

博士論文審査報告書

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

2019年2月

1. 論文内容の要旨

がん細胞は、局所組織と血管およびリンパ管内を移動し、肺や脳などの遠隔組織へと転移する。複数段階から成るがんの浸潤と遠隔転移は、転移制御遺伝子によって制御されている。浸潤-転移機構の理解のためには、各段階における転移制御遺伝子をさらに同定、解析する必要がある。

本研究の目的は、臨床のがんを模倣できる同所性移植手法を用いて高転移株を樹立し、同所性移植手法に特徴的な転移制御遺伝子を明らかにすることである。先行研究で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。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片を採取し、*in vivo* 環境を反映した遺伝子発現解析を行い、転移制御遺伝子の動態を明らかにした。

MDA-MB-231 細胞を用いて同所性移植手法、尾静脈注射手法および尾動脈注射手法を行うことで肺転移・骨転移を初めとした様々な転移巣からがん細胞を回収した。同所性移植手法によって樹立した転移株は親株よりも有意に転移を引き起こした。次に、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った結果から、肺転移および骨転移ともに同所性移植手法に特徴的な遺伝子群が存在することが明らかとなり、従来の手法だけでは転移制御遺伝子に取りこぼしが存在することが示された。また、Gene Ontology データベースを用いたエンリッチメント解析を行い、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。次に、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。ネットワーク解析から中心性の高い遺伝子群（高中心性遺伝子）を抽出すると、*MMP1*、*ECT2*、*MMP3* などの既知の転移制御遺伝子が含まれていることがわかった。さらに同所性ネットワークの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、新規の転移制御遺伝子候補と考えられた。

次に、高転移株の解析における問題点を解決するために、MDA-MB-231 細胞を同所性移植することで形成させた原発腫瘍と腋窩リンパ節転移巣からの *in vivo* 微小組織サンプリングと遺伝子発現解析を行った。実際に、tSNE 解析を用いて類似するスポット同士を可視化し、グループ分けとリポジショニングを行った。結果として、リンパ節転移と原発腫瘍はそれぞれ 2 つのグループ（リンパ節転移：LYMPH_A および B、原発腫瘍：PT_A および B）に分類できた。各スポットの属するグループ情報を組織切片位置情報に照合した結果、各グループのスポットは近接した位置には存在せず、グループごとに分類することができなかった。がんゲノム研究から、類似した細胞群は近傍に位置すると考えられてきたが、トランスクリプトーム階層における解析からは、同様の傾向は見られなかった。また、DESeq2 による遺伝子発現解析を行った結果、LYMPH_A グループは *MMP1*、*TGFBI*、*ZEB1*、*IL13RA2* などの EMT や炎症に関連する既知転移制御遺伝子の発現が上昇していた。一方、LYMPH_B グループでは増殖

に關与する *ADORA2B* や既知のリンパ節転移制御遺伝子 *FGF1* が発現上昇していた。これらの結果から、EMT-like/炎症型転移と増殖型転移がそれぞれ微小組織レベルで存在していることが明らかとなった。

2. 論文審査結果

2019年1月7日に行われた公聴会では、論文内容の説明と質疑応答が行われた。その概要を以下に記載する。

(1) 「原発巣切除によって、転移が亢進されることは考えられるのか。」という質問に対し、「切除しない実験は行っていないが、切除後に放出される VEGF-A などの刺激によって転移が亢進されるとの報告がある」との説明があった。

(2) 「高転移株を移植した際に *in vivo* での増殖能が増大しているが、具体的な機構とし、増殖能の増大とアポトーシスの減少のどちらだと考えられるか」という質問に対し、「実際に原発巣の切片を作製し、HE 染色による組織解析を行ったが壊死領域に大きな差はなかった。腫瘍辺縁部などを増殖マーカーやアポトーシスマーカーで組織免疫染色する必要がある。」と説明があった。

(3) 「高転移株を移植すると全身へ転移する表現型が見られているが、それはどのような転移だと考えているか」という質問に対し、「臓器そのものではなく、臓器に付随するリンパ節への転移だと考えられる。2018年に報告された同所性リンパ高転移株と同じような表現型を示している。」との説明があった。

