

CellKey™ システムを用いた 新しいGPCRの活性評価系

Novel Functional Assay System of GPCRs by CellKey™ System

北里大学 薬学部 生命薬化学教室 教授 藤井 秀明

Hideaki Fujii, Ph.D. (Professor)

Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Kitasato University

国立がん研究センター研究所がん患者病態生理研究分野 研究員 宮野加奈子、 分野長 上園 保仁

Kanako Miyano, Ph.D. (Researcher), Yasuhito Uezono, MD, Ph.D. (Chief)

Division of Cancer Pathophysiology, National Cancer Center Research Institute

はじめに

近年、医薬開発は化学合成により得られたいわゆる低分子医薬から、抗体医薬などのバイオ医薬にシフトしていると言われている。実際、欧米の製薬企業では以前より、日本の製薬企業においても数年前から、バイオ医薬研究の割合が増加している。現在臨床的に使用されている医薬の約30%は、Gタンパク質共役受容体（以下、GPCR）を標的分子としており^{1,2}、その大部分は低分子医薬が占める。今後その割合は低下するかもしれないが、低分子医薬の開発の必要性が無くなったというわけではなく、医薬開発における重要な一分野であることに変わりはない。

受容体には、GPCR、イオンチャネル型受容体、キナーゼ結合型受容体等の種類があり、GPCRは重要な医薬標的分子の一つである。GPCRを標的とした化合物のスクリーニング法としては、主に受容体結合実験、^[35S]GTPγS結合実験、cAMP評価系、レポーター-ジーンアッセイを利用した細胞内Ca²⁺イメージング法などが用いられてきた。これらの評価法に共通する点は、ラジオアイソトープや蛍光色素等により標識する必要があること、または遺伝子操作等の人為的な操作を加える必要があることである。これに対して、CellKey™システムは標識や人為的操作を加える必要のないラベルフリーセルベースアッセイ系であり、CellKey™システムを用いて評価することで種々の応用が期待できる。本稿では、CellKey™システムを用いた新しい活性評価法について紹介したい。

CellKey™ システムの測定原理

CellKey™ システムはMDS Sciex社により開発され、2005年より欧米で発売、2007年に国内導入された新しい技術で、本邦においては日本モレキュラーデバイス株式会社において取り扱われている。国立がん研究センター研究所がん患者病態生理研究分野では、2010年8月にアカデミアにおいては国立がん循環器病研究センターに次いで2番目にCellKey™ システムを導入した(図1)。



図1 国立がん研究センター研究所がん患者病態生理研究分野に導入されたCellKey™ システム

CellKey™ システムの測定原理の概要は、以下の通りである。CellKey™ システムで用いられる専用プレートのウェル底部には2本の電極が取り付けられており、そのプレート上に細胞を培養し、高周波電流を流す。電流は細胞間および細胞内を通り、結果として電極間に電気抵抗(インピーダンス)が生じる。このインピーダンス変化をシグナルとしてとらえるのが細胞誘電分光法(Cellular Dielectric Spectroscopy)である(図2)。インピー

ダンスは、細胞接着性、細胞形態・体積、細胞間相互作用により変化する。細胞に発現したGPCRに作動薬が結合するとGタンパクが α サブユニットと $\beta\gamma$ サブユニット複合体に分解する。 α サブユニットには G_s 、 G_i 、 G_q などのタイプが存在し、各タイプに対応したシグナル伝達が起こり、そのいずれもが、細胞接着性、細胞形態・体積、細胞間相互作用に影響を及ぼしインピーダンス変化を

引き起こす(図3)。従って、評価化合物を添加することで生じるインピーダンス変化を観測することにより、評価化合物の活性評価が可能となる。更には、インピーダンス変化のパターンを解析することにより、結合しているGタンパクのタイプを知ることも可能である(図4)。

