

ストレス応答における癌および正常細胞の個性の追求

理化学研究所 脳神経科学研究センター 細胞機能探索技術研究チーム
阪上一沢野 朝子

本研究は、我々独自の蛍光タンパク質技術 (Wet) に、光学顕微鏡技術 (Hardware) および画像処理技術 (Software) を組み合わせることにより、培養環境における個々の細胞の個性 (ストレス応答) を定量的に評価しながら、それらが構成する生命システムを包括的に理解する技術基盤を開発することを学術的な目的として、さらに、ヒトの正常細胞とがん細胞の差異に着目し、汎用的な High Content Screening を提案することを実用的な目的として以下の研究を推進した。

我々はこれまでに“実験を行う際の細胞の密集度や足場環境によって、あるストレスに対して個々の細胞が異なる反応を示す”ことを実証してきた。こうした細胞の個性は、2次元の培養細胞社会のみならず、最近ではスフィア/オルガノイドなどの3次元環境で取り組むべき課題となっている。よって細胞個性重視の Phenotypic screening を実行し、これまでに見落とされていたであろう多様なストレス応答を定量的に理解することを目的とした。

【2次元 vs. 3次元】

まず、細胞本来の細胞周期情報を非侵襲に可視化する為に、2008年に我々が報告した細胞周期プローブ Fucci (Fluorescent, Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) を導入した。2020年に新規に報告した Fucci (CA)5 は、その構成蛍光タンパク質として我々の研究室で独自に開発された AzaleaB5 (赤蛍光) と h2-3 (緑蛍光) を採用しており、要素技術すべてが純国産の細胞周期プローブという特徴をもつため、学術界のみならず細胞個性重視の Phenotypic screening を目的とした産業界においても導入しやすい形態と期待するところである。Fucci (CA)5 は、AzaleaB5-hCdt1(1/100)Cy(-), h2-3-hGem(1/110) の2つのコンストラクトより構成されており、恒常的に細胞に発現させる。それぞれ細胞周期依存性にユビキチン化を経てプロテアソームで分解される機構によって、G1期にある細胞の核を赤色に、S期にある細胞の核を緑色に、G2期およびM期にある細胞の核を黄色にハイライトする。(M期は光学顕微鏡により形態での識別が容易である。) 本研究課題において、薬剤応答の細胞種依存性などを調べる事を目的として Fucci (CA)5 を安定発現するヒト細胞株のラインアップを整備した (HeLa/Fucci (CA)5, HT1080/Fucci (CA)5, HepG2/Fucci (CA)5 など)。

つぎに、Phenotypic screening を実行するために横河電機の協力を得て、共焦点定量イメージサイトメーター: CQ 1 による薬剤処理後のライブイメージング実験系を構築した。今回は 96-well プレートを用いたが、マルチウェルプレートを用いる事で、同一培養環境の細胞に対して、複数の薬剤を段階的な濃度で処理し、その後の細胞周期動態を一気に可視化して理解し、動態比較などを行う事が可能である。また、一般的な2次元培養用のマルチウェルプレートでの2D培養条件に追加して、Elplasia Plate (Kuraray)を採用し、3D培養条件サンプルとした。このプレートは、ほぼ均一化した3D sphere (直径~100 μm) を大量に形成させることが出来るため、3D-High Content Screening に非常に有用であった。さらに、CQ 1は光学切片画像を容易に取得できるために、3D sphere の個々の細胞のふるまいを可視化する事が可能であり、本目的において最適な組み合わせであった。ここでは代表して、ヒト肝癌由来細胞株 (HepG2/Fucci (CA)5 細胞) をドキシソルピシン (DXR) で処理した例を紹介する。図1に示すように、HepG2/Fucci (CA)5 細胞を、2Dおよび3D sphere 培養条件にて 96-well プレートに準備して、ドキシソルピシン (DXR) 10段階の濃度に対する細胞応答を細胞周期情報により描出した。(対物レンズ: 20倍、透過像、緑蛍光画像、赤蛍光画像、1ウェルにつき9視野、30分間隔で72時間撮影。3D-shere は、z-slice 7.8 μm間隔で10枚撮影。)

