

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25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22681034

研究課題名（和文） エンドサイトーシスを標的とした癌分子標的治療薬の開発

研究課題名（英文） Development of anti-cancer agents targeting the endocytic pathway

研究代表者

川谷 誠 (KAWATANI MAKOTO)

独立行政法人理化学研究所・化合物ライブラリー評価研究チーム・専任研究員

研究者番号：50391925

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、細胞表現型を指標にしたハイコンテンツスクリーニングシステムを構築して、エンドサイトーシスを標的とした新規癌分子標的治療薬を開発することである。イメージングサイトメーターを用いて薬剤が誘導するさまざまな細胞形態変化を定量的に評価することに成功し、さらに形態変化パターンから薬剤作用を予測する手法「モルフオベース」を開発した。スクリーニングで見出したエンドサイトーシスを攪乱する NPD1801 は、カルモジュリンとの結合・機能阻害→Ras-Raf 経路活性化→後期エンドソーム-リソソーム融合阻害→リソソームの機能不全、を引き起こして抗癌作用を示すことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to construct a cell morphology-based high-content screening system and to develop anti-cancer agents targeting the endocytic pathway. We constructed a chemical-genetic phenotype profiling system based on the high-content cell morphology database, Morphobase. We showed that NPD1801, which perturbs the endocytic pathway, targeted calmodulin, caused the activation of Ras-Raf pathway, the inhibition of the fusion of late endosome and lysosome, and the dysfunction of lysosome, and resulted in the cancer cell death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2012年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
総計	18,000,000	5,400,000	23,400,000

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：癌、小分子化合物、エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

エンドサイトーシスは、細胞外物質の取り込み過程にかかわる膜動過程であり、狭義には取り込んだ物質を主に初期エンドソーム、

後期エンドソームを介して消化系であるリソソームへと輸送する一連のプロセスを指す。

近年、ショウジョウバエを用いた発生学研

究から、エンドサイトーシスが癌化と密接にかかわっていることが示唆されてきた。以前から、組織中で隣り合う2つの細胞がその分裂速度を競い合い、分裂速度の速い「勝者」が「敗者」を細胞死によって除去してその場を占有する“細胞競合”と呼ばれる現象が見つかった (Morata G. and Ripoll P. Dev. Biol. 42, 211-221, 1975)。この機構は、組織中の細胞の分裂速度を均一化させることで最終的に形成される各器官の大きさや形を規定するのに貢献するだけでなく、癌細胞の組織内での優勢的増殖にも深く関与していることが示された。細胞競合のメカニズムは長らく不明であったが、2004年にエンドサイトーシス経路を介した生存因子捕獲モデルが報告された (Moreno E. and Basler K. Cell 117, 117-129, 2004)。すなわち、細胞競合の勝者 (癌細胞) はエンドサイトーシス経路を増幅させることでより多くの細胞外生存因子を捕獲し、その優勢的な競合を成立させていることが示された。細胞競合現象の存在は哺乳類でも確認され、癌の全く新しい発症機構を提唱するものである (Moreno, E. Nat. Rev. Cancer 8, 141-147, 2008)。

ヒト癌の発症や進展に関しては、現時点で細胞競合現象に基づいた臨床学的エビデンスは何もない。しかしながら、細胞競合による優勢的増殖を実現している癌種ならば、その増殖や生存にエンドサイトーシスが強く依存しているはずである。このような場合、エンドサイトーシスを標的とした阻害剤は、癌細胞の獲得しているホメオスタシスを破壊させ、速やかに細胞死を導くと考えられ、癌細胞に対する選択毒性を発揮するものと期待できる。しかし、エンドサイトーシスを標的とした抗癌剤開発研究は国内外を見渡してもほとんど行われていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的はエンドサイトーシスを標的とした新たな癌分子標的治療薬を開発することである。具体的には、細胞表現型を指標にしたセルベースハイコンテンツスクリーニングシステムを構築してエンドサイトーシス経路を阻害する小分子化合物を見出す。得られたヒット化合物の細胞内標的分子を同定し、それをツールにエンドサイトーシスの制御機構および癌化における役割を解明する。さらに、得られた化合物の標的分子が創薬ターゲットとして有望と認められた場合、得られた化合物の抗癌剤としての有用性を疾患モデル動物で検証する。

