

令和 6 年 9 月 5 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09133

研究課題名(和文) ミクログリアを標的としたグリオーマ/ミクログリア相関の制御による新規腫瘍抑制

研究課題名(英文) Novel tumor suppression system targeting microglia, considering glioma/microglia correlation

研究代表者

井上 浩一 (Inoue, Koichi)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80345818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトグリオーマ細胞株T98GにSGK阻害剤を投与し、細胞増殖や移動能が抑制された。ミクログリア(MG)細胞株BV-2にIL-4を投与してもMGのM2極性マーカーであるArg-1の変化は認められなかった。一方、SGK1欠損BV-2細胞にIL-4を投与するとArg-1遺伝子発現の増加傾向が認められ、IL-4依存性極性変化へのSGK1の関与が示唆された。また、T98GにIL-4を投与しても増殖変化はなかった。以上、SGK1はMGのM1様変化を促進するが、グリオーマも増殖促進する可能性があり、阻害剤はグリオーマを抑制しても、MGが関わる脳内環境ではMGによる腫瘍増殖抑制系は抑制されることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は、SGK阻害剤がヒトグリオーマ細胞の増殖と移動を抑制する可能性を示しており、新しいがん治療法の開発に寄与する学術的意義があります。上記に関しては、過去にも類似の示唆がありますが、新たに、ミクログリアの極性変化にSGK1が関与することを示唆することができたので、グリオーマなどの腫瘍だけでなく、ミクログリアが関与する他の神経疾患の治療にも応用できる可能性があります。社会的にも、生存率の低いグリオーマの新たな治療のアプローチを提供し、生存率の向上に貢献できる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：Treatment of the human glioma cell line T98G with an SGK inhibitor gsk650394 suppressed cell proliferation and migratory ability. Treatment of the microglial (MG) cell line BV-2 with IL-4 did not alter Arg-1, a marker of M2 polarity in MG. On the other hand, treatment of SGK1-deficient BV-2 cells with IL-4 showed a trend toward increased Arg-1 gene expression, suggesting the involvement of SGK1 in IL-4-dependent polarity changes. IL-4 treatment of T98G cells did not alter their proliferation. These results suggest that SGK1 promotes M1-like changes in MG, but may also promote glioma growth, and that even if inhibitors suppress gliomas, the tumor growth suppression system by MG may be inhibited in the brain environment where MG is involved.

研究分野：神経科学

キーワード：グリオーマ ミクログリア SGK1

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グリオブラストーマを含めたグリオーマは非常に予後が悪く、より良い治療薬・治療法が模索されている。脳腫瘍の近傍に集積するミクログリアは、通常中枢神経組織における障害因子や異物の除去に関わるが、グリオーマからの液性因子等によって腫瘍の増殖・悪性を促進するM2様ミクログリアに変容する。最近我々はミクログリアでのリン酸化酵素SGK1の役割を見出した。SGK1はミクログリアと近縁のマクロファージのM2様変容を促進する。また、SGK阻害によるグリオーマの増殖抑制SGK1の発現と癌の悪性度の強い相関が報告されている。これらから、脳内のような神経/グリオーマ/ミクログリアの共存下では、SGKの阻害はグリオーマ自体の増殖抑制に加え、ミクログリアのグリオーマに対する攻撃を促進し、結果として、神経障害を減弱すると着想した。

2. 研究の目的

本研究では、神経/グリオーマ/ミクログリアのSGK阻害が、相乗効果的に作用し、腫瘍の治療戦略になるか検証する。

3. 研究の方法

・細胞及び培養

ヒトのグリオーマ細胞株としてF98細胞及びT98G細胞を使用した。いずれも培養液としてDMEMに10%FBSを添加したものを使用し、細胞培養用CO₂インキュベーター内で37℃で培養した。

・MTTアッセイ

細胞を24穴プレートに 5×10^3 個/wellで播種する。翌日、示された濃度のSGK阻害剤gsk650394を投与し、48時間培養した。その後、MTT溶液を加え1時間培養し、細胞を塩酸入り2-プロパノールで破壊後、マイクロプレートリーダーを用い570nm/690nmの吸光度を測定し、対象と比較した(Inoue et al 2016 BBRC)。

