

令和 6 年 6 月 2 7 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16455

研究課題名（和文）乳癌細胞の骨におけるDormancyの分子基盤解析と晩期再発への新規治療戦略開発

研究課題名（英文）Analysis of the molecular basis of dormancy in the bone of breast cancer cells and development of new therapeutic strategies for late recurrence

研究代表者

松永 有紀（MATSUNAGA, Yuki）

公益財団法人がん研究会・NEXT-Gankenプログラム がん細胞社会成因解明プロジェクト・客員研究員

研究者番号：80911768

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）：乳癌細胞の骨髄におけるDormancy病態の理解を目的に、骨髄微小環境を再現する乳癌細胞と間質細胞の3D共培養モデルを樹立した。3Dモデルで増殖停止状態にある乳癌細胞は老化、休止、幹細胞様などの特徴を持つ複数のクラスターから成り立つヘテロな細胞集団であった。また、乳癌細胞のみならず、間質細胞として用いた骨芽細胞、線維芽細胞も3D共培養下では複数のクラスターを形成し、それぞれ乳癌細胞の各クラスターと特徴的な相互作用を示した。次のステップとして、エストロゲン遮断やCDK4/6阻害剤などへの反応性評価を行い、晩期再発に寄与する乳癌・間質細胞集団の特定と、新たな治療アプローチの検証を試みる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌の長期予後悪化の要因の一つである晩期再発には、癌細胞が骨内で長期に増殖を停止しているdormancyが深く関わりとされているが、その本態は未だ不明である。本研究では、骨における乳癌細胞と周囲の微小環境との相互作用により乳癌のdormancyを再現する3Dモデルを樹立し、その詳細な病態を明らかにした。今後、晩期再発に關与する細胞集団の特定と、制御方法を検討することで、将来的に乳癌のdormancy細胞を標的とした晩期再発に対する新規治療戦略の創成へと繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：To investigate the pathophysiology of breast cancer dormancy within the bone marrow, we established a 3D co-culture model. In this model, breast cancer cells and stromal cells are seeded into a collagen matrix, emulating the bone marrow microenvironment. Heterogeneity among dormant breast cancer cells was observed in the 3D co-culture model, with each cluster of breast cancer cells interacting uniquely with each cluster of stromal cells. These characteristic interactions appear to contribute to the heterogeneity seen in breast cancer cells in the dormant state. This model offers valuable insights into the complex interactions between cancer cells and the bone marrow microenvironment, guiding future research and potential therapies for managing breast cancer dormancy.

研究分野：乳腺外科

キーワード：ER陽性乳癌 Dormancy single cell analysis 3D model

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 乳癌では、エストロゲン受容体(ER)の発現の有無が再発時期に大きく影響することが知られている。ER 陰性患者は原発腫瘍診断後、最初の 5 年以内に再発する傾向があるが、ER 陽性患者は 5 年から 20 年の間にリスクが増加する[1]。ER 陽性乳癌では 5 年から 10 年の術後内分泌療法が標準となっているが、一定数は術後内分泌療法終了後に骨転移などの晩期遠隔再発を呈する。そのため、晩期再発の予測因子の同定や、新たな晩期再発予防法の開発が強く望まれている。

(2) 乳癌晩期再発の機序として、癌細胞が手術前に遠隔臓器に播種し、微小病変として長期間潜伏し、何らかのきっかけで増殖と転移に切り替わるという Dormancy 説が提唱されてきた[2]。しかし、Dormancy 状態を反映する十分なモデルシステムの欠如のため、乳癌の遠隔再発部位として頻度の高い骨において、乳癌細胞が Dormancy 状態で維持される詳細な分子メカニズム は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

(1) 骨髄間質細胞との共培養下で増殖抑制を起こす乳癌細胞の分子基盤を解明することで、骨髄における乳癌細胞の Dormancy の病態を明らかにする。

(2) 骨髄間質細胞由来の乳癌細胞に Dormancy 状態を誘導する未知の責任因子を同定し、その制御方法を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 骨髄微小環境を忠実に再現した、乳癌細胞と骨髄間質細胞（線維芽細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞）をコラーゲンベースの 3D 骨格内で共培養する in vitro モデル を構築し、シングルセル解析技術を活用することで、Dormancy 状態の乳癌細胞と周囲間質細胞の詳細な分子基盤を解明する。

