

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	新規解析手法を用いた転移微小環境での細胞間相互作用の解明
Title(English)	
著者(和文)	峯岸美紗
Author(English)	Misa Minegishi
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11821号, 授与年月日:2022年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:近藤 科江,曾根 正人,小倉 俊一郎,北口 哲也,門之園 哲哉
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11821号, Conferred date:2022/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース：	生命理工学	系	申請学位(専攻分野)：	博士	(工学)
Department of, Graduate major in	ライフエンジニアリング	コース	Academic Degree Requested	Doctor of	
学生氏名：	峯岸 美紗		指導教員(主)：	近藤 科江	
Student's Name			Academic Supervisor(main)		
			指導教員(副)：		
			Academic Supervisor(sub)		

要旨(和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

本論文は「新規解析手法を用いた転移微小環境での細胞間相互作用の解明」と題し、以下の 5 章より構成される。第 1 章「序論」では、がんを克服する上での大きな課題であり、未だ生物学的機構の全容が解明されていない転移において、転移先臓器内に形成される転移微小環境での正常細胞とがん細胞の相互作用を理解することの重要性について詳述した。転移形成の各段階においてがん細胞と相互作用する細胞の種類やその機能に加えて、悪性化を促す環境要因について、これまでに得られている知見を包括し、生体深部臓器にて低頻度になら観察されない細胞間相互作用の解析には先進的な解析技術が必要であることを述べた。そして、新規に開発した解析手法を用いて、マウス転移実験モデルの転移微小環境での細胞間相互作用機構を解明することを目的として述べた。

第 2 章「転移微小環境の多角的非侵襲発光イメージング」では、三種類の基質交差性を持たない発光酵素により細胞増殖、炎症応答、低酸素応答を多角的に観察する multi-bioluminescent reporter system (MRS) を用いて、転移巣形成の初期段階から微小環境中のがん細胞の応答を経時的・非侵襲的に観察することが可能であることを示した。研究室の先行研究で樹立された MRS を導入したヒト前立がん細胞 PC-3/MRS を尾動脈移植法により骨髄に送達することで、転移巣形成初期段階からのがん細胞の転移微小環境への応答反応を MRS の生体発光イメージングによって明らかにした。また、骨病変治療薬 zoledronic acid (ZA) を PC-3/MRS の骨転移モデルマウスへ投与した結果、腫瘍の縮小に伴い、がん細胞における炎症応答と低酸素応答が有意に低下することが分かった。培養細胞を用いた実験では、PC-3/MRS の増殖、炎症応答、低酸素応答に対する ZA の直接的な影響が見られなかったことから、骨転移モデルにおける ZA 投与による PC-3/MRS の応答変化は、破骨細胞の溶骨活性抑制によって骨髄微小環境が変化したこと起因するという機構が強く示唆された。以上の結果から、MRS は、がん細胞と破骨細胞の相互作用によって形成される転移微小環境に対する応答を、転移初期から解析可能にする有用な手法であることを示した。

第 3 章「がん細胞と相互作用した細胞を蛍光標識する技術の開発」では、転移微小環境においてがん細胞と相互作用した細胞を蛍光標識によって識別する遺伝子コード型細胞蛍光標識技術 secretory glycosylphosphatidylinositol anchored reconstitution-activated proteins highlight intercellular connections (sGRAPHIC) を開発した。分割型蛍光タンパク質の断片を細胞外に分泌することで近接する細胞を蛍光標識する sGRAPHIC における分泌様式と標識効率の関係性を、培養細胞を用いた実験から明らかにした。また、既存の近接細胞標識技術と比較して、sGRAPHIC の標識効率が高いことを示した。さらに、複数種類の正常細胞由来培養細胞株を使って sGRAPHIC の蛍光標識特性を評価することで、がん細胞に近接した細胞を選択的に蛍光標識可能であり、幅広い細胞種に適用可能な汎用的な技術であることを示した。これらの結果から、がん細胞と相互作用した多種多様な正常組織由来細胞を、sGRAPHIC は高効率に蛍光標識できる技術であることを示した。

