

平成 30 年度

博士論文

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

学習院大学理学部化学科 客員研究員

19981915

鍋山 航

指導教員 中村 浩之 教授

| | |
|---|----|
| 目次 | |
| 発表論文 | 5 |
| 第一章 序論 | 7 |
| 1.1 難聴と遺伝 | 7 |
| 1.1.1 症候群性難聴と非症候群性難聴 | 8 |
| 1.1.2 症候群性難聴・非症候群性難聴に共通の <i>SLC26A4</i> 遺伝子 | 10 |
| 1.1.3 Pendrin(<i>SLC26A4</i>)遺伝子変異の種類 | 12 |
| 1.2 Pendrin(<i>SLC26A4</i>)の局在と機能 | 14 |
| 1.2.1 コルチ器における Pendrin 発現 | 15 |
| 1.2.2 前庭における Pendrin 発現 | 16 |
| 1.2.3 Pendrin と相同性の高い Prestin タンパク | 17 |
| 1.3 本研究について | 19 |
| 1.4 引用文献 | 24 |
| 第二章 変異型 Pendrin(P123S)恒常発現細胞の樹立 | 31 |
| 2.1 はじめに | 31 |
| 2.2 試薬および実験方法 | 34 |
| 2.2.1 pcDNA3.1-Pendrin について | 34 |
| 2.2.2 大腸菌遺伝子組み換え | 36 |
| 2.2.3 プラスミド DNA の精製 | 37 |
| 2.2.4 アガロースゲル電気泳動による抽出 DNA の確認 | 39 |
| 2.2.5 HEK293 細胞の培養条件 | 41 |
| 2.2.6 HEK293 細胞への遺伝子導入 | 42 |

| | | |
|---|--------------------------------------|----|
| 2.2.7 | 免疫染色 | 43 |
| 2.2.8 | 限界希釈法による細胞クローニング | 44 |
| 2.3 | 結果および考察 | 48 |
| 2.3.1 | HEK293 細胞への一過性(Transient)遺伝子導入 | 48 |
| 2.3.2 | 限界希釈法による単コロニーからの細胞クローニング | 50 |
| 2.3.3 | Stable 細胞(PH1-1H1)の免疫染色による確認 | 52 |
| 2.3.4 | Stable 細胞のサリチル酸による細胞内局在変化 | 53 |
| 2.4 | 小括 | 54 |
| 2.5 | 引用文献 | 55 |
| 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 | | |
| 3.1 | はじめに | 59 |
| 3.2 | 試薬および実験方法 | 64 |
| 3.2.1 | PH1-1H1 細胞、Wt 細胞の培養条件 | 64 |
| 3.2.2 | サリチル酸添加と免疫染色 | 64 |
| 3.2.3 | Morphology V4 のチャンネル設定と対象物の検出 | 66 |
| 3.2.4 | threshold の設定による重なった細胞の区別 | 68 |
| 3.3 | 結果および考察 | 69 |
| 3.3.1 | Ring Spot 解析の検討 | 69 |
| 3.3.2 | Zone(領域)解析の検討 | 73 |
| 3.3.3 | 核基準と細胞外周基準の検討 | 76 |
| 3.3.4 | 決定したパラメーターによる画像解析と Ch3・Ch4 ドット 分布 | 81 |

| | | |
|---|---|-----|
| 3.4 | 小括 | 84 |
| 3.5 | 引用文献 | 86 |
| 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 | | |
| 4.1 | はじめに | 88 |
| 4.2 | 試薬および実験方法 | 91 |
| 4.2.1 | Stable 細胞(PH1-1H1 細胞、Wt 細胞)について | 91 |
| 4.2.2 | 化合物の添加と免疫染色 | 91 |
| 4.2.3 | Morphology V4 の Ch3 を基準とした変異型 Pendrin 移行活性スクリーニング | 92 |
| 4.2.4 | 化合物の 50 %効果濃度(ED ₅₀)の測定 | 93 |
| 4.2.5 | 化合物の 50 %細胞増殖抑制濃度(IC ₅₀)の測定 | 93 |
| 4.2.6 | FluoView™ を用いた M/C 比の測定 | 94 |
| 4.2.7 | Plot Profile 解析による細胞横断蛍光強度の測定 | 94 |
| 4.2.8 | 細胞内薬剤の分子シャペロン持続性効果の検討 | 95 |
| 4.3 | 結果および考察 | 96 |
| 4.3.1 | Morphology V4 の解析基準の検討 | 96 |
| 4.3.2 | Morphology V4 の Ch3 を基準とした変異型 Pendrin 移行活性スクリーニング | 97 |
| 4.3.3 | 候補化合物の ED ₅₀ | 100 |
| 4.3.4 | MTT Assay による IC ₅₀ | 101 |
| 4.3.5 | 候補化合物の M/C 比の測定 | 104 |
| 4.3.6 | 候補化合物の Plot Profile 解析 | 106 |

| | | |
|-------|------------|-----|
| 4.3.7 | 細胞内薬剤持続性効果 | 108 |
| 4.3.8 | 化合物の構造活性相関 | 110 |
| 4.4 | 小括 | 111 |
| 4.5 | 引用文献 | 113 |
| 第五章 | 総括 | 114 |
| 5.1 | 引用文献 | 118 |
| 謝辞 | | 122 |

発表論文

de novo Design and synthesis of N-benzylanilines as new candidates for VEGFR tyrosine kinase inhibitors

Masaharu Uno, Hyun Seung Ban, Wataru Nabeyama, Hiroyuki Nakamura*

Organic & Biomolecular Chemistry **2008** 6(6):979-981

Allene as an Alternative Functional Group for Drug Design: Effect of C-C Multiple Bonds Conjugated with Quinazolines on the Inhibition of EGFR Tyrosine Kinase

Hyun Seung Ban, Shinya Onagi, Masaharu Uno, Wataru Nabeyama, Hiroyuki Nakamura*

ChemMedChem **2008** 3(7):1094-1103

Discovery of boron-conjugated 4-anilinoquinazoline as a prolonged inhibitor of EGFR tyrosine kinase

Hyun Seung Ban, Taikou Usui, Wataru Nabeyama, Hidetoshi Morita, Kaori Fukuzawa, Hiroyuki Nakamura*

Organic & Biomolecular Chemistry **2009** 7(21):4415-4427

Synthesis and biological evaluation of boron peptide analogues of
Belactosin C as proteasome inhibitors

Hiroyuki Nakamura*, Mizuyoshi Watanabe, Hyun Seung Ban,
Wataru Nabeyama, Akira Asai

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **2009** 19(12):3220-3224

Enhancement of EGFR tyrosine kinase inhibition by C-C multiple
bonds-containing anilinoquinazolines

Hyun Seung Ban, Yuko Tanaka, Wataru Nabeyama, Masako Hatori,
Hiroyuki Nakamura*

Bioorganic & Medicinal Chemistry **2010** 18(2):870-879

Discovery of (2-aminophenyl)methanol as a new molecular chaperone
that rescues the localization of P123S mutant pendrin stably
expressed in HEK293 cells

Wataru Nabeyama, Kenji Ishihara, Hyun Seung Ban, Hiroshi Wada,
Hiroyuki Nakamura*

Bioorganic & Medicinal Chemistry **2017** 25(9):2601-2608

第一章 序論

1.1 難聴と遺伝

0.1 %の割合で生ずる先天性の難聴は遺伝的な原因が全体の約半数を占めており複数の遺伝子の異常が報告されている[1]。難聴に関連する遺伝子は100種類前後といわれており、その遺伝子に変異があることで難聴となる、あるいは、なりやすくなることが知られている。耳の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おこない聴覚の受容を担っているが、これらのタンパクの遺伝子に変異があると、難聴になることがわかっている。また、先天的な難聴だけでなく、老人性難聴、騒音性難聴、突発性難聴などの後天性難聴においても個人差がみられ遺伝子が関係しているといわれており、難聴と遺伝子の関係を調べ、治療の方向性を考えることは大変重要である。

遺伝性の難聴にはさまざまな種類がある。原因遺伝子が常染色体にあり、劣性遺伝形式で遺伝するタイプが最も多く難聴の約70%である[1]。この場合、メンデルの遺伝の法則にしたがい、例えば両親はヘテロで難聴ではないが、両親から難聴の遺伝子をホモ接合体で受け取って子に難聴が生ずる場合としてみつけることが多い。これとは反対に優性遺伝形式による遺伝の例も知られており、この場合は家系の世代間で何世代にもわたって難聴が続いて生じることになる。この遺伝子としては、*KCNQ4*、*TECTA*、*WFS1* 遺伝子が知られている[2-6]。

1.1.1 症候群性難聴と非症候群性難聴

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(表 1.1)。症候群性難聴は随伴症状を伴うため表現型の特定が明確であるが、非症候群性難聴は難聴のみが症状であり、聴力検査によって発見される。前者の例を挙げると、白色の前髪、虹彩異色、白斑などの色素異常をともなう Waardenburg 症候群 (*PAX3*, *MITF*, *SNAI2*, *EDNRB*, *EDN3*, *SOX10* が原因遺伝子)、網膜色素変性による視覚障害を伴う Usher 症候群 (*MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, *SANS*, *USH2A*, *VLGR1*, *USH3* が原因遺伝子)、下眼瞼の欠損、小顎症、小耳症、頬骨弓の低形成をともなう Treacher

表 1.1

| | | | |
|--------------|------------------------------------|---------------|---------------------------|
| 遺伝性難聴 | 症候群性難聴(難聴+随伴症状) 30% | | |
| | Waardenburg症候群 ----- | 毛髪色素異常+眼角隔離など | <i>PAX3, MITF</i> など |
| | Usher症候群 ----- | 網膜色素変性 | <i>MYO7A, USH2A</i> など |
| | Treacher Collins症候群 ----- | 小顎症 | <i>TCOF1</i> など |
| | Stickler症候群 ----- | 小顎症 | <i>COL2A1, COL11A2</i> など |
| | <u>Pendred症候群</u> ----- | 甲状腺腫 | <u><i>SLC26A4</i></u> など |
| | Jervell and Lange-Nielsen症候群 ----- | QT延長 | <i>KCNQ1, KCNE1</i> など |
| | SYM-1, SYNS-1 (NOG-SSD)症候群 ----- | 指骨癒合 | <i>NOG</i> など |
| | ミトコンドリア病 ----- | 糖尿病 | <i>m.3243A>G</i> など |
| | Alport症候群 ----- | 腎疾患 | <i>COL4A3</i> |
| | BOR症候群 ----- | 痔瘻孔+腎疾患 | <i>EYA1</i> |
| | 非症候群性難聴(難聴のみ) 70% | | |
| | <i>GJB2</i> | | |
| | <u><i>SLC26A4</i></u> | | |
| | <i>CDH23</i> | | |
| <i>KCNQ4</i> | | | |
| <i>OTOF</i> | | | |
| <i>TECTA</i> | | | |
| <i>WFS1</i> | | | |

症候群性難聴と非症候群性難聴 両者に共通する遺伝子変異として *SLC26A4* 遺伝子がある [7]。

Collins 症候群(*TCOF1* が原因遺伝子)、近視、硝子体網膜変性、関節変形、顔面形態の低形成をともなう Stickler 症候群(*COL2A1*, *COL11A2*, *COL11A1* が原因遺伝子)、心電図異常で QT 延長を示す Jervell and Lange-Nielsen 症候群(*KCNQ1*, *KCNE1* が原因遺伝子)、指骨癒合をともなう SYM-1, SYNS-1(NO-G-SSD)(*NOG* が原因遺伝子)、糖尿病、種々の神経と筋症状を伴うミトコンドリア病(ミトコンドリア遺伝子の *m.3243A>G* が原因遺伝子)、腎障害をともなう Alport 症候群(*COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5* が原因遺伝子)、耳瘻孔、頸部瘻孔、内耳・中耳奇形、尿路奇形をともなう Branchio-Oto-Renal(BOR)症候群(*EYA1*, *SIX1*, *SIX5* が原因遺伝子)、甲状腺腫、内耳奇形をともなう Pendred 症候群(PDS)(*SLC26A4* が原因遺伝子)、が知られている [7]。

1.1.2 症候群性難聴・非症候群性難聴に共通の *SLC26A4* 遺伝子

症候群性難聴は遺伝性の難聴全体の約 30 %で、非症候群性難聴は約 70 %であるが、これら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(図 1.1)。PDS とは、難聴だけでなく、その随伴症状として甲状腺腫と内耳奇形をともなう症例として知られているが、随伴症状の無い非症候群性難聴にも複数の原因遺伝子(*GJB2*、*CDH23*、*KCNQ4*、*OTOF*、*TECTA*、*WFS1*、*SLC26A4* 遺伝子の異常)が報告されており、その中の 1 つにも *SLC26A4* の遺伝子変異は共通して認められる[8-10]。

視点を変えて、遺伝性難聴について日本人全体でみた場合、*GJB2* 遺伝子変異による難聴の頻度が最も高く、次いで *SLC26A4*、*MYO15A*、

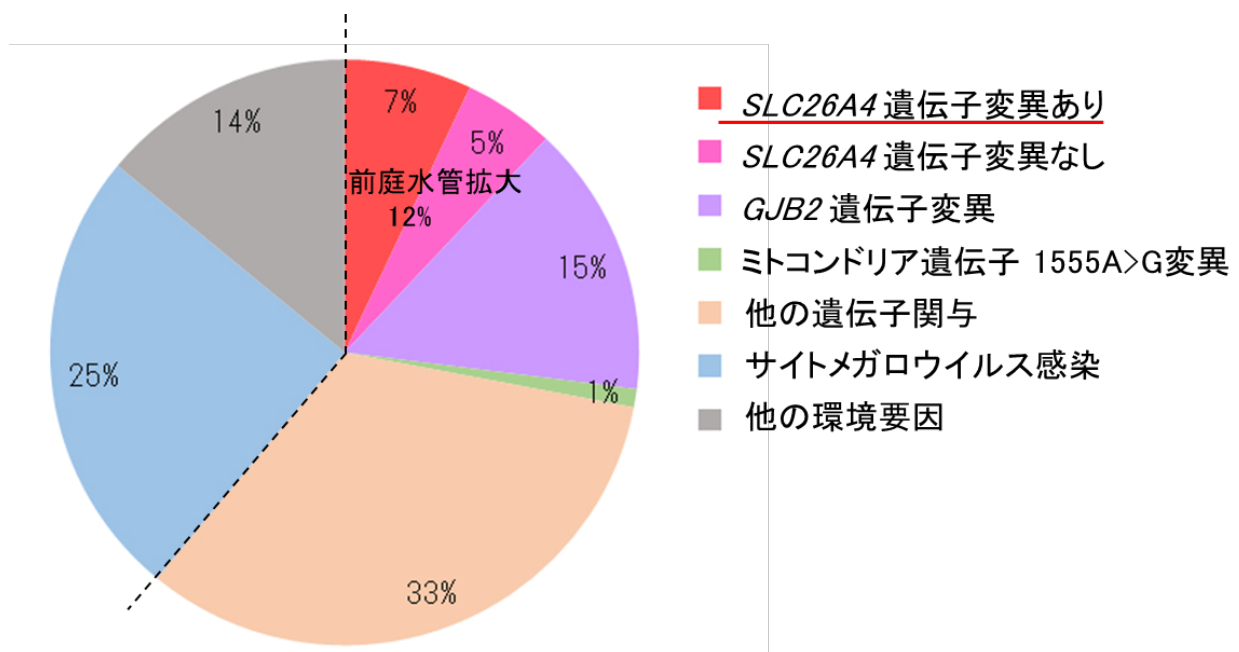


図 1.1 難聴の原因と頻度

遺伝性難聴が難聴全体の 61 %を占め、前庭水管拡大を伴う遺伝性難聴のおよそ半数に *SLC26A4* 遺伝子変異がみられる [1] 。

CDH23、*COL11A2* 遺伝子異常の頻度がほぼ同列に並んで高いとされており [11]、ここでも *SLC26A4* の遺伝子変異は 2 番目に多いことがわかる。遺伝子変異の内容としては、*GJB2* 遺伝子変異では遺伝子の挿入・欠失がおよそ半分で、残りの半分はミスセンスによるものであるが、*SLC26A4*、*MYO15A*、*CDH23*、*COL11A2* 遺伝子変異ではミスセンスによるものが大半である。また、*GJB2* 遺伝子異常は非進行性難聴であるのに対して、*SLC26A4* の遺伝子異常は難聴以外の随伴症状が進行性という特徴を示す。例えば、青年期以降に甲状腺腫を発症する確率が高く、*SLC26A4* 遺伝子変異全体のおよそ 30 % にこれが認められ、またこれとは別に 60~70 % にめまい発作が認められ、これらは次第に麻痺性眼振へと移行することが知られている。このようなことから、*SLC26A4* 遺伝子変異は遺伝性難聴の治療や創薬研究において注目されている。

1.1.3 Pendrin(*SLC26A4*)遺伝子変異の種類

SLC26A4 遺伝子は、Pendrin タンパクをコードする遺伝子で、21 個のエクソンから構成され、780 個のアミノ酸からなる分子量 73 kDa の 11-12 回膜貫通タンパクである。機能としては陰イオンの輸送に関与しており、 Cl^- 、 HCO_3^- 、 I^- の交換輸送に働いている。また、遺伝性難聴の研究から、今日までに *SLC26A4* 遺伝子の変異箇所は 160 種類以上が報告されている[12,13]。

表 1.2 は、このうち *SLC26A4* 遺伝子の主要な遺伝子変異を示したものである。表に示すように *SLC26A4* 遺伝子変異箇所は多岐にわたっており、主にエクソンにおける変異が非症候群性難聴(NSEVA)の原因であるが、一方でイントロンの変異も関与していることが分かる。また、症候群性難聴である PDS の原因としても、アミノ酸置換 p.P123S をはじめとして複数の変異が関与していることが分かる。また、1 つのエクソンにおいても複数箇所の変異が認められることが多い。

表 1.2

SLC26A4 遺伝子変異の種類 [12]

| エクソン | 塩基変化 | アミノ酸置換 | 表現型 |
|-----------|-----------------|----------------|-----------------|
| 1 | c.139insC | | NSEVA |
| 2 | c.82A>G | p.S28G | NSEVA |
| 2 | c.266C>T | p.P76S | NSEVA |
| 3 | c.281C>T | p.T94I | NA(NSEVA:China) |
| 4 | c.322delc | | NSEVA |
| 4 | c.367C>T | p.P123S | NSEVA/Pendred |
| Intron4 | c.416-1G>A | | NSEVA |
| 5 | c.439A>G | p.M147V | NSEVA |
| Intron5 | c.600+1G>T | | NSEVA |
| Intron5 | c.601-1G>A | | Pendred |
| 7 | c.890C>A | p.P297Q | NSEVA |
| 7 | c.917delT | | NSEVA |
| Intron7 | c.919-2A>G | | NSEVA/Pendred |
| Intron8 | c.1001+1G>A | | NSEVA/Pendred |
| Intron8 | c.1002-9A | | NSEVA |
| 9 | c.1105A>G | p.K369E | NSEVA |
| 9 | c.1115C>T | p.A372V | NSEVA/Pendred |
| 10 | c.1174A>T | p.N392Y | NSEVA/Pendred |
| 10 | c.1187G>A | p.G396E | NSEVA |
| 10 | c.1219delCT | | NSEVA |
| 10 | c.1229C>T | p.T410M | NSEVA/Pendred |
| 11 | c.1300G>A | p.A434T | NSEVA |
| 11 | c.1315G>A | p.G439R | NSEVA |
| 11 | c.1343C>A | p.S448L | NSEVA |
| 14 | c.1579A>G | p.T527P | NSEVA |
| 14 | c.1586T | p.I529S | NSEVA |
| 14 | c.1586T>G | p.S532I | NSEVA |
| 15 | c.1652insT | | NSEVA |
| 15 | c.1694G>A | p.C565Y | NSEVA |
| Intron 15 | c.1707+5G>A | | NSEVA |
| 16 | c.1743G>C | p.R581S | NSEVA |
| 17 | c.1829C>A | p.S610X | NSEVA |
| 17 | c.1970G>A | p.S657N | NSEVA |
| 17 | c.1975G>C | p.V659L | NSEVA |
| 17 | c.2007C>A | p.D669E | NSEVA |
| 17 | c.1997C>T | p.S666F | NSEVA |
| 18 | c.2074T>G | p.F692L | NSEVA |
| 19 | c.2111ins GCTGG | | NSEVA/Pendred |
| 19 | c.2162C>T | p.T721M | NSEVA |
| 19 | c.2168A>G | p.H723R | NSEVA/Pendred |
| 19 | c.2169C>T | p.H723Y | NSEVA |
| 19 | c.2180T>A | p.L727X | NSEVA |

NSEVA: 前庭水管拡大を伴う非症候群性難聴

Pendred: Pendred 症候群(PDS)

1.2 Pendrin(*SLC26A4*)の局在と機能

遺伝性聴覚に関わる遺伝子は多数存在するがその多くは内耳の蝸牛(図 1.2)に発現し、個別に局在しており、それぞれ固有の役割を担っている。そのため、遺伝性難聴もこれら聴覚に関わる多数の遺伝子変異が原因で生じる。内耳の蝸牛にあるコルチ器では、機能の要として知られている蓋膜、外有毛細胞(聴細胞)だけでなく、ライスネル膜、血管条、ラセン靭帯、ラセン隆起、外ラセン溝細胞、クラウディウス細胞、ヘンゼン細胞、支持細胞、内柱細胞、外柱細胞、内有細胞、歯間細胞、ラセン板縁、内ラセン溝細胞、ラセン神経節、から構成されていて、極めて複雑な組織をつくっている。聴覚に関わる多数の遺伝子は、これらの組織上でそれぞれ異なる遺伝子を発現し、タンパク質も多様であり、それぞれ部位特異的に局在している[11]。

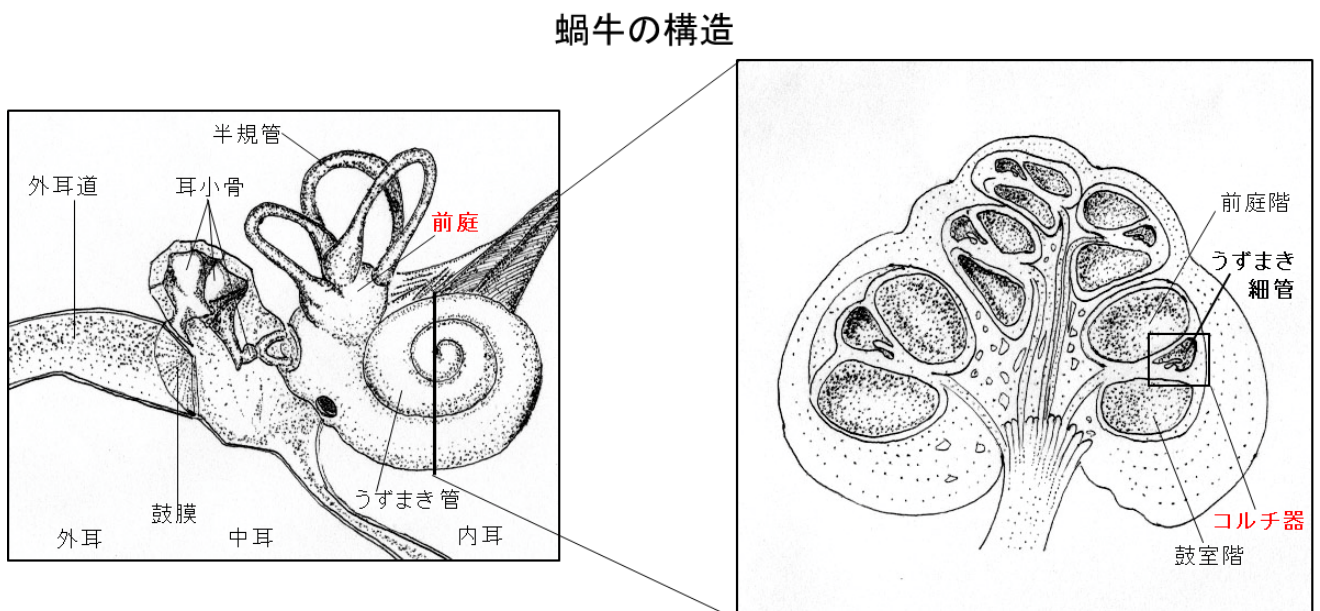


図 1.2 蝸牛のうずまき管は聴覚、前庭と半規管は平衡覚を担う。
うずまき細管の内部にコルチ器がある。

1.2.1 コルチ器における Pendrin 発現

これらの遺伝性難聴に関わる遺伝子の中で、今回我々が着目している *SLC26A4* 遺伝子は、内耳の蝸牛の内部コルチ器(図 1.3)では、ラセン隆起と、外ラセン溝細胞に局所的に発現し[14]、内リンパ液の pH 調整に関与している。さらに詳しく Pendrin が局在する細胞を挙げると、外ラセン細胞、ダイテルズ細胞、クラウディウス細胞、ラセン神経節のみに発現している[15,16]。これらの部位で Pendrin は、塩化物イオン(Cl^-)、重炭酸イオン(HCO_3^-)およびヨウ素イオン(I^-)の輸送を行っている[8,17,18]。

そして、*SLC26A4* 遺伝子に変異することで、内耳内にみられる形態

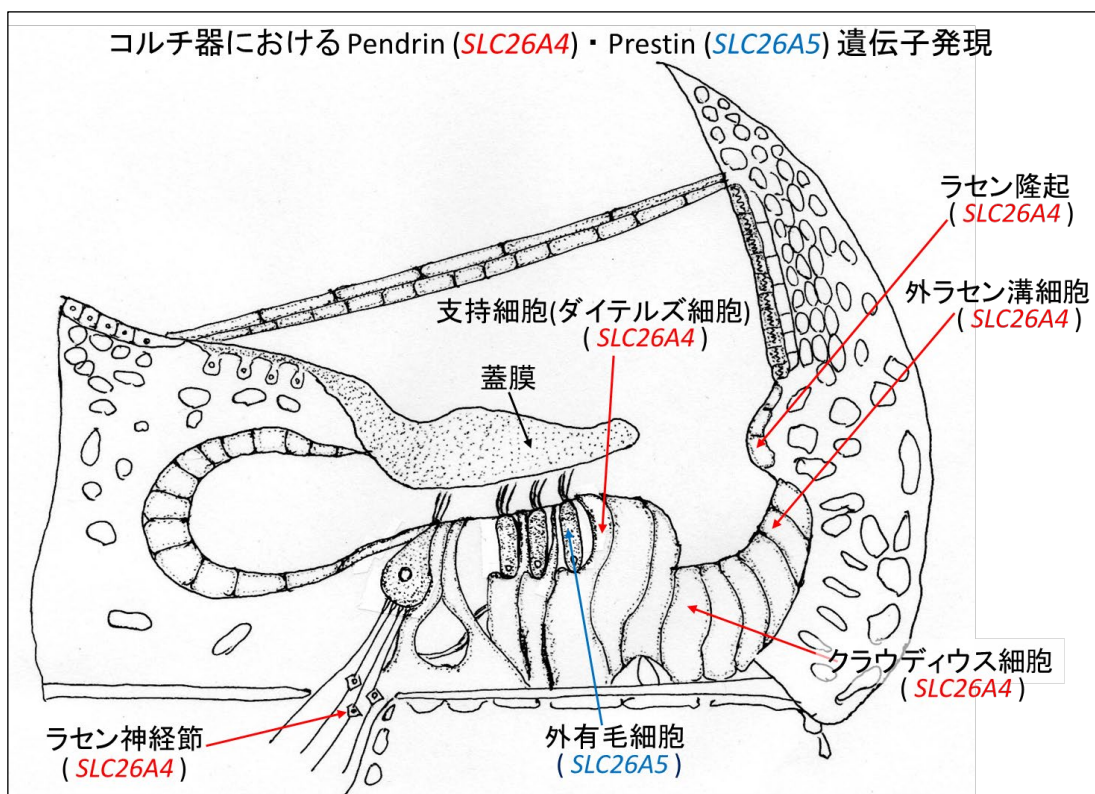


図 1.3 コルチ器は、蓋膜と繊毛を持つ聴細胞(有毛細胞)からなり、音を受容する。蓋膜と聴細胞とが物理的に接触することで音の刺激が聴神経へ伝達される。

的特徴として前庭水管拡大が生じ、難聴になる[1,8,19,20]。また、内耳における奇形全体に占める割合では、前庭水管拡大は最も高頻度にみられる症状で、日本人の内耳奇形の場合全体の 82 %に *SLC26A4* 遺伝子変異が認められる[12]。このことから、*SLC26A4* 遺伝子変異が蝸牛と聴力に与える影響がたいへん大きいことがわかる。

1.2.2 前庭における Pendrin 発現

SLC26A4 遺伝子は、内耳の蝸牛内の前庭においても発現している(図 1.4)。前庭は、聴覚とは別のはたらきをする器官で、加速度と回転運動を感知するセンサーの役割をしており、半規管(三半規管)と卵形嚢と球

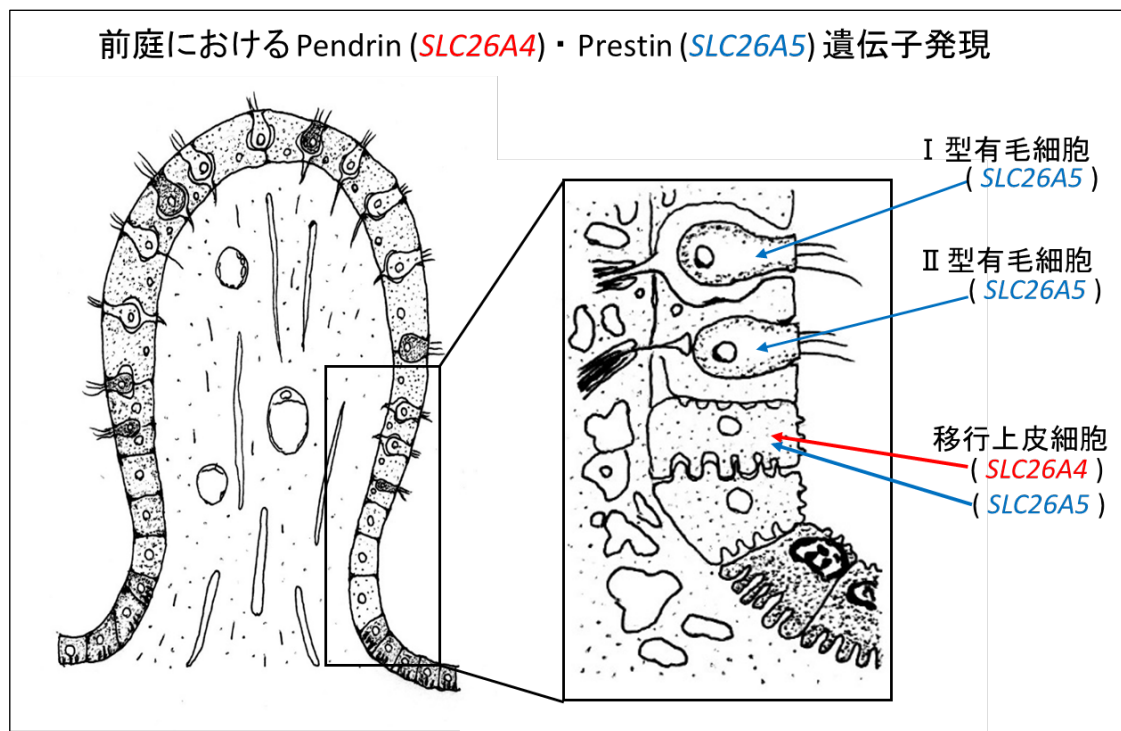


図 1.4 前庭基部のびんにはクプラと呼ばれる突起状の構造がある。ここに繊毛を持つ有毛細胞が存在し、体の動きに伴う内部のリンパ液の流れを、有毛細胞の繊毛が感知することで回転運動を受容する。

