

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：84409

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15510

研究課題名（和文）膵癌におけるERKシグナルの揺らぎの観察と制御

研究課題名（英文）Observation and regulation of fluctuating ERK signal in pancreatic cancer

研究代表者

平塚 徹 (Hiratsuka, Toru)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター（研究所）・その他部局等・腫瘍増殖制御学部 主任  
研究員

研究者番号：30893028

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、細胞内シグナルであるEGFR-ERK経路に注目し、その時間的ダイナミクスが癌に与える影響を検討した。10種類の患者由来膵がんオルガノイドにて、包括的なライブイメージングと自動画像解析による細胞およびオルガノイド認識を行い、がん細胞シグナルの不均一性を定量的に評価した。また、EGFR-ERKシグナル経路の阻害薬の効果の不均一性を同様に評価したほか、マウスにおける同所性担がんモデルの生体ライブイメージングを確立した。本研究により、細胞内シグナルの活性化タイミングと薬剤効果の関係が明らかとなり、将来の新規薬剤の開発や評価、さらには個別化医療の実現に寄与できるものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、既存のオルガノイドを用いたがん研究のボトルネックとなっていた、（1）患者ごと、オルガノイドごとの不均一性の評価方法、（2）その時間による変化、（3）生体内環境がそれに与える影響、にアプローチしたものであり、学術的および臨床的意義の大きい研究であると言える。本手法は、他のがんや再生医学分野においても応用可能なアプローチであり、今後の波及効果が見込まれる。また、本研究にて得られた患者ごとのがん不均一性の定量的なデータは、将来の新規薬剤の開発や評価、さらには個別化医療の実現に寄与する実践的なものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study focused on the temporal dynamics of EGFR-ERK signaling pathway in pancreatic cancer development. 10 patient-derived pancreatic cancer organoid lines were comprehensively analyzed by wide-area observation and automated image analysis. This revealed the heterogeneous signal dynamics in individual organoid lines. We evaluated the heterogeneous effects of drugs targeting EGFR-ERK signaling pathway in vitro. In addition, we established an intravital imaging model of orthotopically transplanted human pancreatic cancer cells in mice. This study reveals the temporal dynamics of intracellular signal, tumor growth and drug efficacy. This will pave the way for the development of new drugs and their evaluation for the future achievement of personalized medicine.

研究分野：細胞内シグナル

キーワード：ERK 膵がん 揺らぎ ライブイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

がんは現代医学の喫緊の課題であるが、中でも膵がんの予後が悪く、10年生存率は5%に満たない。その治療のため、細胞内シグナルであるEGFR-ERK経路を標的とする抗がん剤が多く開発されているが、なお十分な治療効果が得られているとは言い難い。その背景として、がん細胞が単一の性質を保った均質な集団ではないこと(がんの不均一性)が盛んに議論されている。がんのシグナルは細胞ごとに異なり、さらに刻一刻と変化する。そのような複雑さを持つがんに対し、現在の抗癌剤投与プログラムが対応できていないのが現状である。そこで、本研究では、(ア)細胞内シグナルの時間ダイナミクスががん細胞にどのような影響を及ぼすのか、(イ)その時空間的ダイナミクスを、いかに生体での化学療法プログラムに反映させれば良いのか、を最先端のライブイメージング技術を用いて検討した。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヒト膵がん細胞のERKシグナルダイナミクスをシングルセルレベルで明らかとし、がんが耐性を獲得するメカニズムを明らかにするとともに、個別化医療の実現に向けた抗がん剤の新しい治療プログラムを提示することを目的とし、行われたものである。細胞内シグナルであるEGFR-ERK経路に注目し、その時間的ダイナミクスががんに与える影響を明らかにし、そのダイナミクスを考慮した新規抗がん剤投与プログラムを創出することを目指した。特に、申請者が過去に明らかにしたERK活性が持つ時空間的なダイナミクス(参考文献①)に注目し、腫瘍の増殖過程において、いつ、どこでERK活性が重要な意味を持つのかを検討した。