DXR に対する経時的細胞周期プロファイル

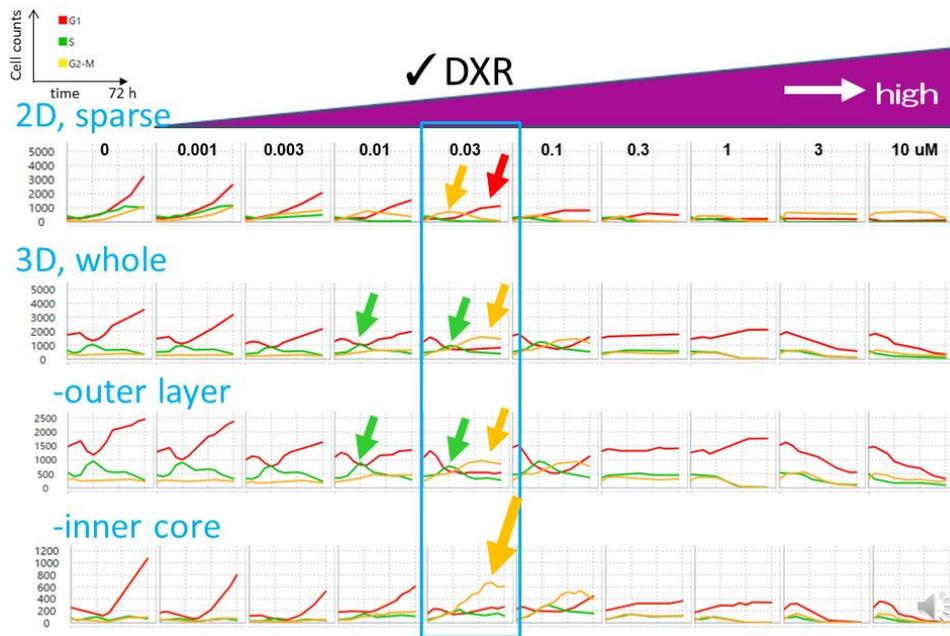


図1 細胞周期進行への抗がん剤 (DXR) 作用を2次元培養と3次元培養とで比較・可視化

そして、High Content Screening において必須なのが画像処理技術 (Software) である。今回は横河電機の CQ1 顕微鏡システムに搭載されている CellPathfinder を用いた。一般的に解析ソフトウェアに細胞の核を認識させるためには、核ラベルが必要である。蛍光タンパク質を連結した HistoneH2B をあらかじめ発現させておいたり、Hoechst などの生細胞で有用な核染色色素を用いる。しかしこうした色素は毒性を示したり、細胞周期に影響を与えてしまう事が多々ある。そこで Fucci (CA)5 の2色の画像の overlay を作成すると、全ての核がいずれかの蛍光情報を持つ事から、ソフトウェアによる核認識が可能となる。よって、核ラベルの為の追加操作を行う事なく、すなわち細胞へ余分なダメージを与える事なく、Fucci (CA)5 細胞の情報のみにより、核認識からその後の細胞周期情報等の抽出の一連が達成されることとなる。今回は図1に、それぞれの条件における各細胞周期にある細胞数を経時的に示したデータを紹介する。(これ以外にも核の面積や真円度など様々なパラメータ設定が出来る。) 3D-sphere においては、各 z-slice 毎に外周から 20 μm の範囲にある核 (細胞) を outer layer として、それよりも内側にある核 (細胞) を inner core として分類して解析するプログラムを作成した。図1から明らかなように、同じ薬剤濃度であっても細胞の環境 (2D or 3D, outer layer or inner core) によって、その応答様式はそれぞれ異なっていた。文献的に DXR は DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼ、およびトポイソメラーゼ II 反応の阻害剤として知られ、特に S 期に高い感受性を示すとされている。実際には HepG2 細胞の 2D 環境では 0.01~0.03 μM で G2 アレスト (黄色矢印) が見られ、いずれ G1 アレスト (赤矢印) する様子が分かる。これに対して、3D-sphere 環境では、同濃度ではまず、S アレスト (緑矢印) が見られ、その後 0.03 μM では G2 アレスト、0.01 μM では G1 アレストを示した。さらに outer layer と inner core を識別すると、0.03 μM DXR による G2 アレストはより inner core で顕著にみられる応答であることが分かった。例えば抗がん剤は、すみやかに細胞の増殖を阻害することで効果的に細胞死を誘導する事が求められ、生体における安全性も高いと期待されるが、実際には投与した薬剤はそれぞれの組織や環境において、局所での最終濃度が異なる事が予想される。増殖曲線のみ情報では、増殖抑制効果があるように思われる条件においても、Fucci シグナルを適用すると、S 期や G2 期での予期しないアレスト状態にあるケースが一目瞭然となる。抗がん剤の濃度特異的かつ、細胞環境依存的なストレス応答と捉えることで、結果として局所での endoreplication や異常な細胞周期突入などの可能性の予測へと繋がる。細胞個々の振る舞いを質的かつ定量的に理解する技術基盤として、以上に示した High Content Screening システムを構築する事ができた。現在は、複数の細胞株における複数の抗がん剤処理の実験について、論文作成を行っている。また学術界および産業界へと技術展開を進行中である。

