

蛍光画像を利用した新規のプロテアソーム阻害剤のハイスループットスクリーニング

Linda Rickardson¹⁾, Malin Wickstrom¹⁾, Rolf Larsson¹⁾, and Henrik Lovborg^{1,2)}

1) Department of Medical Sciences, Division of Clinical Pharmacology, Uppsala University Hospital, 751 85 Uppsala, Sweden

2) Department of Medicine and Care, Division of Clinical Pharmacology, Faculty of Health Sciences, Linköping University, 581 85 Linköping, Sweden

プロテアソームは新たなガン治療法の標的となっており、プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ (bortezomib) が骨髄腫 (ミエローマ) の患者に有効であることが実証されている。本稿では、プロテアソーム活性を阻害する化合物を蛍光画像でスクリーニングする方法の開発について述べる。プロテアソーム阻害剤のスクリーニングと評価には、ZsProSensor-1を発現するLiving Colors HEK 293 ZsGreen Proteasome Sensor Cell Line (ヒト胎児腎臓細胞株にZsProSensor-1ベクターを安定トランスフェクションして得られた細胞株) を用いた。この細胞株では、プロテアソームが阻害されると、緑色蛍光タンパク質 ZsGreenが細胞内に蓄積する。このタンパク質はArrayScan High Content Screening systemにより測定でき、また細胞の形態もこのシステムで観察できる。LOPAC¹²⁸⁰ 化合物ライブラリーをスクリーニングしたところ、プロテアソームを阻害する化合物が7つ発見された。これらの化合物の中にはジスルフィラム (disulfiram) と ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC)が含まれていた。ジスルフィラムとPDTCの細胞傷害活性を調べたところ、これらの化合物がミエローマ細胞株RPMI 8226で細胞傷害を誘導することが判明した。このアッセイの平均Z'値は0.66であった。この結果は、このアッセイ法は新規のプロテアソーム阻害剤を迅速に同定でき、他の化合物ライブラリーの蛍光解析画像スクリーニングの有力なツールになることを示唆している。

はじめに

プロテアソームは細胞質と核に存在する巨大なタンパク質分解酵素複合体であり、20Sのコア触媒複合体とその両端の19Sサブユニットから構成される (1)。ユビキチンで標識されたタンパク質はプロテアソームに運ばれて分解される。ガン細胞は正常細胞よりもプロテアソーム阻害剤に対する感受性が高いことが報告されている (2)。ほとんどの抗ガン剤のエンドポイント (評価項目) は細胞死である。細胞傷害性をもつ従来の薬剤はしばしば重篤な副作用をもつため、毒性が少ない新たな有効な抗ガン剤を探索することが重要である。最近、プロテアソームは抗ガン剤治療の新たな標的として注目されており、プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ (商品名: ベルケード[®]) は多発性骨髄腫の患者で有望な臨床効果を示している (3)。本稿では、蛍光解析画像を利用した新規なプロテアソーム阻害剤の迅速なスクリーニング法の開発について述べる。既存の化合物ライブラリーLOPAC¹²⁸⁰ (Sigma-Aldrich社) からプロテアソーム阻害剤をスクリーニングするために、ZsProSensor-1融合タンパク質 (4) を発現するLiving Colors HEK 293 ZsGreen Proteasome Sensor Cell Line (製品コード 631535) を用いた。ZsProSensor-1は緑色蛍光タンパク質 ZsGreenをマウス・オルニチンデカルボキシラーゼ (MODC; ユビキチン化なしで26Sプロテアソームにより分解される; 5) に融合させたものである。プロテアソーム阻害剤はMODCの分解を妨げ、その結果、細胞内にZsGreenが蓄積する。生じた蛍光はArrayScan HCS readerで測定する。

