

142. 脳転移がん細胞の休眠維持と破綻の機構解明

平田 英周

金沢医科大学 病理学 I

Key words : がん細胞休眠, 脳転移, 腫瘍微小環境, シングルセル, イメージング

緒言

近年の研究により、がん細胞の遠隔転移自体は早期に起こり得ること、この早期転移がん細胞が一定の期間を経た後に再増殖を開始し、新たな肉眼的転移巣を形成することが指摘されている¹⁻³⁾。がん細胞の休眠期間や場所はがんの種類や症例によって様々であるが、臨床的に重要な問題として事前診断と治療が極めて困難であることが挙げられ、特に脳転移は症例数の増加からがん研究が解決すべき喫緊の課題となっている。すなわち、単一細胞として脳組織に潜むがん細胞を検出することは現在の技術では不可能である上、脳血液関門などの特異な構造から抗がん剤や分子標的薬はこれらの細胞に届きにくい。しかも化学療法 of 多くはその作用機序として、がん細胞が正常細胞に比べて増殖が盛んであることを利用しているため、休眠状態にあるがん細胞はこれら既存の治療法に対して耐性を示している。これら複合的な理由により、がん原発巣の完全切除と追加化学療法により完全寛解の導入に至っているにも関わらず、数年後に脳局所的に再発を引き起こす症例が頻繁に認められるものと考えられる。本研究では脳組織特異的に休眠状態を呈するがん脳転移マウスモデルを作製し、がん細胞の休眠維持と破綻の機構を解明することを目標として実験を行った。

方法および結果

1. がん細胞株のマウス心腔内接種による脳転移能の評価

脳転移を来たすがん種としては肺がん・乳がん・悪性黒色腫が挙げられ、これらで転移性脳腫瘍の原発巣として全体の約 60~75%を占める⁴⁾。そこでヒト及びマウス肺がん・乳がん・悪性黒色腫細胞株 15 種類 (ヒト細胞株 5 種類、マウス細胞株 10 種類) に蛍光蛋白質 (EGFP) とルシフェラーゼを発現させ、マウス心腔内接種によるがん全身転移誘導モデルのスクリーニングを行った (図 1A)。結果、脳組織に転移巣を形成する複数のがん細胞株を同定した。脳転移巣の形成様式には angiogenic growth を示すものと cooperative growth を示すもの⁵⁾が存在していたが (図 1B)、これらの中には脳組織内にて休眠状態を呈する細胞も存在していた。組織透明化法を用いた 3 次元的検索により⁶⁾、これら休眠細胞の多くが球状 (rounded morphology) を呈していること、および血管構造に接して存在していることが明らかとなった (図 1C)。

