

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04989

研究課題名(和文) 光イメージングを駆使した冬眠がん細胞ニッチのノンバイアス解析で拓く治療戦略

研究課題名(英文) Unbiased analysis and therapeutic strategies on cancer cell dormancy by using optical imaging techniques

研究代表者

口丸 高弘 (Kuchimaru, Takahiro)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：10570591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,300,000円

研究成果の概要(和文)：がん患者の死因のほとんどは遠隔臓器への転移による。転移の成立には、がん細胞と転移臓器由来の間質細胞との相互作用が重要な役割を担うと考えられてきた。そこで、本研究では、マウスなどの実験動物の生体組織においてがん細胞に近接する組織間質細胞をその場で蛍光標識する遺伝子コード型ツール sGRAPHICを開発した。sGRAPHICは、既存の近接細胞蛍光表記技術に比べ、細胞接着様式の影響を受け難く、汎用性が高い。sGRAPHICで蛍光標識された組織間質細胞は、蛍光活性化細胞分取装置で単離可能であり、1細胞オミクス解析によって、転移を制御するがん細胞-間質細胞相互作用の解明に新たな力となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞と組織間質細胞の相互作用の解析は、これまで組織切片試料の観察から得られるごく限られた情報から構築された仮説に基づいて進められてきた。本研究で開発したsGRAPHICによって、がん細胞と相互作用する組織間質細胞のオミクス解析が実現すれば、相互作用に関する包括的な情報が手に入り、転移の成立を制御する決定的な分子機構が明らかになる可能性が高い。それらは、転移の予防法の確立など、がんを撲滅する新しいアプローチの礎となるはずである。

研究成果の概要(英文)：Most of death from cancer is caused by metastasis. Cancer-stroma interactions are supposed to play critical roles to establish metastasis. To identify and characterize stromal cells interacting with cancer cells in murine metastasis models, we developed a genetically encoded fluorescent labeling technology named sGRAPHIC. sGRAPHIC enables efficient fluorescent labeling of proximal stromal cells interacting with cancer cells in living tissues. sGRAPHIC-labeled stromal cells can be harvested by a fluorescent activated cell sorter. Single cell omics analysis would be powerful to characterize the isolated stromal cells by sGRAPHIC, elucidating cancer-stroma interactions in metastasis.