・スクラッチアッセイ

細胞を24穴プレートに 5×10^3 個/wellで播種し、コンフルエントになった後、1000ulのチップの先端でプレートの底面をひっかけ細胞をはがした(Zeng et al 2015 Am J Physiol)。PBSにて洗浄、示された濃度のSGK阻害剤gsk650394を投与した。48時間培養後、写真殺円を行った。

・定量的PCR

種々の条件で培養した細胞を細胞溶解液Isogen (Nippon Gene)にて説明書に従い処理し、total RNAを取得した(Inoue et al 2016 BBRC)。そのRNAを定量し、Rivatrace (Funakoshi)を用い、cDNAを合成した。合成されたcDNAを試料とし、定量的PCRをSYBR Premix Ex Tag (Takara)、Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara)を用い、実施した。解析は $\Delta\Delta Ct$ 法を使用した。

4. 研究成果

・結果

まず、ヒト・グリオーマのSGK阻害剤に対する反応を調べるため、ヒトグリオーマ細胞株F98およびT98GにSGK阻害剤gsk650394 (gsk)を投与しMTTアッセイを行い細胞増殖に対する効果を検討した。F98ではgskのIC₅₀が約10 μMであったが、T98Gでは100 μM以上であった(図1)。また、T98G細胞において増殖に大きな影響を与えない濃度で細胞移動性が抑制された(図1)。濃

度の差はあるが、いずれのヒトのグリオーマ細胞株においてもSGKの阻害は細胞増殖や移動を抑制することが示された。

つづいて、グリオーマの増殖にミクログリアが関与している可能性を考え、SGK1の有無によるミクログリアの極性関連遺伝子を検討した。SGK1欠損株では、野生型に比べM2型のマーカーであるArg-1の発現が減少し、TNF α の遺伝子発現は上昇していた(図2)。このことから、ミクログリアのSGK1はM2への変化を促進する可能性が示唆された。

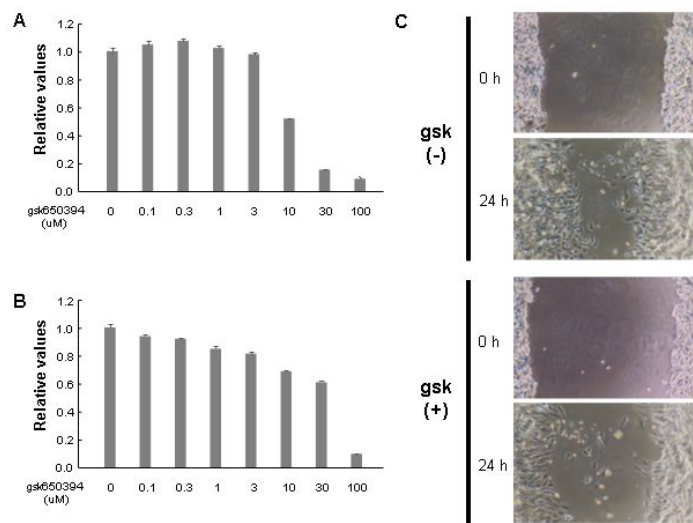


図1 (A, B) F98細胞(A)とT98G細胞(B)にSGK 素材剤 gsk650394 を加え、48 時間培養後、MTT アッセイを行った。(C)コンフルエントの T98G 細胞を引っかいた後、gsk650394(10 uM)存在下で 24 時間培養した。

グリオーマから放出されるIL-4がミクログリアのM2型への変容を促進し、グリオーマへの攻撃性が寛容になることが示唆されているが(Hambardzumyan et al 2016 Nat Neurosci)、T98GでIL-4の発現が確認できなかった(図示せず)。SGK1欠損ミクログリアでIL-4の発現レベルが減少したことから、ミクログリアのIL-4はSGK1により発現が促進される可能性がある(図3)。しかし、IL-4によるT98Gの増殖変化も認められなかったことから(図3)、Hambardzumyanらの報告には普遍性がない可能性がある。

