



Organotypic brain explant culture as a drug evaluation system for malignant brain tumors

Minami, Noriaki

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2018-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7043号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007043>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Organotypic brain explant culture as a drug evaluation system for malignant brain tumors

培養脳切片を用いた悪性脳腫瘍に対する
ex-vivo 薬剤スクリーニング法の開発

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
脳神経外科学
(指導教員：甲村 英二教授)

南 徳明

要旨：

背景：

Glioblastoma (GBM)は現在でも極めて難治で致死的な疾患である。数々の薬剤の有効性が検証されてきたが in vitro で有効であると思われた薬剤が in vivo では無効であることも多く、この差が問題となっている。その一因として、悪性グリオーマの特徴である heterogeneity を in vitro では再現できないことが挙げられる。

一方、脳培養切片法は古くから主に神経生理学分野で広まってきた実験手法で、正常脳の三次元的な組織構造が高度に温存されていることから神経細胞やグリア細胞の機能解析などにさかんに用いられてきた。また、近年腫瘍内微小環境が反映された腫瘍組織片を用いた薬剤スクリーニング法が注目されている。

これらのことを鑑み、今回我々は、脳腫瘍幹細胞、非幹細胞、正常細胞など多様な細胞が共存し、それらを取り巻く微小環境が温存された中での薬効を評価するべく、幹細胞形質を有するグリオーマ起源細胞を用いたマウス脳腫瘍移植モデルと脳切片培養法を融合し、新しい ex vivo 薬剤スクリーニングシステムを確立した。

対象と方法：

がん抑制遺伝子 *Ink4a/Arf* ノックアウトマウスから採取した神経幹細胞にがん遺伝子 *HRasV12* を過剰発現させ、正常な免疫系が機能している C57BL/6J マウスの脳内に移植すると、ヒト GBM に極めて類似した heterogeneity に富む病理像を呈する腫瘍を形成させることができ、この細胞をグリオーマ起源細胞, GICs (glioma initiating cells)と定義した。なお ex-vivo でのイメージングを最適化するため、*HRasV12* と同時に *ds-red* という蛍光レポータータンパクをコードする配列を導入した。Ex-vivo での薬剤効果を検証する前に、まず in vitro でのこれら GICs に対する各種薬剤の効果を評価した。生細胞数測定試薬を用いた生存率評価、スフェア形成アッセイによる腫瘍形成能への影響、及びフローサイトメーターによる細胞周期への影響を検証した。次に ex-vivo での薬剤効果を検証するため GICs を脳内に移植して7日後に脳を摘出し、200μm 厚の未固定の脳切片を作製した。さらに切片を専用のインサートに転載して神経幹細胞培地にて切片培養を行った。培地交換を毎日行い、解析対象となる薬剤を連日投与した。共焦点顕微鏡を用いて腫瘍の面積や腫瘍細胞浸潤に関して経時的な

変化を記録し、解析した。浸潤評価に際してはタイムラプス撮影による評価も行った。さらに、観察終了後に切片を固定し、組織染色することにより、細胞死や増殖、各種薬剤に固有の効果を可視化した。また、腫瘍を移植していない正常の脳切片培養も行い同様に免疫染色をすることにより各種薬剤の正常脳への毒性も評価した。

結果：

本システムによる薬剤評価の妥当性を評価するために異なる薬理作用を持つ4種類の抗腫瘍薬剤を選択した。まずはDNA鎖間架橋と二重鎖切断形成によるDNA損傷作用を持つシスプラチンの薬効を評価した。In vitroにおける生細胞数の評価では濃度依存的な生存率の低下、またスフェア形成アッセイにおいても濃度依存的な増殖抑制効果が認められた。また、フローサイトメーターを用いた細胞周期の解析ではsubG1の細胞比率が顕著に増加していた。これらの結果から、シスプラチンがin vitroにおいてGICに対し殺細胞効果を持つことが示唆された。次に、前述の手順に従い作成した腫瘍を含む培養脳切片に対して培地中にシスプラチンを投与した結果、腫瘍面積の経時的な縮小が観察された。さらに観察終了後に切片を固定し、パラフィン切片を作成して免疫染色をすると、シスプラチン投与群ではcleaved caspase3が広範囲で強陽性を示し、アポトーシスによる腫瘍死が誘導されていることが示された。また、 γ H2AXによる免疫染色ではシスプラチン投与群で陽性細胞率が有意に上昇しており、シスプラチンに特徴的であるDNAの二重鎖切断を介した抗腫瘍効果をex-vivoにおいて可視化することができた。しかしながら、腫瘍を含まない正常脳の培養脳切片をコントロールとし、同様にシスプラチンを投与したところ、脳室壁周囲の正常細胞や血管内皮細胞にも細胞死が誘導されていることがわかり、正常細胞への毒性も確認された。

