

博士学位論文

肝組織模倣精密共培養系と大腸菌巨大スフェロプラスト系を用いた  
薬剤アッセイ系の新規構築

2016

菊池鏡子

国立研究開発法人 産業技術総合研究所  
製造技術研究部門 機能造形研究グループ



|        |                                    |    |
|--------|------------------------------------|----|
| 3-3-6. | LC-MS/MS                           | 24 |
| 3-3-7. | 統計処理                               | 24 |
| 4.     | 結果と考察                              | 25 |
| 4-1.   | 段階的細胞パターンニング技術による                  |    |
|        | 肝組織模倣精密共培養系の構築                     | 25 |
| 4-1-1. | 背景                                 | 25 |
| 4-1-2. | 複数細胞での段階的パターンニング                   | 26 |
| 4-1-3. | HepG2 スフェロイドと Balb/3T3 の           |    |
|        | パターン共培養系                           | 27 |
| 4-1-4. | 他の培養系の形状と増殖                        | 28 |
| 4-1-5. | 肝臓特異的遺伝子の発現                        | 29 |
| 4-1-6. | スフェロイドの直径と CYP3A4 発現               | 33 |
| 4-2.   | 大腸菌巨大スフェロプラストと自動パッチクランプ装置          |    |
|        | によるイオンチャネル新規アッセイ系の構築               | 35 |
| 4-2-1. | 背景                                 | 35 |
| 4-2-2. | スフェロプラストの形状                        | 38 |
| 4-2-3. | 粒径によるスフェロプラストの選別                   | 39 |
| 4-2-4. | Kv2.1 電流の記録                        | 39 |
| 4-2-5. | TEA と 4-AP による Kv2.1 電流の阻害         | 41 |
| 4-2-6. | 自動パッチクランプで使用するサンプルは                |    |
|        | 密度と均一性が重要である                       | 44 |
| 4-2-7. | パッチクランプは微量な膜タンパクを検出する              | 45 |
| 4-2-8. | 安定したイオンチャネルアッセイが                   |    |
|        | 大腸菌スフェロプラストで達成された                  | 45 |
| 4-2-9. | 大腸菌スフェロプラストの利点                     | 45 |
| 4-3.   | クモ毒由来 Inhibitor Cystine Knot の分解耐性 | 47 |



## 1. 論文要旨

医薬品の上市後の回収は研究開発に要した人的・資金的被害が甚大であり、その回避の為には、創薬プロセス初期での薬剤リードの活性と安全性の正確な評価が必要である。現在、薬剤の初期スクリーニングは主に株化細胞での *in vitro* 試験により行われているが、*in vitro* と *in vivo* 試験の相関は必ずしも良くない。本研究では、最初に光応答性細胞培養基材を用いた段階的細胞パターンニングでヒト肝細胞株 HepG2 とマウス線維芽細胞株 Balb/3T3 による肝スフェロイド共培養系を構築し、20日間培養後、肝臓特異的遺伝子3種類の発現をリアルタイムPCRで測定した。CYP3A4の発現には HepG2 と Balb/3T3 細胞の共培養が重要であり、CYP1A2の発現にはスフェロイドとしての形状が重要であることが推察された。また、アルブミンの発現は20日目では HepG2 スフェロイド共培養系は発現の上昇を見せるが、従来の HepG2 細胞単独培養では発現量が急激に低下した。これらの事から、HepG2 スフェロイドと Balb/3T3 細胞のパターン共培養系が薬物代謝の研究に有用であることが期待される。

薬剤アッセイ技術の中には高速化が困難なものが存在し、高価なパッチクランプ装置と熟練したオペレーターが必要であるイオンチャネル解析はその代表であった。誰でも容易に使用可能で安価なイオンチャネルスクリーニング系の構築の為、本研究では容易に培養できる大腸菌の内膜にヒト Kv2.1(電位依存性カリウムチャネル)を発現させ作製した巨大スフェロプラストを自動パッチクランプで測定するアッセイ系を構築した。ヒト Kv2.1 は  $K^+$ チャンネル阻害剤であるテトラエチルアンモニウム (TEA) と 4-アミノピリジン (4-AP) に濃度依存的に阻害され、薬剤投与と洗浄を60分にわたって繰り返した継時的レコーディングにも耐え、大腸菌スフェロプラストがイオンチャネルのスクリーニングに使用可能なことを示した。

今日、イオンチャネル創薬も含め医薬品リードの主流は低分子化合物だが、標的選択制が低く汎用的ではない。一方、クモ毒由来 Inhibitor Cystine Knot (ICK)は様々なイオンチャネルの選択的阻害剤である事から新薬のリードとして期待されているが、長年、生体内安定性に乏しく経口薬には不向きと思われていた。そこでクモ毒由来の ICK である ProTx-I, ProTx-II, GTx1-15, GsMTx-4 それぞれに対して、ペプシン, トリプシン, キモトリプシン, エラスターゼによる *in vitro* での分解反応を調べたところ、これら4種類のペプチドはペプシンに対して耐性があり、特に、ProTx-II, GTx1-15, GsMTx-4 の3種類はテストした全てのプロテアーゼに対して耐性があった。また、*ex vivo* 条件下、ProTx-II はラット血清中で24時間分解されず、ラットを用いた *in vivo* 実験では、ProTx-II 血中濃度は40分間で半減した。これよりクモ毒由来 ICK が高いプロテアーゼ分解耐性と血中安定性を持ち、ペプチドが有望な薬剤リードと成り得ることを示唆した。

本研究により、肝臓組織模倣培養 *in vitro* アッセイ系は生体反応に近い評価が可能であり、大腸菌巨大スフェロプラストの利用によってイオンチャネルの簡便なスクリーニング系が構築された。また、クモ毒由来 ICK の *in vivo* 有用性が示された。

## 2. 緒言

1990年代、米国食品医薬品局（FDA）の承認を受けた抗ヒスタミン薬・テルフェナジン等が心室頻脈（Torsades de pointes, TdP）に関連があるとされ、複数の医薬品が市場から回収された。過去40年間で、アメリカ国内の承認薬で市場から回収された医薬品95品の19%が心臓の安全性に関わるもので、うち12%は催不整脈作用によるものであった(Piccini *et al*, 2009)。このように医薬品が発売後に回収となると大きな公衆衛生上の問題に発展し、研究開発に要した膨大な資金・労力・時間的ダメージは計り知れない。このような事態を回避する為には、創薬プロセス初期の段階で医薬品候補化合物の活性と安全性を正確に評価することが重要である。現在、新薬の開発過程で、リード化合物の初期スクリーニングは主に株化細胞による *in vitro* 試験によって行われている。しかし、*in vitro* 試験で良好な結果が出た候補化合物が *in vivo* でも期待されるような活性を発揮するとは限らない。プラズマ処理で表面加工された組織培養用プラスチック上での培養では細胞は単層で接着・増殖し、これらの細胞は *in vivo* 時の形態を維持出来ず、遺伝子発現プロファイルが変化してしまうことが原因の一つとして考えられる。解決策として、細胞をコラーゲンゲル・生分解性ポリマー等を使用して三次元構造を再構築する手法も開発されているが、この方法だと使用する細胞外基質（ECM）からのシグナルによってインテグリン等の接着分子に連なる一連の遺伝子発現プロファイルが元の組織の状態から変化してしまう可能性がある (Breslin and O'Driscoll, 2013)。

この *in vitro* と *in vivo* の薬剤アッセイ結果のギャップを埋める解決策の一つとして、本研究では細胞の生理的環境がスフェロイド共培養系の構築で再現可能であることを示した。スフェロイドは三次元的に細胞自身が産生する ECM により細胞

が密に集合した凝集塊である。この培養系では、細胞-細胞間・細胞-ECM 間の相互作用が生体に近くなる為、従来の二次元単層培養による細胞と比較すると、その細胞が本来保持している特異的な機能を長期間にわたって維持可能であることが知られている。その為、近年では、スフェロイドは薬剤開発・再生医療研究において、毒性試験・薬理活性評価・機能解析の為のツールとして注目されるようになった。現在、スフェロイドの形成方法としては、ハンギングドロップ、回転培養、低接着表面 U 底プレート、マトリックスゲル、ECM プリント等が利用されている。これらの手法で作成されるスフェロイド培養系は単一細胞によるものであるが、本研究では更に正確な生体組織の模倣を目指し、光応答ポリマーと照射系による段階的パターンニングを使用し、スフェロイド周辺に他種の細胞を配置したスフェロイド共培養系を構築した。

医薬品アッセイ技術の中には、技術的に高速化が困難なものが存在し、イオンチャンネルのスクリーニングはその代表であった。近年、FLIPR アッセイ等の膜電位の測定手法も精度が向上してきたとはいえ、パッチクランプの高い分解能は他のイオンチャンネル解析手法の追随を許さない。2000 年代に入るとオートパッチクランプシステムが発売されるようになり、細胞ベースアッセイの高速化のプラットフォームが整備されつつあるが、Neher と Sakmann (1976)によるパッチクランプの開発以来、イオンチャンネル解析はマニュアルで行われてきた。従来の電気生理学的解析には、高価なパッチクランプ装置と熟練したオペレーターが必要であるが故、イオンチャンネルの研究は中々進まず、高速化が困難であった。緒言冒頭で言及した TdP は後の調査で hERG チャンネルの阻害によって発生することが判明し、対策として非臨床ガイドライン(ICH S7B)と臨床ガイドライン (ICH E14) が作成され、以来、心毒性で市場から回収される新薬はなくなった。現在、ICH S7B/E14 の改定案として議論されている Comprehensive *in vitro* Proarrhythmia Assay (CiPA) initiative では、hERG

だけでなく、複数の心臓イオンチャネルのスクリーニングによる薬物の催不整脈リスク評価が必須とされ、hERG, KvLQT1/KCNE1, Kv4.3, Kir2.1, Cav1.2, Nav1.5 の阻害を調査することを提案している。CiPA の主導機関の一つである FDA は 2016 年からこの構想を施行することから、大手製薬会社はマルチチャネルのプラットフォームを整備し、イオンチャネルスクリーニング高速化へ備えている。

イオンチャネル創薬の世界的動向は、マルチチャネル機種による高速アッセイになりつつあるが、このような体制のイオンチャネルスクリーニングは小規模な研究室や中小企業には敷居が高い。高価なランニングコストと実験の難易度に加え、パッチクランプに使用するサンプルは培養自体に費用がかさむ哺乳類細胞であることが多いので、イオンチャネル創薬研究自体に参入できない研究者が多い。しかし、研究の裾野を広げることで何かしらのブレイクスルーが生じる可能性もある。そこで本研究では、安価で容易に培養できる大腸菌に真核生物のイオンチャネルを発現させ、それを巨大スフェロプラスト化したものを自動パッチクランプで測定するアッセイ系を確立した。本稿では安定的に大腸菌巨大スフェロプラストでパッチクランプを行う方法と、阻害剤を用いた薬物動態試験の様子を述べる。

現在、イオンチャネル創薬も含め、医薬品リードの主流は低分子化合物であるが、低分子化合物はタンパク標的との接触面が小さい為、選択性が低く副作用が出る可能性が高い (Hayashi *et al*, 2010)。近年、副作用の少ない抗体医薬が進歩したが、タンパク医薬品は細胞膜を透過することは出来ない。タンパク間相互作用 (Protein-Protein Interaction, PPI) は、細胞内においても多くの重要な情報伝達経路に関与しているが、これを阻害・模倣することは現時点の技術では困難で、PPI を含めて制御可能な汎用性のある手法は未だ確立されていない。イオンチャネルに関連する疾患は多いものの、イオンチャネルには内在性のリガンドを持たないものが多い為、薬剤設

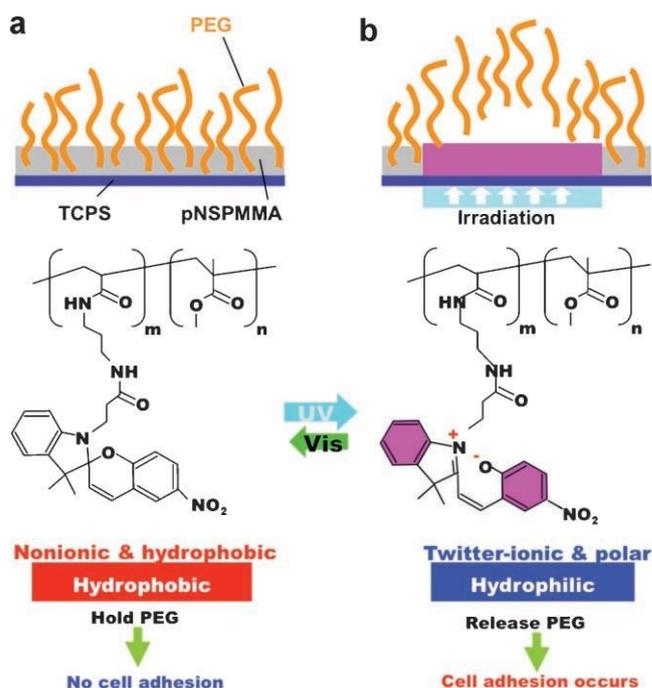
計が困難である。それに加え、パッチクランプの難易度から基礎研究自体が遅れ、イオンチャネルを標的とする医薬品はまだ数少ない。低分子化合物がほぼ探索し尽くされて、低分子での有効なリード発見に限界が見えてきた一方、クモ・サソリ・ヘビ等の生物毒からはイオンチャネルを強力かつ選択的に阻害するペプチドが分離されており、その生理活性の医薬品への応用が期待されている。今までペプチドは生体安定性に乏しく、医薬品には不向きな印象が持たれていたが、毒物研究者の間では生物毒由来のペプチドは酵素や熱に対して安定であることが経験的に知られていた。中でもシスチンノットペプチドは安定性が高いとされていた。本研究ではクモ毒由来シスチンノットペプチドのプロテアーゼ分解耐性と血中安定性について調査し、ペプチドの創薬リードとしての可能性を述べる。

### 3. 方法と材料

#### 3-1. 精密共培養系の構築

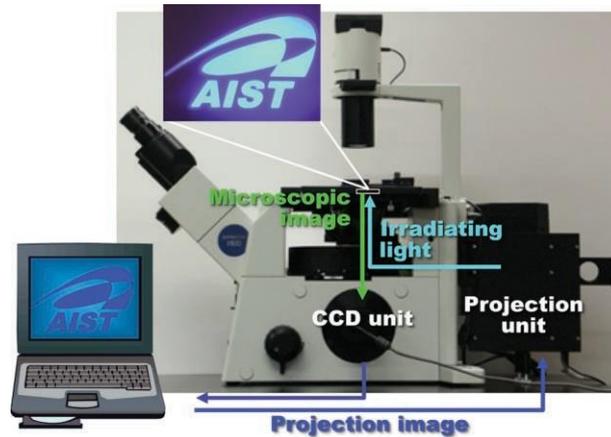
##### 3-1-1. 接着細胞操作システム

光応答細胞培養表面 (Photo Responsive Culture Surface, PRCS) 上に任意のパターンを  $\mu\text{m}$  スケールで刻む為に, PRCS とマイクロパターン照射システムから構成される細胞接着操作装置が構築された. PRCS は波長 365 nm の UV 照射で, クロモフォアであるポリニトロスピロピランメチルメタクリレート (pNSpMMA) の異性化により親水性から疎水性に変化する (Edahiro *et al.*, 2005; Tada *et al.*, 2006). PRCS は細胞接着阻害するポリエチレングリコール (PEG) を光応答ポリマーである pNSpMMA を介して担持し, 細胞接着の加減は PEG の密度と光照射強度によって調節することができる (Figure 1). PRCS の作成過程では, 先ずメチルメタクリレートとニトロスピロベンゾピラン (NSP) 残基を有するメタクリルアミドの共重合体をラジカル重合で作成する. この共重合体の分子量は 58,000, ポリマー中の NSP ユニットの含有率は 0.78 mol% であり, 共重合体は 1,2-ジクロロエタンで 0.2 % に調整された. 同様に PEG もスピンコートのために 1,2-ジクロロエタンに溶かれた. 3 種類の細胞による段階的細胞パターンニングに使用された PRCS の PEG 分子量は 2,000,000 (和光純薬工業, 大阪), PEG の量は 4 % (w/w) で, 肝細胞スフェロイドの作成に使用された PEG の分子量は 40,000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), PEG の量は 9 % (w/w) であった. PRCS は  $\phi$  35mm 細胞培養ディッシュ上にスピンコートされ, 光照射の際には 1ml の水もしくは血清不含の培養液を満たし, 細胞接着を阻害する PEG の除去を行った.



**Figure 1.** (a)光応答培養表面(PRCS)の組成. ポリエチレングリコール(PEG)がPRCSの細胞接着阻害に使用されている. PEGは光応答ポリマーであるポリニトロスピロピランメチルメタクリレート(pNSpMMA)を介してポリスチレン組織培養ディッシュ表面に固定化されている. UV照射前, pNSpMMAは疎水性でPEGを担持しているため細胞は接着することが出来ない. (b)ディッシュに極性の液体(水, PBS, 培養液等)を満たしてUV照射すると, クロモフォアの異性化によりpNSpMMAは親水性に変化しPEGが液体に放出される. pNSpMMAは直ちに疎水性に戻るため, PEGのなくなった表面に細胞が接着可能になる.

CASxP100 マイクロパターン光照射装置はサイトニクス社(松本市, 長野)により開発された(Figure 2). この装置はPCから送られたマスクイメージをIX-71位相差顕微鏡(オリンパス, 東京)の光学系を介して細胞培養ディッシュの底に投影し, PRCSの加工を行う. 実験に使用される照射パターンは, 実験前にマイクロソフト・ウィンドウズのビットマップ形式で保存しておく.



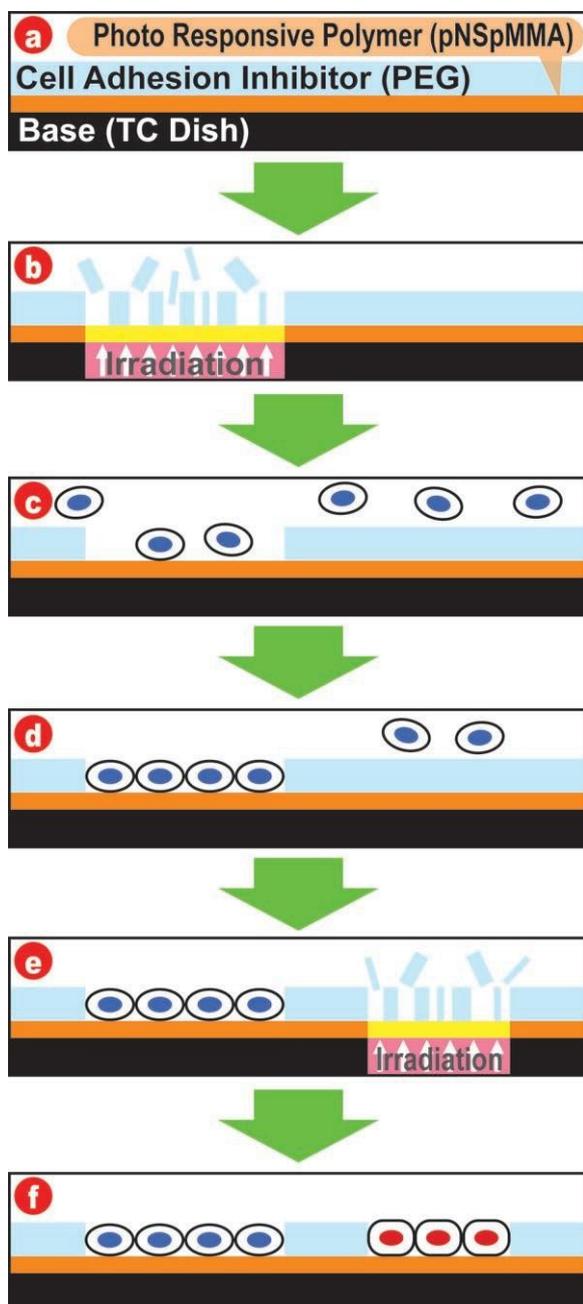
**Figure 2.** “マスク・フリー”照射装置の構成. 照射装置は位相差顕微鏡, 投影ユニット, CCDカメラとPCで構成されている. このシステムでは物理的フォトマスクを使用せず, 照射パターンをPCで編集, それを投影ユニットに送り, 顕微鏡のレンズを通してディッシュの底面に投影することでPRCSにパターンを刻むことが出来る. 照準合わせと実際の照射の様子はPCのモニターで見ることが出来る.

