

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791011

研究課題名（和文） 膠芽腫及びその幹細胞の浸潤機構解明と臨床応用

研究課題名（英文） Expression and function analyses of uPARAP in glioma and glioma cancer stem cells

研究代表者

高橋 里史 (TAKAHASHI SATOSHI)

慶應義塾大学・医学部・研究員（非常勤）

研究者番号：20383870

研究成果の概要：

uPARAP は mRNA レベル、タンパクレベルにおいて正常脳に比べて神経膠腫で高発現していた。uPARAP を特異的に knock down する siRNA をデザインし、神経膠腫 cell line における uPARAP の機能解析を行った結果、同分子が神経膠腫の移動及び浸潤に関与している事が明らかになった。以上より同分子が浸潤能抑制による治療標的となる可能性が示唆された。また、腫瘍幹細胞でもその発現が確認されたため、腫瘍幹細胞を標的とした治療に対する可能性も示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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：脳腫瘍学, 腫瘍幹細胞, 腫瘍浸潤

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 神経膠腫と正常脳の遺伝子発現プロファイルを Gene tip analysis にて比較した。結果 6 個の正常脳平均に比べて神経膠腫で 4 倍以上の高発現を認める遺伝子を同定した。

(2) 得られた遺伝子に関し、NCBI の遺伝子発現データベースを利用して同定された 6 種の遺伝子の発現を確認、神経膠腫に発現が認められる事と、正常組織における発現が比較かがられている事を条件に遺伝子を絞り込んだ。更に文献的考察を加えて、uPARAP が乳がん、頭頸部がん、前立腺がん等のがんにお

ける癌浸潤及び転移に関係している分子であるとの知見を得た。

(3) 上記(1)、(2)より uPARAP が神経膠腫においてもその浸潤機構に関し重要な役割を担っているとの仮説を立て、同分子に関して神経膠腫におけるその発現、機能を検討する事とした。

## 2. 研究の目的

(1) uPARAP の神経膠腫及び神経膠腫幹細胞、正常組織における発現を検討する。

(2)uPARAP が神経膠腫及びその幹細胞においても移動及び浸潤に関与しているのではないかと仮説に基づき、神経膠腫 cell line 培養細胞を用いた *in vitro* の実験を行い、その証明及び uPARAP を治療標的として用い得る可能性につき研究を行った。

### 3. 研究の方法

- (1)qPCR 及び Westernblot にて uPARAP の発現を mRNA レベル及びタンパクレベルでそれぞれ評価した。
- (2)uPARAP を標的とした 2 種類の siRNA をデザインし、それらを用いて神経膠腫 cell line において同分子を knock down した。また Western Blot にて同分子が効果的に knock down されているか否かを評価した。
- (3)Boyden chamber を用いて細胞の移動及び浸潤能 siRNA を用いて uPARAP を knock down した神経膠腫 cell line とコントロール細胞において比較した。

### 4. 研究成果

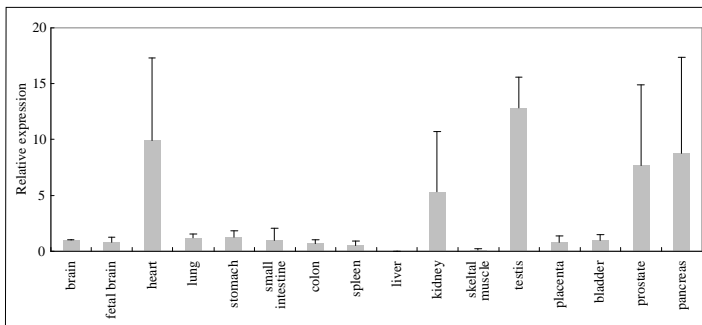
(1) 6 つの神経膠腫と 4 つの正常脳の遺伝子発現プロファイルと比較した Gene tip analysis の結果を供覧する(表 1)。

	MB1	MB2	MB3	glioma1	glioma2	glioma3	glioma4	glioma5	glioma6	glioma7	glioma8	glioma9	glioma10	glioma11
uPARAP	183.1	198	-3.4	626.9	710.8	829.8	702	1250	1850	1259	894.1	754	1028	922.5
EDG4	-3.4	-44	142	303.1	373.8	643.8	618	410	492.2	479.9	335.1	397	318.8	397.9
GM2A	71.3	-74	-31	254.4	255.4	861.9	314	243	201.2	875.1	156.7	328	508	293.5
SMARCG1	-21.2	-49	91.8	314.3	261.6	318.7	521	426	550.7	401.9	109	568	218.1	333.8
WAF1	407.6	-230	-62	761.5	299.5	722.8	1217	942	1342	686.2	1103.1	171	319.3	246.6
Human clone 23933	10.9	-41	106	135.4	474.8	254.7	274	243	478.4	177.6	102.5	162	312	181.6

表 1

(2)uPARAP の mRNA レベルでの発現を qPCR で、タンパクレベルでの発現を Western blot を用いて評価した。

正常組織における mRNA レベルでの uPARAP の発現。(図 1)

