

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592133

研究課題名(和文) 血中循環がん細胞を用いた脳転移におけるがん微小環境の解析

研究課題名(英文) Study of cancer microenvironment in brain metastasis using circulating tumor cells

研究代表者

田中 邦彦(TANAKA, Kunihiko)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：80380955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本人の死因の第一位を占める癌の直接死因は転移である。なかでも脳転移は、血管内に入った癌細胞が脳に到達しそこで増殖することにより起こる。我々は、血液中に存在する癌細胞がどのように脳内に入り脳内の環境にどのように適応して増殖するのかを調べるため、高脳転移性蛍光発現癌細胞を樹立した。また、脳内の環境を試験管内で再現する実験系を新たに開発することに成功した。これらを用いて、癌細胞の種類により脳内での増殖の仕方が異なることを発見した。

研究成果の概要(英文)：The direct cause of death of cancer, which is the leading cause of death in Japan, is metastasis. Above all, brain metastasis is developed by cancer cells' intravasating, extravasating, and proliferating in the brain. The purpose of our project was to investigate how the circulating tumor cells get into the brain, adapt to the microenvironment, and proliferate in the brain. We established highly brain metastatic cancer cells which were expressing green fluorescent protein and succeeded in developing new system in which the brain microenvironment was reconstructed in vitro. Using the system, we clarified that different types of cancer cells showed the different ways of proliferating in the brain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳転移 血中循環がん細胞 がん微小環境

1. 研究開始当初の背景

癌の診断や分子標的治療薬の進歩にも関わらず、本邦において未だ約3人に1人が癌で死亡する。なかでも癌患者の約25%は最終的に脳転移を来たすと言われている。脳転移に対しては、外科的切除、化学療法、局所あるいは全脳放射線照射、これらの組み合わせが主な治療法であるが、切除不能例や脳内移行性の高い治療薬が少ないことにより、十分な予後の改善がみられないのが現状である。そのため、脳転移機構の解明と新規抑制法・治療法の開発は、最も重要で急務な分野のひとつである。

Paget は、転移が成立するためには、転移能をもつ癌細胞 “ seed ” と、その癌細胞の発育に適した転移臓器の微小環境 “ soil ” 両方が必要であると提唱した (Lancet 1: 571-573, 1889)。脳転移は血行性転移が主であり、脳血管内から実質に逸脱し、転移巣を形成する元となる細胞は、血中循環がん細胞であると考えられる。血中循環がん細胞の同定は困難であると考えられてきたが、近年、上皮系マーカーを組み合わせることでその細胞数が計測可能となり、その数と予後との相関や、化学療法の効果判定にも有用であることが報告されている。このように、血中循環がん細胞は血行性転移を直接になう癌細胞、すなわち “ seed ” そのものとして、その重要性が注目されている。

血行性に脳転移するためには、血中循環がん細胞が血管外へ逸脱し、脳内環境に適合して発育する必要がある。すなわち、血中循環がん細胞と脳実質正常細胞との相互作用という、がん微小環境が重要となる。Kienastらは、*in vivo* リアルタイムイメージングを用いることにより、脳転移したメラノーマ細胞は血管に沿って発育すること、また肺癌細胞は血管新生を行い、クラスターが癒合しながら転移巣を形成することを示した (Nat Med. 16: 116-22, 2010)。この結果は、脳

転移の形成にがん微小環境でも特に血管ニッチが重要な役割を果たしていることを示している。この脳毛細血管には血液脳関門が存在し、抗癌剤等の薬剤や有害物質の脳実質への到達を厳しく制限している。血中循環がん細胞が脳転移するためには、何らかの形で血液脳関門 (BBB) を通過する必要がある。BBB 構成細胞のうち、我々は、アストロサイトが BBB において血管内皮細胞間のタイトジャンクションを強化することにより、肺癌細胞の血管外逸脱を抑制していることを見出した (未発表)。このように、BBB は脳転移における “ soil ” としてのがん微小環境として重要な役割をもつが、癌細胞-正常細胞間のクロストークがどのように機能しているかについては、未だ明らかでない。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究において、血中循環がん細胞の転移特性と脳転移がん微小環境としての BBB の役割を明らかにすることで、脳転移機構の解明を行う。脳転移、特に血中循環がん細胞の血管外逸脱に重要な分子と、がん微小環境において脳転移成立に重要な細胞・因子を見だし、治療への応用の基盤となる研究を行う。