形囊の組み合わせからできている。半規管の基部にある膨大部の内部には、コルチ器の内部と同様に有毛細胞が存在し、加速度や回転運動によるリンパの流れを有毛の動きにおいて感知している。具体的には、I型有毛細胞、II型有毛細胞、支持細胞、移行上皮細胞からなる組織をつくり、*SLC26A4* 遺伝子はこの中の移行上皮細胞を構成するタンパク質の1つを担当する。*SLC26A4* 遺伝子が異常となった場合にみられる難聴以外の症状、例えばめまいなどの前庭症状[12,13]は、前庭での加速度と回転運動の感知機能低下が原因であると考えられている。

その他、内耳以外での遺伝子発現部位として、*SLC26A4* 遺伝子は甲状腺と腎臓にも発現する。そのため、PDS では聴覚と平衡覚以外の症状として、甲状腺腫が知られている。これは、ヨード有機化障害を生じ、ヨードが甲状腺濾胞へ正常に運ばれないことが原因で甲状腺腫を生ずると考えられている。

また、Pendrin の機能を解明する目的としてノックアウトマウスの作製も報告されており、このマウスでは、ヒトにおける症状と同様に、内耳奇形、高度難聴、平衡機能障害が報告されている[21]。

1.2.3 Pendrin と相同性の高い Prestin タンパク

これまで、Pendrin について局在と機能を述べてきた。一方、Pendrin と相同性が高い Prestin(*SLC26A5*)と呼ばれるタンパクがある。Prestin は、Pendrin とともに *SLC26A* 遺伝子ファミリーに属しており、Pendrin と 45 %の相同性がみられる大変似かよったタンパク質である[22]。そして、Prestin の遺伝子 *SLC26A5* に異常がある場合、Pendrin と同様に

遺伝性の難聴になることが知られている。Prestin は、聴覚をつかさどる内耳内、コルチ器の外有毛細胞に特異的に発現しモータータンパク質として機能しており(図 1.2)、その機能は、膜電位変化による構造変化をともないながら細胞全体を収縮させ、基底膜の振動を増幅することで知られている[23,24]。これはいわばアンプと同じ役割を果たしており、リンパ液から伝わる微振動を増幅する役目の中核を担っている重要なタンパク質である。また、加速度と回転運動をつかさどる内耳の前庭においても *SLC26A4* 遺伝子と同様に、移行上皮細胞に特異的に発現している[11](図 1.3)。そして、Prestin の Cl^- と HCO_3^- の輸送にサリチル酸が及ぼす影響も報告されている[25]。この点に注目した先行研究が行われ、Prestin はサリチル酸と高い親和性を有し[26,27]、またサリチル酸はミスフォールドした変異型 Prestin をレスキューし、細胞質から細胞膜へと移行させる分子シャペロン活性を有することが報告されている[28]。変異型 Prestin に対するサリチル酸の分子シャペロン効果に着目して、さらに研究が行われ、変異型 Pendrin に対するサリチル酸の影響と分子シャペロン効果が調べられている[29,30]。

1.3 本研究について

これまで述べてきたように、遺伝性難聴の1つ、Pendred 症候群(PDS)の原因である *SLC26A4* の遺伝子変異に対する治療や創薬研究は優先的であり、有効であると考えられる。細胞内における変異型 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と移行することができない。そのため、コルチ器のラセン隆起および外ラセン溝細胞における陰イオンの輸送が障害され、水管拡大をともなう難聴を示す。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 を小胞体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ている[30]。これをふまえて、本研究では、サリチル酸による変異型 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化合物スクリーニング法の開発を行い、サリチル酸とその類縁体から有用な候補化合物の探索を行った。

第二章では、変異型 Pendrin(P123S)恒常発現(Stable)細胞を樹立した。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[30]。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[30]。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)化合物添加、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。そこで本研究では、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 96 well 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 発現細胞(Wt)と変異型 Pendrin(P123S)発現細胞(PH1-1H1)を得たことで、遺伝子導入の段階を省くことが可能となり、第三章の Morphology 解析に有用な細胞株であると判断した。

第三章では細胞イメージアナライザーCellInsight™ を用いて細胞の Morphology 解析のためのパラメーターを検討した。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。この局在変化について、従来の手法では、免疫染色の後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。本研究では 96 well 培養プレートを用いた迅速な化合物スクリーニングを目的にこれを改良した。CellInsight™ による計測は、96 well 内を 100 フィールドに区分し、各フィールド内最大 100 個細胞を検出して、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。複数の条件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 細胞に対するサリチル酸添加後の、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な 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。) このことから、変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングの基準を Ch3(C)蛍光強度の減少として決定し、第四章のサリチル酸類縁体からの化合物探索に用いた。

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を行った。サリチル酸とその類縁体は、96 well 培養プレート中 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 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た。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 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、化合物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 時間後には効果が失われたのに対して、化合物 8 は 12 時間後まで効果が持続した。以上より、化合物 8 は変異型 Pendrin の細胞膜移行活性を示す有用な候補化合物であることが示唆された。

本研究の結論は、以下の 3 点になる。

1. 限界希釈法による細胞のクローニングで、野生型 Pendrin 発現細胞 (Wt)と変異型 Pendrin(P123S)発現細胞(PH1-1H1)を得た。Wt 細胞は G-418 Sulfate 存在下で恒常的に野生型 Pendrin を発現し、細胞膜局在を示した。PH1-1H1 細胞は G-418 Sulfate 存在下で恒常的に変異型 Pendrin を発現し、細胞質に局在を示した。これに 10 mM サリチル酸を 12 時間添加することで細胞膜局在を示した。得られた PH1-1H1 細胞は、サリチル酸類縁体を用いた変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングに有用な細胞である。

2. CellInsight™による Morphology 解析パラメーターの条件検討を行った。細胞外周を解析の基準である Ch1 とし、Ch1 より内側 2 pixel から 7 pixel の 5 pixel 幅を細胞質 Ch3(Cytoplasm:C)として設定することで、サリチル酸濃度依存的な Ch3(C)の減少が確認できた。すなわち、化合物濃度依存的な Ch3(C)の減少に着目することで、96 well 培養プレートを用いた迅速かつ網羅的な、変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングが可能となった。
3. 変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングより 6 つの有効な候補化合物を発見した。中でも化合物 **8** ((2-aminophenyl)methanol)はサリチル酸に対して細胞膜移行活性が 100 倍高く、加えて細胞内薬剤持続的効果も長く 12 時間を示した。すなわち、化合物 **8** は変異型 Pendrin の細胞膜移行活性を有する有用な候補化合物であることが示唆された。

1.4 引用文献

- [1] Morton, CC.; Nance, WE. “Newborn hearing screening: a silent revolution”, *N Engl J Med* **354**(20): 2151-2164 (2006).
- [2] Akita, J.; Abe, S.; Shinkawa, H.; Kimberling, WJ.; Usami, S. “Clinical and genetic features of nonsyndromic autosomal dominant sensorineural hearing loss: KCNQ4 is a gene responsible in Japanese”, *J Hum Genet* **46**(7): 355-361 (2001).
- [3] Naito, T.; Nishio, SY.; Iwasa, Y.; Yano, T.; Kumakawa, K.; Abe, S.; Ishikawa, K.; Kojima, H.; Namba, A.; Oshikawa, C.; Usami, S. “Comprehensive genetic screening of KCNQ4 in a large autosomal dominant nonsyndromic hearing loss cohort: genotype-phenotype correlations and a founder mutation”, *PLoS One* **8**(5): e63231 (2013).
- [4] Iwasaki, S.; Harada, D.; Usami, S.; Nagura, M.; Takeshita, T.; Hoshino, T. “Association of clinical features with mutation of TECTA in a family with autosomal dominant hearing loss”, *J Otolaryngol Head Neck Surg* **128**(8): 913-917 (2002).
- [5] Moteki, H.; Nishio, SY.; Hashimoto, S.; Takumi, Y.; Iwasaki, S.; Takeichi, N.; Fukuda, S.; Usami, S. “TECTA mutations in Japanese

with mid-frequency hearing loss affected by zona pellucida domain protein secretion”, *J Hum Genet* **57**(9): 587-592 (2012).

[6] Fukuoka, H.; Kanda, Y.; Ohta, S.; Usami, S. “Mutations in the WFS1 gene are a frequent cause of autosomal dominant nonsyndromic low-frequency hearing loss in Japanese”, *J Hum Genet* **52**(6): 510-515 (2007).

[7] 宇佐美 真一 「きこえと遺伝子 難聴の遺伝子診断とその社会的貢献」 改訂第2版 金原出版株式会社 14-15 (2015).

[8] Everett, LA.; Glaser, B.; Beck, JC.; Idol, JR.; Buchs, A.; Heyman, M.; Adawi, F.; Hazani, E.; Nassir, E.; Baxevanis, AD.; Sheffield, VC.; Green, ED. “Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS)”, *Nat Genet* **17**(4): 411-422 (1997).

[9] Abe, S.; Usami, S.; Shinkawa, H. “Three familial cases of hearing loss associated with enlargement of the vestibular aqueduct”, *Ann Otol Rhinol Laryngol* **106**(12): 1063-1069 (1997).

[10] Abe, S.; Usami, S.; Hoover, DM.; Cohn, E.; Shinkawa, H.; Kimberling, WJ. “Fluctuating sensorineural hearing loss associated

with enlarged vestibular aqueduct maps to 7q31, the region containing the Pendred gene”, *Am J Med Genet* **82**(4): 322-328 (1999).

[11] Nishio, SY.; Hattori, M.; Moteki, H.; Tsukada, K.; Miyagawa, M.; Naito, T.; Yoshimura, H.; Iwasa, Y.; Mori, K.; Shima, Y.; Sakuma, N.; Usami, S. “Gene expression profiles of the cochlea and vestibular endorgans: localization and function of genes causing deafness”, *Ann Otol Rhinol Laryngol* **124** Suppl 1: 6S-48S (2015).

[12] Miyagawa, M.; Nishio, SY.; Usami, S. “Mutation spectrum and genotype-phenotype correlation of hearing loss patients caused by *SLC26A4* mutations in the Japanese: a large cohort study”, *J Hum Genet* **59**(5): 262-268 (2014).

[13] Suzuki, H.; Oshima, A.; Tsukamoto, K.; Abe, S.; Kumakawa, K.; Nagai, K.; Satoh, H.; Kanda, Y.; Iwasaki, S.; Usami, S. “Clinical characteristics and genotype-phenotype correlation of hearing loss patients with *SLC26A4* mutations”, *Acta Otolaryngol* **127**(12): 1292-1297 (2007).

[14] Everett, LA.; Morsli, H.; Wu, DK.; Green, ED. “Expression pattern of the mouse ortholog of the Pendred’s syndrome gene (PDS)

suggests a key role for pendrin in the inner ear”, *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17): 9727-9732 (1999).

[15] Yoshino, T.; Sato, E.; Nakashima, T.; Nagashima, W.; Teranishi, MA.; Nakayama, A.; Mori, N.; Murakami, H.; Funahashi, H.; Imai, T. “The immunohistochemical analysis of pendrin in the mouse inner ear”, *Hear Res* **195**(1-2): 9-16 (2004).

[16] Yoshino, T.; Sato, E.; Nakashima, T.; Teranishi, M.; Yamamoto, H.; Otake, H.; Mizuno, T. “Distribution of pendrin in the organ of Corti of mice observed by electron immunomicroscopy”, *Eur Arch Otorhinolaryngol* **263**(8): 699-704 (2006).

[17] Scott, DA.; Wang, R.; Kreman, TM.; Sheffield, VC.; Karniski, LP. “The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein”, *Nat Genet* **21**(4): 440-443 (1999).

[18] Scott, DA.; Karniski, LP. “Human pendrin expressed in *Xenopus laevis* oocytes mediates chloride/formate exchange”, *Am J Physiol Cell Physiol* **278**(1): C207-211 (2000).

[19] Li, XC.; Everett, LA.; Lalwani, AK.; Desmukh, D.; Friedman, TB.; Green, ED.; Wilcox, ER. “A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness”, *Nat Genet* **18**(3): 215-217 (1998).

[20] Usami, S.; Abe, S.; Weston, MD.; Shinkawa, H.; Van, Camp, G.; Kimberling, WJ. “Non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS mutations”, *Hum Genet* **104**(2): 188-192 (1999).

[21] Everett, LA.; Belyantseva, IA.; Noben-Trauth, K.; Cantos, R.; Chen, A.; Thakkar, SI.; Hoogstraten-Miller, SL.; Kachar, B.; Wu, DK.; Green, ED. “Targeted disruption of mouse Pds provides insight about the inner-ear defects encountered in Pendred syndrome”, *Hum Mol Genet* **10**(2): 153-161 (2001).

[22] Mount, DB.; Romero, MF. “2004 The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers”, *Pflugers Arch* **447**(5): 710-721 (2004).

[23] Hudspeth, AJ. “Integrating the active process of hair cells with cochlear function”, *Nat Rev Neurosci* **15**(9): 600-614 (2014).

[24] Zheng, J.; Shen, W.; He, DZ.; Long, KB.; Madison, LD.; Dallos, P. “Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells”, *Nature* **405**(6783): 149-155 (2000).

[25] Oliver, D.; He, DZ.; Klöcker, N.; Ludwig, J.; Schulte, U.; Waldegger, S.; Ruppersberg, JP.; Dallos, P.; Fakler, B. “Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein”, *Science* **292**(5525): 2340-2343 (2001).

[26] Tunstall, MJ.; Gale, JE.; Ashmore, JF. “Action of salicylate on membrane capacitance of outer hair cells from the guinea-pig cochlea”, *J Physiol* **485**(Pt3): 739-752 (1995).

[27] Kakehata, S.; Santos-Sacchi, J. “Effects of salicylate and lanthanides on outer hair cell motility and associated gating charge”, *J Neurosci* **16**(16):4881-4889 (1996).

[28] Kumano, S.; Iida, K.; Ishihara, K.; Murakoshi, M.; Tsumoto, K.; Ikeda, K.; Kumagai, I.; Kobayashi, T.; Wada, H. “Salicylate-induced translocation of prestin having mutation in the GTSRH sequence to the plasma membrane”, *FEBS Lett* **584**(11): 2327-2332 (2010).

[29] Tsukamoto, K.; Suzuki, H.; Harada, D.; Namba, A.; Abe, S.; Usami, S. "Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese", *Eur J Hum Genet* **11**(12): 916-922 (2003).

[30] Kenji, I.; Shuhei, O.; Shun, K.; Koji, I.; Hiroshi, H.; Michio, M.; Toshimitsu, K.; Shinichi, U.; Katsuhisa, I.; Yoichi, H.; Kohei, T.; Hiroyuki, N.; Noriyasu, H.; Hiroshi, W. "Salicylate restores transport function and anion exchanger activity of missense pendrin mutations", *Hear Res* **270**(1-2): 110-118 (2010).

第二章

変異型 Pendrin(P123S)恒常発現細胞の樹立

2.1 はじめに

序論で記述した先行研究において、*SLC26A4* 遺伝子変異のうち主要な 10 種類の変異型 Pendrin が作製された(P123S、M147V、K369E、A372V、N392Y、C565Y、S657N、S666F、T721M、H723R)(表 2.1)。これらの変異型 Pendrin はプラスミドベクターを用いて HEK293 細胞に遺伝子導入され、サリチル酸の分子シャペロン活性が調べられている [1]。

形態的特徴として、2 種類 K369E と C565Y は野生型 Pendrin と同様に細胞膜に局在を示したが、陰イオン(Cl^- と HCO_3^-)の交換活性が制御出来ていない可能性が示唆された。次の 4 種類(A372V、N392Y、S666F、T721M)は変異型 Pendrin がミスフォールドしたまま細胞質に局在し、サリチル酸による分子シャペロン活性はみられなかった。これに対して残りの 4 種類(P123S、M147V、S657N、H723R)では、変異型 Pendrin はミスフォールドし細胞質に蓄積したが、10 mM サリチル酸を加えることで機能を回復し、細胞膜へと移行した [1](図 2.1)。

本研究では、先行研究においてサリチル酸による分子シャペロン活性が示されている 4 種類の変異型 Pendrin(P123S、M147V、S657N、H723R)の中から P123S を用いて、HEK293 細胞に遺伝子導入した。従来までの一過性(Transient)による遺伝子導入の場合、1)細胞播種、

2)遺伝子導入(Transient)、3)化合物添加、4)免疫染色、5)細胞内局在変化 の過程を必要とし、この場合、実験ごとの遺伝子導入効率の安定性と、96 well 培養プレートを用いて多数の化合物を迅速にスクリーニングするには課題があった。そのため、変異型 Pendrin を恒常的に発現する Stable 細胞を樹立した。

具体的には、限界希釈法により変異型 Pendrin(P123S)と野生型 Pendrin を恒常的(Stable)に発現する細胞を選出した。遺伝子導入後の HEK293 細胞はネオマイシン耐性であることから、G-418 Sulfate 存在下で 10 日間連続培養し、生え抜きを選んだ。次に Pendrin の発現とサリチル酸による細胞内局在変化を確認した後、96 well 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。再び、同様の細胞のクローニングを行った。合計 2 回の限界希釈により、野生型 Pendrin 発現細胞として Wt と、変異型 Pendrin(P123S)発現細胞 PH1-1H1 を樹立した。

表 2.1

| エクソン | 塩基変化 | アミノ酸置換 |
|------|-----------|----------------|
| 4 | c.367C>T | <u>p.P123S</u> |
| 5 | c.439A>G | <u>p.M147V</u> |
| 9 | c.1105A>G | p.K369E |
| 9 | c.1115C>T | p.A372V |
| 10 | c.1174A>T | p.N392Y |
| 15 | c.1694G>A | p.C565Y |
| 17 | c.1970G>A | <u>p.S657N</u> |
| 17 | c.1997C>T | p.S666F |
| 19 | c.2162C>T | p.T721M |
| 19 | c.2168A>G | <u>p.H723R</u> |

先行研究によって作製された 10 種類のミスセンス変異型 Pendrin(*SLC26A4*)遺伝子。10 種類の変異のうち、サリチル酸による分子シャペロン活性が示された 4 種類を下線で示した[1]。この中から本研究では P123S を用いた。

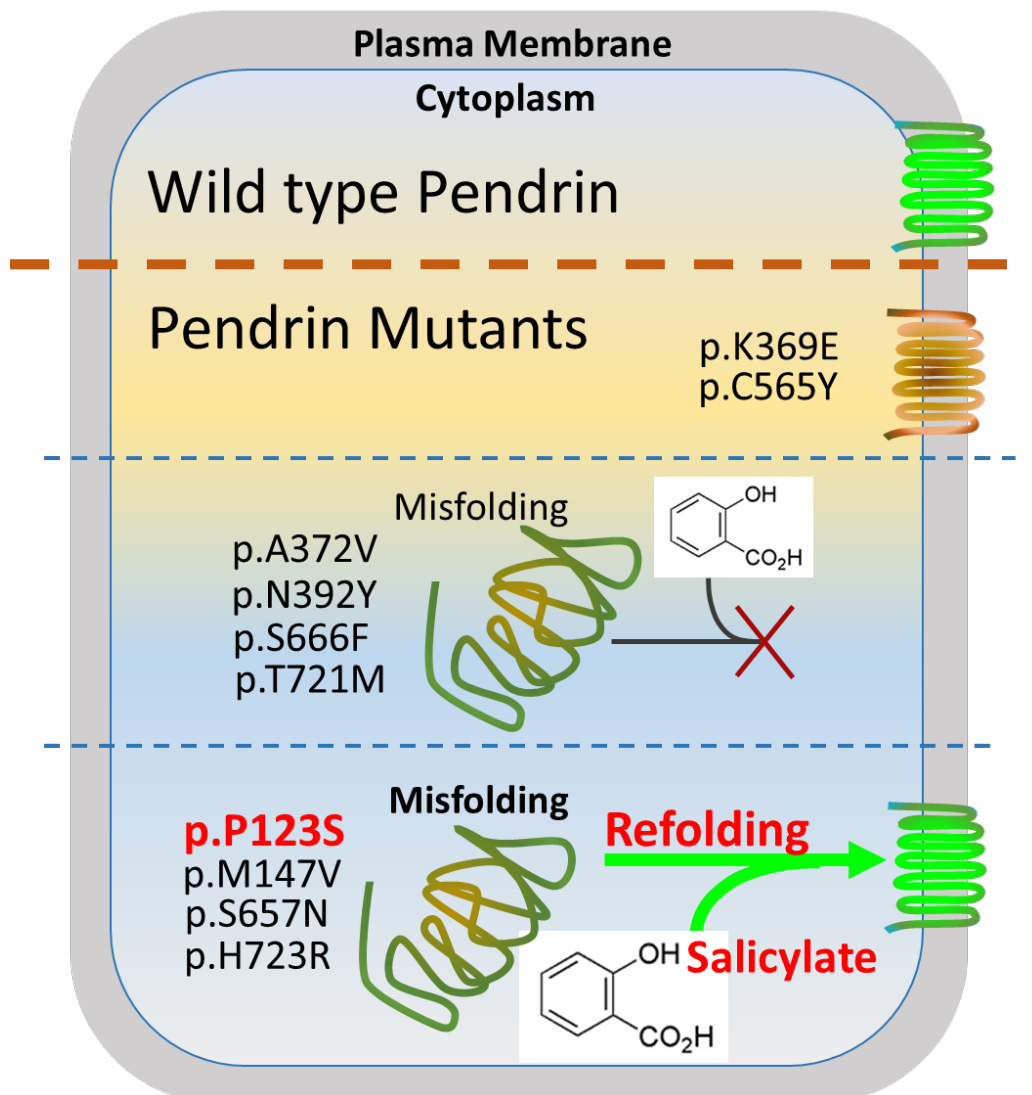


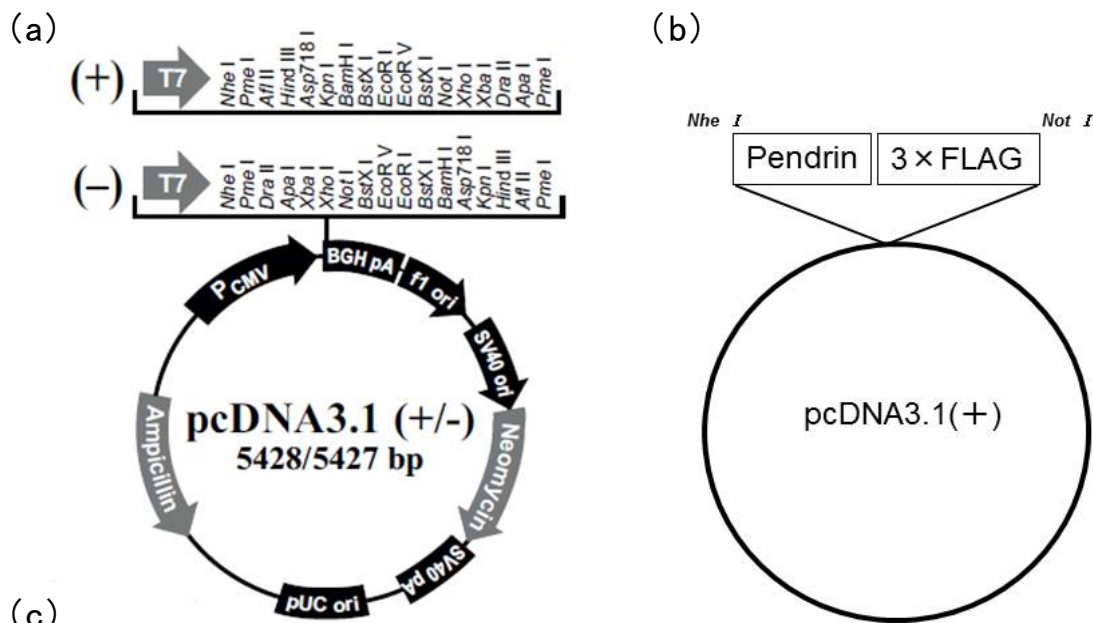
図 2.1 先行研究で作製された 10 種類のスセンス変異型 Pendrin の HEK293 細胞における局在について。

野生型 Pendrin(Wild type Pendrin)は HEK293 細胞において発現後、細胞膜に局在した。変異型 Pendrin である A372V、N392Y、S666F、T721M はミスフォールディングタンパク質で細胞質に局在し、サリチル酸応答性(サリチル酸添加後の細胞膜への移行と陰イオン交換活性)はみられなかった。K369E と C565Y は細胞膜に局在したが、陰イオンの交換活性がなく、サリチル酸添加による再活性化もみられなかった。一方、P123S、M147V、S657N、H723R は細胞質に局在したが、10 mM サリチル酸を 12 時間加えることで細胞内局在変化し、細胞膜局在と陰イオン交換活性を示した[1]。

2.2 試薬および実験方法

2.2.1 pcDNA3.1-Pendrin について

Pendrin を導入したプラスミド DNA は、先行研究において作製されたものを用いた(図 2.2)。これは pcDNA3.1TM(+) (InvitrogenTM) の *Nhe I* site と *Not I* site の間に Pendrin-3×FLAG が挿入されている。このプラスミド DNA には *E. Coli* 用に Ampicillin と、真核細胞用に Neomycin の resistant genes が挿入されており、このプラスミド DNA で形質転換した *E. Coli* は Ampicillin 耐性を持ち、真核細胞に遺伝子導入した場合には抗生物質 G-418 Sulfate 抵抗性を持つことになる。本研究では、野生型 Pendrin と変異型 Pendrin(P123S)を挿入したプラスミド DNA を使用した。プラスミド DNA は HEK293 細胞に遺伝子導入するためには大量に必要であるため、P123S を大腸菌に遺伝子組み換えした後、液体培養で振とう培養し、その後カラムで精製した。なお、野生型 Pendrin は必要な量が十分確保できていたため、大腸菌遺伝子組換えは行わずストックを使用した。



(c)

```

          enhancer region (3' end)
689  CATTGACGTC AATGGGAGTT TGTTTTGGCA CCAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTCG
          CAAT
749  TAACAAC TCC GCCCATTGA CGCAAATGGG CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT
          3' end of hCMV
809  AAGCAGAGCT CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTTAC TGGCTTATCG AAATTAATAC
          T7 promoter/primer binding site
869  GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTGGCTA GCGTTTAAAC TTAAGCTTGG TACCGAGCTC
          BamH I
929  GGATCCACTA GTCCAGTGTG GTGGAATTCT GCAGATATCC AGCACAGTGG CGGCCGCTCG
          Xba I
989  AGTCTAGAGG GCCCGTTTAA ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC
          pcDNA3.1/BGH reverse priming site
1049 CATCTGTTGT TTGCCCTCC CCCGTGCCTT CTTGACCCT GGAAGGTGCC ACTCCCCTG
          BGH poly (A) site
1109 TCCTTTCCTA ATAAAATGAG GAAATTGCAT
  
```

図 2.2 遺伝子導入に用いた pcDNA3.1-Pendrin

(a) pcDNA3.1(+) ベクターマップ

(b) pcDNA3.1(+)の *Nhe* I と *Not* I 間に pendrin-3×FLAG が挿入してある。

(c) pcDNA3.1(+)のマルチクローニングサイト

pcDNA3.1(+)は制限酵素 *Bam*H I と *Hind* III で切断されるが、pcDNA3.1-Pendrin は切断されない。

2.2.2 大腸菌遺伝子組み換え

大腸菌は *E. Coli* JM109 Competent Cells (Takara Bio Inc.)を用いた。培地は、形質転換用に SOC 培地(2 % Tryptone、0.5 % Yeast extract、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、10 mM MgSO₄、10 mM MgCl₂、20 mM Glucose)を用いた。また、通常培養として LB 培地(1 % Tryptone、0.5 % Yeast extract、1 % NaCl、1.5 % agar)を用いた。また、プラスミド DNA 導入後のセレクションには、Ampicillin (TCI Co., Ltd.) 100 µg/ml を添加した LB 培地で行った。

大腸菌遺伝子組み換えは、ヒートショック法で行った(図 2.3)[2-4]。*E. Coli* JM109 Competent Cells を氷中で融解し、穏やかに均一に混和し、100 µl のコンピテントセルを 14 ml、ポリプロピレンラウンドチューブ (FALCON)へ移した。次に、形質転換するプラスミド DNA(P123S)を 10 ng 加え、ヒートショックとして氷中 30 分間インキュベートした後 42 °C で 45 秒間インキュベートし、再び氷中に 1 ~2 分静置した。続いて予め 37 °C に保温しておいた SOC 培地を最終 1 ml になるよう加え、37 °C 225 rpm で 1 時間振とう培養した。これを Amp 100 µg/ml を含む LB 培地プレート(LB/Amp)に 100 µl 播種し、37 °C で一晩培養した。コロニーカウントの結果、形質転換効率は 3×10^3 cfu/µg DNA であった。

