

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18385

研究課題名(和文)びまん性神経周囲浸潤をきたす新規マウスグリオーマモデルを用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a new treatment via the new mouse glioma model which shows perineural invasion.

研究代表者

宮居 雅文(Miyai, Masafumi)

岐阜大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：60613502

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)：ヒストンH3K27M変異をマウスグリア細胞へ遺伝子導入し確立したマウスH3K27M変異導入グリア細胞(IG27細胞)をマウス脳へ移植し、神経周囲浸潤を伴うびまん性グリオーマモデルの作成に成功した。網羅的遺伝子解析で、IG27細胞は野生型細胞と比較してグルコーストランスポーター1(Glut1)の上昇を認めた。Glut1ノックダウンIG27細胞をマウス脳に移植した結果、通常IG27細胞と比較し、生着腫瘍細胞数が有意に減少し、グリオーマの神経周囲浸潤の頻度が有意に減少した。さらにGlut1発現過剰野生型細胞で神経周囲浸潤の再現を認めた。これによりGlut1が神経周囲浸潤を制御していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリオーマのびまん性浸潤は外科的根治術を不可能にしている最大の原因である。びまん性浸潤の中でも神経周囲浸潤に対する有効な治療は現時点ではない。我々が樹立したびまん性グリオーマモデルは、遺伝子異常に基づき、かつ病理組織学的特徴を再現したモデルである。本研究により、Glut1が神経周囲浸潤に関与していることが示され、Glut1阻害薬がグリオーマの神経周囲浸潤に対する治療となりうる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We established a mouse glioma cell line (IG27) by manipulating the histone H3K27M mutation, frequently harboring in diffuse intrinsic pontine gliomas, that reproduced the diffusion invasion phenotype, PS and PVS, following intracranial transplantation in the mouse brain.

Increased H3K27 acetylation in IG27 cells activated glucose transporter 1 (Glut1) expression. Gain- and loss-of-function in vivo experiments demonstrated that Glut1 controls the PS of glioma cells, i. e., attachment to and contact with neurons. GLUT1 is also associated with early progression in glioma patients.

Targeting the transporter Glut1 suppresses the unique phenotype, "diffuse invasion" in the diffuse glioma mouse model.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：神経周囲浸潤 ヒストンH3K27M変異 マウスグリオーマモデル

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫(グリオーマ)は腫瘍周囲の正常組織内へ浸潤する特徴(びまん性浸潤)を示すことが多く、画像での描出が困難で、外科手術で切除しきれないことが予後不良の原因となっている。この浸潤の特徴は、約80年前に病理学者シェラーによって提唱され、「シェラーの二次構造」として有名である。しかし、この構造の一つである神経周囲浸潤(perineuronal satellitosis: PS)についての機能的なメカニズムはほとんど不明である。それは、PSを組織形態学的に再現することが未だ困難なことが一因である。

2. 研究の目的

グリオーマのびまん性浸潤に対する治療を開発するために、びまん性浸潤メカニズムの解明が必要となる。本研究では、PSを伴うびまん性浸潤を再現するマウスモデルを作製し、PSのメカニズムを明らかとし、びまん性浸潤に対する新規治療ターゲットとなりうる遺伝子変異を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

びまん性浸潤を特徴とする小児びまん性グリオーマにおいて頻出の histone H3K27M 変異を、マウスグリア細胞へ遺伝子導入した。確立できたマウス H3K27M グリア細胞(IG27 細胞)をマウス頭蓋内へ移植し、IG27 グリオーマモデルを作製した。増殖した腫瘍を免疫組織化学を用いて、病理組織学的にびまん性浸潤および神経周囲浸潤の再現性を確認した。In vitro 実験で、IG27 細胞と野生型細胞(H3K27M 変異なし)の網羅的遺伝子解析を行った。見いだされた解糖系代謝異常、関連遺伝子異常について、過剰発現細胞、遺伝子抑制細胞、阻害剤実験を IG27 グリオーマモデルで行った。

4. 研究成果

IG27 細胞の免疫不全マウスへの生着率は46例中46例(100%)であり、全例でPSの再現を確認できた。(図1、図2)

