

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18359

研究課題名(和文) 抗がん剤耐性獲得過程における細胞集団内不均一性の理解

研究課題名(英文) Understanding heterogeneity within cell population in the process of acquiring anti-cancer drug resistance

研究代表者

間木 重行(MAGI, Shigeyuki)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：90708546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳がん細胞がtamoxifen耐性を獲得する過程において、細胞集団内の「不均一性」が持つ生物学的意義を解明するため、tamoxifenを持続投与した乳がん細胞を1週ごとに分取し、増殖速度評価ならびに1細胞遺伝子発現解析を実施した。細胞増殖は、tamoxifen投与後3-6週にかけて停止するが、6週目以降で再び回復し耐性の獲得が認められた。1細胞遺伝子発現解析の結果、初期応答による不均一性の増大、細胞淘汰による減少、遺伝子変異の蓄積による再増加とみられる変化が観察されただけでなく、異なる性質を持つ2種類の耐性細胞亜集団の出現軌跡が不均一性の背景に存在することが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の薬剤耐性研究においては、実験手法や結果の解釈の容易さから、野生型株と耐性株を比較する研究手法が主流であった。本研究の成果は、従来型研究で見過ごされてきた耐性獲得の途中過程を経時評価することにより、耐性獲得に伴う不均一性の変化、およびその裏側にある細胞亜集団の複数の出現軌跡を見出した点である。この成果は、複数の軌跡を同時に遮断することで耐性細胞の出現を抑制する新たな治療法の確立につながり、学術的にも社会的にも大きな意義を持つと思われる。

研究成果の概要(英文)：In order elucidate the biological significance of heterogeneity within the cell population in the process of breast cancer cells acquiring tamoxifen resistance, the author examined cell growth assay and single cell gene expression analysis with MCF-7 breast cancer cells, that were continuously treated with tamoxifen. Cell growth stopped 3 to 6 weeks after administration of tamoxifen, but recovered again after 6 weeks and acquired resistance. A result of single cell gene expression analysis implied that the heterogeneity within cell population increased due to initial response, then decreased due to cell selection, and finally re-increased due to accumulation of genetic mutations. The author revealed that there exist several trajectories toward to two major subpopulations of resistant cells with different characteristics in the background of the heterogeneity.

研究分野：システム生物学

キーワード：乳がん 薬剤耐性 1細胞解析

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) がんの治療薬に対する耐性の獲得は、がん治療を困難にする原因のひとつである。細胞集団内で薬剤抵抗性を持つ細胞が出現する原因は、主に腫瘍内の遺伝的変異の不均一性とダーウィン進化様の適応現象によると考えられている。一方で近年、クロマチン制御による遺伝子発現の変化や、細胞集団に元から存在する分子の活性化度の不均一性など、非遺伝的な要因が薬剤耐性の引き金となりうるということが報告され始めていた。

(2) がん細胞が抗がん剤という外的ストレスを経て耐性細胞に変化する一連の過程は、ある一つの安定な状態から、不安定な状態を経て別の安定な状態へと遷移する現象として理解できる。従来の薬剤耐性研究においては、実験手法や結果の解釈の容易さから、野生型株と耐性株の比較、すなわち始点と終点の安定状態を比較する研究手法が主流であった。そのため、抗がん剤耐性が獲得される過程において、どの分子がどのタイミングで不安定になり、不均一に応答することが重要であるかを議論する為のデータや研究報告は殆ど行われていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究は、エストロゲン受容体陽性乳がん細胞が抗エストロゲン薬 tamoxifen に対する耐性を獲得する過程において、細胞集団内のばらつき (=不均一性) が持つ生物学的意義の解明を目的として実施した。上記研究結果を通じて、今まで見過ごされてきた耐性獲得過程において薬剤耐性に関わる分子群と薬剤耐性獲得機構の関係性を明らかにし、抗がん剤耐性克服に寄与する知見の取得を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験機器

ハイコンテツイメーシング装置は、GE Healthcare 社の InCell Analyzer 2000 (理化学研究所在籍時)、および InCellAnalyzer 2500 (大阪大学在籍時) を使用した。細胞集団レベルの RNA シークエンスは東京大学鈴木穰博士の保有する Hiseq 2500 (Illumina) を使用した。1細胞 RNA 発現解析は、大阪大学微生物病研究所ゲノム解析室の保有する ICELL8 シングルセルシステム (Takara) ならびに Hiseq 3000 (Illumina) を利用した。フローサイトメータは FACSCanto II (BD Bioscience) を使用した。

