

研究報告書
令和5年度：A課題

2025年 4月 21日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 大阪国際がんセンター研究所

住 所 大阪府大阪市中央区大手前 3-1-69

研究者氏名 中山 淳

(研究課題)

浸潤性小葉がんにおけるがん幹細胞集団多様性の解析

令和6年 1月 29日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【研究背景と目的】

乳がんのほとんどは乳管に由来する乳管がん (IDC: Invasive Ductal Carcinoma) であるが、乳腺の末梢組織から発症する浸潤性小葉がん (ILC: Invasive Lobular Carcinoma) が一部見られる。乳がんの中では比較的高齢者に発生し、画像検査でとらえられにくいので、進行例が多く見られる。病的には E-Cadherin 陰性でがん細胞がばらばらに浸潤するため境界がわかりにくく、多中心発生をするので、乳房温存手術を避けることが多く、進行すると腹膜、卵巣、消化管等特異な転移様式を取る特徴がある。生物学的には IDC と全く異なるにもかかわらず、現在の ILC 治療は IDC に準じて行われており、ILC の生物学的特性や分子メカニズムに基づいた治療法は存在しない。ILC の分子特性の理解と最適化した治療法確立は重要な課題である。先行研究として、大規模乳がん 1 細胞解析アトラスを構築した論文 (Wu et al., *Nat Genet.*, 2021) に少数の ILC の検体が含まれている。しかし、ILC に着目した詳細な解析は行われておらず、IDC と ILC は混同して取り扱われている。ILC におけるがん幹細胞集団に着目した解析は報告されておらず、ILC におけるがん幹細胞がどのような特徴を持ち、がんを進展させるのか全く明らかにされていない現状である。代表者は、トリプルネガティブ乳がん (細胞株、異種移植腫瘍片、臨床検体腫瘍組織) の 1 細胞 RNA-seq 解析および空間トランスクリプトーム解析より、1 つの腫瘍組織中に複数のがん幹細胞様の集団が存在することを明らかにした (Nakayama et al., *Dis Model Mech.*, 2022)。1 つの腫瘍組織中には複数のがん幹細胞が存在し、腫瘍の進展および薬剤耐性に寄与している可能性を世界で初めて明らかにした。これらの解析基盤を応用し、通常の乳管がんと生物学的に異なる ILC の本態と生物学的特性を 1 細胞レベルで理解できると考えた。本研究の目的は、組織空間トランスクリプトーム解析を用いて ILC における腫瘍内細胞不均一性を明らかにし、細胞間相互作用の解明や ILC がん細胞の増殖・生存に関わる分子経路を同定することである。また、ILC に特徴的ながん幹細胞集団とその多様性を明らかにすることで、ILC に最適化した治療の確立へと繋げる。

【研究方法】

国立がん研究センターバイオバンクに登録されている ILC 臨床検体を解析に使用する予定である (国立がん研究センター生命倫理委員会 承認済み 2019-018)。得られた腫瘍組織に対し、10x Genomics 社の Visium を用いて空間トランスクリプトーム解析を実施する。使用する検体の半分を残し、固定することで組織解析も合わせて実施する。Visium の標準プロトコルに従ってライブラリを作製し、NGS 解析を行う。得られた Sequence データに対して Space Ranger 解析を行い、空間位置情報と各スポットにおける遺伝子発現量を取得する。解析環境として、Seurat/R (Stuart et al., *Cell*, 2019) を使用する。確立した 1 細胞解析および空間トランスクリプトーム解析手法は、ILC の解析にも適用できるよう構築してある。実際の解析として、ILC 組織中に含まれるがん細胞、がん幹細胞、間質細胞それぞれに焦点を当てて、遺伝子発現解析を行う。具体的に、パスウェイ解析や Cell-Cell interaction 解析を行い、ILC に特徴的なシグナル経路・相互作用を明らかにする。

【研究成果】

すでに完了していた ILC4 症例に加えて、追加の 4 症例の Visium 解析を完了し、合計 8 症例について統合解析を行った。間質細胞のマーカーである COL1A2 の発現を見たところ、組織の大部分に発現が確認でき、間質リッチの組織であることが確認できた。このことは、ILC が E-Cadherin 欠損および発現低下による EMT 誘導が起きており、間質様組織が増えていることを裏付けるものであった。この 8 症例について、Classic 型と pleomorphic 型に分類し、Spot 解析を行った結果、Epithelial-enriched spot、Stroma-enriched spot、Immune-enriched spot、Basal-enriched spot に分類してプロファイルを取得することができた。この中でも ILC がん細胞の特性に着目して解析するために、Epithelial-enriched spot をさらに細分化した結果、8 個のクラスターに分類することができた。これらのクラスターは細胞周期関連遺伝子が enrich したクラスターや、細胞外マトリックス (ECM) 産生関連遺伝子が enrich したクラスターなどに分けることができ、がん細胞ごとにことなる機能を持っていることがわかった。

た。加えて、Triple-negative ILC に特徴的なクラスターの抽出に成功した。また、Classic 型と pleomorphic 型の比較解析を行った結果、Classic 型は炎症関連遺伝子の発現が顕著に亢進していることが明らかになった。

これらの結果より、ILC は Classic 型と pleomorphic 型で炎症に関連する遺伝子発現が大きく異なることを見出し、ILC がん細胞は増殖が盛んな領域や ECM 産生が盛んな領域に分けることができることが明らかになった。Visium により ILC の空間多様性と特徴的な遺伝子発現が明らかにすることができた。以上の結果をまとめて、現在海外学術誌への論文投稿の準備を進めている。

最後に、本研究の遂行にあたって支援いただいたがん研究振興財団の関係者の皆様に御礼申し上げます。また共同研究者である国立がん研究センター研究所 病態情報学ユニットの山本雄介先生、都倉桃子先生に感謝申し上げます。

【本助成金関連の査読付き論文】

該当なし

【本助成金関連の代表的学会発表】

【1】中山淳, 都倉桃子, 山本雄介, 浸潤性小葉がんにおける空間遺伝子発現と細胞特性の解明, 第 83 回日本癌学会学術総会, 福岡県福岡市 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 2024 年 9 月 19 日-21 日, P11-5 がん幹細胞・多様性, P-1105