脳腫瘍進展における神経伝達物質の役割の解析

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科
認知神経生物学

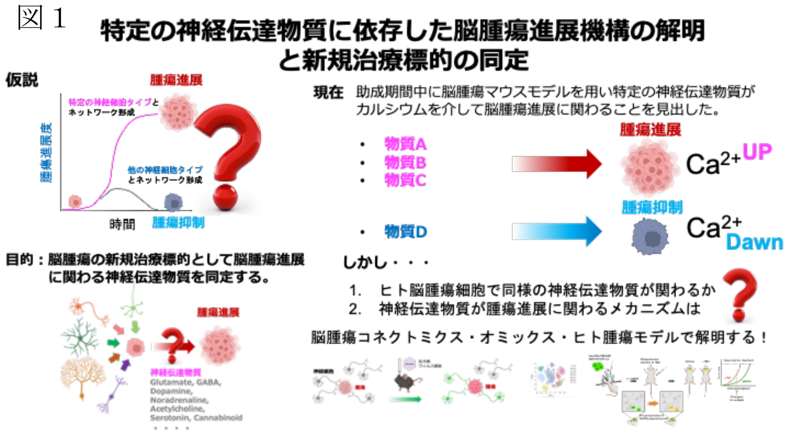
上阪　直史

研究背景

脳が正常に機能するには脳内微小環境の恒常性が必要不可欠であり、脳疾患の病因・病態として微小環境の破綻が示唆されている。脳微小環境の破綻が脳疾患に関わる顕著な例として脳腫瘍がある。脳腫瘍は幼少期から老齢期までさまざまな年代で生じるが、現在、脳腫瘍に効果がある治療法はなく、その病態解明と治療薬の開発は喫緊の課題である。この課題を解決するためには、脳腫瘍細胞の進展(脳内への浸潤や悪性化)のメカニズムを明らかにすることが非常に重要になる。中枢神経系に発生する最も一般的な脳腫瘍である高悪性神経膠腫（特に膠芽腫）は、積極的な外科的切除と放射線治療を行った場合でも現時点では難治性の病である。神経膠腫の悪性化には腫瘍細胞自体のもつ特性のみならず、これを取りまく微小環境が極めて重要であることがわかってきた(Broekman et al., 2018; Johung and Monje, 2017)。正常な脳内と似て、神経膠腫細胞は脳内に存在する正常な神経細胞やグリア細胞などの複数の種類の細胞とコミュニケーションし、腫瘍細胞の進行と浸潤に不可欠な独自の微小環境を形成している。脳腫瘍の微小環境の構成とその発達を理解することは、神経膠腫の予防と治療に大きく貢献する。しかし腫瘍細胞と脳微小環境とがどのように相互作用することで脳腫瘍が進展するかはほとんど明らかになっていない。

　　近年、神経細胞が腫瘍の微小環境における重要な細胞構成要素として浮上してきており、神経細胞の活動は脳腫瘍細胞の増殖や転移に影響を及ぼすことが示されている(Magnon et al., 2013; Monje et al., 2020; Peterson et al., 2015; Venkatesh et al., 2019)。さらに神経膠腫細胞や脳内転移性がん細胞がシナプス*様構造を介して神経細胞と密接に相互作用し、神経細胞がシナプスを介して神経膠腫細胞の増殖や浸潤を促進することが示唆されている(Venkataramani et al., 2019; Venkatesh et al., 2019)。＊シナプス；神経細胞同士の結合部位。グルタミン酸などの伝達物質のやりとりにより、神経細胞同士が情報のやりとりを行う構造。
しかし、脳内には多様な神経細胞タイプが存在しており、どのタイプの神経細胞が脳腫瘍進展に影響するかと神経細胞から腫瘍細胞へ伝わる生理活性物質は不明である。本研究では「特定の神経細胞タイプとネットワークを形成した脳腫瘍細胞は進展し、それ以外の神経細胞タイプとネットワークを形成した脳腫瘍細胞は衰退する」の仮説を検証する。さらに、脳腫瘍進展に関わる新規生理活性物質を探索することで脳腫瘍の治療標的を同定することを目指した（図１）。

