

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16140

研究課題名（和文）脳内における肺癌細胞の排除を規定するメカニズムの可視化と同定

研究課題名（英文）Visualization and Identification of Mechanisms Regulating the Elimination of Metastatic Lung Cancer Cells in the Brain

研究代表者

辻 貴宏（TSUJI, TAKAHIRO）

名古屋大学・医学系研究科・学振特別研究員(PD)

研究者番号：50850046

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：転移性脳腫瘍は予後不良であり、患者の生活の質を損なうため、その病態解明が急務である。申請者らは、2光子顕微鏡を用いて肺癌（転移性脳腫瘍）と脳内自然免疫細胞を生体内で可視化し、肺癌細胞が脳内免疫系を活性化すること、及び癌細胞がその生着・消失の運命決定時に微小環境と相互作用していることを明らかにした。さらに、生着する癌細胞の時系列での発現スクリーニングを行い、癌細胞が微小環境による排除から逃れる因子を特定した。その結果、“Don't eat me”シグナルのうち数因子の発現が癌の生着率を高め、転移発生段階における運命決定因子の一つとなることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

領域横断性：肺癌転移性脳腫瘍への対応は呼吸器内科領域だが、疾患は脳神経領域に及び、専門とする研究者は少なかった。この両分野にまたがる、肺癌から転移性脳腫瘍への移行という過程を詳細に観察・記述し、分子機構の一部を明らかにした点で学術的意義がたかい。転移性脳腫瘍は予後不良の疾患であり、いまだ特異的な治療法・予防法はない。申請者らの発見は、転移性脳腫瘍の発生段階に着目し、その進展・展開を防ぐ分子機構をひとつ見出しているため、これらの治療応用の可能性があり、社会的意義が高い。

研究成果の概要（英文）：Metastatic brain tumors have a poor prognosis and severely impact patients' quality of life, making it urgent to understand their pathology. We used two-photon microscopy to visualize lung cancer cells (metastatic brain tumors) and innate immune cells in the brain in vivo. Our findings revealed that lung cancer cells activate the brain's immune system and interact with the microenvironment during their establishment and disappearance. By conducting a temporal expression screening of these establishing cancer cells, we identified factors that allow cancer cells to evade elimination by the microenvironment. Among these, the expression of several “Don't eat me” signals was found to increase cancer cell colonization rates, serving as key determinants in the metastatic process.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：転移性脳腫瘍

1. 研究開始当初の背景

転移性脳腫瘍は予後不良で、患者の QOL も損なう解決すべき課題である。脳はかつて“免疫特権”と称され、定常状態でリンパ球はほとんど存在せず、組織マクロファージであるミクログリアが多数存在する。ミクログリアは神経細胞の Debris を貪食して脳の恒常性を保つなど自然免疫を担当すると考えられているが (Nat. Med. 2017;23:1018)、癌細胞への反応の経時的変化およびその分子基盤は明らかでない。申請者らは血行性に脳に至った肺癌細胞とミクログリアをマウスの脳内で可視化する取り組みを行ってきた (図 1)。興味深いことに、遺伝的背景を同一にする培養細胞株由来の癌にもかかわらず、その運命は多様で、微小転移形成する癌細胞だけでなく、浸潤せず消失するものやミクログリアに貪食される癌細胞も観察された (図 1)。一方でミクログリアの多くが癌細胞によって形態的に活性化し細胞密度も上昇したが (図 2.3)、癌を貪食するものは一部で多くは癌細胞の成長を許容していた (図 1)。ミクログリアがサイトカインや細胞成長因子の放出を介して癌細胞の運命を決定する可能性もある。癌細胞の運命を決定する複数の因子を明らかにし、それを利用し癌細胞の排除を誘導できれば、転移性脳腫瘍の発生を抑制する治療となりえる (図 4)。そこで申請者らは本課題での核心となる「問い」である、転移性脳腫瘍における免疫細胞—癌細胞の相互作用とこれを担う分子基盤の全容を、生体イメージングによる動態解析・1 細胞解析技術による発現解析を統合して 1 細胞レベルで明らかにする。