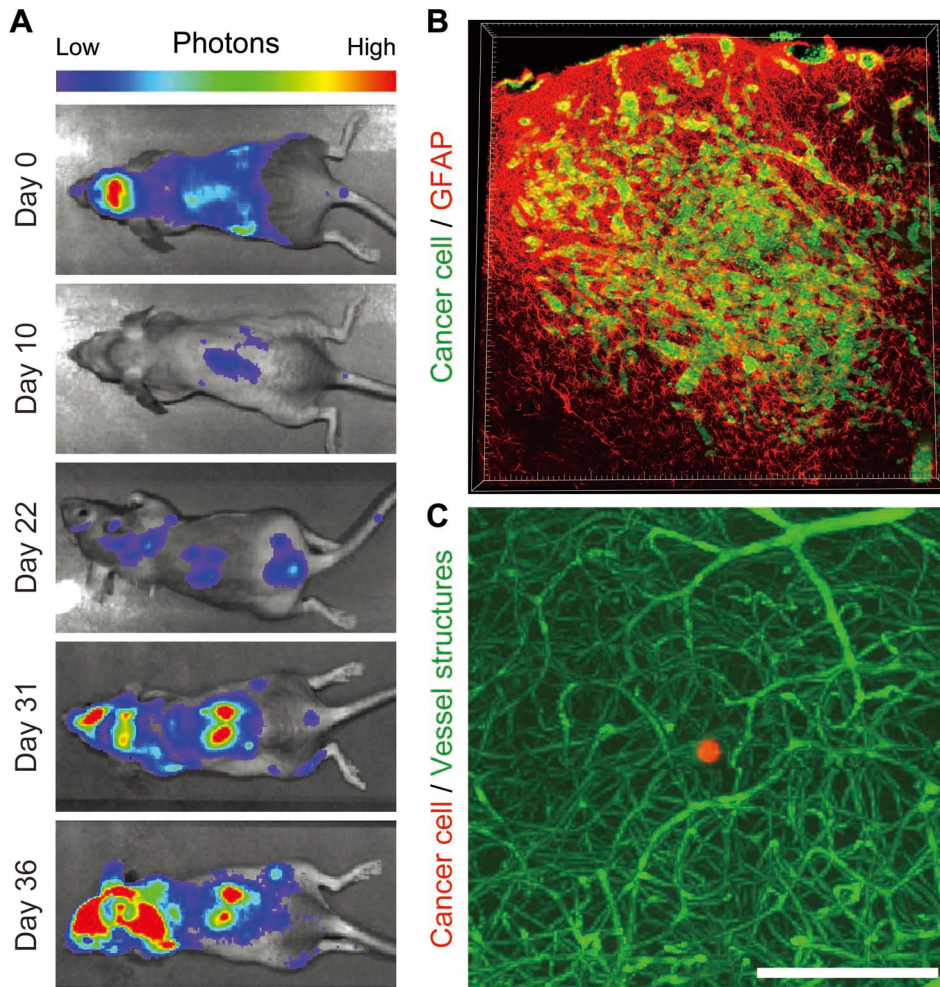


図1. がん細胞のマウス心腔内接種による脳転移モデルの作製

A) がん細胞株の心腔内接種による全身転移誘導。ルシフェラーゼを発現させたヒト乳がん細胞株 (1×10^6 個) をヌードマウス左心室内に接種し、発光イメージングにより全身に転移巣が形成される様子を36日間に渡ってモニタリングした。B) マウス脳組織を摘出後CUBIC法によって透明化し、2光子励起蛍光顕微鏡を用いて撮影。このがん細胞株は脳内で血管構造に沿って転移巣を形成する (angiogenic growth pattern) ことが分かった。がん細胞を緑色 (EGFP)、活性化アストロサイトを赤色 (Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) による免疫染色) にて示す。グリッド = $200 \mu\text{m}$ 。C) 一方、他のがん細胞株の中には脳に転移するものの増殖を示さず、1ヶ月以上に渡って非分裂状態 (= 休眠) を保つ細胞も認められた。同様にCUBIC法によって脳組織を透明化し、2光子励起蛍光顕微鏡を用いて撮影。がん細胞を赤色 (EGFP)、血管構造を緑色 (CUBIC Reagent-1 autofluorescence imaging) にて示す。スケール = $100 \mu\text{m}$ 。

2. 脳転移がん細胞の休眠維持・離脱の経時的解析とがん細胞の抽出

脳に転移したがん細胞の休眠維持と離脱の決定機構を明らかにすべく、上述の脳組織にて休眠を呈しうるがん細胞を用いて脳転移形成プロセスの経時的解析を行った。結果、脳転移巣は大きく4群 (Single cell, Micro-cluster, Micro-mets, Established-mets) に分類することができ (図2A)、時間と共に進展することが明らかとなった (図2B)。これらのうちSingle cell及びMicro-clusterに分類されるがん細胞の多く (90%以上及び60%以上) はKi67陰性の非分裂細胞であったが (図2C)、興味深いことにDay20とDay30ではこの群に分類される転移巣 (foci) の数に変化が認められなかった (図2B)。以上の結果から、マウス心腔内接種から20日程度経過した段階でがん細胞のみを脳組織から抽