次にテモゾロミドを用いて同様の実験を行った。生細胞数評価では500 μ Mで50%近い生存率の減少が得られた。またスフェア形成アッセイにおいても500 μ Mで50%程度のスフェア面積の減少が得られた。細胞周期解析においてはわずかではあるがsubG1とG0, G1期の比率の上昇がみられ、弱い細胞死と増殖抑制効果を反映しているものと考えられた。培養脳切片を用いた解析では、濃度依存的な腫瘍面積の増大抑制効果がみられたが、縮小は得られなかった。また固定切片の免疫染色では両群間でcleaved caspase3の陽性率に有意差はなかった。しかしKi67の陽性率はTMZ投与群で有意に低下した。また、シスプ

ラチンとは対照的に正常脳への明らかな毒性は確認できなかった。

脳切片培養法では血液脳関門の影響を排除して薬効を検討できるという利点があるため、次に血液脳関門を通らない薬剤の代表であるパクリタキセルを選択した。細胞生存率の評価では200nM以上で最大の生存率減少が観察された。スフェア形成アッセイにおいても同様の結果が得られた。細胞周期解析では著名なG2-Mブロックが観察され、パクリタキセルの微小管阻害作用を強く反映していると考えられた。次に培養脳切片にパクリタキセルを200nM, 400nMの濃度で投与した。その結果、いずれの濃度でも有意な腫瘍増大抑制効果は得られなかった。これと一致して、固定切片の免疫染色では治療群と対照群間においてcleaved caspase3の陽性範囲に有意差は見られなかった。一方、HE染色及びphospho-Histone H3の免疫染色では異常な染色体構造を持つ分裂期の細胞や、巨核異型細胞が多数みられ、パクリタキセル特有の薬理効果を確認することができた。

次に、腫瘍浸潤の評価がこのモデルにおいて可能かどうかを検証した。グリオーマ細胞は血管に沿った浸潤パターンを呈するため、まずこの切片内における血管の可視化を試みた。その結果、CD31もしくはSca1に対する蛍光標識抗体を培養液中に直接添加することにより、血管構造を可視化できることがわかった。パクリタキセルやテモゾロミドでは浸潤抑制効果は見られなかったため、腫瘍細胞の浸潤を抑制することが報告されているトラニラストを選択した。培養脳切片に1mMのトラニラストを投与すると、腫瘍細胞の運動速度が有意に低下した。また辺縁部の浸潤巣の数も対照群やTGF β 1投与群と比較して減少した。また、別の遺伝子背景(*Tp53*^{-/-}, *Nf1*^{-/-})を持つマウス脳腫瘍自然発生モデルの脳腫瘍から樹立した細胞(PNMG106)を同様に移植して作成した培養脳切片においても、トラニラストによる浸潤抑制作用が再現された。

考察：

今回我々は、GICsを用いたマウス脳腫瘍移植モデルを用いることで腫瘍幹細胞仮説に基づく悪性グリオーマのheterogeneityを再現し、さらに脳切片培養法を組み合わせることで正常細胞や腫瘍細胞、血管、細胞外マトリックスの三次元的な構造や微小環境が温存された環境下における薬効をex-vivoで評価できるかを検証した。その結果、腫瘍のリアルタイムでの観察、固定切片の免疫染色による各種マーカーの検出を組み合わせることにより、一つのアッセイで包括的な薬剤評価ができることを見出した。

シスプラチンを用いた実験では二つの知見が得られた。一つ目は、十分な殺細胞効果を持つ薬剤は切片の蛍光イメージングにより腫瘍の「縮小」、という形で薬効を容易に評価できるという点である。二つ目は薬剤の正常細胞への毒性も同時に評価できるという点である。注意すべきことは、切片の viability が悪いと偽陽性が出てしまう可能性があることである。よって毒性評価は複数の手法で確認すべきである。

一方テモゾロミドによる検討において、蛍光イメージングで腫瘍の縮小効果は確認できなかった。しかし固定切片の免疫染色を追加することによって有意な増殖抑制効果があることが再確認された。こうした結果は *in vitro* の結果と類似していたが、免疫系が正常である同系マウスの微小環境中において観察されたという点で、実臨床での有用性をより強く裏付けるものである。また、基本的な分子メカニズムの探索も可能であることもわかった。

パクリタキセルでの検討により、血液脳関門を通過しない薬剤の評価法としても有用であることがわかった。HE 染色や phospho-histone H3 の免疫染色ではパクリタキセル特有の所見が得られ、薬剤の proof of concept (POC) の取得が可能であることが示された。また、テモゾロミドと同様に腫瘍細胞の浸潤を抑制することはできないことが判明した。

