセプター発現細胞を用いた測定法における再現性や S/N 比の向上に向けた細胞設計を議論するモデルケースとして、アドバンテージが大きい。そこで本研究では AMPA 型 GluR のサブユニットの一種である GluR-D を発現したモデル細胞構築を行った。

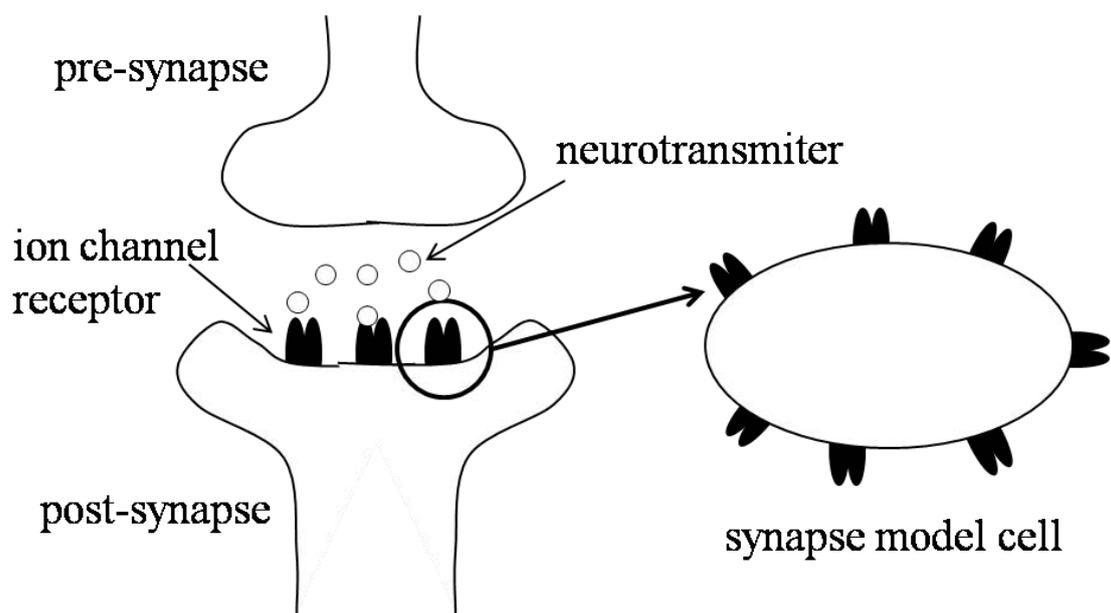


図 1-4 シナプスモデル細胞

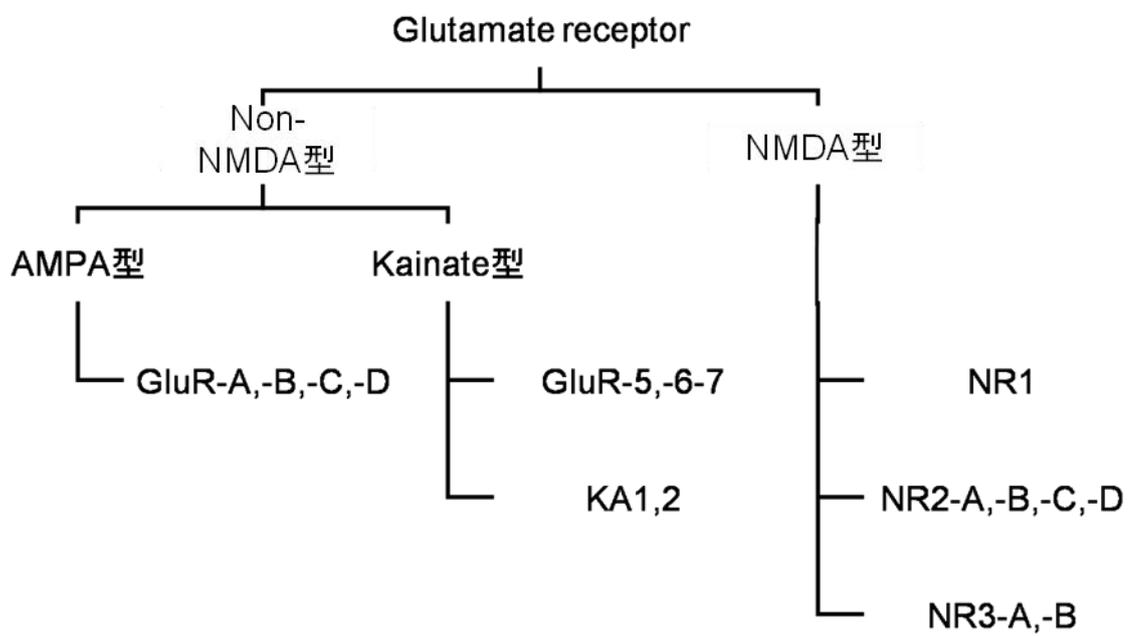


図 1-5 GluR の分類

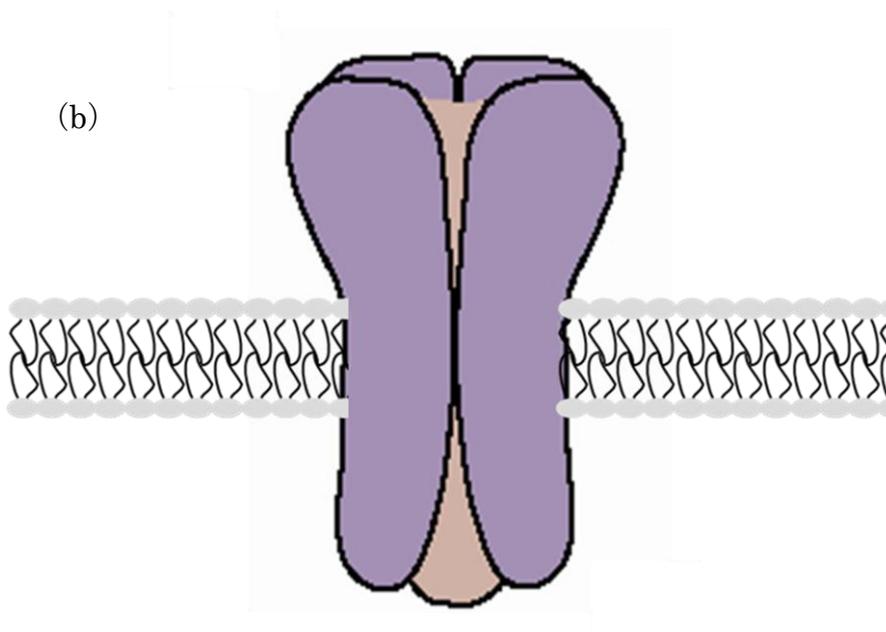
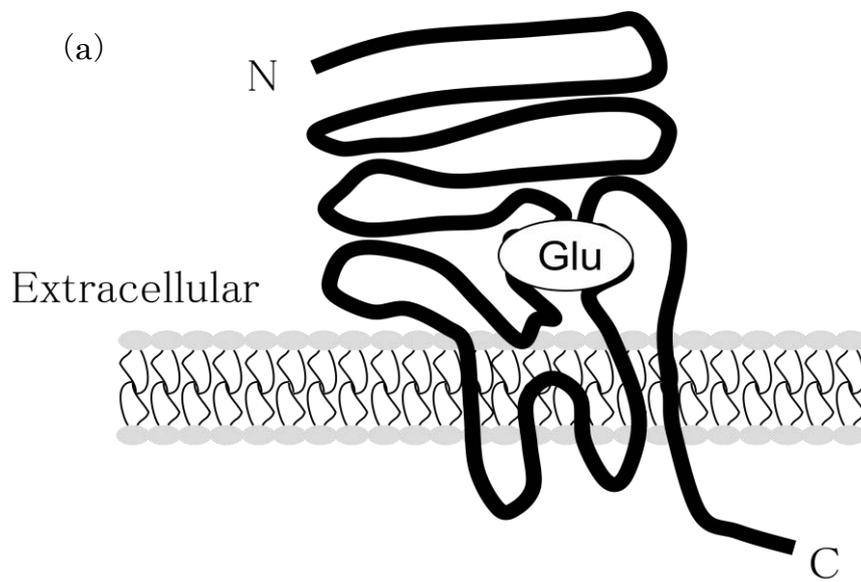


図 1-6 AMPA レセプターの構造

(a) 3次構造 (b) 4次構造

## 1-7. 本研究の目的と意義

本章では医薬開発における HTA の重要性と細胞バイオセンサにおける課題について述べた。細胞バイオセンサ構築において、その目的に応じて適切な解析モデル系を戦略的に構築することが重要である。本研究室では解析モデル系の構築が難しい中枢神経医薬 HTA に着目し、ポスト-シナプス機能を模倣した「ポスト-シナプスモデル細胞」の提唱と構築を推進している。本論文ではモデル細胞を細胞バイオセンサ素子として利用するための課題に着目し、再現性や S/N 比に優れた細胞バイオセンサ構築に必要な分子機能の解明と戦略的構築を行うことである。更にケモメトリクス手法を利用した薬剤解析手法を組み合わせ、モデル細胞の薬剤解析への応用の検討を行う。

本論文は本章を入れて 6 章で構成される。

第 2 章では再現性に優れた細胞バイオセンサ構築を目指し、GFP 共発現モデル細胞を用いた細胞応答安定化の検討を行った。

第 3 章ではモデル細胞の培養系の検討を行い、安定培養が可能な細胞構築戦略について述べる。

第 4 章では S/N に優れた細胞バイオセンサ構築を目指し、モデル細胞応答の増幅の検討を行った。

第 5 章ではケモメトリクス手法を組み合わせた薬剤解析手法の構築を行い、中枢神経薬剤の作用解析への応用について検討する。

最後に、第 6 章では、以上を総括し、今後の展望を述べる。

## 参考文献

1. Gonzalez, G.; Shpall, E. J.; Gathe, J. C.; Behringer, R. R., Cord blood stem cell therapy for acquired immune deficiency syndrome. *Stem Cells Dev* 2009, 18 (1), 1-2.
2. Okano, T.; Hannachi, I. E.; Itoga, K.; Kumashiro, Y.; Kobayashi, J.; Yamato, M., Fabrication of transferable micropatterned-co-cultured cell sheets with microcontact printing. *Biomaterials* 2009, 30 (29), 5427-5432.
3. Takeuchi, S.; Matsunaga, Y. T.; Morimoto, Y., Molding Cell Beads for Rapid Construction of Macroscopic 3D Tissue Architecture. *Advanced Materials* 2011, 23 (12), H90-H94.
4. Wang, P.; Xiao, L. D.; Hu, Z. Y.; Zhang, W.; Wu, C. X.; Yu, H., Evaluation of doxorubicin toxicity on cardiomyocytes using a dual functional extracellular biochip. *Biosensors & Bioelectronics* 2010, 26 (4), 1493-1499.
5. Liu, Q.; Cai, H.; Xu, Y.; Xiao, L.; Yang, M.; Wang, P., Detection of heavy metal toxicity using cardiac cell-based biosensor. *Biosens Bioelectron* 2007, 22 (12), 3224-9.
6. Haruyama, T., Cellular biosensing: chemical and genetic approaches. *Anal Chim Acta* 2006, 568 (1-2), 211-6.
7. Haruyama, T.; Bongsebandhu-Phubhakdi, S.; Nakamura, I.; Mottershead, D.; Keinanen, K.; Kobatake, E.; Aizawa, M., A biosensing system based on extracellular potential recording of ligand-gated ion channel function overexpressed in insect cells. *Anal Chem* 2003, 75 (4), 918-21.
8. Asakawa, H.; Mochitate, K.; Haruyama, T., Seamless signal transduction from live cells to an NO sensor via a cell-adhesive sensing matrix. *Anal Chem* 2008, 80 (5), 1505-11.
9. Haruyama, T., [Cellular engineering and biosensor technology for high

- through-put analysis on drug discovery]. *Yakugaku Zasshi* 2010, 130 (4), 559-64.
10. Dong, S. J.; Liu, C.; Yong, D. M.; Yu, D. B., Cell-based biosensor for measurement of phenol and nitrophenols toxicity. *Talanta* 2011, 84 (3), 766-770.
  11. 堀井郁夫, 新薬の創出に重要な創薬初期段階での安全性、薬物動態および物性試験. *日本薬理雑誌* 2006, 127, 217-221.
  12. 三井郁雄, HTS からリード化合物はでるのか?. *日本薬理学雑誌* 2007, 129, 281-285.
  13. Fattori, D., Molecular recognition: the fragment approach in lead generation. *Drug Discov Today* 2004, 9 (5), 229-38.
  14. Whitebread, S.; Hamon, J.; Bojanic, D.; Urban, L., Keynote review: in vitro safety pharmacology profiling: an essential tool for successful drug development. *Drug Discov Today* 2005, 10 (21), 1421-33.
  15. Chen, W. R.; Hoke, A., Immortalization and development of a nociceptive DRG neuronal cell line for high-throughput drug screening. *Annals of Neurology* 2005, 58, S37-S37.
  16. Ballard, M. E.; Basso, A. M.; Gallagher, K. B.; Browman, K. E.; Fox, G. B.; Drescher, K. U.; Gross, G.; Decker, M. W.; Rueter, L. E.; Zhang, M., The drug-induced helplessness test: an animal assay for assessing behavioral despair in response to neuroleptic treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 2007, 190 (1), 1-11.
  17. Camacho, C.; Chico, B.; Cao, R.; Matias, J. C.; Hernandez, J.; Palchetti, I.; Simpson, B. K.; Mascini, M.; Villalonga, R., Novel enzyme biosensor for hydrogen peroxide via supramolecular associations. *Biosens Bioelectron* 2009, 24 (7), 2028-33.
  18. Wang, S. B.; Tang, D. Y., Electrochemical immune-biosensor for immunoglobulin G based bioelectrocatalytic reaction on micro-comb electrodes.

*Bioprocess Biosyst Eng* 2008, 31 (5), 385-92.

19. McBeath, R.; Pirone, D. M.; Nelson, C. M.; Bhadriraju, K.; Chen, C. S., Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 2004, 6 (4), 483-95.

20. 白山幸彦, うつ病治療の現場から (治療薬の問題点と望まれること). *日本薬理学雑誌* 2006, 127 (3), 209-212

21. Pardridge, W. M., Alzheimer's disease drug development and the problem of the blood-brain barrier. *Alzheimers Dement* 2009, 5 (5), 427-32.

22. Wolf, P., Acute Drug Administration in Epilepsy: A Review. *CNS Neurosci Ther* 2010.

23. 春山哲也, レセプター機能評価技術とその意義. *新薬展望* 2006, 42 (S-1), 249-257.

24. Jimbo, Y.; Tateno, T.; Robinson, H. P., Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons. *Biophys J* 1999, 76 (2), 670-8.

25. Shiroma, S.; Yamaguchi, T.; Kometani, K., Effects of 17beta-estradiol on chemically induced long-term depression. *Neuropharmacology* 2005, 49 (1), 97-102.

26. Castillo, P. E.; Chiu, C. Y. Q.; Carroll, R. C., Long-term plasticity at inhibitory synapses. *Current Opinion in Neurobiology* 2011, 21 (2), 328-338.

27. Stromgaard, K.; Mellor, I., AMPA receptor ligands: Synthetic and pharmacological studies of polyamines and polyamine toxins. *Medicinal Research Reviews* 2004, 24 (5), 589-620.

28. 鈴木 岳之, 都. 馨., 亀山 仁彦, 郭 伸, AMPA 受容体の生理機能. *日本薬理学雑誌* 2003, 122 (6), 515-526

29. Catarzi, D.; Colotta, V.; Varano, F., Competitive AMPA receptor antagonists. *Med Res Rev* 2007, 27 (2), 239-78.
30. Wollmuth, L. P.; Sobolevsky, A. I., Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci* 2004, 27 (6), 321-8.