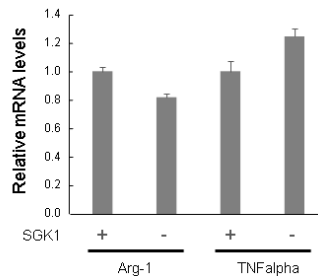


図2 野生型およびSGK1欠損型ミクログリア細胞株BV-2におけるM2型マーカーArg-1とM1型マーカーTNF α の遺伝子発現を検討した。

・考察

これらのことから、SGK1はミクログリアのM1様変化を促進するが、グリオーマの増殖も促進する可能性があり、その場合、阻害剤はグリオーマを抑制しても、ミクログリアが関わる脳内環境ではミクログリアによる腫瘍増殖抑制システムは抑制されることが考えられる。加えて、私たちは以前SGK阻害によるミクログリアの増殖抑制を報告しており(Inoue et al 2016 BBRC)、SGK阻害は臨床における治療薬に適切ではない可能性がある。

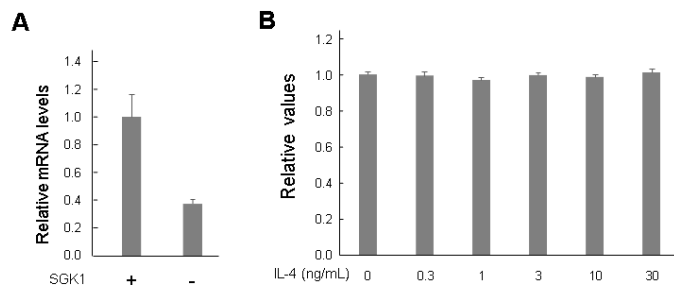


図3 (A) 野生型およびSGK1欠損型ミクログリア細胞株BV-2におけるIL-4の遺伝子発現を検討した。(B)T98G細胞にIL-4を加え48時間培養後、MTTアッセイを行った。

・参考文献

Inoue K, Sakuma E, Morimoto H, Asai H, Koide Y, Leng T, Wada I, Xiong Z-G, Ueki T. Serum- and glucocorticoid-inducible kinases in microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016; **478**:53-59

Zeng Z, Inoue K, Sun H, Leng T, Feng X, Zhu L, Xiong Z-G. TRPM7 regulates vascular endothelial cell adhesion and tube formation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2015; **308**:C308-C318

Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci.* 2016; **19**:20-27

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Okura Atsuhiko, Inoue Koichi, Sakuma Eisuke, Takase Hiroshi, Ueki Takatoshi, Mase Mitsuhiro	4. 巻 607
2. 論文標題 SGK1 in Schwann cells is a potential molecular switch involved in axonal and glial regeneration during peripheral nerve injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 158 ~ 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.03.123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inoue Koichi	4. 巻 17
2. 論文標題 Potential significance of CX3CR1 dynamics in stress resilience against neuronal disorders	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neural Regeneration Research	6. 最初と最後の頁 2153 ~ 2153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.335831	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 Yamanaka Tomoyasu, Ueki Takatoshi, Mase Mitsuhiro, Inoue Koichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Arbitrary Ca ²⁺ regulation for endothelial nitric oxide, NFAT and NF- κ B activities by an optogenetic approach	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1076116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2022.1076116	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 Inoue Koichi, Morimoto Hiroyuki, Ohgidani Masahiro, Ueki Takatoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Modulation of inflammatory responses by fractalkine signaling in microglia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0252118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0252118	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 Koketsu Shinnosuke, Matsubara Kohki, Ueki Yoshino, Shinohara Yoshiaki, Inoue Koichi, Murakami Satona, Ueki Takatoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 The defects of the hippocampal ripples and theta rhythm in depression, and the effects of physical exercise on their amelioration	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e23738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2023.e23738	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 Horii-Hayashi Noriko, Masuda Kazuya, Kato Taika, Kobayashi Kenta, Inutsuka Ayumu, Nambu Miyu F., Tanaka Kazumasa Z., Inoue Koichi, Nishi Mayumi	4. 巻 17
2. 論文標題 Entrance-sealing behavior in the home cage: a defensive response to potential threats linked to the serotonergic system and manifestation of repetitive/stereotypic behavior in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Behavioral Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1289520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnbeh.2023.1289520	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 井上浩一、山中智康、植木孝俊、間瀬光人
2. 発表標題 光遺伝学的アプローチによる血管内皮細胞のC2+制御と機能調節
3. 学会等名 第31回日本血管生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森本浩之、大蔵篤彦、佐久間英輔、高瀬弘嗣、間瀬光人、植木孝俊、井上浩一
2. 発表標題 リン酸化酵素SGKの末梢神経損傷時のシュワン細胞での役割
3. 学会等名 第129回日本解剖学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------