

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17924

研究課題名（和文）膠芽腫における新規予後予測バイオマーカー-ephrin-A2の基礎基盤構築

研究課題名（英文）Construction of a new prognostic factor ephrin-A2 for glioblastoma

研究代表者

平井 希 (Hirai, Nozomi)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：10866445

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）：我々はがん細胞の悪性形質に関わっているEphAのリガンドであるephrin-A2に着目し、神経膠腫における発現と予後の関係、およびグリオーマ細胞とグリオーマ幹細胞における機能をin vitro及びin vivoで検討した。臨床解析及びin vivo実験結果からephrin-A2高発現群ではOSが有意に長く、予後良好因子であった。一方、in vitro実験ではephrin-A2は浸潤促進分子であることが示され、in vivo実験とは一見相反する結果を得た。これらの結果からephrin-A2は生体内においては細胞外微小環境との関係により異なる働きを示す可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では膠芽腫臨床検体を用いた臨床解析及びephrin-A2ノックダウン幹細胞を脳内移植したマウスを用いたin vivo実験ではephrin-A2高発現群において全生存期間の延長を認め、ephrin-A2は予後良好因子である可能性が考えられた。これらの結果は今後、膠芽腫の予後予測に利用可能な新規バイオマーカーの確立につながる可能性がある。また、現在までにephrin-A2の詳細なメカニズムは他のどの悪性腫瘍でも詳細に検討はされていない。本研究により得られたephrin-A2の分子機構の解明は他の癌腫におけるephrin-A2シグナルの解明へつながる横断的研究へと発展すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We focused on ephrin-A2, a ligand for EphA that is involved in malignant phenotypes of cancer cells. We investigated the relationship between ephrin-A2 expression and prognosis in gliomas, and its function in glioma cells and glioma stem cells in vitro and in vivo. Clinical analysis and in vivo experiments showed that ephrin-A2 was a favorable prognostic factor, with a significantly longer OS in the high-ephrin-A2 expression group. On the other hand, in vitro experiments showed that ephrin-A2 is an invasion-promoting molecule. However, these results were seemingly at odds with in vivo experiments. These results suggest that ephrin-A2 may function differently in vivo in relation to the extracellular microenvironment.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：ephrin glioblastoma 膠芽腫 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は致死性が非常に高く、全てのがんのなかでも未だに最も予後不良な原発性悪性脳腫瘍である。膠芽腫は強い治療抵抗性を示し、本邦において、現在の標準治療である手術及び放射線化学療法の治療成績は再発までの期間中央値 10 か月、死亡までの期間中央値 20 ヶ月である。膠芽腫の生物学的特徴の一つとして正常脳への高い浸潤能があり、再発及び治療抵抗性の大きな原因の一つである。膠芽腫を克服するためには浸潤のメカニズム解明が必要不可欠である。チロシンキナーゼ Eph 受容体/ephrin リガンドシステムは細胞間接着を介した双方向性のシグナル伝達様式を有し、がん細胞の悪性形質に関わっている。ヒトで 14 種類存在する Eph 受容体の膠芽腫における機能解析は進んでいるが、9 種類存在する ephrin リガンドに関する報告は少ない。申請者は EphA のリガンドである ephrin-A2 に着目し、神経膠腫における発現と予後の関係、およびグリオーマ細胞とグリオーマ幹細胞における機能を *in vitro* 及び *in vivo* で検討した。

2. 研究の目的

膠芽腫における EphA/ephrin-A システムの研究においても EphA2/ephrin-A1 についての研究が多く、その他のサブタイプに関する研究報告は非常に少ない。膠芽腫における EphA2 について腫瘍悪性度、予後との相関関係やグリオーマ幹細胞の制御と浸潤性の付与などが現在までに報告されているが¹⁾、リガンドである ephrin-A の研究報告は無く、その詳細な分析は膠芽腫における EphA/ephrin-A システムの理解のために重要である。

申請者による予備実験から得られた ephrin-A2 に関する下記の知見 (未発表) をもとに、申請者は ephrin-A2 の膠芽腫細胞における機能を解析しその分子機構を解明する。