細胞培養

プロテアソーム阻害剤のスクリーニングと評価には、ZsProSensor-1融合タンパク質を安定発現するLiving Colors HEK 293 ZsGreen Proteasome Sensor Cell Lineを用いた。この細胞株は、10%ウシ胎児血清、2 mM グルタミン、50 μ g/ml ストレプトマイシン、および60 μ g/ml ペニシリンを添加したDulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma Aldrich社) 中で5%CO₂、湿潤条件、37°Cで培養した。安定にトランスフェクトされた細胞を選択するために、抗生物質G418を0.2 mg/mlの濃度で培地に添加した。この細胞は接着性であるため、トリプシン処理をして継代培養を行った。ミエローマ細胞株RPMI 8226は、上記の添加物を加えたRPMI 1640培地で培養した。HeLa細胞は、上記の添加物と1 mMピルビン酸ナトリウムを加えたEagle 最少必須培地で培養した。細胞の増殖と形態は1週間ごとに観察した。

化合物ライブラリー

スクリーニングに用いた化合物はLOPAC¹²⁸⁰ライブラリーである。このライブラリーは、56の薬効に分類された1,266の薬理活性化合物を集めたものである (6)。これらの化合物をジメチルスルホキシド (DMSO)

に溶解した後、生理緩衝食塩水（PBS）で希釈し、Biomek 2000 pipetting station（Beckman Coulter社）を用いてNunc 384 DeepWellマイクロプレート（Nunc社）に移した。このプレートを使用時まで -70°C で保存した。臨床使用されているプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ（Millennium Pharmaceuticals社）を陽性コントロールとして用いた。スクリーニングでヒットした化合物の再試験には、研究用のプロテアソーム阻害剤であるMG262（Calbiochem社）とlactacystin（Sigma-Aldrich社）を陽性コントロールとして用いた。

蛍光画像によるプロテアソーム活性のスクリーニングアッセイ

HEK 293 ZsGreen Proteasomeセンサー細胞をPrecision 2000 pipetting robot（BioTek Instruments社）を用いて4枚の黒色384ウェルマイクロプレート（BD Falcon社）に2,750 cells/ウェルの密度で播種した。細胞をウェルに1時間接着させた後、さらに 37°C で9時間培養した。次に、1ウェルあたり $5\ \mu\text{l}$ の化合物をBiomek 2000 pipetting stationを用いて加えた（スクリーニング濃度は $10\ \mu\text{M}$ になる）。ウェルの2列には化合物を加えず、コントロールとして用いた。1列は培地のみを加えたもので、ブランクとして用いた。他の1列には、陽性コントロールとして $10\ \mu\text{M}$ ボルテゾミブを加えた。プレートを 37°C で12時間培養した。ELx405 microplate washer（BioTek Instruments社）を用いて培地を除いた後、Multidrop 384分注機（Titertek社）を用いて $40\ \mu\text{l}$ の3.7%パラホルムアルデヒド（固定剤）および $10\ \mu\text{M}$ Hoechst 33342（核染色剤）を加えて細胞を固定した。プレートを15分間放置した後、PBSで洗浄し、シールをして 4°C 暗所で画像解析時まで保存した。DMSOの最終濃度は最大で1%であった。

スクリーニングでヒットした化合物を再試験する場合は、活性化化合物をライブラリーから個々に選択し、スクリーニングの時と同様な操作とセッティングで、まずHeLa細胞で試験を行った。高い蛍光をもつ化合物の場合は自家蛍光とみなした。それ以外の化合物について、陽性コントロールのMG262およびlactacystinと同様に、平底の96ウェルプレートに播種して2時間接着させたHEK 293 ZsGreen Proteasome Sensor Cell Lineで再試験を行った。活性化化合物を細胞に加えて12時間培養した後、細胞を固定、洗浄した。そのプレートを、スクリーニングの時と同様な操作とセッティングで解析した。

画像の取得とサイトメトリー分析

染色・固定化された細胞を含むプレートを、ArrayScan HCS reader software（Cellomics社）で解析した。このシステムはコンピューターで自動的に蛍光画像が得られる顕微鏡で、染色された細胞を自動的に同定し、個々の細胞内の蛍光の強度と分布を記録・報告する。 $5\times$ 対物レンズとXF100フィルターを用いて、各蛍光チャンネル（Hoechst 33342 およびFITC）で画像を得た。26Sプロテアソームの阻害の程度を定量するために、各ウェルの蛍光強度を測定した。各ウェルで700個の細胞を分析した。他のチャンネルの染色強度に関わりなくフォーカスできるように、核チャンネルにオートフォーカスした。容易に検索できるように、画像と各細胞内の蛍光の強度と色に関するデータ、およびウェル内の細胞集団の平均蛍光をMicrosoft SQLデータベースに保存した。

