

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650154

研究課題名（和文） 薬剤耐性解明のための細胞の不均一性のモデルの構築

研究課題名（英文） Modeling of cellular heterogeneity of drug resistance

研究代表者

岡田 眞里子 (OKADA MARIKO)

独立行政法人理化学研究所・細胞システムモデル化研究チーム・チームリーダー

研究者番号：10342833

研究成果の概要（和文）：

本研究では、乳癌細胞における薬剤耐性機構を明らかにするため、単一細胞レベルでの分子ネットワークを実験と理論解析を通じて明らかにすることを目的とした。文献情報や細胞実験をもとに、エストロゲン受容体ネットワークに関わる 35 種の分子種を選定し、細胞平均および単一細胞での測定を行った。その結果、薬剤耐性細胞で EGFR、ErbB2、ErbB3 膜受容体、エストロゲン受容体、GSK3 beta、E2F1、CREB、Fos、Jun、JunB のリン酸化またはタンパク量の変化が見られた。単一細胞で計測すると、ErbB3、ERK、Akt の活性化に細胞間の不均一性が見られた。この結果をもとに Akt を中心としたシグナル伝達系のモデルを構築し、ネットワークのシステムの性質を調べている。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we try to investigate heterogeneous cellular response in tamoxifen-treated breast cancer cell using experimental measurement and mathematical modeling. First, we measured phosphorylation or/and protein level of 35 mediators in signaling network related to estrogen receptor. We identified dysregulated activities in EGFR, ErbB2, ErbB3 receptor, estrogen receptor, GSK3beta, E2F1, CREB, Fos, Jun, JunB in averaged cell population. Furthermore, ErbB3, ERK and Akt showed cell-to-cell variation in their activities. We constructed mathematical model of this signaling network and investigate system properties of the network that may induce heterogeneous response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：細胞不均一性、シグナル伝達、乳がん、エストロゲン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

乳癌は先進国において女性の約 8-10 人に 1 人の割合で起こる社会的に非常に重要な疾患である。7 割の患者の細胞はホルモン受容体依存性であり、タモキシフェンなどの拮抗薬剤の投与が第一選択肢として選ばれる。しかしながら、タモキシフェン治療を長

期間行ったおよそ 3 割の患者には、この薬剤に対する抵抗性が生じ再発が起こるとも言われている。ホルモン薬剤感受性の低くなった細胞では、しばしば別のシグナル受容体やその下流のキナーゼが活性されている。このことは、乳癌におけるホルモン受容体の機能は、ホルモン受容体単体ではなく、大きなネ

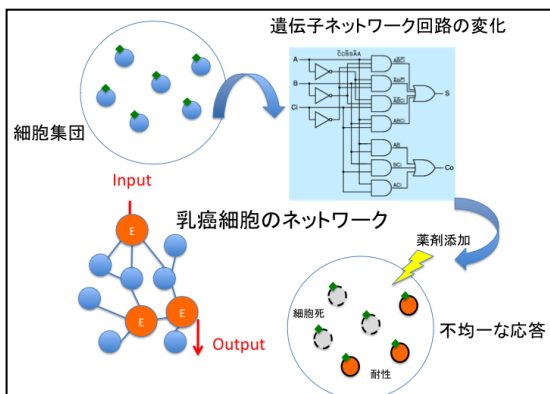
ネットワークとして考える必要があることを示唆している。

また一方で、乳癌細胞ではホルモン感受性が細胞間で大きく異なることが長年問題視されている。しかし、この感受性はホルモン受容体の発現量そのものとは無関係である。今まで、乳癌細胞の研究は、ほかの細胞研究と同じように細胞集団の平均の研究しか行われてこなかった。そのため、乳癌細胞のホルモン応答性に対する不均一性の問題は重要視されながらも手付かずのままである。

