

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16212

研究課題名(和文) がんの三次元病理解析基盤の確立

研究課題名(英文) Whole-body/organ pathology of cancer microenvironment

研究代表者

久保田 晋平 (Kubota, Shimpei)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・特任講師

研究者番号：90808859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてはがん病態を分子から個体レベルまで統合して理解するためにマウス全身に局在するがん細胞の可視化技術の開発に取り組み、個体レベルでの網羅的1細胞解析の基盤技術を構築した。その結果、様々な臓器への転移を個体・臓器レベルで3次元観察することが可能となり、がんの転移に關与するサイトカインであるTGF-betaが、がん微小環境を変えることでがんの転移を促進するという、がん微小環境の新たなモデリング機構を見出しました (Kubota et al., Commun. Biol., 2021)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では、これまでに樹立した簡便な組織透明化手法の開発に、機械学習による画像解析を組み合わせることで、がん微小環境内における細胞間相互作用の解析基盤を構築しました。本解析手法を用いることでTGF-beta刺激を受けたがん細胞が、TGF-beta刺激を受けていないがん細胞にも影響を与えてがん細胞の転移巣形成を促進するという、TGF-betaの新たな作用を明らかにしました。これらの発見は、がん微小環境における細胞間相互作用によるがん転移促進機構と、そのメカニズムを担う分子のがん治療標的としての可能性について有益な示唆をもたらしました。

研究成果の概要(英文)：Tissue clearing is one of the most powerful strategies for a comprehensive analysis of disease progression. In this project, we established an integrated pipeline that combines tissue clearing, 3D imaging, and machine learning and applied to a mouse tumour model of experimental lung metastasis using human lung adenocarcinoma A549 cells. This pipeline provided the spatial information of the tumour microenvironment. We further explored the role of transforming growth factor- (TGF-) in cancer metastasis. TGF- -stimulated cancer cells enhanced metastatic colonization of unstimulated-cancer cells in vivo when both cells were mixed. Further, whole-organ analysis revealed accumulation of platelets or macrophages with TGF- -stimulated cancer cells, suggesting that TGF- might promote remodelling of the tumour microenvironment, enhancing the colonization of cancer cells.

研究分野：システム生物学

キーワード：全身全細胞解析 システム生物学 がん微小環境 組織透明化

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

がんの発生、進行、転移は遺伝子変異を生じたがん細胞が単独で引き起こしているわけではなく、がん細胞を取り巻く多種類の細胞間相互作用を必要とする。研究者らはがん微小環境における細胞間相互作用について理解を深めてきたが、がん微小環境を構成する細胞の組成および相互作用が、時空間的に、治療に応じてどのように変化するのかについては使用可能な研究手法が制限されているために依然として未解明である。近年の網羅的オミクス技術の開発により、細胞内の遺伝子ネットワーク、タンパク質ネットワークを対象とする基盤技術は揃いつつあるが、がんを始めとした多細胞システムを理解する上では細胞ネットワークを対象とする基盤技術が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、“がんの三次元病理解析基盤の構築”である。これまで研究者らは患者由来病理組織、担がんモデルマウスなどから癌の発生、進行および転移に関する知見を得てきたが、技術的な限界のためがんが持つ高度な時空間的多様性に関しては限られた知識しか得られていない。がんのように多種類の細胞群によって構築される多細胞システムの理解は分離された細胞を対象とする解析手法だけでは不十分であり、個体内の細胞の位置情報を保持した状態で細胞の機能情報を包括的に解析する手法が必要とされてきた。申請者は多細胞システムの可視化技術として組織透明化技術およびライトシート蛍光顕微鏡に着目し研究を推進している。申請者はアミノアルコールが血液の脱色作用を持つことを見出し、色素を多く含む全身・臓器の透明化および幼若マウスの全身一細胞解像度でのイメージングに成功した(Tainaka*, Kubota* *et al.*, *Cell*, 2014)。さらに生体の持つ屈折率の観点から透明化試薬を最適化することによって全身に播種する一つ一つのがん転移巣を一細胞解像度で検出・解析することに成功した(Kubota*, Takahashi* *et al.*, *Cell Reports*, 2017)。本研究では申請者が開発を進めている組織透明化手法によって取得が可能となる大容量三次元画像を解析するための手法を構築することで既存の手法では困難であったがん細胞とがん微小環境の時空間的に多様な相互作用に関して定量的に評価する。本研究は、一細胞解像度で全身・全臓器を観察するために必要である組織透明化手法および解析手法を開発してきた申請者ががんの病理学的解析に取り組むことで、初めて可能になる新しい研究である。

