

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17928

研究課題名(和文) 髄膜腫の局在と硬膜の発生学的背景に基づいた腫瘍進展機構と間葉系幹細胞の果たす役割

研究課題名(英文) Growth patterns of meningiomas based on their locations and embryologic backgrounds of the meninges, and the role of the mesenchymal stem cells

研究代表者

棚橋 邦明 (Tanahashi, Kuniaki)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90790717

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)：頭蓋底部に発生する髄膜腫は、脳表面髄膜腫と異なりNF2遺伝子変異を起源とせず、機能的予後不良の進展様式を示すため、その機序解明が望まれる。髄膜腫遺伝子発現データを解析したところ、頭蓋底部髄膜腫において間葉系幹細胞(MSC)の未分化マーカーMeflinの発現が低い傾向が示された。MSCの癌関連線維芽細胞への分化が足場硬度と関連すること、細胞外基質硬度を高めるとNF2遺伝子変異のない髄膜腫細胞株が活性化することから、頭蓋底部髄膜腫の進展様式とMSC分化の関連が示唆された。また、細胞株樹立が困難とされる髄膜腫において、新規オルガノイド培養法による髄膜腫細胞の培養方法を確立し、複数株の培養に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭蓋底部に発生する髄膜腫は、外科的な摘出が難しいことに加え、硬膜に沿って進展し脳神経を巻き込み障害するために、組織学的に良性であっても機能的予後不良となる。頭蓋底部髄膜腫は脳表面に発生する髄膜腫に多くみられるNF2遺伝子変異とは異なる遺伝子変異が起源とされるが、その進展機序との関連は明らかにされていない。本研究により、機能的予後不良の髄膜腫進展様式の解明へ向けた第一歩となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Meningiomas on skull base regions, which do not derive from NF2 mutations in contrast to those on brain surfaces, show poor functional prognosis because they grow along the dura mater and involve the cranial nerves. The mechanism of the growth pattern should be clarified. An analysis of profiling data of meningiomas showed tendency of lower expression of Meflin, a marker protein of undifferentiation of the mesenchymal stem cells (MSCs), in skull base meningiomas. Combined with the findings that differentiation of MSCs into cancer-associated fibroblasts is associated with scaffold stiffness, and that increased extracellular matrix stiffness activates meningioma cell lines without NF2 gene mutations, relationship between skull base meningioma growth patterns and MSC differentiation was suggested. In addition, using meningioma tissues, from which it is supposed to be difficult to establish cell lines, we established a new organoid culture method and succeeded in culturing multiple strains.

研究分野：脳神経外科学関連

キーワード：髄膜腫 間葉系幹細胞 癌関連線維芽細胞 Meflin 足場硬度 細胞外基質 オルガノイド

## 1. 研究開始当初の背景

頭蓋底部に発生する髄膜腫は、その局在から外科的切除が困難であるだけでなく、硬膜を這うように発育し脳神経を巻き込む進展様式を示す(en plaque meningioma)ため、組織学的に良性であっても機能的予後は不良である(Whittle et al. The Lancet. 2004)。この発育様式をもたらす機構の詳細は、未だ解明されていない。また、このような髄膜腫の組織型は髄膜皮性髄膜腫(meningothelial meningioma)が多く、髄膜腫全体の約 60%に存在する *NF2* 遺伝子変異を持たないことが知られている。ただしその意義は明らかにされていない。網羅的次世代シーケンスによる複数の研究から、髄膜腫にはその発生母地の局在に特異的な driver 変異が存在することが報告された(Clark et al. Science. 2013, Brastianos et al. Nat Genet. 2013)。しかし上述の疑問に対する解答は示されていない。en plaque meningioma が好発する頭蓋底正中部の髄膜腫は、*NF2* 変異を起源としないと考えられ、実際 *NF2* の生殖細胞系列変異をもつ神経線維腫症 2 型(NF2)患者では、頭蓋内に髄膜腫が多発するが頭蓋底部にはほとんど発生しない(Goutagny et al. Neuro Oncol. 2012)ことも興味深い。そして *NF2* 野生型髄膜腫には、腫瘍の足場に依存する特有の進展機構が存在する可能性が考えられるものの、それを証明する研究報告はこれまでにない。

当研究室では、*NF2* 野生型髄膜腫組織において、*NF2* 遺伝子の機能である Hippo pathway の制御下で活性型 Yes-associated protein (YAP)が腫瘍組織辺縁部に局在することを確認した。さらに細胞の足場硬度とシグナル伝達の検討により、*NF2* 野生型髄膜腫細胞において硬い足場が YAP を活性化し細胞増殖を促進するメカノセンサー機構を初めて示した(Tanahashi et al. J Neuropathol Exp Neurol. 2015)。en plaque meningioma は正常 *NF2* 機能をもつことで、発育に適した足場環境を提供する硬膜に沿って進展していく可能性が示唆された。