申請者等は、この細胞集団の不均一性が、遺伝子制御ネットワークの変化によって生じ、癌細胞の生存にとっては有利な仕組みとして働いていると考えている。遺伝子間の制御ネットワークを繋ぎかえるだけで出力を変えられれば、細胞はさまざまな環境で柔軟に生き残ることができる。薬剤耐性の乳癌細胞において、ホルモン受容体の量が十分あっても、ホルモン受容体として機能していないということはネットワークの回路の変化が起こっている可能性が考えられる。回路が変化すれば、分子のダイナミクスに変化が生じ、同じ入力に対しても細胞の出力は大きく変化する。このような分子ダイナミクスの違いを、細胞毎に捕捉できれば、ホルモン薬剤耐性の問題も解ける可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、乳癌細胞におけるホルモン受容体の遺伝子制御ネットワークの機械的な制御を明らかにする。そのために、薬剤耐性を説明しうるモデルを構築する。その上で、この耐性の回路を寸断するような分子ターゲットを見出すことを長期的な目的とする。期間内では、様々な分子活性を一細胞レベルの質量分析計などを用いて、定量し、その数理解析を行う。このようなデータを元に乳癌のネットワークを構築する（下図）。ホルモン受容体ネットワークの機械的な回路を明らかにし、薬剤抵抗性のメカニズム解明の端緒としたい。一細胞レベルの解像度で、ホルモン受容体の役割がわかれば、乳癌の各ステージにおける病理から、より良い治療方針が決定できるようになると期待できる。



## 3. 研究の方法

まずはウェスタンブロット等を用い、野生株およびタモキシフェン耐性株 MCF-7 ヒト乳癌細胞内で活性化されている各種受容体およびシグナル分子の活性を明らかにする。その上で様々な条件下における分子活性化やタンパク量を一細胞ごとに収集する。細胞集団における、各細胞の分子ネットワーク同定を可能にする数理モデルを開発する。細胞測定データと文献情報をもとに、ホルモン感受性の差異が生じるネットワークを明らかにする。得られた仮説は、実験によって検証を行う。

ネットワークの同定：

エストロゲン受容体ネットワークに関わる分子制御の情報を文献や公共データベースから集める。基本となる実験測定分子を決定する。

細胞分析：

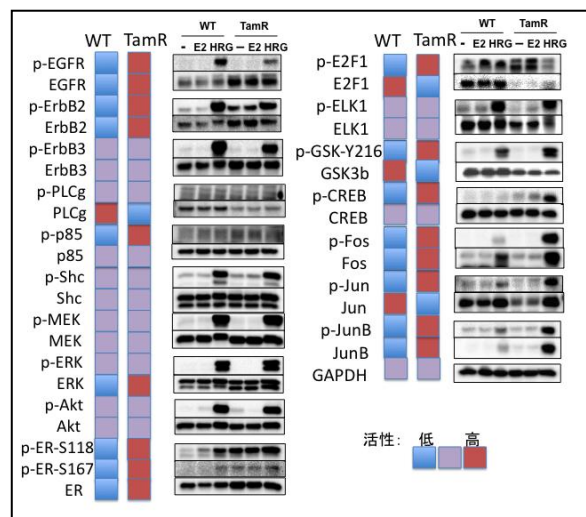
ウェスタンブロットを用い、野生株およびタモキシフェン耐性株の細胞集団における約 30 種類の分子活性を調べる。その上で、分子のリン酸化およびタンパク量を、一細胞レベルで測定する。一細胞測定はフローサイトメトリーまたは CyTOF (一細胞質量分析計) を用いる。そのために抗体選定を行う。成長因子、阻害薬剤を加えた条件で、分子活性化の時系列、定量データを収集する。

数理解析：

分子ネットワークの制御関係を予測する統計的なアルゴリズムを開発する。このアルゴリズムや常微分方程式モデルを用いてデータをもとにネットワークの解析を行う。

## 4. 研究成果

文献情報や細胞実験をもとに、エストロゲン受容体ネットワークに関わる 35 種の分子種を選定した。先の研究 (Oyama et al. JBC 2010) にて埼玉医科大学 井上聡教授が構築されたタモキシフェン耐性 MCF-7 細胞 (TamR) とその野生株細胞について、これらの分子のウェスタンブロットを行い、10nM エストロゲン (E2) および成長因子 (HRG) をそれぞれ投与後 5 分のリン酸化状態とタンパク量を測定した (下図)。



