

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861259

研究課題名(和文)分子生物学的手法を用いた脳腫瘍発生機序の基礎的研究

研究課題名(英文)Basic research of the origin of malignant brain tumor by molecular cell biological techniques.

研究代表者

工藤 琢巳(Kudo, Takumi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90632125

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)：原発性脳腫瘍である膠芽腫において、腫瘍抑制因子として知られるRASSF3の機能解析を行った。全gliomaにおけるRASSF3の発現解析により、RASSF3は腫瘍の悪性度に応じてその発現量が変化していることを発見した。またRASSF3の発現量は患者の生存期間に寄与していることを発見した。膠芽腫の検体から培養細胞を樹立した。分子細胞生物学的手法を用いてRASSF3の機能解析を膠芽腫細胞株であるU87MG細胞で行った。RASSF3は細胞死を誘導した。RASSF3の発現抑制は細胞死誘導を阻害し、細胞増殖を促進した。これはRASSF3が腫瘍抑制因子として機能していることを示す。

研究成果の概要(英文)：we analyzed the function of one of a tumor suppressor, ras-association domain family(RASSF)3, in glioblastoma. The expression analysis of RASSF3 in glioma showed the clinical involvement of RASSF3 expression in terms of the tumor grade and overall survival as well. We established a primary cell culture, glioma stem cell, from the tumor tissue of glioblastoma which was resected in the operation. The functional analysis of RASSF3 with molecular cell biological technique showed that RASSF3 over expression resulted in apoptosis induction. RASSF3 reduction resulted in the impairment of induced apoptosis and promotion of cell proliferation. These results suggested that RASSF3 functions as a tumor suppressor in glioblastoma.

研究分野：脳神経外科

キーワード：膠芽腫 RASSF3 腫瘍抑制因子

1. 研究開始当初の背景

ポスト・ゲノム時代となり、様々な蛋白質が腫瘍抑制因子として報告されている。その中で、**Ras-association-domain-family (RASSF)1** は肺癌においてその発現が抑制されていることから注目され、現在では肺癌以外にも多種の悪性腫瘍においてその発現が抑制されており、また機能的にも i) apoptosis を誘導する、ii) 細胞周期を制御する、iii) 微小管を安定化させるなどの腫瘍抑制機能を有している事が明らかとなっている。**RASSF** 蛋白質は **RASSF1** から **RASSF10** の 10 個で構成され、他の **RASSF** も腫瘍抑制因子として機能していることが報告されている。このような背景のもと、申請者はこれまでに報告がほとんどなされていなかった **RASSF3** も、i) apoptosis を誘導し、ii) 細胞周期を G1/S 期において制御することを確認し、この機序が **p53** を発現抑制して行われていることを明らかにした。更に、iii) **RASSF3** が欠損すると遺伝子不安定性が増加し、多倍数体を形成する異常細胞が増殖することも明らかにした。**p53** は多くの悪性腫瘍においてその発現が抑制されていることが分かっており、非常に強力な腫瘍抑制因子である。このことは **RASSF3** が多種の悪性腫瘍において腫瘍抑制機能を有している可能性を示唆する。

さて、神経膠腫はテモゾロマイドの出現により生命予後は改善したものの、依然としてその結果は満足のものではない。現在いくつかの分子標的治療薬が開発されているが、現時点での治療成績を考えると、更なる治療薬の開発は喫緊の課題であり、そのためには神経膠腫発生の機序の解明が必要である。

2. 研究の目的

上記背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は **RASSF3** の神経膠腫における基礎的研究を世界に先駆けて行い、神経膠腫発生の機序を明らかにし、新しい治療薬への臨床応用に展開するための基盤となる研究を行う。研究期間内には以下のことを明らかにする。

- (1) 神経膠腫から樹立した細胞株における **RASSF3** の発現状況を、各種細胞株の悪性度と対応させ評価する。
- (2) 患者から採取した神経膠腫の検体における **RASSF3** の発現状況を、患者の予後、画像所見、病理所見と対応させ評価する。
- (3) 樹立された細胞株や検体からの初代培養に **RASSF3** を過剰発現させ、あるいは発現抑制し、apoptosis 誘導、細胞周期制御などについて評価する。