* Co-first author

3. 研究の方法

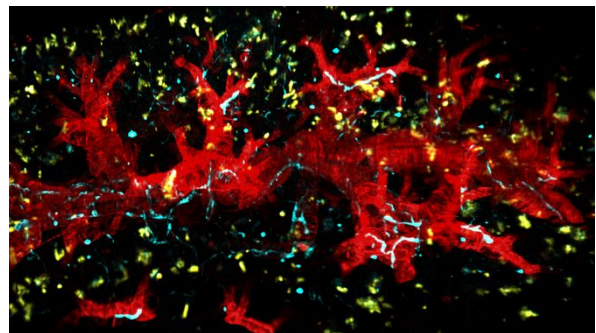
本研究計画では、以下の2つのサブテーマを設定した。サブテーマ1は透明化手法の検討・画像解析の融合による全身全細胞解析手法の確立であり、サブテーマ2はサブテーマ1で確立した全身全細胞解析手法を担がんモデルマウスに対して展開することによる時空間的な多様性を保持するがんの三次元病理解析基盤の確立である。本研究で確立する網羅的な1細胞解像度での解析技術は多細胞生物を織り成す細胞間相互作用を理解するための基盤となり、がん研究のみならず、医学・生物学分野に対して広く波及効果を持つと期待される。

4 . 研究成果

本研究においてはがん病態を分子から個体レベルまで統合して理解するためにマウス全身に局在するがん細胞の可視化技術の開発に取り組み、個体レベルでの網羅的1細胞解析の基盤技術を構築した。その結果、様々な臓器への転移および蛍光標識した抗体治療薬などを個体・臓器レベルで3次元観察することが可能となった。また本研究により TGF-beta 刺激を受けたがん細胞が、TGF-beta 刺激を受けていないがん細胞にも影響を与えてがん細胞の転移巣形成を促進するという、TGF-beta の新たな作用を明らかにした。またこの作用は、マクロファージなどから構成されるがん微小環境のリモデリングによって媒介されることが示唆された ([Kubota et al., Commun. Biol., 2021](#))。これらの発見は、がん微小環境における細胞間相互作用によるがん転移促進機構と、そのメカニズムを担う分子のがん治療標的としての可能性について有益な示唆となる。

組織透明化手法を用いたがん微小環境の可視化

蛍光タンパク質（黄色：mCherry）を発現している肺がん細胞をマウス尾静脈移植することによって肺転移を誘導した。摘出したマウスの肺を透明化し、平滑筋アクチンが染まる蛍光色素標識抗体（赤色：FITC）、血管内皮細胞増殖因子受容体3が染まる蛍光色素標識抗体（青色：Alexa 546）で染色し、がん細胞と脈管を観察した。本解析基盤では、がん微小環境の構成要素である脈管とがん細胞の空間的な関係性を可視化し、定量的に解析することが可能である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kubota Shimpei I., Takahashi Kei, Mano Tomoyuki, Matsumoto Katsuhiko, Katsumata Takahiro, Shi Shoi, Tainaka Kazuki, Ueda Hiroki R., Ehata Shogo, Miyazono Kohei	4. 巻 4
2. 論文標題 Whole-organ analysis of TGF- β -mediated remodelling of the tumour microenvironment by tissue clearing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01786-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kei Takahashi, Ryo Tanabe, Shogo Ehata, Shimpei I Kubota, Yasuyuki Morishita, Hiroki R Ueda, Kohei Miyazono	4. 巻 112(9)
2. 論文標題 Visualization of the cancer cell cycle by tissue-clearing technology using the Fucci reporter system.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer science	6. 最初と最後の頁 3796-3809
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yusaku Momoi, Jun Nishida, Kosuke Miyakuni, Masafumi Kuroda, Shimpei I Kubota, Kohei Miyazono, Shogo Ehata	4. 巻 112(8)
2. 論文標題 Heterogenous expression of endoglin marks advanced renal cancer with distinct tumor microenvironment fitness.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer science	6. 最初と最後の頁 3136-3149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kubota Shimpei I., Takahashi Kei, Mano Tomoyuki, Matsumoto Katsuhiko, Katsumata Takahiro, Shi Shoi, Tainaka Kazuki, Ueda Hiroki R., Ehata Shogo, Miyazono Kohei
2. 発表標題 Whole-organ quantitative analysis of the tumor microenvironment by tissue clearing
3. 学会等名 第93回日本薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kubota Shimpei I., Takahashi Kei, Nishida Jun, Ehata Shogo, Miyazono Kohei
2. 発表標題 Whole-organ quantitative analysis of cancer metastasis with single cell resolution
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 久保田晋平 他多数	4. 発行年 2020年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 200
3. 書名 シングルセル解析でなにがわかるか	

〔産業財産権〕

〔その他〕

TGF-betaを介したがん微小環境リモデリング機構の発見 https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/articles/z0508_00103.html
--

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

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
---------	---------