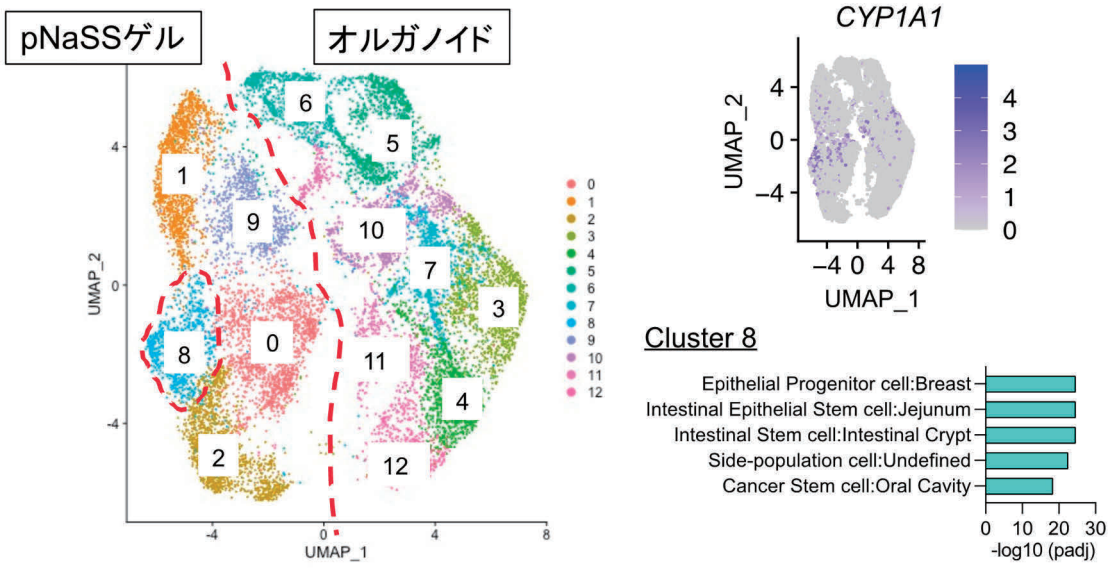
188　ハイドロゲルを用いた乳がん幹細胞の治療標的分子同定	鈴鹿　淳

【目的】乳がんは内分泌療法や分子標的治療等の標準治療が確立され、治療成績は向上しているものの、一部の患者で認められる再発および転移性乳がんについては未だに難治性である。これらの原因には薬剤抵抗性を示す「がん幹細胞」の存在が着目されており、治療抵抗性や晩期再発に関与する可能性が報告されている。しかし、がん幹細胞はがん組織内に極めて僅かしか存在しないため、性状解析のための必要細胞数の確保が困難であり、実際のがん患者組織内に存在するがん幹細胞の生物学的特性や病的意義については十分に解明されていない。本研究では、乳がん患者検体内に潜むがん幹細胞様集団の性質解析および治療標的候補分子の同定を目的とした。

【方法】我々が以前に開発したハイドロゲル（poly-（sodium p-styrene sulfonate）（pNaSS））によるがん幹細胞誘導法を用いて、乳がん患者検体から樹立したオルガノイド 6 例を pNaSS ゲルおよびオルガノイド条件下で培養した。Bulk RNA-seq 解析により、pNaSS ゲル培養細胞にて発現上昇した遺伝子群を用いて、従来報告されているがん幹細胞関連分子や脱分化に関与する遺伝子セットの変動について解析した。また、患者検体由来オルガノイド 1 例を用いたシングルセル RNA-seq 解析にて pNaSS ゲル上での経時的な遺伝子発現変動をオルガノイド培養条件と比較し、特異的な変動を示す細胞集団の遺伝子群の特徴をエンリッチメント解析により検討した。

【結果】pNaSS ゲル上で培養した乳がん患者検体由来オルガノイドでは、薬剤代謝関連分子かつがん幹細胞との関連が報告されている *ALDH1A3* や *CYP1A1* 等の遺伝子発現が亢進し、乳腺前駆細胞や薬剤代謝に関与する遺伝子セットが共通して検出される一方、シグナル伝達関連遺伝子セットの変動は患者検体間で異なっていた。シングルセル RNA-seq 解析より、pNaSS ゲルおよびオルガノイド条件下で培養した細胞集団は異なる分布を示した。pNaSS ゲル培養細胞クラスターの中でも、特に *CYP1A1* を発現する集団においては乳腺前駆細胞や薬剤代謝に関与する遺伝子セットが検出される傾向にあった。以上より、乳がん患者検体より pNaSS ゲルで誘導した幹細胞様集団は患者検体間で多様なシグナル伝達系を利用する一方で *CYP1A1* の発現は共通しており、*CYP1A1* 発現細胞集団が乳がん幹細胞特異的であることが示唆された。