#### (2) 細胞培養・耐性獲得過程の細胞取得・細胞増殖評価

ヒト乳がん由来細胞株 MCF-7 細胞は、10% Fetal Bovine Serum および 1% penicillin/streptomycin を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (以下 培養用培地と表記) を用いて、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の恒温培養器内で維持した。耐性細胞の作成は、1 μM tamoxifen を添加した培養用培地中で MCF-7 細胞を培養することにより作成した。Tamoxifen 添加をはじめて 1 週間ごとに細胞を回収し、下記の各種実験に使用した。各週の細胞増殖速度は、継代時の細胞カウントによって計測した。

#### (3) 免疫染色・1細胞画像解析

MCF-7 細胞をイメーシング用 96 ウェルプレートに播種し、翌々日に細胞を固定した。蛍光免疫染色法により目的のタンパク質を染色後、DAPI 試薬を用いて核染色を行なった。その後、ハイコンテツイメーシング装置を用いて、蛍光画像ならびに明視野画像を撮影した。得られた画像データから細胞領域・核領域のセグメンテーションならびに 1 細胞あたりの蛍光強度の算出は、Developer toolbox (GE Healthcare) を用いて実行した。

#### (4) 細胞周期解析

耐性細胞の細胞周期は固定細胞の propidium iodide (PI) 染色にて行なった。トリプシン処理によって回収した細胞を 80%エタノールで固定後、PI 染色を行い、フローサイトメータによって蛍光強度を測定した。測定データから FlowJo (BD Bioscience) を用いて各細胞周期ステージの割合を算出した。

#### (5) RNA 発現解析 (細胞集団レベル)

MCF-7 細胞に tamoxifen を持続暴露し、1 週経過毎 12 週までの細胞の遺伝子発現解析を行なった。各細胞から RNA を抽出し、ライブラリを調整後、36 bp のシングルリードにてシークエンシングを行なった。得られた生データから各遺伝子発現量を算出し、遺伝子発現の差異および発現変動遺伝子の機能を解析した。

#### (6) RNA 発現解析 (1細胞レベル)

MCF-7 細胞に tamoxifen を持続暴露し、9 週までの細胞を 3 週経過ごとに分取し、1 細胞遺伝子発現解析を行なった。ライブラリを調整後、100 bp のペアエンドにてシークエンシングを行なった。得られた生データから各遺伝子発現量を算出し、①細胞集団内のサブポピュレーション②耐性細胞の遷移軌跡③細胞の遷移に重要な転写因子を推定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Tamoxifen 暴露による細胞の表現型・遺伝子発現変化

はじめに、tamoxifen 暴露による MCF-7 細胞の表現型および遺伝子発現の変化を評価した。耐性獲得過程の細胞の増殖率および細胞周期を測定したところ、tamoxifen 投与後 6 週後には G1 期停止によって細胞の増殖が完全に停止したが、投与後 6 週以降で増殖が部分的に回復したことから、上記の期間に tamoxifen 耐性が獲得されたことが示唆された (図 1)。また、細胞増殖立の回復に伴い、進展した仮足を呈する細胞の割合が優位に増加していたことから、仮足形成と tamoxifen 耐性の間に何らかの関連性があることが示唆された。