## 3. 研究の方法

ERKシグナル活性をモニターするための手法として、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の原理を利用したバイオセンサーを用いた(図1)。10種類の膵がん患者由来オルガノイドに、ERKの活性をモニターするFRET蛍光プローブを発見させ、その時空間的な変化を観察した。さらに、当初の研究計画には含まれていなかったが、細胞の代謝状態をモニターするAMP-activated kinase (AMPK)の活性にも注目し、その活性をモニターするFRET蛍光プローブを使用し、同様の観察を行った。

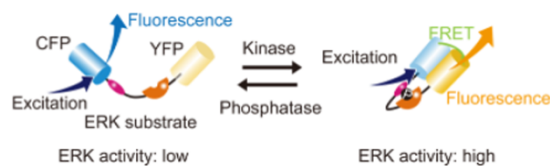


図1: ERK活性をモニターするFRET蛍光プローブ

また、同時に生体マウスにおけるERK活性をシングルセルレベルで検出するシステムとして、イメージングウィンドウと呼ばれる器具をマウス膵臓に取り付けることにより、膵臓に担がんしたヒトがん細胞を時系列的に観察する系を確立し、4種類のヒト膵がんの生体内での挙動を観察した。

さらに、これらの培養およびマウス生体内における腫瘍細胞の画像解析を行うため、自動画像認識のプログラムやクラスター解析を行うプログラムを作出し、シングルセル、シングルオルガノイドの解析を患者サンプルごとに行った。

## 4. 研究成果

### (1) 培養オルガノイドにおけるERK活性のライブイメージング

ERK活性をモニターするFRET蛍光プローブを用いたライブイメージングを行うことにより、オルガノイドのERKシグナル活性は個々のオルガノイドで大きく異なっていることが明らかになった。このような腫瘍細胞の不均一性を正しく評価するためには、目視によって選択されたオルガノイドのみを観察する選択的な手法ではなく、非選択かつ網羅的なイメージング手法が必要であると考えられた。そこで、観察可能な領域に存在する全てのオルガノイドを観察し、得られたビッグデータを自動で解析する画像解析プログラムを樹立した。これにより、どのサイズのオルガノイドがいくつ存在するのか、それぞれのオルガノイドのERKシグナルはどうなっているのかをヒストグラムとして得ることに成功した。さらに、その統計的データをもとに、数理的なモデリングを用いた解析を行った。その結果、オルガノイドの成長はあるステージを境として加速される可能性が示唆された。また、オルガノイドのサイズとERK活性の相関を解析した結果、ERKの活性は比較的初期のオルガノイド増殖に必要であり、一定レベルの増殖の後にはERK活性非依存的にオルガノイドが増殖する可能性が示唆された。以上の手法によって、ERK活性の患者ご