3. 研究の方法

(1) 汎用されている膠芽腫細胞株、及び患者から摘出した神経膠腫における **RASSF3** の発現状況の解析

① U87MG 細胞に siRNA 法を用いて **RASSF3** の発現を抑制した。TRIZOL、isopropanol 沈降法を用いて total RNA を抽出した。Microarray を

もちいて全遺伝子の発現プロファイルを評価した。

② The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<https://cancergenome.nih.gov/>) を用いて、Low Grade Glioma (LGG) および Glioblastoma (GBM) における **RASSF3** の発現状況を確認し、腫瘍の悪性度に応じて **RASSF3** の発現量が変化するか否かを検討した。さらに全 glioma における、**RASSF3** の発現量と生存期間の関連を、Cox hazard model、Maxstat analysis を用いて検討した。統計解析は R (<https://cran.r-project.org/>) を用いて行った。

(2) 神経膠腫から初代培養を樹立

治療目的で摘出した腫瘍を検体として保存した。摘出検体は可及的速やかに冷凍し(可能であれば手術室で液体窒素を用いて冷凍する)、deep freezer で保存した。検体を trypsin を用いて 37°C、10 分間処理を行った。PBS で 1 度 rinse し、FBS、EGF、インスリンを添加した無血清 DMEM に suspend して 37°C、5% CO2 条件下で培養した。

(3) **RASSF3** の過剰発現、及び発現抑制が及ぼす細胞の性質の変化を解析

Cloning は以前報告した通りに行った。Open Biosystem より購入した **RASSF3** ORF (BC055023) の cDNA を pCIneoMyc, pCIneoFLAG-His6 (FH), pCIneoGFP に制限酵素を用いて cloning した。**RASSF3**、**p53** を標的とした siRNA は Ambion より購入した。

Vector または siRNA の培養細胞への transfection は、lipofectamin 2000 または lipofectamin RNAiMAX を用いて、推奨プロトコルを用いて行った。

U87MG 細胞に **RASSF3** を過剰発現し、apoptosis 誘導を免疫染色およびフローサイトメトリーを用いて定量的に評価した。**RASSF3** を knockdown した U87MG 細胞に VP-16 または紫外線照射を細胞に処理、照射し、これらが誘導する細胞死における **RASSF3** の影響を同様の手法で評価する。

RASSF3、**p53** を knockdown した U87MG 細胞の細胞周期解析を 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) labeling and detection kit (Roche)、MTT dye conversion を用いて評価した

FACS 解析は以下の通り行った。細胞を trypsin を用いて回収し、PBS で 2 回 rinse した。70% の ethanol を用いて -20°C、0/N で固定した。PBS で rinse し、10mg/L の Propidium Iodide と 100mg/L の RNase を 15 分間 on ice で incubate した。FACS Calibur を用いて subG1 population を測定した。

4. 研究成果

(1) 発現プロファイル解析

① microarray

siRNA 法を用いて RASSF3 を knockdown した U87MG 細胞と control siRNA を transfection した細胞の tRNA を抽出し、外注で全遺伝子の発現プロファイルを解析した。RNA 抽出、microarray は高い quality で行うことが出来た。

② TCGA data set を download し、LGG および GBM における RASSF3 の発現状況を R を用いて解析した。GBM では有意に RASSF3 の発現量が増加していた ($p < 0.001$)。

Download した RASSF3 の発現量と全 glioma の生存期間を R を用いて解析した。Cox hazard model で RASSF3 の発現量は有意に生存期間に影響を与えていた ($p < 0.001$) (図 1)。同様に RASSF3 の発現量と生存期間について R を用いて Maxstat (<https://cran.r-project.org/web/packages/maxstat/index.html>) で解析すると、有意に RASSF3 の高発現群で生存期間が短かった ($p < 0.001$) (図 2)。

