

令和元年6月3日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16634

研究課題名(和文)脳腫瘍を構成する細胞群におけるAquaporin-1発現意義の解明と新規治療戦略

研究課題名(英文)Elucidation of the Aquaporin-1 expression in the cell group of Glioblastoma

研究代表者

大石 正博(OISHI, MASAHIRO)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：50646693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：AQP1は脳腫瘍の領域においては、腫瘍の浸潤能や遊走能に関わる、AQP1の発現量と神経膠腫の悪性度が比例するなどの機能が報告されている。本研究は、悪性神経膠腫細胞におけるAQP1の発現意義および細胞機能への影響を解明し、AQP1の発現を制御することで新たな治療戦略としての可能性を見出す試みである。

ヒト由来glioblastoma細胞株および血管内皮細胞株を用いて、AQP1の発現が腫瘍細胞の性格や血管新生能に及ぼす影響を検討した。AQP1の過剰発現により腫瘍細胞の遊走能・浸潤能は亢進し、血管内皮細胞の管腔形成も変化させた。またAQP1の過剰発現は腫瘍細胞においてTHSD7Aの発現量を低下させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Glioblastomaは世界中で多くの研究がなされている現在においても非常に予後不良な脳腫瘍である。新規治療法の開発が必要不可欠であり、その腫瘍の増殖・進展に関わる分子メカニズムの解明は重要である。AQP1に関連した本研究が腫瘍の浸潤に関わるメカニズム解明の一助になったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The AQP1 expression has been reported to link to tumor malignancy in brain tumors. The characteristic features of AQP1-expressed GBM remain to be clarified. We observed AQP1 expression of tumor cells in the patients with GBM by an immunohistochemistry. Overexpression of AQP1 significantly accelerated glioblastoma cell migration and invasion, but not proliferation, in vitro. It is also demonstrated that the integrity of tube formation of human endothelial cells was significantly enhanced using direct co-culture system with AQP1-expressed GBM cells. Forced expressions of AQP1 significantly downregulated the THSD7A levels in GBM cells. In human specimens, AQP1 expression was negatively correlated with THSD7A expression in GBM cells. These findings suggest that AQP1 could be implicated in tumor malignancy by facilitating migration and invasion of GBM cells as well as by causing vascular deformation via downregulating anti-angiogenic THSD7A in GBM cells.

研究分野：脳神経外科

キーワード：Aquaporin1 Glioblastoma 脳腫瘍 浸潤 血管新生 解糖系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グルコースを主なエネルギー源とする脳腫瘍、特に悪性脳腫瘍の糖代謝は、腫瘍の増大・進展に重要な要素である。悪性グリオーマでは、グルコースを基質とした解糖系が活性化されることにより、乳酸アシドーシスとなり、細胞内酸化および細胞性浮腫が生じ、これらを緩和するために細胞膜上に発現する選択的水チャンネルである AQP1 が増加、それに伴い H₂O が細胞外に放出され、細胞膜に存在する carbonic anhydrase(CA)によって H⁺ (H₂O +CO₂ ⇌ HCO₃⁻+H⁺) となり細胞外が酸性下環境下に置かれることで、cathepsin B が活性化されやすくなり、さらに血管周囲の細胞外基質を溶解し血管新生と細胞浸潤を促進させることを報告した(Neoplasia 2007)。この悪性腫瘍の進展形式として、特に腫瘍と正常脳の境界において血管周囲に腫瘍細胞群が島状に多数存在していることが観察されるが、この腫瘍細胞群では AQP1 が非常に強く発現していることが分かった。これには腫瘍による細胞外環境の酸性化と血管新生が相まって生じ、腫瘍の正常組織内への浸潤に AQP1 が強く関与していると考えられた。また、解糖系によるピルビン酸発生以降の触媒酵素である乳酸脱水素酵素 (Lactate dehydrogenase, LDH) は、血管内皮細胞と血管周囲の腫瘍細胞に強く発現していた。つまり、このことは血管内からグルコースおよび酸素を取り込みやすい環境下にある細胞において、解糖系が亢進している可能性を示唆している。しかし、それに対応する AQP1 の発現は血管周囲の腫瘍細胞にのみ強く発現しており、血管内皮細胞には発現していなかった。これは悪性グリオーマ内の血管内皮細胞は AQP1 の発現を認めず、自身の細胞性浮腫を緩和できずにいると考えられた。