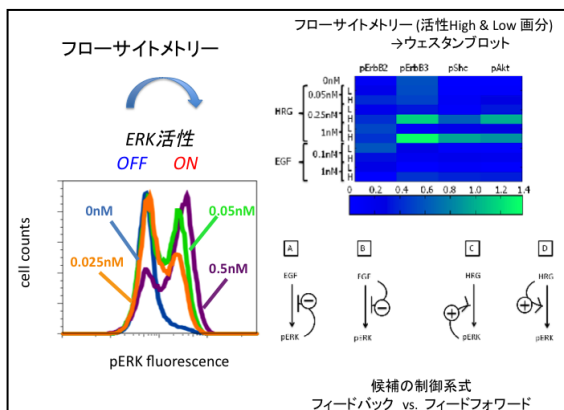
その結果、TamR では EGFR, ErbB2, ErbB3 膜受容体およびエストロゲン受容体がタンパク量、リン酸化量共に上昇していた。また今回測定した下流の転写因子の GSK3b, E2F1, CREB, Fos, Jun, JunB のリン酸化も上昇していた。しかし、これらのタンパク量は必ずしもリン酸化活性と一致しておらず、GSK3b, E2F1, Jun などのタンパク質ではむしろ野生株のほうがタンパク量が多かった。

興味深いことに、エストロゲン受容体や膜受容体活性およびその下流の転写因子の発現量や活性が野生株と薬剤耐性株の2つの細胞で大きく異なるのにも関わらず、中間のシグナルである ERK, Akt やアダプタータンパクのリン酸化には大きな違いはなかった。この2つの細胞間で違いの見られたものは PLCg および ERK のタンパク量、および PI3K p85 のリン酸化量であった。特に ERK では ERK2 のタンパク量が薬剤耐性株 TamR で顕著に増加していた。

ここで、上流の膜受容体活性が細胞間で大きく異なるのにも関わらず、中間のキナーゼリン酸化活性に大きな変化が見られないのは矛盾しているように思われた。考えられるのは、ウェスタンブロットのような細胞集団の平均でそれぞれの個別の細胞の活性が平均化されてしまっていて変化が見えなくなっていることである。よって、次に、HRG 刺激条件の時間と濃度を変えて一細胞レベルでの分子活性を観察することとした。

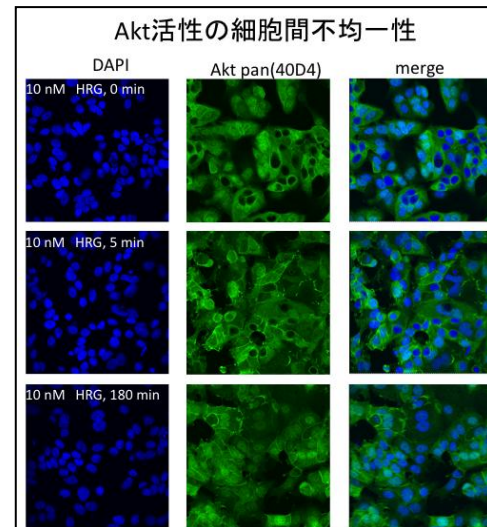
まずは野生株の ERK リン酸化を 0.025-0.5nM の範囲で HRG 濃度を変えてフローサイトメトリーで測定した。その結果、ERK 活性が全くない細胞と活性の高い細胞の2つの集団に分かれることがわかった。さらにこの2峰の活性ピークごとに細胞を分取し、ウェスタンブロットを行うと、細胞の高い集団では ErbB3 および Akt リン酸化が高いことが示された