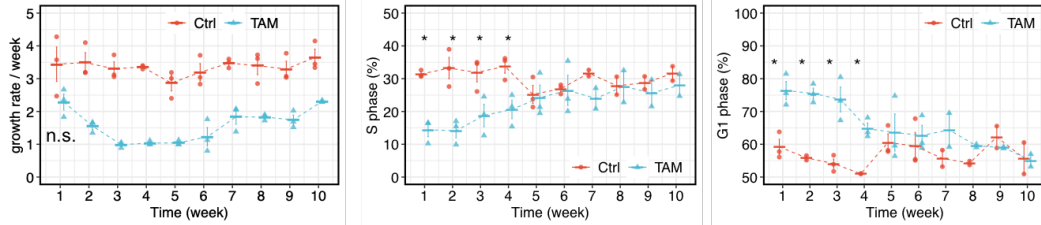


図 1. Tamoxifen 持続投与が細胞増殖・細胞周期に与える影響

続いて、薬剤耐性獲得への関与が予測される分子を遺伝子発現解析により調査した。Tamoxifen の経時投与によって発現量が変化する遺伝子は、6 パタンに大別された (図 2)。細胞増殖や DNA 修復に関与する遺伝子群の多くは tamoxifen 投与後急速に減少し、5 週目以降で回復するパターンを示す cluster B に含まれていた。この結果は、図 1 に示した細胞増殖能力の変化と関連していた。

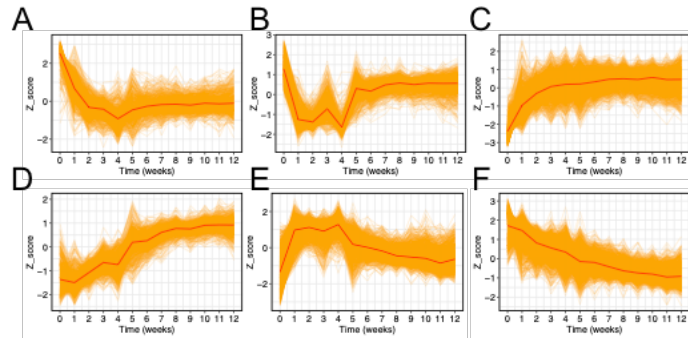


図 2. Tamoxifen 持続投与による遺伝子発現変化

一方で、エストロゲン受容体シグナルによって発現が制御される遺伝子群の多くは cluster F に属していたことから、tamoxifen のエストロゲン受容体アンタゴニスト活性が持続投与実験中も保持されていたことに加え、cluster B に属する遺伝子発現量の回復はエストロゲン受容体非依存的に誘導されたことが示唆された。遮断されたエストロゲン受容体シグナルの代替経路の候補として、早期に上昇する TGF $\beta$ -SMAD 経路 (cluster C) ならびに遅れて上昇する解糖系代謝経路や MAPK 経路 (cluster D) が挙げられた。Cluster E は cluster B と逆の反応をする遺伝子群であり、インターフェロン経路、FOXO 経路、およびオートファジー関連分子が含まれていた。これら分子群の一過적発現増加は、薬剤耐性獲得前後の細胞のみを比較しても観察出来ない現象であり、薬剤耐性獲得過程の細胞選別ならびに環境適応に寄与している可能性が大いに考えられた。

##### (2) 薬剤耐性獲得過程の不均一性解析

各 Cluster から 10 程度の遺伝子を抜き出し、リン酸化修飾などを含めて約 60 種類の分子の 1 細胞相対強度をハイコンテツイメーキングおよび蛍光免疫染色により評価した。Tamoxifen 投与 3 週後におけるリン酸化 Akt および基質である FOXO3 のリン酸化 (不活性型) 量が減少し、Gini 係数や変動係数などの不均一性を表す指標が増大する結果が得られた。しかしながら、上述のような Tamoxifen 耐性獲得過程で発現が不均一になる分子を他に同定することができず、耐性獲得過程で脆弱になる分子ネットワークの推定が困難な状況となった。そのため、ハイコンテツイメーキングを主軸とした研究計画を変更し、1 細胞遺伝子発現解析を行うことによって当初の研究目的の達成を試みた。

##### (3) 薬剤耐性獲得過程の 1 細胞・時系列解析

Tamoxifen 持続投与 0, 3, 6, 9 週の合計 1104 細胞を分取し、1 細胞遺伝子発現解析を行なった。初めに、各週の細胞集団内の遺伝子発現パターンの相関を評価したところ (図 3)、0 から 3 週にかけて細胞集団内の相関が低下していた。これはすなわち、細胞集団内の不均一性が増大したことを意味する。3 週から 6 週にかけて不均一性は一度低下するが、6 週目以降で再び不均一性が増大していた。この一連のデータは、tamoxifen に対する初期応答性の違いがもたらす一過的な多様性の出現フェーズ (0-3 週)、続いて起こるであろう tamoxifen 存在下で増殖能力を持つ細胞の自然選択フェーズ (3-6 週)、さらに続く遺伝子変異の蓄積による細胞多様性の誘導フェーズ (6-9 週) を反映している可能性が考えられた。

