

細胞工学技術とバイオセンシング技術とによる HTA 開発

春山 哲也

Cellular Engineering and Biosensor Technology for High Through-put Analysis on Drug Discovery

Tetsuya HARUYAMA

*Department of Biological Functions and Engineering, Kyushu Institute of Technology
Kitakyushu Science and Research Park, Hibikino, Kitakyushu, Fukuoka 808-0196, Japan*

(Received October 1, 2009)

Sensors have been developed to determine the concentration of specific compounds *in situ*. They are already widely employed as a practical technological tool in the clinical and healthcare fields. Recently, another concept of biosensing has been receiving attention: biosensing for the evaluation of molecular potency. The author described the idea as qualified analysis. The development of this novel concept has been supported by the development of related technologies, such as electrochemistry, molecular interface science, molecular design, molecular biology (genetic engineering), and cellular/tissual engineering. This study addresses this new concept of biosensing and its application to the evaluation of the potency of chemicals in biological systems, in the field of cellular/tissual engineering. Cellular biosensing will provide valuable information for both pharmaceutical research and chemical safety, and be applicable in drug discovery *in vitro* as a screening tool.

Key words—biosensor; cellular; model cell; high through-put analysis; drug discovery; qualified analysis

1. はじめに

医薬開発においては、様々な分析技術が駆使されている。成分分析を行う定性、あるいは特定分子の量を明らかにする定量を行う機器分析やその他の分析手法を駆使している。そのほかに、医薬開発において「測る」ことが重要である事象が、効果の有無である。医薬品開発における評価対象となる化合物種は分子設計及び合成手法の進歩と、化合物情報のネットワーク化により、増大の一途を辿る傾向にあり、特に薬剤効果を分析・解析することができる High through-put screening (HTS)¹⁾の需要は非常に高い。そして HTS を実現するために必須な技術である High through-put analysis (HTA) はますます重要度を高めている。²⁾

効果の有無を測ることは、定量・定性の中で考えることもできるが、効果・影響を測るという課題に

対し、筆者は「定質」という考え方を提唱し、³⁾ またそのための分析技術やハイスループットなセンシング技術の研究開発を行ってきている。

定質は、特定の対象に対する効果の有無や、効果の共通性などから、効果・影響を与える分子の存在を見い出すという考え方である。つまり、定質は、効果・影響を受ける側に着目した測定であり、分子そのものに着目する従来の分析の考え方とは異なるアプローチである。

本稿では、医薬開発における HTA (high through-put analysis) のための定質を行うバイオセンシング技術について報告する。

2. 細胞接着型センサ材料の開発とシームレス細胞 NO センシングシステム

一酸化窒素 (NO) は多くの組織・器官で信号因子や調節因子などとして機能している。一方で、この NO は多くの組織・器官の機能や状態を外部からモニタする場合のよい指標 (言わば質を測るための定質指標) となり、様々な培養細胞、培養組織が産生する NO を直接測定することは、細胞や組織ベースの定質分析として大きな需要がある。そのた

九州工業大学大学院生命体工学研究科生体機能専攻生物電子工学分野 (〒808-0196 福岡県北九州市若松区ひびきの北九州学術研究都市)

e-mail: haruyama@life.kyutech.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム S24 で発表したものを中心に記述したものである。

め、様々な方法やシステムが提案されてきており、筆者自身も新規な NO の検出法⁴⁾開発やその細胞バイオセンシングのためのシステム化^{5,6)}について検討を行ってきた。その中でも、細胞が産生する微量の NO を効率よく検出し、また同時に組織モデルとしての特性を付与した、細胞接着型センサ材料とそれを用いたシームレス細胞 NO センシングに関して以下に述べる。

細胞が産生する NO は、微量であることはもちろんであるが、それ以上に、NO の反応性の高さによって水溶液中では NO としての存在時間も拡散距離もとても短い。そのため、もともと NO の測定は難しく、NO と酸素との反応産物である亜硝酸などを測定する方法が一般的である。しかし、NO を指標とした定質を行うためには、NO の産生挙動が重要であり、NO を直接、かつ経時的にモニタリングすることが可能なセンシング手法が必要である。電気化学反応に基づくセンサは、*in situ* 測定に優れ、経時測定に適している。しかし、電気化学反応における分子選択性（この場合は NO に対する選択性）を獲得するために、電極の表面に分子選択層が必要となる。また、細胞から産生後の NO は、拡散による希釈と反応による消失により濃度が大きく変化してしまうことが明らかになっている。そのため、細胞表面とセンサとの距離を正確に制御することも重要な課題である。それらの課題に対し、筆者が創案したのは、細胞接着センサ材料を開発したことによって実現した Seamless cellular NO sensing (シームレス細胞 NO センシング) である。

