

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：84409

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20656

研究課題名（和文）発癌過程におけるERKシグナルダイナミクスの腫瘍横断的検討

研究課題名（英文）Multi-tumor analysis of ERK signal dynamics during oncogenesis

研究代表者

平塚 徹（Hiratsuka, Toru）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター（研究所）・その他部局等・腫瘍増殖制御学部研究員

研究者番号：30893028

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、皮膚癌と膵臓癌という2つの腫瘍においてFRET生体ライブイメージングを用い、ERK MAPKシグナルのダイナミクスを比較検討した。皮膚において、ERK活性には揺らぎが多く見られるのに対し、膵臓においては比較的定常的な活性パターンが見られた。また、Rash2皮膚癌マウスモデルにおいて、癌の初期段階に見られたERK活性の揺らぎが定常的な高活性に変化した。さらに、定常的なERK活性状態では薬剤抵抗性が確認された。以上のように、本研究はERK活性の時間ダイナミクスの重要性に迫ったものであり、癌の種類と進行段階におけるERK活性の揺らぎの変化とその薬剤治療抵抗性への関与を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ERK MAPKシグナルは癌細胞の増殖を制御する最も古典的な細胞内シグナルと言える。これまでにERKを抑制する抗癌剤が多く開発され、臨床応用されている。しかしなお、癌細胞の不均一性や薬剤耐性に起因する問題から、癌を十分に克服できているとは言い難い状況である。特に、膵臓は難治性の癌として知られており、その早期発見と新規治療の開発は喫緊の課題であると言える。本研究では、基礎研究アプローチが比較的容易である皮膚癌と、最も社会的需要が高いと考えられる膵臓癌の両方をターゲットにし、両者の橋渡しとなる基礎研究を行い、ERK活性のゆらぎが発癌過程および抗癌剤の反応性に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We investigated the spatiotemporal ERK MAPK signal dynamics of cancer cells in two organs, skin and pancreas, using in vivo FRET imaging. While epidermal cells showed ERK activity fluctuations, the activity was highly stable in the pancreatic cancer. We followed the ERK activity dynamics during the mouse skin tumor development in Rash2 transgenic mice and found ERK activity is initially fluctuating but later transits to stably high activity. Interestingly, when the tumor cells are in the high-stable ERK activity, the cells showed heterogeneous response to its inhibitor with some cells showing resistance to the treatment. In this study we observed the two types of cancers and revealed the involvement of ERK activity temporal patterns. Our findings show how the physiological epithelial tissues modify their spatiotemporal signal patterns to generate drug-resistant tumors.

研究分野：細胞内シグナル

キーワード：ERK ライブイメージング 皮膚 膵臓 ゆらぎ 癌

## 1. 研究開始当初の背景

近年のがん研究では、網羅的アプローチの発展により、個々の細胞における遺伝子発現状態を網羅的に取得することが可能になった。しかし、実際のがんを制御するためには、がんを1細胞レベルで捉えるだけでなく、多細胞のネットワークとして捉えることが必要である。

ERKは癌遺伝子Rasの下流に位置するキナーゼであり、その重要性に関する知見は多くの臓器の腫瘍で枚挙の暇がない(参考文献)。しかし、Ras-ERK経路をターゲットにした抗癌剤の効果は限定的であるのが現状である。その一因として、ERKによる遺伝子発現制御機構が、単純なON、OFFでなく、時間的な活性化パターンで制御されていることがあげられる(参考文献)。実際、申請者は、過去の研究で、皮膚上皮細胞のERK活性が一過性活性化や細胞間伝搬を繰り返していることを明らかにしている。

このようなシグナル活性の意義の多様性は、がん種ごとの進展メカニズムの違いにも関与すると考えられる。例えば膵がんと皮膚がんの比較はその好例である。両者においてがん遺伝子Rasの活性化が重要であるが、両者のがんとしての性質は大きく異なる。膵がんの予後は、10年生存率4.6%と、皮膚がんの86.6%と比較し、圧倒的に悪い(参考文献)。