【がん細胞 vs. 正常細胞】 【疎 vs. 密】

第2世代のFucciプローブ：Fucci(CA)2を用いて、紫外線照射後の細胞周期攪乱を観察した実験から、がん細胞と正常細胞とでは、紫外線照射に対する感受性が異なること、ダメージ応答の時間的パターンが異なること、正常細胞においては環境(増殖モードもしくは増殖停止モード)によって応答の様子が異なること、など興味深い知見を得ていた。こういった一連を抗ガン剤効果においても検証するために、がん細胞としてHeLa/Fucci(CA)2, 正常細胞としてhTERT-RPE-1/Fucci(CA)2細胞株などを整備した。

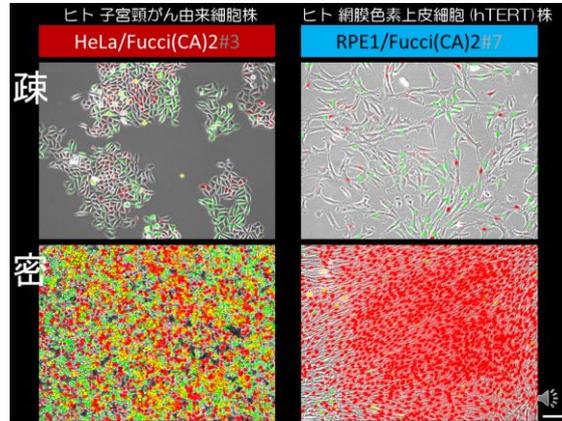


図2 Fucciで可視化する【がん細胞 vs. 正常細胞】 【疎 vs. 密】

図2に示すように、Fucciを安定発現するがん細胞と正常細胞を、それぞれ疎な状態と密な状態で培養すると、結果として得られる細胞周期情報には予想通りの状態が描出された(正常細胞で密な条件は、接触阻止状態=G1 arrest/postmitotic phase=濃い赤を示す)。透過像だけでは得られない情報である。特に生体の多くの組織では、ほとんどの細胞はG1 arrest/postmitotic phaseであることが周知であるが、その状態を模擬する細胞培養環境をモニターするのにFucciは最適な技術と結論できた。G1 arrest/postmitotic phaseにある細胞集団から、増殖フェーズに移行する少数の細胞(がん幹細胞など)を定性的、定量的に捉える事や、あるいは正常細胞に隣接するがん細胞集団の振る舞いを同時に比較する事にも有用でと考えられた。引き続きヒトの正常細胞とがん細胞の差異に着目しながら、様々なFucci発現細胞株を作製し、多様なストレス応答をその環境依存性と合わせて定量的に理解するための研究を続行していく所存である。

Wet+Hardware+Softwareの組み合わせによる実験系構築にトライする事で、培養環境における個々の細胞の個性(ストレス応答)を定量的に評価しながら、それらが構成する生命システムを包括的に理解する技術基盤を開発する事ができた。また、個々の細胞が、いかにストレスに反応していくのかについての理解を深める事ができた。今後は、得られた知見を細胞個性重視のPhenotypic screening研究のみならず、ストレス研究等の研究分野にフィードバックし、多様な「ストレス」を包括的に調べるための技術基盤として、世界に発信していく計画である。細胞種依存性、それら培養環境依存性の細胞応答の差異を可視化し理解する試みを行ってきた経緯から、より複雑な細胞系、いわゆる個体レベル、組織レベルでの個々の細胞の応答性の差異を詳細に解析する必要性を強く感じている。例えばFucciトランスジェニックマウスやflox-マウスの使用は造腫瘍性から薬剤効果を可視化する研究においても有用であると思われ、様々な提案してゆきたい。

- [Sakaue-Sawano A, et al.:](#) Genetically encoded tools for optical dissection of the mammalian cell cycle. *Mol Cell.* 68:626-40, 2017.
- [Ando R, Sakaue-Sawano A, et al.:](#) Two new coral fluorescent proteins of distinct colors for sharp visualization of cell-cycle progression. *BioRx* iv. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.015156>
- 細胞周期インジケータFucciを用いた2D/3D培養の抗がん剤スクリーニング
<https://www.yokogawa.co.jp/library/resources/application-notes/lsc-anti-cancer-drug-screening-in-2d-3d-culture-using-cell-cycle-indicator-fucci/>