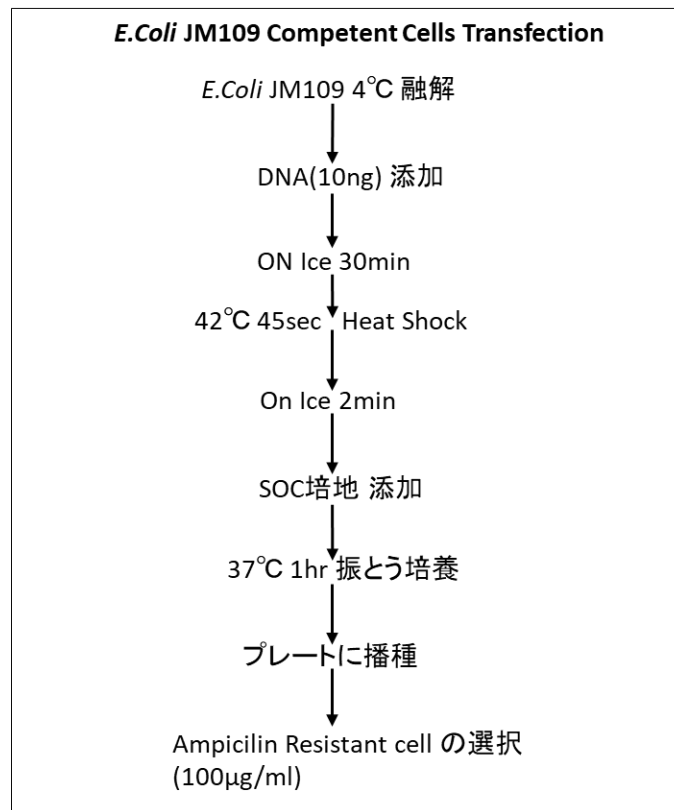


図 2.3 ヒートショック法による大腸菌遺伝子組換え操作

2.2.3 プラスミド DNA の精製

遺伝子組み換えをした *E.Coli* JM109 Competent Cells の LB/Amp 培養プレートよりシングルコロニーを採取し、LB/Amp 液体培地 2 ml に接種し、37 °C で 8 時間、300 rpm で振とう培養した。次に 500 ~1,000 倍量の LB/Amp 液体培地にスケールアップし、37 °C で 12 ~16 時間 300 rpm で振とう培養した。その後 4 °C で 6,000×g、15 分間遠心分離し集菌した。

続いて、カラムによるプラスミド DNA の精製は、QIAGEN® Plasmid Mini (QIAGEN) を用いて行った(図 2.4)。集菌したペレットに 0.3 ml の RNase A を加えた Buffer P1 を加え、細胞塊を 4~6 回

激しく再懸濁した。その後 5 分間 25 °C で静置した。次に 4 °C に冷却した Buffer P3 を 0.3 ml 加え、4~6 回激しく混和した後、氷上で 5 分間インキュベートした。これでゲノム DNA、タンパク、細胞片等を沈殿させた。続いてマイクロ遠心機を用いて最高速 10,000 rpm で遠心分離し、上清を分取した。QIAGEN-tip 20 に QBT を 1 ml 加え、カラムを平衡化した。次に、遠心分離後の上清を QIAGEN-tip 20 にアプライし、プラスミド DNA をカラムに吸着させた。Wash Buffer QC で 2 ml、2 回の洗浄をし、Buffer QF 0.8 ml を加えてプラスミド DNA を溶出させた。これに 0.7 倍容量のイソプロパノールを添加し、DNA を沈殿させ、10,000 rpm で 30 分間遠心分離し、上清を捨てペレットを回収した。得られた DNA ペレットを 70 %エタノール 1 ml で洗浄し、10,000 rpm で 10 分間遠心分離して上清を捨て、ペレットを回収した。ペレットを 5~10 分間乾燥させ、TE Buffer (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) 500 µl で DNA を溶解した。

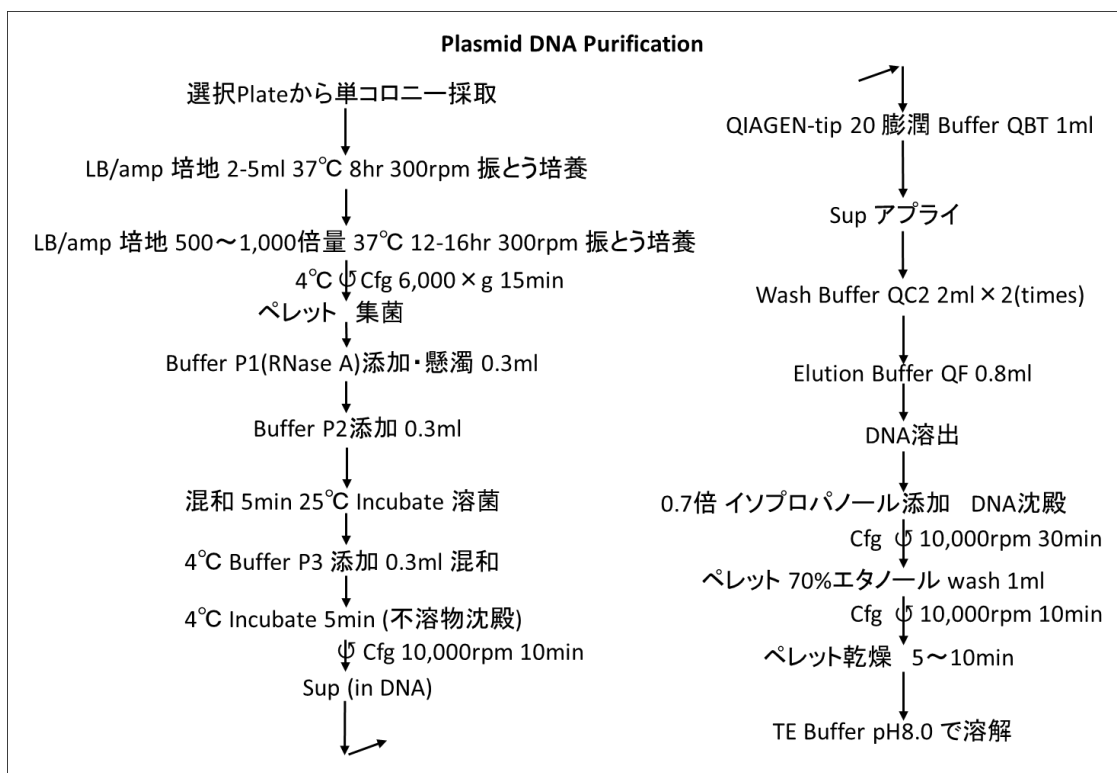


図 2.4 プラスミド DNA の精製

LB/Amp 培地で得られたシングルコロニーを液体培地で振とう培養、スケールアップし、カラムで精製した。

2.2.4 アガロースゲル電気泳動による抽出 DNA の確認

得られたプラスミド DNA はアガロースゲル電気泳動で確認をした(図 2.5)。1 %アガロースゲルを TAE Buffer (40 mM Tris-酢酸、5 mM EDTA-Na、20 mM 氷酢酸、pH 8.3)で作製し、コントロールとして Pendrin 未挿入の pcDNA3.1(+)と、大腸菌より得られた pcDNA3.1-Pendrin を、制限酵素 *BamH* I と *Hind* III (Takara Bio Inc.)で同時消化した[5,6]。制限酵素による消化は、30 °C の K Buffer (20 mM Tris-HCL (pH 8.5)、10 mM MgCl₂、1 mM Dithiothreitol、100 mM KCl)中、DNA 3 µg に対し酵素濃度 5 %で 1 時間行い、TAE

buffer を用いて 80 V 30 分アガロースゲル電気泳動した。その後 5 $\mu\text{g/ml}$ エチジウムブロマイド溶液で 30 分間 DNA を染色し、トランスイルミネーターで UV を照射して確認した。分子量マーカーは Low Range PFG Marker (BioLabs[®] Inc.) を用いた。

Pendrin 未挿入の pcDNA3.1(+) は *BamH* I と *Hind* III によって切断され、大腸菌の環状 DNA はリニア状になる。そのため、5,000 bp 付近のバンドとして現れるのに対して、pcDNA3.1-Pendrin は Pendrin-3 \times FLAG が挿入されているために制限酵素で消化されずにスーパーコイル状となる。そのため、高分子にシフトした(図 2.5)。このことから、目的の pcDNA3.1-Pendrin が得られたことを確認した。続いて、Nano Drop[™] (Thermo Scientific[™]) による 260 nm での核酸定量を行い、プラスミド DNA 収量は 308.5 $\mu\text{g/ml}$ となった。

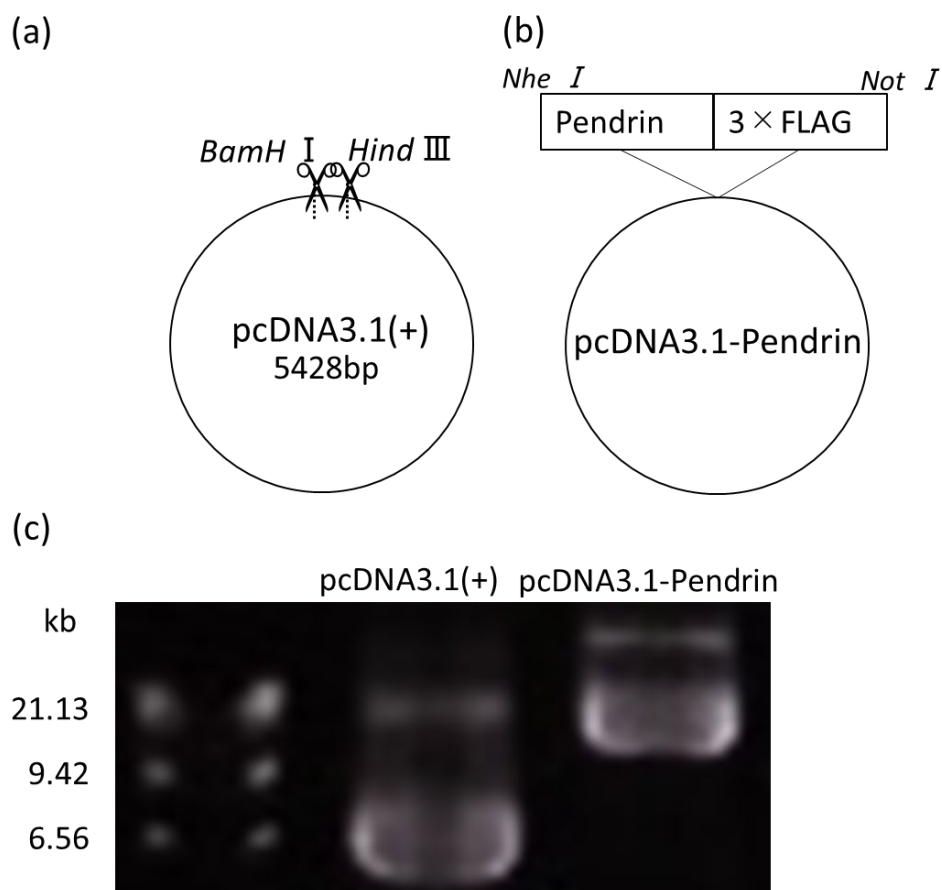


図 2.5 アガロースゲル電気泳動による抽出 DNA の確認

pcDNA3.1(+)と pcDNA3.1-Pendrin を制限酵素 *BamH* I と *Hind* III で消化し、アガロースゲル電気泳動した。

- (a) 制限酵素で切断されてリニアになり 5,000 bp 付近にバンドを示した。
- (b) Pendrin-3 × FLAG が挿入されているため制限酵素で切断されずスーパーコイル状となった。このためバンドが高分子にシフトした。
- (c) エチジウムブロマイド溶液で DNA を染色し、トランスイルミネーターで確認した。

2.2.5 HEK293 細胞の培養条件

HEK293 細胞 (Human Embryonic Kidney cells 293) はヒト胎児腎細胞由来で、遺伝子導入に適した細胞である [7]。先行研究においても、HEK293 細胞に遺伝子導入を行っており本研究でも使用した。

HEK293 細胞 (RIKEN Cell Bank, Tsukuba, Japan) の培養は、10 %

牛血清アルブミン(FBS)を含む RPMI-1640 培地 (Wako pure Chemical, Osaka, Japan)を用いて、37 °C、CO₂濃度 5 %の環境下、CO₂インキュベーターを用いて行った。

2.2.6 HEK293 細胞への遺伝子導入

HEK293 細胞を 96 穴培養プレートに 1×10^4 cells/100 μ l、10 % FBS RPMI-1640 培地に播種した。12 時間後、2 種類(野生型 Pendrin、変異型 Pendrin(P123S))のプラスミド DNA は Opti-MEM[®] (Thermo Scientific)で 2 μ g/100 μ l に希釈した後、FuGENE[®] HD Transfection Reagent (Promega)を用いて FuGENE[®] : DNA = 3 : 1 で混合した (FuGENE[®] 6 μ l : DNA 2 μ g)(図 2.6)[8]。この混合液を静かに培地に 5 μ l 添加し、その後 15 分間インキュベートした後、12 時間以上培養した。また、直径 3.5 cm 培養ディッシュで行った場合は、細胞播種を 5×10^5 cells/well で行った。

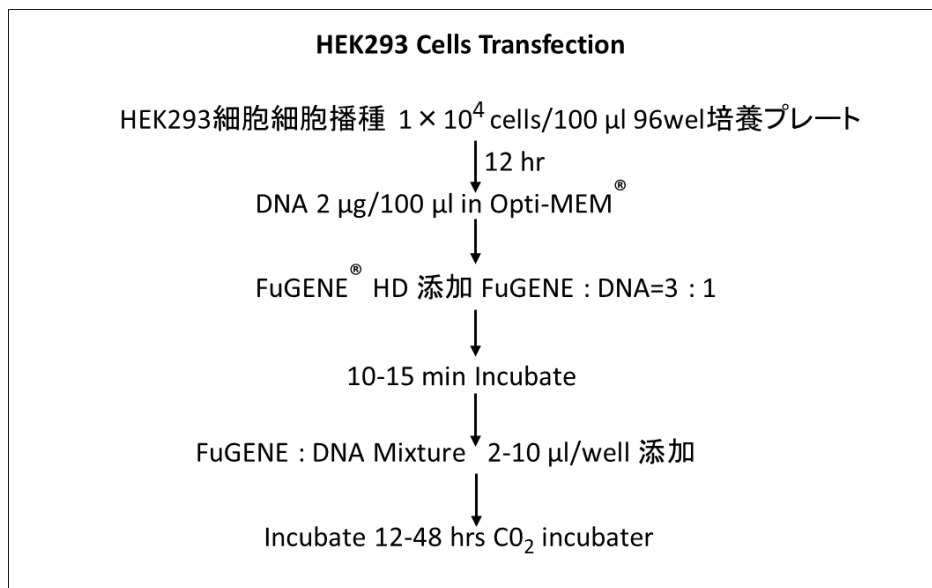


図 2.6 HEK293 細胞への遺伝子導入は、FuGENE[®] HD Transfection Reagent を用いて FuGENE[®] : DNA = 3 : 1 で行った。

2.2.7 免疫染色

野生型 Pendrin、変異型 Pendrin(P123S)を遺伝導入した HEK293 細胞は、遺伝子導入から 12 時間後に免疫染色した[9,10]。HEK293 細胞は、PBS で wash し、4 %パラホルムアルデヒドで 5 分間固定し、1 時間 1 %BSA-PBS でブロッキングした。抗体は、直接ラベル抗 FLAG 抗体(Mouse anti-FLAG[®] M2-FITC antibody (Sigma))、アクチン染色に Rhodamine conjugated Phalloidin (Cytoskeleton, Inc.)、核染色に DAPI (Wako)を用いた(図 2.7)。免疫染色は室温で 1 時間行い、その後 PBS で 3 回 wash した。

画像の取込は、蛍光顕微鏡 CX41 (Olympus)、または共焦点レーザー顕微鏡 FV500 (Olympus)とソフトウェア FluoView[™]を用いて行った。また、各 well の蛍光強度は無作為に細胞を 100 個選び、画像解析ソフトウェア Image J を用いて細胞中央の平均蛍光強度(rfu)を測定した。

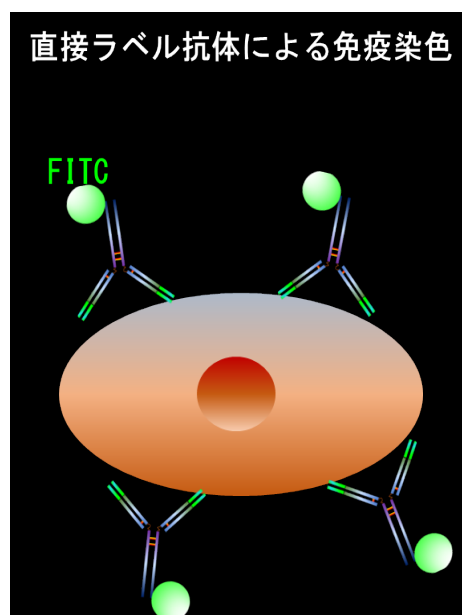


図 2.7 免疫染色では、直接ラベル抗 FLAG 抗体(Mouse anti-FLAG[®] M2-FITC antibody)を用いて Pendrin の局在を調べた。

2.2.8 限界希釈法による細胞クローニング

Pendrin 恒常発現(Stable)細胞の樹立をするため、Pendrin を遺伝子導入した HEK293 細胞を G-418 Sulfate 存在下で限界希釈し、細胞の単コロニーからの細胞のクローニングによる選抜を行った [11-16]。クローニング過程の模式図を示す(図 2.8)。G-418 Sulfate (Calbiochem®) 500 µg/ml を添加した 10 % FBS RPMI-1640 培地で、野生型 Pendrin と変異型 Pendrin (P123S) をそれぞれ FuGENE® HD Transfection Reagent を用いて HEK293 細胞に遺伝子導入した。HEK293 細胞は 96 well 培養プレートに 5×10^4 cells/ml · 100 µl で播種し、これを 10 日間連続培養することで生え抜きのネオマイシン耐性細胞の選別をした(1st Plate)。10 日間の培養の間、G-418 Sulfate を含む培地は 3 日ごとに交換した。

1st Plate で発生したコロニーは、培養用と別に分取し、抗 FLAG 抗体による免疫染色で Pendrin の発現を確認した。また、変異型 Pendrin(P123S) を遺伝子導入した細胞では、10 mM サリチル酸を 12 時間添加した後の変異型 Pendrin 局在変化(細胞膜移行)について確認した。この方法で、P123S を遺伝子導入した細胞では、変異型 Pendrin を良好に発現し、サリチル酸応答性のある細胞を選抜した。また、野生型 Pendrin を遺伝子導入した細胞でも、野生型 Pendrin を良好に発現する細胞を選抜した。

次に選抜した細胞を、96 穴培養プレート中 1 細胞/1well になる計算で限界希釈し、細胞のクローニングをした(2nd Plate)。2nd Plate の培養条件は、1st Plate と同様に G-418 Sulfate 500 µg/ml 存在下

で 10 日間連続培養し、G-418 Sulfate を含む培地交換は 3 日ごとに行った。その後発生したコロニーを光学顕微鏡で観察し、シングルコロニーを確認した。これを培養用と別に分取し、1st Plate 同様の免疫染色と、P123S 遺伝子導入細胞ではサリチル酸応答性を確認した。そして、P123S 遺伝子導入細胞と、野生型 Pendrin 遺伝子導入細胞から、それぞれ良好なコロニーを選抜した。

さらに同様の細胞のクローニングと選抜を行った(3rd Plate)。以上の 3 段階の選抜により、Pendrin を G-418 Sulfate 存在下で恒常的に発現する Stable 細胞を選抜した。

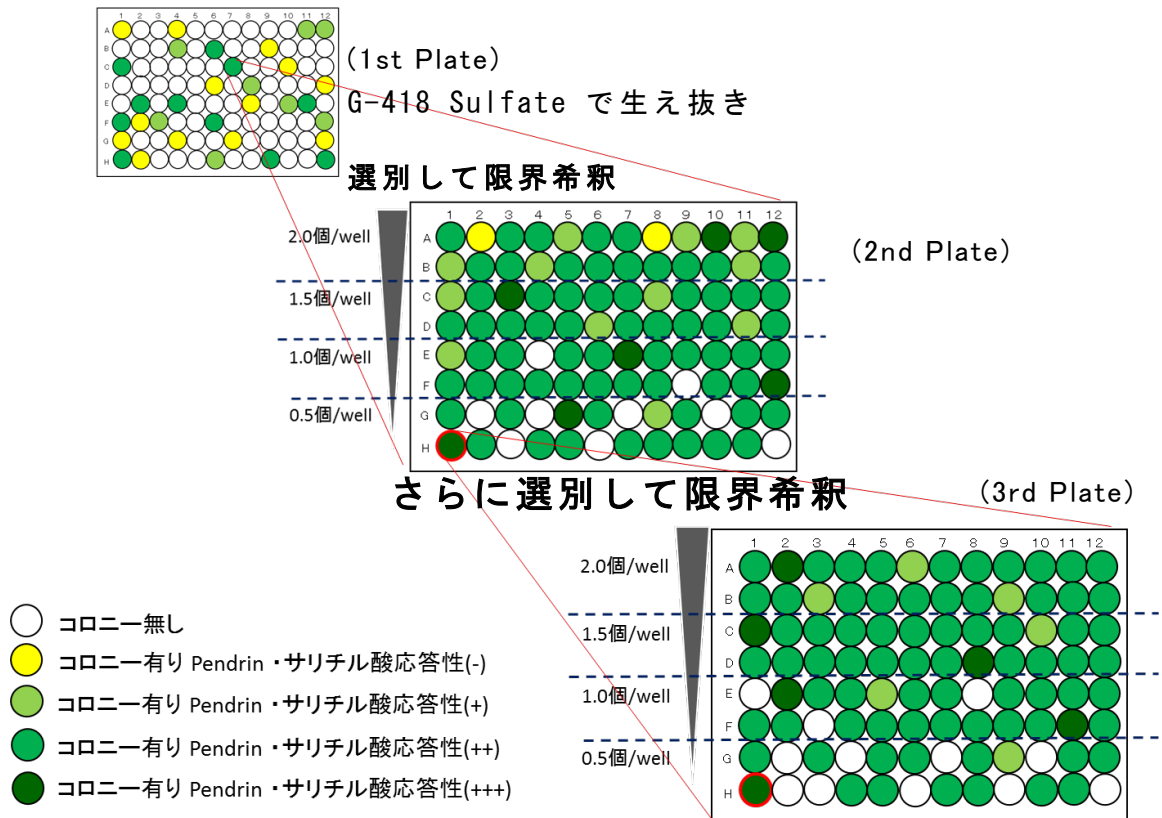


図 2.8 限界希釈法による細胞クローニング方法の模式図
単コロニーからの細胞クローニングは限界希釈法で行った。
野生型 Pendrin 遺伝子(Wild type)、変異型 Pendrin 遺伝子 (P123S)をそれぞれの HEK293 細胞に遺伝子導入後、G-418 Sulfate 存在下で 10 日間連続培養した。生え抜いてきたコロニーを確認し、抗 FLAG 抗体による免疫染色を行い、Pendrin を発現している well の確認と、P123S 遺伝子導入細胞の場合では 10 mM サリチル酸に応答性(変異型 Pendrin の細胞膜移行)を示す well を選別した(1st Plate)。

(続く)

(図 2.8 続き)

1st Plate で蛍光強度が高く、P123S 遺伝子導入細胞ではサリチル酸応答性を示したコロニーを選び、1 cell/well になる計算で限界希釈した(2nd Plate)。(2.0 個/well、1.5 個/well、1.0 個/well、0.5 個/well の計算で限界希釈し、細胞を播種した。)

2nd Plate の中で、シングルコロニーを確認し、1st Plate と同様に Pendrin の発現と、P123S 遺伝子導入細胞ではサリチル酸応答性を確認し、細胞を選別した。これを 3rd Plate に 1 cell/well になる計算で限界希釈した(3rd Plate)。(2.0 個/well、1.5 個/well、1.0 個/well、0.5 個/well に計算し限界希釈をして、細胞を播種した。)

3rd Plate においても同様の選抜を行った。野生型 Pendrin 遺伝子導入細胞では Pendrin 発現が良好な細胞を選び、P123S 遺伝子導入細胞では、Pendrin 発現とサリチル酸応答性がともに良好な細胞を選んだ。以上の 3 段階の選抜方法で、Pendrin を G-418 Sulfate 存在下で恒常的に発現する Stable 細胞を選抜した。

細胞内の平均蛍光強度(rfu) : +は 100~150 未満、++ は 150~200 未満、+++は 200 以上、-は 100 未満。

2.3 結果および考察

2.3.1 HEK293 細胞への一過性(Transient)遺伝子導入

HEK293 細胞に、野生型 Pendrin(Wild type)と変異型 Pendrin(P123S)を FuGENE®-HD Transfection Reagent を用いて遺伝子導入し、先行研究と同様に、抗 FLAG 抗体、Rhodamine conjugated Phalloidin、DAPI によるそれぞれ Pendrin、Actin、核の免疫染色を行った。また Merge(合成)も確認した。(先行研究では、HEK293 細胞へ野生型 Pendrin と変異型 Pendrin(P123S)を一過性(Transient)で遺伝子導入した後に、サリチル酸を 12 時間添加して、変異型 Pendrin の細胞内局在変化を評価してきた。)

その結果、野生型 Pendrin(Wild type)、変異型 Pendrin(P123S)を遺伝子導入した HEK293 細胞において、それぞれ緑色蛍光がみられ、Pendrin の発現を確認した(図 2.9)。Wild type では細胞の中央と細胞の輪郭(細胞膜)付近が染色され、P123S では細胞の中央(細胞質)付近が染色された。

Merge 像において、DAPI 染色による核の位置を基準に Pendrin を発現している細胞を確認したところ、Wild type、P123S ともに緑色蛍光を示す細胞は少なく、遺伝子導入効率の低さと、細胞によるタンパク発現量の違いがみられた。このことから、一過性(Transient)に遺伝子導入をした従来型の手法は、化合物を用いた迅速な変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングに適しておらず、恒常的に Pendrin を発現する Stable 細胞の樹立が必要であると考えられた。

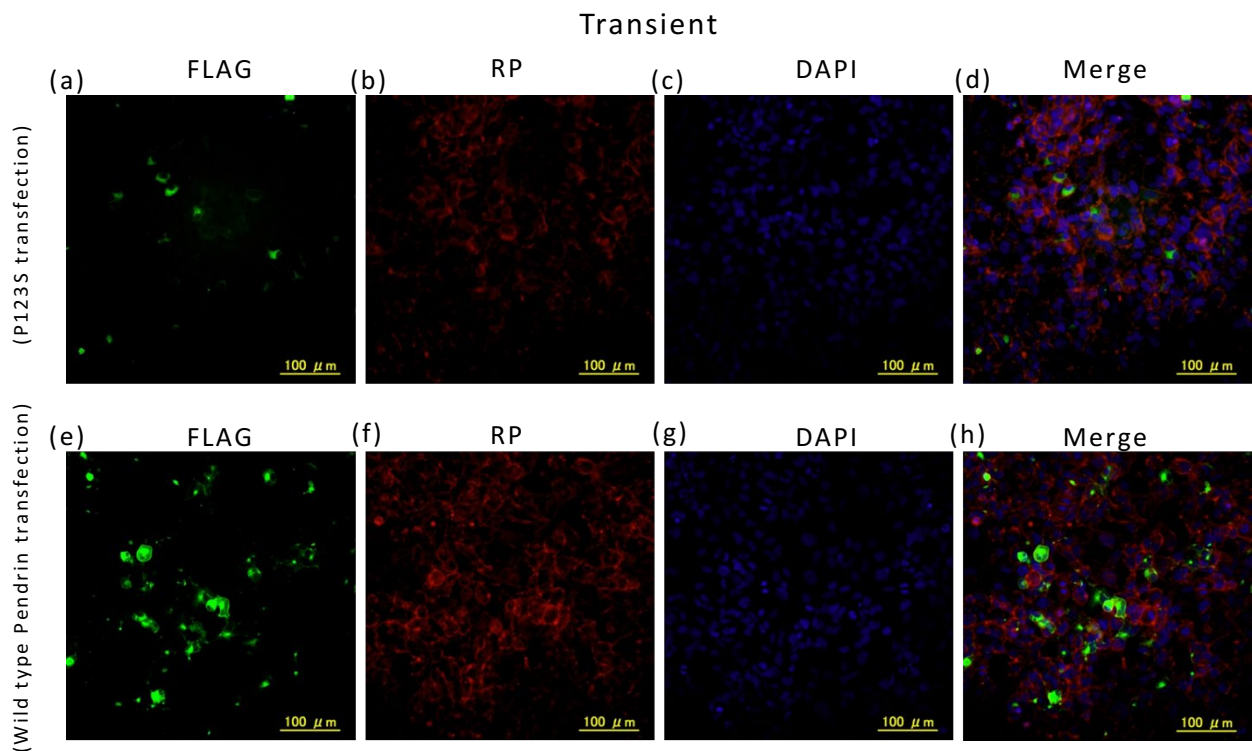


図 2.9 一過性(Transient)の遺伝子導入と免疫染色

HEK293 細胞を直径 3.5cm 培養ディッシュに播種後、FuGENE®-HD Transfection Reagent を用いて変異型 Pendrin(P123S)(図の上段)と野生型 Pendrin(Wild type)(図の下段)をそれぞれ一過性(Transient)に遺伝子導入し、免疫染色をした。図の左側より順番に、抗 FLAG 抗体(緑色)による免疫染色、Rhodamine conjugated Phalloidin(赤色)、DAPI(紫色)による蛍光染色で、それぞれ Pendrin、Actin、核、Merge(合成)を示した。一過性(Transient)の遺伝子導入の結果、P123S、Wild type とともに緑色蛍光がみられ、Pendrin の発現を確認した(a、e)。Merge 像で、DAPI 染色による核の位置を基準に観察した結果、P123S(d)、Wild type(h) とともに、一部の細胞のみ Pendrin を発現していることがわかった。

(Scale bar = 100 μ m)

2.3.2 限界希釈法による単コロニーからの細胞クローニング

Pendrin 恒常発現(Stable)細胞の樹立をするため、G-418 Sulfate 存在下で Pendrin を遺伝子導入した HEK293 細胞の限界希釈を行い、細胞の単コロニーからの細胞クローニングと選抜を 3 段階で行った(表 2.2)。1st Plate で発生したコロニーを確認し、培養と別プレートに分取後、抗 FLAG 抗体による免疫染色での Pendrin の発現確認と、変異型 Pendrin(P123S)遺伝子導入細胞では 10 mM サリチル酸添加後の変異型 Pendrin の細胞膜移行確認をした。その結果、P123S 遺伝子導入細胞ではコロニーが 32 個確認され、そのうち Pendrin 発現・サリチル酸応答性を示すコロニー(++)が 11 個(34.4 %)得られた。また、野生型(Wild type)ではコロニーが 29 個確認され、そのうち Pendrin を発現するコロニー(++)が 3 個(10.3 %)得られた。

