

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670039

研究課題名(和文)イオンチャネル標的創薬における細胞死測定による新規高効率探索系の創出

研究課題名(英文)Development of a novel screening system for drugs acting on ion channels based on measurement of cell death

研究代表者

今泉 祐治 (Imaizumi, Yuji)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60117794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、イオンチャネル標的創薬のための革新的探索方法の開発を目的とした。本課題の研究成果は以下の通りである。

(1)HEK293細胞にKir2.1と変異型Nav1.5を定常発現させ、刺激による1発の活動電位発生により細胞死を引き起こされる細胞(新規作成細胞)を樹立し、維持法を確立した。さらに創薬標的候補となるイオンチャネルを発現させ、複数の作用薬を用いて細胞死測定による高効率探索が可能か試験的に評価したところ、パッチクランプに匹敵する精度の容量作用曲線が得られた。

(2)新規作成細胞を新規高効率スクリーニングシステムへ応用展開するため、96穴プレートで同時に電気刺激する装置を開発した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we developed a novel screening system for drugs acting on ion channels. The achievements of results in this study are as follows;

(1) We established a recombinant cell line co-expressing mutant Nav1.5 and Kir2.1 (IFM/Q3+Kir). Electrical stimulation (ES) of the cell line induced prolonged action potentials and subsequent cell death. Furthermore "third" ion channel (Kv, K2P or 7-nicotinic receptor) that are candidates for therapeutic targets was expressed in IFM/Q3+Kir. In these cells, drugs that modulate the third ion channel activity can change the mortality of the cells after ES. MTT assay using already-known drugs acting on the "third" ion channels demonstrated that dose-response curves obtained from our new system are as accurate as those obtained from patch-clamp recordings.

(2) We developed a new device that enables us to stimulate the recombinant cell lines cultured on 96 well plates with ES. Thus, our new system is available for high throughput screening.

研究分野：薬理学

キーワード：薬理学 薬学 創薬 スクリーニング 電位依存性Na⁺チャネル 内向き整流性K⁺チャネル 細胞死 パッチクランプ法

1. 研究開始当初の背景

活動電位を発生する興奮性細胞において、電位依存性 Na⁺チャネルが細胞機能上、圧倒的な重要性を有していることは論を待たない。電位依存性 Na⁺チャネルは活性化に続く極めて速やかな不活性化を起こすことで、活動電位という高速シグナルを可能にしている。一方、電位依存性 Na⁺チャネルの過剰な活性は様々な疾患をもたらす。特に遺伝子異常を含む何らかの原因による不活性化の遅延は、てんかんや不整脈などの極めて重篤な疾患をもたらす(Diss JK et al., Eur Biophys J., 2004)。また、トリカブト毒成分のアコニチンなどの数種の低分子化合物は、Na⁺チャネルの不活性化を遅延させ、活動電位幅の延長を引き起こすことにより毒性を発揮する。従って、電位依存性 Na⁺チャネルの不活性化機構は非常に深く研究され、不活性化を担う複数部位のアミノ酸群の同定が行われており、これらの部位のアミノ酸を遺伝子の点変異で置換すると、不活性化が遅延されることも明らかとなっている(Grant AO. et al., Biophys J., 2000)。さらにそのような変異を有する Na⁺チャネル発現細胞は死に易いことも記述されている。しかしながら過剰な Na⁺流入による Na⁺貯留の定量的解析や細胞障害発生機構の解明は充分なされていない。また、不活性化遅延性の変異型 Na⁺チャネルを定常発現した細胞を作成し、これを用いて急速 Na⁺流入による細胞死を報告した例は、我々の論文が最初である(Fujii M et al., J Biomol Screen, 2012)。

2. 研究の目的

細胞レベルでの電気生理学的手法のゴールドスタンダードはパッチクランプ法であるが、極めて労力を要する手法のため、イオンチャネル標的創薬のための大規模高効率探索には利用できない。そのため近年、幾種類かのオートパッチクランプ機が開発されているものの、必ずしも効率は高くなく、汎

用されているとは言い難い。電位感受性蛍光色素の利用やその他の方法も一長一短あり、より簡便で革新的な探索方法の開発は、イオンチャネル標的創薬の発展に資する。本研究では(1)遺伝子改変 Na⁺チャネルの発現により1発の超持続性活動電位発生で急速な Na⁺流入と確実な細胞死をもたらすモデル細胞系を確立すること、(2)その細胞系を利用してイオンチャネル標的創薬の画期的高効率探索系の開発・実用化に結び付けることを目的としている。