このセンサの構成を Fig. 1 に示す。この図は、シームレス細胞 NO センサの断面図である。また、本報ではヒト臍帯内皮細胞 (HUVEC) が産生する NO を測定する系を示している。NO は電極電位により酸化することができる。そのため測定は電

気化学的に行うが、そのみでは、NO よりも低い酸化還元電位の夾雑分子も電解酸化されてしまうため、NO に対する選択性が確保できない。そこで、電極電位の二段階印加と、電極表面の分子選択膜による被覆の二つの方法によって NO 選択性を得ることとした。

電極電位の二段階印加 (パルスステップボルタンメトリ) は、NO の酸化還元電位よりも少し低い電位をまず印加し、電極表面に存在する夾雑分子を酸化してしまう。その直後に NO の酸化電位を印加することによって、NO のみの酸化電流を得て、選択的定量を行うものである。このパルスステップボルタンメトリを繰り返し行うことにより 30 秒毎に NO 濃度を測定できる。そのセンサ応答を経時的に記録することで、外部からの薬剤刺激や物理的刺激によって細胞や組織が行う NO 産生のプロファイルを容易に明らかにすることができる。分子選択膜により付与される分子選択性も重要である。ここではポリイオン-ポリイオンコンプレックスにより、密度 (分子ふるい効果) と表面荷電 (イオン交換効果) そして親疎水特性をそれぞれ制御した薄膜を電極表面に形成している。これにより、夾雑物質の電極との反応や、電極表面の汚辱による電気化学反応への影響を妨げることができる。

このセンサのもう一つの画期的特徴は、センサの分子選択膜上で付着性細胞が定着培養できることである (Fig. 1)。これは、分子選択膜を形成するときその表面に細胞外マトリックス (ECM) として機能する配列を有する合成ペプチドを導入している。その機能により、細胞接着型センサ材料 (測定対象分子に対する選択性と、哺乳類細胞の接着性) を創成することに成功したものである。これにより、細胞から産生された NO は直ちにセンサ材料層内に速やかに拡散し、電気化学的に測定されるた

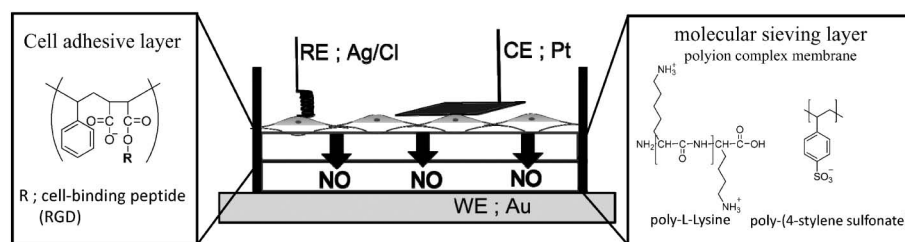


Fig. 1. Cross-section View of Seamless-cellular NO Sensor Device

め、測定の効率・再現性・定量性ともに確保することに成功した。

実際の測定結果（センサ出力の生データ）を Fig. 2 に示す。HUVEC における NO 産生を誘導するアゴニストを適用すると、センサ応答が大きく増える。これは、細胞から NO が産生され、それを本センサが検出していることを示している。また、先に述べたように、30 秒毎に 1 測定を行っているため、細胞が NO を産生する挙動（あるいは産生が抑制される挙動）を詳細に解析することができる。

このセンサ応答は完全な生データである。そのため、センサ応答がドリフト（センサの出力値が定常的に変化すること）やノイズを含んでいることがわかる。これらは詳細な解析を妨げる場合もあるが、センサは変化量を読み取ることによって測定結果とするため、多くの場合は測定結果の獲得を行う上での障害とはならない。

