

平成 27 年 6 月 21 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861162

研究課題名(和文) 脳転移指向性乳癌細胞株を用いた脳転移予測マーカー探索

研究課題名(英文) Identifying prediction marker for brain metastasis using brain seeking breast cancer cells

研究代表者

石田 和茂(ishida, kazushige)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：80583541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：(1) MDA-MB231細胞および231BR細胞について、約2万種類の全ヒト遺伝子発現解析が終了している。MDA-MB231細胞で高発現していた遺伝子、および231BR細胞で高発現していた遺伝子、各9種類ずつ計18遺伝子が抽出されている。
(2) 遺伝子変異に伴うmorphology changeの可能性を考慮し、2細胞間のゲノムシーケンスを行い、幾つかの遺伝子変異が存在することを確認している。

研究成果の概要(英文)：Eighteen candidate biomarkers were identified by gene expression analysis with twenty thousand human genome between MDA-MB231 and 231BR cells. Moreover, some gene mutations were identified by genome sequencing.

研究分野：分子生物学

キーワード：乳癌 脳転移 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 転移性脳腫瘍は予後不良だけでなく、他臓器転移と比較しても miserable な経過を辿ることが知られている。また、癌細胞は脳血液関門 (Blood Brain Barrier, BBB) によって抗腫瘍薬の暴露を免れるため、脳組織は癌細胞にとっての sanctuary (聖域) と呼ばれている。

(2) 乳癌は肺癌に次いで脳転移発生頻度の高い悪性腫瘍であるが、複数の retrospective study によって “ 移巢の早期発見は予後改善に寄与しない ” ことが推測されており、術後 follow up における定期的な CT および MRI 検査はガイドライン上推奨されていない。しかしながら、何らかの生物学的特徴を有するサブグループにおける evidence を抽出するためには、その集団を対象とした研究デザインが必要であり、全乳癌患者を対象にした retrospective study では、小さなサブグループのみで生じうる生物学的事象はノイズとして処理される可能性がある。さらに、一部の肺小細胞癌では予防的全脳照射が予後を改善することが証明されており、乳癌においても予防的前脳照射の恩恵を受けるサブグループの存在が示唆される。

(3) 転移性脳腫瘍の治療は、外科的切除もしくは放射線照射 (全脳照射および定位手術的照射) が中心となる。定位手術的照射や外科的切除は同等の治療効果を期待できるが、適応となる腫瘍径が限られている。そのため、早期発見症例のなかには、有症状で発見されるよりも少ない転移個数で発見される可能性が期待でき、そのことは治療選択肢を維持することにも繋がる。また、全脳照射による晩期脳障害を鑑みても、早期発見によって脳局所療法を行うことの意義は小さくない。

(4) 上記仮説を検証し evidence を確立するためには、適正集団を対象とした研究デザインが求められるが、その母集団を抽出するためにも脳転移リスクをあらかじめ予測することができるバイオマーカーは不可欠である。

(5) 本研究では 2001 年に Yoneda 等によって樹立された脳転移指向性乳癌細胞株 “ 231BR ” を研究サンプルとして用いる。同細胞株は、多臓器転移能を持つヒト乳癌細胞株 MDA-MB231 から樹立された細胞である。Yoneda 等は、マウスの左心室に “ MDA-MB231 細胞 ” を注射することで脳や骨に多臓器転移を生じさせ、その後脳転移巣から癌細胞を初代培養している。さらに、初代培養した細胞を別のマウス左心室に再度注射するという実験系を繰り返すことで、脳転移指向性が増し、他臓器転移指向性が低下することを発見している。最終的には、同様の操作を 6 回繰り返した結果、脳組織のみに転移する phenotype を獲得した細胞株 “ 231BR 細胞 ” の樹立に成功している。

(6) バイオマーカー探索研究では、heterogeneity な集団を解析対象とする場合が多い。この時、個体間のベースライン分子発現レベルが異なるため、解析結果には多くのノイズが含まれることが多い。その中から有意な結果を抽出するためには、膨大な検体数が必要であり、研究遂行にあたっては high volume center に依存せざるを得ない場合がある。本研究で用いる 2 細胞 (MDA-MB231 および 231BR) は同一の origin であるため、本来のベースライン遺伝子発現および遺伝子変異パターンは同様と考えることが出来る。そのため、2 細胞間の分子発現レベルおよび遺伝子変異の相違は、脳転移指向性という phenotype の獲得に寄与している可能性が高い。

2. 研究の目的

乳癌患者の primary tumor tissue を免疫染色することで、将来的な脳転移リスクを予測することが出来るバイオマーカーを同定する。

3. 研究の方法

(1) 2細胞間の遺伝子発現解析を行い、MDA-MB231細胞もしくは231BR細胞に高発現する遺伝子を抽出する。MDA-MB231細胞に高発現する遺伝子は、231BR細胞の樹立に際して発現低下した遺伝子であると推測することができる。逆に、231BR細胞に高発現する遺伝子は、樹立に際して発現上昇した遺伝子であると推測することができ、それらの遺伝子に関わるタンパクの発現変化が脳転移指向性という phenotype の獲得に寄与している可能性があり、候補遺伝子と仮定する。

