

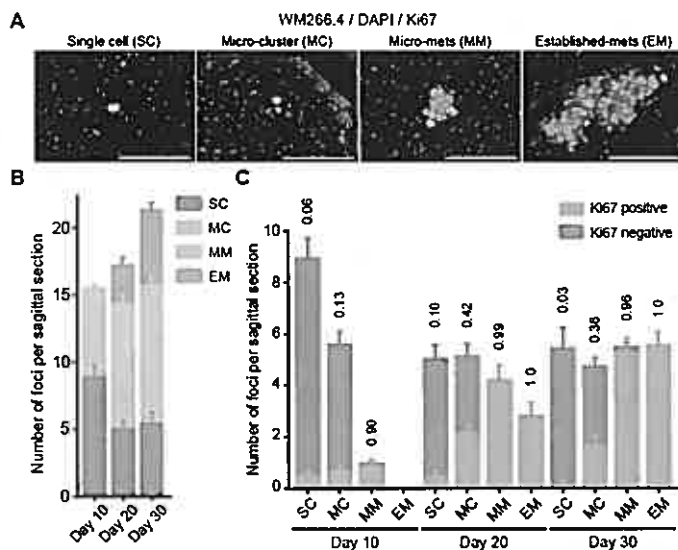
## 脳転移がん細胞の休眠維持・破綻機構の解明

金沢大学がん進展制御研究所 腫瘍細胞生物学研究分野

平田 英周

がんの転移と再発はがん治療を困難にしている最大の要因である。また根治的な治療法によって一旦寛解導入されたがん患者ががんを再発した時の精神的ダメージは極めて大きく、がんの転移・再発を予防することが社会的要請の高い事案であることに議論の余地はない。がんの転移・再発はどの臓器であっても治療を困難にし患者生命予後を悪化させるが、特に脳転移を来たした場合の予後は極めて厳しく生存期間中央値は1年半に満たない (Kayama et al., J Clin Oncol 2018)。また脳転移は精神・運動の両面から機能予後を悪化させ患者の QOL を急激に低下させる。さらに医療の進歩に伴うがん全体の予後改善に伴って、脳転移症例は増加の一途をたどっている。以上の状況から、がん脳転移の予防は現代のがん研究が取り組むべき喫緊の課題であると言える。

近年の研究により、がん細胞の脳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。この脳転移がん細胞の休眠期間はがんの種類によって様々であり、肺がんのように比較的早期に再増殖を開始するものから、HER2 陽性の乳がんや悪性黒色腫のように根治療法から数年～10 数年の時を経て再発するものまである。いずれにせよ、これら休眠がん細胞が臨床的に引き起こしている問題として、事前診断と治療が極めて困難であることが挙げられる。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事を利用して、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。したがって、がんの再発を予防するためには脳に潜むがん細胞の性質とその休眠メカニズムを解明し、がん細胞の生存や休眠からの離脱を標的とした画期的な治療法を開発する必要がある。



【図1】脳転移形成プロセスの経時的解析

A. WM266.4 ヒトメラノーマ細胞株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、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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

