

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20847

研究課題名（和文）乳がんの肺転移をモデルとした前転移ニッチ形成機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism for pre-metastatic niche formation in lung metastasis of breast cancer cells.

研究代表者

富永 香菜 (Tominaga, Kana)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50779569

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、転移巣形成に関与する細胞として肺線維芽細胞に着目し、がん細胞との相互作用に基づいた転移巣形成機序の解明を目指した。乳がんの肺転移をモデルとして、高転移ヒト乳がん細胞を移植した免疫不全マウスで微小転移巣が形成される時期を特定した。また、微小転移が形成される前後で、肺線維芽細胞が高い増殖能を獲得していることを明らかにした。さらに、微小転移形成前後と非移植群の肺組織から単離した肺線維芽細胞のDNAマイクロアレイ解析により、微小転移巣形成に関わる肺線維芽細胞において活性化しているパスウェイや鍵因子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移先で増殖したがん細胞は、正常な組織を破壊し、がん患者の予後やQOLに大きな影響を与える。その結果、根治を実現できずに命を失う患者も少なくない。本研究において腫瘍の発生から転移巣形成までの遺伝子発現の変遷を検証したことにより、転移巣形成メカニズムの解明につながるだけでなく、がん転移において肺の前転移ニッチ形成に寄与する線維芽細胞を標的とした抗転移性の創薬への応用が見込める。将来的には本研究成果に基づき、他のがんの転移機構の解明にも応用し、様々ながん種の抗転移性の治療薬の開発へ応用することも期待できる。

研究成果の概要（英文）：To reveal the mechanism for the formation of metastasis between cancer cells and niche cells, we focused on pulmonary fibroblasts which involved in the formation of the pre-metastasis niche in breast cancer. First, we identified the timing of formation of micrometastatic lesions in immunodeficient mice transplanted with highly metastatic human breast cancer cells. Next, we clarified that pulmonary fibroblasts acquired high proliferation ability before and after the formation of micrometastases. Furthermore, by DNA microarray analysis of pulmonary fibroblasts isolated from lung tissues before and after micrometastase formation, we discovered the key factors which are activated in pulmonary fibroblasts involved in micrometastase formation.

研究分野：幹細胞生物学、分子生物学

キーワード：乳がん 浸潤・転移 DNAマイクロアレイ 肺線維芽細胞 間質 がん関連線維芽細胞 前転移ニッチ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん転移は患者の予後に大きな影響を与えるため、転移機序解明やその応用による治療法の開発は急務である。固形がんのがん細胞は、がんが最初に発生した臓器（原発巣）だけでなく、さらに増殖の場を求めて血管やリンパ管を通して他の臓器（転移巣）に移動し増殖することができる。転移巣は原発巣のある臓器とは異なる種類や働きをもつ細胞で構成されており、本来なら、他臓器から遊離したがん細胞が生着し増殖することは難しいと考えられる。一方で、腫瘍を構成する細胞群から分泌されるサイトカインや機能的なマイクロ RNA を含む細胞外小胞等の作用により、がん細胞が転移を起こす前にすでに転移先でがん細胞が増殖しやすい微小環境（前転移ニッチ）が整っている可能性が報告された (Liu Y. et al., *Cancer Cell* 2016)。しかし、がんの発生から転移巣形成まで過程で、前転移ニッチがいつどのように形成されるのか未解明の部分が多い。

この疑問を解消するために我々は、がん細胞のニッチを構成する細胞の一つであるがん関連線維芽細胞 (CAF) に注目した。CAF は、TGF $\beta$  や SDF-1 などのサイトカインを分泌し、がん細胞との相互作用により腫瘍の悪性化に寄与している細胞である。その研究の過程で、ヒト乳がん由来の CAF との接触により高転移性を授かったヒト乳がん細胞をマウスに移植し、転移巣を形成した肺において、マウス宿主由来の線維芽細胞で CAF のマーカータンパク質 (Fibronectin (FN), Tenascin-C (TN-C), Periostin (POSTN),  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)) が高発現していることを見出した。したがって、がん転移過程では、転移巣の肺線維芽細胞が CAF の特徴を獲得し、転移先での腫瘍形成に重要な働きをしているのではないかと推測した。

### 2. 研究の目的

本研究では、前転移ニッチ形成に関わる細胞として肺の線維芽細胞に着目し、乳がんの原発巣と転移巣間のコミュニケーションに基づいた前転移ニッチ形成機序を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 乳がんの肺転移モデルの微小転移期の特定

