

令和元年6月6日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10473

研究課題名(和文) 乳がん組織の複雑さによって生じるがん細胞協調メカニズムの解明

研究課題名(英文) Cancer cell interaction mechanisms caused by the complexity of breast cancer tissues

研究代表者

有馬 好美 (Arima, Yoshimi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・専任講師

研究者番号：20309751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：がんは、ゲノム的にも形質的にも多様で、異なる性質を持つ不均一ながん細胞の集団およびそれらの微小環境で構成される複雑な組織である。ヒト由来の異なる2種類のトリプルネガティブ乳がん細胞株を混合して免疫不全マウスの乳腺組織に移植すると不均一ながん組織が形成され、1種類のヒトトリプルネガティブ乳がん細胞株を用いた時と比べて、より大きな腫瘍となることがわかった。RNA-seq解析を行い、この不均一ながん組織において、特徴的に発現する遺伝子群を見出した。見出した遺伝子群は腫瘍の増殖能に関与し、これらが乳がんの悪性度および治療抵抗性と関連する腫瘍内不均一性のバイオマーカーとなる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんはゲノム的にも形質的にも多様であり、異なる性質を持つ不均一ながん細胞の集団と、その微小環境で構成される複雑な組織であることが知られている。腫瘍内不均一性は、がんのさらなる悪性化を誘導し、治療を困難にする原因となるため、がんの不均一性を標的とした治療法の開発を目指して本研究を行っている。がん組織内の不均一性がどのような機序で、乳がんの悪性度または治療抵抗性に関与するか解明できれば、今後の乳がん治療に大きく貢献できると考えられる。本研究によって見出した因子は、乳がんの悪性度および治療抵抗性と関連する腫瘍内不均一性のバイオマーカーとなる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)： Cancer is genomically and phenotypically diverse and composed of complex tissues, including tumor microenvironments and a heterogeneous population of cancer cells, all showing different characteristics. We formed heterogeneous cancer tissues by mixing two different human-derived triple-negative breast cancer cell lines and inoculating them into the mammary fat pads of immunodeficient mice. These heterogeneous cancers were more proliferative than the homogeneous cancers that were formed by individually inoculating the cell lines. We performed RNA-sequencing analysis to identify the genes which characteristically expressed in heterogeneous cancer tissues. Our hallmark genes seem to be involved in tumor growth and could be important biomarkers of intratumoral heterogeneity associated with malignancy and therapeutic resistance of breast cancers.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：乳がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんと診断された時点で、その腫瘍塊はすでに均一な細胞集団ではなく、不均一な形質を持った細胞で構成されている。これをがんの不均一性 (heterogeneity) と呼び、同一腫瘍内の不均一性を特に intra-tumor heterogeneity と呼ぶ。近年、がんの不均一性こそが、がんの治療を困難にする最大の原因であることが認識されるようになってきた。がんの不均一性は細胞レベルでゲノムの多様性および形質的な多様性の混合によって生じており、さらに、がん周辺微小環境や治療などによっても誘導され、がんをより複雑にしている。実際の乳がん臨床サンプルにおいて、がん組織を顕微鏡下で観察した際に見られる病理組織像 (形態) の不均一性は最も実感できるものであり、上皮細胞マーカーが陽性であるがん細胞と、間葉系細胞のマーカーが陽性であるがん細胞とが同一腫瘍内に混在していることがある。多様な細胞を含有するがんは、臨床的にも悪性度が高く、がんの不均一性は、治療抵抗性および転移能においても重要なカギを握っていると推測される。がんの不均一性がどのような機序で乳がんの悪性度または治療抵抗性に関与するか解明できれば、今後の乳がん治療に大きく貢献できると考えた。

