

令和 2 年 4 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07181

研究課題名(和文) 脳転移肺がん細胞の薬剤応答と初期耐性のキネティクス解析に基づく新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the nature of treatment-resistant tumor microenvironment in the central nervous system

研究代表者

平田 英周 (Hirata, Eishu)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号：40761937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺がん脳転移マウスモデルの病理組織学的解析により、EGFR阻害剤に対して初期耐性を示すがん細胞は脳内微小環境によって一時的に守られていることが明らかとなった。この初期耐性に関わるシグナル伝達経路の同定を目的として1細胞遺伝子発現解析を行い、ある特定のサイトカインシグナルが初期薬剤耐性に関与していることを突き止めた。またEGFR阻害剤に対する初期薬剤耐性微小環境の分子基盤解明を目的として、がん細胞と初代培養グリア細胞の新規in vitro共培養系を確立した。この共培養系を用いた薬剤スクリーニングにより、脳微小環境のがん促進性・抑制性を規定するシグナル伝達経路の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺がん脳転移は極めて予後不良であり、その克服はがん研究が取り組むべき喫緊の課題である。EGFR変異を有する肺がんに対してはEGFR阻害剤が一定の成果を挙げるに至っているが、現代のがん医療が直面している最大の課題の一つとして、これに対する初期薬剤耐性が挙げられる。本研究は脳転移肺がん細胞の初期薬剤耐性機構を脳微小環境との相互作用の観点から明らかにしたものである。将来的には治療抵抗性微小環境を標的とすることでがん脳転移を根治する革新的な治療戦略の開発につながる可能性を秘めており、学術的・社会的意義の極めて高い研究であると言える。

研究成果の概要(英文)：Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors show certain effects in the treatment of lung cancer brain metastasis with EGFR mutation, however, the problem of drug resistance still remains to be solved. PC9-BrM3 human lung cancer cells form aggressive brain metastasis within one month after intra-cardiac injection in nude mice. The brain metastases respond to gefitinib, an EGFR inhibitor, very well and the drug induces quiescent phenotype in the surviving cells. Intriguingly, we find that the survived cells have not acquired any intrinsic resistance but seems to be temporally tolerating the drug in the brain microenvironment. Single cell transcriptome analysis reveals cytokine signaling as an alternative pathway for the surviving cells to tolerate the drug. We established a novel in vitro co-culture system of cancer cells and primary glial cells and now investigating the mutual interactions between these cell types, which can cause the initial resistance to EGFR inhibitors.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：脳転移 薬剤耐性 腫瘍微小環境 脳微小環境 アストロサイト ミクログリア エピジェネティクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺がんは早期に脳転移を来しやすく、頻度としても転移性脳腫瘍の原発巣として実に約50%を占めている。また乳がんなど他のがん種に比べ脳転移後に激しい臨床経過を示すことも知られており、脳転移を来した肺がん患者の予後は極めて不良である¹⁾。近年、がん遺伝子情報に基づいた分子標的治療薬により、一部のがんに対しては従来の細胞傷害性抗がん剤と比べて格段に効率良くがん細胞を死滅させることができるようになり、EGFR 変異を有する肺がんに対しても EGFR 阻害剤が一定の成果を挙げるに至っている。しかしながら、これら分子標的治療においても治療経過中における薬剤耐性がん細胞の出現が新たな問題となっており、肺がん治療においても EGFR 阻害剤に対する耐性出現が極めて深刻な問題となっている²⁾。この治療耐性は大きく初期耐性と獲得耐性に分けられるが、遺伝子の追加変異等によってがん細胞が一旦強固な治療耐性を獲得すると、その治療は極めて困難となる。そこでがんの初期耐性を標的とし、生存がん細胞の数を極限まで減じることによって、より効率よくがんの治療を目指す治療戦略が提唱されている³⁾。初期薬剤耐性には腫瘍微小環境が大きく関与していることが知られているが、がん脳転移における初期耐性微小環境の構築には依然として不明な点が多い。そこで本研究では EGFR 変異を有する肺がん脳転移を対象とし、EGFR 阻害剤の投与経過中に脳組織内に形成される治療抵抗性微小環境の本態解明を目標として研究を開始した。

2. 研究の目的

EGFR 阻害剤に対する肺がん細胞の薬剤応答と初期耐性を臓器特異的微小環境の再編集に着目して時系列的に明らかにする。特に、実際の臨床において治療効果に乏しい脳転移を標的として解析を行い、EGFR 阻害剤に対する初期薬剤耐性の克服とこれによるがんの根治を目標とした画期的な治療戦略を開発することを本研究の最終目標とする。

