

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08549

研究課題名(和文) 脳転移指向性乳癌細胞株および乳癌原発組織を用いた脳転移予測バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Identifying of prediction marker for brain metastasis using brain seeking breast cancer cells and resected breast cancer tissue from patient

研究代表者

石田 和茂 (Ishida, Kazushige)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：80583541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：MDA-MB231細胞および231BR細胞について、約2万種類の全ヒト遺伝子発現解析が終了している。10倍以上の発現差を認める遺伝子を抽出したところ14遺伝子あり、MDA-MB231細胞に高発現している遺伝子として、CHRD1(chordin-like 1)遺伝子が77.66倍、TMEM98(transmembrane protein 98)遺伝子が62.03倍の発現差を呈していた。また、231BR細胞に高発現している遺伝子として、SLC14A1(solute carrier family14, member 1)遺伝子が137.46倍の発現差を呈していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では乳癌の脳転移を事前予測するためのバイオマーカー探索を行い、現段階で候補となるタンパク質や遺伝子異常を同定している。それらのバイオマーカーが確かに脳転移に関与するかどうかを引き続き検証する必要がある。学術的意義としては、それらのバイオマーカーが臨床的意義を有するかどうかの臨床試験において、脳転移ハイリスク症例を抽出することが可能となる。また、脳転移の事前予測が可能となれば、早期発見・早期治療介入が可能となり、患者のADL維持や予後改善につながることで社会的意義と考える。

研究成果の概要(英文)：We have finished to analyze about twenty thousand whole human gene expression in MDA-MB231 cells and 231BR cells. Fourteen genes were found as more 10-fold difference in gene expression. Two genes were more 50-fold difference, and one gene was more 100-fold difference in those 14 genes. CHRD1 gene was 77.66-fold higher, TMEM98 gene was 62.03-fold higher in MDA-MB 231 cells. SLC14A1 gene was 137.46-fold higher in 231BR cells. We searched published literatures to find any relevance in brain metastasis, and there was no findings.

研究分野：乳癌外科

キーワード：乳癌 脳転移 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 転移性脳腫瘍は予後不良だけでなく、他臓器転移と比較しても miserable な経過を辿ることが知られている。また、癌細胞は脳血液関門 (Blood Brain Barrier, BBB) によって抗腫瘍薬の暴露を免れるため、脳組織は癌細胞にとっての sanctuary (聖域) とも呼ばれている。

(2) 乳癌は肺癌に次いで脳転移発生頻度の高い悪性腫瘍であるが、複数の retrospectivestudy によって“移巢の早期発見は予後改善に寄与しない”ことが推測されており、術後 follow up における定期的な CT および MRI 検査はガイドライン上推奨されていない。しかしながら、何らかの生物学的特徴を有するサブグループにおける evidence を抽出するためには、その集団を対象とした研究デザインが必要であり、全乳癌患者を対象にした retrospective study では、小さなサブグループのみで生じる生物学的事象はノイズとして処理される可能性がある。さらに、一部の肺小細胞癌では予防的全脳照射が予後を改善することが証明されており、乳癌においても予防的前脳照射の恩恵を受けるサブグループの存在が示唆される。

(3) 転移性脳腫瘍の治療は、外科的切除もしくは放射線照射 (全脳照射および定位手術的照射) が中心となる。定位手術的照射や外科的切除は同等の治療効果を期待できるが、適応となる腫瘍径が限られている。そのため、早期発見症例のなかには、有症状で発見されるよりも少ない転移個数で発見される可能性が期待でき、そのことは治療選択肢を維持することにも繋がる。また、全脳照射による晩期脳障害を鑑みても、早期発見によって脳局所療法を行うことの意義は小さくない。

(4) 上記仮説を検証し evidence を確立するためには、適正集団を対象とした研究デザインが求められるが、その母集団を抽出するためにも脳転移リスクをあらかじめ予測することができるバイオマーカーは不可欠である。

(5) 本研究では 2001 年に Yoneda 等によって樹立された脳転移指向性乳癌細胞株“231BR”を研究サンプルとして用いる。同細胞株は、多臓器転移能を持つヒト乳癌細胞株 MDA-MB231 から樹立された細胞である。Yoneda 等は、マウスの左心室に“MDA-MB231 細胞”を注射することで脳や骨に多臓器転移を生じさせ、その後脳転移巣から癌細胞を初代培養している。さらに、初代培養した細胞を別のマウス左心室に再度注射するという実験系を繰り返すことで、脳転移指向性が増し、他臓器転移指向性が低下することを発見している。最終的には、同様の操作を 6 回繰り返した結果、脳組織のみに転移する phenotype を獲得した細胞株“231BR 細胞”の樹立に成功している。

(6) バイオマーカー探索研究では、heterogeneity な集団を解析対象とする場合が多い。この時、個体間のベースライン分子発現レベルが異なるため、解析結果には多のノイズが含まれることが多い。その中から有意な結果を抽出するためには、膨大な検体数が必要であり、研究遂行にあたっては highvolume center に依存せざるを得ない場合がある。本研究で用いる 2 細胞 (MDA-MB231 および 231BR) は同一の origin であるため、本来のベースライン遺伝子発現および遺伝子変異パターンは同様と考えることが出来る。そのため、2 細胞間の分子発現レベルおよび遺伝子変異の相違は、脳転移指向性という phenotype の獲得に寄与している可能性が高い。

