

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09184

研究課題名（和文）膠芽腫微小環境を含めたオートファジー機構の解析による新たな治療法の開発

研究課題名（英文）Revealing the mechanism of autophagy in glioblastoma in association with tumor microenvironment, and developing a new treatment strategy.

研究代表者

武内 勇人（Takeuchi, Hayato）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・客員講師

研究者番号：40838132

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）：悪性神経膠腫の手術摘出検体から、3次元オルガノイドを安定的に樹立しえた。また、悪性神経膠腫細胞株とマイクログリア細胞株とに、オートファジーの発現で蛍光を呈する遺伝子をそれぞれ導入した。これらの細胞株を共培養することによる細胞増殖の変化、オートファジーの状況を調査した。その結果、細胞増殖には単培養を行った場合と比較して有意な差は見られなかった。また、オートファジーの発現の測定については、共培養によって蛍光の減弱が見られたことから困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで明らかとはなっていなかった、マイクログリア細胞の3次元オルガノイドでの振る舞いについては、本研究期間内に解明するには至らなかった。しかし、文献的報告例がほとんど見られていない、マイクログリア細胞株へのリポフェクション法による遺伝子導入に成功し、マイクログリア細胞株のオートファジーについてその一端を解析することができた。これは、更なる研究の継続で悪性神経膠腫のみならず広く中枢神経疾患（頭部外傷、脳血管障害、脱髄・変性疾患など）全般に応用が可能である。

研究成果の概要（英文）：We have successfully established a method to culture 3-dimensional malignant glioma organoids. We also succeeded to introduce fluorescent gene which will radiate green or red fluorescence in autophagic state into glioma cell line and microglia cell lines.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：グリオーマ オートファジー 3次元オルガノイド 腫瘍微小環境 マイクログリア

## 研究成果報告

### 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は、集学的加療を行っても診断からの生存期間中央値は18から24か月と予後が悪く、新規治療法の開発は急務である。膠芽腫の治療抵抗性に関わる機構の一つとして、オートファジーが関与することが明らかとなってきた。オートファジーは正常細胞のホメオスタシスを維持するために不可欠な働きであるが、がん細胞ではオートファジーの制御異常を来しており、がん細胞の治療抵抗性の要因となっている。研究責任者らはこれまでに膠芽腫細胞株を用いた研究で、抗腫瘍薬である Rapamycin がオートファジーを誘導させることを明らかにした (Takeuchi H et al. *Cancer Res* 68: 3336-46, 2005)。しかし、オートファジーにより細胞死に至る腫瘍細胞が存在する一方で、生存、再増殖する細胞も存在しており、オートファジーの誘導による治療では効果が乏しいと考えられる。これに対して、近年オートファジーの抑制によってがん細胞が死滅する可能性が示唆されている。また、オートファジーの抑制により免疫チェックポイント阻害薬抵抗性の腫瘍が、感受性の腫瘍へと変化するとの報告も見られる。このように、オートファジーの抑制が今後の膠芽腫の新たな治療法となる可能性が考えられる。

膠芽腫周囲に浸潤しているマクロファージやミクログリア細胞はそれぞれ極性化や貪食能維持にオートファジーを利用している。特にマクロファージは M2 形に極性化することで抗腫瘍免疫を抑制し、マクロファージの浸潤密度が高いほど膠芽腫患者の予後が悪くなることも示されている。このように、オートファジーは膠芽腫の治療抵抗性と密接に関与していることが次第に明らかとなってきた。従って、これらマクロファージやミクログリアを含めた腫瘍微小環境(tumor microenvironment: TME)を *in vitro* で再現し、その環境下でのオートファジー機構を解明することは、膠芽腫治療におけるブレイクスルーとなり得ると考えられる。

近年、3次元オルガノイド培養法が、物理的、分子のおよび生理的に生体内の組織環境をより再現できるとして注目を集めている。この培養法は、腫瘍幹細胞をマトリゲル等のハイドロゲルマトリックスに埋め込んで培養する方法であるが、浮遊細胞のスフェロイドとは異なり高次の自己凝集能があり *in vivo* に近い流れで自発的に組織化するという特徴を持っている。このことから生体に類似した構造・機能を有する3次元組織として応用が始まりつつある。従来の2次元培養法では多数回の継代を経た樹立に時間を要し、外的な growth factor や血清の添加を必要とするほか、その過程で元のがん組織の特性も失われる部分が多く、薬剤の正確な治療効果を予測できない可能性が高い。これまでに申請者らは膠芽腫の3次元オルガノイドの樹立に成功しており、3次元オルガノイドを用いることでTMEでの膠芽腫細胞の様態をより実際の脳内の環境に近い状態で再現でき、TMEでのオートファジーがより正確に解析できると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、膠芽腫オルガノイドによるTMEを再現した環境でのオートファジー反応とその抑制による腫瘍縮小効果の検討。オートファジー誘発薬、オートファジー抑制薬など使用し