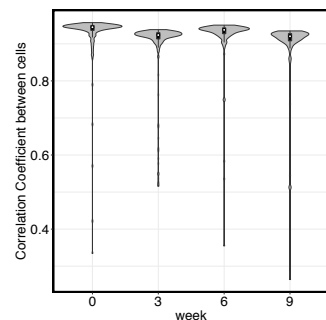


図 3. 遺伝子発現量の細胞集団内相関

続いて、各細胞の遺伝子発現量ベクトルを UMAP に基づき 3 次元に落とし込み、細胞変化の軌跡解析およびクラスター分類を行なった (図 4)。その結果、tamoxifen 耐性を獲得した 9 週の細胞は cluster 3, 4, 5 と 7, 8 のグループとの 2 群に枝分かれていること、3 週の時点で出現する cluster 2 の細胞は週を追うごとに淘汰されている細胞群であることが示唆された。各 cluster の細胞機能の違いをエンリッチメント解析により推定したところ、cluster 3, 4, 5 に属する細胞は酸化的リン酸化と解糖系代謝が高いがん幹細胞に似た性質を持つ一方で、cluster 7, 8 に属する細胞はヒストン脱メチル化酵素の発現量が高く、間葉系の細胞に分化した性質を持つことが示唆された。最後に、2 種類の耐性細胞の出現に寄与する制御分子を、細胞遷移軌跡上で発現が変動する遺伝子の上流パスウェイ解析によって推定したところ、前者の耐性細胞出現には PML1 や TAF1 が、後者の耐性細胞の出現にはヒストン脱メチル化酵素である KDM5B やアンドロゲン受容体 (AR) が重要であることが推定された。以上の結果から、同じ培養条件で tamoxifen を持続投与しても複数の耐性細胞集団が出現すること、ならびにその出現過程の軌跡が明らかになった。本研究の成果によって、枝分かれした複数の遷移過程に重要な分子を同時に阻害することで耐性細胞の出現を抑制できる可能性が見出された。

