

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2008～2009  
 課題番号： 20790307  
 研究課題名 (和文) 膠芽腫の悪性形質を制御する新規機能遺伝子の探索  
 研究課題名 (英文) Exploratory analysis for functional genes which regulate the malignant features of glioblastoma

研究代表者  
 福島 剛 (FUKUSHIMA TSUYOSHI)  
 宮崎大学・医学部・助教  
 研究者番号： 10452913

## 研究成果の概要 (和文)：

極めて予後が不良である膠芽腫について、意義や機能は未だよくわかっていないが高発現している遺伝子を解析し、その下流または上流のシグナル伝達に関わる新規機能遺伝子を探索して、膠芽腫の新たな治療標的を見出すことを目的とした。IGFBP-2、CD24 という遺伝子に着目し、これらが膠芽腫の浸潤性増殖を促進しており、治療標的となりうることを見出し、さらにそれらを正に制御している遺伝子候補を 約 30 遺伝子特定し、その一部について機能解析を行った。

## 研究成果の概要 (英文)：

Glioblastoma is the most malignant brain tumor with very poor prognosis. I aimed to identify novel functional genes influencing the malignant features of glioblastoma by analyzing some genes overexpressed by glioblastomas whose detailed functions remain unknown. In this study, I focused on *IGFBP-2* and *CD24*, both of which were involved in the invasive growth of glioblastoma. The cDNA microarrays for transcriptional profiling revealed significantly reduced expression of progression-associated genes and enhanced expression of suppression-associated genes in response to *IGFBP-2* or *CD24* knockdown in glioblastoma cell lines. Furthermore, about 30 functional genes were identified as candidates for positive regulators of *IGFBP-2* by an expression cloning method. These genes and the related signal transductions serve as potential therapeutic targets in glioblastoma.

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：遺伝子、癌、細胞・組織、病理学、脳神経疾患

## 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫 (Glioblastoma) は、著明な浸潤性増殖と血管新生を特徴とする悪性脳腫瘍であり、近年の脳外科手術技術の向上、抗癌剤の進歩にもかかわらず、未だ 2 年生存率が 30%にも満たない不治の病である。これまで、膠芽腫の進展に関わる遺伝子、シグナル伝達経路は報告されてきているが、治療に結びついておらず、膠芽腫治療の糸口を掴むには、何らかのブレークスルーが必要と考えられる。申請者はこれまでの研究において、膠芽腫で高発現しているが、その真の機能は未知である遺伝子の一つとして、*insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2)* に注目し、その発現、生体内機能について解析してきた。*IGFBP-2* は従来、胎児期に高発現して脳の発達に関与し、*insulin-like growth factors (IGFs)* の調節に抑制的に働く因子とされてきた。一方で、膠芽腫を含む様々な悪性腫瘍において腫瘍進展に伴う高発現が報告されてきており、*IGFs* のシグナルから独立した未知の機能も有している可能性が強く示唆されてきている。

## 2. 研究の目的

本研究は、膠芽腫での高発現が報告されているが、その意義や機能が未だよくわかっていない遺伝子を解析し、その下流または上流のシグナル伝達に関わる新規機能遺伝子を探索して、膠芽腫の新規治療標的を見出すことを目的とする。申請者がこれまでに解析してきた知見をもとにして、*IGFBP-2* と *CD24* が膠芽腫の浸潤性増殖を促進する機序と、そこに関与する因子を解析し、膠芽腫の悪性形質を制御するための分子標的を探索する。また、*IGFBP-2* および *CD24* の発現が薬剤耐性や放射線治療耐性へ関与する可能性を検討し、現在用いられている治療の補助療法標的となり得ないか検討する。さらに、*CD24* 以外にも、cDNA マイクロアレイによって渉猟された *IGFBP-2* と連動して変動する候補遺伝子について、ノックダウンを行って同様に解析し、悪性形質に関与し、治療標的となりうる候補遺伝子を絞り込んでいく。さらに、forward genetics 法を用いて、*IGFBP-2* を制御している未知の遺伝子を網羅的に探索する。

## 3. 研究の方法

(1) レトロウイルスを用いて安定的に標的遺伝子をノックダウンあるいは強制発現し、それを定量的に評価する。表現型の変化を解析する。*(IGFBP-2* のノックダウンおよび強

制発現、*CD24* のノックダウンおよび強制発現を行う。)

(2) 上記で作成した細胞について、cDNA マイクロアレイを用いて遺伝子組み換えや刺激の有無に伴う遺伝子発現プロファイルの変化を解析して表現型の変化の原因となった候補遺伝子を抽出する (reverse genetics 法および強制発現系による解析)。