pNaSS ゲル培養乳がん細胞内の特異的な集団における *CYP1A1* 発現および遺伝子セット



188. ハイドロゲルを用いた乳がん幹細胞の治療標的分子同定

鈴鹿　淳

がん研究会 NEXT-Ganken プログラム がん細胞多様性解明プロジェクト

Key words：乳がん，がん幹細胞，ハイドロゲル，バイオマテリアル

緒　言

乳がんは遺伝子解析結果より様々なサブタイプに分類され、その性質に着目した内分泌療法やチロシンキナーゼである HER2 を標的とした薬物療法といった標準治療が確立されたことにより、治療成績が著しく向上しているものの、一部の患者では治療後に転移性および再発乳がんが認められ難治性であることから、転移や再発を防ぐ治療法の開発は重要な課題の一つである。治療抵抗性や転移・再発の原因として、がん幹細胞の存在が示唆されており［1］、大多数のがん細胞は標準治療へ感受性を示す一方、がん幹細胞は薬剤抵抗性を示すため残存し、晩期再発に関与する。しかしながら、がん幹細胞はがん組織内では極めて少数であるため、実際の患者検体内に存在するがん幹細胞集団を *in vitro* において解析することは非常に困難である。近年、生体適合性を有するバイオマテリアルを用いた細胞培養法の開発が進められており、その中でも網目状の構造を有し、水分を豊富に含むことが可能な高分子材料である「ハイドロゲル」が着目されている。我々は以前に、アクリルアミドを基盤とした PAMPS（poly-（2-acrylamide-2-methylpropanesulfonic acid））と PDMAAm（poly-（N,N-dimethylacrylamide））の 2 種類のゲルを重合した Double-Network（DN）ゲル上で様々ながん細胞株を培養することで簡便かつ迅速にがん幹細胞を誘導できる手法の開発に成功した［2］。DN ゲル以外にも、異なった化学組成のハイドロゲルにおいても幹細胞性誘導能の検討を実施しており、それらの中でも浸潤に関与する遺伝子発現や幹細胞性を最も効率良く誘導した poly-（sodium p-styrene sulfonate）（pNaSS）ゲルを見出した。

本研究では、乳がん患者検体内に存在するがん幹細胞分画を同定し、治療標的候補となり得る性質および分子の同定を目的として、pNaSS ゲルおよびオルガノイド条件下で培養した乳がん患者検体由来オルガノイド（PDO：patient-derived organoid）を用いて遺伝子発現の観点から網羅的解析を実施し、がん幹細胞集団の特徴を探索した。

方　法

1. 乳がん患者検体由来オルガノイド（PDO）および pNaSS ゲルを用いた細胞培養

乳がん PDO 6 例（表 1）は Hans Clevers らの方法を参考に培養した［3］。pNaSS ゲルは培養器材に適した大きさに打ち抜き、オートクレーブ滅菌後、細胞培養に用いる培地で一晩浸漬後、細胞分散液でシングルセルの状態にした PDO を播種し、培養した。

表 1. 乳がん PDO 6 例の臨床情報

検体番号	臨床情報
PDO104	Luminal B or TNBC
PDO155	HER2 (+)
PDO166	HER2 (+)
PDO180	Luminal B
PDO209P	Luminal B、胸水転移サンプル
PDO210	Luminal B

培養に用いた検体番号（左）および臨床情報（右）。

2. Bulk RNA-seq 解析

オルガノイドおよびpNaSSゲル条件で14日間培養した乳がんPDOからRNAを抽出した。GenNext RamDA-seq Single Cell Kit（TOYOBO）を用いてRNA-seqライブラリを作製後、NextSeq 550システム（illumina）を用いてシークエンスを実施し、遺伝子発現解析およびエンリッチメント解析を実施した。

3. シングルセルRNA-seq解析

播種時の回収細胞（0日サンプル）、オルガノイドおよびpNaSSゲル条件で1、3、14日間培養した乳がんPDOを、細胞分散液を用いてシングルセルにした後、BD Rhapsody Single-Cell Analysis System（BD Biosciences）のプロトコルに従いライブラリを作製し、NextSeq 550システム（illumina）を用いてシークエンスを実施した。データ解析はSeurat［4］を用いて実施した。

