

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22710228

研究課題名（和文） モルフォロームを基盤とした微生物由来新奇バイオプローブの探索研究

研究課題名（英文） Development of the cell morphology database for drug and bioprobe discovery

研究代表者

二村 友史 (FUTAMURA YUSHI)

独立行政法人理化学研究所・化学情報・化合物創製チーム・特別研究員

研究者番号：70525857

研究成果の概要（和文）：

がん細胞が与えられた薬剤の作用に応じて特異な形態を示すことに着目し、形態変化データベースを用いた表現型プロファイリング法の開発を目指した。IN Cell Analyzer で細胞形態の数値化を試み、35種のパラメータで HeLa 細胞に対して誘導される多彩な形態変化を特徴づけられた。また得られた形態情報を統計解析することにより、薬剤作用と形態変化を関連づけたデータベースを構築した。このデータベースを利用し、特異な形態変化を誘導する化合物を複数見出した。

研究成果の概要（英文）：

To discover small drug like molecules, we have constructed the encyclopedia of cellular morphology, consisting of the cell-shape changes induced by various compounds. Particularly, we have developed high-content image analysis method to examine the effect of ~100 routinely used chemicals on the cell morphology accompanied by statistical characterization of the obtained phenotypic data. We demonstrated the cell morphology-based profiling system not only reproduces “drug-target-phenotype” relationships for a series of drugs with known targets but also raises the possibility to clear the way to discovery of unique drug candidates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：細胞形態変化、ハイコンテンツスクリーニング

1. 研究開始当初の背景

ケミカルバイオロジーは、画期的なアイデアで免疫抑制剤 FK506 の作用機構を明らかにし、免疫学上非常に重要な T 細胞活性化に関わる新たなシグナル伝達を提示した Schreiber らの研究 (Liu J, et al. *Cell* 1991; 66: 807-15) に端を発し、現在では科学雑誌「Nature Chemical Biology」や「ACS Chemical Biology」が創刊されたことからわかるように世界的にも重要性が認識されている研究領域である。一方、ケミカルバイオロジーの発展には、FK506 のような生命現象の解析に適した小分子化合物 (バイオプローブ) の創出が要求される。従来、そのような化合物は活性・構造多様性に富む微生物代謝産物より供給されてきたが、次第にコンビナトリアル化学によって合成された化合物に取って代わられるようになった。しかし Ortholand らが指摘するように (Ortholand JY, et al. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004; 8: 271-80)、現時点においてコンビナトリアル合成化合物は当初考えられていたような化合物多様性を得られないこと、また過去 20 年間で認可された医薬品のうち、天然有機化合物およびそれをリードとした化合物が実に 60%にものぼることから、バイオプローブの探索源として今再び微生物代謝産物が見直されている。

ところで、天然由来の生理活性物質は歴史的に創薬研究や生命現象解明において重要な役割を果たしてきたが、半世紀以上に及ぶ探索研究の結果、その発見が年々難しくなっているのは事実であり、新奇バイオプローブの発見を達成するにはその探索系や探索源、単離精製法において何らかの工夫が不可欠である。我々は探索源に構造・活性多様性に優れた微生物代謝産物を用いること、また特徴的な細胞形態変化を指標とした独自の探索系を構築することにより目的とする新奇化合物の創出が可能になると考えた。すなわち、細胞は小分子化合物のパラエティーに対応する実に様々な形態変化を引き起こすことから、その形態を注意深く観察することにより多大な情報が得られ、新奇バイオプローブ発見の足がかりになりうる。事実、これまで細胞形態を指標とした探索系によってプロテアソーム阻害剤ラクタシスチン (Omura S, et al. *J. Antibiot.* 1991; 44: 113-6) や分子シャペロン HSP90 阻害剤ゲルダナマイシン (Uehara Y, et al. *Mol. Cell Biol.* 1986; 6: 2198-206) が発見され、これらの化合物は非常に有用な研究ツールとして用いられているばかりでなく、新たながん分子標的の提示にも貢献した。一方、これまで細胞形態変化についてその表現型を網羅的・系統的に分類・カタログ化しようという試みはなされてこなかった。我々は経験的に、ある種の化合