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成し、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。まずは複数種類の肺がん・乳がん・悪性黒色腫細胞株 (ヒト及びマウス計 15 種類) に蛍光蛋白質とルシフェラーゼを発現させ、ヌードマウスまたは同系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。結果、脳転移巣において一部のがん細胞が休眠状態を呈する複数の細胞株を見出した。これらががん細胞株のうち、ヒトメラノーマ細胞株 WM266.4 に関して脳転移形成プロセスの経時的解析を行うと、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 1A)、時間と共に進展することが明らかとなった (図 1B)。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は Ki67 陰性の非分裂細胞であったが、興味深いことに Day20 と Day30 ではこの群に分類される転移巣の数には大きな変化が認められなかった (図 1C)。そこで心腔内接種から 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。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。ハウスキーピ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、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 2A)。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。さらに Cycle group では Ki67 とともにがん増殖のマーカとして免疫染色が臨床応用されている MCM7、TOP2A、PCNA の発現がいずれも上昇しており、またがん増殖を示す超高感度マーカーとしてリキッドバイオプシーでの臨床応用が進められている TK1 の顕著な上昇も認められた。さらに CDK 阻害因子 (CDKN1A、CDKN1B、CDKN1C、CDKN2A、CDKN2B、CDKN2C、CDKN2D) の発現には両群間で差は認められず、mRNA レベルではあるが GLB1 および細胞老化関連因子 (LANCL1、STX4、VAMP3、VPS26A、ARMCX3、SLC9A3R1、LAT2、PTPRJ) の発現にも差は認められなかった。さらに、これらのデータを用いて gene set enrichment analysis (GSEA) 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ており、本解析が「トランスクリプトーム解析に基づく増殖細胞と休眠細胞の分離」という目的に沿って進んでいることが強く示唆された。これらと同時に、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分子およびシグナル経路として、1. non-coding RNA (miR-192) 2. DNA メチル化酵素 (DNMT1) を同定した。

### 1. miR-192 に関して

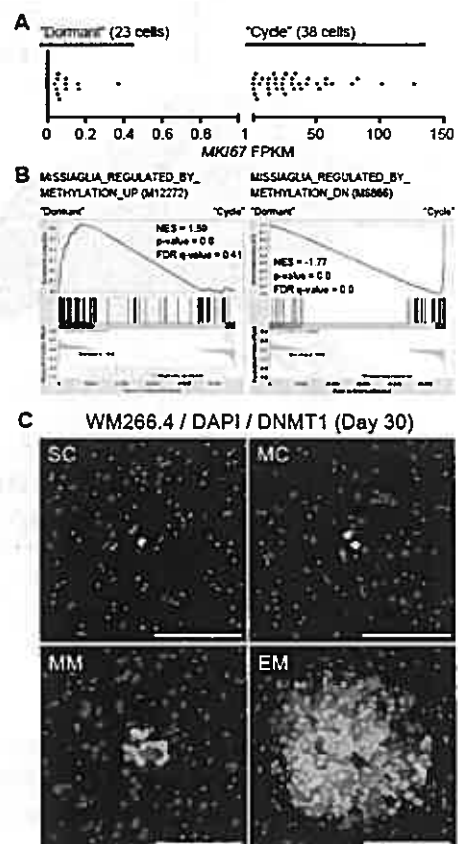
休眠がん細胞においては miR-192 の標的遺伝子の著名な発現低下が認められていた。miR-192 の標的遺伝子には細胞周期制御に関わる遺伝子が数多く含まれており、何らかの機序による miR-192 発現誘導ががん細胞の休眠移行を規定している可能性が示唆された。そこでテトラサイクリン誘導性に miR-192 を発現させることのできるシステムを構築してがん細胞に導入し、miR-192 の発現 on/off によりマウス脳組織内にてがん細胞がどのような挙動を示すかを経時的に明らかにすることを試みた。結果、in vitro では miR-192 発現誘導にてがん細胞の増殖がわずかに抑制されるものの、in vivo (= 脳転移巣) では明らかな差は認められなかった。結論として、miR-192 標的遺伝子の発現低下は細胞周期停止による結果であり、脳転移がん細胞の休眠移行の原因ではないと判断した。

### 2. DNA メチル化酵素 (DNMT1) に関して

遺伝子発現解析の結果、脳転移休眠がん細胞の遺伝子発現はデシタピン (5-アザ-2'-デオキシシチジン) を投与されたがん細胞の遺伝子発現パターンに酷似していることが明らかとなった。(図 2B)。細胞周期関連遺伝子セットとのオーバーラップを検討した結果、脳転移休眠がん細胞が DNA 脱メチル化に伴う遺伝子発現パターンを呈することは細胞周期停止の結果ではなく、休眠移行の原因となっている可能性が示唆された。実際に脳転移がん細胞における DNMT1 の発現は不均一であり、SC や MC ではほとんど発現が認められず、MM や EM でもその発現は一部の細胞に限られていた (図 2C)。そこで siRNA によって DNMT1 の発現を抑制した WM266.4 細胞をヌードマウス心腔内に接種したところ、予想通りがん細胞の転移・増殖が抑制された。しかしながらこの効果は脳転移特異的ではなかったため、脳転移がん細胞の休眠移行の機序として DNMT1 発現の低い細胞が脳に転移して休眠するのではなく、脳転移後に DNMT1 の発現が抑制される可能性を考えた。