細胞傷害アッセイ

以前に詳細に報告（6）したFluorometric Microculture Cytotoxicity Assay (FMCA)により、化合物の細胞傷害活性を測定した。

20S プロテアソーム活性のアッセイ

20Sプロテアソームの酵素活性は、20S proteasome assay kit（BIOMOL International社）を用い、その説明書に従って測定した。簡潔に述べると、25 mM HEPES (pH 7.5)、0.5 mM EDTA、0.05% NP-40および0.03% SDSを含むアッセイバッファー中のヒト赤血球20S酵素に被験物質または既知の阻害剤を加えて20S活性を測定した。10分間インキュベートして酵素と基質を反応させた後、プロテアソーム蛍光基質SUC-LLVY-AMCを加えた。励起波長340 nm、蛍光波長450 nmの条件でFLUOStar Optima（BMG LABTECH社）を用い、 37°C で1時間にわたって蛍光の増加を3分ごとに測定した。蛍光増加のタイムコースから酵素活性を定量した。

統計解析

GraphPad Prism（GraphPad Software社）を用いて統計解析を行った。スクリーニング設定におけるアッセイの有用性を評価するために、次式を用いるZhangらの方法（7）に従ってZ'値を測定した。

$$Z' = 1 - \frac{(3SD_{\text{pos. control}} + 3SD_{\text{neg. control}})}{(\text{Mean}_{\text{pos. control}} - \text{Mean}_{\text{neg. control}})}$$

結果

方法の開発とヒット率

本稿で述べたアッセイでは、プロテアソーム阻害剤をスクリーニングするために、ZsPro-Sensor-1融合タンパク質を発現するHEK 293 ZsGreen Proteasome Sensor Cell Lineを用いた。ArrayScan HCS readerでスクリーニング測定を行い、ヒットした化合物を20S酵素アッセイでさらに試験した。最後に、化合物の細胞傷害活性をミエローマ細胞株で試験した。各ウェルの蛍光シグナルはArrayScanで測定し、ウェルの蛍光シグナルが陰性コントロールシグナルの平均値 (11.1) + 3 SD (標準偏差) を超える場合をヒット化合物とみなした。3 SDカットオフ値は17.1であった。スクリーニングの結果、プロテアソーム阻害活性をもつ化合物が14個同定された。スクリーニング結果のヒストグラムを図1に示す。この図では、ヒットした化合物を矢印で示している。

