

論文の内容の要旨

論文題目 生物発光イメージングを応用した
がん細胞移植モデルにおける腫瘍微小環境の解析

氏名 高橋 恵生

【研究背景と目的】

「がん」は日本人の約半数が生涯にかかる疾患であり、現在は日本人の約 3 分の 1 の人ががんによって亡くなっている。早期診断技術の進歩や新規の医薬品の開発により、がんを根治する例も増えてきているが、一方で再発や転移により予後不良の症例も多い。このような状況を打開するためにがん細胞を取り囲む微小環境が新たながん治療の標的として注目されている。腫瘍はがん細胞のみならず、線維芽細胞やマクロファージ、血管内皮細胞など種々の間質細胞から構成されており、このようながん細胞を取り巻く環境は「腫瘍微小環境」と呼ばれている。腫瘍微小環境では、さまざまな細胞間での直接的な相互作用に加え、サイトカインなどの液性因子を介した間接的な相互作用が活発である。これらの相互作用ががん細胞の増殖や浸潤、血管新生といった悪性化に寄与していると考えられている。

このように腫瘍微小環境ががん細胞に影響を与えることは広く認識されているものの、一方で組織の違いや病態の進展による腫瘍微小環境の変化が、随伴して起こる炎症反応やがん細胞の獲得形質へどのように寄与しているかについては未だ十分な解析が行われていない。そこで私は生物発光イメージングおよびマウスへのがん細胞移植モデルを応用し、組織の違いががん細胞の挙動や獲得形質にどのような影響を与えているのか解析することとした。まず、マウス乳がん細胞を用いた移植モデルに生物発光イメージングを用いて、腫瘍局所での炎症反応を時空間的に観察した。また、ヒト膵臓がん細胞を用いた移植モデルから悪性度の高いがん細胞株を樹立し、その獲得形質および網羅的遺伝子発現の解析を行った。

【方法と結果】

1. マウス乳がん細胞移植モデルを用いた炎症反応の時空間的解析

乳がんでは原発腫瘍における炎症が転移へ寄与していると考えられているが、実際の生体内における炎症性腫瘍微小環境の形成過程は不明な点が多い。そこで異なる腫瘍微小環境における炎症反応を経時的に観察するために、マウス乳がん細胞 4T1 を同系の BALB/c マウスに移植するモデ

ルを利用した。まず、炎症性サイトカイン産生を制御する転写因子 **NF-κB** 応答性にホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現するレポーター細胞 (**4T1-NF-κB**) を作製した。また腫瘍体積を測定するコントロールとして **CMV** プロモーター下に恒常的にホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現する細胞 (**4T1-CMV**) を作製した。これらの細胞を皮下組織への異所性移植 (皮下移植) もしくは由来組織である乳腺脂肪組織への同所性移植 (乳腺脂肪移植) を行い、生物発光イメージングを用いてルシフェラーゼ活性を測定することで、それぞれ **NF-κB** レポーター活性および腫瘍体積を経時的に観察した。その結果、皮下移植もしくは乳腺脂肪移植のどちらの移植モデルにおいても腫瘍体積は単調増加を続けた。一方で、**NF-κB** レポーター活性は皮下移植では移植後 2 週間までに大きな変化は認められなかったが、乳腺脂肪移植の場合は移植後 7 日前後で一過性に **NF-κB** レポーター活性が急激に上昇した。この乳腺移植後早期の **NF-κB** レポーター活性の上昇は免疫不全マウスである **SCID** マウスやヌードマウスへの移植では認められないことから、**T** 細胞依存的な免疫応答由来であると推測された。また、**4T1** 細胞移植後 7 日の乳腺脂肪組織では、炎症性メディエーターである **IL-1** や **MIP-1** の産生が上昇していることや、マクロファージの浸潤が高まっていることもわかった。

以上の結果から、生物発光イメージングは生体内での炎症反応を可視化する際に有用であり、またがん細胞を取り囲む組織の違いが炎症反応の経時的変化に大きく影響を与えることが示された。また、乳腺脂肪組織における移植後早期の炎症反応の惹起は、宿主の免疫応答に加え、臓器特異的な腫瘍微小環境に依存することが示唆された。