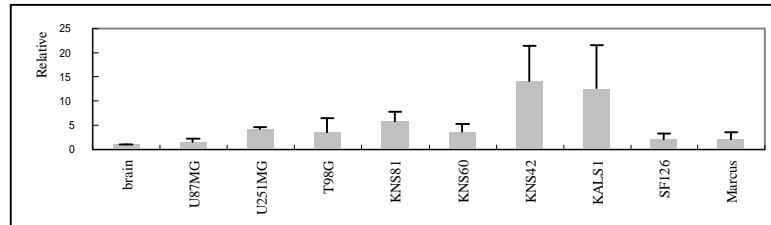
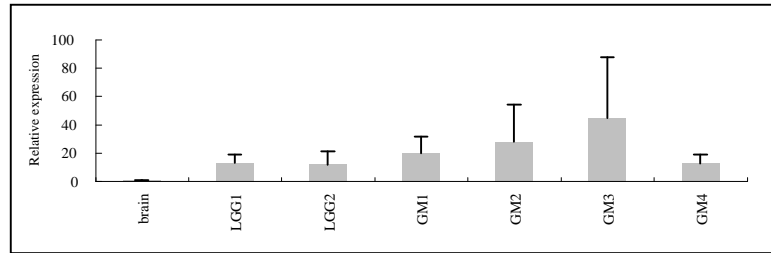


(図 1)

正常脳での発現を 1 として種々の正常組織における uPARAP の発現を評価した。

uPARAP は検討した正常組織の中では心臓、腎臓、精巣、前立腺、膵臓において高い発現を認めた。uPARAP knock out mouse は明らかな phenotype を示さなかったとの報告があり、本研究で明らかになった正常組織における uPARAP の発現は uPARAP を標的にした全身治療の障壁にはならないと考えられた。

慶應義塾大学医学部脳神経外科の手術検体をもちいた神経膠腫における mRNA レベルでの uPARAP の発現を qPCR で検討した。また cell line を選択する目的で種々の神経膠腫 cell line における同分子の発現を同様に



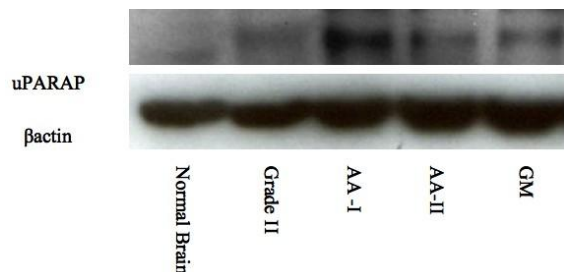
qPCR で検討した(図 2)

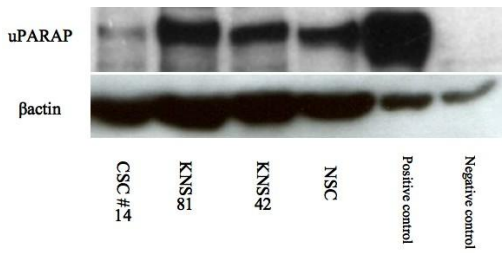
(図 2)

神経膠腫検体において uPARAP はその悪性度分類に関わらず正常脳コントロールと比較して高い発現を認める事が明らかになった。

神経膠腫 cell line の中では日本人の腫瘍検体から樹立された KNS42 と KNS81 において uPARAP が特に高発現していることが確認された。この結果は uPARAP が日本人の腫瘍検体を用いて施行された Gene tip analysis から選ばれた経緯にも矛盾しないと考えられた。

慶應義塾大学医学部脳神経外科の手術検体をもちいた神経膠腫におけるタンパクレベルでの uPARAP の発現を Western blot にて評価した。また同じく慶應義塾大学医学部脳神経外科の手術検体から分離樹立した脳腫瘍幹細胞から調整したタンパク、神経幹細胞から調整したタンパク、及び神経膠腫 cell line から調整したタンパクにおいても uPARAP の発現を同様に評価した。(図 3)





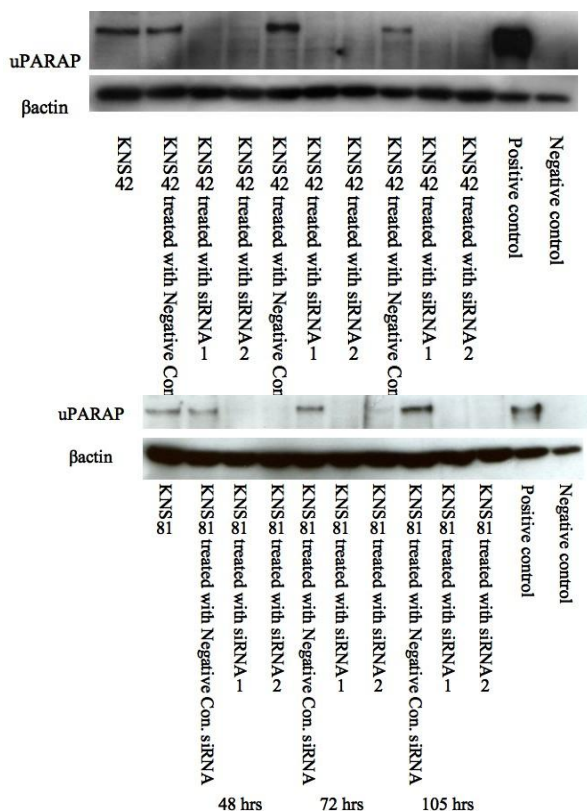
(図 3)

