

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750396

研究課題名(和文)形態異常を誘起する抗がん物質の創薬基盤研究

研究課題名(英文)Drug discovery based on MorphoBase, an encyclopedia of cell morphology

研究代表者

二村 友史(Futamura, Yushi)

独立行政法人理化学研究所・長田抗生物質研究室・訪問研究員

研究者番号：70525857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

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、バイオプローブを発掘する探索基盤として、形態変化データベース「モルフォベース」を用いたハイコンテントスクリーニング法を開発してきた。本研究では、モルフォベースに照合されない特異な表現型を示すオイデスマン化合物を見出し、その作用機序解析を行った。本化合物はHeLa細胞の細胞周期をG2/M期で停止させたことから、分裂期の様子を免疫染色法で検討した。その結果、紡錘体や染色体凝集には影響を与えず、分裂中期で細胞周期を停止させることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To discover small drug like molecules, we have carried out the phenotypic screening based on MorphoBase, an encyclopedia of cellular morphology, consisting of the cell-shape changes induced by various compounds. Among over 10000 compounds deposited in NPDepo library, we found that one eudesman compound show unique cell-shape changes in tsNRK cells and G2/M phase arrest in HeLa cells. Immunofluorescence experiments revealed that this compound induces cell cycle arrest at metaphase without any effect on the spindle formation and chromatin segregation, indicating that it has a distinct mode of action from typical antimitotic drugs.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：モルフォベース

1. 研究開始当初の背景

「創薬研究に資するドラッグターゲットをいかに発掘するか」その答えの一つとして、伝統的な細胞ベースの表現型スクリーニングに注目した。私は経験的に、ある種の化合物はその作用機序に応じて細胞の形を特異に変化させることを知っていたので、様々な薬剤が誘導する形態変化と薬理作用を対応づけた細胞形態変化データベースの作製、とデータベースを基盤とした独自の表現型スクリーニングへの応用、を試みてきた。

化合物が誘導する形態の中には、目視でもその作用標的を推測することが可能な場合があるが、形態の認識は個人差があり、観察者の主観に左右されがちでもある。そこで我々は、誰もが同じように解析できるようにするため、細胞形態をコンピュータ上で定量化（ハイコンテンツイメージング）し、薬剤が誘導する形態変化のデータベース化を試みた。

まずハイコンテンツイメージング法の開発を行い、微細かつ複雑な細胞形態（細胞質、核、顆粒）を認識し、大きさや縦横比、数など 12 パラメータで特徴づけできるようになった。次に約 200 種の標準化合物が誘導する形態変化を数値化し、得られた多次元情報を統計的に解析した。その結果、類似の作用を示す薬剤群は変量プロット上でクラスターを形成し、ハイコンテンツイメージングで形態と薬剤作用とを定量的に関連づけられた。我々はこの形態変化データベースを「モルフォベース」と名付けた。また作用未知化合物がデータベース内のどの化合物と類似するかをスコア化する方法を開発し、がん細胞の形態から薬剤作用を予測する「モルフォベースプロファイリング法」を確立した（Futamura Y et al, Chem Biol, 2012）。

モルフォベースには高分子合成や細胞骨格など抗がん剤標的として重要性が認知されている 14 種の標的はその表現型が登録されている。ここで既存のクラスターに分類されない化合物を選べば、従来、抗がん剤の標的として重要視されていなかった分子に作用する“First-in-class”を見出せる可能性がある。これまでに、天然化合物ライブラリー-NPDepo の中からモルフォベースに照合されないユニークなバイオプローブを複数見出しており、これらを用いたケミカルバイオロジー研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、上記の候補化合物の中からオイデスマン化合物に着目した。本化合物は tsNRK 細胞の巨大化を誘導し、HeLa 細胞に対しては顕著な G2/M 期停止を誘導した。モルフォベースプロファイリングから、典型的な有糸分裂阻害剤である微小管阻害剤などとは異なる作用機序を有することが示唆されている。本研究ではオイデスマン化合物の細胞内標的分子の同定を通じて、抗がん治療薬開発に資する新たなドラッグターゲットの提示に挑む。

3. 研究の方法

小分子化合物の標的タンパク質同定法には、化合物固定化ビーズによるアフィニティー精製、表現型プロファイリング法が挙げられる。所属研究室では、両アプローチにおいて独自の研究基盤技術が開発されており、これらを駆使してオイデスマン化合物の標的分子を探索する。