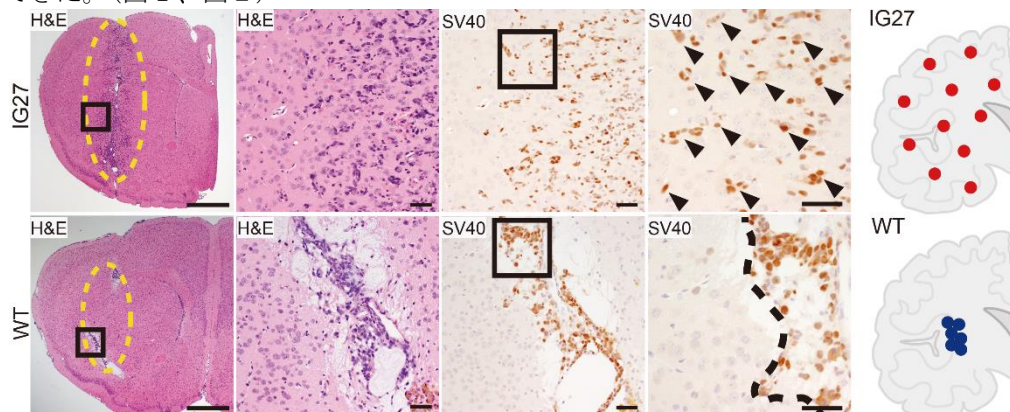


図1 : マウス脳に移植した IG27 細胞と WT 細胞の病理標本

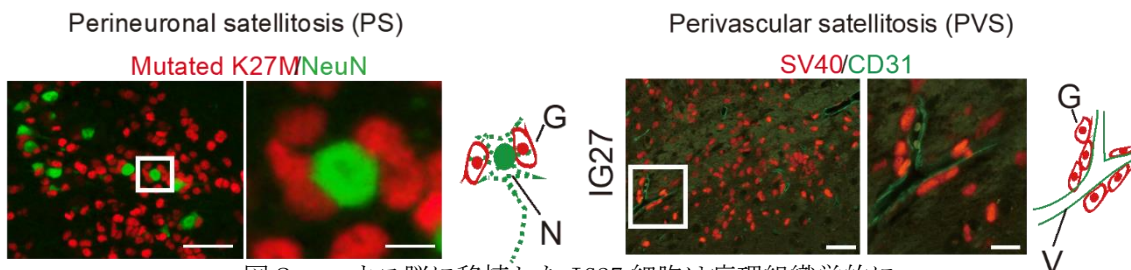


図2 : マウス脳に移植した IG27 細胞は病理組織学的にびまん性浸潤および神経周囲浸潤を再現した。

IG27 細胞の PS の原因となる遺伝子変動を特定するため、マイクロアレイで網羅的遺伝子解析を行った。IG27 細胞では野生型細胞と比較して解糖系代謝に関わる遺伝子群の上昇を認めた。(図3)

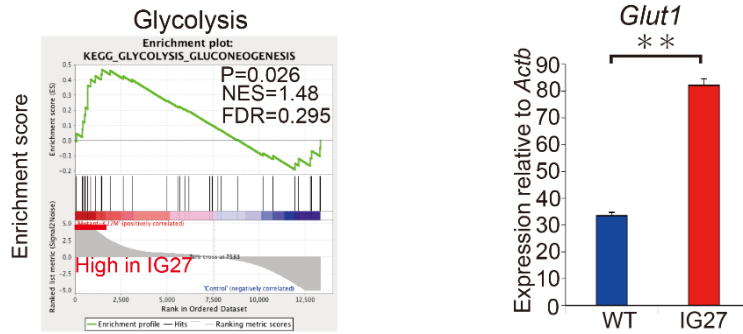


図3：(左) マイクロアレイの結果解糖系代謝に関わる遺伝子群の上昇を認めた。  
 : (右) real time-RT PCRでIG27における *Glut1* の上昇を示した。

解糖系制御遺伝子群の中で、グルコーストランスポーター1 (*Glut1*) の上昇に注目し、shRNAを用いたノックダウンIG27細胞、発現プラスミドを用いた発現過剰野生型細胞を作製し、マウス脳に移植した。その結果、*Glut1* 抑制IG27細胞は通常IG27細胞と比較し、生着腫瘍細胞数が有意に減少し ( $p < 0.01$ )、PSの頻度が有意に減少した ( $p < 0.01$ )。さらに、*Glut1* 発現過剰野生型細胞でPSの再現性を認めた。(図4、図5)

