

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09137

研究課題名（和文）乳癌の脳微小転移および髄膜播種に対する幹細胞治療の有効性の検討

研究課題名（英文）Stem cell therapy for micrometastasis and leptomeningeal metastasis of breast cancer

研究代表者

北村 洋平（Kitamura, Yohei）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：30445382

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）：乳癌は脳転移の頻度の高い悪性腫瘍であり、乳癌の脳転移に対する新たな治療方針の構築が急務である。ここでは間葉系幹細胞を使用した乳癌の転移性脳腫瘍の治療方法の構築を目的に研究を行った。乳癌の細胞株を用いて臨床のシナリオを模したマウスモデルを構築するとともに治療用細胞がマウスの脳内で腫瘍に向かって遊走することを確認した。マウスモデルを使用して治療効果の判定を行う研究を継続中である。同様のアプローチで肺癌、メラノーマの転移性脳腫瘍についても並行して研究を行い、髄膜播種に対する効果を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移性脳腫瘍は治療が困難な疾患であり、一般的に手術、放射線照射、化学療法が行われるが時に命に関わる病態である。私たちは、幹細胞という新しいツールを用いて転移性脳腫瘍を治療する方法の研究を行った。それにより、乳癌、肺癌、皮膚癌の動物実験レベルではあるが、有効性を報告した。今後転移性脳腫瘍治療の新たな選択肢となりうると考えられ、いずれは患者さんに届けることを目標に研究を継続する。

研究成果の概要（英文）：Breast cancer is a malignant tumor that frequently metastasizes to the brain, and it is urgently needed to establish a new treatment strategy for brain metastasis from breast cancer. Here, we conducted a study to establish a treatment strategy for breast to brain metastasis using mesenchymal stem cells. Using breast cancer cell lines, we developed mouse models that mimics a clinical scenario and confirmed that therapeutic stem cells migrate toward the tumor in the mouse brain. Research is ongoing to determine the efficacy of the treatment using the mouse model. In parallel, we conducted similar studies on metastatic brain tumors of lung cancer and melanoma, and showed efficacy of the therapeutic strategy.

研究分野：脳神経外科

キーワード：転移性脳腫瘍 幹細胞治療 髄膜播種

### 1. 研究開始当初の背景

乳癌は日本人女性の 12 人に 1 人が生涯のうちに罹患し、罹患数は約 9 万人におよび、他臓器の癌が減少傾向なのに反し、現在も著しい増加傾向にある。そもそも乳癌は非常に脳に転移しやすい癌であるが(原発として 2 番目)、なかでもヒト上皮成長因子受容体(HER)2 陽性乳癌(乳癌のおよそ 2 割)は、そうでない乳癌に比べて脳転移しやすい。これは近年頻用されている分子標的薬が脳血液関門(Brain-Blood-Barrier;BBB)を通過できないことと強く関係している(Soni, Am J Clin Pathol, 2015)。さらに、乳癌は初期治療が終了した後、他臓器の癌では見られないほど長期間に渡り遠隔臓器での再発のリスクが続くことで知られている。事実、乳癌患者は初期治療終了後も 20 年にわたり遠隔転移・再発の恐怖に苛まれている(Pan, NEJM, 2017)。

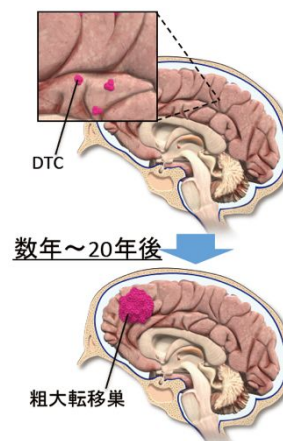


図 1: 脳への微小転移(上)と粗大転移(下)のイメージ図。通常、臨床で治療対象となるのは下のみ。

近年の研究で腫瘍細胞が比較的早期の段階で脳などの遠隔臓器に転移し、増殖せずに休眠した状態で血管周囲のニッチ(perivascular niche; PVN)で長期間潜伏していることがわかってきた(図 1; Ghajar, Nat Cell Biol, 2019)。この現象は播種腫瘍細胞(disseminated tumor cell; DTC)の休眠状態(dormancy)もしくは微小転移(micrometastasis)と呼ばれる(Goddard, Nat Cell Biol, 2018)。申請者は粗大転移巣(macrometastasis) = 臨床的脳転移に成長してしまう前に、微小転移の段階で癌細胞を殺す方法、つまり後々生じる臨床的脳転移を『予防』する方法はないかと考えた。

