

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年度

受付番号 201960604

氏 名

肥後 友彰

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての 1 年間の派遣期間について下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) イギリス (英国)

2. 研究課題名 (和文)

細胞—細胞外マトリックス接着と細胞周期進行共役に関する統合的解析(※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。)

3. 派遣期間 (2 年間)

平成 31 年 04 月 01 日 ~ 令和 03 年 03 月 31 日 (731 日間)

4. 受入機関及び受入研究者

The Institute of Cancer Research, Division of Cancer Biology, Dynamical Cell Systems5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10—別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

癌細胞形態と免疫応答の共役に関する統合的解析

申請者は「細胞—細胞外マトリックス接着と細胞周期進行共役に関する統合的解析」の海外特別研究員に採択頂き、2019 年 4 月より予定留学先の The Institute of Cancer Research, Dr. Chris Bakal ラボへの留学を開始している。しかしながら本テーマは申請者より少し先にラボに合流したポスドクのテーマになっていたこと、およびそれまで Bakal ラボで細胞周期に一貫して取り組んでいたポスドクが独立する時期と重なったことから Dr. Bakal と協議し研究計画を変更する事となった。申請テーマの基礎実験データ収集の際に用いた実験プラットフォームを応用し、現在は「癌細胞形態と免疫応答の共役に関する統合的解析」を行なっている。以下、研究背景・目的を含めて研究経過報告を行う。

1. 研究の背景

生体には行き過ぎた T 細胞の活性化を制御するブレーキ役として、免疫チェックポイント機構が備わっている。抗原提示細胞から抗原の提示を受けた T 細胞が完全に活性化するためには抗原提示側の CD80/86 リガンドと T 細胞表面の CD28 受容体が結合する必要があるが、活性化した T 細胞の表面には

CTLA-4が発現し、これがCD28抗体と競合することでT細胞の過剰な活性化を抑制する（CTLA-4メカニズム）。また活性化されたCD8陽性T細胞はインターフェロン γ （IFN γ ）を分泌し、抗原提示細胞表面上にPD-L1リガンド発現を誘導すると同時に、自身の細胞表面にそれに対するPD-1抗体を発現させる。これら両分子が結合することで免疫寛容が誘導される（PD-1メカニズム）。癌細胞はこうした免疫チェックポイント機構を活用し、免疫系からの攻撃を回避している。近年、抗CTLA-4抗体・抗PD-1抗体薬が臨床応用され様々な癌、特にメラノーマに対し顕著な効果を示している。一方で、これら抗体医薬投与には莫大なコストがかかる（患者一人当たり約1,500万円/年）、また約半数の患者は一次的あるいは獲得耐性を示すなどの問題点がある。したがって、薬剤感受性の判定および患者の選別方法、また薬剤感受性を上げる追加治療の開発が急務である。そのうちのひとつとして、癌細胞が獲得した遺伝子変異により産生された抗原（Neoantigen）数およびその均一性が免疫原性と正の相関を示すことが明らかにされている。Bakalラボはこれまで、ハイスループット画像解析システムを用いた細胞形態解析とその決定に関するシグナル解析、およびそれらとYAP/TAZやNF- κ Bなどの細胞内シグナル伝達との共役に関する解析をシステム生物学的アプローチにより行なって来た。そこで本テーマでは、メラノーマ細胞の細胞形態およびそれに関わるシグナルが癌細胞のNeoantigen提示能、免疫原性を制御しているという仮説の下、細胞形態を操作することで癌細胞の免疫原性を高めることを最終的な目的とし、研究を進める事とした。

2. 研究経過報告

① 細胞形態情報に基づくメラノーマ細胞のクラスタリング

メラノーマ患者のほとんどにRAS/MAPKシグナル経路の異常活性化が認められ、約20%はNRAS分子の活性型変異（NRAS*）、約60%はRASの下流にあるBRAF分子の活性型変異（BRAF*）を獲得していることが知られている。これらの変異を持つメラノーマ細胞を中心に合計23種類のマウスメラノーマ細胞をハイスループット蛍光顕微鏡Opera（Perkinelmer社）によって観察した。その後Columbusソフトウェア（Perkinelmer社）を用いて、約140に及ぶ核・細胞質・細胞全体の面積や対称性などの細胞形態、またそれらのテクスチャー情報を自動的に抽出、得られた数値情報を元に主成分分析を行った。第一・第二主成分分析平面に各細胞の免疫染色画像のマッピングを行なったところ、**図1**に示す通り、視覚的に大きく4つの形態学的集団（Small & round/ellipse, Small & spindle/star, Big & flat/star, Dendritic）に分類することができ、これは第五主成分までの固有値を用いて行