## 2. 研究の目的

これらの背景から、「どのような細胞内シグナルダイナミクスが、膵癌と皮膚癌の悪性度の違いの背景にあるのか」を本研究の学術的課題として設定した。本研究では、皮膚がん膵がんという2つの腫瘍においてERK MAPKシグナルのダイナミクスを比較することで、がんの不均一性の背後にある分子メカニズムの解明に取り組んだ。手法として、申請者の専門である、生体ライブイメージング技術により、発癌過程におけるERKシグナルの時空間変化をとらえた。さらに、2次元培養、オルガノイド培養を用い、それぞれのERKシグナルダイナミクスのメカニズムを検討したほか、抗癌剤投与後のERKダイナミクスを検討し、新たな治療アプローチの可能性について探索を行った。

## 3. 研究の方法

ERKシグナル活性をモニターするための手法として、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の原理を利用したバイオセンサーを用いた(図1)。本研究においては、研究計画通り、既に報告済みのバイオセンサーであるEKAREN5(参考文献)を使用し研究を開始したが、使用する青色および黄色蛍光タンパク質を異なるものに変えることにより、より感度が高いものを作成することに成功したため、それを使用することとした(図2)。このERKバイオセンサーをヒト表皮角化細胞、ヒト膵がん細胞に発現させライブイメージングを行った。さらに、生体ライブイメージングモデルとして、がん遺伝子Rasを過剰発現するマウスモデルであるRasH2マウスを使用したほか、ヒトがん細胞を免疫不全モデルに同所性に移植したマウスモデルを確立し、生体ライブイメージングを行った。



図1: ERK活性の生体ライブイメージング

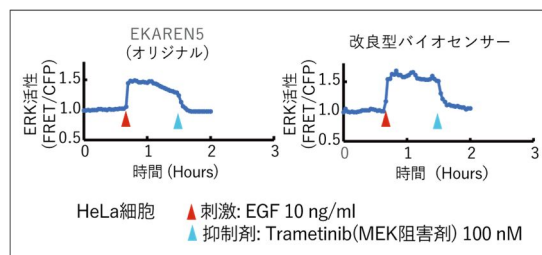


図2: ERK活性バイオセンサーの改良

## 4. 研究成果

### (1) 皮膚癌におけるERK活性ダイナミクス

申請者は過去の研究において、正常ヒトおよびマウス表皮角化細胞のライブイメージングを行い、表皮幹細胞のERK活性に揺らぎが見られることを報告している(参考文献)。その知見に基づき、ERK活性の揺らぎを指標に、まず皮膚がん細胞におけるERK活性のライブイメージングを行った。がんモデルマウスであるRasH2マウスより取得した乳頭腫の細胞を培養し、生体ライブイメージングを行ったところ、ERK活性の揺らぎの頻度および基底活性が有意に亢進してい

ることを明らかにした。さらに、RasH2 マウスの生体ライブイメージングを行うことにより、発がん過程における ERK 活性ダイナミクスの変化を追ったところ、発がん初期の段階において ERK 活性の揺らぎが亢進し、それが徐々に定常的高活性の時間パターンへと推移することが明らかになった (図 3)。