びまん性の浸潤はグリオーマの治療抵抗性の主因であると考えられている。よって、グリオーマ細胞への増殖抑制作用や殺細胞効果だけでなく、浸潤抑制効果も評価することが重要である。本手法においては生体内微小環境が温存された状態においてこれらの効果を同時に検証することが可能である。トラニラストを用いたアッセイでは、共焦点顕微鏡のタイムラプスイメージングを用い、腫瘍細胞の移動速度や浸潤巣の数を定量化することで、同薬剤の浸潤抑制効果を示すことができた。また、同一の動物個体から複数の脳切片を作成し比較することで、エビジェネティックな機序などによる個体間格差を無視でき、さらに動物個体数も削減できるという点もメリットである。

最後に、蛍光標識した CD31 や Sca1 などの表面抗原抗体を切片に直接投与することで、簡便に血管構造を可視化できることがわかった。さらにこの方法は、腫瘍幹細胞や免疫細胞の表面抗原を標識することにより、それらの相互作用や動態の観察に応用できる。今後も引き続き開発を進めていきたい。

結論：

培養脳切片と蛍光イメージング、免疫染色を組み合わせることで、様々な薬剤

の、生存・増殖・浸潤などに及ぼす影響を同時に評価することができた。マウス脳腫瘍モデルから作成した培養脳切片を用いた薬剤スクリーニング法は有用である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2736号	氏 名	南 徳明
論文題目 Title of Dissertation	Organotypic brain explant culture as a drug evaluation system for malignant brain tumors 培養脳切片を用いた悪性脳腫瘍に対する ex-vivo 薬剤スクリーニング法の開発		
審査委員 Examiner	主 査 丹生 謙一 Chief Examiner 副 査 古屋敷 智之 Vice-examiner 副 査 南 樹信 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

背景:

Glioblastoma (GBM)は現在でも極めて難治で致死的な疾患である。数々の薬剤の有効性が検証されてきたが in vitro で有効であると思われた薬剤が in vivo では無効であることも多く、この差が問題となっている。その一因として、悪性グリオーマの特徴である heterogeneity を in vitro では再現できないことが挙げられる。一方、脳培養切片法は古くから主に神経生理学分野で広まってきた実験手法で、正常脳の三次元的な組織構造が高度に温存されていることから神経細胞やグリア細胞の機能解析などにさかんに用いられてきた。また、近年腫瘍内微小環境が反映された腫瘍組織片を用いた薬剤スクリーニング法が注目されている。これらのことを鑑み、今回我々は、脳腫瘍幹細胞、非幹細胞、正常細胞など多様な細胞が共存し、それらを取り巻く微小環境が温存された中での薬効を評価するべく、幹細胞形質を有するグリオーマ起源細胞を用いたマウス脳腫瘍移植モデルと脳切片培養法を融合し、新しい ex vivo 薬剤スクリーニングシステムを確立した。

対象と方法:

がん抑制遺伝子 *Ink4a/Arf* ノックアウトマウスから採取した神経幹細胞にがん遺伝子 HRasV12 を過剰発現させ、正常な免疫系が機能している C57BL/6J マウスの脳内に移植すると、ヒト GBM に極めて類似した heterogeneity に富む病理像を呈する腫瘍を形成させることができ、この細胞をグリオーマ起源細胞, GICs (glioma initiating cells)と定義した。なお ex-vivo でのイメージングを最適化するため、HRasV12 と同時に ds-red という蛍光レポータータンパクをコードする配列を導入した。Ex-vivo での薬剤効果を検証する前に、まず in vitro でのこれら GICs に対する各種薬剤の効果を評価した。生細胞数測定試薬を用いた生存率評価、スフェア形成アッセイによる腫瘍形成能への影響、及びフローサイトメーターによる細胞周期への影響を検証した。次に ex-vivo での薬剤効果を検証するため GICs を脳内に移植して 7 日後に脳を摘出し、200 μ m 厚の未固定の脳切片を作製した。さらに切片を専用のインサートに転載して神経幹細胞培地にて切片培養を行った。培地交換を毎日行い、解析対象となる薬剤を連日投与した。共焦点顕微鏡を用いて腫瘍の面積や腫瘍細胞浸潤に関して経時的な変化を記録し、解析した。浸潤評価に際してはタイムラプス撮影による評価も行った。さらに、観察終了後に切片を固定し、組織染色することにより、細胞死や増殖、各種薬剤に固有の効果を可視化した。腫瘍を移植していない正常の脳切片培養も行い同様に免疫染色をすることにより各種薬剤の正常脳への毒性も評価した。