結果および考察

1. pNaSSゲル培養乳がんPDOにおける共通性およびシグナル伝達経路の変動

pNaSSゲル上で培養した乳がんPDO 6例を用いて、Bulk RNA-seq解析により網羅的に検討した。pNaSSゲル培養PDO検体ではオルガノイド培養と比較して、薬剤代謝やがん幹細胞との関連が報告されている*CYP1A1*［5］や*ALDH1A3*［6］の遺伝子発現が亢進する傾向にあった（図1a）。また、pNaSSゲル上で発現亢進した遺伝子群を用いてエンリッチメント解析を実施したところ、乳腺前駆細胞への脱分化を示唆する遺伝子セット（Epithelial progenitor cell、Basal progenitor cell、Luminal progenitor cell）や薬剤代謝関連細胞（Side-population cell）に関与する遺伝子セットが共通して検出される一方、シグナル伝達系に関与する遺伝子セットは検体間で異なる傾向が認められた（図1b）。この結果より、pNaSSゲルで培養したPDOにおいては、脱分化方向への誘導は共通するものの、その性質変化に関与するシグナルは検体毎に異なることが示唆された。

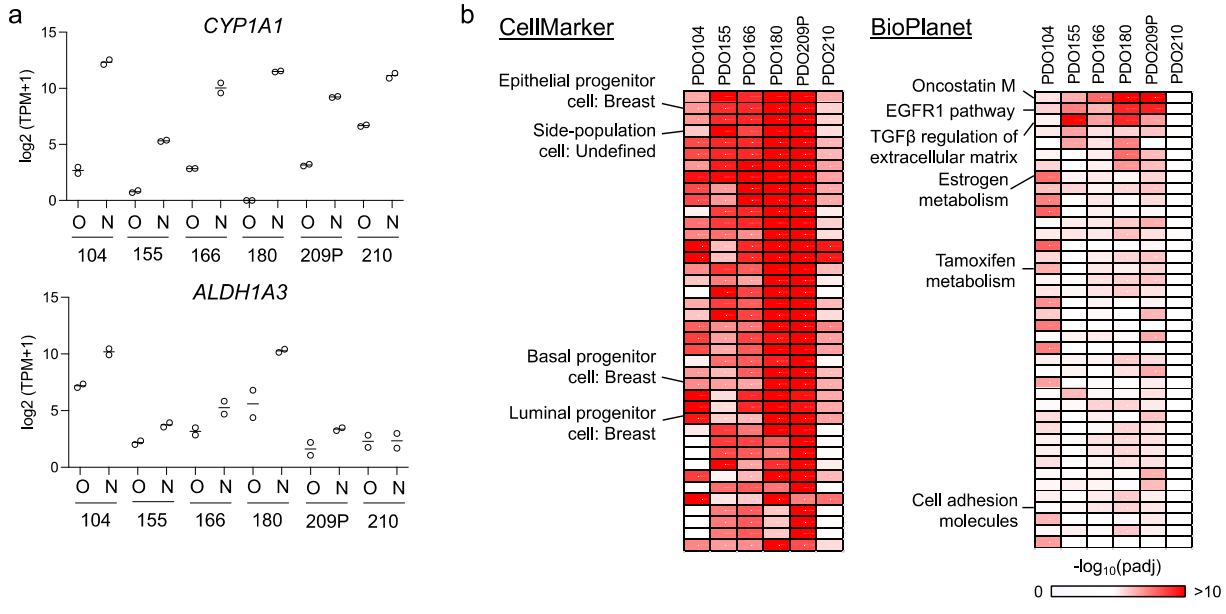


図1. pNaSSゲル培養乳がんPDOにおける特異的な遺伝子発現解析

a）*CYP1A1*（上）および*ALDH1A3*（下）の遺伝子発現結果。Meanおよび各データポイントを表記（N=2、biological duplicate）。O：オルガノイド、N：pNaSSゲル培養。

b） pNaSSゲル培養条件下で発現亢進した遺伝子群（log2 fold change>1、補正*P*値（padj）<0.05、Wald 検定）を対象にしたエンリッチメント解析結果。使用データベース、左：CellMarker、右：BioPlanet。