## 第 2 章

細胞応答安定化のための GFP 共発現  
ポスト-シナプスモデル細胞の構築

## 2-1. 緒言

本研究の目的は、神経医薬探索 HTA のためのモデル解析系として、本研究室で提唱する「ポスト-シナプスモデル細胞」をバイオセンサ素子として利用するため必要な分子機能を戦略的に構築することである。細胞バイオセンサを薬剤解析に応用するためには、再現性やシグナル/ノイズ (S/N) 比に優れた細胞バイオセンサ構築を行うことが重要であり、その目的に応じた細胞設計は極めて重要である。本章では細胞バイオセンサにおける再現性向上を目指し、細胞応答の安定化に向けた検討を目的とした。細胞はその応答に確率的な変動を示すため、細胞バイオセンサにおける再現性に大きな影響を与える。そのため、このような細胞応答の確率的変動を考慮した細胞を設計構築する必要がある。

次項では細胞応答の確率的な変動の大きな要因であると考えられている細胞のゆらぎについて述べる。

## 2-2. 細胞のゆらぎと細胞応答

細胞は同一の細胞であっても、本質的に mRNA 量やタンパク発現量にゆらぎを持っていることが報告されている<sup>1-3</sup>。それに伴い、細胞は同じ遺伝背景・環境であっても細胞機能や性質、つまり表現型が大きく異なることが報告されている<sup>4,5</sup>。近年では分化した哺乳類細胞においても、多様な表現型を示すことが明らかとなっている<sup>6-8</sup>。このような細胞のゆらぎは生体の機能維持<sup>9,10</sup>や細胞分化<sup>11,12</sup>など、生体にとって大きな意味を持っていると考えられている。しかしながら、このような細胞のゆらぎに起因して、細胞の応答は確率的な変動を示すため、細胞バイオセンサにおける再現性に影響を与える<sup>8</sup>。そのため、細胞を分子認識素子として利用するためには、このような細胞のゆらぎを考慮した細胞設計を行うことが重要である。

### 2-3. モデル細胞における細胞応答の確率的変動

モデル細胞において、細胞応答には (1) 細胞膜上のレセプターの数 (2) 個々のレセプターからのイオン流入の 2 つが大きく関与していると考えられる。2-2. で述べたように細胞はタンパク発現量にゆらぎを持っている。そのため、モデル細胞において、細胞ごとの細胞膜上のレセプター量に大きな差異があることが考えられる。再現性の高い細胞バイオセンサ構築のためには、この細胞間のレセプター量の差異を考慮する必要がある。そこで本章では GFP を共発現したモデル細胞の構築を企画した。GFP 蛍光を指標とし、レセプター発現量を見積もることができれば、細胞応答の変動を補正し得ると考えた。本章では GFP 共発現モデル細胞の構築を行い、細胞応答の安定化に向けた検討を行う。

### 2-4. 実験方法

#### 2-4-1. 細胞培養

ポスト-シナプスモデル細胞における宿主細胞として培養が容易で、分析用途に適しているアフリカミドリザル腎臓由来の COS7 細胞を用いた。COS 7 細胞は理研セルバンクから購入した。Dalbbecca' s Modified Eagle' sMedium; DMEM (Invitrogen) に 10%FBS (大日本住友製薬) と 50U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン (Invitrogen) を添加した培地を用いて、37°C で培養し、数日ごとに培地を交換した。細胞の継代には、0.05%トリプシン/EDTA 溶液 (KURABO) を用い、800rpm で 5 分間遠心後、細胞数  $5 \times 10^5$  個になるように 75ml のカルチャーフラスコ (BDFalcon) に播種した。細胞の保存は 10%DMSO (Wako) を含む培地で  $1 \times 10^6$  cells/ml の細胞懸濁液を作成し、-80°C のディープフリーザで凍結保存した。凍結の際には、BICELL (日本フリーザ) を用いて温度を徐々に -80°C

まで低下させた。解凍の際には、37℃の恒温槽で急速解凍し、800rpm で遠心後、75ml のカルチャーフラスコに播種した。

#### 2-4-2. 導入遺伝子

GluR ( $\Delta 22-402$ ) 遺伝子<sup>13</sup>はフィンランド、ヘルシンキ大学の Kari Keinanen 教授より提供いただいた。Flag を N 端に付加した GluR ( $\Delta 22-402$ ) 遺伝子を制限酵素を用いて pIRES-GFP ベクター (Clontech) にクローニングした(図 2-1)。GluR の下流にリボソーム結合サイト (IRES) を介して GFP が導入される設計となるため、GluR と GFP が同一プロモーター支配により等価で発現する仕組みになっている<sup>14, 15</sup>。そのため、GFP 蛍光量より、目的遺伝子の発現量を見積もることができる。

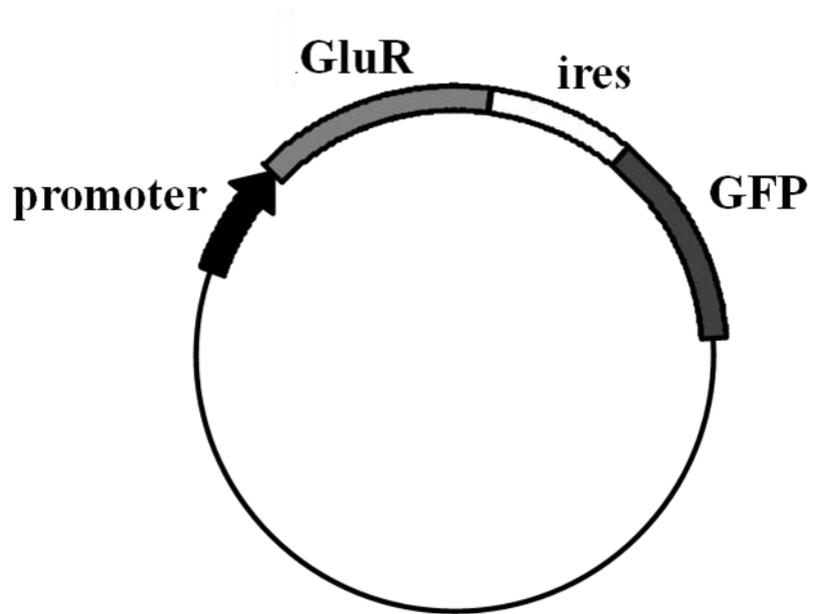


図 2-1 GluR-ires-GFP ベクター

#### 2-4-3. GluR 遺伝子導入の COS 7 細胞への導入

GluR ( $\Delta 22-402$ ) 遺伝子をクローニングした ires-GluR/GFP 遺伝子を X-fect<sup>TM</sup> (Clontech) を用いて COS7 細胞に導入した。遺伝子導入前日に、COS7 細胞を 70% コンフルエントになるように 6 穴プレート (BDFalcon) に播種した。翌日エタノール沈殿により精製した 4 $\mu$ g の DNA を X-fect Reaction Buffer に溶解し DNA solution を作製した。次に X-fect Polymer を X-fect Reaction Buffer に溶解し、X-fect Polymer solution を作製した。作製した DNA solution と X-fect Reaction Buffer を混合し、室温で 10 分間静置した。その後、1ml の DMEM(FBS・ペニシリン/ストレプトマイシン)に培地交換した細胞に混合した溶液を加え、37°C CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養した。4 時間後 DMEM(10%FBS・50U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン)培地に交換し、再び CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養した。

#### 2-4-4. 免疫染色法による GluR の細胞表層提示解析

COS7 細胞表層への GluR の提示を細胞免疫染色法で確認した。一次抗体には Anti FLAG Rabbit IgG (Affinity Bio Regents)、二次抗体には Rhodamine 標識された Anti Rabbit IgG (Affinity Bio Regents) を用いた。測定前日に 37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 0.01% フィブロネクチン/PBS 溶液中に浸漬したスライドガラスに細胞を播種した。CO<sub>2</sub> インキュベータ内 37°C で一晩培養後、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) により培地成分を洗浄した。その後、3%ホルムアルデヒド溶液を用い、室温で 10 分間処理することにより細胞の固定を行った。その後ブロッキング剤として Super Block (Bio Rad) を用い、ブロッキング処理を 30 分間行った。HBSS で 3 回洗浄した後、一次抗体反応を 1 時間行い、HBSS で 3 回洗浄し、二次抗体反応 1 時間行った。その後、再び HBSS で洗浄し、落射型蛍光顕微鏡 (Nikon) による観察を行った。

#### 2-4-5 ナトリウムイオン蛍光指示薬によるイオン流入測定

イオン流入測定にはナトリウムイオン蛍光指示薬である SBFI/AM (invitrogen) を使用した。測定前日にガラスボトムディッシュ (IWAKI) に細胞を播種した。細胞接着を確認し、5 $\mu$ M の SBFI/AM を加えた HBSS を細胞に負荷し、37°C でインキュベートすることで細胞内へ SBFI を導入した。3 時間培養後、HBSS に置換し、測定を行った。

SBFI を 340nm と 380nm の励起光で励起した際の 510nm の蛍光を測定し、そのときの蛍光強度の比である 340/380 をモニタリングした。測定開始 120 秒後に薬剤を滴下し、その後の細胞内のナトリウムイオン濃度変化を計測した。

#### 2-5. GluR および GFP の発現確認

落射型蛍光顕微鏡を用いて GluR および GFP の発現確認を行った (図 2-2)。GFP の発現は GFP 蛍光により、GluR の発現は免疫染色法により観察した。ネガティブコントロールである Native Cos7 細胞では蛍光が観察されない一方で、遺伝子を導入したポスト-シナプスモデル細胞では GFP および免疫染色法での蛍光が観察された。この結果より、GFP と GluR が共発現されていることが確認された。また、免疫染色法では細胞膜の透過処理を行っていないため、抗体は細胞膜上の GluR の Flag-tag のみに結合する。そのため、GluR が細胞膜上に提示されていることも確認された。

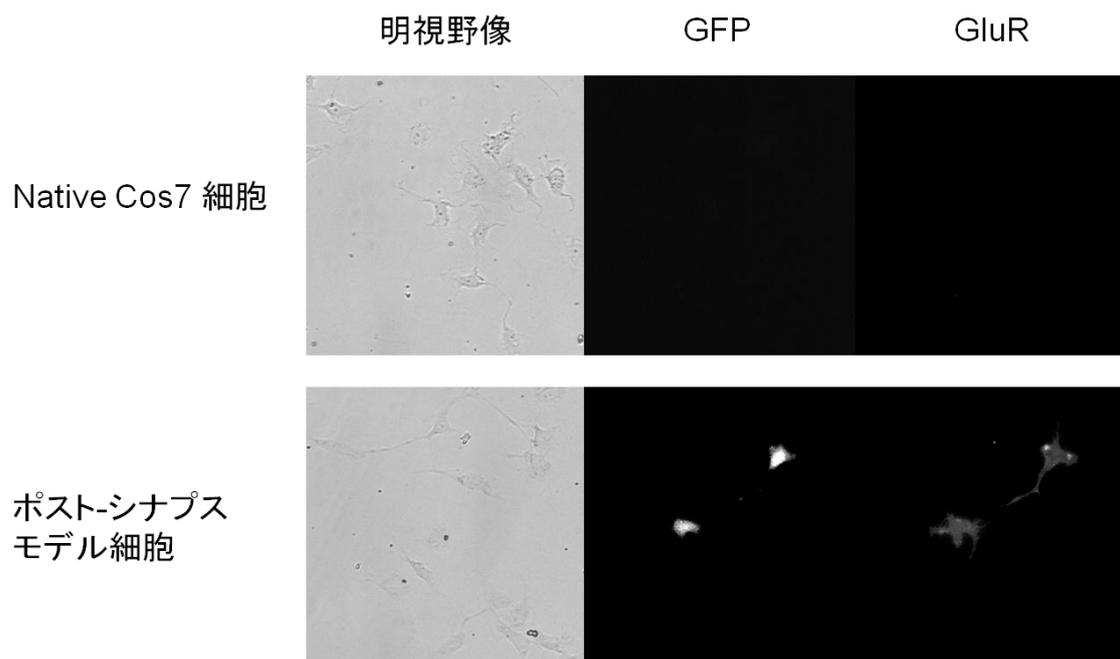


図 2-2 GFP および GluR の発現確認

## 2-6. GluR 発現量と細胞表層提示量の関係の解析

免疫染色法を用いて GluR の発現量と細胞表層提示量の関係の解析を行った (図 2-3)。前述の通り、ires の機能により、GluR と GFP 発現量は相関する。そのため、GluR 発現量は GFP 蛍光量を指標とした。また、免疫染色法では GluR の細胞表層提示量は免疫染色法での蛍光強度を指標とした。発現量が増加するに伴い、提示量が増加し、発現量が一定以上になると提示量は飽和し、一定となることが明らかとなった。この結果より、細胞膜上に提示できる GluR の数には制限があるということが示唆された。

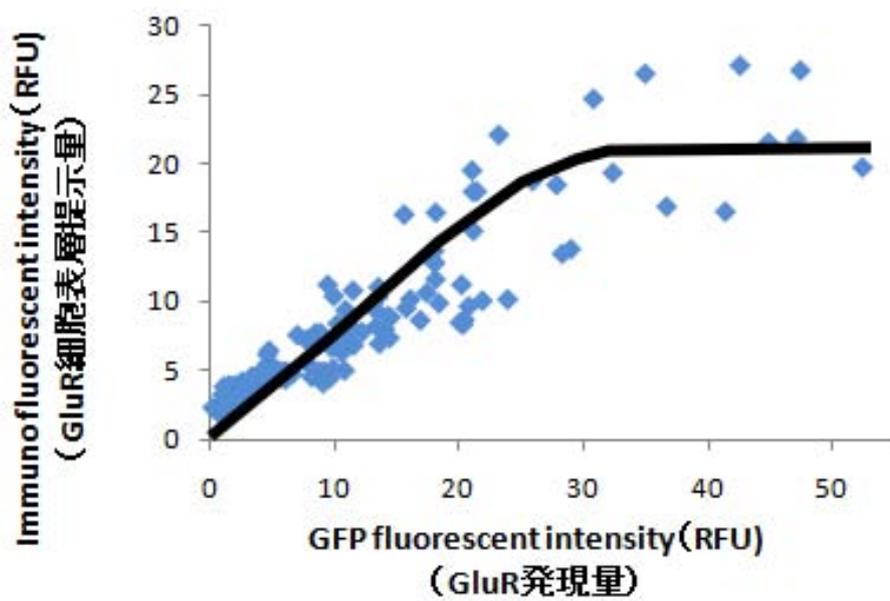


図 2-3 発現量と提示量の関係の解析

## 2-7. イオン蛍光プローブによる GluR 機能解析

SBFI を用いて、モデル細胞のイオン流入の解析を行った。SBFI はナトリウムイオンと結合し、蛍光量が増加する試薬である。これを細胞内に取り込むことで、細胞内のナトリウムイオン濃度変化を評価することができる。そのため、この SBFI を用いることで、GluR への薬剤作用に伴うイオン流入によって生じる細胞内イオン濃度変化を測定することで、レセプター機能の評価が可能であると考えた。モデル細胞におけるイオン流入挙動を図に示す。Glu 適用後、Native Cos7 細胞では細胞内ナトリウム濃度に変化がない一方で、モデル細胞ではアゴニストである Glu 適用後、大きな Na<sup>+</sup>イオン濃度上昇が観察された(図 2-4)。これは適用した Glu がモデル細胞膜上の GluR に作用し、Na<sup>+</sup>流入を引き起こしたためであると考えられる。この結果より、構築した GFP 共発現モデル細胞は Glu と結合しイオン流入を引き起こすという GluR 本来の機能を保持していることが示された。

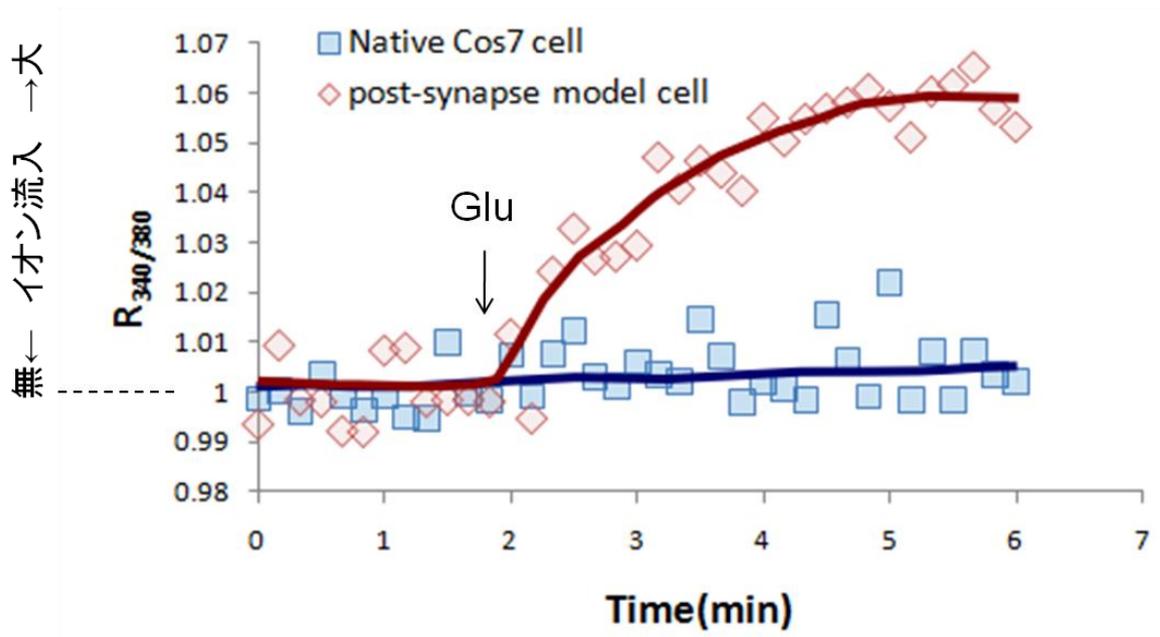


図 2-4 イオン蛍光プローブを用いたイオン流入挙動解析

## 2-8. GluR 発現量と細胞応答の関係

この蛍光指示薬を用いて GluR 発現量とモデル細胞における細胞応答（イオン流入）量の関係を解析した(図 2-5)。2-6 と同様に GluR 発現量は GFP 蛍光量を指標とした。GluR 発現量と GluR 提示量の関係の解析と同様に、発現量が増加するに伴い、イオン流入量は増加し、発現量が一定以上になるとイオン流入量は飽和し、一定となることが示された。モデル細胞におけるイオン流入量に本質的に影響するのは細胞膜上の GluR である。そのため、一定以上の発現量では細胞膜上のレセプター量は飽和し一定となったため、イオン流入量は一定となったと考察した。また、発現量の高い細胞群では発現量の際に関わらず、イオン流入量は比較的安定であるということが明らかとなった。タンパク発現量のゆらぎ<sup>6</sup>やサイレンシング<sup>16</sup>など、様々な要因により、同一の遺伝背景・環境であっても、細胞応答は大きく異なることが報告されている。しかしながら、ires を利用し、GFP 蛍光量の高い細胞のみを用いることで、細胞間の応答の差異を低減でき、定量的な解析が可能になることが示唆された。

