



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第1705号
学位記番号	第351号
氏名	川崎 桂輔
授与年月日	平成31年3月25日
学位論文の題名	改変遺伝子導入培養細胞系を利用した新規2ポアドメイン型カリウムチャネル作用薬の探索方法の開発と応用
論文審査担当者	主査： 平嶋 尚英 副査： 山村 壽男, 青山 峰芳, 中川 秀彦

名古屋市立大学 学位論文

改変遺伝子導入培養細胞系を利用した
新規 2 ポアドメイン型カリウムチャネル作用薬の探索方法の開発と応用

平成 30 年度 (2019 年 3 月)

川崎 桂輔

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野
(指導： 山村 壽男 教授)

**Development of a novel cell-based assay system for compounds acting on
two-pore domain K⁺ channels**

Keisuke Kawasaki

Department of Molecular and Cellular Pharmacology,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Nagoya City University

(Thesis Adviser: Professor Hisao Yamamura)

一、本論文は 2019 年 3 月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 平嶋 尚英 教授

副査 山村 壽男 教授

副査 青山 峰芳 教授

副査 中川 秀彦 教授

二、本論文は、学術誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

基礎となる報文

1. Kawasaki K, Suzuki Y, Yamamura H, Imaizumi Y

Development of a novel cell-based assay system for high throughput screening of compounds acting on background two-pore domain K⁺ channels.

SLAS Discovery, 24(6):641-652, 2019

2. Kawasaki K, Suzuki Y, Yamamura H, Imaizumi Y

Rapid Na⁺ accumulation by a sustained action potential impairs mitochondria function and induces apoptosis in HEK293 cells expressing non-inactivating Nav1.5 channel.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 513(1):269-274, 2019

三、本論文の基礎となる研究は、山村壽男教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

目次

第 1 章 序論	1
1-1 2 ポアドメイン型 K ⁺ チャネル (K _{2P} チャネル)	1
1-2 K _{2P} チャネルの機能と生理的意義	3
1-3 イオンチャネルを標的としたハイスループットスクリーニング (HTS) の現状	4
1-4 新たな HTS 方法の開発の経緯・本研究について	5
1-5 イオン恒常性の破綻による細胞死	6
第 2 章 実験方法	7
2-1 不活性化が非常に遅い変異型 Na ⁺ チャネルの構築	7
2-2 本研究における技術の核となる「脱分極刺激で誘発される活動電位により細胞死が引き起こされる細胞 (試験細胞)」の樹立	8
2-3 組み換えウイルスベクターの構築、及び遺伝子導入	9
2-4 whole-cell patch clamp 法による細胞膜電位及び電流の測定	11
2-5 MTT アッセイによる細胞生存率の測定	11
2-6 新規スクリーニング方法のプロトコル	11
2-7 膜電位感受性蛍光色素を用いた膜電位測定	12
2-8 蛍光色素を用いたミトコンドリアの膜電位測定法	12
2-9 Ca ²⁺ 感受性色素を用いた細胞内 Ca ²⁺ 濃度の測定	13
2-10 細胞死の測定	13
2-11 ルシフェラーゼアッセイによる細胞内 ATP 量の測定	14
2-12 溶液組成	14
2-13 使用薬物	14
2-14 統計処理	15

第3章 実験結果及び考察	16
3-1 Ba ²⁺ による脱分極刺激により細胞死を起こす細胞株	16
3-1-1 Ba ²⁺ により試験細胞は持続的な活動電位を生じる	16
3-1-2 持続的な Na ⁺ 流入による細胞生存率への影響	17
3-1-3 要約	18
3-2 持続的な活動電位の発生による細胞死の機構の解明	19
3-2-1 持続的な活動電位発生時の細胞膜電位の脱分極、及び Na ⁺ 過剰流入が細胞に与える影響	19
3-2-2 既報における Na ⁺ と細胞死の関係性	21
3-2-3 試験細胞における細胞内 Ca ²⁺ 変化、及び LDH 漏出	22
3-2-4 試験細胞におけるホスファチジルセリン (Ptd-L-Ser) の露出	23
3-2-5 試験細胞におけるカスパーゼ活性の変化	24
3-2-6 試験細胞における細胞死の発生機序の解明	25
3-2-7 要約と考察	28
3-3 Ba ²⁺ による脱分極刺激で死ぬ細胞を用いた、K _{2P} チャネルを標的とした新規アッセイ法の確立。	30
3-3-1 K _{2P} チャネルスクリーニング用細胞の構築のための作業仮説	30
3-3-2 K _{2P} チャネルスクリーニング用細胞の樹立	33
3-3-3 スクリーニング用細胞の膜電位測定	34
3-3-4 スクリーニング用細胞を使用した既存薬の評価	36
3-3-5 K _{2P} チャネルを定常発現したスクリーニング用細胞の作製	39
3-3-6 K _{2P} チャネル以外の K ⁺ チャネルへの応用	41
3-3-7 TASK-3 を標的としたスクリーニングのためのアッセイの大規模化とバリデーションの実施	43
3-3-8 TASK-3 チャネルを標的としたスクリーニングの実施	45

3-3-9 要約と考察	46
第4章 総括	47
第5章 謝辞	48
第6章 引用文献	49

改変遺伝子導入培養細胞系を利用した
新規 2 ポアドメイン型カリウムチャネル作用薬の探索方法の開発と応用

川崎 桂輔

K_{2P} チャネルは細胞外の pH、温度、脂質、機械刺激など、多くの因子によりチャネル活性を変化させる性質を持つ特徴的な K^+ チャネルである。 K_{2P} チャネルの多くは静止膜電位において開口しており、リーク K^+ 電流を担うことで、膜電位及び発火閾値の制御に加え、膜電位の再分極にも寄与している。さらに、 K_{2P} チャネルは K^+ の輸送を始め、細胞容量の調節により、多様な細胞の機能の維持にも関わっている。近年の研究により、 K_{2P} チャネルは様々な疾患との関連性が示唆されていることから、 K_{2P} チャネルは有望な創薬標的として注目されている。しかし、コストとデータの正確性の観点から K^+ チャネルを標的としたハイスループットスクリーニング (HTS) を完全に満足させる方法は存在していなかった。

本研究室ではこれまでに、イオンチャネルを標的とした HTS 方法を開発し、hERG チャネルを始めとした複数の電位依存性 K^+ チャネルに適応可能であることを示してきた。本研究においては以上の方法を改良し、高効率かつ高正確性である新規の方法を開発した。そして、現状では K_{2P} チャネルに選択的な作用薬の報告は少ないため、本研究では K_{2P} チャネル作用薬を発見する目的で、開発した方法を用いて実際に TASK-3 チャネルを標的としたスクリーニングを行った。その結果、87 のヒット候補化合物が得られ、パッチクランプ法を用いた 2 次評価の結果より、これらの化合物群の内から TASK-3 チャネル阻害作用を有するものを見出した。

以上より本方法は、 K_{2P} チャネルを標的とした HTS における新規の重要な選択肢となりうると思われる。

第1章 序論

1-1 2ポアドメイン型 K⁺チャネル (K_{2P}チャネル)

K⁺チャネルは活動電位の波形及び持続時間の形成、静止膜電位の制御、内分泌の調節、上皮細胞機能、さらに Ca²⁺活性化 K⁺チャネルにおいては興奮刺激の減衰において重要な機能を担っている¹。K⁺チャネルは構造的な差異から現在、Ca²⁺活性化 K⁺チャネル、内向き整流性 K⁺チャネル、2ポアドメイン型 K⁺チャネル、及び電位依存性 K⁺チャネルの4つのファミリーに分類されている²⁻⁵。K⁺チャネルはほぼすべての細胞において発現しており、細胞内においてはこれらの多様な K⁺チャネルが協奏して様々な生体機能を厳密に制御している。

K_{2P}チャネルは6つのサブファミリーに分類され、15種類のサブタイプが存在している(表1)。K_{2P}チャネルはこれらのサブタイプの内の一つである TWIK-1 (Tandem of pore domains in a weak inward rectifying K⁺ channel) が DNA データベースマイニングにより最初に発見された⁶。その後、合計14個のサブタイプがクローニングされ、構造と機能の類似性から TREK (TWIK-related K⁺ channel)、TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel)、TALK (TWIK-related alkaline pH-activated K⁺ Channel)、THIK (Tandem pore domain halotane-inhibited K⁺ channel)、TRESK (TWIK-related spinal cord K⁺ channel) の6個のサブファミリーに分類された。

K_{2P}チャネルは4つの膜貫通部位を持ち、2つのポアドメインを有する構造が特徴的な K⁺チャネルである(図1)。K_{2P}チャネル分子間で Cap と呼ばれる構造が疎水性相互作用して Coiled-Coil 構造を作ることによって2量体を形成し、機能的な K⁺チャネルが構築される⁷。生体内において、K_{2P}チャネルは細胞外の pH、温度、脂質、機械刺激など、多くの因子によりチャネル活性を変化させる性質を持つ²。そして、K_{2P}チャネルの多くは静止膜電位において開口しており、リーク K⁺電流を担うことで、膜電位及び発火閾値の制御に加え、膜電位の再分極にも寄与している⁸。これにより、K_{2P}チャネルは多様な細胞の機能の維持に関わっていることが明らかとなっている⁹。

表 1 K_{2P} チャンネルの分類と特徴 (Enyedi, P., et al., *Physiol. Rev.*, 2010 を参考に作製)

サブファミリー	分子名	遺伝子名	イオンチャネルの特徴
TWIKファミリー	TWIK-1	KCNK1	イオンチャネルとしての機能は不明な点が多い。
	TWIK-2	KCNK6	
		KCNK7	
TREKファミリー	TREK-1	KCNK2	揮発性麻酔薬、不飽和脂肪酸、機械刺激、温度により活性化される。
	TREK-2	KCNK10	
	TRAAK	KCNK4	
TALKファミリー	TASK-2	KCNK5	細胞外塩基性化により活性化される。
	TALK-1	KCNK16	
	TALK-2	KCNK17	
TASKファミリー	TASK-1	KCNK3	細胞外酸性化により阻害される。
	TASK-3	KCNK9	
	TASK-5	KCNK15	イオンチャネルの機能は見られない。
THIKファミリー	THIK-1	KCNK13	アラキドン酸により活性化される。
	THIK-2	KCNK12	イオンチャネルの機能は見られない。
TRESKファミリー	TRESK	KCNK18	細胞内Ca ²⁺ 濃度の上昇により活性化。

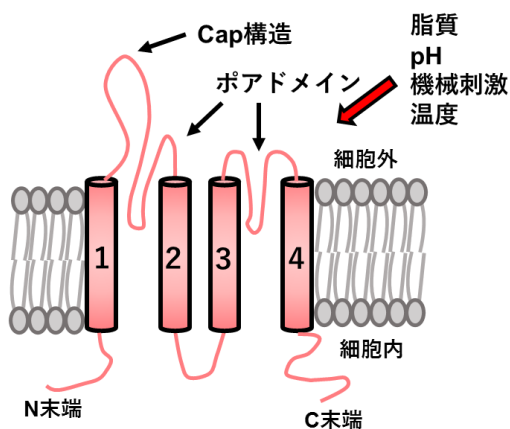


図 1 2ポアドメイン型 K⁺チャンネルの構造的特徴

2ポアドメイン型 K⁺チャンネル (K_{2P}チャンネル) は4回膜貫通型のカリウムチャンネルであり、1つのチャンネルサブユニット内に2つのポアドメインを含む。第1膜貫通領域と1つ目のポアドメインの間に大きな細胞外ループを持つ。ループ中に含まれる Cap 構造が疎水性相互作用により、2分子間で Coiled-Coil 構造を構築することで2量体となり、K_{2P}チャンネルは機能的なカリウムチャンネルを形成する。K_{2P}チャンネルは pH、温度、脂質、機械刺激など、多くの因子により制御される。

1-2 K_{2P} チャネルの機能と生理的意義

近年の研究から、K_{2P} チャネルは循環器疾患、神経疾患、代謝疾患に関与していることが明らかとなっており、重要な創薬標的として注目されている。慢性心房細動を発症した患者の心房筋においては TASK-1 チャネルの発現量が増大し（発作性心房細動患者においては 37.4 %、慢性心房細動の患者においては 64.0 % の発現量の増大がウェスタンプロット法により観察された。）、TASK-1 チャネルの電流は 3.1 倍に増加していた。これにより、活動電位持続時間が短縮されることで、心房細動が悪化すると考えられている^{10, 11}。以上より、TASK-1 チャネル選択的阻害薬は慢性心房細動の新規治療薬として期待されている。また、伸展刺激により活性化される K_{2P} チャネルの 1 つである TREK-1 は、ヒトの心房筋及び心室筋において機能発現しており、心臓の拍動を電気刺激として変化しフィードバックする機構に関与していることが示唆されていることから¹⁰、TREK-1 チャネルも不整脈の治療標的として注目されている。

副腎皮質球状層においては、TASK-1 チャネル及び TASK-3 チャネルが発現していることが報告されている¹²。副腎皮質球状層はレニン-アンジオテンシン系により制御を受けてアルドステロンを産生することで血圧を調節する組織である。昇圧ホルモンのアンジオテンシン II により、TASK チャネルの機能が抑制され、副腎皮質球状層細胞の膜電位が脱分極する¹³。以上の機構により、TASK-1 チャネルは、アルドステロンの分泌を制御していることが示唆されていることから、特発性高アルドステロン症に関与している可能性が示されている^{14, 15}。

TREK-1 チャネル及び TRAAK チャネルは脊髄後根神経節の神経細胞において高発現している^{16, 17}。そして、TREK-1 チャネルノックアウトマウスにおいては熱、及び疼痛刺激に対する感受性が亢進していた¹⁶。TRAAK チャネルノックアウトマウスにおいても痛覚過敏、及び熱に対する感受性の亢進を示した¹⁷。さらに、TREK-1 及び TRAAK チャネルダブルノックアウトマウスにおいてはより強い痛覚・温感の亢進が見られた¹⁷。以上のことから TREK-1 チャネル及び TRAAK チャネルは疼痛知覚において重要な役割を果たしており、急性及び慢性の疼痛疾患の創薬標的として非常に有望であると考えられている。

その他にも多くの K_{2P} チャネルのサブタイプにおいて、表 2 のように様々な疾患との関連性が示唆されている。以上から、K_{2P} チャネルはこれらの疾患の有望な創薬標的として注目されている。

表 2 K_{2P}チャネルと関連疾患

阻害によって治療効果が期待できるものを青字で、活性化によって効果が期待できるものを黒字で示した。

関連疾患	関連するK _{2P} チャネル	引用	
中枢神経系	うつ病	TREK-1, TREK-2, TASK-3	Heurteaux et al., 2006, Enyedi et al., 2010, Bayliss et al., 2008, Borsoatto et al., 2015
	虚血性疾患	TREK-1, TREK-2, TASK-1, TASK-2, TASK-3	Bayliss et al., 2008, Es-Salah-Lamoureux et al., 2010, Ehling et al., 2015
	てんかん	TREK-1, TREK-2, TASK-2	Es-Salah-Lamoureux et al., 2010
	不安症	TASK-1	Es-Salah-Lamoureux et al., 2010
	全身麻酔	TREK-1, TREK-2, TASK-2	Heurteaux et al., 2004, Franks et al., 2004
	片頭痛	TRESK	Enyedi et al., 2015
疼痛	TREK-1, TRAAK, TRESK	Alloui et al., 2006, Honore, 2007, Noel et al., 2009, Devilliers et al., 2013	
循環器系	高血圧	TREK-1, TASK, TWIK-2	Blondeau et al., 2007, Bayliss et al., 2008
	肺性高血圧	TWIK-2	Enyedi et al., 2010, Pandit et al., 2014
	慢性心房細動	TASK-1	Schmitt et al., 2014, Schmitt et al., 2015
	遺伝性不整脈	TALK-2	Schmitt et al., 2014, Friedrich et al., 2014
悪性腫瘍	TWIK-1(前立腺癌)、TREK-1(前立腺癌、食道扁平上皮癌)、TASK-3(乳癌、肺癌)、THIK-1(乳管癌、滑膜肉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍)	Enyedi et al., 2010, Es-Salah-Lamoureux et al., 2010	
免疫疾患	TASK-1, TASK-3, TREK-1	Es-Salah-Lamoureux et al., 2010, Enyedi et al., 2010, Ehling et al., 2015	
無精子症	TALK-2, TRAAK	Dube et al., 2008	

1-3 イオンチャネルを標的としたハイスループットスクリーニング (HTS) の現状

これまでに述べたように、K_{2P}チャネルの作用薬は様々な疾患において有望な創薬標的と考えられているが、これらの K_{2P}チャネルに特異性の高い化合物は未だほとんど見つかっていない。この理由として、現在、K⁺チャネルを標的とした HTS において適切でない方法が使用されることが考えられる。K⁺チャネルの HTS には、現在、Thallium (Tl⁺) flux (TF) アッセイが頻繁に用いられている^{18, 19}。TF アッセイでは、Tl⁺感受性蛍光指示薬を用いて、細胞外に添加した Tl⁺の細胞内への流入を測定している。Tl⁺は Rb⁺のような K⁺の同族元素ではないが、Rb⁺と同様に K⁺チャネルを透過する。しかし、Tl⁺は K⁺チャネルの活性を変化させること²⁰や、K⁺チャネル以外のイオンチャネルにおいて高い透過性を示すことが報告されており²¹、その挙動は K⁺のものとは明らかに異なる。さらに、K⁺チャネルの膜電位を深くするという本来の機能は、K⁺の流出が重要であるにも関わらず、TF アッセイは Tl⁺の流入方向のイオンの流れしか測定をする

ことができない。以上の理由から、TF アッセイは、データの正確性という点において K^+ チャネルの HTS に適しているとは言えない。したがって、 K_{2P} チャネルを標的とした創薬には K^+ チャネルの静止膜電位の形成といった、 K^+ 本来の機能を正確に測定することができる方法でスクリーニングをすることが必要である。膜電位感受性蛍光色素を用いたアッセイ法は、高いスループットを有するが、アーチファクトの生じる危険性がしばしば指摘されている。一方で、イオンチャネル機能アッセイ法のゴールドスタンダードであるオートパッチクランプ法は、データの正確性は非常に高いものの、データの取得にかかる費用が膨大である。したがって、15 種類存在する K_{2P} チャネル全てに対し、化合物の作用を網羅的にプロファイリングすることは大変困難である。以上より、 K_{2P} チャネルの HTS を完全に満足させる方法は未だ存在せず、静止膜電位の形成という K^+ チャネルの本来の機能を正確に測定することができ、同時に低コストかつ高効率である方法が求められている。

1-4 新たな HTS 方法の開発の経緯・本研究について

これまでに本研究室では改変遺伝子導入培養細胞系を用いて、脱分極刺激による 1 発の活動電位発生により細胞死を起こすモデル細胞を作製し、本細胞が hERG チャネルを始め、多くの電位依存性 K^+ チャネルに対する化合物の評価に応用できることを示してきた²²⁻²⁴ (図 2)。本方法は、イオンチャネルを介したイオンの流れによる膜電位変動を細胞死として容易かつ正確に検出できるセルベースドアッセイ系 (特許第 5884222 号 「イオンチャネルに作用する化合物のスクリーニング用材料及びその利用」) であるが、細胞に活動電位を惹起させるために白金双極電極を用いて電気刺激を加える必要がある。そのために、ハイスループット化のために電気刺激用の特殊な装置が必要であるという課題を抱えていた。

そこで、本研究ではこれまでに開発した方法を基にして、創薬標的として注目されている K_{2P} チャネルの HTS に応用可能なセルベースドアッセイ系を新たに考案し、スループット及び簡便性の向上を目指した。さらに、実際に化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを実施した。

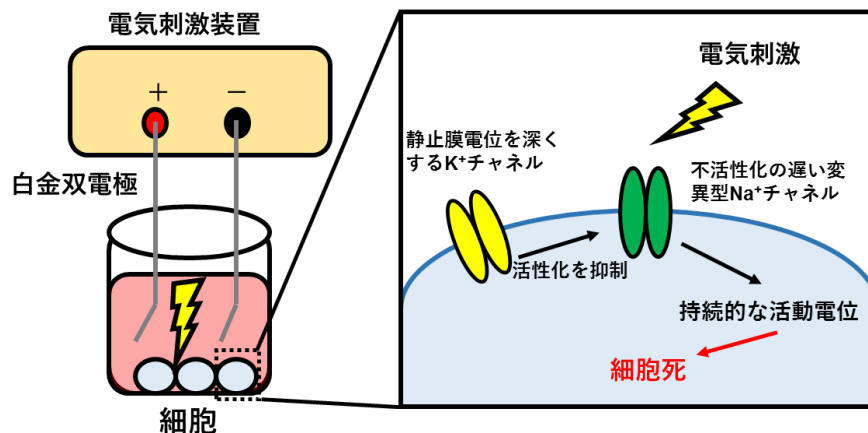


図2 本研究室においてこれまでに開発してきたスクリーニング方法で使用する核となる技術「一発の活動電位で細胞死を起こす細胞」の概要図

本細胞は不活性化の遅い変異型 Na^+ チャンネルと静止膜電位を深くする K^+ チャンネルを定常発現させた細胞である。この細胞に脱分極刺激を与えることで変異型 Na^+ チャンネルが活性化し、持続的な活動電位が生じる。これにより Na^+ が急激に流入することで、細胞内イオン恒常性が破綻し細胞死が引き起こされる。（特許第 5884222 号「イオンチャンネルに作用する化合物のスクリーニング用材料及びその利用」）