- \*1 CSC#14: 腫瘍幹細胞(分離培養から 14 回目の継代の後タンパクを調整した)
- \*2 NSC: 神経幹細胞
- \*3 positive control: pcDNA3.1 vector を用いて uPARAP を強制発現させた 293T 細胞から調整したタンパク
- \*4 293T 細胞から調整したタンパク

神経膠腫検体において uPARAP はタンパクレベルにおいてもその悪性度分類に関わらず正常脳コントロールと比較して高い発現を認める事が明らかになった。

KNS42 及び KNS81 神経膠腫 cell line、脳腫瘍幹細胞、神経幹細胞においても uPARAP が正常脳コントロールと比較して高い発現を示す事が明らかにされた。

(3)uPARAP に対して design した 2 種類の siRNA を作用させた KNS42 及び KNS81 神経膠腫 cell line において 48 時間後から 105 時間後にかけてのタンパクレベルでの uPARAP の発現を評価した。(図 4)

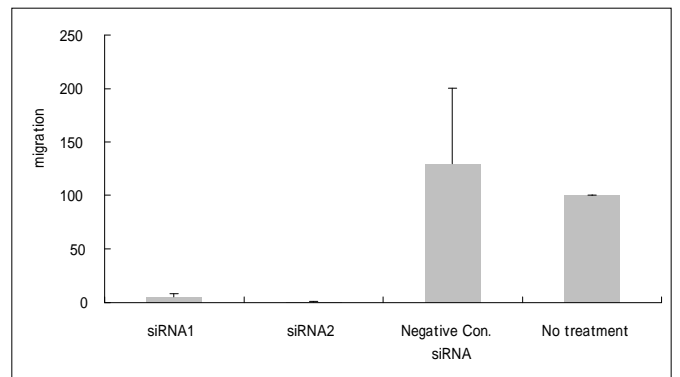


(図 4)

uPARAP を標的に design した 2 種類の siRNA がそれぞれ transfection 後 48 時間後から 105 時間後にかけてタンパクレベルで効果的に uPARAP の発現を抑制する事が確認された。このためこの 2 種類の siRNA 配列を用いて神経膠腫 cell line を用いた uPARAP の機能実験を行う事とした。

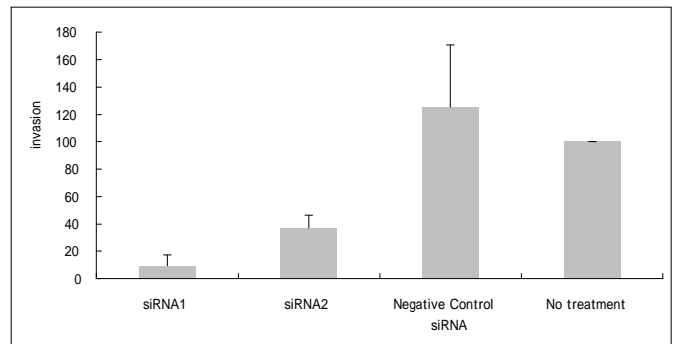
(4)Boyden chamber と前述の 2 種類の siRNA を用いて神経膠腫 cell line における uPARAP の移動能を評価した。

2 種類の siRNA で uPARAP を knock down した神経膠腫 cell line の移動能は Negative Control siRNA を作用させた神経膠腫 cell line 及び siRNA を作用させなかった神経膠腫 cell line と比較して抑制される事が示された。(図 5)



(図 5)

(4)Boyden chamber と前述の 2 種類の siRNA を用いて神経膠腫 cell line における uPARAP の浸潤能を評価した。(図 6)



(図 6)

2 種類の siRNA で uPARAP を knock down

した神経膠腫 cell line の浸潤能は Negative Control siRNA を作用させた神経膠腫 cell line 及び siRNA を作用させなかった神経膠腫 cell line と比較して抑制される事が示された。

(5)以上の知見より神経膠腫 cell line において uPARAP の機能を抑制する事で、その移動能及び浸潤能を抑制できる可能性が示された。神経膠腫より分離した腫瘍幹細胞においても uPARAP の発現が確認されている事から神経膠腫の腫瘍幹細胞を標的とした新規治療への応用も期待される。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕特記すべき事項なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 里史 (TAKAHASHI SATOSHI)

慶應義塾大学・医学部・研究員(非常勤)

研究者番号: 20383870

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし