193　オルガノイドによる少数転移乳癌分子メカニズムの解明	工藤　麗

【目的】少数転移乳癌（Oligometastatic Breast Cancer：OMBC）とは、転移臓器数や大きさ、個数が限られた転移乳癌のことである。これまでは、転移の大きさや個数が少ない OMBC に対しても、転移乳癌として薬物療法を中心に緩和的治療が行われてきた。しかし近年、転移の少ない症例では、十分な薬物療法の上で切除や放射線治療などの局所治療を加えることにより予後が改善されるとの報告がなされるようになった。我々の施設では以前から OMBC に対して積極的な集学的治療を行っており、2012 年に後方視的な解析を報告している。1980～2010 年の OMBC75 例では 20 年生存率が 34%であり、転移乳癌の長期生存 3～4%と比較すると、極めて高いものであった。しかし、OMBC の分子生物学的特徴についての研究はほとんど報告はない。そこで本研究では、前向きのトランスレーショナルリサーチとして、OMBC の分子生物学的特徴を明らかにする。

【方法】乳癌の原発巣および転移巣から針生検にて組織を採取した。組織をメス、酵素により処理しマトリゲル中で培養しオルガノイドの作製を行なった。同様に処理した組織を、Swiss J2 3T3 細胞と共培養し、Conditionally reprogrammed（CR）細胞を作製した。CR 細胞を用いて、マイクロアレイ解析・乳癌での変異が高頻度である 93 遺伝子の DNA ターゲットシークエンスを行なった。OMBC から作製した CR 細胞を用いて、Anti-cancer compound library を添加し、薬剤スクリーニングアッセイを行なった。

【結果】乳癌原発巣 4 例から CR 細胞は 3 例作製できたのに対して、オルガノイドは 1 例も作製することができなかった。そのため、以降の実験系は CR 細胞を用いて行うこととした。原発巣に比較し CR 細胞で発現上昇した遺伝子 162 遺伝子と、発現低下した遺伝子 271 遺伝子を対象として KEGG パスウェイ解析を行なったところ、細胞接着に関与する因子が変動していた。原発巣では 119 遺伝子に変異が、転移巣では 118 遺伝子に変異が同定され、そのオーバーラップは 96%であった。OMBC の薬剤スクリーニングアッセイでは 66 の薬剤が感受性ありとされ、そのターゲットとなる分子が同定された。

表：OMBC の転移巣において感受性のある薬剤のターゲット分子

EGFR	PI3K
ER/PR receptor	PLK
FGFR	VEGFR
mTOR	Aurora kinase
PDGFR	Bcr-Abl
Topoisomerase	

193. オルガノイドによる少数転移乳癌分子メカニズムの解明

工藤　麗

東京慈恵会医科大学 外科学講座

Key words：乳癌，少数転移乳癌，薬剤スクリーニング，パスウェイ解析

緒　言

少数転移乳癌（Oligometastatic Breast Cancer：OMBC）とは、転移臓器数や大きさ、個数が限られた転移乳癌のことである。これまでは、転移の大きさや個数が少ないOMBCに対しても、転移乳癌として薬物療法を中心に緩和的治療が行われてきた。転移乳癌では、治癒を目指した治療はタブー視されてきたのが現状であった。しかし近年、転移の少ない症例では、十分な薬物療法の上で切除や放射線治療などの局所治療を加えることにより予後が改善されるとの報告がなされるようになった。我々の施設では以前からOMBCに対して積極的な集学的治療を行っており、2012年に後方視的な解析を報告している。1980～2010年のOMBC 75例では20年生存率が34%であり、転移乳癌の長期生存3～4%と比較すると、極めて高いものであった［1］。また、乳癌肺転移症例に対して化学療法に加え転移巣切除を行った場合、OMBC症例では5年生存率が92%もあることを報告した。さらにOMBCとnon-OMBCで癌幹細胞の割合を肺転移巣で比較すると、OMBCでは9%に対してnon-OMBCでは73%と有意にOMBCでは癌幹細胞の割合が低かった。腫瘍の不均一性や薬剤抵抗性の温床となると考えられている“癌幹細胞”の割合が大きく異なるという研究結果より、OMBCにはnon-OMBCとは異なる分子生物学的特徴が存在し、良好な予後に寄与しているのではないかとの着想に至った［2］。しかし、OMBCの分子生物学的特徴についての研究はほとんど報告はない。そこで本研究では、前向きのトランスレーショナルリサーチとして、OMBCの分子生物学的特徴を明らかにする。転移乳癌の臨床検体を用いた発現解析の問題点として、転移巣の生検は難しく、検体量不足により、様々な解析アプリケーションへの応用が難しいことが挙げられる。そこで、本研究では新たに転移巣の生検検体から腫瘍オルガイドを作製することでこの困難を解消する。腫瘍オルガノイドとは癌組織から採取した細胞塊をマトリゲル・細胞外マトリックス内で三次元的に培養して形成された立体組織で、生体内での癌組織に近い状態で解析可能である。増殖能が保持され、腫瘍自体の遺伝子変異も受け継がれているため、検体量を増やすことができ、腫瘍の遺伝子発現の経時的変化や形質変化も観察できる［3］。一方、乳癌でのオルガノイド作製の報告は近年なされたもので、乳癌はPatient-derived cultureが難しいという問題がある。そこで我々はオルガノイドのみならずConditionally reprogrammed cell（CR細胞）に注目した。CR細胞はRho-kinase inhibitorを添加した培養液でマウスの線維芽細胞であるSwiss J2 3T3細胞と共培養することで、短期間で培養細胞を樹立できる新しい細胞培養系で、その性質は原発腫瘍を継承していることが報告されている［4］。

