

乳がん患者由来オルガノイドの腫瘍内不均一性の
検討と，その背後にある分子生物学的特徴の探索

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

がん生命科学講座 がん治療外科学分野

佐伯 澄人

目次

I. 要約

II. 研究背景

III. 研究目的

IV. 研究方法

1. 臨床検体の回収と細胞処理
2. オルガノイド培養
3. シングルセルトランスクリプトーム解析 (scRNA-seq)
4. シングルセルエピゲノム解析 (scATAC-seq)
5. データ解析 (クラスタリング・NMF)
6. ROS アッセイ
7. RT-qPCR
8. サイトカインアレイ解析
9. PDO のパラフィン包埋と免疫組織化学染色

V. 研究結果

1. PDO 形態変化の観察 ～表現型の多様性と不均一性～
2. 乳がん PDO 株の樹立
3. scRNA-seq による遺伝子発現プロファイリング

4. 遺伝子発現プロファイリングによる全 PDO の細胞のクラスタリング
～腫瘍“間”不均一性の評価～
5. 遺伝子発現プロファイリングによる PDO ごとの細胞のクラスタリング
～腫瘍“内”不均一性の評価～
6. 異なる PDO で認める共通した遺伝子発現パターンの同定
～メタクラスタの定義と分類～
7. メタクラスタを特徴づける遺伝子発現パターンの機能的特徴の探索
8. PDO に共通するメタクラスタ遺伝子シグネチャーによる ITH の評価
9. オリジナル遺伝子シグネチャーによる分子生物学的特徴の解釈
10. 発現遺伝子群の背後にある生物学的特徴の探索
～遺伝子プログラムを構成する背景因子の導出～
11. IBCPDO における ITH の探索
～PDO155 を特徴づけるサイトカイン～
12. IBCPDO における機能的特徴の探索

VI. 考察

VII. 結論

VIII. 参考文献

IX. 図の説明

X. 図

XI. 表

XII. 謝辞

I. 要約

【背景と目的】乳がんでは、がん細胞の ITH (intratumoral heterogeneity; 腫瘍内不均一性) が、がん治療抵抗性や再発の原因となりうる。より良い治療法を開発するためには、ITH の背景にある分子機構とその機能的意義を理解する必要がある。近年、がん研究において PDO (patient derived organoid; 患者由来オルガノイド) が活用されるようになった。しかし、乳がん PDO における腫瘍内トランスクリプトーム不均一性を検討した報告はない。本研究では、乳がん PDO におけるトランスクリプトーム ITH を精細に記述し、その背後にある分子生物学的特徴を探索することを目的とした。

【方法】乳がん患者 10 名から PDO 株を樹立し、scRNA-seq 解析 (single cell transcriptome sequencing; 1 細胞トランスクリプトーム) を実施した。初めに全 PDO の腫瘍細胞に対し、Seurat パッケージを用いて、有意に発現する遺伝子によるクラスタリングをおこなった。次に、PDO 株ごとに腫瘍細胞のクラスタリングを行い、各クラスタで有意に高発現する遺伝子群 ClustGS (cluster gene signature; クラスタ遺伝子シグネチャー) を定義し、クラスタの特徴づけを行い、その組み合わせとして PDO の ITH を記述した。また、NMF (non-negative matrix factorization ;

非負値行列因子分解)により各 PDO における NMF 遺伝子プログラムを定義し、ITH の評価した。これらにより算出された PDO 株ごとの ITH が有する生物学的意義を探索するべく、scATAC-seq 解析 (single cell epigenome sequence ; 1 細胞エピゲノム解析)、サイトカインアレイ、ROS (reactive oxygen species ; 活性酸素) アッセイ、免疫組織化学染色を実施し細胞機能の評価を行った。

【結果】 scRNA-seq 解析により、全 PDO は 16 個のクラスタに分類され、腫瘍“間”不均一性が示された。続いて、PDO 株毎にクラスタ分類したところ各 3~6 個のクラスタに分類され、腫瘍“内”不均一性 (以後 ITH) を有することが示された。PDO10 株から合計 38 の ClustGS が同定され、その類似性を Jaccard index を用いて評価したところ、29 の ClustGS は細胞周期や EMT (epithelial mesenchymal transition ; 上皮間葉転換) 関連など、7 つの共通する meta-ClustGS に分類された。一方、9 つの ClustGS は互いに類似性を認めず、4 つの PDO 株にオリジナルであった。また、NMF を用いて同様の解析を実施したところ、PDO10 株から 55 の NMF 遺伝子プログラム GP (gene program ; 遺伝子プログラム) が同定され、Jaccard index から 6 個の共通する meta-GP と、PDO オリジナル GP に分けられた。さらに、特徴的臨床経過を示した PDO155 について、ITH 様式が有する生物学的意義の探索を試みた。PDO155 にオリジナルに見出される ClustGS と GP に共通する分子として *CHI3L1* と *CST3* を同定し、サイトカインで他の PDO と比して有意な検出を認めしたが、トランスクリプトーム及び、タンパク質発現において不均一な発現パ

ーンを認めた。また scATAC-seq 解析データと GP の相関を示す TF (transcription factor ; 転写因子) モチーフを探索し, アミノ代謝に関わる *SLC7A5*, *SLC38A1* と *CEBPB*, *CEBPD* の関連が示唆された。これらが標的とする炎症関連分子として *PTGS2* (COX2) が PDO155 特異的に上昇していることを確認した。

【結論】 乳がん PDO におけるトランスクリプトーム ITH の存在を初めて報告した。

いくつかの細胞機能は複数の PDO 株で共通して観察されたが, 一部の細胞機能は単一の PDO 株のみに特有であった。ITH パターンを詳細に記述することで, 乳がんの PDO の生物学的特徴を明らかにした。

II. 研究背景

乳がんは腫瘍ごとに増殖能, 転移能, 治療反応性などの生物学的特性が大きく異なる heterogeneous な疾患群である¹⁾。ER (estrogen receptor ; エストロゲン受容体)・PgR (progesterone receptor ; プロゲステロン受容体) 陽性乳がん, HER2 (human epithelial receptor type 2; ヒト上皮成長因子受容体 2 型) 陽性乳がん, TN (triple negative; トリプルネガティブ) 乳がんといった同じサブタイプに分類される症例であっても, 悪性度や治療反応性の程度は症例ごとに様々である²⁾。このような乳がんの多様性の生物学的背景を理解するために, これまで膨大なデータベースを用いた網羅的ゲノム解析や, 臨床病理学的検討など, 様々な観点から予後の悪い乳がんを層別化する試みがなされてきた³⁻⁵⁾。こうした中, 腫瘍内のがん細胞の不均一

性が、がんの治療抵抗性や再発の少なくとも一部に重要な役割を果たすという証拠が蓄積されつつある⁶⁾。例として、免疫組織化学染色による ER 遺伝子発現の ITH (intratumoral heterogeneity; 腫瘍内不均一性) 腫瘍内不均一性が強いほど予後が悪いこと⁷⁾、HER2 遺伝子の増幅および発現の ITH は治療反応性の低下を予測する指標となること⁸⁾、エピジェネティックな不均一性が乳がん患者の内分泌抵抗性と予後不良につながる可能性があること⁹⁾、がんゲノムアトラス (TCGA) のデータ解析により、コピー数異常の ITH が多い症例は予後不良であること¹⁰⁾ などが報告されている。このような ITH とその悪性度の関係性はタンパク質、トランスクリプトーム、エピゲノム、ゲノム等のあらゆる階層で確認され、その分子機構とその機能的意義を多面的に評価し、より良い治療戦略を構築することが必要である。一方で、実際の臨床に近い状態 (患者の体中における腫瘍の状態) で ITH の全体像をとらえることは極めて困難である。その原因として、腫瘍細胞は正常上皮細胞のみならず、線維芽細胞などの間質細胞やリンパ球等の免疫細胞と混在し、微小環境内で相互作用をもたらしていること¹¹⁾、また、乳がんがその発生段階や、様々な治療介入を経る過程で、構成する細胞集団は生物学的に様々な特徴を持つ細胞集団に系統分化し、場合によって耐性獲得をした細胞集団が選択されて生き残るなど、時間軸をもって変化するキャンサーエヴォリューションという概念^{12, 13)} などがあげられる。したがって、ITH の解析には適した実験モデルが必要となる。

近年、がん研究において、PDX (patient derived xenograft; 患者由来異種移植片) に代わり、3次元オルガノイド培養技術が盛んに利用されるようになってきた¹⁴⁻¹⁶⁾。

オルガノイド培養は様々な正常組織や腫瘍組織における組織の形態や機能、多様性を維持したままインビトロでの培養を可能とする技術基盤である。一定の培養条件により、腫瘍細胞が濃縮されるという特徴があり (図 1)、腫瘍細胞の特徴を、その表現型や機能の面からとらえるうえで適切なモデルである。オルガノイド培養技術は腫瘍細胞の機能評価、例として、薬剤反応性試験 (図 2 A) や CRISPR-Cas9 や RNAi 等の遺伝子操作による細胞の機能評価を可能とするだけでなく、限られたサンプルから腫瘍細胞を選択的に増やすことで、その特徴をより詳細に記述し、臨床に多くの情報を還元できる可能性も秘めている (図 2 B)。また、PDO (patient derived organoid; 患者由来オルガノイド) 培養は、PDX に比べて操作が簡単で短時間で解析が可能であり、患者の腫瘍由来の組織構造や生物学的特徴を一定程度保持していると考えられ^{17, 18)}、がん細胞の腫瘍内不均一性も維持されているものと考えられる。膵がんや大腸がん、肺がん、脳腫瘍などの一部のがん種では、腫瘍内不均一性の観点から PDO 株を解析した報告がいくつかある¹⁹⁻²²⁾、乳がん PDO における ITH の報告は、他がん腫と比してその培養技術の難しさのため、ゲノム及び一部の限られたマーカータンパク質に限られており^{11, 17)}、より精細な解析が必要と考えられる。乳がんを中心とする多くのがん腫では、転移をもたらす予後の悪いタイプが治療課題となる。個々の症例に応じてその形態学的特徴や増殖能力のみならず、微

小環境への影響や、転移を誘発する機能評価が必須であり、これら进行评估するためには、ゲノム情報や特定のタンパク質発現のみでは不十分であり、エピゲノム制御や、トランスクリプトーム発現を含めた生物学的意義の理解が重要である。

私は 2018 年からがん研有明病院乳腺センターに所属し、翌 2019 年からは、がん研究所がんエピゲノムプロジェクト研究生としてがん研有明病院と、がん研究所の連携に中心的役割を担ってきた。立ち上げ時より、がん研有明病院乳腺センターと協力し膨大な数のバンキング・細胞処理・PDO 株樹立・各種解析に取り組んでいる

(図 3)。当初は、検体回収のみならず、細胞処理の条件設定、オルガノイド培養の技術習得など、自ら中心となって試行錯誤を重ね、適切な条件設定を見出してきた。

また、2020 年にがん研究所とがん研有明病院が一体となってリバーズ TR (translational research; トランスレーショナルリサーチ) 研究を推進する「場」として『NEXT-Ganken プログラム』が立ち上げられ、症例の選択や検体の処理からオルガノイド培養やシングルセルオミックス解析までシームレスに効率よく実施できる体制が構築されてきた (図 4)。この過程において、多くのメンバーと綿密な連携を結び、これまで培ってきた技術基盤を共有し、よりよい培養条件を検討することで、これまで、301 例の乳がん患者検体 (原発巣 289 例、リンパ節 4 例、胸水検体 7 例、腹水検体 1 例) を回収し、Hans Clevers のプロトコール¹⁷⁾を参考に 150 例で PDO 作成を試み、一定の増殖を確認した 60 例の PDO 株をストックした (図 4)。

当初は安定しなかった検体処理・培養技術が徐々に安定し、次第に解析する上で十

分な細胞数を確保できる PDO 株を樹立するに至った。また、各 PDO の成長過程の観察を続け、PDO ごとに特徴的な構造変化、表現型の可塑性を確認した。

こうした中で、私は極めて増殖能力の高い IBC (inflammatory breast cancer; 炎症性乳がん) の PDO の樹立に成功した (図 5A)。この症例は、診断時ホルモン受容体弱陽性 (ER0+0, PgR2+2)²³⁾、HER2(1+)、Ki-67 95%であり、TN 乳がんに合わせて術前化学療法 (アンスラサイクリン系、タキサン系) が施行された。しかし、治療効果判定はグレード 0 で、術後病理の免疫組織化学染色では、ホルモン受容体陰性、HER2 陽性となり、HER2 は腫瘍内での不均一な発現パターン呈した (図 5C)。

IBC は、真皮のリンパ管腔内の腫瘍細胞の塊で構成されるリンパ管腫瘍塞栓を伴い、急激で広範な皮膚発赤を伴い、特徴的な臨床像 (図 5B) を呈する疾患群として臨床的 TNM 分類で T4d として定義される²⁴⁾。全乳がんの約 2 ~ 4% を占めるまれで進行性の高い疾患で、発生率が低いにもかかわらず、欧米における乳がん関連死亡率の 7 ~ 10% を占めるとされ予後の悪い乳がんとして、これまで国際的に大規模な研究がなされているにもかかわらず、生物学的メカニズムの解明や新たな治療戦略につながる特定の分子プロファイリングに至っていない²⁾。今回樹立した IBCPDO は、他の PDO でも認めるスフェロイド構造の他、高い密度を保ちつつ膨脹する構造体を伴い、不均一な表現型を示した。PDO によっては、均一なスフェロイド構造のみで構成されるもの、特徴的な構造 (シート様構造、ブドウの房状構造、線維芽細

胞様構造) を呈する細胞集団を伴うものなど、それぞれに多彩な増殖パターンを示す傾向があり、乳がん PDO においても ITH が維持されている可能性が示唆される。

現在のところ、乳がん PDO においてトランスクリプトームの ITH を詳細に報告した例はない。その原因としては、他のがん腫と比較して乳がん PDO の安定培養が難しいこと、長期培養によりエストロゲン受容体の発現が低下することが知られている他、複数の PDO をまとめて scRNA-seq をしてクラスタリングすると、細胞機能よりも、ホルモン受容体や HER2 受容体の発現などのバイオマーカーやコピーナンバー異常 (Copy Number Variation)、実験条件の差 (バッチイフェクト) が強く影響し、転移能や、免疫応答などの詳細な生物学的機能を探索が困難であることが挙げられる。

私たちはこれまで、乳がん患者検体のシングルセルエピゲノム解析 (scATAC-seq) をとおして、クロマチンアクセシビリティを評価し、マーカー遺伝子の推定発現量から細胞腫の分類と腫瘍間、腫瘍内の不均一性を描出する研究を行い海外の学術誌に投稿をしてきた⁹⁾。しかし、患者組織由来の PDO が実際の患者組織の生物学的特徴、細胞状態を維持し、不均一な機能発現パターンを有しているのかについては明らかでなかった。

本研究では、新たな試みとして、PDO ごとにシングルセルトランスクリプトーム解析 (scRNA-seq) を行い、2つの異なる解析手法によって乳がん PDO が細胞状態や機能の異なる複数の細胞クラスターで構成されていることを明らかにした。それぞ

れの細胞状態，機能を規定する遺伝子群にどのような生物学的特徴を見出せるか検討を行い，細胞内トランスクリプトーム ITH の評価が PDO の特徴づけに有用であることを示した。

III. 研究目的

本研究では乳がん PDO における腫瘍内トランスクリプトーム不均一性を明らかにし，その背後にある分子生物学的特徴を探索することを目的とした。

IV. 研究方法

1. 臨床検体の回収と細胞処理

乳がん検体は，手術で摘出された腫瘍または胸腔穿刺液から採取された。参加者へ検体採取前に文書によるインフォームドコンセントを行った。プロトコールは，日本がん研究振興財団がん研有明病院の施設倫理委員会の承認を得た (No.2018-1168)。手術標本については，摘出後の腫瘍部位にコアニードルを数回ファイヤーした。胸水標本については，トロッカー留置後にドレナージ液を採取した (図 6)。手術標本は，MACS Tumor Dissociation Kit と gentle MACS dissociator (Miltenyi Biotec, North Rhine-Westphalia, Germany) を用いて，製造元のプロトコールに従ってシングルセルに解離させた。胸水検体を 4°C，500g で 5 分間遠心分離して上清を除去し，ペレットを Red Blood Cell Lysis Solution lysis buffer (Miltenyl Biotec) で静

かにピペッティングした。4°Cで10分間インキュベートした後、検体を500gで4°C、5分間遠心分離した。この工程を2回繰り返す、細胞を精製した。

2. オルガノイド培養

Hans Clevers のプロトコール¹⁷⁾を参考に、上記の細胞からオルガノイドを樹立した。細胞ペレットをBMEゲル(R&D Systems, 3533-010-02)に4°Cで再懸濁し、24wellまたは48well MICROPLATE (IWAKI, 1830-024/1830-048)にドーム状に播種し、37°Cで10~20分間重合させ、500ml/50 μ l BMEの割合で以下の培地を添加した(図6)。Advanced DMEM/F12 (Gibco, 12634-010), 1X Glutamax 100X (Gibco, 35050-061), 10mM HEPES solution 1M (SIGMA, H3537), 1X Penicillin/Streptomycin X100 (Wako, 168-23191)を混合して AdDF+++培地を調製した。AdDF+++に、1X B27 supplement (50X) (Gibco, 17504044), 5mM Nicotinamide (Sigma, N0636), 250ng/mL R-Spondin 3 (R&D, 3500-RS/CF), 1の因子を加えオルガノイド培養液を調製した。25mM NAC (Sigma, A9165), 100ng/mL Noggin (Peprotech, 120-10C), 20ng/mL FGF10 (Peprotech, 100-26), 5ng/mL FGF7 (Peprotech, 100-19), 5ng/mL EGF (Peprotech, AF-100-15) 50 μ g/mL Primocin (Invitrogen, ant-pm-1), 5nM Neuregulin1 (Peprotech, 100-03), 5 μ M Y-2632 (Abmole, M1817), 500nM A83-01 (Tocris, 2939) and 500nM SB202190 (Sigma, S7067)を加えた。培地は必要量をその都度調製し、2週間以内に使い切った。オルガノイドは、5% (v/v) CO₂中、37°Cで加湿して培養した。培地は3-4日おきに交換

し、PDO は成長に応じて継代した。継代時に上清を捨て、ゲルとオルガノイドを Cultrex Organoid Harvesting Solution (Trevigen, 3700-100-01) でピペティングし、4°Cで1時間、転倒混和した。4°C, 500g で5分間遠心してペレット化したオルガノイドを分離・回収し、0.25w/v% Trypsin-1mM EDTA・4Na Solution with Phenol Red (FUJIFILM, 209-16941) を加えて37°Cで3-8分間インキュベーションを行った。インキュベーション時間は、分離効率や目的に応じて調整した。通常の継代時の断片状態と、正確な細胞数を数えるための単細胞に分離した。トリプシンをFBS入り培地で不活性化し、4°C, 500g, 5分間遠心分離し、上清を捨て、細胞ペレットを前述のように撒いた。継代時の余剰細胞は20,000cells/vial単位で-80°Cにて凍結し、後日 scRNA-seq のサンプルとして使用した。各 PDO について、培養顕微鏡 (OLYMPUS CKX53) を用いて4倍の対物レンズで2~4日ごとに定点観測を行った。

3. シングルセルトランスクリプトーム解析 (scRNA-seq)

オルガノイドは、Harvesting solution と Trypsin を用いてシングルセル懸濁液に分離し、細胞を凍結保存した。scRNA-seq ライブラリーは、BD Rhapsody™ Single-Cell Analysis system (BD, New Jersey, USA) を用いて製造元のプロトコールに従って作成された。まず、凍結保存した細胞を解凍し、細胞を BD Single-Cell Multiplexing Kit で標識した。標識細胞を洗浄、プールし、BD Rhapsody マイクロウェルカートリッジにロードし、BD Rhapsody™ Whole Transcriptome Analysis Amplification Kit で

細胞を溶解し， mRNA をビーズで捕捉して cDNA を合成した．得られた遺伝子発現ライブラリーおよび細胞ラベルライブラリーは， Illumina NextSeq 550 プラットフォーム（Illumina, California, USA）でペアエンドリード（read1, 75bp; index1 8bp; read2 75bp）により配列決定された．シーケンスデータは， BD Rhapsody と BD Precise ASSAYS の Web ベースの解析パイプライン（<https://www.sevenbridges.com/bdgenomics/>）を利用し， カウントマトリクス（遺伝子発現数マトリクス）に変換した（**図 7A**）．

4. シングルセルエピゲノム解析（scATAC-seq）

PDO 株の scATAC-seq は scRNA-seq を施行した 10PDO のうち， PDO210 を除く 9 株に対し施行した． scRNA-seq と場合と同じ条件で処理した凍結保存済みの PDO 株を使用し， SureCell® ATAC-Seq Library Preparation Kit（BIO-LAD, Tokyo, Japan）を用いて製造元のプロトコールに従って scATAC-seq ライブラリーを作成した．得られたライブラリーおよび細胞ラベルライブラリーは， Illumina NextSeq 550 プラットフォーム（Illumina, California, USA）でペアエンドリード（read1, 75bp; index1 8bp; read2 75bp）により配列決定した．シーケンスデータは， ArchR²⁵⁾ のパッケージを用いて処理し， 細胞をクラスタリングし， 細胞ごとの TF（transcription factor；転写因子）のモチーフスコアを算出した．

