

令和 5 年 5 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03510

研究課題名(和文) がん脳転移微小環境分子基盤の統合的理解と治療への応用

研究課題名(英文) Integrated understanding of the molecular basis of the cancer brain metastasis microenvironment and its therapeutic application

研究代表者

平田 英周 (Hirata, Eishu)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号：40761937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究室で独自に開発した新規グリア細胞培養法(MGS法)およびがん脳転移マウスモデルを用いた解析により、肺癌脳転移に対する新規治療標的候補分子として代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1)を同定した。脳に転移したがん細胞ではアストロサイト由来のWnt-5aを介したPRICKLE1-RESTの制御によってmGluR1の発現が誘導され、mGluR1シグナル依存性の増殖を示すようになる。その分子機構としてmGluR1がグルタミン酸依存性に上皮成長因子受容体と直接相互作用し、その分解を抑制することで下流へのシグナル伝達を増強することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳に転移したがん細胞がmGluR1シグナル依存性を示すことは治療に対する脆弱性ともなり得ると考えられ、実際にmGluR1はオシメルチニブに抵抗性を示す脳転移肺癌細胞においても有効な治療標的となり得ることが示された。これらの結果はMGS共培養系ががん細胞とグリア細胞との相互作用を検討するための極めて有用なプラットフォームであることを示すと同時に、脳転移肺癌に対する新たな治療戦略としてmGluR1標的療法の可能性を示すものである。したがって今後の期待される研究の発展や新規治療法開発への貢献も含め、その成果は学術的・社会的意義の高いものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We develop a simple and stable glial culture method, termed mixed-glial culture on/in soft substrate (MGS), which favourably mimics the brain microenvironment for various types of cancer. Utilizing this method, we discover that lung cancer cells become overly dependent on metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) signalling in the brain microenvironment. Mechanistically, interactions with reactive astrocytes induce mGluR1 in cancer cells through the Wnt-5a / prickle planar cell polarity protein 1 (PRICKLE1) / RE1-silencing transcription factor (REST) axis. Induced mGluR1 directly interplays with epidermal growth factor receptor (EGFR), which activates extracellular signal-regulated kinase (ERK) in a glutamate-dependent manner. Notably, mGluR1 may also be an alternative target for osimertinib-resistant brain metastatic lung cancer.

研究分野：腫瘍細胞生物学

キーワード：がん脳転移 脳微小環境 グリア細胞 代謝型グルタミン酸受容体 肺癌

1. 研究開始当初の背景

がんの転移と再発はがん治療を困難にしている最大の要因であるが、特に脳転移を来たした場合の予後は極めて厳しく、生存期間中央値は1年半に満たない¹。また脳転移は精神・運動の両面から機能予後を悪化させ患者のQOLを急激に低下させる。さらに医療の進歩に伴うがん全体の予後改善に伴って、脳転移症例は増加の一途をたどっている²。がん脳転移の克服は現代のがん研究が取り組むべき喫緊の課題である。

がん脳転移に対する治療法としては化学療法、放射線治療、分子標的治療および免疫療法が挙げられる³。どの治療法も一定の効果を示しているが、これらに対する治療耐性の出現が臨床的に大きな問題となっている。この一因としてがんの不均一性が指摘されており、ゲノム不安定性から絶えず多様性を生み出すがん細胞のみを標的とすることへの限界が指摘されている。これを克服するアプローチとして腫瘍微小環境を標的とした治療戦略が提案されており、線維芽細胞やマクロファージ、血管内皮細胞を標的とした治療法の開発が進んでいる。一方、脳組織の微小環境は他臓器とは大きく異なっており、がん脳転移における微小環境を標的とした治療戦略の研究開発は大きく遅れている。