(1) 原発癌細胞、血中循環がん細胞、脳転移癌細胞を単離してマイクロアレイを行うことにより、3者間の遺伝子発現の差、特に血中循環がん細胞に特徴的な遺伝子発現パターンを明らかにする。

(2) フローサイトメトリー、*in vitro* アッセイ系を用いて、血中循環がん細胞のがん幹細胞としての性質、上皮間葉移行との関連を明らかにする。接着、増殖、浸潤能などの癌細胞としての特性を調べ、原発・転移癌細胞と比較する。

(3) 我々の開発した BBB キットに血中循環がん細胞を用いることにより、転移能をもつ血中循環がん細胞を単離し、その転移能を規定する分子を(1)の結果と照らし合わせて明ら

かにする。血中循環がん細胞に対する脳転移がん微小環境の役割を、正常細胞の組み合わせ、因子の添加・抑制実験により調べる。

(4)臨床検体より血中循環がん細胞を単離し、フローサイトメトリーにより脳転移規定分子の発現を調べる。

(5)臨床検体の血中循環がん細胞を脳転移規定分子をマーカーとしてセルソーティングし、マウスに経静脈投与して観察することにより、*in vivo* での特性と細胞動態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)血中循環がん細胞の単離と網羅的遺伝子解析

臨床検体からは安定した量の血中循環がん細胞の回収が困難なため、GFP 発現癌細胞を作成しマウスに原発及び転移巣を形成させ、GFP をマーカーとして各癌細胞を回収し、原発癌細胞、血中循環がん細胞、脳転移癌細胞の三者間の遺伝子発現パターンの相違をマイクロアレイを用いて明らかにする。

GFP 発現高脳転移癌細胞株の樹立

脳転移が報告されているヒト肺癌 (NCI-H1299 など)、乳癌 (MDA-MB-231 など)、悪性黒色腫細胞株 (B16-BL6 など) をヌードマウスに同所移植し、脳転移のみを高率に起こすまで繰り返す。

pAcGFP1-N1 ベクター をトランスフェクションし、GFP 安定発現株を樹立する。

原発癌細胞、血中循環がん細胞、脳転移癌細胞の単離とマイクロアレイ

GFP 発現高脳転移癌細胞株を同所移植し、脳転移巣を形成させたのちサクリファイして、全血を脱血、また原発腫瘍、脳転移腫瘍を摘出する。それぞれの腫瘍より癌細胞を初代培養し、全血の細胞成分とともに GFP をマーカーとしてセルソーティングを行い、原発癌細胞、血中循環がん細胞、脳転移癌細胞を得る。これらの細胞より RNA を

抽出後、DNA マイクロアレイを行う。3 群間で比較し、血中循環がん細胞で大きな差がみられる遺伝子を抽出し、遺伝子レベル、蛋白レベルで確認する。肺癌、乳癌、悪性黒色腫間での血中循環がん細胞の遺伝子発現パターンの違いについても検討する。

(2)血中循環がん細胞の細胞生物学的解析および脳転移におけるがん微小環境との相互作用の解析

血中循環がん細胞の特徴を、特にがん幹細胞と上皮間葉移行の観点から調べる。癌細胞本来の機能も、各種アッセイを用いて明らかにする。血中循環がん細胞内のどの分画が転移するかを我々の BBB キットを用いて調べ、その転移におけるがん微小環境としての正常細胞との相互作用も明らかにする。