図 1

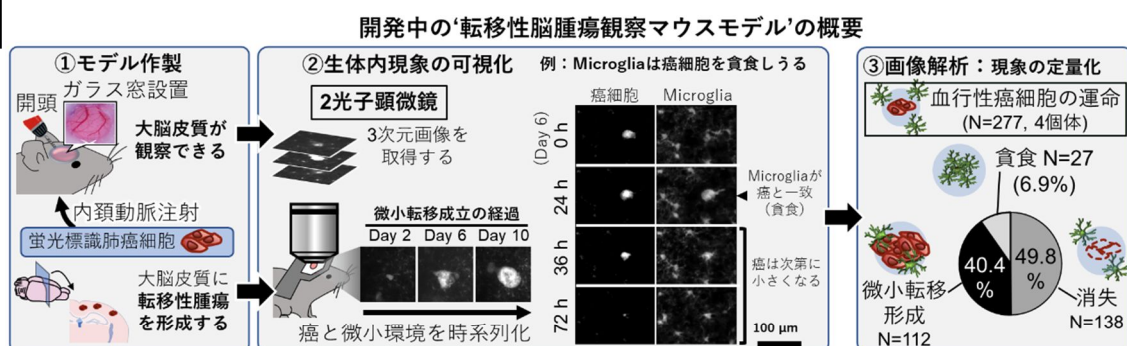


図 2

癌周囲のミクログリア濃度は上昇

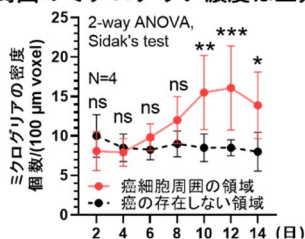
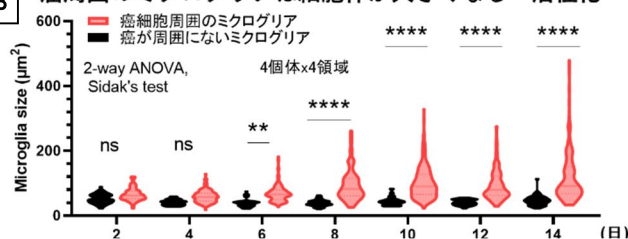


図 3

癌周囲のミクログリアは細胞体が大きくなる = 活性化



2. 研究の目的

目的: 生体内可視化技術と伝統的な生化学的手法を用い、肺癌細胞の生着・排除の運命決定の「場」における、ミクログリアや免疫細胞の役割を明らかにする。多様なミクログリアの反応、癌細胞の運命を規定する分子機構を探索する。

3. 研究の方法

(1) 転移性脳腫瘍観察モデルを用いて、癌細胞の運命の多様さを明らかにする

ミクログリアが蛍光標識された CX3CR1-EGFP マウスを用いる。同系統 (C57BL/6J) で MHC クラスの一致したマウス癌細胞 (CMT167, E0711) を mCherry 標識して内頸動脈注射し、転移性脳腫瘍モデルを作製する。モデルマウスの頭蓋骨に観察窓をつけて脳実質を透視可能とし、癌細胞の転移成立過程を 3 次元的に可視化する。2 光子顕微鏡によって、同一動物の同一部位を繰り返し観察でき、画像解析で癌細胞の生着率や増殖速度を定量化する (図 1)。