なった階層的クラスタリングと一致していた (図2)。

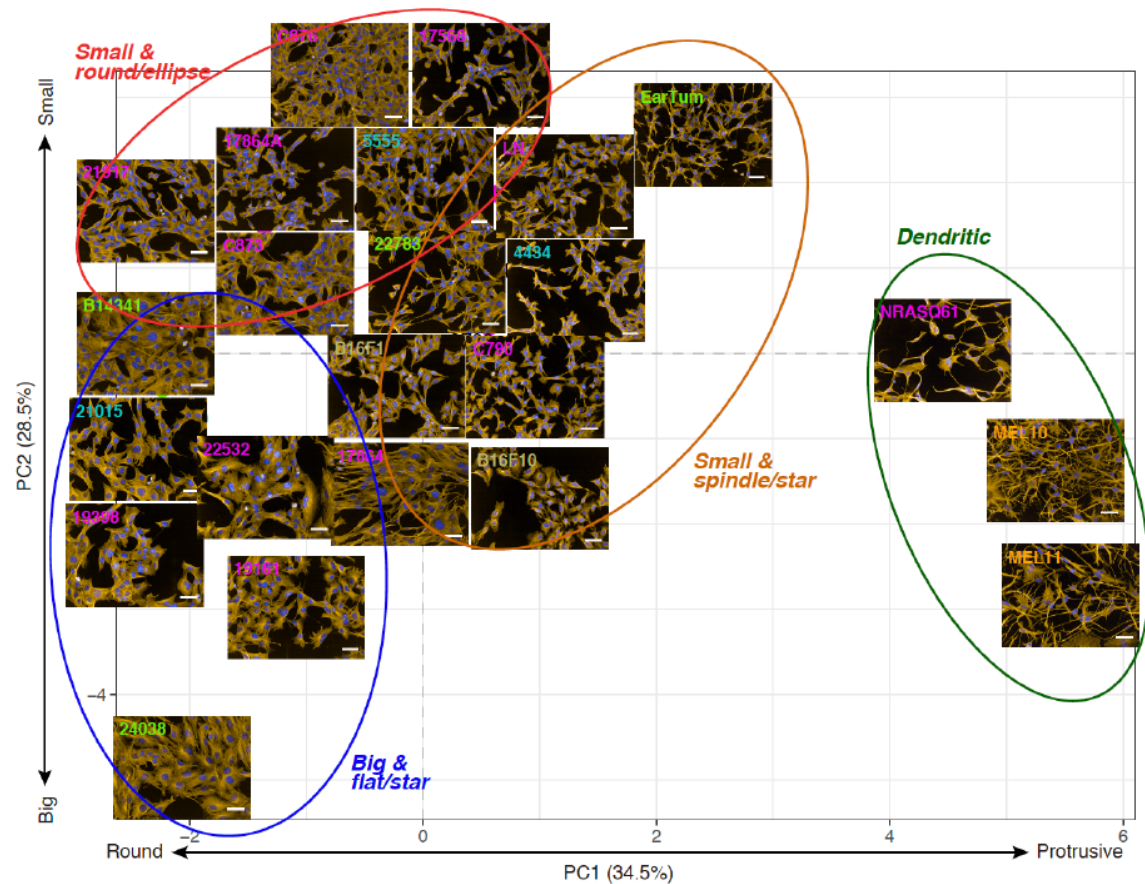


図1. 細胞形態的特徴・テクスチャーに基づいたメラノーマ細胞の主成分分析

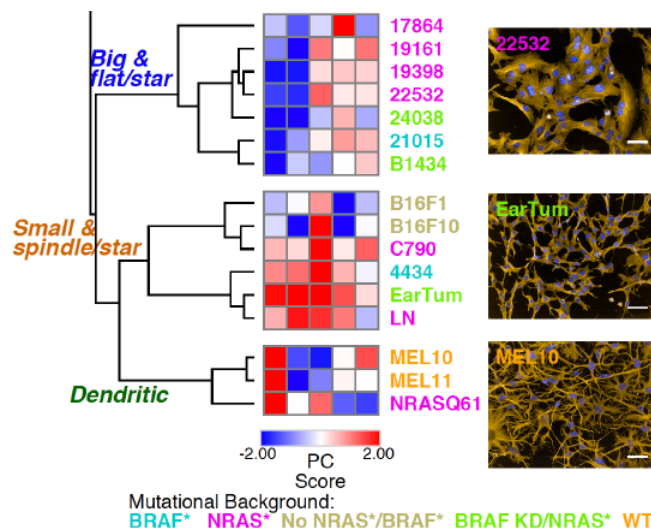
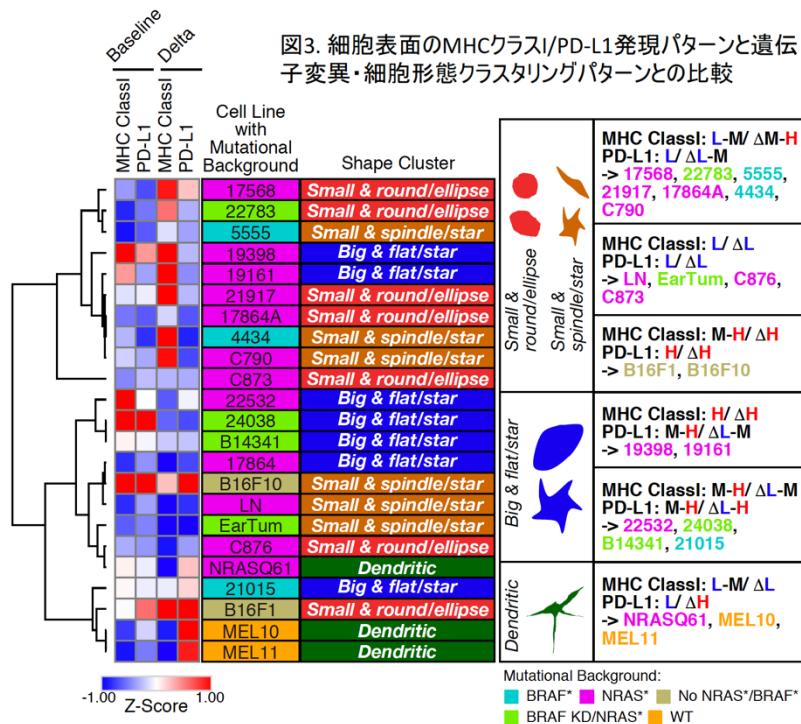


図2. 第1-5主成分を用いたメラノーマ細胞の階層的クラスタリング

② IFN γ 応答性と細胞形態の相関

背景で上述した仮説を立証するため、我々はIFN γ -JAK-STATシグナリングに着目した。IFN γ が受容IFN γ 受容体 (IFNGR) に結合すると、JAKキナーゼがリクルートされ受容体のチロシン残基をリン酸化する。IFNGRが受容体型チロシンキナーゼとしてSTAT1をリン酸化すると、リン酸化を受けた



STAT1は二量体を形成し核内へ移行し、転写因子として主に抗ウイルス応答に関わる。また、主要組織適合抗原MHC Class I分子の転写を促進して抗原提示能を上げると同時に、免疫抑制性リガンドPD-L1の転写を促す。癌細胞における本シグナル経路不活性化や遺伝子コピー数低下が免疫療法耐性を引き起こす事が報告されていることから、まず各メラノーマ細胞のIFN γ に対する応答性と細胞形態との関連を検証した。23種のメラノーマ細胞にIFN γ 刺激を行なった前、24時間後での細胞表面におけるMHC Class I/PD-L1発現をフローサイトメトリーで計測した。これらの発現パターンに基づき階層的クラスタリングを行い、①で決定した細胞形態クラスタリングおよび遺伝子変異パターンとの重複を比較した。MHCクラスI/PD-L1発現パターン-遺伝子変異間では非癌細胞であるメラノサイト（図3, MEL10, MEL11）との重複が認められたものの、癌細胞では両者の間に有意な重複パターンは認められなかった。