### 3-1-2. 細胞と細胞のラベリング

CHO-K1 (チャイニーズハムスター卵巣細胞), MDCK (Madin-Darby イヌ腎臓細胞), Balb/3T3 (マウス線維芽細胞), HepG2 (ヒト肝癌由来細胞) は理研バイオリソースセンター (つくば市, 茨城県) から購入された. これらの株化細胞は 100 mm 細胞培養ディッシュで, 10 %ウシ血清 (Gibco BRL, Rockville, MD), 100 U/ml ペニシリン, 100 mg ストレプトマイシン, グルタミンを添加された Eagle's MEM (Sigma) を使用し, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> で培養された. CHO-K1 の培養液には Ham's F12 (Sigma) を使用した. 実験の際には, これらの細胞は 0.25 %トリプシン/0.53 mM EDTA (Gibco) を使用して剥離された.

3 段階細胞パターンニングには, 第 1 のパターンの細胞・CHO-K1 は

CellTracker Red CMTPX (Invitrogen, Carlsbad, CA) , 第2の 패턴の細胞・MDCKは CellTracker Green CMFDA (Invitrogen)で染色され, 第3の 패턴のMDCKは無着色のまま使用された. 肝組織模倣共培養系の構築の視覚化には, HepG2は Vybrant Cell Labeling System (Invitrogen)の DiI で赤に, Balb/3T3は DiO で緑に, メーカーの取扱説明書に従って染め分けられた.



**Figure 3.** 段階的細胞パターニングのスキーム. (a)PRCSがポリスチレン細胞培養ディッシュに固定された状態. (b)UV照射で細胞接着を阻害しているPEGが表面から外れる. (c)一番目のパターンを細胞を播種する. (d)阻害剤が外れた表面に細胞が移動して接着する. (e)最初のパターンを細胞が埋め尽くした後, 二番目のパターンを照射し接着阻害を解除する. (f)二番目のパターンを細胞を播種する. (a)から(f)までのステップを繰り返して順次, 細胞を配置する.

### 3-1-3. 複数細胞による細胞パターンニング

段階的パターンニングのプロセスは Figure 3 に示した。UV 照射前には PRCS が塗布されたディッシュに 1 ml の MilliQ 水が入れられ、第 1 のパターンの  $\phi 50 \mu\text{m}$  のドットパターンを光密度  $150 \text{ mW/cm}^2$  で照射し、照射後、水はアスピレーターで取り除かれた。照射後のディッシュは PRCS から解放された PEG と未重合のポリマーを除去する為、3 回洗浄された。そこに 1 ml の完全培地が加えられ、 $8.0 \times 10^5$  個の赤にラベルされた CHO-K1 が播種された。細胞は  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$  のインキュベーター内で、細胞がパターンを埋め尽くすまで 2 時間培養された。その時点で未接着の細胞は取り除かれ、2 ml の完全培地を入れ、接着した細胞が十分パターン上に伸展するまでインキュベーターで培養された (Figure 4a)。

第 2 のパターンの照射前には、完全培地は 1 ml の無血清培地に入れ替えられ、前述した条件で六角形のパターンを照射した。照射後のディッシュは 3 回、無血清培地で洗浄され、 $5.0 \times 10^5$  個の緑にラベルされた MDCK が播種された。培養系は前述の通り、MDCK がパターン上に接着後、未接着の細胞を取り除き、完全にパターン上に伸展するのを待った (Figure 4b)。第 3 のパターンは未染色の MDCK を使用し、前述の通り培養を行った (Figure 4c)。このパターン共培養系の観察は、レーザー共焦点顕微鏡システム・FluoView 300 (オリンパス)によって行った。

### 3-1-4. HepG2 スフェロイドと Balb/3T3 のパターン共培養系

HepG2 の接着領域は基本的に前セクションで記述した通りであるが、HepG2 のスフェロイド形成には 3 段階パターンニングより長い時間がかかる為、構築手順には改変が必要となった。スフェロイドの成長を待つ過程で HepG2 の培養期間

が長くなると PRCS 表面への ECM 沈着が多くなり、PRCS から PEG の解放が阻害され、次のパターンニングが困難となった。HepG2 の細胞接着は Balb/3T3 より弱かった為、PRCS の接着阻害は HepG2 の接着阻害は十分行えるが、2 番目に導入される Balb/3T3 の接着には支障が無い程度に調整し、解決した。

最初のパターンの形成には、 $\phi 220 \mu\text{m}$  のドットパターンを  $150 \text{ mW/cm}^2$  で照射し、洗浄後に  $8.0 \times 10^5$  個の HepG2 を播種した。未接着の細胞の除去後、細胞は  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  で 3 日間、スフェロイドが形成されるまで培養された。次いで、HepG2 により分泌された ECM が蓄積されたスフェロイド周辺の表面に  $3.0 \times 10^5$  個の Balb/3T3 を播種し、このスフェロイド共培養系は 3 週間培養された (Figure 5d)。共培養系は 5 日毎に定量 PCR 用にサンプリングされた。

更に、スフェロイドの直径が 100, 150, 200, 300  $\mu\text{m}$  の共培養系を作成、同様に培養され、スフェロイド系のサイズが細胞の機能に及ぼす影響について調べた。

### 3-1-5. 比較に作成された他の培養系

細胞パターンニングと共培養の利点を示す為、HepG2 と Balb/3T3 のランダム共培養、HepG2 スフェロイドのみ、HepG2 単独培養、Balb/3T3 単独培養が比較に用意された。いずれの培養系も  $\phi 35\text{mm}$  細胞培養ディッシュに準備され、培地交換は 1 日おきに行った。HepG2 と Balb/3T3 のランダム共培養には  $8.0 \times 10^5$  個の HepG2 が播種され、3 日後に  $3.0 \times 10^5$  個の Balb/3T3 を追加した。HepG2 スフェロイドのみの系は Balb/3T3 の追加無しで作られた。HepG2 単独培養には  $8.0 \times 10^5$  個が播種され、Balb/3T3 単独培養には  $3.0 \times 10^5$  個が播種された。これらの培養系は共培養開始日から 3 週間培養され、5 日毎に定量 PCR 用にサンプリングされた。

### 3-1-6. パターン共培養系の評価

パターン共培養の評価は肝臓特異的遺伝子・CYP3A4 (GeneBank Accession # NM\_017460), CYP1A2 (NM\_000761), アルブミン (NM\_000477)の mRNA 発現量で評価された. トータル RNA は ISOGEN (日本ジーン, 東京都)で抽出され, フェーストストランドの合成は PrimeScript RT Reagent Kit (タカラバイオ, 大津, 滋賀県)で行った. 定量 PCR は CycleavePCR Core Kit (タカラバイオ) とサーマルサイクラー・ダイス TP800 (タカラバイオ)で行った. プライマーとプローブの配列は Table 1 に記載された通り. 本研究では, PCR プライマーとプローブはヒトの RNA のみ検出するよう設計されており, マウスの RNA が混在したサンプルでも HepG2 由来の mRNA のみ検出する. 遺伝子発現量はグリセルアルデヒド-3-フォスフェイトデハイドロゲナーゼ (GAPDH, NM\_002046)で標準化した.

Table 1. Primers and probes

---

|        |   |  |
|--------|---|--|
| GAPDH  | Fwd: 5 <sup>0</sup> -accgtcaaggctgagaac-3 <sup>0</sup>          | Rev: 5 <sup>0</sup> -tggtgaagacgccagt-3 <sup>0</sup>     |
|        | P: 5 <sup>0</sup> (Eclipse)-tcctcaa(a)at(FAM)-3 <sup>0</sup>    |  |
| ALB    | Fwd: 5 <sup>0</sup> -atgagatgcctgctgacttg-3 <sup>0</sup>        | Rev: 5 <sup>0</sup> -gcacgacagagtaatcagga-3 <sup>0</sup> |
|        | P: 5 <sup>0</sup> (Eclipse)-aa(g)gatgttgcaa(FAM)-3 <sup>0</sup> |  |
| CYP1A2 | Fwd: 5 <sup>0</sup> -ttcatcctggagaccttc-3 <sup>0</sup>          | Rev: 5 <sup>0</sup> -gtagaagccattcagcgttg-3 <sup>0</sup> |
|        | P: 5 <sup>0</sup> (Eclipse)-gaaggcaa(g)aa                       |  |
| CYP3A4 | Fwd: 5 <sup>0</sup> -agtcgcctcgaagatacaca-3 <sup>0</sup>        | Rev: 5 <sup>0</sup> -cgagctccagatcggaca-3 <sup>0</sup>   |
|        | P: 5 <sup>0</sup> (Eclipse)-agtcccaca(a)gc(FAM)-3 <sup>0</sup>  |  |

---

### 3-1-7. 統計処理

定量 PCR のデータは 4 個の独立した培養系サンプルの平均±標準偏差で示した. One-way ANOVA with Tukey HSD テストは Kaleida graph (Ver. 3.6.4. Japanese, Synergy Software, Inc., Reading, PA) で行い, 危険率 1% で有意検定を行った.

## 3-2. 大腸菌巨大スフェロプラストの作成と電気生理

### 3-2-1. 大腸菌と薬品類

大腸菌巨大スフェロプラストの作成には Overnight Express C43 (DE3) SOLOs chemically competent cells (Lucigen, Wisconsin) を使用した. LB ブロス (Sigma, Missouri, USA) と テリフィックブロス (Fluka, Missouri) は製造者の説明書に従って準備した. Ready-Lyse Lysozyme (Epicentre, Chicago) と OmniCleave Endonuclease (Epicentre) はハンドリングを容易にする為, 付属の希釈液で 1/5 に希釈した. D(+)-グルコース 1M Tris-HCl, pH8.0, アンピシリン, セファレキシン, IPTG, テトラエチルアンモニウム (TEA) は和光純薬工業 (大阪, 日本) から購入した. アンピシリン, セファレキシン, IPTG は 50 mg/ml, 10 mg/ml, 1 M に調整された. 4-アミノピリジン(4-AP) と ニフルミック酸(NFA) は Sigma から購入した.

### 3-2-2. 発現ベクターとトランスフォーメーション

ヒト Kv2.1 の人工遺伝子は原核生物コドンを用いて合成され (オペロンバイオテクノロジー, 東京都), pET23a ベクター (Novagen, Massachusetts) の BamHI サイトに In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech, California) で挿入された. 形質転換

された Stellar Competent Cells (Clontech)は LB/Amp プレートに接種され、コロニーPCR でインサートを確認した。形質転換されたコロニーは 100 ml LB/Amp で培養され、プラスミド抽出は Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden)で低コピー・プロトコールを用いて行った。次いでこのプラスミドで Overnight Express C43 (DE3) SOLOs chemically competent cells が形質転換され、LB/Amp プレートに接種された。

### 3-2-3. ウェスタン・ブロッティング

ヒト Kv2.1 を発現した C43 のシングル・コロニーは 100 ml の Overnight Express Instant TB medium (Novagen)に接種され、37 °C で 4 時間、30 °C で一晩、200 rpm で振盪培養された。インサート無しの pET ベクターで形質転換した C43 はコントロールに使用された。カルチャーは 3000 G で 5 分遠心し、ペレットを回収した。次いでペレットから ReadyPrep Protein Extraction Kit (Bio-Rad Laboratories, CA)を使用して膜タンパクを分離した。変性したサンプルは SuperSepAce 7.5 % ゲル (和光純薬工業)を使用し、SDS-PAGE で 200 V で 1 時間分離した。タンパクは Trans-Blot Turbo Blotting System (Bio-Rad Laboratorie) で 0.2  $\mu$ m PVDF メンブレンに転写され、0.5 % Block Ace (DS ファーマバイオメディカル, 大阪府)で一晩ブロッキングされた。メンブレンは、SNAP i.d. (Merck Millipore)を用いて 1 次抗体 (His-probe (G-18) Rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, TX)と 2 次抗体 (Anti-Rabbit IgG heavy and light chain HRP conjugated, Bethyl Laboratories, TX)と結合させ、ImmunoStar LD (和光純薬工業)と室温で 1 分反応させ、C-DiGit Blot scanner (LI-COR Biosciences, NE)でバンドを検出した。

### 3-2-4. スフェロプラストの作成

*E. coli* スフェロプラストはこれらの文献を元に酵素消化で作成された (Berrier *et al.*, 1996; Buechner, *et al.*, 1990; Cui *et al.*, 1995; Martinac *et al.*, 1987). シングルコロニーは 2 ml LB/Amp で 37 °C, 220 rpm で一晩, 振盪培養された. 200  $\mu$ l の前培養液は 20 ml の TB に希釈され, 20  $\mu$ l の 50 mg/ml アンピシリンを加え, 培養した. O.D.<sub>600</sub> が 0.12 に達した時, セファレキシンを最終濃度 60  $\mu$ g/ml で加え, 大腸菌が長さ 100  $\mu$ m 以上の “スネーク” 状に伸びるまで約 2.5 時間培養を続けた. K<sub>v</sub>2.1 の誘導は, 培養の最後に 1 mM IPTG を添加し, 20 分で行った. “スネーク” は, 2 ml 遠心管に 2 ml の培養液を取り, 1000 G, 3 分の遠心で回収した. ペレットは 500  $\mu$ l の 1 M グルコースで懸濁し, 以下の試薬を手早く入れ, その都度, チューブを 5-6 回, 転倒混合した: 30  $\mu$ l 1 M Tris-HCl, pH8.0, 2  $\mu$ l (5760 U) の希釈されたリゾチーム, 2  $\mu$ l (80U) の希釈されたエンドヌクレアーゼ, 6  $\mu$ l 125 mM EDTA, pH8.0. 全部の試薬を混ぜたら, 室温で 10 分インキュベートし, 最後に 100  $\mu$ l の停止液 (10 mM Tris-HCl, pH8.0, 0.7 M スクロース, 20 mM MgCl<sub>2</sub>) を入れ, 消化を止めた.

電気生理実験当日, 冷凍されたスフェロプラストのチューブを氷上で解凍し, 40  $\mu$ m, 20  $\mu$ m の順にナイロンメッシュ (共進理工, 東京都) で大きな夾雑物を取り除いた. フィルターされたスフェロプラストは希釈液 (1 M グルコース, 100 mM Tris-HCl, pH8.0) で 10 倍に希釈, 15 ml のシリンジに装填し, シリンジポンプ (YMC キーボードケミストリー, 京都) にマウントし, スパイラル・ソーター (microfluidic ChipShop, Jena) で流速 0.5 ml/min で粒径を選別した. 4 番目のアウトレットに選別されたスフェロプラストは 700 G, 3 分でペレットにし, 50  $\mu$ l の希釈液で懸濁した.

### 3-2-5. 電気生理

*E.coli* スフェロプラストの whole cell パッチクランプ記録は Port-a-Patch (Nanion, Munchen) で NPC-1 ボロシリケートガラスチップ (抵抗: 10-15 M $\Omega$ ) を使用して行った. 実験は室温 (22-27 °C) で行った. 実験に使用した Nanion 推奨の外液・内液の組成は次の通りである:

内液: 50 mM KCl, 10 mM NaCl, 60 mM KF, 20 mM EGTA, 10 mM Hepes, KOH, pH7.2.

外液: 400 mM sucrose, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM (experimental) or 5 mM (sealing) CaCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, 10 mM Hepes, NaOH, pH7.4.

実験時の外液には 10  $\mu$ M ニフルミック酸 (NFA) を添加して, Cl<sup>-</sup>電流によるコンタミネーションを防止した. Kv2.1 電流の阻害実験には, TEA (100 mM, 300 mM) と 4-AP (1 mM, 10 mM) が外液に使用された.

スフェロプラストの捕捉には, 2 mM Ca<sup>2+</sup>の外液で満たしたウェルに, スフェロプラスト懸濁液 5  $\mu$ l を入れ, スフェロプラストが開口部に捕捉されるのを待った. 矩形波でホールセルが確認出来たら, 外液を 5 mM Ca<sup>2+</sup>に置き換え, ギガシール達成したら外液を再び 2 mM Ca<sup>2+</sup>へ戻し, 数分間, 膜の状態が落ち着くのを待って測定を開始した. 記録中に電流が不安定, もしくは 2 mM Ca<sup>2+</sup>へ戻しても電流がベースラインに戻らないスフェロプラストは, ランダウンが起きているものとして排除した.

K<sup>+</sup>チャネル電流は EPC-10 USB Patch Clamp Amplifier (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH) で記録され, データの取得と解析は Patch Master (HEKA

Electronik)で行った。Kv2.1 と内在性 K<sup>+</sup>チャンネル電流の測定は、holding potential -80 mV, duration 500 msec, 20 mV increment で-60 mV から 60 mV のボルテージ・ステップで行われた。

Kv2.1 電流の阻害実験には TEA と 4-AP が使用された。継時的レコーディングは、holding potential -80 mV, duration 500 msec, 20 msec 間隔で 40 mV のパルスで、パッチの状態が続く限り、最大 60 分間打ち続け計測した。捕捉したスフェロプラストが whole cell 状態になってからパッチの状態が落ち着いたところで、2 mM Ca<sup>2+</sup>外液での最初の 4 分間 (12 ポイント) の計測をコントロール電流とした。次にウェル内を TEA もしくは 4-AP が添加された 2 mM Ca<sup>2+</sup>外液に灌流装置で入れ替え、4 分間 (12 ポイント) 計測した。1 セットの阻害剤での計測が終わったら、直ちに 2 mM Ca<sup>2+</sup>外液でウェル内を洗浄した。

### 3-2-6. 統計処理

TEA と 4-AP による Kv2.1 電流の変動の分析には、継時的レコーディングの各計測セクションの最初と最後の計測ポイントを除外し、中間の 10 ポイントでの電流値を計算に使用した。電流は、阻害剤添加直前のウォッシュアウト 10 ポイントの平均で標準化した。極端な値は Smirnov-Kramer test で除外した。統計は Tukey-Kramer test によって危険率 5% で有意検定を行った。結果は平均±SEM で表示した。

## 3-3. クモ毒由来ペプチドの分解と生体内安定性

### 3-3-1. ペプチド・酵素・科学薬品類

ヒトプロラクチン放出ホルモン (hPRP), ProTx-I, ProTx-II, GsMTx-4 は Peptide Institute, Inc. (大阪府)から購入した。GTx1-15 は Alamone Labs (Jerusalem)から入手した。ペプシン, エラスターゼ, グリシン, 塩酸, Tris-HCl は 和光純薬(大阪府)から購入した。トリプシンは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO),  $\alpha$ -キモトリプシンは Tokyo Kasei 東京化成 (東京都)から購入した。全部の酵素とペプチドは Milli Q 水に溶かし, 100 ng/ $\mu$ l に調整した。1 M 溶液にしたグリシンは 5 M HCl で pH2.0 に調整し, 1 M Tris-HCl (pH8.0)は 500 mM に希釈した。

### 3-3-2. 酵素によるペプチド分解

ProTx-I, ProTx-II, GsMTx-4, GTx1-15 の 4 種の ICK が, 消化管プロテアーゼでの分解の観察に使用された。hPRP は酵素分解部位が均等に散在している非 ICK サンプルとして使用された。ペプシン・トリプシン・キモトリプシン・エラスターゼの使用量は, 各酵素が同量の BSA を 1 時間以内で完全に分解する量に設定された。胃でのペプチド分解を模す為には, 20  $\mu$ l 1 M グリシン(pH2.0)と 20  $\mu$ l 蒸留水の入った 1.5 ml マイクロチューブ中で, 10  $\mu$ l 100 ng/ $\mu$ l のペプシンと 50  $\mu$ l 100 ng/ $\mu$ l のペプチドを混合した。腸管でのトリプシンによるペプチド分解を模す為には, 10  $\mu$ l 500 mM Tris-HCl (pH8.0)と 30  $\mu$ l 蒸留水の入った 1.5 ml マイクロチューブ中で, 10  $\mu$ l 100 ng/ $\mu$ l のトリプシンと 50  $\mu$ l 100 ng/ $\mu$ l のペプチドを混合した。キモトリプシンによる分解には, 10  $\mu$ l 500 mM Tris-HCl (pH8.0)と 10  $\mu$ l 100 mM CaCl<sub>2</sub> と 20  $\mu$ l 蒸留水の入った 1.5 ml マイクロチューブ中で, 10  $\mu$ l 100 ng/ $\mu$ l のキモトリプシンと 50  $\mu$ l 100 ng/ $\mu$ l のペプチドを混合した。エラスターゼによる分解には, 10  $\mu$ l 500 mM Tris-HCl (pH8.0)と 10  $\mu$ l 100 mM KCl と 20  $\mu$ l 蒸留水の入った 1.5 ml マイクロチューブ中で, 10  $\mu$ l 100 ng/ $\mu$ l のエラスターゼと 50  $\mu$ l 100 ng/ $\mu$ l のペプチドを混合した。

酵素とペプチドの混合物は 37 °C で 1-4 時間インキュベートし，1 時間毎に 10  $\mu$ l を取り分け氷上に静置した．取り分けたサンプルには，すぐ 5  $\mu$ l のトリシンサンプルバッファーを加え，100 °C で 5 分間変性させ，消化を止めた．