(3) *IGFBP-2* のプロモーター配列を *thymidine kinase* 遺伝子の 5' 上流に組み込んだベクターを構築し、膠芽腫細胞にトランスフェクションする。膠芽腫細胞のランダムアンチセンスレトロウイルスライブラリーないしはランダム shRNA ライブラリーを構築し、これをこの細胞に感染させ、ガンシクロビルを添加して選択し、生存した細胞からコロニーを分離し、DNA を抽出して、レトロウイルスの配列をプライマーにしてシーケンシングを行い、細胞がガンシクロビル選択から免れる要因となった配列を特定する。この配列の標的遺伝子は、*IGFBP-2* を正に制御している遺伝子の候補である。  
(forward genetics 法)

(4) こうして得られた遺伝子が実際に *IGFBP-2*、*CD24* を制御しているかどうか、RT-PCR、realtime PCR、western blot で確認し、これらの機能解析を行って、悪性形質への関与を証明し、治療標的になりうるかどうか検討する。

## 4. 研究成果

*IGFBP-2* は *CD24* の上流にあって、膠芽腫の浸潤性増殖を促進していること、*CD24* は *IGFBP-2* による浸潤性増殖の唯一の実行因子ではなく、約 40%の膠芽腫で発現している浸潤を促進していることがわかった。*IGFBP-2*、*CD24* を発現している細胞では、いずれのノックダウンによっても、膠芽腫の浸潤が抑制され、ヌードマウス脳内移植モデルにおける生存期間が延長した。*IGFBP-2* および *CD24*、それぞれのノックダウン膠芽腫細胞の cDNA マイクロアレイ解析によって、それぞれの遺伝子抑制に連動して発現低下する遺伝子群、上昇する遺伝子群、をそれぞれ数十遺伝子特定し、*IGFBP-2* および *CD24* は全体として、癌遺伝子、増殖促進因子、浸潤促進因子を促進し、癌抑制遺伝子を抑制していることがわかった。現在、得られた遺伝子のノックダウン、強制発現を試みて、

それらが膠芽腫治療の分子標的となり得ないか解析している。また、*IGFBP-2* のプロモーターを利用した expression cloning 法 (forward genetics 法) によって、*IGFBP-2* を正に制御している遺伝子候補が約 30 遺伝子得られており、その内、*TPM3*、*DKK1* はやはり、膠芽腫の悪性形質を促進していた。

#### 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 9 件)

(1) Mukai S, Fukushima T, Naka D, Tanaka H, Osada Y, Kataoka H: Activation of hepatocyte growth factor activator zymogen (pro-HGFA) by human kallikrein 1-related peptidases. FEBS J., 275:1003-17 (2008)

(2) Nagaike K, Kawaguchi M, Takeda N, Fukushima T, Sawaguchi A, Kohama K, Setoyama M, Kataoka H: Defect of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1/serine protease inhibitor, Kunitz type 1 (Hai-1/Spint1) leads to ichthyosis-like condition and abnormal hair development in mice. Am. J. Pathol.173:1464-1475 (2008)

(3) Komaki W, Fukushima T, Tanaka H, Itoh H, Chosa E, Kataoka H: Expression of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 on the epithelial cell surface is regulated by hypoxic and oxidative stress. Virchows Arch. 453: 347-357 (2008)

(4) Okura T, Marutsuka K, Hamada H, Sekimoto T, Fukushima T, Asada Y, Kitamura K, Chosa E. Therapeutic efficacy of intra-articular adrenomedullin injection in antigen-induced arthritis in rabbits. Arthritis Res. Ther.10:R133 (2008)

(5) Tanaka H, Fukushima T, Yorita K, Kawaguchi M, Kataoka H: Tissue injury alters the site of expression of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in bronchial epithelial cells. Hum. Cell, 22: 11-17 (2009)

(6) Cheng H, Fukushima T, Takahashi N, Tanaka H, Kataoka H: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 regulates

the epithelial to mesenchymal transition through membrane-bound serine proteinases. Cancer Res.69:1828-35 (2009)

(7) Fukushima T, Takeshima, H., and Kataoka, H.: Anti-Glioma Therapy with Temozolomide and Status of the DNA-Repair Gene MGMT. Anticancer Res. 29:4845-4854 (2009)

(8) Kawaguchi M, Orikawa H, Baba T, Fukushima T, Kataoka H: Hepatocyte growth factor activator is a serum activator of single-chain precursor macrophage-stimulating protein. FEBS J. 276:3481-3490 (2009)