脳組織特異的な微小環境要因として、間質細胞の構成と力学的基盤の特異性 (= がん組織や他臓器に比べてやわらかい) が挙げられる。脳転移がん細胞はその初期から活性化アストロサイトによって取り囲まれており、Schnepp らの報告 (Schnepp et al., Cancer Research 2017) と同様、アストロサイト培養上清で培養することによって WM266.4 細胞の DNMT1 発現が抑制されることが明らかとなった。また WM266.4 細胞を 0.2 kPa の硬さのゲル (= 脳組織の硬さに相当) で培養することで DNMT1 の発現が抑制されることも明らかとなり、3 kPa の硬さで MAF (melanoma-associated fibroblast) 上清と培養した場合 (= 原発巣を模倣) と比較して、0.2 kPa の硬さでアストロサイト上清と培養した場合 (= 脳転移巣を模倣) には DNMT1 の発現がより強く抑制され、細胞増殖も DNMT1 発現低下依存性に抑制されることが明らかとなった。

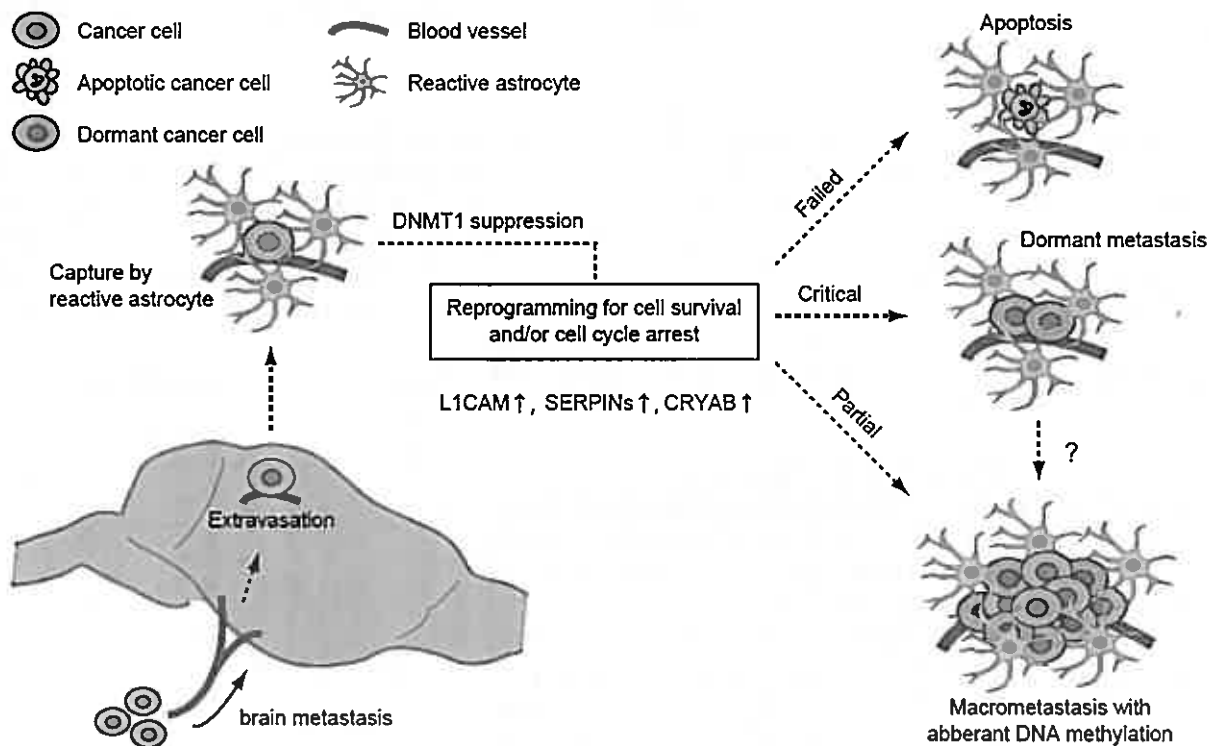
以上の結果から、脳微小環境によるがん細胞の DNMT1 発現



【図 2】脳転移がん細胞の休眠と DNA 脱メチル化遺伝子発現パターン  
A. 1 細胞遺伝子発現解析により、脳転移がん細胞は Ki67 FPKM によって 2 群 (Dormant/Cycle) に分離される。  
B. Dormant に分類される細胞は DNA 脱メチル化の遺伝子発現パターンを示す。  
C. 脳転移がん細胞の DNMT1 発現は不均一であり、SC や MC ではほとんど発現が認められず、MM や EM でもその発現は一部の細胞に限られている。

抑制ががん細胞の休眠移行の原因となっていると考えられた。そこで DNMT1 を過剰発現させた WM266.4 細胞をヌードマウス心腔内に接種し脳転移形成を評価したところ、驚くべきことに脳転移形成そのものが強く抑制されるという予想外の結果を得た。