CellKey™ システムは96穴および384穴プレートに対応しており、迅速な化合物スクリーニングも可能である。

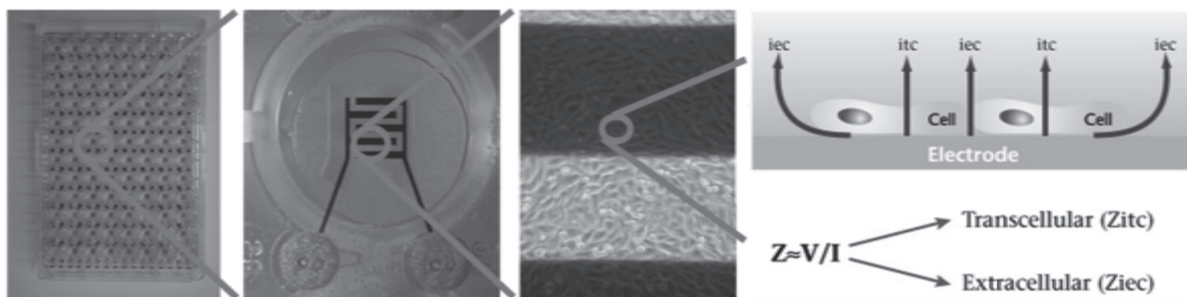


図2 ウェル底部の電極と、細胞間および細胞内を通過した電流 (extracellular current (iec) および transcellular current (itc)) のイメージ図³⁾

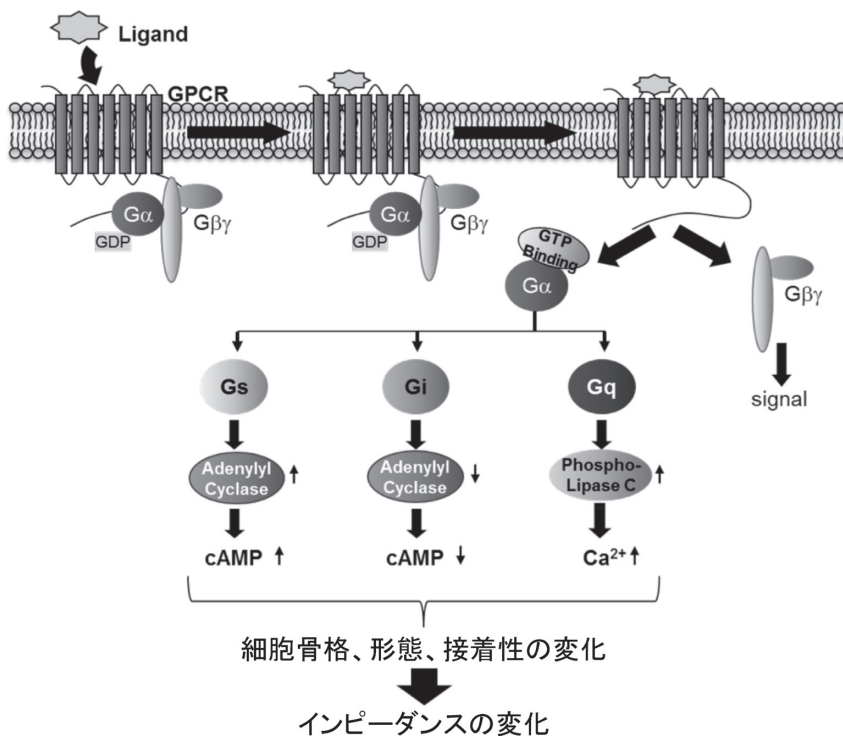


図3 GPCR 下流のシグナルとインピーダンス変化の概念図³⁾

GDP: guanosine diphosphate, GTP: guanosine triphosphate, cAMP: cyclic adenosine monophosphate

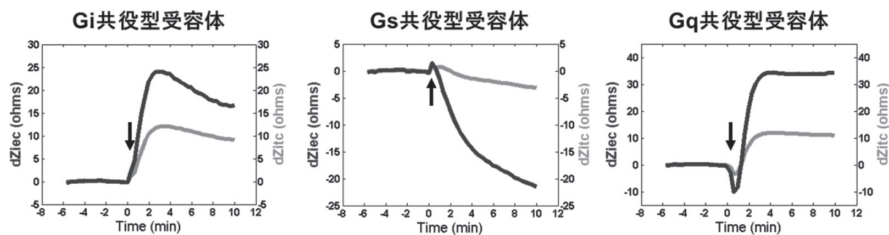


図4 Gタンパクのタイプとインピーダンス変化パターンの違い³⁾

dZiec: the changes in impedance related to extracellular current, dZite: the changes in impedance for transcellular current

GPCRを標的とした化合物評価の例

本項において、 G_s 、 G_i 、および G_q タンパクに結合したGPCRとして各々プロスタグランジンEP4受容体(EP4受容体)、 α_2 アドレナリン受容体(α_2 -AR受容体)、およびヒスタミン H_1 受容体(H_1 受容体)を取り上げ、化合物評価の実例を示す。