(4) 「同所性高転移株と尾静注高転移株に共通する遺伝子はどのような意味をもつか」という質問に対し、「がん転移制御遺伝子には、浸潤・転移機構の中で複数の段階に寄与するものが存在するので、共通の遺伝子群は原発巣内と転移巣内両方で機能を持つ遺伝子ではないかと考えられる。」との説明があった。

(5) 「高転移株に対する遺伝子発現解析と *in vivo* 遺伝子発現解析における類似点はどこか」という質問に対し、「肺転移とリンパ節転移の研究であることから、2つの研究を比較することはできていない。肺胞構造から転移巣を採取することが技術的に難しいため、今後の課題である。」との説明があった。

(6) 「臨床検体転移巣の遺伝子解析に関する先行研究について、臨床検体でも2つの転移様式が混在するのか」という質問に対し、「実際のデータからも臨床検体においても2つの転移様式が混在していると考えられる。」との説明があった。

(7) 「*LBH* と *CAPS* の今後の解析は何を行うか」という質問に対し、「CRISPR/Cas9 を用いた KO 細胞株を樹立し、転移能に寄与するかどうかを評価する。ウェスタンブロットによるシグナル解析や代謝産物の解析などを通して分子機序を明らかにする必要がある。」との説明があった。

(8) 「同所性と尾静注高転移株において Parent 株との比較解析は行ったのか」という質問に対し、「高転移株と Parent 株の比較解析を行い、有意に変動している遺伝子を抽出した後に、移植手法間での比較を行った。」との説明があった。

(9) 「培養によって発現が変化した遺伝子が存在すると考えられるが、高転移株研究と *in vivo* 遺伝子発現解析に関して、条件を揃えて比較する研究が必要なの

ではないか」という質問に対し、「厳密な比較を行うためには条件を揃えた研究も重要であり、今後の課題である。培養によって変化するのは微小環境におけるストレス応答やホルモン応答などであると考えられる。」との説明があった。

(10)「増殖型と EMT/炎症型の表現型は、そもそも原発組織内にあったのではないか。」という質問に対し、「細胞が本来有していた性質である可能性はあり、シングルセル解析による微小不均一性の研究は重要である。しかし、ゲノムバックグラウンドは同一の転移巣であると考えられる。また他の細胞株において同様の転移様式が見られるか評価する必要もある。」との説明があった。

(11)「増殖が顕著であることから、炎症が起きている可能性も考えられる。組織学的な解析を行う必要はないのか」という質問に対し、「増殖・アポトーシスのマーカーを染色することで、組織学的な解析と評価は必要である。本研究ではトランスクリプトーム階層の解析に重点を置いていたので、今後は他のオミクス階層における解析も行うことで、より多角的な視点から解析をする必要がある。」との説明があった。

(12)「転移制御遺伝子を同定する重要性と意義は理解できるが、これらの基礎研究が治療にどう繋がるのか。」という質問に対し、「治療に直結することは難しいが、同定した遺伝子はバイオマーカーや治療標的分子になる可能性がある。これらの可能性については今後検討を進める必要がある。」との説明があった。

以上の研究内容の説明と質疑応答を通して、申請者が研究の意義と目的を理解し、本学術領域における十分な学識と考察力を備えていると判断された。本研究成果は同所性移植手法を用いて樹立した高転移株の有用性を提示した初めての報告である。さらに、微小組織レベルでの *in vivo* トランスクリプトーム解析技術を乳がん同所性移植モデルに初めて適用し、腋窩リンパ節転移巣が 2 つの転移様式を有していることを明らかにした。以上の理由から、主査および副査は博士（理学）の学位論文として相応しいと判断した。

2019 年 2 月

主査 早稲田大学理工学術院 教授 理学博士 東京大学

仙波 憲太郎

副査 早稲田大学理工学術院 教授 医学博士 山梨医科大学

大島 登志男

副査 早稲田大学理工学術院 教授 博士（医学） 慶應義塾大学

合田 亘人