

令和元年6月12日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07156

研究課題名(和文) 単一がん細胞のセクレトームプロファイリング

研究課題名(英文) Secretome profiling of single cancer cells

研究代表者

畠山 慶一 (Hatakeyama, Keiichi)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：20564157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の不均質性が重要視されるようになり、個々のがん細胞を調べることが可能な単一細胞解析が注目を集めている。しかしながら、単一細胞が分泌するタンパク質群を標的としたセクレトームは、ほぼ未踏の領域と言ってもよい。単一細胞由来の分泌タンパク質を調べることができれば、特定のがん細胞が周囲に及ぼす影響を明らかにできるだけでなく、予後予測や新たな腫瘍マーカー探索に貢献できると考えられる。そこで本研究では、単一がん細胞由来の分泌タンパク質を同定可能なプラットフォームを構築した。マイクロデバイスを作製し、単一細胞由来の分泌タンパク質を可視化することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のがん不均質性の研究において、単一細胞を標的としたゲノム解析やトランスクリプトミクス解析が応用されるようになってきた。一方、単一細胞のプロテオミクス解析の報告例は少なく、特に単一細胞が分泌するタンパク質を網羅的に分析している研究報告はない。本研究で得られた成果は、同定されたタンパク質の数は少ないものの、単一細胞由来の分泌タンパク質を可視化できた学術的意義は大きい。これにより、新たな腫瘍マーカーの探索も可能になると予想され、がんの診断に貢献できる可能性もあることから社会的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Heterogeneity of cancerous cell is considered to be important to understand tumor development, and hence single cell analysis is spotlighted. Although many researches achieved single cell analysis focused on intracellular DNA/RNA, secretome analysis of single cell is uncharted territory. Identification of secreted proteins derived from single cell will not only reveal influence of specific cancer cell on its surrounding cells, but contribute prognostic prediction and discovery of new tumor marker. In this study, we developed novel platform for detection of secreted protein derived from single cell. Using microdevice to capture unique proteins, visualization of secreted protein derived from single cell was achieved.

研究分野：がんオミクス解析

キーワード：プロテオミクス解析 単一細胞解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、がん幹細胞などの細胞集団の存在が明らかにされ、がん細胞中の不均質性 (**heterogeneity**) が、がんの生存・維持に重要であることが示唆されている。また、がん細胞周囲の微小環境(ニッチ)に影響を及ぼす分泌タンパク質の存在も、不均質性を保つ要因になっていることがわかってきた (**Yamashina T. et al. Cancer Res. 2014**)。このことから、様々な細胞集団における個々の細胞の挙動を追うことが、がんの理解に重要であると考えられている。

個々の細胞の挙動を調べる手法に、単一細胞解析がある。この解析は古くから行われていたが、近年の微小流体技術 (**microfluidics**) の発展により、スループット性や再現性が格段に進歩した。特にゲノム解析やトランスクリプトミクス解析の分野においては、次世代シーケンサの恩恵もあり、めざましい成果を上げている (**Wills QL, and Mead AJ. Hum Mol Genet. 2015**)。しかしながらプロテオミクス解析においては、**Single-cell mass cytometry (Lujan E. et al. Nature. 2015)** といった手法も考案されているが、網羅的解析と呼べるまでには至っていないのが現状である。分泌タンパク質を対象とした単一細胞のセクレトーム解析においては、ほとんど報告例がない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、単一がん細胞由来の分泌タンパク質群を同定・評価可能なプラットフォームの構築を目指す。はじめに、研究分担者が得意とする微小流体技術を用いて単一細胞のトラップと、微小空間中への分泌タンパク質の固定と濃縮を試みる (図 1A)。この最適化は、がん細胞株を用いて検討する。次に、**LC-MS** と **MS イメージング** を用いた単一細胞の分泌タンパク質を対象としたプロテオミクス解析を試みる (図 1B)。また、細胞の回収も同時に行い、回収した細胞は、**C1 system (Fluidigm)** を用いて、単一細胞の遺伝子発現解析を行う。これらの結果から、特定の細胞集団で分泌されているタンパク質と遺伝子発現の関係性を探る。

3. 研究の方法

(1) 微細構造への抗体の固定化

はじめに、微細構造上へ抗体の固定化方法の最適化を行った。微細構造は、研究分担者が開発したデバイス (**Maeda Y. et al. Proc Chemical Sensor Symposium. 2015**) を用いることとした。固定化抗体のコントロールとして、すでにごん細胞株で分泌が報告されているタンパク質を捕捉できる抗体を選択した。抗体を固定化後に、目的タンパク質を微細構造上へ滴下した。その後 2 次抗体を反応させた際の蛍光強度から、微細構造上の抗体の目的分子の捕捉能を評価した。