EP4受容体は G_s タンパクに結合しており、EP4受容体を発現させたHeLa細胞を用いて検討した。その結果、EP4受容体作動薬であるプロスタグランジンE2(Prostaglandin E2(PGE2), 10 μ M)はインピーダンスの低下を引き起こし(図5A)、PGE2による作動活性は G_s タンパクに特異的な阻害薬であるコレラ毒素(Cholera toxin(CTX), 100nM)によって拮抗された(図5B)。したがって、EP4受容体活性化によるインピーダンスの低下は G_s タンパクを介した作用であることが示唆された。

α_2 -AR受容体は G_i タンパクに結合しており、 α_2 受容体を発現させたHeLa細胞を用いて検討した。その結果、 α_2 受容体作動薬であるUK14,304(100nM)はインピーダンスの上昇を示し(図6A)、 α_2 受容体活性化によるインピーダンスの上昇は G_i タンパクに特異的な阻害薬である百日咳毒素(Pertussis toxin(PTX), 100ng/mL)に

よって拮抗された(図6B)。したがって、 α_2 -AR受容体活性化によるインピーダンスの上昇は G_i タンパクを介した作用であることが示唆された。

H_1 受容体は G_q タンパクに結合しており、 H_1 受容体を発現させたHeLa細胞を用いて検討した。その結果、 H_1 受容体作動薬であるヒスタミン(Histamine, 10 μ M)は一過的なインピーダンスの低下とそれに続くインピーダンスの上昇を示した(図7A)。ヒスタミンによる一過的なインピーダンス低下は、細胞内カルシウムキレーターBAPTA-AM(10 μ M)により抑制された(図7B)。一方、持続的なインピーダンスの上昇はプロテインキナーゼC(Protein kinase C, PKC)阻害剤Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA, 100nM)により抑制された(図7C)。したがって、ヒスタミンによる H_1 受容体活性化による一過的なインピーダンスの低下は細胞内カルシウム濃度の上昇が関与しており、それに続くインピーダンスの上昇はPKCを介した作用であることが示唆された。

このように、 G_s 、 G_i 、および G_q いずれのGタンパクに結合したGPCRにおいても、CellKey™ システムを用いた化合物評価は可能である。ここで気になるのが、CellKey™ システムを用いた評価結果と従来の方法により評価された活性評価結果との相関性である。これに

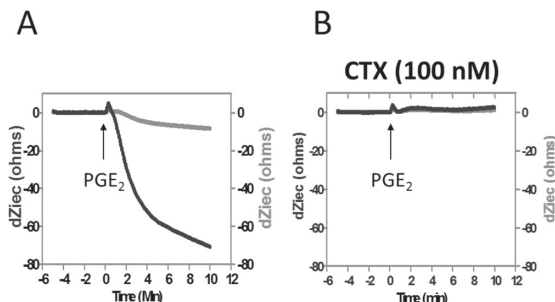


図5 EP4受容体における化合物評価³⁾
EP4受容体発現HeLa細胞をProstaglandin E2(PGE2, 10 μ M)で刺激しCellKey™システムを用いてインピーダンスの変化を測定した(A)。(B) Cholera toxin(CTX, 100nM)は18時間前処置した。

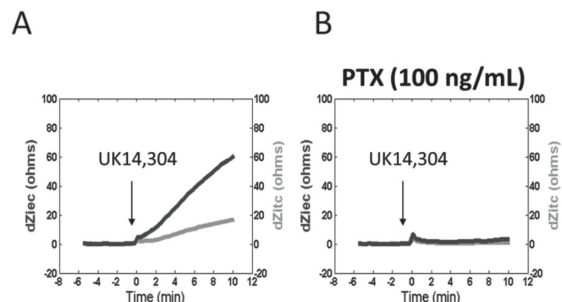


図6 α_2 -受容体における化合物評価³⁾
 α_2 -受容体発現HeLa細胞をUK14,304(100nM)で刺激しCellKey™システムを用いてインピーダンスの変化を測定した(A)。(B) Pertussis toxin(PTX, 100ng/mL)は18時間前処置した。

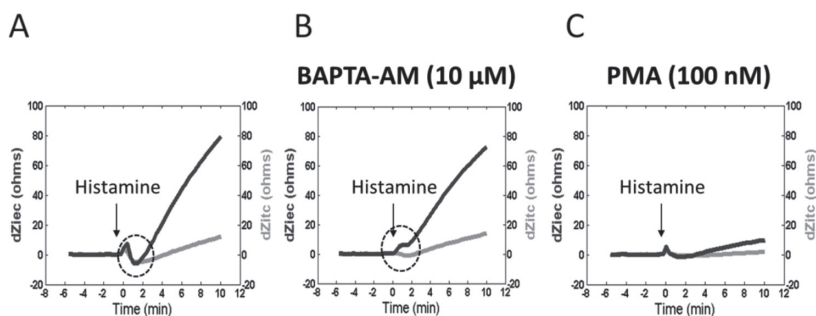


図7 H_1 受容体における化合物評価³⁾
 H_1 受容体発現HeLa細胞をHistamine(10 μ M)で刺激しCellKey™システムを用いてインピーダンスの変化を測定した(A)。BAPTA-AM(B)は30分間、phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA, C)は18時間前処置した。