続いて P123S と野生型のコロニー(++)を各 1 つ選び(P123S は C7、Wt は B5)、2nd Plate に 2.0 個/well、1.5 個/well、1.0 個/well、0.5 個/well の限界希釈で播種した。シングルコロニーを確認し、1st Plate と同様に選抜した。その結果、P123S では、Pendrin 発現・サリチル酸応答性を示すコロニー(+++)を 2 個(11.8 %)、野生型では Pendrin 発現コロニー(+++)を 2 個(15.4 %)得た。

続いて P123S と野生型のコロニー(+++)を各 1 つ選び(P123S は H1、Wt は G10)、同様の細胞のクローニングと選抜を 3rd Plate で行った。その結果、P123S 遺伝子導入細胞より+++のコロニー1 つ(H1)と、野生型 Pendrin 遺伝子導入細胞より+++のコロニー1 つ(G5)を選抜し、前者を PH1-1H1 細胞、後者を Wt 細胞とした。

表 2.2

| 導入遺伝子 | 段階 | 形成コロニー数(96well中) (2nd 3rdはシングルコロニー数) | Pendrin発現・サリチル酸応答性コロニー数 (%)は形成コロニー数に対する割合。2nd、3rdはシングルコロニー数に対する割合。 | | | |
|-----------|-----|---|---|-------------|------------|-------------|
| | | | + | ++ | +++ | - |
| P123S | 1st | 32 | 8 (25.0 %) | 11 (34.4 %) | - | 13 (40.6 %) |
| | 2nd | 17 | 1 (5.9 %) | 14 (82.4 %) | 2 (11.8 %) | - |
| | 3rd | 15 | 1 (6.7 %) | 13 (86.7 %) | 1 (6.7 %) | - |
| 導入遺伝子 | 段階 | 形成コロニー数(96well中) (2nd 3rdはシングルコロニー数) | Pendrin発現コロニー数 (%)は形成コロニー数に対する割合。2nd、3rdはシングルコロニー数に対する割合。 | | | |
| | | | + | ++ | +++ | - |
| Wild type | 1st | 29 | 12 (41.3 %) | 3 (10.3 %) | - | 14 (48.3 %) |
| | 2nd | 13 | 2 (15.4 %) | 9 (69.2 %) | 2 (15.4 %) | - |
| | 3rd | 8 | 2 (25.0 %) | 5 (62.5 %) | 1 (12.5 %) | - |

限界希釈法による細胞クローニングの過程

HEK293 細胞に変異型 Pendrin(P123S)、野生型 Pendrin(Wild type)を遺伝子導入し、G-418 Sulfate 存在下で連続培養した(1st Plate)。発生したコロニーを確認し、Pendrin の発現確認と、P123S 遺伝子導入細胞では 10 mM サリチル酸添加後の変異型 Pendrin の細胞膜局在確認をした。表 2.2 はクローニング過程を示し、導入した Pendrin 遺伝子(P123S、Wild type)と、スクリーニング各段階(1st、2nd、3rd)におけるコロニー形成数(2nd、3rd はシングルコロニー数)、Pendrin 発現・サリチル酸応答性のコロニー数とその割合(%)を示した。

1st Plate では、P123S でコロニーが 32 個確認され、Pendrin 発現・サリチル酸応答性を示すコロニー(++)が 11 個(34.4 %)得られた。Wild type ではコロニーが 29 個確認され、Pendrin 発現コロニー(++)が 3 個(10.3 %)得られた。(P123S では C7、Wild type では B5 を選んだ。)

2nd Plat では、P123S でコロニーが 17 個確認され、Pendrin 発現・サリチル酸応答性を示すコロニー(+++)が 2 個(11.8 %)得られた。Wild type ではコロニーが 13 個確認され、Pendrin 発現コロニー(+++)が 2 個(15.4 %)得られた。(P123S では H1、Wild type では G10 を選んだ。)

3rd Plate では、P123S でコロニーが 15 個確認され、Pendrin 発現・サリチル酸応答性を示すコロニー(+++)1 個が得られた。Wild type ではコロニーが 8 個確認され、Pendrin 発現を示すコロニー(+++)1 個が得られた。

以上 3 段階の選抜で、Stable 細胞として PH1-1H1 細胞と、Wt 細胞を得た。(P123S では H1、Wild type では G5 を選んだ。)

細胞内の平均蛍光強度(rfu) : +は 100~150 未満、++は 150~200 未満、+++は 200 以上、-は 100 未満。

2.3.3 Stable 細胞(PH1-1H1)の免疫染色による確認

PH1-1H1 細胞と Wt 細胞の Pendrin の発現を免疫染色により確認した。免疫染色は直接ラベル抗 FLAG 抗体、Rhodamine conjugated Phalloidin、DAPI を用いて Pendrin、Actin、核と Merge(合成)像を確認した。その結果、DAPI 染色による核の位置を基準として Merge 像を確認すると、全ての細胞において緑色蛍光がみられ、PH1-1H1 細胞、Wt 細胞の全てにおいて Pendrin が発現していることを確認した(図 2.10)。

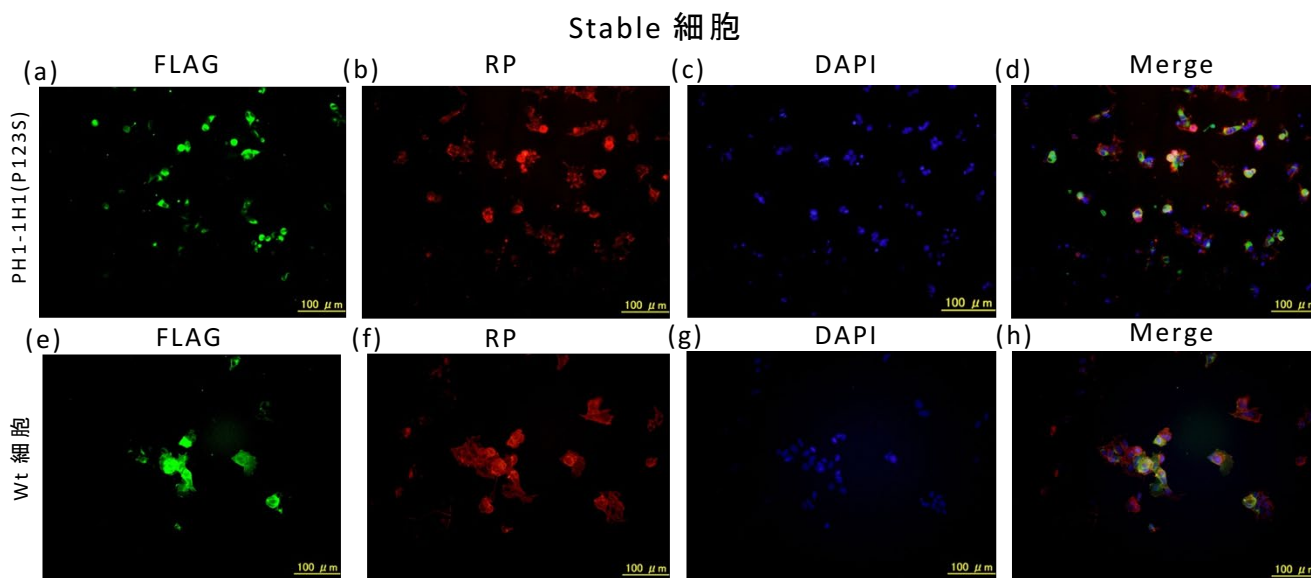


図 2.10 Stable 細胞の免疫染色

G-418 Sulfate 存在下の限界希釈法により、変異型 Pendrin(P123S)を遺伝子導入した PH1-1H1 細胞(上段)と、野生型 Pendrin(Wild type)を遺伝子導入した Wt 細胞(下段)を Stable 細胞として樹立した。これらの細胞を直径 3.5cm 培養ディッシュに播種し免疫染色をした。図は左から順番に、抗 FLAG 抗体(緑色)、Rhodamine conjugated Phalloidin(赤色)、DAPI(紫色)による、それぞれ Pendrin、Actin、核の免疫染色と Merge(合成)像である。

Merge 像の(d)、(h)を確認すると、DAPI 染色による核の位置と抗 FLAG 抗体による緑色蛍光の重なりから、PH1-1H1 細胞、Wt とともに、すべての細胞で Pendrin の発現がみられた。(Scale bar = 100 μm)

2.3.4 Stable 細胞のサリチル酸による細胞内局在変化

PH1-1H1 細胞は播種 12 時間後に、10 mM サリチル酸を 12 時間培地に添加し、直接ラベル抗 FLAG 抗体で免疫染色した。Wt 細胞も播種後、同様に免疫染色した(図 2.11)。その結果、PH1-1H1 の未処理の細胞(None)では、変異型 Pendrin は細胞質に局在したが、10 mM サリチル酸添加により細胞膜局在を示した。Wt 細胞では、野生型 Pendrin は一部小胞体付近と細胞膜に局在を示した。

以上の結果から、Stable 細胞として樹立した PH1-1H1 細胞は変異型 Pendrin を恒常的に発現し、Wt 細胞は野生型 Pendrin を恒常的に発現し、サリチル酸やサリチル酸類縁体を用いた、変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングに有用な細胞であると考えられた。

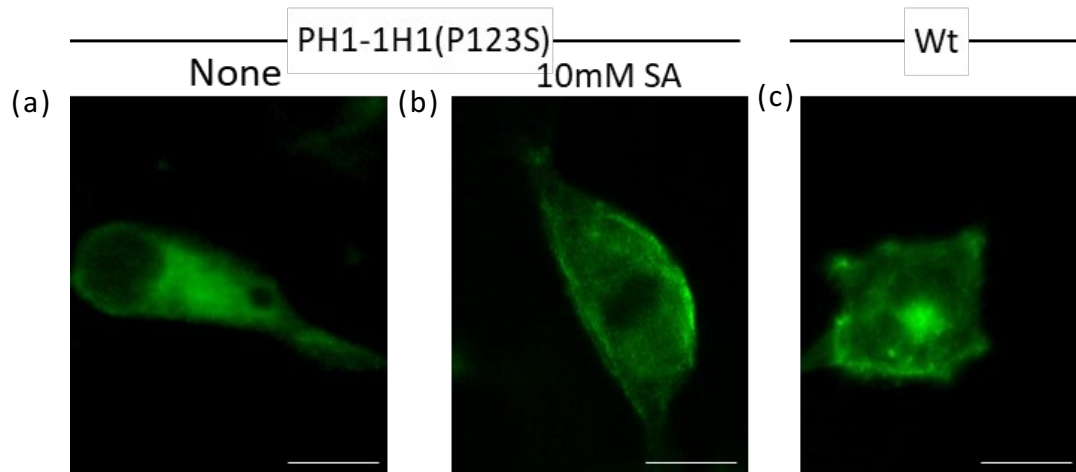


図 2.11 PH1-1H1(P123S)細胞のサリチル酸添加による変異型 Pendrin 細胞内局在変化

樹立した Stable 細胞 PH1-1H1 細胞(P123S)に対して、10 mM サリチル酸を 12 時間添加し、変異型 Pendrin の細胞内局在変化を確認した。Wt 細胞も比較した。図は左から順番に、PH1-1H1 細胞にサリチル酸未処理(None)(a)、PH1-1H1 細胞にサリチル酸 10mM を 12 時間添加(b)、Wt 細胞(c)を示した。

野生型 Pendrin を遺伝子導入した Wt 細胞(c)では、Pendrin は細胞膜に局在を示した。また、小胞体付近での一部局在がみられた。一方、PH1-1H1 細胞のサリチル酸未処理(None)(a)では、変異型 Pendrin は細胞質に局在したが、10 mM サリチル酸を添加した場合には、細胞膜に局在を示した(b)。(Scale bar = 10 μ m)

2.4 小括

従来までの HEK293 細胞への一過性(Transient)な遺伝子導入法を改良し、恒常的に Pendrin を発現する Stable 細胞(PH1-1H1 と Wt)を樹立した。

1. 変異型 Pendrin(P123S)を遺伝子導入した PH1-1H1 細胞は、G-418 Sulfate 存在下で恒常的に変異型 Pendrin を発現し、細胞質に局在した。また、変異型 Pendrin は 10mM サリチル酸を添加することで、細胞膜に局在した。
2. 野生型 Pendrin を遺伝子導入した Wt 細胞は、G-418 Sulfate 存在下で恒常的に野生型 Pendrin を発現し、細胞膜に局在した。
3. 樹立した PH1-1H1 細胞は、1)細胞播種、2)遺伝子導入、3)化合物添加、4)免疫染色、5)細胞内局在変化の確認、の 1)と 2)の操作を省くことが可能になり、サリチル酸類縁体による変異型 Pendrin の移行活性スクリーニングに適した細胞である。

2.5 引用文献

- [1] Kenji, I.; Shuhei, O.; Shun, K.; Koji, I.; Hiroshi, H.; Michio, M.; Toshimitsu, K.; Shinichi, U.; Katsuhisa, I.; Yoichi, H.; Kohei, T.; Hiroyuki, N.; Noriyasu, H.; Hiroshi, W. “Salicylate restores transport function and anion exchanger activity of missense pendrin mutations”, *Hear Res* **270**(1-2): 110-118 (2010).
- [2] Hanahan, D. “Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids”, *J Mol Biol* **166**(4): 557-80 (1983).
- [3] Yanisch-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J. “Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors”, *Gene* **33**(1): 103-19 (1985).
- [4] 松村 正實 「新・ラボマニュアル 遺伝子工学」 丸善株式会社 (2003).
- [5] Roberts, R.J.; Breitmeyer, J.B.; Tabachnik, N.F.; Myers, P.A. “A second specific endonuclease from *Haemophilus aegyptius*”, *J Mol Biol* **91**(1): 121-3 (1975).

[6] Old, R.; Murray, K.; Boizes, G. “Recognition sequence of restriction endonuclease III from *Hemophilus influenza*”, *J Mol Biol* **92**(2): 331-9 (1975).

[7] Shaw, G.; Morse, S.; Ararat, M.; Graham, FL.; FASEB, J. “Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells”, *The FASEB J* **16**(8): 869-71 (2002).

[8] Susan, Calvin.; Jay, Wang.; Jeff, Emch.; Simone, Pitz.; Linda, Jacobsen. “FuGENE®HD Transfection Reagent : Choice of a Trans-fection Reagent with Minimal Off-Target Effect as Analyzed by Microarray Transcriptional Profiling”, *Nature Methods* **65**(2006).

[9] 齊藤ふみ 高浜陽介 「共焦点レーザー顕微鏡を用いた凍結切片の免疫蛍光多重染色解析法」 タンパク質研究のための抗体実験マニュアル 羊土社 24-32 (2004).

[10] 高垣哲也 服部 進 蛍光抗体法 「新染色法のすべて」 医歯薬出版株式会社 208-211 (1999).

[11] 赤司 祥子 「得られた遺伝子(細胞表面分子)に対するモノクローナル抗体の作製」 実験医学別冊 タンパク質研究のための抗体実験マニュアル 羊土社 168-180 (2004).

[12] Ethier, SP.; Taback, E. "Insulin like growth factor-I independence in rat mammary carcinoma cells: a dominant phenotype in somatic cell hybrid experiments", *Cancer Lett* **74**(3): 189-95 (1993).

[13] Santerre, RF.; Walls, JD.; Grinnell, BW. "Use of vectors to confer resistance to antibiotics g418 and hygromycin in stably transfected cell lines", *Mol Biol* **7**: 245-56 (1991).

[14] Edwards, SA.; Adamson, ED. "Isolation of a clone of F9 teratocarcinoma cells "naturally" resistant to G418", *J Cell Physiol* **133**(1): 46-54 (1987).

[15] Jimenez, A.; Davies, J. "Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*", *Nature*. **287**(5785): 869-71 (1980).

[16] Southern, P.J.; Berg, P. "Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter", *J Mol Appl Genet* 1(4): 327-41 (1982).

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

3.1 はじめに

第三章では、CellInsight™を用いた細胞の Morphology 解析の為のパラメーターの検討を行った。第二章において、変異型 Pendrin(P123S)を遺伝子導入した HEK293 細胞では、変異型 Pendrin は細胞質に集積した。これに対して、野生型 Pendrin は細胞膜に局在した。また、変異型 Pendrin を遺伝子導入した HEK293 細胞にサリチル酸を添加すると、変異型 Pendrin は細胞膜へと移行した。このような、サリチル酸添加後の変異型 Pendrin の細胞内局在変化(移行活性)の評価系を確立することは、その後のサリチル酸類縁体を用いた化合物の探索に必要であると考えられた。

これまでの手法では、Pendrin の局在は、免疫染色の後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™ で取込み、細胞膜と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きた。しかし、この手法は時間を必要とすることから、96 well 培養プレートによる多数の化合物のスクリーニングには適さなかった。そこで本研究では、正確かつ迅速な解析を目的として、Thermo Fisher Scientific 社製の細胞イメージアナライザー CellInsight™ を用いた画像解析により変異型 Pendrin の局在変化について検討し、化合物ライブラリーを用いた変異型 Pendrin の移行活性スクリーニングの確立を目的とした。

CellInsight™ は、10×対物レンズを内蔵する蛍光顕微鏡で、撮影した画像を解析するコンピューターとソフトウェアがシステム化された装置である。96 well 培養プレートの 1 well 内を 100 フィールドに分割して自動撮影し、各フィールド中で最大 100 個の細胞を検出し、解析プログラム Morphology V4 により細胞の蛍光強度やタンパクの局在、形態的特徴を網羅的に解析する(図 3.1)[1-5]。

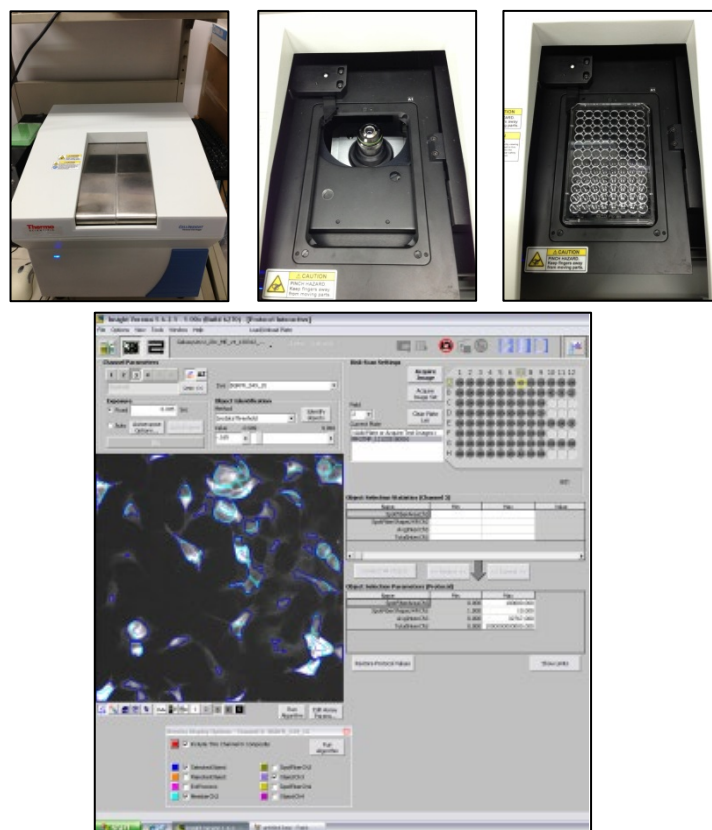


図 3.1 CellInsight™ による解析

CellInsight™ は蛍光顕微鏡が内臓されており、96 well 培養プレートを自動撮影し Morphology V4 で解析する。設定したパラメーターにより目的の対象物を検出する。

CellInsight™による撮影手順は、well 内を中央の 1 フィールドから渦巻き状に撮影し、最終的に 100 フィールドまで撮影する。撮影した画像は Morphology V4 によりモンタージュ合成され、核や細胞外周を基準として、目標とする特徴的構造を特定する(図 3.2)。

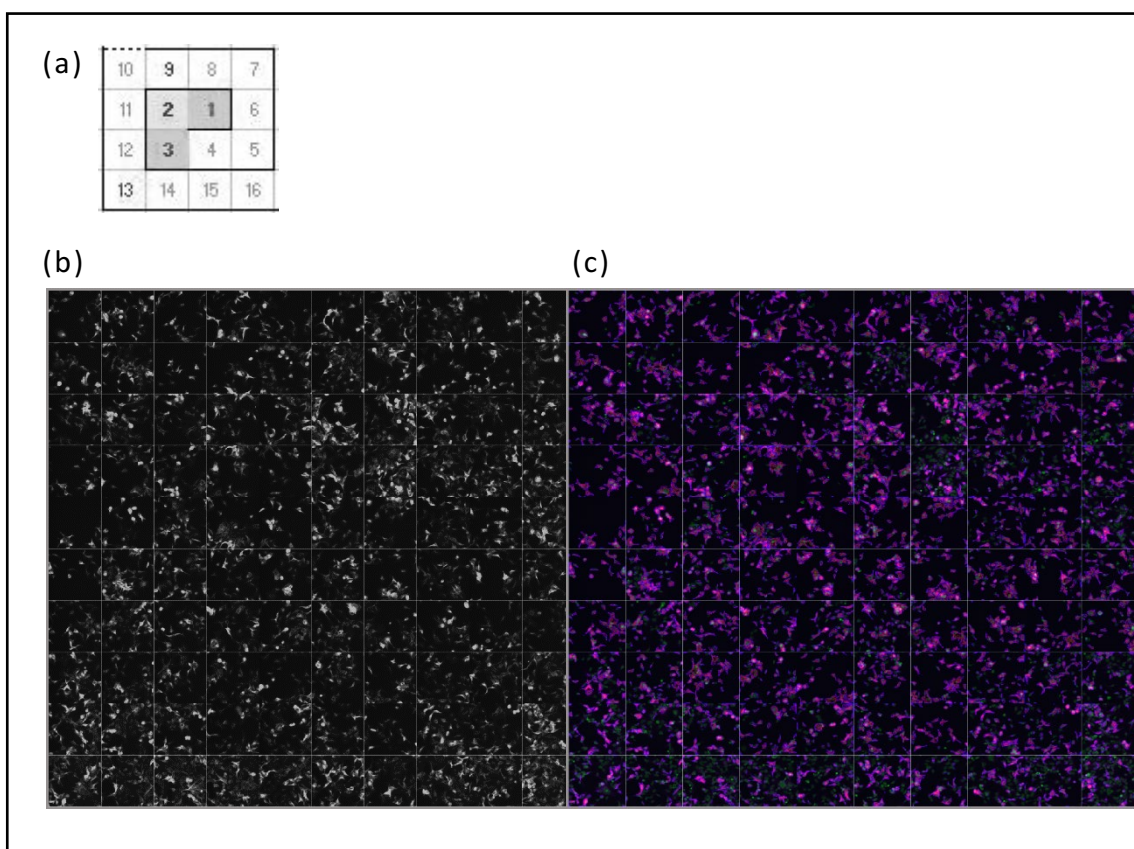


図 3.2 Morphology V4 による試験的解析例 (PH1-1H1 細胞)

- (a) 1 つの well につき、中心の 1 フィールド目から渦巻き状に撮影し、最終的に 100 フィールドを撮影した。細胞は 1 フィールド内で最大 100 個の細胞を測定した。
- (b) 1 well 内の全 100 フィールドの画像は Morphology V4 によりモンタージュ合成した。
- (c) 全細胞の画像は Morphology V4 で解析し、核は緑色、細胞外周は紫色として検出した。

はじめに Morphology V4 の解析パラメーターについて検討した。まず、一定の蛍光強度以上の特徴的構造を検出する Ring Spot 解析と、設定した領域内全ての蛍光強度を測定する Zone 解析について比較した(図 3.3)。

Ring Spot 解析は、核を中心に同心円状に 5 本のリングを設定し、蛍光強度が一定以上の突出したリングがみられた場合に Ring Spot として検出する方法である。

一方 Zone 解析は、細胞膜(Plasma Membrane:M)と細胞質(Cytoplasm:C)を Zone(領域)として設定し、蛍光強度の強弱に関わらず、設定した Zone 内全てを測定する方法である。

2 つの解析を比較した結果、Ring Spot 解析では、サリチル酸添加後の変異型 Pendrin の細胞膜局在を検出することはできなかった。

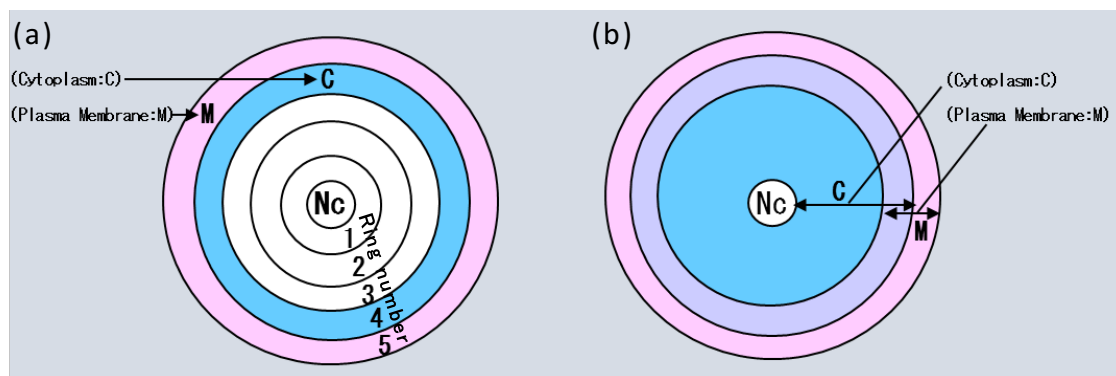


図 3.3 Ring Spot 解析と Zone 解析 (2 つの解析法の検討)

(a) Ring Spot 解析 核を中心に 1 番から 5 番まで 5 本のリングを設定し、蛍光強度が一定以上の突出した領域を Ring Spot として検出する。

(b) Zone(領域)解析 蛍光強度の強弱に関わらず設定した領域内全てを測定する。Zone 解析には、核を解析の基準である Ch1 に設定する方法と、細胞外周を解析の基準である Ch1 に設定する方法がある。

本研究では、(a)の Ring Spot 解析と、(b)の Zone 解析を検討し、Zone 解析では核基準の解析と、細胞外周基準の解析について検討した。

これは、設定した **Ring** と実際の細胞膜の形状が合致しないことが原因として考えられた。一方、**Zone** 解析で細胞質(C)の蛍光強度に注目したところ、サリチル酸濃度依存的な減少がみられた。このため、**Zone** 解析がサリチル酸による変異型 **Pendrin** の局在変化を調べる上で有効な手段と考えられ、追加の条件検討を行った。

Zone 解析において、細胞質(C)と細胞膜(M)の領域の設定には 2 つのアプローチがある。1 つ目は核を基準とする方法で、2 つ目は細胞外周を基準とする方法である。前者は、核を解析の基準である **Ch1** として設定し、**Ch1** より外側を細胞質(C)に、さらに外側を細胞膜(M)に設定し、C と M の蛍光強度を測定する方法である。後者は、細胞外周を解析の基準である **Ch1** として設定し、**Ch1** より内側を細胞膜(M)に、さらに内側を細胞質(C)として設定し、C と M の蛍光強度を測定する方法である。

そこで、細胞質(C)と細胞膜(M)の幅を 5 pixel と 2 pixel に設定し、2 つの **Zone** 解析を比較した。その結果、核基準の **Zone** 解析では、サリチル酸添加後の変異型 **Pendrin** の局在変化を検出できなかったが、細胞外周基準の **Zone** 解析では、サリチル酸濃度依存的に細胞質(C)蛍光強度の減少が認められ、最大で 50 % 低下した。また、細胞質(C)に対する細胞膜(M)の割合を示す M/C 比は、サリチル酸濃度依存的に上昇がみられ、最大 1.5 倍増加した。

以上の結果から、**Morphology V4** を用いた変異型 **Pendrin** の移行活性スクリーニングにおいて、細胞外周を基準とした **Zone** 解析が有効であることが明らかになった。

3.2 試薬および実験方法

3.2.1 PH1-1H1 細胞、Wt 細胞の培養条件

第二章で樹立した Stable 細胞である PH1-1H1 細胞と Wt 細胞の培養は、G-418 Sulfate(Calbiochem®) 500 µg/ml を加えた 10 % 牛血清アルブミン(FBS)を含む RPMI-1640 培地(Wako pure Chemical, Osaka, Japan)で、37 °C、CO₂ 濃度 5 % の環境下、CO₂ インキュベーターを用いて行った。

3.2.2 サリチル酸添加と免疫染色

PH1-1H1 細胞と Wt 細胞は、播種後 12 時間に 10 mM サリチル酸を基準の濃度として加え、さらに 12 時間後に免疫染色を行った[6,7]。細胞を PBS で wash し、4 % パラホルムアルデヒドで 5 分間固定し、1 時間 1 % BSA-PBS でブロッキングした。また、第二章では直接ラベル抗体を用いた免疫染色を行ったが、本章では蛍光強度を上げる目的から、一次抗体と二次抗体を用いる方法に変更した。一次抗体として抗 FLAG 抗体(Mouse anti-FLAG® M2 antibody (Sigma))を用い、二次抗体として Alexa Fluor546 (Goat anti mouse IgG(H+L) (Invitrogen))を使用した(図 3.4)。また核染色用に DAPI (Wako)を用いた。抗原抗体反応は一次抗体、二次抗体ともに室温で 1 時間行い、その後 PBS で 3 回 wash した。画像取込は、蛍光顕微鏡 CX41(Olympus)、または共焦点レーザー顕微鏡 FV500(Olympus)とソフトウェア FluoView™ を用いて行った。