図１



結果

1. 神経膠腫モデルマウスの腫瘍発生段階と腫瘍細胞と相互作用する細胞を同定した。

神経膠腫モデルマウスの脳内で神経膠腫は生後４週目頃から分裂を増大させ、腫瘍細胞の進展により神経細胞とオリゴデンドロサイトが生後８週齢から顕著に減少した（図２）。一方、ミクログリアは生後６週目より腫瘍内で増加し、アストロサイトは腫瘍周囲で増加していた。これらの結果は、このモデル系を用いることで腫瘍細胞―神経細胞と腫瘍細胞―グリア細胞の相互伝達が解析できることを示す。

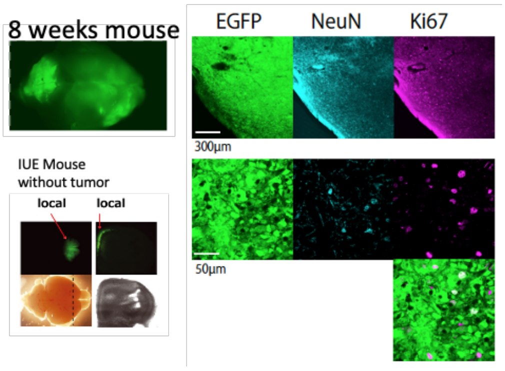


図２． 脳腫瘍の進展により腫瘍組織内で異常分裂がおこる一方、正常な神経細胞が減少した。

2. 腫瘍細胞の活動を検出するためのカルシウムイメージング法を開発した（図３）。
多細胞において細胞内カルシウム濃度の変動（カルシウム活動）を時空間軸の中で解析することでネットワーク活動を行う細胞集団を同定できる。例えば、腫瘍細胞とその周りの正常細胞の間でカルシウム活動に時間的相関があればネットワークがあると考えられる。また腫瘍細胞内のカルシウム活動は腫瘍細胞の進展と正の相関があることも報告されている(Chia et al., 2019; Osswald et al., 2015)。すなわち、多種類多細胞のカルシウム動態を解析することで腫瘍細胞―正常細胞のネットワークと腫瘍細胞の進展度が検出可能となる。腫瘍―正常細胞ネットワーク活動を短期的（分・時）・長期的（日・週）に追跡し、腫瘍―正常細胞ネットワークの活動動態とその変遷を明らかにする。申請者は脳腫瘍細胞にアデノ随伴ウィルスや電気穿孔法を用いカルシウム指示遺伝子を発現させた。その１週間後以降に、腫瘍モデルマウスの頭蓋を開き、レンズ下でカルシウム指示遺伝子を発現した腫瘍細胞を観察した。脳腫瘍細胞は低頻度（３分間で約１回）であるがカルシウム活動を示すこと、特定の細胞集団が同期して活動することを見出した。また、腫瘍細胞のカルシウム活動を検出するために最適なカルシウム指示遺伝子をスクリーニングした結果、jGCamP8m が腫瘍細胞のカルシウム活動を最もよく検出できることを見出した。

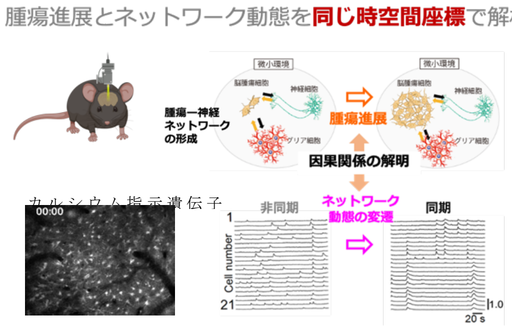


図３． 腫瘍進展、腫瘍細胞の活動、腫瘍―神経細胞のネットワークを同時にモニターする方法の開発

3. 腫瘍進展にともないカルシウム活動を示す腫瘍細胞が顕著に増加することを見出した（図４）
腫瘍進展時に腫瘍細胞の活動が変遷するかを解析した結果、腫瘍が発生して間もない４−５週齢では活動を示す腫瘍細胞は約６％のみであった。しかし、腫瘍進展が顕著におこる生後７−８週齢では５４％の腫瘍細胞がカルシウム活動を示した。また頻度も増加することを見出している。これらの結果は神経細胞からの伝達や感覚入力を受け取る腫瘍細胞が腫瘍進展にともない増加していくことを示唆しており、本研究の仮説である腫瘍進展にともない腫瘍細胞は神経細胞やグリア細胞とネットワークを形成することを支持する。

