

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02862

研究課題名（和文）生体組織における細胞間相互作用の次元拡張オミクス解析

研究課題名（英文）Time-resolved omics analysis of cell-cell interactions in living tissues

研究代表者

口丸 高弘（Kuchimaru, Takahiro）

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10570591

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：分割型GFPシステムを利用して、ある特定の細胞に近接する細胞をその場で蛍光標識する技術sGRAPHICに、蛍光タイマータンパク質を組み込むことで、細胞間相互作用の時間情報を蛍光タンパク質の発色の変化から推定するシステムの構築を試みた。赤色蛍光タイマータンパク質を用いた新規の分割型蛍光タンパク質の構築には成功したものの、その半減期の短さから、細胞間相互作用の時間情報を効果的に取得するにはさらなる改良が必要であった。また、並行してsGRAPHICシステムをがん転移モデルにおける細胞間相互作用解析に実装し、オミクス解析に基づいて、がん細胞と肝細胞の相互作用を媒介し得る分子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん転移は、がん患者における90%以上の死亡原因となっている。転移の成立には、がん細胞と組織構成細胞間の細胞間相互作用が重要な役割を果たしており、その分子機構を包括的かつ高解像度で理解できれば新しい治療手法の考案につながる。本研究では、転移過程における、がん細胞と組織構成細胞間の細胞間相互作用を解析するために、蛍光タンパク質標識とオミクス解析に基づいた新規技術の開発とその実装に取り組んだ。その一例として、マウスの肝転移モデルの解析を進め、肝転移における新たな治療標的候補分子を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We aimed to construct a system to estimate temporal information on cell-cell interactions from color changes in fluorescent timer proteins. To do so, we have incorporated a fluorescent timer protein into sGRAPHIC, a technology for in situ fluorescent labeling of cells neighboring on a particular cell using the split GFP system. Although we succeeded in constructing a novel split fluorescent protein system with a red fluorescent timer protein, further improvement was necessary to effectively obtain temporal information on cell-cell interactions due to its short half-life. In parallel, the sGRAPHIC system was implemented for cell-cell interaction analysis in a murine cancer metastasis model, and a molecule that could mediate the interaction between cancer cells and hepatocytes were identified based on omics analysis.

研究分野：光イメージング

キーワード：細胞間相互作用 オミクス解析 蛍光タンパク質 転移

1. 研究開始当初の背景

実験モデル動物を用いた生体組織における細胞間相互作用の解析は、長らく組織免疫染色に頼ってきた。例えば、転移の成否を決定する細胞間相互作用の解析では、がん細胞の近傍にいる組織間質細胞の種類・機能を明らかにするために、転移モデルマウスから摘出した臓器切片を免疫組織染色する。そして、間質細胞の細胞種を規定するマーカータンパク質や、相互作用に鍵となる分泌因子・リガンド-受容体の発現が調べられてきた。しかし、実用的な抗体が存在しない分子は検出できず、多重染色に限界があることから、細胞種マーカーや細胞間相互作用に関わるタンパク質の発現に関する仮説を包括的に探索することは不可能である。そこで、近年の技術革新が目覚ましい1細胞トランスクリプトーム技術を生体組織の細胞間相互作用の解析に適用する試みが進められている。従来、1細胞トランスクリプトーム解析のためには組織を破碎する必要があり、組織中の細胞の空間位置情報が失われることから細胞間相互作用の解析は困難であった。組織切片上でトランスクリプトームを実施する技術開発が進められているが、空間分解能やシーケンスの深度に関する問題から、細胞間相互作用の解析が十分に実現できない問題がある。申請者はこのような状況を鑑み、遺伝子コード型の分割型緑色蛍光タンパク質 (GFP) を設計原理とする細胞間相互作用検出ツール secretory glycosylphosphatidylinositol anchored reconstitution-activated proteins to highlight intercellular connections (sGRAPHIC)を開発した。sGRAPHIC は、分割した GFP 断片をコードする遺伝子を2種類の細胞にそれぞれ導入する。その時、C末端側断片(cGFP)を細胞外に分泌させ、N末端側断片(nGFP)を細胞膜上に提示することで、cGFPを発現する細胞に近接するnGFP発現細胞が選択的にGFP標識される。sGRAPHICを用いれば、がん細胞に近接し相互作用する間質細胞を高効率かつ選択的に蛍光標識が可能である。生体組織で蛍光標識された組織間質細胞は、破碎した臓器から蛍光活性化セルソーティングによって回収する。そして、回収した間質細胞の細胞種やその機能を1細胞オミクス解析によって明らかにすることができる。しかし、cGFPの分泌をTet-On/Offのようなシステムで制御しても、一時にがん細胞に近接した細胞が蛍光標識され、細胞間相互作用のスナップショットしか捉えられない。例えば、がん転移の初期過程においては、血中に流出したがん細胞の大半は十数時間のうちに毛細血管への補足、血管外浸潤、実組織への生着へと進行し、相互作用パートナーが変化する動的な相互作用を経る一方、一部のがん細胞は血管周辺細胞等と長期間静的に相互作用する。このような細胞間相互作用の時間動態を正確に捉えることができれば、疾患メカニズムの深い理解やその治療戦略の礎となると考えられる。