申請者は活性化アストロサイトによる脳転移がん細胞のエピジェネティックリプログラミングが、がん細胞のその後の運命決定 (= 死滅・生存・休眠・増殖) に重要な役割を担っていることを明らかにした⁴。またこれら活性化アストロサイトにはがん促進性とがん抑制性の両面が存在し、微小環境中に存在する液性因子やミクログリアとの相互作用がこの形質転換に重要な役割を担っていることを示唆するデータも得た。しかしながら、がん脳転移における微小環境ネットワークとその制御機構に関しては現段階ではそのほとんどが不明であった。

2. 研究の目的

そこで本研究課題ではがん脳転移マウスモデルと *in vitro* 共培養系を用いた解析を連動させ、がん脳転移微小環境におけるがん細胞とグリア細胞との相互作用を統合的に明らかにし、がん脳転移の進展に関わる分子・シグナル伝達経路の同定とこれを標的とした新たな治療戦略の開発を目標として研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 共培養系を用いた薬剤スクリーニング

我々が独自に開発した *in vitro* 共培養系を用いた薬剤スクリーニングにより、がん脳転移の進展に関わる分子・シグナル伝達経路を描出した。

(2) グリア細胞との相互作用によるがん脳転移進展の分子機構の解析

上記によって同定されたがん脳転移促進に関わる分子・シグナル伝達経路に関して、その詳細な分子機構の解析を行った。

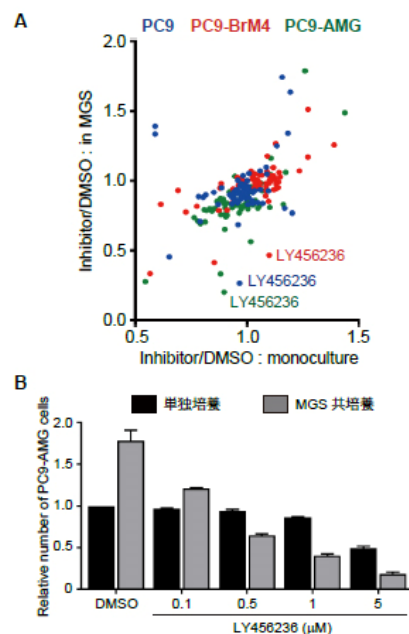
(3) 治療標的としての検証

同定した分子・シグナル伝達経路ががん脳転移に対する治療標的となり得るか、マウスモデルを用いて検証した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 共培養系を用いた薬剤スクリーニング

申請者らは画期的なグリア細胞の *in vitro* 培養法 (Mixed-glial culture on/in soft substrate : MGS 法) を開発することに成功した。この培養法ではマウス新生仔脳組織由来の混合グリア細胞を極めてやわらかい基盤上 (ヤング率 < 0.1 kPa) で培養しており、この方法によってこれまで困難であった初代培養ミクログリアの長期培養が可能となった。また従来の培養法で



【図1】 LY456236 は MGS 共培養されたがん細胞の増殖を強く抑制する。

(A) ヒト肺がん細胞株 PC9 およびその亜株を用いた薬剤スクリーニング。がん細胞の増殖を脳転移特異的に抑制する化合物として、mGluR1 特異的阻害剤である LY456236 を同定した。

