

令和 6 年 10 月 23 日現在

機関番号：32653

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2023

課題番号：17KK0201

研究課題名（和文）イメージング解析によるEGFR阻害剤耐性がん細胞の発生機構解明

研究課題名（英文）Imaging analysis for emergence of EGFR inhibitor-resistant cancer cells

研究代表者

田邊 賢司（Tanabe, Kenji）

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80423341

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 2ヶ月

研究成果の概要（和文）：均質な細胞集団から薬剤耐性細胞が発現することに着目し、細胞のおかれた環境や内部状態から薬剤に対する応答の違いを推測することを目的とした。主に蛍光免疫染色を用いて同一細胞内の数十種類の分子を可視化し、画像解析を用いて分子の発現量や局在を定量化する系を確立した。細胞の集団環境と併せて各々の細胞の特徴づけを行い、薬剤暴露時の応答の予測を試みた。応答予測は現在も解析中だが、本研究によって単一細胞から多数の分子の発現と局在、細胞の環境を定量化する系の確立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立した数十の分子を一細胞において可視化する技術は他の多くの研究に活用できる。特に本研究でも実施した化合物ライブラリーのスクリーニングは創薬分野において重要なアプローチであり、両者を組み合わせることで新たなスクリーニング技術が開発できる。本研究を基盤にした、分子の空間的情報を含めた一細胞解析は産学両分野への新たな展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study focused on the single cell heterogeneity in cell population that arise Drug Tolerant Persister cells (DTPs), and tried to predict the emergence of DTPs by measuring the cellular intrinsic factor, such as protein expression and localization, and extrinsic factor. Using immunofluorescent imaging, dozens of proteins and molecules were visualized in same cells, and quantitatively analyzed. We are now trying to predict the cellular responses, but using this study, we have successfully constructed a workflow to obtain spatial information of dozen of molecules from a single cell.

研究分野：細胞生物学

キーワード：画像解析 薬剤耐性 化合物スクリーニング 一細胞解析

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、研究者個人に帰属します。

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子受容体 (EGFR) は、リガンド刺激によって細胞内シグナル伝達を活性化し、細胞増殖等を促す受容体型チロシンキナーゼの一つである。EGFR シグナルの異常は多くのがんで見つかっており、関連阻害剤が抗がん剤として広く利用されているが、阻害剤耐性細胞の発現が完全寛解に向けた問題となっている。このような薬剤耐性細胞の発現様式は大きく二つに分類される。一つは薬剤の暴露前に存在する耐性変異を有した細胞が増殖する場合、もう一つは薬剤暴露後に新たに変異を獲得する場合である。前者の場合は適切な薬剤を用いることで対応できるが、後者の場合、薬剤暴露時にその耐性機構を予測することは困難である。このような薬剤暴露後に発現する耐性細胞の発現機構として、遺伝子変異を伴わない一時的な薬剤耐性細胞 (Drug Tolerant Persisters, DTPs) の発現が報告されている。DTPs は後に多様な遺伝子変異を獲得するため、その発現機構を解明することが癌の完全寛解に向けた重要な課題となる。一方、DTPs は均質な細胞集団から出現することが知られている。このような均質な細胞集団に見られる異なる細胞応答は以前から知られているが、その機構を解析する手法や有効性が確認されたのはつい最近のことである。そのような細胞間の変動がどこまでが確率的なもので、どこまでが細胞の状態・環境によって決まるのかはわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では薬剤耐性細胞 DTPs が均質な細胞集団から発生する過程に着目し、個々の細胞が持つ特徴をタンパク質レベルで解析し、将来薬剤耐性を示す細胞と示さない細胞の違いを明らかにする。さらに各細胞がおかれた環境 (周辺の細胞との密集度など) も評価することで、個々の細胞の内部状況と外部環境を考慮した細胞の特徴づけが可能となる。細胞応答のばらつきには確率論的なものと決定論的なものが含まれるが、一部の細胞応答はタンパク質の空間的配置や集団環境によって説明できることが既に報告されている。本研究では、薬剤耐性という医学的にも重要な細胞応答について、どこまで予測可能なかを明らかにする。本研究により、薬剤耐性を獲得する細胞の特徴とその機構の一端が明らかになり、本研究を基盤に耐性細胞の発現を抑える手法の提案につながることを期待される。

3. 研究の方法

EGFR 変異体などを発現する細胞株数種に EGFR 受容体阻害剤やその他薬剤処理を行い、DTPs 発現を誘導する。薬剤添加前の細胞について、細胞内小器官のマーカーや関連するシグナル伝達分子など数十種類を同一細胞で可視化し、その発現量や局在を定量的に評価する。定量化にはハイコンテントアナリシスの手法を用いて1条件につき500個以上の細胞を解析した。細胞を核、細胞質などいくつかの領域に分割し、各々の領域におけるタンパク質の発現量や分布を定量化することでタンパク質の位置情報を付加した。まず始めに薬剤耐性細胞の発現系として、肺がん由来細胞 PC-9 細胞と EGFR 阻害剤による DTPs 発現系を用いた。本実験系は DTPs の発現に頻繁に用いられており、いくつかの重要なタンパク質も報告されている。均質な細胞集団を再現するため、PC-9 細胞を単一の細胞から培養し、遺伝的バックグラウンドに差がない集団を作製した。その後、EGFR 阻害剤を添加し DTPs を誘導した。

