

令和 6 年 4 月 28 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09191

研究課題名（和文）遠隔転移の予防に向けた新規免疫調節因子の発現メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of expression mechanism of novel immunomodulators for prevention of metastasis

研究代表者

岩田 亮一（IWATA, Ryoichi）

関西医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：60580446

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）：現在、転移性脳腫瘍に対する治療は、手術切除と放射線治療が標準的治療であるが、患者の予後は悪い。がんの発生かつ治療抵抗性の根源として、がん幹細胞の存在が提唱されている。本研究では、肺癌脳転移巣およびそのがん幹細胞において、制御性T細胞調節因子であるICOSLGの発現を認めた。以上の研究成果は、ICOSLGが転移性脳腫瘍の治療の標的に成り得る可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における転移性脳腫瘍の罹患患者数は年間数万人以上と推計されている。また、転移性脳腫瘍の半数を占める肺がんの国内患者数は11万人である。脳転移開始細胞を標的とする治療法は、がん再発予防法として広く波及すると期待できる。

研究成果の概要（英文）：The standard treatment for metastatic brain tumors is surgical resection and radiation therapy, but the prognosis for patients is poor. The existence of cancer stem cells has been proposed as a source of cancer development and treatment resistance. In this study, we found the expression of ICOSLG, a regulatory T cell regulator, in lung cancer brain metastases and their cancer stem cells. These results suggest that ICOSLG may be a potential therapeutic target for metastatic brain tumors.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳転移 がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん遠隔転移の機序はいまだ不明な点が多く、脳転移を抑制する薬剤はない。また、脳は脳血液関門により薬剤が到達しにくいいため、抗がん剤は不応性である。現在、転移性脳腫瘍に対する治療は、手術切除と放射線治療が標準的治療であり、患者の予後は悪い。がんの発生かつ治療抵抗性の根源として、がん幹細胞の存在が提唱されている。そのため、がん幹細胞を標的とした治療薬の開発が世界中で行われている。脳転移巣には脳指向性をもつがん幹細胞が存在する。がん細胞が脳転移を起こすには、間葉系に転換するなどの過程が必要である。自己複製能と分化能を有するがん幹細胞は、表現型を自由自在に変化させることで、転移に必要な能力を獲得していると考えられる。そして、脳転移巣には脳転移開始細胞が濃縮されていると予想される。

研究代表者はこれまでにグリオーマ患者の手術検体からグリオーマがん幹細胞を単離し、その機能解析を行ってきた (Cancer Cell 2016)。そして、間葉系に転換したグリオーマ由来のがん幹細胞は制御性 T 細胞調節因子である ICOSLG (Inducible costimulatory ligand) を高発現していることを見出した。さらに、ICOSLG の発現が生命予後に影響を及ぼすことを世界に先駆けて証明した (Neuro Oncol 2020)。また、がん幹細胞を単離する手法を、転移性脳腫瘍にも応用し、がん幹細胞株を樹立してきた (Medical Molecular Morphology 2017)。脳転移巣から樹立したがん幹細胞は、マウスに多発性脳腫瘍を形成することから脳転移開始細胞と命名した (Cytometry Research 2018)。脳転移開始細胞を用いて脳転移の機序解明を行うべく、浸潤に関連する分子について解析を行った結果、免疫関連分子である ICOSLQ (Inducible costimulatory ligand) が発現していることを見出した。

### 2. 研究の目的

本研究課題の学術的「問い」は、ICOSLG が転移性脳腫瘍に対する新たな治療標的になりうるかである。そのため、脳転移開始細胞における ICOSLG の発現、発現メカニズム、および生命予後との関連を明らかにする必要がある。