DNMT1 の発現抑制は DNA 脱メチル化依存性・非依存性に様々な遺伝子発現を変化させ、細胞の増殖能や運動能に影響を及ぼすことが知られている。我々は WM266.4 細胞における DNMT1 発現抑制が細胞周期の抑制と同時に脳転移がん細胞の生存に重要な役割を担う遺伝子の発現を誘導している可能性を考え、DNMT1 抑制が WM266.4 細胞の遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。結果、これまでに脳転移がん細胞の生存および増殖・進展に重要な役割を担う分子として報告されている L1CAM、SERPIN、CRYAB の発現が DNMT1 抑制によって誘導されることが明らかとなった。これらの発現は脳転移を模倣した培養環境においても DNMT1 発現抑制依存性に上昇することが確認され、実際に CRYAB の発現抑制によっても脳転移形成が抑制されることも明らかとなった。同様の結果は WM266.4 ヒトメラノーマ細胞株だけでなく MDA-MB-231 ヒト乳がん細胞株、PC9 ヒト細胞株でも認められ、脳微小環境による脳転移がん細胞の DNMT1 発現抑制ががん細胞のリプログラミングを誘導し、脳組織での生存と細胞増殖抑制の両面に影響を及ぼすことが明らかとなった。



【図3】脳微小環境によるがん細胞のリプログラミングと脳転移形成メカニズム

脳に到着して血管外へと遊走したがん細胞はやわらかい組織上で活性化アストロサイトによって捕捉される。これによりがん細胞の DNMT1 発現が抑制され、細胞分裂とともにエピジェネティックなリプログラミングが惹起される。これに伴い L1CAM、anti-PA serpin、CRYAB など脳転移がん細胞の生存に必要な遺伝子の発現が誘導されるが、このがん細胞生存プログラムに適応できなかったがん細胞は死滅する。一方、生存したがん細胞においても DNMT1 抑制は細胞周期停止の引き金となり得るため、これらの細胞は休眠転移巣を形成する。DNMT1 抑制による生存プログラムに適応し、かつ細胞周期の停止を逃れることのできたがん細胞のみが、やがて肉眼的脳転移巣を形成する。

今後の展望として、脳特異的な微小環境におけるがん細胞と間質細胞の双方向性エピジェネティクス制御機構の本態解明を進め、これらによる治療耐性（分子標的治療および放射線治療に対する抵抗性）や神経免疫システム再構成への関与を明らかにすべく更なる解析を進めていく。