

令和 2 年 9 月 14 日現在

機関番号：85402

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07192

研究課題名（和文）乳癌の転移・再発予防の治療開発を目指した新規血管擬態関連遺伝子群の同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of a novel group of vascular mimicry-related genes for the development of treatments on prevention of breast cancer metastasis and recurrence

研究代表者

尾崎 慎治 (Ozaki, Shinji)

独立行政法人国立病院機構（呉医療センター臨床研究部）・その他部局等・その他

研究者番号：10558266

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：当院の臨床データを検討した結果においては、HER2-enrichedのVM（vascular mimicry：血管擬態）陽性例で再発例が多く、予後不良な傾向があることが占められた。また、VM陽性例では、核グレードが高い傾向にあった。また、それぞれのヒト乳癌細胞株でのVM形成再現に関しては、培養の条件の検討を行い、いずれの細胞株においてもVM形成の再現が可能であった。以上より、増殖力が高く悪性度の高い症例においてVM陽性例が多いことが示され、今後の研究にはヒト乳癌細胞株を使用することによりVMの再現が可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌の治療成績は薬物療法の進歩により全体として改善傾向にあるが、悪性度の高い症例での予後改善は十分ではない。本研究により、HER2陽性、核グレードが高いなど、悪性度の高い乳癌においてVMの発現率が高いことが示され、乳癌症例の予後改善のための治療標的となる可能性が示唆された。また、今後の基礎実験のためにヒト乳癌細胞株がVM再現のために使用可能であることが分かり、in vivoへの実験へと発展させることが可能であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The clinical data of our hospital showed that HER2-enriched VM-positive cases were more likely to recur and tended to have a poorer prognosis. Moreover, the nuclear grade tended to be higher in VM-positive cases. Regarding the reproduction of VM formation in each human breast cancer cell line, the conditions of culture were examined, and it was possible to reproduce the VM formation in any cell line. From the above, it was shown that there are many VM positive cases in cases with high proliferative potential and high malignancy, and it was suggested that VM can be reproduced by using human breast cancer cell lines in future studies.

研究分野：乳癌外科

キーワード：乳癌 血管擬態

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌の血管新生は癌細胞の増殖と転移巣の形成に重要な役割を果たすが、より増殖力の高い癌細胞集塊においては、新生血管に加えて血管擬態 (vascular mimicry (VM)) と称される血管内皮細胞をもたない管腔構造が存在し、癌細胞の増殖や転移に寄与することが報告されている。臨床的にも VM は乳癌を含む種々の癌において予後不良因子として報告されているが、VM を治療標的とする研究報告は少ない。

本研究では乳癌肝転移マウスモデルを用い、乳癌肝転移腫瘍と VM の関係を解析し、乳癌における新規 VM 関連遺伝子を同定し、それらが乳癌の転移・再発予防の治療標的候補になり得るかどうかを検証することを目指した。

### 2. 研究の目的

本研究はヒト乳癌における新規 VM (vascular mimicry: 血管擬態) 関連遺伝子を同定し、臨床、有用な治療標的になり得るかどうかを検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト乳癌細胞株の in vitro での 3D 培養および VM 形成の確認

代表的なヒト乳癌細胞株を Matrigel でコーティングされた細胞培養ディッシュで培養し、3D 培養を行い、

VM 形成を確認する。これらの細胞株はこれまでに in vitro あるいは in vivo で VM 形成が確認されている。In vitro で VM 形成が確認された後、研究(2)の in vivo においても同一の乳癌細胞株を用いる予定である。使用するヒト乳癌細胞株は 1.MCF7(Luminal-subtype) 2.SKBR3(HER2-subtype) 3.MDA-MB23(triple negative subtype)を用いる。

#### (2) ヒト乳癌細胞株と免疫不全マウスを用いた乳癌肝転移モデルの確立

1) 乳癌細胞移植部位での腫瘍形成および肝転移巣の観察のためには、自家蛍光を発する tdTomato 遺伝子の乳癌細胞株への導入を行う。この操作により、移植部位での腫瘍形成および肝転移巣の IVIS (in vivo imaging system) での観察が可能となる。