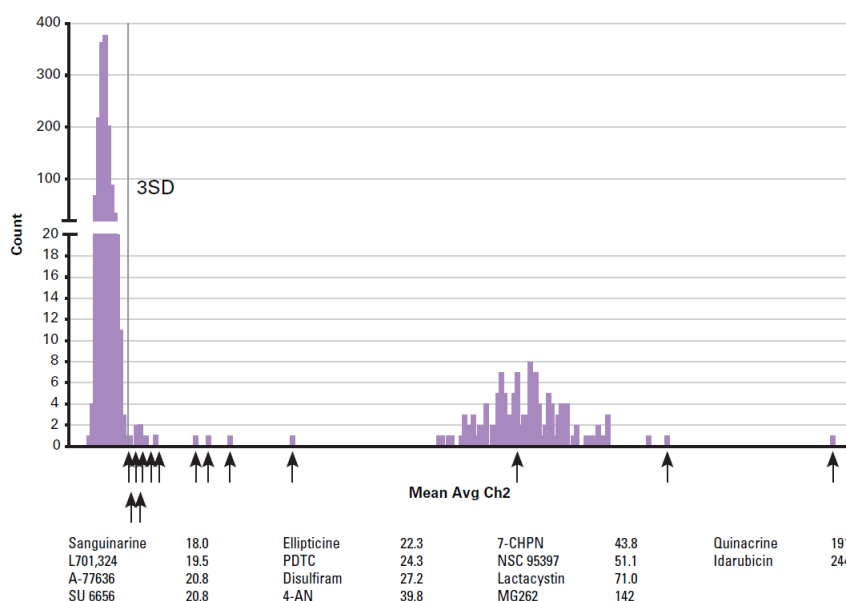


図1. LOPACライブラリー全体のスクリーニング結果のヒストグラム

ウェル内の蛍光シグナルが陰性コントロールシグナルの平均値 (11.1) + 3 SD を超える場合をヒット化合物とみなした。3 SDカットオフ値は17.1であった。スクリーニングの結果、プロテアソーム阻害活性をもつ化合物が14個見つかった。それぞれを矢印で示す。ヒット化合物名の右横に示した値は、ウェル内の蛍光シグナルの平均値である。4-AN = 4-amino-1,8-naphthalimide。7-CHPN = 7-chloro-4-hydroxy-2-phenyl-1,8-naphthyridine。

最初のスクリーニングの後、蛍光が細胞内に存在するかどうかを調べるために、ヒット化合物における画像を手作業で観察した。この実験では、プレートに12時間培養した。この時点では、時間が短すぎて核の状態やプロテアソーム染色パターンの大きな変化は検出できなかった。いくつかのウェルでは細胞残渣が存在し、それが蛍光に寄与していた。また、自家蛍光をもつ化合物もいくつか認められた。これらはアーティファクトとみなした。これらのアーティファクトを除外すると、LOPACライブラリーから7つの化合物が残り、それらについて再試験を行った。再試験でヒット化合物を再び選び、研究用のプロテアソーム阻害剤であるlactacystinとMG262もそれらに含めた。再試験後、8つの化合物をヒットとみなした。真のヒットは57%で、ヒット率は0.63%であった。

陽性コントロールのポルテゾミブと2つのヒット化合物（ジスルフィラムとPDTC）を添加した場合の細胞の蛍光画像を図2に示す。画像アルゴリズムは第一チャンネルの核染色を同定することにより機能する。核染色を起点として1ピクセルずつ領域を広げ、第二チャンネルFITCの対象領域を同定した。この領域拡張は、細胞の細胞質領域をカバーするのに必要であった。

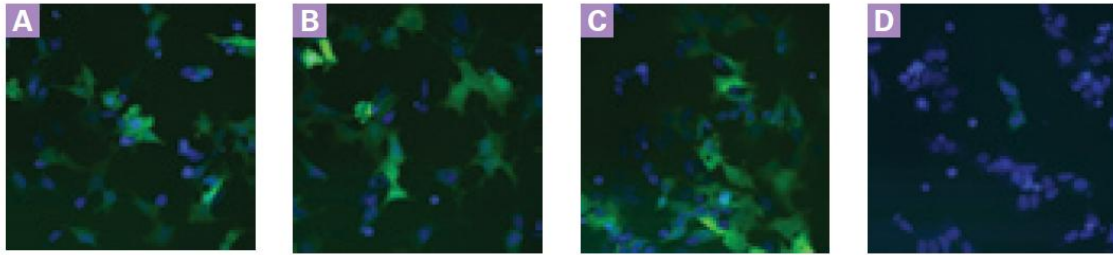


図2. ArrayScan HCS readerで得られたHEK 293 ZsGreen Proteasome Sensor Cell Lineの合成画像
細胞は10 μ M Hoechst 33342 (青色)で染色した。パネルA. 陽性コントロールのボルテゾミブ。パネルB. ジスルフィラム。パネルC. PDTC。パネルD. 陰性コントロール (PBS)。

プロテアソーム阻害活性スクリーニングの実用性

アッセイシグナルのダイナミックレンジと、陰性および陽性コントロールのシグナルのバラツキは、スクリーニングアッセイでヒットを同定するために重要である。Z'値の計算にあたり、HEK 293 ZsGreen細胞を陰性コントロールのPBSまたは陽性コントロールのボルテゾミブ (10 μ M) で12時間処理した。蛍光強度の分析は、5 \times 対物レンズを用い、1ウェルあたり700個の細胞に対して行った。この目的では、3枚のプレート进行分析し、1プレートの平均読み取り時間は22分であった。平均Z'値は0.66と計算された。陰性および陽性コントロール (それぞれ176サンプル) の個々のウェルシグナルのプロットを図3に示す。