一方でMHCクラスI/PD-L1発現パターン-細胞形態クラスタリング間では、細胞面積の大きな細胞と小さな細胞同士がそれぞれMHCクラスI/PD-L1発現クラスタリング上で近接して並んでいることが明らかになった（図3）。これらの結果より、メラノーマ細胞の形態が遺伝子変異背景よりも、よりIFN γ 応答性と関連していることが示唆された。

③ IFN γ 応答性に関わる形態学的特徴の同定

そこで、癌細胞のどのような細胞形態学的特徴が IFN γ 応答性を規定しているのかをより定量的なアプローチで検証することとした。まず、部分的最小二乗回帰法（Partial Least Square Regression: PLSR）を用いて、MHC クラス I/PD-L1 発現に関わる形態学的特徴の抽出を試みた。PLSR とは、主成分分析と重回帰分析を掛け合わせた線形回帰法の一種で、線形回帰の際に入力変数をそのまま用いるのではなく、目的変数と潜在変数の共分散が最大となるような潜在変数を入力変数の線形結合で作出し、その潜在変数を用いて出力変数を表現する手法である。これにより、入力変数間に強い相関関係がある場合や、入力変数となる予測因子の数が観測因子より多い場合でも、潜在変数の数を適切に選択することで、精度の高いモデルを構築することが出来る。メラノーマ細胞細胞を IFN γ 刺激 24 時間後に固定し、刺激前後のサンプルを細胞骨格マーカー α -Tubulin、上述した転写因子 STAT1、および核マーカーで免疫染色を行なった。その後、STAT1 核内蛍光強度・約 140 に及ぶ細胞形態学的特徴・テクスチャーを予測因子、MHC クラス I/PD-L1 発現を観測因子とし、PLSR モデルを構築、回帰係数の絶対値が大きな予測因子のみを抽出する事とした。予想通り、MHC

