

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790384

研究課題名（和文）

膠芽腫の新規治療標的探索

研究課題名（英文）

Exploratory analysis for novel therapeutic targets 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）：致死的脳腫瘍である膠芽腫の新たな治療標的を探索することを目的とした。これまで IGFBP-2 と CD24 が膠芽腫の悪性形質へ関与していることを示してきたが、さらに、その機序と、そこに関わる新規機能遺伝子を探索しており、同定された遺伝子を解析している。候補遺伝子として同定された DKK1、RelA が膠芽腫およびある種の癌の悪性形質を促進していることがわかり、RelA の阻害剤で増殖を抑制できることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Glioblastoma still remains to be a fatal disease. To identify novel therapeutic targets based on molecular and cell biology regarding malignant features of glioblastoma is purpose of this study. At first, 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, among identified genes as candidates for positive regulators of IGFBP-2, DKK1 and RelA were analyzed. It is revealed that DKK1 is involved in invasiveness not only in glioblastoma, but also pancreatic adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. It is also clarified that RelA is involved in the proliferation of glioblastomas, and a RelA inhibitor can suppress the proliferation and tumorigenicity of glioblastoma cells. These genes and the related signal transductions serve as potential therapeutic targets in glioblastoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、放射線治療の進歩にもかかわらず、未だ 2 年生存率が 30%にも満たない致死的疾患であ

る。数十年にわたって予後に対して目立った改善のないこの疾患の治療の糸口をつかむためには、既知のシグナル伝達やすでに行われている治療やアプローチにとらわれない、何らかのブレークスルーが必要と考えられる。

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そうとするものである。当初、報告者は、膠芽腫で高発現している、悪性形質に関連していることが示唆されていた **insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2)** のノックダウンを行って、**IGFBP-2** と **CD24** の関連を見出しており、**IGFBP-2** および **CD24** を足がかりにして解析を進めた。

2. 研究の目的

本研究は膠芽腫の悪性形質を左右する新たな機能遺伝子およびシグナル伝達を探索し、分子機序に基づく新規治療標的を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

レトロウイルスを用いた遺伝子ノックダウンを用いて標的遺伝子を抑制した細胞を作成し、**cDNA** マイクロアレイを主として用いて、標的遺伝子の有無による発現プロファイリングの変化を比較し (**reverse genetics** 的解析)、**IGFBP-2**、**CD24** の下流で膠芽腫の悪性形質を左右している遺伝子を同定する。また、**IGFBP-2** のプロモーター領域を利用した **expression cloning** 法を主として用いて **forward genetics** 的解析を行い、**IGFBP-2** の上流でその発現を左右している因子、すなわち膠芽腫の悪性形質を左右する鍵となる因子を同定する。これらの因子およびその因子の関わるシグナル伝達为新規治療標的になり得ないか、主としてヒト膠芽腫培養細胞を用いたバイオアッセイおよび、ヌードマウスを用いた腫瘍移植モデルで、**in vitro** および **in vivo** において検討する。

4. 研究成果

IGFBP-2 ノックダウンに連動して遺伝子発現が変動した遺伝子として、**DKK1**、**RelA** をはじめとして多くの遺伝子が得られた。**CD24** ノックダウンについても、**Rab23**、**cMet** をはじめとする遺伝子が得られた。これらについては、定量的 **real-time PCR** でマイクロアレイで得られた結果が裏付けられた。**IGFBP-2** に連動して協調的に発現変動した遺伝子の一つ

であった **DKK1** について、膠芽腫と同様に浸潤性の強い癌である膵臓癌について、その発現と悪性形質への関与を解析し、報告した (雑誌論文(1))。

さらに、同じ手法を用いて、膵臓癌細胞の浸潤形質、転移に膜型プロテアーゼインヒビターである **hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1)** が関わっていることを示した。すなわち、**shRNA** 発現レトロウイルスを用いて **HAI-1** をノックダウンすると上皮間葉転換が起こり、**in vitro** および **in vivo** における浸潤能が促進すること、さらに、ヌードマウス尾静脈細胞静注による **in vivo** 転移モデルを用いて、**HAI-1** が初期転移巣形成 (**colonization**) に抑制的に働いており、**HAI-1** をノックダウンによって促進した転移巣形成能は、**HAI-1** の活性ドメインを含む組換え体を用いて抑制できることを示した (雑誌論文(2))。

また、口腔扁平上皮癌の上皮間葉転換、浸潤・転移に **HAI-1** が関わっていることを示した (雑誌論文(5))。さらに、**HAI-1** が皮膚の統合性維持に極めて重要であることを示した (雑誌論文(3))。

やはり **IGFBP-2** ノックダウンに連動して変動した遺伝子の一つであった **RelA** について、膠芽腫における発現を証明し、その特異的阻害剤である **DHMEQ** を用いると、膠芽腫細胞の増殖が抑制され、細胞周期における **G2** 停止が亢進し、アポトーシスが增加すること、ヌードマウス脳内移植モデルにおいて、**in vivo** における膠芽腫細胞の腫瘍形成能を抑制できることを明らかにし、治療薬としての可能性を示した (雑誌論文(4))。