5. データ解析（クラスタリング・NMF）

scRNA-seq により得られたカウントマトリクスは Seurat²⁶⁾ や下流解析に使用した。RSEC (recursive substitution error correction) のカウントは、入力カウントマトリクスとして使用された。ミトコンドリア RNA が 40%以上、かつ 400 未満または 9000 を超える特徴を持つ低品質の細胞は、フィルタリングにより除外した。細胞やサンプル間のミスアサインメントを避けるため、Seurat の標準フローを用いて各 PDO の事前クラスタリングを行い、主要なクラスタから離れた Embedding や、他のサンプルからのコンタミの可能性のある各サンプルタグの異なる分布を示すクラスタを手動で削除した。各 PDO の高品質な scRNA-seq データについて、転写産物カウントマトリクスを細胞の総カウント数で正規化し、10,000 のスケールリングファクターを掛けた。正規化された値は、その後 Seurat の “NormalizeData()” で自然対数変換され、“ScaleData()” で線形変換が適用された。主成分分析 (PCA) は、“FindVariableFeatures()” で特定された上位 2000 個の変数特徴を “RunPCA()” で行い、vst 選択法を用いて行った。上位 20 個の特徴量のうち、半分以上がリボソームタンパク質遺伝子を含む主成分 (PC) は除外した。次に、上位 20 個の PC と分解能 0.4 で、“FindNeighbors()” と “FindClusters()” を用いて Seurat の標準クラスタリング処理を行った。データを可視化するために、“RunUMAP()” を同じ PC で使用し、クラスタを特定した。各 PDO のクラスタリング後、only.pos = TRUE, min.pct = 0.25, logfc.threshold = 0 とした “FindAllMarkers()” 関数により、クラスタ特異的遺伝子発現シグネチャー (ClustGS) として差次的発現遺伝子を同定した。ミトコンドリア

RNA やリボソームタンパク質の遺伝子は除外し、修正 P 値が 0.05 未満の遺伝子を選択した。各 PDO の各クラスタにおいて上位 25 個の有意な遺伝子を ClustGS として選択した。25 個未満の有意な遺伝子（修正 P 値 < 0.05）を持つクラスタは、さらなる解析の対象とはしなかった。少なくとも 2 つの ClustGS に含まれるすべての遺伝子をメタクラスタ特異的遺伝子（meta-ClustGS）、その遺伝子シグネチャーで規定されるクラスタをメタクラスタと定義した。メタクラスタを導出のため、ClustGS の類似度を Jaccard 類似度指数で評価し、階層型クラスタリングガイドによって同定した。各 ClustGS の遺伝子エンリッチメント解析は、ClusterProfiler v3.18.1²⁷⁾ の "enrichr()" 関数を用いて、msigdb の msigdb (species = "Homo sapiens", category = "H") で得られた MsigDB Hallmark 遺伝子で実施した。修正 P 値として FDR(False Discovery Rate)を用いた。全 PDO における DEG (differential expression gene;発現変動遺伝子) をとり、各遺伝子の P 値、log2FC を算出した。正規化データを因子に分解するために、非負行列因子分解 (NMF) を行った。NMF 解析は SingleCellExperiment と NMF のパッケージを使用した。NMF により導出された遺伝子群は GP (Gene Program;遺伝子プログラム) とし、Jaccard 類似度指数で評価し、階層型クラスタリングガイドによって同定した類似度の高い GP 同士を meta-GP と定義した (図 7B)。

NMF によりえられた GP に含まれる遺伝子が共通の TF によって制御されているのではと考え (図 8A)、NMF の特定 GP と相関する TF を相関係数 $r > 0.2$ を基準と

して導出した (図 8B). 解析対象とした 870 の転写因子のうち, 注目した PDO155 に特異的な活性のある転写因子を導出した (図 8C).

6. ROS アッセイ

トータル ROS 検出キット (富士フィルム和光純薬, 340-09811) を使用し製造元のプロトコールに従って検出した. 細胞数は 125cell/ μ l に合わせ, 3D ゲルで希釈, 重合し 8ul (各 well 1000 細胞) ずつに分け, triplicate とし, 48 時間 5% (v/v) CO₂ 中, 37°C で加湿して培養をへて実験に使用した.

7. RT-qPCR

PCR 法を用いて, *CHI3L1*, *CST3*, *SLC7A5*, *CEBPA*, *CEBPB*, *CEBPD*, *PTGS2* のコーディング領域を増幅した. プライマー配列を示す.

CHI3L1 forward, 5' - AGCCAGAATGGGTGTGAAGG -3'
reverse, 5' - TCAGGTTGGGGTTCCTGTTC-3'.

CST3 forward, 5' - CCCGCAAGCAGATCGTAGC -3'
reverse, 5' - GTCCAGGGGTGGGAATACAG-3'.

SLC7A5 forward, 5' - TGTACGTGCTGACCAACCTG -3'
reverse, 5' - ATGACGCCAGGTGATAGTTC -3'.

CEBPA forward, 5' - GCAAACCTCACCGCTCCAATG -3'
reverse, 5' - CTTCTCTCATGGGGGTCTGC-3'.

CEBPB forward, 5' - TCGCAGGTCAAGAGCAAGG -3'

reverse, 5´ - TACTCGTCGCTGTGCTTGTC -3´.

CEBPD forward, 5´ - CTGTCGGCTGAGAACGAGAA -3´

reverse, 5´ - TCTTTGCGCTCCTATGTCCC-3´.

PTGS2 forward, 5´ - AGGGTTGCTGGTGGTAGGAATGTT -3´

reverse, 5´ - ATCTGCCTGCTCTGGTCAATGGAA -3´.

8. サイトカインアレイ解析

サイトカインアレイは、Proteome Profiler™ Array Human XL Cytokine Array Kit (R&D Systems, Catalog No. ARY022B) を用い、製造元のプロトコールに沿って実施した。事前に安定して増殖を示す4つのオルガノイド (PDO 155, 165, 166, 180) の培養上清を培地交換後 72 時間で回収した。同時に、ゲル中のオルガノイド RNA を RNeasy® Micro Kit (50) (QIAGEN Cat.no. 74004) で抽出し、発現 RNA 量を定量した。PDO ごとに使用する試料の量は、各 RNA 量の逆比で補正した。蛍光色素の検出には Odyssey® XF Imaging System (LI-COR, MODEL: 2800) を用い、検出波長を 685nm、露光時間を 10 分に設定した。アレイの各因子に対応するシグナルは、ImageJ ソフトウェア (<https://imagej.nih.gov/ij/>) による解析で定量した。アレイ中の各タンパク質の発現量は、ポジティブコントロールで得られた値との相対値で算出した。得られた値を Excel カラースケールで可視化し、PDO155 で検出されたサイトカインの降順にソートした。PDO155 で検出されなかった、あるいは検出レベ

ルの低いサイトカインは，PDO155 と対照的な検出パターンを示した PDO165, 180 で強く検出された遺伝子の降順にソートした。

9. PDO のパラフィン包埋と免疫組織化学染色

選択したプレートから培地を除去した。PDO を PBS で 3 回洗浄し，オルガノイド固定用バッファー（4% Paraformaldehyde in 0.1M Phosphate Buffer）を加えて 30 分固定した。フィックスバッファーを除去した後，PDO を PBS で 3 回洗浄し，余分な 4% PFA バッファーを除去した。同時にヒストゲル検体処理ゲル（HG-4000-012, Thermo Scientific）を 65°C のヒートブロックで溶かした。HE（Hematoxylin-Eosin）で標識した PDO を 24 ウェルプレートからセルリフターで取り出し，あらかじめ準備した 150 μ l ヒストゲルを入りの 10×10×5 mm のクライオモールドに入れ，クライオモールドのマトリゲルの上に 150 μ l ヒストゲル（65°C の熱ブロックから）を加え，サンドイッチを形成させた。ヒストゲルブロックを組織カセットに移し，組織カセットを 10%ホルマリンに 2 時間浸漬し，カセットを 70%エタノールに移し，24 時間保管した。固定とパラフィン包埋は Tissue-Tec® VIP™（SAKURA）を用いて行った。パラフィン包埋した PDO を 4 μ m のスライドに切り出し，HE 染色 と免疫染色を行った。染色は，ホルマリン固定したパラフィン包埋 PDO の 4 μ m 厚の切片に対して行った。切片は脱脂し，熱媒介抗原賦活法を用いて免疫反応部位を露出させた。その際，沸騰した 0.01M クエン酸緩衝液（pH6.0）中にスライドを入れ，10 分間保持した。切片が冷えた後，内因性ペルオキシダーゼ活性をメタノールと過酸化

水素を用いて 30 分間阻害した。十分に洗浄して、残りの免疫組織化学的染色は、標準的なペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン-ビオチン複合体法を用いて実施した。シスタチン C (CST3) はウサギモノクローナル抗体 (EPR4413) Abcam (ab109508) (1 : 500), YKL-40 (Cell Signaling) はウサギモノクローナル抗体 (E2L1M) (1 : 400), LAT1 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) はマウスモノクローナル抗体 (D-10) (sc-374232) (1 : 200) を使用した。ペルオキシダーゼ活性のある部位は、EnVision™+ Dual Link System-HRP (K406311-2, Agilent) を用いて検出し、褐色の反応産物を検出した。なお、患者組織 (手術検体) については、がん研究会有明病院病理部にて染色を依頼し、シスタチン C (CST3) はウサギモノクローナル抗体 (EPR4413) Abcam (ab109508) (1 : 4000), YKL-40 (Cell Signaling) はウサギモノクローナル抗体 (E2L1M) (1 : 500) の条件で染色された。

V. 研究結果

1. PDO 形態変化の観察 ～表現型の多様性と不均一性～

オルガノイドの形態は PDO によって不均一であった。スフェロイドはすべての PDO で共通して見られたが、一部の PDO では異なる形状のオルガノイドの集団が混在していた。例えば、PDO155 は、スフェロイドとは別に、高密度での膨張を続ける構造を認め、2 つの異なる細胞集団から構成されていた。PDO154, 165, 180 は、スフェロイドの周りにシート状の構造体を形成し、各スフェロイドを引きよせながら、数日ごとに立体的な位置を変えているように観察された。PDO207P は、ブドウの房様の構造を形成していた。PDO166, 195, 202, 203, 210 は均質なスフェロイドを形成していた (図 9A)。このように、オルガノイドの成長と形態には腫瘍間および腫瘍内の不均一性が認められ、これは元の腫瘍の生物学的特性を反映しているものと思われた。

2. 乳がん PDO 株の樹立

一定期間にストックした PDO 株のうち、数 10 万細胞以上の解析に必要な細胞数を確保でき、安定培養・複数回の継代が可能で、各種実験系に使用できる PDO 株として 10 個を解析対象として選択した (図 9BC)。それぞれの臨床病理学的特徴を示す (表 1)。8 株は原発性乳がん、1 株 (PDO 210) は乳房全摘術後の胸壁の局所再発、1 株 (PDO 207P) は胸水を伴う肺転移由来の PDO であった。また、原発性乳がん PDO8 株のうち 1 つ PDO155 の症例は術後すぐに転移を起こした。増殖能の

高い腫瘍は PDO 株を樹立しやすい傾向があり，核グレード 3，Ki67>20%を示す症例が 5 例含まれた．オルガノイドの増殖速度は PDO 株によって異なっていた．PDO155，166，207P は最も増殖速度が速く，倍加時間は約 7 日であり，これは 10 回継代しても継続した．PDO165 と 180 は上記 3 株より成長が遅く，倍加時間は約 14 日であった．その他はより緩徐に成長した．

3. scRNA-seq による遺伝子発現プロファイリング

BD Rhapsody Single-Cell Analysis System を用い，10 個の PDO 株を対象に scRNA-seq のシングルセルトランスクリプトーム解析を実施した．割り当てと品質フィルタリングの後，9,548 個の細胞の高品質発現プロファイルを得た．これは，細胞あたり平均 6,635 カウントと 2,203 個の遺伝子であった．

4. 遺伝子発現プロファイリングによる全 PDO 株の細胞クラスタリング ～腫瘍“間”不均一性の評価～

全細胞は UMAP 上の 16 個のクラスタに分類された (図 10A)．各クラスタはいくつかの PDO によって構成されるもの，単一の PDO によって構成されるものなどいくつかのパターンを認めた (図 10AB)．各 PDO を構成するクラスタの割合に着目すると，PDO155 は C2 と C7 で 90%以上が構成され，C2，C7 は PDO155 のみで構成された．C3 は PDO166，180，195，202 を中心に構成されている．PDO210 は 98%が C11 で構成され，その他のクラスタにはほぼ認めなかった．この様に，PDO では腫瘍“間”不均一性が存在することがわかった．続いて，それぞれの細胞の発現

上位遺伝子 50 位に着目し、各クラスターの DEG を Heatmap として示した。PDO155 によって構成される Cluster2 (C2) と Cluster7 (C7) は他の Cluster と独立して近接し、C2 と C7 では発現上位となる遺伝子リストに共通のものと、独自に認めるものがあった (図 10C)。COX6C, PPP1R1B はいずれのクラスターにも存在する一方で、CHI3L1, CST3 は C2 で優位に、SLC7A5 は C7 でのみ認められ、異なる状態の細胞 PDO155 内の腫瘍“内”不均一性の存在が示唆された (図 10D, 表 2)。その他にも同一 PDO からいくつかのクラスターにまたいで分類されるものもあったが、すべての PDO について腫瘍“内”不均一性が存在するかははっきりしなかった。

5. 遺伝子発現プロファイリングによる PDO ごとの細胞のクラスタリング ～ 腫瘍内不均一性の評価～

全 PDO を混ぜて細胞をクラスタリングし、少なくとも腫瘍“間”不均一性は示された。このような不均一な発現パターンがそれぞれの PDO ごとに認められるか、すなわち各 PDO に腫瘍“内”不均一性 (以後 ITH と表記) が認められるかを検討した。scRNA-seq 解析において、がん細胞は患者サンプルごとにクラスタ化する傾向があることが報告されている²⁸⁻³¹⁾。各 PDO における ITH を明らかにするため、以下のような解析アプローチを開発した。(1) PDO ごとに細胞をクラスタリングし、(2) クラスタ特異的な発現遺伝子を同定し、(3) 類似性を計算し、クラスタを分類する (図 7B)。Seurat の標準的な解析フローにより、細胞は PDO ごとに 3~6 クラスタに分類された (PDO180, PDO195, PDO202 では 3 クラスタ, PDO210 では 6 クラス

タ) (図 11AB). そこで, 各 PDO 内の各クラスタで特異的に発現している遺伝子群を同定し, 最も有意に高発現している 25 個の遺伝子をクラスタ特異的遺伝子シグネチャー (ClustGS) と定義した. 同定された有意な遺伝子 (調整済み P 値<0.05) が 25 未満のクラスタは, さらなる解析の対象とはしなかった. その結果, 各 PDO は少なくとも 1 つの ClustGS で特徴づけられるクラスタで構成され, 合計 38 の ClustGS によって規定されるクラスタが同定された (図 11B).

例として PDO165 には 4 つのクラスタが存在した (図 11C). それぞれのクラスタを特徴づける ClustGS は 4 つ (165-ClustGS1, 2, 3, 4) あり, 165-ClustGS 1 には luminal-lineage TF (*FOXA1*, *GATA3*), 165-ClustGS 2 には *TGFB2* と *DKK1*, 165-ClustGS 3 には細胞周期関連遺伝子 (*CDK1*, *MKI67*), 165-ClustGS 4 には basal keratins (*KRT5*, *KRT14*) などがあつた (図 11DE, 表 3). このように, 各 PDO は, 細胞周期, エストロゲン応答, EMT 様遺伝子発現プログラムなど, 異なる細胞状態および細胞系統を持つ複数のサブポピュレーションから構成されていることが示唆された.

6. 異なる PDO で認める共通した遺伝子発現パターンの同定 ~メタクラスタの定義と分類~

各 PDO がクラスタ化される際に, どのような遺伝子発現パターンにおいて分類され, そこにどのような分子生物学的特徴のある遺伝子が含まれているのかを明らかにするため, 各クラスタの合計 38 個の ClustGS について Jaccard 類似度指数を計算

し、階層的クラスタリングガイドで分類した (図 12A). 異なる PDO のクラスタを規定する ClustGS であっても、含まれる遺伝子に共通するものが多い場合、細胞共通の機能を表現している可能性があると考え、少なくとも 2 つ以上の PDO において重複する遺伝子を含む ClustGS (meta-ClustGS) によって規定されるクラスタの集団をメタクラスタとして定義した (図 12B, 表 4). その結果 7 つの meta-ClustGS が同定され、それぞれが、異なる PDO であっても同じ細胞機能によって特徴づけられる細胞クラスタであることが示唆された (図 12A).

7. メタクラスタを特徴づける遺伝子発現パターンの機能的特徴の探索

MsigDB Hallmark 遺伝子セットを用いた meta-ClustGS の遺伝子濃縮解析では、meta-ClustGS 1-2 は細胞周期、特に meta-ClustGS 1 は G2/M チェックポイント、meta-ClustGS 2 は E2F, G1/S チェックポイントに関連し、meta-ClustGS 3, 4, 6 は EMT (6 は脂肪酸代謝も)、meta-ClustGS 5, 7 はエストロゲン反応と関連すると考えられた (図 12BC). meta-ClustGS 3, 4, 6 にはすべて EMT 関連遺伝子が含まれていたが、それぞれの遺伝子シグネチャーは異なっていた. meta-ClustGS 3 には基底細胞マーカーサイトケラチン (*KRT5*, *KRT14*), meta-ClustGS 4 には間葉系マーカー *ACTA2*, meta-ClustGS 6 には転移関連遺伝子 *ANXA1* が含まれていた. また、エストロゲン反応に関連する meta-ClustGS 5 には Luminal 特異的 TF である *FOXA1* と *GATA3*, meta-ClustGS 7 には *CCND1* が含まれた (表 4). これらの結果から、

各 PDO には PDO 間で共通する遺伝子発現プログラムで制御されるいくつかの細胞集団が存在することが示唆された。

8. PDO に共通するメタクラスタ遺伝子シグネチャーによる ITH の評価

続いて、メタクラスタを用いて各 PDO の特徴を調べた。G2/M 期に関連する meta-ClustGS 1 は、10 個の PDO のうち 7 個に存在し (図 12AD, 13AB, 14A), これらの細胞集団が PDO に共通して存在することが示された。興味深いことに、ER+/HER2- または ER-/HER2+ 腫瘍の患者由来の 4 つのオルガノイド (PDO155, PDO165, PDO166, PDO180) で基底マーカーを含む meta-ClustGS 3 (EMT1) が観察され、これらの PDO は基底様細胞と Luminal 細胞または HER2+ 細胞が共存する異なる ITH であることを示唆していた (図 12D, 13CD, 14C)。なお、PDO155, 166 は meta-Clust3 (EMT1) により特徴づけられるクラスタは少数であり、かつ不均一であり (図 13C), 発現平均値としては低くなっている (図 13D)。一方 PDO166 のように、meta-Clust3 (EMT1) の発現分布が二相性に分かれ、高発現なクラスタが多数を占めることで不均一性のパターンが示されることも示された (図 13CD)。ER+ 腫瘍に由来する 2 つの PDO (PDO195 および PDO202) のほとんどの細胞が EMT 関連 meta-ClustGS 3 を発現しており、これらの PDO の特性がオルガノイド培養で変化したか、これらの PDO が腫瘍隣接部の基底上皮細胞に由来することを示唆している (図 13CD)。また、ER+ 腫瘍由来の PDO154, PDO203, PDO207P, PDO210 では、全体としてエストロゲン応答関連 meta-ClustGS 5 の高

発現を認めた (図 13EF, 14B). ER-/HER2+ 腫瘍に由来する PDO155 と PDO166 では, meta-ClustGS 5 を発現する細胞のクラスタが観察され, 少数の細胞が, バルク評価, すなわち免疫組織化学では検出されないが, シングルセルの分解能では観察可能な Luminal マーカーまたは ER 標的遺伝子を発現することを示唆している (図 12D, 13E). もう一つのエストロゲン反応関連メタクラスタである meta-ClustGS 7 は, PDO154, PDO207P, PDO210 で観察され, ER+/HER2+ (PDO154), 胸水サンプル (PDO207P), 早期再発 (PDO210) といった異なる臨床特性を有していた. これらのことから, meta-ClustGS 7 は, 同じエストロゲン反応でも, 予後良好な正常 ER 陽性乳がん細胞とは異なる細胞状態を反映している可能性が示唆された. 例えば, meta-ClustGS 7 には, 内分泌抵抗性と予後不良に関与するとされる *CCND1*が含まれていた^{32,33}). このことは, この遺伝子シグネチャーが悪性度の高い細胞集団を反映している可能性を示唆している (図 12BD). 以上から, メタクラスタによる, 定性的・定量的評価な各 PDO の ITH の記述ができることがわかった.