1-5 イオン恒常性の破綻による細胞死

アポトーシスは非常に緻密に制御されたプログラムに基づく細胞死であり、生体のホメオスタシスを維持する上で無くてはならない重要な細胞機能である。今日までの研究により、イオンの流出入により細胞質及び細胞内オルガネラのイオン濃度、細胞容量、そして細胞膜電位が変動することが、細胞死において不可欠なプロセスであることが明らかにされている。さらに、癌などのアポトーシスが障害された組織においては、そのほとんどがイオンチャンネルの発現変化を伴っていることも多く報告されている²⁵。以上より、アポトーシスにおいてイオンの変動は重要な役割を担っていることが分かる。アポトーシスと最も関連が深いイオンは Ca^{2+} であり、現在も多くの研究がなされている。一方で Na^+ に関しては報告が少なく、 Na^+ のアポトーシスに対する関与は未だ不明な点が多い。そこで、本研究においては、 Na^+ の大量流入により試験細胞に生じる現象を詳細に調べた。

第 2 章 実験方法

2-1 不活性化が非常に遅い変異型 Na⁺チャンネルの構築

電位依存性 Na⁺チャンネル (Nav チャンネル) は 24 回膜貫通型の Na⁺チャンネルであり、6 つの膜貫通セグメント (TM) が 4 回繰り返された構造をしている (図 3)。図のように Nav チャンネルを 4 つのドメインに分類すると、それぞれの 4 回目の膜貫通セグメント (TM4) は正電荷を多く帯びている。TM4 が電位センサーとして機能することで、Nav チャンネルは電位依存性のイオンチャンネルとして働く。Nav チャンネルの第 3 ドメイン (D3) と第 4 ドメイン (D4) の間にあるリンカーに疎水性アミノ酸残基であるイソロイシン、フェニルアラニン、メチオニンの 3 つが含まれる IFM モチーフが存在する。IFM モチーフを全てグルタミン (IFM/QQQ) に置換することで、Nav チャンネルの不活性化が非常に遅くなることが報告されている^{26, 27}。本研究では hNav1.5 チャンネルをベースにして不活性化が非常に遅い変異型 Na⁺チャンネル (IFM/QQQ チャンネル) を作製し、実験に用いた。

IFM/QQQ チャンネルを含む哺乳類細胞発現コンストラクトは、Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて、pcDNA3.1(+) に組み込まれた hNav1.5 (NM_198056.2) を鋳型として部分的に塩基配列に変異を加えることで作製された。IFM/QQQ チャンネルの作製に用いたプライマーは以下に示した。

¹⁴⁸⁵IFM/QQQ 変異導入用プライマー

5' - ttagggggccaggaccaacaacagacagaggagcagaa - 3'

5' - ttctgctcctctgtctgttggtggtcctggccccctaa - 3'

IFM/QQQ チャンネルは本研究室において藤井博士により作製された²⁴。

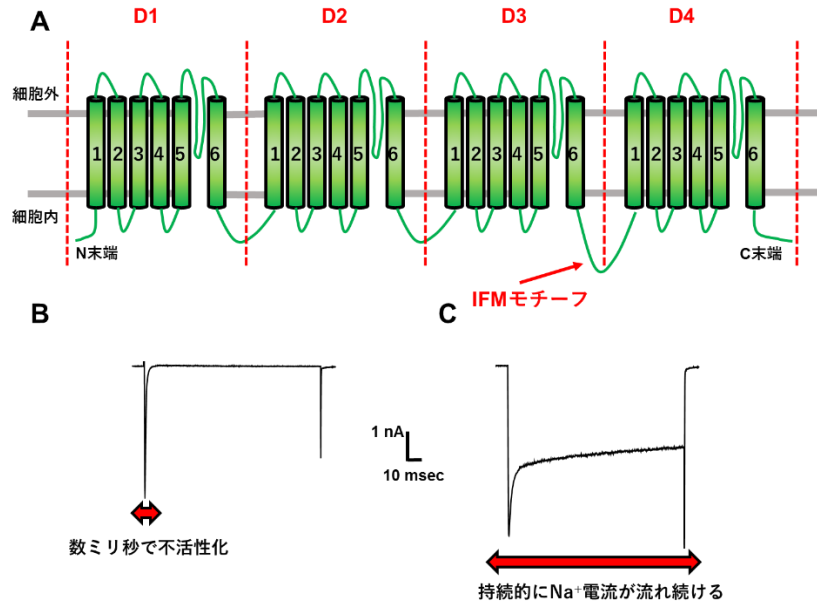


図3 不活性化が非常に遅い変異型ナトリウムチャンネル (IFM/QQQ チャンネル)

A: 電位依存性 Na⁺チャンネルの構造の模式図を示した。電位依存性ナトリウムチャンネル (Nav チャンネル) は6個の膜貫通セグメント (TM) を1つの単位として、4個のドメイン (D1~D4) より構成されている。TM4は正電荷を帯びた残基が多く含んでおり、電位センサーとして機能する。Nav1.5 チャンネルの D3 と D4 の間にあるリンカー部分には3つの疎水性残基のイソロイシン (I1485)、フェニルアラニン (F1486)、メチオニン (M1487) で構成される IFM モチーフが存在する。IFM モチーフは Nav チャンネルの不活性化において重要な役割を担っているため、Nav チャンネルにおいてこれらのアミノ酸をすべてグルタミン (I1485Q, F1486Q, M1487Q) に置換されることで不活性化が非常に遅くなる²⁶。本研究においては以上の変異型ナトリウムチャンネルを IFM/QQQ チャンネルと表記し、実験に用いた。

B: 野生型の Nav1.5 チャンネルのホールセルパッチクランプ法により測定される代表的な電流を示した。

C: 変異型 Na⁺チャンネル (IFM/QQQ チャンネル) のホールセルパッチクランプ法により測定される代表的な電流を示した。

2-2 本研究における技術の核となる「脱分極刺激で誘発される活動電位により細胞死が引き起こされる細胞 (試験細胞)」の樹立

試験細胞の樹立において使用された細胞株は、ヒト胎児腎由来細胞株 (HEK293 細胞) であり、ヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手した。

HEK293 細胞は 10 % Fatal Bovine Serum (FBS) (Invitrogen, Sigma, もしくは GIBCO)、10 mg/mL penicillin (和光純薬)、10 mg/mL streptomycin (明治製菓) を加えた Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (和光純薬) を使用して 5% CO₂ インキュベーター内で培養した。

試験細胞は HEK293 細胞に 2 つの下記のように 2 つの遺伝子を定常発現させることで、本研究室において藤井博士により樹立された²⁴。1 つ目の遺伝子である hKir2.1 (NM_000891.2) の cDNA を pcDNA3.1/zeo(+) にサブクローニングして作製した哺乳類発現コンストラクトを、Lipofectamine2000 (Invitrogen) を使用したリポフェクション法により HEK293 細胞にトランスフェクションし、後に 0.2 g/L zeocin (Thermo Fisher Scientific) を含有する培地に交換することで zeocin 耐性株を選出し、クローン化することで Kir2.1 定常発現細胞を得た。さらに、IFM/QQQ チャネルの cDNA を pcDNA3.1(+) にサブクローニングして構築した IFM/QQQ の哺乳類発現コンストラクトを Lipofectamine2000 によるリポフェクション法により Kir2.1 定常発現細胞にトランスフェクションし、後に 2 g/L G418 (和光純薬) を含有する培地に交換することで G418 耐性株を選出し、クローン化することで Kir2.1 及び IFM/QQQ チャネルの定常発現細胞 (試験細胞) を樹立した。Kir2.1 及び野生型 hNav1.5 チャネルを定常発現する Nav1.5WT+Kir2.1 細胞も同様の方法で作製した。これらの定常発現細胞は、導入した遺伝子の発現低下を防ぐために、実験時以外は常に 0.1 g/L zeocin、1 g/L G418、10 % FBS を添加した D-MEM を使用して培養した。しかし、試験細胞を長期間培養することにより IFM/QQQ チャネルの電流が顕著に減少する傾向があった。変異型 Na⁺チャネルの電流の減少は、mexiletine を培地に添加して培養することで回復することが報告されている^{28, 29}。そして、試験細胞においても、mexiletine を培地に添加して培養することで電流が回復した²⁴。以上の理由から、実験に使用する試験細胞は 300~600 µM mexiletine を培地に加えて培養することで、IFM/QQQ チャネルの電流を回復または維持させた。

2-3 組み換えウイルスベクターの構築、及び遺伝子導入

創薬標的である 3 つ目のイオンチャネルは、組み換えバキュロウイルスベクター、もしくは組み換えレンチウイルスベクターを使用して試験細胞に一過性又は定常的に発現させた。組み換えバキュロウイルスベクターは以下のように作製した。

組み換えバキュロウイルスベクターの構築には順天堂大学の村山尚准教授より入手した pFastBac1 (Thermo Fisher Scientific) に CMV-IE プロモーター、woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) 配列、及び VSV-G を組み込んだベクター (pFB-VSVG-CMV-WPRE) を使用した³⁰。CMV-IE プロモーターにより導入遺伝子の転写を増加させ、WPRE 配列は遺伝子転写後の mRNA の安定性を高めることにより、導入遺伝子のタンパク質発

現量を増加させる。また、VSV-G は水疱性口内炎ウイルスのエンベロープ糖タンパク質であり、ウイルスベクターの細胞への感染効率を向上させる目的で使用した。TASK-1 チャンネル (NM_002246) Δ i20 変異体³¹、TASK-3 チャンネル (NM_001282534)、TREK-1 チャンネル、Ca²⁺活性化 K⁺チャンネル (SK2 チャンネル、SK4 チャンネル)、もしくは GFP の cDNA を pFB-VSVG-CMV-WPRE に組み込み、Bac-to-Bac システム (Thermo Fisher Scientific) を使用して組み換えバキュロウイルスベクターのゲノムである Bacmid を得た。

得られた Bacmid を Sf9 細胞 (Thermo Fisher Scientific) に Cellfectin II (Thermo Fisher Scientific) を使用してトランスフェクションし、Sf-900III SFM 培地 (Thermo Fisher Scientific) 中で 3 日から 7 日間培養した。完成したバキュロウイルスベクターは細胞から培地中へ放出されるため、培養上清を回収し、1000 G, 4 °C, 10 min の条件で遠心分離し、組み換えバキュロウイルス液を得た。

試験細胞にイオンチャンネル遺伝子を導入する際には、培養培地の 10 % 以下となるようにウイルス液を加え、16 時間以上 37°C で 5 % CO₂ の条件で培養した。

レンチウイルスベクターは Addgene より入手した pLenti-puro (Addgene plasmid # 39481)³²、pMD2.G (VSV-G 発現プラスミド、Addgene plasmid # 12259)、及び psPAX2 (パッケージングプラスミド、Addgene plasmid # 12260) の 3 つを使用した。pLenti-puro に TREK-1 チャンネル、TASK-2 チャンネル、TASK-3 チャンネルをサブクローニングし、Cellmatrix Type I -C (新田ゼラチン) を使用してコラーゲンコートしたディッシュに播種した Lenti-X 293T (Clontech) に対し、Polyethylenimine (Polysciences) を使用して pMD2.G 及び psPAX2 とともにトランスフェクションを行った。その後、約 48 時間培養し、培養上清を 1250 rpm、5min の条件で遠心することで、組み換えレンチウイルス液を得た。

試験細胞にイオンチャンネル遺伝子を導入する際には、35 mm ディッシュに培養した試験細胞に対し培地の 20 分の 1 のレンチウイルス液を加え、2 日後に 2 μ g/mL puromycin (Invivogen) を添加し、薬剤耐性を獲得した細胞を選別することで TREK-1 チャンネル、TASK-2 チャンネル、TASK-3 チャンネルを定常発現した試験細胞 (スクリーニング用細胞、後述) を得た。ここで得た定常発現細胞は導入遺伝子の発現低下を防ぐために、実験時以外は常に 0.1 g/L zeocin、1 g/L G418、2 μ g/mL puromycin、10 % FBS を添加した D-MEM を使用して培養した。

2-4 whole-cell patch clamp 法による細胞膜電位及び電流の測定

細胞膜電位、及び電流は whole-cell patch clamp 法³³を用いて行った。外径 1.04~1.08 mm の芯入りガラス管からマイクロピペットプラー (P1000、Sutter Instrument) により測定ガラス電極を作製し、顕微鏡下で熱加工して実験に用いた。本実験においては、電極内を細胞内液で満たした際に電極抵抗が 2~5 M Ω であったものを使用した。細胞を播種したガラス片を測定チャンバー上に置き、チャンバーを細胞外液によって満たした。顕微鏡下において水圧式微動マニピュレーター (MMW203、成茂科学) を用いてガラス片上の細胞に測定ガラス電極を当て、パッチクランプ標本を作製した。標本より得られた信号は、パッチクランプ用の電流増幅器 (CEZ-2400 amplifier、日本光電) 及びデータ取得解析システム (Digidata 1440A 及び pClamp software ver. 10、Molecular Devices) を使用して記録・解析した。

2-5 MTT アッセイによる細胞生存率の測定

細胞生存率の測定には 3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenylterazolium (MTT, Sigma Aldrich) を用いた MTT アッセイにより行った。MTT はミトコンドリアの脱水素酵素により開裂し、紫色のホルマザン色素を生成する。その色素生成量はミトコンドリア酵素活性を持つ生細胞の数に相関することから、細胞の増殖・毒性評価に広く用いられている。

本実験においては Yamazaki らの方法を参考に MTT アッセイを実施した³⁴。PBS(-)に溶解した 5 mg/mL MTT 溶液を培地の 10 分の 1 の量 (培地 100 μ L あたり、MTT 10 μ L) となるように加え、37°C で 4 時間培養した。生成したホルマザン色素は水に不溶であり、細胞内に蓄積しているため、培地と等量の溶解液 (培地 100 μ L あたり、溶解液 100 μ L) である 20 % SDS / 50 % DMF 溶液を加え 37°C で 4 時間以上インキュベートし、色素を可溶化した。色素を完全に溶解させた後、マルチスキャン JX (Ver1.1, Thermo Labsystems) により測定波長: 595nm、参照波長: 650nm における吸光度を測定し細胞生存率を評価した。

2-6 新規スクリーニング方法のプロトコル

新規スクリーニング方法のプロトコルは以下の通りである。PLL コートをしたマルチウェルプレートに細胞を播種し、48~72 時間 37°C、5 % CO₂ の条件で培養した。組み換えバキュロウイルスベクターにより、3 番目のイオンチャンネルを発現させる場合は、細胞の播種から 24~48

時間後にウイルス液を加えた。24 ウェルプレートを用いた実験では、培養液を完全に吸引除去し、フィルター滅菌した実験用緩衝液 500 μL をウェルの壁を伝うようにできる限り静かに加え、約 15 分間静置したのちに再び吸引除去することで培養液成分を完全に洗い流した。次に、被験薬を含む実験用緩衝液 500 μL を加え、約 10 分間静置し、20 mM BaCl_2 溶液を 5 μL ずつ終濃度が 200 μM となるように各ウェルに加え、37°C で 12~16 時間培養した。後に前述の MTT アッセイにより細胞生存率の評価を行なった。

96 ウェルプレートを用いた実験では Multi Works 508 (MSTechnos) を使用して細胞の洗浄を行なった。100 μL 充填された 96 ウェルプレートに対し、すべてのウェルに同時に細胞外液 200 μL を壁面に伝わせるように可能な限り静かに加え、攪拌し、200 μL の液を静かに除いた。これを合計 6 回繰り返し、全てのウェルに同時に 2 倍濃度に調整した試薬及び 400 μM BaCl_2 を 100 μL を加え、37°C で 12~16 時間インキュベートし、MTT アッセイにより細胞生存率の評価を行なった。吸光度の測定にはマルチスキャン JX (Ver1.1)、又は ARVO MX (1420 Multilabel Counter; PerkinElmer Inc.) を使用した。

2-7 膜電位感受性蛍光色素を用いた膜電位測定

細胞膜電位の変化を膜電位感受性蛍光プローブである DiBAC₄(3) (DOJINDO) を使用して測定した。色素濃度が 100 nM となるように細胞外液に加えて細胞に負荷し、共焦点レーザー顕微鏡 (AR1、ニコン) を用いて、488 nm のレーザーで励起した時の 525~555 nm の蛍光を 5 秒毎に測定した。色素の負荷を開始したのち、蛍光強度が安定してから実験を始めた。解析は、取得した蛍光強度 (F) を、実験の最後に 140 mM K^+ HEPES を還流して細胞を近似的に 0 mV に脱分極させた際の蛍光強度 ($F_{140\text{K}}$) で規格することにより行った ($F/F_{140\text{K}}$)。

2-8 蛍光色素を用いたミトコンドリアの膜電位測定法

ミトコンドリアの膜電位は Tetramethylrhodamine, ethyl ester (TMRE、Molecular Probes) を用いて測定を行った。96 ウェルマイクロプレートに播種した細胞を「6. 新規スクリーニング方法のプロトコル」の方法により 200 μM Ba^{2+} で処置した。4 時間後に 100 nM となるように TMRE を細胞外液に加え、37°C で 30 分間インキュベートしたのち、Operetta オールインワン・ハイコンテンツイメージングシステム (PerkinElmer) を使用して測定した。

2-9 Ca²⁺感受性色素を用いた細胞内 Ca²⁺濃度の測定

細胞内 Ca²⁺濃度の測定は Fluo-4 AM (Molecular Probes) を使用して行った。PLL コートしたガラス片に播種された試験細胞に 3 μM Fluo-4 を室温で 30 分間負荷し、ガラス片を細胞外液で満たした白金双極電極付きの測定用チャンバーに移し、電気刺激装置 (SEN-3301、日本光電) により脱分極刺激を与えた。測定には共焦点レーザー顕微鏡 (AR1、ニコン) を用いて、488 nm のレーザーで励起した際の 525~555 nm の蛍光を 5 秒毎に取得した。試験細胞において持続的な活動電位が生じていることを確認する目的で膜電位感受性蛍光色素の 1 μM Oxonol V (Aldrich Chemical) を負荷し、640 nm のレーザーで励起した際の 662~737 nm の蛍光を Fluo-4 と同時に測定した。実験の最後に 10 μM ionomycin を含む 140 mM K⁺ HEPES を還流し、Fluo-4 の最大のシグナル (F_{max}) 及び細胞を近似的に 0 mV に脱分極させた際の Oxonol V の蛍光強度 (F_{140K}) を測定した。解析は、Fluo-4 ではシグナル (F) を F_{max} で規格し (F/F_{max})、Oxonol V は F_{140K} で規格することにより行った (F/F_{140K})。

2-10 細胞死の測定

細胞内から外への LDH の漏出は Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (DOJINDO) を使用した。細胞培養上清を 10 μL 採取し、384 ウェルマイクロプレートに移して反応に用いた。解析は x 時間経過時点で得られたシグナル (LDH_{xh}) を、Kit に付属の Lysis buffer を添加して 30 分間 37°C でインキュベートすることで細胞を完全に溶解し、全ての LDH を放出させたときのシグナル (LDH_{total}) により、規格することで行った (LDH_{xh}/LDH_{total})。

Ptd-L-Ser の細胞外への露出は CytoGLO pSIVA-IANBD Apoptosis / Viability Kit (Novus biologicals, LxLC) を用いて測定した。本研究においては同時に、生細胞の膜透過性がなく、死細胞の核を染色する PI (Propidium Iodide) により共染色をした。細胞膜の完全性が失われた細胞においてのみ PI により核が染色されるため、細胞膜が破綻する細胞死であるネクロシス、及び後期アポトーシスを判別する目的で使用した。蛍光の測定には Operetta オールインワン・ハイコンテンツイメージングシステムを用いてデータの取得を行った。

カスパーゼの活性は蛍光色素の SR-FLICA Poly Caspase Assay Kit (ImmunoChemistry Technologies, LLC) を用いて評価した。色素を添加し 37°C で 1 時間培養した後、Operetta オールインワン・ハイコンテンツイメージングシステムを用いて蛍光画像を取得した。