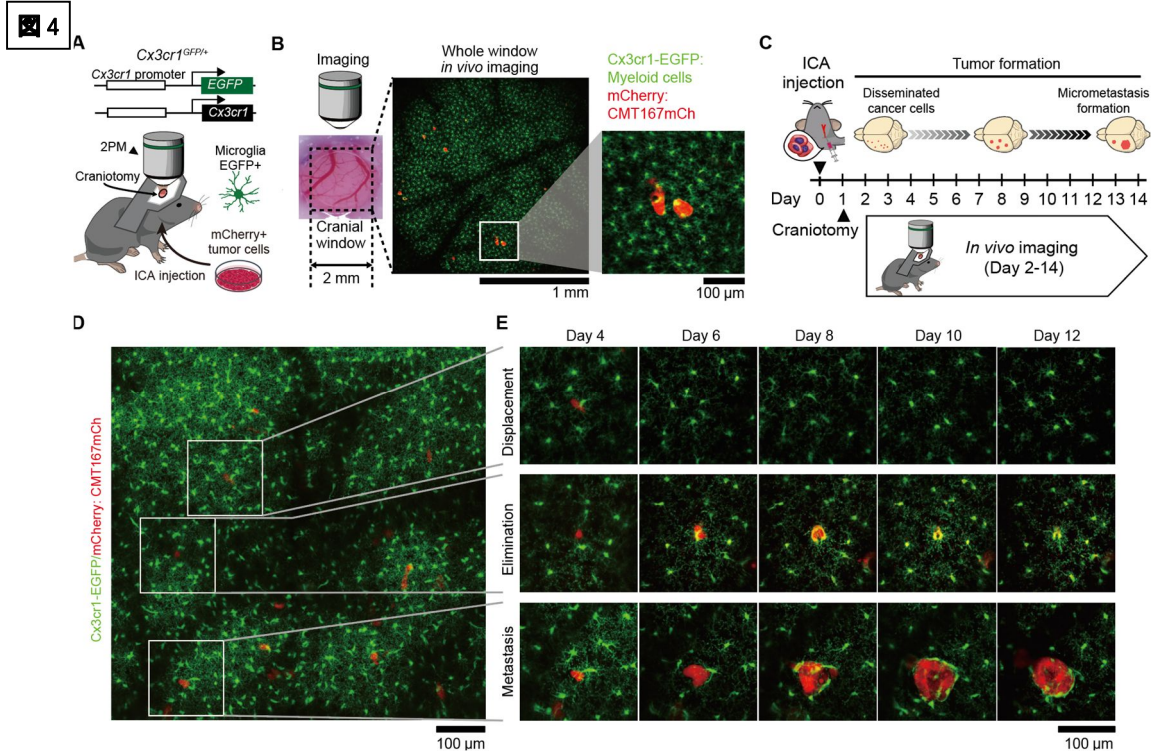
(2) ミクログリアの癌細胞への反応の多様さと、転移形成・排除に関わる役割を明らかにする
マウスへの PLX5622 の投与によってミクログリアを選択的に除去できる。ミクログリアを除去した際の癌細胞の生着割合や増殖速度を定量し、癌の排除に働くか、癌の成長を促しうるか、ミクログリアの脳腫瘍に対する役割をあきらかにする。

(3) 癌細胞の運命を決定する未知の分子機構を探索するため、内頸動脈注射後「脳に生着した癌細胞」と「脳転移を形成しない血液循環癌細胞」を FACS で単離し、網羅的発現解析 (RNA-seq) で比較する。これらの因子を同定した後は、癌細胞から CRISPR-Cas9 で対象の因子をノックアウトして腫瘍モデルを形成し、観察することによって因子の影響を検討する。

4. 研究成果

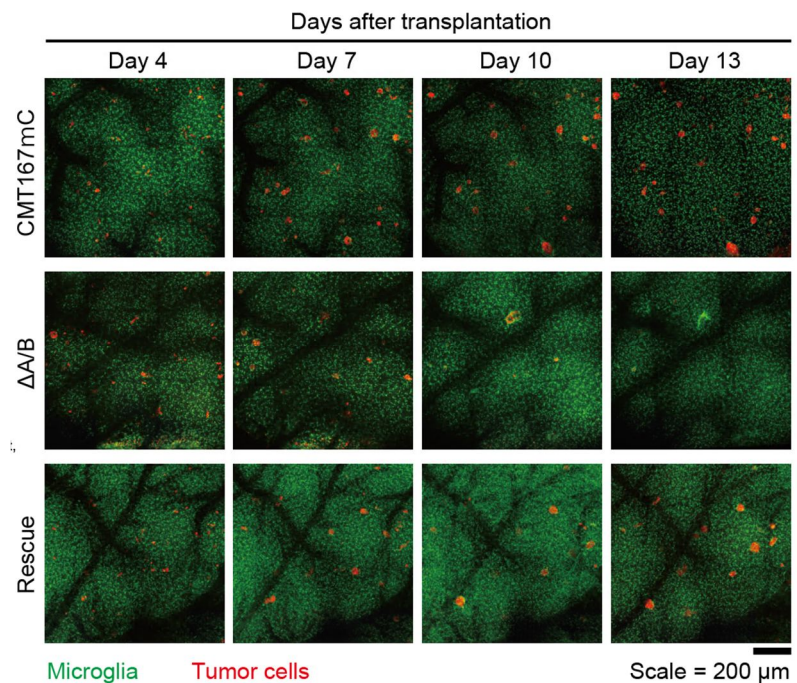
(1) 転移性脳腫瘍生着時における、癌細胞の運命の多様性をあきらかにした

計画通り、転移性脳腫瘍の生着過程におけるミクログリア応答、腫瘍の運命を可視化により追跡する系を確立した(図4A, B, C)。これにより、癌細胞に対してミクログリアが経時的に応答すること、ただし応答した後の癌細胞の運命は一樣ではなく多様であり、ミクログリアにより貪食で排除されるケースと、癌細胞の成長を阻害しないケースがあることが推定された。