3. 研究の方法

3-1. 癌細胞増殖阻害活性化合物の探索 (1次スクリーニング)

癌細胞増殖阻害活性化合物を取得する目的で、理研天然化合物バンク (NPDepo) の化合物ライブラリーおよそ 30,000 化合物について、HeLa 細胞や src^{ts}-NRK 細胞、HL-60 細胞、tsFT210 細胞に対する増殖阻害活性を評価し、化合物の構造と活性情報をデータベース化した。

3-2. 細胞表現型を指標にしたセルベースハイコンテンツスクリーニングシステムの構築

薬剤が誘導するエンドサイトーシス関連オルガネラ (初期エンドソーム、後期エンドソームおよびリソソーム) の形態変化を指標にしたハイコンテンツスクリーニングシステムを構築する目的で、各オルガネラマーカーの蛍光標識タンパク質の強制発現や蛍光標識抗体染色による可視化を検討した。しかし、いずれの検討においても、オルガネラ形態を数値化するための十分な蛍光強度が得られなかった。

そこで、用いるパラメーターを細胞形態にかかわる因子群に変更した。まず、HeLa 細胞と src^{ts}-NRK 細胞の明視野画像および核染色画像を取得し、イメージングサイトメーターを用いてイメージングアルゴリズムの開発を行い、コンピューター上で微細かつ複雑な細胞形態を認識できるようにした。次に、薬剤が誘導するさまざまな形態変化を特徴づけるため、細胞質や核、薬剤の影響で生じる顆粒や液胞などの構造体についてその大きさや数、扁平率など 12 種類のパラメーターを設定した。さらに、およそ 200 種類の作用既知薬剤によって誘導される 2 種類の細胞の形態変化をそれぞれ定量化し、得られた数値を計 71 次元の座標に変換した統計値で分析した。

3-3. 化合物固定化プローブを用いた結合タンパク質の同定

目的化合物を光親和型固定化法 (Kano H. et al., Angew. Chem. Int. Ed., 44, 3559-3562, 2005) でアガロースビーズ上に固定化させたプローブを作製した。HeLa 細胞のライセートに化合物固定化プローブを混合してアフィニティー精製し、SDS-PAGE 後、得られた結合タンパク質を MALDI-TOF/MS で同定した。

4. 研究成果

本研究で得られた主な研究成果を以下に示す。

・イメージングサイトメーターを用いて、薬剤が誘導するさまざまな細胞形態変化を定

量的に評価するハイコンテツセルベーススクリーニングシステムを構築した。さらに、本システムは薬剤の「作用」と「細胞形態変化」を定量的に関係付けられることがわかり、作用既知薬剤の細胞形態変化情報をデータベース化することで、作用未知化合物の作用メカニズムをプロファイリングすることが可能となった（モルフォベース）。

・NPD1801は1次およびハイコンテツセルベーススクリーニングで見出したエンドサイトーシス制御候補化合物である。その作用標的・作用機構解析を行った結果、NPD1801は、カルモジュリンとの結合・その機能阻害→Ras-Raf 経路の活性化→後期エンドソームの膨張および後期エンドソームーリソソームの融合阻害→リソソームの機能不全、を引き起こして抗癌作用を示すことが示唆された。

・NPD6689、NPD8617およびNPD8969は、1次スクリーニングで見出した癌細胞増殖阻害活性化化合物である。モルフォベースで解析した結果、これらの化合物はいずれもチューブリン阻害剤と推定された。3化合物はin vitroでチューブリン重合を阻害し、また化合物処理したHeLa細胞では、間期微小管の崩壊やM期紡錘体の形成異常、G2/M期停止を引き起こした。これらのことから、3化合物はいずれもチューブリン重合阻害剤として作用することが明らかとなった。

・ピロリジラク トンはNPD6689等と同様に1次スクリーニングで見出した癌細胞増殖阻害活性化化合物である。モルフォベースで解析したところ、ピロリジラク トンはプロテアソーム阻害剤と推定された。In vitroプロテアソームアッセイを行った結果、ピロリジラク トンは20Sプロテアソームのトリプシン様活性、キモトリプシン様活性およびカスパーゼ様活性を阻害し、特にトリプシン様活性を強く阻害した。またHeLa細胞において、ピロリジラク トンは既存のプロテアソーム阻害剤と同様に、ユビキチン化タンパク質の蓄積を誘導し、細胞周期をG1期およびG2/M期で停止させた。これらのことから、ピロリジラク トンはプロテアソームを標的にしていることが明らかとなった。