9. オリジナル遺伝子シグネチャーによる分子生物学的特徴の解釈

メタクラスタを同定する過程で, 9つの PDO にオリジナルなクラスタも同定した (図 15AB, 表 5). 9つのオリジナルなクラスタはそれぞれ PDO オリジナル ClustGS により特徴づけられ, それぞれに特徴的な遺伝子が含まれた (図 15A). 例えば, PDO207 にはオリジナル Clust-GS として 3つの異なる 207P-ClustGS2, 4, 5 により特徴づけられるクラスタが不均一に混在した. この様なオリジナル ClustGS によ

り特徴づけられるクラスタを有する PDO は、特徴的な臨床経過や病理像を持つ症例に由来する 4 つの症例に集約された。PDO155 は IBC, PDO203 は IMPCa, PDO207 は転移性乳がん, PDO210 は再発乳がんの症例に由来している。したがって、他の PDO と共有されていない ClustGS は、各 PDO の臨床的または分子生物学的特徴を反映している可能性がある。例えば、207P-ClustGS 4 には、乳がんの予後不良や高悪性度腫瘍と関連する間葉系マーカー *VIM* や *CYP4Z1* が含まれていた³⁴⁾。この ClustGS は、平均としてみれば PDO207P で高い発現傾向を示すが、その傾向は一部のクラスタに偏っていた (図 15CD)。PDO207P は肺転移による胸水貯留液から樹立しており、このクラスタは PDO207P の間葉系で侵襲性の高い特徴を反映していると思われる。

10. 発現遺伝子群の背後にある生物学的特徴の探索 ～遺伝子プログラムを構成する背景因子の導出～

近年、ITH と絡めて細胞の生物学的機能の関わりに注目が集まっている^{35, 36)}。ここまで、PDO ごとにいくつかの遺伝子シグネチャーによって特徴づけられるクラスタを同定し、各遺伝子シグネチャーによって特徴づけられる共通した細胞の状態や機能、症例特異的な細胞の性質と、その不均一な発現の評価を行った。これまでの解析手法は PCA (principle component analysis; 主成分解析) や UMAP (uniform manifold approximation and projection)³⁷⁾ により得られたデータの次元削減と t 分布型確率的近傍埋め込み法 (t-SNE)³⁸⁾ による可視化によりおこなった。このよう

な手法では説明変数を目的変数に絞り込む流れにより情報量が要約され、理解しやすい分類がなされる一方で、取りこぼされる情報がでること、得られる目的変数（遺伝子リスト）が手法やパラメータ設定により変動する可能性がある。この、説明変数から目的変数に絞り込む思考プロセスと逆の発想に基づく解析手法として因子解析が知られている。因子解析は目的変数の背後にある説明変数を探索する思考プロセスである。共通因子となるグループを恣意なく導出できるが、得られた因子がどのような意味を持つのか独自に考察する必要があるほか、有効な共通因子が導けないことも起こりうる³⁹⁾。このような特徴を理解したうえで、NMF(non-negative matrix factorization;非負荷行列因子分析)⁴⁰⁾という手法に着目した。NMFは画像認識や音響工学など幅広い分野で応用され、バイオインフォマティクスの分野でも近年報告されている。NMFでは負の値を一切用いず、分解された要素に正の重みをつけて加算して、もとのデータを再構成する⁴¹⁾。得られたいくつかの要素（因子）にそれぞれ係数をかけて足し合わせることで、もとのデータや現象が再現できるため、要素と現症の関係が理解しやすいものとなる。これまで、scRNA-seqのデータ解析にNMFを利用することで、細胞周期やEMT、ストレス・免疫応答などの細胞の機能的多様性、不均一性を評価する報告がなされてきた^{42, 43)}。今回、NMFという視点を変えた解析手法により各PDOに特徴的なトランスクリプトーム発現パターンとその機能的特徴の探索を試みた（**図7B**）。SeuratのNMF解析のプロトコールに従い、10PDO全体で55の遺伝子発現プログラム（GP）を同定し、各GPについてJaccard

類似度指数を算出し、階層型クラスタリングガイドによりヒートマップを作成したところ、6個の共通する遺伝子プログラム (meta-GP) と、PDO ごとにオリジナルな29個のGPが同定された (図 16AB)。共通するGPには細胞周期、EMT、エストロゲン応答分子の他に、酸化的リン酸化が含まれた (図 16C)。クラスタ分類を通して分類した ClustGS と NMF の GP を比較すると、GPの方が、多くの遺伝子プログラムを有するばかりでなく、オリジナルのプログラムの割合が増える傾向が認められた (図 16D)。PDO155におけるオリジナルなGPは、155-GP #7.1, 155-GP #7.4, 155-GP #9.2の3つであり、これらのGPはPDO155の特徴を表現しているのではないかと考えた (表 6)。

11. IBCPDOにおけるITHの探索 ～PDO155を特徴づけるサイトカイン～

最後に、PDO10例のなかで、特徴的な臨床経過を示したIBCであるPDO155について着目した。この症例は、術前化学療法不応性を示し、術後早期に肝転移を発症し、臨床転帰が不良であった (図 5C)。PDO155の初代培養時はデブリス様結節と認識した構造体が多くを占め、継代後に分解されず、細胞外基質が残存している可能性を考慮したが、顕微鏡下に物理的に破碎を試みたところ、急激な増大を続け、数継代経ても同様の構造を一部保ちつつ増殖し、樹立に至った (図 5A)。臨床的にもIBCという特徴的な所見、経過を示しており、その高い悪性度の特徴をPDO155に見いだすことができないかと考えた。まず、クラスタによるDEGから導出したPDO155オリジナル155-ClustGS 1 (図 15A, 表 5) に注目した。この中には、RNA

輸送と翻訳開始の機能を持つ遺伝子が高率に濃縮されていた (*EIF3H*, *PABPC1*, *EIF3E*, *EIF2S3*; 表 5). 次に, 155-ClustGS 1 と, NMF の PDO155 オリジナル GP の比較を行った. PDO155 オリジナル GP(155-GP#7.1, #7.4, #9.2)と 155-ClustGS1 に共通する分子は *CHI3L1*, *CST3* (NMF#7.1), *LY6D* (NMF#7.4) であった. このうち, *CHI3L1* と *CST3* は細胞から分泌されるサイトカインとして知られ, これらの遺伝子がコードするシスタチン C, YKL-40 (*CHI3L1*) は炎症に関連するサイトカインである^{44, 45)}. これらが IBC の病態生理と関連する可能性を考えた. そこでサイトカインアレイを用いて PDO155 と他の PDO の培養液中のサイトカインを網羅的に検出した (図 17AB). 他の PDO と比較して PDO155 に最も高く検出されたサイトカインは YKL-40 (*CHI3L1*) とシスタチン C (*CST3*) であった. これらの分子がトランスクリプトームで確認できるか, バルクの RT-qPCR をおこなったところ, いずれも PDO155 で有意に上昇していることが明らかとなった (図 17C). しかし, 両遺伝子はトランスクリプトームのレベルで, PDO を構成している全細胞で発現しておらず, 不均一な発現パターンを呈ししていた (図 17D). そこで, タンパク質レベルで PDO 及び, 患者組織において両分子が発現しているか, 免疫組織化学染色を施行したところ, いずれにおいても, 同様に不均一な発現パターンを認めた (図 17E). このことから, 必ずしも全細胞で均一に発現していなくとも, 一部の細胞が特定の分子を有意に発現することで, 組織全体としてその機能を発現することが示唆された.

12. IBCPDO における機能的特徴の探索

次に、転写制御の観点から検討した (図 8A)。トランスクリプトームにおける ITH は多くの場合単一のマスター レギュレーターではなく、複数の TF によって制御されることでもたされる³⁶⁾。そこで、それぞれの GP に含まれる遺伝子が共通の TF によって制御されているのではと考えた (図 8A)。scATAC-seq はオープンな、すなわちアクセシブルなクロマチン領域を同定できる。そこで scATAC-seq により得られたモチーフスコアと GP 間の相関を評価した (図 8B, 18C)。scRNA-seq を行った、PDO10 株のうち、PDO210 を除く PDO9 株の全細胞における scATAC-seq の UMAP でのクラスタ分類を行ったところ、全 PDO は 15 個のクラスタに分類され、PDO155 は単一のクラスタのみで構成された (図 18AB)。PDO155 にはオリジナルの GP としてアミノ酸トランスポーター関連分子 (*SLC7A5*, *SLC38A1*, *PSAT1*) と、*MYC* を活性化させる *BRD4* を含む 155-GP #9.2 (表 6) が存在した。この GP に相関 (相関係数 $r > 0.2$) のある 143 個 の転写因子を同定し (図 18C)、かつ PDO155 に特異的に活性のある 28 の転写因子を同定した (図 18D)。それぞれが共通するものとして、12 の転写因子が見いだされ、その中には C/EBP ファミリーの 3 つ (*CEBPA*, *CEBPB*, *CEBPD*) と神経系発生に関連する 9 つの転写因子を認めた (図 18E)。以上により、155-GP#9.2 を構成する遺伝子の中で他の GP には見られないアミノ酸代謝関連分子と、この GP と相関する *CEBPB*, *CEBPD* が何らかの分子メカニズムにより関連し、IBC としての特徴を担っている可能性があるのではと考

えた(図 18F). 他の PDO に比して PDO155 における CEBP ファミリーは特異的に転写活性があるだけでなく (図 18G), RT-qPCR でも PDO155 において, *CEBPB*, *CEPBD* が他の PDO と比して高い発現傾向が示された (図 18H) ため, 何らかの生物学的意義を有していると考えた.

SLC7A5 と *SLC38A1* はそれぞれ, LAT1, SNAT1 というアミノ酸トランスポーターをコードする. LAT1 は細胞内にロイシンを取り込み, グルタミン酸を基質として排出する共役型のトランスポーターであるのに対し, SNAT1 はシンポーターとしてグルタミン酸を能動的に取り込みグルタミン代謝に重要な役割を担う. グルタミン酸はシステイン, グリシンとペプチド結合しグルタチオンを構成する. グルタチオンは過酸化物質や ROS (reactive oxygen species; 活性酸素) を還元し, 酸化ストレスから細胞を保護する. グルタミン酸が枯渇すると ROS は上昇し, 閾値を超えるとアポトーシスを誘導するが, 一般に腫瘍細胞では正常細胞より高い ROS 値となりつつも, 適度なバランスをとって細胞回転を維持している. ROS 上昇に代表される細胞への酸化ストレスはストレス応答性マイトジェン活性化プロテインキナーゼの p38 α (MAPK14) のリン酸化を介して, *CEBPB* の転写活性を高める(図 19A). そこで, PDO155 において, LAT1 の高発現が, ROS 上昇をもたらし, p38 等の系を介して C/EBPB を高め, *CEBPB* をプロモーターとして何らかの転写産物を産生しているのではないかと考えた. まず, PDO155 における LAT1 の発現を確認したところ, PDO 内の不均一な染色パターンと (図 19B) が確認された一方で, 安定培養中の他の

PDO (PDO165, 166, 180) との RT-qPCR における比較において, LAT1 をコードする *SLC7A5* は PDO155 で最も高い発現していた (図 19C). さらに ROS アッセイを行ったところ, 内在性 ROS 値は LAT1 の発現パターンと同様の傾向を示し, PDO155 で最も高かった (図 19C). CEBP は CCAAT/エンハンサー結合タンパク質として知られ, 細胞分化, 運動, 成長停止, 増殖, アポトーシス, 代謝, 免疫などあらゆる細胞機能を制御している⁴⁶⁻⁴⁸⁾. このうち, 炎症応答と炎症惹起にも重要な役割をもち, NF- κ B, IL-6, COX2, PGE2 産生に関わることが知られている⁴⁹⁾ (文献). そこで, RT-qPCRにより *IL6*, *PTGS2* (COX2) 等の発現を確認したところ, *PTGS2* は PDO155 に特異的に発現していることが示された (図 19C).

VI. 考察

本研究は、乳がん PDO における腫瘍内トランスクリプトーム不均一性を検討すること、いくつかの特徴的な遺伝子発現パターンと生物学的特徴のかかわりを探索することを目的とした。まず、scRNA-seq で得られた遺伝子発現パターンの評価のため、2つの解析戦略を立てた。一つは PDO ごとの遺伝子発現パターンからクラスターを導出し、同一クラスター内における DEG による遺伝子発現パターンの共通項目を見出し、その機能に関連する分子機構をアノテーションする手法。もう一つは、NMF により、クラスターの作成を経ずにデータの背後にある共通因子を抽出し、その機能を説明する分子機構をあぶりだす手法である。前者では、各 PDO の腫瘍間・腫瘍内不均一性を明らかにした。全細胞では 16 個のクラスターに分類され、単独のクラスターを作る群と、クラスターが集合して大きな島を作る群に分かれた。一つの PDO であってもいくつかのクラスターに分かれることもあり、それぞれのクラスに特徴的な遺伝子パターンから、各クラスター内細胞の機能や状態が明らかとなった。また、その機能や状態が少なくとも PDO 間で不均一であること、そして一部の PDO においては異なる機能をもつ細胞が共存し、ITH が存在していることも示された。しかしながら、すべての PDO に ITH が認められるかまでは、はっきりしなかった。そこで、PDO ごとに細胞をクラスタリングし、クラスターオリジナルな発現遺伝子 ClustGS を明らかにした。この結果、各 PDO はそれぞれ 3~6 個、全 PDO では合計 38 個のクラスターに分類され、類似した ClustGS は 7 つの meta-ClustGS としてまとめられた。

各 meta-ClustGS の生物学的意義を検討したところ、meta-ClustGS 1-2 は細胞周期、meta-ClustGS 3, 4, 6 は EMT, meta-ClustGS 5, 7 はエストロゲン反応と関連することが示された。これらの結果から、PDO には症例を跨いで共通する遺伝子発現プログラムにより制御されるクラスタが存在することが明らかとなった。これらに含まれない 9 つの ClustGS は、特徴的な臨床経過や病理像をもつ 4 つの PDO に由来した。それぞれ、IBC, IMPCa, 転移乳がん（肺転移）、局所再発乳がん由来しており、これらの ClustGS は、治療抵抗性や転移再発、特徴的病理像の分子生物学的特徴を説明するものであった。

この論文ではトランスクリプトームに焦点をあて、meta-ClustGS, ClustGS により特徴づけられるクラスタを明らかにし、各 PDO における ITH を示した。これまでの報告では、治療抵抗性や転移再発に関わる ITH のパターンに焦点が当てられる一方で、その他のオリジナルな ITH は無視されていた。そこで今回、特徴的 ClustGS に注目し、いくつかの ITH パターンを示した。その中で IBCPDO の PDO155 は EMT に関連するクラスタをもっていた。以前、EMT に関連する分子として E-カドヘリンの IHC を行ったところ、PDO155 では発現が他の PDO 株と比較して有意に低下していることが明らかとなった。PDO155 は均一なスフェロイドを保ちながら増殖するポピュレーションの他に、細胞間でゆるく接着しつつ急激に膨張する細胞塊を伴う。このような性質の背景に E-カドヘリンの発現低下及び、scRNA-seq の結果により、EMT に関連する遺伝子を高発現するクローンを有していること

も関連している可能性があり、オルガノイドの形態に一部で影響していることも考えられる。

さらに、それぞれの PDO はその他にも分子生物学的にユニークな特徴を保持していると考えられる。そこで、そのような特徴の背後にある因子をより精細に明らかにしようと NMF による解析を行った。NMF 解析の結果、全体でより多くの遺伝子発現パターンを同定し、症例をこえて共通する 6 つの meta-GP と、29 個の症例オリジナルな GP を同定した。meta-GP には meta-ClustGS と同様に、細胞周期、EMT、Luminal 関連分子が含まれた。これら以外の特徴的機能に関連する分子を探索するため、最も臨床病理学的に特徴的な IBC 由来 PDO155 に着目した。PDO155 は臨床病理学的に極めて特徴的な症例から樹立したモデルである。診断時広範な皮膚発赤、リンパ管内腫瘍塞栓を認め、IBC の診断となった。術前組織診断は TN に近いホルモン受容体弱陽性であり、術前化学療法不応性を示し、術後の病理では HER2 タイプの診断となった。術後早期に遠隔転移を認め、抗 HER2 治療を行うも、半年の経過で死亡している。IBC は皮膚炎症所見を伴い、臨床的に定義される疾患概念 (T4d) であり、全乳がんのうち 0.5~2% と診断基準にばらつきがある。ホルモン受容体陰性症例に多いとされ、*MYC*、*ERBB2* 発現上昇をしばしば認める。5 年生存率は 20% 以下と極めて予後不良である。その中で術前化学療法不応症例はさらに予後が悪いとされる^{2, 24, 51)}。PDO155 は QIAseq Targeted DNA Panels (QIAGEN, Vnlo, Netherlands) により *TP53* 変異 (frameshift)、*PIK3R1*(p85) 変異 (missense;

p.Met326Ile), *MYC*, *ERBB2* コピー数増加を有することが分かっている。オルガノイドにおいても極めて高い増殖能を保持していた。一方で、その増殖パターンは均一ではなく、一部のポピュレーションではゆるい接着を保ちつつ一塊となって膨脹することがあった。PDO の免疫組織化学染色は病理結果と一致しており、特徴的な増殖パターンを呈する IBC として、その病態をあぶりだす適切なモデルであると考えた。そこで、PDO155 オリジナル遺伝子リスト (クラスタリングによる DEG の 155-ClustGS1 と NMF の 155-GP#7.1, #7.4, #9.2) に IBC に関連した生物学的機能を説明しうる分子が含まれていないか検討した。

クラスタリングによる DEG, NMF いずれの遺伝子セットでも共通して検出される分子として *CHI3L1* と *CST3* (NMF#7.1) を同定した。これらがコードするシスタチン C, YKL-40 (*CHI3L1*) は炎症に関連するサイトカインであり^{44, 45)}、これらが IBC の病態生理学的特徴と関連している可能性を考えた。実際にサイトカインアレイで両分子は他の PDO との比較において PDO155 で多く分泌され、特にシスタチン C は特異的であることが明らかとなった。シスタチン C は、システイニルカテプシンを可逆的に阻害し、間質のターンオーバーやリモデリングなど、細胞内外の生物学的プロセスを調節する。がんにおいて、シスタチンはシステインペプチダーゼ活性を調節し、がんの進行のすべての段階で重要とされる他、転移腺がん細胞由来のシスタチンは、浸潤突起形成および血管外遊走を上昇させることにより、腺がんの転移を促進することが報告されている⁴⁴⁾。今回 YKL-40 と Cystatin C について

PDO155 と PDO155 由来の患者検体による IHC を行ったところいずれにもいても不均一なタンパク質の発現パターンを認めた。腫瘍組織内に必ずしも同一の機能を持った細胞が均一に存在せずとも、一部の細胞が独自の機能を保持することで組織として特定の機能を果たしていることが示唆された。また、サイトカインアレイの結果からも、PDOにおける ITH は患者組織における腫瘍の特徴、並びにその機能の一部を反映していることが考えられることがわかった。

さらに、PDO155 オリジナル遺伝子プログラム 155-GP #9.2 に着目したところ、*SLC7A5* (1位)、*SLC38A1* (23位) とアミノ酸トランスポーターに関わる分子と *MYC* を活性化させる *BRD4* を同定し、これらが何らかの機能的特徴に関与している可能性を見出した。*SLC7A5* と *SLC38A1* はそれぞれ、LAT1、SNAT1 というアミノ酸トランスポーターをコードする。LAT1 は細胞内にロイシンを取込む代わりに、グルタミン酸を基質として排出する共役型のトランスポーターであるのに対し、SNAT1 はシンポーターとしてグルタミン酸を能動的に取り込みグルタミン代謝に重要な役割を担う⁵²⁻⁵⁴⁾。これらの特徴的遺伝子発現と相関が高く、PDO155 に特異的に開いている TF として CEBP ファミリーを同定したが、両者がどのようなメカニズムで関連するのかについて検討した。*SLC7A5* のコードする LAT1 はがん細胞特異的に発現し、乳がんにおいては TN, グレード高値, TIL(tumor infiltrating leukocyte) と相関し、Luminal B タイプの独立した予後不良因子とされる⁵⁵⁾。その機能は必須アミノ酸であるロイシンの取り込みであり、その後の mTOR パスウェイの

活性化が機能の本態と考えられている。この点に着目し、内分泌抵抗性乳がんに対し LAT1 を標的とする JPH203 治療が報告されている⁵⁶⁾。LAT1 阻害剤である JPH203 は固形がんを対象にした第 I 相試験において、良好な忍容性が確認され、がんに対する治療効果が示唆されており⁵⁷⁾、現在、標準的化学療法に不応・不耐となった進行性の胆道がん患者を対象に第 II 相試験を実施中である。そこで、PDO155 における JPH203 の感受性試験を試みたが、単剤における有意な差までは認めなかった。一方で、LAT1 はロイシンを取り込む際に交換基質としてグルタミン酸が細胞外に放出する。この点に着目し、LAT1 の機能亢進によるグルタミン酸枯渇の概念は、グルタミン酸を取り込む ASCT2 (*SLC1A5*) との関連において報告されてきたが^{52, 58) 59)}、ASCT2 はグルタミン酸の取込の一部を担うのみで、大半は SNAT1 がその役割をになう⁵⁴⁾。SNAT1 によるグルタミン酸取込が LAT1 によるグルタミン酸駆出に追いつかない場合、細胞内グルタミン酸は枯渇することとなる。細胞内に取り込まれたグルタミン酸はシステイン、グリシンとペプチド結合しグルタチオンを構成する。グルタチオンは過酸化物質や活性酸素 (ROS) を還元し、酸化ストレスから細胞を保護する。グルタミン酸が枯渇すると ROS は上昇し細胞への酸化ストレスをもたらす。恒常的な酸化ストレスは p38 α (*MAPK14*) のリン酸化を介して、*CEBPB* の転写活性を高める⁶⁰⁾。そこで、PDO155 について、LAT1 が発現し機能することで、基質としてのグルタミン酸は枯渇傾向となり、ROS 上昇をもたらし、p38 シグナルを介して *CEBPB* を活性化し、下流遺伝子の発現に寄与しているのではと考えた。ま

ず、免疫組織化学染色で LAT1 は、PDO 間で不均一な染色パターンと、PDO 内での染色強度のばらつきを確認した。また、RT-qPCR で、LAT1 は PDO155 で最も高い発現が確認された。ROS は LAT1 と同様の傾向を示し、PDO155 で最も高い結果となった。