1. 正常脳および膠芽腫を含む神経膠腫検体における ephrin-A2 mRNA の発現量は腫瘍悪性度と相関しなかった。

2. Henry ford hospital の data を用いた *in silico* 解析において GBM 患者を ephrin-A2 が高発現している症例群と低発現している症例群を比較すると、前者では生存期間が有意に長かった。

以上より、ephrin-A2 は膠芽腫において予後良好因子である可能性が示唆された。この結果を踏まえ本研究では、ephrin-A2 は膠芽腫細胞においてどのような働きがあるのか解析し、予後予測因子としての基礎基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

①金沢大学附属病院脳神経外科で得られた正常脳 13 例及び、神経膠腫摘出検体 (WHO grade II 14 例、III 10 例、IV 40 例) における ephrin-A2 mRNA の発現量を quantitative real-time PCR で測定し、4 群間を比較した。また、膠芽腫症例について中央値を基準に ephrin-A2 高発現群と低発現群に分け、全生存期間 (OS) と無増悪生存期間 (PFS) を Kaplan-Meier 法にて比較した。さらに、生存期間と関連する因子について、ephrin-A2 発現に一般的な予後因子 (年齢、性別、術前 KPS、手術摘出率、放射線化学療法遂行、IDH1 変異、MGMT promotor メチル化) を加え、これらに従属変数とした多変量解析を行った。

②グリオーマ細胞株 (SNB19、T98G、A172、U251、U87) において ephrin-A2 の発現の高い細胞株に対して siRNA によるノックダウンを行い、細胞形態変化を観察し *in vitro* assay 系で遊走能、浸潤能、増殖能を評価し、これらの変化に寄与するシグナル伝達経路を western blotting にて解析した。

③手術検体より独自に樹立したグリオーマ幹細胞株 KGS01 に対して ephrin-A2 を shRNA によりノックダウンしマウス脳内へ移植し OS を評価した。

4. 研究成果

①正常脳及び神経膠腫摘出検体における ephrin-A2 の発現量は正常脳と比較して膠芽腫で有意に低かった ($p=0.0127$)。膠芽腫摘出検体において ephrin-A2 高発現群は低発現群よりも OS が有意に長かった (中央値各々 24.0 ヶ月、14.0 ヶ月、 $p=0.034$ 、図 1)。また、高発現群と低発現群の 1 年生存率は各々 89.4%、52.8%、2 年生存率は 42.5%、25.3%であった。一方、PFS 中央値は高発現群 (11.0 ヶ月) が低発現群 (9.0 ヶ月) より長い傾向があったが有意差は認めなかった。多変量解析の結果、ephrin-A2 ($p=0.039$)、MGMT promotor メチル化 ($p=0.0001$)、摘出率 ($p=0.017$) が独立した予後因子として抽出された。

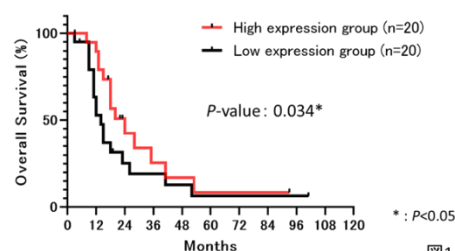


図1

②SNB19 と T98G で ephrin-A2 が高発現しており、主に細胞膜上にその発現を確認した。これらの細胞株で ephrinA2 をノックダウンすると、細胞突起が短縮する形態変化を認めた (図 2)。

これらの ephrin-A2 高発現細胞を用いて Time-lapse 撮影法で細胞遊走を観察すると ephrin-A2 をノックダウンしていない細胞では細胞突起を良く伸ばし活発に細胞が遊走されるのに対し、ノックダウンした細胞では細胞突起を伸ばさず、遊走能が低下していることが確認された。

In vitro 実験においても遊走能、浸潤能の低下を認めたが (図 3)、増殖能は変化を認めなかった。Western blotting を用いて上記の変化を検討すると、ephrin-A2 ノックダウン細胞株では FAK のリン酸化が抑制された (図 4)。