については、PetersらがドパミンD₂受容体において検討している⁴⁾。また、我々もオピオイド受容体において検討し発表している⁵⁾。それらによると、評価系により得られる結果の絶対値は異なり、異なる評価系から得られる結果を直接比較することはできないが、各々の評価系から得られる化合物の活性プロファイルの傾向はほぼ一致しており、化合物の構造活性相関研究においては有用であると考えられる。

ここではどのタイプのGタンパクと結合しているかが既知である受容体を用いた評価例を示したが、図4に示した電気抵抗変化のパターンおよび本項で示した実例から、結合しているGタンパクのタイプが未知であるGPCRに対しても活性評価が可能であり、かつ結合しているGタンパクのタイプを推定できることがご理解いただけると思う。

その他の化合物評価の例

CellKey™ システムはGPCRを標的とした化合物評価だけでなく、キナーゼに結合した受容体やイオンチャネルを標的とした化合物の評価に用いることも可能である。

上皮成長因子(epidermal growth factor(EGF))受容体はチロシンキナーゼに結合した受容体である。EGFはインピーダンスの上昇を示し(図8A)、EGF(1pg/mL)によるインピーダンスの上昇はEGF受容体チロシンキナーゼ阻害薬であるAG1478(1μM)、ならびにphosphoinositide 3-kinase(PI3K)阻害薬 wortmannin(25μM)により抑制された(図8B, C)。したがって、EGFによるEGF受容体活性化によるインピーダンス変化にはEGF受容体のリン酸化とPI3Kが関与することが示唆された。

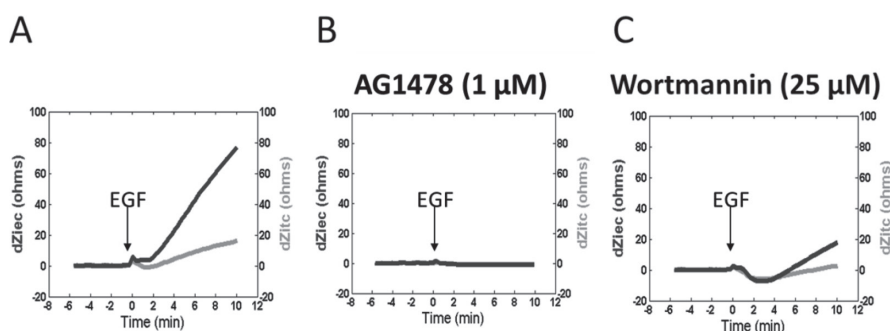


図8 EGF受容体における化合物評価³⁾
EGF受容体発現HeLa細胞をEGF(1pg/mL)で刺激しCellKey™システムを用いてインピーダンスの変化を測定した(A)。AG1478(B)とWortmannin(C)はそれぞれ30分間前処置し、EGFにて刺激した。

表1 CellKey™システムにて測定可能な受容体・イオンチャネル³⁾

GPCR			Cytokine receptor	TKR	Ion channels	Other
Chemokine receptor						
Prostanoid	Serotonin	CXCR3	IL-1	EGF	GABA	FcεRI
Calcitonin	α-adrenergic	CXCR4	IL-2	IGF-1	TRP	Integrins
Adenosine A _{2B}	β-adrenergic	CCR1	IL-3	FGF		
Bradykinin	Dopamine	CCR4	IL-6	HGF		
Endothelin	Muscarinic M	CCR5	TNFRSF1	PDGF		
VPAC ₁	Tachykinin	CCR2	TNFRSF2	NGF		
PAF	Cannabinoid	CCR3				
Histamine H ₁	mGLUR	D6				
Apelin	GABA	US28				
P2Y	Bombesin	DARC				
Cholecystokin	Orexin	ECRF3				
MCHR1	Oxytocin	KSHV				
CGRP1	Urotensin					
CGRP2	EDGE					

