

令和元年6月4日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21109

研究課題名(和文)細胞増殖シグナルの再構成による癌細胞MEK阻害剤抵抗性の動作原理の解明

研究課題名(英文)Unraveling the working principle of MEK inhibitor resistance in cancer cells by artificial control of cell growth signal dynamics

研究代表者

小松 直貴 (Komatsu, Naoki)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：30737440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、依然として本質的な理解には至っていない癌細胞MEK阻害剤抵抗性の原理について、癌細胞増殖シグナルの活性動態に着目して解明を目指した。そのために必要なmTORC1活性動態と細胞周期進行の同時可視化系ならびに画像解析系の構築を行った。解析系の構築により、細胞周期進行を長時間に渡って1細胞レベルで定量計測できるようになった。またmTORC1活性を高い時間分解能で操作可能な系の構築についての検討を行い、mTORC1のmTORホモ多量体化を介した新奇活性制御機構の存在を示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞周期の時系列変化を1細胞レベルかつ数日間にわたって定量的に追跡できるようになったことで、今後は細胞増殖に限らず細胞分化や細胞死といった、細胞周期に関わる多くの生命現象に関する理解を一層加速することが期待される。mTORのホモ多量体化によるmTORC1活性制御の分子機構が今後解明されることで、新しい機序に基づくmTORC1活性の制御法が開発される可能性がある。そのような方法はmTORC1標的治療法の新規の候補になり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It remains largely elusive that how cancer cells show intrinsic resistance to MEK inhibitors. To understand the essentials of the resistance in cancer cells, this study aimed to unravel the working principle of the MEK inhibitor resistance from the viewpoint of activity dynamics of cell growth signaling. For this purpose, I established an imaging system for simultaneous monitoring of the dynamics of mTORC1 activity and that of cell cycle progression in living cells. An image analysis pipeline for the obtained images was also developed. The analysis pipeline enabled to track cell cycle statuses from single cell for more than 3 days with quantitative manner. I also examined the possibilities of manipulating mTORC1 activity dynamics with higher temporal resolution. During the analysis, I obtained a preliminary data that implies a novel regulatory mechanism of mTORC1 activity via homo-multimerization of mTOR.

研究分野：細胞生物学

キーワード：mTORC1 細胞周期 細胞増殖 MEK阻害剤抵抗性 蛍光ライブイメージング 光遺伝学 生物画像解析

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

1. 研究開始当初の背景

細胞内シグナル伝達経路の一つ、Ras-Raf-MEK-ERK 経路は細胞増殖に深く関与している。近年になって、癌細胞の多くがこの経路に遺伝子変異を持っていることが分かってきており、癌細胞の性質との関連について精力的に研究が進められている。中でも注目されているのが、ERK 経路と癌細胞の MEK 阻害剤抵抗性との関連である。すなわち Raf 変異癌細胞は MEK 阻害剤により効果的に細胞増殖が抑制される一方、多くの Ras 変異癌細胞は MEK 阻害剤存在下でも増殖が抑制されず増え続ける。この癌細胞 MEK 阻害剤抵抗性は MEK 阻害剤を利用した抗癌療法における大きな課題の一つとなっている。

癌細胞 MEK 阻害剤抵抗性の克服に向けて、その分子機構の解明が世界的に行われており、いくつかのモデルが提唱されている。これらのモデルに共通するのが、「抵抗性癌細胞では MEK 阻害剤により ERK 活性が完全に抑制されず、このため MEK 阻害剤に抵抗性を示す」という考えである。もしそうだとすると、ERK 活性と細胞増殖には相関があるはずである。研究代表者は以前、ERK 活性の MEK 阻害剤に対する感受性は、MEK 阻害剤感受性細胞と抵抗性細胞との間でほとんど変わらないことを定量的に示していた。さらに感受性細胞では ERK 活性と増殖に強い相関があるが、抵抗性細胞では ERK 活性と増殖は相関せず、むしろ Ras 下流の別シグナル経路である PI3K-Akt-mTORC1 経路の活性と増殖が強く相関することを見出していた。これらの結果は、MEK 阻害剤抵抗性の細胞増殖は ERK 活性ではなく mTORC1 活性によって主に制御されていることを示唆している。同時に、MEK 阻害剤抵抗性を克服するには、ERK 経路に加えて、mTORC1 経路と MEK 阻害剤抵抗性増殖との関連も精密に解明する必要があることも示している。