出して解析を行うことで、休眠維持とそこから離脱を規定するシグナル経路を網羅的に描出することができると考えた。方法としては心腔内接種から 21 日後にマウス脳を摘出、gentleMACS dissociator を用いて組織を単一細胞にまで破碎し、細胞接着能・抗生剤耐性・GFP 発現をマーカーとしてがん細胞を分離した。結果、このマウス脳組織より効率良くがん細胞のみを抽出することに成功した。

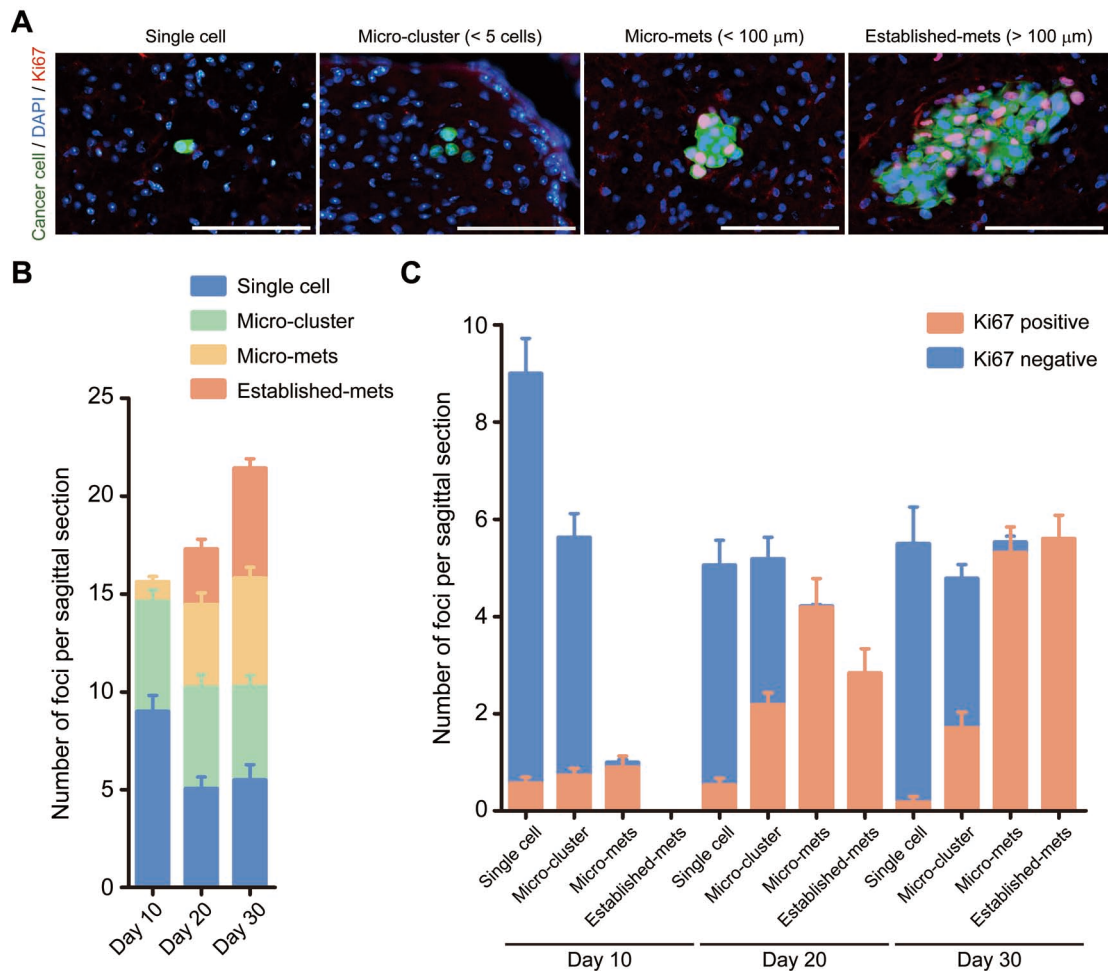


図 2. 脳転移形成プロセスの経時的解析

A) あるがん細胞の脳転移形成プロセスを脳組織切片の免疫染色法にて示す。がん細胞を緑色、細胞核を青色 (DAPI 染色)、増殖細胞の指標として Ki67 染色を赤色にて表示。このがん細胞株の脳転移巣は図に示す 4 群に分類されることが明らかとなった。スケール = 100 μ m。B) 4 群に分けられた転移巣の経時変化をグラフに示す。縦軸は 10 μ m の厚さの sagittal section あたりの foci の数を示す。C) 各群における Ki67 陽性率を経時的に示す。縦軸は 10 μ m の厚さの sagittal section あたりの foci の数を示すが、細胞集団内に一つでも Ki67 陽性の細胞が存在している場合には Ki67 positive としてカウントしている。

3. 単一細胞解析による休眠シグナルの網羅的描出

これらのがん細胞を Fluidigm C1 system を用いて単離し、RNA 抽出・逆転写・unbiased PCR により、脳転移がん細胞の single cell cDNA library を作製した。このライブラリを Illumina HiSeq2500 を用いてシーケンスし、exon mapping による遺伝子発現解析を行った。ハウスキープング遺伝子による主成分解析によって最終的に 61 細胞を解析対象としたが、驚くべきことに MKI67 発現量を指標とすることでこれら 61 細胞が Dormant group (23 細胞) と Cycle group (38 細胞) の 2 群に分離された (図 3A)。また unsupervised hierarchical clustering によってもこれら

61細胞は2群に分離されたが、Dormant groupは一方のクラスターに偏って存在していた(図3B)。このデータを用いてgene set enrichment analysis⁷⁾を行ったところ、Cycle groupにおいて細胞周期進行に係る遺伝子や転写因子E2Fの標的遺伝子、DNA複製に係る遺伝子の発現上昇が認められ(図3C)、本解析が目的に沿って進んでいることが示唆された。