3. 研究の方法

(1) 肺がん脳転移マウスモデルの作成と病理学的検索

EGFR 変異を有するヒト肺がん細胞株 PC9 にルシフェラーゼ (Luc) と緑色蛍光蛋白質 (EGFP) を発現させ、ヌードマウス心腔内への接種と脳転移巣からの回収を繰り返すことにより、脳転移指向性を持った細胞株 PC9-Luc-EGFP-BrM3 を樹立した。この細胞株をマウス心腔内に接種し、2週間後から EGFR 阻害剤ゲフィチニブの投与を行った。これによって形成される微小残存病変 (Minimum residual disease, MRD) の病理組織学的な検索を行い、生存がん細胞の局在と周囲微小環境の構成因子の探索を行った。

(2) 1細胞遺伝子発現解析による生存がん細胞のトランスクリプトーム解析

上記マウスモデルにおいて、がん細胞の心腔内接種から28日目(治療14日目)にマウス脳組織を外科的に摘出し、GentleMACS dissociator を用いて脳転移がん細胞のみを抽出した。1細胞分離と cDNA ライブラリの作成は Fluidigm C1 Single-Cell Auto Prep システムを使用し、Illumina HiSeq 2500 による高速シーケンスを行った。

(3) 新規 in vitro 共培養系の確立とがん細胞-グリア細胞ネットワークの解析

先行研究により、脳転移がん細胞とグリア細胞の間には双方向性エピジェネティクス制御機構が存在していることが明らかとなった。この制御機構が EGFR 阻害剤に対する初期薬剤耐性微小環境の成立に関与していないか検証を行うため、がん細胞と初代培養グリア細胞の新規 in vitro 共培養系を樹立した。この共培養系を用いた薬剤スクリーニングを行

い、脳転移がん細胞の生存に関わると考えられる分子・シグナル伝達経路の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 初期薬剤耐性肺がん細胞は活性化アストロサイトに取り囲まれている

心腔内接種され全身転移を形成した PC9-Luc-EGFP-BrM3 ヒト肺がん細胞株はゲフィチニブに対して良好に応答した。しかしながら病理学的に詳細な検索を行ったところ、脳転移がん細胞は完全には消失しておらず脳組織内に散在する形で MRD を形成し、これらの多くが Ki67 陰性の非分裂細胞として生存していることが明らかとなった。また生存細胞の多くは活性化アストロサイトに囲まれて存在していることも明らかとなったが、これらがん細胞を脳組織内から抽出して細胞株を再樹立したところ、この段階では生存細胞は内因性の薬剤耐性は一切獲得していないことが明らかとなった。このことはゲフィチニブ治療に対して生存したがん細胞がこの段階では脳内微小環境によって一時的に守られていることを示唆していると考えられた。

(2) 初期薬剤耐性肺がん細胞ではサイトカインシグナルが亢進している

初期薬剤耐性がん細胞における生存シグナルの同定を目的として、コントロール (0 mg/kg/day) およびゲフィチニブ治療群 (20 mg/kg/day) のマウス脳組織からがん細胞のみを抽出し、1 細胞遺伝子発現解析を行った。結果、MRD を形成する脳転移肺がん細胞ではサイトカインシグナルが亢進していることが明らかとなった。またがん細胞とアストロサイトとの共培養実験を行ったところ、アストロサイトからある特定のサイトカインの分泌が亢進していることが明らかとなった。

(3) 新規 in vitro 共培養系の構築とがん細胞の生存シグナルの同定

以上の結果は、ゲフィチニブに対する脳転移肺がん細胞の生存戦略としてサイトカイン経路が利用されていることを示唆している。上記で用いたアストロサイトの分離培養法はこれまで一般的に用いられてきた方法であるが、我々の検討の結果、従来の培養法ではアストロサイトの可塑性が徐々に失われてしまい、がん細胞との相互作用を長期間に渡って解析することが困難であることが明らかとなった。治療経過中に脳組織内に形成される治療抵抗性微小環境の本態解明には適切な in vitro 共培養系の構築が必須であると考え、我々は初代グリア細胞培養法に関して各種の検討を行った。結果、アストロサイトの可塑性を保った状態で長期間 (~40 日間) に渡ってグリア細胞の培養が可能となる新規培養法を確立することに成功した。この培養法を用いてがん細胞との相互作用に関する薬剤スクリーニングを行ったところ、がん細胞の増殖促進および増殖抑制に関わるアストロサイトと、これを規定するシグナル伝達経路の同定に成功した。

現在、新規 in vitro 共培養系を用いた解析により、ゲフィチニブ初期耐性に関わるアストロサイト・ミクログリア関連因子の同定を試みている。また新規 in vitro 共培養系を用いた長期培養解析により、in vitro における MRD の形成と薬剤耐性獲得の分子機構解明に向けた研究を展開している。最終的には、治療抵抗性微小環境におけるがん細胞-グリア細胞の相互ネットワークの全貌を解明し、これらを共標的とした革新的な脳転移根治療法を開発することを目標としている。

<引用文献>

1) Wanleenuwat P and Iwanowski P: Metastases to the central nervous system: molecular

basis and clinical considerations. *J Neurol Sci*, 412:116755, [Epub] (2020).