次に、髄膜腫に局在特異的な driver 変異が存在する理由として、髄膜腫の発生母地である髄膜の由来組織に関する発生学的背景に着目した。マウスの頭蓋骨・硬膜の発生由来組織は、一様に中胚葉由来ではなく、局在により神経堤と中胚葉に分類され(Noden et al. J Anat. 2005)、ヒトにおいても同様の分布が予測されている。en plaque meningioma は頭蓋底部正中の中胚葉由来硬膜に好発するため、中胚葉由来の MSC がその進展機構に重要な役割を果たすと推測した。一方、MSC は癌関連線維芽細胞(CAF)に分化して腫瘍増殖に果たす役割が注目されている。MSC 表面マーカー(CD105/CD73/CD90)により同定された骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)がグリオーマや他の癌種での stemness 維持に寄与することが報告され、髄膜腫検体においても BM-MSC が分離培養されている(Lim et al. Int J Oncol. 2013)。また、Meflin が MSC の特異マーカーかつ未分化の指標としての役割をもつことが報告され、MSC が癌促進性 CAF へと形質転換する際に YAP を介し細胞の足場・基質の硬さを感じ取るメカノセンサー機構が示唆されている(Maeda et al. Sci Rep. 2016)。MSC が癌促進性 CAF へ分化することで、*NF2* 野生型髄膜腫の発育に適した微小環境・足場を作り出し、腫瘍進展を誘導する可能性が推測される。

## 2. 研究の目的

髄膜腫の治療法は、現状では外科的切除が主体であるが、頭蓋底部に発生する en plaque meningioma の発育進展様式は外科治療を困難とし、機能的予後不良である。そのためこの腫瘍発育進展機構の解明が望まれる。本研究の目的は、頭蓋底部髄膜腫が *NF2* 遺伝子変異を持たないことの意義を探求すること、*NF2* 野生型髄膜腫において間葉系幹細胞(MSC)が腫瘍発育進展様式に対して果たす役割を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

髄膜腫組織検体において免疫組織染色を行い、髄膜腫の組織型や発生部位別に MSC 由来細胞の局在パターンを明らかにする。髄膜腫遺伝子発現プロファイリングの公開データを用い、髄膜腫の発生部位や組織型別の Meflin および Hippo pathway 関連遺伝子発現を解析する。頭蓋底部発生の髄膜腫細胞を初代培養し、フローサイトメトリーを用い Meflin を識別マーカーとして MSC を抽出・分離培養する。髄膜腫細胞と MSC を共培養し、MSC の CAF への分化とともに Meflin や Hippo pathway 関連タンパク発現の経時変化を明らかにする。発現解析には免疫細胞染色法・ウェスタンブロッティング法・定量 PCR 法を用いる。様々な硬度のアクリルアミドゲル上で髄膜腫細胞と MSC を共培養し、Meflin や Hippo pathway 関連タンパクの発現を解析する。細胞の足場(細胞外基質)硬度のメカニカルな刺激が YAP を介して MSC から CAF への分化および髄膜腫細胞増殖に果たす役割を明らかにする。髄膜腫細胞を MSC と共培養後、胸腺欠損マウスの頭蓋内に接種し髄膜腫マウスモデルを作成する。腫瘍移植部位を脳硬膜下と頭蓋底部に分け、局在ごとに腫瘍発育様式を比較する。免疫組織染色により Meflin や Hippo pathway 関連タンパク発現パターンを解析することで、硬膜の局在・由来組織の違いが腫瘍発育進展様式に与える影響を明らかにする。

## 4. 研究成果

髄膜腫組織検体における免疫組織染色（図 1）では、MSC 由来細胞の有意な局在パターンを認めなかった。*NF2* 遺伝子変異の有無で分類すると、*NF2* 変異のない髄膜腫において MSC の未分化マーカーとされる Meflin 高発現の傾向がみられた。しかし同一検体内での染色が不均であり、組織検体の保存方法や Meflin 抗体の使用条件につき再検討の余地があると考えられた。

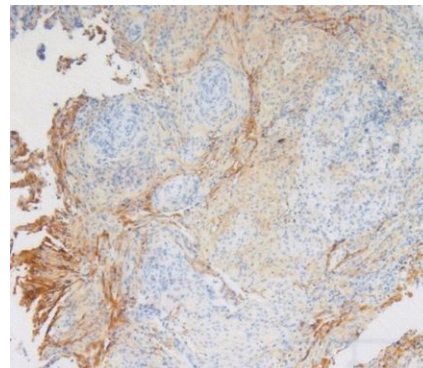


図 1. 免疫組織染色による髄膜腫組織における Meflin 発現

頭蓋底部髄膜腫は摘出難易度が高いことが多く、組織検体採取方法につき検討し、安全性の高い手法を開発した。

髄膜腫遺伝子発現プロファイリングの公開データ (Clark et al. Nat Genet. 2016) を用いて解析したところ、Meflin の発現が *NF2* 遺伝子変異のない頭蓋底部髄膜腫においてむしろ低い傾向が示された（図 2）。MSC から CAF への分化に伴い細胞外基質高度が高まることと、硬い足場環境において *NF2* 野生型髄膜腫が YAP を介して活性化することから、頭蓋底部髄膜腫において MSC の分化が腫瘍進展様式に寄与する可能性が示唆された。