2. pNaSS ゲル培養乳がん PDO における遺伝子発現の不均一性

オルガノイド培養条件と比較し、pNaSS ゲル培養細胞は脱分化・薬剤代謝関連遺伝子を発現する細胞にどのように変化するのかを検討するため、PDO209P を用いて播種時点の細胞（0 日）、オルガノイドおよび pNaSS ゲル培養（1、3、14 日）サンプルを準備し、シングルセル RNA-seq 解析を実施した。UMAP による次元削減をしたクラスタリング解析結果より、オルガノイド培養細胞は Cluster 3～7、10～12 に、pNaSS ゲル培養細胞は Cluster 0～2、8、9 に分布した（図 2a、b）。また、*ALDH1A3* や *CYP1A1* は Bulk RNA-seq 解析結果を反映し、pNaSS ゲル培養細胞の Cluster にて発現が亢進し、特に培養初期時点（1、3 日培養）の細胞が多数属する Cluster 8 において、*CYP1A1* 陽性細胞が集積する傾向にあった（図 2c）。

a

分布細胞数（%）

	Cluster No.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
オルガノイド	0	3.5	1.9	2.5	12.3	7.5	20.7	20.1	9.3	3.0	1.6	3.6	9.7	4.1
	1	8.3	4.0	7.2	10.1	9.1	4.7	2.3	8.0	6.8	0.7	28.9	7.0	2.9
	3	6.5	1.8	5.5	16.6	11.5	7.5	4.9	13.3	5.7	0.9	17.5	6.5	1.7
	14	2.9	1.1	2.0	17.8	16.2	11.4	12.2	9.5	2.3	0.6	2.5	7.3	14.1
pNaSS	1	10.9	7.0	6.8	12.2	10.9	4.4	3.4	8.8	15.1	2.6	10.9	3.7	3.3
	3	18.6	23.2	3.6	3.7	3.2	1.2	1.3	3.3	22.3	11.4	4.9	2.4	1.0
	14	20.8	23.8	26.1	1.9	1.6	1.5	1.1	1.4	4.8	13.2	1.8	1.3	0.6

（日）

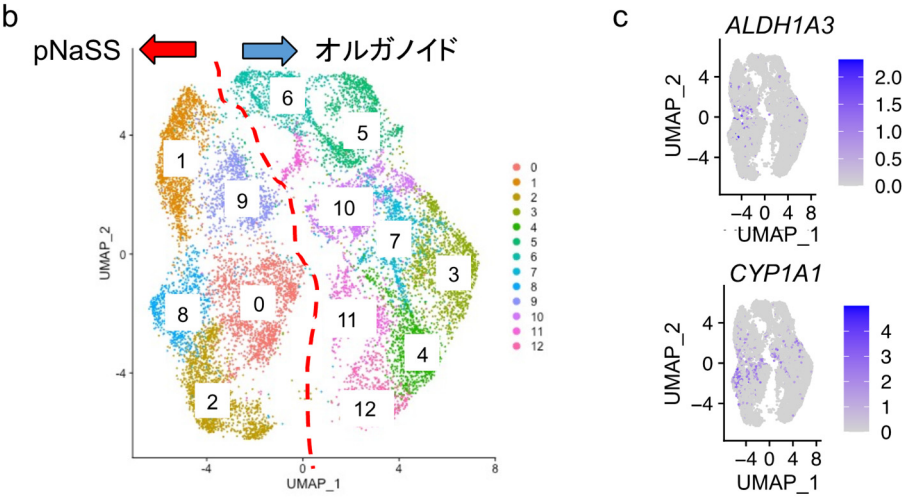


図 2. pNaSS ゲル培養乳がん PDO209P におけるシングルセル RNA-seq 解析結果

a) 各 Cluster 内における分布細胞の割合（%）。横：クラスター番号、縦：サンプル情報、播種時点の細胞（0 日）、オルガノイドおよび pNaSS ゲル培養条件（1、3、14 日）。

b) UMAP クラスタリング解析結果。

c) *ALDH1A3*（上）および *CYP1A1*（下）発現細胞の分布および発現レベル。

3. *CYP1A1* 陽性細胞集団における脱分化および薬剤代謝関連遺伝子セットの検出

シングルセル RNA-seq 解析の結果より、pNaSS ゲル培養の初期段階で *CYP1A1* 陽性細胞が集積する Cluster 8 で脱分化や薬剤代謝関連の性質を示す遺伝子セットが検出されるのではないかと考え、Cluster 8 で発現亢進した遺伝子群を用いてエンリッチメント解析を実施した。Cluster 8 においては Bulk RNA-seq 解析結果と同様に乳腺前駆細胞等の脱分化や薬剤代謝に加え、TGF β のような上皮間葉転換に関わるシグナルや遺伝子転写活性を正に制御する H3K36me3 や H3K4me1 のようなヒストン修飾に関与する遺伝子セットも検出された（図 3）。これらの結果より、Cluster 8 に存在する細胞は乳がん幹細胞の性質を反映する集団の一つであることが示唆され、*CYP1A1* 陽性細胞集団の制御分子に着目することは乳がん幹細胞を標的とした治療開発の一助に繋がるものと考えられた。