このシグナル伝達と細胞増殖との関連については、「シグナル伝達活性の単純な強弱だけでなく、時間パターンにもシグナル下流の表現型に関する情報が埋め込まれている」ことを示す報告が研究開始の直前期に複数なされていた。また研究代表者は、MEK 阻害剤感受性細胞や抵抗性細胞では mTORC1 活性が動的にゆらいでいることを見出していた。こうした知見を踏まえると、MEK 阻害剤抵抗性増殖がなぜおきるのか、その原理を解明するには、ERK や mTORC1 の活性化動態と細胞増殖との関係を調べる必要性が考えられた。そのためには、ERK や mTORC1 の活性化動態を人為的に操作し、細胞増殖を定量計測するアプローチが極めて有効である。しかしながら、mTORC1 を選択的かつ任意のタイミングで活性操作できる実験系は、当時は存在していなかった。

細胞増殖についてもより詳細な解析が必要と考えられた。細胞増殖は一見シンプルな表現型であるが、実際には細胞周期進行が厳密に制御された結果として実現される複雑な過程である。また、細胞周期と mTORC1 活性動態との関連もこれまでに分かっていた。

2. 研究の目的

前述の背景を踏まえ本研究では、癌細胞 MEK 阻害剤抵抗性の原理を解明することを目標とした。この目標を達成するために以下の3つの目的を設定した。

- (1) MEK 阻害剤抵抗性癌細胞における mTORC1 活性動態と細胞周期の生細胞同時可視化
- (2) mTORC1 活性を高い時間分解能で操作可能な系の開発
- (3) ERK および mTORC1 の活性を操作したときの細胞周期の可視化

3. 研究の方法

目的(1)を遂行するにあたり、蛍光ライブイメージングを利用することとした。蛍光ライブイメージングは生きた細胞の形態や動きに加えて、細胞内の分子活性を高い時空間分解能で観察する上で優れた方法である。細胞内の mTORC1 活性を可視化するために、mTORC1 の直下のシグナル伝達分子である S6K の活性を可視化するための蛍光プローブ、Eevee-S6K を利用した。S6K 活性は mTORC1 活性と緊密に相関するため、このプローブを mTORC1 活性のプローブとして利用した。細胞周期の可視化には、同じく蛍光プローブである Fucci(CA)を利用した。細胞は観察中に視野内を移動するため、細胞追尾に必要な細胞核標識マーカーとして核内タンパク質ヒストン H2B と蛍光タンパク質の融合タンパク質を利用することとした。なお、蛍光プローブそれぞれのシグナルを分離できるよう、蛍光波長がそれぞれ異なる蛍光タンパク質変異体を利用している。これらの蛍光プローブをレトロウィルスベクターおよびレンチウィルスベクターを用いて癌細胞に安定発現させた。この蛍光プローブ発現細胞の観察に適した落射型蛍光顕微鏡システムの自動化や、取得画像から mTORC1 活性や細胞周期の時系列変化を解析するために必要な、自動細胞追尾のプログラム開発についても行うこととした。

目的(2)については、光遺伝学の方法論に基づく活性操作系を構築することとした。光は照射するタイミングや場所、照射時間や強度を比較的容易に制御できるため、mTORC1 活性動態

を人為操作する上で有効である。使用する分子としては、シアン色光によってヘテロ 2 量体、あるいはホモ多量体を形成する CRY2 タンパク質を利用した。本研究では、mTORC1 活性を制御するために光操作を行う標的分子について、その検討から行うこととした。研究代表者は以前の研究で、mTORC1 上流の PI3K の活性化を光操作する系を構築していた。この系は mTORC1 は活性化するものの、細胞内の mTORC1 活性動態を再現するには、活性化強度が不十分であり、より強力な活性操作系が必要と考えられたからである。このために、mTORC1 活性化機構の一つとされる、mTOR のホモ 2 量体化を光操作する系を構築することを旨とした。

