

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19637

研究課題名（和文）口腔がんリキッドバイオプシーサンプルからの1細胞・1分子酵素活性分析法の開発

研究課題名（英文）Development of a method for the analysis of single-cell and single-molecule enzyme activities from oral cancer liquid biopsy.

研究代表者

本田 一文（Honda, Kazufumi）

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：10260936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：がん細胞を1細胞毎でマイクロウェル内に封入する技術論を確立した。1細胞毎に口腔がん細胞株を封入し、1細胞毎酵素活性を確認しMMP活性を確認したところ、1細胞毎に培養液中にMMP活性が継続的に増強する性質を保持するもの、時間が経過しても培養液中にMMP活性が確認することができない細胞が存在すること、を明らかにした。本結果は、は分泌型のMMP2やMMP9などで代表されるがん細胞の浸潤をつかさどる分泌型MMPと解釈できる。今回MMPの酵素活性は1細胞毎にheterogeneityが存在することを世界で初めて観察した。1細胞酵素活性はがん微小環境を高分解能で説明する全く新しい概念である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MMP活性に関してはzymographyなどにより細胞全体が持つ活性を計測できる従来技術が存在した。しかしながら、1細胞毎でその活性を計測する方法は確立されていない。MMPの存在はがん手術材料の免疫染色などを利用すればその発現状況は確認できるが、1細胞活性状態を評価する技術解析法は全くない。今回の研究結果から、がん細胞が持つMMPの酵素活性は1細胞毎にheterogeneityが存在することを世界で初めて観察した。1細胞毎の酵素活性heterogeneityはがん細胞巢の微小環境を高分解能で説明する全く新しい概念であり、がん細胞生物学を語るうえで大きなブレークスルーになると期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have established a technical theory for encapsulating cancer cells in microwells one by one. Oral cancer cell lines were encapsulated for each cell, and the enzyme activity of each cell was confirmed, and MMP activity was confirmed, and (1) each cell retained the property of continuously enhancing MMP activity in the culture medium, and (2) there were cells in which MMP activity could not be confirmed in the culture medium even after a long period of time. These results can be interpreted as secretory MMPs that control the invasion of cancer cells represented by secretory MMP2 and MMP9 in (1) and (2). In this study, we observed for the first time in the world that heterogeneity exists in each cell of MMP. Single-cell enzyme activity is a completely new concept that explains the tumor microenvironment at high resolution.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：1細胞酵素活性 口腔がん

### 1. 研究開始当初の背景

がんは自身の生存をかけて治療圧力に抵抗し、その個性を進化させる。口腔がんはひと個性にとってもっとも重要な顎顔面部に発症するため、最小限の侵襲で最大限の治療効果を予測する精密医療 (precision medicine) バイオマーカーの確立が必要である。近年、ゲノム解析を中心とした精密医療が社会実装され、医療、疾病予防の分野で注目を集めている。ゲノム情報は個人の固有なもので、生理的条件下で刻々と変化するものではない。治療圧力に抗して変化し続けるがん細胞の生物学的活性そのものを厳密にモニタリングできる技術開発が必須である。がん治療に利用される分子標的の多くはリン酸化酵素を含めて酵素である。現在までに酵素活性をリキッドバイオプシーや生検検体などの最少侵襲検体から分析できる技術はない。同分析法が開発されれば、ゲノム精密医療を補完する革命的な技術になる。研究グループは、超高感度蛍光プローブを用いて、血液中に存在する酵素 1 分子の活性をマルチプレックスで計測する技術開発に成功した。本技術は従来法に比べて 1000 万倍の感度を達成した (Sakamoto et al. 2020 Science Adv.)。本技術をリキッドバイオプシーや生検試料から得られたがん 1 細胞に応用できれば、分子標的となる酵素活性を持つがん細胞を数えるという、まったく新しい検査概念を提唱できる。また、原発巣や病巣微小環境で惹起され体循環中に逸脱した酵素活性を 1 分子レベルで測れるようになるため、口腔がんコンパニオン診断に対するキラーアプリケーションとなる可能性も高い。研究グループは現在まで日本医科大学、国立がん研究センター、国立シンガポール大学、東京大学、理化学研究所、慶應大学など共同研究を行い、がん血液中の 1 分子酵素活性分析、口腔がんを含んだ CTCs の次世代シーケンス解析、CTC1 細胞メタボローム解析、空間情報を残した多層オミクス解析 (in situ multi-omics analysis) などを開発し、臨床材料に応用することで、数々の創薬標的やバイオマーカーの同定に成功してきている。上記理由からオリジナリティーが極めて高い本研究課題に挑戦する