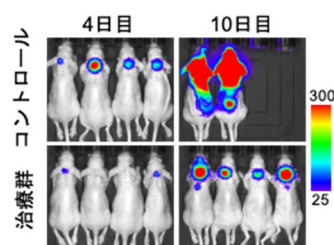


図 2: 乳癌の髄膜播種に対し、幹細胞を髄腔内投与したマウス(下)とコントロール(上)の IVIS 画像。幹細胞投与群は腫瘍の増殖が抑制されている。(申請者が実施)

一方、癌の髄膜播種(癌性髄膜炎)は脳脊髄腔に癌細胞がばら撒かれた状態であり、有効な治療法がなく、平均的な予後は 4-6 週間である(Shapiro, Semin Oncol, 2009)。申請者らはこの髄膜播種に対して幹細胞治療が有効である可能性を示してきた(図 2、Kitamura, Sci Adv, 2021)。最終的な臨床応用への橋渡しとして、ここでは HER2 陽性乳癌の髄膜播種に対しても、幹細胞治療が有効であるかどうかを検証する。

### 2. 研究の目的

現状として、臨床において微小転移巣が駆逐できない理由として、単一細胞レベルのために MRI などの画像検査で居場所を特定できない点と、BBB のため全身投与された薬剤(抗 HER2 抗体など)が癌細胞に到達できない点が挙げられる。幹細胞は BBB を通り抜ける能力を有するとともに(Akiyama, Glia, 2002)、癌細胞に集まる習性(腫瘍向性)を有する(Yang, Stem Cells, 2012)。これらの特性の利用し、幹細胞の経動脈的が脳内の DTC を殺し、動物実験を通して予後を改善させるかを検証するのを目的とする。

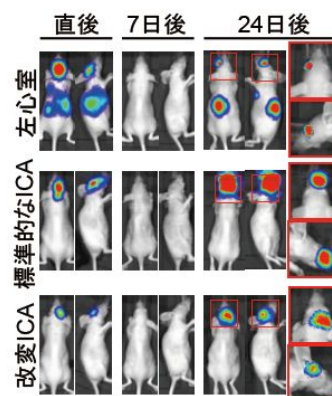


図 3: 癌細胞を左心室に注射した場合と標準的な ICAi、改変 ICAi を施行した後の経時的なマウスの IVIS 写真。上の二つの方法では、脳以外への転移が明らかであるが、改変 ICAi では脳にのみ腫瘍が形成されている。(申請者が実施)

また、このような研究がこれまでされてこなかった一因として動物モデル作成の困難さがある。脳転移モデルは一般的に左心室や頸動脈への癌細胞の注射により作成されてきたが、この方法では脳以外にも病変が多発し、脳転移巣への治療効果の判定が困難であるという問題があった(図 3)。申請者は、内頸動脈の脳以外への分枝を結紮した上で癌細胞を注射

し転移性脳腫瘍モデルを作成する技術(改変 Intracarotid arterial injection; ICAi)を開発した(図3)。この方法により脳内に特異的に癌細胞を接種することができ、臨床におけるPVNのDTCを摸した状態を作成することが可能である(図4)。

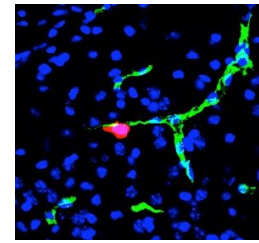


図4:マウスの脳の断面の顕微鏡写真。血管(索状の構造物)の外側に乳癌細胞(中央の比較的大きな丸い構造物)が潜伏している状態が再現されている。(申請者が実施)

