



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Research on tumor microenvironment of brain metastases lung adenocarcinoma
Author(s)	HE, Jintao
Description	配架番号 : 2949
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16639号
Issue Date	2025-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16639
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98249
Type	doctoral thesis
File Information	HE_Jintao_review.pdf, 審査の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 He Jintao

主査 教授 青山 英史
審査担当者 副査 教授 園下 将大
副査 准教授 橋本 茂

学 位 論 文 題 名

Research on tumor microenvironment of brain metastases lung adenocarcinoma
(脳転移性肺腺癌の腫瘍微小環境に関する研究)

本学位論文は、肺腺がん脳転移（BM-LUAD）の新規細胞株樹立法の確立に関する研究である。従来、患者由来 BM 細胞の入手困難さや動物モデルの限界により研究の進展は妨げられてきた。左心室内注射は信頼性が高いが高コスト・長時間を要し、また従来の頭蓋内注射は迅速である一方、多数の細胞を用いるため自然な転移過程と乖離し、再現性に乏しい細胞株が得られる可能性があった。本研究の目的は、少数細胞を用いた改良頭蓋内注射法により、生物学的妥当性と効率性を兼ね備えた BM-LUAD 細胞株を樹立し、その特性と進化を解析し臨床的関連性を検証することである。

EGFR 変異を有する肺腺がん細胞株 H1975 を親株とし、海馬領域への少数細胞連続注射を 3 回実施することで H1975-BM1、BM2、BM3 を順に樹立した。転移能は左心室内注射により評価し、腫瘍形成は IVIS イメージングで追跡した。さらに皮下移植モデルで腫瘍増殖を検証し、遊走能・接着能・増殖能などの *in vitro* アッセイおよび RNA シーケンス解析を行った。臨床サンプルとの比較には GSE131907 を用いた新規バイオインフォマティクス手法を適用し、CIBERSORT により転写プロファイルを解析した。最後に WGCNA を用い転移段階特異的遺伝子モジュールとハブ遺伝子を同定した。

結果として、BM2・BM3 移植マウスは BM1 移植群に比し生存期間が有意に短縮し、BM3 は高い脳親和性を示した。BM1 は高い遊走能を保持する一方、BM3 は遊走能が低下するが強い細胞間接着とクラスター形成を示し、循環腫瘍細胞の特徴を備えていた。増殖能は *in vitro* では BM 株で低下したが、*in vivo* では BM3 由来腫瘍が最大で嚢胞形成を伴い、生理的環境下での旺盛な増殖・分泌活性を示した。単一細胞 RNA-seq 解析では、脳転移に豊富な C0・C1・C3 クラスターが同定され、H1975 から BM3 へ進むにつれ C0・C1 が増加した。これによ

り、樹立株が臨床脳転移の転写プロファイルを段階的に獲得することが示された。WGCNA では、BM1 に Wnt シグナルや ECM 関連遺伝子を含む「ブラウン」モジュール、BM3 に接着・炎症応答に関連する「グリーンイエロー」モジュールが特異的に同定され、RAB25 が BM3 の主要ハブ遺伝子として抽出された。さらに RAB25 は臨床 BM-LUAD においても高発現していることが確認された。

質疑応答については、まず主査の青山から、「少数細胞の使用とプロセスの繰り返したことのどちらが脳転移に特異的な細胞特性の獲得に寄与したと考えるか」、「性質の似ている BM2 ではなく BM3 を解析に用いた理由」、「BM1 と BM3 の違いは細胞数だけなのに、なぜ BM3 の方が強い細胞特性を示すのか」と質問があり、それぞれに対して「少数細胞使用の寄与」、「BM2 の不安定性」、「BM3 は進展段階を再現しているため」と回答があった。次に副査の園下教授から「BM1〜3 樹立における条件の違いについて」、「細胞の表現型進化について」、「マウス数が少ない点について」質問があり、それぞれに対して「BM1 は 500 細胞、BM2/3 は再現性と不均一性維持のため 4000 細胞を使用した」、「最適法は継代比較だが、本研究は簡便で汎用的な手法を重視」、「少数例だが BM3 は 57%で脳転移し信頼性あり」と回答があった。最後に副査の橋本准教授から、「in vitro と in vivo での差異について」、「CTC クラスター検証が不足している点について」、「BM3 特異的遺伝子の評価限界について」質問があり、それぞれに対して「in vitro と in vivo の選択圧差が BM3 の適応進化を生んだ」、「BM3 の CTC クラスター形成は今後 in vivo で検証予定」、「TCGA 解析は限界あり、今後は臨床検体で検証予定」と回答があった。

本研究は新規 BM-LUAD 細胞株を確立し、段階的な表現型・転写プロファイル進化を実証するとともに、臨床病態に対応する分子基盤を明らかにした点に新規性を認め、有力な研究基盤となるモデルの提供という点で大きな意義を有する。また質疑応答における討論の内容を踏まえ、申請者が博士（医学）の学位を授与されるのに十分な資格を有すると判定した。