2. ヒト膵臓がん細胞移植モデルを用いた腫瘍微小環境での獲得形質の解析

異なる腫瘍微小環境での細胞間相互作用ががん細胞の遺伝子発現などの獲得形質にどのように変化をもたらすかを調べるため、ヒト膵臓がん細胞 **SUIT-2** を用いてヌードマウスへの皮下組織への異所性移植 (皮下移植) および由来組織である膵組織への同所性移植 (膵移植) を行い、比較した。生物発光イメージングを用いて経時的に腫瘍形成能を観察したところ、膵移植では原発巣の形成のみならず腹膜播種や肺転移などが認められ、皮下移植よりも進行がはやい傾向が認められた。次に各移植モデルより悪性度の高いがん細胞株 (高悪性株) の樹立を試みた。**SUIT-2** 細胞を皮下移植もしくは膵移植し、1 ヶ月経過した原発巣よりがん細胞を回収し、それらを再び皮下組織もしくは膵組織へと移植した。このプロセスを 3 回繰り返した後、皮下移植および膵移植の原発巣、さらには膵移植の肺転移巣より腫瘍を摘出し、新たながん細胞株を樹立した。皮下移植の原発巣より樹立した細胞株を **3sc** 細胞、膵移植の原発巣より樹立した細胞株を **3P** 細胞、肺転移巣より樹立した細胞株を **3L** 細胞とした。これら細胞株の特性を調べた結果、**3P** 細胞および **3L** 細胞では親株 **P** 細胞と比較して細胞形態の変化、浸潤能や造腫瘍能の亢進、**E-cadherin** の発現低下が顕著に認められ、悪性度が高いことがわかった。一方で **3sc** 細胞では **E-cadherin** の発現低下は認められず、また細胞形態の変化や造腫瘍能の亢進は認められるものの、その程度は **3P** 細胞や **3L** 細胞に比べると限定的であった。これらの結果から、膵移植から樹立された細胞株がより高い悪性

度を示すことが示唆された。さらに次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンスによる網羅的遺伝子発現解析の結果から、各細胞株の遺伝子発現プロファイルが大きく異なっており、腫瘍微小環境によって異なるシグナル伝達経路が活性化されていることが示唆された。また、親株 P 細胞と比較して、樹立した高悪性株で発現が亢進している遺伝子についてより詳細に検討を行った。その結果、細胞外マトリックスやコラーゲンといった腫瘍の生着に重要と考えられている遺伝子の発現上昇は、3P 細胞、3L 細胞および 3sc 細胞に共通して認められたが、一方で ABCG2 などのがん促進遺伝子は膵移植由来の 3P 細胞や 3L 細胞特異的に高発現していることがわかってきた。

以上の結果から、がん細胞を取り囲む腫瘍微小環境の違いががん細胞の獲得形質や遺伝子発現に大きな影響を与えていることがわかった。さらに、膵がん細胞が同所性の腫瘍微小環境、すなわち膵組織内において周囲の間質と相互作用することが膵がんの進展には重要であることが示唆された。

【考察およびまとめ】

1 では皮下移植と乳腺脂肪移植でのマウス乳がん細胞 4T1 の炎症反応を生体発光イメージングにより可視化し、乳腺脂肪組織特異的に移植後早期に炎症反応が惹起されることを見出した。これらはこれまで不明であった腫瘍微小環境における生体反応の経時的変化を示しており、腫瘍微小環境の変化を理解する上で非常に重要な知見であると考えている。

さらに、2 においてはヒト膵臓がん細胞を用いた皮下移植と膵移植から高悪性株を樹立し、その遺伝子発現プロファイルを調べた。その結果、異なる腫瘍微小環境下では、がん細胞が獲得する悪性化因子や活性化されるシグナル経路に大きな違いがあることを見出した。このように、移植モデルを利用して腫瘍微小環境によるがん細胞の遺伝子発現制御を解析した報告は少ない。なお、SUIT-2 細胞以外の複数種のヒト膵臓がん細胞を用いた膵移植からも、高悪性株の樹立および遺伝子発現解析を行っている。今後、複数種の細胞間で共通して高悪性株特異的に高発現している遺伝子に着目することで、新規の治療標的分子もしくは診断分子が見いだされるものと期待している。