

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10839

研究課題名（和文）初代培養細胞とin vitro血液脳関門モデルを用いたがん脳転移メカニズムの解明

研究課題名（英文）Exploration of pericyte-derived factors implicated in lung cancer brain metastasis protection; a pilot messenger RNA sequencing using the blood-brain barrier in vitro model.

研究代表者

氏福 健太 (UJIFUKU, Kenta)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・助教

研究者番号：20437867

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）：がん転移細胞と脳血液関門の相互作用を検討した。ラットから採取した初代培養細胞で脳血液関門モデルを作成した。これに肺がん細胞株を加え、脳血行転移を再現した系を構築した。ペリサイトという脳神経系の細胞が、腫瘍増殖抑制的に働いていた（藤本ら、2019）。ペリサイトの転写因子をRNAseqで網羅的に解析した。予想に反して有意な炎症性サイトカインの発現がなく、実際はWwtr1、Acin1という遺伝子が低下していた。エンリッチメント解析（データ掘り起こし）を行うと、線維芽細胞アポトーシス抑制や細胞内情報伝達系（YAP-TAZ signal pathway）抑制の関与が示唆された（氏福ら、2020）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペリサイトが転移性脳腫瘍の成立に対して抑制的に働いていることが示唆された。また網羅的遺伝子解析を用いて、その機能の一部の解明を目指した基盤研究を実行することができた。炎症性サイトカイン以外の未知の液性因子が、がんの脳転移抑制に関与する可能性が示唆され、その関連遺伝子の有力な候補としてYAP-TAZ pathwayや線維芽細胞に関連する生命現象が挙げられると判明した。今後もIn vitro血液脳関門モデルを用いてその関連遺伝子に関わるメカニズムの解明を目指し、生命現象の解明のみならず、新規治療法の開発につながる知見が獲得できるのではないかと期待している。

研究成果の概要（英文）：The blood-brain barrier (BBB) implication is supposed to play a major role in brain metastasis. We applied an in vitro BBB model with rat primary cultured BBB-related cells (endothelial cells and pericytes), performed the gene expression analyses of pericytes under the lung cancer cells coculture conditions. Pericytes demonstrated inhibition of the cancer cell proliferation significantly. RNA was extracted from the pericytes and RNA-seq was performed. Lot-specific DEG detection demonstrated significant decreases in the expression of two genes (Wwtr1 and Acin1), and enrichment analyses revealed the inhibition of apoptotic processes in fibroblasts. Our results suggest that the expression profiles of brain pericytes are partially implicated in the prevention of lung cancer metastasis to the brain. Pericytes exerted an anti-metastatic effect in the BBB model, and their neurohumoral factors remain to be elucidated.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：転移性脳腫瘍 脳血液関門 初代培養細胞 BBBキット in vitro実験モデル 肺がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

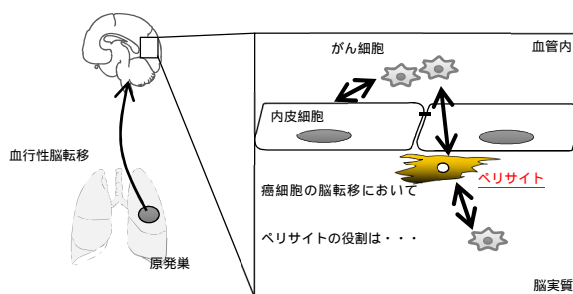
がん治療において、転移とそのメカニズムはいまだ解決されない重要課題で、遠隔転移を起こしたがん患者については、現時点でも原則的に治癒不能と考えられる。特に肺がん、乳がんの治療過程において、脳転移が問題になることが多い。米国ではがん患者の 9.6%の転移性脳腫瘍が認められ、本邦でもその程度の発症が想定される ( Barnhoitz-Sloan JS et al. *J. Clin Oncol* 2004 )。がん治療法の発達に伴うがん患者の生命予後延長に伴い、脳転移患者は増加すると予想される。

