

令和元年6月23日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15012

研究課題名(和文)革新的プロテオミクスによる膠芽腫診断マーカーの探索

研究課題名(英文) Identification of diagnostic biomarker for glioblastoma with innovative proteomics

研究代表者

古田 拓也 (Furuta, Takuya)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：20646690

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)：革新的プロテオミクスSWATH法によるスクリーニングで抽出された膠芽腫の血中バイオマーカー候補分子6種類のうちleucine-rich alpha-2 glycoprotein 1 (LRG1)に着目した。免疫組織化学的検討では、LRG1は腫瘍細胞の細胞質に主に発現し、膠芽腫症例において有意に発現が亢進していた。一方で、LRG1高発現は膠芽腫の予後良好因子であることが判明した。LRG1は膠芽腫の診断マーカーとして有望であることが病理組織学的に示されたばかりでなく、予後予測因子としての可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は経過で治療が必要な真の再発か治療が不要な見かけ上の再発を呈することがしばしばある。真の再発を見逃せば治療介入が遅れ予後が悪化することになる。偽の再発を真の再発と誤診すれば無用の手術など侵襲の高い治療が行われる。本研究で見出した診断マーカーはいずれも新規性が高いだけでなく、真の再発を鋭敏に検知し適切な医療の実施につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Among the six biomarker candidates extracted the SWATH screening, we focused on leucine-rich alpha-2 glycoprotein 1 (LRG1). Immunohistochemical study showed that LRG1 was expressed in the cytoplasm of glioblastoma cells and its expression was significantly high in glioblastoma cases compared with other diffuse glioma cases. Interestingly, high LRG1 expression was found to be a good prognostic factor for glioblastoma. It is suggested that LRG1 is not only a promising diagnostic biomarker histopathologically but also a favorable prognostic factor in glioblastoma.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：膠芽腫 バイオマーカー プロテオミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は症候性となった時点で腫瘍細胞が遠隔部まで浸潤しており手術による全摘出は不可能である。また、初発膠芽腫に対する標準治療は存在するもの、治療反応性は症例によって様々である。今日まで再発病変の検索や治療に対する反応は一般に頭部 MRI で判断されている。しかし、2006 年以降経口アルキル化剤であるテモゾロミドが膠芽腫に対して標準治療薬として保険適応となってから、過度の治療反応性を示す pseudoprogression (偽再発) と呼ばれる腫瘍の真の再発と MRI 画像上鑑別困難な病態が頻繁に認められるようになった。この場合、治療方針が定まらず経過観察を行うが、腫瘍再発であった場合は再発病変に対する治療が遅れることとなり膠芽腫治療において臨床医を悩ませる大きな問題となっている。Pseudoprogression と治療が必要な真の再発との 2 者を的確に鑑別し時間の浪費や無用の手術を避ける必要がある。一方で、膠芽腫の初発あるいは再発を早期に捉えることは、手術による腫瘍細胞の摘出効率を最大限に高め、この根治困難な疾患を克服に導く可能性がある。これらのことから膠芽腫バイオマーカーは「根治」を実現する有用な手段のひとつとして需要が高い。

2. 研究の目的

本研究は、原発性脳腫瘍の中でも最も高頻度で悪性度の高い膠芽腫の「病勢を反映するタンパク質が髄液あるいは血液中に存在する」との仮説に基づき、その挙動を見ることによって膠芽腫の病勢把握および治療法の選択を可能とするバイオマーカーを開発することを目的とする。申請者がすでに保有し、また今後多施設から集積する膠芽腫症例の髄液・血液シーズを使用し、次世代定量プロテオミクス「データベース SWATH 法」によりバイオマーカーの候補分子を同定後、マーカーとしての妥当性を独自の標的プロテオミクスと生物学的機能解析によって検証することで、臨床現場で応用可能な膠芽腫マーカーの基礎基盤を構築する。

3. 研究の方法

膠芽腫の病勢把握に有用なバイオマーカー確立のため、治療の前後および腫瘍再発時の髄液および血液中に含有されるタンパク質プロファイルを作成する。データベース SWATH 法により各採取時点のプロファイルと比較して含有量に著明な差があるタンパク質をマーカー候補として絞り込み、コントロール症例と比較することで膠芽腫の髄液および血液マーカーをそれぞれ同定する。同定したマーカー分子の局在・機能解析を行い、マーカーとしての妥当性を評価する。