これらの手法を用いて、少数転移乳癌の分子生物学的特徴を明らかにし、どのような転移乳癌に集学的治療を行う必要があるのかの指標を確立することを目指す。

方　法

1.　オルガノイドおよびConditionally Reprogrammed cellの樹立

乳癌原発および転移巣からの培養細胞の樹立を行なった。原発巣およびOMBCの肝転移巣からオルガノイドを作製した。14Gの針生検を用いて腫瘍組織を採取し、プロトコールに従い処理をした［3］。一方、CR細胞の作製も同時に行なった。同様に針生検で得たサンプルを処理し、Rho-kinase 阻害薬のY-27632を添加し、30 Gyの放射線を照射したSwiss-J2 3T3 細胞とともに共培養した［4］。

2. マイクロアレイ解析

乳癌原発巣から樹立した CR 細胞より NucleoSpin® RNA XS を用いて RNA を抽出し、SurePrint G3 Human GE microarray kit Ver 2.0（Agilent Technologies）を用いてマイクロアレイ解析を行なった。

3. DNA ターゲットシークエンス

乳癌原発巣から樹立した CR 細胞より NucleoSpin® Tissue XS を用いて DNA を抽出し、QIAseq Targeted DNA Panels を用いて、乳癌において高頻度で変異を持つ 93 遺伝子の変異を解析した。

4. 異種移植実験

乳癌原発巣から樹立した CR 細胞 5×10^6細胞を 100 μl のマトリゲル内に溶解し、7 週齢の雌のヌードマウスの乳腺下に注入した。同時に 17 β-エストラジオールペレットを皮下に挿入した。

5. 薬剤スクリーニングアッセイ

乳癌転移巣から樹立した CR 細胞を 96 well low-attachment multi well plate で培養し tumorsphere を形成させた。Cambridge cancer compound（Selleck chemicals）を添加してから 36 時間後に CellTiter-Glo® 3D cell viability assay を用いて細胞の生存率を解析した。

結　果

1. 乳癌オルガノイド・CR 細胞の作製

OMBC からのオルガノイドを作製する前に原発巣から少量のサンプルで培養細胞を作製できるかどうかを検討した。各プロトコールに従い、乳癌原発巣からオルガノイドと CR 細胞を作製したところ、オルガノイドは 4 例中 0 例で、CR 細胞は 4 例中 3 例で培養細胞が樹立できた。腫瘍オルガノイドを実験系として用いることができなかったため、CR 細胞を用いてその後の実験を行うこととした。原発巣からの CR 細胞は検体採取後 2 週間から 4 週間で樹立可能であった（図 1）。

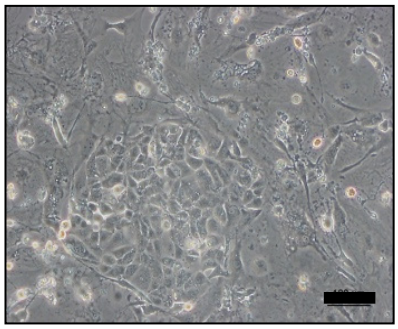


図 1. 原発巣からの CR 細胞
40 倍、スケールバーは 100 μ m を示す。

2. 原発巣と CR 細胞の遺伝子発現の比較

パイロット試験として、原発巣の腫瘍細胞と CR 細胞の持つ遺伝子発現を比較した。マイクロアレイ解析を行い、原発巣に比較し CR 細胞で発現上昇した遺伝子 162 遺伝子と、発現低下した遺伝子 271 遺伝子を対象として KEGG パスウェイ解析を行なったところ、細胞接着に関与する因子が変動していた（図 2A）。