(9) Takahashi N, Fukushima T, Yorita K, Tanaka H, Chijiwa K, Kataoka H: Dickkopf-1 is overexpressed in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells and is involved in invasive growth. Int J Cancer 126:1611-1620, 2010

[学会発表] (計 15 件)

(1) Fukushima T, Kawaguchi M, Tanaka, H, Takahashi N, Itoh H, Kataoka H. Silencing of CD24 affects some progression-associated genes in human glioblastoma cells. AACR Annual Meeting 2008 (San Diego, USA, April 12-16, 2008)

(2) 福島 剛、竹島 秀雄、片岡 寛章: 膠芽腫細胞株における MGMT 発現と temozolomide 感受性、第 26 回日本ヒト細胞学会学術集会 (東京都、2008.8.30-31)

(3) Fukushima T, Takahashi N, Yorita K, Tanaka H, Takeshima H, Kataoka H: IGFBP-2 modulates tumor progression- and suppression-associated genes in human glioblastoma cells. 第 67 回日本癌学会学術総会 (名古屋市、2008.10.28-30)

(4) 福島剛、山下真治、上原久生、竹島秀雄、片岡寛章: 膠芽腫細胞株における MGMT 発現と temozolomide 感受性、第 12 回バイオ治療法研究会 (福岡市、2008.12.6)

(5) 福島 剛、川口 真紀子、居川 拓史、頼田 顕辞、馬場 貴、田中 弘之、片岡 寛章: 膠芽腫における TPM3 発現の意義、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸市、2008.12.9-12)

(6) Cheng H, Fukushima T, Takahashi N, Tanaka H, Kataoka H: Hepatocyte growth

factor activator inhibitor type 1 regulates the epithelial to mesenchymal transition. AACR Annual Meeting 2009 (Denver, USA, April 18-22, 2009)

(7) Takahashi N, Fukushima T, Tanaka H, Chijiwa K, Iwamura T, Kataoka H: Overexpression of Dickkopf-1 gene in pancreatic cancer. AACR Annual Meeting 2009 (Denver, USA, April 18-22, 2009)

(8) 福島剛、川口真紀子、高橋伸育、頼田顕辞、田中弘之、片岡寛章：がん促進遺伝子 IGFBP-2 ノックダウンによる膠芽腫細胞の遺伝子発現プロファイルの変化、日本分子生物学会 第 9 回春季シンポジウム（宮崎市、2009.5.11-12）

(9) 福島剛、程海霞、片岡寛章、山崎正稔：腫瘍転移判定における One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) 法の有用性：マウスモデルを用いた検討、第 18 回日本がん転移学会学術集会（旭川市、2009.7）

(10) 福島剛、梅澤一夫、田中弘之、片岡寛章：膠芽腫細胞に対する NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ の抗腫瘍効果、第 27 回日本ヒト細胞学会（東京都、2009.8.22-23）

(11) 福島剛、梅澤一夫、横上聖貴、山下真治、上原久生、竹島秀雄、片岡寛章：膠芽腫細胞に対する NF- $\kappa$ B 抑制の効果、第 10 回日本分子脳神経外科学会（岡山市、2009.9.19-20）

(12) Fukushima T, Kawaguchi M, Takahashi N, Hoshiko S, Umezawa K, Kataoka H: A novel NF- $\kappa$ B inhibitor DHMEQ reduces proliferation of human glioblastoma cell lines. 第 68 回日本癌学会学術総会（横浜市、2009.10.1-3）

(13) 福島剛、川口真紀子、山崎正稔、片岡寛章：OSNA 法の新規コントロール物質試作品の基礎評価、日本臨床検査自動化学会第 41 回大会（横浜市、2009.10.8-10）

(14) Fukushima T, Kawaguchi M, Orikawa H, Baba T, Kohama K, Yorita K, Tanaka H, Kataoka H: Effects of IGFBP-2 silencing on gene expression profiles of human glioblastoma cells. 第 32 回日本分子生物学会年会（横浜市、2009.12.9-12）

(15) Kawaguchi M, Fukushima T, Takeda N, Hoshiko S, Yorita K, Kohama K,

Orikawa H, Baba T, Kataoka H: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) is required for the integrity of intestinal epithelium. Experimental Biology 2010 (EB2010) (Anaheim, USA, 2010.4.23-28)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

福島 剛 (FUKUSHIMA TSUYOSHI)  
宮崎大学・医学部・助教  
研究者番号：10452913

### (2)研究分担者 ( )

研究者番号：

### (3)連携研究者 ( )

研究者番号：