

ハイスループット細胞機能探索システムによる創薬アプリケーション

Drug Discovery Applications of High-throughput Cytological Discovery Systems

杉本 和之^{*1}

Kazuyuki Sugimoto

鈴木 真帆海^{*1}

Mahomi Suzuki

岩原 寿典^{*1}

Toshinori Iwahara

横河電機には、ハイスループット細胞機能探索システム製品として、小型ベンチトップのCQ1と大型ハイエンドのCellVoyager CV8000の2機種、およびハイコンテンツ解析ソフトウェアCellPathfinderがある。マイクロレンズ付きニポウディスク式共焦点技術をベースに、大量の高精細な顕微鏡画像を自動かつ高速で、2次元だけでなく3次的に撮像、その画像から様々な情報を取得し、定量解析を行うことができる。また、堅牢な環境制御機構により、細胞本来の機能や特性を維持した状態で観察、撮像することもできる。当社の機器は、これらの技術により、細胞の生理現象を多角的に評価することが可能であり、医薬品開発の分野で活用されつつある。本稿では、当社機器による創薬アプリケーション例として、肝毒性試験、癌細胞の経時的な遊走能（癌細胞が移動できる能力で癌の転移能に関わる）の評価、ゼブラフィッシュの解析について紹介する。

Yokogawa's range of high-throughput cytological discovery systems includes the CellVoyager CV8000 high-throughput cytological discovery system, which is a large high-end type, and the CQ1 confocal quantitative image cytometer, which is a small bench-top type, both of which use the CellPathfinder high content analysis (HCA) software. By using confocal scanning technologies based on microlens-enhanced Nipkow disks, both systems can automatically acquire a large amount of high-definition, 2D/3D confocal microscopic images at high speed and quantify the information contained in these images. These systems can also provide ideal culture conditions for cells through temperature control, CO₂ control, and a humidifier. These useful functions enable the systems to analyze various cellular responses and thus to be increasingly used in the drug discovery field. This paper introduces three examples of using these systems for drug discovery research: hepatotoxicity assay, cellular migration assay, and in vivo tumor metastasis assay using zebrafish.

1. はじめに

生命現象の理解には、タンパク質の細胞内での発現量やタンパク質同士の相互作用などの微細な活動を明らかにすることが重要である。細胞およびタンパク質などの挙動を捉えるために、蛍光顕微鏡をはじめとするイメージング技術が著しい発展を遂げている。

当社のハイスループット細胞機能探索システムと呼称する装置は、独自のマイクロレンズ付きニポウディスク方式の共焦点顕微鏡技術により、細胞の顕微鏡画像を高速かつ高精細にイメージングできる。さらに、その画像から、細胞の1つ1つの明るさや大きさを詳細に測定できる装置であり⁽¹⁾、創薬をはじめとする様々な分野でお客様に活用されることが期待されている。

2. 創薬における応用

医薬品開発において、探索といわれる、膨大な数の化合物から新薬の候補となる有用な化合物を選別する工程や、その薬理作用や安全性を評価する工程において、ハイコンテンツスクリーニング(HCS)と呼ばれる手法が盛んに用いられてきている⁽²⁾。HCSとは、顕微鏡をベースとしたイメージングシステムを用いて、大量の画像データを自動かつ高速で撮影、解析し、複数のパラメータを算出する。さらに、データマイニングによって、ヒット化合物を選別する手法である。当社では、CQ1、CellVoyager CV8000、その解析ソフトウェアCellPathfinderなどの製品がそのカテゴリーに含まれる。

本稿では、当社機器を用いたアプリケーション例として、2次元培養した細胞の毒性試験、遊走能試験、そして次世代実験動物として注目されているゼブラフィッシュを用いたin vivo（生体環境下）アッセイについて紹介する。

^{*1} 計測事業本部 ライフサイエンスセンター 営業部

3. 創薬に関するアプリケーション例

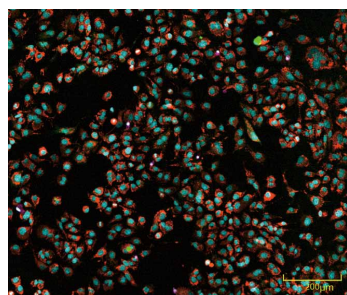
3.1 肝毒性試験

新薬の開発中止や上市後の警告・販売中止は、時に製薬企業にとって死活問題となり、社会への影響も大きい。そのため、創薬の早期段階で候補化合物の安全性を評価し、毒性のあるものを排除することは非常に重要である。