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 14 件)

1. Ueki M., Koshiro N., Aono H., Kawatani M., Uramoto M., Kawasaki H., and Osada H. Isolation of new polyketide metabolites,

linearolides A and B, from a *Streptomyces* sp. RK95-74. *J. Antibiot.* in press

2. Kanoh N., Suzuki T., Kawatani M., Katou Y., Oshima Y., Osada H., and Iwabuchi Y. Dual structure-activity relationship of osteoclastogenesis inhibitor methyl gerfelin based on TEG scanning. *Bioconjug. Chem.* 24, 44-52 (2013)

3. Nogawa T., Takahashi S., Sekiyama Y., Takagi H., Uramoto M., Koshino H., Kawatani M., Shimizu T., and Osada H. Creation of novel reveromycin derivatives by alcohol added fermentation. *J. Antibiot.* in press

4. Futamura Y.*, Kawatani M.*, Kazami S., Tanaka K., Muroi M., Shimizu T., Tomita K., Watanabe N., and Osada H. Morphobase, an encyclopedic cell morphology database, and its use for drug target identification. *Chem. Biol.* 19, 1620-1630 (2012) *, equal contribution

5. Asami Y., Jang J.-H., Oh H., Sohn J. H., Kim J. W., Moon D. O., Kwon O., Kawatani M., Osada H., Kim B. Y., and Ahn J. S. Violaceols function as actin inhibitors inducing cell shape elongation in fibroblast cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 1431-1437 (2012)

6. Tanaka M., Miyazawa K., Tabuchi M., Yabumoto T., Kadota M., Yoshizako M., Yamane C., Kawatani M., Osada H., Maeda H., and Goto S. Effect of reveromycin A on experimental tooth movement in OPG-/- mice. *J. Dent. Res.* 91, 771-776 (2012)

7. Khan M. M., Simizu S., Suzuki T., Masuda, A., Kawatani M., Muroi M., Dohmae N., and Osada H. Protein disulfide isomerase-mediated disulfide bonds regulate the gelatinolytic activity and secretion of matrix metalloproteinase-9. *Exp. Cell Res.* 318, 904-914 (2012)

8. Nogawa T., Takahashi S., Okano A., Kawatani M., Uramoto M., Saito T., and Osada H. Spirotoamides A and B, novel 6,6-spiroacetal polyketides isolated from a microbial metabolite fraction library. *J. Antibiot.* 65, 123-128 (2012)

9. Khan M. M., Simizu S., Kawatani M., and Osada H. The potential of protein disulfide isomerase as a therapeutic drug target. *Oncol. Res.* 19, 445-453 (2012)
Review Article

10. Kawatani M., Takayama H., Muroi M., Kimura S., Maekawa T., and Osada H. Identification of a small-molecule inhibitor of DNA topoisomerase II by proteomic profiling. *Chem. Biol.* 18,

743-751 (2011)

11. Kato N., Tokuoka M., Shinohara Y., Kawatani M., Uramoto M., Seshime Y., Fujii I., Kitamoto K., Takahashi T., Takahashi S., Koyama Y., and Osada, H. Genetic safeguard against mycotoxin cyclopiazonic acid production in *Aspergillus oryzae*. *Chembiochem* 12, 1376-1382 (2011)
12. Khan M. M., Simizu S., Lai N. S., Kawatani M., Shimizu T., and Osada H. Discovery of a small molecule PDI inhibitor that inhibits reduction of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *ACS Chem. Biol.* 6, 245-251 (2011)
13. Muroi M., Kazami S., Noda K., Kondo H., Takayama H., Kawatani M., Usui T., and Osada H. Application of proteomic profiling based on 2D-DIGE for classification of compounds according to the mechanism of action. *Chem. Biol.* 17, 460-470 (2010)
14. Takeuchi M., Kimura S., Kuroda J., Ashihara E., Kawatani M., Osada H., Umezawa K., Yasui E., Imoto M., Tsuruo T., Yokota A., Tanaka R., Nagao R., Nakahata T., Fujiyama Y., and Maekawa T. Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl+ leukemic cells acquiring stem-like characteristics in hypoxic environment. *Cell Death Diff.* 17, 1211-1220 (2010)