### 3. 研究の方法

(1) ヘルシンキ宣言に基づいて関西医科大学の医学倫理審査委員会の承認のもと、転移性脳腫瘍の外科切除残余およびホルマリン固定パラフィンブロックを使用した。転移性脳腫瘍由来の脳転移開始細胞は三次元スフェア培養法を用いて樹立した (Neuro-Oncology 2020)。手術で切除されたがん組織 (0.1-1 g) をはさみにより細かく刻んだ。細切された組織を細胞剥離液 (Accumax(TM); ナカライテスク) 2 mL をいれた試験管に移し、37 °C の恒温槽で 5 分間振盪 (20 回/分) した。細胞培養液 8 mL を加え混和し、遠心 (40 ×g, 5 分) した。上清を捨て、細胞培養液 10 mL を加え混和し、超低接着表面ディッシュ (100 mm; Corning) で培養した。培養は、5% CO<sub>2</sub> / 95% 空気、37 °C の湿潤な環境で行った。細胞培養液は、D-MEM/Ham 's F-12 (和光純薬) に、NaHCO<sub>3</sub> (49 mM)、グルコース (26 mM)、L-グルタミン (3 mM)、MACS NeuroBrew-21 (5 mL; Miltenyi Biotec)、上皮成長因子 (EGF, 20 ng/mL; PeproTech)、線維芽細胞増殖因子 (bFGF, 20 ng/mL; PeproTech) およびペニシリン (100 U/mL) とストレプトマイシン (0.1 mg/mL) を添加したものを使用した。

(2) RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて、がん幹細胞から RNA を抽出した。バイオアナライザ電気泳動システム (Agilent 2100; Agilent) を用いて、RNA の品質を確認した。strand-specific ライブラリー調製法 (NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module; New England Biolabs) でシーケンスライブラリーを作製した。次世代シーケンサー (NovaSeq 6000; Illumina) を用いて、ライブラリー調製したサンプルの塩基配列を 1 検体あたり 12 GB で取得した。ソフトウェア FastQC を用いて、クオリティスコアを確認し、シーケンスの品質に問題がなかった。ソフトウェア Trimmomatic を用いて、シーケンスリードをトリミングした。ソフトウェア HISAT2 を用いて、トリミング後のシーケンスリードをリファレンスゲノム (hg38) へマッピングした。リードのマッピング率は 98.1-98.5% であった。ソフトウェア featureCounts を用いて、マッピングされた raw リード数をカウントした。ソフトウェア featureCounts を用いて、マッピングされたフラグメントのカウントを行い、TPM 値を算出した。

(3) 免疫関連分子である ICOSLG (CD275) を検出するための一次抗体として、抗 CD275 抗体 (LS-B2001; LSBio) を 50 倍に希釈して使用した。がん幹細胞マーカーである CD44 を検出するための一次抗体として、抗 CD44 抗体 (ab189524; abcam) を 400 倍に希釈して使用した。二次抗体は、Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG グロブリン抗体 (A32766; Invitrogen) および Alexa Fluor 555 標識抗ウサギ IgG グロブリン抗体 (A32794; Invitrogen) を使用した。脳転移開始細胞を 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定した。0.2% TritonX-100 により細胞膜の透過処理を行った。10% 正常口バ血清 (D9663; Sigma-Aldrich) によりブロッキングを行い、一次抗体 (抗 CD275 抗体および抗 CD44 抗体) と蛍光二次抗体を反応させた。DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, 1 μg/ml; 同仁化学研究所) を用いて細胞核を染色した。蛍光は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700; Carl Zeiss) を用いて観察し、画像を取得した。

#### 4. 研究成果

(1) 三次元スフェア培養法を用いて、転移性脳腫瘍の切除組織から、がん幹細胞を樹立した(7症例)。肺小細胞癌由来のがん幹細胞において、ICOSLGは細胞膜で発現を認めた(図1)。