研究分野：光イメージング

キーワード：転移 細胞間相互作用 近接細胞蛍光標識技術 一細胞オミクス解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在の抗がん剤治療では、骨髄で冬眠状態にあるがん細胞を駆逐できない。骨転移の発症を未然に防止する効果的な治療を実現するためには、がん細胞の冬眠状態を制御する分子機構の解明が急務である[1,2]。骨髄におけるがん細胞の冬眠制御機構のモデルとして、造血幹細胞(HSC)ニッチ様の機構が支持されている[2]。この10年程の間に、HSCの機能維持に必要な冬眠・増殖状態の制御機構として、HSCを取り囲む細胞が形成するニッチの役割が盛んに研究されてきた。例えば、骨髄内の特定の血管壁細胞、骨芽細胞や神経細胞の機能を欠損すると、HSCの冬眠・増殖状態が変化することが報告されている[3-5]。しかし、これらをもってHSCニッチの実体が解明されたとは言い難い。その理由として、骨髄に播種されたがん細胞と同様に、骨髄内で非常に少数の細胞で構成されるHSCニッチの直接的な解析が困難であることが挙げられる。最新の研究では、従来のように条件付ノックアウトマウスによって、特定の要素(細胞や遺伝子発現)を骨髄から取り除いた時のHSCの機能評価に加えて、トランスジェニック(Tg)マウスにおいてHSCや特定の骨髄間質細胞を蛍光レポーター標識し、HSCの周辺に存在する細胞系統を考察している[6]。このようなHSCニッチの解析に適用されてきたアプローチは、骨髄に形成される冬眠がん細胞ニッチの解析にも応用可能であるが、1)条件付ノックアウトマウスによって取り除ける要素は既知である、2)Tgマウスで遺伝子的に標識可能な限られた細胞群についてしか情報が得られない、3)がん細胞が骨髄に転移した時期、その冬眠・増殖状態が定かでない、といった様々な制限によって、バイアスがかかった解析しか実施できず、ニッチの真の姿を捉えるには限界がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、超高感度蛍光イメージングによって、体外から骨髄に播種されたごく少数のがん細胞の冬眠・増殖状態を正確に追跡しながら、冬眠がん細胞が骨髄内で物理的に接触している間質細胞を蛍光標識するレポーターシステムを用いて、冬眠がん細胞ニッチを構成する間質細胞群を骨髄組織から単離する。単離した間質細胞は、一細胞解析に基づいたノンバイアス解析を適用する。そして、ニッチ構成細胞の分子的な解析に基づいて、骨髄の冬眠状態のがん細胞を駆逐する新たな治療戦略の開拓を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究の研究協力者である理化学研究所の宮脇敦史博士らが開発した近接細胞蛍光標識技術 GRAPHIC(GPI anchored reconstitution-activated proteins highlighting intercellular connections)を用いて[7]、冬眠がん細胞に接触する間質細胞を骨転移モデルマウスから単離する。GRAPHICは、分割型GFPのN末断片とC末断片をそれぞれがん細胞と間質細胞の細胞膜上に発現させ、これらの細胞が接触して、GFP断片が空間的に近接するとGFPが再構成し、蛍光性を獲得するシステムである。そのために、初めにGRAPHICのC末GFP断片(cGFP)レポーター遺伝子を発現するマウス乳がん細胞を樹立し、培養細胞を用いたGRAPHICによる組織間質細胞の蛍光標識特性について調査する。N末GFP断片(nGFP)を全身組織に発現するGRAPHIC Tgマウスの作出と並行して、アデノ随伴ウィルスベクターによってnGFP断片を臓器間質組織に導入後にcGFPを発現するがん細胞を同系移植する条件について検討する。そして、骨転移モデルマウスにおいて、冬眠がん細胞と相互作用する間質細胞をGRAPHICによって標識する。蛍光標識した間質細胞は、蛍光活性化細胞ソーティングを用いて回収し、1細胞トランスクリプトーム解析によって、その細胞種やがん細胞に近接することで特異的に発現制御される分子を探索する。

### 4. 研究成果

GRAPHICを用いてがん細胞と接触する間質細胞の蛍光標識条件について培養細胞を用いて検討したところ、GRAPHICはがん細胞が関与する細胞間接触の蛍光標識に応用できないことが明らかになった。過去にGRAPHICが応用されたことがある正常上皮細胞(LLC-PK1)同士の相互作用に比べて、HeLa細胞ではGFPの再構成に伴う蛍光シグナルはほ

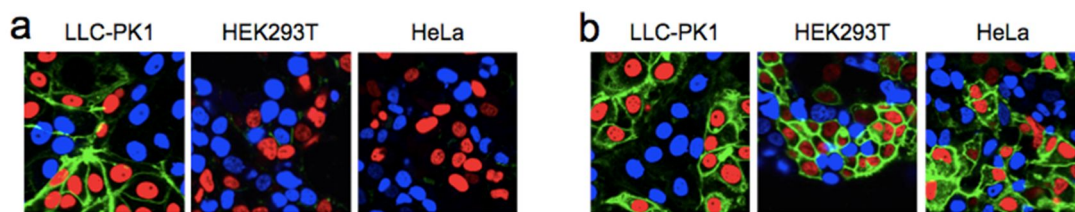


図1(a) GRAPHICによる近接細胞蛍光標識。(b) sGRAPHICによる近接細胞蛍光標識。nGFPを発現する細胞の細胞核がH2B-mCherryで、cGFPを発現する細胞の細胞核がH2B-Azuriteで標識されている。スケールバーは50  $\mu$ mを示している。