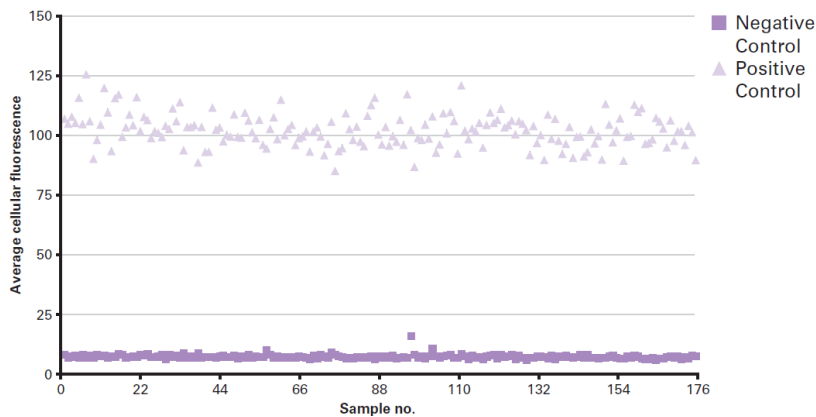


図3. Z' 値の計算のためのデータ

176の陰性コントロールウェル (PBSを含む) と176の陽性コントロールウェル (10 μ Mのボルテゾミブを含む) を含む384ウェルプレート3枚を用いてデータを得た。平均Z' 値はZhangらの式 (7) を用いて計算した。代表的な実験例を1つ示す。

20Sプロテアソーム酵素活性

ヒット化合物がプロテアソームの大サブユニットに作用しているかどうかを調べるために、20S proteasome assay kitを用いた。精製したSDS活性化20Sプロテアソームを用いた実験で、プロテアソーム阻害化合物であるMG262とlactacystinでは阻害活性が認められたが、NSC 95397、ジスルフィラム、PDTC、A-77636、7-chloro-4-hydroxy-2-phenyl-1,8-naphthyridine (7-CHPN)、または 4-amino-1,8-naphthalimide (4-AN)では阻害活性は認められなかった (データ非掲載)。

ヒット化合物の細胞傷害活性

8つのヒット化合物のうち6つ (NSC 95397、ジスルフィラム、PDTC、A-77636、MG262、およびlactacystin) がミエローマ細胞株RPMI 8226で細胞傷害性を示した (データ非掲載)。

考察

このアッセイで、最初、1,266の化合物のうち14個がプロテアソーム阻害物質として検出された。アーティファクトを除外して再試験をすると、8つの化合物が阻害活性を有していることがわかり、真のヒットは57%であった。活性化化合物がプロテアソームのどの箇所にも作用しているかを調べるために、20S酵素の活性を測定するアッセイを行った。20Sサブユニットはキモトリプシン活性をもち (8)、20S活性を測定す

るアッセイはキモトリプシンの阻害剤の研究に広く用いられている(9-10)。20Sアッセイでは、lactacystinとMG262のみで阻害活性が認められた。このことは、他のヒット化合物はプロテアソームの他の箇所には作用するか、あるいはその活性を阻害する他のシグナル伝達経路に作用していることを示唆している。このことはジスルフィラムとPDTCの場合ですでに報告されている(11)。

抗酒癩剤であるジスルフィラムがプロテアソーム阻害剤であると同定されたことは予想外であった。ジスルフィラムは、銅と錯体を形成してヒト・メラノーマ細胞にアポトーシスを起こさせること(12)、およびNF κ Bの核への移行を阻害して大腸ガンにアポトーシスを起こさせること(13)が報告されている。しかし我々は最近、ジスルフィラムがプロテアソーム活性とNF κ Bの核への移行を阻害することによって作用を発揮していることを報告した(11)。ジスルフィラムの細胞への影響についても、我々の研究室で最近研究されている。ジスルフィラムはアポトーシスを誘導するが、様々なガン患者に由来するサンプルの試験において、そのアポトーシス効果は白血病と卵巣ガンで最も高いことが示された(14)。