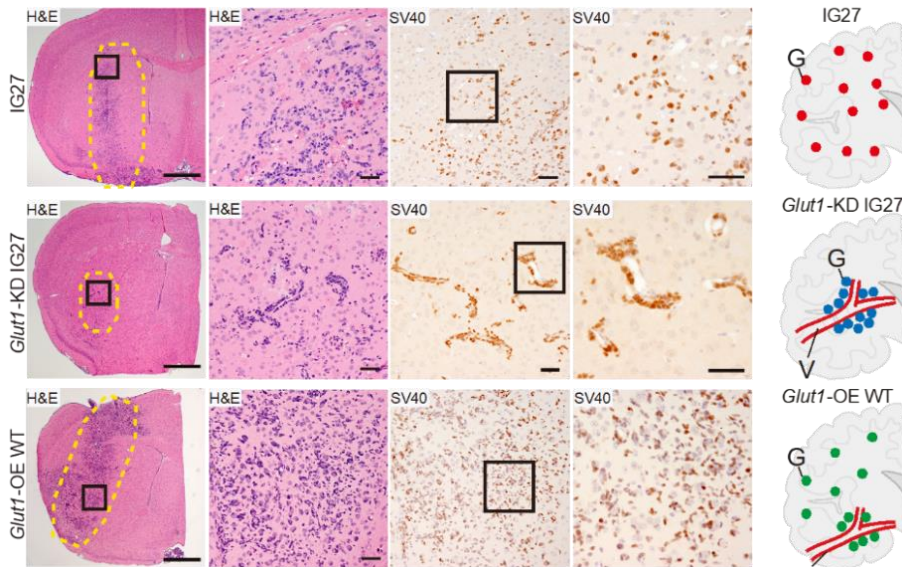


図4：マウス脳に移植したIG27細胞・*Glut1*抑制IG27細胞 (*Glut1*-KD IG27) ・*Glut1*発現過剰野生型細胞 (*Glut1*-OE WT) の病理標本

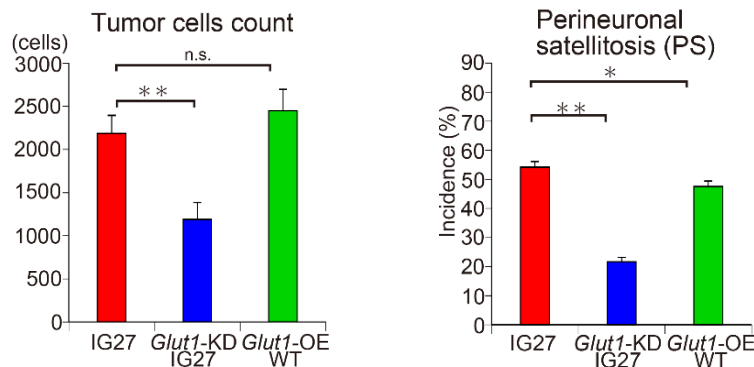


図5：病理標本の解析による (左) 生着腫瘍細胞数・(右) 神経周囲浸潤の頻度の評価

続いて Glut1 阻害薬 (BAY-876) の投与実験を行った。IG27 細胞移植 2 週間後より 14 日間毎日 Glut1 阻害薬を腹腔内投与し、移植 30 日後にマウス脳組織を摘出した。阻害薬投与群で、標本 1 スライス当たりの腫瘍細胞の数、腫瘍面積、PS の頻度が有意に減少した ( $p < 0.01$ )。

(図 6、図 7)

