

令和元年5月14日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19478

研究課題名（和文）潜在的な薬物応答の分析・応用を可能にするディープフェノタイピング法の開発

研究課題名（英文）Development of deep phenotyping method that enables analysis and application of latent drug response

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）：新規プロファイルデータ解析手法OLSA、二次元電気泳動によるプロファイルデータ取得方法を組み合わせ、より“深く”薬物作用を理解可能であることを実証することに取り組んだ。OLSAはトランスクリプトームデータを対象とした際にも、生物学的意義を保持した数学的な構造の抽出を達成した。二次元電気泳動によるデータ取得では、実験間でのばらつきなどの課題も克服した。本研究により、薬物の作用ごとの明確な分類を達成した。抗がん剤曝露の結果、細胞死と考えられる共通作用、併用により打消し合う作用、さらに併用による新たな作用と考えられるベクトルが抽出され、薬物単独および併用による特異な効果を見出していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初の期待通り、OLSAを利用することで、トランスクリプトーム・プロテオームいずれのオミクスデータからも研究者が必ずしも定義していない（できていない）表現型をも利用して、薬物応答性を体系的に捉えることを支援し、薬物応答を深く理解できることを実証した。単剤のみではなく、併用による作用も検出できたことから、有効な抗がん剤の組み合わせを解明することにも貢献するものである。さらに、薬物に限らず、刺激に対する細胞および生体の応答性解析という観点から適用範囲は非常に広く、薬物動態領域にかかわらず、他の研究領域においても有用な実験ツールとして波及効果も期待される。

研究成果の概要（英文）：This study was designed to demonstrate that the new profile data analysis method, OLSA, and the profile data acquisition methodology, two-dimensional electrophoresis using mini-gel, help "deep" understanding of drug action. OLSA achieved extraction of mathematical structures with biological meanings even based on transcriptome data. In data acquisition by two-dimensional electrophoresis, we also overcome problems such as variability between experiments. This study achieved a clear classification for each drug's action using OLSA. As a result of exposure to anticancer drugs, common effects that are considered to be cell death, effects to be canceled by combination, and effects that are considered to be new ones by combination are extracted. We considered that the analysis elucidated drug single and combined effects of anti-cancer drugs.

研究分野：分子薬物動態学

キーワード：プロファイリング OLSA トランスクリプトームデータ プロテオームデータ 抗がん剤 併用効果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体・細胞に対する薬物の作用には、標的タンパクを介して生じるものとオフターゲットタンパクを介して生じるものがあり、後者は、さらに同じ薬効標的群で共通する作用(クラス効果)と、薬物固有の作用に分類することができる。また、薬効標的こそ異なっても、最終的に生体内で同一反応に収斂し、同じ表現系に至ることもある。単独の薬物処理の結果のみではなく、複数の薬物処理の結果を統合的に把握することで、個々の薬物による作用を体系的に理解し、併用効果の予測、未知毒性機序の特定、新規作用の発見などが可能になると考えた。近年オミクス解析により膨大な情報を得ることが可能になったが、膨大な情報からいかに“意味”をくみ取るかは、研究者のセンスに委ねられている。我々は、オミクス情報に立脚し、複数の薬物情報を統合的に用いた独自の解析手法を導入することで、全体像を見渡した客観的な薬効評価システムを考案し、“ディープフェノタイピング”と名付けた。本法は、研究者が必ずしも定義していない(できていない)表現型をも利用して、薬物応答性を体系的に捉えることを支援し、薬物応答を深く理解することを可能とする。

ディープフェノタイピング実現のためには、データ取得方法に 発現量、翻訳後修飾の変動など、網羅性の高い情報を取得できる、情報取得の精度が高く再現性が高い、および多検体の解析を必要とすることからローコスト、といった特性が不可欠である。木之下ら(研究協力者)は画像解析も含めて、二次元電気泳動法の基幹技術を開発し、申請者との共同研究により、薬物応答を評価するための最適化を行ってきた。ゲル上でのスポット位置の再現性を著しく高めることで、実験手技に由来する揺らぎを排除し、かつ、2D-DIGEのような同一ゲル上での比較などの制限がないことから、多検体間でのスポット位置および強度情報を相互に比較解析することができる。この特徴は、申請者が必要とする前述の3条件を満たす。

2. 研究の目的

本研究では、“ディープフェノタイピング”を適用することで薬物作用を体系化できることを実証し、新たな研究ツールとして世の中に発信することを目的とする。本手法は、薬物処理のみではなく、刺激に対する応答性の解析という観点から適用範囲は非常に広く、薬物動態領域にかかわらず、他の研究領域においても有用な実験ツールとして波及効果も期待される。

3. 研究の方法

本研究では、抗がん剤に注目した。薬効標的分子が多様(初期反応の多様性)であり、かつ細胞死に全ての薬物の反応が収斂(終末反応の共通性)する点から、“ディープフェノタイピング”の実証研究において最適な薬物群である。がんの化学療法では、薬効標的の異なる抗がん剤を複数併用する治療法(併用療法)が利用されている。本研究の成果は、治療効果を最大化するため、併用すべき既存薬の決定を支援することが可能になる。