(下図)。つまり、細胞の不均一性に ErbB3 受容体活性そのものが大きく関与する可能性が示された。このことを確かめるべく、リン酸化 ERK, リン酸化 Akt, リン酸化 ErbB3 共染色の CyTOF を試みたが、残念ながら、この手法に適した ErbB3 および Akt リン酸化の市販の抗体やそれに対応した最適化実験条件を期間内に見出すことができなかった。



ただこのリン酸化 ERK のフローサイトメトリーとウェスタンブロットの実験からはこのネットワークの制御系式として、今までシグナルネットワークでよく見られるようなフィードバック制御というよりも、受容体のフィードフォワード制御がこれらの細胞の不均一性に関与しているのではないかと推測された。

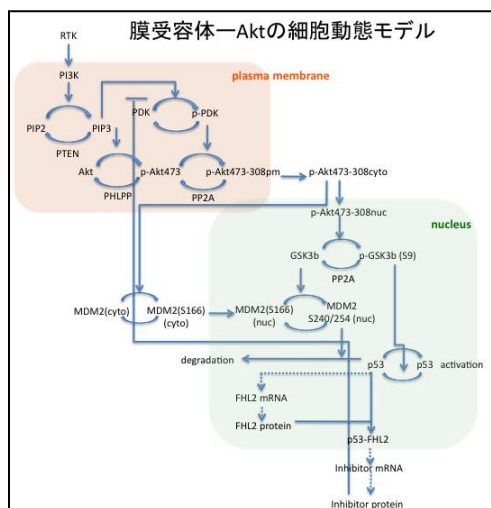
さらに、このような2峰性の細胞活性をリン酸化 Akt 抗体を用いてフローサイトメトリーおよび免疫染色で調べた。リン酸化 ERK のような2つのピーク活性はリン酸化 Akt でも同様に見られ、さらに Akt (pan) 抗体を用いて免疫染色を行うと、成長因子 HRG を添加する前から Akt の細胞局在に細胞間の大きな違いが



あることが見出された(下図)。特にこの局在は核で顕著であり、ほかのリン酸化 Akt 抗体 (Ser473) を用いても同様の傾向が見られた。また Akt は活性化時に細胞膜に移行していることが知られているが、HRG 刺激後5分では膜で強いシグナルが観察されていた。この細胞ごとの Akt 局在の違いはむしろ HRG 添加後180分のほうがばらつきが少ないようにも思われた。また、このような細胞間の不均一性はリン酸化 ERK ではそれほど顕著ではなく、Akt およびリン酸化 Akt で嫌儲であった。これらの実験結果を統合すると、MCF-7 細胞では ErbB3 膜受容体の活性化量の不均一性が Akt 活性の不均一性を引き起こしているように思われた。ハーバード大のグループは PI3K のタンパク発現量が Akt の活性化の不均一性を決定しているという報告をしており、本研究結果はそれとは多少異なる結果となった。これらを詳細に突き止めるためには細胞毎のタンパク量を定量的に調べる実験が必要だと考えている。

これらの情報を理論的に整理するために、膜受容体から Akt 活性化、それによる転写制御を加えた MCF-7 野生株細胞を対象とした数理モデルを用いて作成した(前ページ図)。

この際にパラメータの問題が少ない定微方程式モデルをまずは用いた。モデルには、Aktの挙動を表現するために細胞膜、細胞質、細胞核のコンパートメント情報も加えた。現在、シミュレーションを行いながら、実験結果の検証実験とモデルの精密化を進めている。この野生株モデルの作成後、エストロゲン受容体やタモキシフェン耐性株のパラメータ（受容体の高活性等）を入れてシミュレーションを行う予定である。



### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8件)