ば検出されず、一見密に増殖する HEK293T 細胞においても GFP シグナルはわずかしが観察されなかった(図 1a)。この理由として、HeLa や HEK293T に加え、多くのがん細胞は比較的ヘテロな細胞間接着様式を使って近接する細胞に接触していることが考えられた。LLC-PK1 のような正常上皮細胞は、密着結合を安定して結合するために、細胞膜上に提示された GFP 断片が効率よく介合できるようであった。そこで、細胞接着様式に影響されずに近接細胞を GFP 標識するために、がん細胞から cGFP 断片を分泌する secretory GRAPHIC (sGRAPHIC)を開発した。レンチウイルスベクターを用いて、分泌型 cGFP 断片(scGFP)を安定発現する HEK293T と HeLa 細胞を樹立したところ、LLC-PK1 と同様に nGFP 細胞膜上に強い GFP の蛍光シグナルを観察することができた(図 1b)。続いて、sGRAPHIC によってがん細胞-間質細胞相互作用の検出が可能か調べるために、マウス乳がん細胞 E0771/scGFP を樹立した。nGFP 断片を細胞膜上に発現するマウス間質細胞 (線維芽細胞 NIH3T3/nGFP、骨芽細胞 KUSA-A1/nGFP、血管内皮細胞 MS1/nGFP)と E0771/scGFP を同数混合して 24 時間共培養したところ、間質細胞特異的に GFP シグナルが観察された(図 2a)。共培養したディッシュから剥離回収した細胞をフローサイトメトリによって解析したところ、やはり間質細胞特異的な GFP 標識を確認できた(図 2b)。E0771/scGFP と NIH3T3/nGFP の共培養系において、GFP が再構成する様子をタイムラプス観察によって解析したところ、がん細胞に 4 時間程度近接した間質細胞に GFP の蛍光シグナルが検出された(図 3a)。また、NIH3T3/nGFP の 1/50 の細胞数で E0771/scGFP を混合した共培養系では、E0771 にごく近接する NIH3T3 にのみ GFP シグナルが検出された(図 3b)。これらの結果より、sGRAPHIC はがん細胞に近接する間質細胞を特異的かつ迅速に GFP 標識することが可能であることが示された。

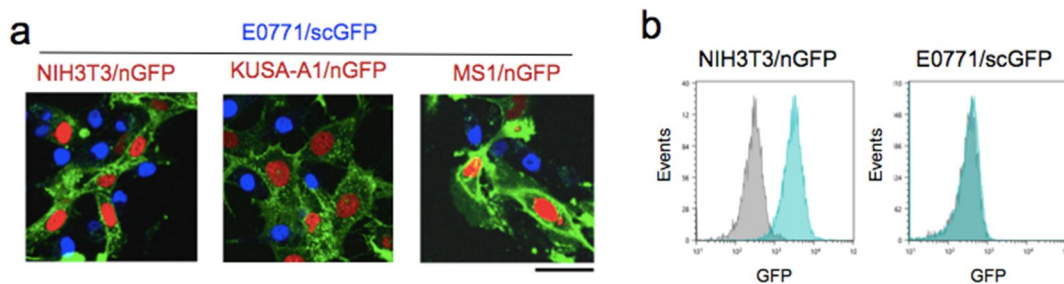


図 2 (a) sGRAPHIC による近接細胞蛍光標識。がん細胞、間質細胞のそれぞれの細胞核が H2B-Azurite と H2B-mCherry で標識されている。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示している。(b) 共培養した E0771 と NIH3T3 のフローサイトメトリ解析。

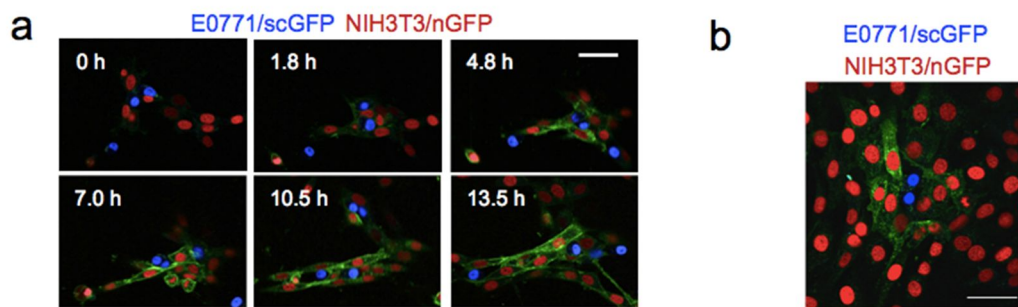


図 3 (a) E0771/scGFP と NIH3T3/nGFP の共培養のタイムラプス観察。(b) E0771/scGFP と NIH3T3/nGFP を 1:50 の細胞数比で共培養した様子。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示している。