2-11 ルシフェラーゼアッセイによる細胞内 ATP 量の測定

細胞内の総 ATP 量の測定には、『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 (東洋ビーネット) を使用した。「2-6. 新規スクリーニング方法のプロトコル」に従って 96 ウェルプレートに細胞を播種したのち、溶媒もしくは 200 μM Ba^{2+} を加えた。x 時間経過時に培養上清を吸引除去し、ATP 測定試薬及び実験用緩衝液を等量混合した溶液 50 μL 加えピペッティングにより細胞をウェルから剥離し、黒色の 384 ウェルプレートに 40 μL を移し採り、1000 rpm、30 秒で遠心したのち、発光を測定した。

2-12 溶液組成

- ・ 実験用緩衝液
137 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.2 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 14 mM glucose, 10 mM HEPES (pH は NaOH を使用して 7.4 又は 8.4 に調製した。)
- ・ 膜電位、及び膜電流測定用
細胞外液：137 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.2 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 14 mM glucose, 10 mM HEPES (pH は NaOH を使用して 7.4 又は 8.4 に調製した。)
140 mM K^+ 溶液：5.9 mM NaCl, 137 mM KCl, 2.2 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 14 mM glucose, 10 mM HEPES (pH は KOH を使用して 7.4 に調製した。)
16/40/90 mM K^+ 溶液は、細胞外液と 140 mM K^+ 溶液を一定の比率で混合することにより調製した。
細胞内液：140 mM KCl, 4 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 2 mM Na_2ATP , 0.05 mM EGTA (pH は KOH を使用して 7.2 に調製した。)
- ・ SK チャネル電流測定用
細胞外液：137 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.2 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 14 mM glucose, 10 mM HEPES (pH は NaOH を使用して 7.4 に調製した。)
細胞内液：140 mM KCl, 2.8 mM MgCl_2 , 4.2 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, 2 mM Na_2ATP , 5 mM EGTA (pH は KOH を使用して 7.2 に調製した。pCa は 6.0 に固定した。)

2-13 使用薬物

塩化バリウム、塩化コリン、Staurosporine (和光純薬)

メキシレチン塩酸塩、Gramicidin、8-Br-cAMP、UCL1684 (Sigma-Aldrich)

Ionomycin, NS309 (Alomone)

ML365, PK-THPP, DCEBIO (Tocris Bioscience)

TRAM34 (Santa Cruz Biotechnology)

Losartan potassium (LKT Laboratories)

Atropine sulfate monohydrate (東京化成工業)

2-14 統計処理

実験の結果は全て平均値±標準誤差として表記した。二群の標本間の有意差検定は F 検定の後、t 検定を行った。多群の標本間の比較には ANOVA の後、Tukey の多重比較法を行った。図における記号の*及び#は危険率 5 %、**及び##は危険率 1 %で有意な差があることを表す。用量作用曲線 (Dose-Response curve) は Hill の式 ($y = 1 / \{1 + (D/EC_{50})^n\}$, $y = A + (1-A) / \{1 + (D/IC_{50})^n\}$) によりフィッティングを行うことで算出した。

D: 薬物濃度、EC₅₀: 50 %有効濃度、IC₅₀: 50 %阻害濃度、A:薬物非感受性成分、n: ヒル係数

第3章 実験結果及び考察

3-1 Ba²⁺による脱分極刺激により細胞死を起こす細胞株

3-1-1 Ba²⁺により試験細胞は持続的な活動電位を生じる

本研究で主に使用している細胞は①静止膜電位を深くする内向き整流性 K⁺チャンネル (Kir2.1 チャンネル) と、②不活性化の遅い変異型電位依存性 Na⁺チャンネル (IFM/QQQ チャンネル) を定常発現させた HEK293 細胞 (以下、「試験細胞」) である。ホールセルパッチクランプ法により求められた試験細胞の静止膜電位は -78.4 ± 1.6 mV (n=6) であった (図 4)。ネルンストの式より算出される K⁺の平衡電位は -80.9 mV であることから、試験細胞においては Kir2.1 チャンネルが高発現しているため、静止膜電位が非常に深く維持されていることが示された。試験細胞に $100 \mu\text{M}$ Ba²⁺を添加することで、細胞膜電位が徐々に上昇していくのが見られた。そして、膜電位がある一定の値に到達したところで、急激かつ持続的な脱分極が見られた。Ba²⁺処置後に見られた膜電位のピークの値は $+40.0 \pm 2.1$ mV (n=6) であった (図 4)。ネルンストの式により算出された Na⁺の平衡電位である $+90.8$ mV に非常に近づいた点、膜電位が 0 mV を上回っている点から、試験細胞において Ba²⁺処置により生じた持続的な脱分極は Na⁺の透過性の亢進による持続的な活動電位であることが示唆された。

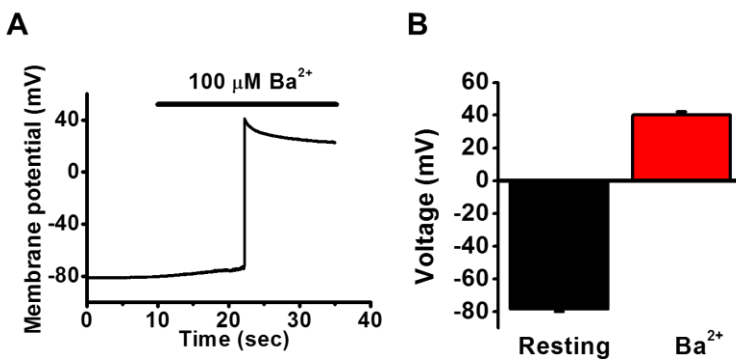


図 4：試験細胞 (Kir2.1 チャンネル及び IFM/QQQ チャンネル) におけるホールセルパッチクランプ法を用いた電気生理学的解析

ホールセルパッチクランプ法の電流固定モードにより試験細胞の膜電位の解析を行なった。A： $100 \mu\text{M}$ Ba²⁺の処置による細胞膜電位の経時変化、B：静止膜電位、及び Ba²⁺添加後に観察された脱分極のピークの膜電位をそれぞれ示した (n=6)。

3-1-2 持続的なNa⁺流入による細胞生存率への影響

持続的な活動電位が生じることで細胞に何らかの影響を与えると考え、MTT アッセイ法を用いて細胞の生存率を測定した。MTT アッセイにおいては、細胞内の脱水素酵素により MTT が還元され有色のホルマザン色素を生じるため、生きている細胞のみが色素により染色される。Ba²⁺添加前はほとんどの細胞が染色されており、細胞が生存しているが、200 μM Ba²⁺処置後は未染色の細胞が急増することから、細胞死が亢進していることが明らかとなった(図 5A)。溶解液によりホルマザン色素を溶出させ、吸光度を測定することで細胞生存率を測定した(図 5B)。コントロールの細胞生存率を 1 とし、解析をしたところ Ba²⁺処置により細胞の生存率が 0.37±0.0071 となり、約 63 %の細胞が死んでいることが明らかとなった。電位依存性 Na⁺チャネルの阻害薬である 300 μM メキシレチン塩酸塩(MEX)を添加することで細胞の生存率は 0.97±0.011 となり、Ba²⁺により誘発された細胞死がほぼ完全に抑制される結果となったことから、Ba²⁺により誘発される細胞死は IFM/QQQ チャネルの活性化により引き起こされていることが示された。さらに、Ba²⁺存在下における細胞生存率の用量作用曲線を取得したところ IC₅₀ 値は 36.0±3.0 μM となった(図 5C)。ホールセルパッチクランプ法により得られた Kir2.1 チャネルに対する Ba²⁺の IC₅₀ 値は 16.2 μM³⁵ と報告されており、今回得られた IC₅₀ 値と非常に近いことから Ba²⁺による Kir2.1 チャネルの阻害が起点となり、深く維持されていた膜電位が脱分極し、IFM/QQQ チャネルが活性化することで細胞死を引き起こしていることが示唆された。

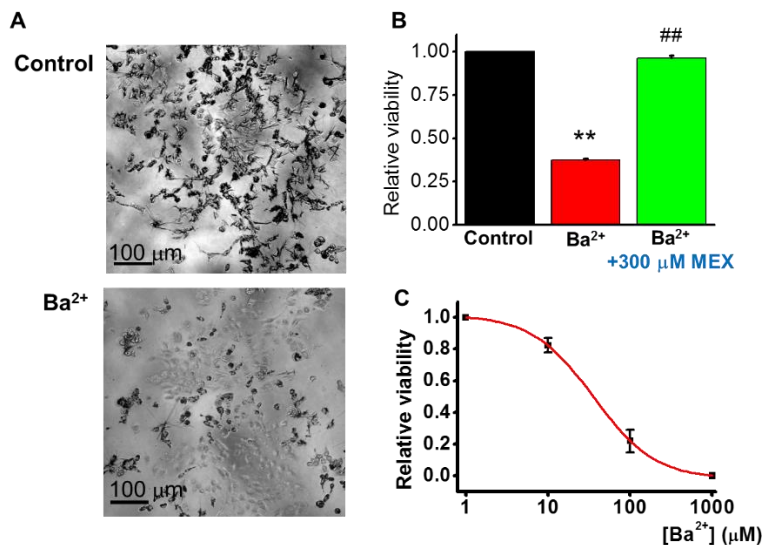


図 5 : 試験細胞における持続的な活動電位が細胞の生存率に与える影響の解析

MTT アッセイにより細胞の生存率を測定した。A : MTT により染色された細胞の画像。B : 溶解液により細胞内のホルマザン色素を溶出させ、色素の吸光度を測定することで細胞の生存率を測定した (n=6)。生存率は全て Ba²⁺非処置群により規格した。**P<0.01 vs. control, ##P<0.01 vs. Ba²⁺, C : Ba²⁺により引き起こされる細胞生存率の低下に対し用量作用曲線を求めた。図は 3 回の独立した実験により求められた解析結果を表している (N=3)。

MEX : 300 μM メキシレチン塩酸塩 (電位依存性 Na⁺チャネルの阻害薬)

3-1-3 要約

得られた結果を以下に要約した（図6）。

- ① Ba²⁺が Kir2.1 チャンネルを阻害することで試験細胞の脱分極を起こした。
- ② 細胞膜の脱分極により IFM/QQQ チャンネルが活性化し、持続的な活動電位が生じた。
- ③ IFM/QQQ チャンネルの活性化により細胞死が引き起こされた。

以上より、試験細胞は脱分極を IFM/QQQ チャンネルが感知することで細胞死を起こすことが明らかとなった。したがって、試験細胞は膜電位の変化を細胞の生死という形で検出することができるため、細胞膜電位を制御するイオンチャンネルの評価に応用できることが示唆された。

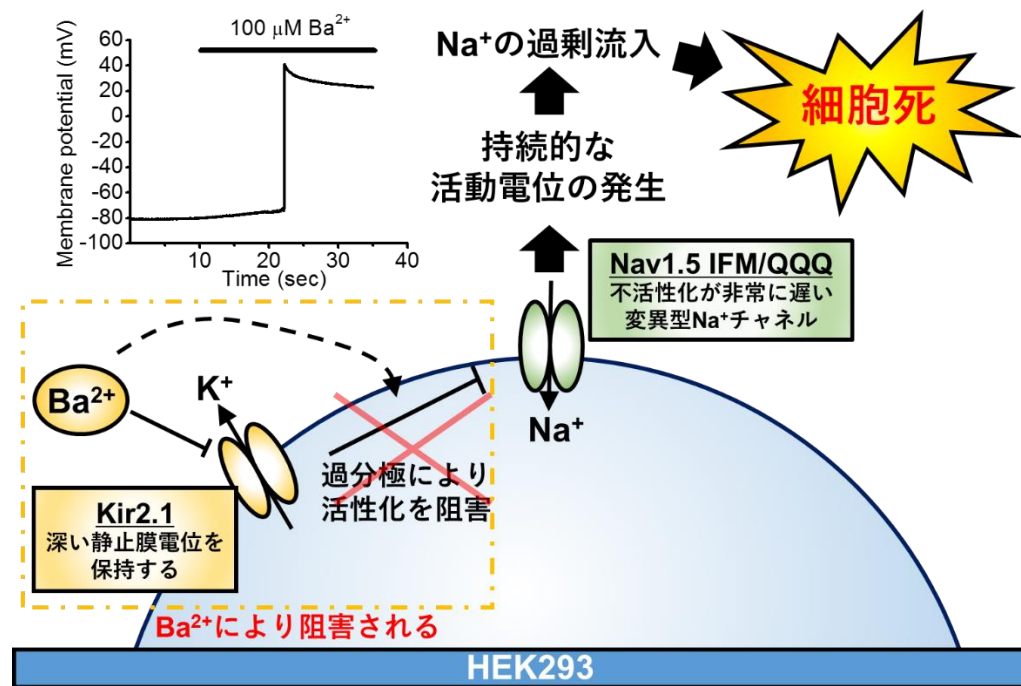


図6：試験細胞における Ba²⁺による細胞死発生の模式図

試験細胞においては Kir2.1 チャンネルにより静止膜電位が深く維持されているため、通常時は IFM/QQQ チャンネルは活性化しないように抑えられている。ここに比較的 Kir2.1 チャンネルに選択性が高い阻害薬である Ba²⁺を処置することで、深く維持されていた静止膜電位が脱分極し、IFM/QQQ チャンネルが活性化する。IFM/QQQ チャンネルは不活性化が非常に遅い変異型 Na⁺チャンネルであるため、持続的に活動電位を起こし続ける。これにより、細胞内に過剰の Na⁺イオンが流入し、細胞内のイオンのホメオスタシスが破綻することで細胞死が引き起こされると考えられる。

3-2 持続的な活動電位の発生による細胞死の機構の解明

3-2-1 持続的な活動電位発生時の細胞膜電位の脱分極、及び Na^+ 過剰流入が細胞に与える影響

本論文においては試験細胞が持続的な活動電位を生じることで、なぜ細胞死を生じるのかという疑問点について追究した。 Ba^{2+} 処置後に生じる現象は、①持続的な膜電位の脱分極、及び②持続的な活動電位中に生じる Na^+ の過剰な流入の2つのステップに大きく分けられることから、以上の2点と細胞死の関連性について検証した。細胞外の K^+ 濃度を上げることで、細胞内外の K^+ の濃度勾配を減少させ、ネルンストの式に対応した細胞膜電位の脱分極を惹起することが可能である。これを利用し、細胞外の K^+ 濃度を、通常 K^+ 濃度の 5.9 mM から 16, 40, 90 mM と段階的に引き上げ、疑似的な細胞膜電位の持続的な脱分極状態を HEK293 細胞に与えたが、細胞死は起こらなかった(図 7A)。したがって、脱分極そのものは細胞死を引き起こさないことが明らかとなった。 Ba^{2+} による細胞死は4時間という短い時間の中で生じ、 Na^+ チャネルの阻害薬であるメキシレチン塩酸塩の処置により図 5B と同様に抑制された(図 7B)。さらに、 Na^+ 蛍光指示薬を用いた細胞内 Na^+ 濃度測定により、脱分極刺激を与えることで試験細胞の細胞内 Na^+ 濃度が急速かつ持続的に上昇することが明らかとなった(図 7C, D)。刺激後、細胞内 Na^+ 濃度の上昇が定常状態を迎えた時点で、 Na^+ を含めた一価のカチオンのイオノフォアである 10 μM gramicidin を処置してもこれ以上の蛍光強度の増大は見られなかったため、試験細胞の細胞内 Na^+ 濃度は、細胞外の Na^+ と同じ 140 mM まで上昇していると考えられる。以上より、試験細胞は Ba^{2+} または電気刺激などの脱分極刺激により、持続的な活動電位が生じ、細胞内 Na^+ 濃度が上昇することで細胞死が生じていることが示唆された。

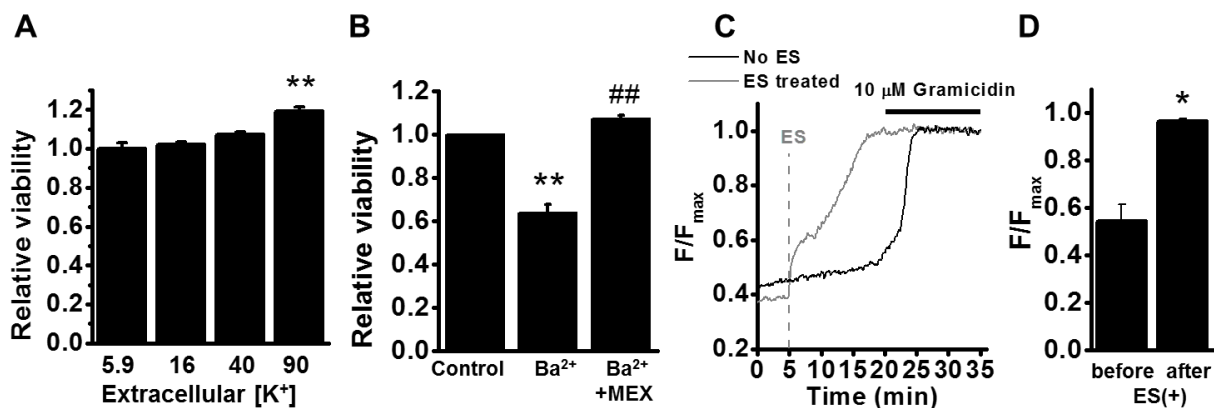


図7：持続的な脱分極、及び活動電位による細胞への影響

A：細胞外の K⁺濃度を、通常 K⁺濃度の 5.9 mM から 16、40、90 mM と段階的に引き上げ、疑似的な細胞膜電位の持続的な脱分極状態を HEK293 細胞に与えた。ネルンストの式より、細胞外 K⁺濃度を 5.9、16、40、90 mM にすることで細胞膜電位はそれぞれ約 -81、-55、-32、-11 mV となることが推測される。細胞生存率は MTT アッセイにより測定した (n=12)。細胞外の K⁺濃度を上げることによる脱分極は K⁺チャンネルを介した現象であるため、安定して脱分極状態を再現するために本実験では K⁺チャンネルを過剰発現している Kir2.1 チャンネルを定常発現した HEK293 細胞を使用した。**P<0.01 vs. 5.9 mM K⁺。

B：試験細胞に 200 μM Ba²⁺を与え、4 時間後の細胞生存率を MTT アッセイにより測定した (n=6)。生存率は全て Ba²⁺非処置群により規格した。図中の表記はそれぞれ、Ba²⁺：200 μM Ba²⁺添加群、Ba²⁺+MEX：200 μM Ba²⁺及び 300 μM メキシレチン塩酸塩処置群を示す。**P<0.01 vs. control, ##P<0.01 vs. Ba²⁺。

C：Na⁺蛍光指示薬の CoroNa Green AM を使用して細胞内 Na⁺濃度を測定した。図中における黒色の線は電気刺激 (ES) を与えていない細胞、灰色の線は ES を与えた細胞の蛍光強度の経時変化を示した。ES は白金双極電極により細胞に 200 mA, 5 msec の ES を 1 秒の間隔で 3 回与えることにより行った。図中の破線は ES を与えた時間を表す。実験の最後に一価のカチオンのイオノフォアである 10 μM Gramicidin を処置して得られた蛍光強度 (F_{max}) で規格するにより解析を行った (F/F_{max})。

D：電気刺激の前後における、CoroNa Green AM の蛍光強度の変化を示した (N=3)。*P<0.05 vs. before ES。

3-2-2 既報における Na⁺と細胞死の関係性

これまでの報告に基づき、Na⁺の流入に関連した細胞死の代表的な機構として以下の2つの経路が考えられる。

①Na⁺流入が脱分極を引き起こし、電位依存性 Ca²⁺チャネルなどを活性化させること、又は細胞内 Na⁺濃度の上昇により Na⁺/Ca²⁺交換体のリバースモードが活性化されることにより、細胞内に Ca²⁺が流入する。この細胞内の Ca²⁺濃度上昇により、カスパーゼなどの細胞死シグナルが活性化されることで細胞死が引き起こされる経路（図 8A）。

Na⁺チャネルが高発現し活動電位を起こすような細胞においては、電位依存性 Ca²⁺チャネルの発現も豊富である場合が多い。この場合は心筋、神経、分泌細胞が最も良い例であると思われる。よって、Na⁺濃度の上昇を伴う程の Na⁺チャネルのバースト様の活性化が引き起こされた際には、細胞膜の脱分極も同時に起こり、Ca²⁺チャネルが活性化されるため、細胞内に Ca²⁺が流入する³⁶。これにより細胞内の Ca²⁺濃度は上昇し、ミトコンドリアの Ca²⁺取り込みが促進されることによるミトコンドリア膜透過性遷移孔（MPTP）の開口が細胞のアポトーシスを誘発する²⁵。