との空間マップを取得した（図2）。

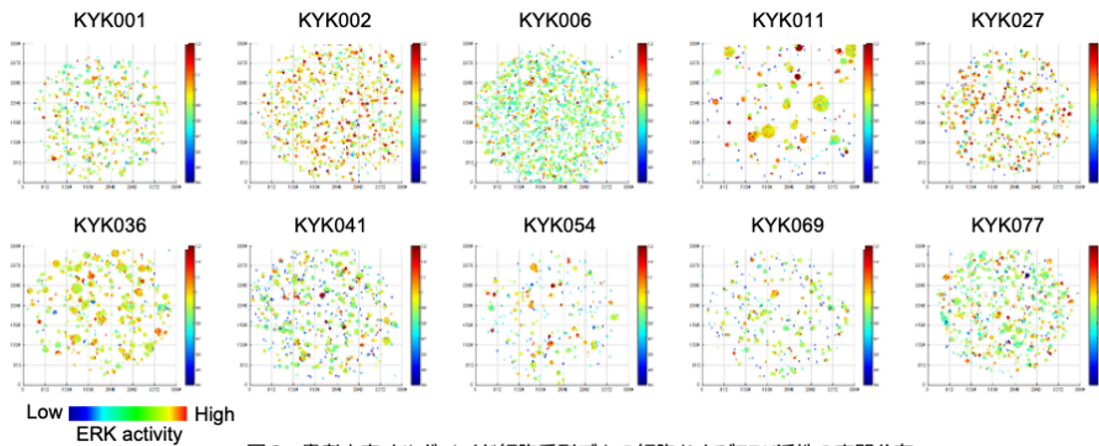


図2：患者由来オルガノイド細胞系列ごとの細胞およびERK活性の空間分布

### (2) 培養オルガノイドにおける AMPK 活性のライブイメージング

同等のアプローチを AMPK 活性をモニターする FRET 蛍光プローブを用いて行った。観察可能な全てのオルガノイドを観察し、これを画像解析したが、ERK と同等の画像解析プログラムでは、細胞の分画化が困難であったため、機械学習に基づく画像認識プラグインである Cellpose (参考文献②) を用い、網羅的解析を行った。ERK 活性の観察と同様、オルガノイドの成長が途中から加速される傾向が認められた。一方で、AMPK 活性との相関と調べたところ、ERK 活性とは対照的に、オルガノイドの増殖初期では活性が低く、後期において活性が高くなるという結果が得られた。これは、ERK と AMPK の2つのキナーゼが増殖のタイミングごとに協調的に働いていることを示唆するものである。ERK 活性と同様、AMPK についても空間分布を得た（図3）。

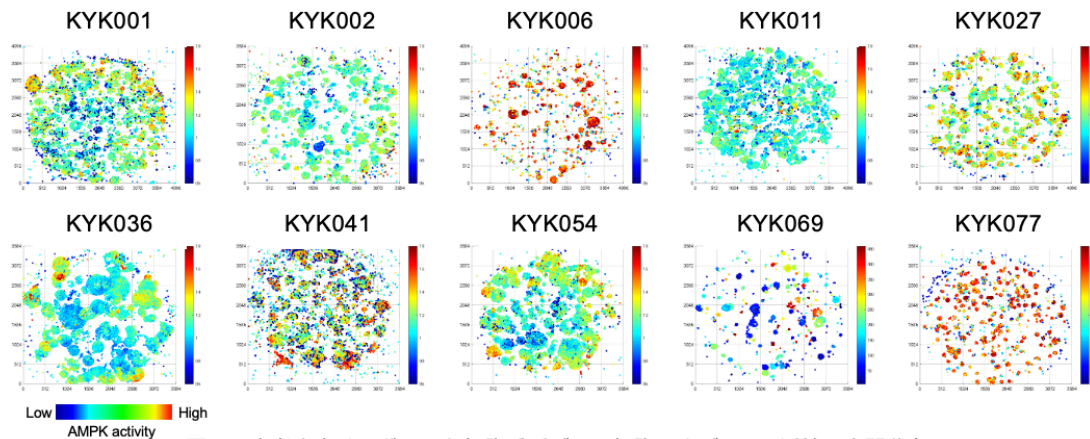


図3：患者由来オルガノイド細胞系列ごとの細胞およびAMPK活性の空間分布

### (3) 抗がん剤添加による膵がんオルガノイドの包括的な増殖制御

増殖シグナル経路である ERK 活性と、オートファジーを制御する AMPK 活性に注目し、それぞれの経路を阻害することによる細胞増殖阻害効果を検討した。ERK 活性を特異的に阻害する薬剤として、MEK 阻害剤 (PD0325901) を使用し、オートファジーを抑制する薬剤としてヒドロキシクロロキンを用いた検討を行った。また、上記の包括的な画像取得および解析アプローチを用いることにより、個々の細胞およびオルガノイドにおけるシグナル抑制効果および細胞増殖抑制効果を検討した。その結果、同じ膵がんであっても阻害剤の効果には大きな違いがあることが明らかとなった。たとえば、あるオルガノイド細胞群においては、80%以上のオルガノイドの増殖がヒドロキシクロロキンによって抑制されたものの、生存したオルガノイドにおける増殖は抑制されず、正常オルガノイドと同等の増殖能が認められた。さらに、本研究における単一細胞および単一オルガノイドレベルの解析プ