次に、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いて、マウスの肝組織に nGFP-T2A-H2B-mCherry を導入し、肝転移したがん細胞と接触した肝組織細胞の GFP 標識が可能か検討した。AAV/nGFP-T2A-H2B-mCherry をマウスに全身投与して 2 週間後に、肝組織細胞の大多数に mCherry が発現していることを intravital microscopy によって確認した。マウスの脾臓組織より E0771/scGFP 細胞を移植し、1 週間後もしくは 3 週間後に肝組織を露出して intravital microscopy によって転移コロニーの辺縁部を観察したところ、GFP シグナル陽性の mCherry を発現する肝組織細胞を多数観察した(図 4)。これらの結果は、sGRAPHIC による近接細胞蛍光標識が、生体組織においても機能することを支持している。

現在、肝臓から単離した GFP 陽性間質細胞の 1 細胞トランスクリプトーム解析を実施し、肝転移病巣におけるがん細胞-間質細胞相互作用の分子機構に関する新たな知見を得ると共に、骨転移の冬眠がん細胞解析を目指して nGFP Tg マウスの作出を急ぎ進めている。

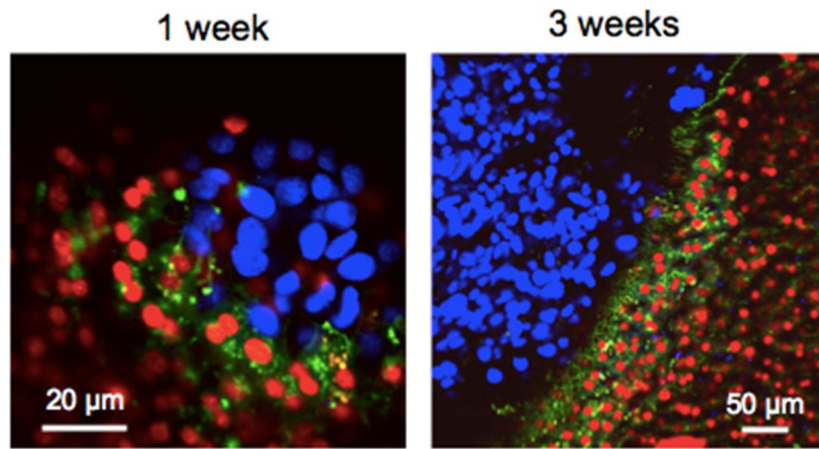


図 4 肝転移コロニー辺縁部の GFP 標識された肝組織細胞の intravital microscopy。

参考文献

- [1] Nat Rev Cancer 2014, 14, 611 [2] Nat Rev Cancer 2016, 16, 373 [3] Trend Immunol 2005, 26, 426 [4] Cell 2011, 147, 1146 [5] Nature 2014, 505, 327 [6] Nature 2015, 526, 126 [7] iScience 2019, 15, 28

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 峯岸美紗、近藤科江、口丸高弘
2. 発表標題 A novel technology for fluorescent labeling of cells involved in cellular interactions in living tissues
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 口丸高弘
2. 発表標題 がん細胞-間質細胞相互作用解析のための新規蛍光イメージング技術
3. 学会等名 第7回細胞凝集研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 口丸高弘、峯岸美紗、近藤科江
2. 発表標題 がん細胞-間質細胞相互作用解析のための近接細胞蛍光標識技術
3. 学会等名 第17回がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Misa Minegishi, Shinae Kondoh, Takahiro Kuchimaru
2. 発表標題 A novel technology for optically labeling stromal cells interacting with cancer cells in the metastatic microenvironment
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 口丸高弘
2. 発表標題 細胞間相互作用のシングルセル解析を指向した蛍光タンパク質技術
3. 学会等名 シングルセルゲノミクス研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 峯岸美紗、宮内ひとみ、近藤科江、口丸高弘
2. 発表標題 生体組織で転移ニッチ構成細胞を蛍光標識する新規技術の開発
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	宮脇 敦史  (Miyawaki Atsushi)		