

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14459

研究課題名(和文) 多次元フローサイトメトリー法によるシグナル分子修飾の解析

研究課題名(英文) Analysis of signal molecule modifications by multidimensional flow cytometric method

研究代表者

川本 智 (Kawamoto, Satoshi)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・教室系技術職員

研究者番号：60457116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：フローサイトメーターを用い、従来の生化学的、分子生物学的手法では独立して行わざるを得ない複数パラメータの解析を同時に1細胞単位で行う「多次元フローサイトメトリー解析法」を確立し、シグナル伝達分子の挙動を解析するツールとなり得ることの検証を行った。メラノーマ細胞株を材料とし、試料調製の条件検討を行うことによって遺伝子発現とリン酸化タンパク質の発現解析を同時に1細胞レベルで行うことができた。また、3つ以上のパラメータを同時に表示する3次元グラフを作成した。

研究成果の概要(英文)：We tried to establish "Multidimensional flow cytometric analysis method" which could analyze multi parameters at the same time on a cell-by-cell basis by using flow cytometer and verify that it could be a tool for analyzing behavior of signaling molecules. By using the system, we analyzed gene expression and expression of phosphorylated protein in melanoma cell line at single cell level at the same time by examining various conditions of sample preparation. We also created a three-dimensional graph that simultaneously displays three or more parameters.

研究分野：生物学 生物科学

キーワード：フローサイトメトリー 細胞内シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は外環境の情報を細胞内外のレセプターで受容し、細胞内シグナル伝達分子(以下、シグナル分子)を介して核、ミトコンドリア等の細胞内小器官へ伝達する。シグナル分子の機能は自身の翻訳後修飾(リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化、SUMO化、ADP リボシル化等)によってコントロールされることが多い。またシグナル分子により伝達された情報に基づき、細胞内小器官の機能が変化する。例えば核の転写レベルの増減や、ミトコンドリア代謝活性の変化等が外環境に応答して変化する。

これまでシグナル分子修飾の解析には生化学的手法(免疫沈降法や免疫プロテイング法等)が多用されてきた。しかし以下に示す生化学的手法の弱点により、シグナル分子修飾と生理応答の因果関係を単純に結論づけることはできないと思われる。

(1) 通常シグナル分子は多種類かつ複数の修飾が同時に起こるのに対し、生化学解析は原則として一解析あたり一種類かつ一ヶ所の修飾しか解析が出来ないので相互の因果関係に言及できない。

(2) 一解析あたり多数の細胞(通常 $10^5 \sim 10^6$ 個細胞)から抽出物を作成して解析するので細胞集団の平均値しか解析出来ないため、均一細胞で同一の反応をする解析にしか向かない。

(3) 細胞を破碎するため、抽出液にした後の非生理的な反応を検出する危険性がある。また、細胞内小器官におけるシグナル分子局在や活性化などの検出は不可能である。

以上のことから、シグナル分子の翻訳後修飾と細胞生理機能を分子レベルで明らかにするためには、これら諸問題を克服しうる新しい解析系を構築する必要がある。

## 2. 研究の目的

(1) シグナル分子の動態と細胞生理現象の複数パラメータを同時に測定する手法、多次元フローサイトメトリー法(多次元フロー法)を確立する。本法を用いることで、シグナル分子の翻訳後修飾や標的遺伝子の発現レベル等の情報をシングル細胞単位で同時に解析することができる。

(2) (1)で確立した多次元フロー法について、遺伝子発現量とタンパク質発現量の同時解析など、実際の実験系に適用してその汎用性を検証するとともに、新たな知見を得るためのツールとして使用する。

(3) 多次元フロー法で得られた複数のパラメータを視覚的に表現するためのソフトウェアを開発する。3次元以上のデータを表示するソフトウェアはすでに市販されているが、高機能な反面、高価である。多次元フロー法による解析結果の表示に特化することで、できるだけコストをかけずに結果の作図が可能となるツールを作成する。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子発現解析条件の至適化

材料: 継代培養中のヒト悪性黒色腫メラノーマ由来 WM98-1 細胞株をトリプシン処理し、PBSで洗浄したものを1サンプルあたり $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個使用した。

cRNA プローブの作成: WM98-1 *GAPDH* のコーディング領域中(425bp) および *PD-L1* の3' 非転写領域中(400bp)の両端に SP6、T7 プロモーター配列をそれぞれ加えた領域を PCR で増幅し、これを鋳型として DIG RNA Labeling Kit を用いて *in vitro* 転写法により DIG(ジゴキシゲニン)ラベルを取り込んだセンス、アンチセンスの RNA プローブを合成した。作成したプローブを固定した細胞中の mRNA とハイブリダイズさせ、ナイロンメンブレン上でのドットプロット及びフローサイトメーターにより、プローブを検出した。