最後に、このような特徴的遺伝子プログラと相関の強く、かつ PDO155 に特異的に開いている *CEBPA*, *CEBPB*, *CEBPD* に注目した。C/EBP ファミリーは炎症制御に重要な役割をもつことが知られている⁴⁶⁾。これらのうち RT-qPCR では *CEBPB*, *CEBPD* が PDO155 で最も高く、*PTGS2* は PDO155 に特異的に発現していることがわかった。*PTGS2* は COX2 をコードし、アラキドン酸カスケードにおける中心的な役割を担う⁶¹⁾。PDO ではピュアな腫瘍細胞が選択されており、周囲の間質細胞や免疫細胞が欠落している。そのため、COX2 を介した炎症反応を再現するべく、PDO155 を使用したアッセイ系の構築、マウス実験系の条件検討を行っているところである。

このようにして、シングルセルトランスクリプトーム、シングルセルエピゲノムを網羅的に解析し PDO において ITH が保持されていることを示すことに成功した。PDO における ITH については、meta-ClustGS で示された細胞周期などの cell status のほか、オリジナルの ClustGS ないし GP で示された炎症応答や免疫関連分子などの制御機構など cell of origin に関連する分子が含まれる可能性がある。また、長期間の培養により、ホルモン受容体陽性 PDO 株のエストロゲン受容体発現低下を認

めることがあることから、培養条件も影響している可能性がある。一方で、サイトカインアレイ、scRNA-seqの結果から見出した特徴的分子が患者組織においても同様の発現を呈していることも今回わかり、あらゆる影響をうけてITHは変化しつつも、その起源となる腫瘍の個性を一部で維持していることが考えられた。

scRNA-seqとscATAC-seqのデータを統合することで発現変動遺伝子とエピゲノムの変化の両方に共通する部分を見出すことができるかもしれない。今後、*CEBPB*を中心とした転写因子の転写制御機構を明らかにすべくChip-seq等を計画している。さらに、今回はMsigDB Hallmark 遺伝子セットを用いたmeta-ClustGSの遺伝子濃縮解析を行ったが、KEGG pathwayを含めた多くの公共データベースとの統合解析も検討したい。

今回の研究についてのリミテーションとして、ITHは腫瘍細胞に限定している。PDOは腫瘍細胞ないし、正常乳腺上皮細胞と一部の基底細胞、間質細胞の培養を維持することが可能であるが、継代を重ねるごとに免疫細胞や間質細胞はほぼ消失し、腫瘍細胞、ないし正常乳腺上皮細胞が濃縮されてくる⁶²⁾。これはオルガノイド培養のメリットである一方で、培養法のリミテーションである。間質細胞との相互作用、免疫細胞との相互作用を評価する上で、例えばin vitro には間質細胞や免疫系細胞との共培養系システムの構築、in vivo ではマウスモデルの構築などが必須である。こうした観点を考慮し、現在いくつかの細胞機能をアッセイする系を構築している。また、現在の培養系ではエストロゲン受容体陽性株のPDO株のエストロゲン受容体

の発現が次第に低下する傾向があるため、培養を安定させ、PDO 株樹立率を向上するため、エストロゲン受容体陽性 PDO 株に対する適切な培養条件を検討する必要がある。現在それぞれの PDO のサブタイプに応じた培養条件の検討を進めている。また、今回解析対象とした 10PDO については、自律的増殖能の高かった PDO 株を利用しており、Ki 値が高値であるか、各グレードが高値など、もともと細胞増殖能力の高い腫瘍組織由来の PDO が使用されている。より細かい腫瘍細胞の生物学的特徴を探索するためには、細胞増殖能のみならず、多角的な細胞機能を考慮した上でそれぞれの PDO の機能を探索することが必要である。この点も重視し今後の培養条件検討や、生物学的意義の探索を続ける必要がある。

私はこれまで、がん研究所がんエピゲノムプロジェクト、NEXT-Ganken プログラムの一員として、PDO の培養基盤の構築、解析プラットフォームの安定化、ITH の評価、探索すべき分子機能の導出まで中心におこなってきた。しかし、そこで得られた分子機構のアッセイまでは至っていない。今後は、樹立した IBCPDO を用いて、IBC の転移機構、炎症誘導のメカニズムを証明していく予定である。具体的には、このような分子機構を証明することを目標として、細胞接着、炎症誘導、免疫応答の機能をバリデートするアッセイ系を構築しているところであり、さらなる知見を積み重ねていきたい。

VII. 結論

乳がんの PDO において、トランスクリプトーム ITH の存在を初めて明らかにした。ある細胞状態を規定する発現遺伝子パターンは複数の PDO で共通して観察されたが、PDO 特異的発現パターン遺伝子は、その PDO がもつオリジナルな機能や生物学的特徴を示すことが考えられた。こうした特徴を説明しうる分子機序を IBCPDO で検討したところ、炎症反応や、転移機構に関連する分子が見いだされ、細胞接着や炎症誘導、免疫応答に関わる細胞機能が関連することが示唆された。今後、PDO 培養技術を向上させ、ITH により見出された機能的特徴をバリデーションすることで、IBC のみならず予後の悪い乳がんの生物学的特徴や分子メカニズムを解明し、クリニカルクエスト、アンメットニーズに応えられる新規治療の開発と、臨床から基礎へとつながるリバーストランスレーショナルリサーチの基盤づくりに貢献していきたい。

VIII. 参考文献

1. Lim B, Lin Y, Navin N. Advancing Cancer Research and Medicine with Single-Cell Genomics. *Cancer Cell*. 2020;37(4):456-470.
2. Lim B, Woodward WA, Wang X *et al*. Inflammatory breast cancer biology: the tumour microenvironment is key. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(8):485-499.
3. Sparano JA, Gray RJ, Ravdin PM *et al*. Clinical and Genomic Risk to Guide the Use of Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(25):2395-2405.
4. Li Q, Seo JH, Stranger B *et al*. Integrative eQTL-based analyses reveal the biology of breast cancer risk loci. *Cell*. 2013;152(3):633-641.
5. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R *et al*. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(22):1656-1664.
6. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*. 2017;168(4):613-628.
7. Lindström LS, Yau C, Czene K *et al*. Intratumor Heterogeneity of the Estrogen Receptor and the Long-term Risk of Fatal Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110(7):726-733.

8. Horii R, Nitta H, Nojima M *et al.* Predictive significance of HER2 intratumoral heterogeneity, determined by simultaneous gene and protein analysis, for resistance to trastuzumab-based treatments for HER2-positive breast cancer. *Virchows Arch.* 2021;479(1):13-21.
9. Kumegawa K, Takahashi Y, Saeki S *et al.* GRHL2 motif is associated with intratumor heterogeneity of cis-regulatory elements in luminal breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2022;8(1):70.
10. van Dijk E, van den Bosch T, Lenos KJ *et al.* Chromosomal copy number heterogeneity predicts survival rates across cancers. *Nat Commun.* 2021;12(1):3188.
11. Jackson HW, Fischer JR, Zanutelli VRT *et al.* The single-cell pathology landscape of breast cancer. *Nature.* 2020;578(7796):615-620.
12. Brooks MD, Burness ML, Wicha MS. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell.* 2015;17(3):260-271.
13. Yates LR, Knappskog S, Wedge D *et al.* Genomic Evolution of Breast Cancer Metastasis and Relapse. *Cancer Cell.* 2017;32(2):169-184.e167.
14. Fong EL, Harrington DA, Farach-Carson MC *et al.* Herdaling a new paradigm in 3D tumor modeling. *Biomaterials.* 2016;108:197-213.

15. Tuveson D, Clevers H. Cancer modeling meets human organoid technology. *Science*. 2019;364(6444):952-955.
16. Kim J, Koo BK, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(10):571-584.
17. Sachs N, de Ligt J, Kopper O *et al*. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell*. 2018;172(1-2):373-386.e310.
18. Yan HHN, Siu HC, Law S *et al*. A Comprehensive Human Gastric Cancer Organoid Biobank Captures Tumor Subtype Heterogeneity and Enables Therapeutic Screening. *Cell Stem Cell*. 2018;23(6):882-897 e811.
19. Grünwald BT, Devisme A, Andrieux G *et al*. Spatially confined sub-tumor microenvironments in pancreatic cancer. *Cell*. 2021;184(22):5577-5592.e5518.
20. Kim SC, Park JW, Seo HY *et al*. Multifocal Organoid Capturing of Colon Cancer Reveals Pervasive Intratumoral Heterogenous Drug Responses. *Adv Sci (Weinh)*. 2022;9(5):e2103360.
21. Taverna JA, Hung CN, DeArmond DT *et al*. Single-Cell Proteomic Profiling Identifies Combined AXL and JAK1 Inhibition as a Novel Therapeutic Strategy for Lung Cancer. *Cancer Res*. 2020;80(7):1551-1563.

22. Jacob F, Salinas RD, Zhang DY *et al.* A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. *Cell*. 2020;180(1):188-204.e122.
23. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK *et al.* Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17(5):1474-1481.
24. Fouad TM, Barrera AMG, Reuben JM *et al.* Inflammatory breast cancer: a proposed conceptual shift in the UICC-AJCC TNM staging system. *Lancet Oncol*. 2017;18(4):e228-e232.
25. Granja JM, Corces MR, Pierce SE *et al.* ArchR is a scalable software package for integrative single-cell chromatin accessibility analysis. *Nat Genet*. 2021;53(3):403-411.
26. Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E *et al.* Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*. 2021;184(13):3573-3587.e3529.
27. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*. 2012;16(5):284-287.
28. Tirosh I, Izar B, Prakadan SM *et al.* Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*. 2016;352(6282):189-196.

29. Tirosh I, Venteicher AS, Hebert C *et al.* Single-cell RNA-seq supports a developmental hierarchy in human oligodendroglioma. *Nature*. 2016;539(7628):309-313.
30. Venteicher AS, Tirosh I, Hebert C *et al.* Decoupling genetics, lineages, and microenvironment in IDH-mutant gliomas by single-cell RNA-seq. *Science*. 2017;355(6332).
31. Filbin MG, Tirosh I, Hovestadt V *et al.* Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq. *Science*. 2018;360(6386):331-335.
32. Bostner J, Ahnstrom Waltersson M, Fornander T *et al.* Amplification of CCND1 and PAK1 as predictors of recurrence and tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer. *Oncogene*. 2007;26(49):6997-7005.
33. Roy PG, Pratt N, Purdie CA *et al.* High CCND1 amplification identifies a group of poor prognosis women with estrogen receptor positive breast cancer. *Int J Cancer*. 2010;127(2):355-360.
34. Wu W, Warner M, Wang L *et al.* Drivers and suppressors of triple-negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(33).
35. Black JRM, McGranahan N. Genetic and non-genetic clonal diversity in cancer evolution. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(6):379-392.

36. Li Z, Seehawer M, Polyak K. Untangling the web of intratumour heterogeneity. *Nat Cell Biol.* 2022;24(8):1192-1201.
37. McInnes L, Healy J, Melville J. Umap: Uniform manifold approximation and projection for dimension reduction. arXiv preprint arXiv:180203426. 2018.
38. Van der Maaten L, Hinton G. Visualizing data using t-SNE. *Journal of machine learning research.* 2008;9(11).
39. Schreiber JB. Issues and recommendations for exploratory factor analysis and principal component analysis. *Res Social Adm Pharm.* 2021;17(5):1004-1011.
40. Lee DD, Seung HS. Learning the parts of objects by non-negative matrix factorization. *Nature.* 1999;401(6755):788-791.
41. Brunet JP, Tamayo P, Golub TR *et al.* Metagenes and molecular pattern discovery using matrix factorization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(12):4164-4169.
42. Puram SV, Tirosh I, Parikh AS *et al.* Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell.* 2017;171(7):1611-1624.e1624.
43. Kinker GS, Greenwald AC, Tal R *et al.* Pan-cancer single-cell RNA-seq identifies recurring programs of cellular heterogeneity. *Nat Genet.* 2020;52(11):1208-1218.
44. Cox TR. The matrix in cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2021;21(4):217-238.

45. Zhao T, Su Z, Li Y *et al.* Chitinase-3 like-protein-1 function and its role in diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):201.
46. Zahnow CA. CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases. *Expert Rev Mol Med.* 2009;11:e12.
47. Sterken BA, Ackermann T, Müller C *et al.* C/EBP β isoform-specific regulation of migration and invasion in triple-negative breast cancer cells. *NPJ Breast Cancer.* 2022;8(1):11.
48. Ko C-Y, Chang W-C, Wang J-M. Biological roles of CCAAT/Enhancer-binding protein delta during inflammation. *Journal of Biomedical Science.* 2015;22(1):6.
49. Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M *et al.* Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(10):1654-1661.
50. Lin CK, Tseng CK, Liaw CC *et al.* Loboheleolide suppresses hepatitis C virus replication via JNK/c-Jun-C/EBP-mediated down-regulation of cyclooxygenase-2 expression. *Sci Rep.* 2018;8(1):8676.
51. Chakraborty P, George JT, Woodward WA *et al.* Gene expression profiles of inflammatory breast cancer reveal high heterogeneity across the epithelial-hybrid-mesenchymal spectrum. *Transl Oncol.* 2021;14(4):101026.

52. Bröer A, Gauthier-Coles G, Rahimi F *et al.* Ablation of the ASCT2 (SLC1A5) gene encoding a neutral amino acid transporter reveals transporter plasticity and redundancy in cancer cells. *J Biol Chem.* 2019;294(11):4012-4026.
53. Cha YJ, Kim ES, Koo JS. Amino Acid Transporters and Glutamine Metabolism in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3).
54. Bröer S. Amino Acid Transporters as Targets for Cancer Therapy: Why, Where, When, and How. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17).
55. Kurozumi S, Kaira K, Matsumoto H *et al.* Association of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) with the immune system and prognosis in invasive breast cancer. *Sci Rep.* 2022;12(1):2742.
56. Shindo H, Harada-Shoji N, Ebata A *et al.* Targeting Amino Acid Metabolic Reprogramming via L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1) for Endocrine-Resistant Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(17).
57. Lopes C, Pereira C, Medeiros R. ASCT2 and LAT1 Contribution to the Hallmarks of Cancer: From a Molecular Perspective to Clinical Translation. *Cancers (Basel).* 2021;13(2).
58. Scalise M, Pochini L, Console L *et al.* The Human SLC1A5 (ASCT2) Amino Acid Transporter: From Function to Structure and Role in Cell Biology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2018;6.

59. Zhao Y, Pu C, Liu Z. Essential amino acids deprivation is a potential strategy for breast cancer treatment. *Breast*. 2022;62:152-161.
60. Byun JK, Choi YK, Kim JH *et al*. A Positive Feedback Loop between Sestrin2 and mTORC2 Is Required for the Survival of Glutamine-Depleted Lung Cancer Cells. *Cell Rep*. 2017;20(3):586-599.
61. De Paz Linares GA, Opperman RM, Majumder M *et al*. Prostaglandin E2 Receptor 4 (EP4) as a Therapeutic Target to Impede Breast Cancer-Associated Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Cancers (Basel)*. 2021;13(5).
62. Dekkers JF, van Vliet EJ, Sachs N *et al*. Long-term culture, genetic manipulation and xenotransplantation of human normal and breast cancer organoids. *Nat Protoc*. 2021;16(4):1936-1965.

IX. 図の説明

図 1. オルガノイド培養の概略図を示す。検体処理時点では腫瘍細胞以外の間質細胞、免疫系細胞などが混在しているが、オルガノイド培養の継代過程において、腫瘍細胞が選択的に増殖し、その他の細胞は脱落してく。本研究の対象は患者由来の腫瘍細胞であり、その特徴の解明を試みている。

図 2. A：オルガノイド培養による腫瘍細胞の機能評価の自験例を示す PDO 株の AKT 阻害剤、mTOR 阻害剤への薬剤反応性試験により、それぞれの PDO 株の薬剤感受性の違いが示された。B：術前化学療法を経て、腫瘍が著減し pCR と診断された IBCPDO の自験例を示した。検体処理により得られた細胞数が極めて少ない場合であっても、オルガノイド培養により腫瘍細胞を選択的に増殖させることで、解析に必要な細胞数を確保し、その特徴を探索できる。検体処理時数細胞であったが、オルガノイド培養後に数万細胞を回収し、各種解析によりその特徴を探索することができた。

図 3. 現在行われている研究・解析基盤の概略図を示す。

図 4. A：検体回収、処理のフローチャートを示す。がん研有明病院乳腺センターで回収された検体をシングルセルへ処理し、バンキング並びにオルガノイド培養をへ

て、ゲノム・エピゲノム解析，機能解析へとシームレスで流れるパイプラインを示した。B：これまで，検体 301 例（原発巣 289 例，転移リンパ節 4 例，胸水 7 例，腹水 1 例）を処理し，うち 150 例（原発巣 140 例，転移リンパ節 3 例，胸水 6 例，腹水 1 例）についてオルガノイド培養を試みた。このなかから一定数の細胞を確保した 60 株の PDO 株をストックした。

図 5. A：IBC の病態図を示す。リンパ管内腫瘍塞栓とリンパ管内圧上昇，広範な皮膚発赤を表現した。B：PDO155 の症例について臨床経過を示す。某年 5 月に IBC の診断となった。術前診断は TNBC に近い Luminal B タイプで，術前化学療法として CEF，PTX を各 4 クール施行し，乳房全摘出，腋窩リンパ節郭清を施行した。術後病理は HER2 タイプの診断で，治療効果判定はグレード 0 であった。局所進行を認めたほか，早期に肺転移，肝転移を認めた。C：PDO155 の樹立過程を示す。初代培養時はデブリス様結節と認識した構造体が，継代後に分解されず残存し顕微鏡下，物理的に破碎を試みた。以後も急激な増大を続け，数継代経ても同様の構造を一部保ちつつ増殖し，樹立に至った。

*略語：CEF (cyclophosphamide；シクロホスファミド，epirubicin；エピルビシン，fluorouracil；フルオロウラシル)，PTX (paclitaxel；パクリタキセル)，HER (trastuzumab；トラスツズマブ)，T-Dxd (trastuzumab deruxtecan；トラスツズマブデルクステカン)，BSC (best supportive care；ベストサポーターケア)。

図 6. オルガノイド培養の工程を示す. 原発巣 (手術検体) から腫瘍組織を一部採取し, 酵素処理により組織をシングルセルに分解処理する. 体腔液検体 (胸水・腹水) は赤血球破碎溶液を添加し, 精製した. いずれも, 遠心分離を経て BME ゲルで均一に希釈し, 3D ドームを作成し重合した.

図 7. 解析のフローチャートを示す. A: PDO 株を酵素処理でシングルセル化し, 1,000~20,000 細胞の細胞溶液を BD Rhapsody™ のカートリッジに流した. 各マイクロウェルにトラップされた細胞は溶解され, mRNA をビーズで捕捉し回収した. cDNA を合成し, NGS DNA ライブラリーにより各遺伝子の発現を定量し, データ補正を経てカウントマトリクスを作成した. B: 二次解析は二つの方法で行った. 一つ目に, 全 PDO 株の全細胞の DEG をとり腫瘍細胞のクラスタリングを行った. その後, PDO 株ごとに DEG をとり, PDO 株ごとのクラスタリングを行った. 全 PDO のクラスタの類似性によりクラスタを特徴づける遺伝子発現パターンを分類した. 二つ目に, 全 PDO 株の全細胞のカウントマトリクスに対し NMF を行い, 各 PDO 株を特徴づける遺伝子発現プログラムを導出し, 全遺伝子発現プログラムを比較し, 分類した.