転移性脳腫瘍の治療は、定位放射線治療の登場で、神経死を予防するという観点からみると大きく進歩した。一部の分子標的薬を含めた化学療法が脳転移に効果的との報告も散見され始めている。しかし、現在でも転移性脳腫瘍の全生存中央値は約 6 カ月と、予後不良の病態であり、神経死に至る患者が全体の 27%で認められ、脳転移を来したがん患者の約 3 割が脳転移が原因で死亡する(Brain Tumor Registry Japan. *Neurol Med Chir(Tokyo)*, 2014)。

脳転移の形式は血行転移に限定される。脳血管には神経細胞を保護するための脳血液関門 ( blood brain barrier: BBB ) が存在する。転移性脳腫瘍に対してもバリアー作用を有していると想定されるが、転移するがん細胞は BBB を通過し、脳内に侵入、定着、増殖する ( 下図 )。

2. 研究の目的

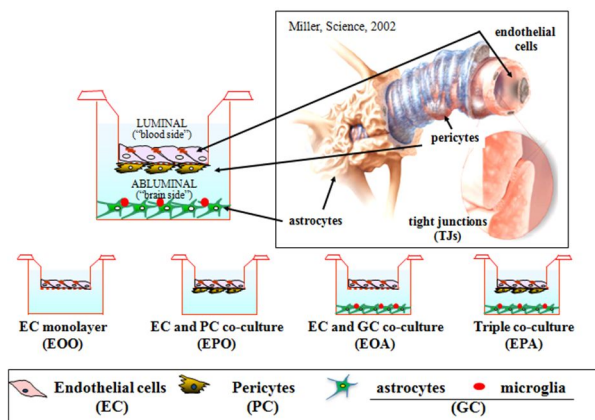
血液脳関門 ( blood brain barrier: BBB ) の機能的な構築には基本構成単位である脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、及びアストロサイト間のクロストークが不可欠である。研究構想時点で、複数の共培養 *in vitro* BBB モデル、および転移性脳腫瘍細胞株を用いて、腫瘍細胞が BBB を通過する機序を検討しようと考えた。



また、近年、コンピューターの長足の進歩により、RNAseq など *in silico* の強力な遺伝子解析手法が開発され、網羅的な遺伝子発現解析が可能となってきたが、BBB モデルでの検討はほとんど認められなかった。特にペリサイトの知見については極めて乏しく、研究対象として有望と考えた。

3. 研究の方法

BBB model based on cell culture

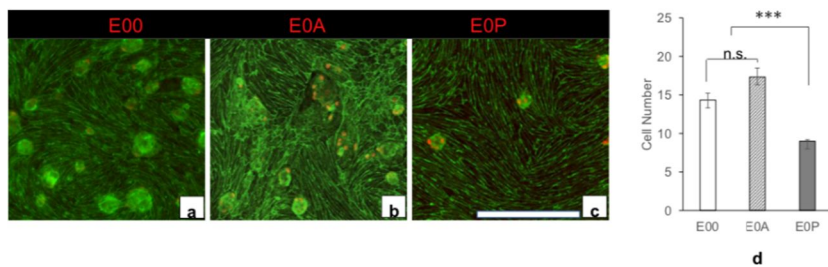


すでに確立済みの *in vitro* BBB モデルと、肺がん細胞株を用いて、がん細胞脳転移モデルを確立する。初代培養細胞を用いたモデルを構築する ( 左図 )。多孔質 ( 0.4μm、3.0μm pore size ) の半透膜をもつ立体培養皿 ( Transwell® ) を用い共培養モデルを作製する。作製するモデルは、液性因子のみの影響を受けるモデルと、内皮細胞とペリサイトまたはアストロサイトが接触できるモデルを構築し、腫瘍

細胞を付加した時の生物学的挙動、腫瘍細胞の増殖速度などを検討する。BBB 機能を、経内皮電気抵抗、Evans' blue-albumin 法、P-糖タンパクの機能検定で評価する。Immunoblot 法にてタイトジャンクションタンパク (claudin-5, occludin, ZO-1)、トランスポーター (P-gp, MRP, BCRP, GLUT1) の発現を確認する。既知の遺伝子、メカニズム以外の未知の候補遺伝子をスクリーニングするため、RNAseq を用いた網羅的解析を行い、腫瘍細胞や BBB の反応について検討する。