ここでは詳述しないが、われわれは、センサの応

答をより詳細に解析するためにセンサ応答の挙動（応答プロファイル）を詳細に解析する手法（データ主成分解析：PCA）を用いる検討も行っている。この PCA により、センサ応答の大小だけでなく、応答の波形を含めた解析を行うことにより、NO の産生挙動の微細な違いを見出すことができる。それにより細胞機能が強く（あるいは弱く）誘導されているかどうか、機能阻害を受けているなどの判定を行うことも可能になりつつある。

この細胞接着型センサデバイスの構成にはもう一つ意義となる理由がある。それは、HUVEC の場合、細胞の基底膜側に多くの NO が産生され、それが血管外表面にある平滑筋などへのシグナル因子となっている (Fig. 3)。つまり、この細胞接着型センサデバイスは、組織のモデルとしての形態を有しており、機能評価に基づく薬剤探索・薬剤評価を行う HTA として、従来の方法にない多くのアドバンテージを有した方法・システムである。

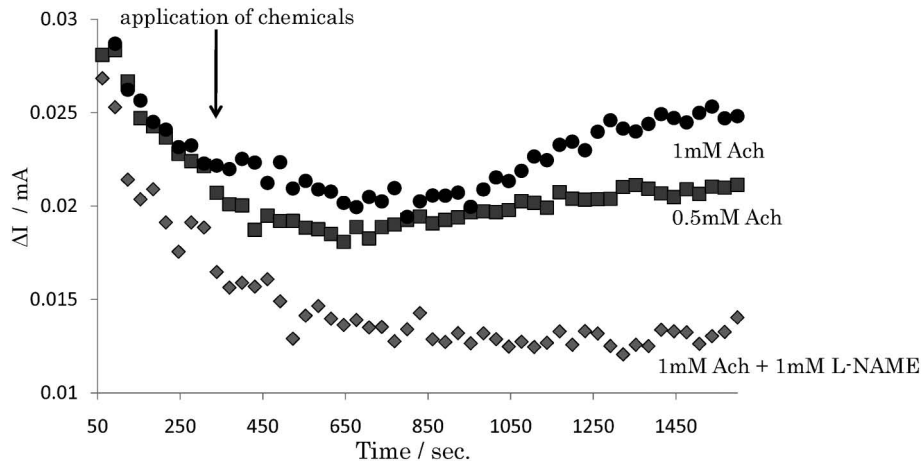


Fig. 2. Actual Data Record of Sensor Output

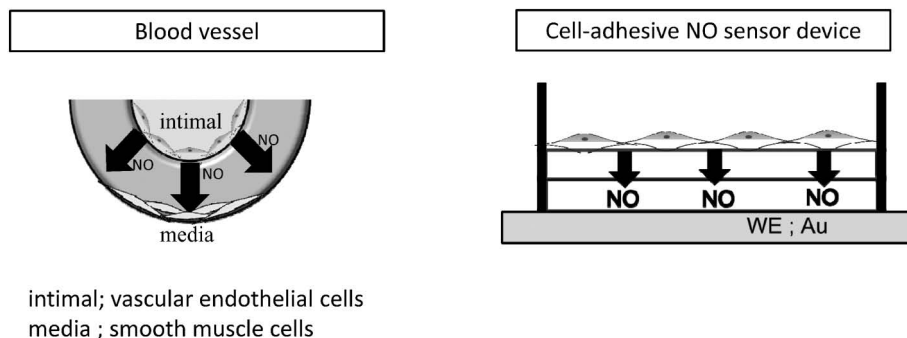


Fig. 3. Involvement between Seamless Cellular NO Sensing System and Functional Structure of Blood Vessel

細胞バイオセンシングで得られるセンサ応答は Fig. 2 にみられるようにドリフトやノイズを含む場合が多い。本報では詳述しないが、われわれはデータ主成分解析という方法を駆使し、ドリフトやノイズを含む場合でも、真の応答成分のみを抽出解析する手法も確立しつつある。この方法により、モデル細胞上にあるレセプターへ外部刺激が与える効果や影響を詳細に解析できる。