これとは別に、Saadoun らは血管内皮細胞における AQP1 の機能に関して報告している(Nature 2005)。AQP1 欠損マウスにおいて皮下もしくは脳内に移植した腫瘍細胞内に進入した新生血管は、対照の野生型マウスと比べて、血管内皮細胞の遊走能や腫瘍内に進入する血管の数などの血管新生能が障害されていた。それにより移植された腫瘍は、AQP1 欠損マウスでは腫瘍内部に広範な壊死を認め、増殖が抑制されたと推測している。これは腫瘍新生血管に AQP1 が存在しないことで、血管新生が抑制され栄養血管として機能していないことを示している。また、Nico らは実際に摘出されたヒトの脳腫瘍病理標本において、AQP1 や AQP4 の発現が血管新生や腫瘍の増殖に関与している可能性を示している(Exp Cell Res 2011)。大腸癌細胞における *in vitro* の実験系では、AQP1 が血管内皮細胞の tube formation に関与しているとも報告されている(J Exp & Clin Cancer Res 2016)。AQP1 が血管新生に関与している可能性および悪性グリオーマ内の血管内皮細胞には AQP1 を認めていないことから、悪性グリオーマにおいて特徴的な病理組織所見である血管内皮細胞の腫大や壊死領域で認める血管の Glomeruloid appearance は、AQP1 の発現がないために細胞性浮腫が緩和されていないことを示していると考えられる。Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)をはじめとした血管新生促進因子により血管内皮細胞が刺激されても、AQP1 の発現がないために通常の血管形成が得られない可能性がある。さらに、正常脳との境界よりも壊死領域に優位に認められることから、血管内皮細胞の腫大は細胞の機能低下から壊死に至る過程を見ていると推測される。

以上より、悪性脳腫瘍において AQP1 を制御することは、腫瘍細胞の解糖系を抑制し腫瘍の増大を抑制、さらに血管内皮細胞に対しては血管新生を阻害し、腫瘍壊死を誘導できる可能性がある。

2. 研究の目的

悪性脳腫瘍細胞ではエネルギー源であるグルコースの代謝(解糖系)により乳酸アシドーシスが生じ、それによる細胞性浮腫を緩和するために AQP1 が増加、さらに周囲の血管新生を促進していることを、研究協力者が報告している。また血管新生(血管内皮細胞の増殖や遊走)は脳腫瘍増大に関与する最大の要因であり、その制御因子に関して多数の報告があるが、グルコース代謝(解糖系)に関連した報告は少ない。本研究の目的は、グリオーマにおける AQP1 の発現意義を解明し、AQP1 の発現量を制御することで解糖系をコントロールし、さらには血管新生を抑制することで、新たな治療ターゲットとしての可能性を見出すものである。

3. 研究の方法

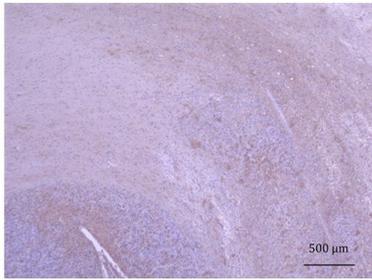
手術で得られた Glioblastoma の病理標本に免疫組織染色を行い、腫瘍細胞および腫瘍内血管内皮細胞における AQP1 の発現確認、局在評価を行った。ヒト由来 glioblastoma 細胞株である U251、U87 および血管内皮細胞株である ECV304 (human umbilical vein-EC-derived cell line) 脳血管内皮細胞 (HBMEC) を用いて、*in vitro* で AQP1 の発現が腫瘍細胞の増殖能、浸潤能、遊走能、さらには血管新生能に及ぼす影響を評価し、その分子メカニズムの解明を行った。

4. 研究成果

1) Glioblastoma の病理検体での AQP1 の発現と分布

手術により得られた Glioblastoma の病理標本 30 例に対して免疫組織染色を行い、腫瘍の辺縁部や壊死部での AQP1 の発現レベル、局在、分布を評価した。Glioblastoma の正常脳への浸潤部位での AQP1 の強い発現を認めた (Figure1)。