[学会発表] (計 12 件)

1. Makoto Kawatani, Harumi Aono, Toshihiko Nogawa, Makoto Muroi, Yushi Futamura, and Hiroyuki Osada 「Proteome- and cell morphology-based target identification for RKB3564F070, a new cytotoxic fungal metabolite」 The 1st official conference of the international chemical biology society, October 4-5, 2012 (Boston, USA)
2. 川谷誠 「Chemical biology studies on inhibitors of cancer bone metastases」 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19-21 日 (札幌) 日本癌学会奨励賞受賞講演
3. 川谷誠、青野晴美、室井誠、二村友史、長田裕之 「Identification of a molecular target for RKB3564F070, a new cytotoxic fungal metabolite」 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19-21 日 (札幌)
4. 川谷誠、長田裕之 「破骨細胞を標的とする小分子化合物の化学遺伝学的解析」 第 153 回日本獣医学会学術集会、2012 年 3 月 27-29 日 (大宮) 招待講演
5. Makoto Kawatani, Makoto Muroi, and Hiroyuki Osada 「Identification of novel tubulin polymerization inhibitors by

proteomic profiling」 The 16th JFCR-ISCC, January 25-26, 2012 (Tokyo, Japan)

6. Makoto Kawatani, Kouji Tomita, Makoto Muroi, Sayaka Kazami, Harumi Aono, Takeshi Shimizu, and Hiroyuki Osada 「Identification of novel tubulin polymerization inhibitors by proteomic profiling」 AACR-NCI-EORTC International Conference “Molecular Targets and Cancer Therapeutics”, November 12-16, 2011 (San Francisco, USA)
 7. 川谷誠、青野晴美、室井誠、長田裕之 「プロテオームプロファイリングによるチューブリン重合阻害剤の同定」 第 70 回日本癌学会学術集会、2011 年 10 月 3-5 日 (名古屋)
 8. 川谷誠、富田康司、風見紗弥香、青野晴美、室井誠、清水猛、長田裕之 「プロテオームプロファイリングによるチューブリン重合阻害剤の同定」 第 15 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2011 年 6 月 22-24 日 (東京)
 9. Makoto Kawatani, Harumi Aono, and Hiroyuki Osada 「Antitumor activity of NPD723, a novel potent cell differentiation-inducing agent in leukemic cells」 22nd AACR-NCI-EORTC International Conference “Molecular Targets and Cancer Therapeutics”, November 16-19, 2010 (Berlin, Germany)
 10. Makoto Kawatani, and Hiroyuki Osada 「The identification of a novel inhibitor of osteoclastogenesis that acts via inhibition of glyoxalase I」 2010 RIKEN Chemical Biology International Symposium, October 26-27, 2010 (Saitama, Japan)
 11. 川谷誠、青野晴美、早川洋一、長田裕之 「細胞質空胞化を誘導する NPD1801 の作用機作解析」 第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22-24 日 (大阪)
 12. 川谷誠、風見紗弥香、青野晴美、早川洋一、長田裕之 「細胞質空胞化を誘導する NPD1801 の作用機構解析」 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 1 件)
1. 川谷誠、長田裕之 「細胞骨格系」 日本臨床 (増刊号) 70, 130-134 (2012)
6. 研究組織
(1) 研究代表者
川谷 誠 (KAWATANI MAKOTO)
独立行政法人理化学研究所・化合物ライブラリー評価研究チーム・専任研究員
研究者番号：50391925

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

室井 誠 (MUROI MAKOTO)

独立行政法人理化学研究所・化合物ライブラ
リー評価研究チーム・専任研究員

研究者番号：30261168

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・協力研究員

研究者番号：70525857

風見 沙弥香 (KAZAMI SAYAKA)

独立行政法人理化学研究所・化合物ライブラ
リー評価研究チーム・協力技術員

本田 香織 (HONDA KAORI)

独立行政法人理化学研究所・化合物ライブラ
リー評価研究チーム・協力技術員