3. シナプスモデル細胞とレセプター機能センシングシステム

レセプターは細胞外からの信号（物質により与えられる情報、あるいは物理的に与えられる情報）を細胞内へ伝えるための情報変換と伝達を担っている多種多様なタンパク質分子群の総称である。その多くは細胞膜上に存在し、受容体とも言われる。別の見方をすると、レセプターは細胞の代謝や応答を外部から制御することができるスイッチであるとも考えることができる。この視点からだけ考えても、創薬の分子ターゲットとして、レセプターが注目されることは明らかであろう。そのことは実際に開発された薬剤、あるいは最近の薬剤開発の分子ターゲットの設定にもあらわれている。売上高で上位 50 までの医薬のうち約 20% がレセプターをターゲットにした医薬である。少し以前の統計でも、その医薬品としての売上高は 230 億米ドルにも達している。^{7,8)} レセプターは、生体内におけるその機能により薬剤開発の主要なターゲットとなっていることから、レセプター機能を簡便に評価し、リガンドの作用をスクリーニングするための、レセプターにおける HTA 手法の開発は、世界的にも今非常にホットな研究領域である。しかし、レセプター機能の *in vitro* 評価系、特に HTA 手法が多くレセプターで確立できていない。ほとんどのレセプターは細胞膜である脂質 2 分子膜を 1-数本のペプチド（タンパク質の 1 次構造であるアミノ酸のポリマーのこと）が数回貫通することによって、機能構造を形成している。レセプターによっては、そのような構造がサブユニットとなり、サブユニットが複数会合し、機能構造を形成している (Fig. 4)。そのため、単純にレセプター分子だけを単離精製してきても、Fig. 4 のような機能構造を保持できず、評価をできない場合もある。そのため、多くは培養細胞系をベースとして評価を行っているが、レセプター機能

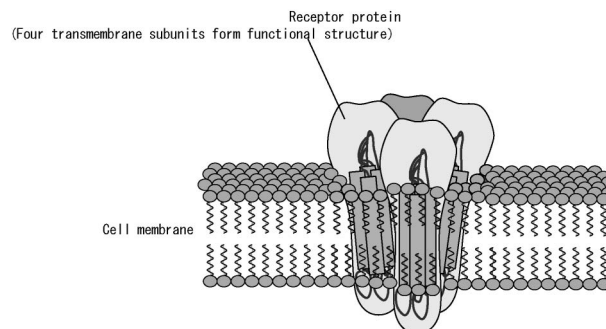


Fig. 4. Functional Structure of Receptor Protein on a Cellular Membrane

の分析手法を含め、方法確立は不十分である。

神経系のレセプター機能（多くはイオンチャネルゲート型レセプター）を評価に用いる HTA の構築は特に難しい。それは、神経細胞は、神経芽細胞として培養増殖後、分化を経て、シナプス形成などの神経細胞機能を発現する。そのため、細胞の培養・分化が煩雑であることはもちろんであるが、神経系薬剤の主要な分子ターゲットとなるレセプターが局在する後シナプスの形成・機能を再現し、維持することが難しい。そのため HTA 系構築自体が難しいことはもちろんであるが、得られる結果の振れ幅が大きいことも方法確立が困難である主要な理由となっている。

筆者は、培養や状態維持が困難である神経細胞を用いずに、イオンチャネルゲート型レセプターそのものの機能のみに限定して着目した方法が、この機能評価とその HTA 化には適するのではないかと考えた。つまり後シナプスに局在する目的とするイオンチャネルゲート型レセプターの分子機能をモデル化する「シナプスモデル細胞」というコンセプトの基、その構築を行った。シナプスモデル細胞は、神経細胞からクローニングしたイオンチャネルゲート型レセプター遺伝子を、培養容易な細胞に遺伝子工学的に導入し、後シナプス膜上で発現提示されるのと同様に細胞膜上に発現提示をさせることによって構築した細胞である (Fig. 5)。増殖が早く、培養容易な細胞として、昆虫細胞や、マウスやヒト由来の哺乳類細胞などでこのシナプスモデル細胞を構築できる。この細胞に、中枢神経系のポストシナプス膜において機能しているイオンチャネルゲート型レセプターであるグルタミン酸レセプターを遺伝子工学的に導入、細胞膜上に機能を保持した状態で提

示することに成功した.⁹⁾

モデル細胞を構築するだけでは HTA の確立には至らない. 筆者は, この細胞の特性を利用した, 効率のよいイオンチャネルゲート型レセプター機能分析法を開発した. この細胞を, 細胞とほぼ同サイズの微小な電極の表面に接触させ (測定電極), 細胞