2. 研究の目的

がんはゲノム的にも形質的にも多彩であり、異なる性質を持つ不均一ながん細胞の集団と、その微小環境で構成される複雑な組織であることが知られている。腫瘍内不均一性は、がんのさらなる悪性化を誘導し、治療を困難にすると考えられる。性質の異なる2つのヒト乳がん細胞株をマウスに同所移植することによって不均一ながん組織を構築し、次世代シーケンサーを用いて RNA シーケンス解析を行い、不均一ながん組織に特徴的に発現する遺伝子群を同定することによって、異なる性質を持つがん細胞間の協調メカニズムを解明することを目的とした。さらに、がん組織の複雑性と乳がんの悪性度および治療抵抗性との関係について分子レベルで明らかにし、がんの不均一性を標的とした治療法の開発を目指すこととした。

3. 研究の方法

異なる2種類のヒトトリプルネガティブ乳がん細胞株 (上皮細胞の性質を持ち腫瘍形成能が極めて低いものと、間葉系細胞の性質を持ち腫瘍形成能の高いもの) を混合して、免疫不全マウスに同所移植することによって構築した不均一な乳がん組織と、それぞれの乳がん細胞株を1種類ずつ同所移植することによって構築した乳がん組織から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。不均一な乳がん組織において特徴的に発現することがわかった候補因子について、乳がん患者の手術サンプルにおける RNA の発現とタンパク質の発現を、RNA-ISH および免疫組織染色により解析し、乳がんの悪性度との関連について検討した。

4. 研究成果

ヒト由来の異なる2種類のトリプルネガティブ乳がん細胞株を混合して、免疫不全マウスの乳腺組織に移植することによって不均一ながん組織を構築した。1種類のヒトトリプルネガティブ乳がん細胞株を用いた時と比べて、2種類のヒトトリプルネガティブ乳がん細胞株を混合した場合にはより大きな腫瘍が形成された。

この不均一ながん組織において、異なる性質を持つがん細胞間の相互作用が腫瘍の増大に関与する可能性が考えられたため、次世代シーケンサーを利用した RNA-seq 法により解析を行い、不均一ながん組織において特徴的に発現する遺伝子群を見出した。

見出したこれらの遺伝子がどのようなメカニズムによって発現上昇するか検討するとともに、乳がん患者の手術サンプルを用いた免疫組織染色により、これらの遺伝子がコードするタンパク質の発現解析を行った。本研究によって見出した因子は、乳がんの悪性度および治療抵抗性と関連する腫瘍内不均一性のバイオマーカーとなる可能性が考えられた。

得られた成果については、現在、論文を作成中である。

今後、見出した遺伝子群についてそれぞれの遺伝子の機能解析をさらに進め、治療標的としての可能性について検討する。がん組織内の不均一性がどのような機序で乳がんの悪性度または治療抵抗性に関与するか解明できれば、乳がんの不均一性を標的とした新たな治療法の開発につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

Hosonaga M, Arima Y, Sampetean O, Komura D, Koya I, Sasaki T, Sato E, Okano H, Kudoh J, Ishikawa S, Saya H, Ishikawa T: HER2 Heterogeneity Is Associated with Poor Survival in HER2-Positive Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8). pii: E2158. doi: 10.3390/ijms19082158. 査読有り

Harigai R, Sakai S, Nobusue H, Hirose C, Sampetean O, Minami N, Hata Y, Kasama T, Hirose T, Takenouchi T, Kosaki K, Kishi K, Saya H, Arima Y: Tranilast inhibits the expression of genes related to epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in neurofibromin-deficient cells. *Sci Rep.* 2018;8(1):6069. doi: 10.1038/s41598-018-24484-y. 査読有り

Semba T, Sugihara E, Kamoshita N, Ueno S, Fukuda K, Yoshino M, Takao K, Yoshikawa K, Izuhara K, Arima Y, Suzuki M, Saya H: Periostin antisense oligonucleotide suppresses bleomycin-induced formation of a lung premetastatic niche for melanoma. *Cancer Sci.* 2018;109(5):1447-1454. doi: 10.1111/cas.13554. Epub 2018 Mar 31. 査読有り

Ouchi T, Morikawa S, Shibata S, Takahashi M, Yoshikawa M, Soma T, Miyashita H, Muraoka W, Kameyama K, Kawana H, Arima Y, Saya H, Okano H, Nakagawa T, Asoda S: Recurrent Spindle Cell Carcinoma Shows Features of Mesenchymal Stem Cells. *J Dent Res.* 2018:22034518759278. doi: 10.1177/0022034518759278. 査読有り