②細胞内に Na⁺が流入することで K⁺、Cl⁻などの他のイオン及び水分子の移動を伴い、浸透圧異常が生じることにより、細胞死シグナルが働く経路（図 8B）。

アポトーシスを起こした細胞においては、イオンの移動が生じ細胞容積が減少しており³⁷、さらに、細胞のホメオスタシス維持機能である、細胞容積の変化そのものがアポトーシスに関連していると報告がなされている。アポトーシスのシグナルを与えた細胞においては細胞容積の低下が引き起こされるが、細胞容積調節に関与する Cl⁻チャネルや K⁺チャネルを阻害するとシトクロム c 放出、カスパーゼの活性化、DNA ラダーの形成などのアポトーシス反応が抑制されることが報告されている^{38, 39}。ただし、Na⁺の流入は他のイオンの動きと共同して浸透圧を調節している印象が強く、Na⁺流入そのものが起点となって細胞死が引き起こされるのかは明らかにされていない。そして、アポトーシスのみではなく、本細胞においては Na⁺が激しく流入するため、イオン及び水分子が過剰に流入することで、浸透圧異常により細胞膜が破壊されるネクローシスの経路も考えられる。本論文では以上の2つの経路を念頭に、急速な Na⁺流入と細胞死の関係性を検証した。

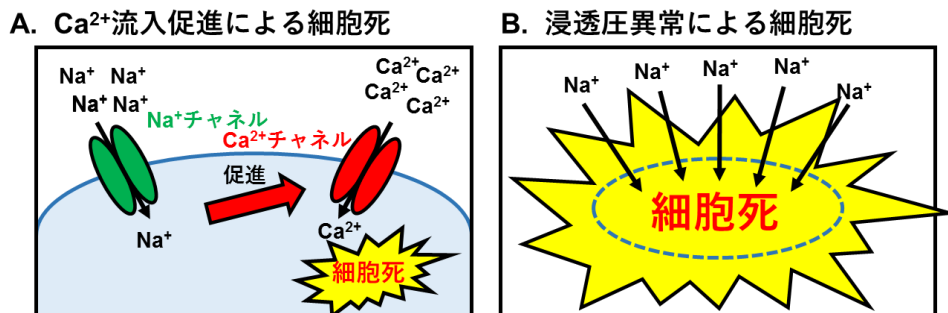


図 8 : 現在までに報告されている細胞内 Na⁺濃度上昇による細胞死発生の機構

これまでに報告されている Na⁺に関連した細胞死機構の概略を示した。

A : Na⁺流入が脱分極を引き起こし Ca²⁺チャネルを活性化させる、又は細胞内 Na⁺濃度の上昇により Na⁺/Ca²⁺交換体のリバースモードが活性化されることにより、細胞内に Ca²⁺が流入し、細胞死シグナルが活性化される経路。細胞死の際には Ca²⁺の流入が伴うことが多く、多くの報告がなされている。

B : 細胞内に Na⁺が流入することで他のイオン及び水分子の移動を伴い、浸透圧異常が生じることで細胞死が引き起こされる経路。

3-2-3 試験細胞における細胞内 Ca²⁺変化、及び LDH 漏出

Ca²⁺感受性蛍光色素の Fluo-4 AM 使用して細胞内 Ca²⁺濃度の測定を行った。本実験においては膜電位感受性蛍光色素の Oxonol V を Fluo-4 AM と同時に負荷することで、試験細胞において電気刺激により持続的な活動電位が起こっていることを確認し、持続的な活動電位が発生した細胞の細胞内 Ca²⁺濃度を解析した (図 9A)。電気刺激の前後で蛍光強度に差は見られなかったため、持続的な活動電位発生の発生により、細胞内 Ca²⁺は変化しないことが明らかとなった (図 9B)。よって、本細胞においては仮説①とは異なり、Ca²⁺濃度上昇を伴わない細胞死であることから、仮説②における細胞死経路を検証した。200 μM Ba²⁺処置による持続的な活動電位の誘発より、12 時間後まで細胞内からの LDH 漏出を伴わなかったため、Na⁺の過剰流入による細胞死はネクローシスが主な経路ではないことが示唆された (図 9C)。

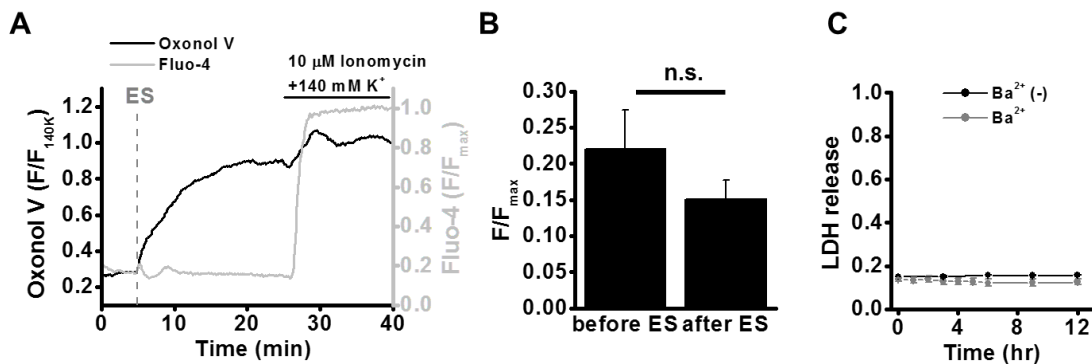


図9：細胞内 Ca²⁺変化、及び LDH 漏出の測定

Ca²⁺感受性蛍光色素、及び共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内 Ca²⁺濃度の測定を行った。

A：Fluo-4の経時変化を図に示した。蛍光色素のシグナルが安定したところで、200 mA、5 msecの電気刺激(ES)を1秒間隔で3回与えることで、細胞膜電位の脱分極を惹起した。実験の最後にCa²⁺のイオノフォアである10 μM Ionomycinを加え、強制的にCa²⁺を細胞内に流入させることでFluo-4の最大のシグナル(F_{max})を取得した。Fluo-4の蛍光強度は全て10 μM Ionomycin処置後の蛍光強度(F_{max})で規格した(F/F_{max})。同時に、細胞外K⁺濃度を140 mM (140 mM K⁺)にすることで、疑似的に細胞膜電位を0 mVにして、蛍光強度が上昇することを観察し、色素が正しく細胞内に負荷されていることを確認した。Oxonol Vの蛍光強度は全て140 mM K⁺における蛍光強度(F_{140K})で規格した(F/F_{140K})。

B：電気刺激前、及び電気刺激後のFluo-4の蛍光強度を示した(N=5)。

C：200 μM Ba²⁺処置後のLDH漏出の経時変化を測定した。黒色の点はBa²⁺未処置の細胞(Ba²⁺(-), n=5)、灰色の点は200 μM Ba²⁺処置を行った細胞(Ba²⁺, n=8)の培養液中へのLDH放出量を表す。数値は細胞ライセートより求められた細胞内の全LDH量を1として規格した。

3-2-4 試験細胞におけるホスファチジルセリン (Ptd-L-Ser) の露出

試験細胞はネクローシスではなく、主にアポトーシスに経路により細胞死を起こしていることが予測されたため、pSIVA-IANBDを用いてPtd-L-Serの細胞外への露出を測定した(図10A)。pSIVA-IANBDは細胞外に露出したPtd-L-Serに結合すると蛍光を発する蛍光色素である。今回は同時に、生細胞の膜透過性がなく、死細胞の核を染色するPI(Propidium Iodide)により共染色を行った。細胞膜の完全性が失われた細胞においてのみPIにより核が染色されるため、細胞膜が破綻する細胞死であるネクローシス、及び後期アポトーシスにおいて蛍光が観察される。Ba²⁺処置後、16時間後には細胞のPtd-L-Serは細胞外に露出し、300 μMメキシレチンにより抑制されることが明らかとなった(図10B)。一方で、PIによる染色は、Ba²⁺処置前後、及び300 μMメキシレチン塩酸塩添加後において有意な差は見られなかった(図10C)。した

がって、細胞内への Na^+ の過剰流入による細胞死はネクローシスが主な機構ではないことが示唆され、漏出 LDH 量の測定結果と一致していた。

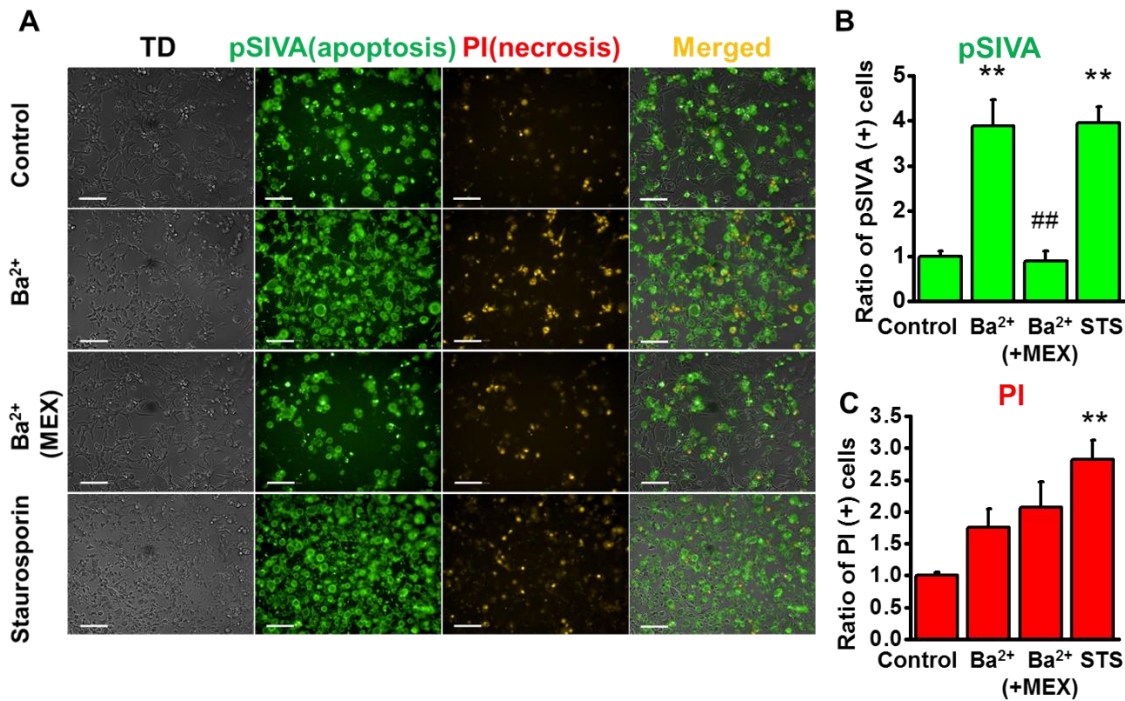


図 10：試験細胞におけるホスファチジルセリン (Ptd-L-Ser) の細胞外への露出の測定

試験細胞における細胞外への Ptd-L-Ser の露出を pSIVA-IANBD により染色した。同時にネクローシス又は後期アポトーシスにより細胞膜の完全性が失われた細胞の核のみを染色、検出する Propidium Iodide (PI) を使用して共染色を行った。

A：蛍光顕微鏡により得られた画像を示した。図中の白線は 100 μm を表す。

B：pSIVA-IANBD による染色が陽性であった細胞を計数し、Control における陽性細胞数を 1 として各群における染色が陽性であった細胞の数を示した。(n=6)。**P<0.01 vs. control, ##P<0.01 vs. Ba²⁺。

C：PI による染色が陽性であった核を計数し、Control における陽性核数を 1 として各群における染色が陽性であった細胞の量を示した。(n=6)。**P<0.01 vs. control。

Ba²⁺：200 μM Ba²⁺ 処置群、Ba²⁺(+MEX)：Ba²⁺及び 300 μM メキシレチン塩酸塩処置群、Staurosporin, STS：1 μM スタウロスポリン (アポトーシス誘導試薬) 処置群。

3-2-5 試験細胞におけるカスパーゼ活性の変化

アポトーシスの兆候を示すパラメーターとして、Ptd-L-Ser の細胞外露出、及び細胞内カスパーゼ活性の増大が広く知られている。アポトーシスの命令を実際に実行するカスパーゼ 3/6/7 を始めとして、多くのカスパーゼがアポトーシスの誘導により活性化されていることから²⁵、試験細胞においてもカスパーゼの活性化が生じているのかを、カスパーゼの活性化を感知して蛍

光を発する蛍光色素の SR-FLICA Poly Caspase Assay Kit を用いて評価した (図 11A) 。Ba²⁺処置により細胞内への Na⁺の過剰流入を起こした後、16 時間後に蛍光強度の増大が見られ、300 μM メキシレチン塩酸塩を前処置することで蛍光強度の増大は抑制された (図 11B) 。以上より、Na⁺の過剰流入によりカスパーゼの活性化が惹起されることにより、細胞のアポトーシスが誘導されていることが示唆された。

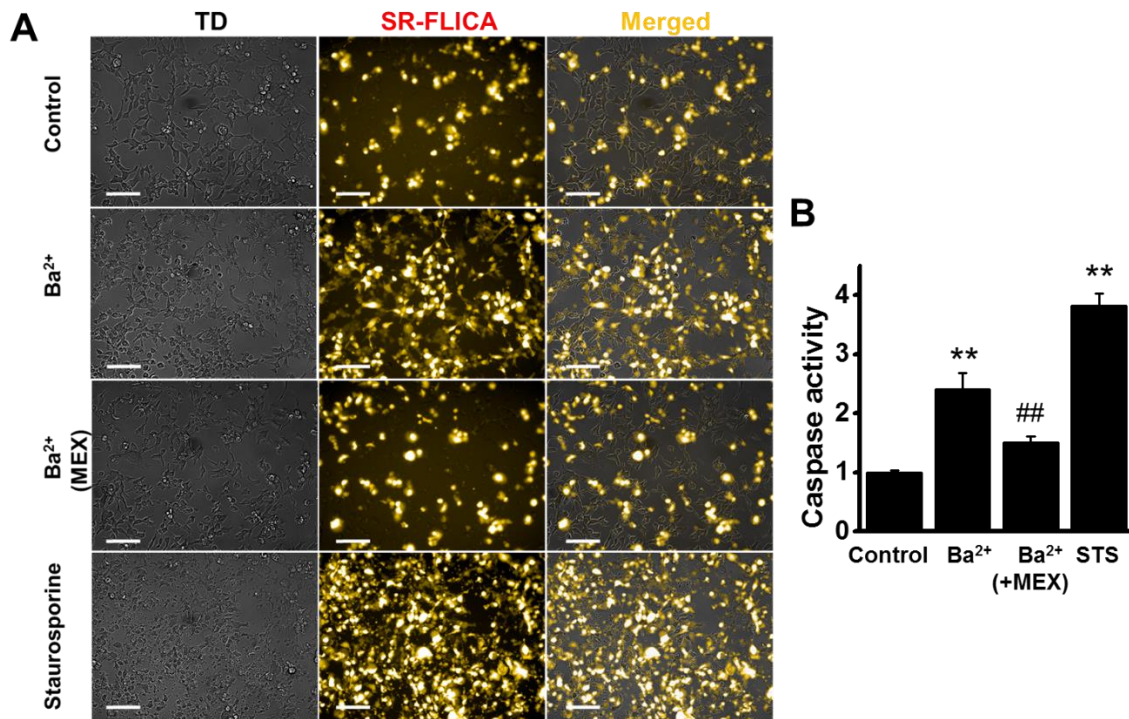


図 11 : 試験細胞におけるカスパーゼ活性の測定

試験細胞におけるカスパーゼ活性を蛍光色素である SR-VAD-FMK FLICA を使用して測定した。SR-VAD-FMK FLICA は活性型カスパーゼ量に応じて蛍光量が増大する。

A : 蛍光顕微鏡により得られた画像を示した。図中の白線は 100 μm を示す。

B : SR-VAD-FMK FLICA の蛍光強度を示した (n=4) 。データは全て Control において得られたデータで規格した。

Ba²⁺ : 200 μM Ba²⁺ 処置群、Ba²⁺(+MEX) : Ba²⁺及び 300 μM メキシレチン塩酸塩処置群、Staurosporin, STS : 1 μM スタウロスポリン (アポトーシス誘導試薬) 処置群。**P<0.01 vs. control, ##P<0.01 vs. Ba²⁺.

3-2-6 試験細胞における細胞死の発生機序の解明

試験細胞における細胞死の発生機序を明らかにするために、MTT アッセイ及び WST-8 を用いた細胞死の経時変化の解析を行った (図 12A, B) 。Ba²⁺処置後 0 時間における細胞生存率を 1 とし、MTT アッセイにより細胞の生存率を測定すると、1 時間後 0.96±0.02、2 時間後

0.94±0.01、3 時間後 0.87±0.01、4 時間後 0.80±0.01、5 時間後 0.74±0.02、6 時間後 0.66±0.03、9 時間後 0.48±0.02、12 時間後 0.38±0.02 であった (n=16)。12 時間後に細胞死の進行が完全に完了していると考え、およそ 6 時間程度で細胞死の半分が進行していることが明らかとなった。Na⁺/K⁺ ATPase の阻害薬である 1 μM Ouabain を加え、細胞内の Na⁺ の貯留を促進した状態で同様の解析を行なったところ、細胞の生存率は 1 時間後 0.88±0.02、2 時間後 0.78±0.03、3 時間後 0.65±0.03、4 時間後 0.55±0.02、5 時間後 0.49±0.02、6 時間後 0.43±0.02、9 時間後 0.29±0.02、12 時間後 0.26±0.02 であった (n=8)。1 μM Ouabain 存在下では 3~4 時間程度で細胞死が半分進行していることから、Na⁺ の貯留を促進することで細胞死が速やかに起こるようになることが明らかとなった (図 12A)。また、WST-8 アッセイにおいても MTT アッセイと同様に細胞死が検出された (図 12B)。MTT アッセイにおいて生成される色素は不溶性で、生じた結晶が細胞膜を障害することで細胞毒性を示すため⁴⁰、実際に起こっている細胞死以上に細胞死が検出されているアーチファクトの可能性が想定された。一方で WST-8 アッセイにおいて生成される色素は水溶性であるため⁴¹、MTT のような細胞毒性は示さないといわれている。したがって MTT アッセイ及び WST-8 アッセイ、以上の 2 つのアッセイにおいて同様の結果が得られたことから、MTT アッセイは本細胞の細胞死を適切に検出していることが示唆された。次に、細胞内 ATP 量の経時変化をルシフェラーゼアッセイにより測定した (図 12C)。Ba²⁺ 処置後 0 時間における ATP 量を 1 とし、ATP 量の経時変化を測定した (図 12C)。野生型の Na⁺ チャンネル (WT) を定常発現した WT+Kir2.1 細胞においては冒頭で述べた通り、野生型の Na⁺ チャンネルの不活性化が数ミリ秒で起こるため Ba²⁺ 処置を行っても Na⁺ の過剰な流入は生じないと考えられる。以上の理由から、本実験において WT+Kir2.1 細胞は Na⁺ の過剰な流入が起こらないコントロールとして使用した。3 時間時点において、WT+Kir2.1 細胞においては 200 μM Ba²⁺ の処置により ATP 量は減少しなかったが、IFM/QQQ+Kir2.1 (試験細胞) では同濃度の Ba²⁺ を処置することで ATP 量が有意に減少した (図 12D)。Ba²⁺ 未処置の WT+Kir2.1 においても、時間経過に応じた細胞内 ATP の穏やかな低下が見られた。これは、栄養豊富な細胞培養培地から、グルコース以外のエネルギー源を含まず栄養分が少ない実験用緩衝液に交換したことによる ATP 産生の減少であると考えられる。Ba²⁺ 未処置の IFM/QQQ+Kir2.1 では、Ba²⁺ 未処置の WT+Kir2.1 と比較して経時的な ATP 量の減少がより速やかであった (図 12C, D)。ATP 量の測定においては溶液の置換、ピペッティング操作による攪拌、遠心操作を行ったため、機械的な刺激が細胞に加わることが避けられなかった。それにより IFM/QQQ チャンネルが一部の細胞で活性化してしまった可能性が考えられる。以上より、IFM/QQQ チャンネルを介した急速な Na⁺ の流入が細胞

内 ATP 量の減少に寄与していることは明らかである。次に、細胞内 ATP 量の減少がミトコンドリアに起因すると考え、ミトコンドリア機能の指標である膜電位に着目した。ミトコンドリアの膜電位感受性の蛍光色素である TMRE により、試験細胞では Ba^{2+} 処置後 4 時間でミトコンドリアの膜電位は脱共役薬添加群と同じレベルにまで減少していることが明らかとなった (図 12E)。したがって、 Na^+ が貯留することでミトコンドリアを障害し、脱分極させ、ATP 産生を低下させることによるものと考えられる。

