2版

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月 ２９ 日現在

機関番号：１４３０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ１０５４６

研究課題名（和文）乳癌微小環境におけるマクロファージの脳転移特異的な役割の解明

研究課題名（英文）Analysis of brain metastasis specific role of macrophages in breast cancer microenvironment

研究代表者
鈴木　栄治（SUZUKI, EIJI）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：００６１２８９７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：乳癌脳転移に特異的な分子同定を目指し実験的に遺伝子発現解析を行った。
マウス乳癌細胞株であるEMT6を用いた脳転移モデル作成を行った。まずはじめにEMT6-WT細胞のマウス頸動脈への注射を行い４週間後脳組織、肺組織を採取し同組織を細片化し細胞懸濁を作成し培養した。培養にてEMT6細胞が確認されこれを脳転移細胞と同定しEMT6-Br1とした。EMT6-Br1細胞を再度頸動脈から注射し再び脳組織培養しEMT6脳転移細胞第二世代を樹立した（EMT6-Br2）。EMT6-WTおよびEMT6-Br2細胞のRNA-seqにより脳転移特徴的な遺伝子群が同定された。今後これら遺伝子の機能解析を行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義
乳癌脳転移は効果的な治療法が確立されておらず予後不良である。今回乳癌脳転移に関する重要な遺伝子群が同定されることにより新規治療法の開発に繋がることが期待される。ここでは乳癌脳転移細胞に特徴的な遺伝子の同定のみならず乳癌脳転移組織内に存在する免疫細胞など間質細胞の遺伝子的特徴の解析を行う。これにより乳癌細胞間質細胞の相互作用観点からの脳転移制御が可能となり、より治療効果の高い新規治療法の開発ができるものと考える。

研究成果の概要（英文）：Gene expression analysis was performed experimentally with the aim of identifying molecules specific for breast cancer brain metastasis.
A brain metastasis model was established using EMT6, which is a mouse breast cancer cell line. First, EMT6-WT cells were injected into the carotid artery of a mouse, and 4 weeks later, brain tissue and lung tissue were collected, and the tissue was fragmented into cell suspensions and cultured. EMT6 cells were confirmed by culture, and these were identified as brain metastatic cells and designated as EMT6-Br1. EMT6-Br1 cells were injected again from the carotid artery, and brain tissue was cultured again to establish the second generation of EMT6 brain metastatic cells (EMT6-Br2). RNA-seq of EMT6-WT and EMT6-Br2 cells identified scecific genes for brain metastasis. In the future, we will analyze the functions of these genes.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌　脳転移　遺伝子発現解析

※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。

１．研究開始当初の背景

乳癌において脳転移の病勢コントロールは他臓器転移と比較して著しく困難である。ゆえに乳癌脳転移治療における新規標的分子の同定とその臨床応用が乳癌診療の重要な課題である。

２．研究の目的

脳転移特異的治療標的分子の同定とその臨床応用への基盤となる成果を得ることを目的として、single cell からのゲノム解析を可能にする DEPArray の技術を利用し脳転移、脳転移以外の転移巣ならびに原発巣における癌細胞及び間質細胞（特に脳内マクロファージであるミクログリアに注目する）を個別に分取しそのゲノム/エピゲノム、遺伝子発現特性を比較解析する。