### 3-3-3. SDS-PAGE と CBB 染色

変性したサンプルは SuperSep Ace 15-20 % トリシゲル(和光純薬)で SDS-PAGE で 200 V，1 時間で分離された．クーマシー・ブリリアント・ブルー染色は e-Stain 2.0 Protein Staining System と eStain Protein Staining Pad (GenScript, NJ) で行った．イメージスキャナーで検出したバンドは Image Studio Digits (LI-COR Bioscience, NE)で数値化した．

### 3-3-4. ラット血漿での *ex vivo* ProTx-II 分解

ペプチドの *ex vivo* 分解を調べる為，イソフルラン吸入により麻酔された 3 匹の 8 週 SD 系雄性ラットから血液を採取し，1,850 G，8 分間，4 °C での遠心によって血漿が分離された．血漿は氷上に保存され，実験当日中に使用された．ProTx-II は 1  $\mu$ g/ml の濃度で血漿に加えられ，37 °C で 24 時間インキュベートされた．0，2，4，8，24 時間毎に 250  $\mu$ l のサンプルが分取され，分析が行われるまで -25 °C で保存された．

### 3-3-5. *in vivo* でのラット血中からの ProTx-II 排出

ラットの血液循環での *in vivo* ProTx-II 濃度の観察には，3 匹の SD 系雄性ラットが使用され，イソフルランでの麻酔後，大腿静脈に 0.1 mg/ml/kg の ProTx-II

が注射された。注射後、0.083 (5 min), 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 時間で 450  $\mu$ l の血液が尾静脈からヘパリン塩コートされたパスツールピペットで採取された。血漿は 10,000G, 3 分間, 4°Cでの遠心によって分離され, 分析まで-25°Cで保存された。動物実験は(株)ネモト・サイエンス (茨城)によって動物実験倫理委員会のガイドライン (承認番号: 14-0024)と AIST 動物実験委員会の承諾 (承認番号: 10150125) の元, 行われた。

### 3-3-6. LC-MS/MS

血漿 100  $\mu$ l は 50 %メタノール 20  $\mu$ l と 4 %リン酸 200  $\mu$ l と混合され, サンプル全量がメタノール 1 ml と蒸留水 1 ml で平衡化された Oasis HLB 1 cc/10mg extraction cartridge (Waters)に加えられた。カラムは 5 %メタノール 1 ml で洗浄され, メタノール 1 ml で溶出された。溶出液は窒素で風乾後, LC-MS/MS の為, 100  $\mu$ l のソルベント A/B (30 %: 70 %, v/v) に溶かれ, 10  $\mu$ l のサンプルが Waters LC-MS/MS (Xevo TQ MS)ユニットで分析された。LC-MS/MS の条件は, 分析カラムが ACQUITY UPLC BEH HILIC, 1.7  $\mu$ m, 2.1 mm I.D. x 100 mm (Milford, MA), 移動相 A は 0.1 % TFA, 移動相 B はアセトニトリル, 移動相は移動相 A: 移動相 B=30 : 70 (v/v), 流速 0.3 ml/min, 分析時間は 2 分間であった。

### 3-3-7. 統計処理

計測結果は未分解の値に対する分解率に変換した。実験は triplicate で行い, 結果は平均 $\pm$ SEM で示した。統計は Tukey-Kramer test によって危険域 5%で有意検定を行った。

## 4. 結果と考察

### 4-1. 段階的細胞パターンニング技術による肝組織模倣精密共培養系の構築

#### 4-1-1. 背景

過去 30 年、細胞生物学とティッシュ・エンジニアリングは大きな進歩を遂げ (Langer and Peppas, 2003; Langer and Vacanti, 1993), 新規の細胞操作技術が組織再建に利用されている (Yang *et al.*, 2007). 接着細胞を任意の場所に配向する細胞パターンニング技術は, 1990 年代から細胞生物学研究を行う為 (Chen *et al.*, 1997; Dike *et al.*, 1999; Sumaru *et al.*, 2007), 薬学研究の為 (Fukuda *et al.*, 2006; Khetani and Bhatia, 2008)に開発されてきた. 従来の細胞生物学パターンニングには専ら,  $\mu$ -コンタクトプリンティング等が用いられ (Falconet *et al.*, 2006; Nakanishi *et al.*, 2008), パターンニング可能なのは 1 回だけで 1 種類の細胞しか使用出来なかった. これらの手法は現在でも細胞パターンニングの主流であり, 幾何学的制御によって細胞機能の研究に使用されているが, これからの高度な医薬研究の為には, 複数の細胞を適当な時期に配置する技術が必要とされる事が予想される.

本研究に使用するシステムでは, 既にパターン配置されている細胞の周囲に, 光照射によって新たに細胞接着領域を追加し, 別種の細胞を配置する事が可能になった. 段階的細胞パターンニングを行う為, 細胞接着阻害剤を光応答ポリマーを介して固定した光応答培養表面 (PRCS)が開発された. PRCS の細胞接着阻害は光照射によって非接触で無効化される為, 液中でも, 既に細胞が接着している場所の近傍にでも, 新たに細胞接着領域を追加する事が出来る. このシステムは  $\mu\text{m}$  スケールのパターン照射により, 接着細胞の配向の方向も制御可能である.

本研究では, PRCS を使用した段階的細胞パターンニングの 3 回繰り返しに成

功し、この知見を基に HepG2 (ヒト肝細胞株) のスフェロイドと Balb/3T3 (マウス線維芽細胞株) から構成されるパターン共培養系を作製した。肝細胞は現行の 2 次元培養下では急激に代謝機能が低下する事が知られている為 (Hewitt *et al.*, 2007; Langer and Vacanti, 1993), 初代肝細胞は他種の細胞との共培養や (Bhatia *et al.*, 1999) スフェロイド培養の研究 (Fukuda *et al.*, 2006) に使用されている。この研究では、HepG2 スフェロイドと Balb/3T3 のパターン共培養系を作成し、従来の二次元培養の HepG2 と比較し、株化細胞の機能が回復するか実験した。各培養系の評価は肝臓特異的遺伝子であるアルブミン、CYP1A2 と CYP3A4 の mRNA 発現の定量で行った。更にスフェロイドの直径を変更した共培養系も作成し、スフェロイド直径と CYP3A4 の遺伝子発現の関係を調べた。

#### 4-1-2. 複数細胞での段階的パターンニング

本研究では、PRCS とマイクロパターン照射装置の使用で、光による細胞接着領域のエッチングと細胞の導入の 3 回繰り返しに成功した。実験に使用した CHO-K1 と MDCK は照射パターン内に配向された (figure 4)。この共培養系は 3 番目のパターンの完成から 1 日フォーメーションを維持し、2 日後から徐々にパターンの外に増殖して移動していった。本研究は同一表面に 3 回の細胞パターンニングを連続で行った世界初の例である。

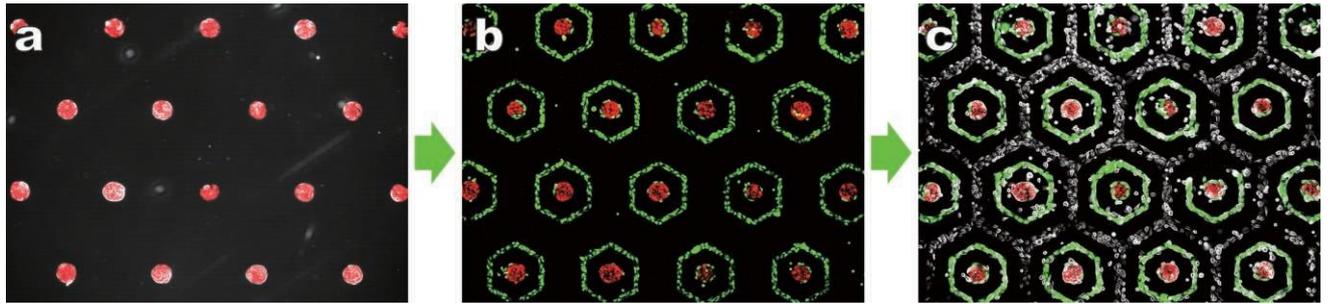
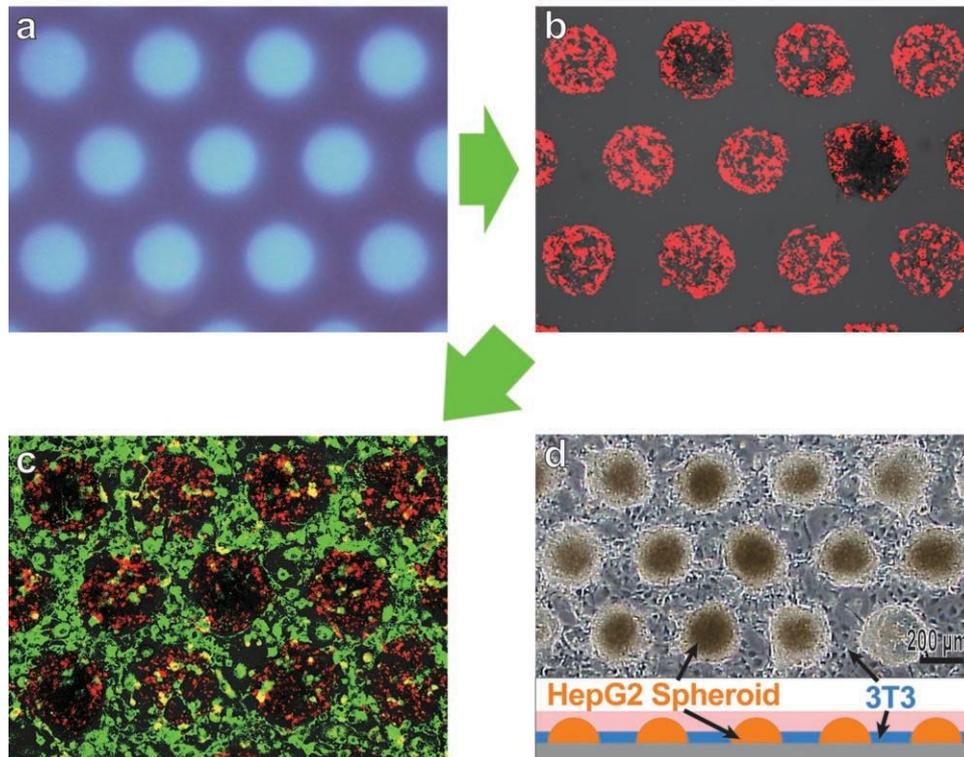


Figure 4. パターン共培養の段階的構築. (a)最初に CMTPX で赤に染色された CHO-K1 でドットパターンを作成する. (b)ドットパターンで配置された CHO-K1 の周囲に六角形のパターンを照射し, CMFDA で緑に染色された MDCK を播種する. (c)さらに大きな六角形パターンを照射し, 無染色の MDCK を播種し, 三番目のパターンを作る.

#### 4-1-3. HepG2 スフェロイドと Balb/3T3 のパターン共培養系

HepG2 がドットパターンを刻まれた PRCS 上に播種されると, 12 時間でパターン内に接着し, PEG の“壁”の中で 3 日かけて均等な半球状のスフェロイドに成長した (Figure 5b). 完成した HepG2 スフェロイド培養系に Balb/3T3 を導入すると, HepG2 が分泌した ECM が蓄積した PRCS 上に接着した (Figure 5c). この HepG2 スフェロイド/3T3 共培養系は, サンプリングで培養を終了した 3 週間目まで元のフォーメーションを維持し続けた. 一方, HepG2 スフェロイドのみの培養系は元のフォーメーションを 2 週間維持したが, それからは細胞がパターン外に進出してスフェロイドの周辺に単層を形成した. HepG2 スフェロイドのみの培養系はシェアストレスに弱く, 手荒に扱くとスフェロイドが剥離したが, 3T3 で周囲を固められた共培養系は強いピペッティングでも剥離しなかった. 接触成長阻害を示す Balb/3T3 は, この様に HepG2 スフェロイドを囲んで支持する理想的な壁として機能した.

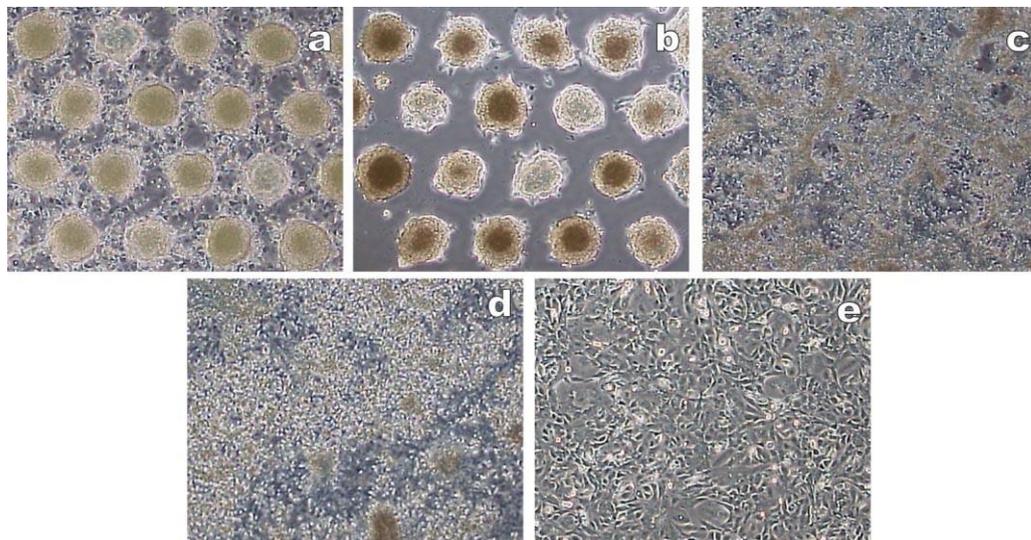


**Figure 5.** HepG2 スフェロイド/3T3 パターン共培養系の構築プロセス。  
**(a)**PRCS 表面にドットパターンを照射して細胞接着領域を作る。**(b)** $5.0 \times 10^5$  cells/ml の HepG2 を播種，一晚，インキュベーター内で静置し，浮いている細胞を取り除く．パターン内に接着した HepG2 を 3 日培養し，半球状に盛り上がるのを待つ。**(c)** $1.0 \times 10^6$  cell/ml の Balb/3T3 を播種し，3 週間培養を続ける。**(d)** パターン共培養開始から 14 日目の位相差イメージ．同サイズの HepG2 スフェロイドの周囲を単層の Balb/3T3 が囲んでいる．この共培養系のスフェロイドの直径は  $220 \mu\text{m}$ ．

#### 4-1-4. 他の培養系の形状と増殖

細胞パターンニングと共培養の効果を調べる為，上記の培養系の他に HepG2 と Balb/3T3 のランダム共培養系，HepG2 単独培養系，Balb/3T3 単独培養系が作成された (Figure 6)．HepG2 単独培養系は 2 日でコンフルエントに達し，不揃いなコロニーを形成しながら 2 週間目まで活発に増殖した (Figure 6d)．それから細胞は，定期的な培地交換をしているにもかかわらず突如死に始め，培養 20 日目には約半分の細

胞が浮遊していた。Balb/3T3 単独培養系は、播種翌日には単層を形成し、培養 20 日目まで特に形質的な変化は見られなかった(Figure 6e)。HepG2 と Balb/3T3 のランダム共培養系では、Balb/3T3 は細胞培養ディッシュの底面に移動し、不定形なスフェロイド状構造をとった HepG2 が Balb/3T3 単層の上に広がった。これらの HepG2 コロニーは次第に繋がっていき、Balb/3T3 の平野の上に山脈状に HepG2 が広がる構造をとった(Figure 6c)。HepG2 単独培養系とは違い、培養終了の 20 日目まで高密度であるにもかかわらず死細胞は観察されなかった。



**Figure 6.** 各培養系の形態。パターン培養と共培養の効果の比較の為に以下の培養系が作成された。これらの写真が撮影されたのは培養開始から 14 日目である。(a) HepG2 スフェロイド/3T3 パターン共培養 (b) HepG2 スフェロイドのみ (c) HepG2/3T3 ランダム共培養 (d) HepG2 単独培養 (e) Balb/3T3 単層培養

#### 4-1-5. 肝臓特異的遺伝子の発現

サンプリング期間終了時、この実験で観察した HepG2 の肝臓特異的遺伝子の発現は、スフェロイドにする、もしくは Balb/3T3 と共培養する事により上昇する

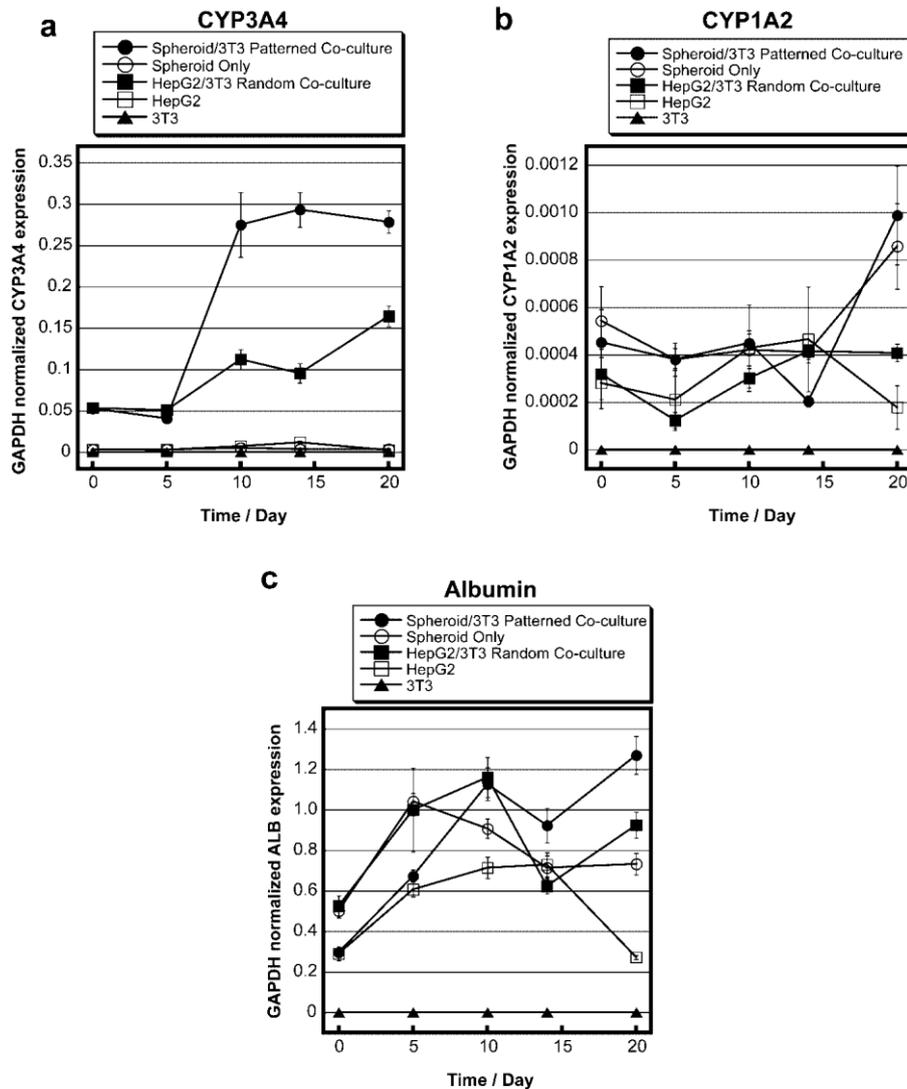
事が判った (Figure 7). CYP3A4 発現(Figure 7a)は, HepG2 スフェロイド/3T3 共培養系とランダム共培養系において他の培養系より優位に上昇し, HepG2 スフェロイド/3T3 共培養系は培養 10 日目以降, ランダム共培養系より常に高いレベルを示した ( $P<0.01$ ). CYP1A2 発現 (Figure 7b)は, HepG2 スフェロイド/3T3 共培養系と HepG2 スフェロイド培養系において, 0, 5, 20 日目に有意な上昇を示し, ランダム共培養系では 20 日目において HepG2 単独培養系より有意に高かった ( $P<0.01$ ). アルブミン発現は (Figure 7c), HepG2 スフェロイド/3T3 共培養系は HepG2 単独培養より培養 5 日目以降いつも高く, HepG2 スフェロイド培養系とランダム共培養系では HepG2 単独培養系より 14 日目以外, 有意に高かった. HepG2 スフェロイド/3T3 共培養系のアルブミン発現は, 培養 20 日目において他の培養系より有意に高く, ランダム共培養系と HepG2 スフェロイド培養系のアルブミン発現は, 培養 20 日目において HepG2 単独培養系より有意に高かった ( $P<0.01$ ). 肝臓の初代細胞の薬物代謝とアルブミン産生機能は, 通常の 2 次元培養条件で培養されると, 急激に下がる事が知られている (Guillouzo, 1998; Hewitt *et al.*, 2007)が, 今回の発見では, 細胞を生体内に模して組織化する事によって, 株化細胞でさえ失われた機能が回復する事が示唆された.

