

審査の結果の要旨

氏名 高橋 恵生

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、さまざまな細胞から複雑に構成されている。このようながん細胞を取り囲む環境は「腫瘍微小環境」とよばれており、近年新たな治療標的として注目されている。腫瘍微小環境におけるサイトカインなどを介した種々の細胞間での相互作用が、がんの進展に重要であると認識されている。しかし、実際の生体内における腫瘍微小環境の形成、変化、役割について未だ不明な点が多い。特に、がん細胞を取り囲む組織の違いが、腫瘍内での炎症反応やがん細胞の獲得形質にもたらす影響について、十分に解析がなされていない。そこで、本研究では異なる腫瘍微小環境下でのがん細胞に着目し、「炎症反応の経時的変化を捉えること」、また「獲得形質を解析すること」を2つの目標を掲げた。そして、生物発光イメージングをマウスへのがん細胞移植モデルに応用することで、新たな角度から腫瘍微小環境の形成とその役割についての理解を試みた。その結果、以下の重要な知見を見出した。

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

腫瘍微小環境における炎症が、乳がんをはじめとした、さまざまながん種の転移に寄与している可能性が指摘されている。しかし、生体内での炎症性微小環境の形成過程について、経時的に観察を行った報告はない。本研究では、ルシフェラーゼ遺伝子を発現したマウス乳がん細胞 4T1 を同系の BALB/c マウスへと移植するモデルを用いた。恒常的に発現するルシフェラーゼ活性から腫瘍の体積を算出し、同時に炎症性サイトカインの産生を制御する転写因子 NF- $\kappa$ B 応答性に発現するルシフェラーゼ活性から炎症反応を可視化した。また、がん細胞を取り囲む組織の違いが、炎症性腫瘍微小環境の形成に影響するか調べるために、皮下移植および乳腺脂肪移植の2つの移植モデルを比較した。それらの結果、1) 皮下移植の場合と比較して、乳腺脂肪移植では原発巣の腫瘍体積が小さいにも関わらず肺転移が高率に起こること、2) 乳腺脂肪組織特異的に移植後早期に一過性に転写因子 NF- $\kappa$ B 活性上昇、すなわち炎症反応が惹起されること、を見出した。さらに、乳腺脂肪移植特異的な早期の炎症反応に着目してそのメカニズムについて解析を進めた結果、3) この炎症反応は免疫不全マウスへと移植するモデルでは観察されないことから、炎症反応の惹起は T 細胞依存的な宿主免疫応答によるものであること、と考えられた。また、腫瘍

内での免疫細胞の浸潤や炎症性サイトカインの産生を調べたところ、4) 皮下移植と乳腺脂肪移植では T 細胞の浸潤にはほとんど差が認められないが、マクロファージの浸潤が乳腺脂肪移植でより高まっていること、5) 乳腺脂肪移植では IL-1 などの炎症性サイトカインの産生が亢進していること、を見出した。

以上より、マウス乳がん細胞移植モデルに生物発光イメージングを用いることにより、腫瘍体積の変化を観察するにとどまらず、これまで可視化することが困難であった炎症反応を同一個体内で経時的に観察することを可能とした。また、炎症反応の惹起には、がん細胞を取り囲む組織内の細胞が協調的に作用することが必要であるなど、炎症性微小環境の形成には組織特異性があると考えられた。さらに、この移植後早期の炎症反応が、乳腺脂肪移植での肺転移に寄与している可能性も示唆された。このように生物発光イメージングを用いて、生体反応の経時的な変化を観察することで得られる情報は、実際の生体内での腫瘍微小環境の変化を理解する上で非常に重要なものであると考えられた。

## 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

がん細胞を取り囲む組織の違いが、がん細胞の獲得形質にどのように影響するか、ヒト膵がん細胞 SUIT-2 のヌードマウスへの移植モデルを用いて解析した。1と同様、異なる組織の影響を調べるために皮下移植と膵移植の2つの移植モデルを比較した。その結果、1) SUIT-2 細胞を皮下移植した場合は原発腫瘍のみが形成されるが、一方で膵移植の場合は原発腫瘍の形成に加え、腹膜播種や肺転移巣が観察されること、がわかった。さらに腫瘍微小環境下でがん細胞が獲得した形質を調べるために、皮下移植と膵移植のそれぞれの移植モデルにおいて、「移植—腫瘍形成—腫瘍からのがん細胞の単離—移植」を繰り返して行い、悪性度の高い細胞株 (高悪性株) を樹立した。それら高悪性株について解析を進めた結果、2) いずれのモデルから樹立した高悪性株においても移植前の細胞 (親株) と比較して細胞形態が異なること、*in vivo* における造腫瘍能が亢進していること、を見出した。さらにその獲得形質について解析を進めたところ、3) 膵移植から樹立した細胞株特異的に E-cadherin の発現低下、浸潤能の亢進などが認められ、皮下移植由来の高悪性株と比較し、膵由来の高悪性株の方がより高い悪性度を示すこと、がわかった。次に RNA シークエンスを用いてそれぞれの細胞株の網羅的な遺伝子発現解析を行った結果、4) 皮下移植もしくは膵移植から樹立した高悪性株は親株と異なる遺伝子発現プロファイルを示し、使用する移植モデルによって活性化されている細胞内シグナル伝達経路が大きく異なること、5) 膵移植由来の高悪性株特異的に複数のがん促進遺伝子の発現が亢進していること、を見出した。また、SUIT-2 細胞とは異なる複数のヒト膵がん細胞を用いて、膵移植モデルから高悪性株の樹

立および遺伝子解析を行った結果、6) 複数類のヒト膵がん細胞の高悪性株で共通して高発現している特定の遺伝子群が存在すること、もわかった。

以上より、2つの移植モデルから樹立した高悪性株の特性を比較することにより、がん細胞を取り囲む環境の違いがその獲得形質に大きく影響していることが示唆された。さらに、膵がん細胞は、由来組織である膵組織の間質と相互作用することが悪性形質の獲得に重要であると考えられた。また、膵移植から得られた高悪性株で特異的に発現が亢進している分子が存在することがわかったが、これらが膵がんの新たな治療標的分子や診断分子となる可能性もあり、膵がん治療や診断への応用も期待される。

本研究では複数のがん細胞の移植モデルにより、腫瘍微小環境の違いががん細胞の経時的な挙動、獲得形質、遺伝子発現変化に大きく寄与していることを示した。このように組織の違いがもたらす腫瘍の変化や形質の違いを、がん細胞移植モデルを用いて示している論文は極めてめずらしい。また、生物発光イメージングを応用することで炎症反応を経時的に観察するといった新たな解析方法の確立、異なる組織から樹立した高悪性株の獲得形質の比較による組織特異性の検討、新規の治療標的分子の探索など、移植モデルを用いた従来の解析手法にはなかった新たな要素が多く取り入れられており、独創性の高い論文であると言える。これらの成果は、腫瘍微小環境の変化やその役割の理解、さらには新たな創薬へと大いに貢献するものと考えられる。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。