3. 研究の方法

(I) HEK293 細胞に Kir2.1 と変異型 Nav1.X を定常発現させ、刺激による1発の活動電位発生により細胞死が引き起こされ、かつ安定継代培養が可能な細胞(「新規作成細胞」)を樹立した。さらに創薬標的候補となる各種イオンチャネル(Kv1.X, 5-HT_{3A}, nicotinic α 7, two pore K⁺ channel, TMEM16A など)を遺伝子導入により発現させ、細胞死測定による作用薬候補化合物の高効率探索が可能かを検証した。

(II) (I)で作製した「新規作成細胞」において、持続的活動電位発生による急速な細胞内 Na⁺濃度([Na⁺]_i)上昇や細胞内 Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)変化を画像解析により計測し、細胞障害の発生さらには細胞死の機構を解明する。

(III) (I)で作製した「新規作成細胞」をイオンチャネル標的創薬の新規高効率スクリーニングシステムへと応用展開するため、96穴プレートで迅速かつ簡便に電気刺激する装置の開発などを含めて実用化の展開を図る。

4. 研究成果

1発の活動電位発生により細胞死が引き起こされる細胞(「新規作成細胞」)の evaluation :

新規細胞の Na⁺電流の減少は、数百 μ M のメキシレチン塩酸塩を培養液に添加することで回復することが明らかとなった。メキシレ

チン塩酸塩により電流を回復させた細胞株に、白金電極を用いた電気刺激を行ったところ、50%以上の細胞死が観測された。また、継代数が40を超えても、新規細胞の形質は安定しており、ハイスループットスクリーニングのための大量培養にも耐えうることを示された。

イオンチャネル標的創薬での新規高効率探索システムへの応用展開：

(1) 96穴に同時に電気刺激する装置部分を開発し、「新規作成細胞」を用いて装置の有用性の評価を行った。本装置により、「新規作成細胞」に対して、極めて短時間で効率的に電気刺激を与えることが可能になった。

2) Kv1.3、Kv1.5、nicotinic $\alpha 7$ 、5-HT_{3A}、TREK1を「新規作成細胞」へ定常発現させた細胞を作製した。これらの細胞株を用いて、複数の作用薬を試験的に評価したところ、パッチクランプに匹敵する精度で容量作用曲線が得られることが分かった。(図1)

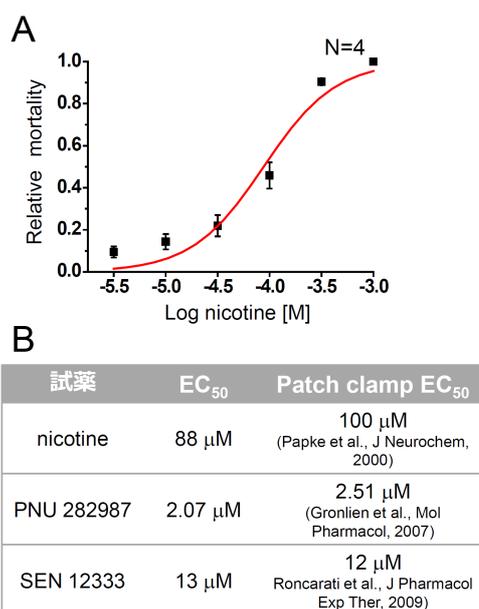


図1 nicotinic $\alpha 7$ 定常発現細胞の評価

A: nicotinic $\alpha 7$ のアゴニストである nicotine の用量作用曲線を示した。B: 本スクリーニング法で求めた EC₅₀ とその文献値を示した。

急速 Na⁺流入による細胞障害機構の解明：

1) 「新規作成細胞」に Na⁺感受性蛍光色素

の CoroNa Green を負荷し、電気刺激を行った。電気刺激の直後に、蛍光強度の急速な増大が見られたことから(図2A)、「新規作成細胞」の電気刺激誘発性細胞死は、Na⁺の細胞内への過剰流入であることが示唆された。

(2) 「新規作成細胞」において Na⁺の過剰流入の後、Na⁺-Ca²⁺交換体の逆回転による Ca²⁺流入が起こり、アポトーシスによって細胞死が起こると仮定した。そこで Ca²⁺感受性蛍光色素である Fura2 を用いて [Ca²⁺]_i の測定を行った。結果、一部の細胞において、細胞膜の持続的な脱分極に同期した、一過性の [Ca²⁺]_i 上昇が起きるのみであった。(図2B) また、電気刺激の直後に細胞の膨潤が多数見られ、さらには破裂して内容物を放出した細胞も散見されたことから、「新規作成細胞」における電気刺激誘発性細胞死は、イオン平衡の破たんによるネクローシスであると考えられる。

