

氏 名（本 籍）	大 西 雅 也	（岐阜県）
学 位 の 種 類	博 士（医学）	
学 位 授 与 番 号	甲第 1239 号	
学 位 授 与 日 付	令和 5 年 3 月 25 日	
学 位 授 与 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
学 位 論 文 題 目	Murine breast cancers disorganize the liver transcriptome in a zoned manner	
審 査 委 員	（主査）教授	長岡 仁
	（副査）教授	大沢 匡毅 教授 前川 洋一

論 文 内 容 の 要 旨

悪性腫瘍は、肝臓などの遠隔臓器に影響し、食欲不振・体重減少・肝臓や脂肪組織の代謝異常など様々な生理機能の障害を引き起こす。これらの異常は臨床的に癌悪液質として知られ、癌患者の生命予後や quality of life に多大な影響を与える。悪性腫瘍が肝臓内の様々な細胞に作用し、これらが複雑に関連して引き起こしていると予想されるが、単一細胞レベルでの検討は十分になされていない。肝臓では門脈や中心静脈との相対的位置に応じて肝細胞の代謝特性が異なっており、その違いに基づき大まかに 3 つの領域（zone）に区分化（zoning）される。zoning は肝臓機能を理解する上で重要な概念である。本研究では、空間トランスクリプトーム解析（ST 解析）とシングルセル RNA シーケンス解析（scRNA-seq 解析）を組み合わせ、乳癌が、遠隔臓器である肝臓内部の zoning に及ぼす影響を詳細に検討した。

【対象と方法】

担癌マウスモデルとして、乳癌細胞株 4T1 細胞を同種移植した乳癌モデルマウスを実験に用いた。移植 14 日後に recipient マウスを解剖して肝臓、大腿骨を摘出した。健常マウス肝臓を対照群とし、摘出した肝臓組織に対し 1) ST 解析（N=2/群）、2) scRNA-seq 解析（N=2/群）をそれぞれ実施した。ST 解析には、肝臓組織より作製した新鮮凍結切片から *in situ* キャプチャー手法を用いて行った。シーケンスデータはリファレンスゲノム（mm10）へマッピング後、1 切片の各プロット部位（約 2000 スポット）から得られた約 5000 遺伝子の発現情報について R パッケージ Seurat を用いて解析を行った。scRNA-seq では、同様の Seurat による発現解析とともに R パッケージ velocity.R を使用し Trajectory 解析を実施した。肝臓、大腿骨より採取した骨髓血に対して magnetic-activated cell sorting を用いて好中球細胞を分離した。採取した細胞から mRNA を抽出し qRT-PCR 解析を行った。

【結果】

ST 解析データより、マウス正常肝臓において既報の *Alb* 遺伝子と *Cyp2e1* 遺伝子の zone 特異的な発現勾配を確認することができた。各スポットは、全遺伝子発現情報から *Alb* 遺伝子高発現スポット（*Alb*^{high}；門脈周囲）、*Cyp2e1* 遺伝子高発現スポット（*Cyp2e1*^{high}；中心静脈周囲）、両者の中間スポット（*Alb*^{mid}*Cyp2e1*^{mid}）の 3 領域に分類された。領域間の変動遺伝子に対する Gene Ontology (GO) 解析を実施したところ、*Alb*^{high} スポットにおいて電子伝達系 ATP 合成とアスパラギン酸のアミノ酸代謝に関連する遺伝子の発現が亢進していた。一方、*Cyp2e1*^{high} スポットでは生体異物代謝と胆汁酸輸送関連遺伝子の発現が亢進しており、代謝機能の領域特異的な zonation を明瞭に可視化することができた。