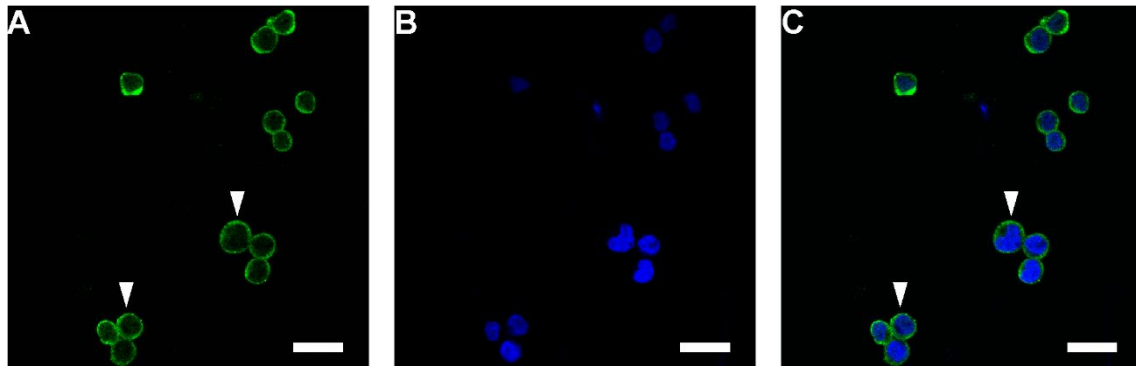


図1 脳転移開始細胞における蛍光免疫染色。(A) ICOSLG (矢頭)、(B)核染色、および(C)は(A)と(B)のマージ。スケールは20  $\mu\text{m}$

(2) 遺伝子変異、スプライシングバリエーションおよび融合遺伝子を明らかにするために、4症例の肺癌脳転移由来のがん幹細胞からRNAを抽出し、RNAシーケンスを実施した。しかし、ICOSLGの遺伝子の発現を検出できなかった。

(3) 病理組織標本におけるICOSLGの発現と分布を調べた。ICOSLGは扁平上皮癌、小細胞癌および腺癌の脳転移巣のCD44陽性細胞で発現していた(4例、図2)。

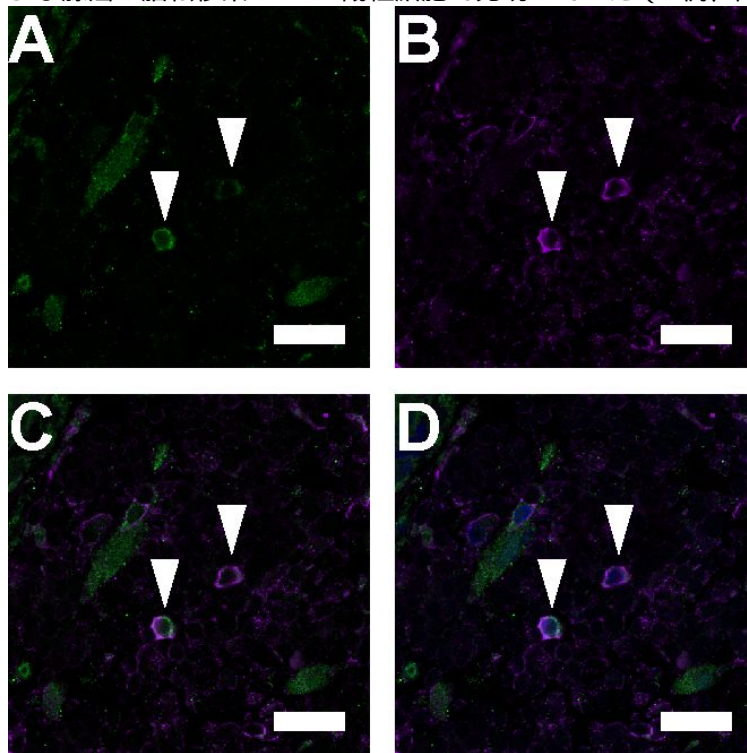


図2 肺癌脳転移巣における蛍光免疫染色。(A) ICOSLG (矢頭)、(B) CD44、(C)は(A)と(B)のマージ、および(D)は(C)と核染色(青)とのマージ。スケールは20  $\mu\text{m}$

以上の研究成果は、ICOSLGが転移性脳腫瘍の治療の標的に成り得る可能性を示唆する。

#### <引用文献>

Kim SH, Ezhilarasan R, Phillips E, et al. Serine/Threonine Kinase MLK4 Determines Mesenchymal Identity in Glioma Stem Cells in an NF-kappaB-dependent Manner. *Cancer Cell*. 2016; 29(2):201-213.

Iwata R, Lee JH, Hayashi M, et al. ICOSLG-mediated regulatory T cell expansion and IL-10 production promote progression of glioblastoma. *Neuro-Oncology*. 2020; 22(3):333-344.

Iwata R, Maruyama M, Ito T, et al. Establishment of a tumor sphere cell line from

a metastatic brain neuroendocrine tumor. *Medical molecular morphology*. 2017; 50(4):211-219.