プロテアソーム阻害活性の検出がガン治療法の新たな標的となって以来、プロテアソーム阻害物質の同定のためにいくつかの方法が用いられてきた。プロテアソーム阻害活性をもつようにデザインされた特異的な阻害剤の探索に関する総説(15)に記載されているように、プロテアソームに共有結合して阻害するペプチドをスクリーニングする方法などがある。新規な阻害剤のスクリーニングとともに、新規なプロテアソーム阻害剤(ペプチドをコアとして持つものが多い)の合成も行われている(16)。我々は、簡単・安価な、そして信頼性のあるハイスループットスクリーニング法の開発に焦点を当てた。そのため、他の作用機作をもつ化合物の中からプロテアソーム阻害活性も持っている可能性のある化合物を発見するために、市販の既知の化合物ライブラリーをスクリーニングした。

このアッセイはLiving Colors HEK 293 ZsGreen Proteasome Sensor Cell Lineから得られる蛍光をそのまま測定するだけであるので、技術的に簡単で安価であり、高価なアッセイ試薬を必要としない。また、96ウェルまたは384ウェルでアッセイを行うこともできる。Z'値はアッセイの質を評価する統計学的パラメーターであり(7)、このアッセイの平均Z'値は0.66と計算された。この値は、ダイナミックレンジが広く、バラツキが少ないことを示している。これらの結果は、この画像スクリーニングアッセイ法がプロテアソーム阻害活性をもつ化合物を迅速かつ信頼性良く同定できる方法であることを示唆している。

謝辞

本稿は*Journal of Biomolecular Screening* (17) に発表された論文をもとに作成したものである。

参考文献

1. Peters, J. M. *et al.* (1993) *J. Mol. Biol.* **234**(4):932–937.
2. Adams, J. (2004) *Nat. Rev. Cancer* **4**(5):349–360.
3. Richardson, P. G. *et al.* (2003) *N. Engl. J. Med.* **348**(26):2609–2617.
4. Turpin, P. H., and Yu, F., inventors: Clontech Lab Inc., assignee. Sensitive proteasome sensor constructs and methods for their design and use. European patent CA20042514066 20040126. August 12, 2004. Retrieved from <http://v3.espacenet.com/textdoc?DB=EPODOC&IDX=CA2514066>.
5. Murakami, Y. *et al.* (1992) *Nature* **360**(6404):597–599.
6. Rickardson, L. *et al.* (2006) *Cancer Chemother. Pharmacol.* **58**(6):749–758.
7. Zhang, J. H. *et al.* (1999) *J. Biomol. Screen.* **4**(2):67–73.
8. Stein, R. L. *et al.* (1996) *Biochemistry* **35**(13):3899–3908.
9. Achanta, G. *et al.* (2006) *Mol. Pharmacol.* **70**(1):426–433.
10. Vaziri, S. A. *et al.* (2005) *Mol. Cancer Ther.* **4**(12):1880–1890.
11. Lovborg, H. *et al.* (2006) *Int. J. Cancer* **118**(6):1577–1580.
12. Cen, D. *et al.* (2004) *J. Med. Chem.* **47**(27):6914–6920.
13. Wang, W. *et al.* (2003) *Int. J. Cancer* **104**(4):504–511.
14. Wickstrom, M. *et al.* (2007) *Biochem. Pharmacol.* **73**(1):25–33.
15. Bogoy, M. (2005) *Methods Enzymol.* **399**:609–622.
16. Vivier, M. *et al.* (2005) *J. Med. Chem.* **48**(21):6731–6740.
17. Rickardson, L. *et al.* (2007) *J. Biomol. Screen.* **12**(2):203–210.

製品ガイド

- ▶ プロテアソームセンサーベクター
- ▶ 蛍光タンパク質検出用抗体