図 8. A : NMF の遺伝子プログラムが細胞内の特定の機能や転写制御機構などの機能的意義を示しうるという観点から、遺伝子プログラム内の遺伝子（分子）と相関の高い転写因子の同定、転写活性のある遺伝子の検出を試みた。B : 遺伝子プログラムと相関の高い転写因子を導出した。C : IBCPDO に特異的な活性のある転写因子を検出した。

図 9. A : 培養過程で特徴的な形態を呈した PDO を示す。PDO155 はスフェロイド構造の他に、塊を保ちながら急速に大型化する細胞集団を認めた（矢印）。PDO165 はスフェロイド間にシート様構造が出現している（破線囲い）。PDO207P はブドウの房様の構造を保ちながら増殖している。C : 解析対象とした 10PDO 株を示す。スケールバーは $500\mu\text{m}$ である。

図 10. A : PDO 株全細胞における UMAP でのクラスタ分類の図を示す。全 PDO は 16 個のクラスタに分類された。PDO155 は赤丸で囲まれた C2 と C7 のクラスタに分類された。B : 各 PDO を構成するクラスタの割合を示す。PDO155 は C2 と C7 で 90%以上が構成され、C2, C7 は PDO155 のみで構成された。C3 は PDO166, 180, 195, 202 を中心に構成されている。PDO210 は 98%が C11 で構成され、その他のクラスタにはほぼ認めなかった。C : 細胞ごとの遺伝子発現パターンをヒートマップとして示した。発現が高いほど赤色となり、低いほど青色で示される。横軸に

細胞が並び、縦軸には遺伝子リストが並ぶ。縦軸の遺伝子は 50 個を一つのまとまりとして、発現強度のパターンにより分類された。右に、PDO 名を記載した。C2 と C7 のクラスタを赤で囲った。青四角で囲った遺伝子群の発現をみると、上二つは共通して高い傾向があるが、下一つは C7 でのみ高い傾向が示された。D：C2 と C7 で有意に発現する遺伝子の上位 25 位をしめした。緑でハイライトしている遺伝子は両方に共通する遺伝子である。

図 11. A：10PDO ごとのクラスタ図を示す。B：各 PDO の細胞数およびクラスタ数をまとめた。CDE：PDO165 を例に、クラスタと ClustGS の関係、ClustGS に含まれている遺伝子を示す。PDO165 は 4 個のクラスタ（165-C1, C2, C3, C4）に分類され、4 個のクラスタを構成する細胞の発現上位 25 遺伝子を ClustGS と定義した。PDO165 は 4 個のクラスタを特徴づける 4 つの ClustGS（165-ClustGS 1~4）が導かれ、それぞれに含まれる遺伝子には細胞機能を表現しうる遺伝子が含まれていた。

図 12. A：各 ClustGS に含まれる遺伝子の重複により全 38 個の ClustGS を Jaccard 類似度係数でまとめた。共通する ClustGS として 7 つの meta-ClustGS と 9 個のオリジナル ClustGS が同定された。類似度の高いほど、黒～濃緑色で示される。それぞれの ClustGS に対応する症例と、サブタイプを右に示す。B：meta-ClustGS に含まれる遺伝子には細胞機能を表現しうる遺伝子が含まれていた。C：meta-ClustGS の

細胞機能をホールマーク遺伝子濃縮解析でアノテーションした。関連が高いほど赤く、特異度が高いほど横軸のバーが長くなる。meta-ClustGS1 は G2/M チェックポイント、meta-ClustGS2 は E2F, G1/S チェックポイント、meta-ClustGS3, 4, 6 は EMT (6 は脂肪酸代謝を含む)、meta-ClustGS5, 7 はエストロゲン応答(各 Early, Late)に関連することが示唆された。D: 各 PDO がどの meta-ClustGS を含むか示す。黒のボックスは左側に記載の meta-ClustGS を含む。図の上に症例を並べる。PDO の免疫組織化学染色の結果を症例番号の下に併記する。青色が Luminal タイプ、橙色が HER2 タイプ、黄色が Luminal HER2 タイプである。

図 13. PDO ごとの meta-ClustGS の発現を示す。ACE: 各 PDO における 3 つの meta-ClustGS の発現平均をヒートマップで示す。各 PDO 内での比較において、発現強度が高いほど、黄色で示され、低いほど紫で示される。BDF: meta-ClustGS の発現平均と分散を示す。極大値が高いほど、平均的な発現レベルが高く、横方向にピークが分散するほど不均一な発現傾向を示す。

図 14. A: 細胞周期に関連する meta-ClustG1, 2 のいずれか、ないし両方の ClustGS を不均一に発現するクラスタをもつ PDO が存在する一方で、PDO180, 195, 202 の様に、その他の ClustGS のみで特徴づけられるクラスタしか有さない PDO も存在した。B: PDO155, 165, 166, 180 は meta-ClustGS5 (エストロゲン

応答 ; Early) により特徴づけられるクラスタを含む一方で, PDO154, 207P, 210 は meta-ClustGS7 (エストロゲン応答 ; Late) により特徴づけられるクラスタを含んだ. C : EMT に関連する meta-ClustGS は 3, 4, 6 と 3 つあり, PDO155, 165, 166, 180, 202, そのいずれかによって特徴づけられるクラスタを有していた.

図 15. A : 9 つの PDO オリジナル Clust-GS における発現上位 5 位の遺伝子を示す. B : オリジナル Clust-GS により特徴づけられるクラスタを示した. PDO207P は 3 つの異なるオリジナル ClustGS2, 4, 5 のクラスタが不均一に混在した. C : PDO207P オリジナルな 207P-ClustGS 4 は PDO207P 内の一部のクラスタで認められ, 他の PDO と比較して発現の高い集団が存在していた. D : 207P-ClustGS 4 に含まれる, *VIM*, *CYP4Z1* は meta-ClustGS4 により特徴づけられるクラスタで高く検出された.

図 16. A : 各 GP に含まれる遺伝子の重複により全 55 個の GP を Jaccard 類似度係数でまとめた. 共通する GP として 6 つの meta-GP を同定した. 類似度の高いほど, 黒~褐色で示される. それぞれの GP に対応する症例と, サブタイプを右に示す. B : PDO はそれぞれ 4~7 個の GP を持ち, 29 個のオリジナルを認めた. C : 6 つの GP に特徴的な遺伝子と, 推定される細胞機能を示す. D : ClustGS と GP を構成する共通 (meta), オリジナルの ClustGS or GP の数と割合を示した.

図 17. A : PDO155, 165, 166, 180 培養液のサイトカインアレイを示す. 各メンブレンに 2 対のサイトカイン抗体を付着したドットが 107 対並ぶ. 右上, 左上, 左下の 2 対がポジティブコントロールで, 右下にネガティブコントロールが置かれる. 各ドットの蛍光強度をポジティブコントロールとの比で定量している. B : PDO155 で強く検出される順にならべ, 検出の低いものは 165, 180 で強く検出される順にしたから並べた. 濃い赤であるほど検出率が高いことを示す. C : PDO155, 165, 166, 180 における *CHI3L1* と *CST3* の RT-qPCR 結果を示す. PDO155 との mRNA 発現比を示している. D : PDO155 における *CHI3L1* と *CST3* の発現強度を示した. 発現が高い程, 黄色を呈し, 低いほど濃青色を示す. 両遺伝子とも不均一なトランスクリプトーム発現を認めた. E : PDO155 由来の患者組織 (手術検体) と PDO155 の HE 染色及び, YKL-49 (*CHI3L1*), Cystatin C (*CST3*) の免疫組織化学染色結果を示す. 両分子ともに, 不均一な発現を認めた.

図 18. PDO9 株 (scRNA-seq を行った 10 株のうち PDO210 を除く) 全細胞における scATAC-seq の UMAP でのクラスタ分類の図を示す. 全 PDO は 15 個のクラスタに分類され, 腫瘍“間”の不均一性を示した. B : PDO155 は C1 のみで構成され, C1 は他の PDO 由来の細胞を含まず, 1 対 1 の関係であった. C : PDO155 オリジナル GP の一つである, 155-GP#9.2 と相関のある (相関係数 > 0.2) 転写因子を

143 個同定した。D : PDO155 に特異的に活性のある転写因子を 28 個同定した。

E : CD で同定した転写因子のうち重なるものを 12 個同定し、C/EBP ファミリーの 3 つ (*CEBPA*, *CEBPB*, *CEBPD*) と神経系発生に関連する 9 つの転写因子を同定した。F : 155-GP#9.2 を構成する遺伝子の中で他の GP には見られないアミノ酸代謝関連分子と、この GP に相関し、特異的な転写活性を示す *CEBPB*, *CEBPD* が何らかの分子メカニズムにより関連し、IBC としての特徴を担っている可能性について検討したシェーマである。G : *CEBPA*, *CEBPB*, *CEBPD* は PDO155 に特異的な転写活性 (高いモチーフスコア) を示した。H : PDO155, 165, 166, 180 における *CEBPA*, *CEBPB*, *CEBPD* の RT-qPCR 結果を示す。PDO155 との mRNA 発現比を示している。このうち、*CEBPB*, *CEBPD* は PDO155 で有意な発現上昇を示した。

図 19. A : アミノ酸トランスポーターの機能と、関連分子の関係を示す。グルタミンの細胞膜における動態を示す。LAT1 はロイシンの取込と共役してグルタミンを細胞外へ駆出する。一方、SNAT1 はナトリウムイオンとグルタミンを細胞内に共輸送する。LAT1 の相対的機能亢進はグルタミン欠乏を誘導し、グルタチオン合成が低下することで ROS の上昇をもたらす。ROS が上昇すると p38 α (MAPK14) リン酸化を介して *CEBPB* の転写活性を引き起こす。*CEBPB*, *CEBPD* の下流には COX2 (*PTGS2*) を含むいくつかの炎症関連分子が存在する。B : PDO155 の LAT1 免疫

組織化学染色結果を示す。オルガノイド間と、オルガノイド内での不均一な染まり方が観察された。スケールバーは上段が 100 μ m, 下段が 50 μ m である。C: PDO155, 165, 166, 180 における *SLC7A5* の RT-qPCR 結果を示す。PDO155 との mRNA 発現比を示している。C: PDO155, 165, 166, 180 における内在性 ROS を示す。D: PDO155, 165, 166, 180 における *PTGS2* の RT-qPCR 結果を示す。PDO155 との mRNA 発現比を示している。

X. 図

図 1.

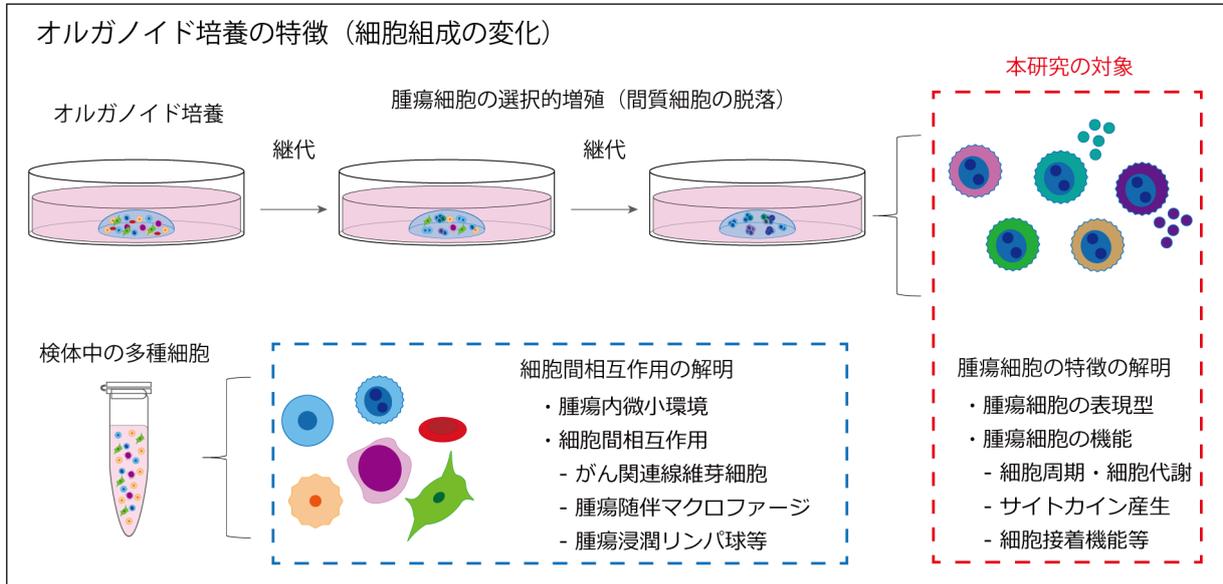


図 2.

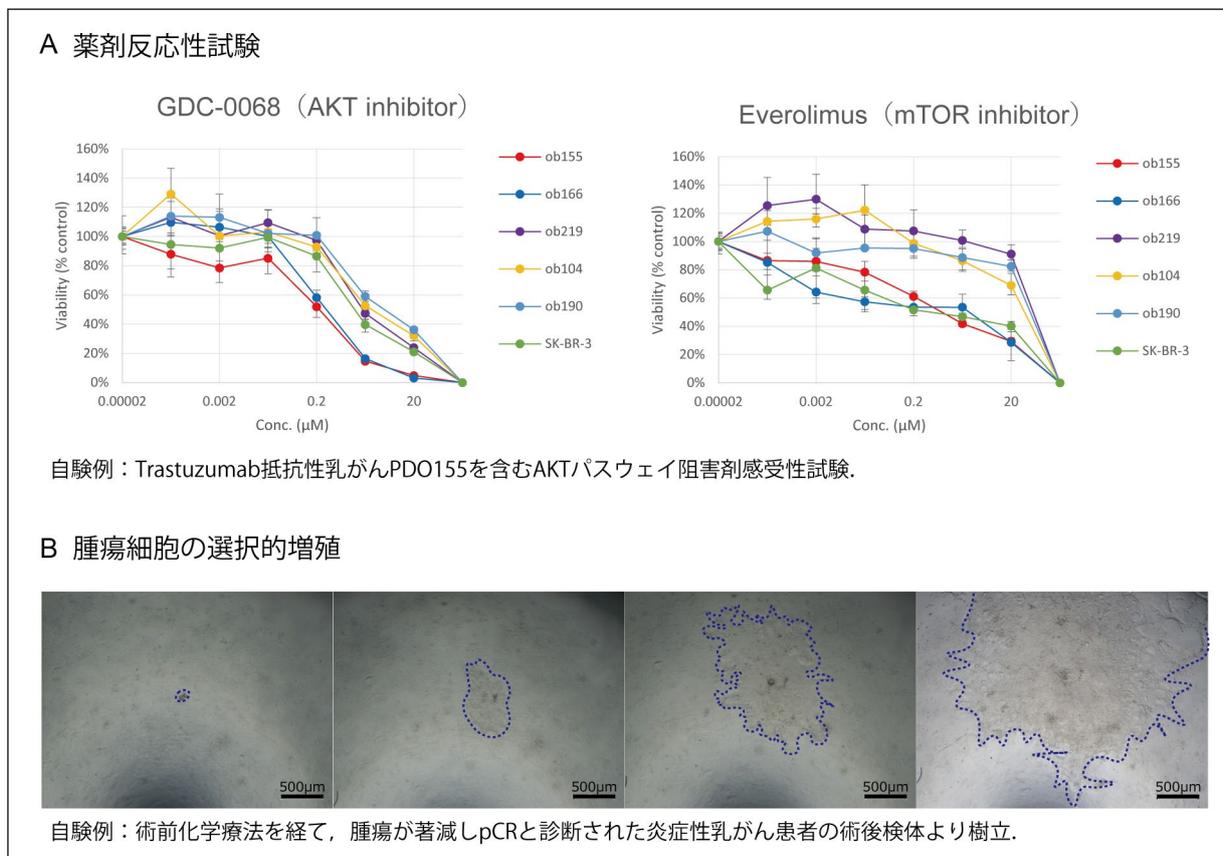


図 3.

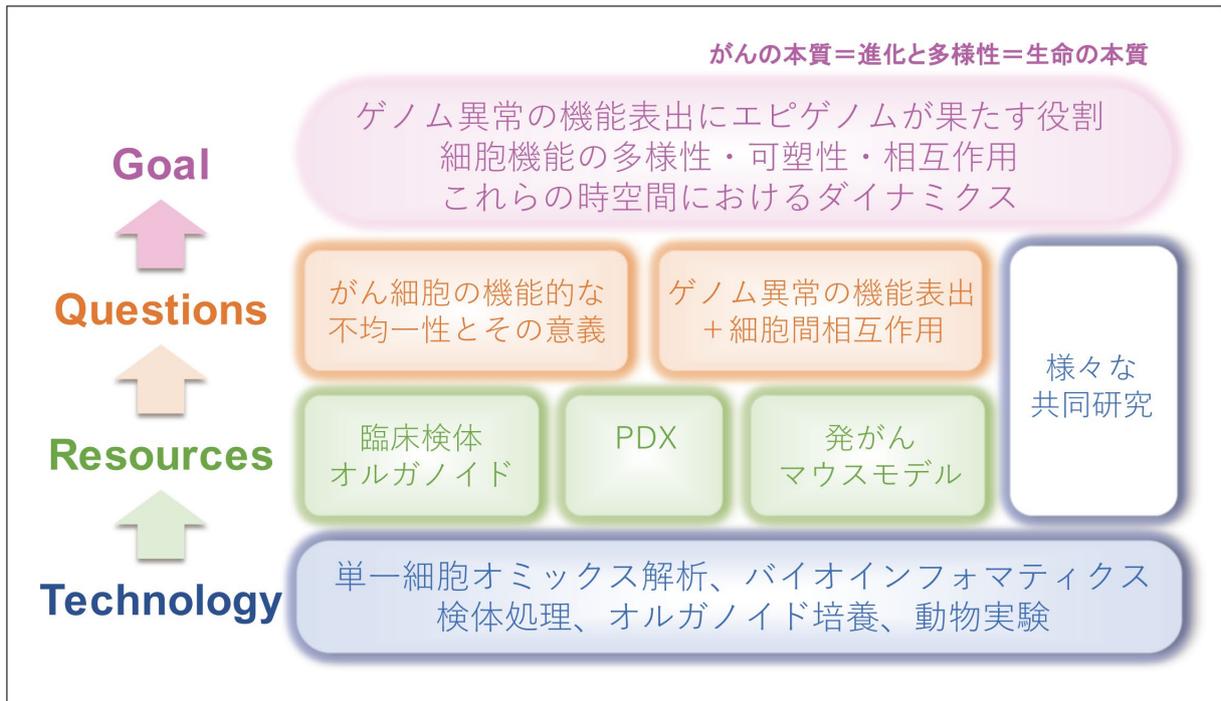


図 4.

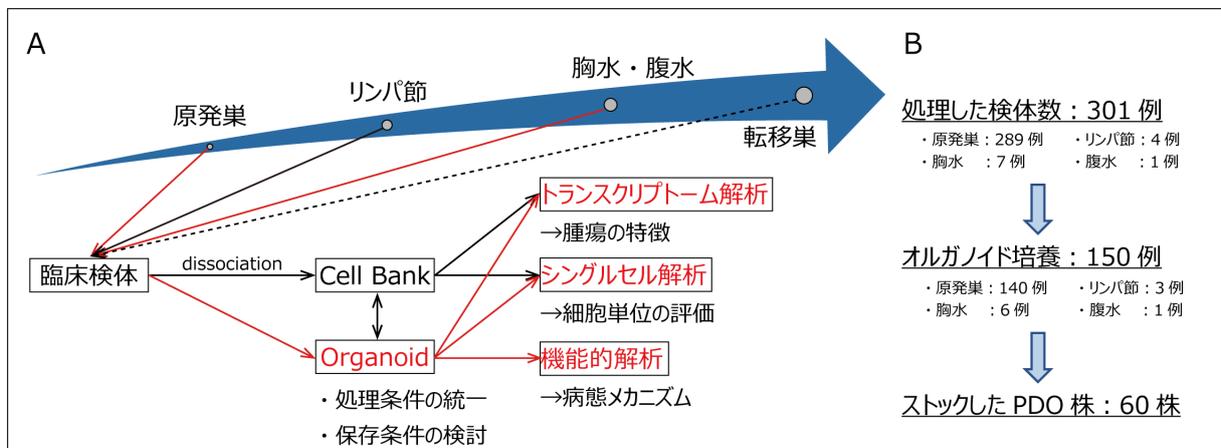


図 5.

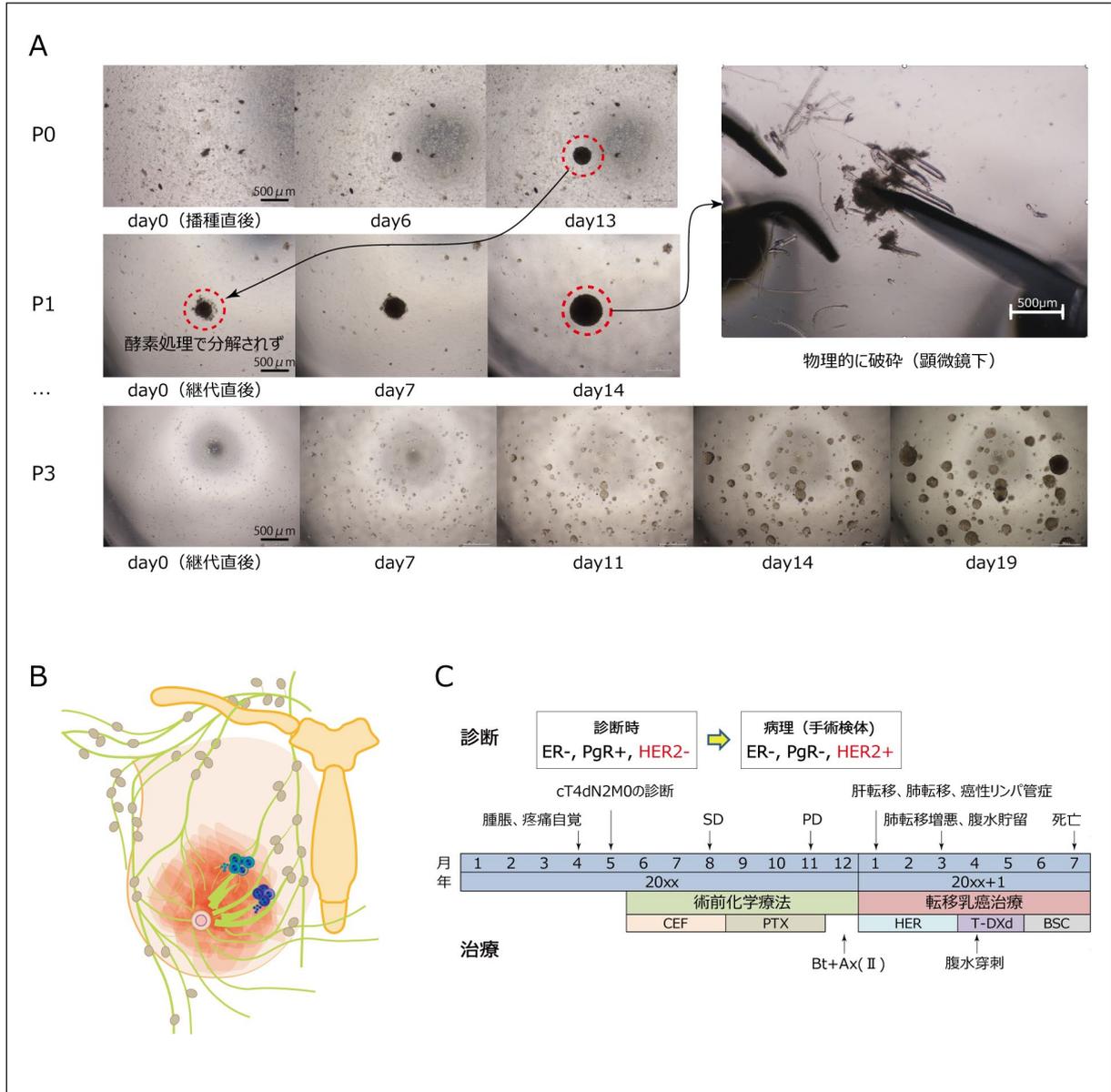


図 6.