第 4 章「肝転移したがん細胞と相互作用した細胞の sGRAPHIC を用いた解析」では、第 3 章で確立した sGRAPHIC をマウス肝転移モデルに適用して、肝転移した乳がん細胞に近接したへパトサイトの蛍光標識を評価するとともに、摘出した肝臓からへパトサイトを単離した。単離した蛍光標識シグナル陽性と陰性のへパトサイトの遺伝子発現プロファイルを、1 細胞トランスクリプトーム解析によって比較した結果、蛍光標識シグナル陽性のがん細胞に近接して相互作用したへパトサイトでは、肝機能の低下、細胞周期の進行や細胞極性の変化など、炎症環境下のへパトサイトに類似する遺伝子発現型を持つことが明らかになった。以上の結果から、sGRAPHIC と 1 細胞トランスクリプトーム解析を組み合わせることで、これまでにほとんど解析されてこなかった肝転移微小環境下のへパトサイトの特性を明らかにし、転移微小環境中の細胞間相互作用解析を実現する有用な手法であることを示した。

第 5 章「結語」では、第 2 章から第 4 章までで得られた主要な知見をまとめ、MRS と sGRAPHIC が、転移微小環境の環境要因や細胞間相互作用の解析において、非常に有用な技術であることを示し、本研究の総括とした。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース：生命理工学 系
Department of Graduate major in ライフエンジニアリング コース
学生氏名：峯岸 美紗
Student's Name

申請学位(専攻分野)：博士 (工学)
Academic Degree Requested Doctor of
指導教員(主)：近藤 科江
Academic Supervisor(main)
指導教員(副)：
Academic Supervisor(sub)

要旨(英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Metastasized cancer cells establish a unique microenvironment (metastatic microenvironment) through interactions with neighboring cells. These cell-cell interactions in the metastatic microenvironment hypothetically play pivotal roles in the efficient survival and growth of cancer cells. However, the mechanisms of the cell-cell interactions in the metastatic microenvironment remain elusive. In this study, I investigated cancer cell responses and cell-cell interactions in the metastatic microenvironment with newly developed optical analysis systems.

First, I observed responses of cancer cells in the metastatic microenvironment of murine models with multi-bioluminescent reporter system (MRS). MRS utilizes three luciferases that react with the substrate without cross-reactivity. Previously established prostate cancer cell line PC-3/MRS that stably carries MRS allows non-invasive and quantitative monitoring of cancer cell growth and activities of transcriptional factors that respond to inflammation and hypoxia. PC-3/MRS enables us to monitor the cancer cell responses to the microenvironment from the early stage of metastatic foci development. Furthermore, PC-3/MRS revealed that zoledronic acid (ZA) treatment suppressed inflammation and hypoxia responses in bone metastasized cancer cells. Since ZA treatment of cultured PC-3/MRS did not elicit these responses, these responses to ZA treatment *in vivo* would reflect the responses of cancer cells to the bone metastatic microenvironment, where ZA suppresses osteoclast activation followed by bone component release.

Next, I developed a new technique, secretory glycosylphosphatidylinositol anchored reconstitution-activated proteins highlight intercellular connections (*s*GRAPHIC), for fluorescently labeling cells adjacent to cancer cells with green fluorescent proteins. Co-culturing of cancer cells and various types of normal cells, both carrying *s*GRAPHIC reporter genes, revealed that *s*GRAPHIC selectively labeled the normal cells close to the cancer cells. In addition, *s*GRAPHIC has significantly higher labeling efficiency than an existing method. Therefore, I concluded that *s*GRAPHIC is capable of selectively and efficiently labeling cells that interact with cancer cells in the metastatic microenvironment.

Lastly, I analyzed cells interacting with cancer cells in the metastatic microenvironment with *s*GRAPHIC and single-cell transcriptomics. A breast cancer liver metastasis model was used to label hepatocytes near metastasized cancer cells with *s*GRAPHIC, and hepatocytes in the metastasized liver were analyzed by single-cell transcriptomics. I compared gene expression profiles between labeled and unlabeled hepatocytes, and successfully characterized hepatocytes in the liver metastatic microenvironment. These results indicate that combined analysis with *s*GRAPHIC and single-cell transcriptomics enables to investigate cell-cell interactions in the metastatic microenvironment.

Altogether, MRS and *s*GRAPHIC would be powerful approaches to fully understand the metastatic microenvironment, bringing new advances in the study of metastasis.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).