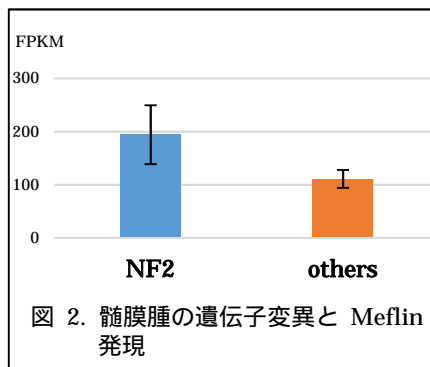


図 2. 髄膜腫の遺伝子変異と Meflin 発現

髄膜腫の初代培養を複数検体で試みたものの、安定した細胞培養や MSC の分離は困難であった。髄膜腫の培養法につき検討した結果、新規オルガノイド培養法を確立し、複数株の培養に成功した。髄膜腫オルガノイドモデルにおいて、髄膜腫組織検体の遺伝子発現や遺伝子変異が保存されることが確認された（図 3）。髄膜腫培養細胞やマウスモデルにおける今後の解析に期待される結果である。髄膜腫オルガノイドモデルにおいては、マトリゲル内での 3D 培養を行うため、従来の細胞株のようにアクリルアミドゲル上での接着培養は困難であった。細胞外基質硬度が与える影響を定量化する方法につき検討する必要がある。

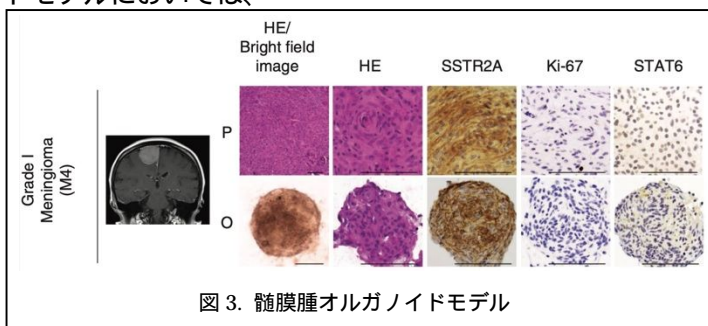


図 3. 髄膜腫オルガノイドモデル

本研究において、MSC の分化が細胞の足場環境を介して頭蓋底部髄膜腫の進展様式に関与する可能性が示唆された。オルガノイド培養法を用いたさらなる研究に期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kuniaki Tanahashi, Masaki Hirano, Lushun Chalise, Takahiko Tsugawa, Yuka Okumura, Tetsunari Hase, Fumiharu Ohka, Kazuya Motomura, Kazuhito Takeuchi, Yuichi Nagata, Norimoto Nakahara, Naozumi Hashimoto, Ryuta Saito	4. 巻 13
2. 論文標題 11C-methionine- and 18F-FDG-PET double-negative metastatic brain tumor from lung adenocarcinoma with paradoxical high 18F-FDG uptake: A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgical Neurology International	6. 最初と最後の頁 372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.25259/SNI_264_2022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuji Kibe, Kuniaki Tanahashi, Kazuhiro Ohtakara, Yuka Okumura, Fumiharu Ohka, Kazuhito Takeuchi, Yuichi Nagata, Kazuya Motomura, Sho Akahori, Akihiro Mizuno, Hiroo Sasaki, Hiroyuki Shimizu, Junya Yamaguchi, Tomohide Nishikawa, Kenji Yokota, Ryuta Saito	4. 巻 22
2. 論文標題 Direct intracranial invasion of eccrine spiradenocarcinoma of the scalp: a case report and literature review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Neurology	6. 最初と最後の頁 223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12883-022-02749-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shintaro Yamazaki, Fumiharu Ohka, Masaki Hirano, Yukihiro Shiraki, Kazuya Motomura, Kuniaki Tanahashi, Takashi Tsujiuchi, Ayako Motomura, Kosuke Aoki, Keiko Shinjo, Yoshiteru Murofushi, Yotaro Kitano, Sachi Maeda, Akira Kato, Hiroyuki Shimizu, Junya Yamaguchi, Alimu Adilijiang, Toshihiko Wakabayashi, et al.	4. 巻 23
2. 論文標題 Newly established patient-derived organoid model of intracranial meningioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuro Oncology	6. 最初と最後の頁 1936-1948
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/neuonc/noab155.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 棚橋邦明 竹内和人 永田雄一 伊藤英治 佐々木博勇 原田英幸 近藤辰磨 齋藤竜太
2. 発表標題 内視鏡併用開頭腫瘍摘出術の有用性
3. 学会等名 第34回日本頭蓋底外科学会
4. 発表年 2022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
---------	---------