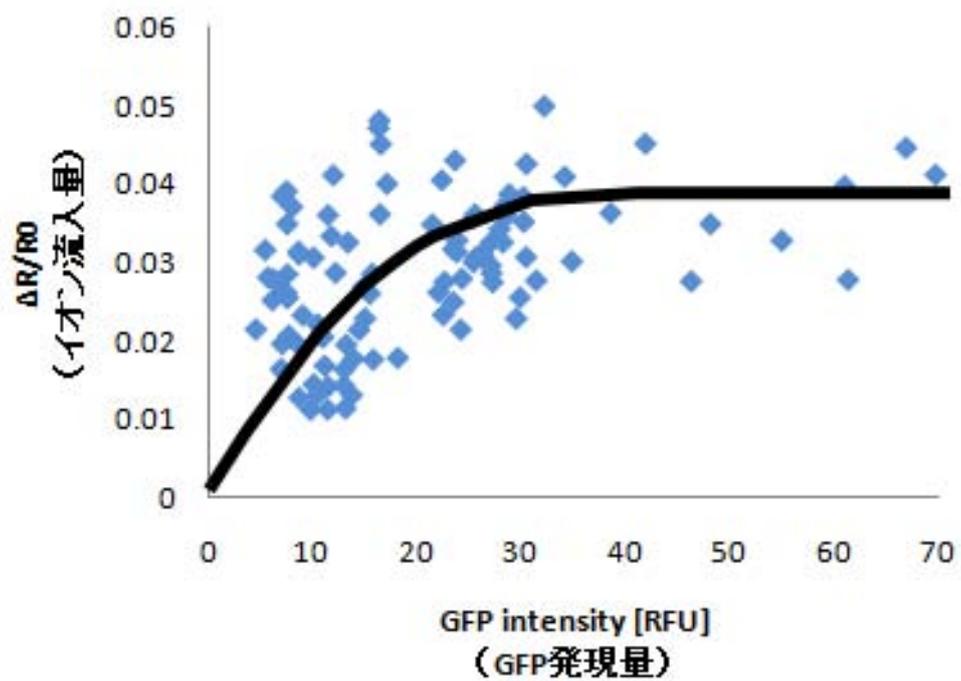


図 2-5 GluR 発現量とイオン流入量の関係の解析

## 2-9. GFP 共発現モデル細胞の薬剤解析への適用性の評価

GFP 蛍光量の高い細胞を用いて、イオン流入量のグルタミン酸濃度依存性を解析した(図 2-6)。グルタミン酸濃度に伴い、イオン流入量が増加することが示された。またモデル細胞において、グルタミン酸の EC50 が 0.1-1mM の間にあることが示された。電気生理学的測定などによって明らかにされている GluR に対するグルタミン酸の EC50 は約 500  $\mu$ M であること<sup>13, 17</sup>から、モデル細胞のグルタミン酸に対する応答は GluR のグルタミン酸に対する薬理学的特性との一致がすることが示唆された。

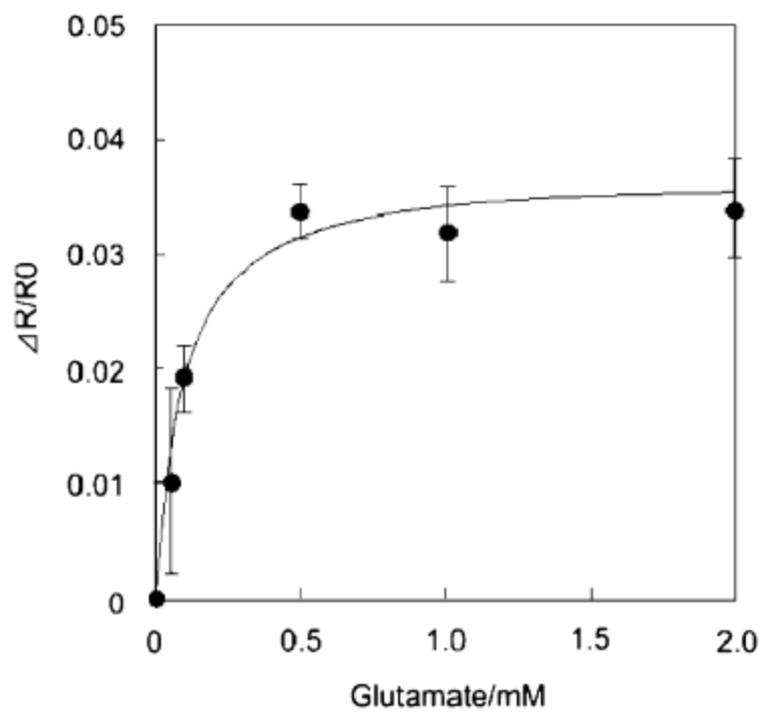


図 2-6 イオン流入量のグルタミン酸濃度依存性

## 2-10. 結言

本章では細胞バイオセンサにおける再現性の向上を目指し、モデル細胞応答の安定化のための検討を行った。GFP 共発現細胞を用いて、GluR 発現量と提示量の関係の解析を行い、GluR 発現量が高い細胞群では提示量は一定となるということが明らかとなった。また GluR 発現量高い細胞群ではイオン流入量は飽和し、比較的安定することが示された。つまり、GFP 蛍光を指標とし、GFP 蛍光量が高い細胞を用いることで、細胞間の応答の差異を低減できることが示された。近年、モデル細胞のようにレセプター提示細胞を用いた細胞バイオセンサは数多く報告されている。しかしながら、細胞は本質的にタンパク発現量にゆらぎを持っているため、細胞間のレセプター量の差異が細胞バイオセンサにおける再現性に大きな影響を与える。しかしながら、蛍光タンパクを利用し、レセプター発現量の高い細胞のみを用いることで、細胞の応答は安定化し、再現性の高い細胞バイオセンサ構築が可能になることが示唆された。

## 参考文献

1. Raj, A.; van Oudenaarden, A., Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences. *Cell* 2008, *135* (2), 216-26.
2. Newman, J. R.; Weissman, J. S., Systems biology: many things from one. *Nature* 2006, *444* (7119), 561-2.
3. Eldar, A.; Elowitz, M. B., Functional roles for noise in genetic circuits. *Nature* 2010, *467* (7312), 167-73.
4. Alon, U.; Surette, M. G.; Barkai, N.; Leibler, S., Robustness in bacterial chemotaxis. *Nature* 1999, *397* (6715), 168-71.
5. Dunlop, M. J.; Cox, R. S.; Levine, J. H.; Murray, R. M.; Elowitz, M. B., Regulatory activity revealed by dynamic correlations in gene expression noise. *Nature Genetics* 2008, *40* (12), 1493-1498.
6. Nakamura, N.; Yamazawa, T.; Okubo, Y.; Lino, M., Temporal switching and cell-to-cell variability in Ca(2+) release activity in mammalian cells. *Journal of Pharmacological Sciences* 2009, *109*, 170p-170p.
7. Sigal, A.; Milo, R.; Cohen, A.; Geva-Zatorsky, N.; Klein, Y.; Liron, Y.; Rosenfeld, N.; Danon, T.; Perzov, N.; Alon, U., Variability and memory of protein levels in human cells. *Nature* 2006, *444* (7119), 643-6.
8. Migita, S.; Wada, K.; Taniguchi, A., Reproducible fashion of the HSP70B' promoter-induced cytotoxic response on a live cell-based biosensor by cell cycle synchronization. *Biotechnol Bioeng* 2010, *107* (3), 561-5.
9. Briggman, K. L.; Abarbanel, H. D. I.; Kristan, W. B., Optical imaging of neuronal populations during decision-making. *Science* 2005, *307* (5711), 896-901.
10. Acar, M.; Mettetal, J. T.; van Oudenaarden, A., Stochastic switching as a

survival strategy in fluctuating environments. *Nature Genetics* 2008, 40 (4), 471-475.

11. Morris, S. A.; Teo, R. T.; Li, H.; Robson, P.; Glover, D. M.; Zernicka-Goetz, M., Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107 (14), 6364-9.

12. Yamanaka, Y.; Lanner, F.; Rossant, J., FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development* 2010, 137 (5), 715-24.

13. Pasternack, A.; Coleman, S. K.; Jouppila, A.; Mottershead, D. G.; Lindfors, M.; Pasternack, M.; Keinänen, K., Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor channels lacking the N-terminal domain. *J Biol Chem* 2002, 277 (51), 49662-7.

14. Jang, S. K.; Krausslich, H. G.; Nicklin, M. J.; Duke, G. M.; Palmenberg, A. C.; Wimmer, E., A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 1988, 62 (8), 2636-43.

15. Baranick, B. T.; Lemp, N. A.; Nagashima, J.; Hiraoka, K.; Kasahara, N.; Logg, C. R., Splicing mediates the activity of four putative cellular internal ribosome entry sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, 105 (12), 4733-4738.

16. Wassenegger, M., Gene silencing-based disease resistance. *Transgenic Research* 2002, 11 (6), 639-653.

17. Koike, M.; Tsukada, S.; Tsuzuki, K.; Kijima, H.; Ozawa, S., Regulation of kinetic properties of GluR2 AMPA receptor channels by alternative splicing. *J Neurosci* 2000, 20 (6), 2166-74.

## 第 3 章

# 培養系の最適化による細胞毒性の 低減と細胞応答の向上

### 3-1. 緒言

細胞は培地成分<sup>1</sup>や培養温度<sup>2</sup>、pH<sup>3</sup>、接着因子<sup>3</sup>など様々な培養環境因子によって機能が大きく異なる。そのため、細胞バイオセンサ構築において、用いる細胞の種類やその用途によって、培養環境を最適化することが重要である。モデル細胞の培養培地には細胞増殖の必須成分であるグルタミン酸が含まれている。このグルタミン酸が培養中にモデル細胞膜上の **GluR** に作用し、膜電位や細胞内イオン濃度異常を引き起こすことが懸念される。このようなグルタミン酸毒性が **GluR** をターゲットとした細胞バイオアッセイ系の確立を阻害している要因であると考えられる。本章ではアンタゴニストの保護作用に着目した。近年、神経伝達物質の異常な放出が神経細胞死を引き起こし、脳虚血<sup>4</sup>やアルツハイマー<sup>5</sup>等、様々な神経疾患の原因となっていることが明らかとなっている。そのため、アンタゴニストの神経保護作用に研究が盛んに進められている<sup>6-8</sup>。神経伝達物質を受容するレセプターをアンタゴニストでブロックすることにより、異常なレセプターの活性化を阻害でき、神経疾患治療に有効となることが期待されている。このアンタゴニストの保護作用に着目し、**GluR** のアンタゴニストを培地に添加することによって、グルタミン酸毒性を阻害でき、安定な培養が可能になるのではないかと考えた。本章では **GluR** の強力なアンタゴニストである **NBQX** を添加培養することによる安定培養の確立を試みた。

### 3-2. NBQX 添加培養

**GluR** のアンタゴニストとして **DNQX**, **NBQX**, **CNQX** 等が報告されている<sup>9</sup>。この中でも特に **NBQX** はアンタゴニスト活性が高いことで知られている。**NBQX** の構造を図 3-1 に示す。**GluR** のリガンド結合ポケットの **Arg485** と **NBQX** の 2 つのカルボニル基が水素結合し、競合的なリガンド結合阻害を引き起こす<sup>10</sup>。そ

のため、NBQX を培地成分に添加することにより、培地中のグルタミン酸の GluR への作用を競合的に阻害できる。そのため、グルタミン酸毒性を低減でき、安定な培養が可能になると考えた。

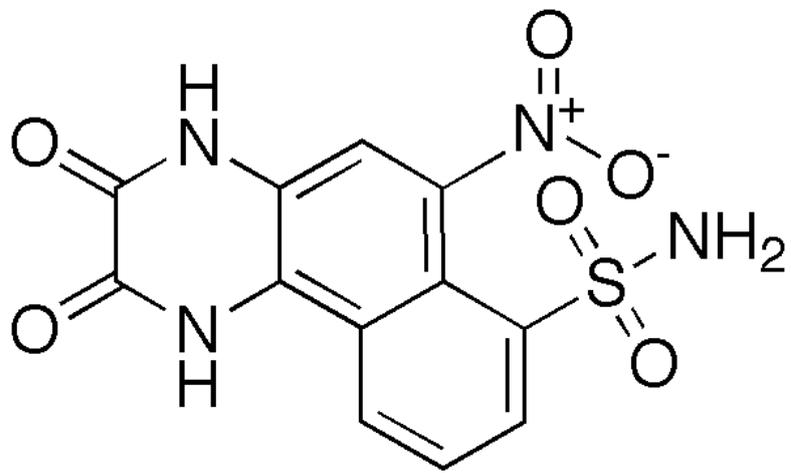


図 3-1 NBQX の構造

### 3-3 実験方法

#### 3-3-1 ポスト-シナプスモデル細胞の構築および培養

ires-GluR/GFP 遺伝子の Cos7 細胞への導入は 2-4-3 と同様の方法で行った。遺伝子導入 4 時間後、DMEM(10%FBS・50U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン・100  $\mu$ M NBQX)培地に交換し、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養した。

#### 3-3-2 GluR 機能解析

GluR の細胞表層提示は 2-4-4 と同様の方法で観察した。また GluR からのイオン流入は Ca<sup>+</sup>蛍光プローブである Fura-2/AM(invitrogen)を用いて観察した。測定前日にガラスボトムディッシュ (IWAKI) に細胞を播種した。細胞接着を確認し、5 $\mu$ M の Fura-2/AM を加えた HBSS を細胞に負荷し、37°Cでインキュベートすることで細胞内へ Fura-2 を導入した。3 時間培養後、HBSS に置換し、測定を行った。

Fura-2 を 340nm と 380nm の励起光で励起した際の 510nm の蛍光を測定し、そのときの蛍光強度の比である 340/380 をモニタリングした。測定開始 120 秒後に薬剤を滴下し、その後の細胞内のカルシウムイオン濃度変化を計測した。

#### 3-3-3 細胞増殖および細胞死数の解析

5 $\times$ 10<sup>5</sup> 個の細胞を 24Well プレートに播種し、培養した。細胞死数の解析にはトリパンプルーを用いた。死細胞は生細胞に比べ、細胞膜の透過性が高いため、トリパンプルーが細胞内に取り込まれる<sup>11</sup>。そのため、死細胞のみを青く染めるため、細胞死数の割合を解析することができる。0.05%トリプシン/EDTA 溶液を用いて細胞を剥がし、800rpm で 5 分間遠心後、1ml の PBS に懸濁した。作製した細胞懸濁液と 0.4%トリパンプルー溶液 1ml を混合し、ヘモサイトメーター

を用いて、細胞数およびトリパンブルー-positive 細胞数を計測した。

#### 3-4 NBQX 添加培養による細胞毒性の低減

通常の DMEM 培地および  $100\ \mu\text{M}$  NBQX を添加した培地で培養した Native Cos7 細胞の細胞増殖曲線を図 3-2 に示す。NBQX 添加培養した場合としていない場合での細胞増殖曲線はほぼ一致することが示された。そのため NBQX 添加培養は Cos7 細胞の細胞増殖能に影響を与えないことが示された。次に構築したポスト-シナプスモデル細胞の細胞増殖を解析した (図 3-3)。NBQX 添加培養したモデル細胞は、添加培養していない場合に比べ、細胞増殖能が大きく向上することが示された。13 日を境に細胞数が減少したが、これは細胞が密になり、アポトーシスを引き起こしたものと考察した。また、この時の細胞死数の割合をトリパンブルーによって解析した。NBQX 添加培養したモデル細胞では、細胞死数の割合が減少することが示された。これらの結果より、NBQX 添加培養により、細胞死を減少でき、安定にモデル細胞を培養し得ることが明らかとなった。Native Cos7 細胞では、NBQX 添加培養は細胞増殖能に影響を与えないため、NBQX がモデル細胞の GluR に作用したため、安定な培養が可能になったと考えられる。つまり、NBQX がモデル細胞膜上の GluR に結合し、グルタミン酸毒性を低減し、安定な培養が可能になったと考察した。