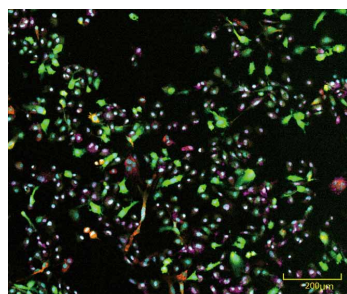
薬物がもたらす毒性の一つに肝障害が挙げられ、肝臓の細胞を用いて様々な項目について測定し、安全性評価が行われている。ここでは、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 と、合成ビタミン K であるメナジオンを用いて、肝毒性試験を次のように行った。

2 次元培養した HepG2 細胞にメナジオンを加え、24 時間曝露を行い、細胞核、ROS (活性酸素) 産生、ミトコンドリア膜電位、死細胞の 4 項目について測定を行った。それぞれの染色は、Hoechst33342 を用いて細胞核 (青)、CMH2DCFDA にて ROS (緑)、MitoTracker Orange にてミトコンドリア膜電位 (赤)、TOTO-3 にて死細胞 (紫) をそれぞれ標識し、撮影した。図 1 にその画像を示す。

図 1 (a) に示すコントロール群では、ミトコンドリア膜電位が正常であることを示す赤色の蛍光が強い。しかし、図 1 (b) に示すメナジオン添加群では、赤色の蛍光が消え、ROS が発生していることを示す緑の蛍光が増加している。また、紫の蛍光が見えることから、死細胞も増加していることがわかる。



(a) メナジオン濃度=0 μM

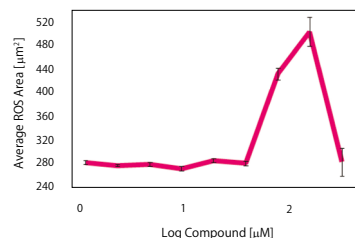


(b) メナジオン濃度=400 μM

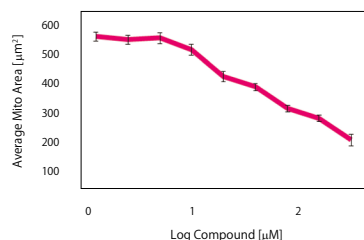
青：細胞核 緑：ROS 産生
赤：ミトコンドリア膜電位 紫：死細胞

図 1 メナジオン添加 HepG2 の撮影画像

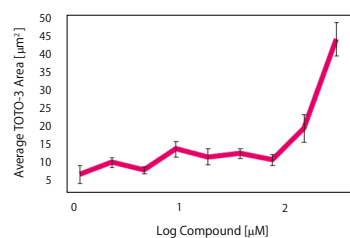
図 2 は、図 1 (b) に示すメナジオン添加群における ROS 産生、ミトコンドリア膜電位、死細胞の各測定項目の画像解析結果を示している。これらのグラフより、メナジオンの濃度依存的にミトコンドリア膜電位活性が低下、ROS は高濃度で急激に上昇し、死細胞も増加していることがわかる。このことから、メナジオンが肝細胞に対して毒性を示していると判断できる。



(a) ROS 産生



(b) ミトコンドリア膜電位



(c) 死細胞

図 2 肝毒性解析結果

ここまで説明してきたように、ハイスループット細胞機能探索システムを用いて、肝毒性試験の撮影、解析を行うことができる。

3.2 細胞遊走能の評価

基本的な細胞の生理機能の一つとして細胞遊走があり、創傷治癒、細胞分化、胚発生、腫瘍の転移などの様々な現象に関わっている。さらに、骨粗しょう症や関節炎、先天性の脳や心臓の異常などの疾患にも深く関与しており、この現象を理解することは疾患治療をする上で非常に重要である。

細胞遊走能を定量的に評価する手法の一つに、スクラッチアッセイがある。これは、細胞を 2 次元培養してコンフルエント (培養皿一面に細胞が密集している状態) にした後、培養皿の底面を道具で引っ掻くことで、細胞を削って溝を作る。その後、細胞遊走によって溝がふさ

がっていく様子を観察する手法である。

本アッセイでは、Fucci プロープ導入 HeLa 細胞と、抗がん剤の一種であるマイトマイシン C (MMC) を用いて観察を行い、画像を定量解析した。Fucci プロープとは細胞周期の進行を可視化できる蛍光プローブであり、これを導入した細胞では、G1 期では赤、それ以外では緑の蛍光を発する。また MMC は、DNA の複製を阻害する抗癌性抗生物質で、細胞が増殖することを阻害する作用を持つ。

溝が埋まる要因として、細胞遊走により埋まる場合と、細胞が増殖した際に、隣の細胞が押し出されて移動する場合は考えられる。それらを区別するために、本試験では Fucci プロープと MMC を用いた。これらを踏まえて、スクラッチアッセイによる細胞の遊走能、および増殖能の経時解析を次のように行った。