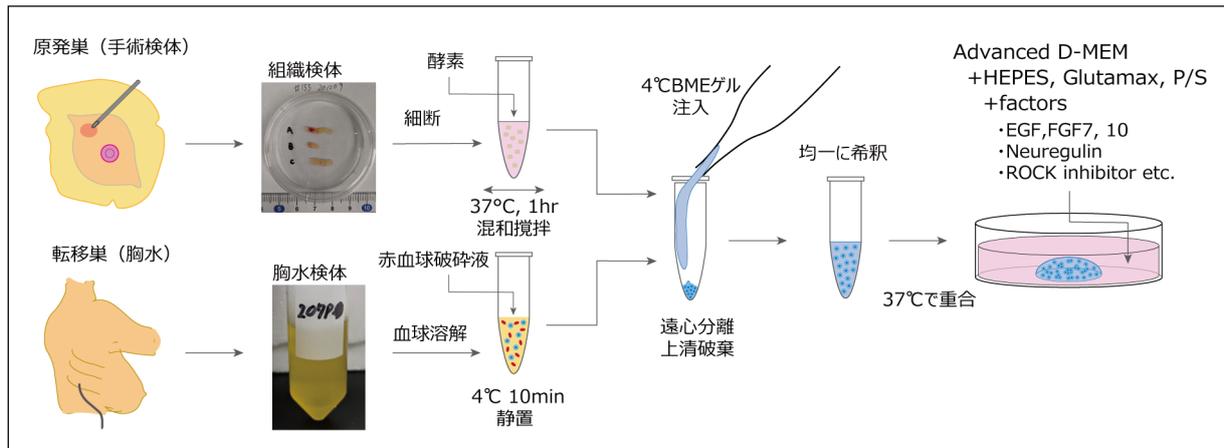


図 7.

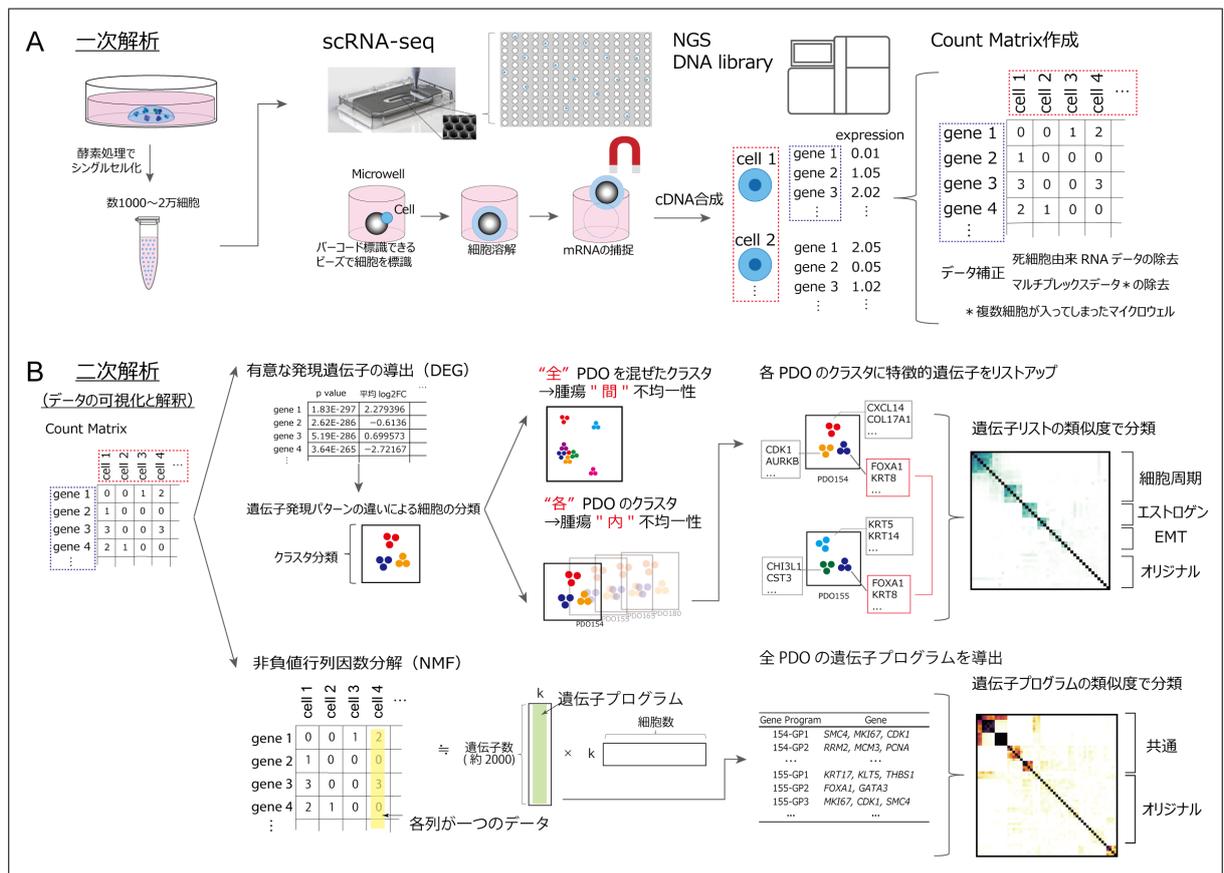


図 8.

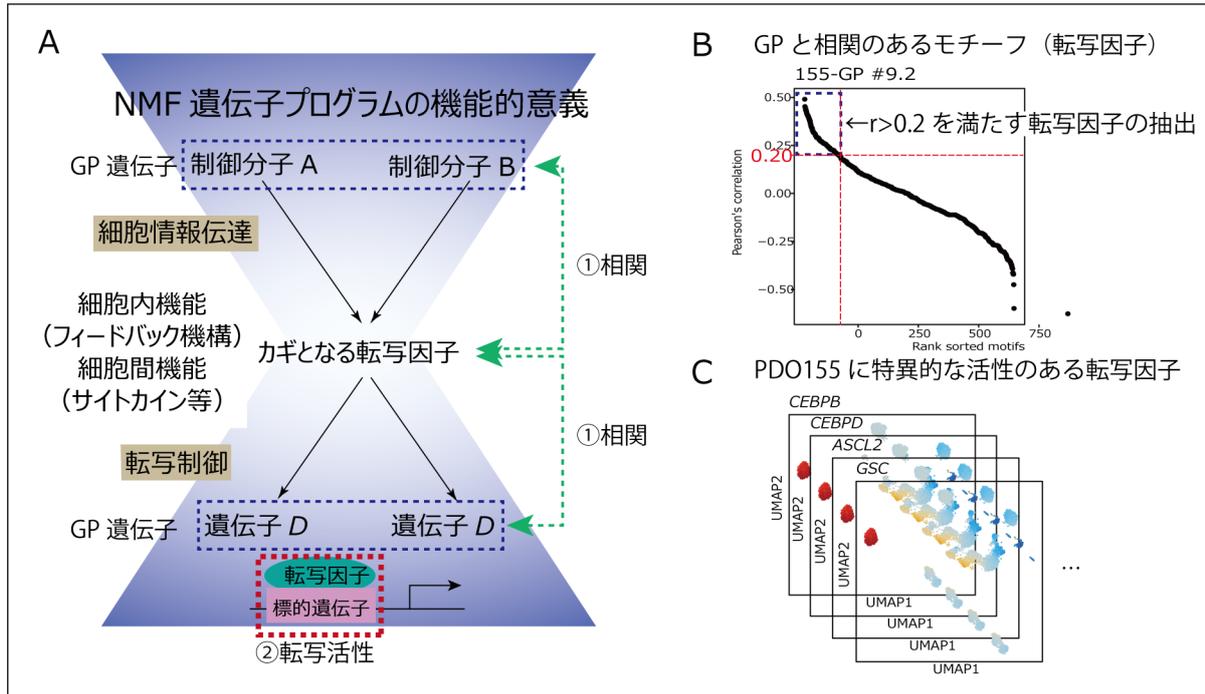


図 9.

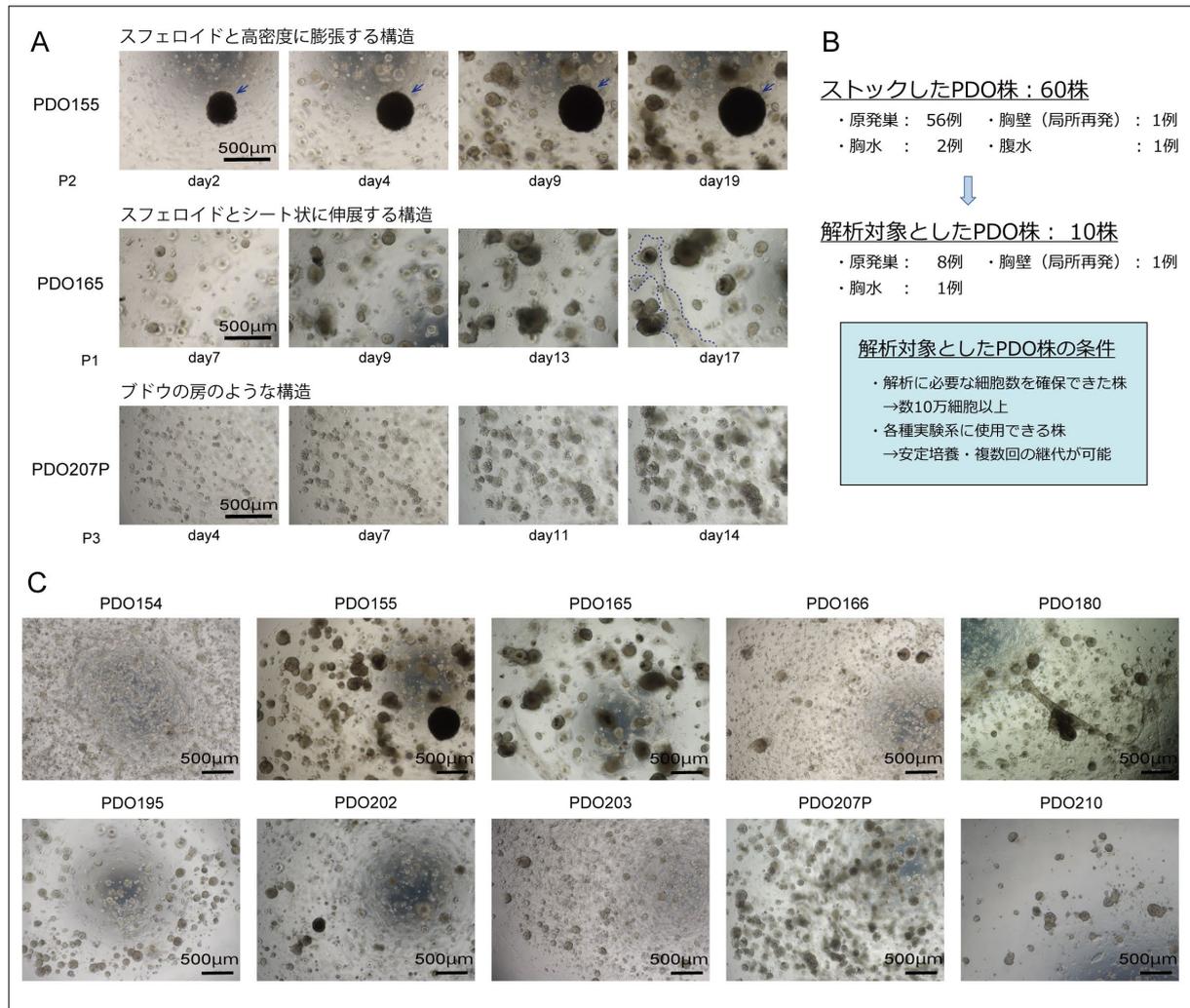


図 10.

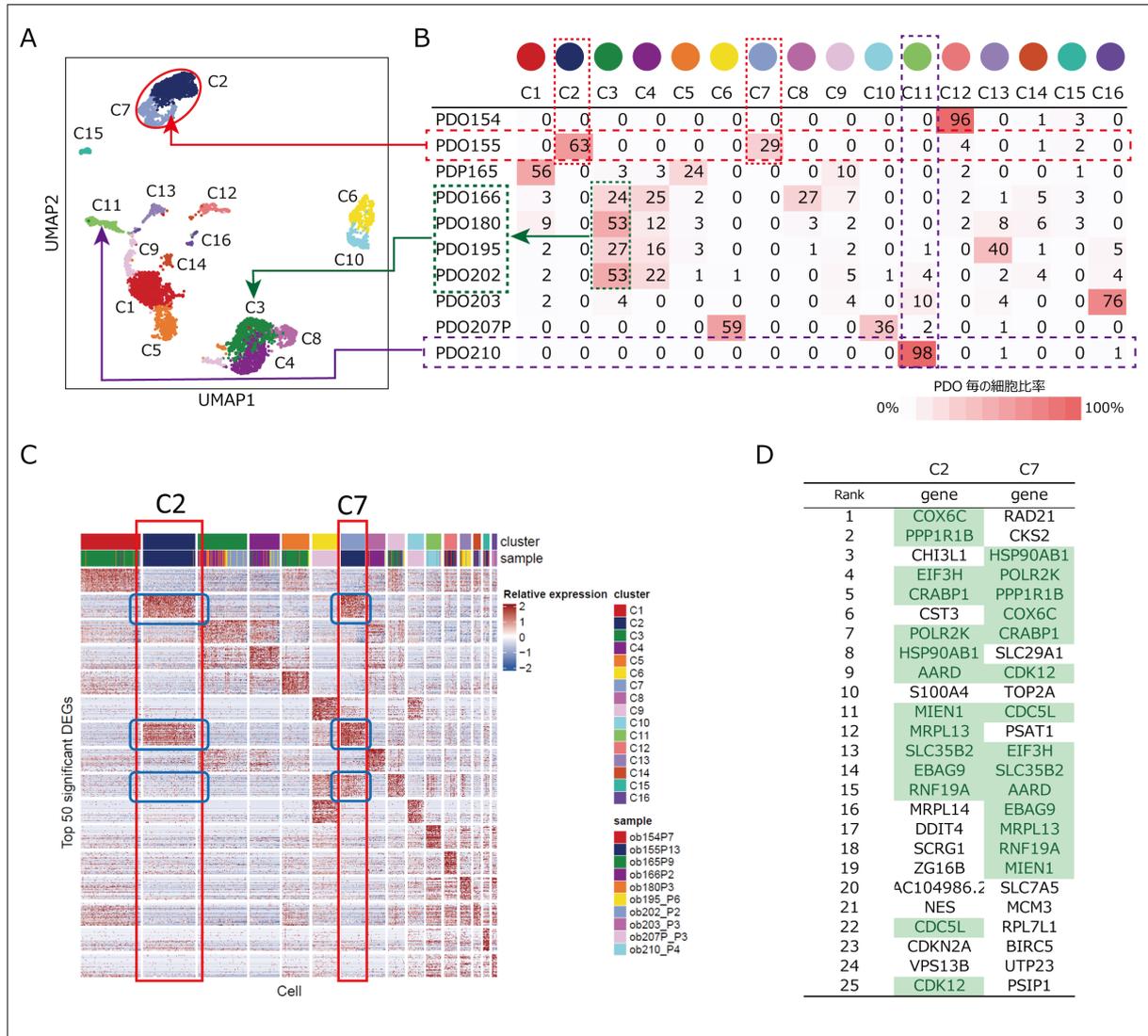


図 11.

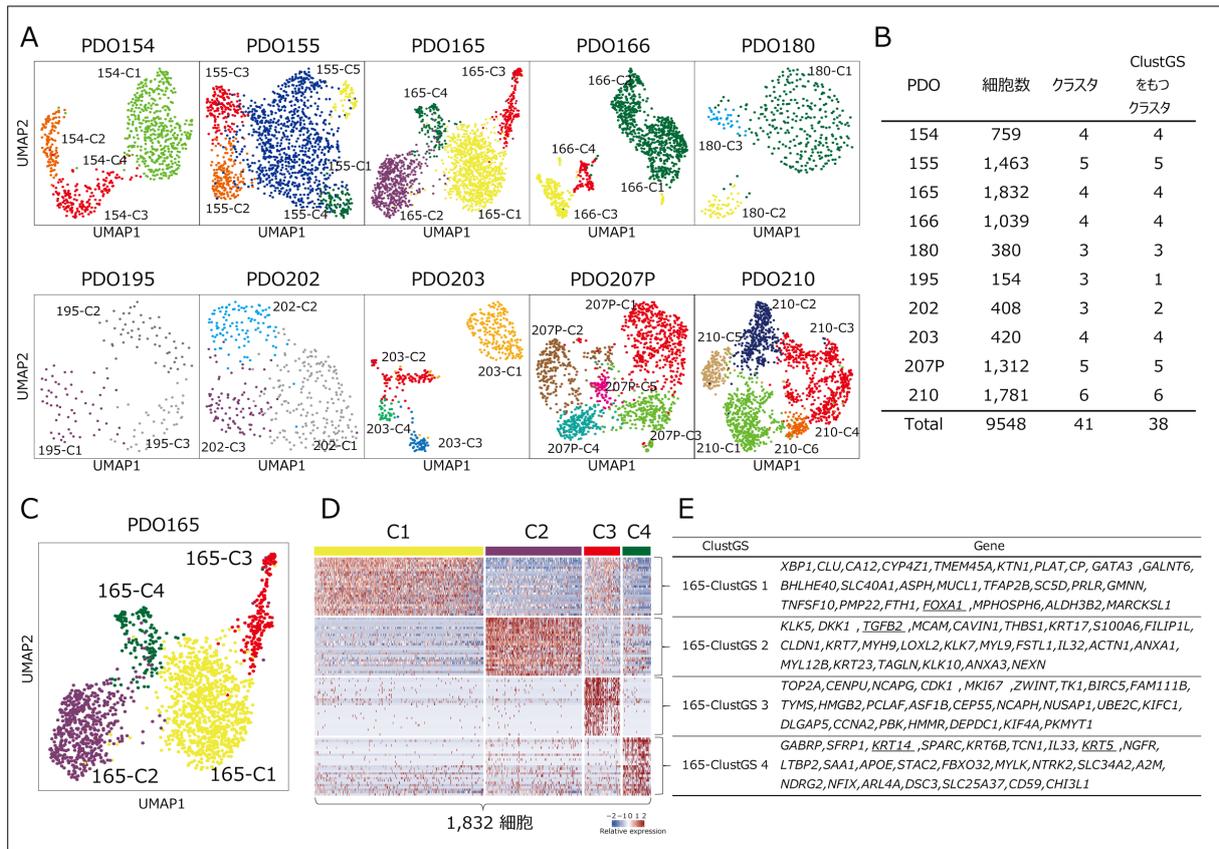
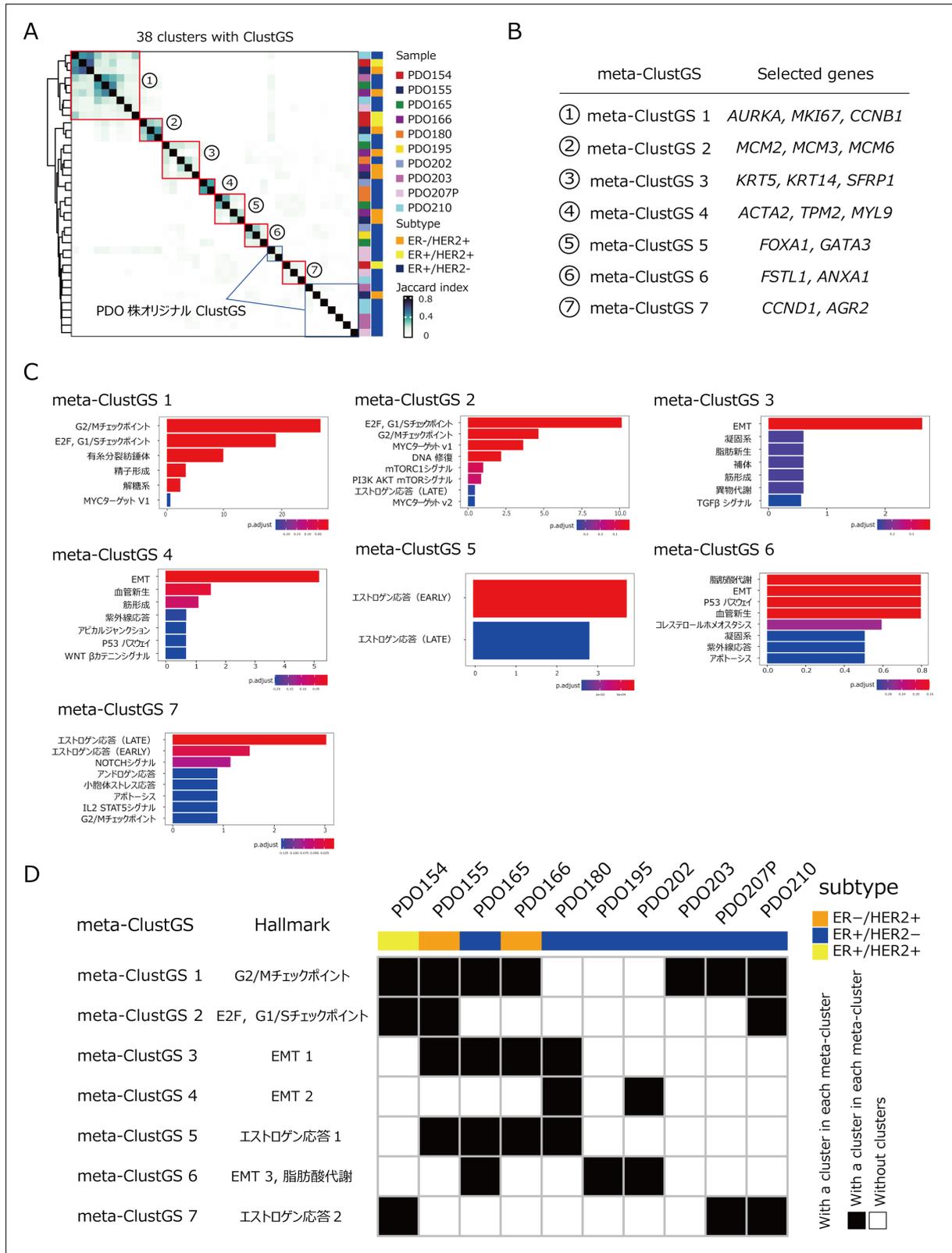


図 12.



