

平成 21 年 05 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591666
 研究課題名（和文） 悪性グリオーマにおけるアクアポリンの機能解明とその抑制による新たな治療戦略
 研究課題名（英文） Research of function of aquaporins in malignant glioma and novel therapeutic strategy with their inhibition
 研究代表者
 林 康彦 (HAYASHI YASUHIKO)
 金沢大学・附属病院・講師
 研究者番号：50324124

研究成果の概要：

悪性グリオーマでは細胞性浮腫を緩和するためにアクアポリンの発現を増加させ、さらにはカテプシンBを活性化して腫瘍細胞が血管周囲腔に沿って増殖浸潤するという推論を証明することが実験の目的である。そこで、解糖系を活性化し、さらにsiRNAにてAQP-1を抑制すると細胞増殖は著しく抑制され、AQP-1 plasmidによる過剰発現細胞株を用いた系では、解糖系の活性、抑制に依らず細胞増殖には差はなかった。これは解糖系による細胞性腫脹の緩和と細胞増殖にAQP-1が大きな役割を果たしていることを示している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：細胞性浮腫、腫瘍浸潤、血管新生

1. 研究開始当初の背景

臓器および組織の機能維持には水は不可欠な要素であり、細胞膜に存在する選択的な水チャンネルであるアクアポリン（AQP）は人体のあらゆる臓器で細胞内水分調節機能を果たしている。AQPはエネルギー非依存性で受動的な水チャンネルであり、細胞内外の環境により発現量やチャンネルを通過す

る水の方向も異なっている。

脳における悪性腫瘍である悪性グリオーマではAQPのサブタイプであるAQP-1, 4が多く存在することが報告されているものの、その存在意義に関しては、周囲の広範な脳浮腫形成に関与するのではと推測されているものの明らかなものは証明されていない。

他臓器の悪性腫瘍と悪性グリオーマでは、

その腫瘍内で豊富な腫瘍血管による血流供給のもとで、唯一のエネルギー源であるグルコースを酸素とともに多量に取り込むことによって、好気性解糖系が非常に活発に維持していることが知られている。解糖系の活性化とともに細胞内の乳酸アシドーシスと細胞性浮腫が生じ、細胞の機能低下を生じる。研究代表者が以前より行ってきた研究結果によれば、そこで悪性グリオーマの腫瘍細胞内では細胞膜において選択的水チャンネルであるアクアポリン-1 (AQP-1) の発現を解糖系の活性化に伴って遺伝子レベルのみならず、蛋白レベルにおいても著しく増加させることがわかっている。それにより細胞内から細胞外への水の流れを生じさせて。細胞性浮腫を緩和しているものと推測された。さらに、細胞外に出された水は同様に細胞外に排出された CO₂ と細胞膜上にあるカルボニックアンヒドラーゼ (IX, XII) の触媒によって再酸化され細胞外を酸性下環境に置く。さらには、細胞内より産生される蛋白分解酵素であるカテプシン B を活性化して細胞外基質を溶解することによって腫瘍細胞が血管周囲腔に沿って浸潤していくのに貢献する。これが悪性グリオーマにおける腫瘍血管に沿った浸潤形式の機序と考えられた。

2. 研究の目的

以上の機序は手術摘出標本での AQP1 蛋白の局在と悪性グリオーマの細胞株を用いた *in vitro* の実験系から推測される機序であり、まだ *in vivo* の実験系にて証明されていない。それで上記の推論が生体内の実験系で証明されることは非常に重要なことであると考えられた。また、AQP1、LDH をはじめとした解糖系酵素、カテプシン B の遺伝子配列の上流域には E-box という特異的な element が共通して存在しておりその制御の有無に関しても調べる必要があった。In vivo の実験系が確立し、E-box による制御が明らかになれば、治療の観点からは解糖系の抑制、細胞腫脹の緩和、細胞浸潤や血管新生の抑制にと繋がり、これらは単に減少として連鎖し