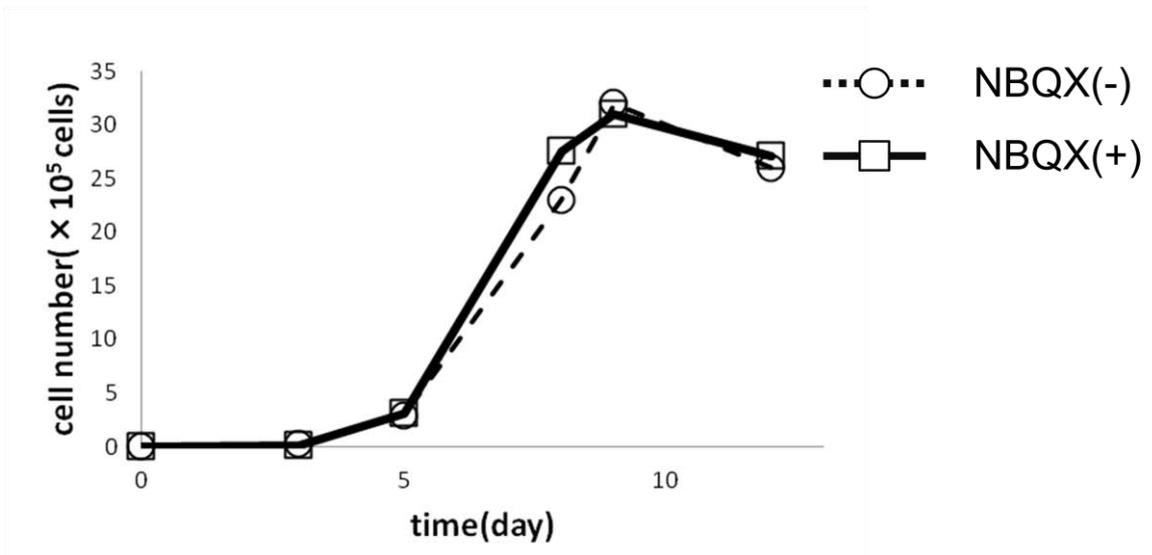


図 3-2 Cos7 細胞の細胞増殖曲線

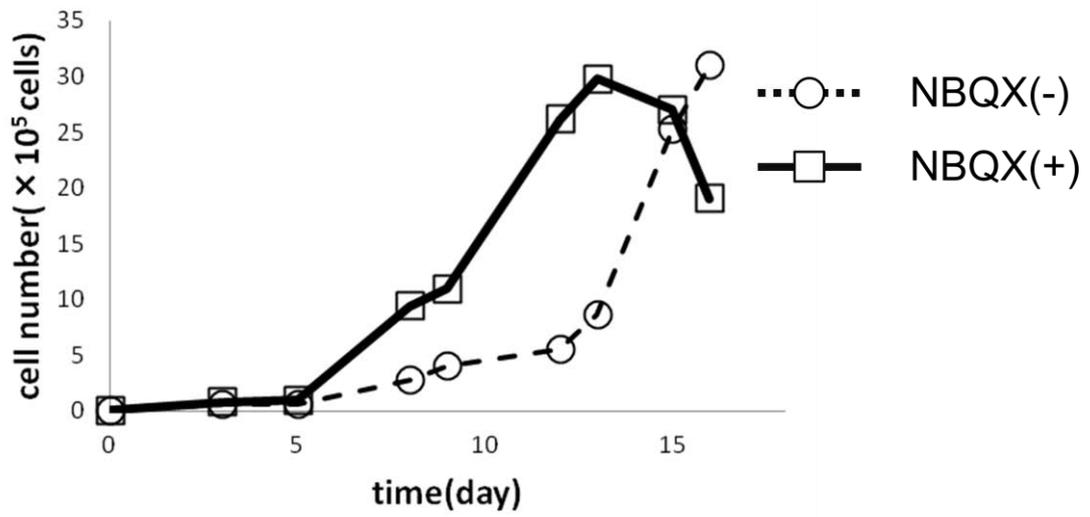


図 3-3 ポスト-シナプスモデル細胞の細胞増殖

表 3-1 トリパンプルーによる細胞死数の解析

	trypan blue positive cells(%)	
	day4	day8
0 $\mu$ M	6.32 $\pm$	6.32 $\pm$
NBQX	1.43	1.17
100 $\mu$ M	3.53 $\pm$	2.50 $\pm$
NBQX	1.22	0.49

### 3-5 NBQX 添加培養の GFP 発現に対する影響

各濃度 NBQX を添加した培地で培養し、GFP 蛍光を示した細胞数の割合を解析した (図 3-4)。第 2 章で述べたように *ires* を介して GFP と GluR を共発現しているため、GFP 陽性細胞数は GluR を発現した細胞の数を示している。NBQX 濃度が増加するに伴い、GFP 陽性細胞の割合が増加することが示された。現状のモデル細胞では一過性発現系であるため、細胞群の中には遺伝子が導入されず、GluR を発現しない細胞が含まれる。NBQX を添加していない培地で培養した場合、培地中のグルタミン酸がモデル細胞膜上の GluR に作用し、GluR を発現した細胞における細胞死を引き起こす。NBQX 濃度が増加するに伴い、グルタミン酸毒性を低減でき、GluR を発現した細胞死を抑制でき、GFP 陽性細胞の割合が向上したと考察した。この結果より、NBQX 添加培養により GluR 発現細胞の細胞毒性を抑制でき、GluR 発現細胞をより多く獲得できることが示された。

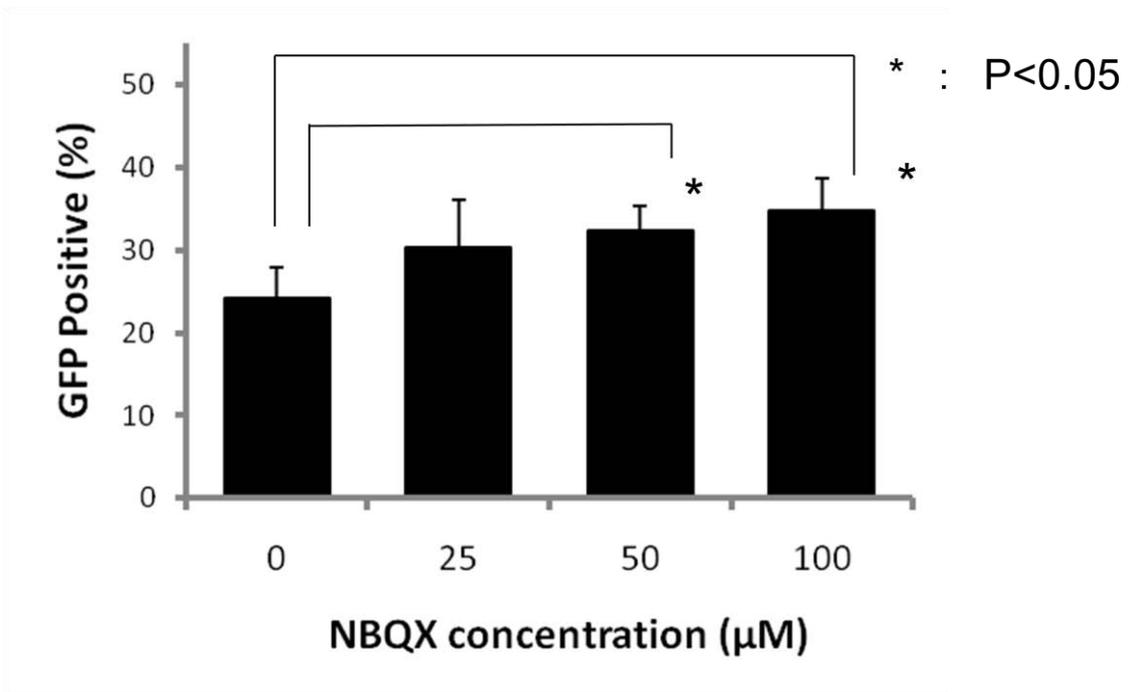


図 3-4 GFP 陽性細胞の割合の解析

### 3-6 NBQX 添加培養時の GluR 機能の解析

#### 3-6-1 NBQX 添加培養時の細胞表面提示量の解析

NBQX 添加培養が GluR 機能に与える影響の解析を試みた。まず免疫染色法を利用して細胞表面提示量の解析を行った (図 3-5)。第 2 章で GluR 発現量が提示量に影響することが明らかとなっている。そのため、GFP 蛍光が高い細胞 (RFU>30) の細胞を用いて解析を行った。NBQX 添加培養した細胞における免疫染色の蛍光強度は、通常培地で培養した場合の蛍光強度と有意な差がないことが明らかとなった。この結果より、NBQX 添加培養は細胞表面提示に影響を与えないことが示された。

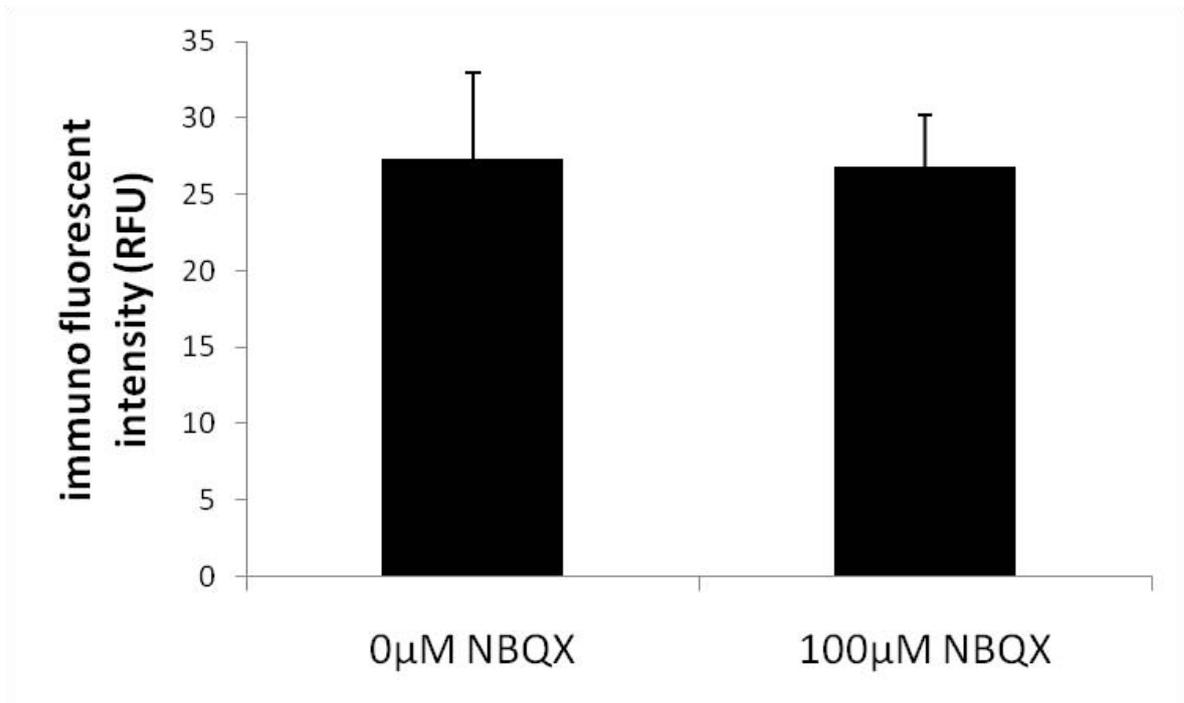


図 3-5 NBQX 添加培養時における GluR の細胞表層提示量の解析

### 3-6-2 NBQX 添加培養時のイオン流入特性解析

イオン蛍光プローブを用いて NBQX 添加培養時のイオン流入特性解析を行った。イオン流入測定を行う前に HBSS で培地をしっかりと洗浄後、イオン流入測定を行った。グルタミン酸および NBQX 適用時のイオン流入挙動を図 3-6 に示す。グルタミン酸を適用した場合、大きなイオン流入が観察された。これは測定前に HBSS で洗浄を行ったため、培養中に結合した NBQX が GluR から解離し、その後に適用したグルタミン酸が GluR に作用することが可能となり、イオン流入を引き起こしたと考えられる。また HBSS で洗浄後、10 分間  $100 \mu\text{M}$  NBQX (in HBSS) で処理し、その後グルタミン酸を適用した場合、NBQX 処理を行っていない細胞に比べ、イオン流入が大きく減少した。そのため、NBQX 添加培養した細胞でも、アンタゴニストの解析が可能であることが明らかとなった。これらの結果より、NBQX 添加培養した場合でも、培地をしっかりと洗浄することにより、GluR から NBQX が解離し、その後アゴニストやアンタゴニストの解析が可能になることが示された。

次に NBQX 添加培養した場合のイオン流入量の解析を行った。NBQX 濃度が増加するに伴い、イオン流入量が増加することが示された (図 3-7)。また NBQX 添加培養した場合のグルタミン酸濃度依存の解析を行った (図 3-8[a])。全てのグルタミン酸濃度において、NBQX 添加培養した場合イオン流入量が増加することが明らかとなった。また、NBQX 添加培養した場合としていない場合のそれぞれの  $2\text{mM}$  Glu 適用した場合のイオン流入量を 100 とした場合のそれぞれのイオン流入量を解析した(図 3-8[b])。NBQX 添加培養した細胞と通常培地で培養した細胞における Glu Dose Curve はほぼ一致することが示された。この結果より、NBQX は GluR の結合特性に影響を与えないことが示唆された。モデル細胞におけるイオン流入量には、活性化したレセプターの数と個々のレセプターから

のイオン流入量が関与していると考えられる。NBQX 添加培養は細胞表面提示量や GluR の結合特性に影響がないため、NBQX 添加培養によるイオン流入増幅には個々のレセプターからのイオン流入量の増加が関与していると考えられる。NBQX 添加培養により、膜電位を正常に保つことができ、イオン流入が増加したのではないかと考えられる。

無← イオン流入 →大

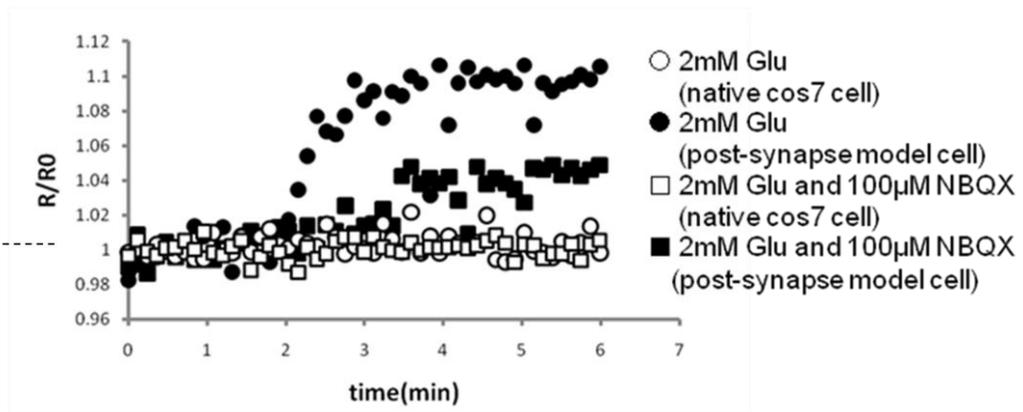


図 3-6 NBQX 添加培養した細胞におけるイオン流入挙動

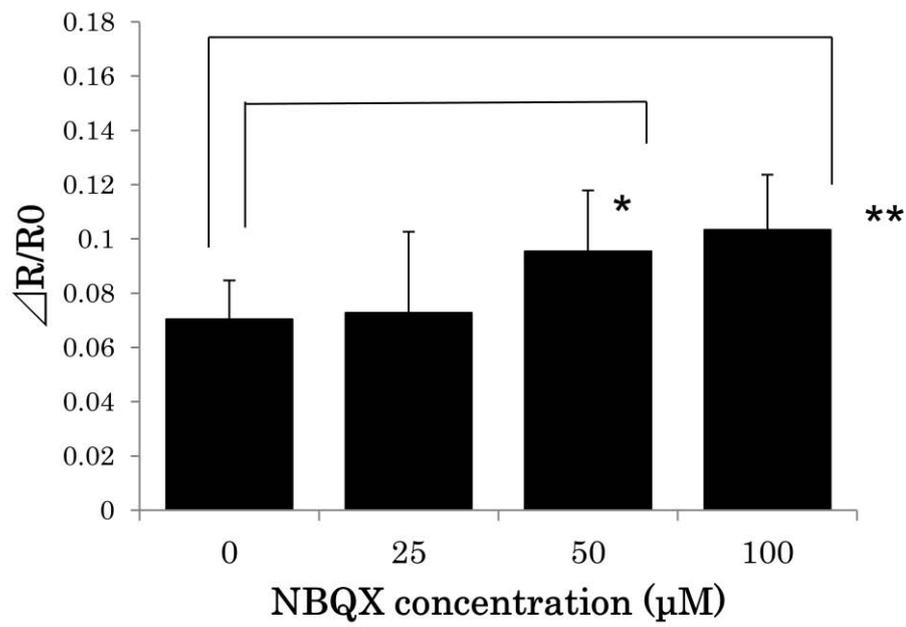
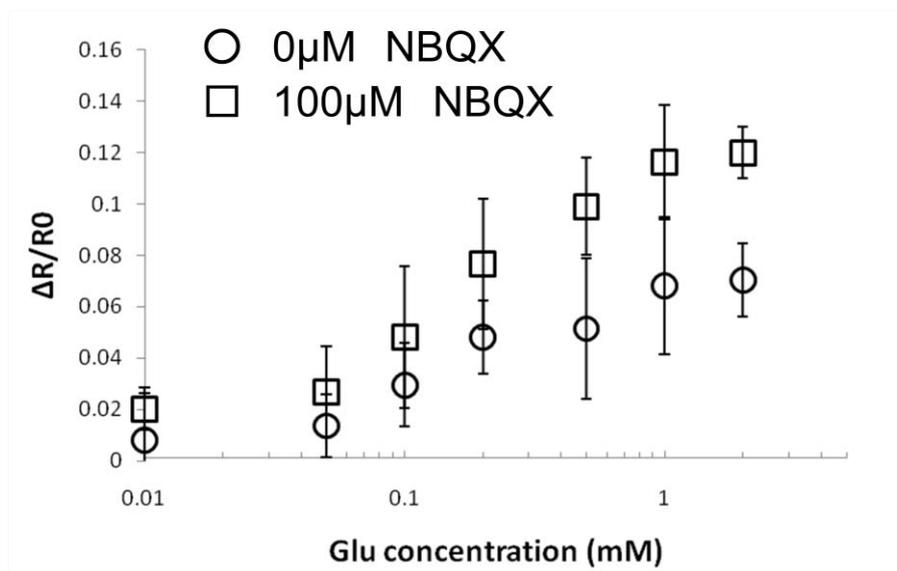


図 3-7 NBQX 添加培養時のイオン流入量

[a]



[b]

