

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07347

研究課題名(和文) イメージング解析によるEGF受容体シグナル制御機構の解明

研究課題名(英文) Image analysis of EGF receptor signaling pathway

研究代表者

田邊 賢司 (Tanabe, Kenji)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80423341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：上皮成長因子受容体(EGFR)はがんの主要な原因遺伝子の一つである。本研究では、画像解析を用いてEGFR経路の新規制御因子の同定を試みた。肺癌由来A549細胞を薬理活性化合物で処理し、EGFで刺激した後に細胞を固定、蛍光免疫染色によって主要なシグナル伝達分子を可視化した。細胞の画像解析によって各化合物による影響を定量的に評価した結果、構造的に異なる3つのプロテアソーム阻害剤が特徴的な表現型を示した。プロテアソームはEGFRのシグナル伝達における役割はわかっておらず、本結果はプロテアソームが新規のEGFRシグナル伝達経路の制御因子であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFRはがんの主要な原因遺伝子の一つであり、その阻害剤が有効な抗がん剤であることが知られている。一方、EGFRの下流に位置するシグナル伝達分子の異常もがんで見つかっており、詳細な分子機構の理解が求められている。本研究では新たな制御因子としてプロテアソームを同定した。本研究で用いた画像解析のアプローチは他の様々な疾患モデルに容易に適用できるため、更なる発展・成果が期待される。

研究成果の概要(英文)：Epidermal growth factor receptor (EGFR) is one of major driver gene in cancer, and many clinically effective drugs that target EGFR-associated molecules have been developed. In this study, I combined image analysis with unsupervised machine learning to identify novel regulators involved in the EGFR pathway. Lung cancer cell line, A549, was treated with a pharmacologically active compound library to evaluate their target's role in the pathway. Cells stimulated by EGF were fixed and stained to visualize several signaling proteins. Cell images were analyzed to evaluate cellular phenotype under the treatment of each compound. As result, three structurally different proteasome inhibitors were statistically identified to have a unique cellular phenotype. Proteasomes are known as degradative enzyme complex for ubiquitinated proteins, but its role in the EGFR pathway were still unknown. This study suggests that proteasome is an essential regulator for EGFR pathway.

研究分野：細胞生物学

キーワード：上皮成長因子 細胞内シグナル伝達 画像解析 ハイコンテンツスクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシンキナーゼ (RTK) は、細胞外リガンドの結合によって細胞内シグナル伝達を活性化し、細胞増殖や遊走、分化や細胞死など様々な細胞応答を引き起こす。RTK シグナルは、細胞内膜輸送やシグナル伝達経路間のクロストークなど、様々な分子機構によって時間的・空間的に高度に制御されている。これらの制御異常は、EGF 受容体における悪性腫瘍のように重篤な疾患の原因となることから、その機構解明が急務である。

これまでに多くの制御因子が報告されているが、全体像解明に近づいているとはいえない。その原因の一つとして、制御因子の同定・解析に用いられる指標が挙げられる。多くの場合、特定のタンパク質や細胞応答といった単一の指標が設けられ、そこに有意な影響をもつ因子が同定、解析されてきた。しかしシグナル制御の全体像を理解するためには、複数の細胞内シグナルや細胞応答を包括的に解析し、評価することが必要である。

2. 研究の目的

RTK による細胞内シグナルの時空間的制御には多くの因子が複雑に関与しているため、全体像の理解には包括的なアプローチが必要である。一方、申請者は最近、細胞画像の蛍光シグナルから時空間的情報を含む多くの特徴を定量化し、数理解析によって分子機構を解明するシステムを構築した。本法は高いスループットを持つため、siRNA ライブラリーなどを用いた RTK シグナルの解明を進めている。

本研究では、RTK のプロトタイプである EGF 受容体に着目する。既知薬理活性化合物ライブラリーを用いた機能タンパク質阻害の影響を包括的に解析し、EGF 受容体シグナル制御の新規制御因子の同定を目指した。

3. 研究の方法

1) 細胞培養と免疫染色

GFP-EGF 受容体を恒常的に発現する肺がん由来 A549 細胞株を DMEM 培地 (10% FBS 添加) で培養し、96 ウェルプレートに播種した。およそ 24 時間後に DMEM 培地 (FBS 不含) に交換し、6 時間培養後、薬理活性化合物ライブラリーを最終濃度 10 μ M で細胞に添加した。1 時間後、EGF (100 ng/ml) を添加し一定時間経過後にホルマリンで固定、蛍光免疫染色によって主要なシグナル伝達分子 (Akt, ERK, PI3P, PI4P) を可視化した。同時に、蛍光標識によって EGF 受容体、EGF、トランスフェリンを可視化した。