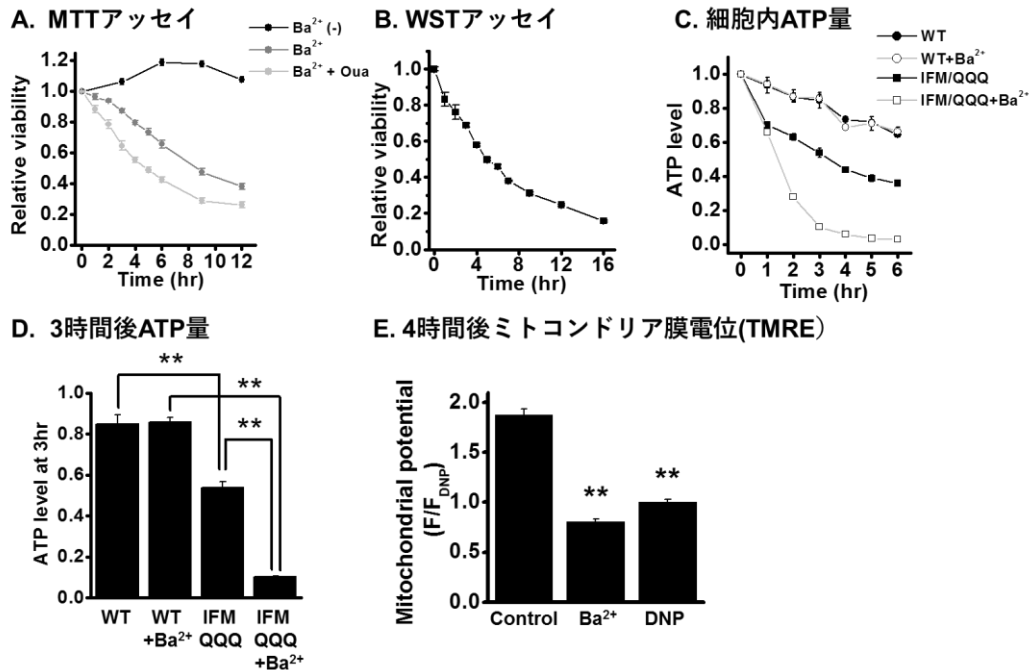


図 12 : Na^+ 過剰流入による細胞死の発生機序の解析

A : 細胞生存率の経時変化を MTT アッセイにより測定した。黒色、灰色、薄い灰色はそれぞれ Ba^{2+} 非処置群 ($Ba^{2+}(-)$, $n=5$)、 $200 \mu M Ba^{2+}$ 処置群 (Ba^{2+} , $n=16$)、 $200 \mu M Ba^{2+}$ 及び $1 \mu M$ Ouabain 処置群 ($Ba^{2+} + Ou$, $n=8$) の各時点における測定値を表す。

Ouabain : Na^+/K^+ ATPase の阻害薬。細胞内への Na^+ 貯留を促進させる目的で使用した。

B : 細胞生存率の経時変化を WST アッセイにより測定した ($n=6$)。

C : 細胞内 ATP 量の変化をルシフェラーゼアッセイにより測定した。図中の●及び○は WT+Kir2.1 細胞の $200 \mu M Ba^{2+}$ 非処置群 (WT, $n=3$) と処置群 (WT+ Ba^{2+} , $n=3$) の測定値をそれぞれ示す。図中の■及び□は IFM/QQQ+Kir2.1 細胞 (試験細胞) の $200 \mu M Ba^{2+}$ 非処置群 (IFM QQQ, $n=3$) と処置群 (IFM QQQ+ Ba^{2+} , $n=9$) の測定値をそれぞれ示す。

D : 3 時間経過時点の C で示した各群における ATP 量を比較した。 ** $P < 0.01$ 。

E : Ba^{2+} 処置後 4 時間時点におけるミトコンドリアの膜電位を TMRE により測定した。TMRE は膜電位依存的にミトコンドリアに取り込まれる蛍光色素であることから、蛍光強度が強いほど膜電位が深く保持されていることを表す ($n=12$)。データは $100 \mu M$ 2,4-Dinitrophenol (DNP) 処置により得られた値で規格した。DNP は脱共役剤でありミトコンドリアの脱分極を惹起する。 ** $P < 0.01$ 。

3-2-7 要約と考察

本研究で得られた Na^+ と細胞死の関係性について得られた知見をまとめた (図 13)。MTT アッセイによる細胞死の検出よりも早く、ミトコンドリアの膜電位の消失、及び細胞内 ATP 量の減少が見られたことから、細胞内に大量かつ急速に流れ込んだ Na^+ は最初にミトコンドリアを障害すると考えられる。今回の結果では、細胞内への Na^+ の貯留を誘発させることで、細胞内 ATP が 3 時間程度で約 81 % 減少していた。これは ATP の供給が停止したのみではなく、細胞内 Na^+ 濃度が上昇したのち、イオンの恒常性を維持するために Na^+/K^+ -ATPase が働き ATP の消費量が増大するなどの ATP 需要の増加も同時に起こっているためであると思われる。細胞では Na^+/K^+ 濃度の維持に、合成した ATP の 20~30% を消費すると考えられているため⁴²、細胞内の Na^+ 濃度が上昇することにより ATP 消費量の亢進が起こり、細胞内の ATP 量の減少につながるものが推察される。このように細胞内の ATP 量が減少することで、 Na^+/K^+ -ATPase による Na^+ の汲み出しが減少し、さらに異常な Na^+ の蓄積が起こり、ミトコンドリア機能のさらなる増悪を引き起こすと考えられる。アポトーシスにおいては、そのシグナル経路の違いから①Fas などの Death Receptor により開始する外因性経路と、②ミトコンドリア及び小胞体ストレスが起点となって開始する内因性経路に分けられる²⁵。今回の実験から Na^+ の過剰流入によるアポトーシスは内因性経路で進行し、ミトコンドリアから放出される因子が、Ptd-L-Ser の細胞外への露出、カスパーゼの活性化、細胞内酵素活性の低下を引き起こしていると考えられる。

細胞内 Na^+ 濃度上昇が分単位で起こる比較的速やかな反応であるのに対して、MTT で検出される細胞死は 6 時間でようやく半分進行するのみであり非常に遅い反応であった。このように 2 つの反応の間にはラグがあるため、この間にいくつかのステップが存在する可能性がある。例えば、細胞内の K^+ が流出することでアポトーシスが生じるという報告があり⁴³、さらに Na^+ と K^+ はお互いに連関した挙動をすることから、細胞内に Na^+ が流入した後に浸透圧を維持するために K^+ が流出することでアポトーシスが誘発されている可能性が考えられる。

アポトーシスとの関連が最も深いイオンは Ca^{2+} であり、細胞質及びミトコンドリアへの Ca^{2+} の過剰な負荷がアポトーシスを引き起こすことは一般的に受け入れられているが、一方で Na^+ についてはこれまでにほとんど報告がない。本報告は急速な Na^+ の流入が Ca^{2+} とは無関係にミトコンドリアの傷害を介してアポトーシス様の細胞死を引き起こす機構が存在することを初めて示唆するものであり、例えば、電位依存性 Na^+ チャネルの過剰な活性化を伴うてんかん、脳卒中、及びその他の神経変性疾患における細胞死^{44, 45} に本機構が一部関与している可能性が考えられる。しかし、試験細胞の細胞内 Na^+ 濃度は 140 mM 程度と非常に高い値を示しているこ

とから、今回得られた結果からは Na^+ と細胞死の量的関係性は不明である。したがって、現時点では生体内における本機構の寄与率も明らかではないため、今後は Na^+ と細胞死の量的関係性に着目した研究を行う必要があると考えられる。

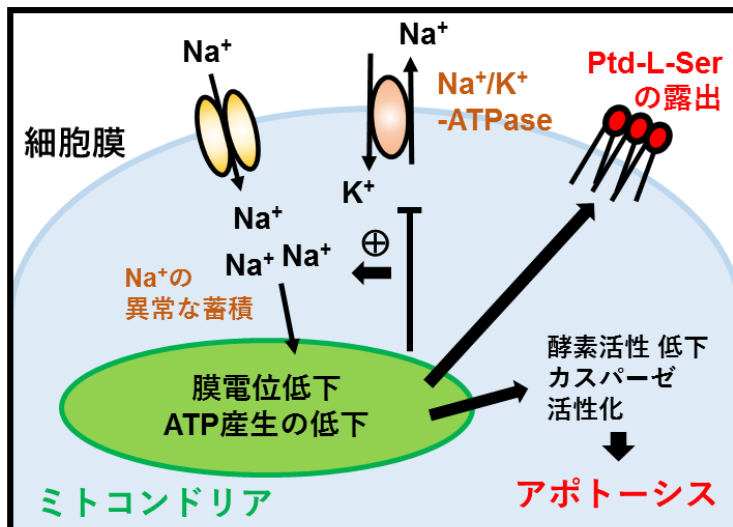


図 13 : Na^+ と細胞死の関係性

Na^+ チャネルを介した、細胞内への Na^+ の過剰な流入により、ミトコンドリアの膜電位の低下を引き起こす。これにより、ミトコンドリアの ATP 産生が低下し、ATP を利用して Na^+ を汲み出す $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ の働きが低下し、結果として Na^+ の異常な蓄積を促進することで状態の増悪が生じると考えられる。ミトコンドリアの膜電位の低下は、細胞死シグナルを入力し、① Ptd-L-Ser の露出、②酵素活性の低下、③カスパーゼの活性化を惹起することで、主にアポトーシスを誘発することが考えられる。

3-3 Ba²⁺による脱分極刺激で死ぬ細胞を用いた、K_{2P} チャンネルを標的とした新規アッセイ法の確立。

3-3-1 K_{2P} チャンネルスクリーニング用細胞の構築のための作業仮説

K_{2P} チャンネルのスクリーニングを行うために、K⁺チャンネルの Ba²⁺感受性に着目した (表 3)。K⁺と Ba²⁺はイオンの半径が類似しており、K⁺チャンネルのイオン選択フィルターと相互作用するため^{46, 47}、Ba²⁺によって全てのチャンネルが阻害される可能性があるものの、Ba²⁺感受性は K⁺チャンネルによって異なる。Kir2.1 チャンネルは Ba²⁺による IC₅₀値が 16.2±3.6 μM と報告されており³⁵、一方で K_{2P} チャンネルにおいては TASK-1 が >400 μM⁴⁸、TASK-3 が >300 μM⁴⁹、TREK-1 が 560±3 μM⁵⁰、と報告されている。さらに K_{2P} チャンネルファミリーには TRAAK チャンネルのように Ba²⁺に感受性を示さないサブタイプも存在している⁵¹。以上のように Kir2.1 チャンネルは Ba²⁺による阻害を受けやすく、一方で、K_{2P} チャンネルは阻害を受けにくい理由として、これらの K⁺チャンネルの構造上の違いにより一部説明できると考えられる。Kir2.1 チャンネルではポア領域における細胞外に面した入り口部分に負電荷を帯びたグルタミン酸残基が配置されており、陽電荷を帯びた Ba²⁺と相互作用するため、Ba²⁺による阻害を受けやすい⁵²。一方で、K_{2P} チャンネルでは細胞外に面した入り口部分の上部に External Ion Pathway (EIP) という 2つのトンネルのような構造が存在しており、物質のポア領域へのアクセスを制限することで、K_{2P} チャンネルの阻害薬感受性に影響を与えていると考えられている^{53, 54}。

このように、Kir2.1 チャンネルと K_{2P} チャンネル、両者の Ba²⁺感受性には大きな差がある。そこで、これらの Ba²⁺感受性の違いを利用して、一定濃度の Ba²⁺ (約 100~200 μM) を加えることで、Kir2.1 チャンネルのみを阻害し、K_{2P} チャンネルは阻害しない状態を作り出すことが可能であると考えた。

Channels	Gene	IC ₅₀ of Ba ²⁺	Reference
Kir2.1	KCNJ2	16.2 ± 3.6 μM	Schram et al., 2003
TREK-1	KCNK2	560 ± 3 μM	Xiao-Yun Ma et al., 2011
TRAAK	KCNK4	insensitive	Lesage et al., 2000
TASK-1	KCNK3	> 400 μM	Larkman et al., 2005
TASK-3	KCNK9	> 300 μM	Kim et al., 2000

表 3 : 各種 K⁺チャンネルに対する Ba²⁺の 50%抑制濃度 (IC₅₀値)

パッチクランプにより測定された K⁺電流の Ba²⁺感受性を示す。K_{2P} チャンネルは Kir2.1 チャンネルと比較して Ba²⁺に対する感受性が低い。

以上を参考にして、 K_{2P} チャンネルを試験細胞に導入することを検討した。Kir2.1 チャンネル、IFM/QQQ チャンネル、そして創薬標的となる K_{2P} チャンネル、の3つのイオンチャンネルを発現させた細胞（スクリーニング細胞）に対し一定濃度の Ba^{2+} を与えることで、Kir2.1 チャンネルのみが阻害され、膜電位は K_{2P} チャンネルによって制御されると考えられる。ここでさらに、 K_{2P} チャンネルの開口薬を加えると、 K_{2P} チャンネルが開口し細胞膜は過分極した状態を維持するため、IFM/QQQ チャンネルは活性化されず、スクリーニング細胞の細胞死は起こらない（図 14, 15）。一方で、 K_{2P} チャンネルの阻害薬を加えると、 K_{2P} チャンネルが阻害されることにより細胞膜は脱分極し、IFM/QQQ チャンネルが活性化されるため、スクリーニング細胞の細胞死が誘発されると想定することができる（図 14, 15）。これらの仮説が成り立つのであれば、細胞の生死という単純な情報から被験薬の K_{2P} チャンネルに対する作用を評価することが可能であると考えた。

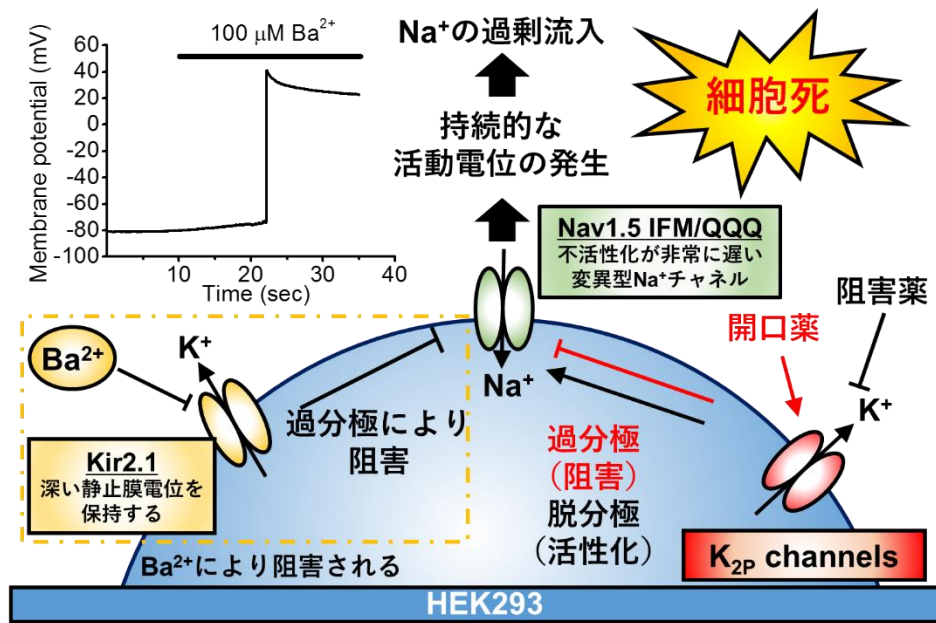


図 14 : K_{2P} チャンネルの解析を行うために樹立した細胞（スクリーニング用細胞）の作業仮説

K_{2P} チャンネルの解析を行うために考案した細胞の概要を図に示した。新規アッセイ方法において使用する細胞は、①不活性化の遅い Na^+ チャンネル（IFM/QQQ チャンネル）、②静止膜電位を深くする Ba^{2+} 感受性が非常に高い K^+ チャンネル（Kir2.1 チャンネル）、そして③創薬標的の K_{2P} チャンネルを共発現させた HEK293 細胞である。100~200 μM の Ba^{2+} を加えることで Kir2.1 のみが阻害され、 K_{2P} チャンネルはほとんど阻害されないことから、 Ba^{2+} 添加後の静止膜電位は K_{2P} チャンネルによって制御させることになる。したがって、 Ba^{2+} とともに K_{2P} チャンネルの開口薬を加えることで細胞膜電位は過分極状態を維持し、 K_{2P} チャンネルの阻害薬を加えることで脱分極する。先述の通り、脱分極は IFM/QQQ チャンネルを活性化させることで細胞死を引き起こすため、 K_{2P} チャンネルの開口薬を加えた状態では細胞死は生じず、 K_{2P} チャンネルの阻害薬を加えることによって細胞死が生じると考えられる。

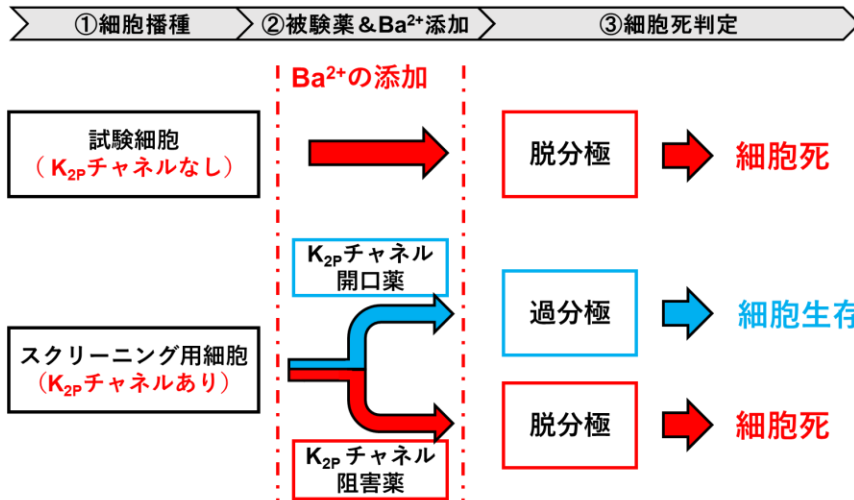


図 15 : 新規スクリーニング法で得られる結果のフローチャート

新たに開発したスクリーニング方法では、スクリーニング用細胞に被験薬及び Ba²⁺を添加し、細胞の生死を観察することで被験薬の K_{2P} チャンネルに対する薬効を評価することが可能であると考えられる。図は本方法を使用することで得られる結果とデータの解釈の仮説について示している。①被験薬が K_{2P} チャンネル開口薬であれば、被験薬及び Ba²⁺添加後も K_{2P} チャンネルが膜電位を過分極状態に維持するため、持続的な活動電位は生じず、細胞死は発生しない。②被験薬が K_{2P} チャンネル阻害薬である場合、被験薬及び Ba²⁺添加後に膜電位が脱分極するため、細胞死が生じる。したがって、本方法において細胞が生存していれば被験薬が活性化薬であり、細胞死が起これば被験薬が阻害薬であることを示している。以上のように、本法を使用することで、細胞の生死という単純な情報から被験薬の K_{2P} チャンネルに対する活性を評価することが可能となるのが期待できる。

3-3-2 K_{2P} チャネルスクリーニング用細胞の樹立

スクリーニング用細胞の作製には、Kir2.1 チャネル及び IFM/QQQ チャネルを定常発現した試験細胞に対し、K_{2P} チャネルを共発現させる必要があり、いずれかの方法により K_{2P} チャネルの遺伝子を細胞に対して高効率に導入する必要がある。そこで、高効率な遺伝子導入ができ、さらに細胞毒性が低い方法であるバキュロウイルスベクターによる遺伝子導入方法の使用を検討した。

遺伝子導入検討のため、TASK-1 チャネル及び TASK-3 チャネルを含むバキュロウイルスベクターを作製し、試験細胞に感染させ、ホールセルパッチクランプ法により膜電流の解析を行った。HEK293 細胞などの培養細胞に対し TASK-1 を一過性に発現させると多くは膜に移行せず、小胞体に局在するため電流が小さいが、i20 ドメインを除去した変異型 TASK-1 チャネル (TASK-1Δi20 チャネル) は細胞膜への移行が増大し膜電流量も大幅に増大することが報告されている³¹。本研究においては、細胞膜における TASK-1 チャネルの機能を見ることから、この TASK-1Δi20 チャネルを全ての実験において使用した。TASK-1 チャネル及び TASK-3 チャネルを試験細胞に導入することで 3 つの電流成分が見られた (図 16A, D)。-120 mV 付近でみられる内向きの電流成分が Kir2.1 チャネルによる電流であり、-40 mV 付近でみられる内向きの電流成分が IFM/QQQ チャネルによる電流成分である。ここでは 750 msec の step pulse の pulse end における電流を測定しているものの、依然として大きな IFM/QQQ チャネルの電流が見られていることから、IFM/QQQ チャネルの持続的な Na⁺電流を再確認することができた。そして+0~+40 mV 付近でみられる外向きの電流成分が TASK-1 チャネル又は TASK-3 に由来する電流である。TASK-1 チャネル阻害薬の ML365 及び TASK-3 チャネル阻害薬の PK-THPP により、これらの電流成分のみが選択的に抑制された。この阻害薬に感受性の電流成分から算出したところ、I-V 曲線の形が TASK チャネルに特徴的である”open rectification”の電流を示した (図 16B, E)。さらに 0 mV において Na⁺チャネルに由来する内向き電流はほとんど見られず、TASK-1 チャネル及び TASK-3 チャネルの阻害剤を処置することで内向きの Na⁺電流が顕著に観察された (図 16C, F)。このように K_{2P} チャネルスクリーニング用細胞において IFM/QQQ チャネルの電流をほぼ完全にマスクする程大きな外向き電流が流れていることが明らかとなった。以上よりスクリーニング用細胞において K_{2P} チャネルを高発現させることに成功した。