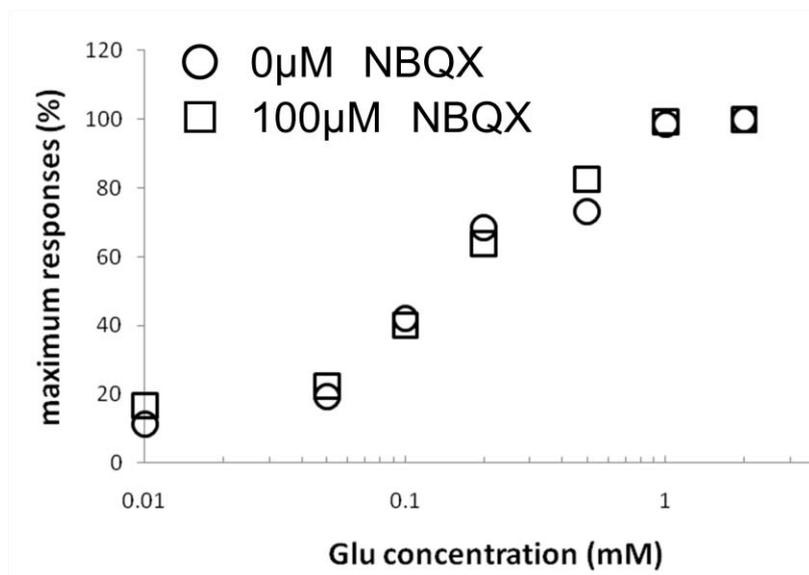


図 3-8 イオン流入量のグルタミン酸濃度依存

[a]各濃度 Glu 適用時のイオン流入量

[b] 2mMGlu 適用時を 100 とした場合の

各濃度 Glu 適用時のイオン流入の割合

### 3-7 結言

本章では NBQX のレセプター保護作用に着目し、モデル細胞における安定培養系の確立を試みた。NBQX 添加培養により、培地中のグルタミン酸の GluR への作用に伴うグルタミン酸毒性を低減でき、安定に培養し得ることが示された。また NBQX 添加培養により、膜電位を正常に保つことができ、細胞応答増幅できることが示唆された。更に NBQX 添加培養は GluR の薬剤の結合特性に影響を与えないため、薬剤解析に適用できることが示された。G タンパク系を含む GluR 発現細胞はグルタミン酸毒性の影響を受けるため、GluR をターゲットとした薬剤を解析するための測定法の構築が難しいという課題がある。本章で報告した NBQX 添加培養のように、レセプター機能を抑制した培養方法を確立することにより、グルタミン酸毒性を低減でき、GluR をターゲットとした測定法の開発の発展が期待できる。

## 参考文献

1. Bogdanov, A. M.; Bogdanova, E. A.; Chudakov, D. M.; Gorodnicheva, T. V.; Lukyanov, S.; Lukyanov, K. A., Cell culture medium affects GFP photostability: a solution. *Nat Methods* 2009, 6 (12), 859-60.
2. Tang, Y. J.; Li, H. M.; Hamel, J. F., Significances of pH and temperature on the production of heat-shock protein glycoprotein 96 by MethA tumor cell suspension culture in stirred-tank bioreactors. *Bioprocess Biosyst Eng* 2009, 32 (2), 267-76.
3. Hanson, M. A.; Ge, X.; Kostov, Y.; Brorson, K. A.; Moreira, A. R.; Rao, G., Comparisons of optical pH and dissolved oxygen sensors with traditional electrochemical probes during mammalian cell culture. *Biotechnol Bioeng* 2007, 97 (4), 833-41.
4. Lee, G. J.; Choi, S. K.; Eo, Y. H.; Kang, S. W.; Choi, S.; Park, J. H.; Lim, J. E.; Hong, K. W.; Jin, H. S.; Oh, B. S.; Park, H. K., The effect of extracellular glutamate release on repetitive transient ischemic injury in global ischemia model. *Korean J Physiol Pharmacol* 2009, 13 (1), 23-6.
5. Quirion, R., Cholinergic markers in Alzheimer disease and the autoregulation of acetylcholine release. *J Psychiatry Neurosci* 1993, 18 (5), 226-34.
6. Rawls, S. M.; Thomas, T.; Adeola, M.; Patil, T.; Raymondi, N.; Poles, A.; Loo, M.; Raffa, R. B., Topiramate antagonizes NMDA- and AMPA-induced seizure-like activity in planarians. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2009, 93 (4), 363-367.
7. Fatokun, A. A.; Stone, T. W.; Smith, R. A., Adenosine receptor ligands protect against a combination of apoptotic and necrotic cell death in cerebellar granule neurons. *Exp Brain Res* 2008, 186 (1), 151-60.
8. Tavakoli-Far, B.; Rahbar-Roshandel, N.; Rahimi-Moghaddam, P.; Mahmoudian,

- M., Neuroprotective effects of mebudipine and dibudipine on cerebral oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2009, 610 (1-3), 12-7.
9. Catarzi, D.; Colotta, V.; Varano, F., Competitive AMPA receptor antagonists. *Med Res Rev* 2007, 27 (2), 239-78.
10. Armstrong, N.; Gouaux, E., Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron* 2000, 28 (1), 165-81.
11. Jones, K. H.; Senft, J. A., An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem* 1985, 33 (1), 77-9.

## 第 4 章

stargazin 共発現したポスト-シナプスモデル  
細胞の構築と細胞応答増幅の検討

#### 4-1. 緒言

細胞バイオセンサの薬剤作用を正確に解析するためには、センサの S/N 比の向上が求められる。しかしながら、一般的に細胞の応答は微弱であり、その検出が難しい。近年、様々な細胞バイオセンサが報告されている<sup>1-3</sup>が、その多くにおいて、S/N 比に課題があることが多い。このような課題に対し、センサ側を改良し、センサの感度向上に取り組む研究は数多く報告されている<sup>4-6</sup>が、本研究では細胞の応答自体を増幅することにより、細胞バイオセンサにおける S/N 比の向上に寄与できるのではないかと考えた (図 4-1)。

モデル細胞における細胞応答増幅には大きく (1) レセプター量を増加させる (2) 個々のレセプターからのイオン流入量を増加させるという 2 つのアプローチが考えられる。しかしながら第 2 章で一定以上の発現量になると細胞膜上のレセプター数は飽和し、それに伴い細胞応答も飽和することが明らかとなっている。そのため、単純にレセプター数を増加させても一定以上細胞応答を増幅し得ないことが明らかとなった。そこで今回我々は、AMPA 型グルタミン酸レセプター調節蛋白質 (TARPs) の一種である *stargazin*<sup>7, 8</sup> に着目した。*stargazin* は GluR の脱感作や脱活性化を阻害することにより、GluR の活性時間を増加し、個々のレセプターからのイオン流入を増加させる働きを保持している。そこで本章では *stargazin* 共発現モデル細胞を構築し、モデル細胞における細胞応答の増幅を試みた。

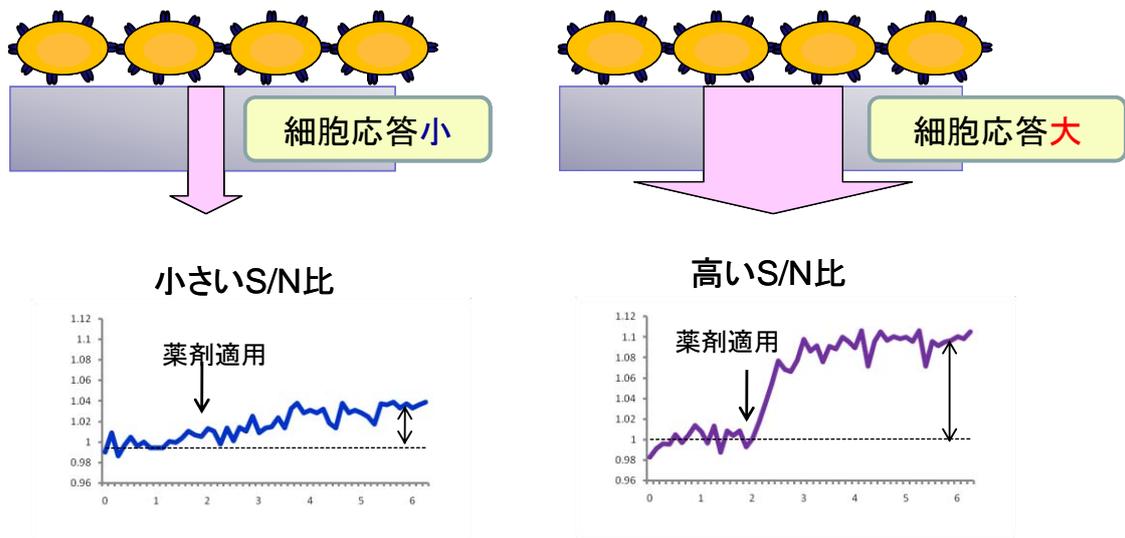


図 4-1 細胞応答増幅による細胞バイオセンサの S/N 比の向上

#### 4-2. stargazin

近年、AMPA 受容体の補助サブユニットとして TARP (transmembrane AMPA receptor regulatory protein) とよばれる補助サブユニットが同定されてきた<sup>9</sup>。現在までに stargazin ( $\gamma$ -2) の他、 $\gamma$ -3,  $\gamma$ -4,  $\gamma$ -5,  $\gamma$ -7,  $\gamma$ -8 の 6 つのファミリーが同定されている。stargazin を含む TARP は 4 回膜貫通型の膜タンパク質 (図 4-2) で、AMPA 受容体の物理学的な特性を修飾することが報告されている。グルタミン酸適用後、グルタミン酸との結合によりチャネルが開いた後、グルタミン酸が結合部位から外れる (脱活性) および受容体の細胞内への取り込みやリガンドへの親和性の低下等 (脱感作) によりチャネルが閉じ、受容体は不活性化する。stargazin を含む TARP は脱活性化および脱感作の過渡特性を遅くすることにより、チャネルが開いている時間を長くする<sup>10-13</sup>。そのため、この stargazin を共発現することにより、モデル細胞膜上のレセプターからのイオン流入が増加し、細胞応答を増幅がし得ると考えた。

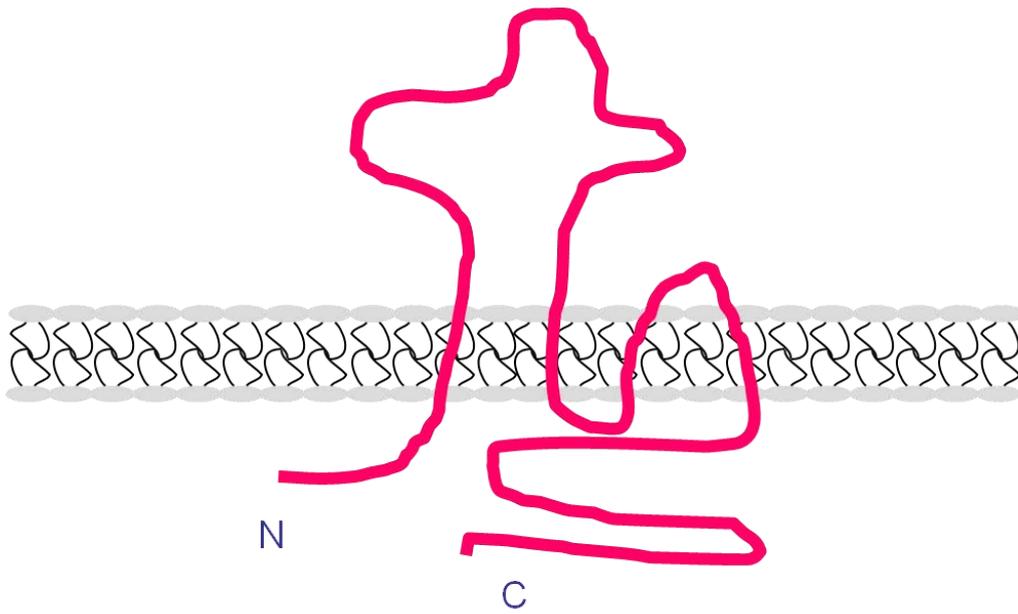


図 4-2 stargazin の構造

## 4-2. 実験方法

### 4-2-1. モデル細胞の構築

pHluorin-GluR ( $\Delta 22-402$ ) -stag 遺伝子はフィンランド、ヘルシンキ大学の Kari Keinanen 教授より提供いただいた。2 つの遺伝子をそれぞれ、制限酵素を用いて pcDNA3.0 ベクター (invitrogen) にクローニングした(図 4-3)。構築した遺伝子はそれぞれ 2-4-3 と同様の方法で Cos7 細胞に導入した。遺伝子導入 4 時間後、DMEM(10%FBS・50U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン・100  $\mu$  M NBQX)培地に交換し、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養した。

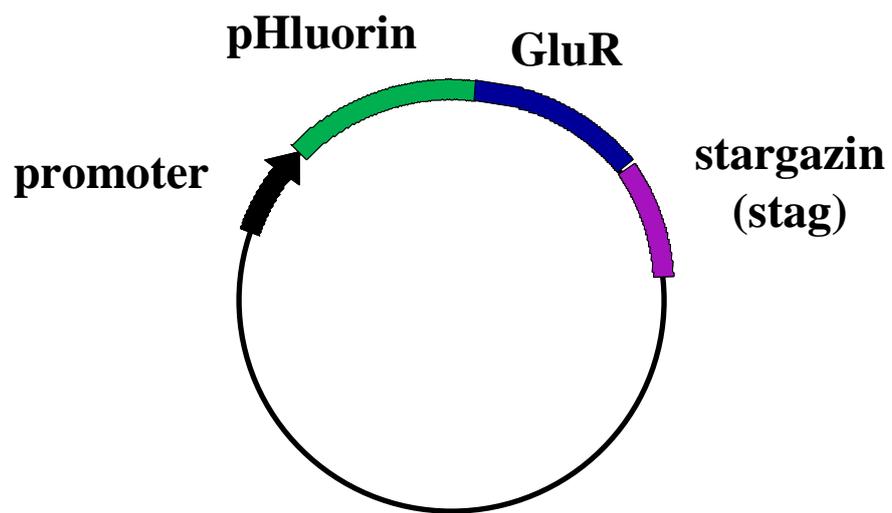


図 4-3 pHluorin-GluR-stargazin ベクター

#### 4-2-2. 免疫染色法による細胞表面提示確認

免疫染色法により GluR および stargazin の細胞表面提示確認を行った。一次抗体として、Anti GFP Rabbit IgG (Sigma)、および Anti stargazin Rabbit IgG (Sigma) を用い、二次抗体には Rhodamine 標識された Anti Rabbit IgG (Sigma) を用いた。測定前日に 37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 0.01% フィブロネクチン/PBS 溶液中に浸漬したスライドガラスに細胞を播種した。CO<sub>2</sub> インキュベータ内 37°C で一晩培養後、HBSS により培地成分を洗浄した。その後、3%ホルムアルデヒド溶液を用い、室温で 10 分間処理することにより細胞の固定を行った。その後ブロッキング剤として Super Block Blocking buffer (Bio Rad) を用い、ブロッキング処理を 30 分間行った。HBSS で 3 回洗浄した後、一次抗体反応を 1 時間行い、HBSS で 3 回洗浄し、二次抗体反応 1 時間行った。その後、再び HBSS で洗浄し、落射型蛍光顕微鏡 (Nikon) による観察を行った。

#### 4-2-3. イオン流入測定

GluR からのイオン流入は Ca<sup>2+</sup> 蛍光プローブである Fura-2/AM(invitrogen) を用いて観察した。測定前日にガラスボトムディッシュ (IWAKI) に細胞を播種した。細胞接着を確認し、5 $\mu$ M の Fura-2/AM を加えた HBSS を細胞に負荷し、37°C でインキュベートすることで細胞内へ Fura-2/AM を導入した。3 時間培養後、HBSS に置換し、測定を行った。

Fura-2 を 340nm と 380nm の励起光で励起した際の 510nm の蛍光を測定し、そのときの蛍光強度の比である 340/380 をモニタリングした。測定開始 120 秒後に薬剤を滴下し、その後の細胞内のカルシウムイオン濃度変化を計測した。

#### 4-3. stargazin 共発現細胞の GluR 機能解析

GluR および stargazin の細胞表層提示は免疫染色法により確認を行った(図 4-4)。遺伝子導入確認は pH 感受性 GFP である pHluorin<sup>14</sup> の蛍光を指標とした。GluR の細胞表層提示は上流に導入した pHluorin を認識する Anti GFP 抗体を用いて観察した。免疫染色法により蛍光が観察されており、GluR および stargazin が細胞膜上に提示されていることが確認された。

次に構築した stargazin 共発現細胞の GluR 機能を Ca<sup>2+</sup> 蛍光プローブである Fura-2 を用いて解析した。リガンドであるグルタミン酸適用後、大きなイオン流入が観察されており、グルタミン酸と結合し、イオン流入を引き起こす GluR 本来の機能をきちんと保持していることが確認された (図 4-5)。