(2) ミクログリアの腫瘍に対するグロスの機能を解析した。ミクログリアを PLX3397 あるいは Siglech-DTX モデルにより除去を行うと、腫瘍の成長を促進した。CMT167mCh 移植モデルにおいては、ミクログリアが癌細胞の成長を全体としては促進していることが推定された。

(3) 計画を変更し、生着の進行過程における癌細胞の発現経過を RNAseq で取得した。結果、8つの因子が癌細胞において上昇していることが推定された。フローサイトメトリー法で、このうち2つの蛋白発現 A と B が上昇していることを同定した。これらを癌細胞からノックアウトして生体内観察を行うと、排除される癌細胞の割合が著しく上昇し、癌細胞が生着し微小コロニーを形成する過程において、これらの因子がその生着率を高めることに貢献していることが示された。



これらの成果は現在英文査読誌に投稿し、原稿の改訂の過程にある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Takahiro Tsuji, Hiroaki Wake, Mariko Shindo, Daisuke Kato, Hiroaki Ozasa, Toyohiro Hirai
2. 発表標題 Microglial phagocytosis suppressed the development of metastatic tumors in the imaging model of brain metastasis
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻貴宏、和氣弘明、進藤麻理子、加藤大輔、小笹裕晃、平井豊博
2. 発表標題 Microglial phagocytosis suppressed the development of metastatic tumors in the imaging model of brain metastasis
3. 学会等名 Neuro2022（第45回神経科学大会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahiro TSUJI, Mariko SHINDO, Rahadian Yudo HARTANTIO, Misuzu HORIKOSHI, Daisuke KATO, Hiroaki WAKE
2. 発表標題 In vivo Imaging of Cancer-Brain Immune Microenvironment Interactions
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahiro Tsuji, Hiroaki Wake, Mariko Shindo, Daisuke Kato, Hiroaki Ozasa, Toyohiro Hirai
2. 発表標題 転移性脳腫瘍の生体内可視化はミクログリアと癌細胞の相互作用の多様さを明らかにする
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1．発表者名 Takahiro Tsuji, Hiroaki Wake, Mariko Shindo, Daisuke Kato, Hiroaki Ozasa, Toyohiro Hirai
2．発表標題 Microglia phagocytose metastatic tumors and suppress metastasis formation
3．学会等名 第80回日本癌学会学術集会
4．発表年 2021年

1．発表者名 辻貴宏、和氣弘明、進藤麻理子、加藤大輔、小笹裕晃、平井豊博
2．発表標題 転移性脳腫瘍モデルを用いた転移制御因子の探索
3．学会等名 第62回日本肺癌学会学術講演会
4．発表年 2021年

1．発表者名 辻貴宏、和氣弘明、進藤麻理子、加藤大輔、小笹裕晃、平井豊博
2．発表標題 Visualizing the effect of 'don't eat me signal' on microglial anti-tumor activity by in vivo imaging of brain metastases
3．学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4．発表年 2022年

1．発表者名 Takahiro Tsuji; Hiroaki Wake; Mariko Shindo; Rahadian Y. Hartantio; Misuzu Horikoshi; Daisuke Kato; Hiroaki Ozasa; Toyohiro Hirai
2．発表標題 Interdisciplinary method to elucidate the interaction between brain microenvironment and cancer cells
3．学会等名 AACR Annual meeting 2023 in Orlando (国際学会)
4．発表年 2023年

1 . 発表者名 Takahiro TSUJI, Mariko SHINDO, Daisuke KATO, Hiroaki WAKE
2 . 発表標題 Heterogeneous microglial response to cancer cells visualized by in vivo imaging model
3 . 学会等名 CSH Asia, Novel Insights into Glia Function & Dysfunction (国際学会)
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Takahiro Tsuji; Mariko Shindo; Rahadian Y. Hartantio; MisuzuHorikoshi; Daisuke Kato; Hiroaki Wake
2 . 発表標題 Heterogeneous microglial response to cancer cells visualized by in vivo imaging model
3 . 学会等名 ISN-ESN meeting (国際学会)
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 辻 貴宏、和氣 弘明
2 . 発表標題 生体内リアルタイムイメージングが可視化する脳内腫瘍微小環境の自然免疫応答
3 . 学会等名 バイオ・メディカル・フォーラム2024 (招待講演)
4 . 発表年 2023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
---------	---------