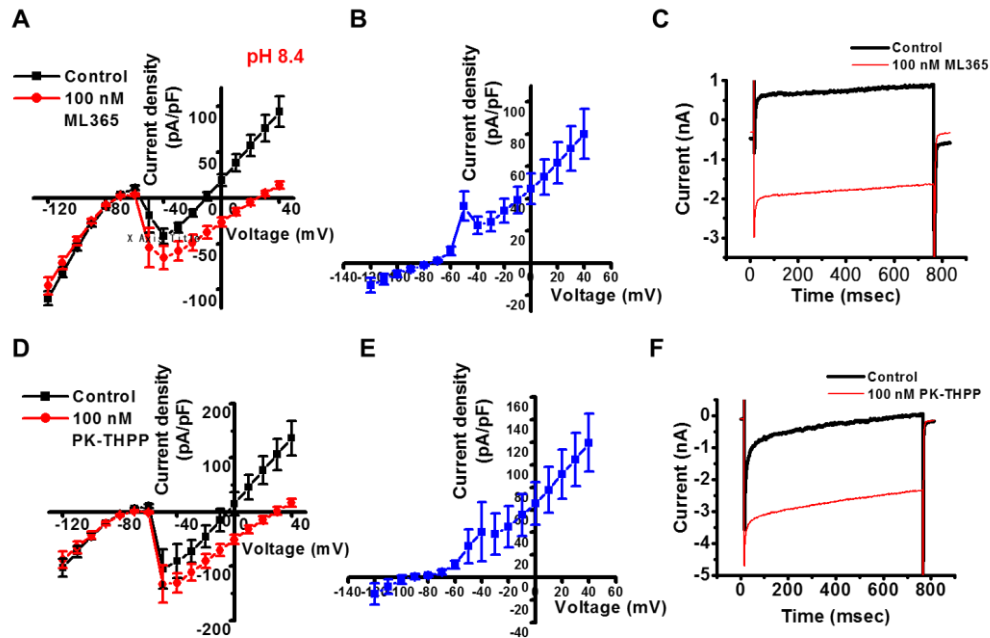


図 16：スクリーニング用細胞の電気生理学的解析

試験細胞に対し、バキュロウイルスベクターを用いて TASK-1 (TASK1Δi20) チャネル又は TASK-3 チャネルを共発現させた細胞の膜電流を、ホールセルパッチクランプ法の電位固定モードで測定した。

A, D：保持電位を-80 mV とし、-120 mV から +40 mV まで 10 mV ごとに 750 msec の step pulse を与え、pulse end における電流量を測定し、TASK-1 チャネル、TASK-3 チャネルのスクリーニング用細胞の電流電位曲線 (I-V 曲線) を測定した。図においては阻害薬適用前の I-V 曲線を黒色、阻害薬適用後の I-V 曲線を赤色で示した。

B, E：TASK-1 スクリーニング細胞における 100 nM ML365 感受性の電流成分、及び TASK-3 スクリーニング細胞における 100 nM PK-THPP 感受性の電流成分を示した。これらは A, D における阻害薬適用前の I-V 曲線から阻害薬適用後の I-V 曲線を減算することにより求めた。

C, F：TASK-1 チャネル及び TASK-3 チャネルスクリーニング用細胞の 0 mV における電流原図を示した。図においては阻害薬適用前の電流原図を黒色、阻害薬適用後の電流原図を赤色で示した。

ML365：TASK-1 選択的阻害薬

PK-THPP：TASK-3 阻害薬

3-3-3 スクリーニング用細胞の膜電位測定

スクリーニング用細胞の膜電位測定を電位感受性蛍光色素である DiBAC₄(3)により行った (図 17)。ホールセルパッチクランプ法による解析 (図 4) と同様に、DiBAC₄(3)を使用した測定においても 100 μM Ba²⁺処置により引き起こされる試験細胞の持続的な脱分極を検出できていることから (図 17A, D)、持続的な活動電位を測定できていると考えられる。ほとんどの

TASK-1 チャンネル及び TASK-3 チャンネルのスクリーニング用細胞においては Ba^{2+} のみを処置しても持続的な脱分極は生じなかったものの、それぞれの阻害薬である PK-THPP 又は ML365 を Ba^{2+} と同時に処置することで持続的な活動電位が生じた (TASK-1 チャンネル: 図 17B, E、TASK-3 チャンネル: 図 17C, F)。以上より、TASK-1 チャンネル及び TASK-3 チャンネルのスクリーニング用細胞において、仮説通り Ba^{2+} 処置後は K_{2P} チャンネルにより膜電位が制御されており、IFM/QQQ チャンネルの活性が抑えられていることが示唆された。

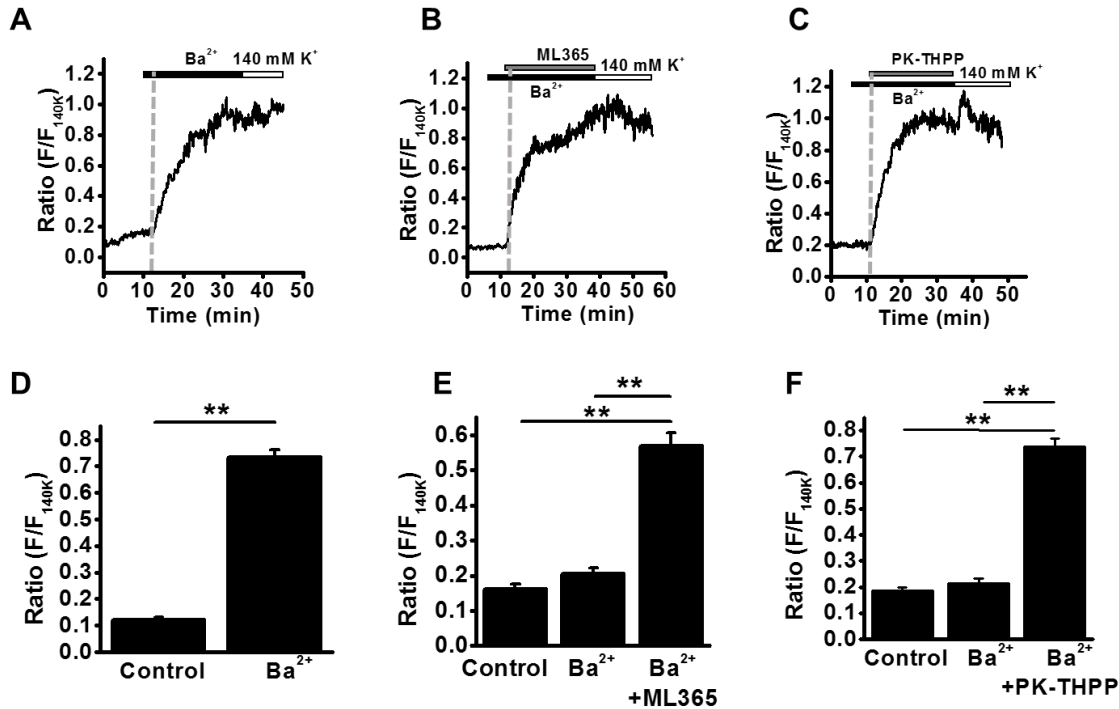


図 17: 蛍光色素を用いた試験細胞、及びスクリーニング用細胞の膜電位の解析

試験細胞、及びスクリーニング用細胞に対し、膜電位感受性蛍光色素である DiBAC₄(3)を使用して膜電位の解析を行なった。

A-C: それぞれ試験細胞 (A)、TASK-1 スクリーニング用細胞 (B)、TASK-3 スクリーニング用細胞 (C) における DiBAC₄(3)の蛍光強度変化のトレースを示した。データは全て細胞外 K^+ 濃度を 140 mM とし、疑似的に細胞膜電位を 0 mV にした際の蛍光強度を 1 として規格した (Ratio F/F_{140K})。図中の灰色の破線は持続的な活動電位が発生した点を表している。

D-F: それぞれ試験細胞 (D, n=63)、TASK-1 スクリーニング用細胞 (E, n=105)、TASK-3 (F, n=90) スクリーニング用細胞における試薬投与前後の DiBAC₄(3)の蛍光強度変化を比較した。薬物による処置は以下に行なった。

Control: 処置前

Ba^{2+} : 100 μ M $BaCl_2$ 処置後

Ba^{2+} + ML365: 100 μ M $BaCl_2$ 及び 100 nM ML365 処置後

Ba^{2+} + PK-THPP: 100 μ M $BaCl_2$ 及び 300 nM PK-THPP 処置後

** $P < 0.01$.

3-3-4 スクリーニング用細胞を使用した既存薬の評価

実際にスクリーニング細胞を用いて MTT アッセイにより細胞死を測定することで、TASK チャンネルの阻害薬を評価することが可能であるかを検討した。まず、TASK-1 スクリーニング用細胞の検討を行った (図 18A)。未処置の細胞の生存率を 1 とした時、TASK-1 チャンネルを発現していない細胞においては Ba^{2+} 処置後の細胞の生存率が 0.534 ± 0.012 ($n=6$) であり、TASK-1 チャンネルを共発現させた細胞においては細胞生存率が 0.787 ± 0.031 ($n=6$) となり、 Ba^{2+} 誘発性細胞死の減少が見られた。さらに細胞外の pH を中性の 7.4 から塩基性の 8.4 にすることで、 Ba^{2+} 処置後の細胞生存率が 0.936 ± 0.033 ($n=6$) となり、細胞外の pH が 7.4 の場合と比較して有意に上昇した。この結果は TASK-1 チャンネルの活性化によりもたらされたものであると思われる。TASK-1 チャンネルは酸感受性を有するため、細胞外 pH が酸性に傾くほどチャンネル活性が抑制される。TASK-1 チャンネルの細胞外 pH による IC_{50} 値は約 7.3 であると報告されている⁵⁵。そのため、細胞外の pH が中性の 7.4 では TASK-1 チャンネルは活性が半分程度しかなく、塩基性の 8.4 にすることでより強い活性を示す。したがって、本実験においても細胞外の pH を 7.4 から 8.4 にすることで、TASK-1 チャンネルの活性が上昇し、スクリーニング用細胞の膜電位がより過分極したため、 Ba^{2+} により誘発される細胞死が減少したと考えられる。実際にこの細胞に対し TASK-1 チャンネル選択的阻害薬である 300 nM ML365 を処置し、TASK-1 チャンネルを阻害することで細胞の生存率が 0.474 ± 0.015 ($n=6$) となり、 Ba^{2+} による細胞死が増強された。よってスクリーニング用細胞を使用してアッセイを行う本方法においては、TASK-1 チャンネルの活性化は Ba^{2+} により誘発される細胞死を抑制し、TASK-1 チャンネルの阻害は Ba^{2+} により誘発される細胞死を増強することが明らかとなった。

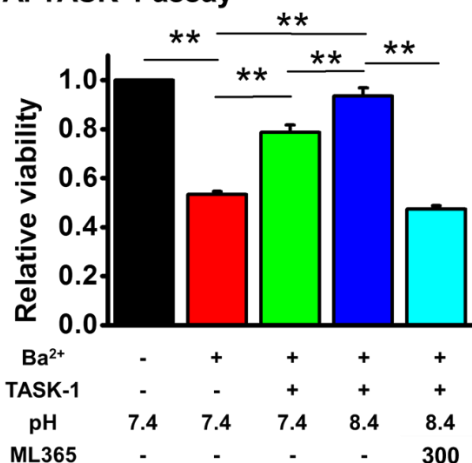
次に、TASK-3 スクリーニング用細胞の検討を行った (図 18B)。未処置の細胞を 1 とし、TASK-3 チャンネルを発現していない細胞と共発現させた細胞の Ba^{2+} 処置後の細胞の生存率はそれぞれ 0.532 ± 0.006 及び 0.965 ± 0.020 ($n=6$) であり、TASK-3 チャンネルにより Ba^{2+} 誘発性の細胞死が抑制される結果となった。この細胞に TASK-3 チャンネル阻害薬の 1 μ M PK-THPP で処置した後に、 Ba^{2+} を加えることで細胞の生存率は 0.402 ± 0.007 ($n=6$) となり、TASK-3 チャンネルによる細胞死抑制効果が消失した。以上より TASK-3 チャンネルも TASK-1 チャンネルと同様にスクリーニング用細胞の膜電位を過分極させることで IFM/QQQ チャンネルの活性を抑えることで細胞死を抑制することが示唆された。したがって、TASK-3 チャンネルスクリーニング用細胞を使用してアッセイを行う本方法においては、TASK-3 チャンネルの阻害は細胞死を誘発することが明らかとなった。

TASK-1 及び TASK-3 スクリーニング用細胞を使用して、ML365 及び PK-THPP の K_{2P} チャンネルに対する用量作用曲線を求めた (図 19)。これらの用量作用曲線から求められた IC_{50} 値を表 4 にまとめた。TASK-1 チャンネルに対する ML365 及び PK-THPP の IC_{50} 値は 20.6 ± 2.5 nM ($n=4$) 及び 3.0 ± 0.3 ($n=4$) であった。そして、本方法で測定した TASK-3 チャンネルに対する PK-THPP の IC_{50} 値は 10.1 ± 1.6 nM ($n=4$) であった。ML365 の TASK-3 阻害作用は高い濃度から見られ、シグモイドのフィッティングが不可能であったため、正確な IC_{50} 値を求めることはできなかったが、少なくとも > 150 nM ($n=3$) であることが明らかとなった。

ML365 の TASK-1 チャンネルに対するパッチクランプ法で測定された IC_{50} 値は 12 nM と報告されている⁵⁶。本方法で測定した IC_{50} 値は 20.6 ± 2.5 nM であり既報の値と非常に近かった。ML365 の TASK-3 に対する IC_{50} 値は、パッチクランプ法においては 480 nM であると報告されているため⁵⁶、本方法で求められた IC_{50} 値 (150 nM 以上) と一致していた。PK-THPP の TASK-3 チャンネルに対するパッチクランプ法により求められた IC_{50} 値は 35 nM であることが報告されており⁵⁶、本方法により算出された値 (10.1 ± 1.6 nM) と非常に近かった。PK-THPP の TASK-1 チャンネルに対する作用は報告により差異があった。PK-THPP を最初に報告した論文においては、PK-THPP の TASK-1 チャンネル及び TASK-3 チャンネルに対する IC_{50} 値はそれぞれ 303 nM 及び 35 nM であり、PK-THPP は TASK-3 チャンネルに約 9 倍の選択性があるとされている⁵⁷。別の報告では TASK-1 チャンネル及び TASK-3 チャンネルに対する PK-THPP の IC_{50} 値は、蛍光色素を使用した実験 (FDSS) においてはそれぞれ 16 nM 及び 180 nM であり、パッチクランプ (Q-Patch) においてはそれぞれ 17 nM 及び 35 nM であったことから、PK-THPP は TASK-1 チャンネルに対し TASK-3 チャンネルと比較して FDSS においては 11.2 倍、Q-Patch においては 2.1 倍選択的であるとされている⁵⁶。本方法で求められた PK-THPP の TASK-1 チャンネル及び TASK-3 チャンネルに対する IC_{50} 値はそれぞれ 3.0 ± 0.3 nM 及び 10.1 ± 1.6 nM であり、TASK-1 に対し約 3 倍選択的である結果が得られているため、後者の報告に近いといえる。

以上のようにスクリーニング用細胞を使用したアッセイにおいて、イオンチャンネルの解析に使用される方法のゴールドスタンダードであるパッチクランプ法と同等の IC_{50} 値が得られることが明らかとなった。

A. TASK-1 assay



B. TASK-3 assay

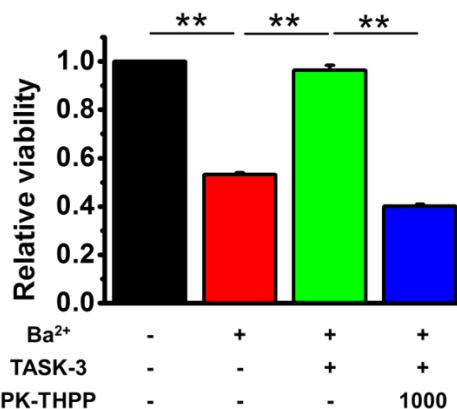


図 18 : スクリーニング用細胞を使用した各チャネルに対する既存薬の解析

TASK-1 及び TASK-3 のスクリーニング用細胞を使用して TASK-1 選択的阻害薬の ML365、及び TASK-3 阻害薬の PK-THPP の阻害作用を評価することが可能であることを検討した。

A : TASK-1 スクリーニング用細胞を使用したアッセイの結果を示した (n=6)。

B : TASK-3 スクリーニング用細胞を使用したアッセイの結果を示した (n=6)。

図において、縦軸は Ba²⁺処置前の細胞の生存率を 1 とした際の、各条件により処置した後の生存率を表している。処置の条件の表記に関する詳細は以下に示す通りである。

Ba²⁺ : 200 μM BaCl₂による処置の有無 (- : 処置なし、+ : 処置あり)

TASK-1 または TASK-3 : TASK チャネルの共発現の有無 (- : 発現なし、+ : 発現あり)

pH : 細胞外 pH (数字により条件を記載)

ML365 : ML365 による処置の有無 (- : 処置なし、300 : 300 nM で処置あり)

PK-THPP : PK-THPP による処置の有無 (- : 処置なし、1000 : 1000 nM で処置あり)

**P<0.01.

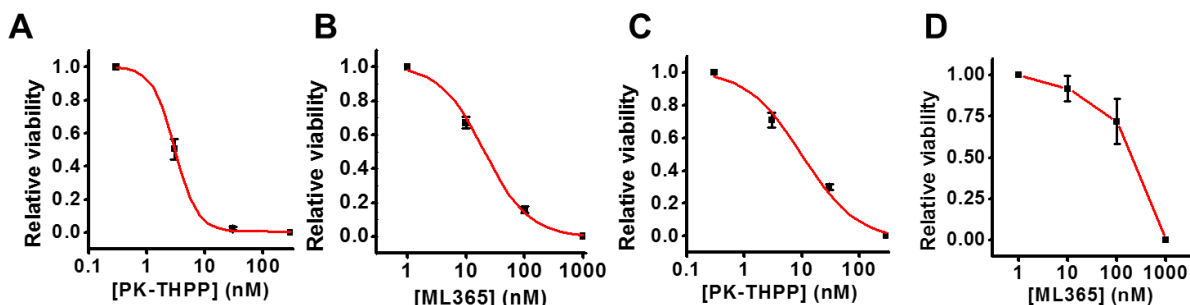


図 19 : スクリーニング用細胞による用量作用曲線の作成

TASK-1 チャネル及び TASK-3 チャネルのスクリーニング用細胞を使用して ML365 及び PK-THPP の TASK-1 チャネル及び TASK-3 チャネルに対する用量作用曲線を求めた。

A, B : TASK-1 チャネルに対する PK-THPP (A, N=4)及び ML365 (B, N=4)の用量作用曲線を示した。

C, D : TASK-3 チャネルに対する PK-THPP (C, N=4)及び ML365 (D, N=3)の用量作用曲線を示した。

図中の赤色の線はシグモイド曲線によるフィッティングの結果を示している。D のみフィッティングができなかったため、図中に線は各プロットを直線で結んだ線を示した。

表 4 : スクリーニング用細胞を使用して得られた IC₅₀ 値

スクリーニング用細胞を使用して得られた PK-THPP 及び ML365 の TASK チャンネルに対する IC₅₀ 値とパッチクランプ法により求められた IC₅₀ 値 (文献値) を示した^{56,57}。

被験薬	標的チャネル	本法によるIC ₅₀	文献値
PK-THPP	TASK-1	3.0 ± 0.3 nM	17~303 nM
	TASK-3	10.1 ± 1.6 nM	35 nM
ML365	TASK-1	20.6 ± 2.5 nM	12 nM
	TASK-3	> 150 nM	480 nM