(B) LY456236 は MGS 共培養された場合のみ、容量依存性にごん細胞の増殖を強く抑制する。

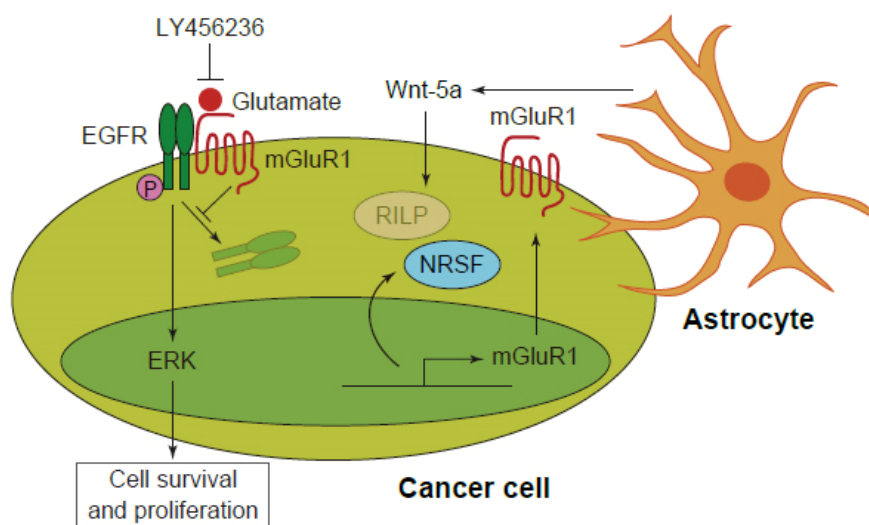
は2週間程度で失われていたアストロサイトの可塑性を数か月以上に渡って保持することも可能となり、がん細胞とグリア細胞との複雑なネットワークを長期間に渡って解析することが可能となった。

この MGS 共培養系を用いた薬剤スクリーニングにより、脳微小環境においてがん細胞の生存と増殖を規定する分子として metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) を同定した【図 1A】。mGluR1 はグループ I 代謝型グルタミン酸受容体に属する G タンパク質共役受容体であり、中枢神経系において L-グルタミン酸の受容体として主にシナプス後膜に局在している。シグナルを受けると phospholipase C (PLC)、イノシトール-3-リン酸 (IP3) を介して細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こすことでシナプス伝達に関与するが、その他に protein kinase C (PKC) を介して MAPK 経路の活性化を引き起こすことも知られている。mGluR1 を含む代謝型グルタミン酸受容体の発現はほぼ中枢神経系に限られており、他の組織では精巣、腎尿細管などにわずかな発現が認められるのみである。またがん組織では乳がんやメラノーマの一部においてある程度発現を示すことが報告されているものの、その意義は全く分かっていない。我々の実験においてもがん細胞における mGluR1 の発現はごくわずかであったが、がん細胞単独培養下では全く効果が認められない mGluR1 阻害剤 (LY456236) が、MGS 共培養下においてはがん細胞の増殖を用量依存性に強く抑制することが明らかとなった【図 1B】。この分子機構として、グリア細胞との共培養によってがん細胞に mGluR1 の発現が誘導されること、mGluR1 の発現が誘導されたがん細胞では、細胞の生存・増殖に関して mGluR1 下流シグナルへの依存性が增強していることが明らかとなった。

(2) グリア細胞との相互作用によるがん脳転移進展の分子機構の解析

MGS 共培養法およびがん脳転移マウスモデルを用いた解析により、アストロサイトとの相互作用によってがん細胞に mGluR1 の発現が誘導され、がん細胞の生存と増殖が mGluR1 シグナル依存性となることが明らかとなった。その分子機構は以下の通りである【図 2】。

- ① アストロサイト由来の Wnt-5a によってがん細胞の prickle planar cell polarity protein 1 (PRICKLE1) が核膜周囲から転移し、これに伴って転写抑制因子である RE1-silencing transcription factor (REST) が核外に移行する。
- ② REST の核外移行により、mGluR1 の発現が誘導される。
- ③ 発現誘導された mGluR1 は EGFR と直接相互作用することによって、その発現をタンパクレベルで増加させる。
- ④ EGFR および活性化 EGFR (リン酸化 EGFR) の増強により、下流の ERK 活性化を介してがん細胞の生存・増殖が促される。
- ⑤ 以上の分子機構によって、mGluR1 の発現が誘導されたがん細胞は mGluR1 シグナル依存性となり、mGluR1 阻害剤である LY456236 によってその増殖が強く抑制される。



