

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23911

研究課題名（和文）がん脳転移関連アストロサイトの制御機構の解明

研究課題名（英文）Identification of the regulation mechanism of brain metastasis-related astrocytes

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） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、転移性脳腫瘍におけるグリア細胞の関与を検討するためのアッセイとして、グリア細胞同士の相互作用を保ったまま1ヶ月以上の長期間に渡り安定的に培養することが可能なMGS法（Mixed- glial culture on soft substrate）を開発した。この培養法を用いて、転移性脳腫瘍におけるグリア細胞に重要な因子を薬剤スクリーニングにより網羅的に探索した結果、脳転移微小環境におけるがん細胞の運命を制御するアストロサイトの膜タンパク質Xを同定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

これまでの転移性脳腫瘍研究では適切なin vitroモデルが存在しておらず、マウスを用いたin vivo研究により転移性脳腫瘍の分子メカニズムの解明が行われてきた。そこで、本研究課題で開発したMGS法により、in vitroにおいて脳転移微小環境を模倣することが可能となり、薬剤スクリーニングなどのハイスループットスクリーニングを行うことが可能になった。これにより、極めて予後不良である転移性脳腫瘍の根治療法へとつなげることができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In order to investigate the involvement of glial cells in brain metastasis, I successfully developed a simple and stable culture method MGS (Mixed- glial culture on soft substrate) for prolonged observation of astrocytes and microglia. By using this culture method, I performed drug screening to identify key molecules for brain metastasis-associated glial cells. As a result, I successfully identified a membrane protein X which is important for the cancer promotive phenotype of astrocytes.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：転移性脳腫瘍 グリア細胞

## 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を決定することが明らかになった。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。しかし、現在までにがん脳転移関連アストロサイトの制御メカニズムは明らかになっておらず、アストロサイトを標的としたがん脳転移治療法の確立には至っていない。この主な原因として、がん脳転移関連アストロサイトを解析、評価するモデル系が確立されてこなかったことが挙げられる。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。実際に、予備実験において、脳転移がん細胞に対してすべてのアストロサイトが同様の表現型を示さなかったことから、申請者は、がん脳転移関連アストロサイトの機能は、アストロサイトとがん細胞の相互作用だけではなく、多様性を持つアストロサイト同士の相互作用によって制御されている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、「脳転移がん細胞の周囲のがん脳転移関連アストロサイトの機能はどのようなメカニズムで制御されているのか？」を設定し、脳転移がんの出現により生じた多様なアストロサイト同士の相互作用を解析するモデル系の構築を目指す。

## 2. 研究の目的

従来のアストロサイトの研究では、脳転移がん細胞が隣接するアストロサイトにどのような影響を与えるのかについて着目されており、脳転移がん細胞に隣接するアストロサイトとその周囲のアストロサイトなど、アストロサイト同士の相互作用に着目した研究は行われてこなかった。そこで、本研究ではがん細胞の出現により多様性を獲得したアストロサイト同士の相互作用に着目して *in vitro* モデルを構築する。本研究により、がん細胞とその周囲の間質細胞の相互作用だけではなく、がん細胞の出現により多様性を獲得した間質細胞同士の相互作用が初期転移ニッチの形成に重要であるという新たな概念を提示するとともに、アストロサイトが作り出す初期脳転移ニッチの形成メカニズムを明らかにすることで、微小環境を標的としたがん脳転移を根治する革新的な治療戦略の基盤を創出できると考えている。

## 3. 研究の方法

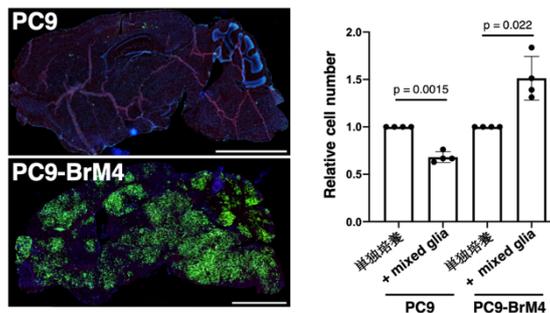
転移性脳腫瘍における脳微小環境の解析を行うために、*in vitro* 脳転移モデルの構築を試みた。具体的な手法としては、新生仔マウス (Day1~3) から脳を抽出し、Neural Tissue Dissociation Kits (Miltenyi Biotec)を用いて脳の構成細胞をバラバラに単離した後、脳内の硬さを再現した Type-I コラーゲンゲルの上で培養を行った。このように培養したグリア細胞の性質や遺伝子発現を従来の培養法と比較して解析した。さらに、この培養法 (MGS 法) にがん細胞を組み込むことにより *in vitro* 脳転移モデルを構築した。

このようにして構築した *in vitro* 脳転移モデルを用いて、脳転移がん細胞と周囲のグリア細胞の相互作用を解析した。さらに、がん-グリア間相互作用がどのような分子メカニズムにより制御されているのかを明らかにするべく、金沢大学が所有する薬剤ライブラリーを用いて薬剤スクリーニングを行った。