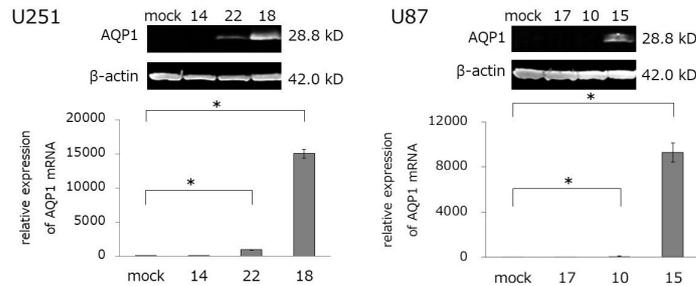
Figure1



2) Glioblastoma 細胞株の AQP1 発現調整

U251、U87 の 2 種類の細胞株を用いて実験系を作成したが、共に AQP1 の発現を認めなかったため、それぞれの細胞株に AQP1 を transfection し、cloning を行った。AQP1 発現量を調整した stable cell line を樹立した (Figure2)。

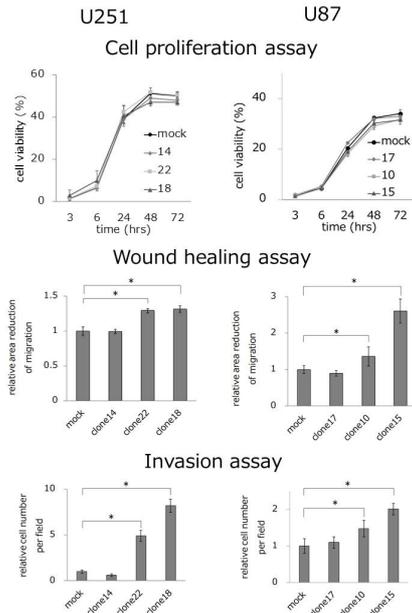
Figure2



3) AQP1 発現調整株の性質

樹立した細胞株の増殖能、遊走能、浸潤能を評価した。増殖能は AQP1 の発現により変化しなかった。遊走能、浸潤能は AQP1 の発現量依存的に亢進した (Figure3)。

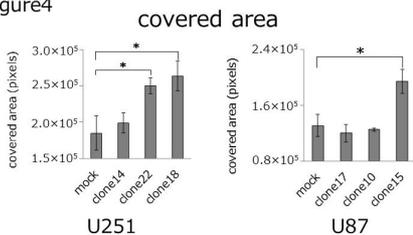
Figure3



4) 腫瘍細胞の AQP1 発現が血管内皮細胞の tube formation に及ぼす影響

AQP1 発現調整 Glioblastoma 株と血管内皮細胞株の共培養を行い、血管新生能を評価した。

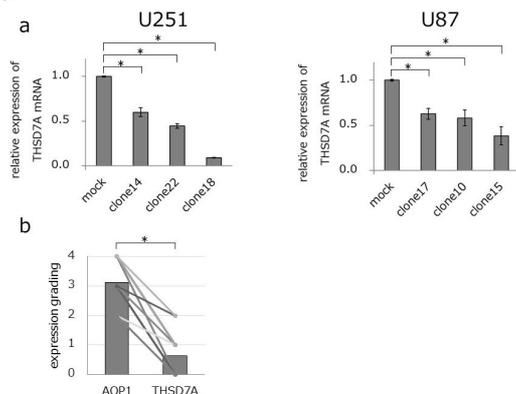
Figure4



直接 coculture する方法と半透膜で仕切った容器で coculture し液性因子の影響をみる方法を行った。その結果、直接共培養した場合に tube formation に変化が生じていた (Figure4)。

5) thrombospondin type 1 domain containing 7A (THSD7A) の tube formation への関与
培養細胞では AQP1 の発現と THSD7A の発現には逆相関の関係があり、またヒトの検体の病理検体でも同様に逆相関の関係が認められた (Figure5)。

