

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16647

研究課題名(和文) がん幹細胞を標的とした新規脳転移予防法・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new preventive and therapeutic methods for brain metastases targeting cancer stem cells

研究代表者

阿知波 孝宗 (ACHIHA, TAKAMUNE)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：00771908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はがんの脳転移機序の解明のために、マウスモデルを作成し遺伝子発現やがん幹細胞マーカーを検討を行なった。

転移性脳腫瘍マウスモデルは、腫瘍細胞株の心腔内移植により転移性脳腫瘍が形成が確認されたが、手技の不確実性により安定したモデルの確立が困難であった。髄膜播種マウスモデルについては、腫瘍細胞株の脳室内移植により髄膜播種の形成が確認された。髄膜播種はIVISによるex vivoイメージング、蛍光顕微鏡により確認された。細胞株MDA-MB-231の髄膜播種マウスモデルを用いて、髄液中浮遊腫瘍細胞と脊髄髄膜接着腫瘍細胞からのRNAシーケンス解析により、多くの遺伝子発現差が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりがんの脳転移機序の解明のための端緒を得ることができた。がんの髄膜播種モデルが確立され、髄液中浮遊腫瘍細胞と脊髄髄膜接着腫瘍細胞の遺伝子発現差が明らかになったことは新しい知見である。髄膜播種はがんの転移の中でも特に予後が不良な病態で、有効な治療も確立されておらず、得られた知見を活用し今後更なる研究が必要である。本研究成果について社会に還元をするため、学会発表を予定している。

研究成果の概要(英文)：We have made a mouse model and examined gene expression and cancer stem cell markers in order to elucidate the mechanism of brain metastasis of cancer.

In a mouse model of brain metastasis, formation of brain metastasis was confirmed by intracardiac transplantation of the tumor cell line, but it was difficult to establish a stable model due to the uncertainty of the procedure. In a mouse model of leptomeningeal dissemination, formation of leptomeningeal dissemination was confirmed by intraventricular transplantation of the tumor cell line, which was observed by IVIS and fluorescence microscopy. We have revealed many gene expression differences between floating tumor cells in cerebrospinal fluid and tumor cells attached to leptomeninges by RNA sequence analysis using a leptomeningeal dissemination mouse model of the MDA-MB-231 cell line.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳転移 がん幹細胞 マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんの脳転移は、がん患者にとって神経症状により生活自立度の悪化をきたし、治療の継続を困難にさせるなど、予後に対して大きな影響を与える病態である。近年のがんに対する分子標的薬などの新規治療法の発展に伴い、原発巣制御性が向上し、がん患者の長期生存が従来に比べて可能になりつつある。がん患者の転移性脳腫瘍に対する治療は手術摘出や放射線治療を用いた局所制御のための姑息的な治療が一般的だが、長期生存が得られるようになるに伴って転移性脳腫瘍の長期制御の必要性が高まっている。脳は多くの抗がん剤の到達を妨げる血液脳関門 (Brain Blood Barrier: BBB) を有しており、既存の治療とは異なる新たな視点からの治療開発が必要となる。がんの脳転移について考える上で、がん細胞が BBB を通過して脳組織と親和性を獲得し、生着・増殖する機序の詳細については未だに十分な知見が得られておらず、この点を明らかにすることで新たな治療への発展性が期待できる。

申請者らは肺がんの脳転移が EGFR の変異型によって脳転移様式や脳内局在が異なり、がんの分子生物学的背景が脳への転移に寄与していることを明らかにした¹⁾。がんの脳転移について考える上で、このような分子生物学的知見に加えて、近年重要性が明らかになりつつあるがん幹細胞に注目した²⁾。転移性脳腫瘍は原発巣から遊離した 1 個ないしは少数の腫瘍細胞から形成されると考えられるため、脳転移にはがん幹細胞のような極めて強い腫瘍形成能を有する腫瘍細胞が必要であると仮定される。本研究では脳転移に関連する分子生物学的背景に加え、がん幹細胞に焦点をあて脳転移のメカニズムを明らかにしていく。

2. 研究の目的

本研究はがんの脳転移におけるがん幹細胞の役割を解明することで、転移性脳腫瘍に対する新たな治療法、発症予測法、発症予防法の確立のための端緒を得ることを目的とする。

また、がんの中枢神経系への特殊な転移形式として髄膜播種があるが、申請者ら研究グループが手法を確立している脳室内移植により髄膜播種マウスモデルの作成が可能であったため、がんの髄膜播種においてもがん幹細胞の役割を明らかにしていく。特にこの髄膜播種マウスモデルを用いて、髄液中の浮遊腫瘍細胞が脊髄髄膜に生着する過程でがん幹細胞に関わる遺伝子発現を含め、どのような変化が生じているかを検討する。