【図 2】 アストロサイトとの相互作用によるがん細胞での mGluR1 の発現誘導と誘導された mGluR1 シグナルへの依存性増強の分子機構

(3) 治療標的としての検証

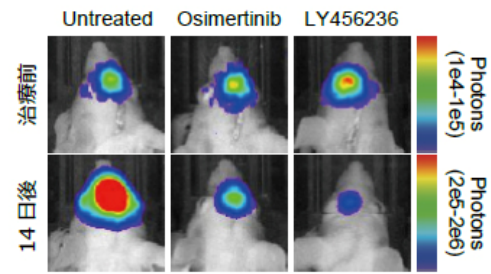
MGS 共培養系およびがん脳転移マウスモデルを用いた検証により、LY456236 は EGFR 変異を有する肺がん脳転移の進展を抑制することが明らかとなった。一方、EGFR 変異を有する肺がんには EGFR 阻害剤であるオシメルチニブが有効であることが知られている。そこで本研究ではオシメルチニブ耐性となった場合でも mGluR1 が有効な治療標的となり得るかどうか検証を行った。結果、EGFR C797S 変異の獲得によってオシメルチニブ耐性を示す肺がん細胞の脳転移に対しても、mGluR1 の阻害が脳転移の進展を抑制することが明らかとなった【図 3】。

以上より、アストロサイトとの相互作用によって脳転移特異的にがん細胞に mGluR1 の発現が誘導され、これががん脳転移に対する新たな治療標的となり得ることが示された。本研究成果は、現在以下の論文として投稿中である。

Ishibashi et al., Brain mimetic co-culture experiments identify mGluR1 dependence as a vulnerability of lung cancer brain metastasis (under review)

参考文献

1. Kayama T, *et al.* Effects of Surgery With Salvage Stereotactic Radiosurgery Versus Surgery With Whole-Brain Radiation Therapy in Patients With One to Four Brain Metastases (JCOG0504): A Phase III, Noninferiority, Randomized Controlled Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, Jco2018786186 (2018).
2. Amsbaugh MJ, Kim CS. Brain Metastasis. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC. (2022).
3. Le Rhun E, *et al.* EANO-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up of patients with brain metastasis from solid tumours. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **32**, 1332-1347 (2021).
4. Hirata E, *et al.* The Brain Microenvironment Induces DNMT1 Suppression and Indolence of Metastatic Cancer Cells. *iScience* **23**, 101480 (2020).