物についてはどの化合物がどのような形態変化を誘導するかについて情報をもっており、細胞形態変化から作用機序を推測できる。そこでこれを拡張し、様々な化合物が誘導する細胞形態変化を系統的に分類・カタログ化したデータベースを構築すれば、分子レベルでのタンパク質機能を顕微鏡下で観察される“形態変化”として容易に捉えることができるようになり、簡便な表現型比較が可能なハイコンテンツスクリーニング系への応用が展開できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、標的既知薬剤が様々な細胞に対して誘導する細胞形態変化を網羅的に収集した細胞形態変化データベースの構築を行う。またこのデータベースを基盤としたハイコンテンツスクリーニングの実施し、微生物代謝産物や理研天然化合物ライブラリーより創薬シードとなりうる化合物を創製することを旨とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞形態変化のカタログ化

小分子化合物は添加や除去、また加える濃度や処理時間によって細胞内標的分子の機能を容易に制御できることから、細胞に小分子化合物を添加し、濃度・時間依存的に収集した形態変化パターンは添加した化合物固

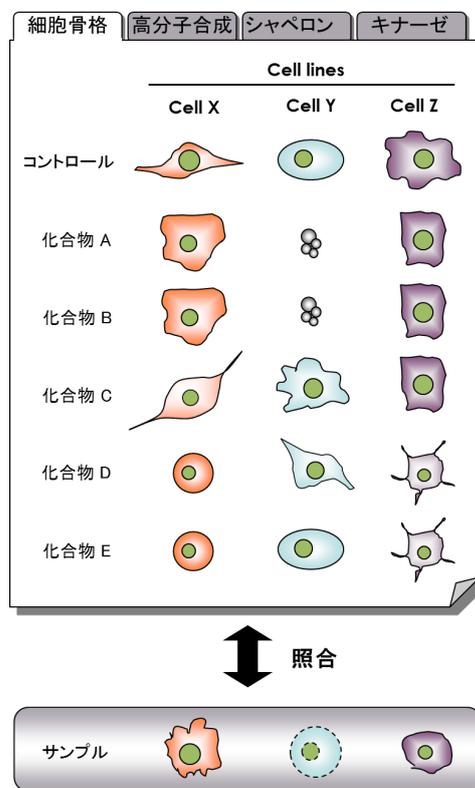


図1 細胞形態変化のカタログ化

有の表現型となる。そこで、標的分子が明らかでない標準化合物が細胞形態に与える影響を観察し、細胞画像データを取得する。このとき用いる薬剤に作用機序が同一である小分子化合物を含めることでタンパク質機能と表現型の関係を確認するものにする。また薬剤によっては細胞透過性や感受性の違いにより効果を示さないケースが想定されることから、データ収集は、複数の細胞に対する影響を幅広く検討する。このようにして得られた表現型はその類似性及びタンパク質間の関連性により分類し、カタログ化する(図1)。具体的には、60種類の標準化合物と3種類の動物細胞を用いて検討を行い、既存の抗がん剤が示す表現型を容易に判別することが可能なデータセットを構築する。

(2) 細胞形態変化データベースの構築

観察者に依存した形態観察を IN Cell Analyzer を用いたハイコンテントイメージ解析法を開発することにより、客観性の高いデータベースへの拡張を試みる。細胞撮像の条件検討や独自の細胞認識アルゴリズムを開発し、IN Cell 上で様々な細胞形態を認識できるようなパラメータを探索する。次に、(1)で特徴的な形態変化を示した化合物を含む約100種類の標準化合物が誘導する形態変化を数値化する。得られた多次元形態パラメータは多変量解析に供し、薬剤作用と表現型を関連づけた細胞形態変化データベースの構築を試みる。

(3) 形態変化データベースを基盤としたハイコンテントスクリーニングの実施

構築した形態変化データベースを基盤としたハイコンテントスクリーニングを実施する。微生物代謝産物及び理研天然化合物ライブラリーNPDepoを探索源とし、各サンプルの細胞形態変化誘導活性を評価する。得られる表現型によってはデータベースへの照合により、容易にその標的分子を推定することが可能である。一方、データベースに照合されない表現型を誘導する化合物はこれまでにない興味深い生理活性を有することが期待できることから、活性物質の同定を行う。