クラス I/PD-L1 とともに回帰係数の最も大きな予測因子としてその主な転写因子である STAT1 核内蛍光強度が上がって来た (図 4)。それ以外の予測因子に関し MHC クラス I、PD-L1 それぞれでみると、MHC クラス I に対する予測因子は主に細胞・細胞質の形態学的特徴であった一方で、PD-L1 に対する予測因子のほとんどが核の形態学的特徴であった (図 4)。これらのデータは、PD-L1 は STAT1 によりほぼ排他的に制御されているのに対し、MHC クラス I は STAT1 の他に細胞の形態や地理的な影響を受けることを示唆している (図 5)。MHC クラス I は翻訳された後、小胞体で抗原 loading の際に様々なタンパクと相互作用する事が知られており、本結果はそうした既知の知見と矛盾しないものである。

次に MHC クラス I 発現に関与する形態学的特徴を同定するため、我々はまず MHC クラス I の免疫染色実験系を確立し (図 6)、

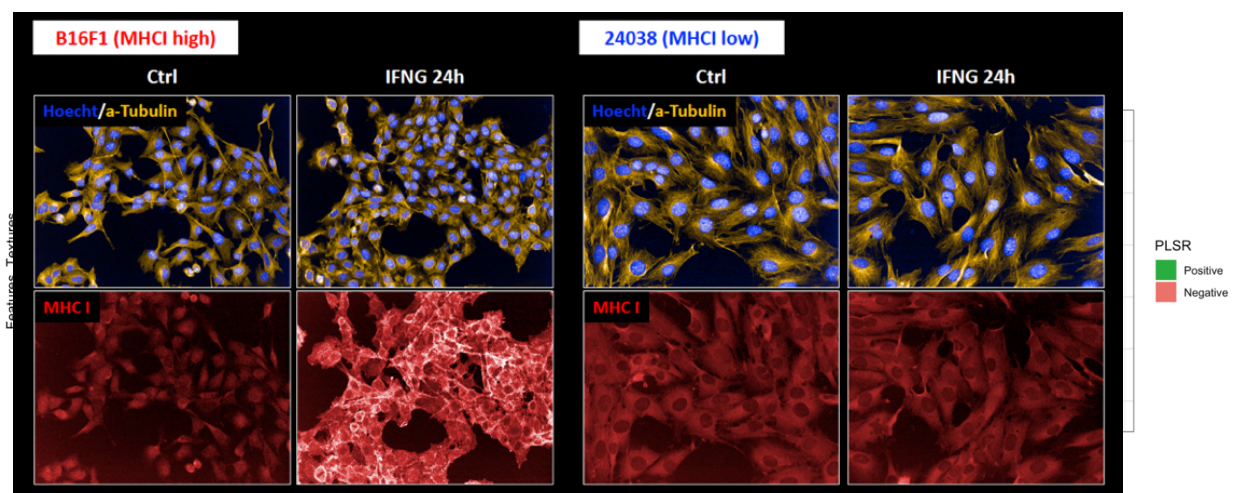


図6. MHCクラスI免疫染色: 左のパネルがMHCクラスの発現が高い細胞 (B16F1)。右のパネルがMHCクラスの発現が低い細胞 (24038)。免疫染色のデータはフローサイトメトリーのデータと概ね一致していた。

図5. PD-L1よりもMHCクラスIの方が細胞形態による影響を受けやすい。

STAT1、 α -Tubulin との同時染色を行う事により、1 細胞毎のデータを収集して Bayesian ネットワークを構築した。

Bayesian ネットワークは「原因」と「結果」の関係を複数組み合わせることにより、「原因」と「結果」がお互いに影響を及ぼしながら発生する現象をネットワーク図と確率という形で可視化した有向非循環グラフである。本ネットワークにおいては、確率変数がノード、ノード間の関係が矢線に対応し、矢印の方向に因果関係があると解釈することが出来る。23 種類のメラノーマ細胞から各 1,000 個の細胞をランダムに選出し、STAT1 核内蛍光強度、細胞内 MHC クラス I 蛍光強度に加

え、約 140 の形態学的特徴のうち 10 個の代表的な形態学的特徴計 12 個のノードに関して、相互の因果関係を IFN γ 刺激なしと刺激 24 時間後でそれぞれネットワーク図を作成した（図 7）。

