

# 博士論文概要

## 論文題目

同所性移植手法による乳がん高転移株の樹立と  
そのトランスクリプトーム解析  
Establishment of High-Metastatic Breast  
Cancer Cell Lines by Orthotopic  
Transplantation and Their Transcriptome  
Analysis

申請者

中山 淳

Jun NAKAYAMA

生命医科学専攻 細胞情報学研究

2018年12月

がんの約 80% は上皮から発生する癌腫であり、良性腫瘍は遺伝子変異とエピジェネティックな変化を蓄積することで悪性腫瘍（がん）へと変化する。がん細胞は基底膜を破壊して正常組織中へと浸潤し、遠隔臓器へ転移する。最初にごんが発生した組織病変を原発巣もしくは原発腫瘍と呼び、遠位リンパ節および遠隔臓器へ播種され増殖したがん病巣を転移巣と呼ぶ。原発巣から循環系・リンパ系を介して遠隔臓器へがん細胞が移動し増殖する過程が転移である。がんにおける死因のほとんどは遠隔臓器への転移によるものであり、転移は予後を規定しうる重要な要因である。転移巣に対する治療法は未だに確立されておらず、がんの根治を実現するためには転移の制圧（治療・予防）がなによりも重要である。

がん細胞が原発巣から転移する過程は、血行性転移、リンパ行性転移、播種性転移の 3 つに分類される。特に、血行性・リンパ行性転移における浸潤-転移機構は、複数段階に分けて考えることができ、1. 原発巣形成、2. 基底膜の分解および局所組織への浸潤、3. 血管およびリンパ管新生、4. 血管（リンパ管）内浸潤、5. 循環系（リンパ系）における生存、6. 遠隔臓器における血管（リンパ管）内皮細胞への接着、7. 血管（リンパ管）外浸潤、8. 転移ニッチの形成、9. 微小転移の形成および転移コロニーの形成、と多くの段階を経ることで成立しており、いずれかの段階でも欠けている場合は、遠隔臓器での転移巣形成は難しい。これまでの先行研究において、樹立されてきたほとんどの高転移株は血中移植や異所性移植によって樹立されたものであり、臨床の転移過程を正確に模倣できていない。臨床の原発腫瘍環境・浸潤-転移機構を模倣した転移株は樹立されておらず、どのような転移機構、転移制御遺伝子によって遠隔臓器への転移を引き起こすのか明らかになっていない。

本研究は、乳がんにおいて転移を高頻度で引き起こし、有効な治療法が確立されていないトリプルネガティブ乳がんをモデルとして、同所性移植手法を用いることで臨床における転移過程を模倣した高転移株の樹立を行った。実際にトリプルネガティブ乳がんの中でも、血中移植や異所性移植による高転移株の樹立に最もよく用いられてきたヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞を採用し、従来の血中移植手法で樹立した高転移株との比較解析を行った。樹立した高転移株に対して DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、同所性高転移株に特徴的な遺伝子群を抽出した。

また、同所性移植を行った原発腫瘍と転移巣から微小組織切片を採取し、空間情報を持つトランスクリプトーム解析を応用することで、*in vivo* 環境を反映した網羅的遺伝子発現解析の技術構築を行った。具体的には、無染色の凍結組織切片から高速かつ自動に微小組織を採取するシステムを採用し、*in vivo* 微小組織切片に対する網羅的遺伝子発現解析を行った。微小組織レベルでの原発腫瘍と転移巣の比較解析を行い、転移制御遺伝子の動態を明らかにした。

本論文は 5 つの章で構成されており、各章における概要を下記に詳述する。

第 1 章では、6 節に分けて序文と本研究の目的について記した。

第 1 節では、発がん浸潤・転移機構、またがん転移患者の予後について記した。

第 2 節では、転移における重要な考え方である臓器指向性と、それを制御する遺伝子の同定について、過去の研究と現在の動向について記した。

第 3 節では、上皮間葉移行 (EMT) と転移の関係性、また EMT とがん幹細胞について記した。

第 4 節では腫瘍内微小環境に存在する間質細胞と転移における役割、その同定方法について記した。

第 5 節では、がん研究における遺伝子発現解析とそのバイオインフォマティクス解析技術の貢献について詳述した。

第 6 節では、本研究の目的について詳述した。

第 2 章では、本研究に用いた材料と方法について記した。細胞培養法、プラスミドの構築法、動物実験と高転移株の樹立法、バイオインフォマティクス解析によるトランスクリプトーム解析法について記載した。