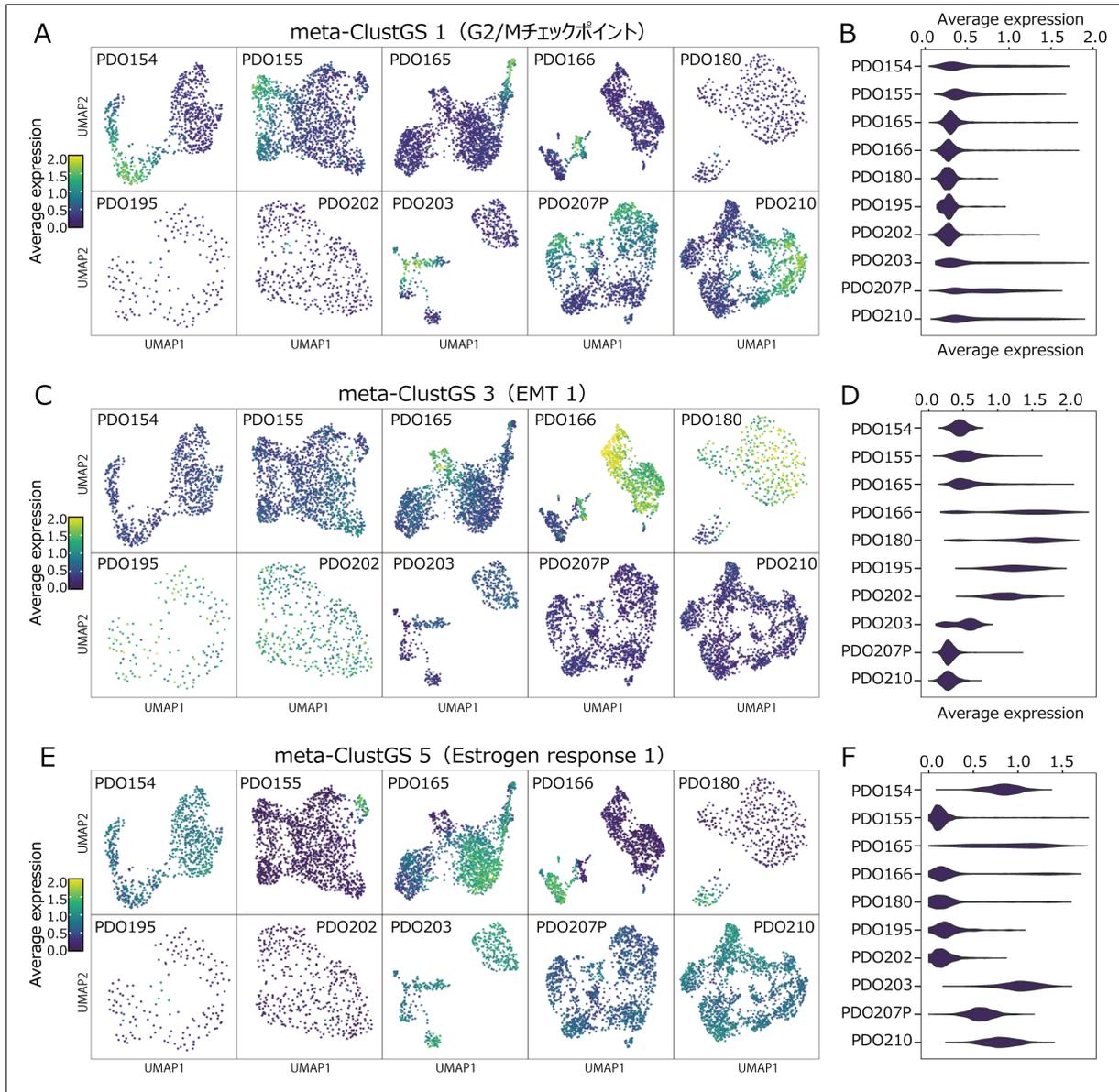


图 14.

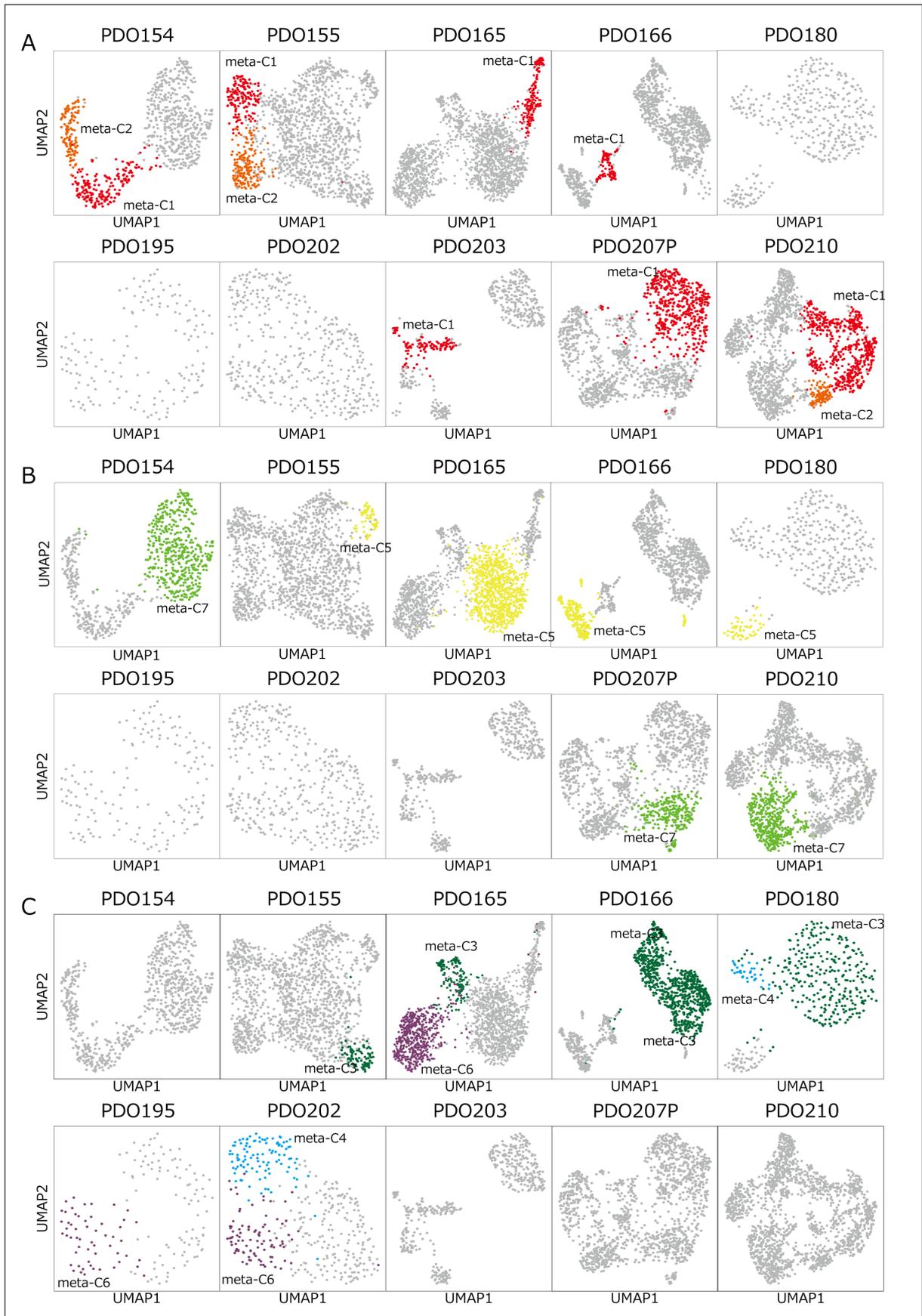


図 15.

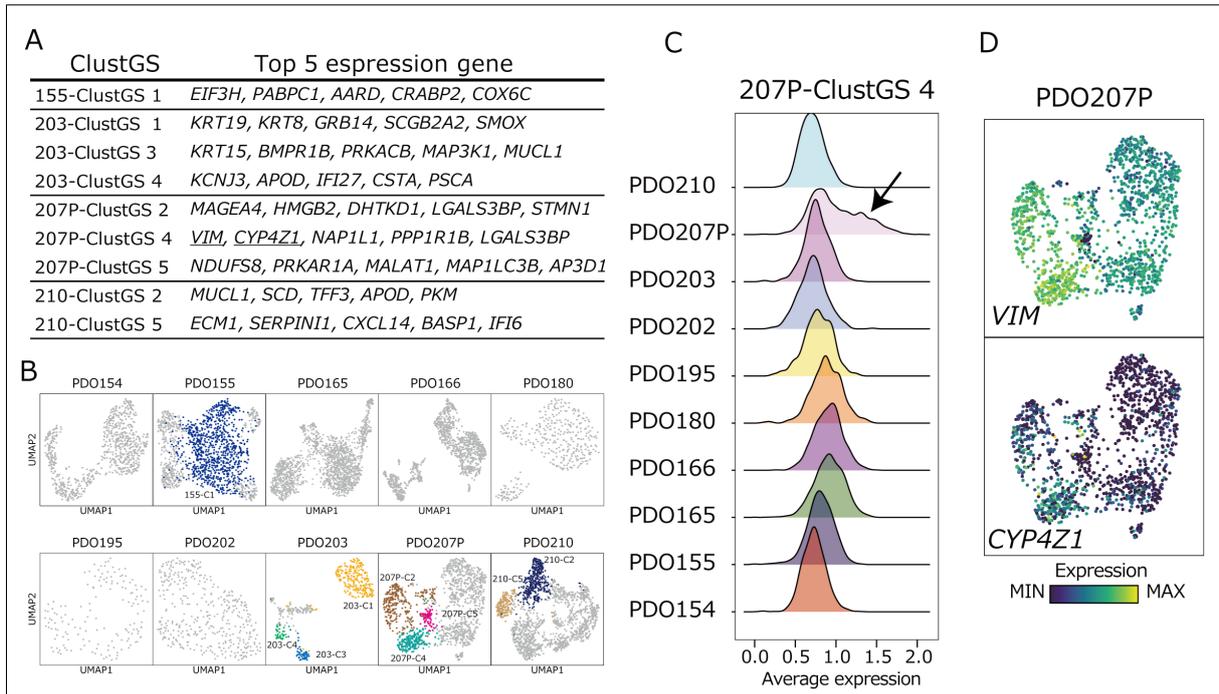


図 16.

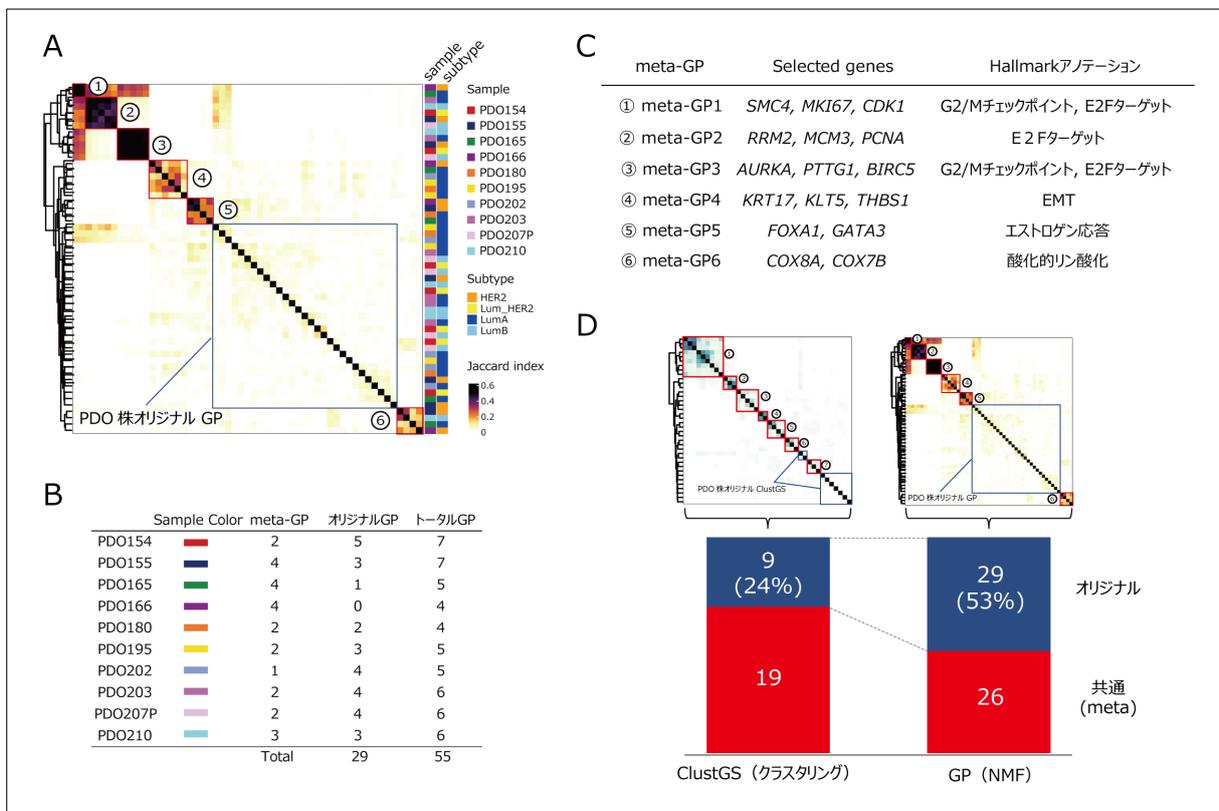


図 17.

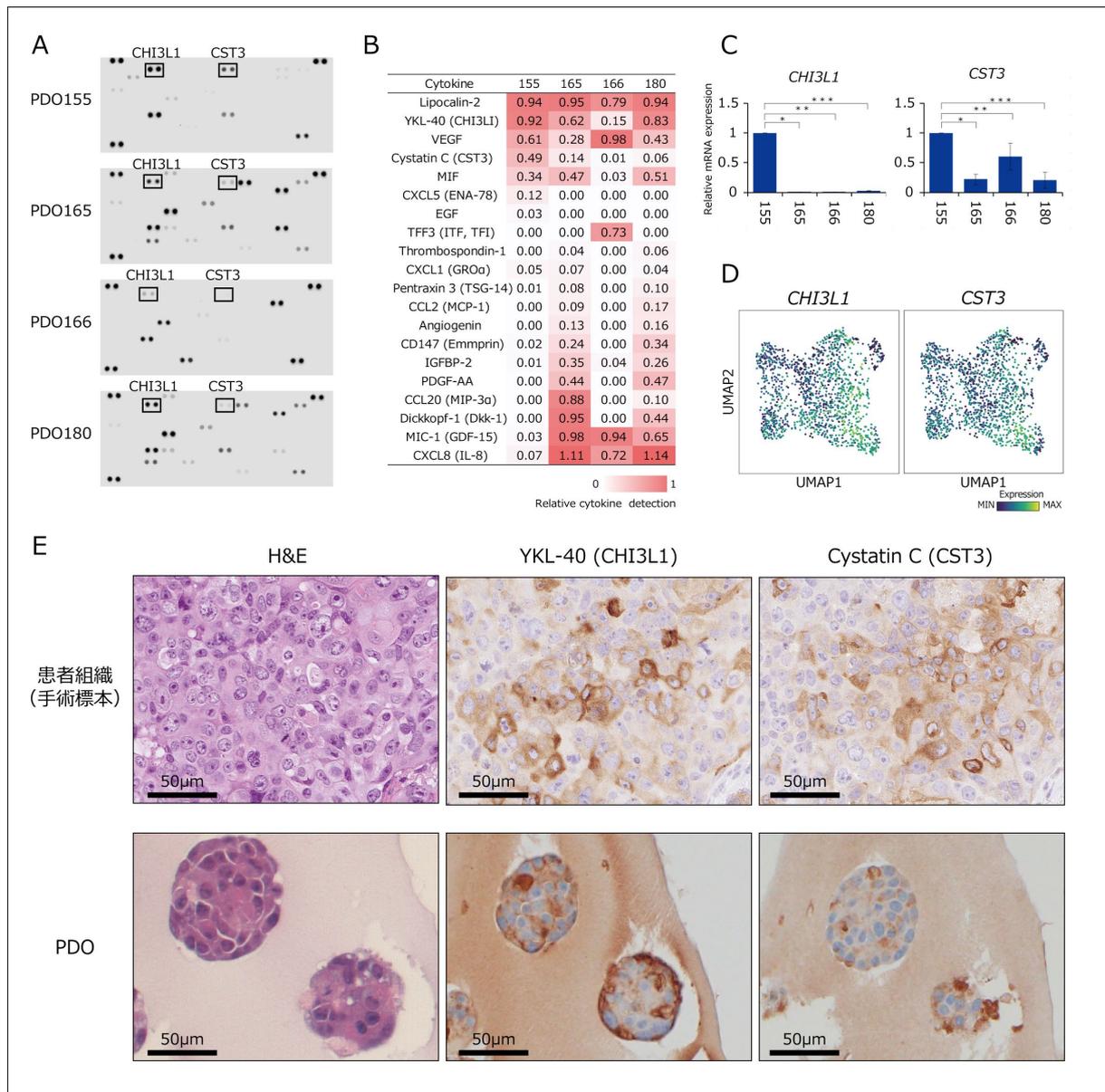


図 18.