(2) 微細構造上への分泌タンパク質捕捉

上記(1)で作製した抗体固定化微細構造体を用いて、微細構造上へ分泌タンパク質固定化方法の最適化を行った。はじめに、この基板上での単一細胞分離と培養を実施した。血清培地は抗体のタンパク質捕捉に影響を及ぼす恐れがあるため、培養には無血清培地を用いた。本研究では、大腸がんが日本で多いがんの 1 つであることと、大腸がん組織において不均質性の 1 つであるがん幹細胞(様細胞)が発見されている (**Ricci-Vitiani et al. Nature. 2007, Schepers et al. Science. 2012**) ことをふまえて、大腸がんの株化細胞を標的として用いた。

(3) 単一細胞の遺伝子発現解析

個々の大腸がん細胞株の遺伝子発現を確認するために、**C1 system (Fluidigm)** を用いて、単一細胞の **RNA-seq** を実施した。対象は上記(2)で使用した細胞株であり、微細構造上での細胞培養と同様の無血清培養を用いた。

(4) MS イメージングによるペプチドの検出

IGFBP7 のアミノ酸配列からトリプシン消化可能でかつ **MS** 解析が可能と考えられる分子量の配列を選択し、基板上で検出するペプチド断片のコントロールとした。これら合成ペプチドを用いて **MS イメージング** の検出限界を推定した。各濃度の合成ペプチドを平面基板上にスポットし、風乾後にマトリックスである **CHCA** を噴霧し積層させた。スポットした領域を **MS イメージング** により測定した。測定時のレーザー直径は **5-10 μm** とした。また、**MS イメージング** 時のピークのズレの評価、ペプチド断片検出時に適切なマトリックス等の探索も同時に行った。

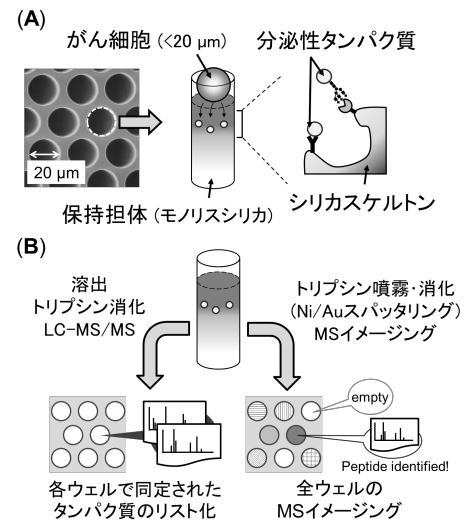


図 1. 単一がん細胞の培養から分泌タンパク質の同定まで。(A) 微小空間内での細胞の培養と分泌タンパク質トラップと濃縮。(B) トラップされたタンパク質の検出。

4. 研究成果

(1) 微細構造の構築

直径 $20\ \mu\text{m}$ の貫通孔の集合体であるキャピラリープレート(浜松ホトニクス)にモノリスシリカを形成した。モノリスシリカ形成時に使用する **polyethylene glycol (PEG)** の濃度を変化させることで、キャピラリー内へのシリカ充填量を制御することができた(図 2)。また、細胞の単一細胞レベルでの捕捉効率が最大値を示した **60 mg/ml PEG** を以降の実験で使用した。この **PEG** 濃度で、キャピラリー内にシリカを完全充填できることが分かった。また、表面は約 $20\ \mu\text{m}$ のくぼみができ、単一細胞をそのくぼみ内で保持できることも明らかになった。

