

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16327

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Investigation of the cancer-glia network in the brain metastasis using MGS method

研究代表者

石橋 公二郎（Ishibashi, Kojiro）

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：10847601

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題は脳転移微小環境における細胞間相互作用をターゲットにした転移性脳腫瘍の治療法の開発を目指すものであり、独自に開発したin vitro共培養法を用いて脳転移微小環境の解析を行った。その結果、アストロサイトとの相互作用により代謝型グルタミン酸受容体の一種であるmGluR1の発現ががん細胞で大きく亢進し、細胞の生存がグルタミン酸依存的シグナルにスイッチすることを明らかにした。さらに、mGluR1を標的にすることで転移性脳腫瘍の進展を抑制することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上述のように本研究課題により、転移性脳腫瘍におけるがん細胞とアストロサイトの相互作用を解析した結果、脳転移がん細胞の生存にはmGluR1が重要であることを明らかにし、これを標的にすることで転移性脳腫瘍の進展を抑制することに成功した。このようなmGluR1を介した生存シグナルの亢進メカニズムは抗がん剤耐性のがん細胞でも観察され、mGluR1を阻害することにより抗がん剤耐性ががん細胞の脳転移の進展を抑制した。これらの結果から、本研究で明らかにした転移性脳腫瘍におけるmGluR1を介した生存シグナルの亢進は、これまで治療が困難であった抗がん剤耐性がん細胞に対する新たな治療法として大きく期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this project is to understand the cancer-glia network in the brain metastasis. By using a novel culture method for glial cells named MGS (Mixed glial culture on soft substrate) method, I successfully identified mGluR1 as a key molecule for cancer cell survival in the brain microenvironment. Furthermore, inhibition of mGluR1 in metastatic cancer cells suppressed the growth of cancer cells. So from these results, I identified mGluR1 as a novel therapeutic target for the cancer brain metastasis.

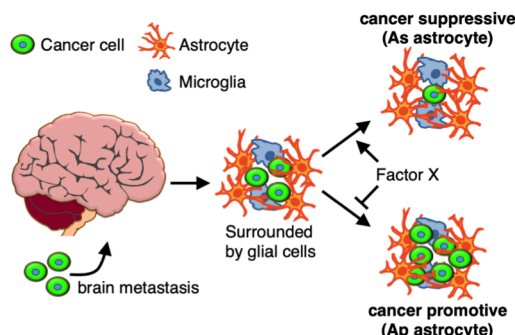
研究分野：腫瘍細胞生物学

キーワード：グリアネットワーク 脳転移微小環境 mGluR1

1. 研究開始当初の背景

がんに対する集学的治療は一定の効果を示しているが、手術により根治が難しい症例や遠隔転移のある症例では、経過中に出現する治療耐性が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 (Kienast et al., Nat Med, 2010)。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。

申請者の所属する研究室での先行研究において、ヒトおよびマウスの肺がん、乳がん、メラノーマ細胞株の心腔内接種によるがん脳転移マウスモデルを樹立し、脳転移形成機構の詳細な解析を行った。その結果、脳転移形成の超初期において、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 (= 死滅・生存・休眠・増殖) の制御に重要な役割を担っていることを明らかにした (Hirata et al., under review)。この結果より、がん脳転移の形成にはがん細胞の周囲に存在するアストロサイトが重要な役割を担っていることが明らかになった。また、近年、活性化アストロサイトの多様性が指摘されている。これまでの報告により、神経活動における活性化アストロサイトには A1 (= 神経毒性)・A2 (= 神経保護性) の 2 つのサブタイプが存在することが明らかとなっており、これらサブタイプの分化にはミクログリアとの相互作用が必須であることも報告されている (Zamanian et al., J Neurosci, 2012; Liddlelow et al., Nature, 2017)。がん脳転移マウスモデルを用いた予備実験において、脳転移したがん細胞の中には (1) 増殖するもの、(2) 増殖せずに生存しているもの、(3) 細胞死を起こしているものというように異なる運命を辿るものが存在することから、がん脳転移においても神経活動における A1・A2 アストロサイトのように As (= がん抑制性)・Ap (= がん促進性) のような異なるサブタイプのアストロサイトが存在することが示唆される【図1】。しかし、脳転移がん細胞の運命と周囲のアストロサイトの活性化レベルが必ずしも相関していなかったことから、脳転移関連アストロサイトのサブタイプの決定にはがん細胞との相互作用だけではなく、ミクログリアとの相互作用が重要なのではないかと考えた。そこで本研究では研究課題の核心をなす学術的な「問い」として、「脳転移微小環境におけるアストロサイト-ミクログリアの相互作用がどのように脳転移がん細胞の運命を制御しているのか？」を設定した。