【図 3】 mGluR1 はオシメルチニブ耐性を示す肺がん脳転移に対する治療標的となり得るヒト肺がん細胞株 PC9 に CRIPR/Cas9 ノックインシステムを用いて EGFR C797S 変異を導入し、オシメルチニブ耐性を有する細胞株を樹立した。これをヌードマウス脳内に移植し、脳転移の形成を確認後、オシメルチニブ (osimertinib) および LY456236 にて 14 日間治療を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kato Yui, Uto Takuya, Tanaka Daisuke, Ishibashi Kojiro, Kobayashi Akiko, Hazawa Masaharu, Wong Richard W., Ninomiya Kazuaki, Takahashi Kenji, Hirata Eishu, Kuroda Kosuke	4. 巻 4
2. 論文標題 Synthetic zwitterions as efficient non-permeable cryoprotectants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42004-021-00588-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sharma Gyanendra, Kato Yui, Hachisu Ayumi, Ishibashi Kojiro, Ninomiya Kazuaki, Takahashi Kenji, Hirata Eishu, Kuroda Kosuke	4. 巻 29
2. 論文標題 Synthesis of a cellulose dissolving liquid zwitterion from general and low-cost reagents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellulose	6. 最初と最後の頁 3017 ~ 3024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10570-021-04185-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kadokawa Riki, Fujie Tetsuo, Sharma Gyanendra, Ishibashi Kojiro, Ninomiya Kazuaki, Takahashi Kenji, Hirata Eishu, Kuroda Kosuke	4. 巻 11
2. 論文標題 High loading of trimethylglycine promotes aqueous solubility of poorly water-soluble cisplatin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-89144-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirata Eishu, Ishibashi Kojiro, Kohsaka Shinji, Shinjo Keiko, Kojima Shinya, Kondo Yutaka, Mano Hiroyuki, Yano Seiji, Kiyokawa Etsuko, Sahai Erik	4. 巻 23
2. 論文標題 The Brain Microenvironment Induces DNMT1 Suppression and Indolence of Metastatic Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101480 ~ 101480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101480	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kondo Natsuko, Hikida Masaki, Nakada Mitsutoshi, Sakurai Yoshinori, Hirata Eishu, Takeno Satoshi, Suzuki Minoru	4. 巻 12
2. 論文標題 Glioma Stem-Like Cells Can Be Targeted in Boron Neutron Capture Therapy with Boronophenylalanine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3040 ~ 3040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12103040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuroda Kosuke, Komori Tetsuo, Ishibashi Kojiro, Uto Takuya, Kobayashi Isao, Kadokawa Riki, Kato Yui, Ninomiya Kazuaki, Takahashi Kenji, Hirata Eishu	4. 巻 3
2. 論文標題 Non-aqueous, zwitterionic solvent as an alternative for dimethyl sulfoxide in the life sciences	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-020-00409-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 平田 英周
2. 発表標題 脳微小環境による脳転移がん細胞の運命決定機構
3. 学会等名 フォーラム富山「創薬」第53回 研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋 公二郎、平田 英周
2. 発表標題 新規in vitro共培養系を用いた脳転移微小環境を形成する細胞間相互作用の解明
3. 学会等名 2021年度 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田 英周
2. 発表標題 がん脳転移微小環境の細胞分子基盤
3. 学会等名 2021年度 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋 公二郎、平田 英周
2. 発表標題 The concept of cancer associated glial-network in brain metastasis
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田 英周
2. 発表標題 臓器特異的腫瘍微小環境
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eishu Hirata
2. 発表標題 Multifaceted interactions between cancer cells and glial cells in brain metastasis
3. 学会等名 The 16th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences & KEY FORUM 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eishu Hirata
2. 発表標題 Multifaceted interactions between cancer cells and glial cells in brain metastasis
3. 学会等名 International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eishu Hirata
2. 発表標題 Multifaceted interactions between cancer cells and glial cells in brain metastasis
3. 学会等名 The 8th Neuroscience Network in Kobe Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平田 英周
2. 発表標題 がん脳転移微小環境の細胞分子基盤
3. 学会等名 Breast Cancer Seminar in Hanshin 2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石橋 公二郎、平田 英周
2. 発表標題 転移性脳腫瘍におけるがん抑制性・促進性アストロサイトの制御メカニズム
3. 学会等名 第2回金沢大学がん進展制御研究所・国立がん研究センター研究所 若手研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平田 英周、石橋 公二郎
2. 発表標題 脳転移におけるがん促進性・抑制性アストロサイトの同定
3. 学会等名 公益財団法人MSD生命科学財団 合同研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平田 英周、石橋 公二郎
2. 発表標題 脳微小環境による脳転移がん細胞の休眠維持機構
3. 学会等名 第4回乳がん・転移若手研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石橋 公二郎、平田 英周
2. 発表標題 がん抑制性・促進性グリア細胞による脳転移の制御メカニズム
3. 学会等名 2020年度 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石橋 公二郎、平田 英周
2. 発表標題 脳転移におけるがん抑制性・促進性グリア細胞の解析
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 固体組成物、液体組成物、及び固体組成物の製造方法	発明者 黒田 浩介、平田 英周	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-004142	出願年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 脳転移がん抑制剤又は治療剤	発明者 平田 英周、石橋 公二朗	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-20000	出願年 2022年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 非プロトン性双性イオンを用いた未分化促進剤及び凍結保護剤	発明者 黒田 浩介、平田 英周	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/18668	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

脳微小環境によるDNMT1抑制が脳転移がん細胞の休眠と生存に關与する https://tcbb-kucri.wixsite.com/tcbb-kucri/iscience2010 双性イオン液体のライフサイエンスへの応用：溶媒革命によるDMSO依存からの脱却を目指して https://tcbb-kucri.wixsite.com/tcbb-kucri/communications-chemistry-2020
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に關連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------