HeLa 細胞がコンフルエントになるまで培養し、ピペットチップの先端で培養容器の底面を引っ掻き、傷を付けた。薬剤添加群には MMC を $3\text{ }\mu\text{g/mL}$ になるように加え、溝の領域を中心に 3 日間のタイムラプス撮影を行った。細胞を引っ掻いてからの経時変化の様子を、図 3 に示す。

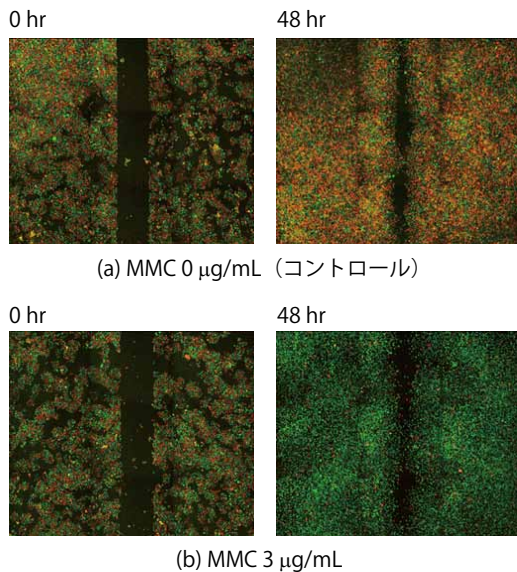


図 3 MMC 添加 Hela 細胞のタイムラプス撮影画像

図 3 では、48 時間後にはコントロール、MMC 添加群の両方で細胞によって溝が埋められているのが観察された。しかし、コントロール群は赤色の細胞と緑色の細胞が混在しているのに対し、MMC 添加群では、ほぼ緑の細胞のみとなっているように見える。解析ソフトウェアにより、溝の部分解析領域とし、領域内の細胞数をカウントした。解析の数値化結果を図 4 に示す。

図 4 を見ると、コントロール群では赤と緑の細胞がほぼ同じ数で増えているのに対し、MMC 添加群では緑の細胞のみが増加し、赤色はわずかであることが確認できる。このことから、コントロール群では増殖と細胞遊走

の両方によって溝が埋まっていったと考えられ、MMC 添加群では細胞遊走が要因となって溝が埋まっていったと考えられる。

タイムラプス観察により、細胞のない領域が徐々に埋められていく様子を観察することができた。コントロール群にて細胞が順調に増殖していることから、生細胞生育のための環境制御機構が安定していることがわかる。また、48 時間後の細胞の蛍光の明るさが試験開始直後と変わらないことから、装置が低光毒性であることが示唆される。細胞等を生きたまま観察するライブセルイメージングが多くの研究で行われるようになった今、当社の機器により長期間観察できる性能は、非常に有益であると考えられる。

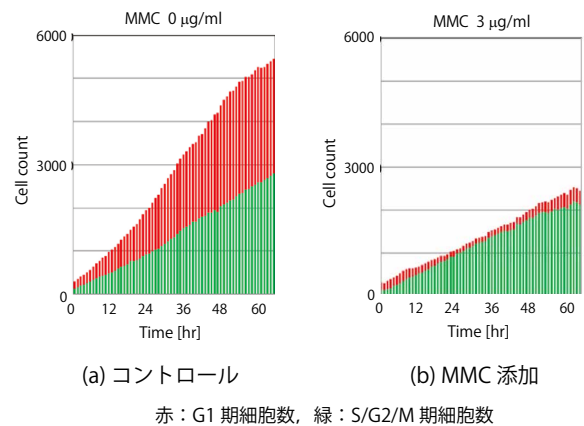
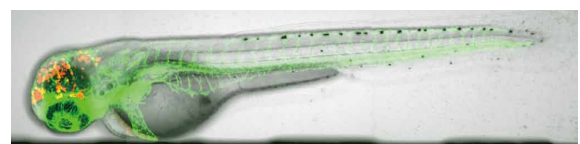


図 4 溝領域細胞数解析結果

3.3 ゼブラフィッシュの解析

近年、従来の哺乳動物に代わり、創薬ツールとして利用が増えているのがゼブラフィッシュである。ゼブラフィッシュは、ヒトへの外挿性、化合物スクリーニングの簡便性・高速性、組織の複雑性のバランスに優れている⁽³⁾。ここでは、ヒト癌細胞を移植したトランスジェニックゼブラフィッシュの撮影、およびその解析結果を紹介する。