ていたのではなく遺伝子レベルで制御されていることが証明される。その抑制する薬剤の開発およびそれを腫瘍にいかにして取り込ませるかが細胞浸潤の抑制という治療の新たなターゲットとなりうる可能性がある。これは悪性グリオーマにとってグルコースが唯一のエネルギー源であることを考えれば、細胞浸潤や血管新生への関与度は非常に大きいことが予想される。

3. 研究の方法

AQP-1 シークエンスより siRNA を作成し、ラット悪性グリオーマの細胞株から 9L, C6, S635 を用いてその mRNA および蛋白が十分に抑制されていることをノーザンブロット法さらにウエスタンブロット法にて確認する。続いてこれらの悪性グリオーマ細胞株において AQP-1 をその解糖系を活性化することにより発現量を増加させ、それを上記の siRNA を用いることにより抑制することで細胞増殖および浸潤能にどのような違いが出るかを比較検討する。

また、今度は逆に Mayo Clinic の Dr.LaRusso より供与された AQP-1 plasmid をこれらの悪性グリオーマ細胞株に取り込ませて AQP-1 の過剰発現させたものを作成する。これらの発現をウエスタンブロット法によって確認する。まずこれらの細胞株における解糖系を低酸素、高グルコース処理することで活性化させて培地内の乳酸値、細胞内の乳酸逸脱酵素 (LDH) を測定して、解糖系にいかなる影響が出るのかを確認する。同様に細胞増殖および浸潤能に違いが出るかを比較検討する。

また生体内環境による AQP-1 の発現の違いを調べるために、ヒト悪性グリオーマの細胞株を手術によって摘出された悪性グリオーマから蛋白質を抽出して、その発現量の違いをウエスタンブロット法により比較検討を行う。

これらの *in vivo* 系の実験が終了した後に、ラット悪性グリオーマ細胞株を定位的に脳内に植え込んで脳腫瘍を作成したラットモデル

などを用いてAQP-1やLDHの免疫染色やin situ hybridizationを行って脳腫瘍内でのAQP-1の局在パターンの違いを比較する。脳腫瘍はラットの細胞株から9L, C6, S635を用い、適切な量に調節しラットの脳内に定位的注入装置を用いて注入し約2週間これらが固定し、脳腫瘍を形成するのを待つ。これらはAQP-1と同様の染色局在を示すことが予想され、悪性グリオーマにおけるAQP-1が解糖系の亢進と関連していることをさらに強く支持する。血管がその脳腫瘍内にどの程度進入しているかを血管標識マーカー (Factor VIII, CD34など) を用いた免疫組織染色にて評価する。また、悪性グリオーマは広範な浮腫を周囲に有しており、ステロイドに対して良好に反応することが特徴的であるが、AQP-1はその遺伝子配列の上流域においてsteroid response elementを有しており、AQP-1の関与が非常に興味を持たれるところであるが、ラットに移植後2週間の経過の後に大量のステロイドを投与することで、その時点でのAQP-1の発現の差を比較検討する。

また、AQP-1により細胞外に出されたH₂Oが再び酸化され水素イオンに変換されるので、その酸性環境が細胞外基質を融解するばかりでなく、現在、悪性グリオーマにおいて細胞増殖、浸潤、血管新生などに深く関わっていると注目されているcathepsin familyの中で特にcathepsin Bは酸性環境下で活動性を増すとされている。また、その腫瘍内局在は血管周囲腔であることもすでに報告されておりAQP-1の局在と非常に類似する。従って、E-box mutant 腫瘍細胞の脳内移植モデルにおいてもAQP-1, LDHとの蛍光二重染色を施行してこの局在が一致するか否かを確認する。

4. 研究成果

まず定常状態にて培養された上記のヒト悪性グリオーマ細胞株とヒトグリオブラストーマの手術標本において、AQP-1の蛋白質の発現量をウエスタンブロット法によって比較したところ後者において高値を示し、生体内環境により多大な誘導を受けることがわかった。