幹細胞を使った転移性脳腫瘍治療の研究は少ないが報告がある(Stuckey, Nat Rev Cancer, 2014)。しかし、そのほとんどが既にある程度の大きさに育ったあとの脳内の腫瘍塊に対する治療である。DTCは単一細胞レベルでPVNに潜んでおり、これらに適切に幹細胞を届けることができればDTCを減らす、もしくは一掃することが可能であると考えられ、臨床的脳転移の『予防』が可能かどうかについても検討することを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 乳癌脳転移マウスモデル作成

HER2陽性乳癌の細胞株にレンチウイルスを使って蛍光タンパクと luciferase(生体発光タンパク質)を発現させた。当研究室では2種類の蛍光タンパク質(GFPとmCherry)と2種類の luciferase(FireflyとRenilla)の組み合わせ、計4種類のベクターを保有しており、癌細胞と治療用幹細胞を色分けを行なった。脳微小転移モデルは改変 ICAiで、髄膜播種モデルはCisterna magnaからの髄注で作成した。

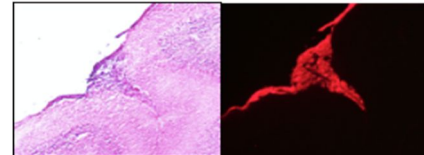


図5:蛍光タンパクを持つ乳癌細胞を髄注したマウスの、一週間後の小脳の組織の顕微鏡所見。癌細胞が脳の表面に沿って増殖している(左)HE染色、(右)蛍光写真

レンチウイルスを使用し、幹細胞に抗HER2抗体を発現させた。抗HER2抗体のベクターは研究室に保有されており、他のシナリオを模した動物モデルにおいて、幹細胞治療の有効性が報告されている(Kanojia, Stem Cells, 2015)。動物実験に移る前に *in vitro* で腫瘍殺効果を確認した。また、少数のマウスで幹細胞の動脈注射の安全性を事前に確認した。

#### (2) 治療効果の評価

微小脳転移モデルでは癌細胞を内頸動脈に注射してから1-2週間前後で、今度は治療用幹細胞を同じ血管から注射した。髄膜播種モデルでは、癌細胞を髄注し、約1週間後に幹細胞を髄注する。腫瘍サイズは *in vivo* imaging system (IVIS)を利用して評価した。同時に幹細胞の挙動もIVISで追跡した(FireflyとRenillaを使い分けた)。

#### (3) 癌微小環境の評価

治療後の脳組織切片の各種免疫染色を行い(CD31、GFAP等)、PVNでの幹細胞の癌細胞に対する挙動や周囲の細胞、構造物との関係性などの評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 乳癌脳転移マウスモデル

レンチウイルスを使用し、乳癌細胞株に firefly luciferase と mCherry を導入した安定細胞株を作成した。細胞株に luciferin を加えることにより発光し、腫瘍数を適切に反映することを確認した。この細胞株を脳内に注射することで、頭蓋内で生着可能な細胞株を樹立した。この細胞株をヌードマウスに動脈注射することで安定的に微小脳転移マウスモデルが作成できるようになった。同様に、大孔から髄注することにより髄膜播種マウスモデルが作成できることを確認した。これらのマウスモデルをIVISでフォローアップし、腫瘍の病勢を適切にモニタリングできることを確認した。

#### (2) 間葉系幹細胞の遊走性を確認

間葉系幹細胞が脳内で腫瘍細胞に向かって遊走することを確認し、治療物質のデリバリーのツールとしての有用性を確認した。幹細胞の投与によるマウスの有害事象についてもデータを集め