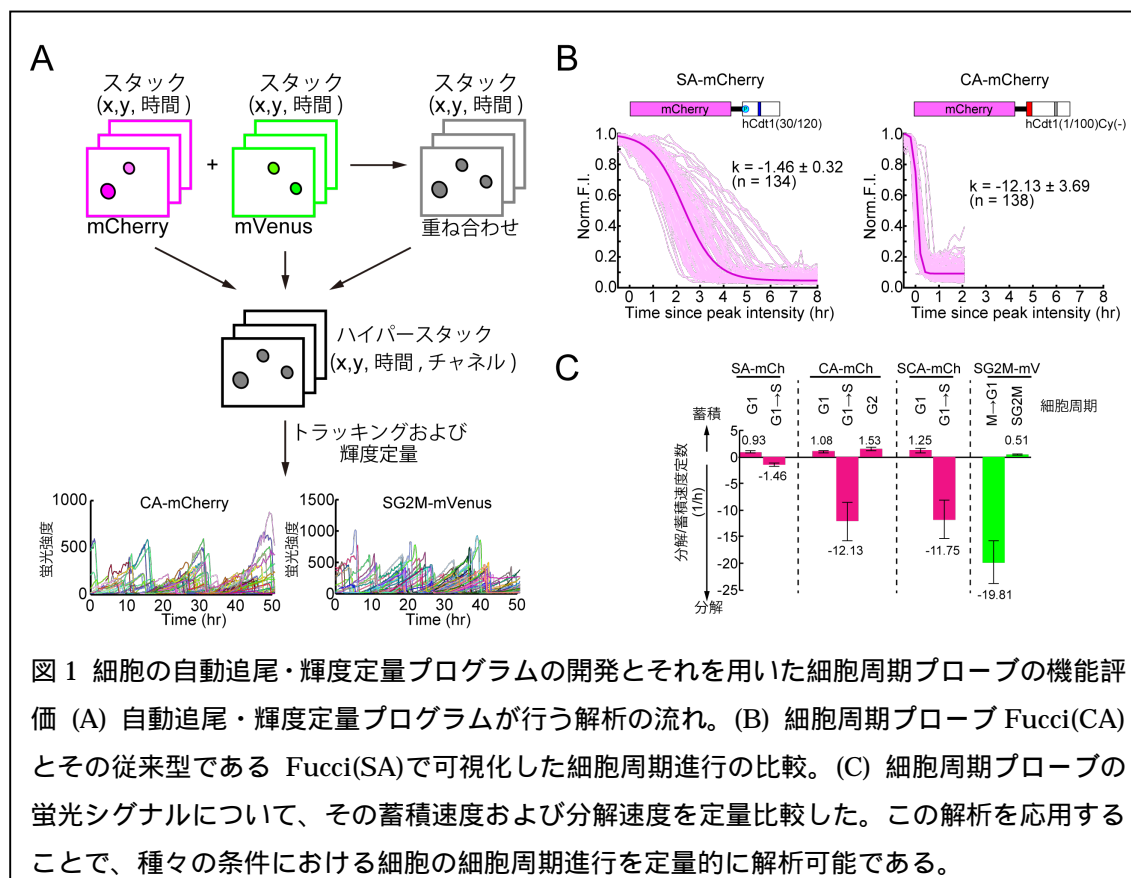
目的(3)においては、MEK 阻害剤抵抗性細胞で特徴的な mTORC1 活性動態を、目的(2)で開発する mTORC1 活性の操作系を用いて、感受性細胞で上書き(再構成)し、上書きした細胞における細胞周期進行を目的(1)で構築する系で生細胞可視化することを計画した。

4. 研究成果

(1) 自動細胞追尾・輝度定量プログラムの開発

細胞周期プローブ Fucci(CA)を発現する細胞について、細胞を自動追尾し、さらにプローブの蛍光輝度を 1 細胞ごとに定量するためのプログラムを、生物画像解析に広く用いられているフリーソフトウェアである ImageJ(Fiji)を利用して作成した。さらにこのプログラムを用いて得られる細胞周期の時系列変化を統計解析するプログラムを数値解析用ソフトウェアである MATLAB (MathWorks 社)を用いて作成した。これらの利用することで、Fucci(CA)とその従来型である Fucci(SA)の細胞周期可視化における性能差を定量的に示した(図 1)。