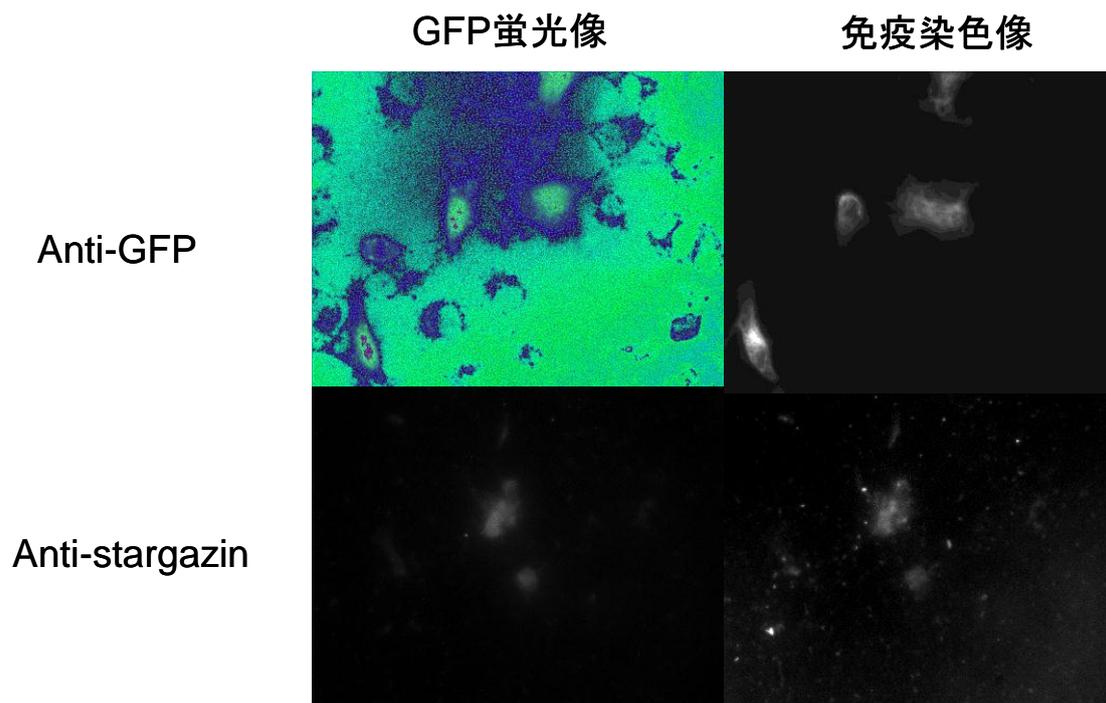


図 4-4 免疫染色法による GluR および stargazin の細胞表面提示確認

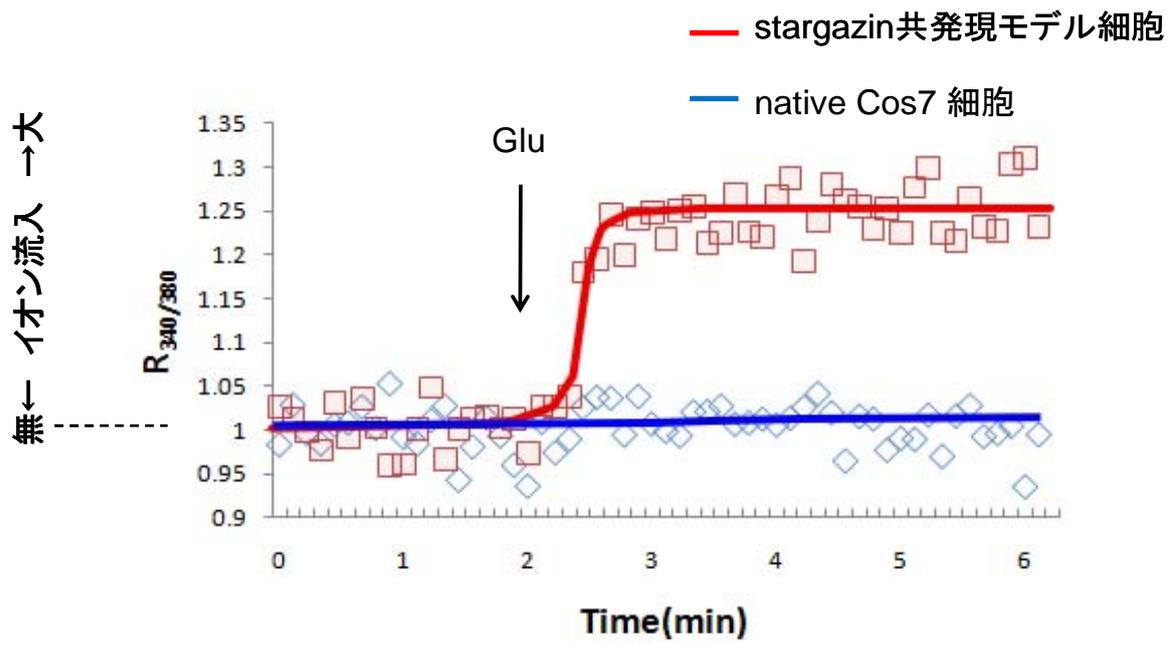


図 4-5 stargazin 共発現モデル細胞におけるイオン流入挙動

#### 4-4. stargazin 共発現によるイオン流入の増幅

stargazin を共発現した場合と共発現させていない場合でのイオン流入量の比較を行った。stargazin を共発現させた場合、共発現させていない場合に比べ、イオン流入が大きく増大することが明らかとなった(図 4-6)。stargazin は GluR の脱感作と脱活性化を阻害することで、GluR の活性時間を増大し、シングルチャンネルコンダクタンスを増大させる機能を保持していることが明らかとなっている。この結果より、stargazin を共発現させることで、モデル細胞応答を増幅することが可能であることが示された。

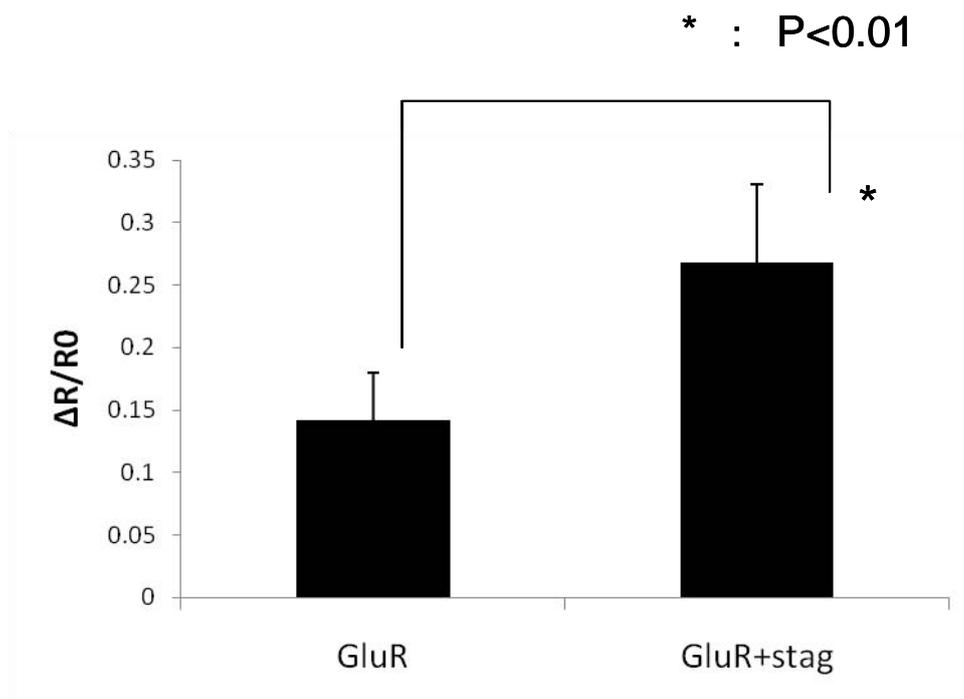


図 4-6 stargazin 共発現の有無によるイオン流入量の比較

#### 4-5. 結言

本章では S/N 比の高い細胞バイオセンサ構築を目指し、モデル細胞における細胞応答増幅に必要な分子機能の検討を行った。近年、モデル細胞のようにレセプター強制発現細胞と測定系とを組み合わせた細胞バイオセンサが多数報告されている。しかしながら、細胞の応答は微弱であり、S/N 比の低さが大きな課題となっている。そのため、レセプター強制発現細胞における細胞応答を増幅させることは重要な課題である。レセプター発現量を増加させるというアプローチは、細胞膜上に提示できるレセプター量に制限があるため、一定以上の細胞応答の増幅は見込めないことが第 2 章で明らかとなっている。本章では GluR のシングルチャネルコンダクタンスを向上させる機能を持つ stargazin に着目し、stargazin を共発現したモデル細胞の構築を行った。Stargazin を共発現した細胞では、イオン流入量が大きく増大することが明らかとなった。そのため、stargazin 共発現のように異種タンパク共発現によるアプローチによって、細胞応答増幅が可能となり、モデル細胞を含むレセプター強制発現細胞を用いたバイオセンサにおける S/N 比向上が可能になることが示唆された。

## 参考文献

1. Asphahani, F.; Thein, M.; Veiseh, O.; Edmondson, D.; Kosai, R.; Veiseh, M.; Xu, J.; Zhang, M., Influence of cell adhesion and spreading on impedance characteristics of cell-based sensors. *Biosens Bioelectron* 2008, *23* (8), 1307-13.
2. Veiseh, M.; Veiseh, O.; Martin, M. C.; Bertozzi, C.; Zhang, M., Single-cell-based sensors and synchrotron FTIR spectroscopy: a hybrid system towards bacterial detection. *Biosens Bioelectron* 2007, *23* (2), 253-60.
3. Wu, P.; Grainger, D. W., Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis. *Biomaterials* 2006, *27* (11), 2450-67.
4. Soleymani, L.; Fang, Z. C.; Sargent, E. H.; Kelley, S. O., Programming the detection limits of biosensors through controlled nanostructuring. *Nature Nanotechnology* 2009, *4* (12), 844-848.
5. Inoue, K. Y.; Ino, K.; Shiku, H.; Kasai, S.; Yasukawa, T.; Mizutani, F.; Matsue, T., Electrochemical monitoring of hydrogen peroxide released from leucocytes on horseradish peroxidase redox polymer coated electrode chip. *Biosens Bioelectron* 25 (7), 1723-8.
6. He, Q.; Sudibya, H. G.; Yin, Z.; Wu, S.; Li, H.; Boey, F.; Huang, W.; Chen, P.; Zhang, H., Centimeter-long and large-scale micropatterns of reduced graphene oxide films: fabrication and sensing applications. *ACS Nano* 4 (6), 3201-8.
7. Chen, L.; Chetkovich, D. M.; Petralia, R. S.; Sweeney, N. T.; Kawasaki, Y.; Wenthold, R. J.; Brecht, D. S.; Nicoll, R. A., Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature*

2000, *408* (6815), 936-43.

8. Vandenberghe, W.; Nicoll, R. A.; Brecht, D. S., Stargazin is an AMPA receptor auxiliary subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, *102*(2), 485-90.

9. Tomita, S.; Chen, L.; Kawasaki, Y.; Petralia, R. S.; Wenthold, R. J.; Nicoll, R. A.; Brecht, D. S., Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *Journal of Cell Biology* 2003, *161* (4), 805-816.

10. Tomita, S.; Adesnik, H.; Sekiguchi, M.; Zhang, W.; Wada, K.; Howe, J. R.; Nicoll, R. A.; Brecht, D. S., Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. *Nature* 2005, *435* (7045), 1052-1058.

11. Turetsky, D.; Garringer, E.; Patneau, D. K., Stargazin modulates native AMPA receptor functional properties by two distinct mechanisms. *J Neurosci* 2005, *25* (32), 7438-48.

12. Priel, A.; Kollekter, A.; Ayalon, G.; Gillor, M.; Osten, P.; Stern-Bach, Y., Stargazin reduces desensitization and slows deactivation of the AMPA-type glutamate receptors. *J Neurosci* 2005, *25* (10), 2682-6.

13. Yamazaki, M.; Ohno-Shosaku, T.; Fukaya, M.; Kano, M.; Watanabe, M.; Sakimura, K., A novel action of stargazin as an enhancer of AMPA receptor activity. *Neurosci Res* 2004, *50* (4), 369-74.

14. Miesenbock, G.; De Angelis, D. A.; Rothman, J. E., Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 1998, *394* (6689), 192-195.

## 第 5 章

### 主成分分析法 (PCA) を用いた薬剤解析法の構築

## 5-1. 緒言

細胞バイオセンサにおいて、分子認識素子である細胞の状態やタンパク発現のゆらぎ、薬剤を適用しても応答しない細胞（non-responding 細胞）の混在、測定時のノイズなど様々な要因によって、薬剤の効果を正確に分析することは難しい。モデル細胞における細胞応答（イオン流入）挙動を図 5-1 に示す。薬剤を適用しても応答しない細胞やノイズを含む細胞、ベースラインが増加している細胞などが混在することが見て取れる。そのため、薬剤作用や効果を定量的に比較することが困難であった。第 4 章までは適切な細胞設計というアプローチによってこのような課題に取り組んできたが、本章ではデータ解析手法からのアプローチを行った。そこで本研究では、経時変化などの多量な情報から得られる波形データを解析する手法である主成分分析（PCA）や階層的クラスタ分析（HCA）などのケモメトリクス手法<sup>1</sup>に着目した。本章ではモデル細胞から得られたイオン流入挙動とケモメトリクス手法とを組み合わせることにより、薬剤作用・効果の詳細な解析を試みる。

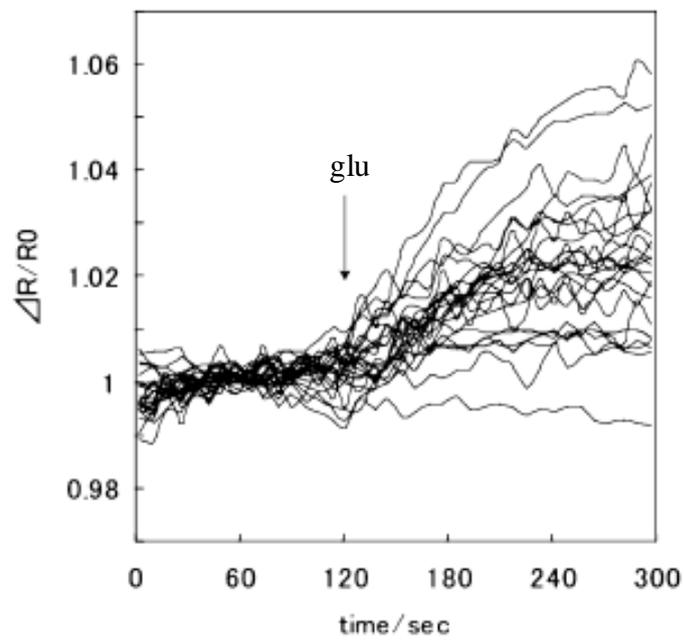


図 5-1 モデル細胞におけるイオン流入挙動

## 5-2. 主成分分析 (PCA)

モデル細胞に薬剤を適用した際、図 5-1 のようなイオン流入挙動を示す。このイオン流入挙動の波形は各測定時間ごとイオン蛍光プローブの蛍光強度から成り立っている。つまり各時間での蛍光強度の一つ一つが細胞の状態や薬剤の作用・効果を表していると考えられる。このように各サンプルの特性を表す数値を説明変数という。つまりイオン流挙動の波形は複数の説明変数から成る多変量データ<sup>2</sup>であるといえる (表 5-1)。第 4 章までのイオン流入の定量化には、特定の時間における説明変数 (SBFI 蛍光強度) の値を平均化する方法を用いていたが、測定の際のノイズやベースラインの増加、蛍光強度増加の傾き等の情報が含まれていないため、正確に細胞の状態や測定時のノイズを考慮した形で薬剤の効果・作用を定量化しているとは言い難い。そのため、薬剤の効果・作用を正確に解析するためには、イオン流入挙動全体を解析する必要がある。先に述べたようにイオン流入挙動の波形は多変量のデータである。変数が 2 個である場合、各説明変数を軸とし、プロットすることで、2 次元でサンプル間の関係性を表わすことが可能である。しかし多変量のデータの場合、多次元での比較になるため、サンプル間の比較が困難である (図 5-2)。このような多変量データを解析する手法として主成分分析 (principal component analysis; PCA) 法に着目した。PCA により多変量データを解析することで、この多次元のデータを 2 次元に圧縮することで、サンプル間の比較が容易となる。この手法は、IR や NMR を用いた波形による構造分析結果を解析することで、反応にもっとも関与する反応構造の特定や、目的化合物の反応メカニズムを特定する方法として、近年用いられている<sup>3-6</sup>。

PCA は、複数の変数間の相関 (共分散) を少数の合成変数で説明することが可能である。また PCA は、共分散行列の固有値問題の解として得ることができる

(式(1))。Figure5-3 に上記の概念図を示す。

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P} + \mathbf{E} \dots \dots \dots \text{式(1)}$$

$\mathbf{X}$  は、サンプルの各説明変数の数値データを表わした行列である。これらをスコア行列  $\mathbf{T}$  とローディング行列  $\mathbf{P}$  に分裂させることで得られる<sup>7-10</sup>。スコアはサンプル間の類似性に関する情報を含んでおり、ローディングはサンプル間の類似性にどの説明変数が大きく影響しているかを表している。今回我々はこのスコアに着目し、薬剤の効果・作用への応用を試みた。

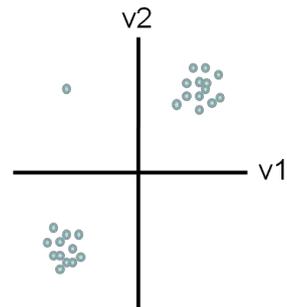
表 5-1 イオン流入挙動におけるデータ

	SBFI蛍光強度 (0 sec)	SBFI蛍光強度 (5 sec)	SBFI蛍光強度 (n sec)
サンプル1	F10	F15	F1n
サンプル2	F20	F25	F2n
サンプルm	Fm0	F25	Fmn


  
説明変数

変数が2つの場合

		説明変数	
		v1	v2
サンプル	a	---	---
	b	---	---
		⋮	⋮
		⋮	⋮
		⋮	⋮



- 2次元で表すことができる為
- ・ サンプル間の類似性が明解
  - ・ アウトライナーの除去

変数が増えると . . .