スフェロイドへ組織化, もしくは共培養する事により, HepG2 は 2 つの P450 アイソフォームの発現を上昇させた. パターン共培養とランダム共培養は CYP3A4 発現を強く誘導したが, CYP1A2 は CYP3A4 ほど強く誘導されなかった. 観察期間中, HepG2 スフェロイドのみの培養系の CYP3A4 発現は, ずっと HepG2 単独培養系と同程度に低かったが, 一方, CYP1A2 発現は HepG2 スフェロイドのみの培養系はどの系より実験開始時間から高く, 最終的にはパターン共培養に次ぐランクに落ち着いた. Bhandari *et al.* (2001)によると, 肝細胞の機能は 3T3 コンディショニング培地

単独では 3T3 との共培養より効果的に維持出来なかったと報告されている。Hui と Bhartia (2007)は、肝細胞のフェノタイプの維持には可溶性シグナルへの曝露と 3T3 との直接接触が必要と報告している。CYP1A2 誘導は、肝細胞同士の密な接触が可溶性因子より重要というケースで、CYP3A4 の誘導に関しては繊維芽細胞から供給されるサイトカイン等の可溶性因子の方が主であると推察される。

HepG2 単独培養系の発現は培養 14 日目までゆっくり上昇し、細胞が過剰に増殖すると急激に死に始めた。このアルブミンの恒常的な発現は肝臓特異的遺伝子の基礎的発現について報告した Maruyama *et al.* (2007)の結果と合致する。彼らの報告では、HepG2 のアルブミン mRNA 発現は 20 日目まで目立った変動はないが、本実験も HepG2 の播種した細胞数が彼らの条件と同じ少なめの数であったなら、彼らと同じ結果を得ていたと考えられる。HepG2 単独培養系のアルブミン発現は、細胞が密に凝縮塊を形成していた 14 日目がピークであった。LeCluyse (2001) は、密な培養系の方が密度の低い培養系より CYP3A4 の発現が高いことを報告している。これは E-カドヘリンと Cx-32 の連結に起因し、高密度での培養は細胞骨格のタンパクの発現を変動させ、様々な遺伝子の発現動態に影響を及ぼす事から、単独培養 HepG2 の初期のアルブミンの発現上昇もスフェロイドの形状で発現が増加することも、細胞密度で説明できると考えられる。ランダム共培養系のアルブミン発現は、培養 14 日目以外で高かった。Ito *et al.* (2007)によると、HepG2 と NIH/3T3 の細胞シートが相互に絡んだ状態で高いアルブミンの分泌量が観察されており、当研究のランダム共培養系の状況と似ている。彼らは更に、HepG2 と NIH/3T3 の細胞シートの重層によってアルブミンの分泌量が有意に増加しないと報告している。アルブミンの発現量がランダム共培養系でスフェロイド培養系より高く、HepG2 スフェロイド/3T3 共培養系が一番高いことから、アルブミンの産生を向上させる為には肝細胞の集合状態と共培

養のどちらかだけではなく、肝細胞がある一定のサイズのユニットにまとまって、線維芽細胞にある種の“黄金比”で囲まれている状態で高いパフォーマンスを発揮することを示唆している。



**Figure 7. 肝臓特異的遺伝子発現**

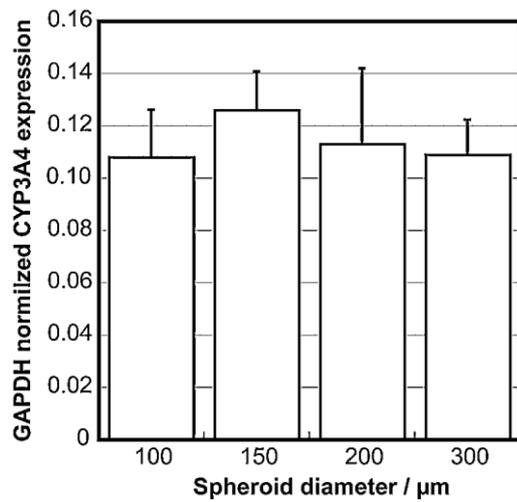
HepG2 スフェロイド/3T3 パターン共培養系、HepG2 スフェロイド培養系、HepG2/3T3 ランダム共培養系、HepG2 のみ、Balb/3T3 のみの培養系における肝臓特異的遺伝子発現。これらの培養系は共培養開始から5日毎、20日までサンプリングした。各遺伝子の mRNA 発現量は GAPDH で標準化した。ネガティブ・コントロールの Balb/3T3 単層培養からの増幅は確認されなかった。エラーバーは SD を表す。\* $P < 0.01$ . (a)CYP3A4 (b)CYP1A2 (c)アルブミン

#### 4-1-6. スフェロイドの直径と CYP3A4 発現

HepG2 の肝細胞としてのパフォーマンスを高める“最適な”スフェロイド径を見つける為、我々は直径 100, 150, 200, 300  $\mu\text{m}$  のスフェロイドと Balb/3T3 の共培養系を 20 日間培養し、定量 PCR で CYP3A4 mRNA を測定した。サンプル採取時には、スフェロイドのサイズは元のサイズより 5 %程度増加した。直径 150  $\mu\text{m}$  のスフェロイド共培養系が 1 番高い CYP3A4 発現を示し (Figure 8), 同じ期間培養された HepG2 単独培養系と比較すると 50 倍高かった。いずれのサイズのスフェロイド共培養系も HepG2 単独培養系と比較して有意に CYP3A4 発現を増加したが、サイズ間での検定では有意差を認める事ができなかった ( $P>0.01$ )。この現象は、前述した様に CYP3A4 のモジュレーターは細胞の物理的接触というよりは、繊維芽細胞由来の培地への可溶性成分である事を支持した結果であると考えられる。この実験で我々が CYP3A4 を選んだ理由は、CYP3A4 が薬物代謝に関わる肝臓に最も多い酵素であり、今日、使用される薬物の約 50%を代謝するからであったが (Shou, 2008), CYP1A2 発現をモニターすればスフェロイドにのサイズとの相関性が示されたかも知れない。

直径が 200  $\mu\text{m}$  以上のスフェロイドは、スフェロイドが大きくなると共に中心部が死滅して黒くなり、直径 300  $\mu\text{m}$  のスフェロイドほぼ全部にこの現象が見られた。Sumaru と Kanamori (2004)による数理的モデルによると、スフェロイド径は酸素分圧による制約で 150  $\mu\text{m}$  に限定されると予想されていた。直径 180  $\mu\text{m}$  以上の HepG2 スフェロイドのコア部分の死滅は Tamura *et al.* (2008)からも報告されている。今回の実験では、細胞は静置培養で培地交換時以外に培養液の動きはなく、この条件では直径 200  $\mu\text{m}$  以上のスフェロイドの中心部への酸素供給が不十分であったと思われる。CYP3A4 での有意差を示す事はできなかったものの、定量 PCR の結果を

見ると、この静的条件で最適な直径は 150  $\mu\text{m}$  から 200  $\mu\text{m}$  の間にあるものと推測される。仮にスフェロイド培養系が、培養液の灌流が行われ、酸素供給が十分な環境に置かれれば、最適サイズは大きい側にシフトすると思われる。



**Figure 8.** スフェロイドの直径と CYP3A4 発現. 100, 150, 200, 300  $\mu\text{m}$  の HepG2 スフェロイドが作成され, Balb/3T3 と 20 日間共培養された. エラーバーは SD を表す.

## 4-2. 大腸菌巨大スフェロプラストと自動パッチクランプ装置による

### イオンチャネル新規アッセイ系の構築

#### 4-2-1. 背景

イオンチャネルは神経伝達や筋収縮等の広範囲の生物現象に重要な役割を果たしている(Dworakowska *et al.*, 2000). 電位依存的 K<sup>+</sup>チャネルは、脳、心臓、腎臓、骨格筋、虹彩、膵臓といった様々な組織で広範囲に発現しており、Kv2.1 は神経伝達物質の放出、心拍、筋収縮、インスリン分泌、細胞のボリュームの制御に関与するので(Shieh *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2010; Misonou *et al.*, 2005; Hölter *et al.*, 2012), 多くの疾患がこのイオンチャネルの誤作動に起因し、Kv2.1 は重要な創薬ターゲットとして認識されている。

Neher と Sakmann (1976)によって開発されたパッチクランプは、イオンチャネル分析の最も鋭敏な手法で、薬物候補の電気生理的特性の解明のゴールド・スタンダードである(Brüggemann *et al.*, 2008; Farre *et al.*, 2009; Yajuan *et al.*, 2012). 従来のパッチクランプは、組織切片・アフリカツメガエル (*Xenopus levis*)の卵母細胞・酵母・株化細胞・脂質二重膜を顕微鏡下で目視しながら手動で行うが、熟練したオペレーターと高価な装置が必要であり、薬剤アッセイのハイスループット化へのボトルネックとなっている(Brüggemann *et al.*, 2008). この状況を解決する為に、過去10年で数種類の自動パッチクランプシステムが開発されている(Yajuan *et al.*, 2012). Nanion 社の Port-a-Patch に代表される自動パッチクランプシステムは、細胞の自動捕捉を行い、実験者の手技を問わず電気生理的観測が行えるようになった(Farre *et al.*, 2009; Yajuan *et al.*, 2012). この新規のシステムを用いれば、例えオペレーター

がパッチクランプ初心者であろうと煩雑な操作無しで高いクオリティのデータが取得可能である。

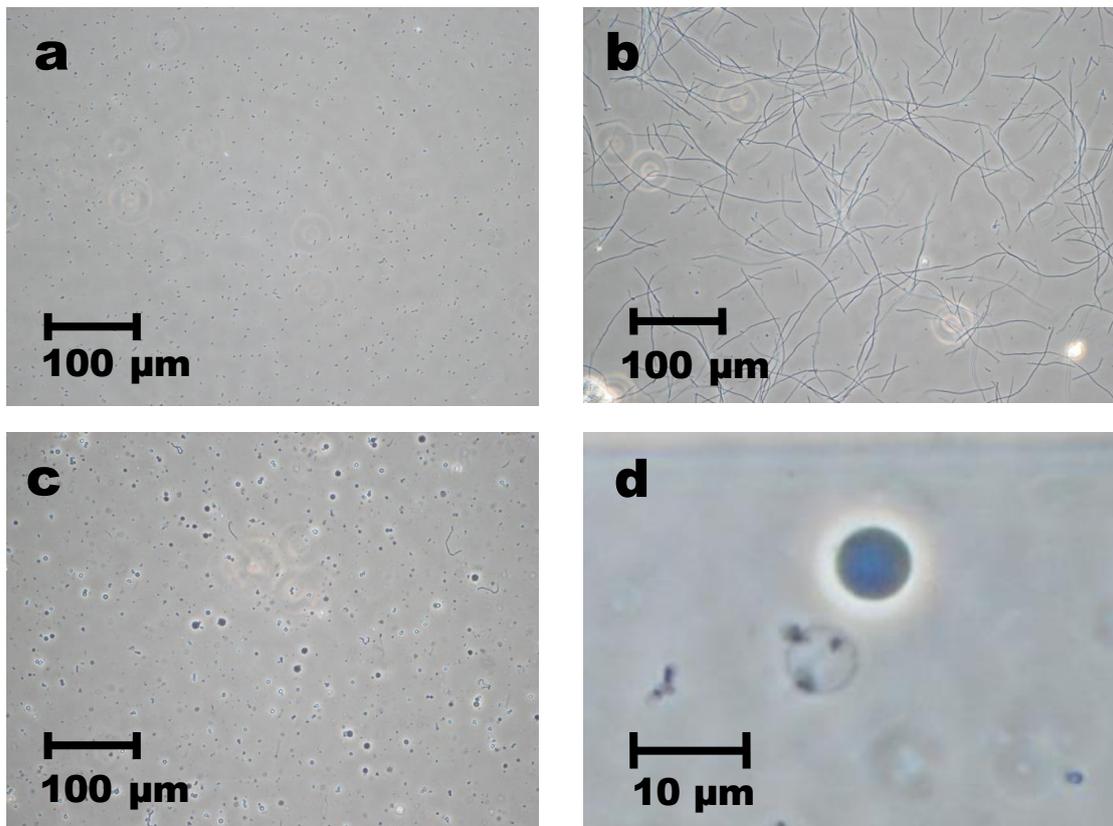
グラム・ネガティブ細菌の *Escherichia coli* は、遺伝的・生化学的に最も集中的に解析された生物であり、*E. coli* の操作に必要な多くの遺伝子操作手法は既に確立され、多数の突然変異体も利用できる状況にある。生理的背景と翻訳後修飾機構の違いにも関わらず、真核生物と原核生物の電位依存性イオンチャネルの配列のマルチプル・アラインメントを行うと、膜貫通ヘリックス内の荷電残基は驚異的に保存されていることが判明した(Santos *et al.*, 2006)。原核生物のイオンチャネルは真核生物のイオンチャネルとほぼ同じ物理的特性を持ち、真核生物のチャネルと同等である(Milkman, 1994; Schrempf *et al.*, 1995)。よって細菌の膜はチャネルの構造の研究に有効なモデルとして通用すると考えられる (Blount *et al.*, 1996)。今まで、*E. coli* は異種組み換えタンパクの生産にしか用いられなかったが、*E. coli* 発現系は *Xenopus* 卵母細胞のような真核生物発現系と同様に異種イオンチャネル研究に使用可能かも知れない。*E. coli* の使用には既存の真核生物発現系には無い幾つかの技術的利点がある。原核生物のチャネルを発現する場合、それらのチャネルの機能は同じ原核生物である *E. coli* 内で真核生物発現系より正確に再現される。加えて、遺伝子コードが共通なので、チャネルの発現と電気生理学的解析が、ひとつのコンストラクトのみで継ぎ目なく行えるので、*Xenopus* 卵母細胞へのインジェクションの為に mRNA を真核生物コードで準備したり、脂質二重膜再構成でのパッチクランプの為に膜タンパクを精製する必要が無い為、多くの時間と手間の節約になる(Kuo *et al.*, 2007)。更に、*E. coli* は原核生物のタンパクだけでなく、真核生物のタンパク発現にも利用出来る。*E. coli* には糖鎖付加のメカニズムは存在せず、真核生物の膜タンパクの発現は時に細菌に対して毒性を生じることがあるものの、*E. coli* は真核生物系からの実現可能な代替

手段である。例えば、導入された異種のターゲットタンパクと干渉する遺伝子をサイレンシングしたノックアウト株を作成すれば、ターゲット膜タンパクの正確な分析が可能である。更に、膜タンパクが真核生物細胞で発現された場合、膜タンパクは細胞膜表面ではなくオルガネラ膜にソートされてしまう可能性があるが、*E. coli* を発現系として選択すれば、膜タンパクは確実に内膜に発現され、パッチクランプには好都合である(Uozumi, 2001)。このような理由から、*E. coli* はイオンチャネル研究をする際の真核生物系に替わる現実的な手段であると言えよう。*E. coli* を使用したパッチクランプを困難にする主な障害といえば、細菌はパッチクランプの電極に対して小さ過ぎる事であり、現時点で実施例の報告も数少ない。細菌の中隔形成を阻害する抗生剤を使用し、“スネーク”と呼ばれる巨大細菌を作成、その外膜の酵素消化によりパッチクランプに十分なサイズの巨大スフェロプラストを作成する手法は Matrinac *et al.* (1987)によって開発され、以来、*E. coli* のイオンチャネルはパッチクランプによって研究されてきた。

巨大細菌スフェロプラストと使用が容易な自動パッチクランプの組み合わせは、膜タンパクの生物物理学的な特性評価を効果的に行い、薬物候補の迅速な一次スクリーニングを実現すると思われる。この研究の目的は、大腸菌巨大スフェロプラストと自動パッチクランプシステムによる、シンプルで鋭敏な薬剤アッセイ手法の確立である。このセクションでは、ヒト  $K_v2.1$  を発現させた *E. coli* を巨大スフェロプラスト化し、自動パッチクランプに適したサンプル調整するプロセス、および実際の薬物アッセイを想定した  $K^+$ チャネル阻害剤による  $K_v2.1$  電流の阻害のデモンストレーションを紹介する。

#### 4-2-2. スフェロプラストの形状

60  $\mu\text{g/ml}$  のセファレキシシン存在下で培養した大腸菌の“スネーク”は 100-150  $\mu\text{m}$  に伸長し (Fig.9a-b), 酵素で外膜を消化すると  $\phi$  1-7  $\mu\text{m}$  のスフェロプラストになった (Fig.9c). このスフェロプラスト集団は, 大きく濃灰色 ( $\phi$  4-7  $\mu\text{m}$ ), 中程度で濃灰色 ( $\phi$  2-4  $\mu\text{m}$ ), 小さく白色 ( $\phi$  2  $\mu\text{m}$  以下), 透明で影のような“ゴースト”の 4 種類に大別された.



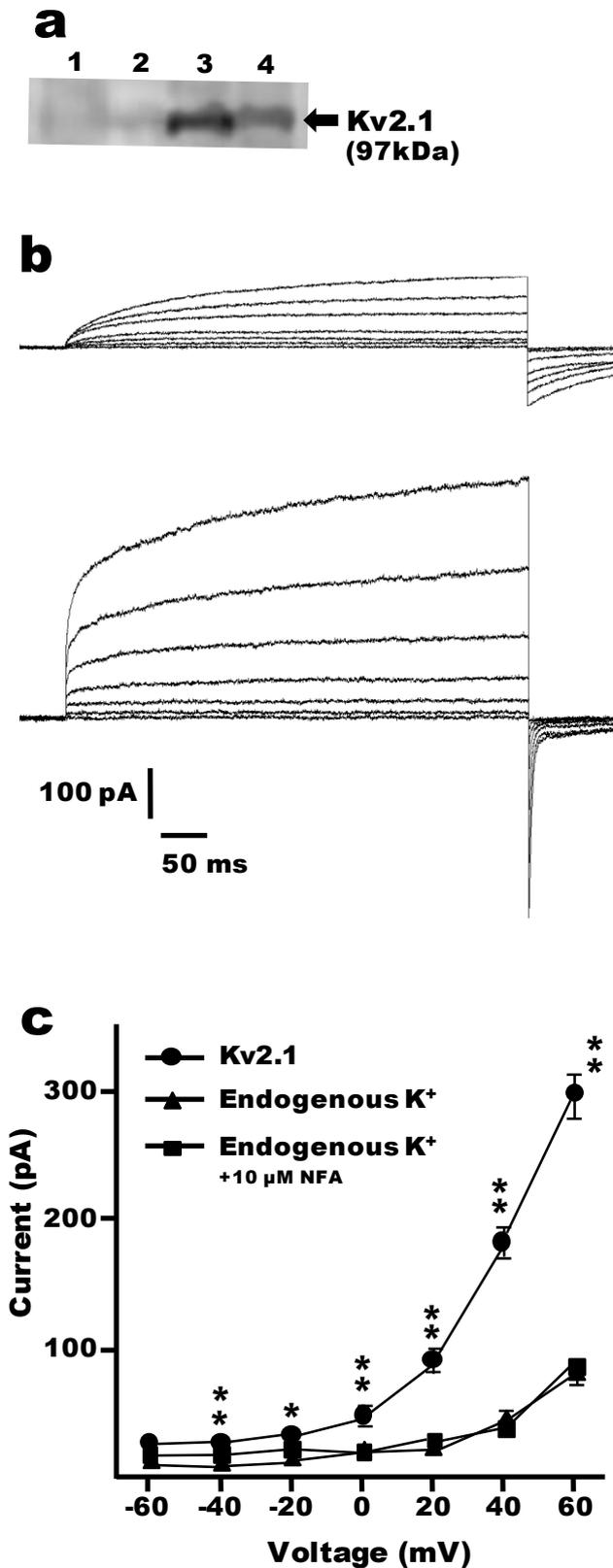
**Figure 9.** *E. coli* 巨大スフェロプラストの調整. (a)通常の C431 カルチャー. (b)60 mg/ml セファレキシシン添加で 3 時間培養した C43. 細菌は伸びて 100-150  $\mu\text{m}$  の“スネーク”に成長した. (c)細菌の“スネーク”は 5760 U のリゾチームと 80 U の DNase で消化され, 直径 1-7  $\mu\text{m}$  の巨大スフェロプラストになった. (d)パッチクランプに適したスフェロプラストは黒っぽく見える (右上). その左下の影のような脆い“ゴースト”が見える.

#### 4-2-3. 粒径によるスフェロプラストの選別

φ 4-7 μm の大きいスフェロプラストはマイクロ流路チップで分取され (Figure 9a), 700G, 3分で濃縮された (Figure 9c). 小さなスフェロプラストやデブリの大部分は他のポートに分けられたが (Figure 9d), 幾何かの小さなスフェロプラストの混入は完全には避けられなかった. 加えて, このマイクロ流路チップはサイズで分別するデザインで, スフェロプラストの状態は考慮されないため, 粒径が大きいのが壊れ易い“ゴースト”を除去することは出来なかった. そうとはいえ, 90%のスフェロプラストはウェルへの添加から2分以内にギガシールに達し, 70%はパッチクランプでの記録が十分可能であった.