2) 細胞画像の取得と画像解析

蛍光免疫染色した細胞を、細胞イメージアナライザー CellInsight (Thermo) を用いて 20 倍の対物レンズで 1 サンプルあたり 36 枚撮影した。得られた細胞画像を CellProfiler (Broad Inst. USA) を用いて解析した。染色画像から細胞を核、細胞質、核近傍や細胞膜近傍などの領域に区分し、それぞれの領域から蛍光シグナルの強度や数、大きさなどを測定した (画像特徴量)。

3) 統計解析

取得した画像特徴量を Kolmogorov-Smirnov 検定によって対照群 (DMSO 処理群) と比較し、標準化した Z 値を化合物評価に用いた。主成分分析によって画像特徴量間の情報の重複を除いた後、階層的クラスタ分析によって化合物を分類した。

4) キナーゼアッセイ

化合物によるキナーゼ阻害活性には SelectScreen kinase profiling (Thermo) を用いた。

4. 研究成果

1) 細胞表現型による化合物の分類

低分子化合物を階層的クラスタ分析によって分類した。結果の一部を図 1 に示す。図 1A に示すように、異なる MEK 阻害剤は一つのクラスタにまとめられ、標的分子に従った化合物の分類が行えていることを示している。この結果は、特定の標的分子の阻害が特定の表現系を惹起し、その表現系を適切に評価できていることを示している。

2) 化合物の効果に重要な標的分子の同定

一方、図 1B に示すように、異なる標的分子を持つ化合物が含まれるクラスタもみられた。このクラスタには、構造が異なる複数の PI3K 阻害剤、Akt 阻害剤および mTOR 阻害剤が含まれていることから、PI3K-Akt-mTOR 経路を阻害した表現系を共有するクラスタと考えられる。しかしその一方、本経路とは無関係な標的分子が多く含まれることから、それら化合物が PI3K-Akt-mTOR 経路の分子に対する阻害活性を生化学的実験によって検証した (図 2)。その結果、多くの化合物が PI3K-Akt-mTOR 経路の主要分子を直接阻害することが示された。以上の結果は、本アプローチが各化合物の未知のオフターゲットを含めた標的分子の機能評価が可能であることを示している。

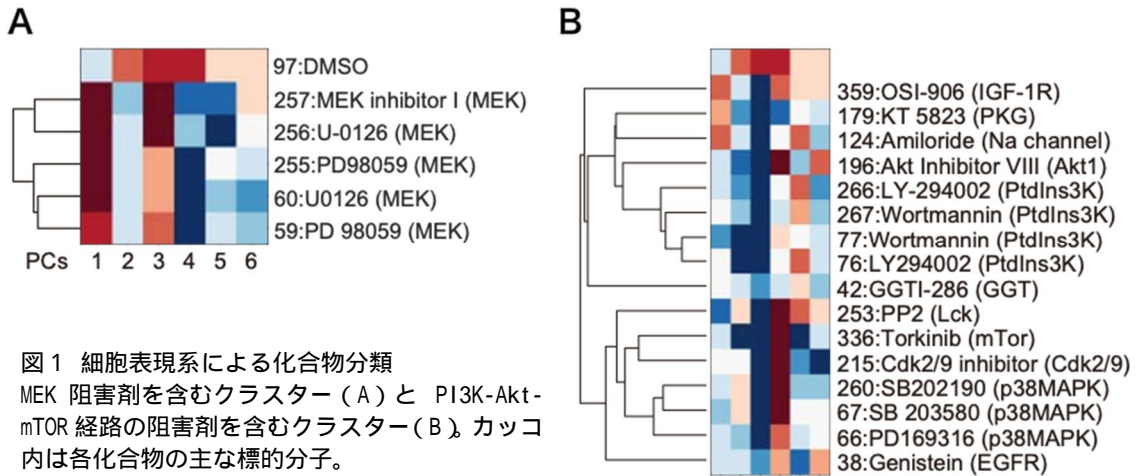


図1 細胞表現系による化合物分類
MEK 阻害剤を含むクラスター (A) と PI3K-Akt-mTOR 経路の阻害剤を含むクラスター (B)。カッコ内は各化合物の主な標的分子。