結果:

本システムによる薬剤評価の妥当性を評価するために異なる薬理作用を持つ4種類の抗腫瘍薬剤を選択した。まずは DNA 鎖間架橋と二重鎖切断形成による DNA 損傷作用を持つシスプラチンの薬効を評価した。In vitro における生細胞数の評価では濃度依存的な生存率の低下、またスフェア形成アッセイにおいても濃度依存的な増殖抑制効果が認められた。また、フローサイトメーターを用いた細胞周期の解析では subG1 の細胞比率が顕著に増加していた。これらの結果から、シスプラチンが in vitro において GIC に対し殺細胞効果を持つことが示唆された。次に、前述の手順に従い作成した腫瘍を含む培養脳切片に対して培地中にシスプラチンを投与した結果、腫瘍面積の経時的な縮小が観察された。さらに観察終了後に切片を固定し、パラフィン切片を作成して免疫染色をすると、シスプラチン投与群では cleaved caspase3 が広範囲で強陽性を示し、アポトーシスによる腫瘍死が誘導されていることが示された。

また、 γ H2AX による免疫染色ではシスプラチン投与群で陽性細胞率が有意に上昇しており、シスプラチンに特徴的である DNA の二重鎖切断を介した抗腫瘍効果を ex-vivo において可視化することができた。しかしながら、腫瘍を含まない正常脳の培養脳切片をコントロールとし、同様にシスプラチンを投与したところ、脳室壁周囲の正常細胞や血管内皮細胞にも細胞死が誘導されていることがわかり、正常細胞への毒性も確認された。次にテモゾロミドを用いて同様の実験を行った。生細胞数評価では 500 μ M で 50%近い生存率の減少が得られた。またスフェア形成アッセイにおいても 500 μ M で 50%程度のスフェア面積の減少が得られた。細胞周期解析においてはわずかではあるが subG1 と G0, G1 期の比率の上昇がみられ、弱い細胞死と増殖抑制効果を反映しているものと考えられた。培養脳切片を用いた解析では、濃度依存的な腫瘍面積の増大抑制効果がみられたが、縮小は得られなかった。また固定切片の免疫染色では両群間で cleaved caspase3 の陽性率に有意差はなかった。しかし Ki67 の陽性率は TMZ 投与群で有意に低下した。また、シスプラチンとは対照的に正常脳への明らかな毒性は確認できなかった。

脳切片培養法では血液脳関門の影響を排除して薬効を検討できるという利点があるため、次に血液脳関門を通らない薬剤の代表であるパクリタキセルを選択した。細胞生存率の評価では 200nM 以上で最大の生存率減少が観察された。スフェア形成アッセイにおいても同様の結果が得られた。細胞周期解析では著名な G2-M ブロックが観察され、パクリタキセルの微小管阻害作用を強く反映していると考えられた。次に培養脳切片にパクリタキセルを 200nM, 400nM の濃度で投与した。その結果、いずれの濃度でも有意な腫瘍増大抑制効果は得られなかった。これと一致して、固定切片の免疫染色では治療群と対照群間において cleaved caspase3 の陽性範囲に有意差は見られなかった。一方、HE 染色及び phospho-Histone H3 の免疫染色では異常な染色体構造を持つ分裂期の細胞や、巨核異型細胞が多数みられ、パクリタキセル特有の薬理効果を確認することができた。

次に、腫瘍浸潤の評価がこのモデルにおいて可能かどうかを検証した。グリオーマ細胞は血管に沿った浸潤パターンを呈するため、まずこの切片内における血管の可視化を試みた。その結果、CD31 もしくは Sca1 に対する蛍光標識抗体を培養液中に直接添加することにより、血管構造を可視化できることがわかった。パクリタキセルやテモゾロミドでは浸潤抑制効果は見られなかったため、腫瘍細胞の浸潤を抑制することが報告されているトラニラストを選択した。培養脳切片に 1mM のトラニラストを投与すると、腫瘍細胞の運動速度が有意に低下した。また辺縁部の浸潤巣の数も対照群や TGF β 1 投与群と比較して減少した。また、別の遺伝子背景(*Tp53^{-/-}*, *Nf1^{-/-}*)を持つマウス脳腫瘍自然発生モデルの脳腫瘍から樹立した細胞 (PNMG106)を同様に移植して作成した培養脳切片においても、トラニラストによる浸潤抑制作用が再現された。

結 論：

本研究は、悪性脳腫瘍について、薬剤スクリーニング法の開発を目指して研究したものであるが、従来ほとんどおこなわれなかったマウス脳腫瘍モデルから作成した培養脳切片を用いた薬剤スクリーニング法について重要な知見をえたおのとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。