

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 31 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870456

研究課題名(和文) glioblastomaの新規予後因子として同定したABCG4とFLNCの機能解析

研究課題名(英文) analysis of ABCG4 and FLNC; new prognosticators of glioblastoma

研究代表者

新里 能成 (Shinsato, Yoshinari)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：00464470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、公共の大規模ながんゲノムデータベースを用い、GBMの予後に関わる新たな予後規定因子を探索し、Filamin C (FLNC)を同定し、そのGBMにおける機能解析、治療標的としての可能性の模索を行った。

実際にGBMの病理検体を用いて免疫染色を行い、FLNC高発現群は有意差を持ってFLNC低発現群より予後が悪いこと、FLNCの発現は、GBMのグレードにも相関していることを確認した。また、FLNC発現を抑制すると、GBM細胞株細胞の浸潤能を強く抑制されることも示され、FLNCを中心としたGBMの浸潤機構がGBMの治療標的となりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this research, a new prognostic factor related to the prognosis of GBM is searched by using a large public cancer genome database. Then, Filamin C (FLNC) is identified. Immunohistochemistry using GBM pathologic specimens showed that the FLNC high expression group had a significantly poor prognosis than the FLNC low expression group, and the expression of FLNC also correlated with the GBM grade. It was also shown that suppression of FLNC expression strongly suppresses the invasive ability of GBM cell line cells and the possibility that the infiltration mechanism of GBM centered on FLNC may be a therapeutic target for GBM.

研究分野：分子腫瘍

キーワード：glioblastoma 細胞浸潤 Filamin C

1. 研究開始当初の背景

GBMは、悪性脳腫瘍の中で最も頻度が高く、予後の悪い腫瘍である。現在、手術による摘出と、その後の放射線照射、TMZ投与が標準的な治療である。しかし、これらの治療を適切に行っても、5年生存割合は10%程度である。また、新たな治療薬として、分子標的薬(アバスチン)が用いられるようになってきているが、無増悪生存期間は延長するものの生存期間は延長しない。このことは、現段階の治療のみではGBMを治療することが困難であり、さらなる新しい治療を模索することが必要な状況であることを意味する。

我々は、公共の大規模ながんゲノムデータベースを用い、GBMの予後に関わる新たな予後規定因子を探索し、Filamin C (FLNC)を同定した。本研究は、FLNCのGBMにおける機能解析、治療標的としての可能性の模索、また、さらなる予後規定因子の同定を目的とした。

2. 研究の目的

FLNCは、アクチン繊維架橋タンパクであるfilamin familyのひとつである。Filamin familyには、filamin A (FLNA), filamin B (FLNB), FLNCの三種類があり、おのおのの相同性は非常に高い。また、FLNA, Bは各臓器で発現しているが、FLNCは筋のみで発現している。また、それぞれ細胞骨格の維持や細胞運動など、類似の機構に関わっている(Cell Adh Migr. 2011; 5(2))。Filamin familyと癌との関連はFLNAで多くの報告が見られる。FLNAは、足場蛋白として機能し、TRIOなどのRhoグアニチンヌクレオチド交換因子(ARHGEF)とRhoAなどのRhoファミリーと結合し、

ARHGEFによるRhoファミリーの活性化を促進することで癌細胞の浸潤能亢進に関与する。しかし、FLNCと癌の関連についてはほとんど分かっていない。興味深いことに、The Cancer Genome Atlas (TCGA)のDNAマイクロアレイデータを用いた解析では、FLNA、FLNBの発現とGBMの予後とに相関はなく、FLNCの発現のみがGBMの予後に相関していた。このことから、GBM細胞では、FLNCがFLNAのような機能を発揮し、GBM細胞の増殖や、運動能・浸潤能を亢進させ、GBMの悪性化に関与していると考えられ、本研究では、この仮説を軸に解析を行った。

3. 研究の方法

GBM細胞株を用いた *in vitro* での検討

まず、FLNCの発現を抑制するために、FLNCに対するshRNAを発現するレンチウイルスベクターを作成し、293T細胞に導入して、shRNAを発現するレンチウイルスを作成した。このウイルスを、FLNCがこう発現しているGBM細胞株U87に感染させて、FLNCに対するshRNAを導入し、FLNCノックダウン細胞を作成した。この細胞を用いて、細胞運動能、浸潤能に対するFLNC発現抑制の効果を評価した。