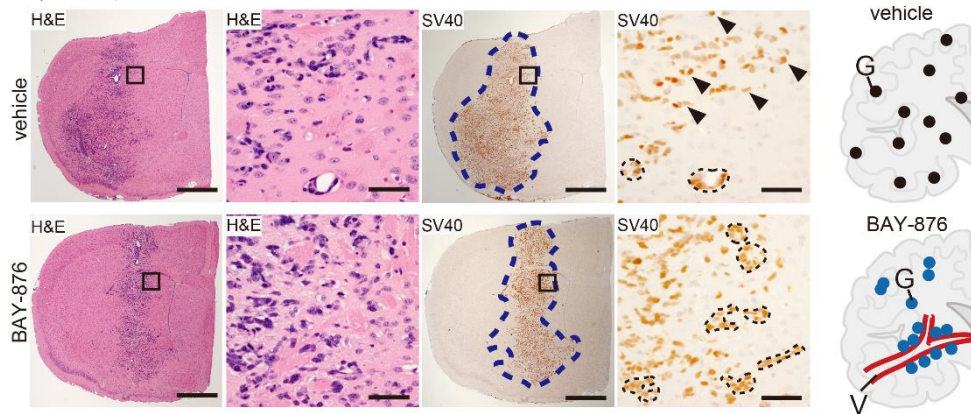


図 6 : マウス脳に IG27 細胞移植後薬剤投与実験を行った病理標本

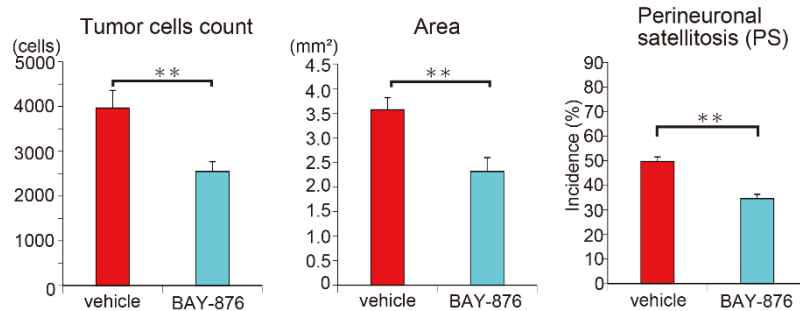
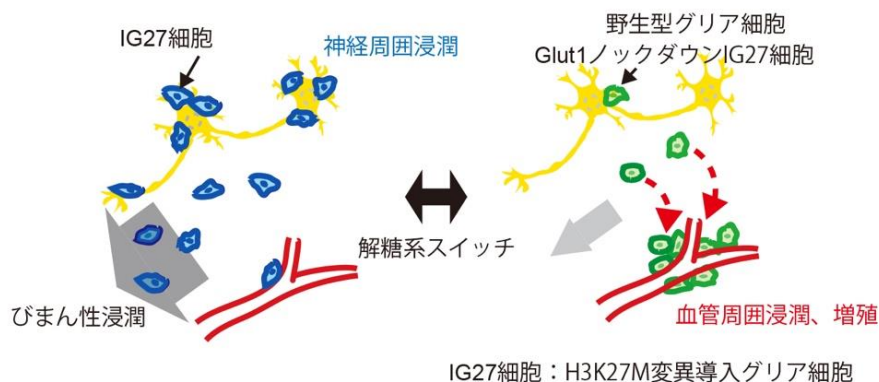


図 7 : 病理標本の解析による (左) 生着腫瘍細胞数・(中) 腫瘍面積・(右) 神経周囲浸潤の頻度の評価

本研究で樹立したびまん性浸潤グリオーマモデルの解析結果から、ヒト小児で見られる histone H3K27M 変異びまん性グリオーマは、周囲環境に依存せず histone H3K27M 変異の獲得により、グリア細胞が解糖系優位の代謝変化を起こし、周囲の神経細胞間にびまん性に広がっていくメカニズムを有する可能性が示唆された。このようにグリオーマの予後不良の原因となる神経周囲浸潤のメカニズムの一端が解明され、新たな治療法の可能性が示されたことは有意義である。(図 8)



IG27細胞：H3K27M変異導入グリア細胞

図 8 : グルコーストランスポーターGlut1による解糖系スイッチによって制御される神経周囲浸潤とびまん性浸潤 (模式図)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyai M, Kanayama T, Hyodo F, Kinoshita T, Ishihara T, Okada H, Suzuki H, Takashima S, Wu Z, Hatano Y, Egashira Y, Enomoto Y, Nakayama N, Soeda A, Yano H, Hirata A, Niwa M, Sugie S, Mori, T, Maekawa Y, Iwama T, Matsuo M, Hara A, Tomita H	4. 巻 3
2. 論文標題 Glucose transporter Glut1 controls diffuse invasion phenotype with perineuronal satellitosis in diffuse glioma microenvironment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology Advances	6. 最初と最後の頁 vdaa150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/oaajnl/vdaa150	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮居雅文, 富田弘之, 金山知弘, 中山則之, 大江直行, 矢野大仁, 原 明, 岩間 亨
2. 発表標題 びまん性浸潤を特徴とする新規マウスグリオーマ前臨床モデルを用いた腫瘍微小環境の検証
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮居雅文, 富田弘之, 金山知弘, 山田哲也, 江頭裕介, 榎本由貴子, 中山則之, 大江直行, 矢野大仁, 原 明, 岩間 亨
2. 発表標題 新規マウスグリオーマモデルを用いた、グリオーマの神経周囲浸潤における腫瘍と神経細胞の相互関係についての検証
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮居雅文, 山田哲也, 中山則之, 大江直行, 矢野大仁, 岩間 亨
2. 発表標題 マウスグリオーマモデルによる神経周囲浸潤でのBDNFとMMPの関与についての検証
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮居雅文, 金山知弘, 富田弘之, 中山則之, 林 克彦, 矢野大仁, 原 明, 岩間 亨
2. 発表標題 H3K27M mutationによる腫瘍細胞内代謝の変化がグリオーマのびまん性浸潤を促進する
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮居雅文, 金山知弘, 富田弘之, 山田哲也, 田口幸太郎, 林 克彦, 原 明, 岩間 亨
2. 発表標題 びまん性神経周囲浸潤を呈するマウスグリオーマモデルの網羅的遺伝子解析と治療標的遺伝子
3. 学会等名 第79回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岐阜大学医学部脳神経外科 <a href="http://www.med.gifu-u.ac.jp/neurosurgery/">http://www.med.gifu-u.ac.jp/neurosurgery/</a>  Glut1は、脳グリオーマ微小環境において神経周囲浸潤をともなったびまん性浸潤を制御する <a href="https://www.amed.go.jp/news/seika/kenkyu/20201201.html">https://www.amed.go.jp/news/seika/kenkyu/20201201.html</a>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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
---------	---------