

IL-6R シグナル伝達のマルチプレックスイメージング

藤田 恵介（ヒューマン・メタバース疾患研究拠点）

上田 昌宏（生命機能研究科）

1 研究の背景

遺伝的に同一であり、同じ環境下に置かれた細胞集団においても、個々の細胞には差異が生じ、細胞の不均一性が現れる。近年、1細胞計測技術の発展により、この不均一性が定量的に評価できるようになり、その生物学的意義やメカニズム、さらには制御手法に関する研究が進められている。細胞の不均一性を制御する技術が確立されれば、薬剤耐性を獲得するがん細胞サブクローンの制御や、再生医療における均質な分化誘導の実現が可能となる。また、オルガノイドや人工組織の設計・構築に必要な、パターン化された細胞運命の制御にも応用できると期待される。

2 研究の目的

Interleukin-6 (IL-6) は、炎症、免疫応答、造血において多面的に機能し、がん細胞においては腫瘍の進行を促進する。また、神経幹細胞の自己複製能や分化の制御を通じて、発生や分化の過程にも重要な役割を果たす。IL-6 は細胞膜上に発現する IL-6 受容体 (IL-6R)/gp130 複合体に結合し、主に二つのシグナル伝達経路を活性化する。ひとつは JAK/STAT 経路であり、gp130 に結合した JAK が gp130 の細胞質領域に存在するチロシン残基をリン酸化し、リン酸化されたチロシン残基を足場として STAT3 が gp130 にリクルートされ、JAK によって STAT3 がリン酸化されることで活性化が進む。もうひとつは JAK/SHP2/MAPK 経路で、同様にリン酸化された gp130 のチロシン残基に SHP2 がリクルートされ、その下流で最終的に ERK が活性化される経路である。過去の報告では、EGFR 受容体シグナル伝達において応答の確率性が細胞状態により予測可能であることが示されている（引用文献 a）。本研究では、この予測可能性が他のシグナル伝達経路にも一般化できるかを検証した。特に、IL-6 シグナル伝達は EGFR シグナル伝達と分子ネットワークの一部が重なる一方で、JAK/STAT3 経路は関与する分子が少ないため、EGFR シグナルとの比較に有効であると考えられる。

3 研究の方法

本研究では、4i (Iterative Indirect Immunofluorescence Imaging、引用文献 b) と呼ばれる多重免疫染色技術を用いて、IL-6 刺激後のヒト肺がん由来上皮細胞 A549 の解析を行った。4i は、蛍光標識抗体による蛍光免疫染色を繰り返し行うことで、複数のタンパク質を同一細胞内で可視化・多重化する技術である。具体的には、IL-6 刺激によって活性化が知られている JAK、STAT、SHP2、MEK、ERK、AKT に加え、細胞状態の特性を反映するオルガネラマーカー、細胞周期マーカー、細胞接着分子、細胞骨格関連分子を多重免疫染色（マルチプレックスイメージング）により計測した（図1）。これらの画像情報からは、細胞間の位置関係、細胞周期、細胞