臨床検体を用いたFLNC発現の意義
鹿児島大学脳神経外科で手術、治療を受けたGBM患者の連続92症例の病理検体を用いて、免疫染色を行った。また、グレードとの相関を検討するため、グレードII (astrocytoma) 10例、グレードIII (anaplastic astrocytoma) 30例、の免疫染色も併せて行った。

4. 研究成果

GBM 細胞株を用いた *in vitro* での検討

FLNC の発現を抑制した U87 細胞を用いて、FLNC 発現抑制が細胞の運動能・浸潤能に与える影響を検討した結果、FLNC の発現抑制は、細胞の運動能にはほとんど影響を与えず、その浸潤能を強く抑制することが分かった(図 1,2)。

臨床検体を用いた FLNC 発現の意義

GBM92 症例の病理検体を用いて免疫染色を行い、FLNC 染色率の平均で群分けを行った。その結果、FLNC 高発現群は、有意差を持って FLNC 低発現群より予後が悪いことが示された($P=0.0324$)(図 3)。また、その発現は、GBM のグレードにも関連しており(図 4)、データベースを用いた解析を裏付ける結果となった。

以上の結果から、FLNC が GBM の悪性化に寄与していることが明らかとなり、FLNC は、GBM の治療標的となり得ることが明らかとなった。これらの結果を踏まえ、研究代表者は現在、GBM において、FLNC の発現がどのように制御されているか？(FLNC 発現制御機構の解明)、FLNC の下流で作用し、GBM の浸潤能を亢進させている分子は何か？(FLNC を軸とした GBM 浸潤機構の解明)を進めている。

図1)FLNC発現抑制はGBM細胞の運動能に影響を与えない

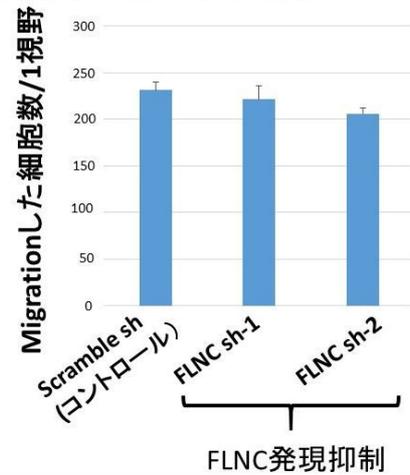


図2)FLNC発現抑制によりGBM細胞の浸潤能は顕著に低下する

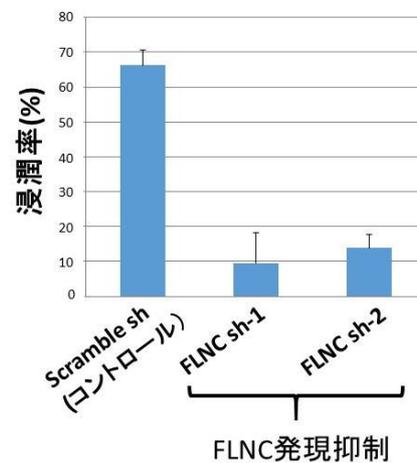
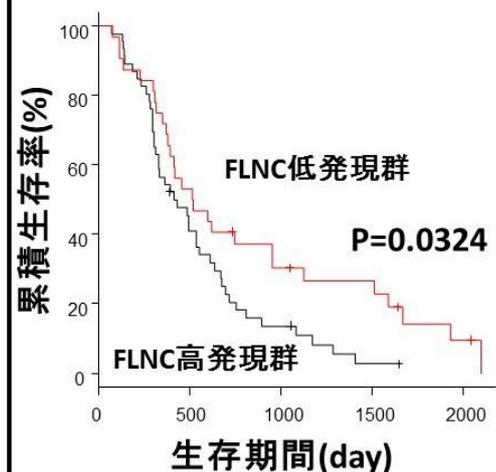
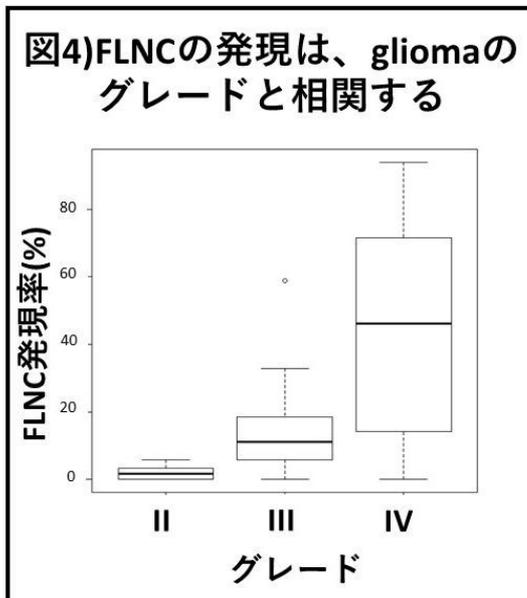


