

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640069

研究課題名(和文)患者由来乳癌転移細胞の樹立および個別化転移モデルマウスの作製

研究課題名(英文)Establishment of breast PDX mouse models with high metastatic potential

研究代表者

折茂 彰(orimo, akira)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70275866

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):申請研究では、患者個別乳癌の転移モデルマウスを作製し、癌転移の分子機構を解明し、癌転移治療に役立てるため、10症例の患者乳癌をNOGマウスに移植した。後6か月観察し、症例2のみ直径1cm程度の癌塊に増殖した。しかしながら、新たなNOGマウスに継代したところ増殖が停止した。他の9症例に関しては、移植後より癌の増殖が観察されなかった。従来よりER+乳癌の免疫不全マウスへの生着率は極めて低いことが報告されている。今後は、エストロゲンを投与するとともに、乳腺管腔内への癌細胞の注入法などの移植系の改善が必要である。

研究成果の概要(英文): Human primary breast tumors were dissected from 10 breast cancer patients without any treatment in this study. Small tumor fragments were implanted orthotopically into NOG immunodeficient mice. As the result, one specimen generated an advanced tumor in 1st NOG mice, however, the tumor was not transplantable in 2nd NOG mice. The rest of 9 specimens were never grown in recipient mice for periods of 6 months. The previous report indicated very low rate (2.5%) of implantation of human breast tissues in immunodeficient mice, when 423 specimens of ER-positive human breast cancers were examined. As recent report also suggested the technical benefit of use of the intraductal injection of cancer cells but not the injection into mammary fat pad with estrogen treatment to increase implantation of cancer cells. Further study requires for overcoming the low implantation ratio and for developing the PDX model efficiently.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：乳癌 PDX s 癌微小環境 CAF s

1. 研究開始当初の背景

癌患者より切除された癌組織は、T や B 免疫細胞を欠如した免疫不全マウス(ヌード[®] や SCID マウス)に非常に低率に移植される。そのため、大多数の癌研究は患者のプライマリーの癌細胞を使用することなく、長期間特別な培養条件下で人工的に増殖された癌細胞株を代用した。癌細胞株が移植された xenograft のマウスモデルで癌を抑制した多くの治療薬が、癌患者では無効であることは稀ではない。

現在、ヒト癌の生物学的特性を模倣した動物実験モデルの欠如が、癌研究を遂行する上で大きな障害になっている。また乳癌患者間に見られる治療反応性の相違および、癌細胞内の遺伝子変異やシグナル伝達の患者間でのバリエーションの違いは、各癌患者のプライマリーの癌細胞を使用した前臨床モデルの作製および患者個別な癌治療法の確立が欠かせないことを示唆している。近年樹立された T, B, NK (natural killer) 免疫細胞を欠損した高度免疫不全 NOG (NOD/Shiscid, IL-2R KO)マウスの使用により、劇的な移植率の向上が予期される。

血中循環癌細胞は、癌患者の末梢血液中に存在する癌細胞で、原発癌より血中に侵入し、近い将来遠隔臓器に転移を形成する細胞であると推測されている。血中循環癌細胞は、患者の予後の予測や治療効果の判定に関してのバイオマーカーとして役立ち、その臨床的有用性の期待は増加の一途をたどっている。申請研究では原発癌組織および血中循環癌細胞を NOG マウスに移植し、患者個別乳癌の転移モデルマウスを作製する。癌転移の分子機構を解明し、癌転移治療に役立てることを計画している。

2. 研究の目的

癌患者の治療薬への感受性は様々であり、決められた化学療法のレジメで予期した

治療効果が得られない事も少なくない。申請計画では血中循環癌細胞や手術後に摘出された乳癌組織断片を、高度免疫不全マウスに移植継代し、患者個別乳癌転移モデルマウスを作製する。このモデルを用い癌転移の分子機構の解明や、再発癌転移に最も効果のある治療薬を患者に投与前に選択することに役立てる。

3. 研究の方法

患者由来癌組織を免疫不全マウスに安定して移植する方法は未だ明確でない。初年度は、患者より切除された乳癌を効率よく NOG 高度免疫不全マウスの乳腺に移植するプロトコルを確立する。また同一患者より血中循環癌細胞を抽出して、NOG マウスに経静脈的に移植して患者転移モデルを作製する。複数の患者個別乳癌モデルマウスの原発癌と転移巣より DNA や RNA を抽出し、そのミックス情報を同一患者間あるいは他患者間で比較する。癌転移に関与している遺伝子やシグナルを患者個別に同定する。予後不良で治療法の確立されていないトリプルネガティブタイプの乳癌患者のマウスモデルを使用し、患者個別に特定の癌転移に関係したシグナルを抑制し、治療効果を検討する。