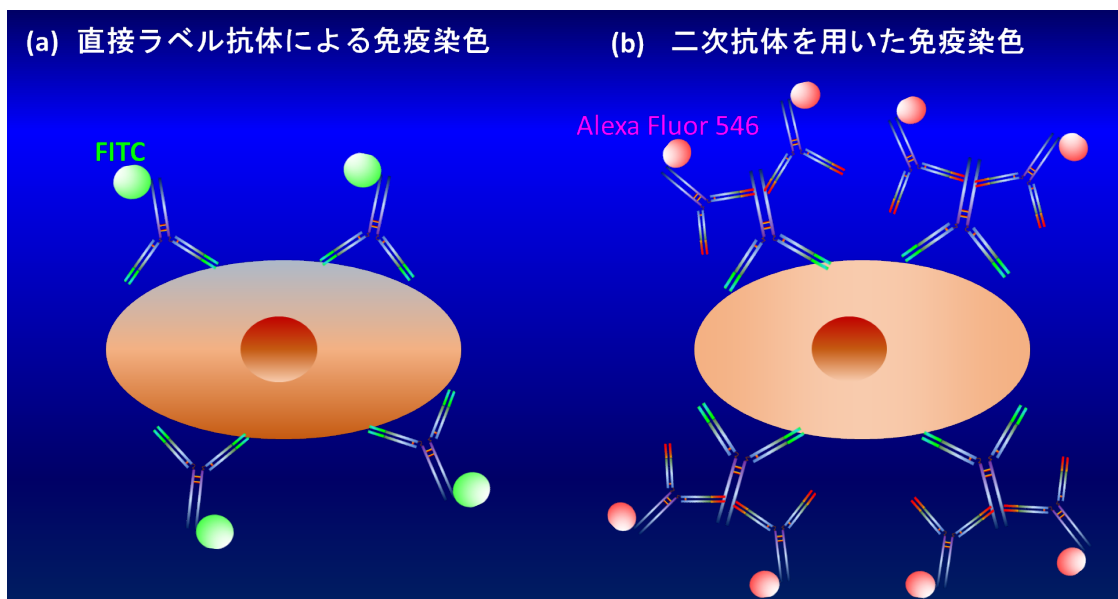


図 3.4 直接ラベル抗体による免疫染色と一次抗体と二次抗体を用いた免疫染色

- (a)第二章では FITC を直接ラベルした抗体による免疫染色を行った。簡易的な方法であるが、FLAG に結合する蛍光色素の量が少ない。
- (b)本章では、一次抗体(抗 FLAG 抗体)と二次抗体(Alexa Fluor 546)を用いる方法に変更した。二次抗体を用いることにより FLAG に結合する蛍光色素の量が増えることから、蛍光強度の上昇が見込まれた。

3.2.3 Morphology V4 のチャンネル設定と対象物の検出

Morphology V4 による解析手順は、はじめに解析の基準となる対象物(Object Mask)を Ch1 として設定した。(解析の基準となる Ch1 の設定は、解析によって異なり、核を Ch1 とする設定と、細胞外周を Ch1 とする設定がある。) 次に Ch1 を基準とし、追加の対象物(Modified Object Mask)を Ch2、Ch3、Ch4 として設定した。

追加の対象物(Ch2~Ch4)の設定方法は 2 通りあり、一定の蛍光強度以上の特徴的構造を検出する方法(a)と、蛍光強度の強弱に関わらず、設定した Zone(領域)内全ての蛍光強度を測定する方法(Zone 解析)(b)がある。

本研究では、(a)の複数の解析の中から、はじめに Ring Spot 解析について検討し、次に(b)の Zone 解析について検討した(図 3.5)。

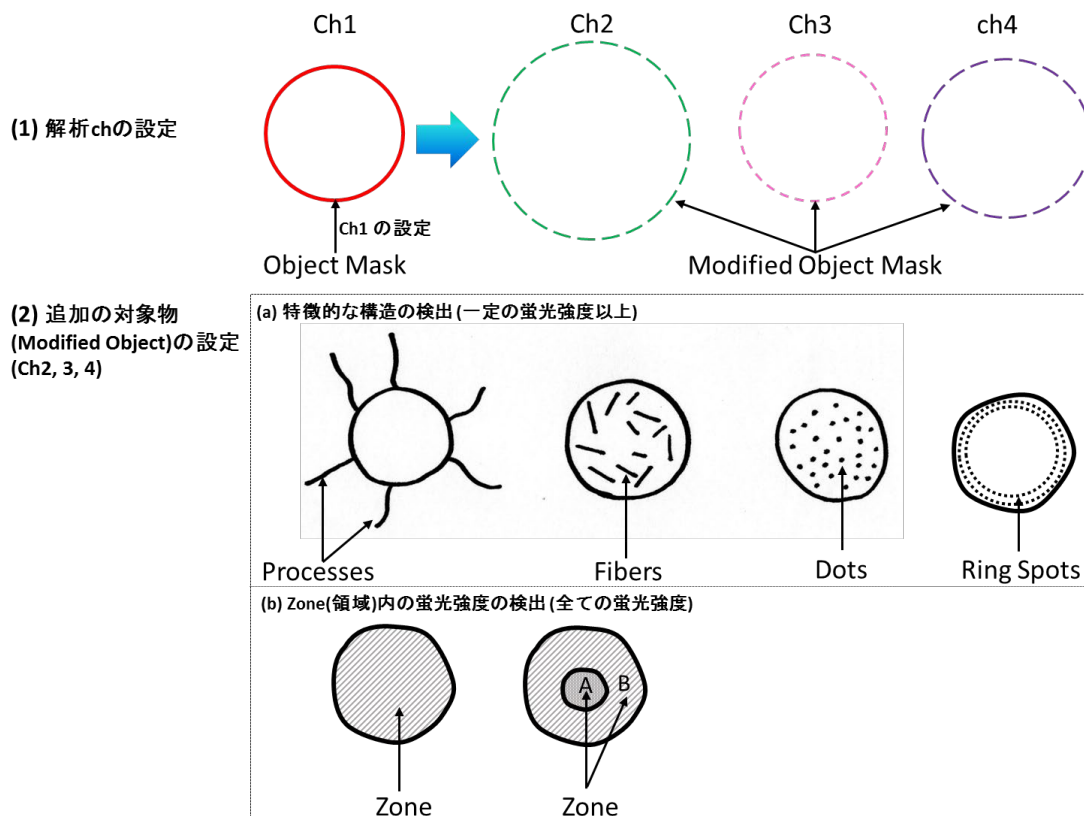


図 3.5 Morphology V4 のチャンネル設定と対象物の検出

(1) 基準となる対象物(Object Mask)を Ch1 として設定した。次に Ch1 を基準として、追加の対象物(Modified Object Mask)を Ch2、Ch3、Ch4 として設定した。

(2) 追加の対象物(Modified Object Mask)の設定

(a) 一定の蛍光強度以上の特徴的な構造を検出する方法。

Processes(神経突起の構造)や Fibers(繊維状の構造)、Dots(顆粒状の構造)、Ring Spot(リング状の構造)などを検出する。

(b) 設定した Zone(領域)内全ての蛍光強度を測定する方法。

蛍光強度の強弱に関わらず、設定した Zone 内の蛍光強度を測定する。細胞全体の蛍光強度や、例えば核(A)と細胞質(B)のタンパク局在変化の測定などに適する。

3.2.4 threshold の設定による重なった細胞の区別

HEK293 細胞は、隣り合う細胞どうしが重なることがあり、2 つの重なった細胞を 2 つに区別するための threshold(閾値)の設定をした。具体的には、重なった細胞の 60 %以上を 2 つに区別する条件を検索し、蛍光強度(intensity (rfu))が 150 を超えた 2 つのピークと下回った 1 つの谷が存在する場合に、2 個の細胞に区別する設定とした(図 3.6)。

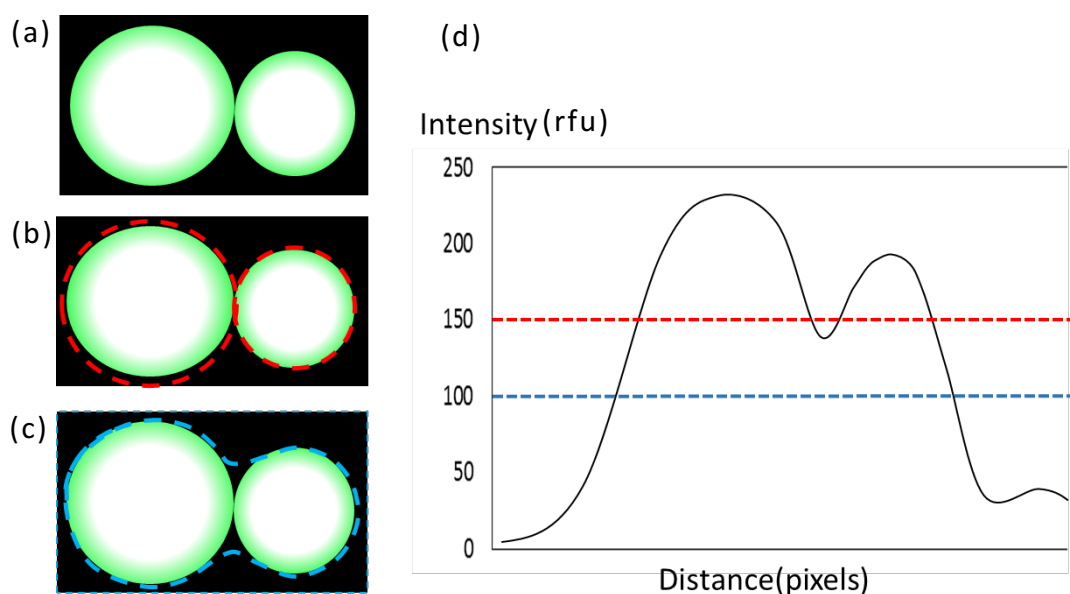


図 3.6 threshold(閾値)の設定

threshold(閾値)は、重なった 2 個の細胞の 60 %以上を 2 つに区別する条件として、蛍光強度(intensity (rfu))150 を基準値に決定した。グラフ(d)に示したように、蛍光強度(intensity (rfu))が 150 を超えた 2 個のピークと、150 を下回った 1 つの谷がみられた場合、図の(b)に示したように 2 個の細胞として区別する設定とした。

3.3 結果および考察

3.3.1 Ring Spot 解析の検討

Ring spot 解析では、核を中心に波紋状のリングを設定し、蛍光強度が一定以上の突出した領域を Ring Spot として検出する方法である(図 3.7)。この解析法は、変異型 Pendrin がサリチル酸を添加することで細胞膜に局在し、その形状がリング状(輪の状態)にみられたことから、はじめに検討した。

はじめに Ring Spot 解析の基本設定をした。核を解析の基準である Ch1 として設定し、細胞外周を Ch2 として設定した。そして、Ch1(核)から同心円状に 3 pixel 幅の 5 本のリングを設定した。(Ring number として 1 番~5 番のリングを設定した。)

次に、細胞膜(M)の検出設定をした。Ch2(細胞外周)と位置の重なりがみられる最外周のリングで、平均蛍光強度(Avg Intensity (rfu))が 300 以上のリングを、解析上の細胞膜(Plasma Membrane:M)の Ring Spot として検出する設定とした。

つづいて、細胞質(C)の検出設定をした。Ch2(細胞外周)と重なりがなく、Ch2 よりも細胞の内側に位置しているリングで、平均蛍光強度(Avg Intensity (rfu))が 300 以上のリングを、解析上の細胞質(Cytoplasm:C)の Ring Spot として検出する設定とした。

また、サリチル酸の添加時間は 6 時間、12 時間、24 時間を検討した。

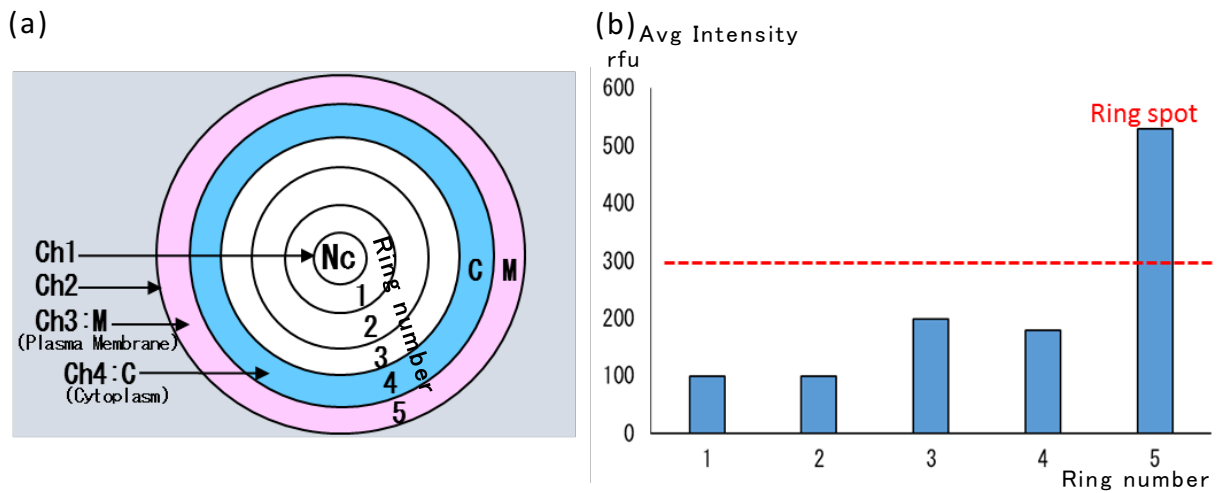


図 3.7 Ring Spot 解析設定

Ring spot 解析では、核を中心に同心円状のリングを設定し、蛍光強度が一定以上の突出した領域を Ring Spot として検出した。

解析の基本設定では、解析の基準である Ch1 を核に設定し、Ch2 は細胞外周として設定した。次に Ch1(核)から同心円状に 1 番から 5 番までの 5 本のリングを 3 pixel 幅の間隔で設定した(a)。

次に、細胞膜(Plasma Membrane:M)の Ring Spot 検出の設定をした。1 番~5 番のリングで平均蛍光強度(Avg Intensity (rfu))が 300 以上を示し、かつ、Ch2(細胞外周)と位置の重なりがみられた最外周のリングがある場合、これを細胞膜(M)の Ring Spot として検出する設定にした。(図(a)の桃色：細胞膜(M))

つづいて細胞質(Cytoplasm:C)の Ring Spot 検出の設定をした。

細胞質(C)の Ring Spot 検出では、Ch2(細胞外周)と重なりがなく、Ch2 よりも細胞の内側に位置しているリングで、平均蛍光強度(Avg Intensity (rfu))が 300 以上のリングがみられた場合に、細胞質(C)の Ring Spot として検出する設定にした。(図(a)青色：細胞質(C))

Ring Spot 解析を検討した結果について述べる(図 3.8)。

Ring Spot Count は、検出した Ring Spot の数を示している。Ring Spot Count の結果では、細胞膜(M)の値は、サリチル酸 6 時間の 10 mM でわずかに増加がみられたが、全体としてサリチル酸濃度依存的な増加はみられず、細胞質(C)と、細胞質(C)に対する細胞膜(M)の Ring Spot 数の比を示す M/C 比でも、濃度依存的な変化がみられなかった。

Ring Spot Avg Intensity は、検出した Ring Spot の平均蛍光強度を示している。Ring Spot Avg Intensity の結果では、Ring Spot Count の結果と同様に、サリチル酸濃度依存的な細胞膜(M)の蛍光強度の増加はみられなかった。また、細胞質(C)の蛍光強度と、M/C 比についてもサリチル酸による濃度依存的な変化を確認できなかった。

これは、実際の細胞において、サリチル酸添加後の変異型 Pendrin の局在は完全な真円の形状を示さないが、設定上のリングは真円であることから、変異型 Pendrin の局在を正確に検出できていないことが考えられた。また、全ての細胞において核は細胞の中心に位置しているとは限らないが、Ring Spot 解析では核を中心とした同心円状のリング設定をしていることから、解析の中心にずれが生じることで、目標とした細胞膜(M)と細胞質(C)の正確な検出ができていない可能性が考えられた。

以上の結果から、はじめに検討した解析法の 1 つである Ring Spot 解析では、サリチル酸による変異型 Pendrin の細胞膜移行活性の解析には適していないことが考えられた。

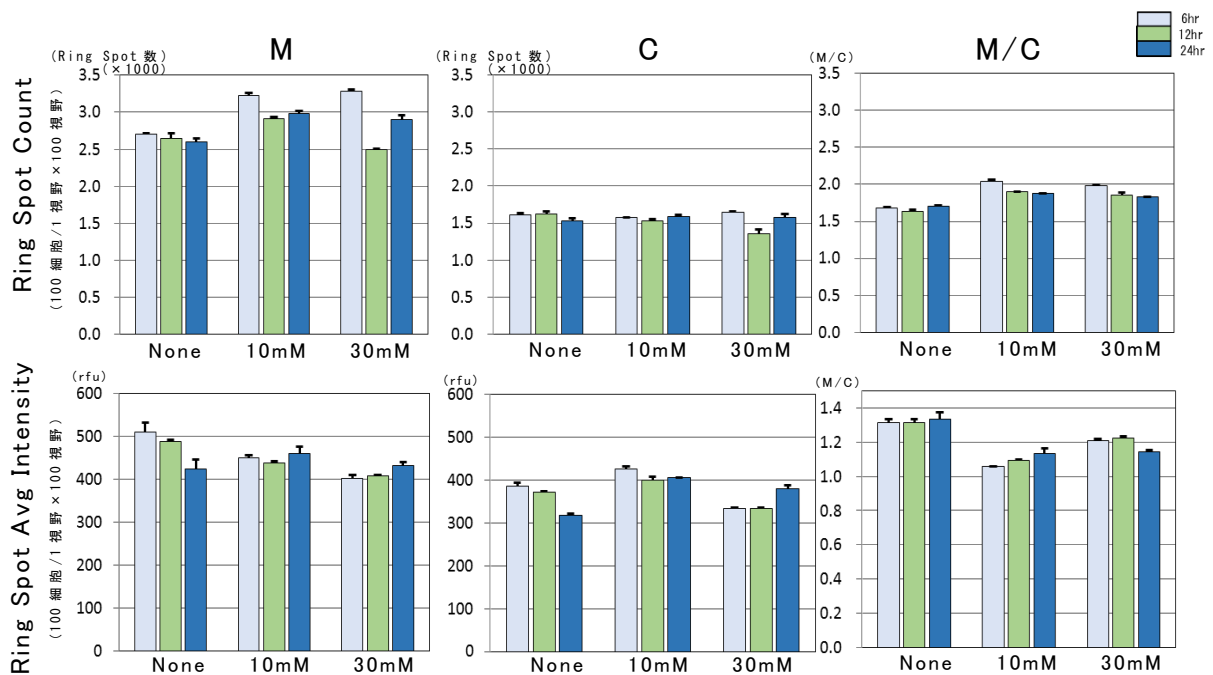


図 3.8 Ring Spot 解析結果

PH1-1H1 細胞にサリチル酸を 0~30 mM で 6~24 時間添加し、抗 FLAG 抗体で免疫染色した後 Ring Spot 解析について検討した。

Ring Spot 解析では、核を解析の基準である Ch1 に設定した。次に Ch1(核)を中心に同心円状に 5 本のリングを設定し、蛍光強度が一定以上の突出した領域を Ring Spot として検出した。これらの解析では、1 視野あたり最大 100 個の細胞を撮影し、1 well 内 100 視野分を集計した。

グラフ上段は Ring Spot Count(リングスポット数)、グラフ下段は Ring Spot Avg Intensity(リングスポットの平均蛍光強度)を示した。左から順番に、細胞膜(M)(左)、細胞質(C)(中央)、細胞質(C)に対する細胞膜(M)の比としての M/C 比(右)を示した。

細胞膜(M)に着目すると、Ring Spot Count の 6 時間 10 mM でわずかに増加がみられたが、Ring Spot Count、Ring Spot Avg Intensity とともにサリチル酸濃度依存的なグラフの増加は確認できなかった。細胞質(C)に着目した場合も、Ring Spot Count、Ring Spot Avg Intensity とともにサリチル酸濃度依存的な変化がみられなかった。M/C 比に着目した場合も、サリチル酸濃度依存的な変化はみられなかった。また、サリチル酸の添加時間の違いによる明確な違いもみられなかった。

3.3.2 Zone(領域)解析の検討

Zone 解析では、蛍光強度の強弱に関わらず設定した領域内全てを測定する方法である。はじめに Zone 解析の基本設定をした。核を解析の基準である Ch1 として設定し、細胞外周は Ch2 に設定した。次に Ch1(核)から外側に 10 pixel 幅を設定し、これを解析上の細胞質 (C)として Ch3(C)に設定した。また Ch1(核)より 8 pixel 外側から 4 pixel 幅の範囲を解析上の細胞膜(M)として Ch4(M)に設定した。また、Ch3(C)と Ch4(M)は 2 pixel 幅で互いに重複する設定とすることで、検出範囲を広げた設定とした。サリチル酸の添加時間は 6 時間、12 時間、24 時間を検討した(図 3.9)。

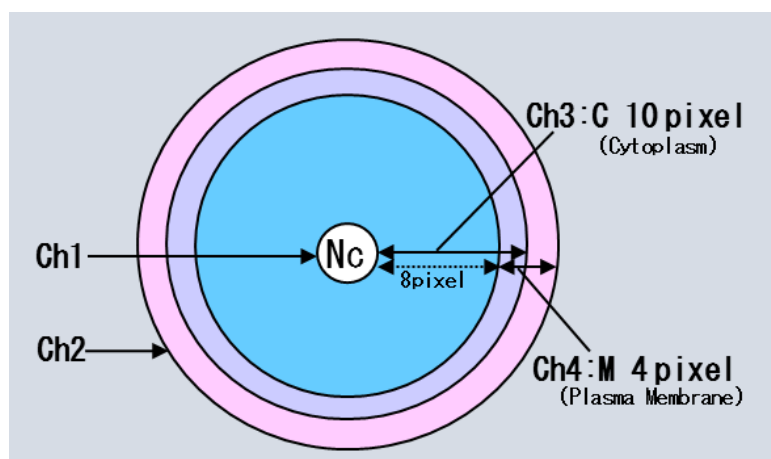


図 3.9 Zone 解析設定

Zone 解析は蛍光強度の強弱に関わらず設定した領域内全てを測定した。基本設定として、解析の基準とする Ch1 を核に設定し、Ch2 は細胞外周に設定した。

細胞質(C)の検出設定は、Ch1(核)から細胞の外側方向へ 10 pixel 幅とし、これを Ch3 に設定した。(Ch3(C)は図の青色の領域。)

細胞膜(M)の検出設定は、Ch1(核)から外側に 8 pixel 目から 4 pixel 幅の範囲として、これを Ch4 に設定した。(Ch4(M)は図の赤色の領域。)

また、Ch3(C)と Ch4(M)の設定範囲は 2 pixel 幅で互いに重複させることにより、検出範囲を広く設定した。(Ch3 と Ch4 の重なりは図の紫色の領域。)

Zone 解析を検討した結果について述べる。Zone 解析では、細胞膜(M)、細胞質(C)、細胞質(C)に対する細胞膜(M)の蛍光強度の比である M/C 比について、それぞれ Total Intensity(合計の蛍光強度)と Avg Intensity(平均蛍光強度)を調べた(図 3.10)。

はじめに、細胞膜(M)の蛍光強度に注目すると、Total Intensity、Avg Intensity とともにサリチル酸濃度依存的な増加はみられなかった。また、サリチル酸の添加時間による違いも確認できなかった。これは、細胞膜(M)としての設定が 4 pixel 幅で、実際の細胞膜に対して幅が広く、細胞膜だけでなくその周辺の領域も含めて検出した可能性が考えられた。

つづいて細胞質(C)の蛍光強度に注目した。Total Intensity では 6 時間でサリチル酸濃度依存的な細胞質(C)の減少がみられた。12 時間の場合では 30 mM において細胞質(C)の減少がみられた。一方、細胞質(C)の Avg Intensity に注目すると、6 時間、12 時間、24 時間全てにおいてサリチル酸濃度依存的減少を確認することができた。

次に M/C 比に注目した。Total Intensity では 6 時間、12 時間でサリチル酸濃度依存的増加がみられた。また、Avg Intensity では 6 時間、12 時間、24 時間でサリチル酸濃度依存的増加を確認することができた。

以上、Zone 解析について検討した結果、細胞質(C)の Avg Intensity ではサリチル酸濃度依存的に減少がみられ、M/C 比はサリチル酸濃度依存的に増加がみられた。そこで引き続き、次の 3.3.3 では Zone 解析の解析条件と設定範囲を絞って、詳細な条件検討をした。

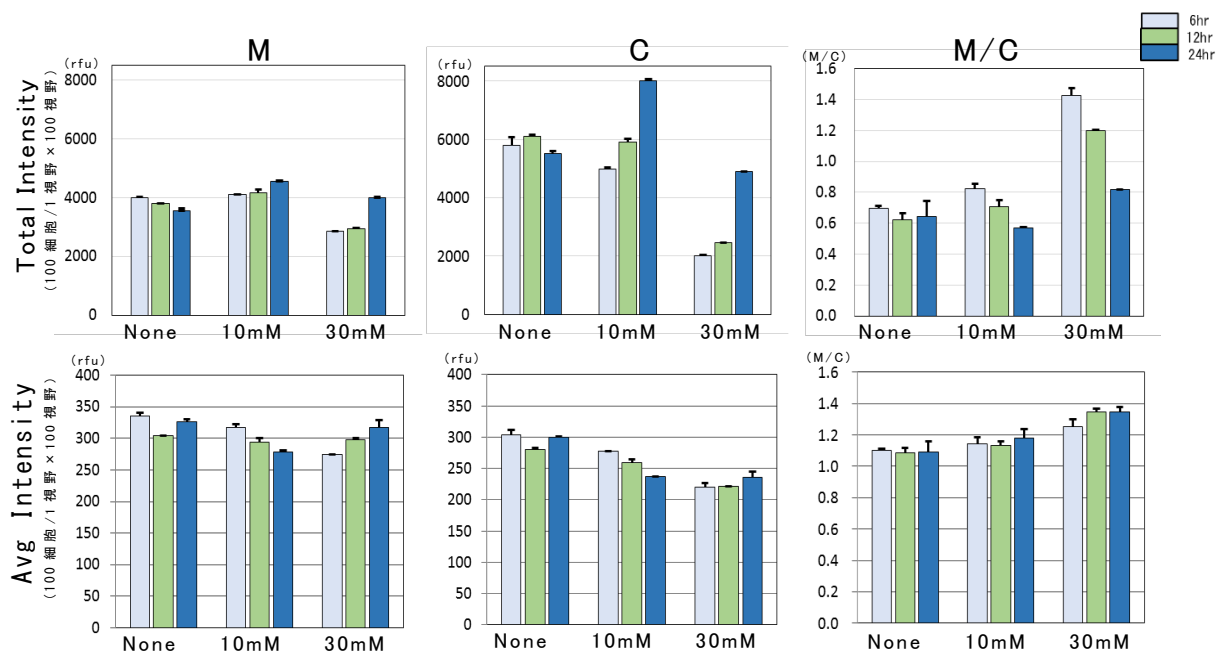


図 3.10 Zone 解析結果

PH1-1H1 細胞にサリチル酸を 0~30 mM で 6~24 時間添加し、抗 FLAG 抗体で免疫染色した後に Zone 解析について検討した。Zone 解析では、解析の基準となる Ch1 を核に設定し、蛍光強度の強弱に関わらず設定した領域内全てを測定した。この Zone 解析では、細胞質(C)、細胞膜(M)の設定幅をそれぞれ 10 pixel と 4 pixel として広く設定した。細胞は 1 視野あたり最大 100 個の細胞を撮影し、1 well 内 100 視野分を集計した。

グラフ上段は Total Intensity(合計蛍光強度)、グラフ下段は Avg Intensity(平均蛍光強度)を示した。左から順番に、細胞膜(M)(左)、細胞質(C)(中央)、細胞質(C)に対する細胞膜(M)の蛍光強度の比として M/C 比(右)を示した。

細胞膜(M)の蛍光強度は、Total Intensity、Avg Intensity とともにサリチル酸濃度依存的な変化がみられなかった。

次に細胞質(C)の蛍光強度に着目すると、Avg Intensity の 6 時間、12 時間、24 時間においてサリチル酸濃度依存的な減少がみられた。また、M/C 比の Avg Intensity に着目すると、6 時間、12 時間、24 時間においてサリチル酸濃度依存的な増加がみられた。

3.3.3 核基準と細胞外周基準の検討

3.3.2 に引き続き、Zone 解析についての詳細な条件検討をした。ここではサリチル酸添加による変異型 Pendrin の細胞内局在変化を明確に検出する目的から、3.3.2 で行った Zone 解析の各チャンネルの設定幅に対して検出範囲を絞り、細胞質(C)、細胞膜(M)の検出範囲を、細胞質(C)は 10 pixel 幅から 5 pixel 幅に、細胞膜(M)は 4 pixel 幅から 2 pixel 幅に変更して行った。サリチル酸添加時間は 12 時間で行った。

Zone 解析における細胞質(C)と細胞膜(M)の設定には、核を基準とする方法と、細胞外周を基準とする方法の 2 種類がある。

前者の、核を基準である Ch1 とした Zone 解析では、Ch1(核)から細胞の外周方向へ 2 pixel 目から 5 pixel 幅を解析上の細胞質(C)として Ch3 に設定した。そして Ch3(C)から外側方向の 2 pixel 幅を解析上の細胞膜(M)として Ch4 に設定した。また Ch2 は細胞外周に設定した(図 3.11(a))。

一方、後者の細胞外周を基準である Ch1 とした Zone 解析では、Ch1(細胞外周)から細胞の内側方向へ 2 pixel 幅を解析上の細胞膜(M)として Ch4 に設定した。そして Ch4(M)から細胞の内側方向へ 5 pixel 幅を解析上の細胞質(C)として Ch3 に設定した。また Ch2 は核に設定した(図 3.11(b))。

この 2 種類の Zone 解析は、設定した細胞膜(M)と細胞質(C)の幅はそれぞれ 5 pixel と 2 pixel で同じであるが、前者の核基準解析では細胞の中心から外側方向へ Ch3(C)、Ch4(M)を設定しており、後者

の細胞外周基準解析では反対に、細胞の外周から内側方向へ Ch3(C)、Ch4(M)を設定している点が異なる。

また、核基準と細胞外周基準の 2 つの基準の検討に加えて、PH1-1H1 細胞はしばしば塊状になることがあり正確な画像解析を困難にしたことから、直径が 100 pixel 以上の細胞塊を含めた場合と除外した場合についても合わせて検討した。

