

論文審査の要旨及び担当者

論文題名

遺伝性難聴に対する有効な薬剤のスクリーニング法の確立と候補化合物の探索

論文審査の要旨

1. 論文の要旨

1000人に1人の割合で生ずる先天性難聴は、遺伝的な原因が全体の約半数を占めており、難聴に関連する遺伝子はおよそ100種類が知られている。聴覚を司る内耳の蝸牛は非常に複雑な構造で、種々のタンパク質が役割分担をして聴覚受容を担っているが、これらの遺伝子に変異があることで難聴となる。遺伝性難聴の分類は、難聴以外の随伴症状の有無により症候群性難聴と非症候群性難聴に分けられる。両者に共通している原因遺伝子として Pendred 症候群(PDS)の原因遺伝子 *SLC26A4* が挙げられる。PDS では難聴以外にその随伴症状として、甲状腺腫と内耳奇形が報告されており、一方の非症候群性難聴にも *SLC26A4* 遺伝子の異常が共通してみられる。加えて、*SLC26A4* の遺伝子異常にともなう随伴症状は進行性である。このようなことから、*SLC26A4* の遺伝子変異を治療や創薬研究の目標とすることは、優先的であり、有効であると考えられる。*SLC26A4* からつくられる Pendrin は、アミノ酸 780 個からなる膜貫通型タンパクで、主に内耳に発現し、塩化物イオン、重炭酸イオンなどの陰イオンとヨードの輸送を行っている。細胞内において変異型 Pendrin は、正常な Pendrin が小胞体で発現した後に細胞膜へと移行するのに対して小胞体に蓄積し、本来あるべき細胞膜へ移行することができない。このため、内耳コルチ器内のラセン隆起および外ラセン溝細胞においては陰イオンの輸送が障害され、水管拡大の症状をとめない難聴を示す。そこでこれを改善する試みとして先行研究が行われ、古くから鎮痛作用として知られているサリチル酸が、変異型 Pendrin に対しての分子シャペロン活性を示し、変異型 Pendrin を遺伝子導入した HEK293 細胞において、変異型 Pendrin を細胞質から細胞膜へ移行させ再活性化することが明らかにされた。

本論文提出者は、サリチル酸添加による変異型 Pendrin の細胞内局在変化に着目し、変異型 Pendrin を恒常的に発現する Stable 細胞の確立、網羅的画像解析による迅速な薬剤スクリーニング法を開発し、サリチル酸とその類縁体から有効な細胞膜移行活性を有する化合物の探索を行った。その結果、有望な候補化合物を発見し、先天性難聴の創薬研究に繋がる成果を見出している。

本論文は、第一章「序論」、第二章「変異型 Pendrin(P123S)恒常発現細胞の樹立」、第三章「CellInsight™を用いた細胞の Morphology 解析のためのパラメーターの検討」、第四章「サリチル酸類縁体の変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングと候補化合物の探索」より構成されている。

第二章では、変異型 Pendrin(P123S)恒常発現(Stable)細胞の樹立について述べられている。先行

研究により *SLC26A4* 遺伝子の変異のうち主要な 10 種類のミスセンスの変異型 Pendrin の作製と、ミスフォールドからの薬剤によるレスキューが報告されている。10 種類の変異型 Pendrin を遺伝子導入した HEK293 細胞に対するサリチル酸の分子シャペロン活性が調べられており、サリチル酸応答性を示す有用な 4 種類(P123S、M147V、S657N、H723R)の変異型 Pendrin 遺伝子が特定されている。ここで行われた一過性(Transient)の遺伝子導入と解析の場合、1)細胞播種、2)遺伝子導入、3)薬剤添加、4)免疫染色、5)細胞内局在変化 の過程を必要とし、実験ごとの遺伝子導入と遺伝子導入効率の安定性、化合物多数を用いた迅速なスクリーニングには課題があった。そこで本論文提出者は、変異型 Pendrin(P123S)を恒常的(Stable)に発現する細胞の樹立を検討した。具体的には、遺伝子導入後の HEK293 細胞はネオマイシン耐性である性質を利用し、G-418 Sulfate 存在下で 10 日間連続培養後、その生え抜きを選抜した。Pendrin 発現とサリチル酸応答性を確認した後、これらを 96well 培養プレートで 1 細胞/1well に限界希釈し、シングルコロニー由来の単クローンを得た。得られた単クローン細胞を再度、Pendrin 発現・サリチル酸応答性の確認後、細胞のクローニング操作を合計 2 回行った。このようにして、野生型 Pendrin 安定発現細胞(Wt)と変異型 Pendrin(P123S)安定発現細胞(PH1-1H1)を得た。このことは、樹立した Wt 細胞と PH1-1H1 細胞で Pendrin が安定的に恒常発現し、化合物を用いた変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングに適していること、また、スクリーニングにおける遺伝子導入の段階を省くことが可能となり、迅速な Morphology 解析における有用な細胞株を得た点で大きな意義がある。