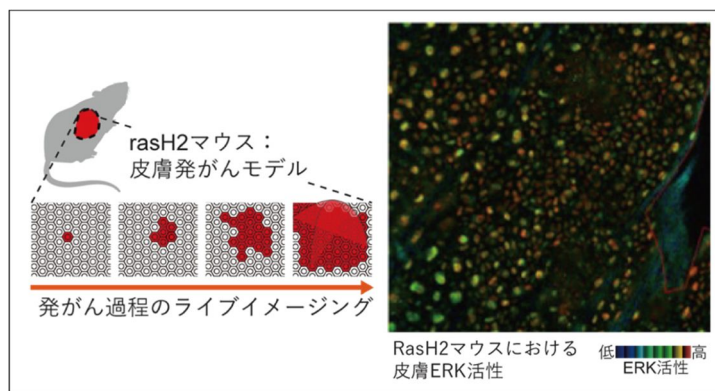


図 3：皮膚癌におけるERK活性ダイナミクス

### (2) 膵がんにおける ERK 活性ダイナミクス

ヒト膵臓癌細胞として、ヒト膵管腺癌から樹立したオルガノイド細胞を使用した。皮膚細胞と異なり、3次元のクラスター構造をとり、マトリゲル内での培養が必要であった。観察の結果、オルガノイドにおける ERK 活性は個々に大きく異なっており、その不均一性を正しく評価するための実験システムが必要と考えられた。そこで、オルガノイドを包埋するマトリゲル全体(およそ 60 視野、各視野 500 程度)を撮影し、自動化した画像解析アルゴリズムを用いて個々のオルガノイドにおける活性を定量的に解析した(図 4)。

また、時系列データの取得および解析によって ERK 活性は時間的に安定しており、皮膚細胞との

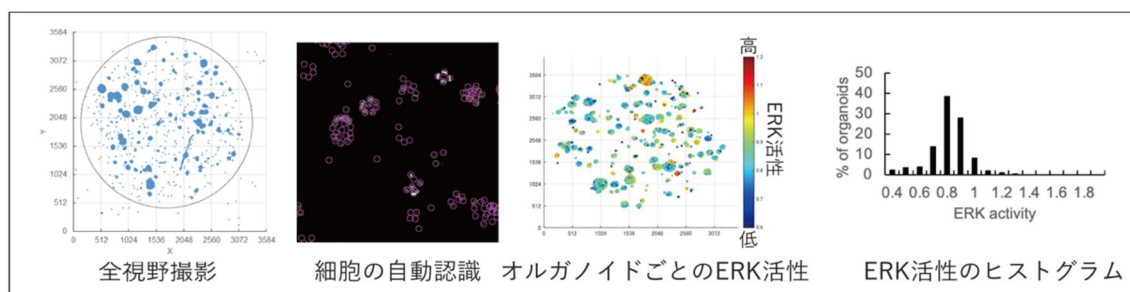


図 4：膵臓癌オルガノイドの包括的ライブイメージング

差異が認められた。しかし、ERK 活性は癌細胞の持つ Ras 遺伝子変異によって恒常的に高い ERK 活性を保持しているわけではなく、活性の高い細胞から低い細胞まで不均一な集団として存在しており、Ras 変異が下流シグナルに及ぼす影響が ERK 活性の規定レベルの変化ではなく、その活性の安定性である可能性が示唆された。

さらに、ヒト膵臓癌細胞をマウス膵へ同所性に移植した担癌モデルを確立し、その生体ライブイメージングを行った。その結果、生体における癌細胞の ERK 活性は培養オルガノイドで見られた

よりも高い不均一性を示しており、生体内環境(線維芽細胞、免疫細胞など)の関与が示唆された(図 5)。この ERK 活性の不均一性は時間によって変化し、移植後 3 週間程度にて定常的に高い ERK 活性の時間パターンへと変化した。また、ERK 活性を抑制する薬剤であり、抗癌剤として既に用いられている MEK 阻害剤 Trametinib を用いた検討を行ったところ、ERK 活性が不均一性の状態では Trametinib による ERK 活性効果が弱く、むしろ ERK 活性が上昇する細胞さえ確認された。これは既存