4. 研究成果

(1) SWATH スクリーニング

革新的プロテオミクス SWATH 法によるスクリーニングでは、健常人に比べて膠芽腫症例で有意に発現が上昇していた分子を 6 種類同定した (図 1)。その中で leucine-rich alpha-2 glycoprotein 1 (LRG1) に着目した。LRG1 は糖尿病網膜症や固形癌において病的な血管新生に関与する分子で、膠芽腫における生物学的機能については十分な検討がなされていない。

(2) 膠芽腫組織における検討

申請者の所属施設に集積されている膠芽腫を含む神経膠腫 160 症例に対して LRG1 の免疫組織化学を施行した。患者検体を用いる研究であり久留米大学倫理審査委員会 (生命に関する倫理委員会) の承認を得て行った (審査番号: 1363)。LRG1 は腫瘍細胞の細胞質に主に発現していた。LRG1 の免疫組織化学的な発現強度 (LRG1 score) を 4 段階 (陰性; 0、弱陽性; 1、中等度陽性; 2、強陽性; 3) に分類したところ、浸潤性神経膠腫では膠芽腫症例において LRG1 score は 1-3 が有意に多く、LRG1 発現は膠芽腫特異的であることが認められた。(図 2)。次に

LRG1 score 0-1 を低発現群、2-3 を高発現群と規定し、両群の全生存期間を Kaplan-Meier 法で解析したところ、LRG1 高発現群は膠芽腫の予後良好因子であることが判明した (図 3)。LRG1 発現と腫瘍細胞の増殖能の目安となる MIB-1 標識率は統計学的に有意な逆相関を示したことから、LRG1 が腫瘍増殖を抑制する可能性が示唆された。他の分子として p53 変異、TERT プロモーター変異をそれぞれ免疫組織化学、Sanger sequence で解析を行ったところ、LRG1 との有意な相関は認められなかった。臨床的パラメーターとして治療前の全身状態、年齢、腫瘍体積、MGM プロ

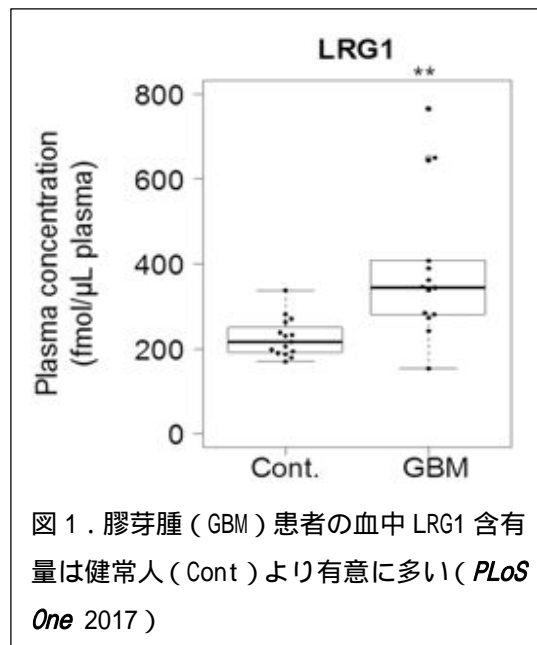
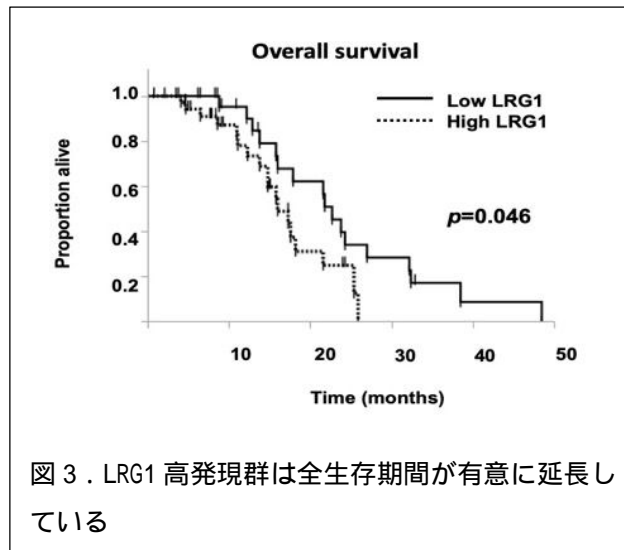
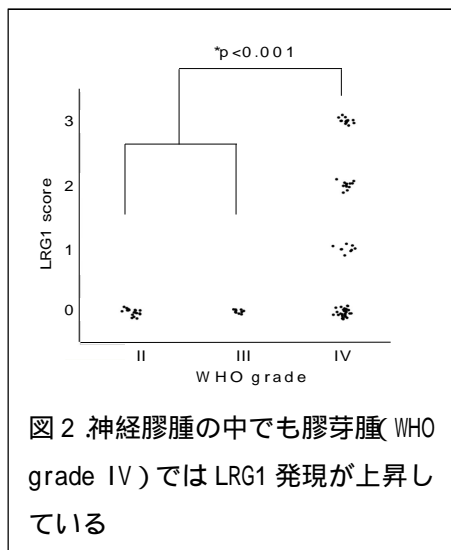


