

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：72609

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16758

研究課題名（和文）マルチカラー画像解析を用いた薬剤耐性クローンの出現に寄与する腫瘍内微小環境の探索

研究課題名（英文）Analysis of the tumor microenvironment that contributes to the emergence of drug-resistant clones by multi-color fluorescent imaging

研究代表者

宮崎 允（Miyazaki, Makoto）

公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・研究員（移行）

研究者番号：20804131

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）：肺がんを含む様々ながんにおいて、薬剤耐性獲得が治療上の問題となっている。がん細胞がどのような環境下で薬剤耐性を獲得するかについては不明な点が多い。本研究では、マルチカラー蛍光イメージングにより、腫瘍内において、どのような環境下で薬剤耐性クローンが出現するかを明らかにすることを目的とした。まず、RGBマーキング法を用いて肺がん細胞株の標識を行った。さらに、標識した肺がん細胞株を間質細胞と共培養すると、ALK阻害剤感受性が低下することを確認した。今後、本研究により作成した細胞を用いることで、薬剤耐性クローンの出現に寄与する微小環境の探索が可能となると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療において問題となっている、がん細胞による薬剤耐性獲得を克服するためには、その詳細な分子メカニズムを理解することが重要である。これまでに、薬剤耐性獲得に寄与する遺伝子変異や細胞内シグナルについての研究が行われている。一方で、薬剤耐性クローンが腫瘍内のどのような環境で出現するかについては不明な点が多い。本研究で作成した細胞を用いることで、腫瘍内における薬剤耐性クローンの出現環境について新たな知見が得られることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Drug resistance has become a therapeutic obstacle in various cancers, including lung cancer. In this study, we aimed to reveal the microenvironment in which drug-resistant clones emerge in tumors by multicolor fluorescent imaging. First, we labeled the lung cancer cell lines by RGB marking. Furthermore, we confirmed that the sensitivity to ALK inhibitors was reduced when the labeled lung cancer cell lines were co-cultured with stromal cells. We have successfully generated cells that allow us to search for the microenvironment that contributes to the emergence of drug-resistant clones.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：マルチカラー蛍光イメージング 薬剤耐性 腫瘍内微小環境

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の生存や増殖は、遺伝子変異等により異常に活性化したがん遺伝子に依存していることが知られている。近年、次世代シーケンシング技術(NGS)等の発達により、患者の腫瘍におけるゲノム異常を調べることで、それぞれの患者に適した分子標的薬の選択が可能となってきたが、分子標的薬に対する耐性の獲得が治療において大きな問題となっている。腫瘍内でがん細胞は二次変異の獲得、間質細胞との相互作用など様々な機構を介して薬剤耐性を獲得するため、申請者を含む多くの研究グループによりその回避方法等が提案されている(引用文献①)。がん細胞の薬剤耐性獲得機構については多数の研究が行われている一方で、腫瘍内の「どこで」薬剤耐性クローンが出現しているかについては不明な点が多い。がん細胞は間質細胞の影響を受けて薬剤耐性を獲得することが報告されていることから、腫瘍内部の間質細胞の密度や血管の密度等の様々な腫瘍内微小環境の違いにより、薬剤耐性クローンが出現しやすい環境が存在することが予想される。このことから、腫瘍内で薬剤耐性クローンの出現に寄与するがん微小環境を同定できれば、そのようながん微小環境を標的とした薬剤耐性獲得を抑制する新たな治療法の開発に繋がると予想される。

本研究では、申請者はこれまでにがん細胞の ALK 阻害剤耐性に関する研究を行ってきたこと、EML4-ALK 陽性肺がん細胞では、間質細胞との相互作用により ALK 阻害剤に対し耐性を獲得することが *in vitro* の実験において示されていること(引用文献②)、以上2点を踏まえて、EML4-ALK 陽性肺がん細胞における薬剤耐性クローンの出現に焦点をあてて解析を行うこととした。

本研究では腫瘍内において空間情報を保持したまま各細胞クローンの増殖を解析するために、RGB マーキング法を応用したマルチカラー蛍光イメージングを用いることとした。これまでに細胞系譜追跡技術としては主に DNA バーコード法と BRAINBOW 法が知られているが、前者では空間的情報の解析は不可能であり、後者では同時に観察できるクローン数が限定的であった。本研究で用いる RGB マーキング法は、何百種類もの細胞クローンについて空間情報を保持したまま観察することが可能な点で他の手法に比べ優位であると考えた。このような特徴を持つ RGB マーキング法を用いることで初めて腫瘍内において多様なクローンの増殖が解析可能となると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がん細胞の薬剤耐性獲得について腫瘍内の空間的情報に着目し解析を行い、薬剤耐性クローンが出現するがん微小環境の特徴を明らかにすることである。本研究では、蛍光タンパク質により様々な色で標識したがん細胞をマウスに移植し、薬剤投与後の腫瘍組織を多色蛍光イメージングにより解析することで、薬剤耐性細胞の出現環境について明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