#### 4-2-4. Kv2.1 電流の記録

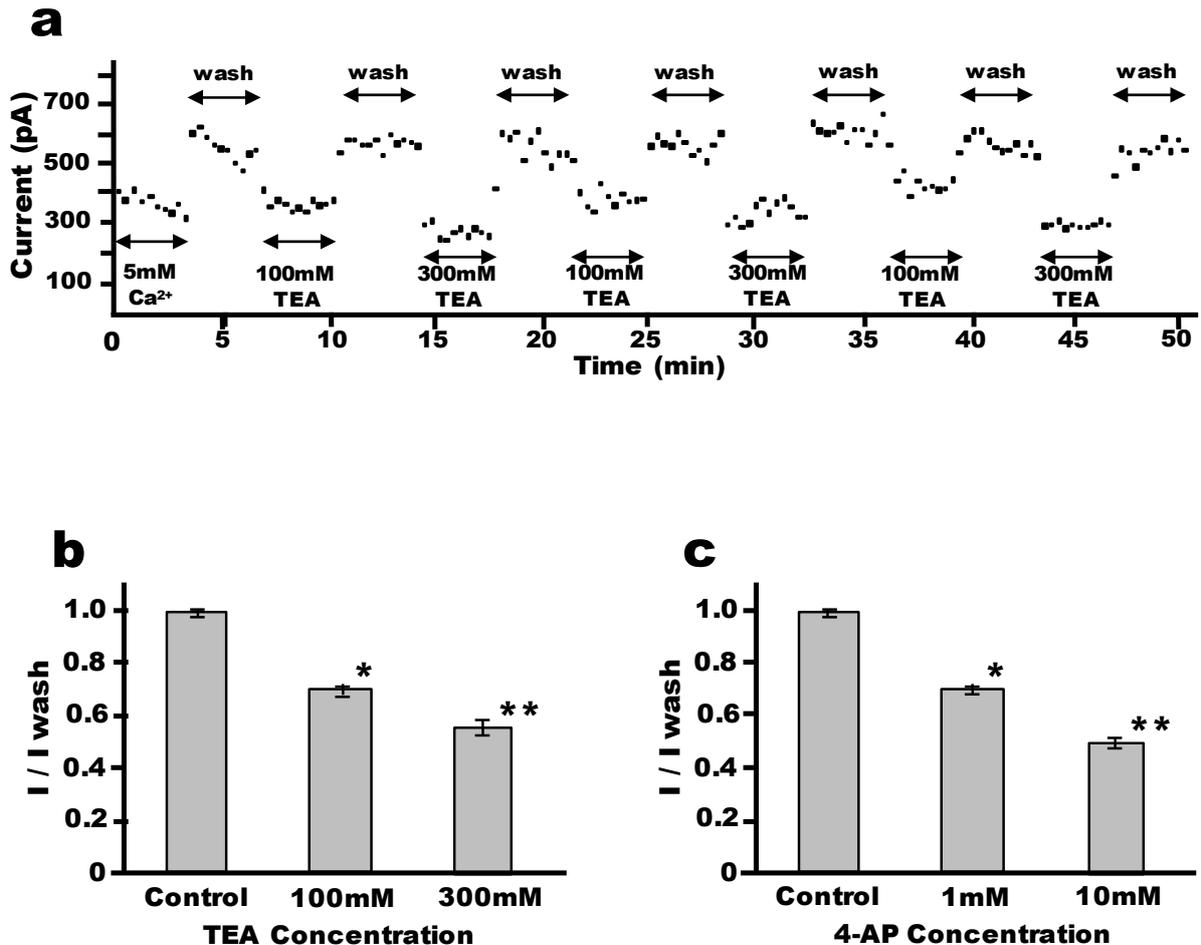
ヒト Kv2.1 は C43 で発現され, 内膜での発現はウエスタン・ブロッティングで確認された (Figure 10a). ヒト Kv2.1 と内在性 K<sup>+</sup>チャンネル電流は Port-a-Patch オート・パッチクランプ・システムで記録された. -60 mV から 60 mV のボルテージ・ステップで計測された代表的なトレースを Figure 10b に示す. Figure 10c に示す通り, -40 mV 以上のステップに於いて, ヒト Kv2.1 を発現した C43 からの電流は, コントロールベクターを発現した C43 より優位に高かった (P<0.05). Cl<sup>-</sup>チャンネル電流でのコンタミネーションを区別する為, 内在性 K<sup>+</sup>チャンネル測定の際に 10 mM NFA が外液に添加されたが, どのステップでも内在性 K<sup>+</sup>チャンネル電流に優位な変化は観察されなかった (P<0.05).



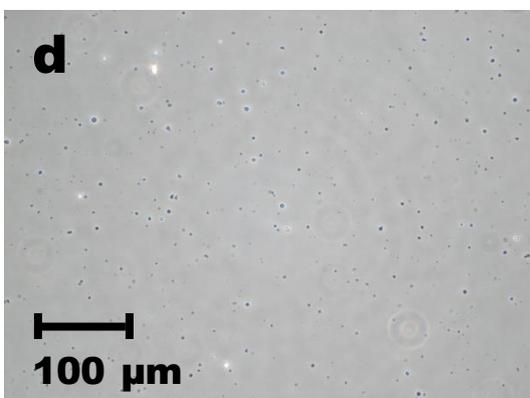
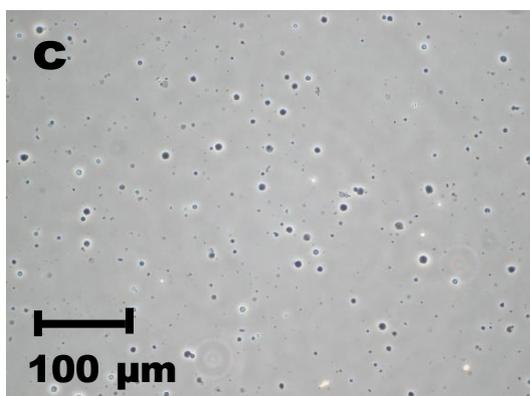
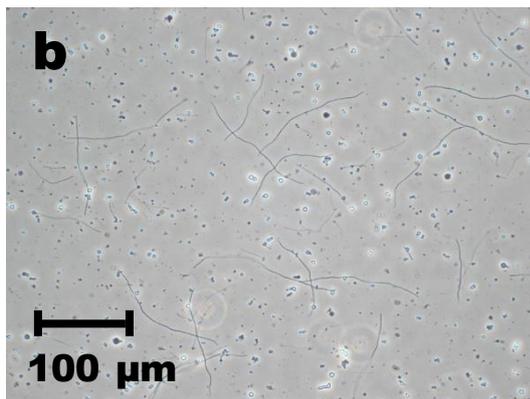
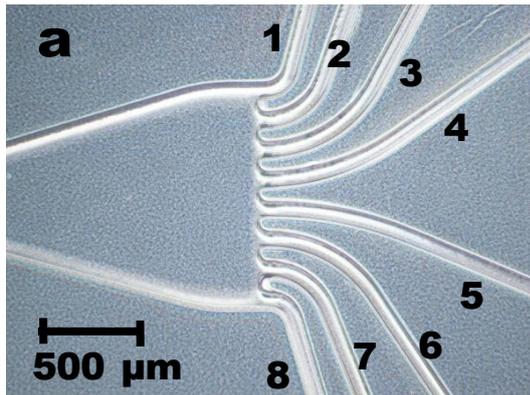
**Figure 10.** C43 に発現されたヒト Kv2.1. (a)C43 に発現した Kv2.1 と BL21 の 97 kDa のバンド (3 番目と 4 番目のレーン). 1 番目と 2 番目のレーンはコントロールベクターを発現した C43 と BL21. BL21 は発現チェックにのみ使用された. (b)Holding potential  $-80$  mV , duration 500 ms,  $-60$  mV から  $60$  mV の間で測定された内在性の K<sup>+</sup>電流 (上). 同条件で測定されたヒト Kv2.1 (下). (c)IV カーブ. 結果は, NFA なし内在性 K<sup>+</sup>電流は 18 回,  $10\mu\text{M}$  NFA 添加の内在性 K<sup>+</sup>電流は 17 回,  $10\mu\text{M}$  NFA 添加のヒト Kv2.1 電流は 12 回の平均 $\pm$ SEM( $P<0.05$ )で示す. \*内在性 K<sup>+</sup>電流より有意に高い( $P<0.05$ )

#### 4-2-5. TEA と 4-AP による Kv2.1 電流の阻害

ヒト Kv2.1 を発現した C43 巨大スフェロプラストは、阻害剤の添加と洗浄の繰り返しの安定した反応をみせた。一旦、強いシールが形成されると、30 分以上は安定に測定可能で、60 分安定なものもあった。TEA 添加と Kv2.1 電流の阻害、洗浄と Kv2.1 電流の回復の代表的な継時的レコーディングを Figure 11 に示す。TEA に阻害された Kv2.1 電流は、ウェルを 2 mM Ca<sup>2+</sup>外液で洗浄すると、すぐさまコントロールのレベルに回復した。加えて、ヒト Kv2.1 を発現した C43 巨大スフェロプラストは、TEA に濃度依存的に反応した。Figure 11b に示されるように、100 mM と 300 mM の TEA は、コントロールに対し、Kv2.1 電流の大きさを優位に減少させた（それぞれ順に  $0.706 \pm 0.009$  と  $0.569 \pm 0.009$ ;  $P < 0.05$ ）。更に、Kv2.1 電流の阻害は、他の K<sup>+</sup>チャンネルの阻害剤・4-AP でも観察され、Kv2.1 電流は 4-AP によって濃度依存的に阻害され、ウェルの洗浄でコントロールのレベルに戻った。Figure 11c では、1 mM と 4 mM の 4-AP がコントロールに対し有意に Kv2.1 電流を阻害する様子が示されている（それぞれ順に  $0.667 \pm 0.023$  と  $0.481 \pm 0.019$ ;  $P < 0.05$ ）。



**Figure 11.** TEA と 4-AP による Kv2.1 阻害. (a) 代表的な Kv2.1 の継時的レコーディング. このスフェロプラストは 100 mM もしくは 300mM TEA の添加と洗浄の繰り返りに約一時間安定して反応した. (b) TEA による Kv2.1 電流の阻害は Holding potential -80 mV, 40 mV, duration 500 ms で 20 秒間隔で測定された. 測定はホールセル達成後 10 分後から開始し, 30 分から 60 分, パッチが安定している間, 続けられた. Kv2.1 電流の強度は TEA 添加直前のウォッシュ時の電流の平均で標準化した. 結果は 6 回の独立した実験の 60 ポイントの平均  $\pm$  SEM ( $P < 0.05$ ) で示す. \* 2 mM Ca<sup>2+</sup> 外液のコントロールより有意に低い ( $P < 0.05$ ); \*\* 2 mM Ca<sup>2+</sup> 外液のコントロールと 100 mM TEA より有意に低い ( $P < 0.05$ ). (c) 4-AP による Kv2.1 電流の阻害は TEA と同様に行われた. 10  $\mu$ M NFA が Cl<sup>-</sup> 電流のコンタミ防止に添加された. 結果は 2 回の独立した実験の 20 ポイントの平均  $\pm$  SEM ( $P < 0.05$ ) で示す. \* 2 mM Ca<sup>2+</sup> 外液のコントロールより有意に低い ( $P < 0.05$ ); \*\* 2 mM Ca<sup>2+</sup> 外液のコントロールと 1 mM 4-AP より有意に低い ( $P < 0.05$ ).



**Figure 12.** 粒径によるスフェロプラストの選別. パッチクランプ実験前, スフェロプラスト懸濁液はスパイラルソーターチップに通され, サイズの選別を行った. (a)スパイラルソーターチップのアウトレット部分の拡大. (b)未処理のスフェロプラスト懸濁液. 未消化の“スネーク”やデブリが混在し, 大きいスフェロプラストの密度も低い. (c)4番目のポートに振り分けられた粒径 $\phi$ 4-7  $\mu\text{m}$ の大きいスフェロプラスト. (d) $\phi$ 2-4  $\mu\text{m}$ の中程度サイズのスフェロプラストは3番目のポートに振り分けられた. 更に小さいスフェロプラストとデブリは1番と2番のポートに分けられた.

#### 4-2-6. 自動パッチクランプで使用するサンプルは密度と均一性が重要である

大腸菌巨大スフェロプラストを自動パッチクランプ装置で使用する為には、スフェロプラスト懸濁液が密で均一であることが必要だった。粒径サイズの選別をしなかった前実験では、捕捉したスフェロプラストのうちギガシールに達するものは20%のみで、これはスフェロプラスト懸濁液全体の中で、大きめで濃灰色のスフェロプラストの割合にほぼ比例する。過去の文献にも、理想的なホールセル・パッチは大きく灰色のスフェロプラストで得られ、壊れ易くリークの多い“ゴースト”スフェロプラストでは安定した結果は得られない；小さくて光沢のあるスフェロプラストに関しては、単純に小さ過ぎて電極で捕捉出来ないと報告されている (Berrier *et al*, 1996; Cui *et al*, 1995)。そこで我々は、 $\phi$  4-7  $\mu\text{m}$  の大きいスフェロプラストを、遠心力で粒径を選別するマイクロ流路チップで分取し、更に軽い遠心で懸濁液を濃縮した。結果、自動パッチクランプはサンプルのウェルへの添加から 10 秒以内にスフェロプラストを捕捉し、その 90 %が 2 分以内にギガシールを達成した。最終的には、捕捉したスフェロプラストの 70 %が電気生理記録に十分使用可能となり、哺乳類細胞 CHO-K1 でのパッチクランプでの成功率に並んだ。サイズの選別無しで単純に遠心操作でスフェロプラスト懸濁液の濃縮を行った際、Port-a-Patch はサンプルの添加から 10 秒以内に何かを捕捉したものの、捕捉した全パッチの 20 %しか電気生理記録に使用できなかった。酵素消化したまま、何の操作も加えていないサンプルでは、Port-a-Patch はサンプルの添加から 2 分でも何も捕捉出来ないことがあった。自動パッチクランプ装置は、スフェロプラストの濃度が  $1 \times 10^7$  spheroplasts/ml 以上になると効率的に捕捉出来るようになり、Brüggemann (2004) より哺乳類細胞で報告された適正濃度 ( $5 \times 10^5$ - $5 \times 10^7$  cells/ml) の範囲と一致した。マイクロ流路チップの使用はギガシール率を上げただけでなく、時間の節約にも一躍買っている。スフェロプラストの濃縮に

超遠心を利用したとしたら 2 時間以上かかるのに対し、サンプルを流路チップにシリ  
ンジポンプで送液するのに 11 分、700G での遠心に 3 分である。

#### 4-2-7. パッチクランプは微量な膜タンパクを検出する

細胞膜に微量に発現しているイオンチャネルは、免疫学的手法では検出が難  
しい。ウェスタン・ブロッティングの結果でも示された様に、Kv2.1 の検出には超遠  
心での膜画分の分離といった煩雑なステップが多い割にバンドの検出が難しかった  
が、パッチクランプはこのような発現量が少なく微細な膜タンパクのシグナルを鋭敏  
に検出し、パドルの開閉等の生物物理的な挙動も観察することが出来ることを示した。

#### 4-2-8. 安定したイオンチャネルアッセイが大腸菌スフェロプラストで達成された

大腸菌巨大スフェロプラストを使用した継時的レコーディングによって、  
Kv2.1 電流が TEA と 4-AP に濃度依存的に阻害される様子を観察した。大腸菌巨大  
スフェロプラストは 30 分から 60 分にわたる阻害剤の投与と洗浄に鋭敏に反応し、  
実際のイオンチャネルアッセイへ応用可能なことを示した。

#### 4-2-9. 大腸菌スフェロプラストの利点

背景で述べた利点に加え、大腸菌スフェロプラストには有核細胞系やリポゾ  
ーム系と比較しても技術的利点がある。ターゲットのタンパクが薬物アッセイに素早  
いバス・ソリューションの交換が必要なリガンドゲートイオンチャネルである場合や、  
迅速な洗浄が困難な平面脂質二重膜パッチにおいては、大腸菌スフェロプラスト系は  
より良いオプションであると言える。更に、人工脂質二重膜系では膜タンパクの極性

の方向の制御が不可能であるのに対し，天然の大腸菌スフェロプラストでは膜タンパクの極性は必ず正しく配向されている(Kuo *et al.*, 2007).

## 4-3. クモ毒由来 Inhibitor Cystine Knot の分解耐性

### 4-3-1. 背景

消化管内および血漿中でのタンパク分解は経口ペプチド薬開発の主な障壁である (Bernkop-Schnürch, 1998; Choonara *et al.*, 2014; Pawar *et al.*, 2014; Werle and Bernkop-Schnürch, 2006). 高いターゲットの選択性にも関わらず, ペプチドは分解と生体利用効率の問題から, 長らく経口投与には適さないと今まで考えられていた. 現時点で, 60 以上の FDA 承認を得たペプチド薬が市販され, 約 140 のペプチド薬が臨床実験中で, 500 以上のペプチドが前臨床ステージにある (Fosgerau and Hoffmann, 2015). ジコノタイドもしくは Prialt として知られる  $\omega$ -コノトキシン・MVIIA は, イモガイ *Conus magus* 由来の初の FDA 承認ペプチド薬で, 深刻な慢性的疼痛に対して使用される. しかしジコノタイドは *in vivo* 安定性が悪い為, 髄腔内投与でしか使用されない (Schroeder and Craik, 2012). このように, 多くのペプチドは酵素による消化に弱く, 大体のペプチド薬は非経口で投与され, 現在, その約 75% は注射で投与されている (Fosgerau and Hoffmann, 2015). そうとはいえ, 生命の危険が差し迫った状況でなければ, 通常, 非侵襲的投与方法が好まれ, ICK の小さなサイズ自体を生かして, 口腔・経鼻・経皮吸収でのデリバリー方法が開発されている (Truong-Le *et al.*, 2015). その中でも, 日常生活を送る上では, 経口投与が最も知られた薬物投与の形態である. ペプチド薬を経口投与する為に, タンパク分解耐性と生体利用効率を強化する戦略が数種類あり (King, 2011), ペプチド末端の修飾・不安定なアミノ酸の置換・ペプチドの環状化等が消化管と血漿中安定性を高める為に使用されている (Truong-Le *et al.*, 2015). ペプチドの血中濃度半減期を向上させる為には PEG 修飾による分子量の増加・酵素阻害剤と浸透エンハンサーと合わせての服用や,

生分解性ポリマーのマイクロスフィアやリポソームでのカプセル化等の手法が用いられている (Werle and Bernkop-Schnürch, 2006). Clark *et al.* (2005)は, コノトキシンの骨格を環状化することで生体活性を保ったまま分解耐性を上げ, Armisaw *et al.* (2006) はシステイン残基をセレノシステインで置換することにより $\alpha$ -コノトキシン ImI から, 完全に生体活性のある $\alpha$ -セレノコノトキシンを合成した.

通常のシスチンノットペプチドは, 約 30 個のアミノ酸から成るペプチドであり, 3 個の $\beta$ シートが 3 組のジスフィルド結合で“結ばれた”堅牢な構造を持つ. この構造は多くのシスチンノットペプチドに共通で, 酵素・熱・化学物質に対して並外れた耐性を付与しており, 新規ペプチド薬の有望なスキファールドとして期待されている (Colgrave and Craik, 2004; Craik *et al.*, 2001; Heitz *et al.*, 2008; Kolmar, 2009; Reinwarth *et al.*, 2012). 長い生物の進化の過程において, シスチンノットペプチドは, 堅牢なシスチンノットのコア部分から突出した機能性に関与するループ部分を変化させることによって, 環境に合わせ多くの種で多様な機能を持つよう進化した. 植物は種子の動物散布の為にプロテアーゼ阻害剤を作り上げ (Sommerhoff *et al.*, 2010), 多くの種が感染症を防ぐ為に抗菌 (Park *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2007)・抗真菌 (Park *et al.*, 2014)・抗プラスモジウム活性 (Pimentel *et al.*, 2006)のあるペプチドを作り, 有毒動物は自衛の為に, 狩りの為にイオンチャネル阻害剤を作り上げた (Schroeder and Craik, 2012; Gao *et al.*, 2007; Kimura *et al.*, 2012; Ono *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2013).