おわりに

CellKey™ システムは、GPCRだけではなくGPCR以外の受容体やイオンチャネルを標的とした化合物評価にも利用可能である(表1)。また、具体例は示さなかったが、迅速評価が可能であるため、受容体の安定発現細胞を作製する際の細胞株選定も効率的に行うことが可能である。

ラベルフリーアッセイシステムというCellKey™ システムの特徴は、単純に操作の簡便化を意味するだけではなく、標識化合物による影響などを考慮する必要がないことと考えられる。化合物の受容体結合実験の結果と活性評価の結果を同等に扱うことはできないが、 $[^3\text{H}]$ 標識化合物を用いる受容体結合実験は、評価に用いる $[^3\text{H}]$ 標識化合物により得られる結果が大きく影響されるようである。実際、TRK-820とU69,593はいずれも κ オピオイド受容体(KOR)作動薬であるが、 $[^3\text{H}]$ TRK-820および $[^3\text{H}]$ U69,593を用いた実験において、 $[^3\text{H}]$ TRK-820および $[^3\text{H}]$ U69,593の K_d 値や B_{\max} 値は大きく異なっ

た(表2)⁶⁾。本稿において紹介した化合物評価は比較的簡単な例であったが、生体由来の細胞でも発現細胞のいずれでもラベルフリーで評価が可能、人為的な操作を加える必要がないといった特徴を利用すれば、CellKey™ システムにより評価できる範囲はさらに拡大するものと期待できる。例えば、受容体の二量体(ダイマー)または/および多量体(オリゴマー)に関する評価に利用できるのではないかと考え、現在検討を進めている。以前は、受容体は単体(モノマー)として発現し機能していると考えられてきたが、約10数年の間に、受容体はダイマーまたはオリゴマーとしても存在し、かつ生体内で機能していることを示す報告が相次いでいる⁷⁻⁹⁾。しかし、受容体ダイマーおよびオリゴマーに対する評価系が確立されていないのが現状である。更には、漢方薬による薬理作用の作用機序解明にも利用可能と考えている。

CellKey™ システムは開発されて10年程度の新しい評価システムである。評価者の工夫により、まだまだ可能性が広がるシステムであると期待している。

表2 モルモット小脳における $[^3\text{H}]$ TRK-820および $[^3\text{H}]$ U69,593を用いた受容体結合実験

	$[^3\text{H}]$ TRK-820 ^a	$[^3\text{H}]$ U69,593
K_d	0.46 nM ^b	1.17 nM
B_{\max}	284 fmol/mg protein ^b	83.7 fmol/mg protein

^a TRK-820は $[^3\text{H}]$ TRK-820の結合を完全に置換したが、U69,593は約80%しか置換しなかった。

^b DAMGO(μ 作動薬、100nM)およびDPDPE(δ 作動薬、200 nM)存在下における $[^3\text{H}]$ TRK-820の K_d 値および B_{\max} 値は、非存在下の値と同等であった($K_d=0.51\text{nM}$, $B_{\max}=265\text{fmol/mg protein}$)。

参考文献

- Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006, 5(12), 993-996.
- Jacoby, E.; Bouhelal, R.; Gerspacher, M.; Seuwen, K. *ChemMedChem* 2006, 1(8), 761-782.
- Molecular Devices社 CellKey™ システム紹介資料.
- Peters, M. F.; Knappenberger, K. S.; Wilkins, D.; Sygowski, L. A.; Lazor, L. A.; Liu, J.; Scott, C. W. *J. Biomol. Screen.* 2007, 12(3), 312-319.
- Fujii, H.; Hayashida, K.; Saito, A.; Yokoyama, A.; Hirayama, S.; Iwai, T.; Nakata, E.; Nemoto, T.; Sudo, Y.; Uezono, Y.; Yamada, M.; Nagase, H. *ACS Med. Chem. Lett.* 2014, 5(4) 368-372.
- Fujii, H.; Hirayama, S.; Nagase, H. "Opioid Kappa Receptor Selective Agonist TRK-820 (Nalfurafine Hydrochloride)". *Pharmacology*. Ed. by Gallelli, L. InTech, 2012, 81-98.
- Milligan, G. *Mol. Pharmacol.* 2004, 66(1), 1-7.
- Prinster, S. C.; Hague, C.; Hall, R. A. *Pharmacol. Rev.* 2005, 57(3), 289-298.
- Rozenfeld, R.; Gomes, I.; Devi, L. A. "Opioid Receptor Dimerization". *The Opiate Receptors*. 2nd ed., Ed. by Pasternak, G. W. Humana Press, 2010, 407-437.