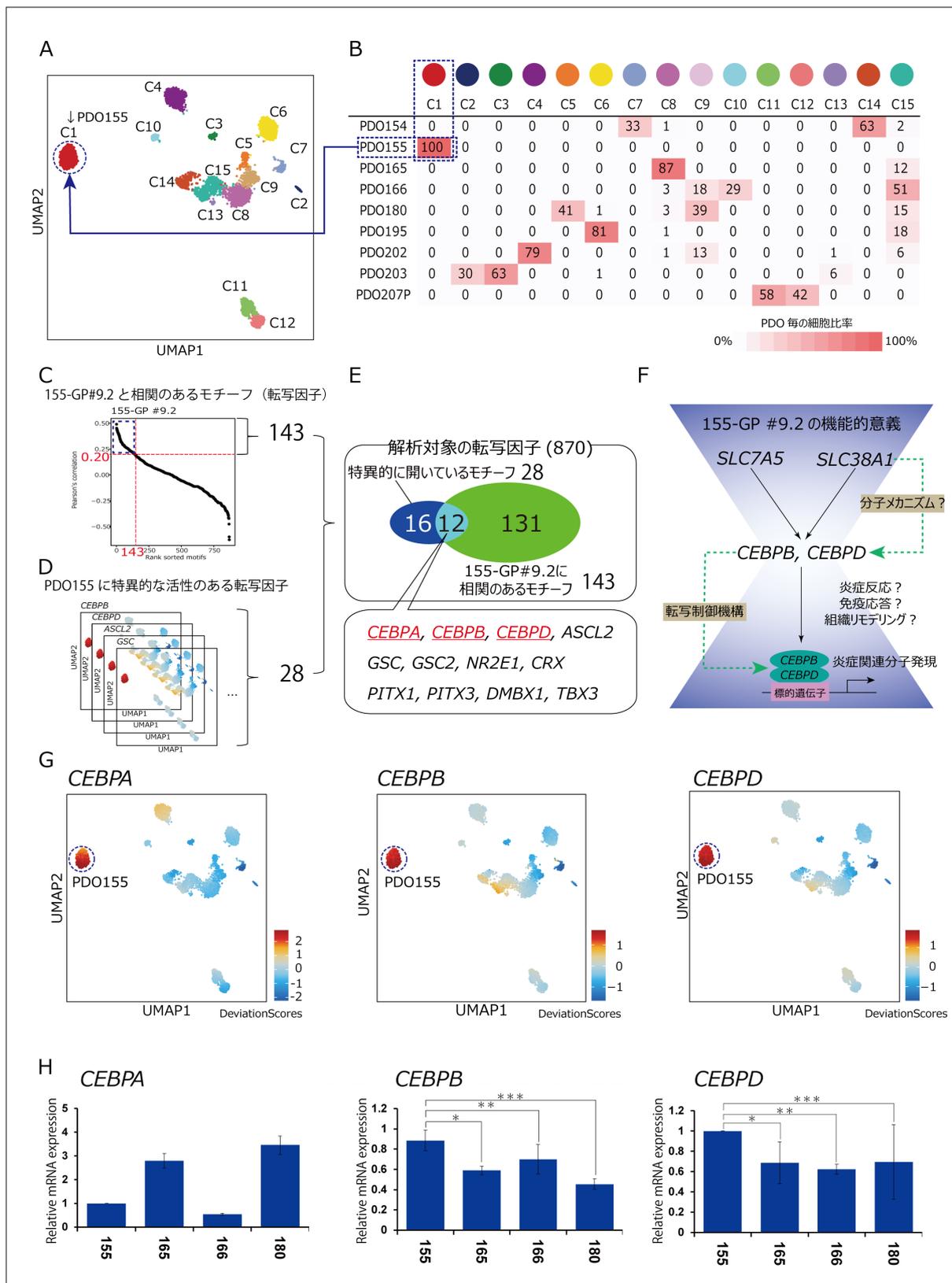
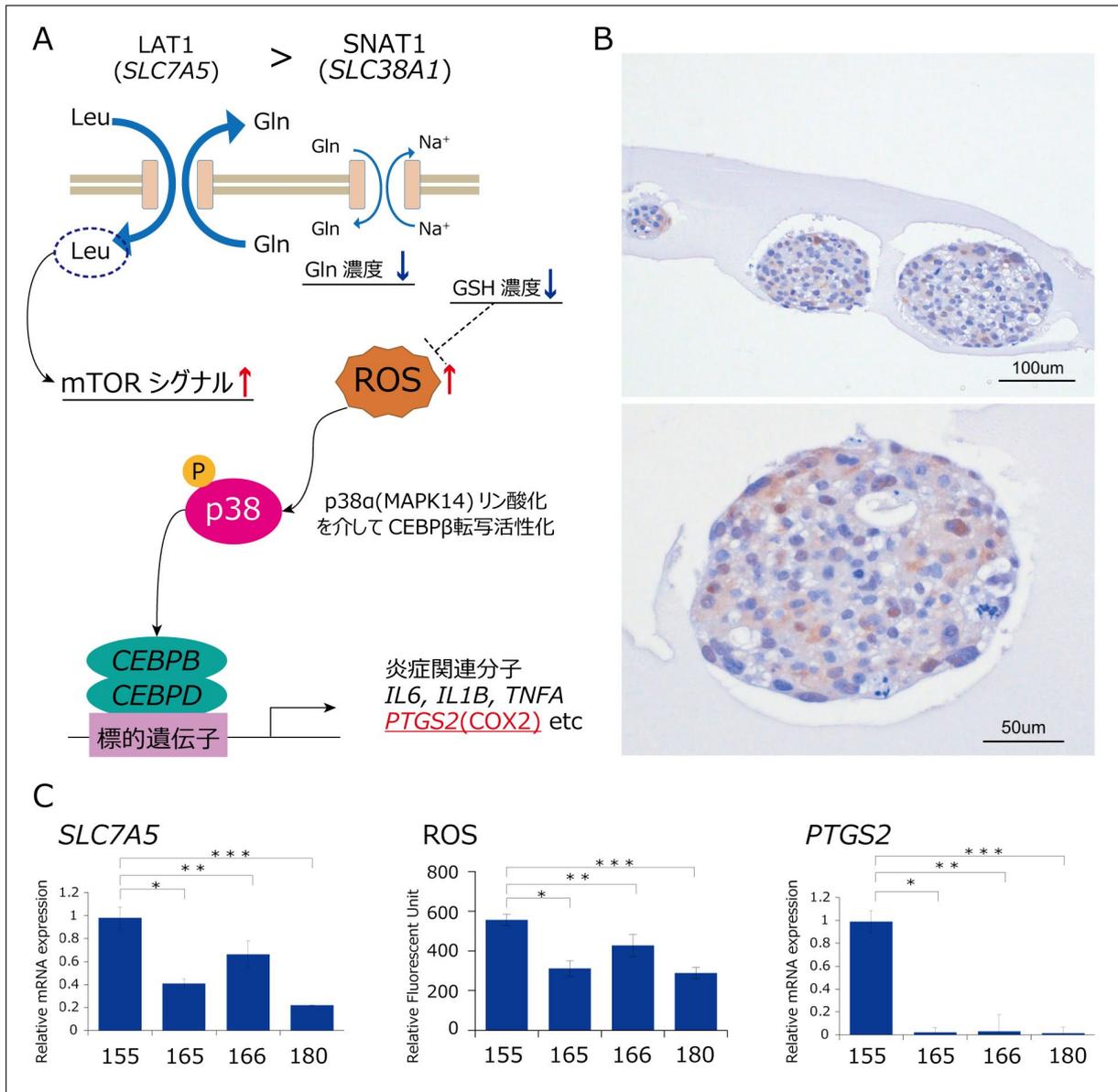


図 19.



XI. 表

表 1. 解析対象とした患者の臨床病理学的情報を示す.

Table1 解析対象としたPDOの臨床病理学的特徴

PDO	年齢	閉経状況	採取部位	組織型	ER*	PgR*	HER2	グレード	Ki67	LVI**
154	53	前	乳腺	IDC***	4+2	3+2	+	3	55%	+
155	51	前	乳腺	IDC	0+0	1+1	+	3	95%	+
165	41	前	乳腺	IDC > IMPCa***	5+3	5+3	-	3	35%	+
166	48	前	乳腺	IDC	0+0	0*0	+	3	65%	-
180	32	前	乳腺	IDC	5+3	5+3	-	1	25%	+
195	46	前	乳腺	IDC	5+2	5+3	-	2	10%	-
202	45	前	乳腺	IDC	5+3	4+3	-	2	35%	-
203	53	後	乳腺	IMPCa > IDC	5+2	4+3	-	1	5%	-
207P	52	後	胸水	Adenocarcinoma	N/A [†]	N/A				
210	47	前	胸壁(再発部)	IDC	4+2	4+2	-	3	90%	-

* オールレッドスコア (=Proportion score+Intensity score) で算出.

** LVI (lymphovascular invasion; リンパ管侵襲)

*** IDC (invasive ductal carcinoma; 浸潤性乳管癌 9, IMPCa (invasive micropapillary carcinoma; 浸潤性微小乳頭癌)

[†] 細胞診による診断を行った.

表 2. PDO155 の二つのクラスター間で共通する遺伝子を緑で示す.

C2				C7		
Rank	gene	avg_log2FC	p_val	gene	avg_log2FC	p_val
1	COX6C	3.284	0	RAD21	2.485	6E-206
2	PPP1R1B	3.102	0	CKS2	2.261	7E-158
3	CHI3L1	2.890	1E-307	HSP90AB1	2.216	3E-187
4	EIF3H	2.388	0	POLR2K	2.169	9E-180
5	CRABP1	2.380	0	PPP1R1B	2.169	2E-179
6	CST3	2.250	1E-249	COX6C	2.025	1E-144
7	POLR2K	2.151	0	CRABP1	1.934	1E-194
8	HSP90AB1	2.116	0	SLC29A1	1.812	2E-167
9	AARD	2.083	0	CDK12	1.797	2E-182
10	S100A4	1.943	0	TOP2A	1.697	1E-201
11	MIEN1	1.911	0	CDC5L	1.646	7E-172
12	MRPL13	1.802	0	PSAT1	1.626	9E-176
13	SLC35B2	1.636	0	EIF3H	1.588	1E-134
14	EBAG9	1.618	0	SLC35B2	1.523	6E-153
15	RNF19A	1.596	0	AARD	1.517	2E-158
16	MRPL14	1.531	0	EBAG9	1.486	1E-168
17	DDIT4	1.520	2E-261	MRPL13	1.436	3E-138
18	SCRG1	1.513	0	RNF19A	1.430	1E-149
19	ZG16B	1.481	2E-53	MIEN1	1.408	1E-141
20	AC104986.2	1.473	0	SLC7A5	1.381	8E-184
21	NES	1.461	0	MCM3	1.346	6E-109
22	CDC5L	1.455	1E-275	RPL7L1	1.315	2E-128
23	CDKN2A	1.414	3E-298	BIRC5	1.312	9E-171
24	VPS13B	1.382	0	UTP23	1.292	8E-163
25	CDK12	1.376	3E-271	PSIP1	1.287	3E-136

表 3. PDO165 の 4 つの ClustGS に含まれる遺伝子を示す。

ClustGS	Gene
165-ClustGS 1	<i>XBP1, CLU, CA12, CYP4Z1, TMEM45A, KTN1, PLAT, CP, GATA3, GALNT6, BHLHE40, SLC40A1, ASPH, MUCL1, TFAP2B, SC5D, PRLR, GMNN, TNFSF10, PMP22, FTH1, FOXA1, MPHOSPH6, ALDH3B2, MARCKSL1</i>
165-ClustGS 2	<i>KLK5, DKK1, TGFB2, MCAM, CAVIN1, THBS1, KRT17, S100A6, FILIP1L, CLDN1, KRT7, MYH9, LOXL2, KLK7, MYL9, FSTL1, IL32, ACTN1, ANXA1, MYL12B, KRT23, TAGLN, KLK10, ANXA3, NEXN</i>
165-ClustGS 3	<i>TOP2A, CENPU, NCAPG, CDK1, MKI67, ZWINT, TK1, BIRC5, FAM111B, TYMS, HMGB2, PCLAF, ASF1B, CEP55, NCAPH, NUSAP1, UBE2C, KIFC1, DLGAP5, CCNA2, PBK, HMMR, DEPDC1, KIF4A, PKMYT1</i>
165-ClustGS 4	<i>GABRP, SFRP1, KRT14, SPARC, KRT6B, TCN1, IL33, KRT5, NGFR, LTBP2, SAA1, APOE, STAC2, FBXO32, MYLK, NTRK2, SLC34A2, A2M, NDRG2, NFIX, ARL4A, DSC3, SLC25A37, CD59, CHI3L1</i>

* 下線太字は本文中で言及のある遺伝子である。

表 4. 7 つの meta-ClustGS で共通となる遺伝子を示す。

ClustGS	Gene
meta-ClustGS 1	<i>TOP2A, BIRC5, MKI67, TUBA1B, HMGB2, UBE2C, TPX2, CENPF, DLGAP5, CDK1, CNA2, NCAPG, CCNB1, PLK1, HMMR, KIF20A, AURKA, PTTG1, CENPA, PBK, ZWINT, H2AFZ, DEPDC1, CENPE, PRR11, HSP90AB1, TK1, CKS1B, CEP55, CENPU, PTMA, NEK2, PCLAF, HMGB1, TYMS, TUBB, NCAPH, CKS2, STMN1, UBE2T, ASPM, HSP90AA1, NUSAP1, KIFC1, PKMYT1, TTK, KIF2C, KIF4A, CDC20, IQGAP3, HMGN2, FOXM1, UBE2S, BUB1</i>
meta-ClustGS 2	<i>FAM111B, PCNA, RRM2, DTL, CCNE2, GINS2, MCM3, MCM4, MCM6, WDR76, E2F1, CDC6, CENPU, ZWINT, MCM2, MCM7, DUT, TK1, ZNF367, HELLS, CDK1, FEN1</i>
meta-ClustGS 3	<i>SFRP1, NTRK2, NGFR, STAC2, CHI3L1, GABRP, SPARC, RARRES1, LTF, SLC25A37, NDRG2, SAA1, APOE, LTBP2, EEF1A1, KRT14, CD59, KRT5, MYLK, CYP1B1, SCGB2A1, A2M, KRT6B, PTN, SCGB1D2, MGP, CITED4, TNFAIP2, SCGB2A2</i>
meta-ClustGS 4	<i>CXCL14, COL17A1, TIMP3, MYL9, MYLK, TAGLN, JAG2, SEMA5A, LOXL2, IGFBP5, TPM2, ACTA2, EFEMP1, PDGFA</i>
meta-ClustGS 5	<i>XBP1, TFAP2B, TMC5, AGR2, CYP4Z1, SPTSSB, CA12, MUC6, FOXA1, PRSS23, TMEM45A, SLC40A1, MLPH, TMEM45B, ANKRD30A, PLAT, GMNN, PRLR, MUCL1, GATA3, AR, KRT8, PMP22, ALDH3B2, TCIM</i>
meta-ClustGS 6	<i>KLK5, KRT17, TMSB4X, ANXA2, KLK7, LGALS1, S100A10, S100A6, S100A11, KRT23, KRT6B, FSTL1, ANXA1, TACSTD2</i>
meta-ClustGS 7	<i>XBP1, EEF1A1, KRT7, CCND1, ST3GAL1, AGR2</i>

* 下線太字は本文中で言及のある遺伝子である。

表 5. 各 PDO オリジナル ClustGS に含まれる遺伝子を示す。

ClustGS	gene
155-ClustGS 1	<u>EIF3H</u> , <u>PABPC1</u> , AARD, CRABP2, COX6C, TKT, TACSTD2, PIK3R3, SPTSSA, EEF1A1, NES, <u>EIF3E</u> , CST3, HIST1H2BG, CHI3L1, GSTP1, LY6D, UQCRB, AC104986.2, RACK1, <u>EIF2S3</u> , HIST2H2BE, SLC25A6, MIEN1, CEBPB
203-ClustGS 1	KRT19, KRT8, GRB14, SCGB2A2, SMOX, CRISP3, SCGB1D2, STC2, MAOB, DCAF10, DUSP4, SEMA3C, COL2A1, LURAP1L, RBPMS, COX6C, GPRC5A, EVL, CD36, KRT18, NAT1, C6orf141, FAM198B, ZBTB18, CALML5
203-ClustGS 3	KRT15, BMPR1B, PRKACB, MAP3K1, MUCL1, COX7A1, UGT2B11, ITPRID2, PDZK1IP1, CST4, S100A7, H1F0, MGP, JUN, TPT1, NFKBIZ, HIST1H1C, ELOVL5, FTH1, HOXB3, BST2, SLC39A6, NTN4, NPY1R, MRPS30.DT
203-ClustGS 4	KCNJ3, APOD, IFI27, CSTA, PSCA, TRGC1, CTTN, DNAJC1, IFI6, BRINP3, HSPB8, POF1B, MDK, FAM3B, BMI1, ANO1, CRABP2, PABPC1, TPM4, YWHAZ, CD63, CFL1, ATP6AP1, ATP5F1E, MARCKS
207P-ClustGS 2	MAGEA4, HMGB2, DHTKD1, LGALS3BP, STMN1, HSPB1, PCLAF, VIM, HCLS1, HMGB1, FRZB, CALM1, TYMS, CENPU, MCM10, RRM2, WFDC2, H2AFZ, ATAD2, PTMA, DUT, SSX1, CAPRIN1, RARRES1, CDK4
207P-ClustGS 4	<u>VIM</u> , <u>CYP4Z1</u> , NAP1L1, PPP1R1B, LGALS3BP, DUSP6, MAGEA4, ST8SIA6, AS1, TPT1, PIP, HSPB1, RARRES1, CD59, SELENOP, SERPINI1, TFAP2B, CD36, FAIM2, PLD3, IFITM3, HCLS1, FMOD, FRZB, GRN, CLU
207P-ClustGS 5	NDUFS8, PRKAR1A, MALAT1, MAP1LC3B, AP3D1, ATXN7L3B, SSR4, RAB3D, RTF1, DDX3X, AKT1, STRAP, LRP10, SF3B1, RDH11, CD151, MMADHC, CCT8, MAGED1, PTBP1, UBE2Z, ATP6V1A, SRSF10, CIRBP, MANF
210-ClustGS 2	MUCL1, SCD, TFF3, APOD, PKM, TFF1, TRGC1, SPINT2, EEF1A1, CD24, HSP90AB1, BRINP3, MAGED1, KCNC2, HSPB1, RHOBTB3, S100A6, TMED3, DHCR7, CLU, CXCL17, CEACAM5, ARF1, NUCB2, S100A14
210-ClustGS 5	ECM1, SERPINI1, CXCL14, BASP1, IFI6, S100A14, STS, UPK2, NCAM2, PSCA, FAM107B, MX1, PLAT, TCEAL4, CCL28, TSPAN8, SLPI, PHLDA1, SELENBP1, ADAM8, EGLN3, STC1, PLA2G2A, SLC39A6, RALBP1

* 下線太字は本文中で言及のある遺伝子である。

表 6. PDO155 オリジナル GP に含まれる遺伝子を示す.

Gene Program	gene
155-GP#7.1	<i>ZG16B</i> , <i>CHI3L1</i> , <i>RARRES1</i> , <i>SCGB2A2</i> , <i>THRSP</i> , <i>SLC12A2</i> , <i>NDRG1</i> , <i>CST3</i> , <i>CD59</i> , <i>SPARC</i> , <i>NTRK2</i> , <i>FOS</i> , <i>SFRP1</i> , <i>STARD3</i> , <i>TMEM213</i> , <i>SAT1</i> , <i>VIM</i> , <i>CSRP1</i> , <i>CAMP</i> , <i>SELENOP</i> , <i>CITED4</i> , <i>LMO4</i> , <i>CD44</i> , <i>DBI</i> , <i>DUSP6</i> , <i>SCGB2A1</i> , <i>TXNIP</i> , <i>YBX2</i> , <i>TMEM87A</i> , <i>EN1</i> , <i>KRT19</i> , <i>NXPH4</i> , <i>FZD1</i> , <i>SCGB1D2</i> , <i>RDH10</i> , <i>TRIB1</i> , <i>CD82</i> , <i>NDRG2</i> , <i>MBOAT2</i> , <i>TMEM45A</i> , <i>AP1G2</i> , <i>PADI2</i> , <i>SCRG1</i> , <i>SELENBP1</i> , <i>GRB7</i> , <i>JUNB</i> , <i>CASP14</i> , <i>OBP2B</i> , <i>FBXO32</i> , <i>CTNNB1</i>
155-GP#7.4	<i>STEAP4</i> , <i>LY6D</i> , <i>SPON2</i> , <i>TLDC1</i> , <i>LCN2</i> , <i>G6PD</i> , <i>GCLM</i> , <i>ANXA1</i> , <i>TAOK1</i> , <i>CD14</i> , <i>SERPINA5</i> , <i>C3</i> , <i>OSBP</i> , <i>MUC15</i> , <i>PTPN14</i> , <i>ADAM9</i> , <i>ALCAM</i> , <i>RCOR1</i> , <i>NCOA3</i> , <i>SQSTM1</i> , <i>AHR</i> , <i>IFNGR1</i> , <i>FLNA</i> , <i>EIF4G3</i> , <i>MAP7D3</i> , <i>AC009283.1</i> , <i>MIA2</i> , <i>CYP1B1</i> , <i>BOD1L1</i> , <i>VAT1</i> , <i>SLFN5</i> , <i>PRRG1</i> , <i>PTK7</i> , <i>PDXK</i> , <i>TRIM2</i> , <i>TRIM38</i> , <i>TMEM179B</i> , <i>AACS</i> , <i>GUK1</i> , <i>SWAP70</i> , <i>PBRM1</i> , <i>KLK6</i> , <i>MYOF</i> , <i>FBNP1L</i> , <i>GAPVD1</i> , <i>RAB29</i> , <i>SESN3</i> , <i>IDH1</i> , <i>SLC11A2</i> , <i>RTL8B</i>
155-GP#9.2	<i>SLC7A5</i> , <i>PTBP3</i> , <i>PTPN11</i> , <i>SYNCRIP</i> , <i>BRD4</i> , <i>NFIX</i> , <i>CBX5</i> , <i>NFIC</i> , <i>DDX6</i> , <i>NFIB</i> , <i>LARP1</i> , <i>GTF3C4</i> , <i>CDK12</i> , <i>FAM120A</i> , <i>EIF3A</i> , <i>IMPAD1</i> , <i>RCC2</i> , <i>NOLC1</i> , <i>SMARCC1</i> , <i>UHMK1</i> , <i>YWHAG</i> , <i>PAPOLA</i> , <i>SLC38A1</i> , <i>DSC3</i> , <i>PRRC2C</i> , <i>MYH9</i> , <i>GOLGA4</i> , <i>SBNO1</i> , <i>DDX21</i> , <i>LMAN1</i> , <i>PRRC2B</i> , <i>KHSRP</i> , <i>TTC3</i> , <i>HDLBP</i> , <i>PSAT1</i> , <i>RAB10</i> , <i>ENAH</i> , <i>ARF3</i> , <i>BPTF</i> , <i>MIB1</i> , <i>DSC2</i> , <i>DCAF7</i> , <i>TRPS1</i> , <i>RB1CC1</i> , <i>LRRC58</i> , <i>HNRNPU</i> , <i>CCND1</i> , <i>HNRNPR</i> , <i>B4GALT5</i> , <i>IKZF3</i>

* 下線太字は本文中で言及のある遺伝子である.

XII.謝辞

本研究のご指導いただきました，がん研究会有明病院（連携）がん治療外科学 佐野武教授，東北大学病院総合外科 亀井尚教授に深くお礼申し上げます。定期的に大学院総会を主催いただいた，がん研究所 野田哲生先生，広田亨先生，高橋俊二先生に心よりお礼を申し上げます。検体回収・研究所と病院の連携にご尽力いただいた，乳腺センター高橋洋子先生，尾崎由記範先生，高野利実先生，オルガノイド培養法をご教授いただいたがん生物部八尾良治先生，NEXT-Ganken プログラムディレクターの大野真司先生，副ディレクターの上野貴之先生，病理部の大迫智先生，他，乳腺センターの皆様，実験のご指導をいただいたがん研究所がんエピゲノムプロジェクト・NEXT-Ganken プログラムの皆様，解析を全面的にサポートいただいた糸川昂平先生，そしてプロジェクトリーダーの丸山玲緒先生に深く御礼申し上げます。