内のテクスチャといった、サブセラーレベルから細胞集団レベルにわたる複数の空間スケールの特徴を取得でき、最終的に 900 以上の特徴量を抽出した。

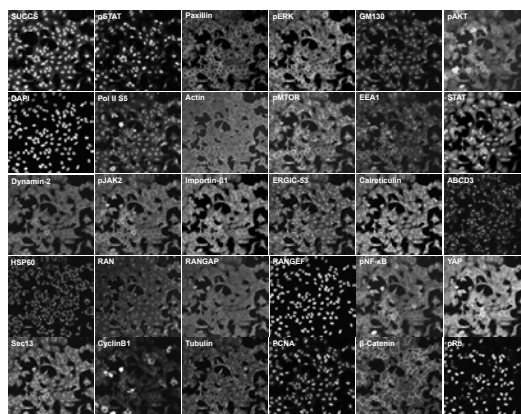


図 1: 本研究で行ったマルチプレックスイメージング

4 研究成果

本研究では、まずハイスループット共焦点顕微鏡を用いて、タイル状に取得した約 7 mm 四方の 30 種類の免疫染色画像から、数万個の細胞に対する画像解析を行い、900 以上の特徴量を抽出した。この実験では、IL-6 濃度を 100 ng/ml と設定し、刺激 5 分後に細胞を固定した。抽出された特徴量に対して主成分分析を適用し、90 % のばらつきを説明する 140 軸を設定することで、個々の細胞状態を 140 次元の変数空間で表現した。次に、この 140 次元で表された細胞状態を用いて、IL-6 刺激後のシグナル伝達ノード（JAK、STAT、SHP2、MEK、ERK、AKT）における核内および細胞質内でのリン酸化状態を予測するモデルを、重回帰分析により構築した（図2）。予測精度を決定係数で評価した結果、核内の STAT3 リン酸化に関しては、他のシグナル伝達ノードに比べて予測精度が低いこと（R2=0.18）が明らかとなった。一方、今年度の追加実験により、同じレセプターから活性化される SHP2 タンパク質については、ERK と同様に高精度な予測モデルを構築できた（図3）。この実験では、IL-6 濃度を 0、5、10、25、100 ng/mL と設定し、刺激 5 分後に細胞を固定した。構築した重回帰分析モデルにおいて、係数が高い軸に寄与する特徴量を解析した結果、SHP2 は核形状特徴量や、ペルオキシソームおよびエンドソームに局在する ABCD3 や EEA1 といったタンパク質と強い相関を示すことが判明した。以上の結果は、IL-6 受容体から情報伝達を受け取る二つのタンパク質（SHP2 および STAT3）が、外部刺激に対して異なる様式で応答している可能性を示唆している（図4）。現在、「SHP2

は従来のモデルで予測精度が高く、STAT3 は予測精度が低い」という結果に対して、その分子メカニズムの解明に向けた仮説を立て、研究を進めている。

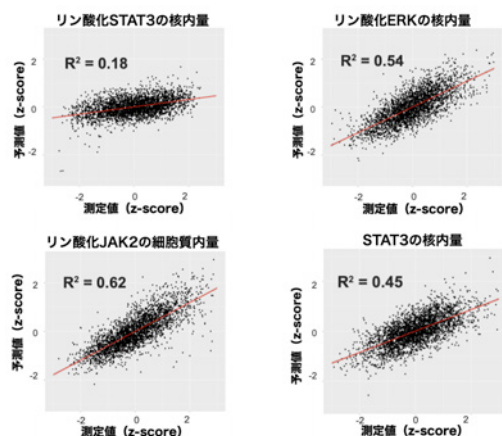


図 2: 重回帰分析を用いた活性化予測モデル

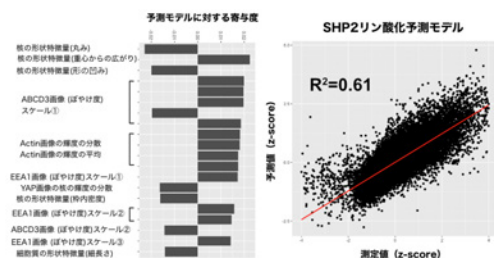


図 3: SHP2 リン酸化予測モデルと各細胞特徴量の寄与度

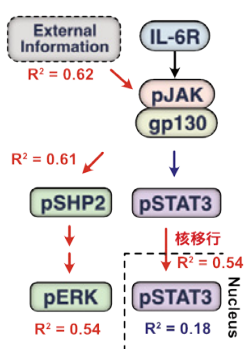


図 4: IL-6 刺激後の情報伝達の流れ

【学会発表】

- [1] Keisuke Fujita, “Modulation of Single-Molecule Stochasticity by Cellular Features”, EAST Asian Single-Molecule Biophysics Symposium, 2024.

【外部資金】

- [1] 2023-2025 年度, 科学研究費助成金 若手研究, “新規分子バーコードを用いた高速・高多重度・高空間分解能トランスクリプトーム解析”, (代表) 藤田恵介

引用文献

- [a] Bernhard A. Kramer, Jacobo Sarabia del Castillo, Lucas Pelkmans, “Multimodal perception links cellular state to decision making in single cells”, Science, 2022.
- [b] Gabriele Gut, Markus D. Herrmann, Lucas Pelkmans, “Multiplexed protein maps link subcellular organization to cellular states”, Science, 2018.