本研究の意義は、患者由来乳癌転移モデルを作製し、癌転移の分子機構を解明し、患者個別の癌転移療法の基礎を構築することにある。

4. 研究成果

申請者のグループは、転移能の極めて弱い DCIS (Ductal Carcinoma In Situ) 由来のヒト乳癌細胞株が、CAFs とマウスに共移植された時、癌塊内で CAFs により教育され、転移能の亢進した転移性乳癌細胞に進化することを観察した(未発表データ)。

1X105 の blasticidin 耐性遺伝子が導入された ds-tomato 陽性の DCIS 細胞は、

GFP 陽性の CAFs と NOG 高度免疫不全マウスの皮下に共移植された。1 ヶ月後に切除された癌塊は酵素処理により消化され、blastocidin 存在下で 4-6 日間培養された。この条件では、blastocidin 非耐性の CAFs やマウスの間質細胞は生存不可能である。

増殖した blastocidin 耐性の DCIS 細胞は DCIS-1cycle と名付けられた。この細胞にさらに教育を施す為に、再度 CAFs と DCIS-1cycle をマウスに共移植した。

DCIS-1cycle は癌塊中より抽出され、その blastocidin 耐性の DCIS 細胞は DCIS-2cycle と名付けられた。

DCIS-2cycle は CAFs の非存在下で NOG マウスに皮下移植された。1 ヶ月後に原発癌を切除し、さらに 1 ヶ月後に切除された肺を顕微鏡下で観察した。CAFs で教育された DCIS-2cycle は、対照の正常乳腺由来線維芽細胞で 2 cycle 教育された DCIS 細胞と比較して、顕著に肺転移形成能力を亢進していた。

申請研究では、より臨床的意義を強める為に、細胞株を使用せずに原発巣由来の患者乳癌組織を使用するため、合計 10 例の患者乳癌組織の小断片（直径 7 mm）をメス NOG マウスの右左乳腺脂肪組織に移植した。内訳は、以下である。

症例 1 : ER+PR+Her1+

症例 2 : ER+PR+Her2+

症例 3 : ER+(5%)PR+(5%)Her3+

症例 4 : ER-PR-Her1+

症例 5 : ER+(20%)PR+(10%)Her2+

症例 6 : ER+(90%)PR-Her2+

症例 7 : ER+(90%)PR+(40%)Her2+

症例 8 : ER+(80%)PR-Her3+

症例 9 : ER+(90%)PR+(90%)Her2+

症例 10 : ER-PR-Her2-

移植後 6 か月観察し、症例 2 のみ直径 1 cm 程度の癌塊に増殖した。しかしながら、新たな NOG マウスに継代したところ増殖が停止した。他の 9 症例に関しては、移植後より癌の増殖が観察されなかった。

それ故、予定していた以下の実験の遂行が困難であった。

増殖した患者癌塊を切除し、酵素処理後、1X10⁵ 癌細胞を 3X10⁵ CAFs と共に新たな NOG マウスの乳腺に移植する。1 ヶ月間増殖した癌を切除し、酵素処理後、抽出された乳癌細胞を 1 cycle と名付ける。患者乳癌細胞にさらに教育を施すために、乳癌細胞(1 cycle)と CAFs を新たな NOG マウスの乳腺に共移植する。さらに 1 ヶ月後、癌塊をマウスより切除する。酵素処理後、乳癌細胞 (2 cycle)を抽出する。この細胞の転移能が cell-autonomous に亢進しているか否かを調べる為に、CAFs の非存在下で、NOG マウスの乳腺に移植し、2-3 ヶ月間経過を観察する。乳癌の転移の好発臓器である肺、肝臓、骨や脳などを摘出し顕微鏡下で観察する。また、組織標本作製し、ヒト特異的な抗体を用いて転移巣での移植された癌細胞の存在を検出する。また、患者由来血中癌細胞の免疫不全マウスの移植も行われなかった。

考察

従来より ER+乳癌の免疫不全マウスへの生着率は極めて低いことが報告されている。423 例の ER+乳癌 luminal type の免疫不全マウスへの生着率は 2.5%であることが報告されている Cottu P, et al., Modeling of response to endocrine therapy in a panel of human luminal breast cancer xenografts., Breast Cancer Res Treat.

2012 Jun;133(2):595-606. 近年、乳癌の patient-derived tumor xenograft (PDX) の生着率を上げるために、乳腺管腔内に癌細胞を注入すると、癌の生着・増殖が顕著に改善されることが報告されている (Sflomos G et al., A Preclinical Model for ER -Positive Breast Cancer Points to the Epithelial Microenvironment as Determinant of Luminal Phenotype and Hormone Response., Cancer Cell. 2016 Mar 14;29(3):407-22)。

対照的に従来のように、乳腺脂肪組織に癌塊が移植された場合は、従来 luminal type の乳癌が basal type の乳癌に変化することが報告されている。

今後は、エストロゲンを投与するとともに、これらの報告を考慮して、移植系の改善が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

