

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22485

研究課題名(和文)新規プロファイルデータ解析手法を用いたリード化合物最適化法の構築

研究課題名(英文)Development of lead optimization method using novel profile data analysis method

研究代表者

楠原 洋之(Kusuhara, Hiroyuki)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：00302612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々が開発した新規プロファイルデータ解析手法orthogonal linear separation analysisを用いて、リード化合物最適化支援システムの確立することに取り組んだ。大規模プロファイルデータを解析し、レシナミンやシロシゴピンなど構造類似体間で保存された作用、特異的な作用を検証することに成功した。本手法により潜在的な薬物の作用の評価が可能であると示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オフターゲット効果は薬物のリポジショニングや有害事象発現に関連しており、その検出方法の開発は、医薬品開発において重要な課題である。本研究で提唱した低分子医薬品の作用を分離して理解するというアプローチが、化合物の潜在的な作用の検出を通じて、目的に掲げたリード化合物最適化に資するものであることを強く支持するものであり、医薬品開発に大きく貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our novel profile data analysis method, orthogonal linear separation analysis (OLSA), can visualize even off-target-derived drug action. We aimed to establish a lead compound optimization support system using this analysis method. According to the analysis of 293 compounds, we focused on resinnamine (RES) and syrosingopine, which are quite similar in structure. As suggested, we confirmed their HDAC inhibitory action and mTORC inhibitory action in vitro. Notably, SREBP activating action, which presumed to be higher in RES, could be also reproduced in vitro. It was clarified that the similarities and differences in the actions of structurally similar compounds can be estimated by decomposing their actions using our analysis method. Since the effects of RES and syrosingopine detected in this study have not been reported yet, the approach developed in this study is useful to uncover unrecognized effects of compounds, and hence, contribute to derivatization strategies in lead optimization.

研究分野：薬物動態学

キーワード：プロファイル解析 OLSA リード化合物最適化 構造類似体 潜在的な作用

## 1. 研究開始当初の背景

創薬におけるリード化合物最適化プロセスでは、候補化合物群の中から期待する薬効が高いものの選択、有害な作用を持つものの除外、等が行われる。想定する薬効や有害作用（オンターゲット効果）は、標的分子と薬物の相互作用を直接的に *in vitro* 実験で評価することが可能であるが、想定されない作用（オフターゲット効果）については、標的分子の網羅的探索が要求され、様々な方法論が提唱されているものの、ライブラリーの網羅性の確保や薬物とターゲット分子との意味のある相互作用の抽出等、技術的に未だ障壁が高いのが現状である。申請者らは、オフターゲットに由来するフェノタイプをも可視化する方法論として、新規プロファイルデータ解析手法、orthogonal linear separation analysis (OLSA)を開発した(特許出願済, Mizuno T, *Sci Rep*, 2019)。本手法は因子分析主成分法をベースに薬理作用のオミクスデータを教師無しに次元縮約する方法論である。縮約された因子により形作られる新たな座標空間において薬剤の作用は、縮約前の解釈困難な全変数によってではなく、研究者にも認識しやすい基礎的な薬理作用として記述される。本手法により分離・抽出された因子の共通性や相違から被験化合物が持つ作用の推定が可能であり、これらは事前仮説を必要としないため、医薬品の開発者が想定しない作用の推定を可能とする。

副作用による市場撤退の事例を鑑みると、創薬の成功においてオンターゲットとオフターゲットの見極めは必要不可欠である。オミクスデータの類似性を解析する手法としてはクラスタリング解析が有名であるが、全変数を用いるため変動の大きい変数に解析結果が依存するという欠点がある。そのため共通作用だけではなく、各薬剤に特異な作用も評価して総合的に薬剤の純度を議論する必要のあるリード化合物最適化には適さない。一方、申請者らが開発した方法により、合成された類似化合物内での共通性と特異性を明確化し、フェノタイプデータと突合せすることで、リード化合物最適化の理想的な方向付けが可能になるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

以上の背景を元に、本研究では、新規プロファイルデータ解析手法によるリード化合物最適化支援システムの確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 独自解析手法による構造類似化合物作用の類似点・相違点の解析

293種類の低分子化合物を処理したMCF7細胞の遺伝子発現データをBroad Instituteが提供するConnectivity Map (CMap)より取得し、OLSAに供した。各化合物の作用は、分離された作用を示す重み付き遺伝子群と作用強度を示す係数(スコア)により表される。各作用について係数が特に高い化合物をスコアの分布に基づいて統計的に決定し、当該作用を代表する化合物群として定義した。

次に上述で解析した化合物群の構造類似性を評価した。具体的にはMorgan finger print、及びMol2vecにより化合物の構造を数値化し、教師なしクラスタリングにより類似となる群を定義した。構造類似と判断された化合物が持つ各作用を、作用を定義する遺伝子群や上位化合物群により生物学的な知見と対応させた後、構造が類似しているにも関わらずスコアに差異がある化合物群とその作用を探索した。

(2) 解析結果の実験科学的検証

(1)で見出した化合物群と作用の関係性より、各作用の評価系を構築し、実際に化合物をMCF7細胞に処理して推定された作用の有無と強度を評価した。具体的にはHDAC阻害作用、SREBP活性化作用、mTORC阻害作用を対象とし、蛍光プローブを用いた活性測定、ハイコンテンツアナライザーによるマーカーの測定、ルシフェラーゼアッセイによる転写因子の活性測定、及びウェスタンブロッティングによるリン酸化測定等を実施した。