ることができた。

### (3) 治療効果判定

上記マウスモデルを使用した *in vivo* 実験を遂行し、さらにデータの蓄積を行うことが今後の課題となる。これらの結果を統合し、最終的には幹細胞治療の効果の総括的評価を行う予定である。乳癌と並行して、同様のアプローチを肺癌、メラノーマの髄膜播種モデルを使用して行い、有効性を認め文献として発表した(Kanaya, *Sci Transl Med*, 2023, Moleirinho, *Stem Cell Transl Med*, 2023)。具体的には非小細胞肺癌の髄膜播種に対して、上皮成長因子受容体(EGFR)と細胞死受容体(DR)の両方をターゲットとしたタンパク質を分泌する幹細胞が有効であることを示した。また、メラノーマの癌性髄膜炎に対しては、腫瘍溶解性ヘルペスウイルスと顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、PD1 に対する単鎖可変領域フラグメント(scFv)を分泌する幹細胞による治療が有効であることを示した。今後は、これらの他の癌種の転移性脳腫瘍や、グリオーマなどの原発性脳腫瘍の治療への応用も検討される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakaya Masato, Tamura Ryota, Takahara Kento, Senuma Takumi, Yoshida Keisuke, Kitamura Yohei, Ueda Ryo, Toda Masahiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Volumetric measurement of paranasal sinuses and its clinical significance in pituitary neuroendocrine tumors operated using an endoscopic endonasal approach	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 1162733
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2023.1162733	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 Moleirinho Susana, Kitamura Yohei, Borges Paulo S G N, Auduong Sophia, Kilic Seyda, Deng David, Kanaya Nobuhiko, Kozono David, Zhou Jing, Gray Jeffrey J, Revai-Lechtich Esther, Zhu Yanni, Shah Khalid	4. 巻 12
2. 論文標題 Fate and Efficacy of Engineered Allogeneic Stem Cells Targeting Cell Death and Proliferation Pathways in Primary and Brain Metastatic Lung Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cells Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 444 ~ 458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/stcltm/szad033	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 Kanaya Nobuhiko, Kitamura Yohei, Lopez Vazquez Maria, Franco Arnaldo, Chen Kok-Siong, van Schaik Thijs A., Farzani Touraj Aligholipour, Borges Paulo, Ichinose Toru, Seddiq Waleed, Kuroda Shinji, Boland Genevieve, Jahan Nusrat, Fisher David, Wakimoto Hiroaki, Shah Khalid	4. 巻 15
2. 論文標題 Gene-edited and -engineered stem cell platform drives immunotherapy for brain metastatic melanomas	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 eade8732
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scitranslmed.ade8732	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 北村 洋平, 佐々木 光, 戸田 正博
2. 発表標題 急性リンパ性白血病中枢神経浸潤に対する幹細胞治療
3. 学会等名 第81回日本脳神経外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北村 洋平, 佐々木 光, 戸田 正博
2. 発表標題 当院における中枢神経原発悪性リンパ腫の治療と予後
3. 学会等名 第27回日本脳腫瘍の外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北村 洋平, 佐々木 光, 戸田 正博
2. 発表標題 幹細胞治療研究のための転移性脳腫瘍マウスモデルの構築
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kitamura Y, Kanaya N, Moleirinho S, Du W, Reinshagen C, Sasaki H, Shah K
2. 発表標題 Anti-EGFR VHH-armed death receptor ligand-engineered stem cells have therapeutic efficacy in basal-like breast cancer brain metastasis
3. 学会等名 The 6th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology Societies (WFNOS) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 5)Yohei Kitamura, Nobuhiko Kanaya, Susana Moleirinho, Ryota Tamura, Ryo Ueda, Hikaru Sasaki, Msahiro Toda, Khalid Shah
2. 発表標題 Stem cell therapy for leptomeningeal disease
3. 学会等名 The 28th Annual Scientific Meeting of the Society for Neuro-Oncology (SNO) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 34)北村洋平、Susana Moleirinho、Nobuhiko Kanaya、田村亮太、植田良、佐々木光、Khalid Shah、戸田正博
2. 発表標題 癌性髄膜炎に対する幹細胞治療
3. 学会等名 第41回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北村洋平、田村亮太、植田良、佐々木光、戸田正博
2. 発表標題 中枢神経系原発悪性リンパ腫の手術についての検討
3. 学会等名 第27回日本脳腫瘍の外科学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北村洋平、田村亮太、植田良、佐々木光、戸田正博
2. 発表標題 当院での中枢神経系原発悪性リンパ腫の治療
3. 学会等名 第82回日本脳神経外科学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 22)北村洋平、Susana Moleirinho、Nobuhiko Kanaya、田村亮太、植田良、佐々木光、Khalid Shah、戸田正博
2. 発表標題 固形癌の癌性髄膜炎に対する幹細胞治療
3. 学会等名 第23回日本分子脳神経外科学会
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
---------	---------