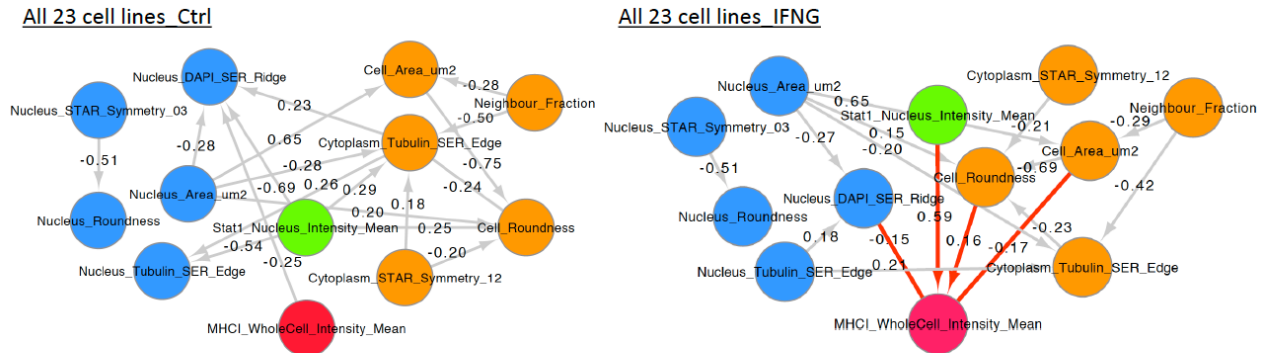


図7. IFN γ 刺激あり、刺激24時間後におけるBayesianネットワーク図。各ノードを繋ぐ矢印方向に因果関係があると解釈可能。また各矢印上の数値はノード間の相関係数を表す(相関が有意なもののみを可視化)。

IFN γ 刺激のない状態では MHC クラス I に対して因果関係を示すノードが存在しなかったのに対し、刺激 24 時間後、STAT1 核内蛍光強度の他に Cell Roundness, Cell Area が MHC クラス I に対して因果関係を示した。今回データは割愛するが、Cell Roundness, Cell Area は PLSR モデルにおいても、MHC クラス I 細胞内蛍光強度に対しそれぞれ正、負の予測因子として抽出された。これらの結果より、小さく、丸い細胞が IFN γ 刺激に対してより多くの MHC クラス I を発現させることが明らかになった。

④ 細胞形態的人為的操作による MHC クラス I 発現変化の検討

上記 Cell Roundness, Cell Area が細胞表面の MHC クラス I 発現とそれぞれ正の相関、負の相関を示すという実験結果に基づいて、次に細胞形態を人為的に変化させた時に IFN γ 刺激に対する MHC クラス I 発現がどのように変化するかを検討した。

384-well 内に播種する細胞密度を変化させたところ、細胞密度が上がるに従って全 12 細胞種で核内 STAT1 発現が低下したのに対し、MHC クラス I 発現は上昇する傾向にあった（図 8）。

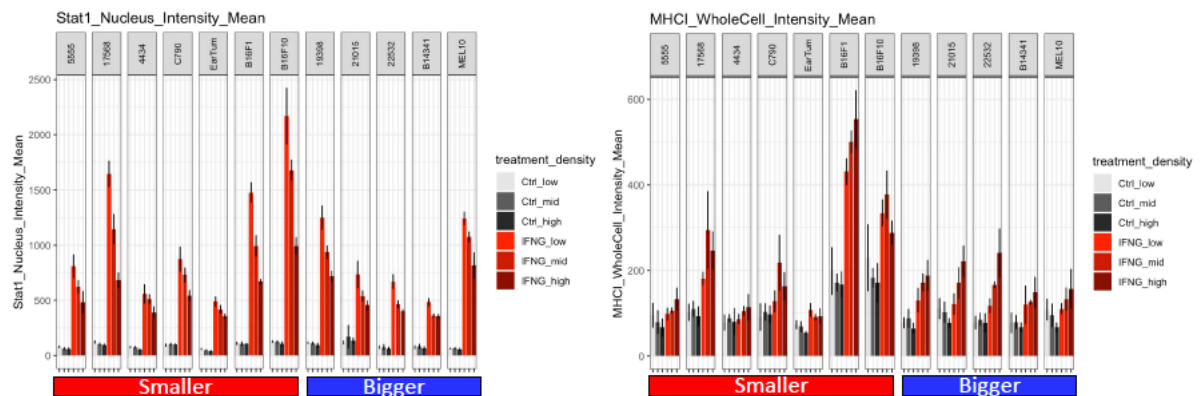


図8. 細胞密度が上がるに従って核内STAT1発現が低下したのに対し、MHCクラスI発現は上昇する傾向にあった。これは MHC クラス I 発現が STAT1 だけでなく細胞形態により制御されているという①、②の実験結果と一致している。また、細胞密度上昇に伴う MHC クラス I 発現の上昇は細胞面積の大きい細胞でより顕著に認められた（図 9）。