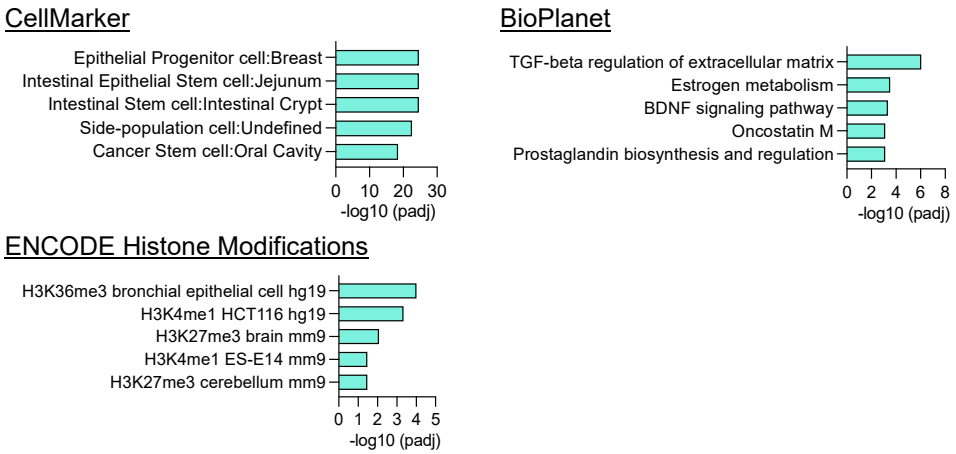


図 3. pNaSS ゲル培養乳がん PDO209P におけるシングルセル RNA-seq 解析結果
Cluster 8 において発現亢進した遺伝子群（log2 fold change＞0.58、補正 *P*値（padj）＜0.05、Wald 検定）を用いたエンリッチメント解析結果。使用データベース（上段左：CellMarker、上段右：BioPlanet、下段：ENCODE Histone Modifications）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者はがん研有明病院乳腺センター・乳腺外科の上野貴之部長である。本稿を終えるにあたり、ご指導いただきました全ての皆様、ご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. Nat Med. 2017 Oct 6;23(10):1124-34. PMID: 28985214 DOI: 10.1038/nm.4409

2) Suzuka J, Tsuda M, Wang L, Kohsaka S, Kishida K, Semba S, Sugino H, Aburatani S, Frauenlob M, Kurokawa T, Kojima S, Ueno T, Ohmiya Y, Mano H, Yasuda K, Gong JP, Tanaka S. Rapid reprogramming of tumour cells into cancer stem cells on double-network hydrogels. Nat Biomed Eng. 2021 Aug;5(8):914-25. Epub 2021 Mar 29. PMID: 33782572 DOI: 10.1038/s41551-021-00692-2

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 Jan 11;172(1-2):373-86.e10. Epub 2017 Dec 7. PMID: 29224780 DOI: 10.1016/j.cell.2017.11.010

4) Satija R, Farrell JA, Gennert D, Schier AF, Regev A. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. 2015 May;33(5):495-502. Epub 2015 Apr 13. PMID: 25867923 PMCID: PMC4430369 DOI: 10.1038/nbt.3192

5) Al-Dhfyan A, Alhoshani A, Korashy HM. Aryl hydrocarbon receptor/cytochrome P450 1A1 pathway mediates breast cancer stem cells expansion through PTEN inhibition and β-Catenin and Akt activation. 2017 Jan 19;16(1):14. PMID: 28103884 PMCID: PMC5244521 DOI: 10.1186/s12943-016-0570-y

6) Marcato P, Dean CA, Pan D, Araslanova R, Gillis M, Joshi M, Helyer L, Pan L, Leidal A, Gujar S, Giacomantonio CA, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. 2011 Jan;29(1):32-45. PMID: 21280157 DOI: 10.1002/stem.563