(2) 骨髄間質細胞との 3D 共培養で乳癌細胞に増殖抑制を引き起こす因子の同定のため、骨髄細胞由来液性因子の乳癌細胞への添加、サイトカインアレイ、プロテオーム解析を行う。増殖抑制因子候補の絞り込み後、添加実験により増殖抑制効果を検証する。

## 4. 研究成果

(1) 骨髄間質細胞との共培養下における Dormancy 状態の乳癌細胞の分子基盤の解明

既報の骨髄微小環境を再現した 3D 共培養 in vitro モデル[3]を改編し、汎用性を高めたオリジナルの共培養モデルを構築した。本モデルでは骨髄間質細胞(線維芽細胞：HS-5、骨芽細胞：hFOB、血管内皮細胞：HUEhT-2)との共培養によって乳癌細胞株 T47 D の増殖抑制を引き起こすことに成功した。限界希釈による T47D 細胞のクローニングを行い、それぞれのクローンで 3D 共培養を行ったところ、増殖抑制の程度は様々であった。1 クローンのみ増殖抑制が引き起こされないクローンも確認できた。

次に、骨髄間質細胞との 3D 共培養下の乳癌細胞と、3D 単培養の乳癌細胞の性質を、シングルセル解析技術を用いて詳細に分析した。T47D 細胞のみを抽出し再クラスタリングを行ったところ、それぞれ特徴的な発現状態を示す複数のクラスターに分かれ、3D 共培養下で増殖停止中の T47D 細胞はヘテロな細

胞集団であることがわかった。細胞周期解析で S、G2/M 期にあるクラスター、T47D 細胞 mono culture 由来のクラスターを除き、4 つのクラスターが間質細胞からの影響下で dormant 状態にある T47D 細胞と考えられた。また、3D 共培養下の hFOB 細胞、HS-5 細胞についても複数のクラスターを形成し、それぞれ乳癌細胞の各クラスターと特徴的な相互作用を示した。血管内皮細胞 HUEhT-2 については single cell 解析の結果、3D 共培養 Day9 時点で生存細胞数が極少なく、乳癌細胞への影響は限定的と考えられた。骨髄間質細胞として HS-5 細胞と hFOB 細胞のみを用いた場合も乳癌細胞の増殖抑制効果に有意な差は認めなかったため、以降は 3D 共培養の際に HUEhT-2 を除いている。今回、新たに樹立した 3D 共培養モデルにより骨微小環境での乳癌細胞、間質細胞の多様性、相互作用特性を明らかにした。今後は、この 3D モデルを使用し、エストロゲン遮断や CDK4/6 阻害剤などへの反応性評価を行い、晩期再発に寄与する乳癌・間質細胞集団の特定と、新たな治療アプローチの検証を試みる。

## (2) 骨髄間質細胞由来の乳癌細胞に Dormancy 状態を誘導する未知の責任因子の同定

樹立した 3D 共培養モデルを用いて T47D 細胞に間質細胞の培養上清を添加し、同様の増殖抑制が引き起こされることを確認した。次に、間質細胞の培養上清添加下の乳癌細胞の発現変化を評価するため、間質細胞由来上清添加 9 日目の T47D 細胞の bulk RNA-seq 解析を行った。Enrichment score 解析で E2F target gene、ER response early、ER response late の低下、Inflammatory response、Interferon alpha response、Interferon gamma response の増加が見られた。

3D model での間質細胞培養上清、T47D 培養上清、間質細胞と T47D 細胞共培養上清のサイトカインアレイ解析を施行し、乳癌細胞に増殖抑制状態を引き起こす原因因子の特定を試みた。間質細胞由来の 12 種類のサイトカインと、共培養下のみで上昇が見られた 2 種類を合わせた 14 種類のサイトカインを候補としてリストアップした。14 種類のサイトカインの生理的濃度をプロテオーム解析により同定した。生理的条件下で T47D の 3D 培養を行い、増殖抑制効果を引き起こすサイトカインの同定を試みたが、単一サイトカインの添加では有意な増殖抑制は見られなかった。

<引用文献>

1. Pantel K, Hayes DF. Disseminated breast tumour cells: biological and clinical meaning. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15: 129–131.
2. Mayhew V, Omokehinde T, Johnson RW. Tumor dormancy in bone. *Cancer Rep*. 2020;3: e1156.
3. McGrath J, Panzica L, Ransom R, Withers HG, Gelman IH. Identification of Genes Regulating Breast Cancer Dormancy in 3D Bone Endosteal Niche Cultures. *Mol Cancer Res*. 2019;17: 860–869.

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------