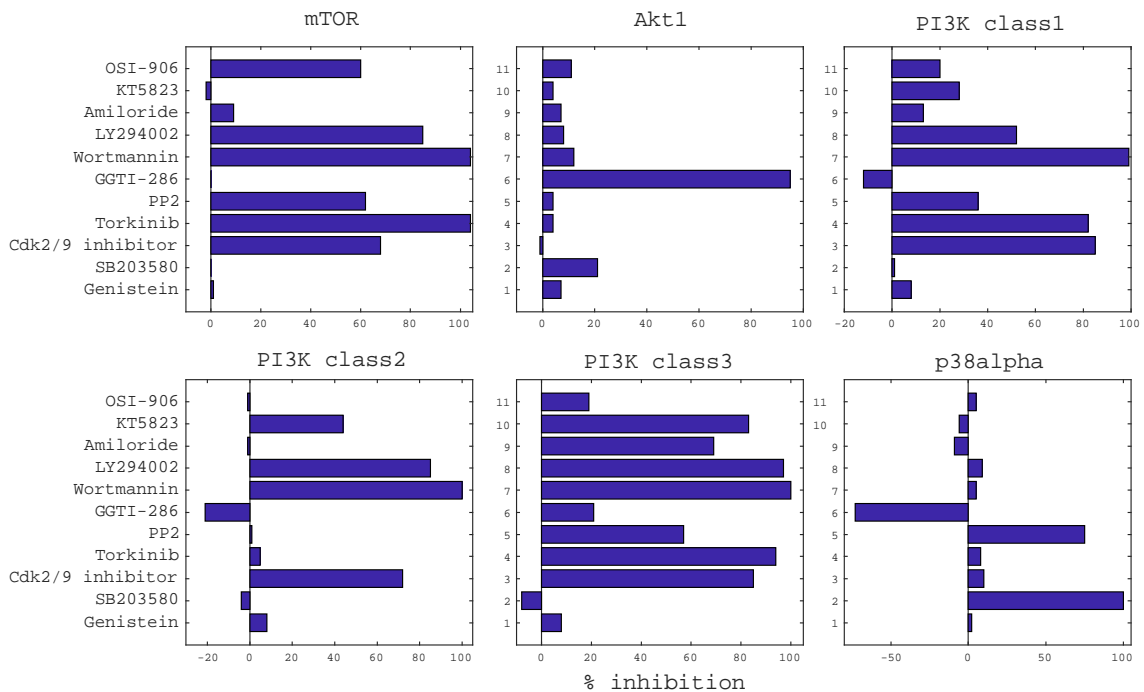


図2 PI3K-Akt-mTOR 経路阻害剤のクラスター (図1B) に含まれる化合物のキナーゼ阻害活性

3) EGFR 経路における新規制御分子の同定

各クラスターには既知の標的分子が共通のものや、2)のようにオフターゲットを考慮する必要があるものまで様々なものが確認できた。各クラスターは特有の細胞表現型がみられた化合物を分類しているため、その標的分子は EGF 経路において何らかの重要な役割を果たしていることが考えられる。そこで EGF 経路での役割が知られていない標的分子からなるクラスターを探索した。その結果、3種の構造が異なるプロテアソーム阻害剤 (Bortezomib、Lactacystin、MG-132) からなるクラスターが確認された。図3にプロテアソーム阻害剤を添加し、EGF 刺激をした際のリン酸化 Akt を示す。通常は EGF 刺激によって細胞膜近辺におけるリン酸化 Akt が上昇するが、プロテアソーム阻害剤で処理した細胞ではそのような上昇が認められない。この結果は、プロテアソームが EGF 刺激によって Akt がリン酸化される過程で何らかの役割を果たしていることを示唆している。