4. 研究成果

作用機序が明らかでない約60種類の標準薬剤が誘導する形態変化を時間・濃度依存的に収集し、その形態変化パターンによる分類を行った。その結果、細胞骨格系作用薬はもちろん、細胞骨格とは関連のない高分子合成阻害剤、HSP阻害剤やHDAC阻害剤なども細胞形態変化パターンから容易に判別することができるようになった(図2)。

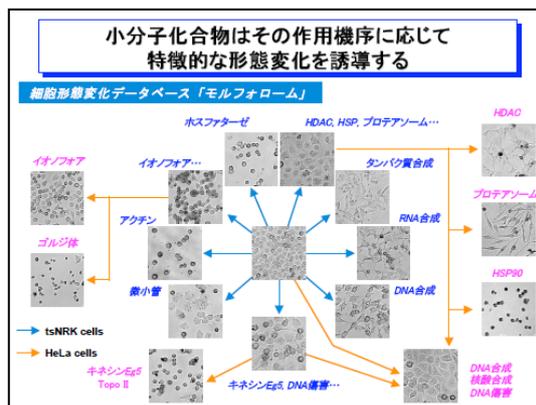


図2 細胞は薬剤作用に応じて特徴的な形態変化を示す

次に観察者に依存した形態観察を IN Cell Analyzer で数値解析し、ハイコンテントデータベースへの拡張と表現型プロファイリングシステムへの応用を試みた。

まず撮像条件や独自のアルゴリズム開発を行い、明視野画像上で微細かつ複雑な細胞形態を認識できるようになった。次に、標準化合物が誘導する様々な形態変化を特徴づけるパラメータを探索し、細胞や核、細胞表面に現れる構造体の大きさや数、扁平率、縦横比など35種のパラメータを設定した。次に、約100種類の標準化合物が誘導する形態変化を数値化した。得られた多次元情報で主成分分析を行うと、類似の作用を示す化合物群は固有ベクトルで描くプロット上でクラスターを形成し、薬剤作用と形態変化とを紐づけられた。またユークリッド距離で順位付けした類似度ランキングを基に、テストサンプルの作用予測が可能になった。形態変化プロファイリングシステムは様々な形態変化データが収載されており、標準化合物との類似性比較からその薬剤作用を予測することができる画期的なシステムである。

細胞形態変化データベースを基盤としたハイコンテントスクリーニングを実施し、微生物代謝産物や天然物化合物ライブラリーNPDepoからデータベースに未登録の興味深い形態変化を誘導する化合物を探索した。微生物代謝産物からいずれも既知化合物ではあったが、31種の活性物質を見出した。天然化合物ライブラリーNPDepoからは興味深い表現型を示す化合物を複数見出した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Futamura Y (8名中4番目) "Vipirinin, a coumarin-based HIV-1 Vpr inhibitor, interacts with a hydrophobic region of VPR" *J. Biol. Chem.*, 286; 14049-56 (2011) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Futamura Y., Osada H. "Identification of NPD3483 as a unique cell division inhibitor via the cell morphology-based screen" 22nd EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2010 年 11 月 16-19 日, ベルリン
- ② Futamura Y., Osada H. "Screening of bioactive compounds through morphology-based screens" Chemical Biology International Symposium, 2010 年 10 月 26-27 日, 埼玉
- ③ Futamura Y., Osada H. "The cell morphology-based screen revealed NPD3483 to be a unique type of cell division inhibitor" 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2010 年 9 月 22-24 日, 大阪
- ④ 二村友史、長田裕之 「細胞形態変化を指標としたがん分子標的治療薬の探索研究」第 14 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2010 年 7 月 6-8 日、東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二村 友史 (FUTAMURA YUSHI)

独立行政法人理化学研究所・化学情報・化合物創製チーム・特別研究員

研究者番号：7 0 5 2 5 8 5 7