		説明変数
サンプル	X	



- ???
- 2次元で表すことが不可能
- ・ サンプル間の比較が困難

図 5-2 多変量データの相関比較図

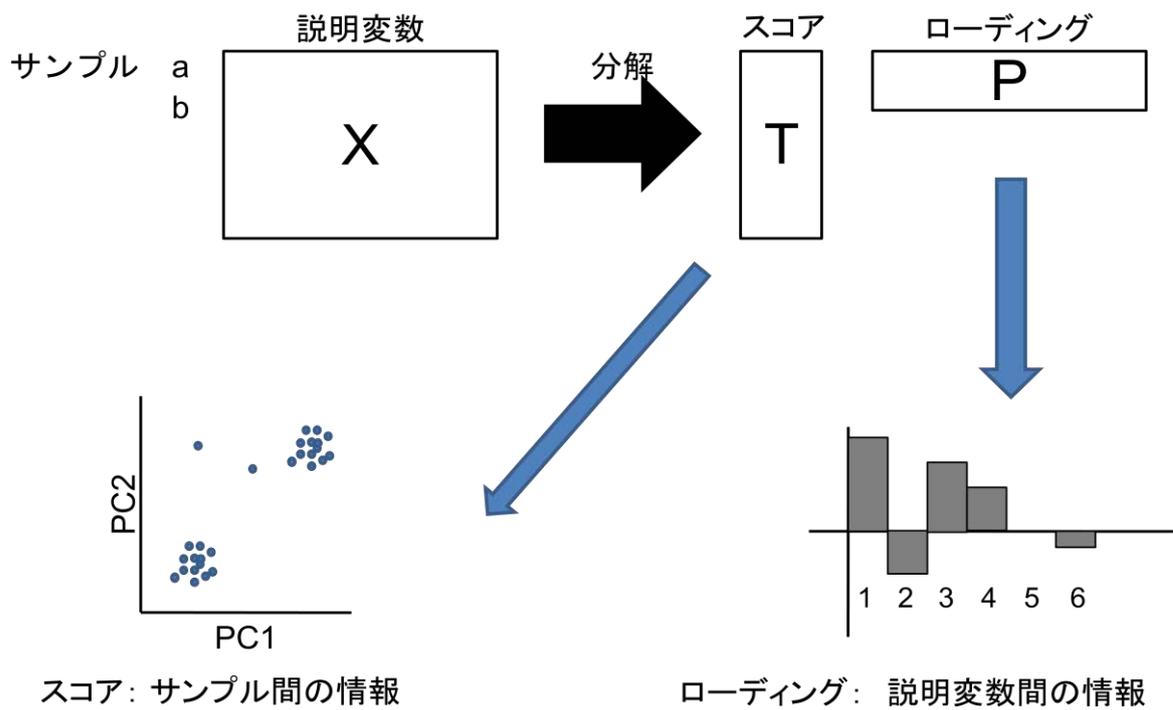


図 5-3 PCA の概念図

### 5-3. 階層的クラスター分析 (HCA)

階層的クラスター分析では 5-2 で得られたスコア間の全ての距離を計算した後に、各距離を比較する手法である<sup>11-13</sup>。スコアの距離が比較的短い場合、それらのサンプルが似ていることを示し、逆に、似ていないサンプルは、距離が比較的長くなる。全てのサンプル間のスコアの距離が計算された後、最初に最も近い 2 つのサンプルがリンクされる。クラスターと他のクラスターがリンクされると、新しい単一のクラスターが作成される。この新しいクラスターと他のクラスターとの間の距離が計算されたあとで、一番小さいクラスターの間の距離を再び見つけ出そうとし、他のリンクが作られる。この作業は全てのサンプル(またはクラスター)がリンクされるまで続けられる。このようにして図 3-2 のような樹形図 (デンドログラム) が作成される。クラスターをリンクしている枝(Branch)の長さは、両者の類似性と関係している。枝が長いほど類似性が弱くなり、反対に短いほど類似性が強くなり、クラスター間の距離が狭くなる。そのため、HCA を用いることでサンプル間の類似性を解析することが可能である。

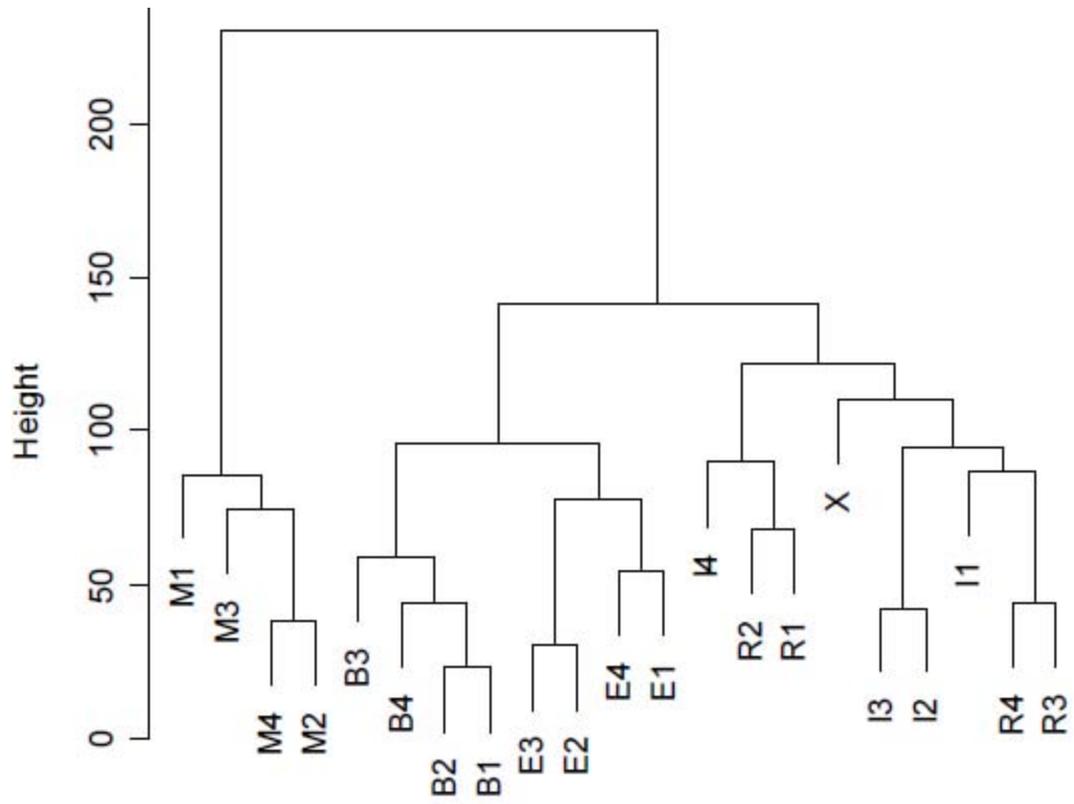


図 5-4 HCA の概念図

## 5-4. 実験方法

### 5-4-1. モデル細胞構築および培養

ires-GluR/GFP 遺伝子の Cos7 細胞への導入は 2-4-3 と同様の方法で行った。遺伝子導入 4 時間後、DMEM(10%FBS・50U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン・100  $\mu$ M NBQX)培地に交換し、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養した。

### 5-4-2. イオン流入測定

イオン流入測定にはナトリウムイオン蛍光指示薬である SBFI/AM (invitrogen) を使用した。測定前日にガラスボトムディッシュ (IWAKI) に細胞を播種した。細胞接着を確認し、5 $\mu$ M の SBFI/AM を加えた HBSS を細胞に負荷し、37°C でインキュベートすることで細胞内へ SBFI を導入した。3 時間培養後、HBSS に置換し、測定を行った。

SBFI を 340nm と 380nm の励起光で励起した際の 510nm の蛍光を測定し、そのときの蛍光強度の比である F340/F380 を 8 秒毎に計測した。測定開始 120 秒後に薬剤を滴下し、その後の細胞内のナトリウムイオン濃度変化を計測した。

### 5-4-3. データ解析

説明変数として各時間での SBFI の蛍光強度 (F340/F380) を用いた。R 言語により統計数値解析プログラミングを組み、PCA および HCA を行った。

## 5-5. HCA による non-responding 細胞の同定

0mM および 2mM の Glu を適用し、得られたイオン流入挙動を HCA により解析した (図 5-5)。HCA により大きく 2 つのクラスターに分類された。右側のクラスターには 2mM グルタミン酸適用サンプルのみが分類される一方、左側のク

クラスターには 0mM および 2mM グルタミン酸が混在した。この結果は左側のクラスター内に分類された 2mM サンプルのイオン流入挙動は、グルタミン酸を適用していない場合のイオン流入挙動と類似性があることを示している。細胞群には、細胞状態や活性等により、薬剤を適用しても応答しない non-responding 細胞が混在している。そのため、左側のクラスターに分類されたサンプルは non-responding 細胞であると考察した。この結果より HCA 解析を応用することで nonresponding 細胞を同定し得ることが示唆された。

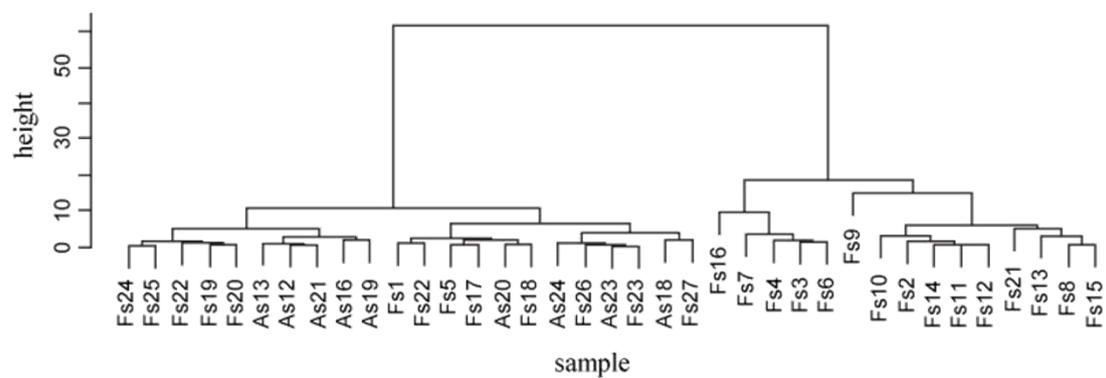


図 5-5 0mM および 2mM グルタミン酸適用時の HCA 解析

(As) 0mM サンプル (Fs) 2mM サンプル

#### 5-6. 各濃度グルタミン酸適用時の PCA による解析

各濃度グルタミン酸 (0-2mM) 適用時のイオン流入挙動を PCA による解析結果を図 5-6 示す。5-5 と同じ方法により、non-responding 細胞を同定し、行列式から取り除き、その後 PCA 解析を行った。0mM サンプルの PC 点は大きく右側に分類される一方、1.5mM および 2mM の PC 点は大きく左側に分類されることが示された。図 5-6(b)は 0-1mM サンプルのみを PCA 解析した結果を示している。各グルタミン酸濃度に依存した PC 点を得られた。この結果より、PCA によりイオン流入挙動を解析することにより、薬剤活性を解析し得ることが示唆された。

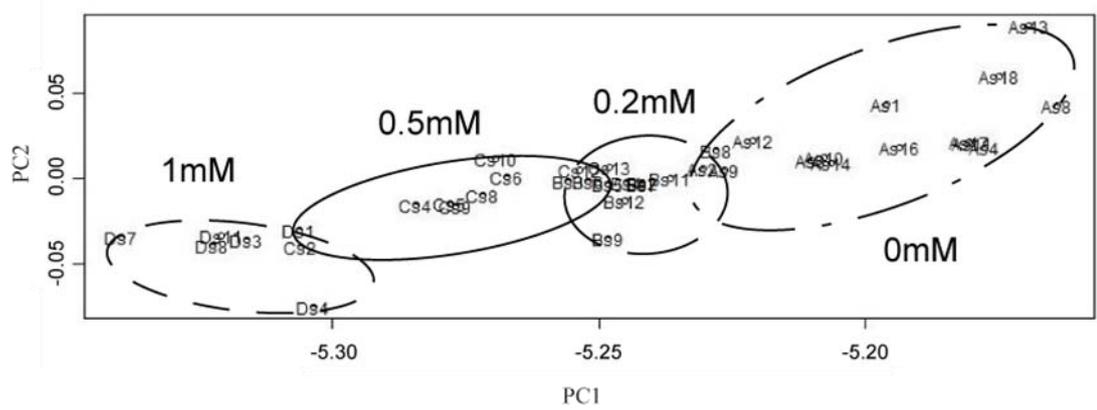
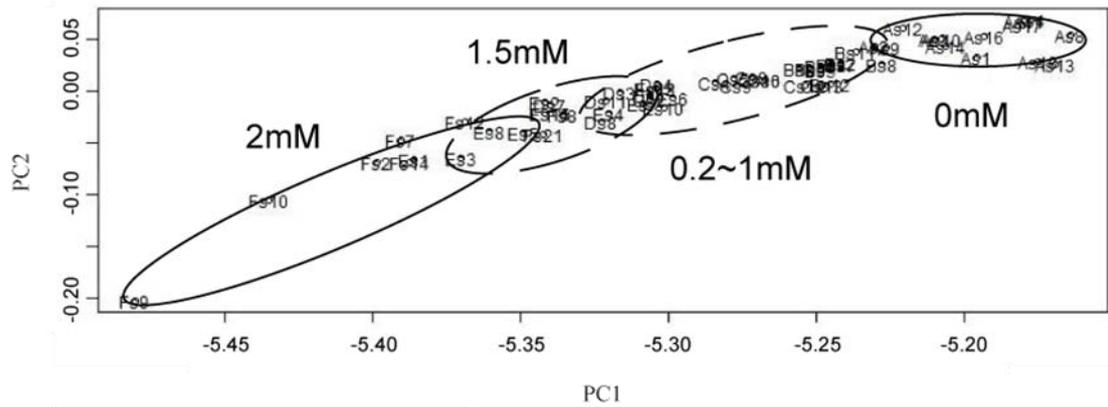


図 5-6 各濃度グルタミン酸適用時の PCA 結果

[a] 0-2mM グルタミン酸適用時の PCA 結果

[b] 0-1mM グルタミン酸適用時の PCA 結果

(As) 0mM (Bs)0.2mM (Cs) 0.5mM (Ds) 1mM (Es) 1.5mM (Fs) 2mM

## 5-7. PCA による薬剤活性解析

GluR の partial アゴニストであるカイニン酸および full アゴニストである AMPA をそれぞれ 2mM 適用した場合のイオン流入挙動を PCA によって解析した結果を図 5-7 に示す。full agonist は生体内のアゴニスト（グルタミン酸）と同じ効率でチャンネルを活性化するリガンドであり、partial agonist は飽和濃度を適用しても生体内アゴニスト波の効率ではチャンネルを活性しないリガンドである<sup>14, 15</sup>。AMPA の PC 点は 2mM グルタミン酸とほぼ同じ領域に分類された一方、カイニン酸は 0.5mM グルタミン酸と同じ領域に分類された。つまり、各アゴニストの活性の強さに依存した PC 点が得られたことが示された。

次に GluR のアンタゴニストである NBQX および DNQX をそれぞれ 100  $\mu$ M の濃度で 10 分間細胞に負荷し、その後 2mM グルタミン酸を適用した場合のイオン流入挙動を PCA により解析した結果を図 5-8 に示す。DNQX の PC 点は 0.5mM-1mM のグルタミン酸適用時の PC 点の領域に分類された一方、DNQX よりアンタゴニスト活性の強い NBQX を適用した場合の PC 点は 0.2mM グルタミン酸の領域に分類された。この結果よりアンタゴニストにおいても同様に各薬剤の強さに依存した PC 点が得られることが示された。つまりモデル細胞と PCA によるデータ解析手法を組み合わせることにより、薬剤解析に応用し得ることが示された。