岩田 亮一, 丸山 正人, 大舟 晃平, ほか. 転移性脳腫瘍とがん幹細胞の関連. *Cytometry Research*. 2018; 28(1):13-18.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Miyata Mayuko, Nonaka Masahiro, Ueno Katsuya, Naito Nobuaki, Yamamura Natsumi, Li Yi, Isozaki Haruna, Kamei Takamasa, Iwata Ryoichi, Takeda Junichi, Hashiba Tetsuo, Yoshimura Kunikazu, Asai Akio	4. 巻 37
2. 論文標題 A ventricular catheter that migrated into the fourth ventricle successfully removed using a neuroendoscope	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 British Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1753 ~ 1756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/02688697.2021.1900782	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 Hatta M, Kaibori M, Matsushima H, Yoshida T, Okumura T, Hayashi M, Yoshii K, Todo T, Sekimoto M.	4. 巻 25
2. 論文標題 Efficacy of a third-generation oncolytic herpes simplex virus in refractory soft tissue sarcoma xenograft models.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular therapy oncolytics	6. 最初と最後の頁 225 - 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2022.04.010.	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 Kaibori M, Matsui K, Hayashi M.	4. 巻 14(15)
2. 論文標題 Theranostics Using Indocyanine Green Lactosomes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14153840.	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 Shoji T, Hayashi M, Sumi C, Kusunoki M, Uba T, Matsuo Y, Hirota K.	4. 巻 58(11)
2. 論文標題 Sevoflurane Does Not Promote the Colony-Forming Ability of Human Mesenchymal Glioblastoma Stem Cells In Vitro.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medicina	6. 最初と最後の頁 1614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medicina58111614.	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 Masato Maruyama, Yousuke Nakano, Takuya Nishimura, Ryoichi Iwata, Satoshi Matsuda, Mikio Hayashi, Yuki Nakai, Masahiro Nonaka, Tetsuo Sugimoto	4. 巻 44(7)
2. 論文標題 PC3-Secreted Microprotein Is Expressed in Glioblastoma Stem-Like Cells and Human Glioma Tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological & pharmaceutical bulletin	6. 最初と最後の頁 910-919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00868	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 Yamamura Natsumi, Iwata Ryoichi, Suyama Takehiro, Ueno Katsuya, Kawano Haruka, Naito Nobuaki, Li Qiang, Miyata Mayuko, Li Yi, Fukuda Akihiro, Hashiba Tetsuo, Yoshimura Kunikazu, Nonaka Masahiro, Asai Akio	4. 巻 15(7)
2. 論文標題 破裂脳底動脈本幹部血豆状動脈瘤に対してステント支援下コイル塞栓術を行った一例 Stent-Assisted Coil Embolization of Ruptured Blood Blister-Like Aneurysm of the Basilar Artery: A Case Report and Literature Review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JNET:Journal of Neuroendovascular Therapy	6. 最初と最後の頁 449-455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Tomohiko Matsuo, Tomoko Isosaka, Yuichiro Hayashi, Lijun Tang, Akihiro Doi, Aiko Yasuda, Mikio Hayashi, Chia-Ying Lee, Liqin Cao, Natsumaro Kutsuna, Sachihito Matsunaga, Takeshi Matsuda, Ikuko Yao, Mitsuyoshi Setou, Dai Kanagawa, Koichiro Higasa, Masahito Ikawa, Qinghua Liu, Reiko Kobayakawa, Ko Kobayakawa	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Thiazoline-related innate fear stimuli orchestrate hypothermia and anti-hypoxia via sensory TRPA1 activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 2074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22205-0.	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 窒素含有化合物、前記窒素含有化合物を含む組成物、及び腫瘍悪性度の予測マーカー	発明者 林美樹夫、池田幸樹、岩田亮一	権利者 学校法人関西医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/036077	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 窒素含有化合物、前記窒素含有化合物を含む組成物、及び腫瘍悪性度の予測マーカー	発明者 林美樹夫、池田幸樹、岩田亮一	権利者 学校法人関西医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/14962	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔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
研究分担者	林 美樹夫  (HAYASHI Mikio)  (10368251)	関西医科大学・医学部・講師    (34417)	

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
---------	---------