図3)FLNCの発現は、GBMの予後と相関する





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2件)

- (ア) Tanabe K, Shinsato Y(equal first), Furukawa T, Kita Y, Hatanaka K, Minami K, Kawahara K, Yamamoto M, Baba K, Mori S, Uchikado Y, Maemura K, Tanimoto A, Natsugoe S. Filamin C promotes lymphatic invasion and lymphatic metastasis and increases cell motility by regulating Rho GTPase in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017 Jan 24;8(4):6353-6363. doi: 10.18632/oncotarget.14087. 査読有
- (イ) Moinuddin FM, Shinsato Y, Komatsu M, Mitsuo R, Minami K, Yamamoto M, Kawahara K, Hirano H, Arita K, Furukawa T. ATP7B expression confers multidrug resistance through drug sequestration. *Oncotarget*. 2016 Apr 19;7(16):22779-90. doi: 10.18632/oncotarget.8059. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

河原 康一、川畑 拓斗、下川 倫子、上條 陽平、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、古川 龍彦、核小体ストレス応答による細胞分裂監視機構と抗癌剤の開発、2016年5月30日、第20回日本がん分子標的治療学会学術集会、別府国際コンベンションセンター(大分県別府市)

下川 倫子、河原 康一、川畑 拓斗、上條 陽平、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、古川 龍彦、バイオイメージング技術による細胞分裂期チェックポイントとしての核小体ストレス応答の役割の解明、2016年5月30日、第20回日本がん分子標的治療学会学術集会、別府国際コンベンションセンター(大分県別府市)

新里 能成、南 謙太郎、河原 康一、古川 龍彦、ATP7B の発現はドキシソルピシンの核から後期エンドゾームへの再局在と抗がん剤耐性に関与する、第20回分子標的治療学会学術集会、2016年5月30日、第20回日本がん分子標的治療学会学術集会、別府国際コンベンションセンター(大分県別府市)

河原康一、川畑拓斗、堀口史人、上條陽平、新里能成、南謙太郎、有馬一成、濱田季之、古川龍彦、核小体ストレス応答機構による腫瘍化進展制御と抗癌治療、2015年6月10日、第19回日本がん分子標的治療学会学術集会、松山全日空ホテル(愛媛県松山市)

河原康一、堀口史人、上條陽平、山本雅達、新里能成、南謙太郎、エフ・エム・モイヌディン、有馬一成、西尾美希、佐々木雅人、前濱朝彦、鈴木聡、古川龍彦、生体イメージング技術による核小体ストレス応答の制御基盤の

解明、2014年10月15日、第87回
日本生化学会、国立京都国際会館(京
都府京都市)

堀口史人、河原康一、上條陽平、新里
能成、南謙太郎、有馬一成、古川龍彦、
核小体ストレス応答の新規制御機構
の解明とこれを利用した抗癌治療薬
探索系の構築、2014年6月25日、第
18回日本がん分子標的治療学会、仙
台市情報・産業プラザ(AER) ホテルメ
トロポリタン仙台 TKP ガーデンシテ
ィ仙台(宮城県仙台市)

河原康一、上條陽平 堀口史人、
山本雅達、新里能成、南謙太郎、
西澤由紀彦、鈴木聡、有馬一成、
古川龍彦、p53経路を制御する核小
体ストレス応答を標的とした癌治
療薬スクリーニング系の構築、
2014年5月12日、化学療法基盤支
援活動 第3回シンポジウム、万
国津梁館オーシャンホールA(沖縄
県名護市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

新里能成 (SHINSATO, YOSHINARI)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：00464470