3-3-5 K_{2P} チャンネルを定常発現したスクリーニング用細胞の作製

本研究においては3つめのイオンチャネルである K_{2P} チャンネルの遺伝子をバキュロウイルスベクターにより一過性発現させている。しかし、非常に多くの検体を扱う HTS においては、データのバラつきを少しでも減らす目的で定常発現細胞の使用が望ましいと考えられる。そこで、K_{2P} チャンネルをレンチウイルスベクターにより導入し定常発現させることで、スクリーニング用細胞を作製することが可能であるかを検討した。K_{2P} チャンネルのサブタイプの一つである、TREK-1 チャンネル、TASK-2 チャンネル、TASK-3 チャンネルをレンチウイルスベクターに組み込み、試験細胞に感染させることでこれらの K_{2P} チャンネルを定常発現したスクリーニング用細胞を作製した。

TREK-1 スクリーニング用細胞において、未処置の細胞の生存率を 1 とした時、Ba²⁺処置後の細胞生存率は 0.71±0.030 であり、さらに TREK-1 チャンネル阻害薬である 1 mM 8-Br-cAMP を与えることで Ba²⁺処置後の細胞生存率が 0.48±0.0021 (n=6)に減少した (図 20A)。TREK-1 チャンネルが膜電位を過分極させることで IFM/QQQ チャンネルの活性を抑え、Ba²⁺による細胞死を減少させており、8-Br-cAMP による TREK-1 チャンネルの阻害が細胞膜の過分極を解除し細胞死を増大させたことが示唆された。TASK-2 チャンネルのスクリーニング用細胞においては、Ba²⁺処置後の細胞生存率は 0.76 ±0.036 (n=6)であった (図 20B)。TASK-2 チャンネルは TASK-1 チャンネルと同様に細胞外環境が塩基性になることで活性が上昇するイオンチャネルであるため⁵⁸、細胞外 pH を 8.4 にすることで活性化することが予想された。そこで、細胞外 pH を 8.4 にしたところ TASK-2 スクリーニング用細胞の Ba²⁺処置後の細胞生存率は 0.94±0.032 (n=6)となり上昇した。以上の結果は TASK-2 チャンネルの活性化を測定することができているものと考えられる。

TASK-3 スクリーニング細胞においては Ba^{2+} 添加により細胞生存率は 0.83 ± 0.018 ($n=6$) に減少し、TASK-3 阻害薬の $1 \mu M$ PK-THPP を処置することで細胞生存率はさらに減少して 0.38 ± 0.0050 ($n=6$) となった (図 20C)。

以上のように①8-Br-cAMP の TREK-1 チャンネル阻害作用による細胞死の増加、②細胞外の塩基性の TASK-2 チャンネル活性化作用による細胞死の減少、③PK-THPP の TASK-3 チャンネル阻害作用による細胞死の増加が見られた。これらは、図 18A, B における K_{2P} チャンネルの活性化は細胞死を抑制し、 K_{2P} チャンネルの阻害は細胞死を増加させるという結果と一致している。レンチウイルスベクターを用いて K_{2P} チャンネルを定常発現させたスクリーニング用細胞でも同様に K_{2P} チャンネルを標的とした作用薬の評価が可能であることが示唆された。

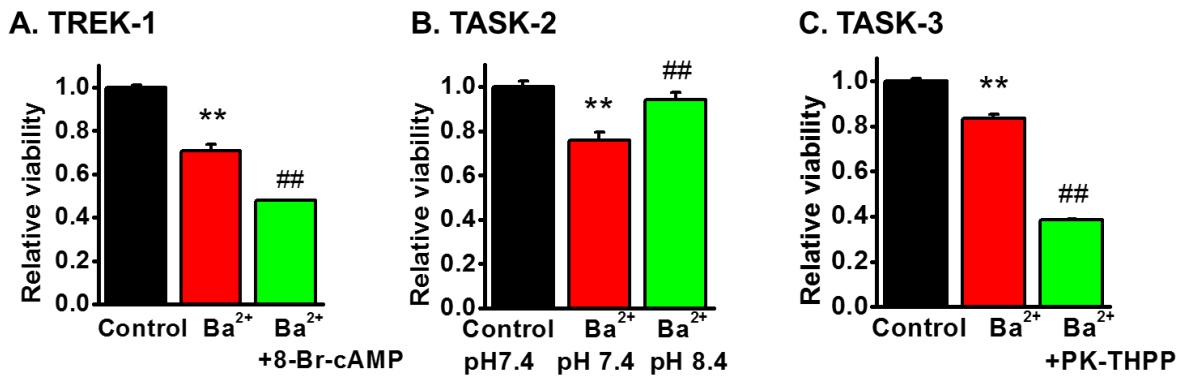


図 20 : K_{2P} チャンネルの定常発現したスクリーニング用細胞の評価

レンチウイルスベクターを使用し、TREK-1 チャンネル、TASK-2 チャンネル、TASK-3 チャンネルを定常発現させたスクリーニング用細胞を作製した。これらの細胞を用いて、バキュロウイルスベクターを用いて一過性導入により作製したスクリーニング用細胞と同様に K_{2P} チャンネル作用薬の評価が可能であるかを検討した。 Ba^{2+} の濃度は全て $200 \mu M$ で使用した。

A : TREK-1 スクリーニング用細胞を使用して、 $1 mM$ 8-Br-cAMP の TREK-1 チャンネルに対する作用を測定した。 ** $P < 0.01$ vs. control, ## $P < 0.01$ vs. Ba^{2+}

B : TASK-2 スクリーニング用細胞を使用して細胞外の塩基性化による、TASK-2 チャンネルへの効果を測定した。 ** $P < 0.01$ vs. control, ## $P < 0.01$ vs. Ba^{2+} pH7.4

C : TASK-3 スクリーニング細胞を使用して、 $1 \mu M$ PK-THPP の TASK-3 チャンネルに対する作用を測定した。 ** $P < 0.01$ vs. control, ## $P < 0.01$ vs. Ba^{2+}

3-3-6 K_{2P} チャンネル以外の K⁺チャンネルへの応用

バキュロウイルスベクターを使用して小コンダクタンス Ca²⁺活性化 K⁺チャンネル (SK チャンネル) ファミリーに属する K⁺チャンネルである、SK2 チャンネル及び SK4 チャンネルのスクリーニング用細胞の作製を試みた。SK チャンネルも Kir2.1 と比較すると Ba²⁺感受性が低く、SK4 チャンネルは 100 µM の Ba²⁺存在下でも電流が観察される⁵⁹ため、Ba²⁺を使用する本アッセイ法が適応可能であると考えられる。HEK293 細胞にバキュロウイルスベクターを使用してこれらの SK チャンネルを導入し、細胞内 Ca²⁺濃度を 1 µM に固定した条件下でホールセルパッチクランプ法を用いて電流を測定した。非常に大きな K⁺チャンネル電流が見られ、それぞれ SK2 チャンネル阻害薬の 100 nM UCL1684 (図 21A)、及び SK4 チャンネル阻害薬の 1 µM TRAM34 (図 21B) により、K⁺電流はほぼ完全に遮断された。したがって、今回作製したバキュロウイルスベクターを使用することで SK2 チャンネル及び SK4 チャンネルを試験細胞に非常に高発現させることが可能であることが示された。

以上のバキュロウイルスベクターを用いて SK2 チャンネル及び SK4 チャンネルスクリーニング用細胞を作製し、既存の作用薬を評価することが可能であるかを検討した。SK2 チャンネルスクリーニング用細胞において、SK2 チャンネルは 200 µM Ba²⁺処置による細胞死を抑制しなかったものの、Ca²⁺イオノフォアであり細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させる 100 nM Ionomycin 及び SK チャンネル活性化薬である 10 µM NS309 を処置することで、Ba²⁺による細胞死が抑制された。さらに、SK2 チャンネルの阻害薬である 100 nM UCL1684 を処置することで、再び細胞死が見られた (図 21C)。SK4 スクリーニング用細胞においても同様の傾向が見られ、SK4 チャンネル共発現させるのみでは Ba²⁺により引き起こされる細胞死の抑制は見られなかったが、100 nM Ionomycin 及び SK チャンネル活性化薬である 10 µM DCEBIO を処置することで細胞の生存率が上昇し、SK4 チャンネル阻害薬の 1 µM TRAM34 により細胞死が再誘発された (図 21D)。

SK チャンネルは通常、100 nM 以下の細胞内 Ca²⁺濃度では活性が低いことが報告されている^{60, 61}。通常細胞内の Ca²⁺濃度は 10~100 nM と非常に低く保たれていることから、定常状態の SK チャンネルの活性は非常に低いと思われる。そのため、SK2 チャンネル及び SK4 チャンネルを共発現させただけでは Ba²⁺処置による細胞死を抑制することができなかったと考えられる。したがって、Ionomycin により細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させると同時に、SK チャンネルの活性化薬を与えることで SK チャンネルが活性化し細胞死を抑制したと思われる。さらに、UCL1684 及び TRAM34 といった SK チャンネルの阻害薬を処置することで、細胞死が再誘起されたことから SK チャンネルの活性化により、Ba²⁺処置後も静止膜電位が深く保たれ IFM/QQQ チャンネルの活性化が抑えられる

ことで細胞死が抑制されたことを示唆している。したがって、SK2 及び SK4 スクリーニング用細胞は、正確にこれらの K⁺チャネルの活性を測定することが可能であり、そして、SK チャネルをはじめとする、静止膜電位を維持する Ba²⁺に対して感受性が低い全てのイオンチャネルの作用薬の探索に対し本方法が応用可能である可能性が示された。

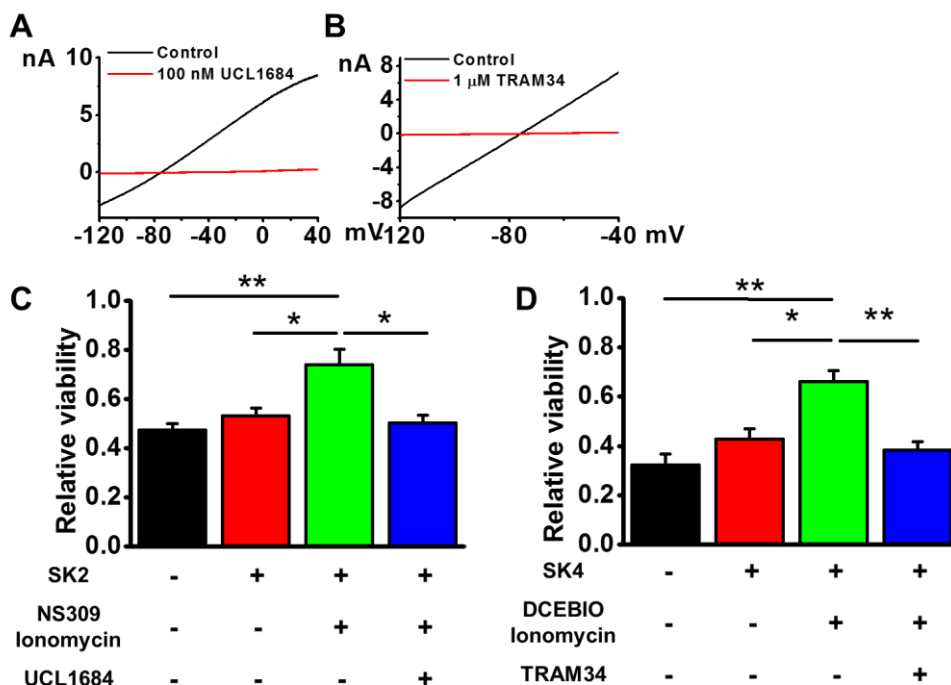


図 21 : SK2 チャネル及び SK4 チャネルスクリーニング用細胞の評価

SK2 チャネル及び SK4 チャネルに対してもスクリーニング用細胞を用いた評価が可能であるかを検証した。

A, B : ホールセルパッチクランプ法を用いて、SK2 チャネル及び SK4 チャネルの cDNA を組み込んだバキュロウイルスベクターの HEK293 細胞への導入確認を行った。SK2 チャネル及び SK4 チャネルを活性化させるため、細胞内の Ca²⁺濃度は 1 μM に固定して実験を行った。電流の測定は、電極より -120 mV から +40 mV (A, SK2 チャネル) もしくは -120 mV から -40 mV (B, SK4 チャネル) の ramp pulse を与えて測定を行った。黒色の線が Control、赤色の線が阻害薬処置後における電流をそれぞれ示す。

C, D : バキュロウイルスベクターによる一過性発現により作製した、SK2 チャネル及び SK4 チャネルスクリーニング用細胞を使用して、SK チャネルの活性化薬、及び阻害薬の評価を行った (n=3)。図中で行っている処置の詳細は以下の通りである。

SK2, SK4 : SK2 チャネル、又は SK4 チャネルの発現の有無 (無 : -, 有 : +)

NS309 Ionomycin : 10 μM NS309 及び 100 nM Ionomycin の処置の有無 (無 : -, 有 : +)

DCEBIO Ionomycin : 10 μM DCEBIO 及び 100 nM Ionomycin の処置の有無 (無 : -, 有 : +)

UCL1684 : 100 nM UCL1684 の処置の有無 (無 : -, 有 : +)

TRAM34 : 1 μM TRAM34 の処置の有無 (無 : -, 有 : +)

*P<0.05, **P<0.01.

3-3-7 TASK-3 を標的としたスクリーニングのためのアッセイの大規模化とバリデーションの実施

これまでは全て 24 well フォーマットを使用した小規模のかつ手作業による実験であった。しかし、HTS 等のプライマリースクリーニングにおいては非常に多くの検体を扱う上に、データの取得は 1 例であることが多い。したがって HTS では一度に多くの検体を評価することができるように 96 well フォーマット以上であり、かつ、人の手による誤差を最小限にする目的で、できる限りすべての操作を機械による自動操作により実験を行うことが好ましいとされる。

そこで、スクリーニング用細胞を用いた本方法においても Micro shot 706 (MSTechnos) 等のディスペンサーや、Multi Works 508 (MSTechnos) 等の分注機といった HTS において頻繁に使用される機械を使用して、できる限り実験方法の自動化を行い、96 well フォーマットにおいて HTS において要求されるアッセイ系の基準を満たすことができるかを検証した。

まずは精度の指標として Z' 値を算出した (図 22A)。Z' 値は以下の式から算出される。

$$\text{計算式: } Z' = 1 - (3 \times SD_{100\%} + 3 \times SD_{0\%}) / (Av_{100\%} - Av_{0\%})$$

$Av_{0\%}$ 、 $Av_{100\%}$: 標的分子の活性が 0 % 及び 100 % の時のアッセイにおけるシグナルの平均値

$SD_{0\%}$ 、 $SD_{100\%}$: 標的分子の活性が 0 % 及び 100 % の時のアッセイにおけるシグナルの標準偏差

以上のように、Z' 値はシグナル強度、及びデータのバラつきから算出されるパラメーターであり、アッセイ系の質を示す重要な指標である。一般的に Z' 値が 0.5 以上であれば、HTS のアッセイ系として優秀であるとされている⁶²。

本アッセイ系の精度を評価するために、TASK-3 スクリーニング用細胞を使用した 96 well フォーマットにおけるアッセイの Z' 値を算出した。溶媒群 (0.1 % DMSO) により処置をした群を、TASK-3 チャンネルの活性が 100 % であるとし、1 μ M PK-THPP で処置した群を TASK-3 チャンネルの活性が 0 % であるとした。これらの群における平均値 ($Av_{0\%}$ 、 $Av_{100\%}$) 及び標準偏差値 ($SD_{0\%}$ 、 $SD_{100\%}$) から Z' 値を算出したところ、図 22A においては Z' 値が 0.75 であった。同様の実験を合計 3 回繰り返したところ Z' 値は 0.66 ± 0.05 (n=3) であり、基準の 0.5 以上であることを満たしているため、本方法は HTS のアッセイ系として適切であることが示された。

次に、本アッセイ系の確度の観点からバリデーションを行うために、ブラインドの条件下で化合物群の中から阻害薬を見つけることが可能であるかを検証した。TASK-3 阻害作用のある PK-THPP、ML365、これらに加えて TASK-3 チャンネル以外に特異的な作用点を持つ化合物である Losartan、Atropine、NS309 をそれぞれ 1 μ M の濃度で DMSO に溶解し、第三者が無作為に C1 から C5 の番号を割り当てた。どの化合物にどの番号が割り当てられているのかが分からな

い、ブラインドの条件下でスクリーニング用細胞を用いて化合物の TASK-3 への作用を評価した (図 22B)。測定の結果、TASK-3 チャンネルに対し、C1 が弱い阻害作用を示し、C3 が強い阻害作用を示した。実験後に開示された番号と化合物の対応は、C1 : ML365 (TASK-3 チャンネルに対する IC₅₀ 値 : 480 nM)、C2 : NS309 (SK チャンネル活性化薬)、C3 : PK-THPP (TASK-3 チャンネルに対する IC₅₀ 値 : 35 nM)、C4 : Losartan (アンジオテンシン II 受容体阻害薬)、C5 : Atropine (ムスカリン受容体阻害薬) であった。C1 が TASK-3 チャンネルに対する弱い阻害作用をもつ ML365 であり、C3 が TASK-3 チャンネルに対して強い阻害作用を示す PK-THPP であった。C2、C4、C5 については今回の結果では TASK-3 阻害作用を示さなかった。これらに化合物について、TASK-3 チャンネル阻害作用は報告されていない。以上より、今回の結果と化合物に関する報告が一致していることから、確度の観点においても本方法は HTS に応用可能であることが示唆された。

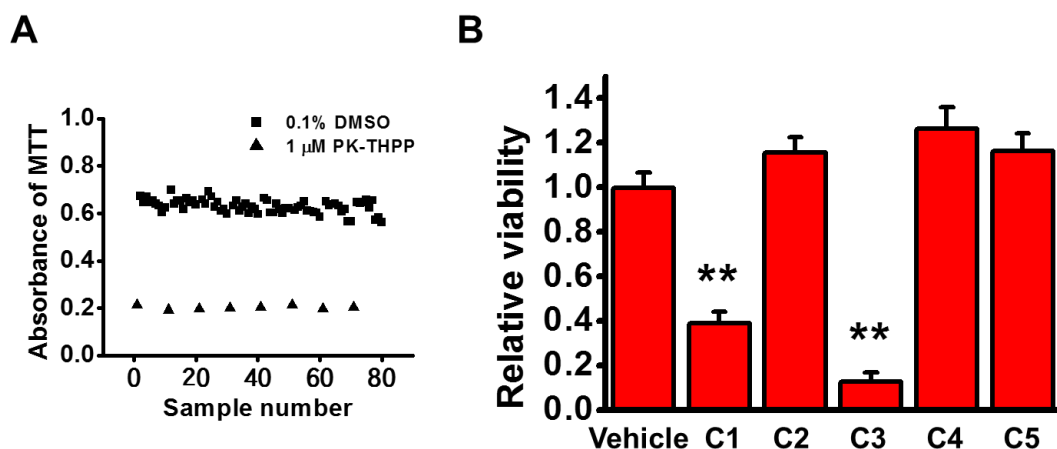


図 22 : TASK-3 スクリーニング用細胞を使用したアッセイの 96 well フォーマットにおける精度、及び確度の検証

A : TASK-3 スクリーニング細胞を使用し、Z'値を算出した。図中において■は Vehicle 群 (0.1 % DMSO 処置群)、▲は 1 μM PK-THPP 処置群における 200 μM Ba²⁺処置後の MTT アッセイにより得られた 590 nm における吸光度を示した (n=80)。

B : TASK-3 スクリーニング用細胞を使用し、小規模のブラインドテストを行った。TASK-3 スクリーニング細胞を用いて、第三者より渡された C1~C5 の番号が割り当てられた未知の化合物の TASK-3 チャンネルに対する作用を評価した。細胞の生存率は MTT アッセイにより評価した。Vehicle 群 (0.1 % DMSO 処置群) における Ba²⁺添加後の生存率を 1 とし (n=6)、1 μM PK-THPP 処置群 (図示せず) における細胞生存率を 0 とし、MTT アッセイにより細胞生存率を測定した (n=12)。実験後に開示された番号と化合物の対応は以下の通りであった。括弧内には、報告されている TASK-3 に対する化合物の IC₅₀ 値、または化合物の薬理活性を示した。

C1 : ML365 (TASK-3 チャンネル IC₅₀ : 480 nM)、C2 : NS309 (SK チャンネル活性化薬)、C3 : PK-THPP (TASK-3 チャンネル IC₅₀ : 35 nM)、C4 : Losartan (アンジオテンシン II 受容体阻害薬)、C5 : Atropine (ムスカリン受容体阻害薬)