①RGB マーキング法による EML4-ALK 陽性肺がん細胞(H3122 細胞および H2228 細胞)の蛍光標識
細胞に3種類の蛍光タンパク質(dTomato, mVenus, mTFP1)を発現させるためのコンストラクトを作成する。この際、画像解析において細胞のセグメンテーションを容易にするために、蛍光タンパク質に核移行シグナルを付加する。作成したコンストラクトを用いてレンチウイルスを作成し、がん細胞(H3122、H2228)に3種類の蛍光タンパク質遺伝子を導入する。蛍光タンパク質遺伝子を導入した細胞(RGB細胞)について、蛍光顕微鏡を用いてマルチカラー蛍光イメージングを行う。

②*in vitro* において間質細胞が ALK 阻害剤感受性に与える影響の検討

①で作成した RGB 細胞について、*in vitro* でヒト肺由来正常線維芽細胞(MRC-5)および肺微小血管内皮細胞(HMVEC-L)との共培養による ALK 阻害剤感受性への影響を検討する。RGB 細胞を単独あるいは MRC-5 細胞または HMVEC-L 細胞と共に 96 ウェルプレートへ播種し、ALK 阻害剤(アレクチニブ)処理で2日間処理する。細胞を溶解バッファー処理し、プレートリーダーで蛍光を測定することで、RGB 細胞数を定量する。

③皮下移植モデルの腫瘍における薬剤耐性クローン出現の観察

①で作成した細胞について、ヌードマウス皮下に移植を行い、薬剤耐性クローン出現の観察を試みる。RGB 細胞の皮下移植については、MRC-5 細胞および HMVEC-L 細胞との共移植も実施する。腫瘍形成後に ALK 阻害剤の投与を行い、経時的に腫瘍体積を測定することで阻害剤の効果を評価する。マウスから腫瘍を摘出し固定後に凍結切片を作成する。蛍光顕微鏡を用いてマルチカラー蛍光イメージングを行い、腫瘍内の薬剤耐性クローンを探索する。画像解析ソフト(ImageJ)と統計解析ソフト(R)を腫瘍内におけるクローンの存在比を定量する。

④免疫組織染色と画像解析によるがん微小環境の定量的評価

③で得られた腫瘍組織切片について、線維芽細胞および血管内皮細胞に対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、腫瘍組織における局在を調べる。さらに、蛍光顕微鏡によるマルチカラー蛍光イメージングを行うことで、RGB細胞の局在も同時に調べる。取得した画像について、ImageJにより解析を行い、腫瘍組織中における間質細胞の密度や使用する抗体については、MRC-5細胞およびHMVEC-L細胞を用いて特異性を確認する。

4. 研究成果

まず、RGBマーキング法によるEML4-ALK陽性肺がん細胞(H3122, H2228)の蛍光標識を行った。既にレンチウイルスを用いて複数の蛍光タンパク質遺伝子を導入するコンストラクトを作成していたが、腫瘍組織の画像解析において細胞のセグメンテーションを容易にするための改変を行った。具体的には、3種類の蛍光タンパク質(dTomato, mVenus, mTFP1)のN末端にSV40由来核移行シグナル、C末端にc-myc由来核移行シグナルを付加した。PCRにより核移行シグナルを付加した蛍光タンパク質遺伝子を増幅し、pCDH-EF1-MCS-IRES-puroベクターに挿入した。このような改変により蛍光タンパク質の局在が核に限定されるため、細胞同士の区別が容易になることが期待された。作成したコンストラクトを用いてレンチウイルスを産生し、H3122細胞およびH2228細胞に3種類の蛍光タンパク質遺伝子を導入した(RGB細胞)。蛍光顕微鏡によりマルチカラー蛍光イメージングを行った結果を図1に示す。核移行シグナルの付加により、個々の細胞同士を容易に区別できることがわかった。

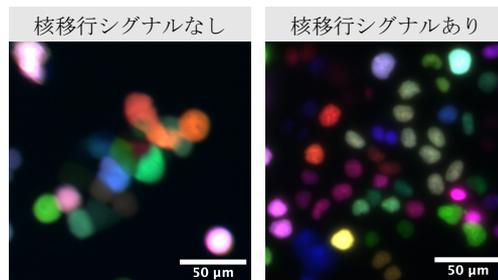


図1、H3122RGB細胞のマルチカラー蛍光イメージング

次に、作成したRGB細胞について、MRC-5細胞またはHMVEC-L細胞と共培養した際のALK阻害剤感受性について検討した。その結果、RGB細胞単独に比べて、MRC-5細胞あるいはHMVEC-L細胞と共培養すると、アレクチニブに対する感受性が低下することを確認した(図2)。