2. 研究の目的

蛍光タンパク質の蛍光団が形成されていく過程で発色が青から赤、もしくは緑から橙へと変化する蛍光タイマータンパク質を分割し sGRAPHIC に組み込むことで、相互作用の時間分解能を有する近接細胞標識技術 T-sGRAPHIC を開発する。そして、マウス生体内におけるがん細胞と間質細胞の相互作用を解析モデルとして、T-sGRAPHIC による細胞間相互作用の時間動態描出を参照することで、時間軸に解析次元を拡張した細胞間相互作用の1細胞オミクス解析を提案する。そのために、最適な蛍光タイマータンパク質の選択とその分割様式の最適化に取り組みると同時に、sGRAPHIC をマウス転移モデルの解析に実装し、T-sGRAPHIC の生体応用の足がかりとする。

3. 研究の方法

sGRAPHIC は、GFP を7番目と8番目の beta sheet の間で分割した N末端側断片 (nGFP) と C末端側(cGFP)を膜輸送ペプチドと GFP 断片の会合を促す leucine zipper domain (LZD) によって挟み込む構造になっている。この GFP 断片を蛍光タイマー蛍光タンパク質断片に置換する。主に分割型 mCherry を鋳型にして十分な再構成効率が得られるタイマー蛍光タンパク質を探索する。構築したタイマー蛍光タンパク質の再構成システムは、マウスがん細胞に遺伝子導入し、培養細胞での特性評価を経て、がん転移モデルマウスに実装する。また、これと並行して、sGRAPHIC をマウス転移モデル解析へと実装する。具体的には、膜提示型 nGFP レポーター遺伝子を、アデノ随伴ウイルスを使ってマウスの間組織に安定導入する。nGFP 発現マウスに、sGRAPHIC の分泌型 cGFP レポーターを安定導入したマウスがん細胞を経静脈移植し、肝転移を形成させる。転移が形成された肝臓を摘出・破碎し、GFP 陽性細胞を回収後に、それらを single cell RNA-seq (scRNA-seq) することで肝転移病巣におけるがん細胞と組織構成細胞間の相互作用を明らかにする。

4. 研究成果

mCherry をベースにした蛍光タイマー変異を、高輝度赤色タンパク質である mScarlet に導入して、その蛍光タイマー特性を flow cytometry で解析したところ、複数の波長域に広がる蛍光タイマースペクトルを得ることができた。さらに、mScarlet の分割様式を最適化して、断片を分泌型と膜提示型としてそれぞれ細胞に発現させ、共培養したところ、細胞膜上で mScarlet の再構築を顕微鏡観察下で確認できた(図 1a)。しかし、細胞膜上に mScarlet 蛍光タイマータンパク質を再構成したところ、細胞内に発現させたものとは異なった蛍光スペクトラムの広がりを示していた。その理由として、細胞膜上に再構成された蛍光タンパク質の半減期(< 4 hours)が(図 1b)、細胞内の半減期(>24 hours)に比較して非常に短いことが考えられた。そのため、細胞膜上に再構成された蛍光タイマータンパク質のタイマー特性を最大限に活かすためには、細胞膜上での半減期を長くする必要が明らかになった。

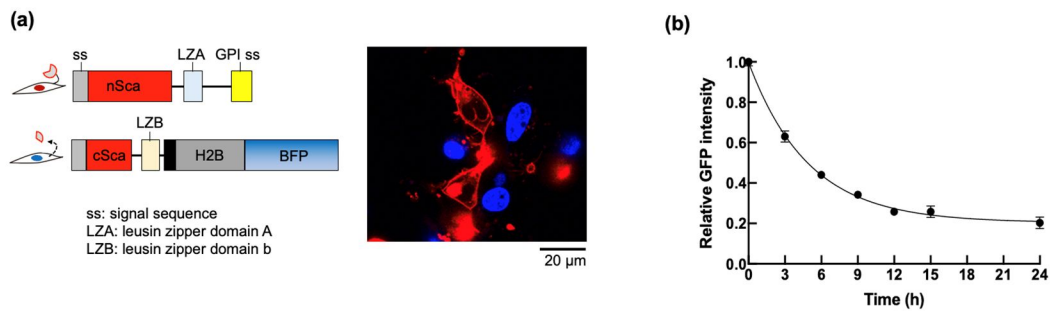


図 1(a) 分割型 mScarlet (nSca/cSca)を用いた sGRAPHIC レポーターシステムの概略図と共培養系におけるその蛍光観察。(b)細胞膜上の再構築 GFP 量の経時変化。