本研究では、申請者が所属する研究室で樹立した、ヒト乳がん由来のがん関連線維芽細胞 (CAF) との接触により高転移能を持ったヒト乳がん細胞 (CAF-DCIS, Matsumura Y et al. *Life Sci. Alliance*. 2019) を使用する。前肺転移ニッチ形成期を見つける目的で、乳がん細胞を免疫不全マウス (NOG マウス、♀、6 週齢) の皮下へ 1 匹当たり 1 ヶ所同所移植する。移植後 20 日目および 30 日目にマウス肺を取り出し、酵素処理にて細胞を分散し、がん細胞の有無を FACS にて確認する。同時に、マウス肺組織をパラフィン固定し、組織標本として保存する。HE 染色により細胞形態の全体像を把握する。

#### (2) 前肺転移ニッチにおける CAF の特性の解明

微小転移前後のマウス肺組織を取り出し、細胞分離システム (MACS) にて線維芽細胞を取り出し、初代培養を行う。MACS を用いたネガティブセレクションでは、抗マウス CD45 抗体 (血球)、抗マウス CD31 抗体 (血管内皮)、抗マウス CD324 抗体 (上皮細胞)、抗ヒト CD324 抗体 (がん細胞) を用いる。培養マウス肺線維芽細胞を 96-well plate へ  $5 \times 10^3$  cells/well で播種し、培養 3 日目と 5 日目に細胞増殖アッセイ (Cell Counting Kit-8@DOJINDO) を行う。

#### (3) 微小転移前後の肺線維芽細胞の遺伝子発現プロファイル取得と治療への応用に向けた前肺転移ニッチ形成に寄与する因子の同定

微小転移直前のマウス肺線維芽細胞から RNA を抽出し、DNA microarray 解析にて遺伝子発現量の変化を解析する。がん細胞を移植していないマウスから取り出した肺線維芽細胞 (コントロール) と比較する。微小転移前後で発現量が変化する鍵となる遺伝子を見出す。

### 4. 研究成果

#### (1) 乳がんの肺転移モデルの微小転移期の決定

実験の計画は Fig 1A に示す。高転移ヒト乳がん細胞を移植後 20 日目および 30 日目の肺組織では、コントロール群と比較して重量 (Fig 1B)、や細胞形態 (Fig 1C) に変化はなかった。しかし、移植後 30 日目の肺組織中の一部分でクラスター状に生着しているがん細胞を確認できた (Fig 1D)。がん細胞の有無を FACS にて確認する予定にしていたが、肺組織とがん細胞の分離が不十分であったためがん細胞のみを解析できなかった。今後、がん細胞を単離できる酵素処理の条件と検討する必要がある。その代替実験として、移植後の肺組織を酵素処理し細胞培養した。

その結果、移植後 30 日目の肺組織からのみ乳がん細胞の増殖が確認できた。以上の結果から、本研究で使用したモデルでは、移植後 20 日～30 日目の間にがん細胞が生着していると考えられたため、移植後 20 日を前転移期 (pre-metastasis phase)、30 日目を転移期と定義した (metastasis phase)。