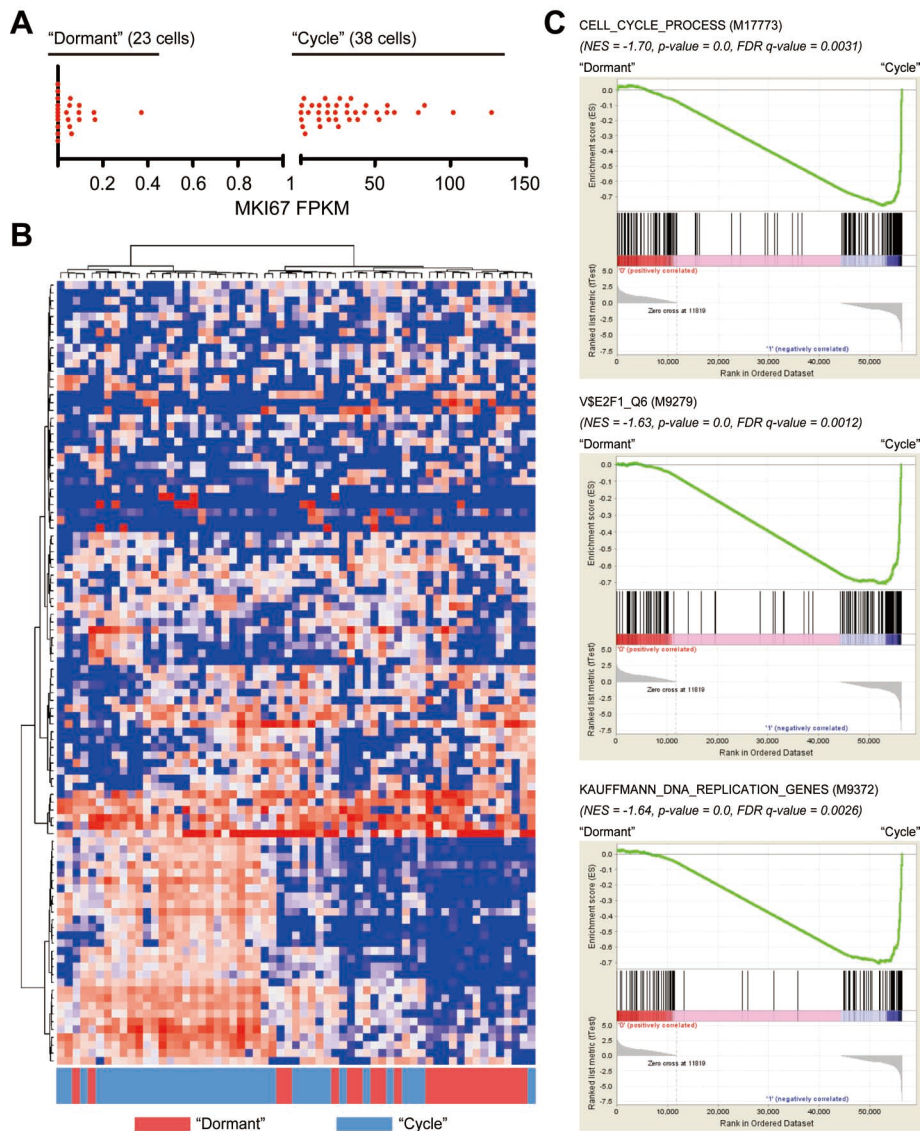


図3. シングルセル RNA シーケンスによるがん細胞休眠シグナルの解析

A) 61個のシングルセル cDNA ライブラリを MKI67 発現量にて展開すると2群に分離された。FPKM = fragments per kilobase of exon per million reads mapped。B) 同様に unsupervised hierarchical clustering によっても61細胞は2群に分離された。C) Gene set enrichment analysis によるシグナル経路の解析。Cycle group において細胞周期の進行に係るタンパクをコードする遺伝子や E2F の標的遺伝子、DNA 複製に係るタンパクをコードする遺伝子の発現上昇が確認された。

考 察

上述の経路と同時に、脳転移がん細胞の休眠維持と離脱に係っていると考えられるシグナル経路および分子として、ある特定の 1. non-coding RNA、2. メチル化酵素、3. 分子シャペロンタンパク、4. 炎症メディエータ、の関与が示唆されており、現在更なる解析を行っている。

共同研究者

本研究は東京大学大学院医学系研究科ゲノム医学講座の間野博行教授、高阪真路特任助教との共同研究として遂行中である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Muller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmuller G, Eils R, Klein CA. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 24;100(13):7737-42. doi: 10.1073/pnas.1331931100.
- 2) Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, Riethmüller G, Klein CA. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell*. 2008 Jan;13(1):58-68. doi: 10.1016/j.ccr.2007.12.003.
- 3) Hosseini H, Obradović MM, Hoffmann M, Harper KL, Sosa MS, Werner-Klein M, Nanduri LK, Werno C, Ehrl C, Maneck M, Patwary N, Haunschild G, Gužvić M, Reimelt C, Grauvogl M, Eichner N, Weber F, Hartkopf AD, Taran FA, Brucker SY, Fehm T, Rack B, Buchholz S, Spang R, Meister G, Aguirre-Ghiso JA, Klein CA. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature*. 2016 Dec 14. doi: 10.1038/nature20785.
- 4) Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Ellison DW, Figarella-Branger D, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A. Metastatic tumours, ed. by Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, pp 337-341, 2016.
- 5) Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Klinkert WE, Goldbrunner R, Herms J, Winkler F. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med*. 2010 Jan;16(1):116-22. doi: 10.1038/nm.2072.
- 6) Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, Yokoyama C, Onoe H, Eguchi M, Yamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Shimizu Y, Miyawaki A, Yokota H, Ueda HR. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell*. 2014 Apr 24;157(3):726-39. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.042.
- 7) Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 25;102(43):15545-50. doi: 10.1073/pnas.0506580102.