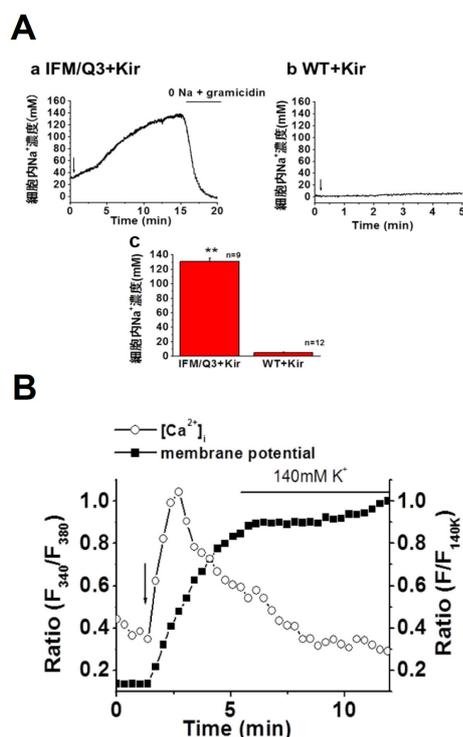


図2 「新規作成細胞」における細胞死機構

A: WT Nav1.5+Kir 及び新規作成細胞(IFM/Q3+Kir) 発現細胞に CoroNa Green を負荷し、細胞内 Na⁺濃度 ([Na⁺]_i)測定を行った。a: IFM/Q3+Kir 発現細胞、b: WT+Kir 発現細胞の [Na⁺]_i 変化の原因図を示した。c: それぞれの細胞における脱分極刺激後の最大 [Na⁺]_i を示した。 **P<0.01 vs WT + Kir

B: 「新規作成細胞」に fura-2AM と DiBAC₄(3) を負荷し、細胞内 Ca²⁺濃度と膜電位の同時測定を行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 13 件)

Hirata T, Terai T, Yamamura H, Shimonishi M, Komatsu T, Hanaoka K, Ueno T, Imaizumi Y, Nagano T, Urano Y. Protein-coupled fluorescent probe to visualize potassium ion transition on cellular membranes. *Anal Chem.* 88(5):2693-700 (2016). (doi: 10.1021/acs.analchem.5b03970). 【査読有】

Mizutani H, Yamamura H, Muramatsu M, Hagihara Y, Suzuki Y, Imaizumi Y. Modulation of Ca²⁺ oscillation and melatonin secretion by BKCa channel activity in rat pinealocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 310(9):C740-7 (2016). (doi: 10.1152/ajpcell.00342.2015). 【査読有】
Yamamura H, Suzuki Y, Imaizumi Y. New light on ion channel imaging by total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. *J Pharmacol Sci.* 128(1):1-7 (2015). (doi: 10.1016/j.jphs.2015.04.004). 【総説】【査読有】

Kurita T, Yamamura H, Suzuki Y, Giles WR, Imaizumi Y. The ClC-7 chloride channel is downregulated by hypoosmotic stress in human chondrocytes. *Mol Pharmacol.* 88(1):113-20 (2015). (doi: 10.1124/mol.115.098160). 【査読有】

Inayama M, Suzuki Y, Yamada S, Kurita T, Yamamura H, Ohya S, Giles WR, Imaizumi Y. Orai1-Orai2 complex is involved in store-operated calcium entry in chondrocyte cell lines. *Cell Calcium.* 57(5-6):337-47 (2015). (doi: 10.1124/mol.115.098160). (doi: 10.1016/j.ceca.2015.02.005). 【査読有】

Kito H, Yamamura H, Suzuki Y, Yamamura H, Ohya S, Asai K, Imaizumi Y. Regulation of store-operated Ca²⁺ entry activity by cell cycle dependent up-regulation of Orai2 in brain capillary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 459(3):457-62 (2015). (doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.127). 【査読有】

山村寿男, 栗田卓, 鈴木良明, 今泉祐治. 低浸透圧環境下で発現低下する軟骨細胞 ClC-7 クロライドチャネル. *臨床薬理の進歩*, 36:21-31 (2015). 【総説】【査読有】

無】

Susumu Ohya, Yuji Imaizumi. Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel KCa3.1 and its related molecules in T-lymphocytes. *Inflamm. Cell Signal.* 1:e327 (2014) 【査読有】

Kito H, Yamamura H, Suzuki Y, Ohya S, Asai K, Imaizumi Y. Membrane hyperpolarization induced by endoplasmic reticulum stress facilitates Ca²⁺ influx to regulate cell cycle progression in brain capillary endothelial cells. *J Pharmacol Sci.* 125(2):227-32.(2014). (doi: 10.1254/jphs.14002SC). 【査読有】