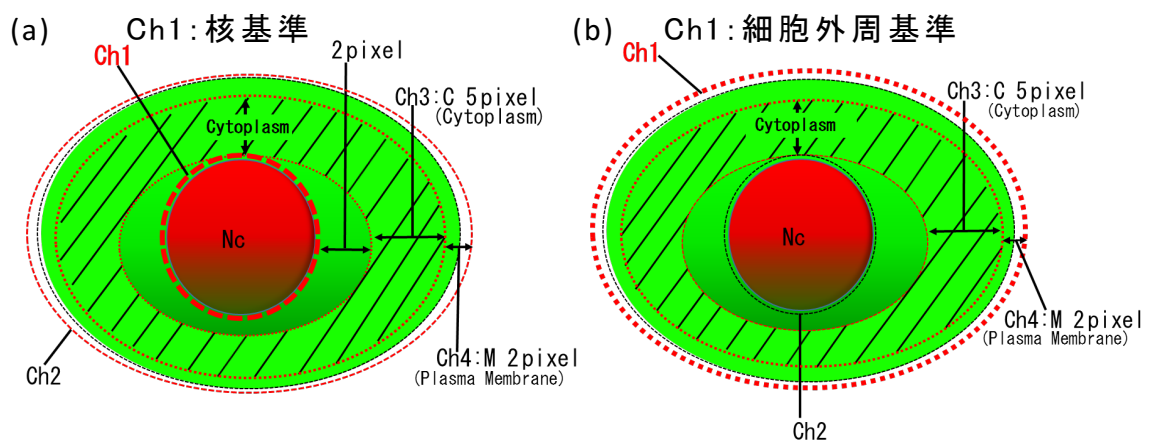


図 3.11 Zone 解析の 2 つの基準の検討(核基準と細胞外周基準)

(a) 核を基準として Ch1 に設定した。Ch1(核)の外側方向に細胞質(C)として 5 pixel 幅の Ch3(C)を設定し、Ch3(C)のさらに外側方向に細胞膜(M)として 2 pixel 幅の Ch4(M)を設定した。Ch2 は細胞外周とした。

(b) 細胞外周を基準として Ch1 に設定した。Ch1(細胞外周)の内側方向に細胞膜(M)として 2 pixel 幅の Ch4(M)を設定し、Ch4(M)のさらに内側方向に細胞質(C)として 5 pixel 幅の Ch3(C)を設定した。Ch2 は核とした。

3.3.2 の Zone 解析に対して各設定の幅を絞って解析を行った。

(細胞質(C)は 8 pixel→5 pixel、細胞膜(M)は 4 pixel→2 pixel に設定。)

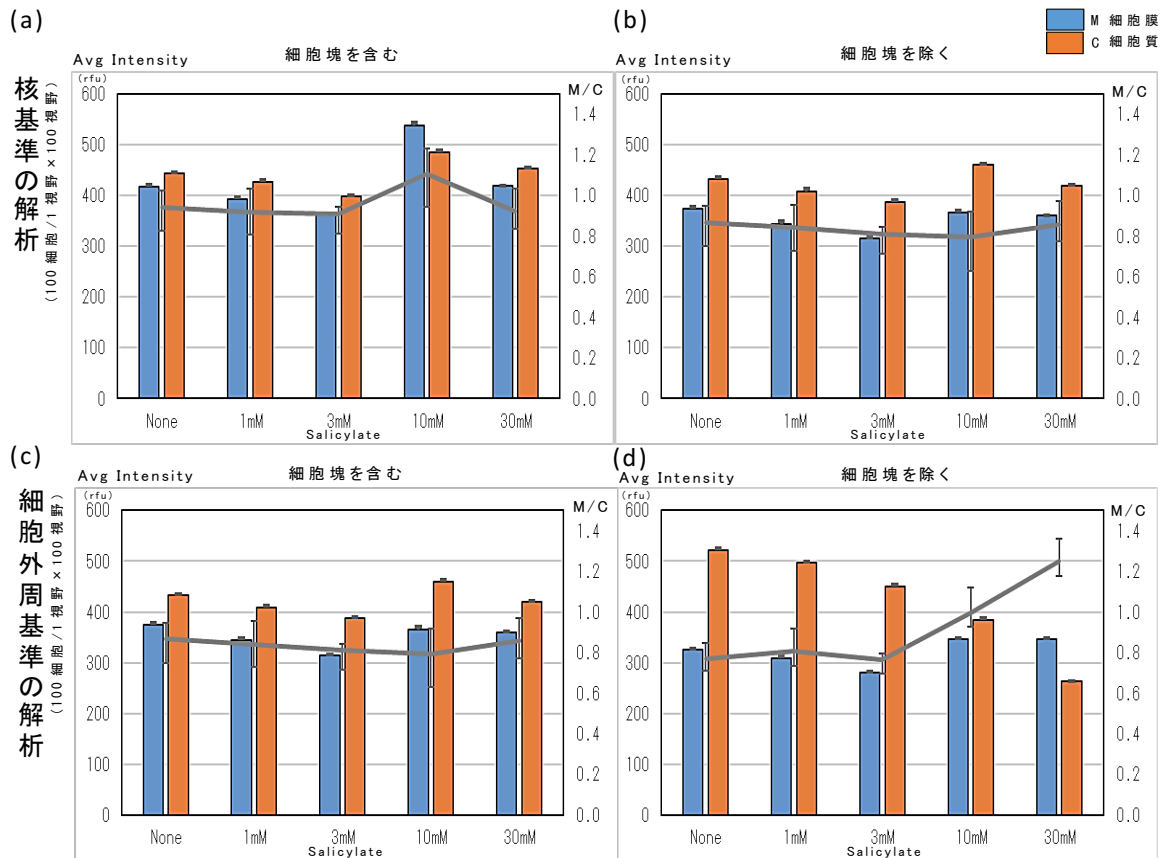


図 3.12 Zone 解析における核基準と細胞外周基準の検討

PH1-1H1 細胞にサリチル酸を 0~30 mM で 12 時間添加し、抗 FLAG 抗体で免疫染色した。Zone 解析での細胞膜(M)と細胞質(C)はそれぞれ 5 pixel 幅と 2 pixel 幅に設定し、核を基準(Ch1)とした Zone 解析と、細胞外周を基準(Ch1)とした Zone 解析を比較した。また直径が 100 pixel 以上の細胞塊を含めた解析と除外した解析を検討した。これらの解析では、細胞は 1 視野あたり最大 100 個の細胞を撮影し、1 well 内 100 視野分を集計した。グラフの上段は核基準の解析、下段は細胞外周基準の解析、左列が細胞塊を含めた解析、右列が細胞塊を除いた解析である。細胞膜(M)は青色、細胞質(C)は橙色、細胞質(C)に対する細胞膜(M)の蛍光強度の比である M/C 比は折線(灰色)で示している。

核基準の解析の(a)、(b)では、細胞膜(M)、細胞質(C)、M/C 比において、サリチル酸濃度依存的な変化がみられなかった。

また、(c)の細胞外周基準で細胞塊を含めた解析でも、サリチル酸濃度依存的な変化はみられなかった。一方、細胞外周基準で細胞塊を除いた解析の(d)に着目すると、サリチル酸濃度依存的な細胞質(C)の減少がみられ、最大約 50%低下した。また(d)の M/C 比では、サリチル酸濃度依存的に約 1.5 倍の増加がみられた。

Zone 解析における核基準と細胞外周について検討した(図 3.12)。その結果、核基準の解析では、細胞膜(M)、細胞質(C)、細胞質(C)に対する細胞膜(M)の比である M/C 比のすべてにおいて、サリチル酸濃度依存的な変化はみられなかった。

これに対して、細胞外周基準の解析では、細胞外周基準で細胞塊を除いた条件(図 3.12(d))において、細胞質(C)の蛍光強度がサリチル酸濃度依存的に減少を示し、最大約 50%低下した。また M/C 比では、サリチル酸濃度依存的におよそ 1.5 倍の増加がみられた。細胞膜(M)では濃度依存的な変化がみられなかった。以上の検討から、Zone 解析の細胞外周を基準とし、細胞塊を除いた解析(d)において、変異型 Pendrin の細胞内局在変化を検出できることが明らかになった。

この結果について考察する。核基準の解析の場合、すべての細胞で核の位置は細胞中央に存在するとは限らないことから、設定上の細胞膜(M)、細胞質(C)の領域と実際の領域が合致せず、正確に蛍光強度測定をできなかったものと考えられた。また、核基準の解析は、核を中心に細胞質(C)、細胞膜(M)を同心円状に設定していることから、円形とは限らない実際の細胞膜や細胞質の形状と、チャンネル設定した円形の領域とが合致しなかったものと考えられた(図 3.13(a))。

一方、細胞外周基準の解析の場合では、細胞質(C)として設定した Ch3 は、細胞外周をそのまま縮小した形状であることから、実際の細胞質の形状と合致し、正確に細胞質の蛍光強度を測定することができたと考えられた(図 3.13(b))。また、3.2.2 の Zone 解析に対して

各チャンネル(Ch)の設定範囲を絞り、Ch3(C)は 5 pixel に設定したことで、検出範囲がより限定され、実際の細胞質の領域と合致したことが考えられた。

また、細胞膜(M)として設定した Ch4 は、サリチル酸濃度依存的な増加を確認できなかった。この理由として、実際の細胞膜の幅はおよそ 1 pixel 幅であること、また実際の細胞膜には細かな凹凸があるが、Ch1 による細胞外周のトレースは細かい形状に対して不完全であるため Ch4(M)も凹凸に対応しておらず、背景部分である黒色領域を多く検出したことが原因として考えられた。

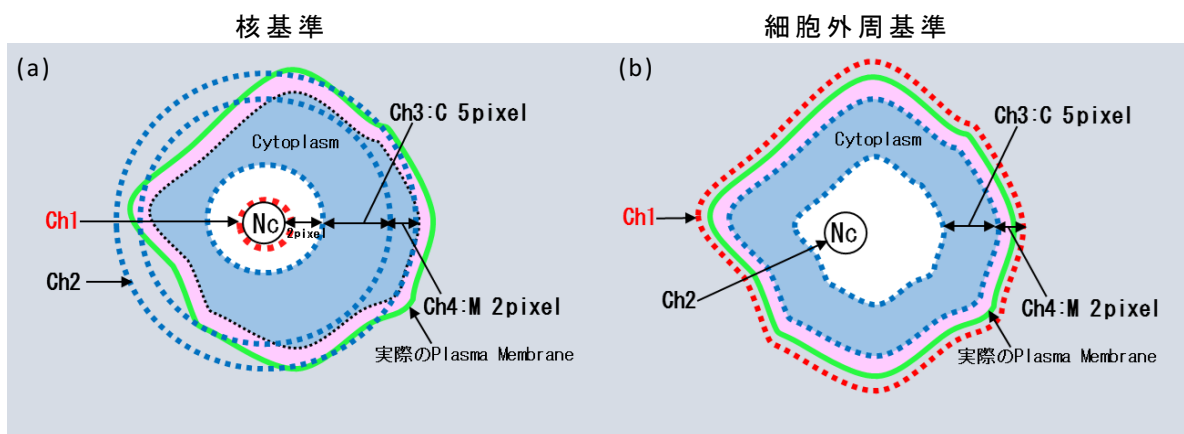


図 3.13 核基準の解析と細胞外周基準の解析についての考察

- (a) 核基準の解析(核を Ch1 に設定)の場合、すべての細胞で核が細胞の中心に存在するとは限らないことから、設定した Ch3(C)、Ch4(M)が実際の細胞質、細胞膜から外れたと考えられた。また、各チャンネルは、核(Ch1)を中心とした同心円状の設定であるため、実際の細胞の形状と設定した円形の領域が合致しないことが考えられた。
- (b) 細胞外周基準の解析(細胞外周を Ch1 に設定)の場合、Ch1 が検出した細胞外周の形状をそのまま縮小した形で Ch3(C)、Ch4(M)を設定できた。このため Ch3(C)は実際の細胞質(C)の領域を正確に検出した。また、細胞膜として設定した Ch4(M)は、Ch1 による細胞外周のトレースが実際の細胞膜の細かな凹凸に対して不完全であり、背景の黒色領域も含めて検出したことから、正確な蛍光強度を測定することはできなかった。

以上の条件検討をふまえて、Morphology V4 解析条件を決定した。Zone 解析において細胞外周を解析上の基準である Ch1 に設定した。次に Ch1 から細胞の内側へ 2 pixel 幅を解析上の細胞膜(M)である Ch4 に設定し、Ch4 から細胞の内側へ 5 pixel 幅を解析上の細胞質(C)である Ch3 に設定した。また、核は Ch2 に設定した。そして、細胞質(C)の蛍光強度がサリチル酸濃度依存的に減少する点を、変異型 Pendrin の細胞質からの移行として考え、Morphology V4 による変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングの基準とした。

3.3.4 決定したパラメーターによる画像解析と Ch3・Ch4 ドット分布

最後に、決定したパラメーターによる試験的解析をした。PH1-1H1 細胞に 10 mM サリチル酸を 12 時間添加し、抗 FLAG 抗体、DAPI で免疫染色した後、CellInsight™ で画像を取り込んだ。細胞は 1 視野あたり 100 細胞を 100 視野分撮影し、画像は Morphology V4 で設定した各チャンネル別に解析した。Ch1 は細胞外周、Ch2 は核、Ch3 は細胞質(5 pixel 幅)、Ch4 は細胞膜(2 pixel 幅)をそれぞれ測定した。

解析画像を確認した結果、細胞膜として設定した Ch4(M)は、実際の細胞膜の位置や幅、凹凸に対するずれがみられ、背面の黒色領域を多く捉えていることがわかった。そのため、サリチル酸添加による変異型 Pendrin の細胞膜移行を正確に捉えていないことがわかった。

一方、細胞質として設定した Ch3(C)は、細胞外周として設定した Ch1(細胞外周)の形状をそのまま縮小した形を示しており、実際の細胞質の中心を捉えることができた(図 3.14(1))。

次に、PH1-1H1 細胞に対し、サリチル酸未処理(None)の場合と、10 mM サリチル酸添加後の場合の、Ch3・Ch4 の蛍光強度のドット分布を調べた。その結果、未処理(None)(a)に対して、10 mM サリチル酸を添加した場合(b)では、グラフの傾き低下がみられた。これは、Ch4(M)に対して細胞質として設定した Ch3(C)の蛍光強度が低下したことを示しており、サリチル酸添加により変異型 Pendrin が細胞質から減少したことを裏付ける結果となった(図 3.14(2))。

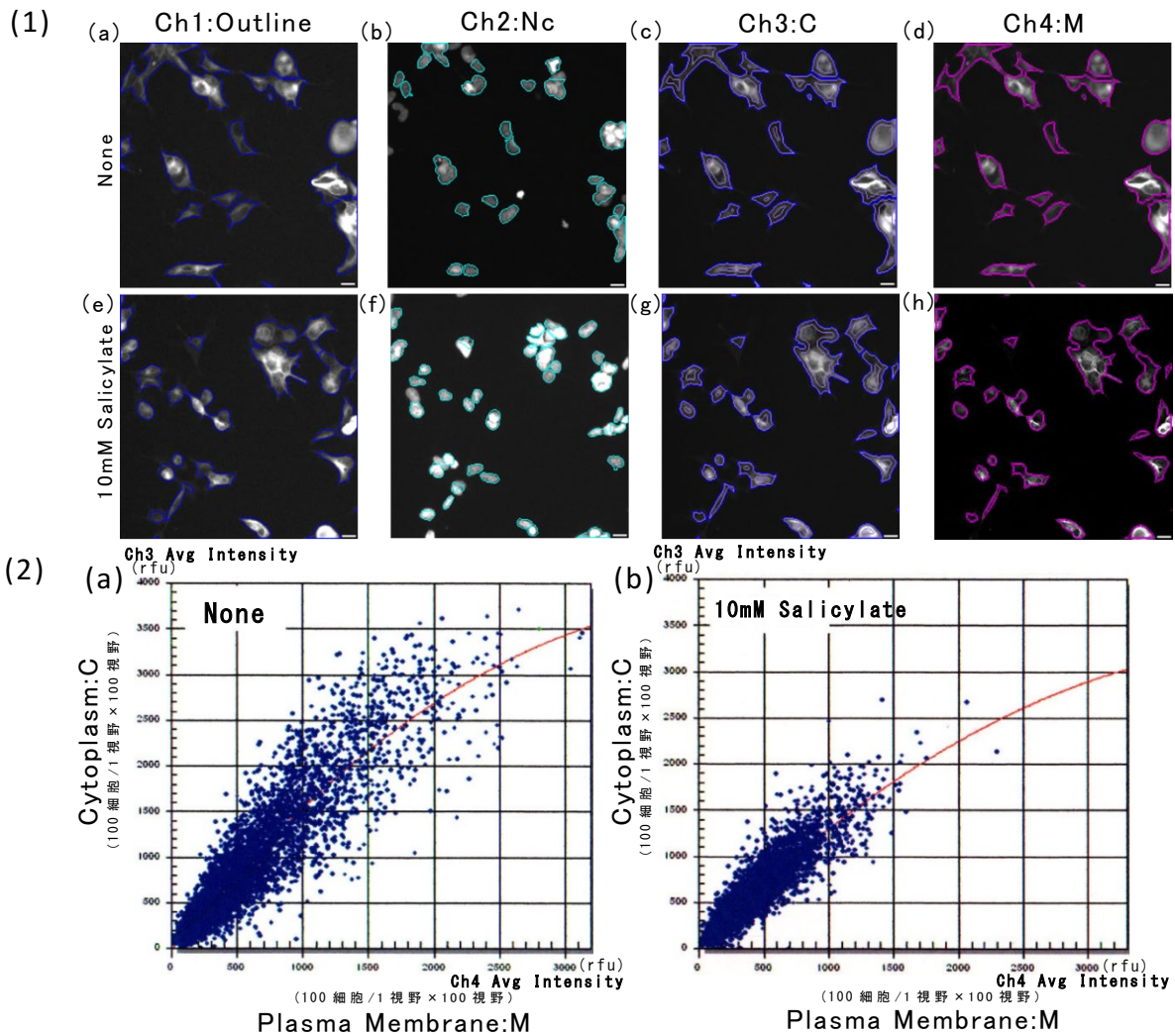


図 3.14 決定したパラメーターでの画像解析と Ch3・Ch4 ドット分布図

(1) Ch1～Ch4 の検出結果

PH1-1H1 細胞に 10 mM サリチル酸を 12 時間添加し、抗 FLAG 抗体、DAPI で免疫染色した。これを 3.3.3 で決定した条件で Morphology V4 解析した。細胞は 1 視野あたり 100 細胞を検出し、合計 100 視野分を解析した。

Ch1 は細胞外周(Outline:(a),(e))、Ch2 は核(Nc:(b),(f))、Ch3 は細胞質(C:(c),(g))、Ch4 は細胞膜(M:(d),(h))を検出目標に設定した。Ch4(M)は実際の細胞膜を正確にトレースできていないが、Ch3(C)は細胞質の中央部分を検出した。(Scale bar = 10 μ m)

(2) Ch3 と Ch4 のドット分布図

PH1-1H1 細胞に対して、10 mM サリチル酸添加の有無による Ch3・Ch4 のドット分布を比較した。その結果、(a)に比べて(b)でグラフの傾きが低下した。これは、サリチル酸添加により Ch4(M)に対して Ch3(C)の蛍光強度が減少したことを示した。

3.4 小括

CellInsight™ 用いたサリチル酸による変異型 Pendrin 局在変化の解析を目的とし、ソフトウェア Morphology V4 の解析パラメータについて検討した。

1. 一定の蛍光強度以上の特徴的構造を検出する Ring Spot 解析と、蛍光強度の強弱に関わらず領域内全てを解析する Zone 解析について検討した。その結果 Ring Spot 解析では、変異型 Pendrin の局在変化を測定することはできなかったが、Zone 解析では、細胞質(C)の蛍光強度がサリチル酸濃度依存的に減少することを確認した。
2. 次に Zone 解析の基準とする Ch1 設定を検討した。Ch1 を核に設定した核基準解析では、変異型 Pendrin の局在変化を測定できなかった。一方、Ch1 を細胞外周に設定した細胞外周基準解析では、細胞塊を除いた条件で、細胞質 Ch3(C)の蛍光強度がサリチル酸濃度依存的に減少し、最大で 50 %低下した。また M/C 比はサリチル酸濃度依存的に上昇し、最大で 1.5 倍に増加した。
3. 以上をふまえて、Morphology V4 解析の条件は次のように決定した。Zone 解析で細胞外周を基準の Ch1 に設定した。Ch1 から細胞の内側へ 2 pixel 幅を解析上の細胞膜(M)として Ch4 に設定し、Ch4 から細胞の内側へ 5 pixel 幅を解析上の細胞質(C)として Ch3

に設定した。また、核は **Ch2** に設定した。細胞質 **Ch3(C)** の蛍光強度がサリチル酸濃度依存的に減少する点に着目し、**Morphology V4** 解析における変異型 **Pendrin** 移行活性スクリーニングの基準として決定した。この解析により、サリチル酸添加による変異型 **Pendrin** の細胞内局在変化を検出することが可能となった。

3.5 引用文献

[1] Barabasz, A.; Foley, B.; Otto, JC.; Scott, A.; Rice, J. “The use of high-content screening for the discovery and characterization of compounds that modulate mitotic index and cell cycle progression by differing mechanisms of action” *Assay Drug Dev Technol* **4**(2): 153-63 (2006).

[2] Barnard, R.; Barnard, A.; Salmon, G.; Liu, W.; Sreckovic. S. “Histamine-induced actin polymerization in human eosinophils: an imaging approach for histamine H4 receptor” *Cytometry A*. **73**(4):299-304 (2008).

[3] Bauer, PO.; Goswami, A.; Wong, HK.; Okuno, M.; Kurosawa, M.; Yamada, M.; Miyazaki, H.; Matsumoto, G.; Kino, Y.; Nagai, Y.; Nukina, N. “Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein” *Nat Biotechnol* **28**(3): 256-63 (2010).

[4] Bauwens,CL.; Peerani, R.; Niebruegge, S.; Woodhouse, KA.; Kumacheva, E.; Husain, M.; Zandstra, PW. “Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories”

Stem Cells **26**(9):2300-10 (2008).

[5] Tierno, MB.; Kitchens, CA.; Petrik, B.; Graham, TH.; Wipf, P.; Xu, FL.; Saunders, WS.; Raccor, BS.; Balachandran, R.; Day, BW.; Stout, JR.; Walczak, CE.; Ducruet, AP.; Reese, CE.; Lazo, JS.

“Microtubule binding and disruption and induction of premature senescence by disorazole C(1).” *J Pharmacol Exp Ther* **328**(3): 715-22 (2009).

[6] 齊藤ふみ 高浜陽介 「共焦点レーザー顕微鏡を用いた凍結切片の免疫蛍光多重染色解析法」 タンパク質研究のための抗体実験マニュアル 羊土社 24-32 (2004).

[7] 高垣哲也 服部 進 蛍光抗体法 「新染色法のすべて」 医歯薬出版株式会社 208-211 (1999).

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

4.1 はじめに

第二章では、変異型 Pendrin 遺伝子(P123S)と野生型 Pendrin 遺伝子(Wt)を HEK293 細胞に遺伝子導入し、G-418 Sulfate 存在下で 2 回の限界希釈法によるクローニングを行い、Stable 細胞である PH1-1H1 細胞と Wt 細胞を樹立した。Stable 細胞を樹立したことにより、変異型 Pendrin が細胞内で安定して発現し、実験ごとの遺伝子導入が不要となった。

第三章では、化合物による変異型 Pendrin の移行活性スクリーニングを目的とし、細胞イメージアナライザーCellInsight™ とソフトウェア Morphology V4 による解析条件の検討をした。

変異型 Pendrin は細胞質に蓄積し細胞膜へ移行できないが、サリチル酸を加えることで細胞膜へ移行した[1,2]。これをふまえて、サリチル酸誘導体についての変異型 Pendrin の移行活性について評価するため、Morphology V4 の解析条件とパラメーターを次のように決定した。

細胞膜を解析上の解析の基準である Ch1 として設定し、核を Ch2 に設定した。そして Ch1 から内側に 2 pixel 幅を細胞膜(Plasma Membrane:M)として Ch4 に設定し、さらに内側 5 pixel 幅を細胞質(Cytoplasm:C)として Ch3 に設定した。この条件で PH1-1H1 細胞にサリチル酸を添加し、Morphology V4 による解析をした結果、サリチル酸濃度依存的に Ch3(C)が減少し、最大で 50 %低下した。そこで、Ch3(C)

に注目し、細胞質(C)の蛍光強度が化合物濃度依存的に減少する点を変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングの基準とした。

本章では、サリチル酸類縁体を用いた変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングとその後の詳しい解析から、サリチル酸と同様の活性を示し、添加後に変異型 Pendrin が細胞膜局在を示す候補化合物の探索を行った。化合物は、本研究室の化合物ライブラリーより 20 種類のサリチル酸類縁体を用いた(図 4.1)。

はじめに、Morphology V4 の Ch3(C)を基準に、20 種類のサリチル酸類縁体を用いて変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングをした。

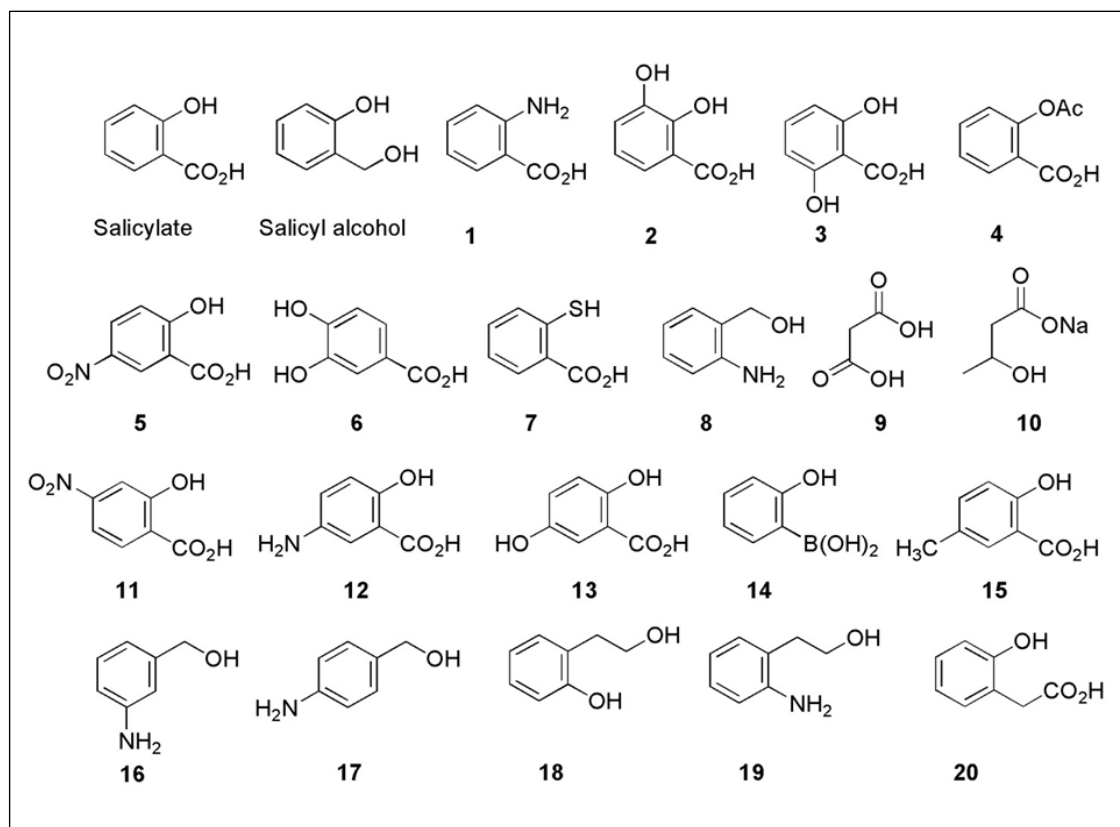


図 4.1 変異型 Pendrin の移行活性スクリーニングに用いたサリチル酸類縁体
変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングでは、サリチル酸(Salicylate)、サリチルアルコール(Salicyl alcohol)、20 種類のサリチル酸類縁体を本研究室の化合物ライブラリーより用いた。ビークルコントロールは 0.1 % DMSO を用いた。

その結果、6つの化合物 **5**、**8**、**11**、**14**、**15**、**18** で濃度依存的な Ch3(C) の減少がみられた。またこれらの化合物の 50 %有効量を示す ED₅₀ を調べ、変異型 Pendrin 移行活性を定量化した。次に、抗 FLAG 抗体による免疫染色の後 FluoView™ を用いて細胞膜(M)と細胞質(C)の蛍光強度測定をし、詳細な M/C 比を測定した。この方法は先行研究と同様に行った[2]。その結果、サリチル酸と比較して M/C 比が高い 3つの化合物、**5**、**8**、**15** を選抜した。さらに、これら 3つの化合物について、Plot Profile 解析による細胞横断蛍光強度の測定をした。Plot Profile 解析では、細胞膜に局在する変異型 Pendrin について評価するため、核の上を通る横断線を設定し、線上の蛍光強度をグラフ化した。最後にこれらの化合物について、化合物除去 24 時間後までの、細胞内薬剤持続性効果を検討した。この結果を Morphology V4 で解析し、Ch3(C)の結果を用いて持続性効果について定量化した。

以上の実験から、20 種類のサリチル酸類縁体より変異型 Pendrin の細胞膜移行活性を有する化合物として **5**、**8**、**15** を選抜した。中でも化合物 **8** ((2-aminophenyl)methanol)はサリチル酸に対して 100 倍高い活性を示し、化合物除去後 12 時間で 50 %の細胞内薬剤持続性効果を示したことから、Pendred 症候群(PDS)に対する創薬研究上での有用な候補化合物であることが示唆された。

4.2 試薬および実験方法

4.2.1 Stable 細胞(PH1-1H1 細胞、Wt 細胞)について

第二章において、HEK293 細胞に対して変異型 Pendrin 遺伝子 (P123S) と野生型 Pendrin 遺伝子をそれぞれ遺伝子導入し、G-418 Sulfate を含む培地で 2 回の限界希釈を行い、恒常的に遺伝子発現をする Stable 細胞を樹立した。変異型 Pendrin(P123S) を発現する Stable 細胞は PH1-1H1 細胞、野生型 Pendrin を発現する Stable 細胞は Wt と命名した。

第三章で PH1-1H1 細胞はサリチル酸応答性を示し、10 mM サリチル酸を添加すると細胞質に蓄積した変異型 Pendrin は細胞膜へ移行した。化合物添加後の変異型 Pendrin の局在変化は、第三章で決定した細胞膜移行活性スクリーニングで評価した。