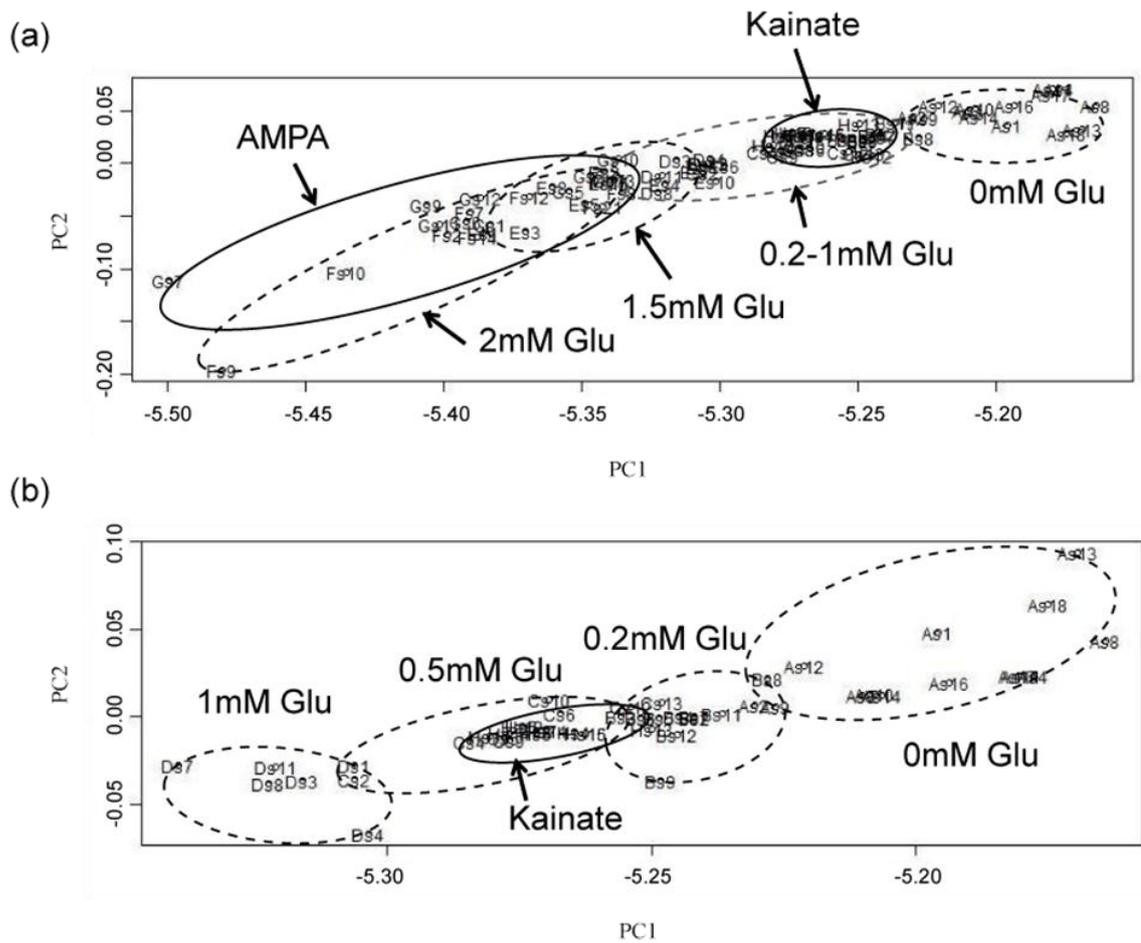


図 5-7 各アゴニスト適用時の PCA 解析結果

(Gs)AMPA (Hs)カイニン酸

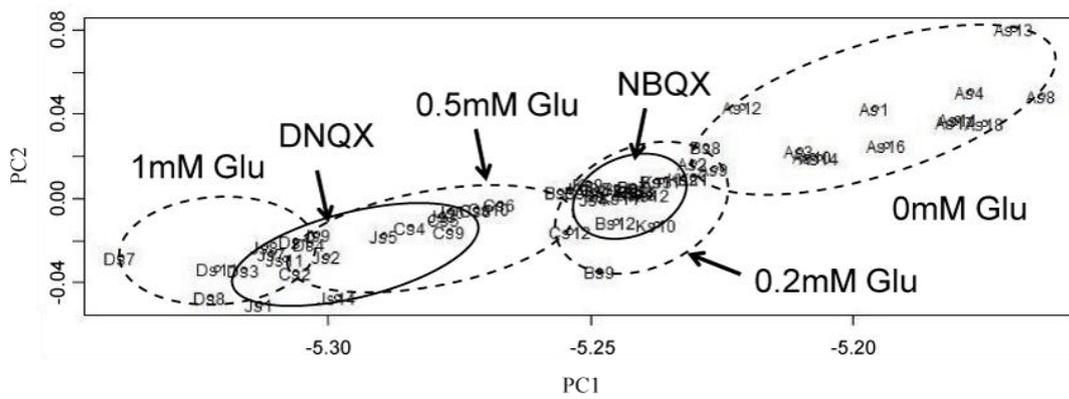


図 5-8 各アンタゴニスト適用時の PCA による解析結果

(Gs) DNQX (Ks) NBQX

## 5-7. 結言

本章ではケモメトリクス手法を駆使し、モデル細胞におけるイオン流入挙動から薬剤作用・効果の解析を行った。HCA を利用することにより、noon-responding 細胞を同定し得ることを示唆した。更に、PCA による解析により、アゴニスト・アンタゴニストの薬剤活性を解析できることが示された。細胞バイオセンサにおいて、測定時のノイズや個々の細胞の状態などの影響で、外部刺激に対応した細胞応答を正確に評価することが困難である場合が多い。本章で明らかにしたようにイオン流入波形の形状を比較することで、これまで困難であると考えられていた、細胞応答の定量、再現性の向上、正確な応答評価が可能であることが示された。そのためケモメトリクス手法を組み合わせることにより、細胞バイオセンサの応答挙動から薬剤の活性の強さの各情報を獲得できることが可能となり、高効率な薬剤解析への応用が期待できる。

## 参考文献

1. Lavine, B.; Workman, J., Chemometrics. *Anal Chem* 2008, 80 (12), 4519-31.
2. Yu, H.; Wu, Z. R.; Bao, T. F.; Zhang, L., Multivariate analysis in dam monitoring data with PCA. *Science China-Technological Sciences* 2010, 53 (4), 1088-1097.
3. Pan, Z. Z.; Gu, H. W.; Talaty, N.; Chen, H. W.; Shanaiah, N.; Hainline, B. E.; Cooks, R. G.; Raftery, D., Principal component analysis of urine metabolites detected by NMR and DESI-MS in patients with inborn errors of metabolism. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007, 387 (2), 539-549.
4. Manzano, E.; Navas, N.; Checa-Moreno, R.; Rodriguez-Simon, L.; Capitan-Vallvey, L. F., Preliminary study of UV ageing process of proteinaceous paint binder by FT-IR and principal component analysis. *Talanta* 2009, 77 (5), 1724-1731.
5. Navas, N.; Romero-Pastor, J.; Manzano, E.; Cardell, C., Raman spectroscopic discrimination of pigments and tempera paint model samples by principal component analysis on first-derivative spectra. *Journal of Raman Spectroscopy* 2010, 41 (11), 1486-1493.
6. Nevin, A.; Osticioli, I.; Anglos, D.; Burnstock, A.; Cather, S.; Castellucci, E., The analysis of naturally and artificially aged protein-based paint media using Raman spectroscopy combined with Principal Component Analysis. *Journal of Raman Spectroscopy* 2008, 39 (8), 993-1000.
7. Bessant, C.; Saini, S., A chemometric analysis of dual pulse staircase voltammograms obtained in mixtures of ethanol, fructose and glucose. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2000, 489 (1-2), 76-83.
8. Fend, R.; Bessant, C.; Williams, A. J.; Woodman, A. C., Monitoring

haemodialysis using electronic nose and chemometrics. *Biosensors & Bioelectronics* 2004, 19 (12), 1581-1590.

9. Thanaraj, T.; Terry, L. A.; Bessant, C., Chemometric profiling of pre-climacteric Sri Lankan mango fruit (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry* 2009, 112 (4), 786-794.

10. Fend, R.; Kolk, A. H. J.; Bessant, C.; Buijtelts, P.; Klatser, P. R.; Woodman, A. C., Prospects for clinical application of electronic-nose technology to early detection of *Mycobacterium tuberculosis* in culture and sputum. *Journal of Clinical Microbiology* 2006, 44 (6), 2039-2045.

11. Prasad, M. L.; Barbacioru, C. C.; Rawal, Y. B.; Husein, O.; Wen, P., Hierarchical cluster analysis of myoepithelial/basal cell markers in adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma. *Modern Pathology* 2008, 21 (2), 105-114.

12. Suzuki, N.; Sarikaya, M.; Ohuchi, F. S., Adsorption of genetically engineered proteins studied by time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS). Part B: hierarchical cluster analysis (HCA). *Surface and Interface Analysis* 2007, 39 (5), 427-433.

13. Alaiya, A. A.; Franzen, B.; Hagman, A.; Dysvik, B.; Roblick, U. J.; Becker, S.; Moberger, B.; Auer, G.; Linder, S., Molecular classification of borderline ovarian tumors using hierarchical cluster analysis of protein expression profiles. *International Journal of Cancer* 2002, 98 (6), 895-899.

14. Yakushiji, T.; Fukuda, T.; Oyama, Y.; Akaike, N., Effects of benzodiazepines and non-benzodiazepine compounds on the GABA-induced response in frog isolated sensory neurones. *Br J Pharmacol* 1989, 98 (3), 735-40.

15. Stromgaard, K.; Mellor, I., AMPA receptor ligands: Synthetic and pharmacological studies of polyamines and polyamine toxins. *Medicinal Research Reviews* 2004, 24 (5), 589-620.

## 第 6 章

### 結論

創薬市場において High through-put なセンシング技術が求められている。特に細胞センサ素子として利用した細胞バイオセンサは、High through-put な薬剤スクリーニングに応用可能な技術として期待されている。しかしながら、細胞の状態やタンパク発現量や細胞機能のゆらぎ、微弱な細胞応答など、様々な要因によって、細胞バイオセンサを用いて薬剤作用を定量的に解析することが難しい。細胞バイオセンサ構築において、その目的に応じて適切な解析モデル系を戦略的に構築することが重要である。本研究室では解析モデル系の構築が難しい中枢神経医薬 HTA に着目し、ポスト-シナプス機能を模倣した「ポスト-シナプスモデル細胞」の提唱と構築を推進している。本論文の目的はモデル細胞を細胞バイオセンサ素子として利用するための課題に着目し、細胞バイオセンサ構築に必要な分子機能の解明と戦略的構築を行うことである。また同時にデータ解析によるアプローチを組み合わせ、薬剤作用解析のためのシステム化を試みた。

第 2 章では再現性の高い細胞バイオセンサ構築を目指し、モデル細胞の細胞応答の安定化を試みた。GFP 共発現細胞を用いて、GluR 発現量と提示量の関係の解析を行い、GluR 発現量が高い細胞群では提示量は一定となるということが明らかとなった。また GluR 発現量高い細胞群ではイオン流入量は飽和し、比較的安定することが示された。つまり、GFP 蛍光を指標とし、GFP 蛍光量が高い細胞を用いることで、細胞間の応答の差異を低減できることが示された。

第 3 章では NBQX のレセプター保護作用に着目し、モデル細胞における安定培養系の確立を試みた。NBQX 添加培養により、培地中のグルタミン酸の GluR への作用に伴うグルタミン酸毒性を低減でき、安定に培養し得ることが示された。また NBQX 添加培養により、膜電位を正常に保つことができ、細胞応答増幅できることが示唆された。更に NBQX 添加培養は GluR の薬剤の結合特性に

影響を与えないため、薬剤解析に適用できることが示された。

第 4 章では S/N 比の高い細胞バイオセンサ構築を目指し、モデル細胞における細胞応答増幅に必要な分子機能の検討を行った。GluR のシングルチャネルコンダクタンスを向上させる機能を持つ stargazin に着目し、stargazin を共発現したモデル細胞の構築を行った。Stargazin を共発現した細胞では、イオン流入量が大きく増大することが明らかとなった。そのため、stargazin 共発現のように個々のレセプターからのイオン流入量を増加させるというアプローチによって、細胞応答増幅が可能となり、モデル細胞を細胞バイオセンサにおける S/N 比向上が可能になることが示唆された。

第 5 章ではケモメトリクス手法を利用してモデル細胞におけるイオン流入挙動から薬剤作用・効果の解析を行った。HCA を利用することにより、noon-responding 細胞を同定し得ることを示唆した。更に、PCA による解析により、アゴニスト・アンタゴニストの薬剤活性を解析できることが示された。これらの結果より、ケモメトリクス手法を駆使し、イオン流入挙動の形状を比較することで、これまで困難であると考えられていた、細胞応答の定量、再現性の向上、正確な応答評価が可能でことが示された。そのため、ケモメトリクス手法を組み合わせることにより、細胞バイオセンサの応答挙動から薬剤の活性の強さの各情報を獲得できることが可能となり、高効率な薬剤解析への応用が期待できることが示された。

以上本論文では、細胞バイオセンサにおいて適切なモデル細胞系およびデータ解析手法を組み合わせることの重要性について明らかにした。細胞バイオセンサは、医薬開発における新たな HTA 手法として期待が大きい。しかしながら、再現性や S/N 比等、様々な課題により、薬剤作用を定量的に解析することが難しいという課題がある。今後、我々が提唱する適切なモデル細胞設計およびデー

一タ解析の活用が広く浸透し、医薬品開発におけるリード化合物評価の HTA 化に寄与することを期待する。

## 謝辞

本論文は、九州工業大学大学院 生命体工学研究科 教授 春山哲也先生のご指導のもとに作成したものであり、多大なご指導、ご意見を賜りましたことに心より深く感謝いたします。

本論文をまとめるにあたり、九州工業大学大学院 生命体工学研究科 教授 尾川博昭 先生、准教授 加藤珠樹 先生、ならびに北九州市立大学 国際環境工学部 准教授 中澤浩二 先生には多大なご指導、そして適切なご意見、ご助言を賜りました。ここで厚く御礼申し上げます。

ポスト-シナプスモデル細胞の構築にあたり、ご意見、ご助言を賜りましたヘルシンキ大学 Kari Keinänen 先生ならびに Sarah K. Coleman 先生に深く感謝致します。

細胞応答解析を行うにあたり多大な御助言を賜りました英国クランフィールド大学 Conrad Bessant 先生、Michael Cauchi 先生に深く感謝いたします。

同研究室卒業生の右田聖博士には、右も左も分からない私に実験操作、研究の進め方等、常に熱心にご指導頂きました。心より御礼申し上げます。

研究に対する献身的な姿勢で研究者としての在り方を教えて頂いた同研究室卒業生の浅川雅博士、坂元博昭博士に深く感謝いたします。

本研究の間、絶えず御助言頂きました池野慎也先生に深く御礼申し上げます。

同研究室卒業生の田ノ上千里博士、永井貴仁氏、中道桃佳氏には研究のみならず日々の生活においても力強い支えになって頂きました。ここで厚く御礼申し上げます。

最後に、数多くのご助力をいただきました春山研究室の皆様方、春山研究室のOBの方々、ならびに様々な機会に多大なるご協力いただきました生物環境機能講座の皆様方に深く感謝いたします。

立石 彰人

## 研究業績一覧

### 公表論文等

#### (1) 原著論文

1. Akito Tateishi, Michael Cauchi, Chisato Tanoue, Satoshi Migita, Shinya Ikeno, Kari Keinänen, Conrad Bessant, and Tetsuya Haruyama, “Discerning data analysis methods to clarify agonistic/antagonistic actions on the ion flux assay of ligand-gated ionotropic glutamate receptor on engineered post-synapse model cells”, *Journal of Biosensors and Bioelectronics*, **2**(103); doi:10.4172/2155-6210.1000103 , (2011)
2. Akito Tateishi, Sarah K. Coleman, Satoshi Migita, Kari Keinänen, and Tetsuya Haruyama, “Post-synapse model cell for synaptic Glu receptor (GluR) based biosensing ; Strategy and engineering to maximize a ligand-gated ion-flux achieving high signal-to-noise ratio.”, *Sensors*, **12**(1), 1035-1041, 2012; doi:10.3390/s120101035

#### (2) 参考論文

1. Satoshi Migita, Akito Tateishi, Kari Keinänen, and Tetsuya Haruyama, “Engineered synapse model cell: genetic construction and chemical evaluation for reproducible high-through put analysis”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **396**(3), 1153-1157, 2010

### 国内会議

1. 立石彰人、右田聖、Kari Keinänen、池野慎也、春山哲也、“機能評価モデ

- ルとしてのシナプスモデル細胞の構築とその機能”、第3回バイオ・ナノテク シンポジウム、2009.3.12 (化学会館・東京)
2. 立石彰人、右田聖、Kari Keinänen、池野慎也、春山哲也、“ポスト-シナプスモデル細胞の構築とその神経系創薬 HTA のためのシステム化”、第46回化学関連支部合同九州大会、2009.7.11、(北九州国際会議場・福岡)
  3. 立石彰人、右田聖、Kari Keinänen、池野慎也、春山哲也、“神経系創薬 HTA のためのポスト-シナプスモデル細胞の構築とその特性解析”、第24回生体機能関連化学・第12回バイオテクノロジーシンポジウム、2009.9.13-15 (九州大学・福岡)
  4. 立石彰人、田ノ上知里、右田聖、Conrad Bessant、Kari Keinänen、春山哲也、“神経医薬探索 HTA のためのポスト-シナプスモデル細胞の分子育種と PCA による特性解析”、第4回バイオ・ナノテク シンポジウム、2010.3.3 (化学会館・東京)
  5. 立石彰人、右田聖、Kari Keinänen、池野慎也、春山哲也、“神経医薬評価 HTA のためのポスト-シナプスモデル細胞の構築とその特性評価”、日本化学会第90春季年会(2010)、2010.3.26-29 (近畿大学・大阪)
  6. 立石彰人、右田聖、Sarah K.Coleman、Kari Keinänen、春山哲也、“神経医薬探索ハイスループット分析法のためのポスト-シナプスモデル細胞の構築と安定培養系の検討”、第48回化学関連支部合同九州大会 2011.7.9 (北九州国際会議場・福岡)
  7. 立石彰人、右田聖、Sarah K.Coleman、Kari Keinänen、春山哲也、“イオン流入を増幅させたポスト-シナプスモデル細胞の構築と神経医薬ハイスループット分析法への応用”、第5回バイオ関連化学シンポジウム、2011.9.12-14 (つくば国際会議場・茨城)

8. 立石彰人、Sarah K.Coleman, 右田聖、Kari Keinänen、春山哲也, “神経医薬探索ハイスループット分析法における高 S/N 比化を目指したポスト-モデルシナプス細胞の構築”、第21回インテリジェント材料/システム シンポジウム、2012.1.10 (東京女子医科大学・東京)
9. 立石彰人、Sarah K.Coleman, 右田聖、Kari Keinänen、春山哲也, “イオン流入を増幅させたポスト-シナプスモデル細胞の分子育種とその HTA 応用”、日本化学会第92春季年会(2012)、2012.3.25-28 (慶應義塾大学・神奈川)

#### 国際会議

1. Akito Tateishi, Satoshi Migita, Kari Keinänen, Shinya Ikeno and Tetsuya Haruyama “Engineered post-synapse model cell for neural drug high-through-put analysis(HTA)”, KETI and KIT workshop, 2009.10.15 (Kitakyushu Science and Research Park)
2. Akito Tateishi, Kazutaka Mori, Kari Keinänen, Shinya Ikeno and Tetsuya Haruyama “High through-put analysis (HTA) for neural drug discovery based on engineered post-synapse model cell system”, 2nd JKBT, 2009.11.13 (Kyushu Institute of Technology)
3. Akito Tateishi, Satoshi Migita, Kari Keinänen, Shinya Ikeno, and Tetsuya Haruyama, “Engineered post-synapse model cell and characterize it as functional model for neural drug high through-put analysis (HTA)”, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2010.12.15-17 (Hilton Hawaiian village Honolulu)

4. Akito Tateishi, Sarah K. Coleman, Satoshi Migita, Kari Keinänen, and Tetsuya Haruyama “Engineered post-synapse model cell with elevated ion flux using receptor-suppressed culture with the antagonistic inhibitor for practical cell-based assay”, 4th JKBT, 2011.10.28 (Kyushu Institute of Technology)