第 3 章では、本研究の結果について全部で 6 節に分けて記載した。

第 1 節では、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞を免疫不全マウスに移植することで作製した高転移性細胞株の樹立過程について記載した。

第 2 節では、第 1 節で樹立した肺高転移株の転移能の評価について詳述した。同所性移植手法を繰り返すことで、肺転移能の強い細胞株を樹立することに成功した。この高転移株は浸潤・転移機構のより早期の段階を亢進していることが明らかとなった。

第 3 節では、樹立した転移性細胞株における DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果について記した。解析の結果、移植手法に特徴的な遺伝子が存在することが明らかとなり、同所性肺高転移株に特徴的なこれらの遺伝子群はこれまでの高転移株研究では取りこぼされていた新規の転移制御遺伝子である可能性が示唆された。骨転移における解析でも、同様に移植手法に特徴的な遺伝子群が存在することがわかった。

第 4 節では、第 3 節で抽出した遺伝子群に対して、どのような機能を持つ遺伝子が多く発現しているかを評価するため、Gene Ontology データベースを用いたエンリッチメント解析を行った。この結果からも、移植手法が異なる高転移株では、それぞれ異なる生物学的機能が浸潤・転移過程に関与することが示唆された。

第 5 節では、第 3 節で抽出した遺伝子群に対して、遺伝子同士の発現相関性に着目したネットワーク解析を行った。ネットワークの構造からノード (遺伝子) の重要性を計算・可視化することができる中心性解析を行い、中心性の高い遺伝子群 (高中心性遺伝子) を抽出した。結果として、同所性高発現ネットワークにおいて *MMP1*、*TM4SF1*、*HAS2*、*ECT2*、*MMP3* などが抽出され、既知の転移制

御遺伝子が多く含まれていることがわかった。さらに高中心性遺伝子の生存解析から、*LBH*や*CAPS*が高発現している乳がん患者は転移・再発しやすいという結果が得られた。この2つの遺伝子のがんや転移に関連する報告はなく、新規の転移制御遺伝子候補として期待できる。また、尾静注高発現相関ネットワークにおいて高中心性遺伝子として抽出された*CSF3*は、MDA-MB-231細胞において肺微小転移ニッチの形成を促進する遺伝子である。尾静注肺高転移株においては、*CSF3*による肺微小転移ニッチの形成が重要な役割を担っていると考えられる。

第6節では、同所性移植モデルにおける微小组織切片の採取と原発巣と腋窩リンパ節転移巣の遺伝子発現解析について詳述した。結果として、リンパ節転移を亢進する*FGF1*がリンパ節転移に特徴的に発現上昇している遺伝子群の中に見つかった。さらにtSNE解析から原発腫瘍とリンパ節転移はそれぞれ2つのグループに分類できることがわかり、リンパ節転移はEMT-like/炎症型転移タイプと増殖型転移タイプの転移様式をとっている可能性が示唆された。臨床転移組織から取得したバルクのRNAに対する遺伝子発現解析の研究から、“EMT-like/炎症型”と“増殖型”の2つに分類できることが明らかにされていたが、微小组織レベルで解析を行った結果、転移組織内にはEMT-like/炎症型転移と増殖型転移が微小组織レベルで混在することが明らかとなった。

第4章では、5節に分けて本研究結果に基づく考察を行った。

第1節では、同所性移植手法によって樹立できた肺高転移株の表現型とその有用性について議論した。

第2節では、肺高転移株に対する網羅的遺伝子発現解析の結果に基づき、既知の転移制御遺伝子を例にあげて従来の移植手法で樹立された高転移株だけでは転移制御遺伝子を取りこぼされる可能性を提示した。

第3節では、骨転移における網羅的遺伝子発現解析の結果に基づいて、移植手法間の骨転移機構の違いについて考察した。

第4節では、発現相関性ネットワーク解析手法の有用性について考察し、同所性肺高転移株においては複数の浸潤-転移機構が存在する可能性を提示した。

第5節では、*in vivo*環境を反映した空間トランスクリプトームの結果について考察した。微小组織ごとの発現解析では、EMT-like/炎症型転移と増殖型転移が混在していることが示され、*in vivo*における転移動態と治療の問題点を考察した。

第5章では、本研究の結論を記した。すなわち、本研究により、高転移株を樹立する移植手法は、新規転移遺伝子の同定において重要な意味をもつことが示された。また、*in vivo*微小组織の遺伝子発現解析から、転移巣が持つ不均一性を反映した遺伝子発現プロファイルを取得することに成功し、EMT-like/炎症型転移と増殖型転移が混在していることが明らかになった。以上の研究内容は、がん転移機構の解明とその制御法の開発に貢献すると期待される。