本研究には、申請者のほか、申請者の研究室スタッフである水野忠快助教、及び特別研究員の木之下節夫が参加した。まず新規計算手法により抽出される数学的構造(薬物応答ベクトル)が生物学的意義を保持しているか否かの検討を実施した。具体的には、データベースが充実しているトランスクリプトームデータを本手法による解析に供し、得られた指標を元に薬物の作用を予測、in vitro 試験系による実証試験に取り組んだ。二次元電気泳動では、培養細胞に種々薬物を曝露して得られた試料を二次元電気泳動法に供し、スポット情報を取得した。スポット情報を、新規計算手法も含めた各種多変量解析によって解析し、得られたスポット情報の生物学的な意味付けを試みた。また複数薬物による併用効果(相加、相乗、相殺)予測など、プロファイル情報に基づいた薬物作用の理解にも取り組んだ。

4. 研究成果

(1)新規プロファイルデータ解析手法によるトランスクリプトームデータ解析手法の構築

提案当初の主成分分析に基づいた計算手法を洗練し、Orthogonal Linear Separation Analysis (OLSA)を開発した。本手法は、薬物などを作用させた際の応答プロファイルデータを、生物学的意義を保持したベクトルへと線形分離・縮約するものである。これにより薬理作用の理解を支援す

ることが可能となる(主な論文発表等欄参照)。Broad institute が提供する Connectivity map (CMap, 引用文献 1) による MCF7 細胞に対して 318 化合物、370 条件のトランスクリプトームデータを解析に供したところ、1 サンプルにつき 11911 遺伝子(次元)からなるデータが 118 個



図1. OLSAによるCMapデータの解析。左: 累積寄与率のプロット。右: 各ベクトル主要構成遺伝子のGO解析結果(塗り潰しがGOで統計的有意差が認められたベクトル)。SEGR:有意差が得られたベクトルの比率。

のベクトル (次元) に縮約された。これらは遺伝子の協奏性により縮約されているものと考えられるため、各々が何らかの薬剤作用に反応して変動した遺伝子パターン (シグネチャー) であると推察される。実際に個々のシグネチャーにおいて寄与率の高い遺伝子群 (上位 1%, 119 遺伝子) を gene ontology 解析した結果、65 個のベクトル (55.1%) に関して有意な濃縮が認められ、確かに薬物作用を細胞において意味のある情報に縮約することに成功した (図 1)。

(2) 新規解析手法に基づいた薬物作用の予測と in vitro 試験系による検証

得られたベクトルのうち、2 番目に寄与率の高いもの (P2V) に着目した。gene ontology 解析等から、P2V は PI3K/AKT/mTOR 経路阻害に対応すると考えられるため、P2V ハイスコア化合物は autophagy を誘導するものと推察される。そこでこれらの化合物のうち、autophagy との関係性が報告されていない 5 化合物 (Benzamil (BEN), Benzethonium Chloride, Metixene (BC), Metitepine (MTP), MTX (Metixene), Phenazopyridine (PP)) について、HeLa 細胞に処理し、autophagy 誘導能の指標である LC3-I から -II への変換を Western blotting 法により評価した。結果、PP を除く 4 化合物について確かに autophagy の誘導が認められた (図 2)。免疫染色法等、他の解析手法によっても同様に autophagy 誘導能を支持する結果が得られ、OLSA 結果に基づく予測が概ね正しいことが示された。

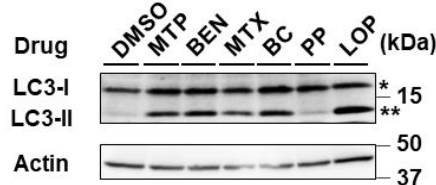


図 2. 予測された化合物の autophagy 誘導能の検証*: LC3-I, **: LC3-II

(3) 二次元電気泳動によるプロファイルデータの安定性の検証

ミニゲル (10 cm × 10 cm) を用いた二次元電気泳動に HeLa 細胞を DMSO、あるいは bortezomib にて 18 時間処理した試料を供した結果、図 3 に示すような画像が得られた。本実験系では、蛍光色素 Cy2 で標識した内部標準サンプルから得られる画像を利用して同一 gel 内に展開された被検サンプル (Cy3 或いは Cy5 で標識) の各蛋白スポット位置を補正、確定する。これにより、図 3 に示すような Master Spot Map を作成し、複数のデータであっても自動でスポットを抽出、定量可能となっている。本研究においては、1,697 の安定したタンパク質スポットを自動的に抽出することに成功した。

各スポットを定量、数値化することで、各処理、各実験日ごとのプロファイルデータを得た。実験日間差を評価するため、各処理での実験日間の相関係数を計算したところ、図 4 のようになった。すなわち実験日間での変動よりも処理間での差が大きいことが示唆された。従って、本手法がプロファイルデータ取得手法として信頼性がある可能性が示された。