## 4. 研究成果

OLSAによる作用分離解析の結果、293化合物に由来する作用は、40の作用に縮約された。数値化した化合物の構造類似性を化合物と作用の関係性を調査

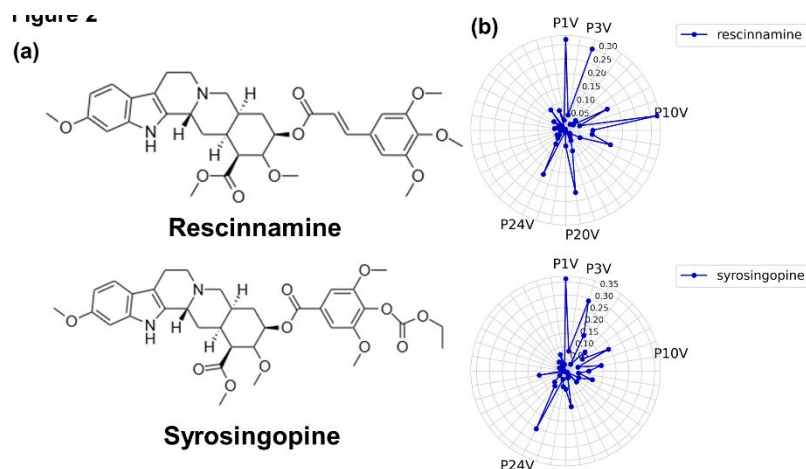


図 1. Rescinnamine と Syrosingopine の構造、及び OLSA 結果

し、興味深い化合物として天然物 Resinamine (RES), 及びその誘導体である Syrosingopine (SYR)に着目した。RES は高血圧治療薬として FDA により認可されている。これらの化合物はいずれも HDAC 阻害作用, 及び mTORC 阻害作用が高いと推定された一方, SREBP 活性化作用については RES のみが高いと推定された。上記 3 つの作用と両化合物との関係性は報告されていない。そこで両化合物を MCF7 細胞に処理し, これらの作用を評価した (図 1)。

両化合物を処理した MCF7 細胞中の HDAC 活性を蛍光基質により評価したところ, 濃度依存的に HDAC 活性が減弱することを見出した。特筆すべきことに HDAC 阻害作用とスコアは相関していた。mTORC1 の基質である S6K のリン酸化をウェスタンブロッティングにより測定することで mTORC1 阻害作用についても評価したところ, 同様の傾向が得られた。次に RES では高いものの SYR では低いスコアを示した SREBP 活性について, SREBP1/2 の DNA 結合部位を対象としたルシフェラーゼアッセイを実施したところ, RES でのみ活性化が得られた。SREBP1/2 は細胞内にコレステロールが蓄積することで活性化される。そこで両化合物を処理した MCF7 細胞中のコレステロール蓄積をフィリピン染色により評価したところ, RES 処理群でのみコレステロール蓄積が確認された (図 2)。

本研究により, 独自解析手法を用いて作用を分解することで構造類似化合物が持つ作用の類似点と相違点を推定可能であることが明らかとなった。実験科学的に実証された複数の作用はいずれも文献報告がなかったことから, これらの作用は開発者が認識していなかった作用であると考えられる。すなわち本結果は, 本研究で提唱した低分子医薬品の作用を分離して理解するというアプローチが, 目的に掲げたリード化合物最適化に資するものであることを強く支持する。COVID19 による研究活動の制限, 及び実験消耗品の供給不足等により, 当初計画していた低分子化合物を新規に合成して解析する前向きな検証には及ばなかったものの, 本結果に基づいて今後取り組んでいきたい。

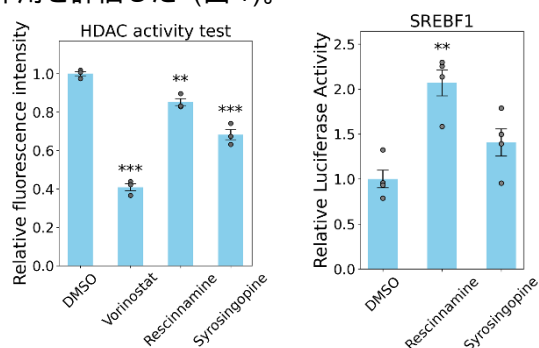


図 2. HDAC 阻害作用と SREBP 活性化作用の実験結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mizuno Tadahaya, Morita Katsuhisa, Kusahara Hiroyuki	4. 巻 43
2. 論文標題 Interesting Properties of Profile Data Analysis in the Understanding and Utilization of the Effects of Drugs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1435 ~ 1442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00301	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 Nemoto Shumpei, Morita Katsuhisa, Mizuno Tadahaya, Kusahara Hiroyuki	4. 巻 84
2. 論文標題 Decomposition Profile Data Analysis for Deep Understanding of Multiple Effects of Natural Products	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 1283 ~ 1293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jnatprod.0c01381	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 Katsuhisa Morita, Tadahaya Mizuno, Hiroyuki Kusahara	4. 巻 -
2. 論文標題 Decomposition Profile Data Analysis of Multiple Drug Effects Identifies Endoplasmic Reticulum Stress-Inducing Ability as an Unrecognized Factor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森田勝久、水野忠快、楠原洋之
2. 発表標題 プロファイルデータ分離解析による天然物誘導体シロシゴピンのHDAC阻害作用の発見
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根本駿平、森田勝久、水野忠快、楠原洋之
2. 発表標題 プロファイルデータ分離解析による天然物レシナミンの複合的作用の同定
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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
研究分担者	水野 忠快  (Mizuno Tadahaya)  (90736050)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教    (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------