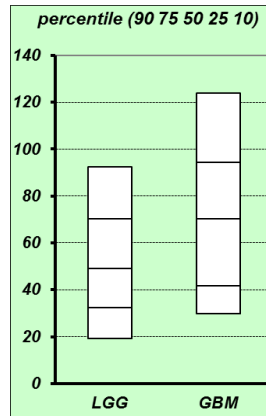


図 1

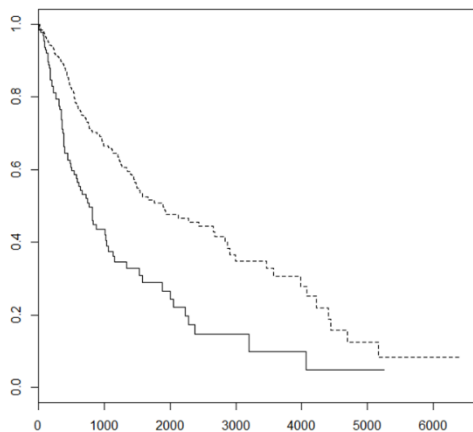


図 2

(2) 神経膠腫から初代培養を樹立

いくつかの GBM 検体を用いて、初代培養を樹立した。Glioma stem cell の樹立は問題なく行えた。さらに血清下で培養すると接着性の細胞が樹立できた。現在これらの培養細胞を細胞生物学的手法を用いて解析している。

(3) RASSF3 の過剰発現、及び発現抑制が及ぼす細胞の性質の変化を解析

① RASSF3 は細胞増殖に関与している。

GBM 細胞株である U87MG 細胞において RASSF3 を siRNA 法を用いて knockdown すると細胞増殖が促進した (図 3)。P53 を siRNA 法を用いて U87MG 細胞において knockdown すると同様に細胞増殖が促進したが、RASSF3 と p53 の double knockdown ではその上乗せ効果は認められなかった (図 4)

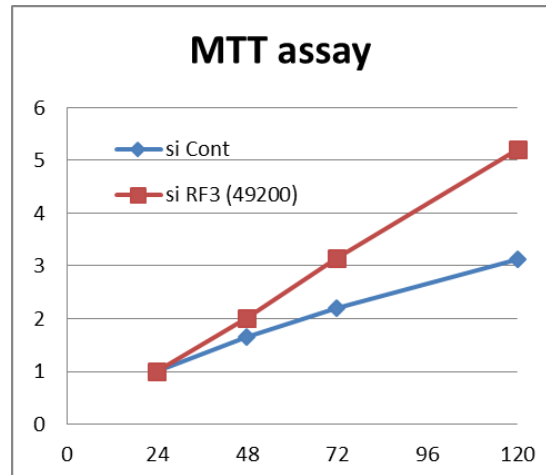


図 3

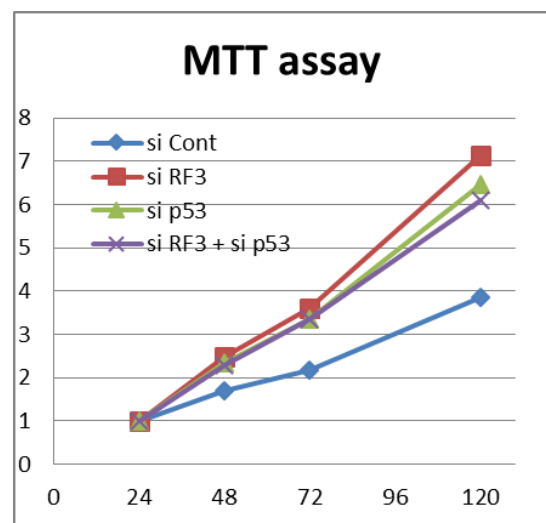


図 4

②RASSF3 は細胞死制御に関与している
EGFP-RASSF3 を U87MG 細胞に lipofectamine 2000 を用いて過剰発現し、transfection48 時間後に細胞免疫染色での nuclear condensation を呈する細胞の割合を測定すると、RASSF3 の過剰発現により細胞死が誘導された (図 5)。