Inhibitor cystine knot (ICK)は“knottin”と呼ばれる直鎖状 ICK で, クモ・サソリ・イモガイ由来の ICK は毒として, 植物や節足動物由来の ICK は抗菌ペプチドとして機能する (Park *et al.*, 2014). 直鎖に作り変えられたウリ科植物由来のシスチンノットはプロテアーゼ阻害剤として機能し, マスト細胞のトリプターゼ $\beta$ を阻害

することにより抗炎症薬としての利用が期待されている (Sommerhoff *et al.*, 2010). クモ・サソリ由来の殺虫 ICK は (Gao *et al.*, 2007; Kimura *et al.*, 2012; Ono *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2013), Kv チャネル・Nav チャネル・Cav チャネル・BK チャネル・グルタミンレセプターの NMDA サブタイプ (Smith *et al.*, 2013)等の多様なイオンチャネルやレセプターを阻害する神経毒として広く認知されている (Dworakowska and Dolowy, 2000). イオンチャネルは神経伝達や筋収縮等, 広範囲の生命現象に重要な役割を果たす為, 高血圧・QT 延長症候群・糖尿病・癲癇・統合失調症・鬱・疼痛等の様々な疾患に対応する魅力的な創薬ターゲットとなっている (Camerino *et al.*, 2007; Cannon, 2007; Mathie, 2010).

今まで, 消化液と血漿中での ICK の優れた安定性は, King (2011)の総説で語られているように毒物研究者の間では経験的に知られていた. ICK 自体がプロテアーゼに対する分解耐性が高く, ヒトの血漿中で一週間安定, 人工消化液中で 12 時間以上の分解耐性を持つと数報の総説の中では記述されているものの (Saez *et al.*, 2010), ICK 分解に関する実際のデータはほんの数報しか出版されていない. 大豆・リマ豆・ウシ膵臓由来のトリプシン阻害剤は人工胃液・腸液では全く分解されず (Fu *et al.*, 2002), ウリ科植物由来の 2 種類のプロテアーゼ阻害剤はエラスターゼとトリプシンに対し分解耐性がある (Werle *et al.*, 2006). 海綿から分離された 4 種の ICK はペプシン・トリプシン・キモトリプシン・エラスターゼに対して優れた分解耐性を見せた (Li *et al.*, 2014).

この章では, クモ毒由来 ICK の消化管と血漿中での分解耐性を報告する. ProTx-I, ProTx-II, GsMTx-4, GTx1-15 の 4 種の ICK は, ペプシン・トリプシン・キモトリプシン・エラスターゼと生理的条件下での分解を観察した. GTx1-15 は Cav3.1 の阻害剤で, 将来, 薬品開発に使用予定である (Ono *et al.*, 2011). ProTx-I,

ProTx-II もまた Cav3.1 の阻害剤で, GTx1-15 との比較に使用した (Middleton *et al.*, 2002; Priest *et al.*, 2007). GsMTx-4 はメカノセンシティブイオンチャネルの例として比較した (Ostrow *et al.*, 2003; Suchyna *et al.*, 2000). 更に, ProTx-II のラット血中における安定性を *ex vivo* と *in vivo* で観察して報告する.

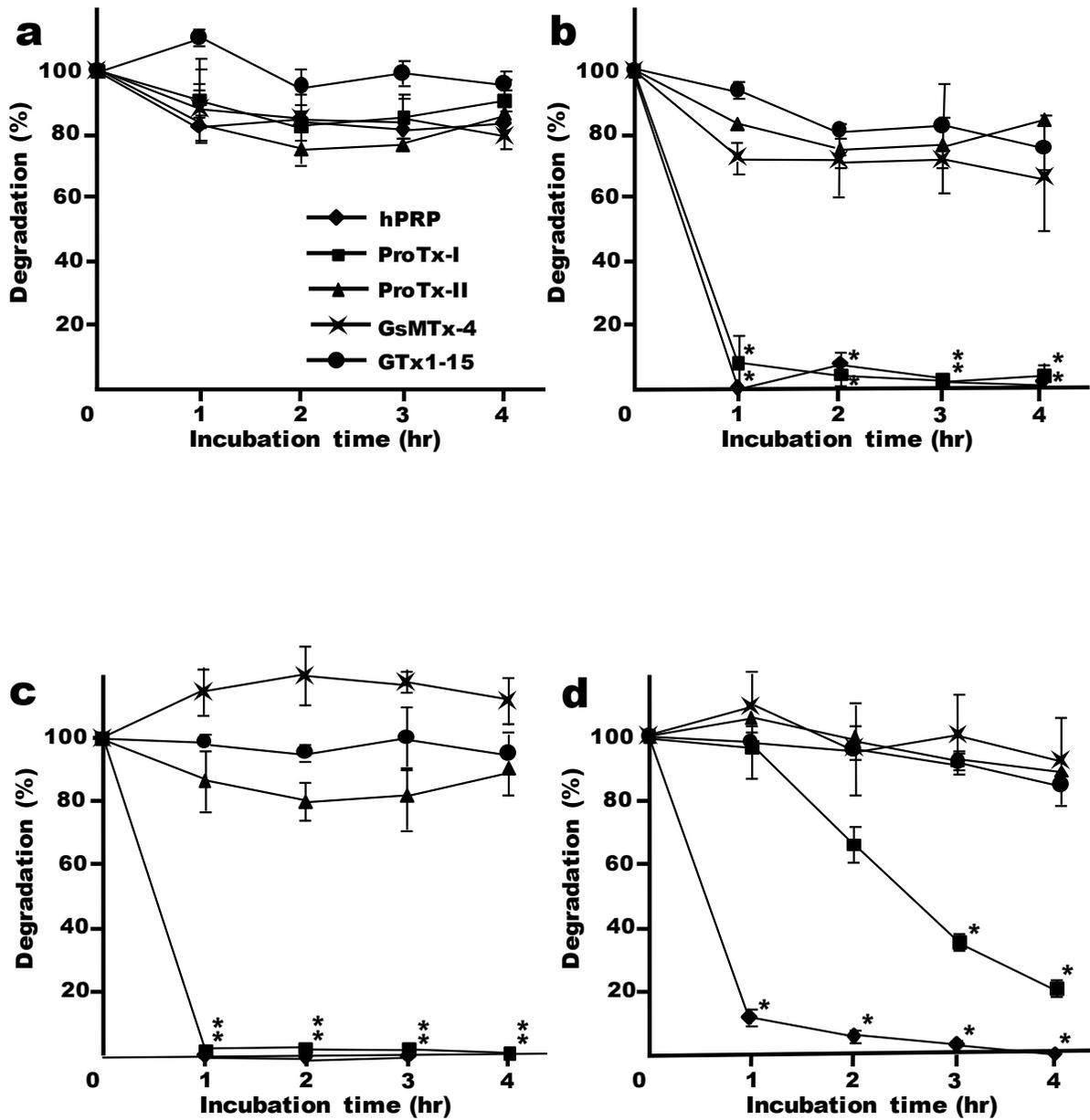
#### 4-3-2. クモ毒由来 ICK は消化管のプロテアーゼに対して分解耐性がある

ProTx-I, ProTx-II, GsMTx-4, GTx1-15, hPRP は胃の消化酵素ペプシンと pH2.0 バッファー中で 37°C で 4 時間インキュベートされた. BSA が 1 時間以内で完全消化される条件で, 試験に使用したペプチド全部が 80 % 以上, 実験終了時まで残存した. GTx1-15 は特に優れた安定性を示し, 96 % が残存した (Figure 13a). 同様に, 同じセットのペプチドが腸管の消化酵素・トリプシン・キモトリプシン・エラスターゼ pH8.0 バッファー中で 37°C で 4 時間インキュベートされた. hPRP と ProTx-I はトリプシンにより 1 時間以内にほぼ完全に分解された. 他の ICK はインキュベーション 2 時間で約 80 % まで分解されたが, それ以上の分解は進まなかった (Figure 13b). キモトリプシンは hPRP と ProTx-I を 1 時間以内に完全に分解した; 86 % の ProTx-II と 93 % の GTx1-15 は 4 時間後にも残存し, GsMTx-4 は全く分解されなかった (Figure 13c). エラスターゼは 1 時間以内に hPRP を 12 % まで分解し, 最終的には全部が消化された; ProTx-I は徐々に 4 時間後 22 % まで分解された; ProTx-II, GsMTx-4, GTx1-15 は 4 時間かけて少しずつ分解が進んだが, 84 % 以上が残存した (Figure 13d). このような ICK のプロテアーゼに対する分解度の違いは Werle *et al.* (2006; 2007; 2008) によっても報告されている.

ProTx-II, GsMTx-4, GTx1-15 は, ペプチド配列中に複数のプロテアーゼの切断部位が存在するにも関わらず分解され難かった. 本研究に使用した ICK のアミ

ノ酸配列を比較してみると、切断され難かった ICK (GsMTx-4, GTx1-15) のプロテアーゼ切断部位は比較的ブロック状に局在していた (Figure 15). 唯一、分解に弱かった ICK である ProTx-I の配列は、非 ICK で速やかな分解を示した hPRP と同様にプロテアーゼ切断部位はアミノ酸配列全体に均等に散在しており、この切断部位の分布の違いがペプチドのプロテアーゼに対する感受性の違いに関係する可能性がある。今回、ICK 分解は簡易的にウェスタン・ブロッティングで“定量”されたが、この手法は半定量的であり、位置情報の取得には不十分である。抗分解性ペプチドのプロテアーゼ切断部位は、堅固なシスチンノット構造によってプロテアーゼのバインディングから保護されていると推察されるが、この仮説は LC-MS/MS と NMR による分析で再確認する必要がある。

$\beta$ シートが3個存在する典型的なシスチンノットペプチドとは違い、クモ毒由来ペプチドには通常、アンチパラレル $\beta$ シートが 2 個しか存在しない (Figure 16)(Saez *et al.*, 2010). ProTx-II に至っては小さな $\beta$ シートが 1 個しか存在しないにも関わらず (Park *et al.*, 2014), ProTx-II は GsMTx-4 と GTx1-15 同様に高いプロテアーゼ分解耐性を示す。Colgrave and Craik (2004)は、1 個のジスフィルド結合の削除は 3 次元構造にはさほど影響しないものの、化学的・酵素的な安定性を損なうと報告している。Heitz *et al.* (2008) もまた、シスチンノット自体が高い安定性の主要因であり、ペプチドの環状化は強い変性条件下での安定性に関するようだと報告している。以上の事から、安定な $\beta$ シートが相互にジスフィルド結合により結合されている構造がシスチンノットペプチドの特徴ではあるが、ICK の堅牢性は $\beta$ シートというよりは、主にジスフィルド結合が担っていると考えられる。



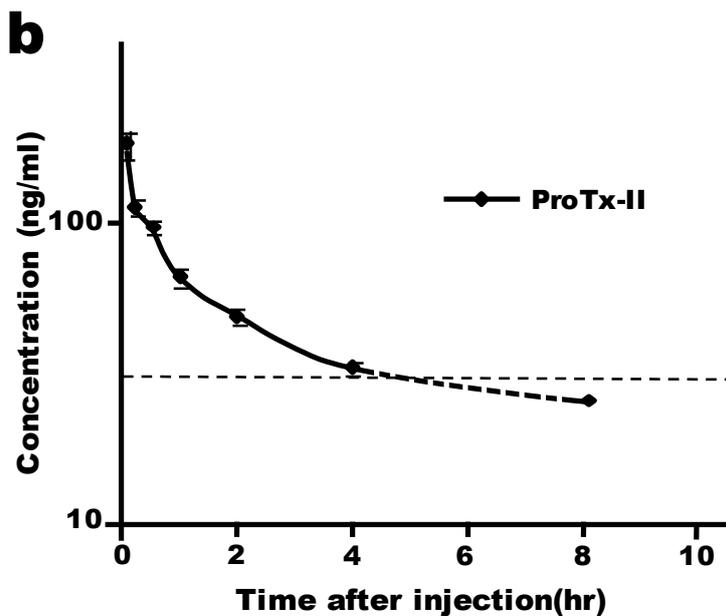
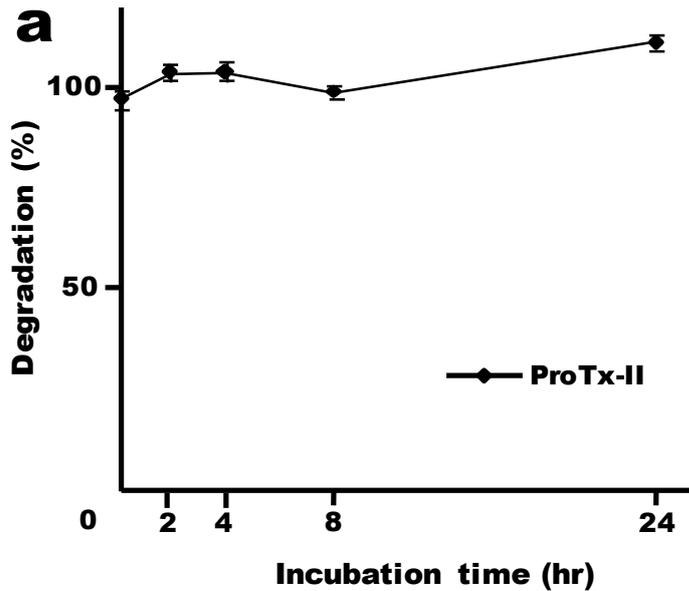
**Figure 13.** ICK ペプチドのプロテアーゼ分解耐性. クモ毒由来の 4 種類の ICK は消化管に存在する代表的なプロテアーゼ(a)ペプシン, (b)トリプシン, (c)キモトリプシン, (d)エラスターゼと混合され, 生理的条件下で 4 時間インキュベートされた. 結果は独立した 3 回の実験の平均  $\pm$  SEM ( $P < 0.05$ ) で示す. \*他の分解されなかったペプチドと比較して有意に分解された ( $P < 0.05$ ). すべてのペプチドはペプシンでは分解されなかった. ProTx-I のみトリプシン, キモトリプシン, エラスターゼで分解され, 他のペプチドは分解されず残存した.

#### 4-3-3. ProTx-II は血漿中で分解されず、血液循環から速やかに除去される

ペプチドの血漿中安定性は血漿中半減期等に関わる薬物動態の重要な要因である為、*in vitro* における血漿中での ICK 分解と、その血液循環からのクリアランスを ProTx-II とラットを用いて調べた。1  $\mu\text{g/ml}$  の ProTx-II をラット血漿と混合し、37  $^{\circ}\text{C}$  で 24 時間インキュベートしたところ、ProTx-II は 24 時間後も全く分解されず、ProTx-II はラットの血液循環に入っても完全に安定であることが示唆された (Figure 14a)。次に *in vivo* で、0.1  $\text{mg/ml/kg}$  の ProTx-II をマウスの大腿静脈から注射し、ProTx-II の血中濃度を 24 時間観察したところ、ProTx-II は投与から 40 分後に血中濃度は急速に半減し、投与後 8 時間で検出限界以下 (<30.0  $\text{ng/ml}$ ) に下がった (Figure 14b)。一般的に、血漿タンパクに結合しない分子量 5 kDa 以下の物質は、腎臓から排出され、これが酵素に分解の他にペプチドの半減期が短い主な理由である (Werle and Bernkop-Schnürch, 2006)。ProTx-II の血漿タンパクへのアフィニティは今のところ不明であるが、ProTx-II の大部分は腎臓により排出されていると推測される。

“短い血中半減期” はペプチド薬開発にかかっている呪いであり、数多くの血中半減期を伸ばす試みが行われてきた。ICK ペプチドは大変低い濃度でターゲットに作用することが可能である。ProTx-II の場合、血中濃度が投与後 8 時間で HPLC の検出限界以下 (<30.0  $\text{ng/ml}$ ) に下がったとしても、ProTx-II 血中濃度はそれでも 7.8 nM あり、 $\text{IC}_{50}$  が 0.3 nM である Nav1.7 を十分に阻害することが可能である。ProTx-II は 1  $\text{mg/kg}$  の投与量がラットでは致死量と報告されているが、死亡時の血中濃度は 3  $\mu\text{M}$  であり、心筋に分布するナトリウム電位依存型チャネルの Nav1.5 と中枢神経系とランヴェリエ絞輪に分布する Nav1.6 の  $\text{IC}_{50}$  のはるか上である (Schmalhofer *et al.*, 2008)。加えて、このような早い排出は診断目的としては寧ろ好ましく、例えば、

クモ毒の AgTx は腫瘍に関連するインテグリンレセプターに高いアフィニティを持つよう組替えられ、画像診断に使用されている (Moore *et al.*, 2013).



**Figure 14.** ラット血漿中での ProTx-II の安定性. ラット血漿中での ProTx-II の分解は *ex vivo* と *in vivo* で評価された. 結果は独立した 3 回の実験の平均  $\pm$  SEM ( $P < 0.05$ ) で示す. (a) ラット血漿中 ProTx-II の *ex vivo* での分解. ProTx-II はラット血漿で 24 時間全く分解されなかった. (b) *in vivo* でのラット ProTx-II 血中濃度. ProTx-II は急速に血液循環から除かれていった. ProTx-II の血中濃度半減期は 40 分で, ProTx-II 濃度は 8 時間で HPLC の検出限界以下になった.

#### 4-3-4. ICK ベースの胃をターゲットとした薬品の開発

多くの経口薬は腸管で吸収されるよう設計されており、ICK の中にはラット小腸の粘膜に他のモデル薬剤より良く透過するものがあることが示されている (Werle *et al.*, 2006). しかしながら小腸を吸収の場を選ぶと、薬剤は常に多様なプロテアーゼに曝されている (Shah *et al.*, 2002). 今回実験した ICK はいずれもペプシンに対し高い分解耐性があり、胃で作用する、もしくは胃から吸収される薬品に応用可能であると思われる。胃が薬物の吸収の場として選ばれるとなると、強い酸性条件の他には、手強いプロテアーゼとしてはトリプシンが残るのみである (Woodley, 1994). Guggi *et al.* (2003)は、キトサン-ペプスタチン A 複合体の共投与でペプシンによる分解を防ぎ、サケのカルシトニンの胃をターゲットしたデリバリーに成功した。この様に、ICK をベースとした薬品は、透過増幅剤やプロテアーゼ阻害剤と一緒に投与することによって、胃からの吸収はより確実になると考えられる。本研究により、ICK 自体には分解耐性があるものがあることが判明したが、将来、それをベースに改変された官能基部分を含めた分解耐性については不明である。現時点で研究すべきことは山積しているものの、胃をドラッグ・デリバリーのターゲットに設定すれば、薬剤が胃に到達する時間が短い分、薬効が出る時間が短くなることも魅力である。

#### 4-3-5. ICK をスキャフォールドに新機能を追加した新薬の開発

序論でも述べたように、ICK ペプチドのループ部分は、ペプチドの持つ多様な機能性に関与している。この官能基部分の配列を分子進化的手法を用いて“改良”することによって、元の機能を最適化したり、もしくは新規の機能を移植することが可能であり (Kimura *et al.*, 2009; Silverman *et al.*, 2009; Souriau *et al.*, 2005), この様な組替え ICK の HIV ワクチン (Stricher *et al.*, 2008) や腫瘍ターゲティング

(Moore *et al.*, 2013; Glotzbach *et al.*, 2013)への応用が報告されている。将来的には GTx1-15 をベースとしたランダムペプチドライブラリーを準備し、大腸菌パッチクラップのセクションでも記述した分子進化的手法である PERISS(intraperiplasm selection and seretion)法(Kubo *et al.*, 2012)にて官能基の改変を行う予定である。

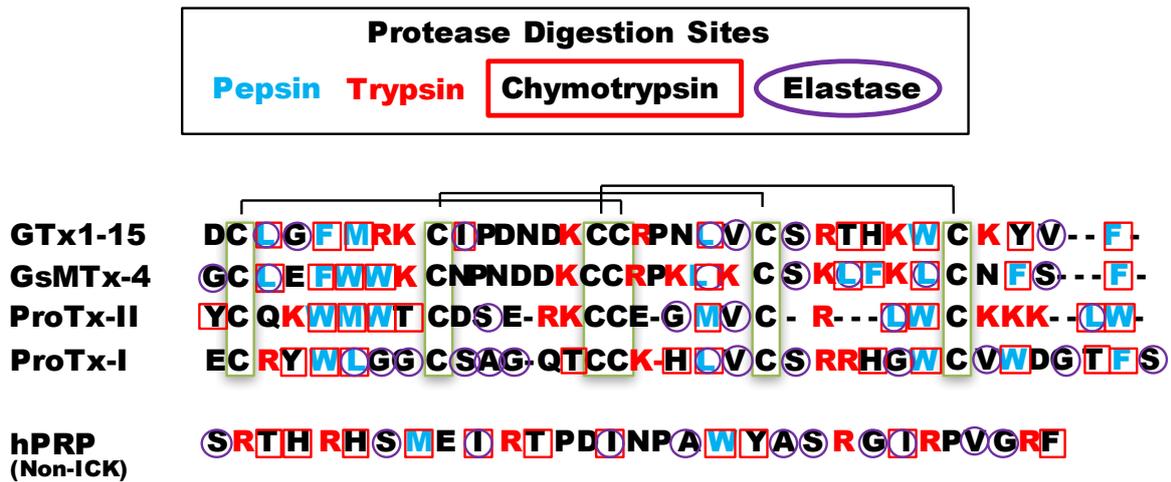


Figure 15. 各ペプチドのプロテアーゼ切断サイト。ペプシン，トリプシン，キモトリプシン，エラスターゼの切断サイトをアミノ酸配列に表示した。6個のシスチン残基は緑のボックスで，3組のジスフィルド結合は線で結んで表示した。