2. 研究の目的

乳癌患者の primary tumor tissue を免疫染色することで、将来的な脳転移リスクを予測することが出来るバイオマーカーを同定する。

3. 研究の方法

(1) 2 細胞間の遺伝子発現解析を行い、MDA-MB231 細胞もしくは 231BR 細胞に高発現する遺伝子を抽出する。MDA-MB231 細胞に高発現する遺伝子は、231BR 細胞の樹立に際して発現低下した遺伝子であると推測することができる。逆に、231BR 細胞に高発現する遺伝子は、樹立に際して発現上昇した遺伝子であると推測することができ、それらの遺伝子に関わるタンパクの発現変化が脳転移指向性という phenotype の獲得に寄与している可能性があり、候補遺伝子と仮定する。

(2) 231BR 細胞樹立に際して、遺伝子発現の変化とともに、遺伝子変異を獲得している可能性がある。そのため、2 細胞についてのゲノムシーケンスを行い、MDA-MB231 細胞と 231BR 細胞間で異なる変異遺伝子を同定する。文献的に MDA-MB231 細胞の有する遺伝子変異は確認されているため、結果からは、231BR 細胞が有する新規遺伝子変異が phenotype 獲得に寄与している可能性を考慮し、候補遺伝子と仮定する。

(3) 上記 2 実験によって抽出された候補遺伝子について、231BS 細胞を用いて Knockdown もしくは Transfection 細胞を作成する。それらの細胞を用いて、Yoneda 等が行った方法と同様にマウスの左心室に注射することで脳転移指向性が減弱することを確認する。また、文献では注射後 4 週間で脳転移が生じることが報告されているため、4 週以内に何らかの理由で死亡したマウス

は観察対象から外す。さらに、MDA-MB231 細胞の脳転移発生率が 43%であったと報告されていることから、脳転移発生率の減弱は 50%を cut off 値とする。

(4) 当科で外科的に切除されたヒト乳癌組織を用いて、候補遺伝子に関連するタンパクと脳転移発生頻度の相関を retrospective に検討する。評価方法は免疫染色にて行うが、実験毎の手技的・環境的バイアスによる染色強度の変化を避けるため、多量サンプルの一次的染色に特化した組織マイクロアレイ法 (Tissue microarray, TMA) を用いる。TMA で 1 枚のスライドに搭載可能なサンプル数が約 80 であることをすでに確認しているため、本研究では『脳転移合併乳癌症例 40 例 vs 脳転移非合併乳癌症例 40 例』、計 80 症例の組織を用いる。染色判定は病理医を含む 3 人の研究者によって独立して行うことで客観性を維持する。最終的に脳転移との相関が確認された蛋白を脳転移予測マーカーとし、将来的に prospective な検証作業へ繋げる。

4. 研究成果

(1) MDA-MB231 細胞および 231BR 細胞について、約 2 万種類の全ヒト遺伝子発現解析が終了している。そのうち、どちらかの細胞に 10 倍以上の発現差を認める遺伝子を抽出したところ 14 遺伝子あり、更に 2 遺伝子について 50 倍以上、1 遺伝子については 100 倍以上の発現差を呈していた。具体的には、MDA-MB231 細胞に高発現している遺伝子として、CHRD1 (chordin-like 1) 遺伝子が 77.66 倍 ($p=4.07E-22$)、TMEM98 (transmembrane protein 98) 遺伝子が 62.03 倍の発現差 ($p=1.50E-21$) を呈していた。また、231BR 細胞に高発現している遺伝子として、SLC14A1 (solute carrier family14, member 1) 遺伝子が 137.46 倍 ($p=4.82E-23$) の発現差を呈していた。これらの遺伝子について、乳癌もしくは脳転移に関わる文献検索を行ったところ、現在までにそれらの biology との関連を示唆する報告は確認されなかった。各々の遺伝子において発現差のあった上位 9 遺伝子を以下に示す。

MDA-MB231細胞に高発現する9遺伝子			231BR細胞に高発現する9遺伝子		
Gene name	fold change	P value (log ratio)	Gene name	fold change	P value (log ratio)
CHRD1	77.66	4.07E-22	SLC14A1	137.46	4.82E-23
TMEM98	62.03	1.50E-21	GRB14	18.79	4.95E-15
XK	15.26	2.43E-20	AZU1	12.10	4.03E-10
FZRL2	14.46	8.40E-11	SOX30	10.95	5.31E-09
SLCO3A1	13.95	8.37E-10	KAAG1	10.77	7.80E-09
CC2D2A	11.60	1.02E-08	IL17F	10.36	1.35E-08
ROLA	11.18	1.08E-07	DACH1	9.85	4.80E-08
ACOXL	10.01	1.29E-15	IL1R2	8.37	5.12E-08
PPN	9.38	3.81E-08	C1orf98	8.18	4.13E-08

(2) 遺伝子変異に伴い phenotype が変わる可能性も考慮し、次世代ゲノムシーケンサーを用いて 2 細胞間のゲノムシーケンスを行った。結果、幾つかの遺伝子変異が 231BR 細胞に存在することを確認している。現在解析中であり、本報告で最終結果を提示することが出来ないため、最終研究結果とともに論文報告する予定である。

(3) ヒト乳癌切除検体を用いた候補遺伝子の確認研究は、岩手医科大学医学部附属病院における倫理委員会の承認の得る必要があるため、現在審査の準備段階にある。上記の遺伝子変異解析終了を待って、遺伝子発現解析結果から抽出された候補遺伝子と併せて、関連するタンパク質の免疫染色を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田和茂
2. 発表標題 脳転移指向性乳癌細胞株を用いた脳転移予測バイオマーカー探索
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019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	佐々木 章 (Sasaki Akira) (40275540)	岩手医科大学・医学部・教授 (31201)	
研究分担者	岩谷 岳 (Iwaya Takeshi) (70405801)	岩手医科大学・医学部・准教授 (31201)	
研究分担者	小松 英明 (Komatsu Hideaki) (90593640)	岩手医科大学・医学部・助教 (31201)	

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