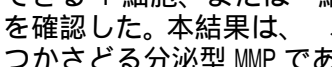
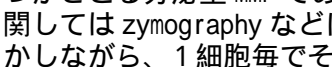
### 2. 研究の目的

がんゲノム精密医療を補完するために、治療圧力によって時々刻々変化する口腔がん細胞の個性を適時・適格に評価する方法を、「血液中の 1 分子酵素活性や口腔がんの抹消循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells; CTCs) や微量がん検体 1 細胞から酵素活性を数える」という概念で実現する。口腔がんへの臨床開発にむけて、その概念を実証する。

### 3. 研究の方法

われわれは東京大学とものがん患者血液をマイクロデバイス内に理論上 1 分子酵素が存在する濃度まで限界希釈したのち、基質・酵素反応で惹起される超高感度蛍光プローブを利用することで、腫瘍や病巣の微小環境が産生し体循環に逸脱した酵素活性を 1 分子レベルで計測する方法を開発した。本法は「体内を循環する 5 L 以上ある血液中に存在する 1 分子酵素の活性を数える」という全く新しい概念の解析手法で、複数酵素をマルチカラーで計測することが可能である。同方法を用いて、がん血漿中では、ENPP3 の酵素活性が健常者に比較して有意に高いことを発見した。本法は、従来法の活性試験に比較して簡便で 1000 万倍以上の感度の向上を達成した (Sakamoto et al Science Adv. 2020)。今回の研究では、がん転移に關与する MMPs (matrix metalloproteases)、扁平上皮がんなどに高発現する DPP4 (dipeptidyl peptidase-4) などの 1 分子酵素活性を口腔がん患者の血漿検体から計測する検査手法を確立する。

### 4. 研究成果

マイクロデバイス内に口がん細胞株を 1 細胞毎に閉じ込める技術プロトコルを最適化し、口腔がん細胞株を 1 細胞毎でマイクロウェル内に封入する技術論を確立した。さらに効率よくマイクロウェル内に 1 細胞株を封入するためのマイクロデバイスを再設計するために、理化学研究所と気共同研究契約を締結し、口腔がん細胞径に適した大きさに特化したマイクロデバイスの作製を開始した。1 細胞毎に口腔がん細胞株を封入し、MMP 酵素活性を定量化できる蛍光プローブをロードして、1 細胞毎の酵素活性を確認しタイムラプス顕微鏡でその活性を確認したところ、培養液中に MMP 活性が継時的に増強する性質を保持する細胞、時間が経過しても培養液中に MMP 活性が確認することができない細胞が存在すること、を明らかにした。また、条件を変えてさらに観察すると、細胞膜上の MMP 蛍光強度を観察できる 1 細胞、または細胞膜上に MMP 蛍光強度を観察できない 1 細胞に分類できることを確認した。本結果は、 は分泌型の MMP2 や MMP9 など代表されるがん細胞の浸潤をつかさどる分泌型 MMP であり、 は MT1-MMP などの膜型 MMP と解釈できる。MMP 活性に関しては zymography などにより細胞全体が持つ活性を計測できる従来技術が存在した。しかしながら、1 細胞毎でその活性を計測する方法は確立されていなかった。MMP の存在はが