細胞内タンパク質の発現量や局在を観察する一般的な手段として、蛍光免疫染色法が用いられるが、一般的な手法では観察できる分子種は3~4種類に限られる。より多くのタンパク質を解析することで細胞の詳細な状態を評価できるため、本研究では繰り返し蛍光免疫染色法を応用し、合計40種類以上の分子を解析した。解析対象とする分子には、細胞の内部構造を観察するためのマーカー分子や、阻害剤添加により活性化あるいは不活性化すると思われるシグナル伝達分子を含めることで細胞の状態と細胞応答の関係を詳細に解析した。染色ごとに細胞画像の撮影を行い、全ての染色・撮影が終了した後に細胞画像を重ね合わせ、多重染色画像を作成した。得られた画像からディープラーニングを用いて細胞核と細胞体のセグメンテーションを行い、各シグナルを定量化することで細胞の特徴抽出をおこなった。

4. 研究成果

均質な細胞集団から DTPs が発現する系を樹立した。肺がん由来 PC-9 細胞を単一細胞に分離し、遺伝的に同一な細胞集団を作製し、EGFR 阻害剤を加えることで DTPs を誘導した。多くの細胞が死滅する一方、一部の細胞が DTPs として生存する (図1 矢印)。

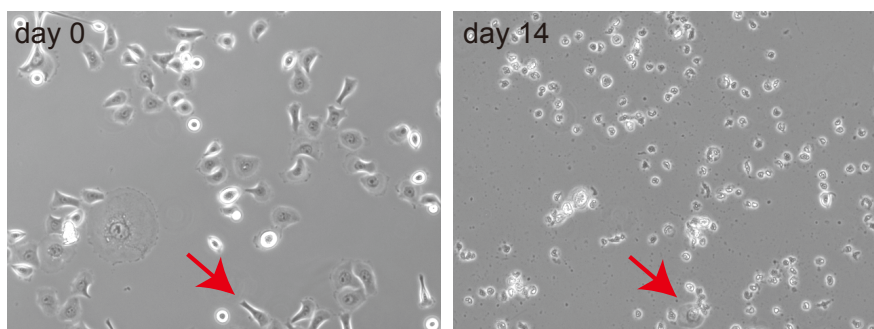


図1 薬剤添加による DTPs の発現
一部の細胞 (赤矢印) が薬剤添加14日後に生存し DTPs となっている。

本実験系を用いて細胞内分子の可視化を行い、細胞の特徴づけを進めた。細胞内分子の可視化には主に蛍光免疫染色法を用いて、染色・撮影後に抗体を変性させることで除去し、新たな免疫染色をおこなった。これを繰り返すことで40種類以上の分子を同一細胞で観察できる。同時に細胞の集団環境を定量化し、細胞内だけでなく細胞周囲の環境も考慮した特徴づけをおこなう(図2)。

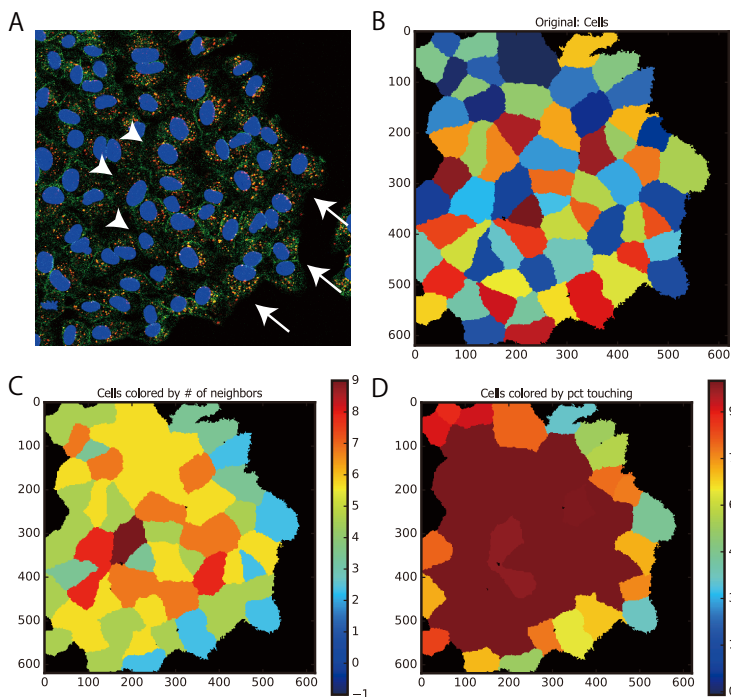


図2 細胞集団環境の定量化
細胞はその周辺環境によって応答が変化する。細胞が疎な場所(矢印)に比べ、密な場所(矢頭)では蛍光リガンドの取り込みが少ない(A)。画像解析によって個々の細胞を認識させ(B)、接触している細胞の数(c)や比率(D)によって分類することで集団環境を抽出する。