原著論文

1. Phase responses of oscillating components in a signaling pathway. Nomura M, Okada-Hatakeyama M. (2013) *Front Physiol.* 2013;4:68. 査読有
2. Hiroshima, M., Saeki, Y., Okada-Hatakeyama, M., and Sako, Y. (2012) Dynamically varying interactions between heregulin and ErbB proteins detected by single-molecule analysis in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (35) 13984-13989. 査読有
3. Till D. F., Cheong, A., Okada-Hatakeyama, M., and Kholodenko, B. N. (2012) Catching transcriptional regulation by thermostatistical modeling. *Physical Biology* 9(4)045007. 査読有
4. Saeki Y., Nagashima T., Kimura S., and Okada-Hatakeyama M. (2012) An ErbB receptor-mediated AP-1 regulatory network is modulated by STAT3 and c-MYC during calcium-dependent keratinocyte differentiation. *Exp. Dermatol.* 21(4), 293-298. 査読有
5. Kimura S., Araki D., Matsumura K., and Okada-Hatakeyama M. (2012) Inference of

S-system models of genetic networks by solving one-dimensional function optimization problems. *Math. Biosci.* 235(2), 161-170. 査読有

6. Shiraishi Y., Okada-Hatakeyama M., and Miyano S. (2011) A rank-based statistical test for measuring synergistic effects between two gene sets. *Bioinformatics* 27(17), 2399-2405. 査読有

7. Naruo, Y., Nagashima, T., Ushikoshi-Nakayama, R., Saeki, Y., Nakakuki, T., Naka, T., Tanaka, H., Tsai, S-F., and Okada-Hatakeyama, M. (2011). A kinetic model explains increased gefitinib sensitivity associated with Mig6 expression. *BMC Systems Biology* 5(1):29. 査読有

総説

8. がん細胞情報伝達のダイナミクスとシステムバイオロジー. 岡田真里子. *応用数理* 22 (3), 2012. 査読無

9. 遺伝子ネットワークのスイッチが細胞運命を決定する. 岡田真里子. *実験医学増刊* 29 (12), 127-132, 2011. 査読無

[学会発表] (計 8件)

国際学会

1. A switch in NF-kappa B signaling. Mariko Okada. The first annual Winter q-Bio Meeting (Feb 2013, Hawaii, USA) 招待発表
2. Identifying logics of signal-transcription network for cellular differentiation. Mariko Okada. IFRcC / IPR Joint Seminar (Nov. 2011, Osaka). 招待発表
3. Transcriptional feedback shapes signaling activity in cancer. Mariko Oakda. JCR-AACR Joint Symposium (Oct. 2011, Nagoya). 招待発表

国内学会・研究会

4. シグナル転写ネットワークのダイナミクスと疾病制御. 岡田真里子. 文部科学省イノベーションシステム整備事業 先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム「翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成」第4回公開シンポジウム バイオインフォマティクスの最前線 (横浜 2012年10月) 招待発表
5. 実験と計算による細胞情報処理機構の同定. 岡田真里子. 情報処理学会 バイオ情報学研究会 (SIG BIO) (飯塚 2012年8月) 招待発表
6. 細胞運命を決定する遺伝子ネットワークのスイッチ機構. 岡田真里子. ミニシンポジウム: 計算ウイルス学・免疫学の展開 (京都 2011年11月) 招待発表
7. c-Fos 転写因子のスイッチ様活性化を説明

するシグナル転写ネットワークの速度論的解析. 岡田真里子. 第84回日本生化学会大会 (京都 2011年10月) 招待発表

8. シグナル伝達の空間制御と不均一性に関するモデル化の試み 岡田真里子. 理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 III」 (和光 2011年5月) 招待発表

その他ポスター発表 10件程度

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡田 真里子 (OKADA MARIKO)

独立行政法人理化学研究所・細胞システムモデル化研究チーム・チームリーダー

研究者番号: 10342833

### (2) 研究分担者

Karin Mitosch (ドイツ財団フェロー)

奇世援 (理化学研究所)

湯本範子 (理化学研究所)

### (3) 連携研究者

岩本一成 (理化学研究所)

木村周平 (鳥取大学)

Boris Kholodenko (ダブリン大学)

長嶋剛史 (東北大学)

井上聡 (埼玉医科大学)