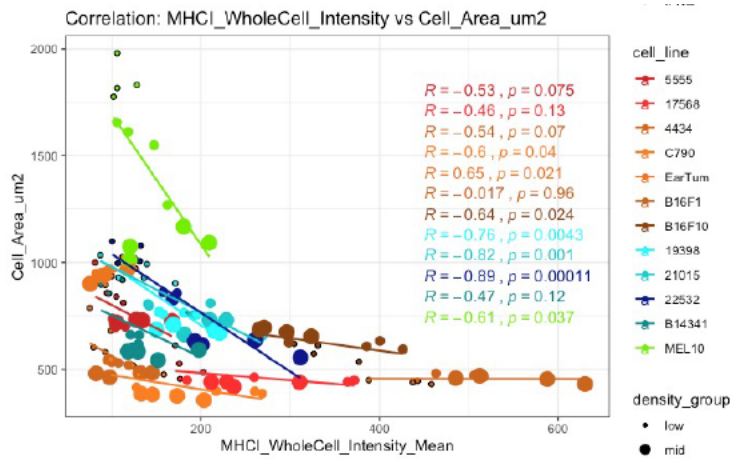


図9. 細胞密度上昇に伴うMHCクラスI発現の上昇は細胞面積の大きい細胞でより顕著に認められた（青色、緑色の細胞腫）。

細胞形態の操作による MHC クラス I 発現変化をより詳細に検討するため、IFN γ 刺激と共に細胞骨格を変化させる Blebbistatin（ミオシン II 阻害剤）、H1152（ROCK 阻害剤）、Nocodazole（微小管重合阻害剤）、PF-573228（FAK 阻害剤）、CK-666（Arp2/3 阻害剤）で処理した。図 10, 11 で示すようにこれらの薬剤はそれぞれ細胞の形態を変化させると同時に MHC クラス I 発現を変化させた。