Minami N, Maeda Y, Shibao S, Arima Y, Ohka F, Kondo Y, Maruyama K, Kusuhara M, Sasayama T, Kohmura E, Saya H, Sampetean O: Organotypic brain explant culture as a drug evaluation system for malignant brain tumors. *Cancer Med.* 2017;6(11):2635-2645. doi: 10.1002/cam4.1174. Epub 2017. 査読有り

Otsuki Y, Saya H, Arima Y: Prospects for new lung cancer treatments that target EMT signaling. *Dev Dyn.* 2018;247(3):462-472. doi: 10.1002/dvdy.24596. Epub 2017. Review. 査読有り

Semba T, Arima Y: Epithelial-mesenchymal transition is predetermined by the epigenetic state of the skin tumor cell of origin. *Stem Cell Investig.* 2017;4:37. doi: 10.21037/sci.2017.04.04. eCollection 2017. 査読無し

Sato R, Nakano T, Hosonaga M, Sampetean O, Harigai R, Sasaki T, Koya I, Okano H, Kudoh J, Saya H, Arima Y: RNA Sequencing Analysis Reveals Interactions between Breast Cancer or Melanoma Cells and the Tissue Microenvironment during Brain Metastasis. *Biomed Res Int.* 2017;2017:8032910. doi: 10.1155/2017/8032910. Epub 2017. 査読有り

Takamoto Y, Arima Y, Saya H: Development of mouse models of malignant phyllodes tumors by transplantation of syngeneic mammary gland cells expressing mutant H-Ras. *Genes Cells.* 2016;21(11):1244-1252. doi: 10.1111/gtc.12435. Epub 2016. 査読有り

Sato R, Semba T, Saya H, Arima Y: Concise Review: Stem Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Cancer: Biological Implications and Therapeutic Targets. *Stem Cells.* 2016;34(8):1997-2007. doi: 10.1002/stem.2406. Epub 2016. Review. 査読有り

Umeyama K, Watanabe K, Watanabe M, Horiuchi K, Nakano K, Kitashiro M, Matsunari H, Kimura T, Arima Y, Sampetean O, Nagaya M, Saito M, Saya H, Kosaki K, Nagashima H, Matsumoto M: Generation of heterozygous fibrillin-1 mutant cloned pigs from genome-edited foetal fibroblasts. *Sci Rep.* 2016;6:24413. doi: 10.1038/srep24413. 査読有り

[学会発表](計 15 件)

Arima Y, Saya H

Early diagnostic markers for refractory heterogeneous breast cancers containing squamous-like cancer cells (ポスター発表)

11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine
2019

Arima Y

上皮系および間葉系乳がん細胞から成る不均一性腫瘍

Heterogeneous Tumors Composed of Epithelial-type and Mesenchymal-type Breast Cancer Cells (コアシンポジウム、セッションテーマ: 治療標的としてのがん幹細胞の位置付け)
第77回日本癌学会学術総会 2018年

Kasuga A, Semba T, Takaishi H, Kanai T, Saya H, Arima Y
Intrahepatic cholangiocarcinoma and gallbladder carcinoma mouse model based on
transplantation of syngeneic tumor-initiating cells (ポスター発表)
American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018
2018

Semba T, Sato R, Kasuga A, Suzuki M, Saya H, Arima Y
Enriching EpCAM+/Sca-1+ mouse bronchioalveolar stem cells to generate lung
adenocarcinoma (ポスター発表)
American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018
2018

Arima Y, Harigai R, Saya H
The Mutation of the PTPN11 Gene that Encodes SHP-2 Protein Promotes Tumorigenic
Activity of the NF1-Deficient cells (ポスター発表)
American Society for Cell Biology (ASCB) | EMBO Meeting 2017
2017

Sato R, Semba T, Ichiyasu H, Fujii K, Saya H, Arima Y
TGF- Signaling Mediated by Fibroblasts is Associated with the Histological
Subtypes of Lung Adenocarcinoma (ポスター発表)
The IASLC 18th World Conference on Lung Cancer
2017