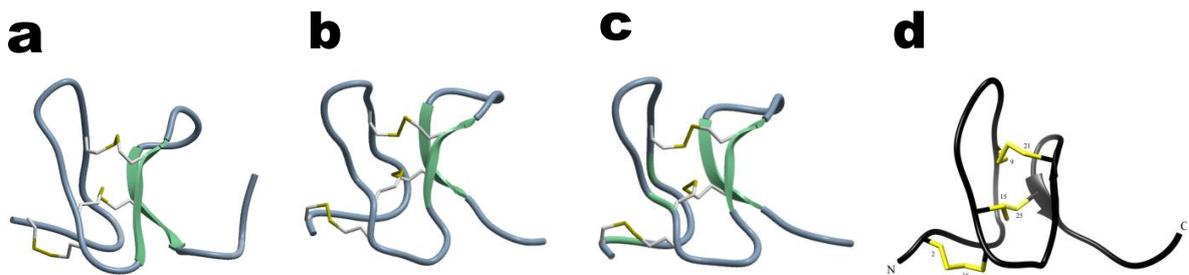


Figure 16. クモ毒由来 ICK ペプチドの三次元構造。Protein Data Bank の NMR 構造図の ID ナンバーは(a)ProTx-I (2M9L), (b)GsMtx-4 (1TYK)である。(c)GTx1-15 の三次元モデルは HnTx-IV (PDB: 1niy) の NMR 構造を基に ICM-PRO(Molsoft, La Jolla, CA)を使用してホモロジー・モデリングで作成された。(d)ProTx-II の NMR 構造は Park *et al.*(2014)より転載(Copyright: 2014 American Chemical Society)。βシートは緑もしくは黒の矢印，ジスフィルド結合は黄色で表示。クモ毒由来 ICK にはβシートが 2 個しかなく，ProTx-II にはβシートが 1 個しかない。

#### 4-3-6. 結論

現状の細胞ベースの *in vitro* 薬剤スクリーニング系は *in vivo* 相関性が悪く、多くの動物実験が行われている。それでもマウスやラット等の動物とヒトでは薬物感受性が異なることも多く、臨床試験の段階で被験者に被害が出ることもある。研究の背景で触れた CiPA は心臓安全性評価に関わる改定案で、精度の高い *in vitro* アッセイによってより正確な薬剤の挙動を予測し、治験患者の安全を担保し、動物実験と臨床試験の莫大なコストを削減することを目的としている。CiPA では心臓に発現する複数のイオンチャネルスクリーニングのみならず、*in silico* のシミュレーションモデルによる予測、ヒト iPS 細胞誘導心筋細胞を用いた *in vitro* アッセイも考慮に入れられ、動物実験の削減・置き換えに努めており、この流れは近い将来、心毒性評価のみならず創薬分野全体に波及していくことが予測される。

本研究で、複数株化細胞のオルガノイドへの作り込みによって構築された HepG2 スフェロイドと Balb/3T3 の共培養系は、CYP3A4, CYP1A2, アルブミンといった肝臓特異的遺伝子発現を上昇させ、パターン共培養系が細胞本来の機能を回復させ *in vitro* と *in vivo* の隔たりを埋めることを示した。近年、本研究が行われていた時点には無かった三次元培養に必要なアイテムが数々市販されるようになり、スフェロイド培養を利用した研究が容易に進められるようになった。スフェロイド培養した細胞は細胞毒性のある薬剤に対して抵抗性を示し、腫瘍細胞増殖因子に対する受容体発現が異なることが知られ、スフェロイド培養系は腫瘍の増殖、細胞の浸潤、抗ガン剤の *in vivo* での評価モデルとなっている (Katt *et al.*, 2016)。また、三次元培養は初代細胞の機能の長期維持、幹細胞の未分化の維持及び分化効率の向上に有効であることが分かり、幹細胞の未分化維持と分化効率は EB のサイズによって影響されるこ

とがわかってきた(Kawaguchi *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016). スフェロイド共培養系を作成できるキットも市販されており, これらを利用した薬剤スクリーニング系の研究も見受けられるようになった. 健常人由来の iPS 細胞を使用した健常組織を構築し, 薬剤リードのスクリーニングを行えば, より *in vivo* に近似したデータの収集が可能になり, 且つ, 動物実験数削減も実現されるだろう. 更に, 特定疾患を持つ患者由来 iPS 細胞から病態組織モデルを構築し, アッセイに使用することも可能だろう.

イオンチャネル創薬に必須のパッチクランプは高価なランニングコストと実験者の習熟度に依存するが故, 長年, アッセイの高速化が難しかった. 本研究では, 真核生物由来の電位依存性イオンチャネル・Kv2.1 を *E. coli* の内膜に発現させ, パッチクランプに必要なサイズの巨大スフェロプラストをマイクロ流路チップで選別した. 選別された大腸菌スフェロプラストを使用し, 電気生理的測定を実験者の手技に依存しない自動パッチクランプ装置で行ったところ, ヒト Kv2.1 電流を安定して検出することが出来た. Kv2.1 発現スフェロプラストは TEA と 4-AP を使用した継時的レコーディングにおいて濃度依存的に Kv2.1 電流の阻害を示し, 本研究は自動パッチクランプ装置を使用した大腸菌スフェロプラストの薬剤アッセイへの世界最初の応用例となった.

本研究では調製したスフェロプラストは一か月以内に使用したが, 他文献によると(Matrinac *et al.*, 1987), 大腸菌スフェロプラストのサンプルは-80 °C で約半年の長期保存も可能である. 電気生理実験に *Xenopus* 卵母細胞を使用する為には生体の飼育を継続しておかなければならないことは勿論, 哺乳類細胞を使用する場合でも実験期間に合わせて細胞をスタートさせ, 実験期間中は培養を継続する必要がある. *Xenopus* 卵母細胞も哺乳類細胞も維持にそれなりの手間とコストがかかるが, 大腸菌スフェロプラストの場合, 必要量を一度に調製し, 一日での実験に必要な量を分注し

て冷凍保存しておけば、いつでも直ちにパッチクランプ実験が開始可能である。“小規模な研究室でも手の届くパッチクランプ”というコンセプトから始めた研究であるが、マイクロ流路で粒径選別された大腸菌スフェロプラストのギガシール形成率は CHO-K1 のそれと遜色ない為、マルチチャネルのプラットフォームを使用すれば哺乳類細胞と同様に高速アッセイが可能である。Kv2.1 のように糖鎖の修飾の違いが問題にならないイオンチャネルであれば、大腸菌を使用した方が哺乳類細胞を維持するよりコストを抑えることが出来るだろう。

その上、冷凍保存された大腸菌スフェロプラストのサンプルは研究室間の移動も容易であり、移動先で直ちにパッチクランプを行うことが可能である。極端な例を挙げれば、粒径選別された大腸菌スフェロプラストは凍結したまま宇宙実験室への移送が可能である。現在、宇宙実験室で哺乳類細胞を使用した実験を行うには、連絡船の打ち上げのタイミングに合わせて綿密な下準備が必要である上に、可能な細胞操作は限られている。一方、解凍するだけで直ちにパッチクランプを行うことが可能な大腸菌スフェロプラストであれば、培養のタイミング等を考慮する必要が無く、宇宙実験室であっても容易にイオンチャネル研究が可能である。宇宙飛行士が宇宙長期滞在する際、問題となるのが骨と筋肉の減少、循環器系の衰弱であり、骨と筋肉の代謝にはメカニカルストレスが重要な役割を果たしている。微小重力環境における骨量減少にはカルシウムバランスが関係しており、細胞内のカルシウムイオン濃度を調節する TRP (Transient Receptor Potential)チャネルの微小重力下での挙動の解析は、メカノセンシティブチャネルに作用する新規医薬品のアッセイを可能にする。現在、黎明期にあるメカノ創薬は、宇宙飛行士といった特殊な状況に置かれた人達だけではなく、長期の寝たきり状態により身体機能が低下した患者達のリハビリに貢献し、更には“運動に替わる飲み薬”によってメタボリックシンドロームの解消にも繋がる一大

マーケットを築くだろう。

ペプチドはサイズの的に低分子とタンパクの中間に位置し、高い標的の選択性を持つ。理想的な薬は“高い細胞膜透過性と標的選択性を有し、且つ、副作用の少ない薬”であり、このような医薬品はまだ存在しない。低分子化合物をリードとする薬剤開発が手詰まりになりつつある今、ペプチド医薬品は低分子医薬品と抗体医薬品の“良いとこ取り”が出来る可能性があり、更に熱・化学・プロテアーゼに対する高い安定性に恵まれた生物毒由来 ICK は有力な薬物リードとなり得る。ペプチドを医薬品とする際、問題視されるのは主に分解に対する安定性だが、本研究で用いたクモ毒由来 ICK3 種は消化管プロテアーゼ 4 種類に対して高い分解耐性を示し、ProTx-II は *ex vivo* と *in vivo* での血中安定性を示した。ペプチドは生物製剤より安価に合成でき、直鎖の ICK ペプチドは環状ペプチドより更に合成ステップが単純であることも魅力である。

イオンチャネルに対して活性を發揮するペプチドのリードを天然物から探索する一方、本研究は分子進化的手法を用いて機能の強化・新機能の付加をしたペプチドの作成を視野に入れている。分子進化実験の過程では、無数のバリエーションのペプチド配列を持った大腸菌が生み出されることになり、これらの一次スクリーニングには迅速で安価な手法を開発する必要があった。大腸菌巨大スフェロプラストのパッチクランプへの直接使用は、真核細胞系の電気生理解析のセットアップに必要な煩雑なステップを一切省略する事が出来る。ペプチドをリードとした創薬において、大腸菌スフェロプラストアッセイ系は、イオンチャネルスクリーニングの高速化に必須である。生物毒由来ペプチドをリードとして分子進化的手法で開発されたペプチド医薬品は、オリジナルのペプチドより強力な活性を持つ、もしくはこれまで有効な選択肢がなかった標的に対して活性のある医薬品を生み出すかも知れない。

現在, HepG2 スフェロイド-Balb/3T3 共培養系に関する論文を投稿した時点での“未来”が既に現実になりつつあり, マイクロ流路で構築された様々な *in vitro* アッセイの例が報告されている(Barata *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2016; Katt *et al.*, 2016). 光応答性培養機材による細胞のパターニング技術は MEMS (Micro Electro Mechanical Systems)のバイオへの転用であり, Sugiura *et al.* (2008)が作成した複数の化合物の希釈系列を行うチップ等との組み合わせにより, 医薬品アッセイの効率化を試みるものであった. 生物は常に様々な物理的刺激を受けながら生きており, それらのストレスに応答することで恒常性を維持している. 生物の最小単位である細胞は, 血管内皮細胞であれば流体による剪断応力や静水圧, 骨・軟骨・筋細胞であれば引張力や振動といった様々なメカニカルストレスにさらされることで, その場に相応しい組織を作り上げている. 動物を使用した *in vivo* アッセイ系では, 液体の流量・メカニカルストレスを正確に制御することは不可能で, 必然的に個体差が発生するが, マイクロ流路に統合されたオルガノイドであれば常に一定の条件でアッセイが可能である. 新鮮な培養液と酸素が供給されるバイオリアクターチップ内に肝スフェロイド共培養系を構築すれば, より生体の肝臓に近い薬剤分解アッセイが安定して行えるだろう. また, CiPA では, ヒト iPS 細胞から分化された心筋細胞でのイオンチャネルスクリーニングを提唱しているが, 実際の分化誘導された心筋細胞は, 心室筋・心房筋・結節細胞といった様々な細胞の集合で, 分化度もまちまちであるのが現状である. 心毒性アッセイに使用する *in vitro* 心筋モデルの条件は暫く議論する必要があるが, 近い将来, バイオリアクター技術の向上によって純度の高いヒト心筋細胞への分化, より精度の高い *in vitro* 心筋モデルの構築が可能になり, パッチクランプや QT 延長のデータ取得も *on chip* で効率的に行うことが可能となるだろう. これからアッセイに適したオルガノイドの作成に必要な細胞と物理的条件の検討は更に進み, 将来の医

薬品スクリーニングは、オルガノイドの構築に必要な新たなバイオマテリアルと集積化したバイオリクター技術に支えられ発展すると考えられる。

## 5. 参考文献

1. Armishaw, C.J., Daly, N.L., Nevin, S.T., Adams, D.J., Craik, D.J., and Alewood, P.F. Alpha-selenoconotoxins, a new class of potent alpha7 neuronal nicotinic receptor antagonists. **The Journal of Biological Chemistry**, 281:14136-43 (2006)
2. Barata, D., van Blitterswijk, C., and Habibovic, P. High-throughput screening approaches and combinatorial development of biomaterials using microfluidics. **Acta Biomaterialia**, 34:1-20 (2016)
3. Bernkop-Schnurch, A. The use of inhibitory agents to overcome the enzymatic barrier to perorally administered therapeutic peptides and proteins. **Journal of Controlled Release**, 52:1-16 (1998)
4. Berrier, C., Besnard, M., Ajouz, B., Coulombe, A., and Ghazi, A. Multiple Mechanosensitive Ion Channels from Escherichia coli, Activated at Different Thresholds of Applied Pressure. **The Journal of Membrane Biology**, 151:175-185 (1996)
5. Bhandari, R.N., Riccalton, L.A., Lewis, A.L., Fry, J.R., Hammond, A.H., Tendler, S.J., and Shakesheff, K.M. Liver tissue engineering: A role for co-culture systems in modifying hepatocyte function and viability. **Tissue Engineering**, 7:345-357 (2001)
6. Bhatia, S.N., Balis, U.J., Yarmush, M.L., and Toner, M. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: Cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. **FASEB Journal**, 13:1883-1900 (1999)
7. Blount, P., Sukharev, S.I., Moe, P.C., Schroeder, M.J., Guy, H.R., and Kung, C. Membrane topology and multimeric structure of a mechanosensitive channel protein of Escherichia coli. **EMBO Journal**, 15(18):4798-805 (1996)
8. Breslin, S. and O'Driscoll, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug Discov Today**, 18:240-249 (2013)
9. Brüggemann, A., Farre, C., Haarmann, C., Haythornthwaite, A., Kreir, M., Stoelzle, S., George, M., and Fertig, N. Planar Patch Clamp: Advances in Electrophysiology. **Methods in Molecular Biology. Potassium Channels**, 491:165-176 (2008)

10. Brüggemann, A., George, M., Klau, M., Beckler, M., Steindl, J., Behrends, J.C., and Fertig, N. Ion channel drug discovery and research: the automated Nano-Patch-Clamp technology. **Current Drug Discovery Technology**, 1(1):91-6 (2004)
11. Buechner, M., Delcour, A.H., Martinac, B., Adler, J., and Kung, C. Ion channel activities in the Escherichia coli outer membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1024(1):111-21 (1990)
12. Camerino, D.C., Tricarico, D., and Desaphy, J.F. Ion channel pharmacology. **Neurotherapeutics**, 4:184-98 (2007)
13. Cannon, S.C. Physiologic principles underlying ion channelopathies. **Neurotherapeutics**, 4:174-83 (2007)
14. Chen, C., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G., and Ingber, D. Geometric control of cell life and death. **Science**, 276:1425–1428 (1997)
15. Choonara, B.F., Choonara, Y.E., Kumar, P., Bijukumar, D., du Toit, L.C., and Pillay, V. A review of advanced oral drug delivery technologies facilitating the protection and absorption of protein and peptide molecules. **Biotechnology Advances**, 32:1269-82 (2014)
16. Clark, R.J., Fischer, H., Dempster, L., Daly, N.L., Rosengren, K.J., Nevin, S.T., Meunier, F.A., Adams, D.J., and Craik, D.J. Engineering stable peptide toxins by means of backbone cyclization: stabilization of the alpha-conotoxin MII. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 102:13767-72 (2005)
17. Colgrave, M.L. and Craik, D.J. Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: the importance of the cyclic cystine knot. **Biochemistry**, 43:5965-75 (2004)
18. Craik, D.J., Daly, N.L., and Waine, C. The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. **Toxicon**, 39:43-60 (2001)
19. Cui, C., Smith, D.O., and Adler, J. Characterization of Mechanosensitive Channels in Escherichia coli Cytoplasmic Membrane by Whole-Cell Patch Clamp Recording. **The Journal of Membrane Biology**, 144:31-42 (1995)
20. Dike, L., Chen, C., Mrksich, M., Tien, J., Whiteside, G., and Ingber, D. Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using

- micropatterned substrates. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Animal**, 35:441–448 (1999)
21. Du, G., Fang, Q., and den Toonder, J.M. Microfluidics for cell-based high throughput screening platforms - A review. **Analytica Chimica Acta**, 903:36-50 (2016)
  22. Dworakowska, B. and Dołowy, K. Ion channels-related diseases. **Acta Biochimica Polonica**, 47(3):685-703 (2000)
  23. Edahiro, J., Sumaru, K., Tada, Y., Ohi, K., Takagi, T., Kameda, M., Shinbo, T., Kanamori, T., and Yoshimi, Y. *In situ* control of cell adhesion using photoresponsive culture surface. **Biomacromolecules**, 6:970–974 (2005)
  24. Falconnet, T., Csucs, G., Grandin, M., and Textor, M. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. **Biomaterials**, 27:3044–3063 (2006)
  25. Farre, C., Haythornthwaite, A., Haarmann, C., Stoelzle, S., Kreir, M., George, M., Brüggemann, A., and Fertig, N. Port-a-Patch and Patchliner: High Fidelity Electrophysiology for Secondary Screening and Safety Pharmacology. **Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening**, 12(1):24-37 (2009)
  26. Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C., and de Boer, J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. **Trends in Biotechnology**, 31:108-115 (2013)
  27. Fosgerau, K. and Hoffmann, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, 20:122-8 (2015)
  28. Fu, T.J., Abbott, U.R., and Hatzos, C. Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid-a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50:7154-60 (2002)
  29. Fukuda, J., Sakai, Y., and Nakazawa, K. Novel hepatic culture system developed using microfabrication and collagen/polyethylene glycol microcontact printing. **Biomaterials**, 27:1061–1070 (2006)
  30. Gao, B., Tian, C., and Zhu, S. Inducible antibacterial response of scorpion venom gland. **Peptides**, 28:2299-305 (2007)
  31. Glotzbach, B., Reinwarth, M., Weber, N., Fabritz, S., Tomaszowski, M., Fittler, H.,

- Christmann, A., Avrutina, O., and Kolmar, H. Combinatorial optimization of cystine-knot peptides towards high-affinity inhibitors of human matriptase-1. *PLoS. One*, 8: e76956 (2013)
32. Guggi, D., Krauland, A.H., and Bernkop-Schnurch, A. Systemic peptide delivery via the stomach: in vivo evaluation of an oral dosage form for salmon calcitonin. **Journal of Controlled Release**, 92:125-35 (2003)
33. Guillouzo, A. Liver cell models in in vitro toxicology. **Environmental Health Perspectives**, 106 (Suppl 2):511–532 (1998)
34. 林剛介, 大城幸紀, 菅裕明. 特殊環状ペプチドの翻訳合成と医薬品探索への展開. *生化学*, 第 82 卷, 第 6 号, 505-514 (2010)
35. Heitz, A., Avrutina, O., Le-Nguyen, D., Diederichsen, U., Hernandez, J.F., Gracy, J., Kolmar, H., and Chiche, L. Knottin cyclization: impact on structure and dynamics. **BMC Structural Biology**, 8:54 (2008)
36. Hewitt, N.J., Lecho´n, M.J., Houston, J.B., Hallifax, D., Brown, H.S., Maurel, P., Kenna, J.G., Gustavsson, L., Lohmann, C., Skonberg, C., Guillouzo, A., Tuschl, G., Li, A.P., LeCluyse, E., Groothuis, G.M., and Hengstler, J.G. Primary hepatocytes: Current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. **Drug Metabolism Reviews**, 39:159–234 (2007)
37. Hölter, P., Kunst, S., Wolloscheck, T., Kelleher, D.K., Sticht, C., Wolfrum, U., and Spessert, R. The retinal clock drives the expression of *Kcnn2*, a channel essential for visual function and cone survival. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, 53(11):6947-54 (2012)
38. Hui, E.E. and Bhatia, S.N. Micromechanical control of cell-cell interactions. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United State of America**, 104:5722–5726 (2007)
39. Ito, A., Jitsunobu, H., Kawabe, Y., and Kamihira, M. Construction of heterotypic cell sheets by magnetic force-based 3-D coculture of HepG2 and NIH3T3 cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 104(5):371–378 (2007)