血管細胞を GFP で標識したゼブラフィッシュの頭部に、赤色蛍光タンパク質 tdTomato で標識したヒト癌細胞を移植し、Z 軸方向のスライス撮影により、立体的な観察を行った。図 5 に、その MIP (Max Intensity Projection) 画像を示す。



緑：血管、赤：癌細胞、グレー：明視野像

図 5 ゼブラフィッシュ全体像撮影

次に、ゼブラフィッシュ内の癌細胞の量を定量するため、画像解析により赤い蛍光の癌細胞を認識した。図6に結果を示す。ここでは、図6(a)で認識した赤い癌細胞部分を解析することで、図6(b)で癌細胞の面積、総輝度値等のパラメータを算出している。

図6のように、3次元撮像した画像から2DであるMIP画像を作成し、平面的に解析することもできるが、各スライス画像を用いることで立体的な解析が可能である。このような3Dの解析を行うと、体内での癌細胞の空間的分布や体積を知ることができる。



(a) 解析前

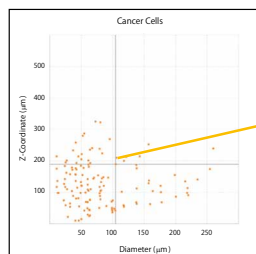


(b) 解析後

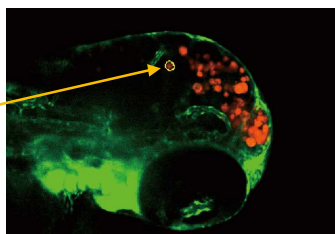
水色：ゼブラフィッシュ輪郭 青：癌細胞

図6 ゼブラフィッシュ領域と癌細胞の認識 (MIP 画像)

さらに、図7のように、ソフトウェア上で解析結果のグラフのプロット(測定値)をクリックすれば、対応するゼブラフィッシュの部位がハイライトされる機能がある。このように数値と画像がリンクしており、癌細胞の状態を画像で簡単に確認できる。



(a) 個々の癌細胞の測定結果



(b) 左図にて選択した細胞

図7 解析グラフと画像のリンク

このアッセイの目的は、癌細胞を移植したゼブラフィッシュをウェル内で飼育し、それぞれのウェルに様々な抗癌剤を添加する。そこで、癌細胞の増減やゼブラフィッシュ内での転移を定量化することで、抗癌剤の効果を評価することである。将来的には、患者の癌細胞を用い、その患者に最適な抗癌剤を選定する個別化医療のツールとなることが期待されている。同様の実験を哺乳動物で行うと多くの時間とコストがかかり、また全身に転移した癌細胞の様子を撮像することも難しい。ゼブラフィッシュはこのような点でも、in vivo アッセイに最適であると言える。

4. おわりに

本報では創薬に関するいくつかのアプリケーション例を示した。近年、従来のプレートリーダー等を用いた High Throughput Screening (HTS) に代わり、イメージングの手法を用いた High Content Screening (HCS)、High Content Analysis (HCA) の必要性が増し、さらに、生細胞を用いた High Content Live Cell Analysis も注目されてきている。医薬品開発においては、候補化合物の探索や臨床試験での安全性の問題により、膨大な費用を投入したにもかかわらず、新薬を上市できないケースが多い。その中で、従来のような少ない測定情報だけではなく、ライブセルイメージングの手法を用いたより多くの情報を基に、また、より生体に近い状態で薬効・安全性の評価を行う必要があると、多くの研究者が考えるようになったからである。

当社機器が持つ高画質、ハイスループット、3次元解析機能、生細胞用環境機構といった特長は、このような要求に適合している。CQ1, CV8000, CellPathfinder は、医薬品開発の効率を向上させると同時に、イメージングを用いたアッセイの幅を広げることができる。さらに、これまで見逃していたような現象も多角的に評価でき、多くの知見を研究者に与えることができると考えている。

参考文献

- (1) 坂下浩史, 大橋功治, 他, “共焦点イメージサイトメーターとそのバイオアプリケーション”, 横河技報, Vol. 58, No. 1, 2015, p. 29-33
- (2) Steven A. Haney, High Content Screening: Science, Techniques and Applications, John Wiley & Sons, Inc., 2008
- (3) 西村有平, “神経疾患治療薬の開発におけるゼブラフィッシュの有用性”, 日薬理誌, Vol. 150, 2017, p. 88-91

* CSU, CellVoyager は、横河電機株式会社の登録商標です。

* その他、本文中の会社名および商品名は、各社の登録商標または商標です。

i 本稿のゼブラフィッシュのデータは、三重大学大学院医学系研究科薬理ゲノミクス 田中利男教授のご協力で得られたものである。