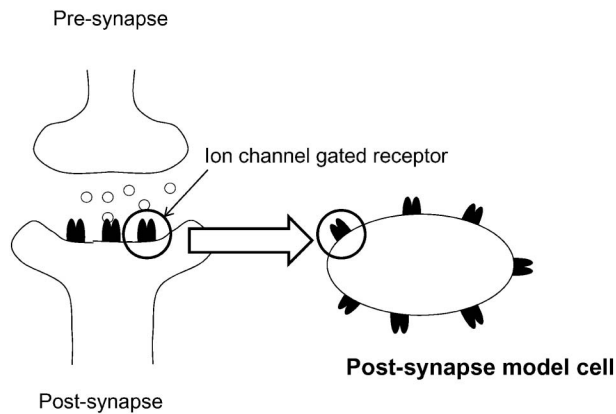


Fig. 5. Conceptual Illustration of Engineered Post-synapse Model Cell

が接触しない同様の電極 (基準電極) との間の電極電位を測定する. このとき, リガンド結合によりイオンチャネルが開くと, 特定のイオン種だけが細胞内に流入するため, 測定電極表面にあるイオン種の一部が細胞内に選択的に取り込まれ, 荷電粒子であるイオンの特異的な濃度の偏りによって測定電極-基準電極間の電極電位が変化する. この電位変化挙動がイオンチャネルゲート型レセプターの機能と連動しているため, レセプター機能をモニタリングすることができる.¹⁰⁾ このシナプスモデル細胞は培養が容易である上に, 神経細胞よりも多くのレセプターを発現, 細胞表面に提示できる. そのため, より大きな応答をするために測定を行う際の S/N 比 (シグナル/ノイズ比) が良好であり, 再現性もよい. また, 浮遊細胞でこのシナプスモデル細胞の構築も行っている. その場合は, 浮遊培養したモデル細胞をフローで測定セル内の電極上に導くなど, より分析作業効率の高い HTA を構築可能である.