Figure5



6) 研究の成果と問題点・展望

AQP1 の発現上昇は GBM の浸潤能・遊走能に関わる可能性があり、さらに血管新生抑制因子である THSD7A を抑制することで、血管新生をうながす可能性が示唆された。しかし本研究はいずれも *in vitro* での成果が主であり、*in vivo* にも発展させる必要がある。また AQP1 と THSD7A を結びつける詳細なメカニズムに迫るには至らず、今後も継続して検討する必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

① Masahiro Oishi, Yasuhiko Hayashi, Yasuo Sasagawa, Daisuke Kita, Osamu Tachibana, Mitsutoshi Nakada

Outcome of diabetes insipidus in patients with Rathke 's cleft cysts
Clinical Neurology and Neurosurgery 167 (2018) 141-146.

査読有り DOI: 10.1016/j.clineuro.2018.02.031

② 大石正博、林 康彦、笹川泰生、福井一生、立花 修、中田光俊

尿崩症により発症したラトケ嚢胞 5 例の検討

日本内分泌学会雑誌 93 Suppl: 76-78, 2017.

査読なし DOI: https://doi.org/10.1507/endocrine.93.S.HPT_5

共著

平成 31 年

Yasuhiko Hayashi, Yasuo Sasagawa, Masahiro Oishi, Daisuke Kita, Shingo Tanaka, Fumiaki Ueda, Osamu Tachibana, Mitsutoshi Nakada

Directional Regulation of Extrasellar Extension by Sellar Dura Integrity and Intrasphenoidal Septation In Pituitary Adenomas

World Neurosurgery 122: e130-e138, 2019

査読有り DOI: 10.1016/j.wneu.2018.09.127

平成 30 年

④ Sho Tamai, Yasuhiko Hayashi, Yasuo Sasagawa, Masahiro Oishi, Mitsutoshi Nakada

A case of a mobile choroid plexus cyst presenting with different types of obstructive hydrocephalus

Surg Neurol Int. 2018; 9: 47. doi: 10.4103/sni.sni_377_17

査読有り DOI: 10.4103/sni.sni_377_17

⑤ Yasuo Sasagawa, Yasuhiko Hayashi, Osamu Tachibana, Atsushi Nakagawa, Masahiro Oishi, Toshinari Takamura, Hideaki Iizuka, Mitsutoshi Nakada

Transsphenoidal Surgery for Elderly Patients with Acromegaly and Its Outcomes: Comparison with Younger Patients

World Neurosurgery 118: e229-e234, 2018

査読有り DOI: 10.1016/j.wneu.2018.06.165

Yasuhiko Hayashi, [Masahiro Oishi](#), Yasuo Sasagawa, Daisuke Kita, Kazuto Kozaka, Mitsutoshi Nakada
Evaluation of Soft Tissue Hypertrophy at the Retro-Odontoid Space in Patients with Chiari Malformation Type I on Magnetic Resonance Imaging
World Neurosurgery116: e1129-e1136, 2018.
査読有り DOI: 10.1016/j.wneu.2018.05.186

Yasuhiko Hayashi, Yasuhiro Aida, Yasuo Sasagawa, [Masahiro Oishi](#), Daisuke Kita, Osamu Tachibana, Fumiaki Ueda, Mitsutoshi Nakada
Delayed Occurrence of Diabetes Insipidus After Transsphenoidal Surgery with Radiologic Evaluation of the Pituitary Stalk on Magnetic Resonance Imaging
World Neurosurgery110: e1072-e1077, 2018.
査読有り DOI: 10.1016/j.wneu.2017.11.169

Yasuhiko Hayashi, Yasuo Sasagawa, [Masahiro Oishi](#), Daisuke Kita, Koishi Misaki, Issei Fukui, Osamu Tachibana, Mitsutoshi Nakada
Contribution of Intracellular Pressure Elevation to Headache Manifestation in Pituitary Adenoma Evaluated With Intraoperative Pressure Measurement
Neurosurgery 84(3): 599-606, 2019.
査読有り DOI: 10.1093/neuros/nyy087

平成 29 年

Issei Fukui, Yasuhiko Hayashi, Daisuke Kita, Yasuo Sasagawa, [Masahiro Oishi](#), Osamu Tachibana, Mitsutoshi Nakada
Significant Improvement in Chronic Persistent Headaches Caused by Small Rathke Cleft Cysts After Transsphenoidal Surgery
World Neurosurg. 99:362-368, 2017.
査読有り DOI: 10.1016/j.wneu.2016.12.111