#### MEK阻害剤 (PD0325901) 200 nM

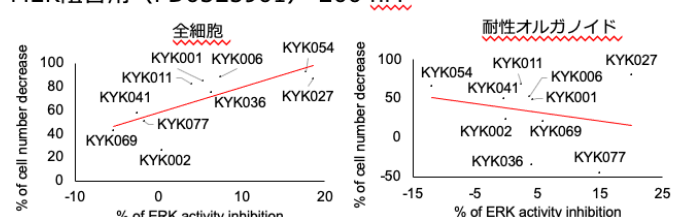


図4：ERK活性阻害と細胞増殖抑制の相関



ラットフォームを活かし、阻害剤処理した細胞群の全体の解析（全細胞）と阻害剤存在下であっても増殖したオルガノイド（耐性オルガノイド）の両面でERK活性との相関を検討した。その結果、全細胞においてはERK活性阻害による細胞増殖抑制との相関が認められたが、耐性オルガノイドにおいてはそれが認められず、耐性を持つオルガノイドが他の細胞群と独立した増殖パターンを示すことが明らかになった（図4）。

さらに、同様の解析をオートファジー阻害剤およびAMPK活性について行ったところ、AMPK活性と細胞増殖抑制の間には相関関係が認められず、全ての患者由来オルガノイドにて同等の細胞増殖制御効果が認められた（図5）。これらの結果により、ERK活性とMAPK活性は、異なる分子メカニズムにより細胞増殖を抑制することが示唆された。

オートファジー阻害剤 (HCQ) 50  $\mu$ M

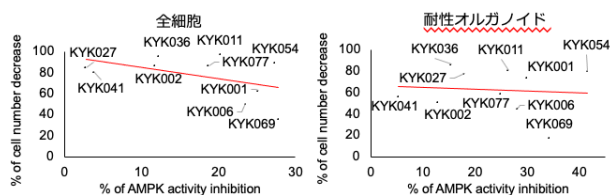


図5：AMPK活性阻害と細胞増殖抑制の相関

#### (4) 生体マウスにおけるERK活性のライブイメージング

生体でのヒト膵がん細胞の動態を観察するために、イメージングウィンドウの設計を行い、長期的に安定して観察ができるものを最適化した（図6）。このイメージングウィンドウを用いることにより、週に3回程度、全体で4週間にわたる長期の観察が可能となった。これにより、腫瘍が時間と共に増殖し、ERK活性を変化させる様子が生体かつシングルセルのレベルで可視化された。さらに、ERK活性の変化の背景にある生体微小環境（生体コラーゲン組織、血管）をSecond Harmonic Generationと呼ばれる蛍光特性および色素によって可視化し、ERK活性と同時に観察することに成功した（図6）。ERK活性と腫瘍微小環境との相関を解析したところ、一部の患者由来膵がん細胞においてコラーゲン増生や腫瘍血管新生とERK活性との正の相関が認められたものの、全ての腫瘍や観察タイミングにおける一貫性は認められず、腫瘍微小環境と腫瘍細胞との相互作用が腫瘍細胞の遺伝学的背景や時間によってダイナミックに変化することが示唆された。

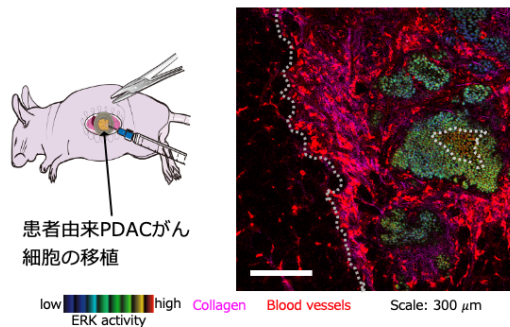


図6：生体内微小環境におけるERK活性の空間分布

#### (5) 生体マウスにおける抗がん剤のシングルセルレベル評価

以上の生体内ライブイメージングシステムを用い、ERK活性を阻害するPD0325901の効果はシングルセルレベルで評価した。過去の研究においては、全体としてのERK活性の阻害が主に評価されていたが、この実験により、実際にどの細胞にどの程度の阻害効果が得られるのかが定量的に明らかとなった。一例として、ある腫瘍において、阻害剤の効果がある細胞は83%であったのに対し、残りの19%の細胞においては阻害剤の効果が認められない、もしくはERK活性の上昇が認められた。このようなERK活性阻害が認められない細胞群は空間的に一様に分布しており、特定の場所における局在化は認められなかった（図7）。