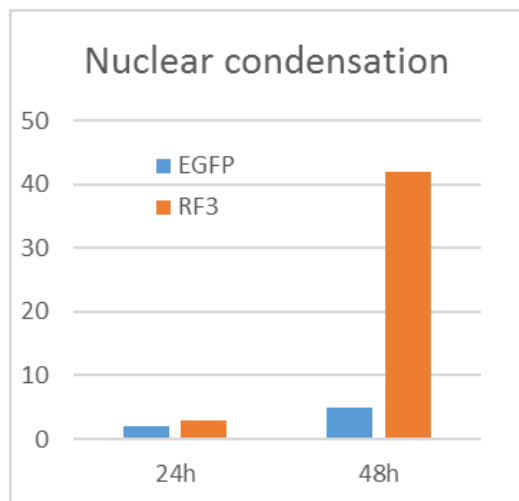


図 5

最後に、RASSF3 が細胞死に与える影響を、UV 照射が誘導する apoptosis を用いて評価した。U87MG 細胞に lipofection 法を用いて RASSF3 を標的とした siRNA を transfection し、48 時間後に 3.5 cm dish に reseeding した。その 24 時間後に UV を 20J/m²、50J/m² 照射し、その 48 時間後の細胞死を subG1 population を測定することで評価した。50J/m² の UV 照射で細胞死が誘導された。そして RASSF3 knockdown により UV が誘導する細胞死が阻害された (図 6)。

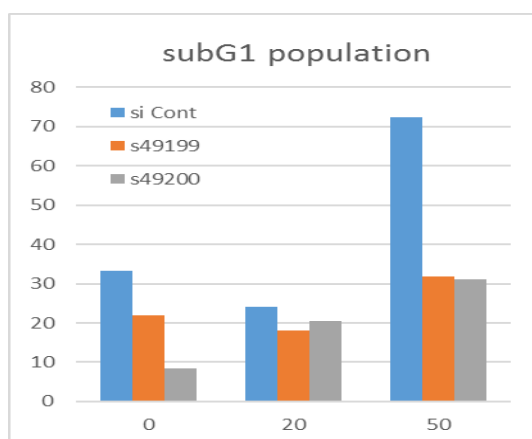


図 6

以上の結果は RASSF3 が膠芽腫においても腫瘍抑制因子として機能していることを示唆する。

今回の研究では mouse の xenograft を用いた脳腫瘍モデルを作成することはできなかったが、既に脳腫瘍の検体から glioma stem

cell を確立することが出来ており、早晩 mouse glioma model が確立できると予想している。今後 RASSF3 を恒常的に発現する U87MG 細胞や RASSF3 を恒常的に発現抑制する U87MG 細胞を generate し、mouse glioma model を用いて、RASSF3 の生理的機能解析を行う予定としている。

〈引用文献〉

- ① Ikeda M, Hirabayashi S, Fujiwara N, Mori H, Kawata A, Iida J, et al. Ras association domain family protein 6 induces apoptosis via both caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Exp Cell Res* 2007;313:1484-95.
- ② Hirabayashi S, Nakagawa K, Sumita K, Hidaka S, Kawai T, Ikeda M, et al. Threonine 74 of MOB1 is a putative key phosphorylation site by MST2 to form the scaffold to activate nuclear Dbf2-related kinase 1. *Oncogene* 2008;27:4281-92.
- ③ Ikeda M, Kawata A, Nishikawa M, Tateishi Y, Yamaguchi M, Nakagawa K, et al. Hippo pathway-dependent and -independent roles of RASSF6. *Sci Signal* 2009;2:ra59.
- ④ Kudo T, Ikeda M, Nishikawa M, Yang Z, Ohno K, Nakagawa K, et al. The RASSF3 Candidate Tumor Suppressor Induces Apoptosis and G1-S Cell-Cycle Arrest via p53. *Cancer Res.* 2012 Jun 1;72(11):2901-11.

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 琢巳 (Kudo, Takumi)
東京医科歯科大学・脳神経外科・助教
研究者番号：90632125