血中循環がん細胞の細胞生物学的解析

血中循環がん細胞におけるがん幹細胞の有無、割合、上皮間葉移行をおこした細胞の割合、CD マーカーを、フローサイトメトリーを用いて解析する。原発癌細胞、転移癌細胞においても同様に行い比較する。

血中循環がん細胞の機能解析

血中循環がん細胞の癌細胞としての機能を、増殖能、基底膜や血小板及び内皮細胞への接着能、移動能、浸潤能、アノキス抵抗性、マトリックスメタロプロテアーゼ産生能、増殖因子感受性、サイトカイン分泌能それぞれのアッセイを行い、原発癌細胞、転移癌細胞の結果と比較する。

BBB キット及び *in vivo* での血中循環がん細胞の転移能とがん微小環境との相互作用の解析

BBB キットに血中循環がん細胞を播種して、血管内皮細胞、ペリサイト層の通過を観察し、血管外逸脱能力を比較する。通過を指標に比較し、規定分子を明らかにする。こ

の2種の血中循環がん細胞をマウス血中に投与し、転移能と細胞動態を観察する。正常細胞の組み合わせを変え、また BBB キット培養液中に各種増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、阻害剤を添加し細胞動態を観察することにより、脳転移におけるがん微小環境内のそれぞれの正常細胞、液性因子の作用を明らかにする。

(3)臨床検体を用いた血中循環がん細胞および脳転移がん微小環境の解析

臨床検体を用いて、上記において明らかとなった血中循環がん細胞の脳転移関連分子の確認及び脳転移がん微小環境との相互作用を検討する。

患者様からの血中循環がん細胞単離及び転移巣癌細胞の初代培養

患者様から静脈血を採取し、各種癌の上皮マーカーを用い血中循環がん細胞を単離する。脳転移巣の切除が行われた患者様から、転移組織より転移癌細胞を初代培養により得る。

フローサイトメトリーを用いた血中循環がん細胞の転移関連分子の解析

上記で明らかとなった血中循環がん細胞での脳転移関連分子の発現を、培養後フローサイトメトリーを用いて調べる。候補分子の強制発現、あるいは RNA 干渉による効果を BBB キットを用いて行う。

in vivo での血中循環がん細胞転移能の比較

候補分子をマーカーにセルソーティングし培養後、PKH26GL を用いて蛍光標識し、マウスの血中に播種する。細胞希釈による脳転移の有無、頻度、脳血管・脳実質との関係を明らかにする。

4. 研究成果

(1)高脳転移癌細胞株を樹立するために、*in vivo* で脳転移が報告されているヒト肺癌細胞株及びヒト乳がん細胞株をそれぞれ1種

ずつ選択し、pAcGFP1-N1 ベクターをトランスフェクション、抗生物質によるセレクションをかけ、GFP 高発現癌細胞株を樹立した。これらを免疫不全マウスに同所移植し脳転移の形成を観察したが、どちらも転移形成を認めなかった。最適化の検討を行ったが、転移形成を認めなかったため、*in vivo* イメージングにて各臓器への転移を観察されている高崎健康福祉大学の村上孝教授より、同手法にて脳転移が確認されたヒト肺癌細胞株を3種ご提供いただき、GFP 高発現癌細胞株を樹立した。

(2)このうち2種を用い、脳転移 *in vivo* セレクションを3回実施した。具体的には、ヌードマウスの肺内に癌細胞をマトリゲルとともに播種し、飼育を続け、衰弱あるいは体重減少を認めた時点でサクリファイスして、脳を速やかに摘出した。脳実質を細切、酵素処理後、G418 入りの培養液にて初代培養した。GFP 陽性細胞をクローニングシリンダーにてサブクローニングし、培養後、再びヌードマウスの脳内に播種した。これを3回繰り返すことにより、高脳転移性肺癌細胞株を樹立した。この癌細胞を培養にて増やしたのち、再びヌードマウスの肺内に播種し、最終的に原発巣、脳、前血液を採取した。原発巣及び脳実質からは GFP 陽性肺癌細胞を回収、培養することが可能であったが、血液からは GFP をマーカーとするセルソーティングでは、GFP 陽性細胞を回収することができなかった。サンプル回収の時期、血管内の灌流による回収、MACS によるセルソーティング、スフェロイド培養など様々な条件を変えて試みたが、健康で十分量の GFP 陽性細胞を回収することができなかった。