*In situ* hybridization: 回収した細胞を4%PFAで1.5時間固定し、PBSで洗浄後、細胞膜透過処理を0.5% PBST(PBS + 0.5% Tween20)で15分間、室温でおこなった。PBSで2回洗浄後、プレハイブリダイゼーション溶液(50%ホルムアミド、50X デンハルト液、500mM リン酸バッファー(pH7.0)、2X SSC、200 ng/ $\mu$ l Sheared Salmon Sperm DNA、200 ng/ $\mu$ l Yeast tRNA、2% DIG Blocking Solution)100  $\mu$ l を加えて30分間プレハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、ハイブリダイゼーション溶液(プレハイブリダイゼーション溶液に60%デキストラン硫酸、100 ng RNA プローブを加えたもの)100  $\mu$ l を加え、68 $^{\circ}$ Cで一晩ハイブリダイゼーションした。400  $\mu$ l の洗浄液(50%ホルムアミド、0.05% Tween20、PBS)で室温10分間、200  $\mu$ l 10分間の2回洗浄後、0.1X SSC、0.1% SDS、PBSを含む洗浄液200  $\mu$ l で10分間、2回洗浄した。その後DIG Blocking Solutionで30分間ブロッキング、40分間抗体処理を行った。処理後DIG Washing Bufferで2回洗浄し、PBSを200  $\mu$ l 加えてフローサイトメトリー解析に用いた。ドットプロットではハイブリダイゼーション溶液にデキストラン硫酸を加えず、ハイブリダイズ後の洗浄液を2X SSC、0.1X SSC、0.1X SSC + 0.1% SDSの組み合わせで行った。

抗体処理: ドットプロットでは1:5000 Anti-DIG AP Conjugate (Roche)、フローサイトメトリーでは1:100 Anti-DIG DyLight488 Conjugate (Vector)を用いた。

フローサイトメトリー: BD FACSAria III (BD)を用いた。ノズル径100  $\mu$ mのノズルを使用し、室温で解析を行った。

### (2) 多次元フロー法の汎用性の検証

リン酸化タンパク質の発現量と遺伝子発現の同時解析を行うため、(1)で確立した遺伝子発現解析の系を用いて発がんプロモーターであるTPA(12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート)で処理した細胞における、*GAPDH*及び*PD-L1*の遺伝子発現量とリン

酸化 STAT3 の発現量との同時解析を行った。処理は細胞を 100 nM TPA で処理し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 濃度の条件下でそれぞれ 1 時間、3 時間、6 時間処理した。回収した細胞をフローサイトメーター及び定量的 PCR で遺伝子発現量を測定し、汎用性を検証した。

### (3) 解析結果分析ソフトウェアの開発

2 種のリン酸化タンパク質の発現量及び核酸の量についての多次元解析データを BD FACSDiva Software Version 6.1.3 上から FCS ファイルにエクスポートし、FCS Extract 1.02 を用いてテキストファイルに変換した。このデータについて、R 言語を用いてグラフ化を行った。

## 4. 研究成果

(1) 多次元フローサイトメトリー解析法を確立するにあたり、まず目的遺伝子の発現を検出するための cRNA プローブを *in vitro* 転写法を用いて作成した。*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いてフローサイトメーターで細胞中の mRNA 量を解析する方法についてはすでに報告されているが、*in situ* ハイブリダイゼーションの前処理としてプローブが核酸にアプローチしやすいようにプロテイナーゼ K で処理して核酸の周囲のタンパク質を除去する必要がある。多次元フローサイトメトリーで遺伝子発現とタンパク質の同時解析を目的とする場合はプロテイナーゼ K を使用することができず、細胞固定、細胞膜の透過処理の条件を調整する必要があった。細胞の固定を 4%PFA で 1.5 時間、細胞膜の透過処理を 0.5%PBST で 15 分行うことでタンパク質を失わずにプローブを検出することができた。メンブレン上に細胞を固