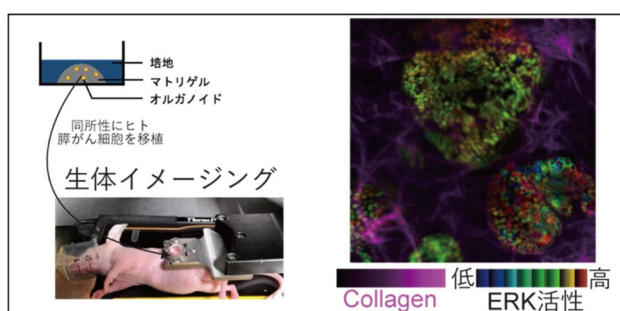


図 5：ヒト膵臓癌細胞の同所性移植モデル

の集団レベルの知見から知られていなかった意外な結果であり、腫瘍塊に対して抗癌剤が一様に効くわけではなく、むしろ癌の不均一性を助長し、薬剤耐性を生む結果にもなりうることを示唆する興味深い知見であった。

### (3) ERK MAPK シグナルダイナミクスの比較によって得られた今後の課題

本研究において、皮膚がん膵臓がんにて ERK MAPK シグナルのダイナミクスを比較することで、ERK シグナルの複雑さとその制御の難しさの一端が明らかになったものと考えられる。近年、ライブイメージング技術および AI などを用いた画像解析技術の進歩はめざましく、がんの複雑性に引けを取らない高度な実験系がより進むものと考えられる。オルガノイドを用いたアプローチは実際のヒトのがんを模倣する実験系として期待され、現在多く応用が進んでいるが、生体内での挙動はさらにその先のステージになるものと期待できる。本研究では、より詳細な時間変化の検出や、他の細胞内シグナルの関与、他の薬剤に対する応答性など、課題も多く存在するが、今後の研究につながる良いプラットフォームが確立できたものと考えている。がんという大き

な社会的な問題に対し、今後もライブイメージングを用いた直接的観察手法を用いて、臨床応用につながる実践的な基礎研究を続けていきたい。

#### 参考文献

Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(11):761-74.

Atay O, Skotheim JM. Spatial and temporal signal processing and decision making by MAPK pathways. *J Cell Biol*. 2017;216(2):317-30.

Ponsioen et al.. *Nat Cell Biol*. 2021;23(4):377-390.

Hiratsuka et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(30):17796-17807.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Emanuel Rognoni, Georgina Goss, Toru Hiratsuka, Kalle H Sipila, Thomas Kirk, Katharina I Kober, Prudence PokWai Lui, Victoria Sk Tsang, Nathan J Hawkshaw, Suzanne M Pilkington, Inchul Cho, Niwa Ali, Lesley E Rhodes, Fiona M Watt.	4. 巻 10
2. 論文標題 Role of distinct fibroblast lineages and immune cells in dermal repair following UV radiation-induced tissue damage.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Elife	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) 10.7554/eLife.71052.	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shoko Tsukamoto, Akihito Machinaga, Nobuyuki Kakiuchi, Seishi Ogawa, Hiroshi Seno, Shigeki Higashiyama, Michiyuki Matsuda, Toru Hiratsuka
2. 発表標題 The Quantitative Landscape of ERK MAPK Signal Dynamics in Patient-Derived Pancreatic Cancer Organoids
3. 学会等名 The 7th JCA AACR Special Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shoko Tsukamoto, Akihito Machinaga, Nobuyuki Kakiuchi, Seishi Ogawa, Hiroshi Seno, Shigeki Higashiyama, Michiyuki Matsuda, Toru Hiratsuka
2. 発表標題 The quantitative landscape of ERK MAPK signal dynamics in patient-derived pancreatic cancer organoids.
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toru Hiratsuka, Ignacio Bordeau, Gunnar Preussner, Fiona Watt
2. 発表標題 Fluctuating ERK signal during epidermal stem cell proliferation and differentiation
3. 学会等名 第74回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shoko Tsukamoto, Akihito Machinaga, Nobuyuki Kakiuchi, Seishi Ogawa, Hiroshi Seno, Shigeki Higashiyama, Michiyuki Matsuda, Toru Hiratsuka
2. 発表標題 Spatiotemporal dynamics of ERK activity in human and mouse epidermal cells
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022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			