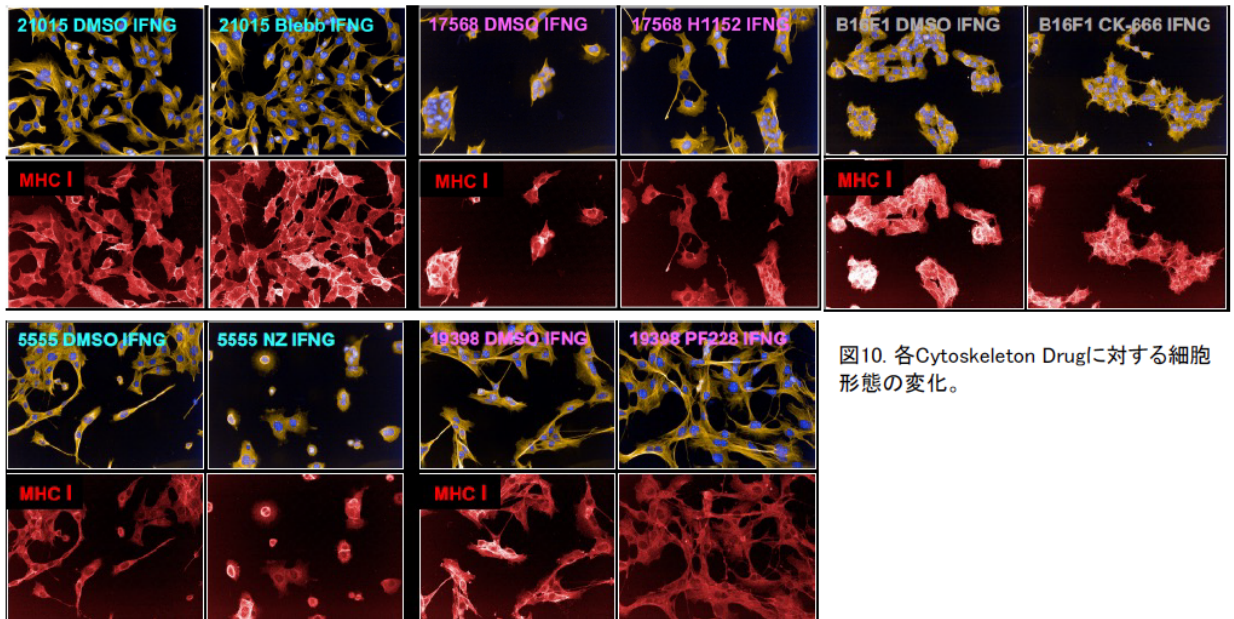


図10. 各Cytoskeleton Drugに対する細胞形態の変化。

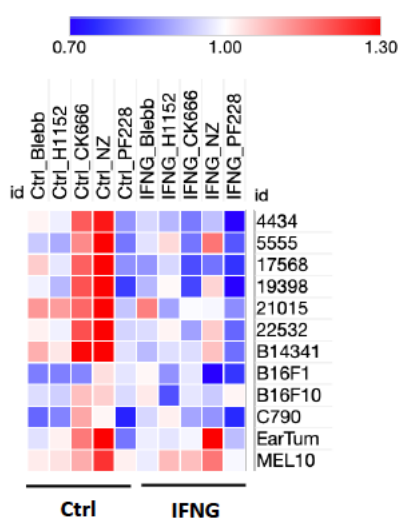


図11. 各Cytoskeleton Drugに対するMHC I 発現の変化。

細胞種毎の細胞形態と MHC クラス I 発現の共役関係を明らかにするため、まずコントロールの DMSO 処理時のデータを学習データとして STAT1 核内発現と細胞形態学的特徴・テクスチャーを予測因子、細胞表面の MHC クラス I 発現を観測因子とした PLSR モデルを構築した。PLSR モデル構築により IFN γ 刺激下における STAT1 核内発現と細胞形態学的特徴・テクスチャーから MHC クラス I 発現を予測することが出来る。さらに、このモデルに各細胞骨格を変化させる薬剤（Cytoskeleton Drug）で処理した際のデータをテストデータとして入力することで、それぞれの Cytoskeleton Drug で処理された細胞が細胞形態の変化を通じて MHC クラス I 発現を変化させているのか、あるいは細胞形態変化ではなくそれぞれの薬剤が特異的に阻害する経路を通じて変化させているのかを知ることが出来る。詳細は割愛するが、これらを定量的に評価する指標を考案しこれを Cytoskeleton Interaction Value（図 12）、また各細胞ご

との Cytoskeleton Value 合計値を Cytoskeleton Interaction Index と定義し、細胞種間における MHC クラス I 発現の細胞形態依存度を比較した。例えば、Cytoskeleton Interaction Index が低い（予測 MHC クラス I 発現と実測 MHC クラス I 発現が一致している）場合、その細胞は細胞形態の変

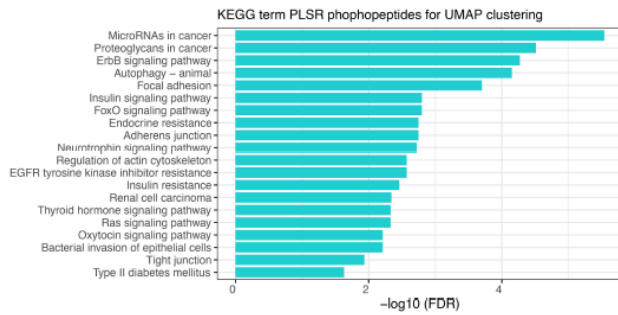


図15. リン酸化プロテオミクスデータのクラスターリングに寄与するシグナル経路(KEGGパスウェイ解析)。

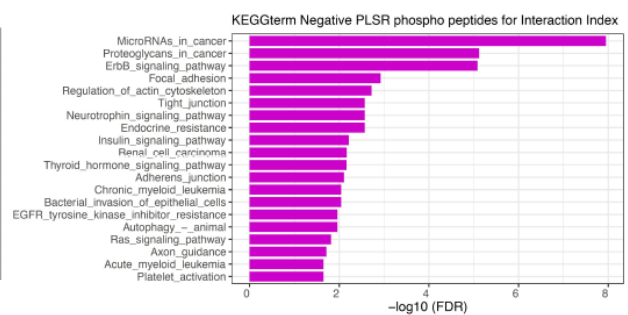


図16. Cytoskeleton Interaction Indexに負に寄与するシグナル経路(KEGGパスウェイ解析)。

り Cytoskeleton Interaction Index に負に寄与する（細胞形態-MHC クラス I 発現共役に関わる）リン酸化ペプチドの抽出を行った（図 16）。興味深いことに、これら 2 つに関わるリン酸化ペプチドには多くの重複が認められ、細胞骨格形成に関わる Focal Adhesion, Regulation of Actin Cytoskeleton や細胞接着に関わる Tight Junction, Adhesion Junction 関連のリン酸化ペプチドが濃縮されていた（図 17）。