腫瘍組織の免疫組織染色による解析のために、抗体の選定および染色条件の検討を行った。その結果、抗alpha-SMA抗体および抗CD31抗体をそれぞれ線維芽細胞および血管内皮細胞の検出に使用することとした。

今後、作成したRGB細胞を用いて、皮下移植モデルの腫瘍における薬剤耐性クローン出現の観察およびそれに関連した微小環境の解析を進める。それにより、腫瘍内における薬剤耐性クローンの出現環境について新たな知見が得られることが期待される。

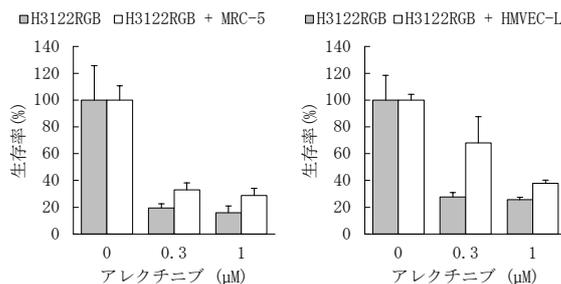


図2、共培養によるALK阻害剤感受性への影響

<引用文献>

- ① Miyazaki M et al., The p53 activator overcomes resistance to ALK inhibitors by regulating p53-target selectivity in ALK-driven neuroblastomas, Cell Death Discov., Vol. 4, 2018, p56
- ② Yamada T et al., Paracrine receptor activation by microenvironment triggers bypass survival signals and ALK inhibitor resistance in EML4-ALK lung cancer cells, Clin. Cancer Res., Vol. 2, 2012, p3592-3602

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 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagamura Yuko, Miyazaki Makoto, Nagano Yoshiko, Yuki Masako, Fukami Kiyoko, Yanagihara Kazuyoshi, Sasaki Kazuki, Sakai Ryuichi, Yamaguchi Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 PLEKHA5 regulates the survival and peritoneal dissemination of diffuse-type gastric carcinoma cells with Met gene amplification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogenesis	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） 10.1038/s41389-021-00314-1	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 Kobayashi T, Miyazaki M, Sasaki N, Yamamuro S, Uchida E, Kawauchi D, Takahashi M, Otsuka Y, Kumagai K, Takeuchi S, Toyooka T, Otani N, Wada K, Narita Y, Yamaguchi H, Muragaki Y, Kawamata T, Mori K, Ichimura K, Tomiyama A	4. 巻 12
2. 論文標題 Enhanced Malignant Phenotypes of Glioblastoma Cells Surviving NPe6-Mediated Photodynamic Therapy are Regulated via ERK1/2 Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3641 ~ 3641
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12123641	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 Nakano Yoshiko, Takadera Mutsumi, Miyazaki Makoto, Qiao Zhiwei, Nakajima Kosei, Noguchi Rei, Oyama Rieko, Kimura Yui, Okuhiro Yuki, Yamasaki Kai, Kunihiro Noritsugu, Fukushima Hiroko, Inoue Takeshi, Hara Junichi, Ozawa Tatsuya, Kondo Tadashi, Ichimura Koichi	4. 巻 34
2. 論文標題 Drug screening with a novel tumor-derived cell line identified alternative therapeutic options for patients with atypical teratoid/rhabdoid tumor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 271 ~ 278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-020-00438-3	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮崎 允、宮本 真吾、柳原 五吉、深見 希代子、山口 英樹
2. 発表標題 Analysis of peritoneally disseminated tumors of scirrhous gastric carcinoma by multicolor fluorescent imaging
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎 允、中坊 彩花、宮本 真吾、柳原 五吉、深見 希代子、山口 英樹
2. 発表標題 マルチカラー蛍光イメージングによるスキルス胃癌腹膜播種機構の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎 允、中坊 彩花、宮本 真吾、柳原 五吉、深見 希代子、山口 英樹
2. 発表標題 マルチカラー蛍光イメージングによるスキルス胃癌腹膜播種巣の形成機構の解析
3. 学会等名 第29回がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎 允、中坊 彩花、宮本 真吾、柳原 五吉、深見 希代子、山口 英樹
2. 発表標題 マルチカラー蛍光イメージングによるスキルス胃癌腹膜播種機構の解析
3. 学会等名 第28回がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎 允、中坊 彩花、宮本 真吾、柳原 五吉、深見 希代子、山口 英樹
2. 発表標題 Multicolor fluorescent imaging analysis of peritoneally disseminated tumors of scirrhus gastric carcinoma
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎 允、中坊 彩花、宮本 真吾、柳原 五吉、深見 希代子、山口 英樹
2. 発表標題 マルチカラー蛍光イメージングによるスキルス胃癌腹膜播種機構の解析
3. 学会等名 2019年度文部科学省新学術領域研究先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎 允、中坊 彩花、宮本 真吾、柳原 五吉、深見 希代子、山口 英樹
2. 発表標題 マルチカラー蛍光イメージングを用いたスキルス胃癌腹膜播種機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019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

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