Stable 細胞の培養条件は、G-418 Sulfate(Calbiochem®) 500 µg/ml を含む 10 %牛血清アルブミン(FBS) RPMI-1640 培地(Wako pure Chemical, Osaka, Japan)で、37°C、CO₂濃度 5 %の環境下、CO₂インキュベーターを用いて行った。

4.2.2 化合物の添加と免疫染色

PH1-1H1 細胞と Wt 細胞は 96 well 培養プレート、または直径 3.5cm 培養皿に 5×10^4 cells/ml で播種し 12 時間培養した。PH1-1H1 細胞に化合物を 12 時間添加し、PBS で wash、4 %パラホルムアルデヒドで 5 分間固定し、1 時間 1 %BSA-PBS でブロッキングした。一次抗体として

抗 FLAG 抗体(Mouse anti-FLAG® M2 antibody (Sigma))を用い、二次抗体として Alexa Fluor 546 (Goat anti mouse IgG(H+L) (Invitrogen))を用いた。また核染色用に DAPI (Wako)を用いた。抗原抗体反応は一次抗体、二次抗体ともに室温で1時間行い、その後 PBS で3回 wash した。Wt 細胞は 0.1 % DMSO を添加し、同様の免疫染色をした[3,4]。撮影は蛍光顕微鏡 CX41(Olympus)、または共焦点レーザー顕微鏡 FV500(Olympus)で行い、画像解析はソフトウェア FluoView™ を用いて行った。ビークルコントロールは 0.1 % DMSO を用いた。

4.2.3 Morphology V4 の Ch3 を基準とした変異型 Pendrin の移行活性スクリーニング

PH1-1H1 細胞と Wt 細胞は 5×10^4 cells/ml \cdot 100 μ l で 96 well 培養プレートに 12 時間播種した。PH1-1H1 細胞に化合物を各濃度で 12 時間添加し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫染色した。Wt 細胞は 0.1 % DMSO を添加し、同様に免疫染色をした。これを細胞イメージアナライザー CellInsight™ で撮影し、ソフトウェア Morphology V4 で解析した。CellInsight™ による撮影は、96 well 培養プレートの 1 well 内を 100 フィールドに分割し、1 フィールドあたり最大 100 細胞を検出した。Morphology V4 解析では細胞外周を解析の基準である Ch1 とし、核を Ch2 とした。Ch1 より内側の 2 pixel 幅を細胞膜(M)として Ch4 に設定し、さらに内側の 5 pixel 幅を細胞質(C)として Ch3 に設定した。そして Ch3(C)の蛍光強度が化合物濃度依存的に減少する割合(%)を変異型 Pendrin の移行活性スクリーニングの基準とした。また、細胞膜として

設定した Ch4(M)は、Ch1 による細胞外周のトレースが不完全で、細胞膜の検出が困難であったことから、スクリーニングの基準に用いなかった。ビークルコントロールは 0.1 % DMSO を用い、この実験は n=3 で行った。

4.2.4 化合物の 50 %効果濃度(ED₅₀)の測定

Morphology V4 の Ch3(C)を基準とした変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングの結果から、活性のみられた化合物を選抜し、薬剤の 50 %効果濃度を示す ED₅₀ を測定した。ED₅₀ は、無刺激(None)の Ch3(C)の蛍光強度(Avg Intensity)を 100 %とし、効果が 50 %になる濃度を Semilogarithmic dose-response plots より算出した。ビークルコントロールは 0.1 % DMSO を用い、この実験は n=3 で行った。

4.2.5 化合物の 50 %細胞増殖抑制濃度(IC₅₀)の測定

PH1-1H1 細胞を 5×10^4 cells/ml · 100 μ l で 96 well 培養プレートに播種し 12 時間培養した。その後化合物を各濃度で 12 時間添加した。これに 5 mg/ml MTT 試薬(TCI Co., Ltd. Japan)を 10 μ l 添加し、48 時間培養した。その後、100 μ l DMSO を加えて細胞を溶解し、570 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した。IC₅₀ は 48 時間後の無刺激(None)の吸光度(Absorbance)を 100 %とし、吸光度が 50 %になる濃度を Semilogarithmic dose-response plots より算出した。ビークルコントロールは 0.1 % DMSO を用い、この実験は n=3 で行った。

4.2.6 FluoView™ を用いた M/C 比の測定

変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングにより選抜した候補化合物について、より詳細な細胞膜(M)と細胞質(C)を調べるため、画像解析ソフト FluoView™ (Olympus)を用いた細胞膜(M)と細胞質(C)の蛍光強度を測定した。PH1-1H1 細胞と Wt 細胞は直径 3.5 cm 培養皿に 5×10^4 cells/ml で播種し、12 時間培養した。PH1-1H1 細胞に化合物を各濃度で 12 時間添加し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫染色をした。Wt 細胞は 0.1 % DMSO を添加し、同様に免疫染色した。これを共焦点レーザー顕微鏡 FV500(Olympus)で撮影し、FluoView™で蛍光強度の測定をした。測定は、無作為に 100 細胞を選び、細胞膜(M)と細胞質(C)のそれぞれ 10 か所の平均蛍光強度(Avg Intensity)を求めた。そして細胞質(C)に対する細胞膜(M)の割合を示す M/C 比を求めた。ビークルコントロールは 0.1 % DMSO を用い、この実験は n=3 で行った。この方法は先行研究にしたがった[2]。

4.2.7 Plot Profile 解析による細胞横断蛍光強度の測定

候補化合物添加後の変異型 Pendrin の細胞膜局在を確認するため、画像解析ソフトウェア Image J の Plot Profile 解析をし、細胞の横断蛍光強度を測定した。

PH1-1H1 細胞と Wt 細胞は 5×10^4 cells/ml で直径 3.5cm 培養皿に播種し、12 時間培養した。PH1-1H1 細胞に化合物を各濃度で 12 時間添加した後、抗 FLAG 抗体で免疫染色した。Wt 細胞は 0.1 % DMSO を添加し、同様に免疫染色した。これを共焦点レーザー顕微鏡 FV500 で撮

影した。画像は FluoView™ で取込した後、画像解析用ソフトウェア Image J の Plot Profile 解析をした。Plot Profile 解析は、細胞の核上に線引きし、細胞を横断する蛍光強度を測定しグラフ化した。ビークルコントロールは 0.1 % DMSO を用い、この実験は n=3 で行った。

4.2.8 細胞内薬剤持続性効果の検討

候補化合物について、化合物除去後の細胞内薬剤持続性効果を検討した。PH1-1H1 細胞は 5×10^4 cells/ml で直径 3.5cm 培養皿に播種し、12 時間培養した。PH1-1H1 細胞に化合物を 12 時間添加した後、PBS で wash し、培地を交換して 0 時間、6 時間後、12 時間後、24 時間後にそれぞれ 4 %パラホルムアルデヒド/PBS で固定した。これを抗 FLAG 抗体により免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡 FV500 で撮影した。

また、同様の免疫染色を Morphology V4 解析し Ch3(C)を測定することで、細胞内薬剤持続性効果を定量した。無刺激(None)の Ch3(C)を 100 %とし、化合物除去後の各時間の Ch3(C)を割合(%)として求めた。化合物除去後の時間は 0 時間、6 時間、12 時間で検討した。ビークルコントロールは 0.1 % DMSO を用い、この実験は n=3 で行った。

4.3 結果および考察

4.3.1 Morphology V4 の解析基準の確認

第三章で設定した Morphology V4 の解析基準について、確認した。PH1-1H1 細胞は 5×10^4 cells/ml \cdot 100 μ l で 96 well 培養プレートに播種して 12 時間培養し、サリチル酸を 0~30 mM で 12 時間添加した。これを抗 FLAG 抗体で免疫染色し、Morphology V4 で解析した。この解析では、1 視野あたり最大 100 個の細胞を撮影し、1 well 内 100 視野を集計した。

その結果、細胞質(C)として設定した Ch3 の蛍光強度(Avg Intensity (rfu))はサリチル酸濃度依存的に減少を示した。細胞膜(M)として設定し

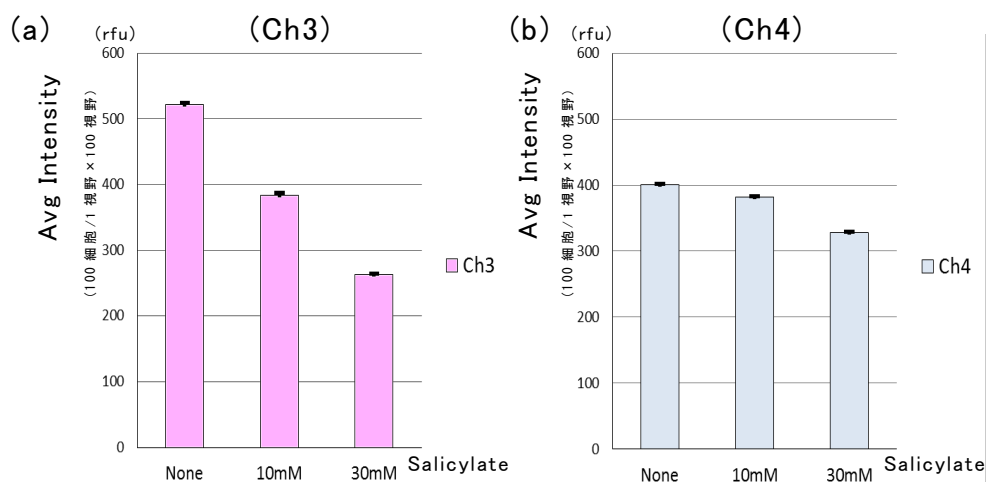


図 4.2 Morphology V4 の解析基準の確認

PH1-1H1 は 96 well 培養プレートに 5×10^4 cells/ml \cdot 100 μ l で播種し、12 時間培養した。サリチル酸(Salicylate)を 0 mM~30 mM で 12 時間添加し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫染色をした。第三章で決定した Morphology V4 の解析基準の確認として行った。1 視野あたり最大 100 個の細胞を撮影し、1 well 内 100 視野分を集計した。横軸はサリチル酸濃度、縦軸は Avg Intensity (rfu)を示した。グラフ(a)は Ch3(C)、(b)は Ch4(M)を示した。その結果、Ch3(C)はサリチル酸濃度依存的に減少した。ビークルコントロールは 0.1 % DMSO を用い、この実験は n=3 で行った。

た Ch4 は、正確な細胞膜の蛍光強度を検出できなかった。このことから、Ch3(C)の化合物濃度依存的な減少を変異型 Pendrin の細胞質からの移行として判断した。Ch4 は、Ch1 による細胞外周のトレースが細胞膜の細かな凹凸に対して不完全であり、その内側に設定した Ch4 も同様に検出範囲が外れたと考えられた。以上より、Ch3 を移行活性スクリーニングの基準とした。

4.3.2 Morphology V4 の Ch3 を基準とした変異型 Pendrin 移行活性スクリーニング

Morphology V4 の Ch3(C)の蛍光強度(Avg Intensity (rfu))が化合物濃度依存的に減少する点を基準として、サリチル酸とサリチルアルコール、20 種類のサリチル酸類縁体の変異型 Pendrin に対する移行活性スクリーニングをした(図 4.3)。(以下、移行活性として表記する。) 化合物濃度は、サリチル酸は 1 mM~30 mM、他は 1 mM~10 mM で添加し、化合物 8 は、予備実験で高い活性がみられたことから 0.03 mM~1.0 mM で添加した。化合物添加時間は 12 時間で行った。この解析では、1 視野あたり最大 100 個の細胞を撮影し、1 well 内 100 視野分を集計した。結果について化合物順に考察する。

化合物 1、4、7 は、サリチル酸と同様カルボン酸であるが、Ch3 の化合物濃度依存的減少はみられなかった。このことから、サリチル酸の構造におけるフェノール類のヒドロキシ基が、移行活性に不可欠であることが考えられた。化合物 2、3、6、12、13 は、Ch3 の化合物濃度依存的減少がみられず、移行活性はなかった。次に化合物 5、11 は電子吸引

性グループ(EWG)であるが、Ch3は化合物濃度依存的減少し、移行活性がみられた。この結果から、サリチル酸の構造における安息香酸による酸性条件も移行活性にとって重要であると考えられた。化合物 9、10では、移行活性がみられなかったことから、ベンゼン環は移行活性に必要不可欠であることが考えられた。アニリン由来の化合物 8とボロン酸由来の化合物 14では Ch3が化合物濃度依存的に減少し、高い移行活性がみられた。これはカルボン酸がアミンまたはボロン酸に置き換えが可能な可能性を示唆した。次に化合物 18 (2-(2-hydroxyethyl)phenol)は、Ch3が化合物濃度依存的に減少し、移行活性がみられたのに対して、化合物 19 (2-(2-hydroxyethyl)aniline)では、移行活性がみられなかった。化合物 20は、サリチル酸のベンゼン環とカルボン酸の間にエチレンリンカーをつけた構造であるが、Ch3は化合物濃度依存的に減少し、サリチル酸と同程度の移行活性がみられた。

以上の結果から、6つの化合物 5、8、11、14、15、18が変異型Pendrin(P123S)に対する移行活性を有する可能性が示唆された。特に化合物 8は、0.03 mM~1 mMで添加したことから、これらの化合物の中で最も高い活性である可能性が考えられた。

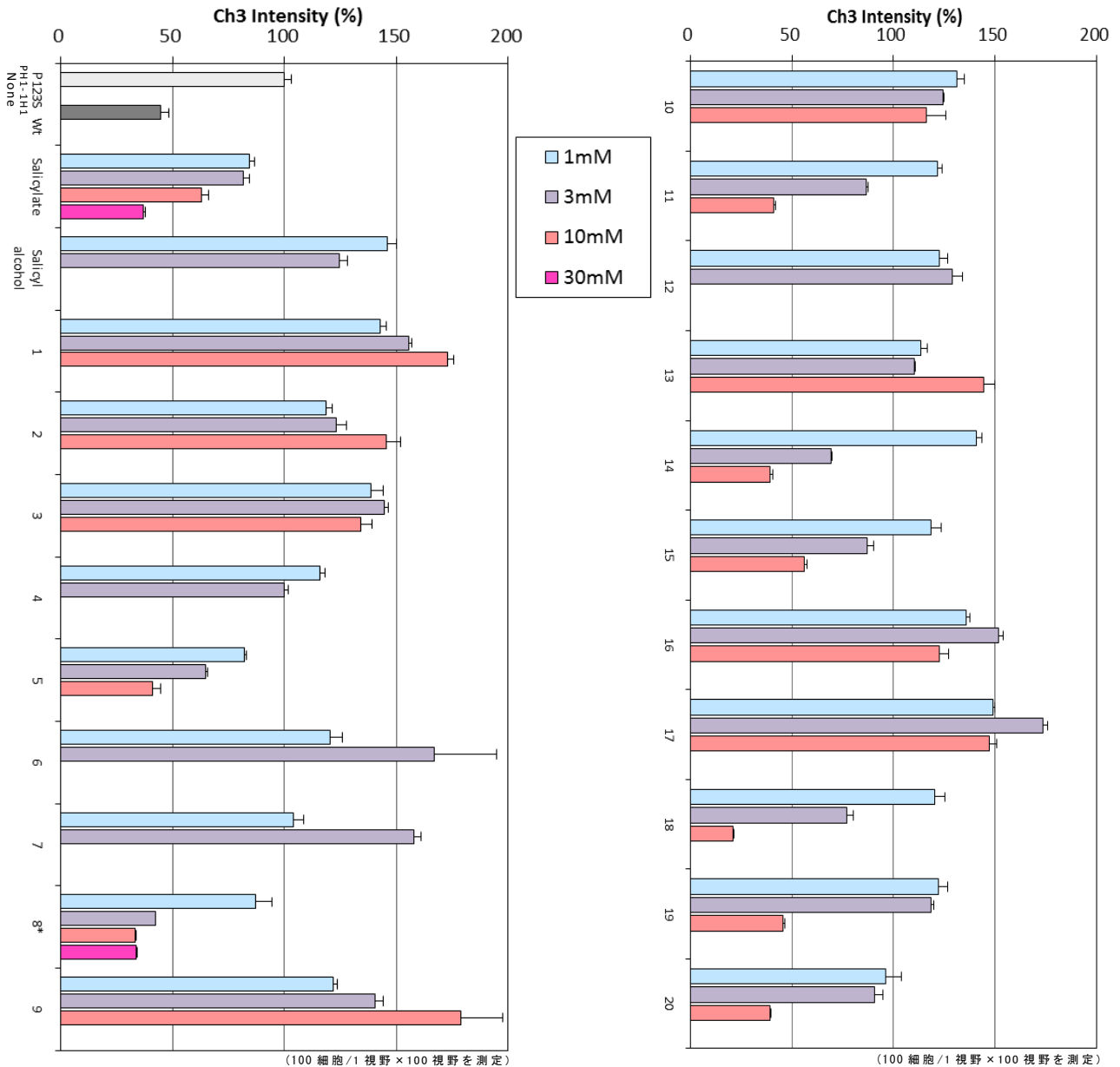


図 4.3 サリチル酸類縁体の Morphology V4 の Ch3 を基準とした変異型 Pendrin 移行活性スクリーニング

PH1-1H1 細胞、Wt 細胞は 96 well 培養プレートに 5×10^4 cells/ml \cdot 100 μ l で播種し、12 時間培養した。PH1-1H1 細胞に化合物を各濃度で 12 時間添加し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫染色した。これらを Morphology V4 解析し、Ch3(C)の蛍光強度 (Avg Intensity (rfu))が化合物濃の濃度依存的に減少する点を、無刺激(None)に対する割合(%)で評価した。これらの解析では 1 視野あたり最大 100 個の細胞を撮影し、1 well 内 100 視野分を集計した。化合物の濃度はサリチル酸(Salicylate)が 1 mM ~30 mM、他は 1 mM~10 mM で添加した。化合物 8*は活性が高く、0.03 mM~1.0 mM で添加した。Wt 細胞は 0.1 % DMSO を添加し、同様に解析した。ビークルコントロールは 0.1 % DMSO を使い、この実験は n=3 で行った。

4.3.3 候補化合物の ED₅₀

Morphology V4 の Ch3(C)を基準とした変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングから、活性のみられた 6 つの候補化合物 **5**、**8**、**11**、**14**、**15**、**18** を選抜した。これらの Ch3(C)の蛍光強度(Avg Intensity (rfu))から、50 %効果濃度である ED₅₀ を求めた(表 4.1)。その結果、サリチル酸の ED₅₀ は 11.4 mM であるのに対し、化合物 **11**、**15** は同程度の移行活性を示した。また、化合物 **5**、**14**、**18** はサリチル酸に対しておよそ 2 倍高い移行活性がみられた。特に化合物 **8** ((2-aminophenyl)methanol) は ED₅₀ が 0.11 mM を示し、サリチル酸と比べておよそ 100 倍高い移行活性を示した。

表 4.1

候補化合物の ED₅₀

| Compound | ED ₅₀ /mM |
|------------|----------------------|
| Salicylate | 11.4 ± 0.65 |
| 5 | 5.1 ± 1.35 |
| 8 | 0.11 ± 0.08 |
| 11 | 9.5 ± 0.41 |
| 14 | 4.4 ± 0.47 |
| 15 | 13.7 ± 0.52 |
| 18 | 5.1 ± 0.28 |

変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングで選抜した 6 つの候補化合物について、Ch3(C)の蛍光強度(Avg Intensity (rfu))から 50 %効果濃度である ED₅₀ を算出した。ED₅₀ は無刺激(None)の Ch3(C)を 100 %とし、効果が 50 %になる濃度を Semilogarithmic dose-response plots より算出した。ビークルコントロールは 0.1 % DMSO を用い、この実験は n=3 で行った。

4.3.4 MTT Assay による IC₅₀

化合物による 50 %細胞増殖抑制(IC₅₀)濃度は、MTT Assay により求めた。サリチル酸とサリチルアルコール、20 種類のサリチル酸類縁体を PH1-1H1 細胞に各濃度で 12 時間添加し、MTT 試薬を加えて 48 時間培養後、DMSO で溶解し、570 nm で吸光度を測定した。IC₅₀ は、化合物添加 48 時間後の無刺激(None)の吸光度を 100 %とし、50 %細胞増殖抑制濃度を Semilogarithmic dose-response plots より算出した(図 4.4)(表 4.2)。

その結果、サリチル酸、サリチルアルコール、化合物 1、2、6、10、12、13、14、16、18、19 では IC₅₀ が 15 mM 以上を示し、また化合物 3、4、7、9、11、15、17、20 では IC₅₀ がおよそ 10 mM を示した。これらの化合物による細胞増殖抑制は低いと考えられた。

また、化合物 5 の IC₅₀ は 5.3 mM を示した。化合物 5 の ED₅₀ は 5.1 mM であることから、移行活性のみられる濃度(5.1mM)での細胞増殖抑制が示された。一方、化合物 8 の IC₅₀ は 3.6 mM を示した。化合物 8 の ED₅₀ は 0.11 mM で、この値は IC₅₀ の 3.6 mM より大幅に低く、また、化合物 8 が 0.1 mM での細胞増殖抑制を求めたところ 5 %であった。このため、化合物 8 の移行活性のみられる濃度(0.1mM)での細胞増殖抑制は影響しないと考えられた。

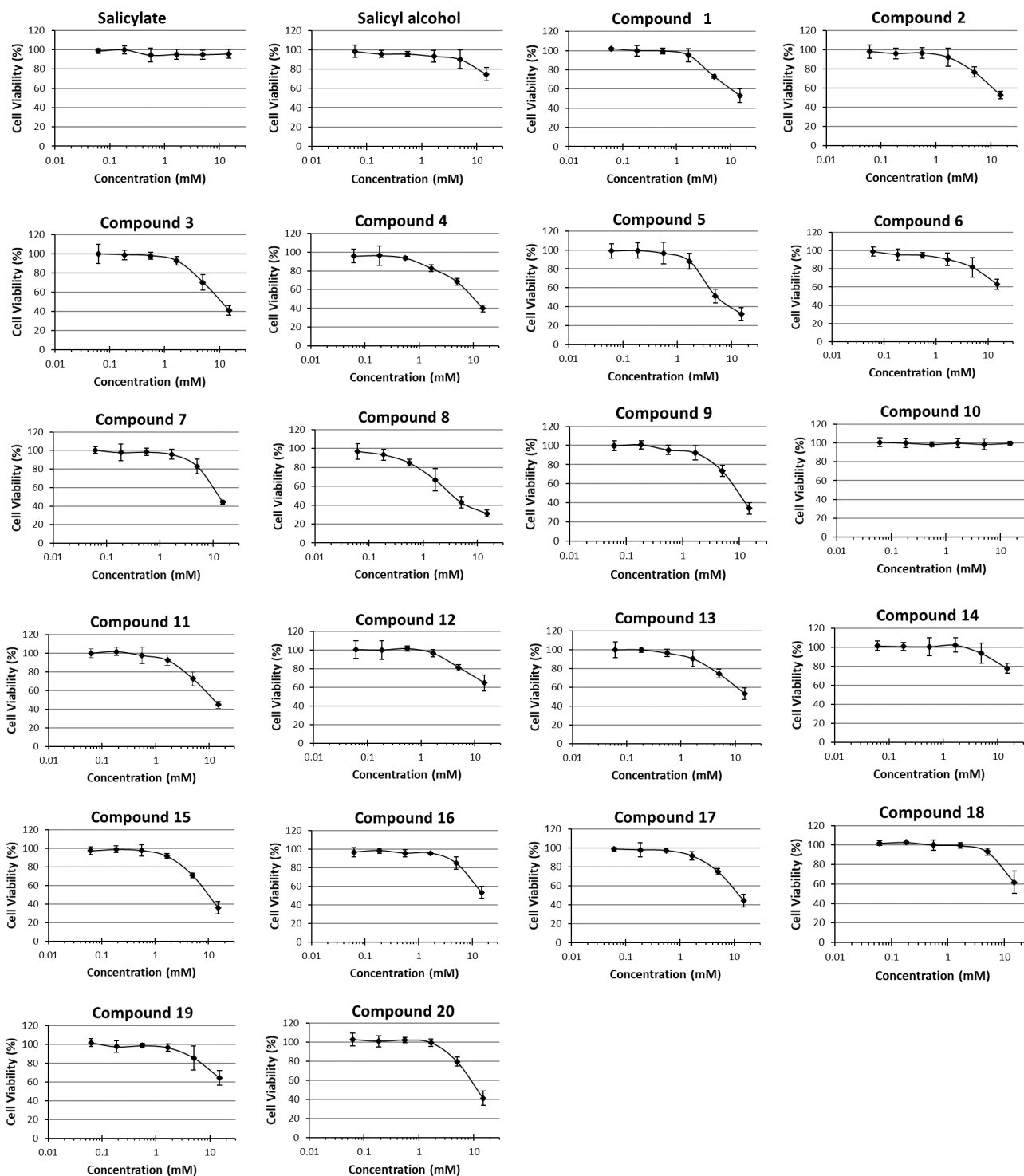


図 4.4 サリチル酸類縁体の MTT Assay

PH1-1H1 細胞は 96 well 培養プレートに 5×10^4 cells/ml \cdot 100 μ l で播種し、サリチル酸(Salicylate)とサリチル酸類縁体(Salicyl alcohol、化合物 1 から 20)を 12 時間添加した。これに 5 mg/ml MTT 試薬を 10 μ l 加えて 48 時間培養し、100 μ l DMSO で溶解した。細胞は溶解後に 570 nm で吸光度(Absorbance)を測定した。

グラフの縦軸は化合物添加 48 時間後の無刺激(None)の吸光度を 100 %とし、化合物添加による吸光度減少の割合(%)を示した。横軸は化合物濃度を log で表示した。化合物濃度は、15.00 mM、5.00 mM、1.67 mM、0.56 mM、0.19 mM、0.06 mM を添加した。ビークルコントロールは 0.1 % DMSO を用い、この実験は n=3 で行った。

表 4.2

MTT Assay による IC₅₀

| Compound | IC ₅₀ /(mM) ^a | Compound | IC ₅₀ /(mM) ^a |
|-----------------|-------------------------------------|-----------|-------------------------------------|
| Salicylate | > 15.0 (4.2%) | 10 | > 15.0 (0%) |
| Salicyl alcohol | > 15.0 (25.3%) | 11 | 12.5 ±2.41 |
| 1 | > 15.0 (46.9%) | 12 | > 15.0 (35.5%) |
| 2 | > 15.0 (47.4%) | 13 | > 15.0 (46.8%) |
| 3 | 10.6 ±2.60 | 14 | > 15.0 (22.3%) |
| 4 | 10.2 ±0.62 | 15 | 9.8 ±0.48 |
| 5 | 5.3 ±0.87 | 16 | > 15.0 (46.7%) |
| 6 | > 15.0 (37.0%) | 17 | 12.7 ±0.85 |
| 7 | 12.7 ±1.84 | 18 | > 15.0 (38.3%) |
| 8 | 3.6 ±0.57 | 19 | > 15.0 (35.8%) |
| 9 | 9.7 ±0.71 | 20 | 12.1 ±0.86 |

^a Percentage inhibition of cell viability at 15 mM is indicated in parenthesis.