2) Takeuchi S, Yano S: Clinical significance of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: sensitivity and resistance. *Respir Investig*, 52(6), 348-56 (2014).

3) Hirata E and Sahai E: Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7(7), [Epub] (2017).

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Wang Rong, Yamada Tadaaki, Arai Sachiko, Fukuda Koji, Taniguchi Hirokazu, Tanimoto Azusa, Nishiyama Akihiro, Takeuchi Shinji, Yamashita Kaname, Ohtsubo Koshiro, Matsui Junji, Onoda Naoyoshi, Hirata Eishu, Taira Shu, Yano Seiji	4. 巻 18(5)
2. 論文標題 Distribution and Activity of Lenvatinib in Brain Tumor Models of Human Anaplastic Thyroid Cancer Cells in Severe Combined Immune Deficient Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 947-956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-18-0695	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 Hirata Eishu, Kiyokawa Etsuko	4. 巻 20
2. 論文標題 ERK Activity Imaging During Migration of Living Cells In Vitro and In Vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 679 ~ 679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20030679	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 Hirata Eishu, Ichikawa Takehiko, Horike Shin-ichi, Kiyokawa Etsuko	4. 巻 109
2. 論文標題 Active K-RAS induces the coherent rotation of epithelial cells: A model for collective cell invasion in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4045 ~ 4055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13816	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 Hirata Eishu, Sahai Erik	4. 巻 7
2. 論文標題 Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine	6. 最初と最後の頁 a026781 ~ a026781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/cshperspect.a026781	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 該当する

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Eishu Hirata
2. 発表標題 Unravel the mysteries of cancer cell dormancy in brain metastasis
3. 学会等名 The 17th Stem Cell Research Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田 英周
2. 発表標題 脳転移がん細胞の休眠維持・破綻機構の解明
3. 学会等名 アステラス病態代謝研究会 竹中奨励賞受賞講演 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田 英周
2. 発表標題 脳転移休眠がん細胞の謎を解く
3. 学会等名 第1回日本医学会連合リトリート
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eishu Hirata
2. 発表標題 DNMT1 suppression and epigenetic reprogramming induced by brain microenvironment determines the fate of brain metastatic cancer cells
3. 学会等名 Joint Symposium on Tumor Microenvironment and Precision Oncology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eishu Hirata
2. 発表標題 Epigenetic reprogramming induced by brain microenvironment determines the fate of brain metastatic cancer cells
3. 学会等名 The 9th KUCRI-FUSCC Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田 英周
2. 発表標題 人工知能と生体内イメージングの融合
3. 学会等名 がん研究とデータサイエンスのコミュニケーション
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eishu Hirata
2. 発表標題 Unravel the mysteries of cancer cell dormancy in brain metastasis
3. 学会等名 International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eishu Hirata
2. 発表標題 Unravel the mysteries of cancer cell dormancy in brain metastasis
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 (International Symposium) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平田 英周
2. 発表標題 脳転移休眠がん細胞の謎を解く
3. 学会等名 金沢大学脳神経科学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平田 英周
2. 発表標題 脳転移休眠がん細胞の謎を解く
3. 学会等名 第1回日本医学界連合リトリート
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eishu Hirata
2. 発表標題 Unravel the mysteries of cancer cell dormancy in brain metastasis
3. 学会等名 Satellite Interstellar Initiative（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Eishu Hirata
2. 発表標題 Tumour microenvironment: Safe havens and drug resistance
3. 学会等名 ESMO Asia 2017（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平田 英周、矢野 聖二
2. 発表標題 脳転移肺がん細胞の薬剤応答と耐性のキネティクス解析
3. 学会等名 平成29年度金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平田 英周、堀家 慎一、清川 悦子
2. 発表標題 腺管・腺房型がん細胞集団浸潤機構としてのMDCKシスト回転の動的解析
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Eishu Hirata, Yan Yan, Chwee Ming Lim
2. 発表標題 Nanoparticle Geometry-Based Reprogramming of Innate Immunity for Nasopharyngeal Cancer Vaccine
3. 学会等名 AMED/NYAS Interstellar Initiative (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平田 英周、堀家 慎一、清川 悦子
2. 発表標題 腺管・腺房型がん細胞集団浸潤機構としてのMDCKシスト回転の動的解析
3. 学会等名 第68回日本細胞生物学学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Eishu Hirata
2. 発表標題 Imaging 'Failure' How BRAF inhibition generates drug tolerant Microenvironment
3. 学会等名 The 25th IRCMS seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 近藤 夏子、平田 英周	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 483-492 (503)
3. 書名 がん生物学イラストレイテッド 第2版 (編集 渋谷 正史・湯浅 保仁) 「第9章 6. 脳腫瘍」	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 非プロトン性双性イオンを用いた未分化促進剤及び凍結保護剤	発明者 黒田 浩介、平田 英周	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-90509	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----