3. 原発巣と CR 細胞の遺伝子変異の比較

次に原発巣の腫瘍細胞と CR 細胞の持つ遺伝子変異を比較した。乳癌での変異が高頻度である 93 遺伝子の DNA ターゲットシークエンスを行い、原発巣では 119 遺伝子に変異が、転移巣では 118 遺伝子に変異が同定された。変異遺伝子と、変異部位を考慮した場合、96%のオーバーラップがあることが示された（図 2B）。さらに、早期の継代の CR 細胞の遺伝子変異の割合が原発巣とほぼ同等であることから、腫瘍内の遺伝子変異の不均一性が保たれている可能性が示唆された（表 1）。

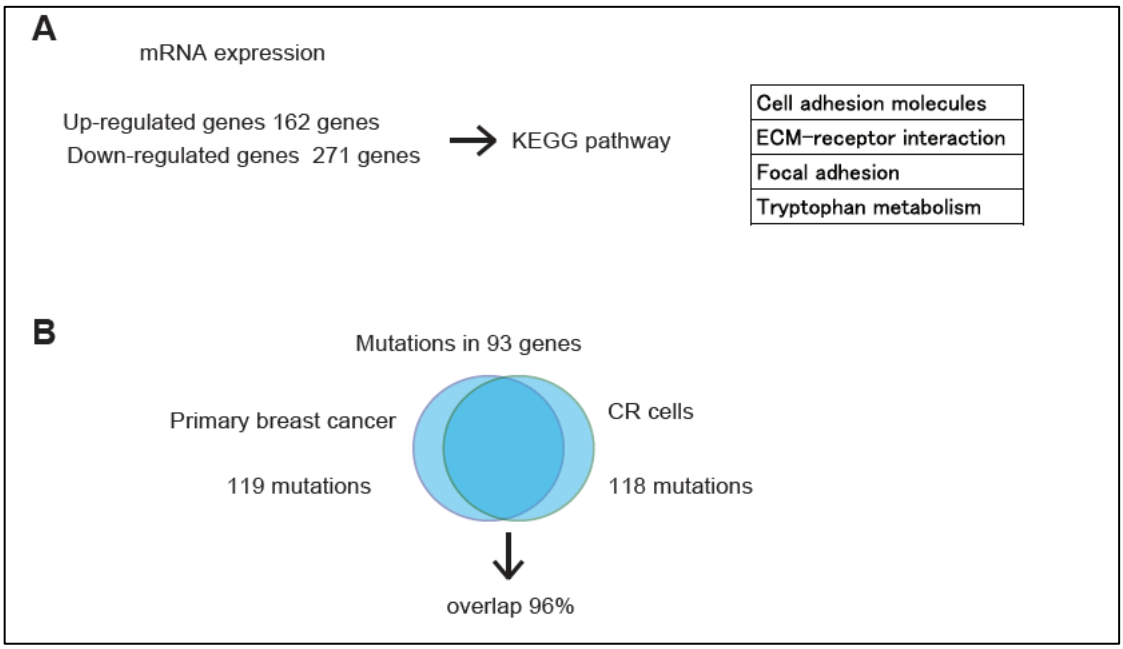


図 2. 乳癌原発巣と CR 細胞の比較

a) 原発巣とそれと対応する CR 細胞の 3 継代目の RNA を採取しマイクロアレイ解析を行なった。KEGG パスウェイ解析により 4 つの特徴が同定された。

b) 原発巣とそれと対応する CR 細胞の 3 継代目の DNA を採取し 93 遺伝子に対してターゲットシークエンス解析を行なった。2 グループにおける遺伝子変異数を示す・

表 1. 代表的な遺伝子における変異の部位、割合、変異の種類

Gene	Mutation	Tissue	CR cells	
RAD50	TA>T	0.0365	0.0437	L719 fs
BLM	GA>G	0.0413	0.0285	G512 fs
KMT2C	CT>C	0.0689	0.0502	K2707 fs