Arima Y
がんの促進における腫瘍内不均一性
Intratumor Heterogeneity and Cancer Promotion (International Sessions: 10. 癌幹
細胞の理解と克服に向けた新たな取り組み)
第76回日本癌学会学術総会 2017年

Arima Y, Saya H
Intra-tumor Heterogeneity Associated with EMT Contributes to the Progression of
Cancer (ポスター発表)
Gordon Research Conference, Cell Growth & Proliferation
2017

Arima Y, Harigai R, Sato R, Takenouchi T, Kosaki K, Saya H
Additional Mutation in PTPN11 Gene Promotes Tumorigenesis of the NF1 Gene Mutated
Cells (ポスター発表)
American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017
2017

Hosonaga M, Arima Y, Sato E, Yamada K, Kaise H, Kawai Y, Teraoka S, Saya H and Ishikawa
T
Intratumoral Heterogeneity of HER2 Expression is Relevant to Breast Cancer
Malignancy (ポスター発表 233P)
European Society of Clinical Oncology (ESMO) 2016 Congress
2016

Arima Y
EMT が関連するがんの不均一性と乳がんの進展
Tumor Heterogeneity Associated with EMT Contributes to the Progression of Breast
Cancer (Symposia 16, がん転移におけるがん細胞と微小環境の変化 Cancer metastasis:
Beyond EMT)
第75回日本癌学会学術総会 2016年

有馬好美
がん細胞間相互作用と intra-tumor heterogeneity (ワークショップ 4: 乳癌個別化診断
への多様なアプローチ)
第24回日本乳癌学会学術総会 2016年

Sato R, Semba T, Kohroggi H, Saya H and Arima Y
The Association between Gastric Mucin 5AC (MUC5AC) Expressions, Transforming Growth

Factor- (TGF-) Signal, and Histopathological Phenotypes of Lung Cancer in Xenograft Models (ポスター発表)
American Association for Cancer Research Annual Meeting 2016
2016

Semba T, Sato R, Suzuki M, Saya H and Arima Y
EpCAM Positive Lung Cells are Involved in Organoid Formation (ポスター発表)
American Association for Cancer Research Annual Meeting 2016
2016

Arima Y, Semba T, Kasuga A, Harigai R and Saya H
The Cancer Promoting Mechanism Driven by Intra-tumor Heterogeneity (ポスター発表)
Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics
2016

〔図書〕(計 2 件)

(雑誌)

木村聖美、有馬好美：治療戦略を考えるうえでの Luminal/HER2 乳癌の基礎
医学のあゆみ Vol.261 No.5, 463-468, 2017

有馬好美、佐藤 亮：転写因子による上皮間葉転換の制御とがん幹細胞
実験医学 Vol.34 No.14, 2283-2287, 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 6 件)

名称：癌組織の不均一性マーカー及びその利用

発明者：有馬好美、佐谷秀行

権利者：学校法人慶應義塾

種類：特許

1)番号：特願 2015-133033 (優先権主張 PCT 出願により擬制取下げ)

出願年：2015 年

国内外の別：国内(日本国)

2)番号：PCT/JP2016/069529

出願年：2016 年

国内外の別：外国(PCT 出願)

2-1)日本国移行出願

番号：特願 2017-503971

出願年：2017 年

国内外の別：国内(日本国)

2-2)米国移行出願

出願年：2017 年

番号：US 15/740,214

国内外の別：外国(米国)

2-3)欧州移行出願

番号：EP 16818051.1

出願年：2017 年

国内外の別：外国(欧州)

2-4)中国移行出願

番号：CN 201680037950.9

出願年：2017 年

国内外の別：外国(中国)

取得状況(計 1 件)

名称：癌組織の不均一性マーカー及びその利用

発明者：有馬好美、佐谷秀行

権利者：学校法人慶應義塾

種類：特許

番号：特許第 6202659 号

取得年：2017年
国内外の別：国内（日本国）

〔その他〕
ホームページ等
慶應義塾大学・医学部・先端研遺伝子制御
<http://www.genereg.jp/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。