生きた細胞における細胞周期を解析することは、未だ多くの不明点が残されている細胞周期研究において重要である。それにも関わらず、細胞周期の 4 つの相(G1 期、S 期、G2 期および M 期)の時間変化を 1 細胞レベルで正確に解析することは可視化の問題と画像解析の複雑さの問題があり、これまで難しかった。開発したプログラムの利用により長時間、かつ大量に細胞周期を定量可能となり、細胞周期と密接な関連のある生命現象についての理解が進むと考えられる。一方で開発したプログラムはそのままでは mTORC1 活性プローブの定量には不向きであるので、今後はプログラムの機能拡充を図り、mTORC1 活性と細胞周期を同時に定量できるようにする予定である。



(2) mTORC1 活性と細胞周期の同時可視化系の構築

ヒト由来 HeLa 細胞に mTORC1 活性プローブ Eevee-S6K と細胞周期プローブ Fucci(CA) ならびに細胞核マーカーを安定発現させ、多色蛍光イメージングが可能であることを検証した。多色イメージングに用いた蛍光波長域と実際の画像を以下に示す(図 2)。

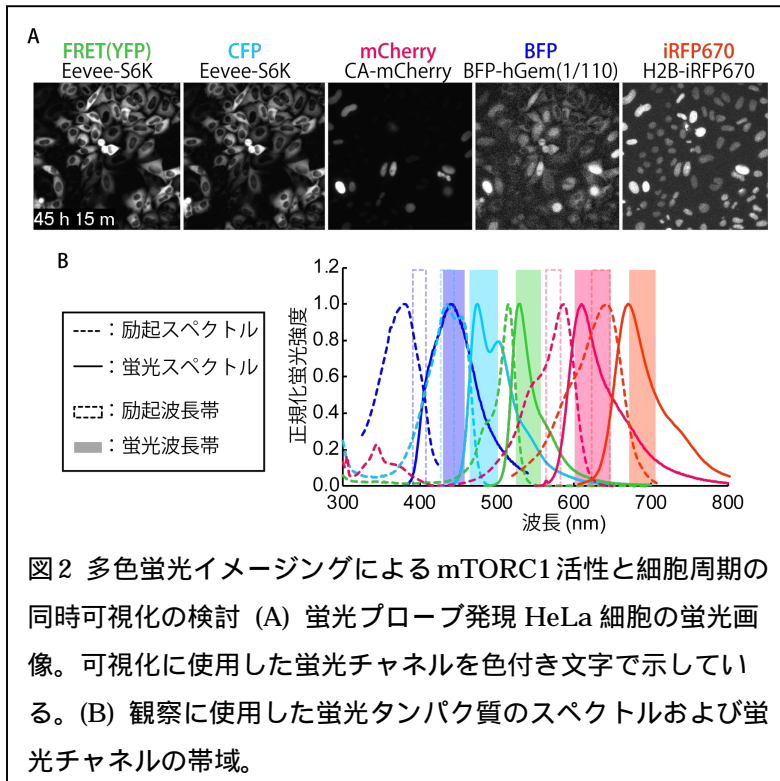


図2 多色蛍光イメージングによるmTORC1活性と細胞周期の同時可視化の検討 (A) 蛍光プローブ発現 HeLa 細胞の蛍光画像。可視化に使用した蛍光チャンネルを色付き文字で示している。(B) 観察に使用した蛍光タンパク質のスペクトルおよび蛍光チャンネルの帯域。

観察を行った結果、ウイルスを用いた遺伝子導入に起因すると考えられる、蛍光シグナルの減少が見受けられた。具体的には、BFP-hGem(1/110)の発現抑制によるBFPシグナルの減少が起きており、高い定量性で細胞周期を計測することが難しかった。考えられる原因の一つとして、ウイルスの多重感染による影響が挙げられる。

今後は自己切断性ペプチドである2A配列を用いることで、蛍光プローブ遺伝子を一つ(あるいは二つ)のウイルスベクターで一度に導入できるよう工夫し、多重感染ならびに蛍光プローブ発現抑制のリスクを避ける。