シナプスモデル細胞と機能分析システムにより葉

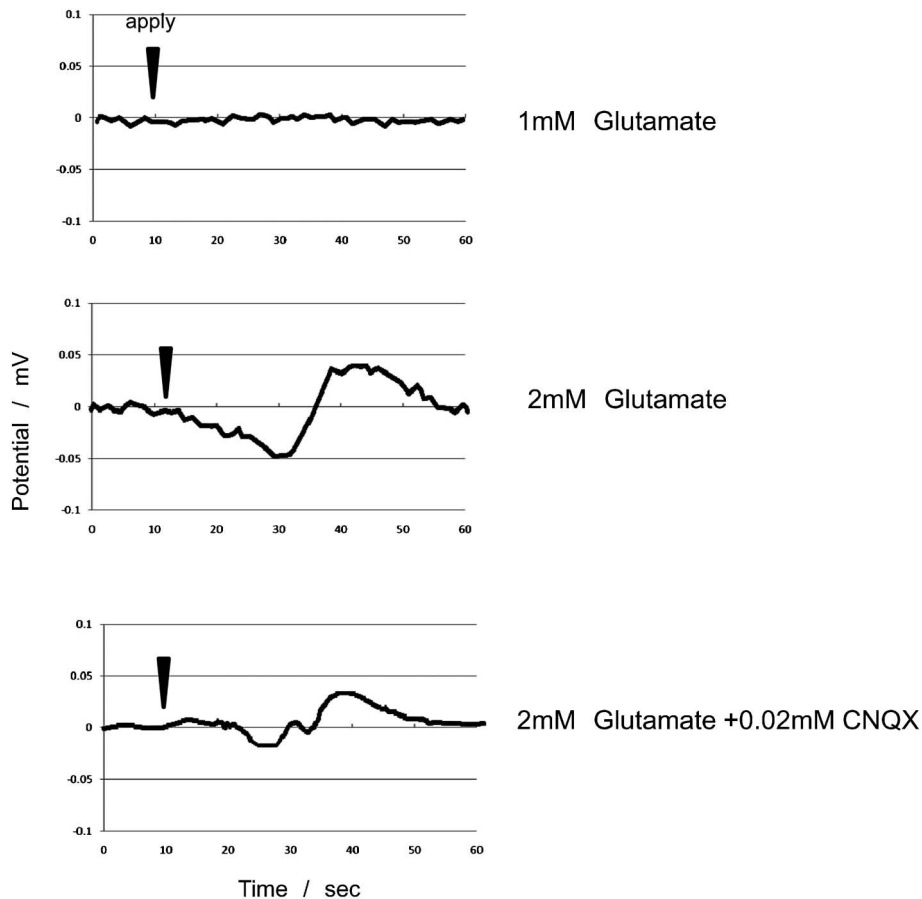


Fig. 6. Signal Output Profile of Agonist-stimulated Post-synapse Model Cell on Functional Assay System

剤評価を行った結果の一部を Fig. 6 に示す。Figure 6 に示すのは、中枢系後シナプスに多く局在する Na ion gated glutamine receptor (iGluR) を細胞表面提示しているシナプスモデル細胞を、機能分析システムの測定電極上に配置し、そこに、それぞれ異なる濃度のアゴニスト（グルタミン酸）を適用した際に得られる測定電極と基準電極との間の電位差の時間変化（センサ応答）を示している（Fig. 6, upper and middle）。この結果から分かるように、iGluR はアゴニスト濃度依存的に、イオンチャンネルが開閉し、細胞内へのイオン流入量に変化することが本システムにより経時的に測定できる。また、iGluR の働きを抑制することが知られている cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) を、アゴニストであるグルタミンと同時適用すると、センサ応答である電位変化により示される細胞内へのイオン流入は著しく減少した（Fig. 6, lower）。このことは、本システムが、iGluR への様々な影響や効果を解析する手法となることを示している。

4. まとめ

薬剤開発は、化合物が、目的とする分子ターゲットや分子カスケードに与える影響・効果を見極めることが、一つの端緒となる。影響・効果に着目したスクリーニングの中核をなす HTA 技術を開発・構築することによって、候補物質が与える影響・効果そのものを指標としたスクリーニング系を獲得することができる。その HTA 技術において、バイオセンサ、特に細胞バイオセンシングは強力な手法とツールを提供する科学技術であると言い得る。

重要な点は、医薬開発の分子ターゲットを設定し、その目指す分子ターゲット及び機能ターゲットを十分に考慮し、スクリーニングストラテジーを十分に勘案した影響・効果の分析手法としての HTA を開発・構築することが非常に重要である。そうし

た技術の開発には、非常に学際的な取り組みと知見が必要とされる。そして、実際に医薬研究開発を行う側と、*in situ* 分析法あるいはセンシング手法といった HTA 技術を研究開発する側とが連携し、綿密なストラテジー構築を行うことが、より効果的な方法を開発し獲得する近道であると考えられる。

REFERENCES

- 1) Ma P., Zimmel R., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1**, 571–572 (2002).
- 2) Hughes I. and Hunter D., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 243–247 (2001).
- 3) Haruyama, T., Ikeda, M., Katayama, M., Suzuki, S., Sonezaki, S., Tanaka, I., Mitsubayashi, K., Haneda, H., Tanaka, T., Mizutani, Y., Yagi, K., Social demands and technical overviews of sensors based on qualified analysis, C.R., Eds. by Haruyama, T., and Haneda, H., The Society of non-traditional Technology. 2009.3.1, Tokyo.
- 4) Haruyama T., Shiino S., Yanagida Y., Kobatake E., Aizawa M., *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 763–769 (1998).
- 5) Haruyama T., Aizawa M., *Electrochemistry*, **67**, 484–487 (1999).
- 6) Asakawa H., Mochitate K., Haruyama T., *Anal. Chem.*, **80**, 1505–1511 (2008).
- 7) Arai Y., *Kagaku to Seibutsu*, **38**, 264–269 (2000).
- 8) Drews J., *Science*, **287**, 1960–1963 (2000).
- 9) Haruyama T., Bongsebandhu-Phubhakdi S., Nakamura I., Mottershead D., Keinänen K., Kobatake E., Aizawa M., *Anal. Chem.*, **75**, 918–921 (2003).
- 10) Haruyama T., Migita S., *IEEJ Trans, SM*, **128**, 373–376 (2008).