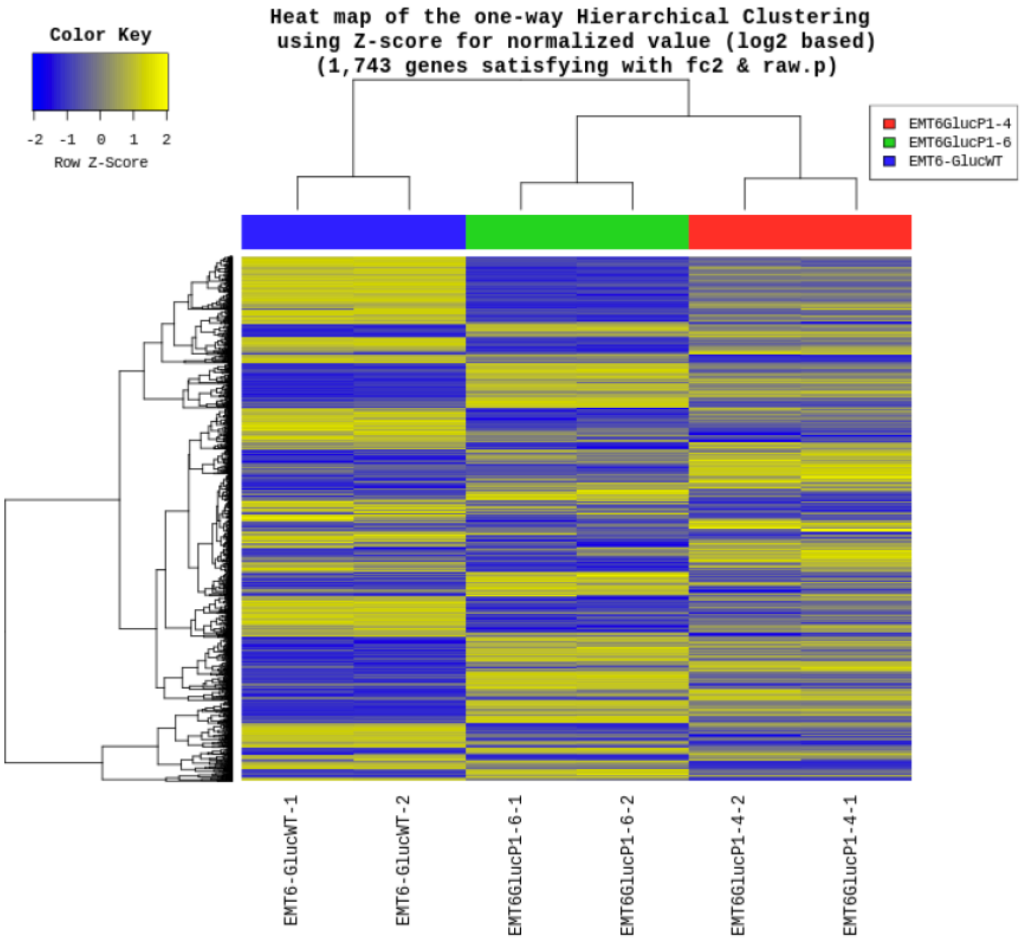
３．研究の方法

ヒト乳癌脳転移組織サンプルからの脳転移特異的分子の同定は凍結サンプルでの解析は全ての症例での保存がなされておらず断念した。そこで FFPE サンプルでの解析を目的に FFPE サンプルからの RNA 抽出を行った。得られた RNA の状態を評価したところ RIN 値は RNA-seq 解析には不十分であることが判明した。そこでマウス脳転移モデルでの解析へと予定を変更した。

マウス乳癌細胞株である EMT6 を用いた脳転移モデル作成を行った。まず始めに EMT6-WT 細胞の BALB/c マウス頸動脈への注射を行った。その際脳組織に効率良く流入することを目的に外頸動脈、総頸動脈（穿刺部近位側）を結紮したのち EMT6-WT 細胞を頸動脈注射した。4 週間後脳組織、肺組織を採取し肉眼的に観察したところ転移は確認されなかった。しかし同組織を細片化し細胞懸濁を作成し培養した。それぞれの培養にて EMT6 細胞が確認されたためこれを細胞レベルでの脳転移細胞と同定し EMT6-Br1 とした。EMT6-Br1 細胞を再度頸動脈から注射し脳組織を観察したところ結節が確認され組織採取、細片化し細胞懸濁を再度培養した。これを EMT6 脳転移細胞第二世代とし EMT6-Br2 とした。EMT6-WT および EMT6-Br2 細胞から RNA を抽出し RNA-seq により遺伝子発現比較解析を行った。

４．研究成果

EMT6-WT および EMT6-Br2 細胞から抽出した RNA を用いた RNA-seq により脳転移特徴的な遺伝子群が同定された（図：赤と緑が脳転移細胞株）。またさらに臨床状態に近い形での脳転移モデル作成のため、EMT6-Br2 細胞をマウスの乳腺組織へ注射し orthotopic breast cancer モデルからの自然脳転移モデルの作成を行った。現在自然脳転移細胞第一世代である EMT6-MFP-Br1 が得られている。このモデルを用いて組織解析から標的分子機能解析へと今後進めていく予定である。



Color Key
-2 -1 0 1 2
Row Z-Score
Heat map of the one-way Hierarchical Clustering
using Z-score for normalized value (log2 based)
(1,743 genes satisfying with fc2 & raw.p)
EMT6GlucP1-4
EMT6GlucP1-6
EMT6-GlucWT
EMT6-GlucWT-1
EMT6-GlucWT-2
EMT6GlucP1-6-1
EMT6GlucP1-6-2
EMT6GlucP1-4-2
EMT6GlucP1-4-1

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Suzuki E, Sugimoto M, Kawaguchi K, Pu F, Uozumi R, Yamaguchi A, Nishie M, Tsuda M, Kotake T, Morita S, Toi M	４．巻 X
２．論文標題 Gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells may contribute to the identification and immunological classification of breast cancer patients	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Breast Cancer	６．最初と最後の頁 X
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12282-018-0920-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Kawaguchi Kosuke、Suzuki Eiji、Nishie Mariko、Kii Isao、Kataoka Tatsuki R.、Hirata Masahiro、Inoue Masashi、Pu Fengling、Iwaisako Keiko、Tsuda Moe、Yamaguchi Ayane、Haga Hironori、Hagiwara Masatoshi、Toi Masakazu	４．巻 66
２．論文標題 Downregulation of neuropilin-1 on macrophages modulates antibody-mediated tumoricidal activity	５．発行年 2017年
３．雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	６．最初と最後の頁 1131～1142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-017-2002-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　2件）

１．発表者名 Eiji Suzuki; Kei Ishii; Takeshi Kotake; Fengling Pu; Eri Hohokabe; Mariko Nishie; Micio Yoshimura; Masakazu Toi
２．発表標題 Exploration of metastatic brain tumor microenvironment specific molecular properties of immune cells and breast cancer cells
３．学会等名 Cambridge Healthcare Institute ’ s 2nd Annual Advancing CNS Biotherapeutics and Crossing the Blood-Brain Barrier（国際学会）
４．発表年 2019年

１．発表者名 鈴木栄治
２．発表標題 Gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells in breast cancer patients may contribute to the identification and the immunological classification of breast cancer patients by blood test.
３．学会等名 米国がん学会（国際学会）
４．発表年 2017年

〔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	片岡　竜貴 (KATAOKA TATSUKI) (20343254)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	