て検討し、それらの治療薬の TME 全体に与える影響を評価・解析することで将来の創薬への基盤を確立することである。

### 3. 研究の方法

#### (A) 3次元オルガノイドによる TME の再現

(1) 手術摘出標本から 3 次元オルガノイドを樹立する。その後、3 次元オルガノイドを形成した膠芽腫細胞とミクログリア細胞との共培養に最適な条件を設定する。続いて両細胞の形態を観察し、TME の再現性を確認（インターロイキン-1 $\beta$ 、-6、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  などの炎症性サイトカイン発現量を測定）する。

(2) 膠芽腫細胞の単培養時とミクログリア細胞との共培養時とを比較し細胞増殖能、形態変化、タンパク質発現の変化について解析するが、①増殖能については WST アッセイ（CytoSelectTM WST-1 細胞増殖アッセイ）を、②形態変化については光学顕微鏡的観察を、③タンパク質発現についてはウエスタンブロット（アポトーシス解析として Caspase-9、オートファジー解析として LC3, Atg13、ヘッジホッグシグナル解析として Gli1, Gli2, Shh, Ptch1, PI3K/Akt シグナル解析として Akt, p70S6K, MAPK シグナル解析として Ras, Raf, MEK, を測定する）をそれぞれ用いる。

#### (B) オートファジー解析

生細胞（3 次元オルガノイド）の状態でのオートファジーの観察を可能とするために、ミクログリアの細胞株（BV2）に GFP ラベルされた LC3（オートファジー小胞のマーカー）ベクターを、リポフェクション法を用いて導入する。次に緑色蛍光を生じている、すなわちオートファジーを来している細胞を確認する。

#### (C) シグナル特異的分子標的薬、その他の薬剤のスクリーニング

また、現在の標準治療薬であるテモゾロミドやオートファジー阻害薬として知られる 3-MA（3-メチルアデニン）、バフィロマイシン A1、クロロキン、（オートファジー遺伝子である Atg7: autophagy related 7 に対する）siRNA、あるいは腫瘍細胞で亢進している PI3K-Akt 経路を標的とした薬剤を加えることによるオートファジーの機構や腫瘍細胞死についても解析を行う。この解析では①TUNEL 染色を用いたアポトーシスの同定、②フローサイトメトリーを用いた細胞周期の測定、③ウエスタンブロットによる LC3, Akt, p70S6K などのオートファジー蛋白の発現量測定を行う。上記の結果から効率的な抗腫瘍治療方法を検討する。

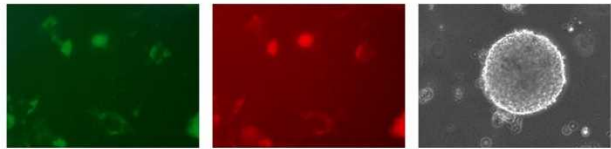
### 4. 研究成果

#### (A) 3次元オルガノイドによる TME の再現

前者については、患者から摘出した腫瘍検体を消化酵素で分離した後、上皮細胞基底膜成分を主成分とするゲルへ播種し、固形化させた後、幹細胞性を保ち増殖するための細胞培養液を添加し細胞培養インキュベーターにて培養を行うという方法で樹立に成功している。

## (B) オートファジー解析

マイクログリア細胞株におけるオートファジーの検出用を簡便とすべく、LC3 タンパク質に蛍光タンパク質を融合させたベクターを遺伝子導入した。この LC3 とは、MAP1LC3 : Microtubule-associated protein 1 light chain 3 の略称で、ユビキチン用の分子であり、オートファジーに際して type I (LC3-I) から type II (LC3-II) へと変換される。この LC3 に GFP (緑色蛍光) を、LC3 からグリシンを欠いたものを LC3 ΔG とし、これに RFP (赤色蛍光) をそれぞれ結合させたベクターが GFP-LC3-RFP-LC3 ΔG である。このベクターをリポフェクションの手法を用いて悪性神経膠腫細胞株およびマイクログリア細胞株に遺伝子導入した。悪性神経膠腫細胞株への導入は比較的容易に可能であったが、マイクログリア細胞株への導入は効率が低く、導入された細胞が安定的に蛍光を発現することが認められるまでに多くの時間を要した。