2) 乳癌肝転移マウスモデルの作製は研究代表者が確立した癌細胞の脾臓被膜下注入による血行性肝転移モデルの作製方法で行う。使用するマウスは重度の免疫不全マウス (NSG マウス) を用いる。研究開始時にマウスを購入し、交配により必要なマウスを準備する。1) で樹立した tdTomato 遺伝子を導入した3種類のヒト乳癌細胞株につき、10匹のマウスを使用し、全身麻酔下に乳癌細胞の移植を行う。移植部位で移植から4~8週後に摘出し、ホルマリン固定の後、パラフィン包埋の後、保存する。乳癌細胞移植から8~12週のモニタリングを行い、肝転移巣の成立を確認した後、マウスを安楽死させ、肝臓を摘出し、肝転移巣標本を同様に保存する。

(3) マイクロダイセクション法による VM 陽性 / 陰性腫瘍組織の回収と VM 関連遺伝子の同定  
腫瘍内の VM 形成の確認には、研究代表者らが確立したマウス抗ヒト laminin 抗体 (Sigma-Aldrich 社) を用いた免疫染色と Periodic acid Schiff (PAS) 染色を用いる。癌細胞は不均一な集団から構成されているため、乳癌細胞移植部位および肝臓転移巣において VM 陽性腫瘍と VM 陰性腫瘍に分かれることが予想される。次に、レーザーマイクロダイセクション法にて VM 陽性腫瘍組織と VM 陰性腫瘍組織を採取し、それぞれの total RNA を抽出し、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現プロファイルの比較を行う。解析には DN チップ (Affymetrix 社の Human gene 2.0ST Array, 40716 個の遺伝子のプロファイリングが可能) を用いる。この解析の結果、遺伝子変異によって VM 陽性腫瘍に有意に発現が上昇している遺伝子を新規 VM 関連遺伝子候補としてスクリーニングを行う。

#### (4) 乳癌臨床検体を用いた VM 関連遺伝子の発現と臨床的データとの相関関係の検討

研究(3)で得られた VM 関連遺伝子候補の発現を当施設の乳癌臨床検体を用いて定量的 RT-PCR 法、免疫組織染色によるタンパク質発現解析で検討する。また、当施設での臨床情報データベースの臨床情報との比較検討を行い、臨床、有用な治療標的となり得るかどうかを検討する。

#### (5) VM 関連遺伝子ノックダウンによる VM 形成および転移巣形成への影響の検討

研究(3)(4)の結果から得られた有望な VM 関連遺伝子に対する siRNA (small interfering RNA) \* をヒト乳癌細胞株に導入し、VM 関連遺伝子がノックダウンされたそれぞれのヒト乳癌細胞株を作成する。これらの細胞を用いて 3D 培養および乳癌肝転移モデルでの VM 形成および転移巣形成への影響を検討する。

\* TAKARA BIO INC. に siRNA1 発現プラスミド作製を依頼する。

### 4. 研究成果

(1) 臨床データを検討した結果、HER-2-enriched の VM 陽性例で再発例が多く、予後不良な傾向であった。また、VM 陽性例では、組織学的グレードが高い傾向にあった。

(2) それぞれのヒト乳癌細胞株での VM 形成再現に関しては、培養の条件の検討を行い、いずれの細胞株においても VM 形成の再現が可能であった。

(3)(4) それぞれのヒト乳癌細胞株への td-Tomato 遺伝子の導入は条件検討を行ったが、遺

伝子導入後の細胞形態が上皮系から間質細胞系に変異することが多く、更なる条件検討あるいは他の蛍光遺伝子の導入を考慮すべきと考えられた。In vivo の実験には蛍光遺伝子が導入された安定した細胞株を樹立して使用する必要がある。

・マウス肝転移モデルの樹立が出来なかったため、VM 関連遺伝子の同定のためのマイクロアレイを用いた解析は施行できなかった。

結果のまとめ：

蛍光遺伝子が導入された安定した細胞株の樹立が困難であり、In vivo の実験は実施できなかったが、VM の発現と臨床上の予後のデータとは相関する傾向にあり、現在の治療への抵抗性と関連する可能性は示唆された。

今後、これまでのデータをまとめて学会報告を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	倉岡 和矢  (Kuraoka Kazuya)  (00397928)	独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・ その他部局等・その他    (85402)	