## 4. 研究成果

従来のアストロサイト培養法では、培養を続けることによりアストロサイトの性質が徐々に失われてしまっていくことが問題点であった。そこで、アストロサイトを含むグリア細胞の新たな培養法を構築すべく、新生仔マウス (Day1~3) から脳を抽出し、Neural Tissue Dissociation Kits (Miltenyi Biotec)を用いて脳の構成細胞をバラバラに単離した後、脳内の硬さを再現した Type-I コラーゲンゲルの上で培養を行った。その結果、従来の培養法で失われてしまっていたアストロサイトの性質や可塑性を1ヶ月以上の長期間に渡り保つことに成功した。この MGS 法 (Mixed-glia

culture on soft substrate) では、アストロサイトとミクログリア間の相互作用と基質の柔らかさがグリア細胞の性質を保つことに重要であることも明らかにした。この MGS 法にがん細胞を組み込み、三次元培養をすることで *in vitro* 脳転移モデルを構築した。はじめに、脳転移指向性肺がん細胞株である PC9-BrM4 を用いて *in vitro* 脳転移モデルの評価を行った。PC9-BrM4 細胞は脳転移研究に用いられる細胞であり、PC9 の親株をマウスに心腔内接種し、脳に転移した細胞を回収するという操作を繰り返すことにより、親株と比較してより脳に転移しやすくなる性質を持っている (Bos et al., Nature, 2009)。*in vitro* 脳転移モデルにおいては、親株の PC9 細胞と比較して、転移指向性細胞株である PC9-BrM4 細胞の細胞数が増加していた。この結果は、*in vivo* のマウス脳内におけるがん細胞の挙動と一致しており、*in vitro* 脳転移モデルは脳転移微小環境を模倣していることが明らかになった【図 1】。

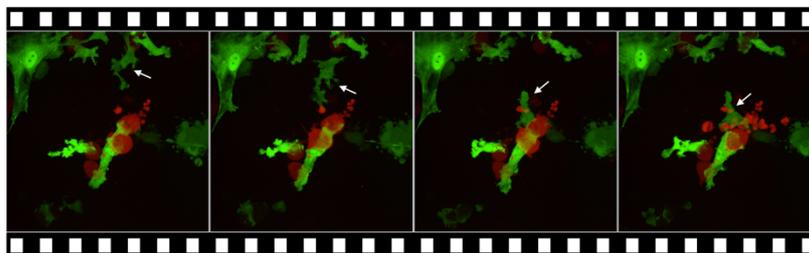


【図 1】 グリア細胞によるがん細胞の制御

左図：PC9(親株)、PC9-BrM4(脳転移指向性株)をマウスの心腔内に接種した28日後のマウス脳切片の画像。PC9では脳転移巣がほとんど観察されないが、PC9-BrM4では多くの脳転移巣が観察された。

右図：MGS法を用いて*in vitro*でmixed gliaと共培養したときのPC9、PC9-BrM4の細胞数。単独培養時と比較して、PC9はグリア細胞との共培養により減少するが、PC9-BrM4は増加した。

脳転移微小環境において、がん細胞の運命が mixed glia によりどのように制御されているのか検討するためにタイムラプスイメージングを行った。その結果、グリア細胞の一種であるミクログリアが PC9 を積極的に殺し、排除している様子が観察された【図 2】。また、金沢大学薬剤ライブラリーを用いた薬剤スクリーニングにより、がん細胞を排除する際にミクログリア内で活性化される Kinase-X を同定した。



【図 2】 ミクログリアによるがん細胞の殺傷

3次元モデルを用いてミクログリア(緑色)

+アストロサイト(標識なし)と共培養した肺がん細胞PC9(赤色)の様子を共焦点顕微鏡により経時的に観察した。ミクログリアが離れた場所からがん細胞へと接近し、直接接触することにより殺している様子が観察できる。

本研究課題では、転移性脳腫瘍における *in vitro* モデルを新たに構築したことにより、転移性脳腫瘍に関わる重要な因子を薬剤スクリーニングなどのハイスループットスクリーニングで網羅的に探索することが可能になった。これまでの脳転移研究では、マウスの脳内にはがん細胞を接種し、がん細胞や脳微小環境の phenotype を免疫染色法やルシフェラーゼを用いた解析により評価を行ってきた。この方法では、1つの薬剤に対してマウス1匹を使用することになり、倫理的、費用的、手間的にも現実的ではなかった。これらの理由より、申請者が開発した *in vitro* 脳転移モデルは脳転移研究において *in vivo* 実験に取って代わる可能性が高く、非常に意義深い研究である。将来的には MGS 法を用いて、転移性脳腫瘍だけではなく精神疾患、神経変性疾患など、脳に関わるあらゆる疾患のモデルを構築することが可能になると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1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 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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石橋公二郎
2. 発表標題 Identification of tumor-promotive and -suppressive astrocytes in brain metastasis
3. 学会等名 第14回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋公二郎
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 石橋公二郎
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
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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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