(3)我々が開発した *in vitro* 血液脳関門再構成キット(図1)に脳転移性ヒト肺癌細胞株及び脳転移性ヒト悪性黒色腫細胞株を播種し、その浸潤通過を観察した(図2)。

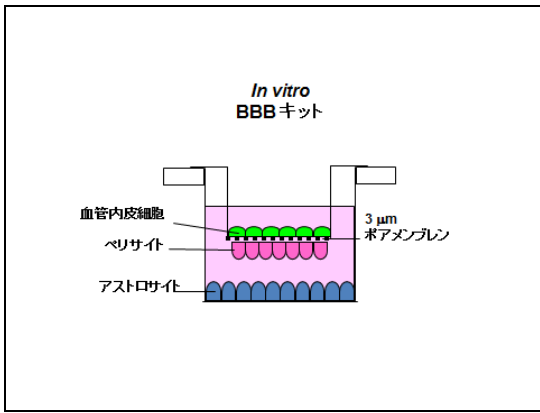


図 1

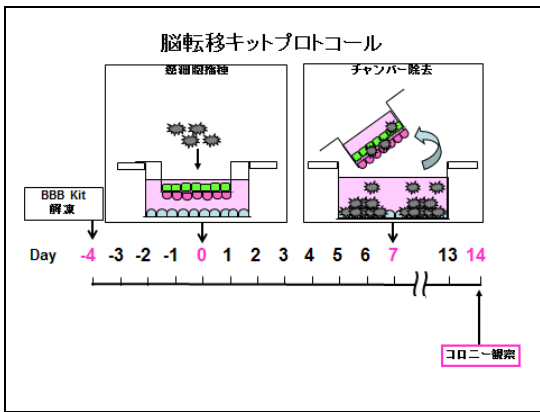


図 2

肺癌細胞は血管内皮細胞から離れてコロニーを形成するのに対し(図3)、悪性黒色腫細胞は血管内皮細胞に接着したまま増殖することを、ルシフェラーゼ発現悪性黒色腫細胞株を用いて見出した(図4)。

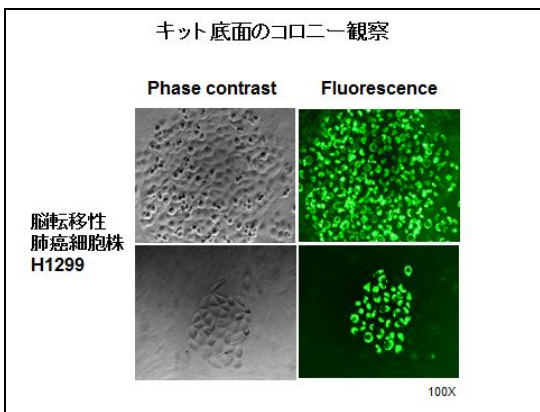


図 3

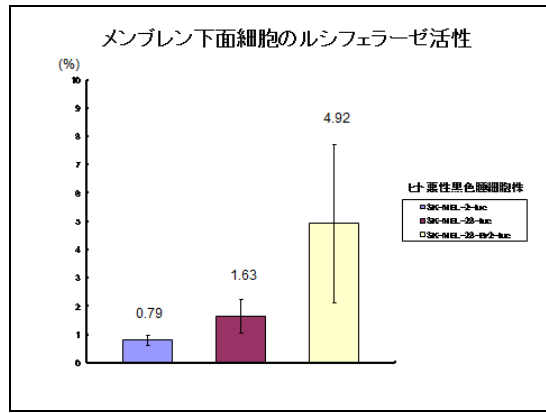


図 4

これにより、癌細胞のタイプごとに脳転移メカニズムが異なることを in vitro で再現し、脳転移機構の細胞生物学的解析に我々のキットが有用であることを示した。

(4)さらに、8 ミクロンポアメンブレンの上面に初代培養のアストロサイトとペリサイトを混合接着培養し、裏面に初代培養血管内皮細胞を接着培養した reversed BBB キットを新たに開発することにより、BBB キットと組み合わせて、脳転移のみならず原発性脳腫瘍も含め、より多面的な細胞生物学的な解析ができるようになった。