Yasuo Sasagawa, Yasuhiko Hayashi, Osamu Tachibana, [Masahiro Oishi](#), Issei Fukui, Hideaki Iizuka, Mitsutoshi Nakada
Clinical characteristics of acromegalic patients with empty sella and their outcomes following transsphenoidal surgery
Pituitary (2017) 20:403-408.
査読有り DOI: 10.1007/s11102-017-0798-6

Yasuhiko Hayashi, [Masahiro Oishi](#), Issei Fukui, Yasuo Sasagawa, Kenichi Harada, Mitsutoshi Nakada
Rathke cleft cyst with entirely ossified cyst wall and partially solid cyst content: a case report and literature review.
World Neurosurgery 98:e15-e20, 2017.
査読有り DOI: 10.1016/j.wneu.2016.10.052

Yasuhiko Hayashi, Yasuo Sasagawa, Issei Fukui, [Masahiro Oishi](#), Daisuke Kita, Kouichi Misaki, Kazuto Kozaka, Osamu Tachibana, Mitsutoshi Nakada
Descent of the anterior communicating artery after removal of pituitary macroadenoma using transsphenoidal surgery
Surg Neurol Int. 2017; 8: 306.
査読有り doi: 10.4103/sni.sni_411_16

Yasuhiko Hayashi, Yasuo Sasagawa, Daisuke Kita, Issei Fukui, [Masahiro Oishi](#), Osamu Tachibana, Fumiaki Ueda, Mitsutoshi Nakada
Contribution of sellar dura integrity to symptom manifestation in pituitary adenomas with intratumoral hemorrhage
Pituitary (2017) 20:531-538.
査読有り DOI: 10.1007/s11102-017-0814-x

Yasuhiko Hayashi, Daisuke Kita, Issei Fukui, Yasuo Sasagawa, [Masahiro Oishi](#), Osamu Tachibana, Fumiaki Ueda, Mitsutoshi Nakada
Preoperative Evaluation of the Interface Between Tuberculum Sellae Meningioma and the Optic Nerves on Fast Imaging with Steady-State Acquisition for Extended Endoscopic Endonasal Transsphenoidal Surgery

〔学会発表〕(計 4件)

国際学会

平成 31 年

- ① Masahiro Oishi, Yasuhiko Yamamoto, Seiichi Munesue, Ai Harashima, Yasuhiko Hayashi, Mitsutoshi Nakada
AQP1-elicited invasion and angiogenesis is mediated by thrombospondin type 1 domain containing 7A (THSD7A) in glioblastoma multiforme.
International Symposium on Chronic Disease and Glycation Biology 平成 31 年 1 月 15 日、金沢

平成 30 年

- ② Masahiro Oishi, Yasuhiko Yamamoto, Seiichi Munesue, Ai Harashima, Yasuhiko Hayashi, Mitsutoshi Nakada
AQP1-elicited invasion and angiogenesis is mediated by thrombospondin type 1 domain containing 7A (THSD7A) in glioblastoma multiforme.
Russia - Japan medical symposium, 平成 30 年 9 月 20-22 日、クラスノヤルスク

平成 29 年

- Masahiro Oishi, Yasuhiko Hayashi, Issei Fukui, Yasuo Sasagawa, Mitsutoshi Nakada
Significant improvement in intractable headaches caused by small Rathke cleft cysts after transsphenoidal surgery
8th IFNE WORLD CONGRESS OF NEUROENDOSCOPY, 平成 29 年 10 月 31 日-11 月 4 日、ケープタウン

国内学会

平成 30 年

- ④ 大石正博、林 康彦、棟居聖一、山本靖彦、中田光俊
Glioblastoma における Aquaporin1 の腫瘍浸潤・血管新生能に及ぼす影響
第 77 回脳神経外科学会学術総会 平成 30 年 10 月 11 日、仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 正博 (OISHI MASAHIRO)

金沢大学 附属病院 医員

研究者番号 50646693

(2) 研究分担者

(3) 研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。