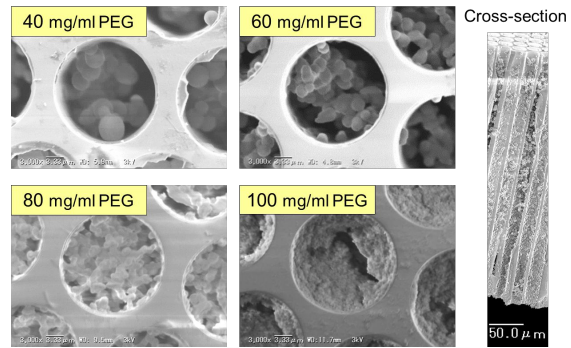


図 2. PEG 濃度とキャピラリープレート内へのシリカ充填量との関係。

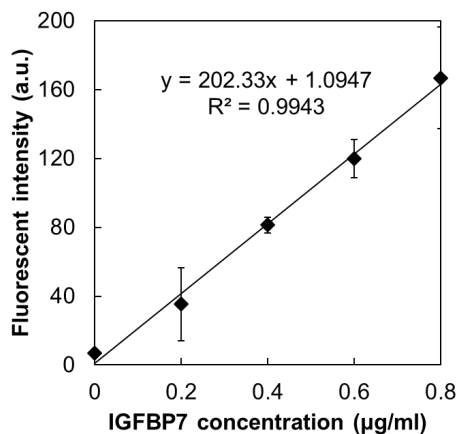


図 3. 物理吸着を用いて抗体が固定された微細構造上での **IGFBP7** の捕捉能の評価。

(2) 微細構造への固定化方法の最適化

本研究では、抗 **IGFBP7** 抗体をコントロールとして、物理吸着並びに、架橋剤を用いた共有結合によるモノリスシリカ上への抗体固定化の最適化を試みた。結果として、物理吸着が安定して高密度に固定化できることを明らかにした(図 3)。また平面基板に比べて微細構造により多くの抗体を固定できることがわかった。さらに検出限界並びに、検出可能範囲が平面基板より優れていた。以上のことから、微細構造体は、細胞の分泌物を効率的に捕捉できるポテンシャルを有するといえる。これ以降の微細構造上への抗体固定化は、物理吸着を採用することとした。

(3) 分泌タンパク質捕捉と蛍光検出

IGFBP7 の分泌が確認されている **SW480** をポジティブコントロール、一方検出限界以下であった **SW620** をネガティブコントロールとして、微細構造

上で細胞培養を実施した。細胞を除去後に、サンドイッチ法によって **SW480** にのみ、それぞれ分離された蛍光シグナルを確認することができた。この蛍光シグナルは、微細構造上で培養された細胞の **10~20%** で検出された。これらの結果から、**IGFBP7** の分泌を単一細胞レベルで可視化できることが示された。

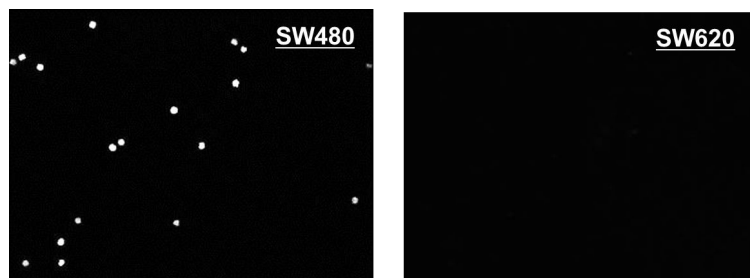


図 4. 細胞分泌性 **IGFBP7** の微細構造上での可視化。

(4) RNA-seq を用いた単一細胞発現解析

SW480 の単一細胞解析発現解析を実施した結果、**19% (4/21)** の細胞で **IGFBP7** が高発現していた(図 5)。この頻度は微細構造上で検出された分泌性の **IGFBP7** と同程度であった。それ故、**IGFBP7** が発現している **SW480** は、積極的に **IGFBP7** を分泌していると考えられる。また、**IGFBP7** の発現している細胞すべてで **VIM** の発現亢進が認められた。その一方で、**CDH1** 発現は確認されなかった。近年、バルクのがん細胞株では **IGFBP7** の発現亢進が上皮間葉転換 (**EMT**) と関わる **VIM** の発現を促す報告がなされた(**Rupp C. et al. Oncogene. 2015**)。我々の結果は、単一細胞内で **IGFBP7** と **VIM** との関係を示しており、このような細胞集団は、**EMT** 様の性質を有することが示唆される。分泌性のタンパク質と遺伝子発現の関係を単一細胞レベルで明らかにしたのは、私が知る限りでは初めての報告である。このような分泌タンパク質を可視化する手法は、単一細胞解析分野に新たな知見をもたらすのかもしれない。