1. Mezawa, Y. and Orimo A*, The roles of tumor- and metastasis-promoting carcinoma-associated fibroblasts in human carcinomas. Cell tissue research, (2016), *In press* (査読あり)

* Corresponding author

2. Cartilage oligomeric matrix protein contributes to the development and metastasis of breast cancer. Englund E, Bartoschek M, Reitsma B, Jacobsson L, Escudero-Esparza A, Orimo A, Leandersson K, Hagerling C, Aspberg A, Storm P, Okroj M, Mulder H, Jirstrom K,

Pietras K, Blom AM. Oncogene. Apr 11. 2016 (査読あり)

3. Holmquist E., Reitsma B., King B., Escudero-Esparza Sioned Owen A., Orimo A., Okroj M., Anagnostaki L., Jiang W., Jirstrom K., Blom A., The human complement inhibitor Sushi Domain-Containing Protein 4 (SUSD4) expression in tumor cells and CD8+ T cells is associated with better prognosis of breast cancer patients. BMC Cancer, (2015) 19, 737. (査読あり)

4. Polanska, Y. * and Orimo A.* (2013) Carcinoma Associated Fibroblasts. Journal of Cellular Physiology, 228, 1651-7. (査読あり) *Corresponding author

5. Togo, S.* , Polanska, Y., Horimoto, Y and Orimo, A. * (2013) Carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) are a promising therapeutic target. Cancers, 5, 149-169. (査読あり)

[学会発表](計5件)

1. 招待講演 ; Carcinoma-associated fibroblasts confer adherent epithelial cell traits in breast cancer cells to promote metastasis OrimoA. シンポジウム がんの浸潤・転移メカニズムの解明と治療標的 第75回日本癌学会学術総会 名古屋、10月8日 2015年

2. 招待講演 折茂彰 癌内線維芽細胞による癌悪性化分子機構 日本癌学会シンポジウム・共同利用共同研究拠点シン

ポジウム 「がん幹細胞・微小環境・分子標的～がん進展制御への挑戦」 金沢、1月21-22日、2015年 *Invited*

3. 招待講演 折茂彰 Evolution of human breast carcinoma cells with stromal myofibroblasts to propagate tumor metastasis シンポジウム：がんを知る：「がん細胞の浸潤の新たなメカニズム」第73回日本癌学会学術総会 横浜、9月27日 2014年
4. 招待講演 折茂彰 シンポジウム、間質性肺炎に合併した肺癌の現状と治療戦略- 炎症や線維化が及ぼす癌化や癌進展促進機構-Carcinoma-associated fibroblasts (CAFs)の視点から 第54回日本呼吸器学会 大坂 4月25日 2014年
5. 招待講演 折茂彰 Evolution of metastasis-promoting stromal myofibroblasts. 第58回幹細胞治療研究センターフォーラム 東京大学医科学研究所 4月19日 2013年

〔図書〕(計5件)

1. 伊藤匠、松村優子、伊藤恭彦、折茂彰 癌内線維芽細胞と癌進展・悪性化 34巻8号758-766頁 呼吸 2015
2. 折茂彰、松村優子、本多一貴、Nadila Wali, がん内線維芽細胞とがんの悪性化 Vol.33 No.5 73-80 癌小環境と標的治療 実験医学 羊土社 2015年
3. 折茂彰、松村優子、伊藤恭彦、十合晋作 線維化病態と癌悪性化 呼吸器内科 科学評論社 2月号第27巻第2号

142-148, 2015年

4. 谷口源太郎、折茂彰 肺の損傷と発癌機序「Annual Review 呼吸器 2015」(株)中外医学社 99-106, 2015年
5. 松村優子、伊藤恭彦、折茂彰 がん細胞の浸潤・転移を促進するがん微小環境：がん内線維芽細胞を例に 細胞工学 Vol.33 No.6 609-12 2014年

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称：強転移性ヒト癌細胞株

発明者：折茂彰

権利者：同上

種類：特許

番号：2013-178842

出願年月日：平成25年8月30日

国内外の別：国内

名称：早期癌転移検出法および新規癌転移抑制薬のスクリーニング法

発明者：折茂彰 他3名(4人中1番目)

権利者：同上

種類：特許

番号：2013-189538

出願年月日：平成25年9月12日

国内外の別：国内

名称：ヒト癌上皮細胞の遠隔転移の移行ルートの作出方法

発明者：折茂彰

権利者：同上

種類：特許

番号：2012-175544,

出願年月日：平成24年8月8日

国内外の別：国内

取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

研 究 紹 介 site:

<http://ganshien.umin.jp/research>

[/main/orimo/index.html](http://main/orimo/index.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

折茂 彰 (ORIMO, Akira)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70275866

(2)研究分担者

堀本 義哉 (HORIMOTO, Yoshiya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40424246

(3)連携研究者

()

研究者番号：