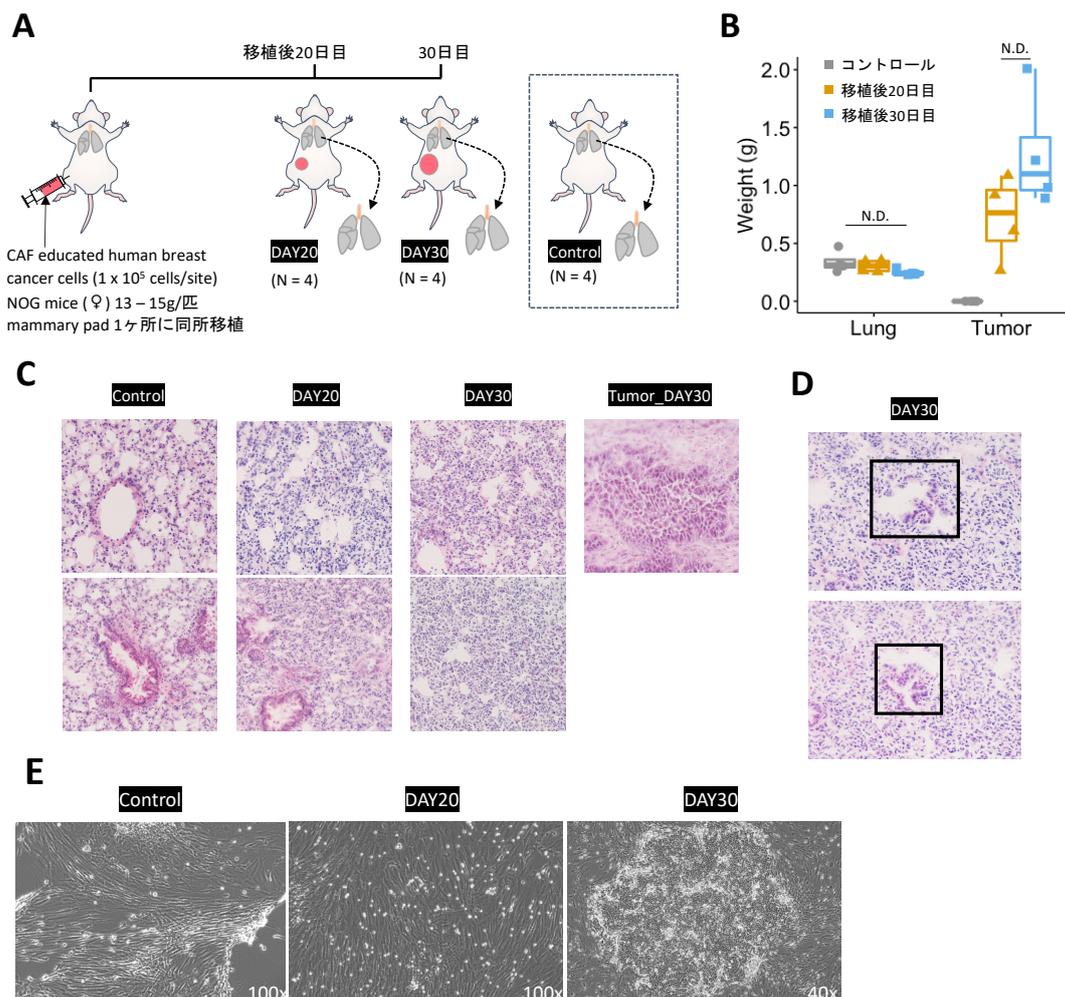


Fig 1. 乳がんの肺転移モデルにおける微小転移期の決定

A. 実験概要図. B. ヒト乳がん細胞移植後 20 日目、30 日目、および非移植群 (コントロール) における、肺組織と乳がん腫瘍の重量.  $N = 4$ . Student t-test. C. HE 染色. マウス肺組織および乳がん原発巣. Magnification, 200x D. HE 染色. 移植後 30 日目の肺組織中のがん細胞クラスター. Magnification, 400x. E. マウス肺組織から単離した培養細胞の位相差顕微鏡写真. コントロール (Control) および移植後 20 日目 (DAY20) Magnification, 100x. 移植後 30 日目 (DAY30) Magnification, 400x.

## (2) 前肺転移ニッチにおける CAF の特性の解明

微小転移前後のマウス肺組織を取り出し、細胞分離システム (MACS) を使ったネガティブセレクションより、肺線維芽細胞を取り出し初代培養を行った。培養 3 日目と 5 日目に細胞増殖アッセイを行った。培養 5 日目ではコントロールと比較して移植後 20 日目 ( $p < 0.01$ )、30 日目 ( $p < 0.001$ ) の肺線維芽細胞で有意に細胞増殖能が亢進していた (Fig 2)。さらに興味深いことに、移植後 20 日目の培養肺線維芽細胞は、培養 3 日目からコントロールおよび移植後 30 日目の培養肺線維芽細胞と比較しての増殖能が高いことがわかった ( $p < 0.01$ )。がん細胞の生着前から肺線維芽細胞の特性が変化している可能性が考えられた。

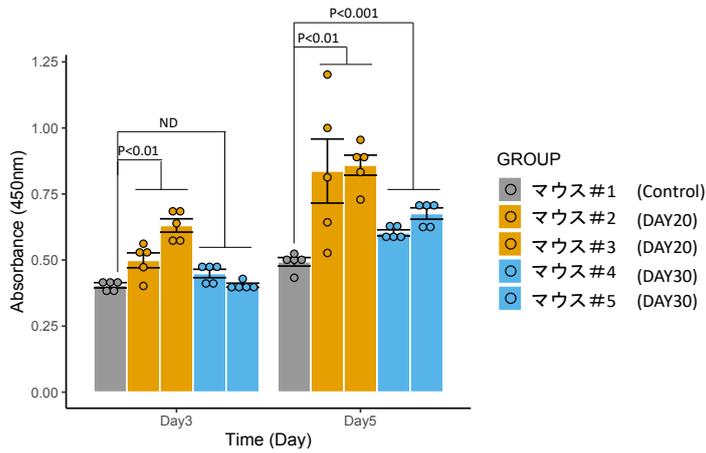


Fig 2 マウス肺繊維芽細胞の細胞増殖アッセイ. コントロール, Control; 移植後 20 日目, DAY20; Magnification, 移植後 30 日目; DAY30. N = 5. Student t-test.

(3) 微小転移前後の肺線維芽細胞の遺伝子発現プロファイル取得と治療への応用に向けた前肺転移ニッチ形成に寄与する因子の同定

乳がん細胞移植群および非移植群(コントロール)の肺線維芽細胞から RNA を抽出し、共同研究先(順天堂大学研究基盤センター)にて DNA microarray を行った。得られた遺伝子発現情報を用いて、クラスター解析を行いグループ化された遺伝子群を評価した。さらに、移植後 20 日(pre-metastasis)および 30 日(Metastasis)の肺線維芽細胞に共通して発現が亢進している遺伝子の中から、転移巣形成に関わることが予測される鍵因子候補を 10 個得ることができた (Fig 3A)。その中には炎症に関わり、すでに転移巣形成に関わることが報告されている S100a9, S100a8 が含まれている。さらに、CAF の中でも 抗原提示能を持つ Antigen-presenting CAF (apCAF) のマーカーが移植群で亢進されていることがわかった (Fig 3B)。一方で、炎症性 CAF (iCAF) や筋線維芽細胞性 CAF (myCAF) については移植群とコントロールで差がなかった。apCAFs は中皮細胞に由来し、ナイーブ T 細胞を Treg へと誘導することにより免疫抑制に働くことが報告されている (Huang H et al. Cancer Cell 2022)。今後、転移ニッチを形成する肺線維芽細胞だけでなく腫瘍浸潤免疫細胞との相互作用についても検討したい。

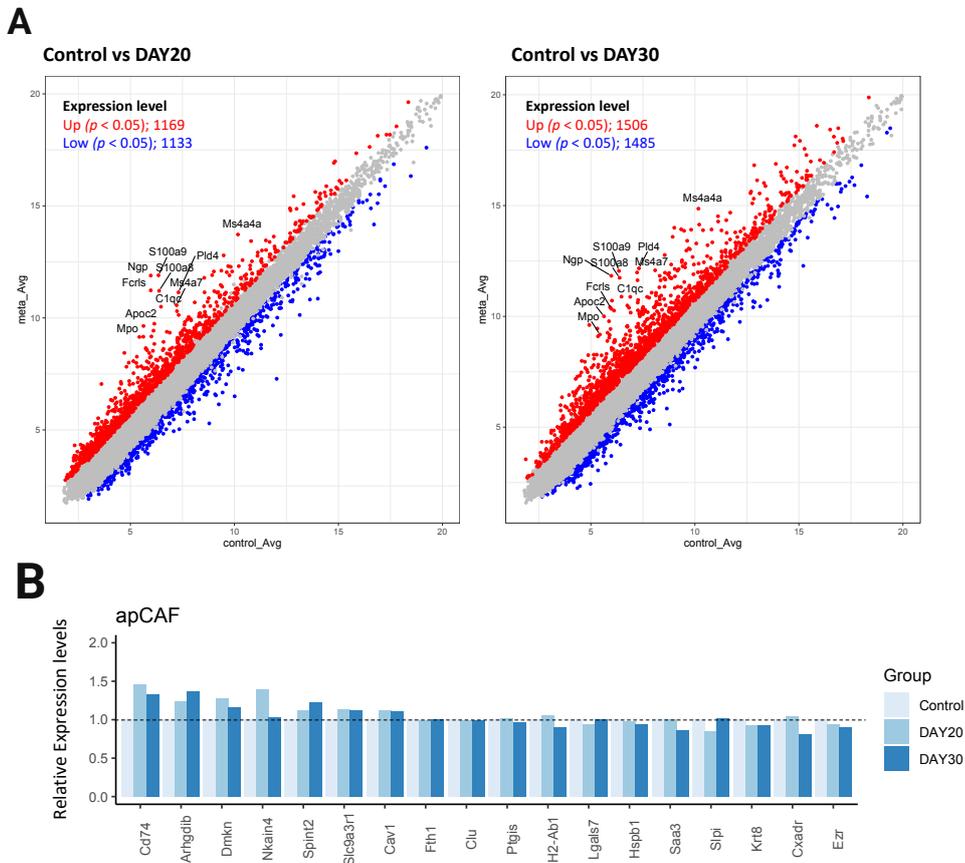


Fig 3 マウス肺繊維芽細胞の DNA microarray 結果. A 遺伝子発現プロファイルにより、転移巣形成に関わる鍵因子候補を同定した。B apCAF 発現遺伝子群について、移植後 20 日の前転移期ですでに発現が亢進していた。

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1件

1. 著者名 富永 香菜, 折茂 彰	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 5
3. 書名 実験医学【がん微小環境に1細胞レベルで挑む】	

〔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
---------	---------