Ohba T, Xu J, Alexander DB, Yamada A, Kanno J, Hirose A, Tsuda H, Imaizumi Y. MWCNT causes extensive damage to the ciliated epithelium of the trachea of rodents. *J Toxicol Sci.* 39(3):499-505.(2014). (doi.org/10.2131/jts.39.499) 【査読有】

Ohshiro J, Yamamura H, Suzuki Y, Imaizumi Y. Modulation of TMEM16A-channel activity as Ca²⁺ activated Cl⁻ conductance via the interaction with actin cytoskeleton in murine portal vein. *J Pharmacol Sci.* 125(1):107-11. (2014). (doi: 10.1254/jphs.14015SC). 【査読有】

Mizutani H, Yamamura H, Muramatsu M, Kiyota K, Nishimura K, Suzuki Y, Ohya S, Imaizumi Y. Spontaneous and nicotine-induced Ca²⁺ oscillations mediated by Ca²⁺ influx in rat pinealocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 306(11):C1008-16(2014). (doi: 10.1152/ajpcell.00014.2014). 【査読有】

Ohya S, Fukuyo Y, Kito H, Shibaoka R, Matsui M, Niguma H, Maeda Y, Yamamura H, Fujii M, Kimura K, Imaizumi Y. Up-regulation of KCa3.1 K⁺ channel in mesenteric lymph node CD4⁺ T-lymphocytes from a mouse model of dextran sodium sulfate-induced inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 306(10):G873-85(2014). (doi: 10.1152/ajpgi.00156.2013). 【査読有】

〔学会発表〕(計 10 件)

堤香菜子, 鈴木良明, 山村寿男, 今泉祐治. Two-pore-domain K⁺ チャネル TASK1、TALK2 のヘテロ 2 量体形成の解明. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 29 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

川崎桂輔, 藤井将人, 鈴木良明, 山村寿男, 今泉祐治. 一発の活動電位により細胞死を引き起こす改変遺伝子導入培養細胞系を用いた K_{2P} チャネル作用薬の新規スクリーニング法の開発. 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 11 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

萩原由実子, 山村寿男, 西村歌織, 鈴木良明, 今泉祐治. TMEM16A と TMEM16B によって構成されるヘテロ Ca^{2+} 活性化 Cl⁻ チャネルの機能解析. 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 9 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

川崎桂輔, 藤井将人, 鈴木良明, 山村寿男, 今泉祐治. イオンチャネル標的創薬のための新規スクリーニング系実用化. 第 6 回スクリーニング学研究会, 2015 年 11 月 27 日, ソニックシティ (埼玉県さいたま市).

佐伯尚紀, 村山尚, 鈴木良明, 山村寿男, 櫻井隆, 今泉祐治. 3 型リアノジン受容体と Ca^{2+} 活性化 Cl⁻ チャネル TMEM16A の共発現 HEK293 細胞における Ca^{2+} クロックの電気信号への変換. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 28 日, デザイン・クリエイティブセンター神戸 (兵庫県神戸市).

山田啓史, Regis Azizieh, 梅田俊太郎, 村本孝博, 鈴木良明, 山村寿男, 今泉祐治. 電位依存性 Kv1.3 チャネルに対するホスファチジルイノシトール 4,5 ニリン酸の特異的作用の機構解析. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 28 日, デザイン・クリエイティブセンター神戸 (兵庫県神戸市).

林恵介, 藤井将人, 鈴木良明, 山村寿男, 今泉祐治. 一発の活動電位発生により細胞死を引き起こす改変遺伝子導入培養細胞系を用いたリガンド依存性イオンチャネル (nAChR 7 と 5-HT_{3A}) 作用薬の新規スクリーニング法の開発. 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 19 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).

宮本達也, 鈴木良明, 山村寿男, 今泉祐治. K_{2P} チャネルの新たなヘテロ 2 量体形成の一分子可視化法による解明. 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 19 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).

西村歌織, 山村寿男, 鈴木良明, 今泉祐治. ラット松果体細胞において TMEM16A と TMEM16B は Ca^{2+} 活性化 Cl⁻ チャネル分子として機能する. 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 18 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).

宮本達也, 鈴木良明, 山村寿男, 今泉祐治. K_{2P} チャネルの複数体形成の多様性についての検討. 第 126 回日本薬理学会近畿部会, 2014 年 10 月 24 日, 和歌山県

JA ビル (和歌山県和歌山市).

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ysg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今泉 祐治 (IMAZUMI, Yuji)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 60117794

(2) 研究分担者

山村 寿男 (YAMAMURA, Hisao)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号: 80398362

鈴木 良明 (SUZUKI, Yoshiaki)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号: 80707555

(3) 連携研究者

該当なし