(3) mTOR ホモ多量体化による mTORC1 不活性化の可能性の検証

mTOR を人為的にホモ 2 量体化させることで内在性の mTORC1 活性を操作できるか検証するために、タンパク質の多量体化タグである PB1 ドメインおよび蛍光タンパク質 mAG1 を mTOR の全長に付加した融合タンパク質 PB1-mAG1-mTOR を HeLa 細胞に一過性発現させた。続いて mTORC1 活性の代替マーカーであるリン酸化 S6 に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行ったところ、PB1-mAG1-mTOR 発現細胞は未発現細胞と比較して、mTORC1 活性が有意に減少していた。この mTORC1 不活性化は mTOR 単独の一過性発現では見られなかったことから、mTOR のホモ多量体化が何らかのメカニズムにより内在性の mTORC1 の活性を抑制したためと考えられる。mTOR は一部のフラクシオンが細胞内にて多量体として存在していることが報告されているものの、多量体化による mTORC1 不活性化はこれまでに知られていなかった。mTORC1 についての新奇活性制御機構の一端を見ている可能性もあり、今後解析を行う予定である。並行して、CRY2 タンパク質の利用によりシアン色光で mTOR のホモ多量体化を誘導したときの mTORC1 活性を評価する予定である。首尾よく mTORC1 不活性化が誘導できれば、mTORC1 活性の光操作系として利用できると期待される。

本研究では、mTORC1 活性動態と細胞周期進行の可視化系の構築ならびに mTORC1 活性の光操作系の構築に取り組んだ。多色蛍光イメージング系のセットアップや mTOR ホモ多量体化系の構築など、研究の遂行に必要な基盤の整備に想定以上の時間がかかり、目的(3)で計画していた mTORC1 活性の人為操作および細胞周期進行の計測までは達成することができなかった。今後は、当初の目標であった MEK 阻害剤抵抗性の原理解明について、本研究で構築することができた研究基盤を最大限活用して、取り組んでいく。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Naoki Komatsu, Kenta Terai, Ayako Imanishi, Yuji Kamioka, Kenta Sumiyama, Takashi Jin, Yasushi Okada, Takeharu Nagai and Michiyuki Matsuda, A platform of BRET-FRET hybrid biosensors for optogenetics, chemical screening, and in vivo imaging, Scientific Reports, vol.8, 8984, 2018. 査読有り
DOI: 10.1038/s41598-018-27174-x

Asako Sakaue-Sawano, Masahiro Yo, Naoki Komatsu, Toru Hiratsuka, Takako Kogure, Tetsushi Hoshida, Naoki Goshima, Michiyuki Matsuda, Hiroyuki Miyoshi, and Atsushi Miyawaki, Genetically Encoded Tools for Optical Dissection of the Mammalian Cell Cycle, Molecular Cell, vol.68, 626-640, 2017. 査読有り
DOI: 10.1016/j.molcel.2017.10.001

Takuya Hiratsuka, Takeshi Sano, Hisashi Kato, Naoki Komatsu, Masamichi Imajo, Yuji

Kamioka, Kenta Sumiyama, Fumiaki Banno, Toshiyuki Miyata and Michiyuki Matsuda, Live imaging of ERK and PKA activities during thrombus formation in transgenic expressing biosensors based on Förster resonance energy transfer, Journal of Thrombosis and Haemostasis, vol.15, 1487-1499, 2017. 査読有り
DOI: 10.1111/jth.13723

Chunjie Li, Ayako Imanishi, Naoki Komatsu, Kenta Terai, Mutsuki Amano, Koza Kaibuchi and Michiyuki Matsuda, A FRET biosensor for ROCK based on a consensus substrate sequence identified by KISS technology, Cell Structure and Function, vol.42, 1-13, 2017. 査読有り
DOI: 10.1247/csf.16016

〔学会発表〕(計1件)

小松 直貴, 癌細胞増殖シグナルのライブイメージング、(招待講演)、理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 XI」、2019年3月28日、国立研究開発法人理化学研究所、埼玉

〔図書〕(計2件)

Toru Hiratsuka and Naoki Komatsu, Single Cell Live Imaging, Single Cell Methods (Part of the Methods in Molecular Biology series (vol.1979)) (SpringerNature), 409-421, 2019.

坂上 - 沢野朝子、小松直貴、宮脇敦史
細胞周期の可視化と自動追尾
実験医学(羊土社), vol.36, No.11 1913-1920, 2018.

〔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】

細胞周期の間期(G1・S・G2)を3色で識別する技術の開発
http://www.riken.jp/pr/press/2017/20171027_1/

蛍光と発光のハイブリット型バイオセンサー ~ワンステップで蛍光バイオセンサーを発光モードに~
<http://www.fret.lif.kyoto-u.ac.jp/rab/komatsu.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

(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。