続いて、解糖系が活性化された状態で、AQP-1に対するsiRNAを細胞内に取り込ませることは蛍光標識したものをを用いることにより証明された。またAQP-1の蛋白発現の抑制はウエスタンブロット法により88%の抑制と証明された。さらに解糖系の活性化に相関して、細胞増殖が各細胞株において抑制された。ここでAQP-1のsiRNAを取り込ませると、その濃度依存性に抑制された細胞株の増殖がよりさらに抑制されることが判明した。これはAQP-1による悪性グリオーマ細胞での細胞性浮腫の緩和が抑制されて、細胞の機能維持に著しい障害が出たものと思われた。

またAQP-1の過剰発現細胞株の作成をこれもウエスタンブロット法において確認した。その後で、in vitroの系において定常状態では細胞増殖に通常のwild typeと差がないばかりか、高グルコース下において解糖系を活性化して培養した場合、さらにはD-グルコースの代わりに代謝活性の無い光学異性体であるL-グルコース下に培養した場合においても濃度を変えることによっても通常のwild typeとの差を認めなかった。これらの結果は解糖系による細胞性腫脹の緩和と細胞増殖におけるAQP-1の大きな関与を示したものと思われた。

ラット悪性グリオーマ細胞株を定位的に脳内に植え込んで脳腫瘍を作成したラットモデルなどを用いてAQP-1, LDH, cathepsin Bの免疫染色を施行したが、その脳腫瘍内でのAQP-1の局在パターンはヒト悪性グリオーマにおいて証明された血管周囲の腫瘍細胞に置ける発現の増加と同じパターンが再現されていることも二重蛍光染色法によって認められた。これらは悪性グリオーマにおけるAQP-1が解糖系の亢進と関連していることをさらに強く支持する。

次に、ステロイドを移植後2週間後に大量投与したラットにおいては免疫染色のみではあるが、AQP-1の発現の増加が観察された。これはAQP-1のsteroid response elementが反応したものと思われるが、浮腫形成との直接の因果関係は今後の成果を待つ必要がある。

今後においては、今回は施行できなかったものの遺伝子配列の上流域にある E-box element を silencing した悪性グリオーマ細胞株を作成して、これらが上記の AQP-1 を抑制した細胞株と過剰発現した系と in vitro において、または in vivo において検討するのも今後の課題と言える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1) Hayashi Y, Oldfield EH, Merrill MJ. (他 2 名、1 番目), Regulation and function of aquaporin-1 in glioma cells. Neoplasia, 9(9), 777-787, 2007 (査読有)

2) Hayashi Y, Oldfield E, Merrill M (他 5 名、1 番目), The mechanism of cytotoxic edema alleviation by AQP1 in malignant glioma cells. Progress in Research on Brain Edema and ICP 9, 7-12, 2007 (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1) Yasuhiko Hayashi, Nancy Edwards, Martin Proescholdt, Jun-ichiro Hamada, Edward Oldfield, Marsha Merrill, Possible participation of aquaporin-1 in aerobic glycolysis and perivascular cell invasion of glioma cells
2008 Annual Meeting of Congress of Neurological Surgeons, 2008. 9. 20-25, Orland, FL, USA

2) 林 康彦、吉田優也、中田光俊、喜多大輔、濱田潤一郎、岡本浩昌、Martin Proescholdt, Nancy Edwards, Marsha Merrill, Edward Oldfield、悪性グリオーマの perivascular cell infiltration における AQP-1 の関与、第 12 回グリア研究会、2007. 11. 17、名古屋

3) 林 康彦、吉田優也、濱田潤一郎、岡本浩昌、Martin Proescholdt, Nancy Edwards,

Edward Oldfield, Marsha Merrill、悪性グリオーマにおける AQP1 による細胞性浮腫調節機構、第 2 回脳浮腫・頭蓋内圧フォーラム、2007. 6. 30、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 康彦 (HAYASHI YASUHIKO)
金沢大学・附属病院・講師
研究者番号 : 50324124

(2) 研究分担者

濱田潤一郎 (HAMADA JUNICHIRO)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号 : 40253752

(3) 連携研究者

林 裕 (HAYASHI YUTAKA)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号 : 90262568

内山尚之 (UCHIYAMA NAOYUKI)
金沢大学・附属病院・講師
研究者番号 : 80293364