## 早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

中山 淳

印

(2018年 12月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
論文	<p>1. A Murakami, M Maekawa, K Kawai, <u>J Nakayama</u>, N Araki, K Semba, T Taguchi, Y Kamei, Y Takada, and S Higashiyama, "Cullin-3/KCTD10 E3 complex is essential for Rac1 activation through RhoB degradation in HER2-positive breast cancer cells". <i>Cancer Science</i>, <i>in press</i>(掲載決定)</p> <p>2. ○<u>J Nakayama</u>, E Ito, J Fujimoto, S Watanabe, and K Semba, "Comparative analysis of gene regulatory networks of highly metastatic breast cancer cells established by orthotopic transplantation and intra-circulation injection". <i>International Journal of Oncology</i> 50.2 (2017): 497-504.</p> <p>3. T Matsudaira, K Mukai, T Noguchi, J Hasegawa, T Hatta, S Iemura, T Natsume, N Miyamura, H Nishina, <u>J Nakayama</u>, K Semba, T Tomita, S Murata, H Arai, and T Taguchi, "Endosomal phosphatidylserine is critical for the YAP signaling pathway in proliferating cells", <i>Nature Communications</i> 8,1246(2017).</p>
講演 国際学会	<p>1. <u>Jun Nakayama</u>, Jiro Fujimoto, and Kentaro Semba, Establishment and Characterization of highly metastatic breast cancer cell line by orthotopic transplantation, Metastasis Research Society 17th Biennial Congress, Princeton University NJ USA, 31 Jul- 5 Aug 2018, Poster presentation: Y73</p> <p>2. <u>Jun Nakayama</u>, Jiro Fujimoto, and Kentaro Semba, Establishment and Characterization of highly metastatic breast cancer cell line by orthotopic transplantation, EACR-MRS Conference Seed and Soil: In Vivo Models of Metastasis, Harnack House Berlin Germany, 27-29 November 2017, poster presentation:No.70</p>
講演 国内学会	<p>1. <u>中山淳</u>, 伊藤恵美, 藤元次郎, 渡邊慎哉, 仙波憲太郎, 同所性移植手法を用いた乳がん高転移株の作製とその Transcriptome 解析, In vivo イメージングフォーラム 2018, 東京都港区 THE GRAND HALL, 2018年10月19日, ポスター発表 No:9</p> <p>2. <u>中山淳</u>, 仙波憲太郎, 腫瘍内微小不均一性解明のための空間トランスクリプトミクス解析技術の確立, 第77回日本癌学会学術総会, 大阪府北区 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪, 2018年9月27-30日, ポスター発表:P-2163</p> <p>3. <u>中山淳</u>, 仙波憲太郎, 空間トランスクリプトミクス解析技術を用いた腫瘍内微小不均一性の解明, 文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」平成30年度若手技術講習会(がん若手), 長野県茅野市 蓼科グラウンドホテル滝の湯, 2018年9月6-8日, ポスター発表:P48</p> <p>4. <u>中山淳</u>, 仙波憲太郎, 腫瘍内微小不均一性解明のための空間トランスクリプトミクス解析技術の確立, 第27回日本がん転移学会学術集会・総会, 神奈川県横浜市 ホテルメルパルク横浜, 2018年7月19-20日, ワークショップ3: 転移研究の新技術 W3-3</p>