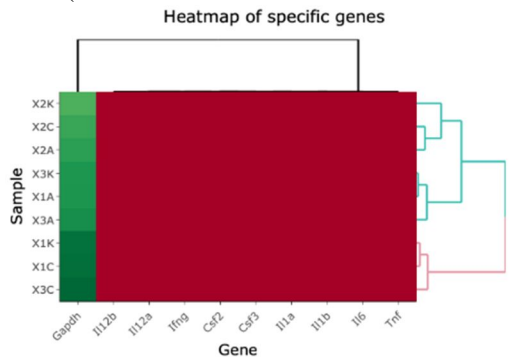
#### 4. 研究成果

肺がん細胞株をもちいた in vitro の BBB モデル実験を行った (動物実験委員会 承認番号 0704190570)。具体的には BBB モデルに肺がん細胞株を加え、脳血行転移を再現した系を構築し、BBB とがん細胞の反応について解析を行った。肺がん細胞株は経内皮電気抵抗を下げ、タイトジャンクションを破壊し増殖したが、細胞株 KNS-62 の増殖はアストロサイト共培養で増強し、ペリサイト共培養で抑制された。ペリサイトの腫瘍増殖抑制効果は新知見と思われたため、論文として発表した(藤本ら、2019、右図)。



ひきつづき、ペリサイトに対して網羅的遺伝子解析を行う方針

とし(臨床倫理委員会 許可番号 18070906-2)、RNAseq を行った。得られたデータは、適切なデータベースに登録して公表済みである (アクセシオン番号: DRR219358 ~ DRR219366)。

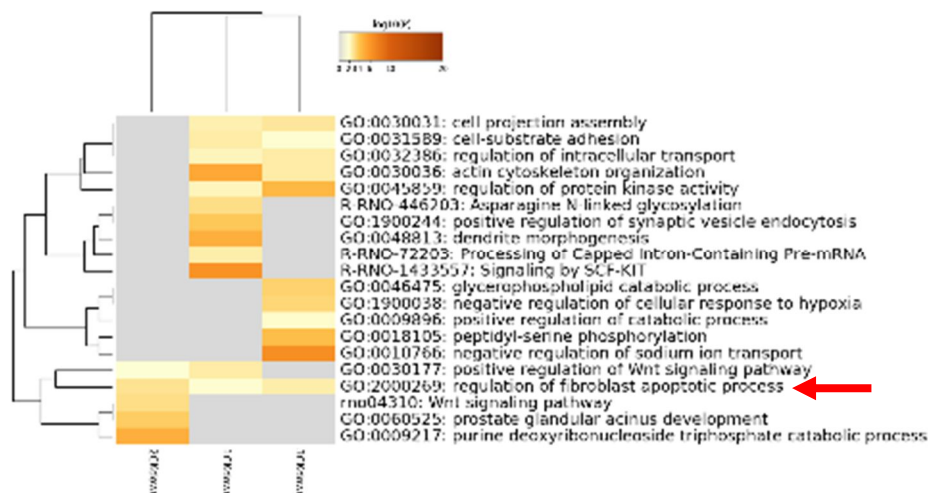


データ解析すると、炎症性サイトカインの発現がほとんど認められないことを発見した(左図)。具体的には *Wwtr1*(TAZ)および *Acin1* の低下が認められ、発現が低下した遺伝子群のエンリッチメント解析では、線維芽細胞のアポトーシスが抑制されていた(下図)。

以上より我々はサイトカイン以外の液性因子を介して、ペリサイトが転移性脳腫瘍を抑制する競合阻害メカニズムに関与する、という仮説をたて、ここまでの結果を pilot study として、学術誌に投稿し、論文として発表した(氏福ら、2020)。

上記知見を踏まえ、新たな科学技術研究費を申請してさらに検討を続ける予定である。

具体的には、エクソソームの関与などについて実験を構想する予定である。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujimoto, T., Nakagawa, S., Morofuji, Y., Watanabe, D., Ujifuku, K., Horie, N., Izumo, T., Niwa, M., Banks, W. A., Deli, M. A., Matsuo, T.	4. 巻 40(1)
2. 論文標題 Pericytes Suppress Brain Metastasis from Lung Cancer In Vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Mol Neurobiol	6. 最初と最後の頁 113-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10571-019-00725-0	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
1. 著者名 Ujifuku, K., Fujimoto, T., Sato, K., Morofuji, Y., Muto, H., Masumoto, H., Nakagawa, S., Niwa, M., Matsuo, T.	4. 巻 1(Supplement 2)
2. 論文標題 MRNA-SEQ FOR PERICYTES FROM IN VITRO BRAIN METASTASIS AND BLOOD-BRAIN BARRIER MODEL.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology Advances	6. 最初と最後の頁 ii11-ii11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/oaajnl/vdz039.050	査読の有無 無
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 氏福 健太、松尾 孝之	4. 巻 35巻4月号
2. 論文標題 定位放射線治療の適応	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 CLINICAL NEUROSCIENCE	6. 最初と最後の頁 483-486
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 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 -
1. 著者名 Ujifuku Kenta, Fujimoto Takashi, Sato Kei, Morofuji Yoichi, Muto Hideki, Masumoto Hiroshi, Nakagawa Shinsuke, Niwa Masami, Matsuo Takayuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Exploration of Pericyte-Derived Factors Implicated in Lung Cancer Brain Metastasis Protection: A Pilot Messenger RNA Sequencing Using the Blood-Brain Barrier In Vitro Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10571-020-00988-y	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 氏福 健太、馬場 史郎、吉田 光一、鎌田 健作、松尾 孝之
2. 発表標題 専門家なしで試みるRNA-seq - 無料のGUIツールでDRY解析/MaserおよびTCC-GUI
3. 学会等名 第2回九州脳腫瘍研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 氏福 健太、藤本 隆史、佐藤 慧、諸藤 陽一、武藤 秀樹、増本 博司、中川 慎介、丹羽 正美、松尾 孝之
2. 発表標題 ペリサイトmRNA の網羅的解析In vitro 脳転移脳血液関門モデルにおいて
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 氏福 健太
2. 発表標題 Orbitozygomatic approachにおける3D-4Kビデオマイクロスコープの使用経験：教育効果の観点から
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第77回学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤本 隆史
2. 発表標題 がんの脳転移機序と血液脳関門（BBB）の関連性の検討
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第77回学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤本 隆史
2. 発表標題 Role of Pericytes in brain metastasis formation
3. 学会等名 the 21st International Symposium on "Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 氏福 健太、梅野 哲也、馬場 史郎、吉田 光一、鎌田 健作、森川 実、安倍 邦子、松尾 孝之
2. 発表標題 WHO分類に基づくグリオーマ遺伝子分類 長崎大学病院における初期導入
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第76回学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 氏福 健太、梅野 哲也、馬場 史郎、吉田 光一、鎌田 健作、森川 実、安倍 邦子、松尾 孝之
2. 発表標題 WHO分類に基づくグリオーマ遺伝子分類 長崎大学病院における初期導入
3. 学会等名 第35回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://www.nagasaki-nouge.jp/">https://www.nagasaki-nouge.jp/</a> 長崎大学 脳神経外科
---

## 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	松尾 孝之 (MATSUO Takayuki) (00274655)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授  (17301)	
研究分担者	吉田 光一 (YOSHIDA Koichi) (20393457)	長崎大学・病院(医学系)・助教  (17301)	
研究分担者	馬場 史郎 (BABA Shiro) (30530430)	長崎大学・病院(医学系)・助教  (17301)	
研究分担者	鎌田 健作 (KAMADA Kensaku) (30549655)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員  (17301)	
研究分担者	諸藤 陽一 (MOROFUJI Yoichi) (40437869)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員  (17301)	

## 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