3. 研究の方法

1) 左室内移植による転移性脳腫瘍マウスモデルを用いた脳転移形成能の検証

転移性脳腫瘍マウスモデル作成のため既に報告されている方法の検証として、まずは同種細胞移植モデルを作成のため C57BL/6 マウスへ神経由来細胞であり脳への生着性も高いと考えられる C57BL/6 マウス由来神経膠腫細胞株 GL261 の心腔内接種を行なった。心腔内投与は報告があるような左室内投与とし³⁾、胸骨下より 29G 針を用いて PBS100 μ l に懸濁した腫瘍細胞を移植した。脳転移の形成は安楽死後、脳組織を回収しホルマリン固定パラフィン包埋切片の HE 染色によって確認した。

2) 髄膜播種マウスモデルを用いた髄膜播種形成能の検証

髄膜播種マウスモデル作成のため、免疫不全 NOG マウス (In-Vivo Science Inc.) の側脳室内に脳定位固定装置 (Stoelting) を用いて PBS2 μ l に懸濁した腫瘍細胞を移植した。移植する腫瘍細胞はヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 (ATCC), MDA-MB-361 (ATCC), SK-BR3 (ATCC) を使用し、標識のために rLuc, GFP を Lentivector (pLL-EF1a-rFLuc-T2A-GFP-mPGK-Puro, System Biosciences) を用いて導入した。髄膜播種の形成は IVIS による ex-vivo イメージングおよび安楽死後、髄液と脊髄組織を回収し蛍光顕微鏡によって確認した。

3) 髄液中浮遊腫瘍細胞と脊髄髄膜接着腫瘍細胞の遺伝子発現差解析

IVIS で髄膜播種が確認されたマウスを安楽死させ、髄液と脊髄組織を回収した後 Cell Dissociation Buffer, enzyme-free, PBS (Gibco) で処理し FACS によりそれぞれの検体で GFP 標識された腫瘍細胞を回収した。7-AAD (BD Biosciences) を用いて死細胞は除去した。回収した細胞より Picopure RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) で RNA を抽出した。抽出の過程で RNase-Free DNase Set (Qiagen) で DNA 除去を行った。抽出 RNA を SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA kit for Sequencing (Takara Bio) で処置し、HiSeq System (Illumina) で RNA シークエンスを実施した。RNA-Seq データを iDEP (bioinformatics.sdstate.edu/idep/) を用いて Enrichment Analysis により髄液中浮遊腫瘍細胞と脊髄髄膜接着腫瘍細胞の遺伝子発現差解析を行なった。

4. 研究成果

1) 左室内移植による転移性脳腫瘍マウスモデルを用いた脳転移形成能の検証

細胞株 GL261 を 1×10^5 個/PBS100 μ l の濃度で C57BL/6 マウスの左室内の移植することにより、早い個体では 40 日程の経過で神経症状が出現した。これを安楽死させ脳組織の切片を HE 染色により確認すると、散在性に脳転移が形成されていることが確認された (図 1)。しかし脳転移の腫瘍形成時間にはかなりの個体差があり、手技の不確実性が要因と考えられ安定したモデルの確立が困難であった。脳へ転移のための効率性を上げるために、他の方法として報告のあ

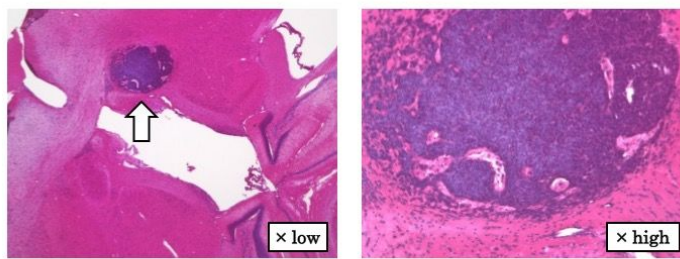
る脳親和性 (Brain seeking) の細胞株樹立や経頸動脈移植が必要と考えられた^{3,4)}。

2) 髄膜播種マウスモデルを用いた髄膜播種形成能の検証

細胞株 MDA-MB-231, MDA-MB-361, SK-BR3 のいずれにおいても、 2×10^5 個/PBS2 μ l の腫瘍細胞を免疫不全 NOG マウスの脳室内へ移植することにより脊髄部に髄膜播種を形成することが IVIS によって確認された (図 2)。

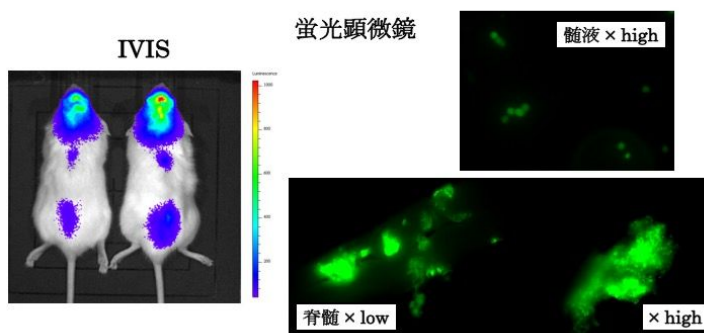
MDA-MB-231, SK-BR3 を移植した髄膜播種モデルでは移植後 35 日程の時点で安楽死させ、髄液および脊髄を蛍光顕微鏡で確認すると、髄液中に浮遊腫瘍細胞を、脊髄に髄膜接着腫瘍細胞が確認された (図 2)。MDA-MB-361 を移植した髄膜播種モデルでは IVIS での発光が他の MDA-MB-231, SK-BR3 と比較して弱く腫瘍の発育が緩徐であり、移植後 60~140 日程時点では脊髄の髄膜接着細胞は確認されたが、髄液中に浮遊腫瘍細胞は認めなかった。細胞株の違いにより髄膜播種の形成性が異なる可能性があることが示唆された。