【図1】本研究課題のモデル図
 原発巣から転移し、血管外へと遊走したがん細胞は脳微小環境中に存在するアストロサイトとミクログリアによって捕捉される。このときの何らかの環境因子(アストロサイトとミクログリアの配向、液性因子の局所濃度、がん細胞からのシグナルなど)の影響を受けることでアストロサイトとミクログリアの相互作用が変化することにより、がん脳転移微小環境ががん抑制性(As astrocyte)もしくはがん促進性(Ap astrocyte)に変化するのではないかと？

2. 研究の目的

本研究課題では上述の学術的な「問い」に答えるために、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、脳転移微小環境におけるがん促進性・抑制性の分子基盤を統合的に明らかにすることを目的とする。まずは、我々が独自に開発した新規 in vitro 共培養系を用いて、脳転移微小環境におけるアストロサイトとミクログリアの相互作用を解析し、この相互作用ががん脳転移の促進と抑制を制御する分子機構を明らかにする。次に、この結果に基づいてがん脳転移を阻害しうる標的分子を同定し、がん脳転移マウスモデルを用いた前臨床試験により脳微小環境を標的とした新たな脳転移治療戦略を提案する。

3. 研究の方法

申請者が独自に開発したグリア細胞の新規培養法である MGS 法 (Mixed glial culture on soft substrate) では、neonatal mouse の脳から抽出したアストロサイト・ミクログリア・オリゴデンドロサイトを選別することなく、やわらかいコラーゲンゲル上 (Young's modulus = 0.2 kPa) でがん細胞と共に培養しており、これによって通常の培養法では DNA メチル化によって失われてしまうアストロサイトの可塑性が長期間に渡って保持されることが明らかとなった。この MGS 法にがん細胞を組み込むことにより作製した in vitro 共培養系を用いて、金沢大学薬剤ライブラリーを用いたスクリーニングを行う。評価法としてはがん細胞の単独培養時には効果がないが、グリア細胞との共培養条件でのみがん細胞の数を増加または減少させる阻害剤を網羅的に探索することにより、グリア細胞によるがん抑制機能に関与する因子を同定する。

4. 研究成果

申請者が独自に開発した *in vitro* 共培養法を用いて薬剤スクリーニングを行った結果、がん細胞の単独培養時には効果を示さないが、グリア細胞との共培養時にのみがん細胞の細胞数を減少させる薬剤として LY456236 を同定した。LY456236 は代謝型グルタミン酸受容体 の一種である mGluR1 の阻害剤であることから、mGluR1 の脳転移における機能の解析を行った。その結果、肺がん細胞株 PC9 における mGluR1 の発現は周囲のアストロサイトによって引き起こされること、mGluR1 の発現亢進によりがん細胞の生存シグナルが増強されることで、原発巣の微小環境とは大きく異なる脳転移微小環境に適応できることを明らかにした。さらに、脳転移モデルマウスを用いた解析を行った結果、PC9 を心腔内接種することにより形成した脳転移巣が mGluR1 の阻害剤投与により大きく縮小することが明らかになった。

mGluR1 の転移性脳腫瘍における機能をより詳細に解析した結果、脳転移がん細胞において発現が亢進した mGluR1 が EGFR のシグナルを増幅させることにより、原発巣の微小環境とは大きく異なる脳転移微小環境に適応できることを明らかにした。EGFR 遺伝子変異を有する肺がんには、Osimertinib などの変異型 EGFR への分子標的薬が標準治療となっているが、新たな変異の獲得による治療抵抗性が問題となっている。そこで、CRISPR-Cas9 システムを用いて肺がん細胞株である PC9 の Osimertinib 耐性細胞株を樹立し、*in vitro* 共培養系を用いて mGluR1 阻害剤への感受性を検討した。その結果、親株である PC9 細胞はアストロサイト共培養条件において Osimertinib と mGluR1 阻害剤のどちらにも感受性を示した。一方、Osimertinib 耐性細胞株はアストロサイト共培養条件において Osimertinib 抵抗性を示したが、親株と同様に mGluR1 阻害剤への感受性を示した。さらに、脳転移マウスモデルを用いた実験においても Osimertinib 耐性細胞株に対して mGluR1 阻害剤が脳転移を大きく縮小させることが明らかになった。これらの結果より、Osimertinib 耐性脳転移肺がんの新たな治療法として mGluR1 を標的とした分子標的治療が有効であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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 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 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

1. 発表者名 石橋 公二郎、新城 恵子、近藤 豊、平田 英周
2. 発表標題 Investigation of novel therapeutic targets for brain metastasis using MGS method
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
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 MGS法を用いた脳転移がんグリアネットワークの解析
3. 学会等名 2022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 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

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、石橋公二郎	権利者 国立大学法人金沢大学
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

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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 . 本研究に関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
---------	---------