Forward genetics 的アプローチとして、**IGFBP-2** を制御している未知の遺伝子を網羅的に探索するために、**IGFBP-2** のプロモーターとランダムアンチセンスライブラリーを用いた **expression cloning** 法を試みている。**IGFBP-2** のプロモーター領域を自殺遺伝子 (チミジンキナーゼ) の上流に配列した DNA をヒト膠芽腫細胞に導入して、ガンシクロビル投与によって細胞死が誘導されるようにした細胞の作成、アンチセンスライブラリーの構築、膠芽腫細胞へのレトロウイルス導入の条件最適化、上記で作成した細胞へのアンチセンスライブラリー導入、**expression cloning** 法による陽性細胞の選択、陽性細胞に導入されたアンチセンスとして作用したと考えられる DNA 配列のシークエンス法による同定、が終了した。現在のところ未公表であるが、約30遺伝子が新規機能遺伝子候補として得られた。これらについて、膠芽腫組織、細胞において mRNA 蛋白の発現が認められるかの解析、得られた遺伝子の発現変化が実際に **IGFBP-2** 発現に影響を与えているかどうかを

レポーターアッセイなどにより検証しているところである。得られた遺伝子の中には、その解析方法が確立し、今後 IGFBP-2 の発現への影響を確かめていく予定のもの、IGFBP-2 の発現を制御している可能性が強く示唆される結果が得られたもの、期待した結果が得られなかったもの、があるが、得られた結果を *in silico*, *in vitro* で検証している。これらの中から、IGFBP-2 との連動が強く疑われ、生物学的に意義が見出せそうな遺伝子について、さらに詳細な解析を進めて行く予定である。

今後、本研究をさらに発展させ、膠芽腫の新規治療標的を探索していく所存である。これらの解析により、既知のシグナル伝達からの考察では予想できない新規機能遺伝子が同定され、新規治療標的として新たな治療法への扉を開くことが究極の目標であるが、直接の新規治療にたどり着かなかったとしても、現在までに本研究で得られた知見を含め、解析の過程で解明される膠芽腫の生物学的特性や生体現象の分子機構から、何らかの新規治療の糸口を掴むことを目指す。

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 5 件) 全て査読有り

(1) 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) (DOI: 10.1002/ijc.24865)

(2) Fukushima T, Kawaguchi M, Yamasaki M, Tanaka H, Yorita K, Kataoka H: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 suppresses metastatic pulmonary colonization of pancreatic carcinoma cells. **Cancer Sci.** 102:407-13 (2011) (DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01808.x)

(3) Kawaguchi M, Takeda N, Hoshiko S, Yorita K, Baba T, Sawaguchi A, Nezu Y, Yoshikawa T, Fukushima T, Kataoka H. Membrane-bound serine protease inhibitor HAI-1 is required for maintenance of intestinal epithelial integrity. **Am. J. Pathol.** 179:1815-1826 (2011) (DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.06.038)

(4) Fukushima T, Kawaguchi M, Yorita K, Tanaka H, Umezawa K, Takeshima H, Kataoka H: Antitumor effect of dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), a small molecule inhibitor of nuclear factor- κ B, on glioblastoma. **Neuro. Oncol.** 14:19-28 (2012) (DOI: 10.1093/neuonc/nor168)

(5) Baba T, Kawaguchi M, Fukushima T, Sato Y, Orikawa H, Yorita K, Tanaka H, Lin C-Y, Sakoda S, Kataoka H: Loss of membrane-bound serine protease inhibitor HAI-1 induces oral squamous cell carcinoma cells invasiveness. **J. Pathol.**, in press (doi: 10.1002/path.3993)

[学会発表] (計 6 件)

(1) 福島剛、片岡寛章、山崎正稔：癌細胞における HGF activator inhibitor type 1 発現の意義：マウス転移モデルを用いた検討、第 19 回日本がん転移学会学術集会(金沢市、2010. 6. 16-17)

(2) 福島剛、横上聖貴、竹島秀雄、片岡寛章：ヒト膠芽腫細胞 (NP1) の樹立とその特徴、第 28 回日本ヒト細胞学会 (つくば市、2010. 8. 23)

(3) Tsuyoshi Fukushima, Makiko Kawaguchi, Kazuo Umezawa, Kenji Yorita, Hiroyuki Tanaka, Hiroaki Kataoka: Effects of a NF- κ B inhibitor DHMEQ on glioblastoma cells in vitro and in vivo. 第 69 回日本癌学会学術総会 (大阪市、2010. 9. 22-24)

(4) Tsuyoshi Fukushima, Makiko Kawaguchi, Kazuo Umezawa, Kenji Yorita, Yoshiko Umekita, Hiroyuki Tanaka, Hiroaki (5) Kataoka: Antitumor effect of a novel nuclear factor- κ B inhibitor, DHMEQ, in glioblastoma cells. 第 56 回日本病理学会秋期特別総会 (国際ポスターセッション) (北九州市、2010. 11. 25-26)

(5) 福島 剛, 川口 真紀子, 居川 拓史, 馬場 貴, 頼田 顕辞, 田中 弘之, 片岡 寛章: 癌転移における膜型プロテアーゼインヒビター HAI-1 の抑制的役割、第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010) (神戸市、2010. 12. 7-10)

(6) Fukushima T, Kawaguchi M, Baba T, Takeshima H, Kataoka H: Changes in expression profiles of glioblastoma cells by CD24 silencing. 第 70 回日本癌学会学術

総会（名古屋市、2011.10.3-5）

〔図書〕（計1件）

Fukushima, T. and kataoka, H.:
Insulin-Like Growth Factor Binding
Protein-2: A Possible Regulator of Invasive
Growth in Glioblastoma, Molecular
Targets of CNS Tumors, Miklos Garami
(Ed.), ISBN: 978-953-307-736-9, InTech
(2011)

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：