(5) 8 ミクロンポアメンブレンの上面に初代培養血管内皮細胞を単層で接着培養したモデルを用いることにより、肺癌細胞は血管内皮細胞を浸潤通過できるが、膠芽腫細胞は通過できないことを見出した。また、膠芽腫細胞が血管内皮細胞と接着した際に、血管内皮細胞のタイトジャンクションバリア機能を強化させることを新たに見出し、これに線維芽細胞増殖因子タイプ 2 (FGF2) が関与していることを発見した(図5)。

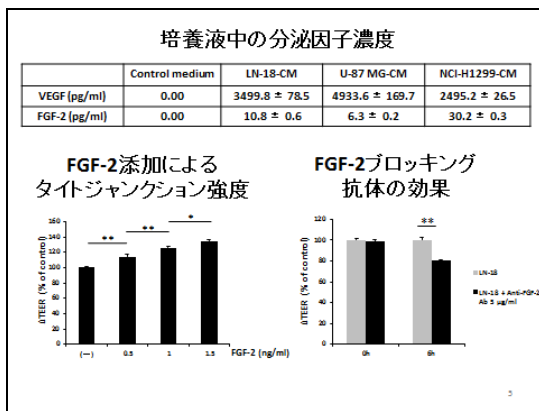


図 5

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Takeshita T, Nakagawa S, Tatsumi R, So G, Hayashi K, Tanaka K, Deli MA, Nagata I, Niwa M. Cilostazol attenuates ischemia-reperfusion-induced blood-brain barrier dysfunction enhanced by advanced glycation endproducts via transforming growth factor- β 1 signaling. *Mol Cell Neurosci.* 2014 60:1-9. 査読有
doi: 10.1016/j.mcn.2014.01.006.
2. Yamada N, Nakagawa S, Horai S, Tanaka K, Deli MA, Yatsushashi H, Niwa M. Hepatocyte growth factor enhances the barrier function in primary cultures of rat brain microvascular endothelial cells. *Microvasc Res.* 2014 Mar.92:41-49. 査読有
doi: 10.1016/j.mvr.2013.12.004.
3. Toyoda K, Tanaka K, Nakagawa S, Thuy D. HD, Ujifuku K, Kamada K, Hayashi K, Matsuo T, Nagata I, and Niwa M. Initial contact of glioblastoma cells with existing normal brain endothelial cells strengthen the barrier function via fibroblast growth factor 2 secretion: A new in vitro blood-brain

barrier model. *Cell Mol Neurobiol.* 2013 ;33:489-501. 査読有
doi: 10.1007/s10571-013-9913-z.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 田中 邦彦
腫瘍微小環境としての血液脳関門
第 86 回日本薬理学会年会
2013 年 3 月 22 日
福岡
 2. Kunihiko Tanaka
Initial contact of glioblastoma cells with existing normal brain endothelial cells strengthen the barrier function via fibroblast growth factor 2 secretion.
Cold Spring Harbor Meeting 2012
Blood-brain Barrier
2012 年 12 月 6 日
Cold Spring Harbor, USA
 3. 田中 邦彦
BBB キットを用いた脳転移形式の評価
第 85 回日本薬理学会年会
2012 年 3 月 16 日
京都
- ## 6 . 研究組織
- (1)研究代表者
田中 邦彦 (TANAKA, Kunihiko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号 : 80380955
- (2)連携研究者
豊田 啓介 (TOYODA, Keisuke)
長崎大学・大学病院・医員
研究者番号 : 40597366