次に、乳癌による肝内 metabolic zonation への影響を検討した。乳癌マウス肝臓においても、*Alb* 遺

伝子と *Cyp2e1* 遺伝子の zone 特異的な発現勾配は確認された。アスパラギン酸のアミノ酸代謝と脂質合成の代謝関連遺伝子群の発現は *Alb*^{high} スポットにて *Cyp2e1*^{high} スポットと比較し亢進しており正常マウス同様の zonation がみられたが、生体異物代謝の関連遺伝子については *Alb*^{high} スポットと *Cyp2e1*^{high} スポットにおいて有意な発現差はみられず (Wilcoxon 順位検定: $p > 0.05$)、領域特異的な発現パターンは消失していた。この結果は、担癌マウスでは一部の代謝機能においては zonation パターンが破綻することを示唆している。このほか、急性炎症応答遺伝子である *Saa1* と *Saa2* 遺伝子発現は *Alb*^{high} スポットにて亢進する zonation パターンも認めた。

次に、乳癌による肝内免疫細胞への影響を検討するため scRNA-seq データ解析を行なった。好中球と好塩基球にアノテーションされた細胞集団の割合が乳癌マウスでは大きく増加していた。さらに intron の情報を利用し細胞状態の遷移パターンを推定する RNA velocity 解析から、乳癌により増加した好中球集団は様々な分化状態の細胞が存在していることがわかった。好中球の分化と細胞増殖マーカー *Mki67* 遺伝子の発現は相関しており、分化度の低いと考えられる好中球亜集団では *Mki67* 遺伝子が高発現していた。骨髄においても *Mki67* 陽性好中球の有意な増加が乳癌マウス群にてみられた。この結果は、乳癌では骨髄にて好中球細胞分裂が促進されており、未成熟な状態のまま肝内へ浸潤していることを示唆している。最後に、乳癌マウス肝臓内で増加した好中球、好塩基球がどのように局在しているのかを ST データにて検討した。他の免疫細胞では領域特異的な局在はみられなかったが、好中球の局在を示唆する好中球活性遺伝子群モジュールは *Alb*^{mid}*Cyp2e1*^{mid} スポットにて亢進しており、乳癌により増加した好中球は肝内で偏って局在していることが明らかとなった。

【考察】

これまでに固形腫瘍が遠隔臓器である肝臓の恒常性を乱すことは知られていたが、本研究の結果から肝小葉レベルで細密に影響を及ぼしていることが明らかとなった。乳癌によって肝細胞の代謝機能の領域特異性は一部の代謝経路において破綻し、liver zonation の複雑な乱れが引き起こされる。さらに、悪性腫瘍は好中球、好塩基球の肝臓への浸潤を誘発することがわかった。特に未成熟な好中球は多数肝臓に動員され、肝内で領域特異的に分化・活性することが示唆された。これらの肝構成細胞における領域特異的な変化の相互関係は今なお不明であるが、これら異常が互いに密接に関連し宿主個体の肝臓に癌がさまざまな悪影響を及ぼしている能性がある。

【結論】

本研究では、新規技術である ST 解析と scRNA-seq 解析を組み合わせ、乳癌が遠隔臓器である肝臓内での zonation パターンを狂わせ代謝機能を抑制することを明らかにした。この結果は癌悪液質の病態に対する新たな知見であり、担癌患者における癌悪液質の病態解明につながる重要な発見である。同時に、脂肪肝や肝線維症など領域依存性に発症する肝疾患の病態解明においても、本研究の手法は有用と言える。

論文審査の結果の要旨

申請者 大西 雅也は、乳癌が宿主の肝臓に及ぼす影響について詳細に検討し、癌が遠隔にある肝臓の空間的な遺伝子発現パターンを攪乱することを明らかにした。本研究結果は、癌が宿主肝臓に及ぼす異常の全体像を理解するための重要な基盤となる成果であり、腫瘍内科学の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Alexis Vandenbon, Rin Mizuno, Riyo Konishi, Masaya Onishi, Kyoko Masuda, Yuka Kobayashi, Hiroshi Kawamoto, Ayako Suzuki, Chenfeng He, Yuki Nakamura, Kosuke Kawaguchi, Masakazu Toi, Masahito Shimizu, Yasuhito Tanaka, Yutaka Suzuki, Shinpei Kawaoka: Murine breast cancers disorganize the liver transcriptome in a zonated manner
Communications Biology 6(1):97 (2023) Doi: 10.1038/s42003-023-04479-w.