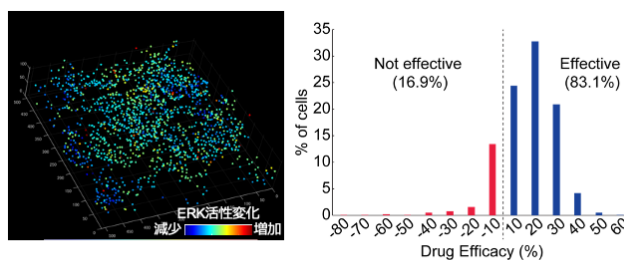


図7：生体でのERK活性の阻害剤による抑制効果

#### (6) まとめと今後の課題

本研究において、ヒト膵がんのERKおよびAMPKシグナルがシングルセル、シングルオルガノイドのレベルで非常に多様であることが明らかになったほか、空間的な位置や時間によって、がん細胞が依存するシグナル経路が異なることが示唆された。また、生体におけるERK活性のシグナルはさらに不均一性に富み、単一の阻害剤による全ての細胞群の排除は困難であることが示唆された。本研究の遂行にあたっては、ライブイメージング技術およびAIなどを用いた画像解析技術の貢献が大きく、今後の研究の進展においても重要な役割を果たすものと考えられる。本研究では、より詳細な時間変化の検出や、他の細胞内シグナルの関与、他の薬剤に対する応答性など、課題も多く存在するが、今後、イメージング以外の技術との融合や、よりよい蛍光プロ

ブの開発によって、ヒトがん組織に限りなく近い実験モデルにおけるシグナルダイナミクスの解明が可能になるものと考えられる。

#### 参考文献

- ① Hiratsuka et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2020;117(30):17796-17807.
- ② Stringer et al. Nat Methods 2021;18, 100-106.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shoko Tsukamoto, Akihito Machinaga, Nobuyuki Kakiuchi, Seishi Ogawa, Hiroshi Seno, Shigeki Higashiyama, Michiyuki Matsuda, Toru Hiratsuka
2. 発表標題 The Quantitative Landscape of ERK MAPK Signal Dynamics in Patient-Derived Pancreatic Cancer Organoids
3. 学会等名 The 7th JCA AACR Special Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shoko Tsukamoto, Akihito Machinaga, Nobuyuki Kakiuchi, Seishi Ogawa, Hiroshi Seno, Shigeki Higashiyama, Michiyuki Matsuda, Toru Hiratsuka
2. 発表標題 The quantitative landscape of ERK MAPK signal dynamics in patient-derived pancreatic cancer organoids.
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toru Hiratsuka, Ignacio Bordeau, Gunnar Preussner, Fiona Watt
2. 発表標題 Fluctuating ERK signal during epidermal stem cell proliferation and differentiation
3. 学会等名 第74回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平塚 徹, Ignacio Bordeau, Gunnar Preussner, Fiona Watt
2. 発表標題 Spatiotemporal dynamics of ERK activity in human and mouse epidermal cells
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塚本祥子、待永明仁、垣内伸之、小川誠司、妹尾浩、東山繁樹、松田道行、平塚徹
2. 発表標題 膵癌オルガノイドにおけるERK MAPKシグナルの不均一性のライブイメージング
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Houssam K Alkoussa、待永明仁、垣内伸之、小川誠司、妹尾浩、東山繁樹、松田道行、平塚徹
2. 発表標題 In vivo ERK MAPK signaling dynamics in the orthotopic xenograft model of human patient-derived pancreatic cancer cells
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平塚徹、塚本祥子、Houssam Al Koussa、待永明仁、垣内伸之、小川誠司、妹尾浩、東山繁樹、松田道行
2. 発表標題 膵癌オルガノイドにおけるERK MAPKシグナルの不均一性のクローン進化過程
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 塚本祥子、待永明仁、垣内伸之、小川誠司、妹尾浩、東山繁樹、松田道行、平塚徹
2. 発表標題 患者由来の膵がんオルガノイドにおける定量的かつ包括的なERK MAPKシグナルダイナミクス解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平塚徹
2. 発表標題 ヒト膵がんオルガノイドにおける包括的ライブイメージングアプローチ
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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