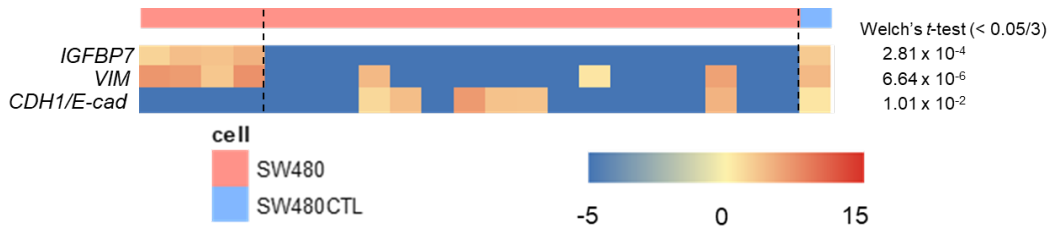


図 5. SW480 の *IGFBP7* と上皮間葉転換(EMT)関連遺伝子の単一細胞発現解析。SW480CTL はバルクサンプルを表す。

(5) MS イメージングによる合成ペプチドの検出限界の評価

本研究では、MS イメージングに AP-SMALDI と Orbitrap の組み合わせを採用した。また、マトリックスの組成や濃度並びに噴霧条件の検討を行い、安定的に検出できる条件を決定した。合成ペプチドの配列によって検出できる固有の MS シグナル強度は異なっており、最小で 100 fg/spot の合成ペプチドまで検出することができた(図 6)。これは、1 レーザーショット(直径 5~10 μm)当たり約 2,000 分子に相当する。一方で、MS/MS まで検出できるのは、10 pg/spot であった。さらに、トリプシン消化された *IGFBP7* でも同様の MS スペクトル(誤差 ± 0.5 ppm)を確認することができた(data not shown)。また、微細構造上でも *IGFBP7* の MS スペクトルを検出することがわかった。以上の結果から、微細構造上に 2,000 分子以上の標的分子が固定化されていれば MS イメージングが可能であると考えられた。

(6) まとめ

キャピラリープレートにモノリスシリカを形成し、単一細胞由来の分泌物を吸着できる微細構造体を構築することができた。実際に、大腸がん細胞株から分泌する *IGFBP7* を単一細胞レベルで蛍光検出することに成功した。この分泌物は、*IGFBP7* 遺伝子が高発現の細胞で分泌していると考えられた。次に、基板上でペプチド断片の MS イメージングが可能なプラットフォームを構築し、1 レーザーショット(直径 5~10 μm)当たり約 2,000 分子を検出できることを示した。この感度は、単一細胞由来の分泌物を検出するに十分な感度であると推察される。今後は、実際にがん細胞株から分泌しているタンパク質の MS イメージングを試みる。

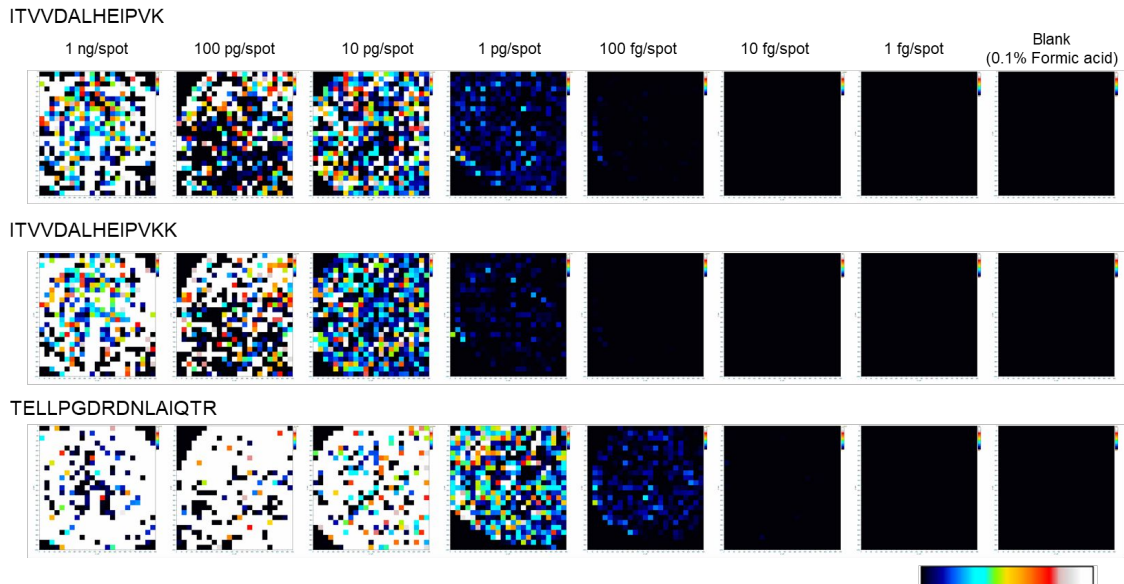


図 6. 合成ペプチドの MS イメージング。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

- 1) 太田 健人, 前田 義昌, 畠山 慶一, 吉野 知子, 田中 剛. 単一細胞高集積化デバイス上におけるがん細胞分泌タンパク質の免疫測定法の開発. . 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム (2016)
- 2) 前田 義昌, 太田 健人, 畠山 慶一, 吉野 知子, 田中 剛. 細胞高集積化デバイスを用いた単一がん細胞からの分泌タンパク質の免疫測定. 第 69 回日本生物工学会大会 (2017)
- 3) 前田 義昌, 太田 健人, 畠山 慶一, 吉野 知子, 田中 剛. 細胞高集積化デバイスを用いたがん細胞分泌タンパク質のシングルセル解析. 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム (2017)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：前田義昌

ローマ字氏名：**Yoshiaki Maeda**

所属研究機関名：東京農工大学

部局名：工学（系）研究科（研究院）

職名：助教

研究者番号（8桁）：**30711155**

(2)研究協力者

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、研究者個人に帰属されます。