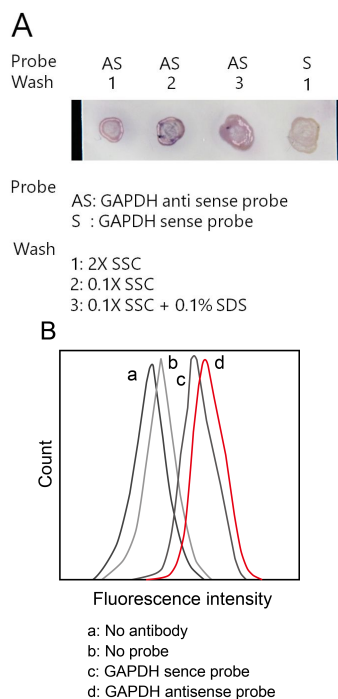


図 1 *in situ* hybridization による RNA プローブの検出。(A) ドットプロット、(B) フローサイトメトリーでの結果。

定し、ハイブリダイズさせた結果、ハイブリダイズ後の洗浄を 0.1X SSC + 0.1% SDS の条件で行ったものが、アンチセンスプローブより強い発色が見られた (図 1A)。さらに、フローサイトメトリー解析を行い、アンチセンスプローブを用いて細胞中の *GAPDH* 遺伝子の発現を確認することができた (図 1B)。この方法で作成したプローブと特異標識抗体を用いることで、タンパク質の発現レベルと遺伝子発現量、タンパク質のリン酸化レベルと遺伝子発現量など、これまでは困難だった組み合わせのパラメータについて同時解析が可能である。

(2) 多次元フロー法の実際の実験系への適用として、遺伝子発現とリン酸化タンパク質の解析を行った。発がんプロモーターである TPA (12-O-テトラデカノイルホルボル-13-アセテート) は WM98-1 を含む悪性度の高いメラノーマにおいては細胞の増殖を抑制し、顕著な形態変化を誘導することが知られている (図 2)。この時転写因子 STAT3 のセリンリン酸化レベルが上昇することがわかっており、この系に多次元フローサイトメトリー法を適用して、従来法との比較を行った。

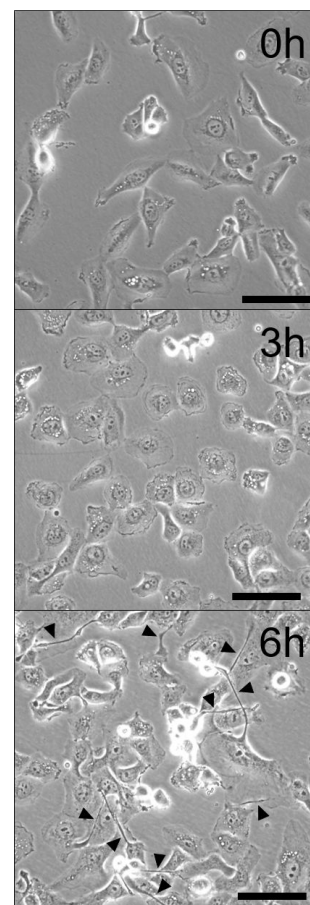


図 2 WM98-1 細胞を 100 nM TPA で 3, 6 時間処理し、細胞形態を観察した。  
Scale bar: 100 μm  
Arrowhead: 神経突起様の構造物

STAT3 はリン酸化により活性化し、核へ移行して標的遺伝子の転写を誘導する。TPA 処理による遺伝子発現への影響を、STAT3 の標的遺伝子の1つである免疫チェックポイント分子、*PD-L1* について解析した結果、定量的 PCR、フローサイトメトリーともに処理 3 時間以降で発現が上昇することが確認できた。しかしながら、フローサイトメトリーの結果では定量的 PCR で見られた処理 1 時間での発現上昇が見られなかった(図 3)。リン酸化タンパクについてはすでにフローサイトメトリーでの解析法が確立されており(Phos-Flow 法) これらを組み合わせることで同時解析が可能である。