第三章では CellInsight™ を用いて細胞の Morphology 解析のためのパラメーターの検討について述べられている。変異型 Pendrin(P123S)は細胞質に集積し、野生型 Pendrin(Wt)は細胞膜に局在する。一方、10 mM サリチル酸を加えることで改善し、Pendrin の細胞膜局在が上昇し細胞質局在は減少する。この細胞内局在変化について、先行研究の手法では、免疫染色の後に共焦点レーザー顕微鏡にて得られた画像を画像解析ソフト FluoView™ で取込し、細胞膜・細胞質の蛍光強度を無作為に 100 ポイント測定して評価していた。申請者は 96well 培養プレートを用いた迅速な薬剤スクリーニングを目的にこれを改良した。細胞イメージアナライザーCellInsight™ による計測は、96well 内を 100 フィールドに区分し、各フィールド内最大 100 個細胞を検出し、全細胞のタンパク質局在を網羅的に解析し蛍光強度を測定できる。そこで解析プログラム Morphology V4 の解析パラメーターの検討を行った。複数の検討より、細胞の外周を解析の基準である Ch1 とし、核を Ch2 とした。そして Ch1 から内側へ 5 pixel 幅を細胞質 Ch3(Cytoplasm:C)とし、Ch1 から内側 2 pixel 幅を細胞膜 (Plasma Membrane:M)Ch4 とした。次に PH1-1H1 細胞に対してサリチル酸による変異型 Pendrin 移行活性を評価した結果、Ch4(M)の上昇はみられなかったものの、サリチル酸濃度依存的 Ch3(C)の減少を確認することができた (Ch4 は、細胞外周の微小な凹凸や輪郭の正確なトレースが困難で、また、背景の黒色領域も合わせて検出したため、正確な細胞膜の蛍光強度が検出できなかった)。このことは、細胞の Morphology 解析における Ch3(C)の値に着目したことにより、サリチル酸添加後の変異型 Pendrin 移行活性の測定を可能にし、サリチル酸やサリチル酸類縁体を用いた 96well 培養プレートによるハイスループットスクリーニングを実現した点で、大いに意気がある。

第四章では、サリチル酸類縁体による変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングと候補化合物の探索について述べられている。申請者は、サリチル酸とその類縁体を 96well 培養プレートに播種した PH1-1H1 細胞に 12 時間添加し、免疫染色の後、第三章で確立した CellInsight™ による Morphology

V4でCh3(C)を基準にスクリーニングした。その結果、化合物の濃度依存的にCh3(C)減少を示す6つの候補化合物を発見した。さらに、FluoView™による詳細な蛍光強度の測定をし、細胞膜(Plasma Membrane:M)/細胞質(Cytoplasm:C)=M/C比を調べた結果、サリチル酸は10 mMでM/C比が1.0であるのに比べ、M/C比が0.3 mMで1.5、0.1 mMで0.9を示す化合物(2-aminophenyl)methanolを見出した(化合物番号8)。すなわち、化合物8はサリチル酸に対して活性がおよそ100倍高いことを示した。さらに、薬剤を培地から取り除いた後24時間までの細胞内薬剤持続性効果を検討した結果、サリチル酸は薬剤除去後6時間で効果が失われたのに対して、化合物8は12時間後まで50%の効果が持続した。このことは、ベンジルアルコール骨格から成る化合物8が変異型Pendrinに対して高い細胞膜移行活性と長い細胞内持続性効果を有する有用な候補化合物であることが示された点で、大きな意義がある。

本論文提出者は、解熱鎮痛剤として古くから用いられているサリチル酸とその類縁体から、変異型Pendrin移行活性スクリーニングを行い、6つの候補化合物を発見した。中でもベンジルアルコール骨格を有する化合物8はサリチル酸に対して100倍高い細胞膜移行活性と長い細胞内薬剤持続性効果を有することを見出した。このことは、Pendred症候群や非症候群性難聴に共通のSLC26A4遺伝子変異による変異型Pendrinの細胞膜移行活性に対して創薬研究に繋がる重要な成果である。

2. 審査の方法、内容の評価、結論

本論文は、平成31年1月に提出され、上記3名の論文審査担当者がそれぞれ査読した。さらに、平成30年1月24日午後5時から1時間にわたって、学習院大学理学部南6号館2階セミナー室で開催された公聴会では、当該論文の内容およびこれに関する分野の学識ならびに生命科学全般にわたる学力について、詳細な質疑応答形式による口頭試験により審査した。

本論文は、変異型Pendrinを恒常的に発現するStable細胞を確立ことで、網羅的画像解析による迅速な薬剤スクリーニング法開発を実現し、その結果、有望な候補化合物の発見に至っており、これらの知見は先天性難聴の創薬研究に繋がる可能性を有している。

以上を総合し、本論文は博士の学位論文として十分な内容があり、3名の論文審査担当者は一致して、本学位申請者に博士(理学)の学位を授与するにふさわしいと認めた。

論文審査主査	岡本治正	教授
	高島明彦	教授
	中村浩之	特別非常勤講師
		(東京工業大学教授)