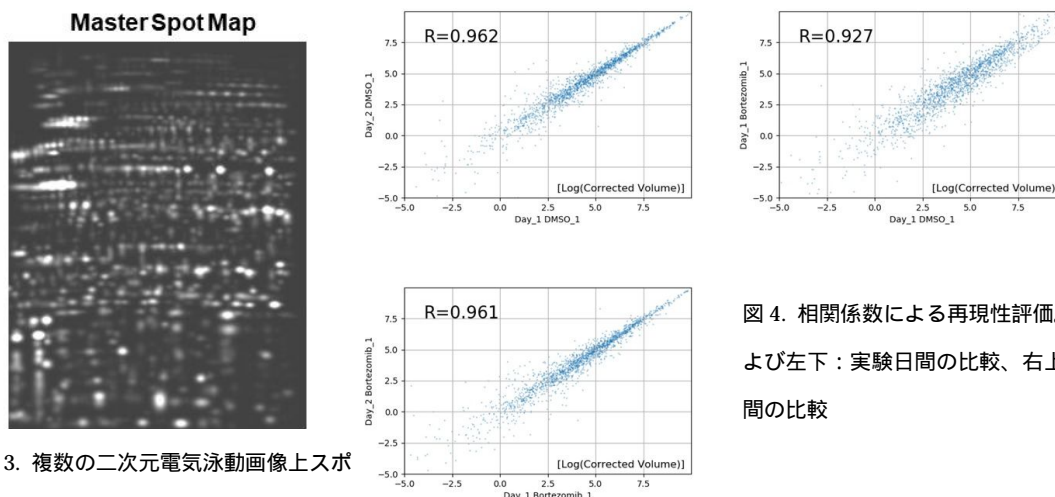


図 3. 複数の二次元電気泳動画像上スポット群を同時検出し、得られたスポット形状データを合成した人工画像

図 4. 相関係数による再現性評価。左上および左下: 実験日間の比較、右上: 処置間での比較

(4) 二次元電気泳動による薬物の併用効果プロファイルの取得とデータ解析

2 種類の抗がん剤 (Vincristine, PD0325901 およびその併用) を、24 時間処理したヒト線維肉腫由来 HT-1080 細胞より、細胞質画分を調整し、二次元電気泳動に供した。得られたデータを OLSA により解析したところ、3 ベクトルが抽出された。各ベクトルはこれらのデータを縮約する基礎的な作用であると考えられる。各ベクトルに着目すると、細胞死と考えられる共通作用 (寄与率 58%)、併用により打消し合う作用 (寄与率 18%) が明確に見いだされ、さらに併用による新たな作用 (寄与率 16%) と考えられるパターンが見いだされた。この結果により、当初の期待通り、ミニゲルを用いた二次元電気泳動によるプロファイルデータを、OLSA により解析することで、抗がん剤の併用効果を解析可能であることが示された。

(5) まとめ

本研究では、新規プロファイルデータ解析手法 OLSA の確立、及び二次元電気泳動によるプロファイルデータ取得方法論の構築に取り組み、両者を組み合わせることで、より”深い”薬物作用の理解を達成可能であるという概念の実証に取り組んだ。OLSA はデータの再現性が低くばらつきが大きいとされるトランスクリプトームデータを対象とした際にも、生物学的意義を保持した数学的な構造の抽出を達成した。ミニゲルを用いた二次元電気泳動によるプロファイルデータ取得では、実験間でのばらつきが大きいといった課題が認められたものの、本研究期間内に克服した。実際、標準手順書を作成した後に取得したデータを解析した際には、薬物の作用ごとの明確な分類を達成した。また併用時においてのみ得られる数学的構造も認められたことから、薬物の併用による特異な効果を見出している可能性もある。当該ベクトルの生物学的な解釈までには至っていないものの、重要な検討課題である。

プロファイルデータ解析においてはリファレンスとなるデータベースの充実が肝要である。本研究により、ミニゲルを用いた二次元電気泳動による比較的低コスト、かつスループット性の高いプロファイルデータ取得、及びその蓄積が可能であることが実証できたため、今後薬物のデータを増やし、ライブラリーを充実させ、薬理作用を深く理解するためのプラットフォーム構築に取り組みたい。

< 引用文献 >

Lamb J, et al “ The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. ” Science. 2006 Sep 29;313(5795):1929-35. doi: 10.1126/science.1132939

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

著者名: Mizuno T, Kinoshita S, Ito T, Maedera S, Kusuhara H

論文標題: Development of Orthogonal Linear Separation Analysis (OLSA) to Decompose Drug Effects into Basic Components.

雑誌名: Scientific reports

巻: 9

発行年: 2019 年

DOI: 10.1038/s41598-019-38528-4.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

産業財産権の名称: 生物応答の解析方法、解析プログラム、及び解析装置 同左

発明者: 楠原洋之, 水野忠快, 木之下節夫, 佐竹和子

権利者: 楠原洋之, 水野忠快, 木之下節夫, 佐竹和子

産業財産権の種類、番号: 特許、特願 2018 - 042467

出願年: 2018 年

国内・国外: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~molpk/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者
いません。

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 水野 忠快 (助教)、木之下 節夫 (受託研究員)

ローマ字氏名: Mizuno Tadahaya, Kinoshita Setsuo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。