並行して、sGRAPHIC のマウス肝転移モデルへの実装を進めた。肝臓に高い遺伝子導入効率を保つアデノ随伴ウイルスの血清型 8(AAV8)に、nGFP を細胞膜に提示すると同時に、細胞核を mCherry で標識するレポーター遺伝子を搭載した(AAV8-nGR)。AAV8-nGR を尾静脈から投与したマウスから、肝臓を摘出してその組織切片を蛍光観察したところ、組織を構成する多数の細胞の核が mCherry 標識されていることが明らかになった(図 2a)。また、同マウスの肝臓をコラゲナーゼ灌流によって破碎して得た細胞群を scRNA-seq 解析したところ mCherry 発現細胞は肝細胞であることが明らかになった(図 2b)。AAV8-nGR マウスに、分泌型 GFP 断片を恒常発現するがん細胞株 E0771/scGR を脾臓から移植して、肝転移を形成させた後、肝組織を破碎して回収した GFP 陽性ヘパトサイトと GFP 陰性ヘパトサイトの遺伝子プロファイルを解析したところ、GFP 陽性ヘパトサイトで発現が大きく変動している遺伝子として *Lgals3* を同定した(図 3a)。*Lgals3* がコードするタンパク質 galectin-3 の発現を免疫組織染色で確認したところ、転移病巣と肝組織の境界部に特異的に galectin-3 の発現が確認された(図 3b)。転移境界領域で、がん細胞とヘパトサイトは galectin-3 を介して相互作用している可能性が示唆された。

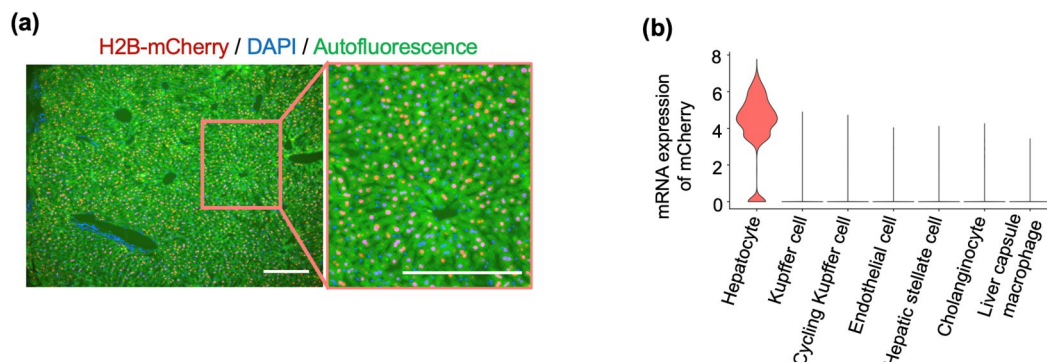


図 2(a) AAV8-nGR マウスの肝組織切片の蛍光観察。スケールバーは 200 μm を示す。(b) scRNA-seq による AAV8-nGR マウスの肝組織構成細胞における mCherry の発現解析。

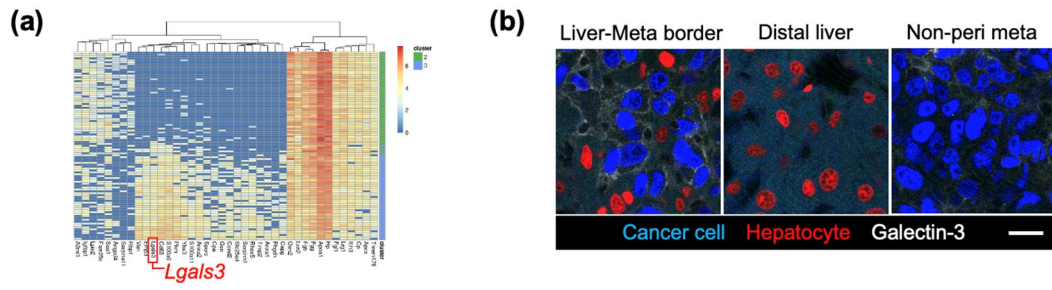


図 3(a) scRNA-seq による GFP 陽性/陰性細胞の遺伝子発現解析。(b) 免疫蛍光組織染色による Galectin-3 の発現解析。スケールバーは 50 μm を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 峯岸美紗, 門之園哲也, 近藤科江, 口丸高弘	4. 巻 15
2. 論文標題 細胞間相互作用可視化光技術を使ったがん転移形成過程の1細胞オミクス解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JSMI Report	6. 最初と最後の頁 17-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 口丸高弘
2. 発表標題 生体組織における細胞間相互作用の光記録技術による疾患メカニズムの1細胞オミクス解析
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第15回年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 峯岸美紗, 門之園哲哉, 近藤科江, 口丸高弘
2. 発表標題 細胞間相互作用可視化光技術を使ったがん転移形成過程の1細胞オミクス解析
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会 学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 口丸高弘
2. 発表標題 近接細胞蛍光標識技術を用いた生体組織におけるがん-間質細胞相互作用の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第141回年会 (招待講演)
4. 発表年 2021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 分担者	岩野 智 (Iwano Satoshi) (10734832)	国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・ 客員研究員 (82401)	
研究 分担者	近藤 科江 (Kondoh Shinae) (40314182)	東京工業大学・生命理工学院・教授 (12608)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------