図1 マウスモデルによる転移性脳腫瘍形成



大脳 (HE染色)

図2 マウスモデルによる髄膜播種形成

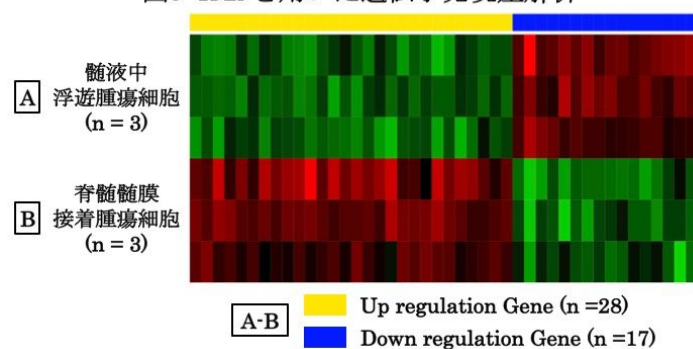


3) 髄液中浮遊腫瘍細胞と脊髄髄膜接着腫瘍細胞の遺伝子発現差解析

細胞株 MDA-MB-231 の髄膜播種マウスモデルより得られた髄液中浮遊腫瘍細胞と脊髄髄膜接着腫瘍細胞の RNA-Seq データ (n = 3) を iDEP で Enrichment Analysis を行うと、多くの遺伝子発現の違いが明らかになった (図 3)。傾向として脊髄髄膜の接着腫瘍細胞群では細胞接着に関連する遺伝子群で発現亢進を、一方、髄液中の浮遊腫瘍細胞群では細胞増殖に関連する遺伝子群で発現亢進を認めた。乳がんの幹細胞マーカーとして知られる CD44 や ESA (epithelial specific antigen) に注目してみると、CD44 の発現が髄液中の浮遊腫瘍細胞群よりも脊髄髄膜接着腫瘍細胞群で僅かに亢進を認めた (Fold change 1.55, $P < 0.01$)。ESA の発現は有意差を認めなかった。

解析する細胞株を増やして更なる検討を行うことにより、髄膜播種の細胞動態の解明の一助になると考える。本研究成果については、学会で発表予定である。

図3 iDEPを用いた遺伝子発現差解析



[引用文献]

1. Takano K et al., Neuro Oncol. 2016 May;18(5):716-24.
2. Reya T et al., Nature. 2001 Nov 1;414(6859):105-11.
3. Palmieri D et al. Cancer Res. 2007 May 1;67(9):4190-8.
4. Zhang Z et al., Neuropathology. 2008 Feb;28(1):24-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Achiha Takamune, Takagaki Masatoshi, Oe Hiroshi, Sakai Mio, Matsui Hitoshi, Nakanishi Katsuhiko, Ozaki Tomohiko, Fujimoto Yasunori, Yoshimine Toshiki, Nakanishi Katsuyuki, Kinoshita Manabu	4. 巻 26
2. 論文標題 Voxel-Based Lesion Mapping of Cryptogenic Stroke in Patients with Advanced Cancer: A Detailed Magnetic Resonance Imaging Analysis of Distribution Pattern	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Stroke & Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 1521 ~ 1527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.02.038	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 Achiha Takamune, Arita Hideyuki, Kagawa Naoki, Murase Tsuyoshi, Ikeda Jun-ichiro, Morii Eiichi, Kanemura Yonehiro, Fujimoto Yasunori, Kishima Haruhiko	4. 巻 35
2. 論文標題 Enchondromatosis-associated oligodendroglioma: case report and literature review	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology	6. 最初と最後の頁 36 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-017-0303-y	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 谷脇 祥吾, 阿知波 孝宗, 林 友豊, 石原 正浩, 後藤 哲, 足立 史朗, 西尾 雅実
2. 発表標題 多臓器転移を認めた膠芽腫の一例
3. 学会等名 第78回日本脳神経外科学会 近畿学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takamune Achiha, Noriyuki Kijima, Naoki Kagawa, Chisato Yokota, Yasunori Fujimoto, Haruhiko Kishima
2. 発表標題 Expression and functional analysis of the CD166/activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) in medulloblastoma
3. 学会等名 18th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology (ISPNO) (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究協力者	木嶋 教行 (KIJIMA NORIYUKI) (80534627)	大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤) (14401)	
研究協力者	高野 浩司 (TAKANO KOJI) (90649203)	大阪大学・医学系研究科・招へい教員 (14401)	