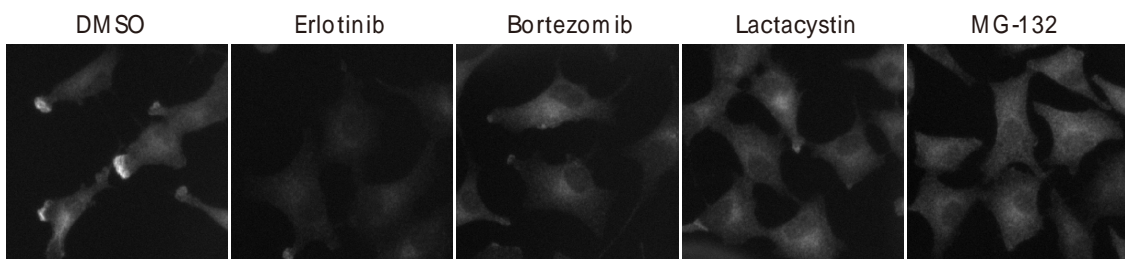


図3 プロテアソーム阻害剤処理された細胞では細胞膜近辺における Akt リン酸化が抑制された

今回、EGF 受容体からのシグナル伝達経路における新規制御因子を同定するため、画像解析を用いて細胞応答を包括的に評価した。分子の同定には薬理活性化合物ライブラリーを用い、階層的クラスター分析によって化合物を分類した。その結果、化合物はその標的分子の役割によって適切に分類された。化合物を用いたスクリーニングの場合、オフターゲットの効果が問題になることが多いが、本アプローチではオフターゲットの同定が比較的容易にできることが示され、標的分子の機能評価にも有効だった。分類された化合物の中には、EGF 受容体シグナル経路における役割が知られていない標的分子を共有するクラスターがみられた。プロテアソーム阻害剤がその一つで、細胞膜近辺における Akt リン酸化が阻害されていた。現在、Akt リン酸化に必須のプロテアソームサブユニットの同定を進めており、詳細な分子機構を明らかにするには更なる実験が必要となるが、本アプローチは他のシグナル伝達経路にも容易に応用できることから、将来的に多様な生物現象の解明につなげられると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurokawa Yuna, Yoshida Akane, Fujii Emi, Tomioku Kanna, Hayashi Hiroki, Tanabe Kenji, Fujita Akikazu	4. 巻 20
2. 論文標題 Phosphatidylinositol 4 phosphate on Rab7 positive autophagosomes revealed by the freeze fracture replica labeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Traffic	6. 最初と最後の頁 82～95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1111/tra.12623	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanabe Kenji, Inagaki Ayane, Henmi Yuji, Satake Masanobu	4. 巻 23
2. 論文標題 Image-Based Profiling Can Discriminate the Effects of Inhibitors on Signaling Pathways under Differential Ligand Stimulation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D	6. 最初と最後の頁 330～340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2472555217751091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Akane, Hayashi Hiroki, Tanabe Kenji, Fujita Akikazu	4. 巻 1859
2. 論文標題 Segregation of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate into distinct microdomains on the endosome membrane	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 1880～1890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamem.2017.06.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanabe Kenji	4. 巻 18
2. 論文標題 Microtubule Depolymerization by Kinase Inhibitors: Unexpected Findings of Dual Inhibitors	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2508～2508
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms18122508	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kurokawa Yuna, Konishi Rikako, Yoshida Akane, Tomioku Kanna, Futagami Taiki, Tamaki Hisanori, Tanabe Kenji, Fujita Akikazu	4. 巻 1864
2. 論文標題 Essential and distinct roles of phosphatidylinositol 4-kinases, Pik1p and Stt4p, in yeast autophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 1214 ~ 1225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.bbali.2019.05.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 田邊賢司
2. 発表標題 Image-based phenotypic profiling using a pharmacologically active compound library identify novel druggable targets.
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenji Tanabe
2. 発表標題 Image-based phenotypic profiling associated with EGF receptor trafficking and signal transduction reveals novel targets of drugs.
3. 学会等名 SBI2 High Content 2018, 5th Annual Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenji Tanabe
2. 発表標題 Image-based phenotypic profiling associated with EGF receptor trafficking and signal transduction reveals novel targets of drugs.
3. 学会等名 SLAS2019 International Conference and Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Tanabe
2. 発表標題 Image-based phenotypic profiling associated with EGF receptor trafficking and signal transductions reveals novel mode of action of drugs
3. 学会等名 CBI学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenji Tanabe
2. 発表標題 Image-based compound profiling reveals functionally unrelated target molecules
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenji Tanabe
2. 発表標題 Image-based phenotypic profiling for target deconvolution of drugs reveals novel regulatory mechanisms
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田邊賢司
2. 発表標題 細胞画像解析と機械学習による細胞内現象の理解と創薬への応用
3. 学会等名 北大・部局横断シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田邊賢司
2. 発表標題 ハイコンテンツアナリシスと機械学習による薬物作用機序の予測
3. 学会等名 スクリーニング学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenji Tanabe
2. 発表標題 High Content Analysis with Unsupervised Machine Learning to Find a Novel Druggable Target of EGFR Pathway
3. 学会等名 CYT02019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考