40. Katt, M.E., Placone, A.L., Wong, A.D., Xu, Z.S., and Searson, P.C. *In Vitro* Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 4:12 (2016)
41. Kawaguchi, N., Machida, M., Hatta, K., Nakanishi, T., and Takagaki, Y. Cell shape and cardiosphere differentiation: a revelation by proteomic profiling. **Biochemistry Research International**, 2013:730874 (2013)
42. Kelm, J.M., Timmins, N.E., Brown, C.J., Fussenegger, M., and Nielsen, L.K. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. **Biotechnology and Bioengineering**, 83(2):173–180 (2003)
43. Khetani, S.R. and Bhatia, S.N. Microscale culture of human liver cells for drug development. **Nature Biotechnology**, 26(1):120–126 (2008)
44. Kim, H.D., Lee, E.A., Choi, Y.H., An, Y.H., Koh, R.H., Kim, S.L., and Hwang, N.S. High throughput approaches for controlled stem cell differentiation. **Acta Biomaterialia**, 34:21-29 (2016)
45. Kimura, R.H., Cheng, Z., Gambhir, S.S., and Cochran, J.R. Engineered knottin peptides: a new class of agents for imaging integrin expression in living subjects. **Cancer Research**, 69:2435-42 (2009)
46. Kimura, T., Ono, S., and Kubo, T. Molecular Cloning and Sequence Analysis of the cDNAs Encoding Toxin-Like Peptides from the Venom Glands of Tarantula *Grammostola rosea*. **International Journal of Peptides**, 2012:731293 (2012)
47. King, G.F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**, 11:1469-84 (2011)
48. Kolmar, H. Biological diversity and therapeutic potential of natural and engineered cystine knot miniproteins. **Current Opinion in Pharmacology**, 9:608-14 (2009)
49. Kubo, T., Ono, S., Kimura, T., Kobayashi, S., Kondo, T., Fukuda, E., Haga, T., and Kameyama, K. Random peptide library based on spider neurotoxin, and utilization of the library in in vitro evolution directed to GPCR ligands. **Toxicon** 60: 113 (2012)
50. Kuo, M.M., Saimi, Y., Kung, C., and Choe, S. Patch clamp and phenotypic analyses of a prokaryotic cyclic nucleotide-gated K<sup>+</sup> channel using *Escherichia coli* as a host. **The Journal of Biological Chemistry**, 282(33):24294-301 (2007)

51. Lambert, B., De Ridder, L., Slegers, G., De Gelder, V., Dierckx, R.A., and Thierens, H. Screening for supra-additive effects of cytotoxic drugs and gamma irradiation in an in vitro model for hepatocellular carcinoma. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 82(2):146–152 (2004)
52. Langer, R. and Peppas, N.A. Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology. **AIChE Journal**, 49:2990–3006 (2003)
53. Langer, R. and Vacanti, J.P. Tissue engineering. **Science**, 260:920–926 (1993)
54. LeCluyse, E.L. Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 13:343–368 (2001)
55. Li, H., Bowling, J.J., Su, M., Hong, J., Lee, B.J., Hamann, M.T., and Jung, J.H. Asteropsins B-D, sponge-derived knottins with potential utility as a novel scaffold for oral peptide drugs. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 1840:977-84 (2014)
56. Martinac, B., Buechner, M., Delcour, A.H., Adler, J., and Kung, C. Pressure-sensitive ion channel in Escherichia coli. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 84:2297-2301 (1987)
57. Maruyama, M., Matsunaga, T., Harada, E., and Ohmori, S. Comparison of basal gene expression and induction of CYP3As in HepG2 and human fetal liver cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 30(11):2091–2097 (2007)
58. Mathie, A. Ion channels as novel therapeutic targets in the treatment of pain. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 62(9):1089-95 (2010)
59. Middleton, R.E., Warren, V.A., Kraus, R.L., Hwang, J.C., Liu, C.J., Dai, G., Brochu, R.M., Kohler, M.G., Gao, Y.D., Garsky, V.M., Bogusky, M.J., Mehl, J.T., Cohen, C.J., and Smith, M.M. Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels. **Biochemistry**, 41:14734-47 (2002)
60. Milkman, R. An Escherichia coli homologue of eukaryotic potassium channel proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 91(9):3510-4 (1994)

61. Misonou, H., Mohapatra, D.P., and Trimmer, J.S. Kv2.1: a voltage-gated K<sup>+</sup> channel critical to dynamic control of neuronal excitability. **Neurotoxicology**, 26(5):743-52 (2005)
62. Moore, S.J., Leung, C.L., Norton, H.K., and Cochran, J.R. Engineering agatoxin, a cystine-knot peptide from spider venom, as a molecular probe for in vivo tumor imaging. **PLoS. One**, 8: e60498 (2013)
63. Nakanishi, J., Takarada, T., Yamaguchi, K., and Maeda, M. Recent advances in cell micropatterning techniques for bioanalytical and biomedical sciences. **Analytical Sciences**, 24:67–72 (2008)
64. Neher, E. and Sakmann, B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. **Nature**, 260(5554):799-802 (1976)
65. Nyga, A., Neves, J., Stamati, K., Loizidou, M., Emberton, M., and Cheema, U. The next level of 3D tumour models: immunocompetence. **Drug Discov Today**, pii: S1359-6446(16)30115-5 (2016)
66. Ono, S., Kimura, T., and Kubo, T. Characterization of voltage-dependent calcium channel blocking peptides from the venom of the tarantula *Grammostola rosea*. **Toxicon**, 58:265-76 (2011)
67. Ostrow, K.L., Mammoser, A., Suchyna, T., Sachs, F., Oswald, R., Kubo, S., Chino, N., and Gottlieb, P.A. cDNA sequence and in vitro folding of GsMTx4, a specific peptide inhibitor of mechanosensitive channels. **Toxicon**, 42:263-74 (2003)
68. Park, J.H., Carlin, K.P., Wu, G., Ilyin, V.I., Musza, L.L., Blake, P.R., and Kyle, D.J. Studies examining the relationship between the chemical structure of protoxin II and its activity on voltage gated sodium channels. **Journal of Medicinal Chemistry**, 57:6623-31 (2014)
69. Park, H.G., Kyung, S.S., Lee, K.S., Kim, B.Y., Choi, Y.S., Yoon, H.J., Kwon, H.W., Je, Y.H., and Jin, B.R. Dual function of a bee (*Apis cerana*) inhibitor cysteine knot peptide that acts as an antifungal peptide and insecticidal venom toxin. **Developmental and Comparative Immunology**, 47:247-53 (2014)
70. Pawar, V.K., Meher, J.G., Singh, Y., Chaurasia, M., Surendar, R.B., and Chourasia, M.K. Targeting of gastrointestinal tract for amended delivery of protein/peptide

- therapeutics: strategies and industrial perspectives. **Journal of Controlled Release**, 196:168-83 (2014)
71. Piccini, J.P., Whellan, D.J., Berridge, B.R., Finkle, J.K., Pettit, S.D., Stockbridge, N., Valentin, J.P., Vargas, H.M., and Krucoff, M.W. Current challenges in the evaluation of cardiac safety during drug development: translational medicine meets the Critical Path Initiative. **American Heart Journal**, 158:317-326 (2009)
  72. Pimentel, C., Choi, S.J., Chagot, B., Guette, C., Camadro, J.M., and Darbon, H. Solution structure of PcFK1, a spider peptide active against *Plasmodium falciparum*. **Protein Science**, 15:628-34 (2006)
  73. Priest, B.T., Blumenthal, K.M., Smith, J.J., Warren, V.A., and Smith, M.M. ProTx-I and ProTx-II: gating modifiers of voltage-gated sodium channels. **Toxicon**, 49:194-201 (2007)
  74. Reinwarth, M., Nasu, D., Kolmar, H. and Avrutina, O. Chemical synthesis, backbone cyclization and oxidative folding of cystine-knot peptides: promising scaffolds for applications in drug design. **Molecules**, 17:12533-52 (2012)
  75. Saez, N.J., Senff, S., Jensen, J.E., Er, S.Y., Herzig, V., Rash, L.D., and King, G.F. Spider-venom peptides as therapeutics. **Toxins**, 2:12, 2851-71 (2010)
  76. Santos, J.S., Lundby, A., Zazueta, C., and Montal, M. Molecular template for a voltage sensor in a novel K<sup>+</sup> channel. I. Identification and functional characterization of KvLm, a voltage-gated K<sup>+</sup> channel from *Listeria monocytogenes*. **The Journal of General Physiology**, 128(3):283-92. (2006)
  77. Schmalhofer, W.A., Calhoun, J., Burrows, R., Bailey, T., Kohler, M.G., Weinglass, A.B., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., Koltzenburg, M., and Priest, B.T. ProTx-II, a selective inhibitor of NaV1.7 sodium channels, blocks action potential propagation in nociceptors. **Molecular Pharmacology**, 74:1476-84 (2008)
  78. Schrempf, H., Schmidt, O., Kümmerlen, R., Hinnah, S., Müller, D., Betzler, M., Steinkamp, T., and Wagner, R. A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. **EMBO Journal**, 14(21):5170-8 (1995)
  79. Schroeder, C.I. and Craik, D.J. Therapeutic potential of conopeptides. **Future Medicinal**

**Chemistry**, 4:1243-55 (2012)

80. Shah, R.B., Ahsan, F., and Khan, M.A. Oral delivery of proteins: progress and prognostication. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, 19:135-69 (2002)
81. Shieh, C.C., Coghlan, M., Sullivan, J.P., and Gopalakrishnan, M. Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic Opportunities. **Pharmacological Reviews**, 52(4): 557-594 (2000)
82. Silverman, A.P., Levin, A.M., Lahti, J.L., and Cochran, J.R. Engineered cystine-knot peptides that bind alpha(v) beta (3) integrin with antibody-like affinities. **Journal of Molecular Biology**, 385:1064-75 (2009)
83. Shou, S.F. Potential strategies for minimizing mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4. **Current Pharmaceutical Design**, 14(10):990–1000 (2008)
84. Smith, J.J., Herzig, V., King, G.F., and Alewood, P.F. The insecticidal potential of venom peptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 70:3665-93 (2013)
85. Sommerhoff, C.P., Avrutina, O., Schmoldt, H.U., Gabrijelcic-Geiger, D., Diederichsen, U. and Kolmar, H. Engineered cystine knot miniproteins as potent inhibitors of human mast cell tryptase beta. **Journal of Molecular Biology**, 395:167-75 (2010)
86. Souriau, C., Chiche, L., Irving, R., and Hudson, P. New binding specificities derived from Min-23, a small cystine-stabilized peptidic scaffold. **Biochemistry**, 44:7143-55 (2005)
87. Stricher, F., Huang, C.C., Descours, A., Duquesnoy, S., Combes, O., Decker, J.M., Kwon, Y.D., Lusso, P., Shaw, G.M., Vita, C., Kwong, P.D., and Martin, L. Combinatorial optimization of a CD4-mimetic miniprotein and cocrystal structures with HIV-1 gp120 envelope glycoprotein. **Journal of Molecular Biology**, 382:510-24 (2008)
88. Suchyna, T.M., Johnson, J.H., Hamer, K., Leykam, J.F., Gage, D.A., Clemo, H.F., Baumgarten, C.M., and Sachs, F. Identification of a peptide toxin from *Grammostola spatulata* spider venom that blocks cation-selective stretch-activated channels. **Journal of General Physiology**, 115:583-98 (2000)
89. Sugiura, S., Edahiro, J., Kikuchi, K., Sumaru, K., and Kanamori, T. Pressure- driven perfusion culture microchamber array for a parallel drug cytotoxicity assay.

- Biotechnology and Bioengineering**, 100(6):1156–1165 (2008)
90. Sumaru, K., Edahiro, J., Ooshima, Y., Kanamori, T., and Shinbo, T. Manipulation of living cells by using PC-controlled micro-pattern projection system. **Biosensors and Bioelectronics**, 22:2356–2359 (2007)
  91. Sumaru, K. and Kanamori, T. Optimal design of bio-hybrid systems with a hollow fiber scaffold: Model analysis of oxygen diffusion/consumption. **Biochemical Engineering Journal**, 20:127–136 (2004)
  92. Tada, Y., Sumaru, K., Kameda, M., Ohi, K., Takagi, T., Kanamori, T., and Yoshimi, Y. Development of a photoresponsive cell culture surface: regional enhancement of living-cell adhesion induced by local light irradiation. **Journal of Applied Polymer Science**, 100:495–499 (2006)
  93. Tamura, T., Sakai, Y., and Nakazawa, K. Two-dimensional microarray of HepG2 spheroids using collagen/polyethylene glycol micropatterned chip. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 19:2071–2077 (2008)
  94. Terstappen, G.C. and Reggiani, A. In silico research in drug discovery. **Trends in Pharmacological Sciences**, 22(1):23-6 (2001)
  95. Truong-Le, V., Lovalenti, P.M., and Abdul-Fattah, A.M. Stabilization Challenges and Formulation Strategies Associated with Oral Biologic Drug Delivery Systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 93:95-108 (2015)
  96. Uozumi, N. *Escherichia coli* as an expression system for K (+) transport systems from plants. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 281(3):C733-9 (2001)
  97. Werle, M. and Bernkop-Schnurch, A. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. **Amino. Acids**, 30:351-67 (2006)
  98. Werle, M., Kafedjiiski, K., Kolmar, H., and Bernkop-Schnurch, A. Evaluation and improvement of the properties of the novel cystine-knot microprotein McoEeTI for oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, 332:72-9 (2007)
  99. Werle, M., Kolmar, H., Albrecht, R., and Bernkop-Schnurch, A. Characterisation of the barrier caused by lumenally secreted gastro-intestinal proteolytic enzymes for two novel cystine-knot microproteins. **Amino Acids**, 35:195-200 (2008)

100. Werle, M., Schmitz, T., Huang, H.L., Wentzel, A., Kolmar, H., and Bernkop-Schnurch, A. The potential of cystine-knot microproteins as novel pharmacophoric scaffolds in oral peptide drug delivery. **Journal of Drug Targeting**, 14:137-46 (2006)
101. Woodley, J.F. Enzymatic barriers for GI peptide and protein delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, 11:61-95 (1994)
102. Yajuan, X., Xin, L., and Zhiyuan, L. A comparison of the performance and application differences between manual and automated patch-clamp techniques. **Current Chemical Genomics**, 6:87-92 (2012)
103. Yang, J., Yamato, M., Shimizu, T., Sekine, H., Ohashi, K., Kanzaki, M., Ohki, T., Nishida, K., and Okano, T. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. **Biomaterials**, 28:5033–5043 (2007)
104. Yoshida, M., Nakata, M., Yamato, S., Dezaki, K., Sugawara, H., Ishikawa, S.E., Kawakami, M., Yada, T., and Kakei, M. Voltage-dependent metabolic regulation of Kv2.1 channels in pancreatic beta-cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 396(2):304-9 (2010)

## 6. 主要論文目録

1. Kikuchi, K., Sumaru, K., Edahiro, J., Ooshima, Y., Sugiura, S., Takagi, T., and Kanamori, T. Stepwise assembly of micropatterned co-cultures using photo-responsive culture surfaces and its application to hepatic tissue arrays. **Biotechnology and Bioengineering**, 103: 552-561 (2009) (国際誌)
2. Kikuchi, K., Sugiura, M., Nishizawa-Harada, C., and Kimura, T. The application of the *Escherichia coli* giant spheroplast for drug screening with automated planar patch clamp system. **Biotechnology Reports**, 7: 17-23 (2015) (国際誌)
3. Kikuchi, K., Sugiura, M., and Kimura, T. High proteolytic resistance of spider-derived inhibitor cystine knots. **International Journal of Peptides**, Volume 2015: Article ID 537508 (2015) (国際誌)

## 7. 参考文献目録

1. Kikuchi, K., Hirai, M., and Shiotuki, T. Molecular cloning and tissue distribution of farnesyl pyrophosphate synthase from the silkworm *Bombyx mori*. **Journal of Insect Biotechnology and Sericology**, 70:167-172 (2001) (国際誌)
2. Shiotuki, T., Bonning, B.C., Hirai, M., Kikuchi, K., and Hammock, B.D. Characterization and affinity purification of juvenile hormone esterase from *Bombyx mori*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, 64:1681-1687 (2000) (国際誌)
3. Hirai, M., Kamimura, M., Kikuchi, K., Yasukochi, Y., Kiuchi, M., Shinoda, T., and Shiotuki, T. cDNA cloning and characterization of *Bombyx mori* juvenile hormone esterase: an inducible gene by the imidazole insect growth regulator KK-42. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 32:627-635 (2002) (国際誌)
4. Takahashi, M., Kikuchi, K., Tomita, S., Imanishi, S., Nakahara, Y., Kiuchi, M., and Kamimura, M. Transient in vivo reporter gene assay for ecdysteroid action in the *Bombyx mori* silk gland. **Comparative Biochemistry and Physiology -part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 135:431-437 (2003) (国際誌)
5. Kamimura, M., Takahashi, M., Kikuchi, K., Reza, A.M.S., and Kiuchi, M. Tissue-specific regulation of juvenile hormone esterase gene expression by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in *Bombyx mori*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 65:143-151 (2007) (国際誌)
6. Sugiura, S., Edahiro, J., Kikuchi, K., Sumaru, K., and Kanamori, T. Pressure-driven perfusion culture microchamber array for a parallel drug cytotoxicity assay. **Biotechnology and Bioengineering**, 100:1156-1165 (2008) (国際誌)
7. Yamaguchi, S., Yamahira, S., Kikuchi, K., Sumaru, K., Kanamori, T., and Nagamune, T. Photocontrollable dynamic micropatterning of non-adherent mammalian cells using a photocleavable poly (ethylene glycol) lipid. **Angewandte Chemie International Edition in English**, 51:128-131 (2012) (国際誌)
8. Sumaru, K., Kikuchi, K., Takagi, T., Yamaguchi, M., Satoh, T., Morishita, K., and Kanamori, T. On-demand killing of adherent cells on photo-acid-generating culture substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, 110:348-352 (2013) (国際誌)

## 8. 学位論文審査

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

|    |              |    |             |
|----|--------------|----|-------------|
| 主査 | 千葉大学大学院薬学研究院 | 教授 | 山口直人 (薬学博士) |
| 副査 | 千葉大学大学院薬学研究院 | 教授 | 村山俊彦 (薬学博士) |
| 副査 | 千葉大学大学院薬学研究院 | 教授 | 伊藤素行 (医学博士) |
| 副査 | 千葉大学大学院薬学研究院 | 教授 | 伊藤晃成 (薬学博士) |
| 副査 | 千葉大学大学院薬学研究院 | 教授 | 川島博人 (薬学博士) |

## 9. 謝辞

この論文の執筆にあたり、多くの方々の御支援・御協力を賜りました。謹んで御礼申し上げます。

要領を得ない私に親切に根気強く博士論文執筆の御指導御鞭撻頂いた千葉大学大学院薬学研究院 山口直人教授に深謝いたします。お忙しい中、審査を引き受けて頂いた千葉大学大学院薬学研究院 村山俊彦教授，伊藤素行教授，伊藤晃成教授，川島博人教授に感謝申し上げます。また，今回，博士号取得のチャンスを与えて頂いた産総研 創薬研究部門の福田道子先生に心より感謝申し上げます。

在職中，広い裁量権と研究する機会を与えて頂いた産総研 医薬品アッセイデバイス研究グループの金森敏幸研究グループ長，実験を支えて頂いた須丸公雄上級主任研究員，杉浦慎治主任研究員，高木俊之主任研究員とメンバーの方々に感謝申し上げます。論文の使用許諾をして頂いた産総研 ペプチド創薬ラボの木村忠史主任研究員とメンバーの方々に感謝します。産総研内での私の処遇について便宜を図って頂いた第二事業所の方々には大変お世話になりました。現在，博士号取得を応援して頂いている産総研機能造形研究グループの花田幸太郎上級主任研究員に御礼申し上げます。

最後に，問題児を並ならぬ苦勞で“普通”まで育て上げた両親と，論文執筆中の家事手抜きを笑って許容し，深夜まで資料のコピーに付き合ってくれた夫・正紀に感謝します。

本博士論文は筆者が国立研究開発法人産業技術総合研究所に在職中に行った研究をまとめたものである。光応答細胞培養表面による研究は **Industrial Technology Research Grant Program from the New Energy Development Organization (NEDO)**と **Japan Science and Technology Agency (J.S.T.)**のスタートアップ支援で行われた。大腸菌パッチクランプとクモ毒由来ペプチドの研究は **JSPS** 科研費と産総研ベンチャータスクフォースの支援で行われた。