4. 少数転移からの CR 細胞の樹立

原発巣での実験結果を踏まえ、OMBC の肝転移巣のからの CR 細胞を樹立した。原発巣からの CR 細胞と比較し樹立に約 6 週間の時間を要した。この細胞を用いて薬剤スクリーニングを行ない、細胞の生存率をコントロールの DMSO と比較し 25%以下に抑える薬剤を 66 個同定した。これらの薬剤のターゲットを解析するといくつかの重要なパスウェイが亢進していることが示された（表 2)。

表 2. 感受性のある薬剤のターゲット分子

EGFR	PI3K
ER/PR receptor	PLK
FGFR	VEGFR
mTOR	Aurora kinase
PDGFR	Bcr-Abl
Topoisomerase	

感受性ありと判断した66の薬剤がターゲットとしている主な分子

考　察

本研究ではOMBCの肝転移巣から、比較的簡便に培養細胞系を樹立できることが示された。今回用いたCR細胞はconditionally（ある条件下で）reprogrammed（リプログラミングされる）という新しい細胞培養システムであり、非常に少量の検体量から数週間という短期間で樹立が可能である。特にOMBCは、臨床的に進行が緩やかな傾向にあり、分子生物学的には幹細胞の比率も少ないため、樹立に時間を要する可能性があったが、原発巣と比較し4週間程度の差にとどまった。腫瘍オルガノイドを用いてOMBCの特徴を解析する計画であったが、今回プロトコールに従い培養を試みたが作製することができなかった。さらなる検討が必要と考える。

本研究最大の目標であるOMBCに特徴的な分子生物学的特徴については、マイクロアレイ解析を用いると、元の腫瘍から大きく遺伝子発現が変化していた。そこで、薬剤スクリーニングの手法を用いて、別のアプローチからCR細胞内でアクティブとなっているパスウェイを見つけることとした。その結果、表2に示すように、通常乳癌では報告がないようなPLKやBcr-Abが同定された（表2）。今後はOMBC以外の転移乳癌にてこれらのパスウェイがどう異なるのかを比較検討していく必要がある。

謝　辞

最後に、本研究に御支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1) Kobayashi T, Ichiba T, Sakuyama T, Arakawa Y, Nagasaki E, Aiba K, Nogi H, Kawase K, Takeyama H, Toriumi Y, Uchida K, Kobayashi M, Kanehira C, Suzuki M, Ando N, Natori K, Kuraishi Y. Possible clinical cure of metastatic breast cancer: lessons from our 30-year experience with oligometastatic breast cancer patients and literature review. Breast Cancer. 2012;19(3):218-37. Epub 2012/04/26. doi: 10.1007/s12282-012-0347-0. PubMed PMID: 22532161.

2) Mimoto R, Kobayashi T, Imawari Y, Kamio M, Kato K, Nogi H, Toriumi Y, Hirooka S, Uchida K, Takeyama H. Clinical relevance and low tumor-initiating properties of oligometastatic breast cancer in pulmonary metastasectomy. Breast Cancer Res Treat. 2014;147(2):317-24. Epub 2014/08/27. doi: 10.1007/s10549-014-3111-7. PubMed PMID: 25156580.

3) Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, Balgobind AV, Wind K, Gracanin A, Begthel H, Korving J, van Boxtel R, Duarte AA, Lelieveld D, van Hoeck A, Ernst RF, Blokzijl F, Nijman IJ, Hoogstraat M, van de Ven M, Egan DA, Zinzalla V, Moll J, Boj SF, Voest EE, Wessels L, van Diest PJ, Rottenberg S, Vries RGJ, Cuppen E, Clevers H. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. Cell. 2018;172(1-2):373-86 e10. Epub 2017/12/12. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.010. PubMed PMID: 29224780.

4) Liu X, Krawczyk E, Suprynowicz FA, Palechor-Ceron N, Yuan H, Dakic A, Simic V, Zheng YL, Sripadhan P, Chen C, Lu J, Hou TW, Choudhury S, Kallakury B, Tang DG, Darling T, Thangapazham R, Timofeeva O, Dritschilo A, Randell SH, Albanese C, Agarwal S, Schlegel R. Conditional reprogramming and long-term expansion of normal and tumor cells from human biospecimens. Nat Protoc. 2017;12(2):439-51. Epub 2017/01/27. doi: 10.1038/nprot.2016.174. PubMed PMID: 28125105; PMCID: PMC6195120.