(左、中) オートファジーフラックスを評価する蛍光プローブ GFP-LC3-RFP-LC3ΔG が導入されたマイクログリア細胞株 (HMC3)。左は GFP-LC3 の導入により細胞質が緑色の蛍光を発している。中は RFP-LC3ΔG の導入により細胞質が赤色の蛍光を発している。この細胞において、RFP に対する GFP の蛍光強度比をとることで、オートファジーフラックスを評価することが可能である。  
(右) 樹立した膠芽腫の 3 次元オルガノイド。

また、これと並行して、神経膠腫細胞にオートファジーを誘起させる抗腫瘍薬であるラパマイシンをマイクログリアに投与し、その生存率、オートファジー誘引度などを解析した。

樹立した悪性神経膠腫オルガノイドに関して、本研究の予備実験としてその生理的特質を探った。これには、抗腫瘍薬投与による生存の観察や継代培養前後での遺伝子発現解析などである。この結果、オルガノイド培養は通常の 2 次元培養よりも、より生体内の状況を再現していると結論づけた。

Gene	original	2D		3D			
		P1	P3	P3	P5	P5	
MET	AMP	AMP	(-)	(-)	AMP	AMP	AMP
CDKN2A	HD	HD	(-)	HD	HD	HD	HD
MAP3K1	LOH	LOH	(-)	(-)	LOH	LOH	LOH

次世代シーケンサー解析による、膠芽腫細胞継代培養後の遺伝子変化。AMP: amplification, HD: homozygous deletion, LOH: loss of heterozygosity。通常の培養方法(2D)では、継代(passage: P3, P5)につれて遺伝子変異が失われていくが、3次元オルガノイド培養(3D)による継代では保たれていることが示された。

さらに、悪性神経膠腫オルガノイドにマイクログリア細胞株を共培養し、再現した腫瘍微小環境でのオートファジー等の細胞死を解析すべく研究を行った。このうち、予備実験としてのグリオーマ細胞株とマイクログリア細胞株との共培養を 2 次元培養下で行った結果、両細胞株の比率を変えたことによる増殖率の変化を有意な数字として検出することには結びつかなかった。これについては、条件を変更して再度実験しても同様の結果であった。また、GFP-LC3-RFP-LC3 ΔG ベクターを遺伝子導入したグリオーマ細胞株、マイクログリア細胞株のオートファジー発現の可視化についてはグリオーマ細胞株とマイクログリア細胞株との共培養によって蛍光の変化が認められはしたもののその蛍光強度は強いものではなかった。これらの実験の施行途中から実験室内で細胞の生育が不良となり、培養環境の問題と考えられた。このため、一旦培養を停止して環境調整を行うこととなったが、これに時間を費やしたことから研究の進捗は予定より大幅に遅延することとなった。

最終的には、本研究で目標としたオルガノイドとマイクログリア細胞株との共培養までの到達は研究期間内には達成することができなかった。

結語としては、これまで明らかとはなっていなかった、マイクログリア細胞の3次元オルガノイドでの振る舞いについては、本研究期間内に解明するには至らなかった。しかし、文献的報告例がほとんど見られていない、マイクログリア細胞株へのリポフェクション法による遺伝子導入に成功し、マイクログリア細胞株のオートファジーについてその一端を解析することができた。これは、更なる研究の継続で悪性神経膠腫のみならず広く中枢神経疾患（頭部外傷、脳血管障害、脱髄・変性疾患など）全般に応用が可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	山中 巧  (Yamanaka Takumi)  (20398382)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教   (24303)	
研究分担者	橋本 直哉  (Hashimoto Naoya)  (90315945)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授   (24303)	
研究分担者	高橋 義信  (Takahashi Yoshinobu)  (90347451)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師   (24303)	
研究分担者	梅林 大督  (Umebayashi Daisuke)  (90635575)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教   (24303)	

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