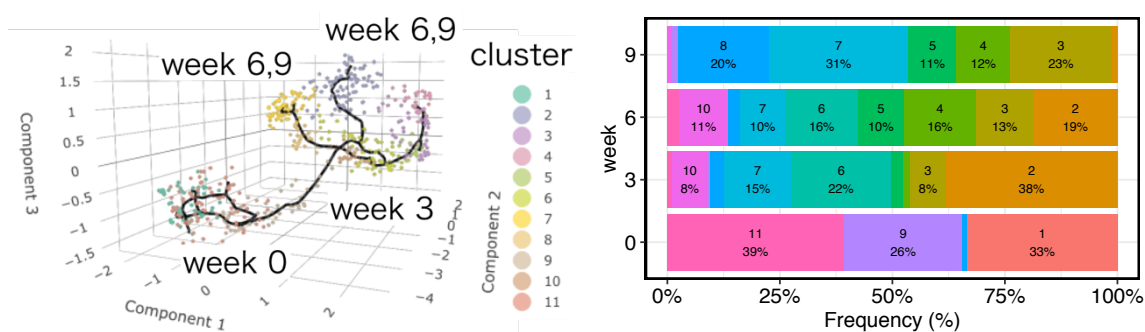


図 4. Tamoxifen 経時投与過程の 1 細胞解析

(左) 細胞内小集団 (クラスター) および細胞変化軌跡の推定結果

(右) 各週のサブポピュレーションの割合変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Magi Shigeyuki, Iwamoto Kazunari, Okada-Hatakeyama Mariko	4. 巻 2
2. 論文標題 Current status of mathematical modeling of cancer ??From the viewpoint of cancer hallmarks	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Current Opinion in Systems Biology	6. 最初と最後の頁 39 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.02.008">https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.02.008</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masunaga Hiroyuki, Sugimoto Yurie, Magi Shigeyuki, Itasaki Ryunosuke, Okada-Hatakeyama Mariko, Kurata Hiroyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Robustness analysis of the detailed kinetic model of an ErbB signaling network by using dynamic sensitivity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0178250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0178250	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Magi Shigeyuki, Iwamoto Kazunari, Yumoto Noriko, Hiroshima Michio, Nagashima Takeshi, Ohki Rieko, Garcia-Munoz Amaya, Volinsky Natalia, Von Kriegsheim Alexander, Sako Yasushi, Takahashi Koichi, Kimura Shuhei, Kholodenko Boris N., Okada-Hatakeyama Mariko	4. 巻 293
2. 論文標題 Transcriptionally inducible Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1, attenuates ErbB receptor activity by inhibiting receptor oligomerization	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 2206 ~ 2218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.778399	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Imoto H, Ebata K, Magi S, Zhang S, Okada M
2. 発表標題 A comprehensive model of heterogeneous cell cycle responses
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 間木重行, 奇世媛, 鶴飼正雄, 鈴木 穰, 岡田眞里子
2. 発表標題 時系列・一細胞解析による抗がん剤耐性獲得過程の理解
3. 学会等名 日本バイオインフォマティクス学会 2019年年会・第8回生命医薬情報学連合大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 間木 重行
2. 発表標題 時系列・一細胞解析による抗がん剤耐性獲得過程の理解
3. 学会等名 新学術領域研究「数理シグナル」第3回 若手ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 間木 重行
2. 発表標題 時系列・一細胞解析から見える抗がん剤耐性獲得過程
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー 「がん研究の新機軸」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 間木 重行
2. 発表標題 オートファジーが関与する抗がん剤耐性獲得過程の数理モデル解析
3. 学会等名 令和元年「数理シグナル」領域推進会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Imoto H, Ebata K, Zhang S, Magi S, Okada M
2. 発表標題 Model-based identification of ErbB network principles among cell types
3. 学会等名 The 20th International Conference of Systems Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michida H, Ando M, Magi S, Okada M
2. 発表標題 A NF- B - p38 MAPK crosstalk shapes oscillatory gene expression
3. 学会等名 The 20th International Conference of Systems Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Dominguez-Huttinger E, Magi S, Antonia A, Ortiz O., Ramirez A.R., Okada M
2. 発表標題 A hybrid mathematical model for design and optimization of tamoxifen treatment in MCF-7 breast cancer cells
3. 学会等名 The 20th International Conference on Systems Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Zhang S, Magi S, Okada M
2. 発表標題 Crosstalk between the estrogen receptor and ErbB signaling pathways in breast cancer cells
3. 学会等名 the 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigeyuki Magi
2. 発表標題 Understanding negative feedback mechanism of ErbB signaling using mathematical modeling of cell population dynamics
3. 学会等名 Frontiers of Multiscale Structural Biology: Order-disorder transitions and dynamic membrane interactions (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 間木重行
2. 発表標題 乳がん細胞におけるタモキシフェン耐性獲得過程の時系列解析
3. 学会等名 大阪大学大学院医学系研究科 第11回 若手研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shigeyuki Magi, Yutaka Suzuki, Mariko Okada
2. 発表標題 Time-series analysis on the process of acquiring tamoxifen resistance in breast cancer cells
3. 学会等名 日本癌学会 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 間木重行
2. 発表標題 乳がん細胞におけるタモキシフェン耐性獲得過程の時系列解析
3. 学会等名 新学術領域「代謝統合オミクス」第一回若手合宿
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Shigeyuki Magi, Sewon Ki, Masao Ukai, Yutaka Suzuki, Mariko Okada
2. 発表標題 Time-series analysis on the process of acquiring tamoxifen resistance in breast cancer cells
3. 学会等名 日本分子生物学会 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shigeyuki Magi
2. 発表標題 Time Series Analysis on the Process of Acquiring Resistance for Estrogen Receptor Antagonist in Breast Cancer Cells
3. 学会等名 3rd Symposium on Complex Biodynamics + Networks (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 間木重行
2. 発表標題 シグナルの定量解析と数理モデルによる分子制御機構の同定
3. 学会等名 生化学会近畿部会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 間木重行 奇世媛 鶴飼正雄 鈴木穰 岡田真里子
2. 発表標題 乳がんの内分泌療法抵抗正獲得過程の時系列解析
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 間木重行
2. 発表標題 乳がん細胞におけるタモキシフェン耐性獲得過程の時系列解析
3. 学会等名 第一回がんと代謝研究会・若手の会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----