

## 高次生命機能を指標としたケミカル・スクリーニング系開発

日大生産工(院) ○山崎 拓也 日大生産工 野呂 知加子

### 1. 緒言

抗生物質を初めとする低分子化合物は、古くから医薬品等として有効活用されている。従来は微生物や植物等の天然資源からの抽出・精製が主であったが、近年はまず多様な化合物を合成して網羅的なライブラリとし、これをスクリーニングしてターゲットを探索する方法が、製薬会社等の新薬開発戦略となってきた。例えば、大手外資製薬会社における抗ガン剤の開発では、大規模な合成とロボットオートメーションによる細胞増殖抑制効果判定、すなわちハイスループットスクリーニング・セルベースアッセイと言われる手法が用いられている。さらに多様な生物効果をもつ薬剤を選択するためには、細胞の種類を選択や、新しい視点による高度で複雑な細胞機能を指標としたスクリーニング系の開発が重要である。

本研究は高次生命機能を指標とした定量的ケミカル・スクリーニング系を開発し、これを利用して新たに効果のある化合物を見だし、創薬に繋げることを目標とする。その一環として、ヒト肝臓癌細胞を用いた細胞死・細胞接着・細胞移動(転移性浸潤)の阻害/促進を指標としたケミカル・スクリーニング系の開発を目指す。開発した系を用いて理化学研究所化合物ライブラリの約2万種類のケミカルについてスクリーニングを行い、効果のあった化合物に関しては、より詳細なメカニズム研究を展開する。

通常、細胞はアポトーシスと呼ばれる個体の制御機構に従ってプログラムされた生理的、能動的な細胞死によって制御されている。アポトーシスに関連

する遺伝子に化学物質、環境因子、放射線などによる突然変異が起こると、細胞増殖が過剰となり腫瘍を形成する。特にアポトーシス関連遺伝子 p53 は癌抑制遺伝子としても知られ、研究が進んでいる。

さらに遺伝子変異が蓄積されていくと、転移能をもつ悪性度の高い癌細胞となる。癌転移の引き金である原発腫瘍からの離脱は、「上皮-間充織転換 (Epithelial to mesenchymal transition: EMT)」と呼ばれる現象が関与している。EMT とは、頂端面と基底面をという形態的な極性を持つ上皮細胞から、不規則な形態で運動性を有する間充織細胞へと変化することであり、細胞極性の崩壊や細胞間の接着の解離、基底膜の分解といった一連の細胞反応からなる複合的な現象である。EMT には E-カドヘリン (Epithelial cadherin) 分子の発現低下が関係していることがわかっている。E-カドヘリンは上皮細胞に存在し間充織細胞には発現していない細胞膜貫通型のタンパク質で、カルシウム依存性の接着分子である。細胞内でカテニンを介して細胞骨格アクチン繊維と結合し、また細胞内の種々のシグナル伝達にも関与している癌転移のキーとなる分子である。

本報告では、ヒト癌細胞の細胞死・細胞接着・細胞移動という3つの指標のうち、まず細胞死について、ArrayScan という機器を利用した定量的スクリーニング系の開発結果について述べる。

### 2. 実験

本実験では、ヒト肝臓癌細胞株 HepG2 を使用した。HepG2 は 1979 年に原発性ヒト肝臓癌(白人男性、15 才)から樹立された細胞株で、上皮細胞様の付着

性細胞である。癌研究のみならず、肝臓の機能を模倣する系として国内外で幅広く使われている。

## 2. 2. 細胞培養

HepG2 は、10%の FBS(Fetal bovine serum)と Penicillin-Streptomycin を 0.1mg/ml になるように加えた DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)を用いて、5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37℃で培養した。

## 2. 3. 細胞毒性試験

ATRA all-trans retinoic acid(all-trans retinoic acid)を用いた細胞毒性試験を行った。ATRAは癌細胞でアポトーシスを誘導するビタミンA誘導体の一種である。まず、96well plateに細胞を1.0×10<sup>4</sup> cell/wellで播種し、一晚培養して細胞を接着させた。一晚培養後、培養液を除去し、ATRAを50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125 μg/mlの濃度で加え72h培養した(対象群は1/1000DMSO(dimethyl sulfoxide) in DMEMを加えた)。培養後、Cell Viability Kit (Cellomics® K02-0001-1)を用いて細胞核、生細胞、死細胞を染色した。測定は96well plate上に播種した細胞を特定の蛍光試薬で染色することにより、各well中の個々の細胞についての蛍光強度を測定し統計処理することができるArrayScanを使用した。細胞核、生細胞、死細胞の蛍光強度を測定し、生細胞頻度 Viability Percentageを算出した。

## 3. 結果および考察

HepG2 に対する ATRA の細胞毒性試験を行った結果、Fig.1 の Viability Percentage が得られた。Fig.1 は対象群 well を 100%としたときの値である。ATRA の濃度が高くなるにつれ Viability Percentage は低下していき、25 μg/ml で 50%を下回った。ATRA の細胞毒性は観測されたが、文献値では 25 μg/ml で 90%を上回り、50 μg/ml で急激に低下し 20%程度となっているので、文献値との相関性を得ることはできなかった。原因としては、細胞

数のばらつき、蛍光試薬の特異性などが考えられる。また、ATRA は HepG2 に対し 50 μg/ml で急激に細胞毒性を示すので、実験系としては検討しにくいということも考えられる。今後は、播種する細胞数の再検討を行うと共に、細胞毒性が報告されている他の試薬 Tamoxifen, Sulindac についても検討していく。また、細胞死に伴い、播種した細胞が plate から剥がれてしまい、結果にばらつきが出る傾向も認められたので、培養皿に処理を施して細胞が剥がれるのを防ぐ等の工夫を行う。

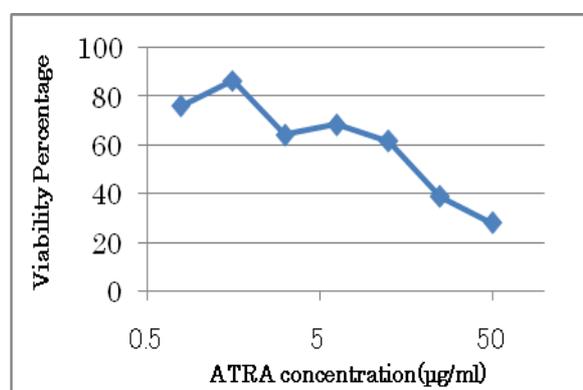


Fig.1 ATRAに対するHepG2の細胞毒性

### 「参考文献」

- 1) Md Atiqur Rahman, et.al.; Sulindac and Exisulind Exhibit a Significant Antiproliferative Effect and Induce Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *CANCER RESEARCH* 60, (2000), 2085-2089
- 2) Frederick Arce et al.; Apoptotic events induced by naturally occurring retinoids ATRA and 13-cis retinoic acid on human hepatoma cell lines Hep3B and HepG2. *Cancer Letters* 229 (2005), 271-281
- 3) Yusmazura Zakaria, et.al.; Eurycomanone induce apoptosis in HepG2 cells via up-regulation of p53. *Cancer Cell International* (2009), doi:10.1186/1475-2867-9-16