

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution

研究開発課題名： (日本語) 脳転移がん細胞の休眠維持・破綻機構の解明と新規治療法の開発
(英語) Elucidation of the mechanisms underlying cancer cell dormancy in brain metastasis for the development of ground-breaking treatment strategies

研究開発担当者 (日本語) 学校法人金沢医科大学 医学部 病理学I 講師 平田 英周
所属 役職 氏名： (英語) Department of Oncologic Pathology, Kanazawa Medical University
Senior Assistant Professor Eishu Hirata

実施期間： 平成28年9月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 脳転移がん細胞の休眠維持・破綻機構の解明と新規治療法の開発
開発課題名： (英語) Elucidation of the mechanisms underlying cancer cell dormancy in brain metastasis for the development of ground-breaking treatment strategies

研究開発分担者 (日本語) 学校法人金沢医科大学 医学部 病理学I 講師 平田 英周
所属 役職 氏名： (英語) Department of Oncologic Pathology, Kanazawa Medical University
Senior Assistant Professor Eishu Hirata

分担研究 (日本語) 新規に開発した FRET バイオセンサーを発現するトランスジェニックマウスの作成

開発課題名： (英語) Development of transgenic mice expressing new FRET biosensor

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 生命システム研究センター 高速ゲノム変異マウス作製支援ユニット ユニットリーダー 隅山 健太

所属 役職 氏名： (英語) Laboratory for Mouse Genetic Engineering,
Quantitative Biology Center, RIKEN
Unit Leader Kenta Sumiyama

分担研究 (日本語) 完全寛解導入後に脳転移による再発を来たしたがん患者の臨床データ
および腫瘍標本の収集

開発課題名: (英 語) Collection of clinical data and tumour samples of patients with
cancer brain metastasis after long-term complete remission

研究開発分担者 (日本語) 学校法人金沢医科大学 医学部 脳神経外科学 教授 飯塚 秀明

所属 役職 氏名: (英 語) Department of Neurosurgery, Kanazawa Medical University
Professor Hideaki Iiduka

分担研究 (日本語) 完全寛解導入後に脳転移による再発を来たしたがん患者の臨床データ
および腫瘍標本の収集

開発課題名: (英 語) Collection of clinical data and tumour samples of patients with
cancer brain metastasis after long-term complete remission

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人京都大学 大学院医学研究科 脳病態生理学講座 脳神経
外科 助教 荒川 芳輝

所属 役職 氏名: (英 語) Department of Neurosurgery,
Kyoto University Graduate School of Medicine
Assistant Professor Yoshiki Arakawa

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

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（計 15 種類）に蛍光蛋白質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。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細胞株を見出した。このがん細胞株の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、時間と共に進展することが明らかとなった。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。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。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。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、本解析が目的に沿って進んでいることが示唆された。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 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 が同定された。

英文

In this research project, we aimed to elucidate the mechanisms underlying cancer cell dormancy in brain metastasis using mouse models. We introduced a fluorescent protein (EGFP, mCherry or dKeima) and firefly luciferase into human and mouse lung cancer, breast cancer and melanoma cell lines (fifteen cell lines in total), injected them into the left ventricle of nude (human cell lines) or syngeneic (mouse cell lines) mice and induced systemic metastasis. We could identify several cancer cell lines that form detectable brain metastasis, where at the same time some of the cells stay dormant in the same brain. Time-course analysis with a melanoma cell line showed that the process of brain metastasis formation can be roughly divided into four stages; Single-cell, Micro-cluster, Micro-mets and Established-mets. Among these, majority of the cells categorized into Single-cell and Micro-cluster are Ki67-negative, non-dividing cells even at day 30 (30 days after injection), whose foci numbers seemed to be relatively stable after day 20. Therefore, we extracted the cancer cells from mouse brain at day 21 and established single cell cDNA libraries by using Fluidigm C1 system. We sequenced the libraries with Illumina HiSeq2500 and analyzed gene expression status by exon mapping. We finally selected 61 cells for further investigation by principal component

analysis with 99 house keeping genes. Interestingly, these 61 cells were clearly divided into two groups - “Dormant” and “Cycle” - depending on the fragments per kilobase of exon per million fragments mapped (FPKM) of MKI67. Unsupervised hierarchical clustering also divided these cells into two groups, where the cells in “Dormant” group disproportionately existed in one cluster. Gene set enrichment analysis (GSEA) revealed that genes related to cell cycle progression, DNA replication or “melanoma relapse” are up-regulated in “Cycle” group, suggesting that the analysis is directed toward the purpose. Together with these, we could identify some specific 1. non-coding RNA 2. DNA methyltransferase 3. molecular chaperon protein 4. inflammation mediator as candidate molecules/signaling pathways implicated in the regulation of cancer cell dormancy in brain metastasis.

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）
該当なし
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし
- (4) 特許出願
該当なし