(2) 231BR細胞樹立に際して、遺伝子発現の変化とともに、遺伝子変異を獲得している可能性がある。そのため、2細胞についてのゲノムシーケンスを行い、MDA-MB231細胞と231BR細胞間で異なる変異遺伝子を同定する。文献的にMDA-MB231細胞の有する遺伝子変異は確認されているため、結果からは、231BR細胞が有する新規遺伝子変異が phenotype 獲得に寄与している可能性を考慮し、候補遺伝子と仮定する。

(3) 上記2実験によって抽出された候補遺伝子について、231BS細胞を用いて Knock down もしくは Transfection 細胞を作成する。それらの細胞を用いて、Yoneda 等が行った方法と同様にマウスの左心室に注射することで脳転移指向性が減弱することを確認する。また、文献では注射後4週間で脳転移が生じることが報告されているため、4週以内に何らかの理由で死亡したマウスは観察対象から外す。さらに、MDA-MB231細胞の脳転移発生率が43%であったと報告されてい

ることから、脳転移発生率の減弱は50%を cut off 値とする。

(4) 当科で外科的に切除されたヒト乳癌組織を用いて、候補遺伝子に関連するタンパクと脳転移発生頻度の相関を retrospective に検討する。評価方法は免疫染色にて行うが、実験毎の手技的・環境的バイアスによる染色強度の変化を避けるため、多量サンプルの一次的染色に特化した組織マイクロアレイ法 (Tissue microarray, TMA) を用いる。TMAで1枚のスライドに搭載ことの出来るサンプル数が約80であることをすでに確認しているため、本研究では『脳転移合併乳癌症例40例 vs 脳転移非合併乳癌症例40例』、計80症例の組織を用いる。染色判定は病理医を含む3人の研究者によって独立して行うことで客観性を維持する。最終的に脳転移との相関が確認された蛋白を脳転移予測マーカーとし、将来的に prospective な検証作業へ繋げる。

4. 研究成果

(1) MDA-MB231細胞および231BR細胞について、約2万種類の全ヒト遺伝子発現解析が終了している。そのうち、どちらかの細胞に10倍以上の発現差を認める遺伝子を抽出したところ14遺伝子あり、更に2遺伝子について50倍以上、1遺伝子については100倍以上の発現差を呈していた。具体的には、MDA-MB231細胞に高発現している遺伝子として、*CHRD1* (chordin-like 1) 遺伝子が77.66倍 ($p=4.07E^{-22}$)、*TMEM98* (transmembrane protein 98) 遺伝子が62.03倍の発現差 ($p=1.50E^{-21}$) を呈していた。また、231BR細胞に高発現している遺伝子として、*SLC14A1* (solute carrier family 14, member 1) 遺伝子が137.46倍 ($p=4.82E^{-23}$) の発現差を呈していた。これらの遺伝子について、乳癌もしくは脳転移に

関わる文献検索を行ったところ、現在までにそれらの biology との関連を示唆する報告は確認されなかった。各々の遺伝子において発現差のあった上位 9 遺伝子を以下に示す。

MDA-MB231細胞に高発現する9遺伝子			231BR細胞に高発現する9遺伝子		
Gene name	fold change	P value (log_ratio)	Gene name	fold change	P value (log_ratio)
<i>CHRD1</i>	77.66	4.07E-22	<i>SLC14A1</i>	137.46	4.82E-23
<i>TMEM98</i>	62.03	1.50E-21	<i>GRB14</i>	18.79	4.95E-15
<i>XK</i>	15.26	2.43E-20	<i>AZU1</i>	12.10	4.03E-10
<i>F2RL2</i>	14.46	8.40E-11	<i>SOX30</i>	10.95	5.31E-09
<i>SLCO3A1</i>	13.95	8.37E-10	<i>KAAG1</i>	10.77	7.80E-09
<i>CC2D2A</i>	11.60	1.02E-08	<i>IL17F</i>	10.36	1.35E-08
<i>ROLA</i>	11.18	1.08E-07	<i>DACH1</i>	9.85	4.80E-08
<i>ACOXL</i>	10.01	1.29E-15	<i>IL1R2</i>	8.37	5.12E-08
<i>PPN</i>	9.38	3.81E-08	<i>C1orf98</i>	8.18	4.13E-08

(2) 遺伝子変異に伴い phenotype が変わる可能性も考慮し、次世代ゲノムシーケンサーを用いて 2 細胞間のゲノムシーケンスを行った。結果、幾つかの遺伝子変異が 231BR 細胞に存在することを確認している。現在解析中であり、本報告で最終結果を提示することが出来ないため、最終研究結果とともに論文報告する予定である。

(3) ヒト乳癌切除検体を用いた候補遺伝子の確認研究は、岩手医科大学医学部附属病院における倫理委員会の承認の得る必要があるため、現在審査の準備段階にある。上記の遺伝子変異解析終了を待って、遺伝子発現解析結果から抽出された候補遺伝子と併せて、関連するタンパク質の免疫染色を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 第 114 回日本外科学会学術集会
- (2) 第 52 回日本癌治療学会学術集会

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

石田 和茂 (ISHIDA, Kazushige)
 岩手医科大学医学部附属病院・助教
 研究者番号：80583541