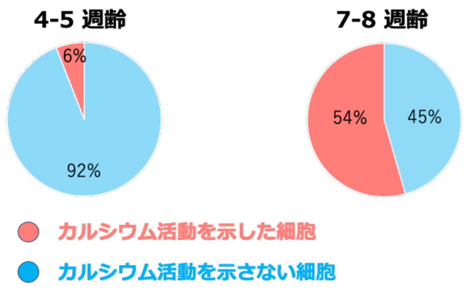


図４． 腫瘍進展に伴いカルシウム活動を示す腫瘍細胞が増大する。

4. 神経活動が数時間以内に腫瘍進展を促進することを見出した。
特定の神経細胞の活動を操作するために、アデノ随伴ウィルスを用いて人工合成受容体（DREADD）を神経細胞に発現させた。DREADD は細胞で発現するとそのリガンドである CNO に反応し、細胞にカルシウム活動を誘発する。腫瘍モデルマウスの神経細胞に DREADD を発現させ、CNO を腹腔内に投与し、神経細胞の活動を上昇させたマウスを解析した（**図５左**）。神経活動を上昇させていない腫瘍モデルマウスと比較し、神経活動を上昇させた腫瘍モデルマウスは脳腫瘍組織内で分裂細胞のマーカである Ki67 陽性細胞の数が約２倍に増加

していた（**図５右**）。また神経活動上昇により、腫瘍内でミクログリアやオリゴデンドロサイトが増加していた。これらの結果は、神経細胞の活動が腫瘍進展を促進すること、腫瘍周囲の脳内在細胞を腫瘍内にリクルートすることを示す。

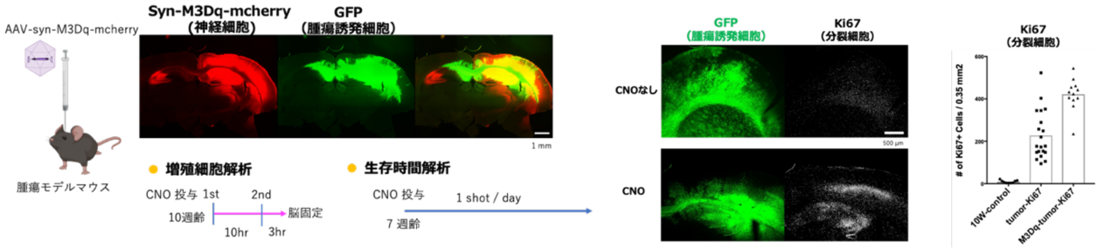


図 5. 腫瘍細胞周囲の神経細胞の活性化により腫瘍細胞の増殖が亢進した。左図：腫瘍周囲の神経細胞に神経細胞を活性化できる M3Dq-mcherry を発現させた。その１週間後に M3Dq を活性化するリガンド CNO を２回マウスに投与した。右図：その後分裂マーカーである ki67 陽性細胞を解析した結果、通常の腫瘍組織内より神経細胞を活性化した腫瘍組織内では ki67 陽性細胞が優位に増加した。

考察

本研究は脳科学の最先端技術と基礎医学研究を組み合わせた脳腫瘍生理学を確立し、最終的には脳腫瘍を治すことに繋げる。腫瘍進展の過程における感覚入力と神経伝達の寄与を解明することで、腫瘍細胞そのものを標的にする従来の治療法ではなく、「腫瘍進展をサポートする因子を治療標的にする」という新たな治療法を開発する足掛かりとなる。