(1) ケムプロテオームによる作用予測

細胞内タンパク質の発現量や修飾は、与えられた薬剤の作用にตอบสนองして変化する。これに着目して、所属研究室では約 40 種の既知薬剤を処理した HeLa 細胞のプロテオーム変化をデータベース化（ケムプロテオーム）し、試験化合物のプロテオームパターンと比較することによって薬剤標的を予測するシステムが構築されている。ここでは HeLa 細胞にオイデスマン化合物を 18 時間処理し、その抽出液を二次元電気泳動で分離する。得られるプロテオームの増減パターンをデータベースに照合して作用機序の推定を行う。推定された候補タンパク質について、*in vitro* や細胞レベルで機能阻害活性を評価する。

(2) 化合物固定化ビーズによる標的決定法

薬剤をビーズに固定するには、生物活性に影響のない官能基を介して結合することが望ましいが、利用できる官能基が明らかでない場合は、このステップが大抵ボトルネックとなる。所属研究室では、ジアジリンを先端に有する光親和型リンカーを導入した担体を開発し、官能基非依存的に化合物を固定化できる手法を確立している。そこでオイデスマン化合物の光親和型固定化ビーズを作製し、tsNRK や HeLa 細胞の抽

出液から細胞内結合タンパク質を探索する。尚、目的の化合物が UV 照射に不安定な場合、固定化ビーズが作製できないので、第一段階として UV への安定性を確認する。光親和型ビーズの作製が困難な場合は、生物活性に影響しない官能基にビオチンリンカーを導入した誘導体を合成し、これをプローブとして標的タンパク質を探索する。

4. 研究成果

オイデスマン化合物は、天然化合物ライブラリー NPDepo より表現型スクリーニングで見出した化合物である。本化合物は tsNRK 細胞の巨大化を誘導し、HeLa 細胞に対して顕著な G2/M 期停止を誘導する。

この化合物の細胞内標的分子標的を見出すことを目的とし、まずケムプロテオームによる作用予測を試みた。その結果、高いスコアで分類される標的は見つからず、わずかにプロテアソーム阻害剤との類似性が示唆されたのみであった。プロテアソームを阻害するかを *in vitro*、細胞レベルで確認したところ、酵素阻害活性や細胞内ユビキチン化タンパク質の蓄積は観察されず、本化合物はプロテアソームを阻害しないことが示唆された。

次に化合物固定化ビーズを用いたアフィニティー精製に着手した。まず固定化に必要な UV 照射に対する安定性を確認したところ、この化合物は UV に不安定ではないことがわかった。次に作製した化合物固定化ビーズを用いて細胞抽出液より結合タンパク質を探索した。様々なアフィニティー精製の条件検討を行ったが、特異的な結合タンパク質の発見には至らなかった。

一方、オイデスマン化合物は G2/M 期停止を誘導したことから細胞分裂に与える影響を免疫染色法で検討した。その結果、本化合物は紡錘体形成や染色体凝集に影響を与えず、分裂中期で細胞周期を停止させることが明らかになった。

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 3 件)

1. Futamura Y et al, "Identification of a molecular target of a novel fungal metabolite, pyrrolizilactone, by phenotypic profiling systems" *ChemBioChem*, **18**:

2456-2463 (2013) 査読有

2. Futamura Y et al, "Target identification of small molecules based on chemical biology approaches" *Mol Biosyst*, **9**: 897-914. (2013) 査読有
3. 長田 裕之, 二村 友史, 渡邊 信元, 近藤 恭光「新たな抗がん剤探索を加速する新スクリーニング技術」細胞工学 **32**: 655-59, 秀潤社 (2013) 査読無

[学会発表](計 4 件)

1. Futamura Y, Kawatani M, Muroi M, Aono H, Osada H. "Development and utilization of a cell morphology database, MorphoBase, for drug target identification" AACR-NCI-EORTC International Conference Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2013 年 10 月 19~23 日, ボストン
2. 二村 友史, 川谷 誠, 室井 誠, 青野 晴美, 長田 裕之 "モルフォベースを利用した抗がん剤探索: 特異な線状構造体を誘導する NPD4152 の発見" 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3~5 日, 横浜
3. 二村 友史 "細胞形態変化データベース「モルフォベース」の構築とその応用" GE Life Sciences Day 2013, 2013 年 7 月 3 日, 横浜
4. Futamura Y, Kawatani M, Muroi M, Shimizu T, Watanabe N, Osada H. "MorphoBase, an encyclopedia of cell morphology, and its use for drug target identification" The 2nd Symposium of RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology, 2013 年 4 月 16~17 日, 埼玉

[図書](計 1 件)

1. Osada H, Muroi M, Kondoh Y, Futamura Y. "A Target Identification System Based on MorphoBase, ChemProteoBase, and Photo-Cross-Linking Beads." *Concepts and Case Studies in Chemical Biology* (Ed. Waldmann H, Janning P), Wiley-VCH, 163-176.

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・長田抗生物質研究室・訪問研究員

研究者番号：70525857