## 早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
講演 国内学会	<p>5. 中山淳, 藤元次郎, 仙波憲太郎, 同所性移植手法を用いた乳がん高転移株の作製とその Transcriptome 解析, 第 22 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 東京都千代田区都市センターホテル, 2018 年 5 月 16-18 日, ワークショップ 14: 転移・浸潤 I W14-5</p> <p>6. 中山淳, 松井貴香, 藤元次郎, 二口充, 仙波憲太郎, Multi-organ metastasis 誘導遺伝子 HNF1B の同定と機能解析, 文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」平成 29 年度成果発表会, 滋賀県大津市 琵琶湖ホテル, 2018 年 1 月 24-25 日, ポスター発表: P-49</p> <p>7. 中山淳, 松井貴香, 坂本舞, 藤元次郎, 仙波憲太郎, 乳がんアンプリコンに存在するホメオボックス遺伝子群の機能解析, 第一回がん代謝研究会・若手の会, 東京都港区 東京大学医科学研究所, 2018 年 1 月 16-17 日, 口頭発表: 0-09</p> <p>8. 中山淳, 有川浩司, 丸山徹, 松永浩子, 依田卓也, 細川正人, 神原秀記, 竹山春子, 仙波憲太郎, “腫瘍内微小不均一性解明のための空間トランスクリプトミクス解析技術の確立”, 第 40 回日本分子生物学会年会 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会, ConBio2017), 兵庫県神戸市 ポートアイランド, 2017 年 12 月 6 日-9 日, 口頭発表: 4AT-27-12, ポスター発表: 3P-1362</p> <p>9. 中山淳, 伊藤恵美, 藤元次郎, 渡邊慎哉, 鈴木健之, 仙波憲太郎, 同所性移植手法を用いた乳がん高転移株の作製とその Transcriptome 解析, 平成 29 年度金沢大学がん進展制御研究共同利用・共同研究拠点シンポジウム・成果発表会, 石川県金沢市 金沢東急ホテル, 2017 年 10 月 26 日, ポスター発表: 9-1</p> <p>10. 中山淳, 松井貴香, 藤元次郎, 二口充, 伊藤恵美, 渡邊慎哉, 仙波憲太郎, Multi-organ metastasis 誘導遺伝子 HNF1B の同定と機能解析, 第 76 回日本癌学会学術総会, 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜, 2017 年 9 月 28-30 日, 口頭発表: J-3104</p> <p>11. 中山淳, 松井貴香, 藤元次郎, 二口充, 仙波憲太郎, Multi-organ metastasis 誘導遺伝子 HNF1B の同定と機能解析, 文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」若手技術講習会 2017 (がん若手), 長野県茅野市 蓼科グランドホテル滝の湯, 2017 年 9 月 7-9 日, 口頭発表: 0S-6</p> <p>12. 中山淳, 伊藤恵美, 藤元次郎, 渡邊慎哉, 仙波憲太郎, 同所性移植手法を用いた乳がん高転移株の作製とその Transcriptome 解析, 第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会, 大阪府大阪市 大阪国際会議場, 2017 年 7 月 27-28 日, ポスター発表: P05-3</p> <p>13. 中山淳, 藤元次郎, 仙波憲太郎, Multi-organ metastasis 誘導遺伝子 HNF1B の同定と機能解析, 第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 福岡県福岡市 九州大学医学部百年講堂・同窓会館, 2017 年 6 月 14-16 日, ポスター発表: P10-5</p>

## 早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
講演 国内学会	<p>14. <u>中山淳</u>, 伊藤恵美, 藤元次郎, 渡邊慎哉, 仙波憲太郎, 同所性移植手法を用いた乳がん高転移株の作製とその Transcriptome 解析, 文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」平成 28 年度成果発表会, 滋賀県大津市 琵琶湖ホテル, 2017 年 2 月 6-7 日, ポスター発表:P-28</p> <p>15. <u>中山淳</u>, 伊藤恵美, 藤元次郎, 渡邊慎哉, 仙波憲太郎, 同所性移植手法を用いた乳がん高転移株の作製とその Transcriptome 解析, 第 39 回日本分子生物学会年会, 神奈川県横浜市 パンフィコ横浜, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日, ポスター発表:2P-0708</p> <p>16. <u>Jun Nakayama</u>, Emi Ito, Jiro Fujimoto, Shinya Watanabe, and Kentaro Semba, Transcriptome analysis of early metastasis using breast cancer cells established by orthotopic transplantation, 第 5 回生命医薬情報学連合大会 (IIBMP2016), 東京都江東区 東京国際交流館プラザ平成, 2016 年 9 月 29 日-10 月 1 日, ポスター発表:PS-42</p> <p>17. <u>中山淳</u>, 伊藤恵美, 藤元次郎, 渡邊慎哉, 仙波憲太郎, 同所性移植手法を用いた乳がん高転移株の作製とその Transcriptome 解析, 文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」平成 28 年度若手技術講習会 (がん若手), 長野県茅野市 蓼科グランドホテル滝の湯, 2016 年 9 月 14-17 日, ポスター発表:PS-6</p>
その他 受賞等	<p>1. In vivo イメージングフォーラム 2018, 2018, <b>SPI 大賞 (最優秀賞)</b></p> <p>2. 文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」平成 30 年度若手技術講習会, 2018, <b>ベストポスター賞</b></p> <p>3. 文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」平成 29 年度若手技術講習会, 2017, <b>ベストトーク賞</b></p> <p>4. 第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2017, <b>ポスター賞</b></p> <p>5. 文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」平成 28 年度若手技術講習会, 2016, <b>ベストポスター賞</b></p>