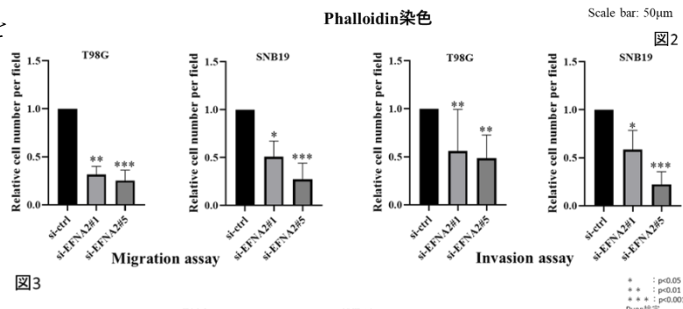
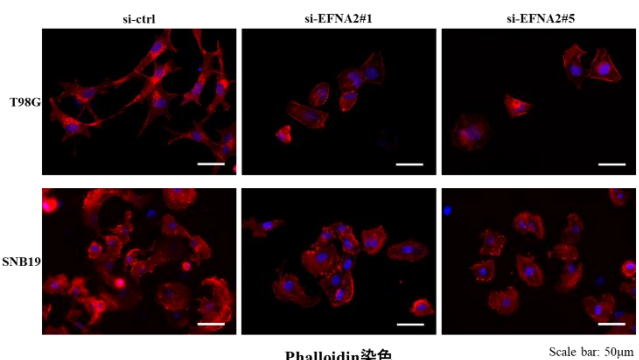


図3

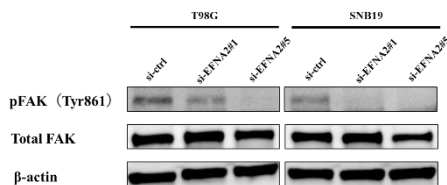


図4

③次に独自に樹立したグリオーマ幹細胞株 KGS01 に対して ephrin-A2 を shRNA によりノックダウンしグリオーマ細胞株と同様に遊走能、浸潤能が低下することを確認した (図 5)。

Ephrin-A2 を shRNA によりノックダウンしマウス脳内へ移植し OS を評価すると、ephrin-A2 ノックダウン KGS01 を脳内移植したマウスはコントロールと比較して増殖が著しく OS が有意に短かった (中央値各々 66 日、53 日、 $p=0.0012$ 図 6)。

臨床解析及び *in vivo* 実験結果から ephrin-A2 は予後良好因子であった。

一方、*in vitro* 実験では ephrin-A2 は浸潤促進分子であることが示され、*in vivo* 実験とは一見相反する結果を得た。これらの結果から ephrin-A2 は生体内においては細胞外微小環境との関係により異なる働きを示す可能性が示唆された。

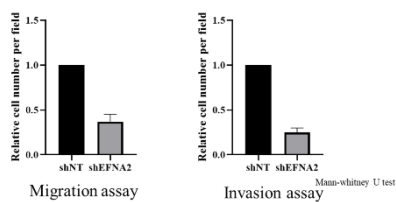


図5

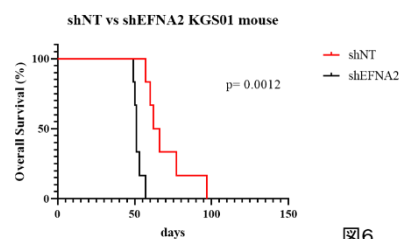


図6

引用文献: 1)Miao H et al. EphA2 promotes infiltrative invasion of glioma stem cells in vivo through cross-talk with Akt and regulates stem cell properties. *Oncogene*. 2015

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平井 希
2. 発表標題 膠芽腫患者におけるephrin-A2発現と予後との相関解析
3. 学会等名 脳神経外科学会第79回学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平井 希
2. 発表標題 Correlation between ephrin-A2 expression and prognosis in patients with glioblastoma
3. 学会等名 Society for Neuro-Oncology (SNO) Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平井 希
2. 発表標題 膠芽腫微小環境における腫瘍膜タンパクephrin-A2の機能解析
3. 学会等名 第39回脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平井 希
2. 発表標題 膠芽腫細胞の遊走と浸潤におけるephrinA2シグナルの解析
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第80回学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------