上記実験系と並行して、細胞の特徴量に変化をもたらす既知薬理活性化合物のスクリーニングを進めた(図3)。FDA承認薬を含む8,500種類の化合物を用いて薬剤暴露時の細胞表現型を解析し、細胞内小器官などの形態に影響を及ぼす化合物を同定する。

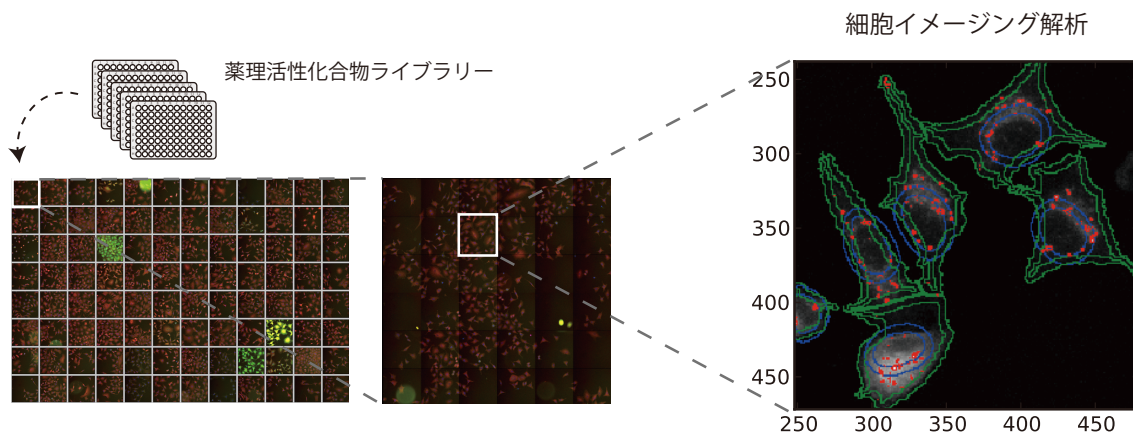


図3 細胞集団環境の定量化

標的分子が既知の薬理活性化合物ライブラリーを用いて細胞の表現形に及ぼす影響を定量的に評価する。

現在は上記実験系で得られた結果の解析と並行して他の細胞種、薬剤を用いた系を進めている。今後は解析を順次進めるとともに、本研究で得られた手法を用いて創薬開発にもつなげていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanabe Kenji	4. 巻 -
2. 論文標題 Image-based phenotypic profiling of a chemogenomic screening library identifies novel druggable targets in the EGFR-pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.04.16.440090	査読の有無 無
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 Kurokawa Yuna, Konishi Rikako, Yoshida Akane, Tomioku Kanna, Futagami Taiki, Tamaki Hisanori, Tanabe Kenji, Fujita Akikazu	4. 巻 1864
2. 論文標題 Essential and distinct roles of phosphatidylinositol 4-kinases, Pik1p and Stt4p, in yeast autophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 1214 ~ 1225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbalip.2019.05.004	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 Shirai Yoko, Miura Kenichiro, Ishizuka Kiyonobu, Ando Taro, Kanda Shoichiro, Hashimoto Junya, Hamasaki Yuko, Hotta Kiyohiko, Ito Naoko, Honda Kazuhiko, Tanabe Kenji, Takano Tomoko, Hattori Motoshi	4. 巻 105
2. 論文標題 A multi-institutional study found a possible role of anti-nephrin antibodies in post-transplant focal segmental glomerulosclerosis recurrence	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 608 ~ 617
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.kint.2023.11.022	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 Aker Eilma, Tasaki Yukihiro, Mori Yusuke, Nakai Kazuki, Hachiya Kazuki, Lin Hancheng, Konno Masamitsu, Kamasaki Tomoko, Tanabe Kenji, Umeda Yumi, Yamano Shotaro, Fujita Yasuyuki, Kon Shunsuke	4. 巻 40
2. 論文標題 Non-degradable autophagic vacuoles are indispensable for cell competition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111292 ~ 111292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.111292	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 田邊賢司	4. 巻 55
2. 論文標題 イメージング解析による細胞表現型と集団環境の定量化	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 456-458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Kenji Tanabe
2. 発表標題 Image-based phenotypic profiling of a chemogenomic screening library identifies novel druggable targets in the EGFR-pathway
3. 学会等名 Cell Bio 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenji Tanabe
2. 発表標題 High content analysis with unsupervised machine learning to reveal a novel druggable target of EGFR pathway
3. 学会等名 CYT02019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Tanabe
2. 発表標題 Image-based phenotypic profiling of a chemogenomic screening library identifies novel targets of known inhibitors.
3. 学会等名 American Association for Cancer Resaearch 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ペルクマンス ルーカス (Pelkmans Lucas)	チューリッヒ大学・分子生命科学・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スイス	チューリッヒ大学			