**P<0.01 vs. Vehicle (DMSO) .

3-3-8 TASK-3 チャンネルを標的としたスクリーニングの実施

精度及び確度がともにスクリーニングへの応用に申し分ないと考え、東京大学創薬機構の化合物ライブラリー（既知薬理活性試薬、1379 検体）を使用し、TASK-3 スクリーニング用細胞による TASK-3 を標的としたスクリーニングを行った。合計 18 回のアッセイを行い、全てのアッセイの Z' 値の平均値は 0.65 ± 0.042 ($n=18$) であった。このように Z' 値が 0.5 以上であったことから、今回の TASK-3 を標的としたスクリーニングは適切な精度のもと遂行されたことが示された。溶媒コントロール群のシグナルを Control、TASK-3 阻害剤である $1 \mu\text{M}$ PK-THPP 添加群のシグナルを Background として規格し、阻害率 (InH) を算出した ($\text{InH} = 1 - (\text{Sample} - \text{Background}) / (\text{Control} - \text{Background})$)。InH がそれぞれ 0 以上であれば阻害薬、0 以下であれば活性化薬であることを表す。偽陽性、偽陰性の出現率が予測できなかつたため、なるべく多くの化合物を調べ、偽陽性の出現頻度を評価する目的で、ヒット候補化合物の判断基準を 0.4 以上または -0.4 以下とした。その結果、87 のヒット候補化合物が得られた (図 23A)。2 次評価はホールセルパッチクランプ法により行い、現在も進行中である。評価が完了したものは未だごく少数ではあるが、2 次評価の結果、87 のヒット候補化合物のうちの 1 つである化合物 X が TASK-3 チャンネル阻害作用を有することを見出した (図 23B, C)。

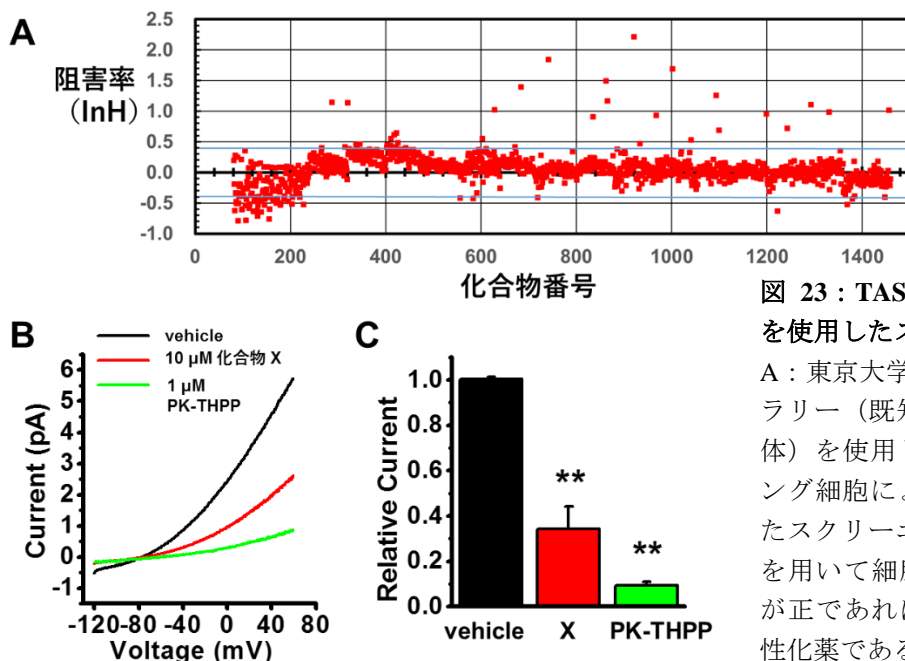


図 23 : TASK-3 スクリーニング細胞を使用したスクリーニングの実施

A : 東京大学創薬機構の化合物ライブラリー（既知薬理活性試薬、1379 検体）を使用し、TASK-3 スクリーニング細胞による TASK-3 を標的としたスクリーニングを行った。MTT 法を用いて細胞生存率を測定した。値が正であれば阻害薬、負であれば活性化薬であることが示唆される。

阻害薬、及び活性化薬の判定値である 0.4 と -0.4 を図中において青色の線で示した。B : スクリーニングにより得られた 87 の Hit 候補化合物の内 1 つの化合物 (X) について、ホールパッチクランプ法により X の TASK-3 チャンネル阻害作用を評価した。

C : ホールパッチクランプ法により 0 mV における化合物 X の TASK-3 チャンネルの阻害作用を示した ($n=3$)。** $P < 0.01$ v.s. Vehicle (DMSO) .

3-3-9 要約と考察

本研究においては、①Kir2.1 チャンネル、②IFM/QQQ チャンネル、及び③創薬標的となる K_{2P} チャンネルを発現させた HEK293 細胞（スクリーニング用細胞）を使用した新規のスクリーニング方法を開発した。本アッセイ方法においては、 K_{2P} チャンネルの活性化はスクリーニング用細胞の細胞死の抑制、そして K_{2P} チャンネルの阻害はスクリーニング用細胞の細胞死の増強という形でデータが得られた。したがって、MTT アッセイなどの汎用される細胞生存率の測定方法により得られる、細胞の生死という単純な情報から被験化合物の K_{2P} チャンネルへの作用を評価することが可能であった。本アッセイ法で得られる IC_{50} 値は、パッチクランプ法で求められた値と近いことから、本アッセイ法によりパッチクランプ法と同等の精度で測定が可能であることが示された。さらに、本アッセイ方法は SK チャンネルにも応用可能であったことから、 K_{2P} チャンネル以外の静止膜電位に関わるイオンチャンネルの評価にも応用可能であることが示唆された。

実際に本アッセイ法を用いて、TASK-3 チャンネルを標的としたスクリーニングを行い、東京大学創薬機構の化合物ライブラリーの既知薬理活性試薬である 1379 検体中から 87 のヒット候補化合物が得られた。本アッセイ法は細胞の生死を測定することから、細胞毒性を有する化合物、及びイオンチャンネル以外に作用してイオン動態に影響を与える化合物は本方法においては阻害薬の偽陽性として検出される恐れがある。そして、スクリーニング細胞の細胞死は変異型 Na^+ チャンネルに依存しているため、 Na^+ チャンネルを阻害する化合物は K_{2P} チャンネル活性化薬の偽陽性として検出される恐れがある。実際に、ヒット候補化合物の中には偽陽性を起こす恐れのある薬理作用を有する化合物も見られた。したがって、偽陽性を排除するために対比実験を行うことが好ましいと思われる。①Kir2.1 チャンネル、及び②IFM/QQQ チャンネルのみを発現した試験細胞においても被験化合物の作用を測定することで、上記の作用を持つ偽陽性、又は偽陰性を起こす恐れのある化合物を判別することが可能である。現時点で偽陽性を含む可能性は完全に否定することはできないものの、スクリーニングで得られたヒット候補化合物の中から、実際に TASK-3 チャンネルに対して阻害作用を示す化合物を見出すことができたため、本アッセイ方法はプライマリースクリーニングとしての役割は十分に果たしていると考えられる。

第4章 総括

- ① 本アッセイ方法では、 K_{2P} チャンネルの阻害薬は細胞死を増強し、 K_{2P} チャンネルの活性化薬は細胞死を抑制するため、細胞の生死という単純な情報より被検化合物の K_{2P} チャンネルに対する作用を定量的に評価することが可能となった。
- ② 得られた IC_{50} 値がパッチクランプ法で得られた IC_{50} 値に近いことから、本アッセイ方法の精度はパッチクランプ法に匹敵することが示された。
- ③ 実際に TASK-3 チャンネルを標的としたスクリーニングを実施し、複数のヒット化合物が得られた。その中から、TASK-3 チャンネルに対し阻害作用を示す化合物を見出した。
- ④ 試験細胞は Na^+ の過剰流入により、ミトコンドリア障害を介してアポトーシス様の細胞死を呈することが明らかとなった。 Na^+ の流入のみによりアポトーシスが引き起こされる興味深い例であり、例えば神経細胞の過剰興奮における Na^+ スパイクのバーストによりアポトーシスが誘発されることが示唆された。

以上より、本アッセイ方法はイオンチャンネルによる膜電位変動を細胞死として容易かつ正確に検出できるセルベースドアッセイ系であることが示された。本アッセイ方法は電気刺激装置といった特殊な機械は不要であり、主に分注機といった HTS で汎用される機器による分注操作のみで測定をすることができることから、電気刺激を採用していた従来の方法²²⁻²⁴と比較して飛躍的な高効率化に成功した。そして、 K_{2P} チャンネルをはじめとする様々な K^+ チャンネルを標的とした化合物のスクリーニングにおいて、新規の重要な選択肢となりうると考えられる。

第5章 謝辞

本研究の遂行に際し、終始一貫して御懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました名古屋市立大学 大学院薬学研究科 今泉 祐治 特任教授に深甚な謝意を表します。

本研究に際し、終始御懇篤な御指導と御助言を賜りました名古屋市立大学 大学院薬学研究科 山村 壽男 教授に深甚な謝意を表します。

本論文の作成にあたり、有益な御助言および御校閲を頂きました名古屋市立大学 大学院薬学研究科 平嶋 尚英 教授、青山 峰芳 教授、中川 秀彦 教授に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、化合物ライブラリーの提供をしてくださり、また技術的な御指導、御助言を賜りました東京大学 創薬機構の長野 哲雄 名誉教授、小島 宏建 特任教授、岡部 隆義 特任教授、須藤 直樹 特任准教授に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、終始有益な御指導、御助言を賜りました名古屋市立大学 大学院薬学研究科 鈴木 良明 講師に深謝致します。

本研究にあたり、御協力を頂いた名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野の卒業生及び教室員諸氏に心より感謝致します。

第 6 章 引用文献

1. Gonzalez, C.; Baez-Nieto, D.; Valencia, I.; et al. K⁺ channels: function-structural overview. *Compr Physiol* **2012**, *2*, 2087-149.
2. Goldstein, S. A.; Bayliss, D. A.; Kim, D.; et al. International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev* **2005**, *57*, 527-40.
3. Gutman, G. A.; Chandy, K. G.; Grissmer, S.; et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* **2005**, *57*, 473-508.
4. Kubo, Y.; Adelman, J. P.; Clapham, D. E.; et al. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* **2005**, *57*, 509-26.
5. Wei, A. D.; Gutman, G. A.; Aldrich, R.; et al. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* **2005**, *57*, 463-72.
6. Lesage, F.; Guillemare, E.; Fink, M.; et al. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J* **1996**, *15*, 1004-11.
7. Goldstein, M.; Rinne, S.; Kiper, A. K.; et al. Functional mutagenesis screens reveal the 'cap structure' formation in disulfide-bridge free TASK channels. *Sci Rep* **2016**, *6*, 19492.
8. Enyedi, P.; Czirjak, G. Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* **2010**, *90*, 559-605.
9. Feliciangeli, S.; Chatelain, F. C.; Bichet, D.; et al. The family of K_{2P} channels: salient structural and functional properties. *J Physiol* **2015**, *593*, 2587-603.
10. Schmidt, C.; Wiedmann, F.; Schweizer, P. A.; et al. Inhibition of cardiac two-pore-domain K⁺ (K_{2P}) channels--an emerging antiarrhythmic concept. *Eur J Pharmacol* **2014**, *738*, 250-5.
11. Schmidt, C.; Wiedmann, F.; Voigt, N.; et al. Upregulation of K_{2P}3.1 K⁺ Current Causes Action Potential Shortening in Patients With Chronic Atrial Fibrillation. *Circulation* **2015**, *132*, 82-92.
12. Bayliss, D. A.; Sirois, J. E.; Talley, E. M. The TASK family: two-pore domain background K⁺ channels. *Mol Interv* **2003**, *3*, 205-19.
13. Czirjak, G.; Fischer, T.; Spat, A.; et al. TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol Endocrinol* **2000**, *14*, 863-74.

14. Davies, L. A.; Hu, C.; Guagliardo, N. A.; et al. TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 2203-8.
15. Heitzmann, D.; Derand, R.; Jungbauer, S.; et al. Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. *EMBO J* **2008**, *27*, 179-87.
16. Alloui, A.; Zimmermann, K.; Mamet, J.; et al. TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J* **2006**, *25*, 2368-76.
17. Noel, J.; Zimmermann, K.; Busserolles, J.; et al. The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J* **2009**, *28*, 1308-18.
18. Nausch, B.; Rode, F.; Jorgensen, S.; et al. NS19504: a novel BK channel activator with relaxing effect on bladder smooth muscle spontaneous phasic contractions. *J Pharmacol Exp Ther* **2014**, *350*, 520-30.
19. Wang, H. R.; Wu, M.; Yu, H.; et al. Selective inhibition of the K_{ir}2 family of inward rectifier potassium channels by a small molecule probe: the discovery, SAR, and pharmacological characterization of ML133. *ACS Chem Biol* **2011**, *6*, 845-56.
20. Piskorowski, R. A.; Aldrich, R. W. Relationship between pore occupancy and gating in BK potassium channels. *J Gen Physiol* **2006**, *127*, 557-76.
21. Du, Y.; Days, E.; Romaine, I.; et al. Development and validation of a thallium flux-based functional assay for the sodium channel NaV1.7 and its utility for lead discovery and compound profiling. *ACS Chem Neurosci* **2015**, *6*, 871-8.
22. Fujii, M.; Hayashi, K.; Ohya, S.; et al. New screening system for selective blockers of voltage-gated K⁺ channels using recombinant cell lines dying upon single action potential. *J Pharmacol Sci* **2013**, *123*, 147-58.
23. Fujii, M.; Ohya, S.; Yamamura, H.; et al. Development of recombinant cell line co-expressing mutated Nav1.5, Kir2.1, and hERG for the safety assay of drug candidates. *J Biomol Screen* **2012**, *17*, 773-84.
24. 藤井将人. 改変遺伝子導入培養細胞系を用いたイオンチャネル標的創薬における新規高効率スクリーニング用細胞の開発とその応用. 名古屋市立大学大学院薬学研究科 博士論文 **2013**.
25. Kondratskyi, A.; Kondratska, K.; Skryma, R.; et al. Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **2015**, *1848*, 2532-46.
26. Hartmann, H. A.; Tiedeman, A. A.; Chen, S. F.; et al. Effects of III-IV linker mutations on human heart Na⁺ channel inactivation gating. *Circ Res* **1994**, *75*, 114-22.
27. Ulbricht, W. Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. *Physiol Rev* **2005**, *85*, 1271-301.

28. Valdivia, C. R.; Ackerman, M. J.; Tester, D. J.; et al. A novel SCN5A arrhythmia mutation, M1766L, with expression defect rescued by mexiletine. *Cardiovasc Res* **2002**, *55*, 279-89.
29. Valdivia, C. R.; Tester, D. J.; Rok, B. A.; et al. A trafficking defective, Brugada syndrome-causing SCN5A mutation rescued by drugs. *Cardiovasc Res* **2004**, *62*, 53-62.
30. Uehara, A.; Murayama, T.; Yasukochi, M.; et al. Extensive Ca²⁺ leak through K4750Q cardiac ryanodine receptors caused by cytosolic and luminal Ca²⁺ hypersensitivity. *J Gen Physiol* **2017**, *149*, 199-218.
31. Renigunta, V.; Yuan, H.; Zuzarte, M.; et al. The retention factor p11 confers an endoplasmic reticulum-localization signal to the potassium channel TASK-1. *Traffic* **2006**, *7*, 168-81.
32. Guan, B.; Wang, T. L.; Shih Ie, M. ARID1A, a factor that promotes formation of SWI/SNF-mediated chromatin remodeling, is a tumor suppressor in gynecologic cancers. *Cancer Res* **2011**, *71*, 6718-27.
33. Hamill, O. P.; Marty, A.; Neher, E.; et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **1981**, *391*, 85-100.
34. Yamazaki, D.; Kito, H.; Yamamoto, S.; et al. Contribution of Kir2 potassium channels to ATP-induced cell death in brain capillary endothelial cells and reconstructed HEK293 cell model. *Am J Physiol Cell Physiol* **2011**, *300*, C75-86.
35. Schram, G.; Pourrier, M.; Wang, Z.; et al. Barium block of Kir2 and human cardiac inward rectifier currents: evidence for subunit-heteromeric contribution to native currents. *Cardiovasc Res* **2003**, *59*, 328-38.
36. Jordan, J.; Galindo, M. F.; Gonzalez-Garcia, C.; et al. Role and regulation of p53 in depolarization-induced neuronal death. *Neuroscience* **2003**, *122*, 707-15.
37. Bortner, C. D.; Cidlowski, J. A. Uncoupling cell shrinkage from apoptosis reveals that Na⁺ influx is required for volume loss during programmed cell death. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 39176-84.
38. Maeno, E.; Ishizaki, Y.; Kanaseki, T.; et al. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 9487-92.
39. Okada, Y.; Maeno, E.; Shimizu, T.; et al. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol* **2001**, *532*, 3-16.
40. Lu, L.; Zhang, L.; Wai, M. S.; et al. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicol In Vitro* **2012**, *26*, 636-44.
41. Tominaga, H.; Ishiyama, M.; Ohseto, F.; et al. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Analytical Communications* **1999**, *36*, 47-50.

42. Jorgensen, P. L.; Pedersen, P. A. Structure-function relationships of Na⁺, K⁺, ATP, or Mg²⁺ binding and energy transduction in Na,K-ATPase. *Biochim Biophys Acta* **2001**, *1505*, 57-74.
43. Hughes, F. M., Jr.; Bortner, C. D.; Purdy, G. D.; et al. Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 30567-76.
44. Fricker, M.; Tolkovsky, A. M.; Borutaite, V.; et al. Neuronal cell death. *Physiol Rev* **2018**, *98*, 813-880.
45. Chi, H.; Chang, H. Y.; Sang, T. K. Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*.
46. Chang, H. K.; Marton, L. J.; Liang, K. K.; et al. K⁺ binding in the G-loop and water cavity facilitates Ba²⁺ movement in the Kir2.1 channel. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1788*, 500-6.
47. Chatelain, F. C.; Alagem, N.; Xu, Q.; et al. The pore helix dipole has a minor role in inward rectifier channel function. *Neuron* **2005**, *47*, 833-43.
48. Larkman, P. M.; Perkins, E. M. A TASK-like pH- and amine-sensitive 'leak' K⁺ conductance regulates neonatal rat facial motoneuron excitability in vitro. *Eur J Neurosci* **2005**, *21*, 679-91.
49. Kim, Y.; Bang, H.; Kim, D. TASK-3, a new member of the tandem pore K⁺ channel family. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 9340-7.
50. Ma, X. Y.; Yu, J. M.; Zhang, S. Z.; et al. External Ba²⁺ block of the two-pore domain potassium channel TREK-1 defines conformational transition in its selectivity filter. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 39813-22.
51. Lesage, F.; Maingret, F.; Lazdunski, M. Cloning and expression of human TRAAK, a polyunsaturated fatty acids-activated and mechano-sensitive K⁺ channel. *FEBS Lett* **2000**, *471*, 137-40.
52. Alagem, N.; Dvir, M.; Reuveny, E. Mechanism of Ba²⁺ block of a mouse inwardly rectifying K⁺ channel: differential contribution by two discrete residues. *J Physiol* **2001**, *534*, 381-93.
53. Gonzalez, W.; Zuniga, L.; Cid, L. P.; et al. An extracellular ion pathway plays a central role in the cooperative gating of a K_{2P} K⁺ channel by extracellular pH. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 5984-91.
54. Concha, G.; Bustos, D.; Zuniga, R.; et al. The insensitivity of TASK-3 K_{2P} channels to external tetraethylammonium (TEA) partially depends on the cap structure. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*.
55. Duprat, F.; Lesage, F.; Fink, M.; et al. TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J* **1997**, *16*, 5464-71.
56. Zou, B.; Flaherty, D. P.; Simpson, D. S.; et al. ML365: Development of bis-amides as selective inhibitors of the KCNK3/TASK1 two pore potassium channel. *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)* **2013**.

57. Coburn, C. A.; Luo, Y.; Cui, M.; et al. Discovery of a pharmacologically active antagonist of the two-pore-domain potassium channel K_{2P}9.1 (TASK-3). *ChemMedChem* **2012**, *7*, 123-33.
58. Reyes, R.; Duprat, F.; Lesage, F.; et al. Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 30863-9.
59. Sonkusare, S. K.; Dalsgaard, T.; Bonev, A. D.; et al. Inward rectifier potassium (Kir2.1) channels as end-stage boosters of endothelium-dependent vasodilators. *J Physiol* **2016**, *594*, 3271-85.
60. Joiner, W. J.; Wang, L. Y.; Tang, M. D.; et al. hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94*, 11013-8.
61. Keen, J. E.; Khawaled, R.; Farrens, D. L.; et al. Domains responsible for constitutive and Ca²⁺-dependent interactions between calmodulin and small conductance Ca²⁺-activated potassium channels. *J Neurosci* **1999**, *19*, 8830-8.
62. Zhang, J. H.; Chung, T. D.; Oldenburg, K. R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* **1999**, *4*, 67-73.