ん手術材料の免疫染色などを利用すれば その発現状況は顕微鏡を用いて空間解析すれば確認できるが、1細胞活性状態を評価する技術解析法は全くない。今回の研究結果から、がん細胞が持つ MMP の酵素活性は1細胞毎に heterogeneity が存在することを世界で初めて観察した。1細胞毎の酵素活性 heterogeneity はがん細胞巢の微小環境を高分解能で説明する全く新しい概念であり、がん細胞生物学を語るうえで大きなブレイクスルーになると期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Naito Yutaka, Honda Kazufumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Liquid Biopsy for Oral Cancer Diagnosis: Recent Advances and Challenges	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 303 ~ 303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm13020303	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 Nojima Yosui, Aoki Masahiko, Re Suyong, Hirano Hidekazu, Abe Yuichi, Narumi Ryohei, Muraoka Satoshi, Shoji Hirokazu, Honda Kazufumi, Tomonaga Takeshi, Mizuguchi Kenji, Boku Narikazu, Adachi Jun	4. 巻 21
2. 論文標題 Integration of pharmacoproteomic and computational approaches reveals the cellular signal transduction pathways affected by apatinib in gastric cancer cell lines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Computational and Structural Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 2172 ~ 2187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.csbj.2023.03.006	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 Nagano Norimichi, Ichihashi Yuki, Komatsu Toru, Matsuzaki Hiroyuki, Hata Keisuke, Watanabe Toshiaki, Misawa Yoshihiro, Suzuki Misa, Sakamoto Shingo, Kagami Yu, Kashiro Ayumi, Takeuchi Keiko, Kanemitsu Yukihide, Ochiai Hiroki, Watanabe Rikiya, Honda Kazufumi, Urano Yasuteru	4. 巻 14
2. 論文標題 Development of fluorogenic substrates for colorectal tumor-related neuropeptidases for activity-based diagnosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 4495 ~ 4499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2sc07029d	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 Matsuzaki Yusuke, Naito Yutaka, Miura Nami, Mori Taisuke, Watabe Yukio, Yoshimoto Seiichi, Shibahara Takahiko, Takano Masayuki, Honda Kazufumi	4. 巻 30
2. 論文標題 R10K2 Contributes to Cell Growth and Protein Synthesis in Human Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Oncology	6. 最初と最後の頁 381 ~ 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/curronc130010031	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 Tozuka Takehiro, Noro Rintaro, Seike Masahiro, Honda Kazufumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Benefits from Adjuvant Chemotherapy in Patients with Resected Non-Small Cell Lung Cancer: Possibility of Stratification by Gene Amplification of ACTN4 According to Evaluation of Metastatic Ability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4363 ~ 4363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14184363	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 -

1. 著者名 Hirano Hidekazu, Abe Yuichi, Nojima Yosui, Aoki Masahiko, Shoji Hirokazu, Isoyama Junko, Honda Kazufumi, Boku Narikazu, Mizuguchi Kenji, Tomonaga Takeshi, Adachi Jun	4. 巻 12
2. 論文標題 Temporal dynamics from phosphoproteomics using endoscopic biopsy specimens provides new therapeutic targets in stage IV gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-08430-7	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 Noro Rintaro, Honda Kazufumi, Nagashima Kengo, Motoi Noriko, Kunugi Shinobu, Matsubayashi Jun, Takeuchi Susumu, Shiraishi Hideaki, Okano Tetsuya, Kashiro Ayumi, Meng Xue, Yoshida Yukihiro, Watanabe Shunichi, Usuda Jitsuo, Inoue Tatsuya, Wilber Huang, Ikeda Norihiko, Seike Masahiro, Gemma Akihiko, Kubota Kaoru	4. 巻 113
2. 論文標題 Alpha actinin 4 (ACTN4) gene amplification is a predictive biomarker for adjuvant chemotherapy with tegafur/uracil in stage I lung adenocarcinomas	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1002 ~ 1009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15228	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 Ukegawa Tatsuya, Komatsu Toru, Minoda Mayano, Matsumoto Takuya, Iwasaka Takumi, Mizuno Tadahaya, Tachibana Ryo, Sakamoto Shingo, Hanaoka Kenjiro, Kusuhara Hiroyuki, Honda Kazufumi, Watanabe Rikiya, Urano Yasuteru	4. 巻 11
2. 論文標題 Thioester Based Coupled Fluorogenic Assays in Microdevice for the Detection of Single Molecule Enzyme Activities of Esterases with Specified Substrate Recognition	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Advanced Science	6. 最初と最後の頁 1 ~ 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adv.202306559	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 Sakamoto Shingo, Hiraide Hideto, Minoda Mayano, Iwakura Nozomi, Suzuki Misa, Ando Jun, Takahashi Chiharu, Takahashi Ikuko, Murai Kazue, Kagami Yu, Mizuno Tadahaya, Koike Tohru, Nara Satoshi, Morizane Chigusa, Hijioka Susumu, Kashiro Ayumi, Honda Kazufumi, Watanabe Rikiya, Urano Yasuteru, Komatsu Toru	4. 巻 4
2. 論文標題 Identification of activity-based biomarkers for early-stage pancreatic tumors in blood using single-molecule enzyme activity screening	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100688 ~ 100688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2023.100688	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	吉本 世一 (Yoshimoto Seichi) (00462242)	国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・科長  (82606)	
研究分担者	本間 義崇 (Honma Yoshitaka) (30719943)	国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医長  (82606)	

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
---------	---------