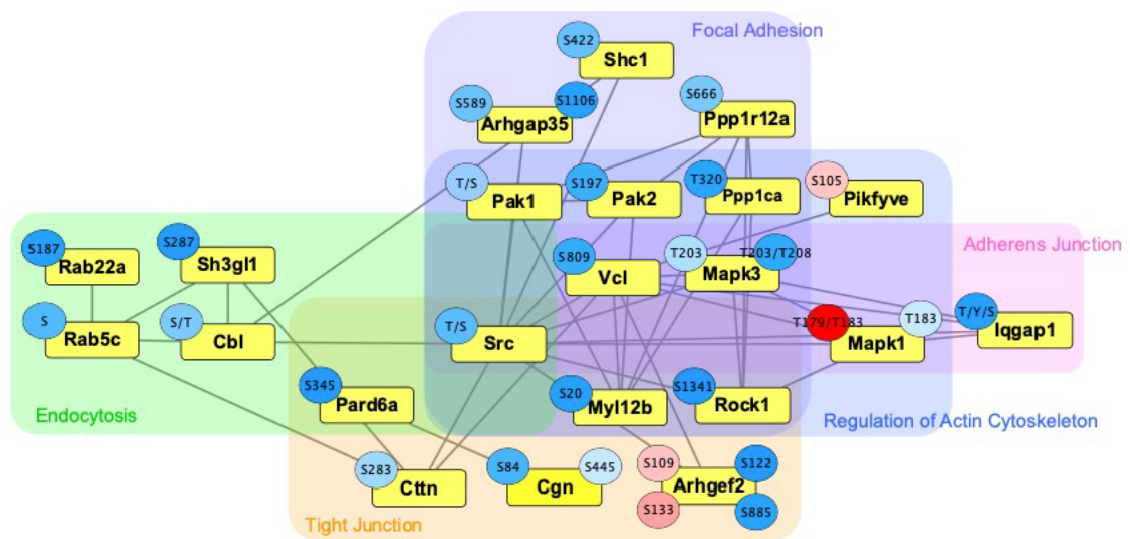


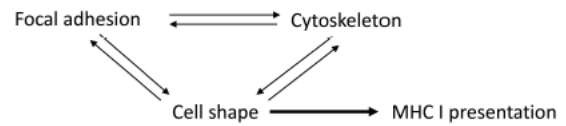
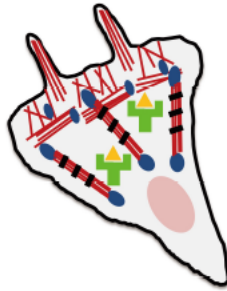
図17. Cytoskeleton Interaction Indexに負に寄与するシグナル経路としてFocal Adhesion, Regulation of Actin Cytoskeletonといった細胞骨格に関わる経路や、Adherens JunctionやTight Junctionといった細胞接着に関わる経路が同定された。

⑥ メラノーマ細胞の細胞形態-MHCクラスI分子共役に関する作業仮説

上記のデータからFocal Adhesion/ストレスファイバー形成が発達している細胞面積が大きい細胞（Mesenchymal-like）では、MHCクラスI発現が低く細胞形態-MHCクラスI発現が共役しており、反対に細胞面積が小さい細胞（Epithelial-like）では、MHCクラスI発現が高く細胞形態-MHCクラスI発現が脱共役している可能性が示唆された（図18）。特に全23細胞種の中でも最もIFN γ 刺激下のMHCクラスI発現が高かったB16F1は、IFN γ 刺激に応答してその形態を積極的に変化させて集簇を形成しており（図6）、現在その形態変化・細胞形態-MHCクラスI脱共役に関わる分子の同定に取り組んでいる。

■ Mesenchymal-like

- ✓ Low interaction index
- ✓ Large
- ✓ Protrusive
- ✓ Focal adhesion ↑
- ✓ MHC Class I ↓



■ Epithelial-like

- ✓ High interaction index
- ✓ Small
- ✓ Round
- ✓ Focal adhesion ↓
- ✓ MHC Class I ↑

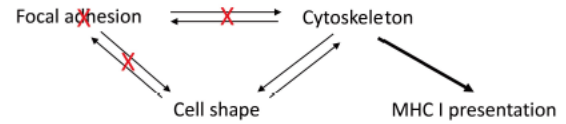
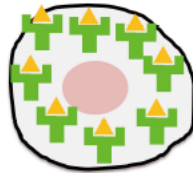


図18. 作業仮説: Focal Adhesion/ストレスファイバー形成が発達している細胞面積が大きい細胞 (Mesenchymal-like) では、MHCクラスI発現が低く細胞形態-MHCクラスI発現が共役しており、反対に細胞面積が小さい細胞 (Epithelial-like) では、MHCクラスI発現が高く細胞形態-MHCクラスI発現が脱共役している。