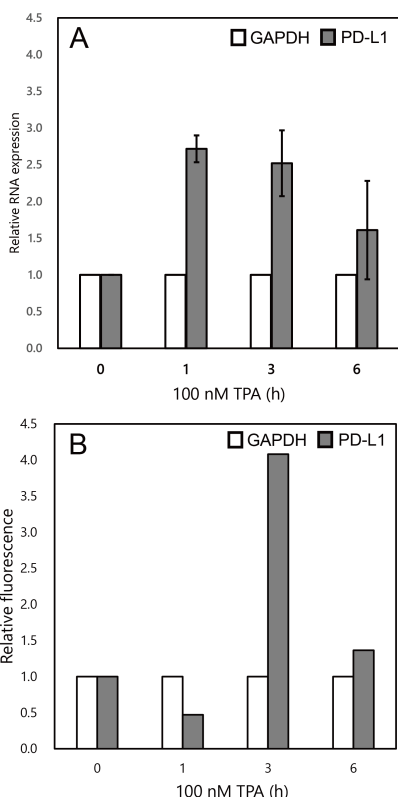


図 3 TPA 処理による *PD-L1* 発現量の変化。(A) 定量的 PCR、(B) フローサイトメトリーでの結果。

(3) 多次元フロー法により得られた解析結果を表示するためのソフトウェア開発に取り組んだ。フローサイトメーターに付属するソフトウェアでは一つのグラフに二つのパラメータまでしか図示することができず、3 つ以上のパラメータを解析する場合は、パラメータ 2 つで解析したデータをゲーティングして対象を絞り込み、3 つ目以降のパラメータと比較する手法を取るため、1 つのグラフ上で 3 つ以上のパラメータを示すことができない。本研究ではグラフを 3 次元化して 3 つのパラメータを展開し、同時に比較が行えるようにした(図 4)。さらに、薬剤の処理時間で色分けすることにより 4 次元目のデータを表示している。表示する処理時間は組み合わせを選択することができ、処理時間での比較が行えるようにした。また、グラフは回

転させることができ、結果を 360 度全ての方向から評価することが可能である。

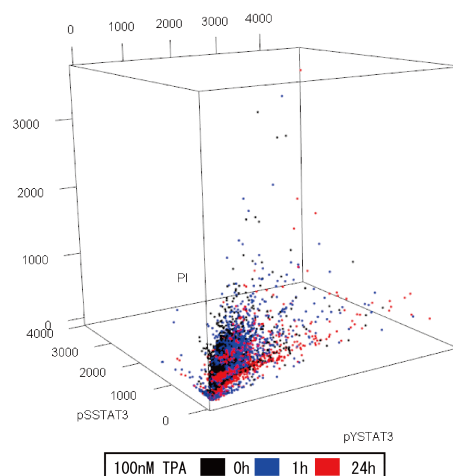


図 4 多次元フロー法で得られた複数のパラメータの視覚化。100nM TPA で 0, 1, 24 時間処理した細胞のチロシンリン酸化 STAT3(pY STAT3)、セリンリン酸化 STAT3(pS STAT3)、細胞周期 (PI) の関係を 3 次元散布図に展開した。

フローサイトメトリーで多次元の解析を行うにあたって、遺伝子発現の解析と他の解析を同時に行うことは困難であったが、回収した細胞の処理やハイブリダイゼーションの条件を検討する事により遺伝子発現量の変化をフローサイトメトリーで確認することができた。一部フローサイトメトリーと定量的 PCR の結果が一致しなかったが、コントロールより低い値であり、実験操作の影響が考えられる。現在、再確認を行うとともに、遺伝子発現と TPA が駆動するシグナル伝達に関わるタンパク質のリン酸化レベルの変化の同時解析について、安定して行える条件の至適化に取り組んでいる。また、遺伝子発現を伴わない多次元解析についても、タンパク質の発現と細胞周期の同時解析を試行中であり、これらの多次元フロー法は複数のパラメータを同時に 1 細胞レベルで得ることができるとなる有用なツールになり得ることを確認できた。さらに、多次元フロー法の特徴である、複数パラメータの同時解析の結果を立体的に捉えることが可能な 3 次元グラフを作成した。インターフェースに改善の余地は残っているが、装置付属のソフトウェアに加えてこのシステムを用いることにより、これまでとは違う視点からも解析結果を検討することが可能となった。

今回得られた成果を活かし、さらなる精度の向上とより多くのパラメータの同時解析を目指したい。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 1 件)

川本 智, 岩崎 哲史, 鎌田 真司, 多次元フローサイトメトリー解析法の確立, 第 29 回生物学技術研究会, 2018.2.15, 自然科学研究機構 (愛知県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川本 智 (KAWAMOTO, Satoshi)  
神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・教室系技術職員  
研究者番号： 60457116

### (2) 研究分担者

岩崎 哲史 (IWASAKI, Tetsushi)  
神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・助教  
研究者番号： 40379483