PH1-1H1 細胞にサリチル酸(Salicylate)とサリチル酸類縁体(Salicyl alcohol、化合物 **1** から **20**)を 12 時間添加した後 MTT Assay を行い、IC₅₀ を求めた。IC₅₀ は、化合物添加 48 時間後の無刺激(None)の吸光度を 100 % とし、50 % 細胞増殖抑制濃度を Semilogarithmic dose-response plots より算出した。ビークルコントロールは 0.1 % DMSO を用い、この実験は n=3 で行った。

Salicylate、Salicyl alcohol、化合物 **1**、**2**、**6**、**10**、**12**、**13**、**14**、**16**、**18**、**19** は IC₅₀ が 15 mM 以上を示し、化合物 **3**、**4**、**7**、**9**、**11**、**15**、**17**、**20** は IC₅₀ がおよそ 10 mM を示した。これらの化合物による細胞増殖抑制は低いことが示唆された。化合物 **5**、**8** は、IC₅₀ がそれぞれ 5.3 mM、3.6 mM を示し、サリチル酸類縁体の中では比較的細胞増殖抑制がみられた。化合物 **5** の IC₅₀ は 5.3mM、ED₅₀ は 5.1 mM であることから、移行活性濃度(5.1 mM)での細胞増殖抑制が示された。一方、化合物 **8** の ED₅₀ は 0.11 mM であり、化合物 **8** の IC₅₀ 値 3.6 mM に対して大幅に低い値を示した。

4.3.5 候補化合物の M/C 比の測定

変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングの結果、6つの候補化合物 **5**、**8**、**11**、**14**、**15**、**18** を選抜した。これらを PH1-1H1 細胞に添加し、免疫染色した後、共焦点レーザー顕微鏡(FV500)による撮影と、ソフトウェア FluoView™ を用いて細胞膜(M)と細胞質(C)の蛍光強度(Avg Intensity (rfu))を測定し、M/C 比を測定した(図 4.5)。1細胞あたり無作為に細胞膜(M)と細胞質(C)をそれぞれ 10 ポイント測定し、100 細胞分を集計した。

その結果、10 mM のサリチル酸は M/C 比がおよそ 1.0 であるのに対し、化合物 **5**、**11**、**15**、**18** の M/C 比は 10 mM でおよそ 1.5 を示し、化合物 **14** は 3 mM で M/C 比が 1.75 を示した。この中で化合物 **8** は、0.1 mM で M/C 比が 0.9 を示し、0.3 mM では M/C 比が 1.5 を示した。この結果から、M/C 比に着目した場合、化合物 **5**、**11**、**14**、**15**、**18** はいずれもサリチル酸に対して高い移行活性がみられ、特に化合物 **8** はおよそ 100 倍移行活性が高いことが示された。

一方、免疫染色像の観察結果から、化合物 **11**、**14**、**18** は細胞どうしの立体的な凝集が強くみられた。この場合、細胞どうしが上下に重なり合うことで細胞層に高さが生じ、重なりのある領域を個別にフォーカスし正確に評価すること難しくなった。このため、撮影後の画像解析が困難なことから、その後の Plot Profile 解析と、培養時間を長く確保する必要がある細胞内薬剤持続性効果での候補化合物から除いた。

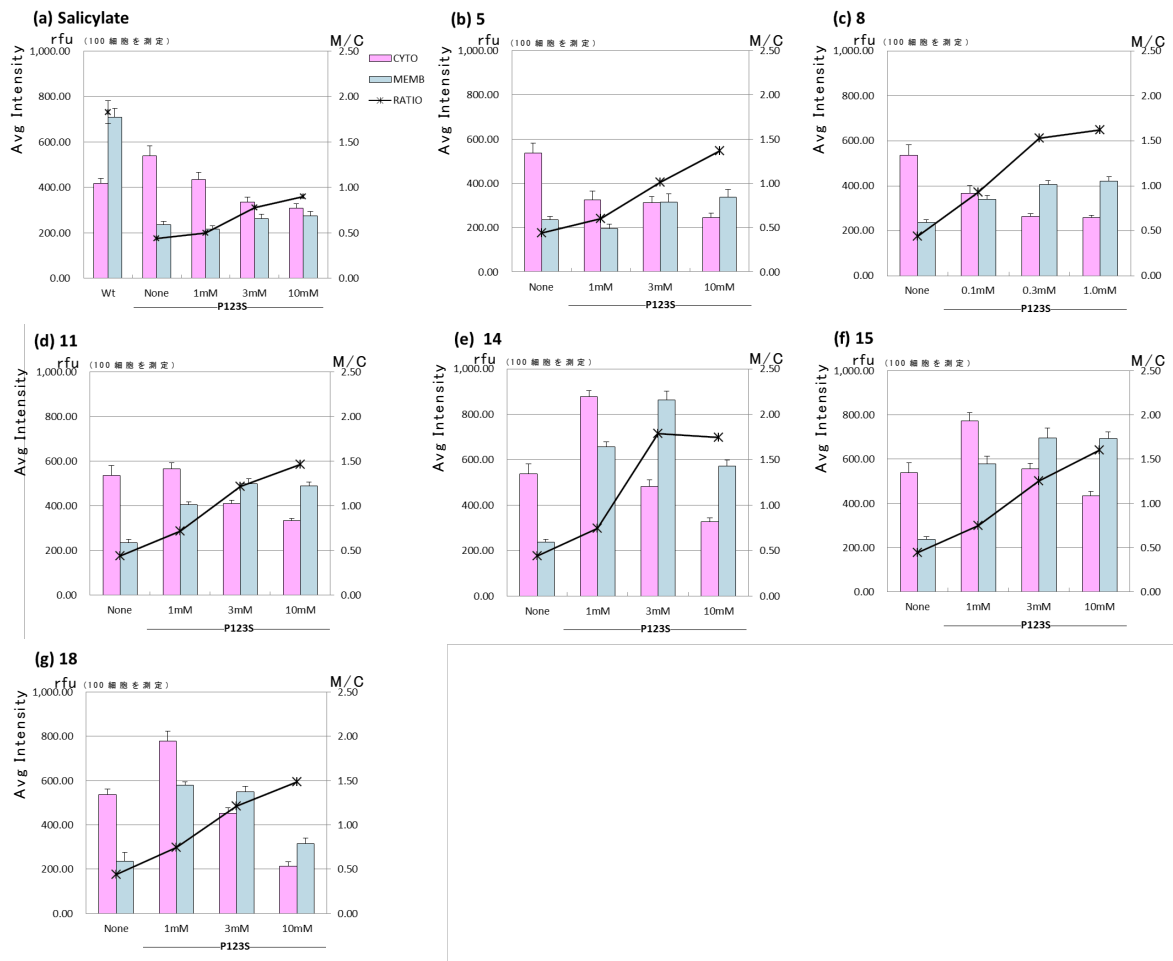


図 4.5 候補化合物の M/C 比の測定

変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングで選抜した 6 つの候補化合物について、FluoView™ を用いて M/C 比を測定した。

PH1-1H1 細胞と Wt 細胞は 5×10^4 cells/ml で直径 3.5 cm 培養皿に播種した。PH1-1H1 細胞に候補化合物を各濃度で 12 時間添加し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫染色した。Wt 細胞は、0.1 % DMSO を添加し、同様に免疫染色した。化合物濃度は化合物 8 のみ 0.1 mM ~ 1.0 mM を添加し、サリチル酸(Salicylate)、化合物 5、11、14、15、18 は 1 mM ~ 10 mM を添加した。これを共焦点レーザー顕微鏡 FV500 で撮影し、100 個の細胞について、FluoView™ により細胞膜(M)と細胞質(C)の蛍光強度(Avg Intensity (rfu))を測定し M/C 比を求めた。縦軸左は平均蛍光強度(Avg Intensity (rfu))、横軸は化合物濃度、右縦軸は M/C 比を示し、グラフで細胞質(C)は桃色、細胞膜(M)は水色、M/C 比は折線で示した。ビークルコントロールは 0.1 % DMSO を用い、この実験は n=3 で行った。

4.3.6 候補化合物の Plot Profile 解析

変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングと M/C 比の測定から選抜した 3 つの候補化合物 **5**、**8**、**15** について Plot Profile 解析をし、細胞の横断蛍光強度の測定をした(図 4.6)。

PH1-1H1 細胞に化合物を各濃度で 12 時間添加し、抗 FLAG 抗体、DAPI により免疫染色した。化合物の濃度は、サリチル酸、化合物 **5**、**15** は 1 mM~10 mM を添加し、化合物 **8** は 0.03 mM~0.3 mM を添加した。Plot Profile 解析は、細胞の核上に線引きし、細胞を横断する蛍光強度(Intensity (rfu))を測定してグラフ化した。Wt 細胞は 0.1 % DMSO を添加し、同様に解析した。

その結果、サリチル酸は 10 mM で変異型 Pendrin が細胞膜局在を示したのに対して、化合物 **5** は 3 mM、**15** は 10 mM で細胞膜局在を示した。また化合物 **8** は、0.1 mM で明確な細胞膜局在を示し、0.03 mM においても細胞膜局在を確認した。以上の Plot Profile 解析から、化合物 **5**、**8**、**15**、はいずれも細胞膜移行活性を有し、特に化合物 **8** はサリチル酸と比べておよそ 100 倍高い活性が示された。

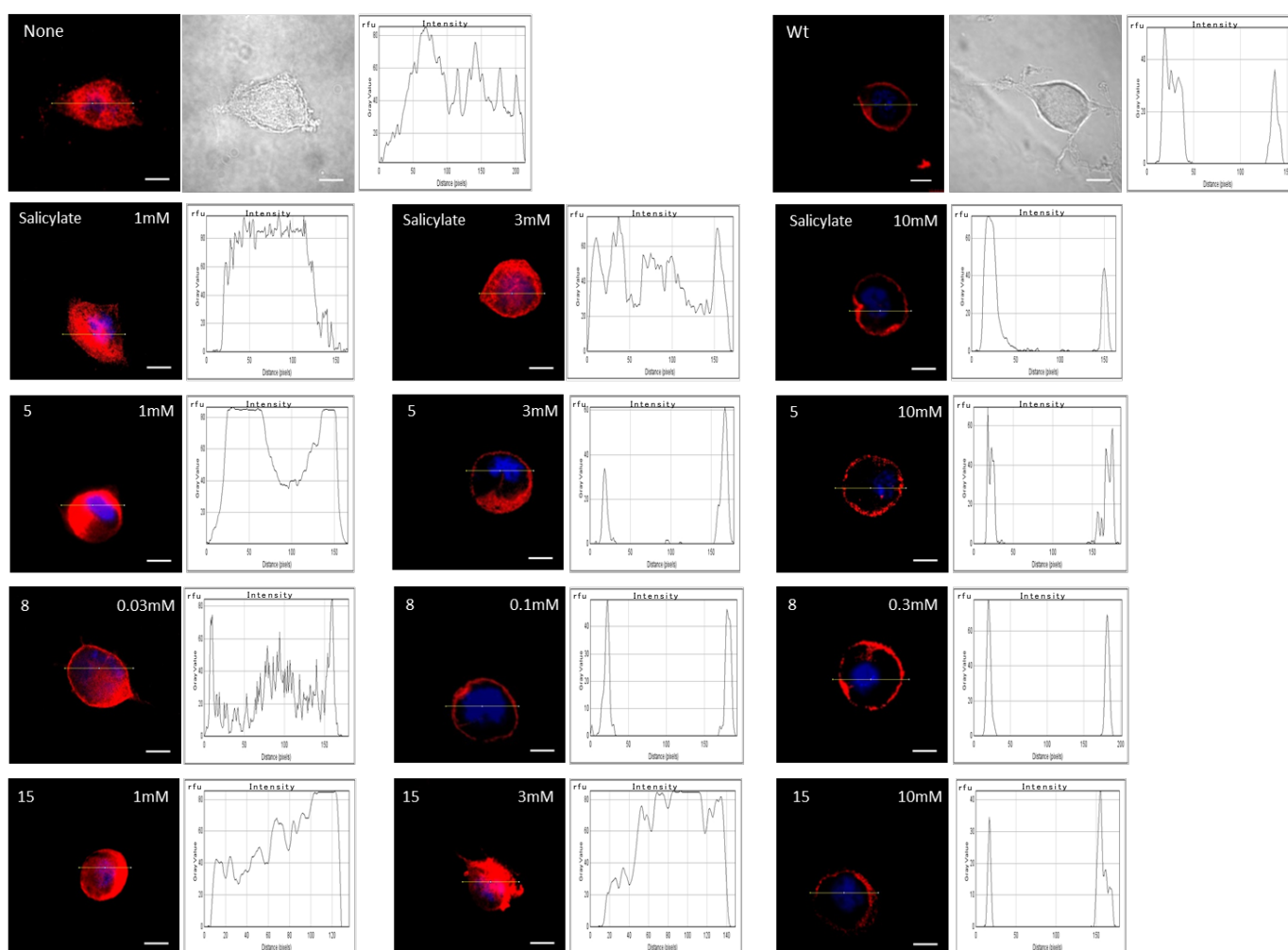


図 4.6 候補化合物の Plot Profile 解析

PH1-1H1 細胞と Wt 細胞は 5×10^4 cells/ml で直径 3.5 cm 培養皿に播種した。PH1-1H1 細胞にサリチル酸(Salicylate)、化合物 **5**、**8**、**15** を各濃度で 12 時間添加し、抗 FLAG 抗体、DAPI を用いて免疫染色をした。Wt 細胞は 0.1 % DMSO を添加し、同様に免疫染色した。化合物濃度は、サリチル酸、化合物 **5**、**15** は 1 mM~10 mM で添加し、化合物 **8** は 0.03 mM~0.3 mM で添加した。これを共焦点レーザー顕微鏡 FV500 で撮影し、Plot Profile 解析で細胞の横断線上の蛍光強度をグラフ化した。グラフ縦軸は蛍光強度(Intensity (rfu))、横軸は距離(pixel)を示した。ピークルコントロールは 0.1 % DMSO を用い、この実験は n=3 で行った。(Scale bar = 10 μ m)

サリチル酸、化合物 **15** は 10 mM、化合物 **5** は 3 mM で細胞膜局在を示し、化合物 **8** は 0.03 mM 以上で細胞膜局在がみられた。

4.3.7 細胞内薬剤持続性効果

選抜した 3 つの候補化合物 **5**、**8**、**15** について、化合物除去後の細胞内薬剤持続性効果について検討した(図 4.7)。PH1-1H1 細胞にサリチル酸、化合物 **5**、**8**、**15** を 12 時間添加した後、培地交換により化合物を培地中から除去した。そして除去後 0 時間、6 時間後、12 時間後、24 時間後に 4 %パラホルムアルデヒド/PBS で固定した。サリチル酸、化合物 **5**、**15** は 10 mM で添加し、化合物 **8** は 0.1 mM で添加した。これを抗 FLAG 抗体、DAPI を用いて免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡 FV500 で撮影した。

また、この免疫染色を Morphology V4 解析し、Ch3(C)を測定することで細胞内薬剤持続性効果を定量した。無刺激(None)の Ch3(C)の蛍光強度(Avg Intensity (rfu))を 100 %とし、化合物除去後の各時間の Ch3(C)を割合(%)として求めた。

その結果、10 mM のサリチル酸は除去後 6 時間で Ch3 の割合(%)が無刺激(None)のおよそ 80 %まで回復し、細胞内薬剤持続性効果が失われた。これに対して、10 mM の化合物 **5**、**15** は 6 時間後でおよそ 60 %を示し、約 40 %の細胞内薬剤持続性効果がみられた。特に化合物 **8** は、12 時間後でおよそ 50 %の細胞内薬剤持続性効果がみられた。

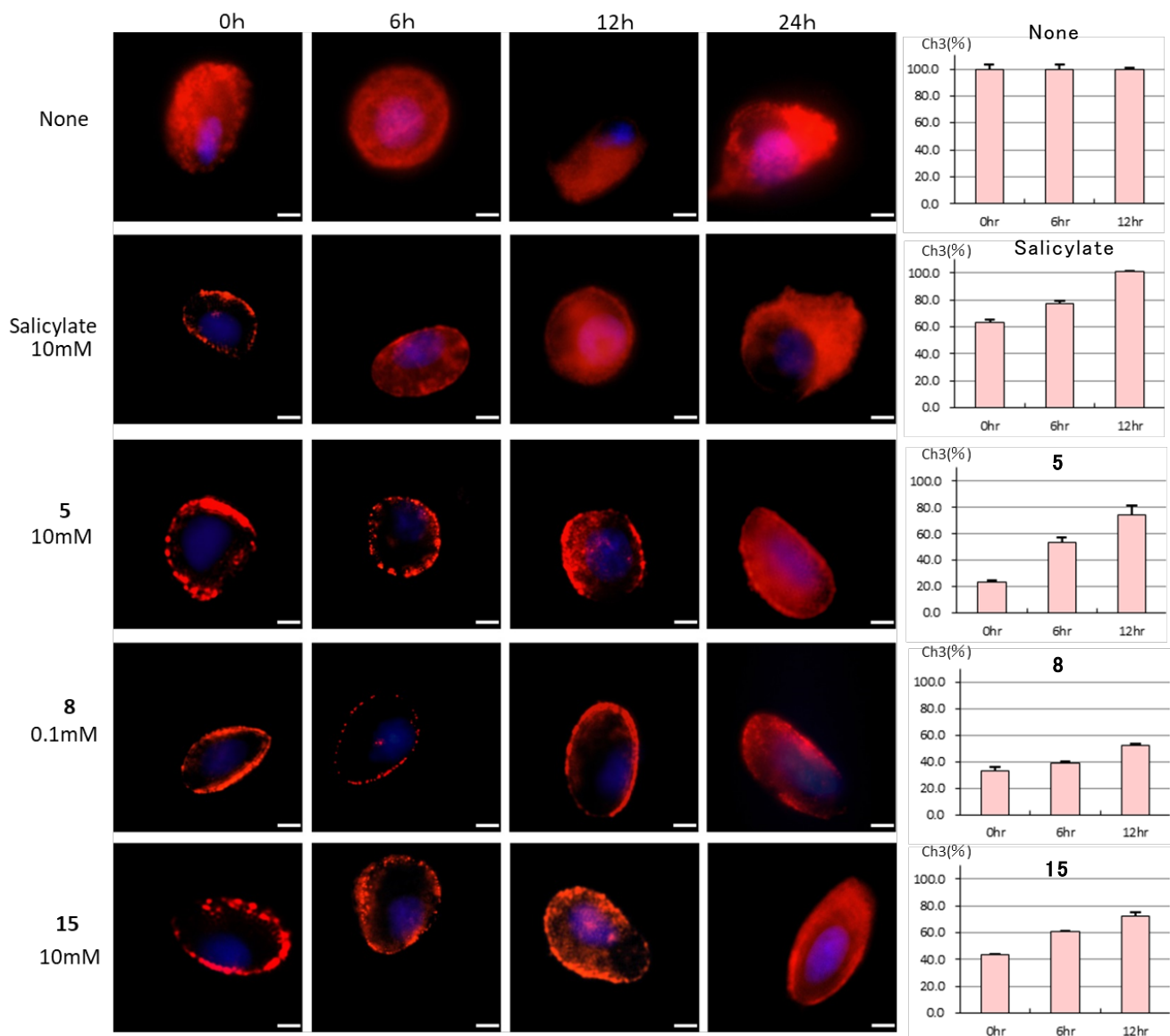


図 4.7 細胞内薬剤持続性効果

PH1-1H1 細胞にサリチル酸(Salicylate)、化合物 5、8、15 を 12 時間添加した後、化合物を培地交換により除去した。そして除去後 0 時間、6 時間、12 時間、24 時間後に 4 %パラホルムアルデヒド/PBS で固定した。サリチル酸、化合物 5、15 は 10 mM で添加し、化合物 8 は 0.1 mM で添加した。これを抗 FLAG 抗体、DAPI を用いて免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡 FV500 で撮影した。

また、この免疫染色を Morphology V4 で解析し、Ch3(C)を測定した。無刺激(None)の Ch3(C)の蛍光強度(Avg Intensity (rfu))を 100 %とし、化合物除去後の各時間の Ch3(C)の割合(%)を求めた。化合物除去後の時間は 0 時間、6 時間、12 時間を評価した。ビークルコントロールは 0.1 % DMSO を使い、この実験は n=3 で行った。(Scale bar = 10 μ m)

4.3.8 化合物の構造活性相関

以上の結果をふまえて、化合物の構造活性相関について考察する。サリチル酸の構造におけるフェノール類のヒドロキシ基は、変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングで活性が示された化合物 **5**、**11**、**14**、**15**、**18**、**20** に共通してみられた。これに対して化合物 **1**、**4**、**7** はサリチル酸と同様のカルボン酸であるが活性はみられなかった。このことから、フェノール類のヒドロキシ基は移行性活性に不可欠であると考えられた。また、サリチル酸、化合物 **5**、**11**、**15** に共通する安息香酸の酸性条件も重要と考えられた。このことから、フェノール類のヒドロキシ基とカルボン酸がともに必要で、官能基の配向性がオルト位であることが重要であると考えられた。またサリチル酸、化合物 **5**、**15** に共通するカルボキシル基は、化合物 **8**、**14** のようにアミノ基またはボロン酸基に置換できる可能性が考えられた。ベンゼン環を持たない化合物 **9**、**10** では活性がみられなかったことから、ベンゼン環は移行活性に必要不可欠であると考えられた。化合物 **8**、**16**、**17** はベンジルアルコールを基本骨格として官能基の配向性がそれぞれオルト位、メタ位、パラ位であるが、オルト位の化合物 **8** のみ高い移行活性を示した。このことから、今後の課題として、ベンジルアルコールを基本骨格とし、オルト位を中心にアミノ基、ヒドロキシ基、ボロン酸基、ニトロ基などを導入した誘導体を合成し、さらに移行活性の高い化合物を得ることが期待できた。

4.4 小括

本章では、Morphology V4 の Ch3(C)を基準に、サリチル酸類縁体の変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングをし、候補化合物の探索を行った。

1. 化合物ライブラリーより 20 種類のサリチル酸類縁体を用いて、Morphology V4 の Ch3(C)を基準とした変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングをした。その結果、Ch3(C)が濃度依存的に減少を示した 6 つの候補化合物 **5**、**8**、**11**、**14**、**15**、**18** を発見した。また 50 % 効果濃度を示す ED₅₀ はサリチル酸が 11.4 mM であるのに対して、化合物 **8** では 0.11 mM であった。この結果から、ED₅₀ に着目した場合、化合物 **8** はサリチル酸に対しておよそ 100 倍活性が高い可能性が示唆された。
2. 6 つの候補化合物 **5**、**8**、**11**、**14**、**15**、**18** について、FluoView™ を用いた細胞膜(M)と細胞質(C)の蛍光強度測定から M/C 比を求めた。その結果、10 mM サリチル酸の M/C 比が 1.0 であるのに対して、化合物 **5**、**11**、**14**、**15**、**18** の M/C 比は 10 mM でおよそ 1.5、化合物 **8** は 0.1 mM で 0.9 となった。この結果から、M/C 比に着目した場合、化合物 **8** はサリチル酸に対しておよそ 100 倍活性が高いことが示された。

3. 3つの候補化合物 **5**、**8**、**15** について、細胞横断蛍光強度の Plot Profile 解析をした。その結果、これらの化合物による濃度依存的な変異型 Pendrin の細胞膜局在を確認し、化合物 **5** は 3 mM、**8** は 0.1 mM、**15** は 10 mM で明確な細胞膜局在がみられた。また化合物 **8** は、さらに低濃度の 0.03 mM においても細胞膜局在を示した。

4. 3つの候補化合物 **5**、**8**、**15** について、細胞内薬剤持続性効果を検討した。10 mM のサリチル酸は除去後 6 時間で細胞内薬剤持続性効果が失われたのに対して、0.1 mM の化合物 **8** は 12 時間後まで効果がおおよそ 50 % 持続した。また、10 mM の化合物 **5**、**15** も 12 時間後まで効果が持続した。

5. 以上の結果から、化合物 **8** ((2-aminophenyl)methanol) はサリチル酸と比較しておおよそ 100 倍高い細胞膜移行活性と、化合物除去後 12 時間の細胞内薬剤持続性を有し、変異型 Pendrin(P123S) の細胞膜移行に有効な化合物であることが示唆された。

4.5 引用文献

[1] Tsukamoto, K.; Suzuki, H.; Harada, D.; Namba, A.; Abe, S.; Usami, S. "Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese", *Eur J Hum Genet* **11**(12): 916-922 (2003).

[2] Kenji, I.; Shuhei, O.; Shun, K.; Koji, I.; Hiroshi, H.; Michio, M.; Toshimitsu, K.; Shinichi, U.; Katsuhisa, I.; Yoichi, H.; Kohei, T.; Hiroyuki, N.; Noriyasu, H.; Hiroshi, W. "Salicylate restores transport function and anion exchanger activity of missense pendrin mutations", *Hear Res* **270**(1-2): 110-118 (2010).

[3] 齊藤ふみ 高浜陽介 「共焦点レーザー顕微鏡を用いた凍結切片の免疫蛍光多重染色解析法」 タンパク質研究のための抗体実験マニュアル 羊土社 24-32 (2004).

[4] 高垣哲也 服部 進 蛍光抗体法 「新染色法のすべて」 医歯薬出版株式会社 208-211 (1999).

第五章 総括

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[1]。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[2]。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[3-5]。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。現在の治療法としては、生後 3~4 ヶ月での補聴器の装着や、その後の人工内耳の装用が効果的とされているが[2]、一方で変異型 Pendrin に直接作用し機能を回復する薬剤は実用化されていない。このことから、*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[6-9]、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[3,10,11]。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まない難聴を示す[1,3,12,13]。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、10 mM において変異型 Pendrin に対しての分子シャペロン活性を示し、HEK293 細胞では変異型 Pendrin を小胞体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[14,15]。

本研究では、サリチル酸による変異型 Pendrin の細胞内局在変化に着目した。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化合物スクリーニング法の開発を行い、サリチル酸類縁体から変異型 Pendrin 移行活性を示す候補化合物の探索を行った。本研究で得られた知見を要約する。

本研究の結論

1. 限界希釈法により、Stable 細胞として変異型 Pendrin(P123S)発現細胞(PH1-1H1)と野生型 Pendrin 発現細胞(Wt)を得た。PH1-1H1 細胞は G-418 Sulfate 存在下で恒常的に変異型 Pendrin を発現し、細胞質に局在を示した。PH1-1H1 細胞はサリチル酸応答性を示し、10 mM サリチル酸を 12 時間加えることで、変異型 Pendrin は細胞膜に局在変化した。また Wt 細胞は、G-418 Sulfate 存在下で恒常的に野生型 Pendrin を発現し、細胞膜に局在を示した。
2. Stable 細胞として PH1-1H1 細胞を樹立したことにより、化合物の活性評価において、1)細胞播種、2)遺伝子導入、3)化合物添加、4)免疫染色、5)細胞内局在変化の確認、の 1)と 2)の操作を省くことが可能

となり、変異型 Pendrin 移行活性評価による迅速な化合物スクリーニングが可能となった。

3. CellInsight™ による Morphology 解析パラメーターの検討をした。
細胞外周を解析の基準である Ch1 とし、Ch1 より内側 2 pixel から 7 pixel までの 5 pixel 幅を細胞質 Ch3(Cytoplasm:C)としたことで、サリチル酸濃度依存的な Ch3(C)蛍光強度(Avg Intensity (rfu))の減少を検出した。このような化合物濃度依存的 Ch3(C)蛍光強度の減少に着目したことで、変異型 Pendrin の細胞内局在変化が検出できるようになり、96 well 培養プレートを用いた迅速かつ網羅的な、変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングが可能となった。
4. 変異型 Pendrin 移行活性スクリーニングとその後の詳細な解析による候補化合物探索の結果、3つの有効な候補化合物(化合物 5、8、15)を発見した。中でも化合物 8 ((2-aminophenyl)methanol)は ED₅₀ が 0.11 mM で、サリチル酸と比較して細胞膜移行活性が 100 倍高く、細胞内薬剤持続性効果はサリチル酸(6 時間で消失)より長い 12 時間を示した。このことから、化合物 8 は変異型 Pendrin の細胞膜移行に対して効果的な化合物であることが示唆された。
5. 今後の課題として、化合物 8 ((2-aminophenyl)methanol) のベンジルアルコールを基本骨格とし、オルト位を中心にアミノ基、ヒドロキ

シ基、ボロン酸基、ニトロ基などを導入した誘導体を合成することで、さらに細胞膜移行活性の高い化合物を得ることが期待できた。

5.1 引用文献

[1] Morton, CC.; Nance, WE. “Newborn hearing screening: a silent revolution”, *N Engl J Med* **354**(20): 2151-2164 (2006).

[2] 宇佐美 真一 「きこえと遺伝子 難聴の遺伝子診断とその社会的貢献」 改訂第2版 金原出版株式会社 14-15 (2015).

[3] Everett, LA.; Glaser, B.; Beck, JC.; Idol, JR.; Buchs, A.; Heyman, M.; Adawi, F.; Hazani, E.; Nassir, E.; Baxevanis, AD.; Sheffield, VC.; Green, ED. “Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS)”, *Nat Genet* **17**(4): 411-422 (1997).

[4] Abe, S.; Usami, S.; Shinkawa, H. “Three familial cases of hearing loss associated with enlargement of the vestibular aqueduct”, *Ann Otol Rhinol Laryngol* **106**(12): 1063-1069 (1997).

[5] Abe, S.; Usami, S.; Hoover, DM.; Cohn, E.; Shinkawa, H.; Kimberling, WJ. “Fluctuating sensorineural hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct maps to 7q31, the region containing the Pendred gene”, *Am J Med Genet* **82**(4): 322-328 (1999).

[6] Nishio, SY.; Hattori, M.; Moteki, H.; Tsukada, K.; Miyagawa, M.; Naito, T.; Yoshimura, H.; Iwasa, Y.; Mori, K.; Shima, Y.; Sakuma, N.; Usami, S. “Gene expression profiles of the cochlea and vestibular endorgans: localization and function of genes causing deafness”, *Ann Otol Rhinol Laryngol* **124** Suppl 1: 6S-48S (2015).

[7] Everett, LA.; Morsli, H.; Wu, DK.; Green, ED. “Expression pattern of the mouse ortholog of the Pendred’s syndrome gene (PDS) suggests a key role for pendrin in the inner ear”, *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17): 9727-9732 (1999).

[8] Yoshino, T.; Sato, E.; Nakashima, T.; Nagashima, W.; Teranishi, MA.; Nakayama, A.; Mori, N.; Murakami, H.; Funahashi, H.; Imai, T. “The immunohistochemical analysis of pendrin in the mouse inner ear”, *Hear Res* **195**(1-2): 9-16 (2004).

[9] Yoshino, T.; Sato, E.; Nakashima, T.; Teranishi, M.; Yamamoto, H.; Otake, H.; Mizuno, T. “Distribution of pendrin in the organ of Corti of mice observed by electron immunomicroscopy”, *Eur Arch Otorhinolaryngol* **263**(8): 699-704 (2006).

- [10] Scott, DA.; Wang, R.; Kreman, TM.; Sheffield, VC.; Karniski, LP. “The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein”, *Nat Genet* **21**(4): 440-443 (1999).
- [11] Scott, DA.; Karniski, LP. “Human pendrin expressed in *Xenopus laevis* oocytes mediates chloride/formate exchange”, *Am J Physiol Cell Physiol* **278**(1): C207-211 (2000).
- [12] Li, XC.; Everett, LA.; Lalwani, AK.; Desmukh, D.; Friedman, TB.; Green, ED.; Wilcox, ER. “A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness”, *Nat Genet* **18**(3): 215-217 (1998).
- [13] Usami, S.; Abe, S.; Weston, MD.; Shinkawa, H.; Van, Camp, G.; Kimberling, WJ. “Non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS mutations”, *Hum Genet* **104**(2): 188-192 (1999).
- [14] Tsukamoto, K.; Suzuki, H.; Harada, D.; Namba, A.; Abe, S.; Usami, S. “Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese”, *Eur J Hum Genet* **11**(12): 916-922 (2003).

[15] Kenji, I.; Shuhei, O.; Shun, K.; Koji, I.; Hiroshi, H.; Michio, M.; Toshimitsu, K.; Shinichi, U.; Katsuhisa, I.; Yoichi, H.; Kohei, T.; Hiroyuki, N.; Noriyasu, H.; Hiroshi, W. “Salicylate restores transport function and anion exchanger activity of missense pendrin mutations”, *Hear Res* **270**(1-2): 110-118 (2010).

謝辞

本研究の過程において、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜り、本論文をまとめるに際して、親身にご助言と励ましをいただきました、現東京工業大学 中村浩之教授に、心より感謝を申し上げます。

本研究は、学習院大学理学部化学科、中村研究室で中村浩之教授のご指導のもと、およそ8年間行ってきました。チロシンキナーゼ阻害剤に関する研究、プロテアソーム阻害剤に関する研究、チューブリン重合阻害剤に関する研究、そして遺伝性難聴に関する本研究と、様々な創薬研究に携わることができました。これまで自分が学んできた生物学に加えて、薬理学を深く勉強させていただきました。

中村研究室では、潘鉉承助教、佐藤伸一助教、宇野正治博士、立川将士博士、峯岸秀充博士、杉石露佳博士、臼井大晃氏、職員の方々、学生の皆様と共に研究に励むことが何よりも楽しく、充実した研究生生活を過ごすことが出来ました。

本研究を懇切丁寧にご指導して下さいました、東北文化学園大学 和田仁教授、茨城大学 石原研治教授、学習院大学 高島明彦教授、学習院大学 岡本治正教授 に深く感謝申し上げます。