図 1. 膠芽腫 (GBM) 患者の血中 LRG1 含有量は健常人 (Cont) より有意に多い (PLoS One 2017)

モーターのメチル化有無との関連も認められなかった。以上より LRG1 は膠芽腫の診断マーカーとして有望であることが病理組織学的に示されたばかりでなく、予後予測因子としての可能性が示唆された。



(3) 検討課題

LRG1 は膠芽腫の診断マーカーとして有望であることが病理組織学的に示されたばかりでなく、予後予測因子としての可能性が示唆された。ただし、LRG1 発現と一般的な膠芽腫の予後因子との関連がなく、LRG1 が予後良好因子である理由についてはさらなる検討が必要であると考えられた。具体的には膠芽腫細胞株を用いた基礎実験で、LRG1 発現のノックダウンあるいは LRG1 タンパクの培養液への添加による細胞増殖および浸潤能の変化を捉え、関連するシグナル分子を特定する必要がある。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Jiapaer S, Furuta T, Tanaka S, Kitabayashi T, Nakada M. Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2018 Oct 15;58(10):405-421. doi: 10.2176/nmc.ra.2018-0141.

Furuta T, Miyoshi H, Komaki S, Arakawa F, Morioka M, Ohshima K, Nakada M, Sugita Y. Clinicopathological and genetic association between epithelioid glioblastoma and pleomorphic xanthoastrocytoma. *Neuropathology*. 2018 Jun;38(3):218-227. doi: 10.1111/neup.12459.

Miyauchi E, Furuta T, Ohtsuki S, Tachikawa M, Uchida Y, Sabit H, Obuchi W, Baba T, Watanabe M, Terasaki T, Nakada M. Identification of blood biomarkers in glioblastoma by SWATH mass spectrometry and quantitative targeted absolute proteomics. *PLoS One*. 2018 Mar 7;13(3):e0193799. doi:10.1371/journal.pone.0193799.

Dong Y, Furuta T, Sabit H, Kitabayashi T, Jiapaer S, Kobayashi M, Ino Y, Todo T, Teng L, Hirao A, Zhao SG, Nakada M. Identification of antipsychotic drug fluspirilene as a potential anti-glioma stem cell drug. *Oncotarget*. 2017 Dec 4;8(67):111728-111741. doi: 10.18632/oncotarget.22904.

Furuta T, Sabit H, Dong Y, Miyashita K, Kinoshita M, Uchiyama N, Hayashi Y, Hayashi Y, Minamoto T, Nakada M. Biological basis and clinical study of glycogen synthase kinase- 3 -targeted therapy by drug repositioning for glioblastoma. *Oncotarget*. 2017 Apr 4;8(14):22811-22824. doi: 10.18632/oncotarget.15206.

〔学会発表〕(計2件)

古田拓也. SWATH プロテオミクスによる膠芽腫バイオマーカー探索. 第76回日本脳神経外科学会学術総会. 2017年10月12-14日、名古屋

古田拓也. 悪性神経膠腫における leucine -2 glycoprotein 1 の臨床病理学的役割. 第36回日本脳腫瘍病理学会、9月25-27日、東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：中田 光俊、 大槻 純男、 小牧 哲

ローマ字氏名：(NAKADA, Mitsutoshi)(OTSUKI, Sumio)(KOMAKI, Satoru)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。