

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 4 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462178

研究課題名(和文) グリオーマにおける上皮間葉転換の機序解明とマイクロRNAによる制御

研究課題名(英文) Expression of ZEBs in gliomas is associated with invasive properties and histopathological grade

研究代表者

川瀧 智之 (KAWATAKI, Tomoyuki)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：20303406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：グリオーマは、予後不良な疾患であり、その高い浸潤性が治療上の問題である。我々は、同一細胞が、上皮系から間葉系に形態及び機能が変化する現象である上皮間葉転換に着目した。この中で、ZEB1/ZEB2が、グリオーマにおける浸潤に関与しているという仮説に基づき、その関連性を検討した。その結果、グリオーマ細胞において、ZEB1/2が高発現し、浸潤能に相乗的に関与とヒトグリオーマ組織検体におけるZEB1/2の発現と病理学的悪性度との相関を明らかにした。上皮間葉転換の転写因子であるZEB1/2が、悪性グリオーマの治療上の重要な標的になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The invasiveness of glioma cells is the predominant clinical problem associated with this tumor type, and is well correlated with pathological malignant grade. In this study, we examined the expression of ZEB1 and ZEB2 with the goal of determining the role of ZEBs in glioma. ZEB1 and ZEB2 were highly expressed in all glioma cells used in this study. Double knockdown of both ZEB1 and ZEB2 suppressed tumor invasiveness more effectively than knockdown of either alone, in both in vitro and in vivo experiments. ZEB1 and ZEB2 were marginally expressed in grade II, but expressed at higher levels in grade IV. Levels of ZEB1 and ZEB2 are positively correlated with histopathological grade and invasiveness of glioma, suggesting that E2F1 family proteins (ZEB1 and ZEB2) would be useful as prognostic markers and therapeutic targets for glioma patients.

研究分野：脳神経外科

キーワード：悪性グリオーマ 浸潤 上皮間葉転換 ZEB1/2

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の悪化促進機構のひとつとして近年、上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition, EMT) が注目されている。上皮間葉転換は、上皮細胞がより運動性の高い間葉系細胞に変化する現象で、胚形成や創傷治癒に関し提唱された概念であり近年、EMT 誘導転写因子と制御ネットワークが明らかになりつつある¹。一方、EMT が各種の癌細胞における接着、浸潤に加えて化学療法抵抗性や腫瘍幹細胞性維持との関連性が報告され、悪性腫瘍の予後や治療戦略を考える上で極めて重要である。しかし、グリオーマの浸潤や進展への関与について十分に解明されていない。本研究の目的は、グリオーマにおける EMT の機序と治療抵抗性への関与について解明することである。

2. 研究の目的

悪性グリオーマは、現在行われている最新の集学的治療でも再発は不可避であり、生存期間の大幅な改善はなく、予後不良の疾患である。治療抵抗性の原因の一つは、グリオーマの高い浸潤性であり、MRI 造影領域の周辺部位にも、組織的に細胞浸潤が観察される。悪性グリオーマの高い浸潤能については、細胞外環境としての間葉系蛋白や蛋白分解酵素の発現についての検討が詳細に加えられている。我々は、ラミニンなどの間葉系蛋白のグリオーマにおける発現と浸潤能との関連について報告してきた²。また、細胞表面のレセプターであるインテグリンがグリオーマで強発現しており、マウスモデルにおいてインテグリン中和抗体により、著明に浸潤能が抑制されることを報告した²。これまで細胞浸潤と様々な間葉系蛋白との関連について数多くの報告がなされており、グリオーマが自ら間葉系蛋白を産生し、浸潤に有利な微小環境を構築するという考え方は興味深い。そこで、我々は、初期発生や創傷治癒な

どにおいて上皮細胞が間葉系細胞へ形質変化する現象である上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)¹に注目し、グリオーマの浸潤能の機序解明のため分子生物学的にアプローチする着想に至った。

EMT を誘導するシグナルについては、上皮細胞株である NMuMG 細胞で検討されている。TGF- β 等によるサイトカインの刺激により Snail ファミリー (Snail/Slug) や EMT 1 ファミリー (ZEB1, ZEB2/SIP1) 等の細胞内転写調節因子が活性化すると細胞間接着をなす E-cadherin の転写レベルが抑制され、vimentin や N-cadherin などの間葉系蛋白の産生が亢進する。その結果、細胞間接着能が喪失し、細胞浸潤が生じやすい微小環境が構築され、高い細胞浸潤能が獲得される。EMT を誘導する因子としては、fibroblast growth factor, epidermal growth factor, Wnt シグナル、Hedgehog シグナルなどの関与が報告されている。最近になり、悪性腫瘍細胞において EMT と細胞浸潤や転移との関連性が指摘された³。肺癌、乳癌及び消化器癌で、E-cadherin が抑制状態にあり、浸潤能が上昇し EMT が誘導されている。また、細胞浸潤のみならずアポトーシスの抑制や腫瘍幹細胞性維持の関与も指摘されている。悪性腫瘍では、上記の制御バランスの不均衡が生じていると考えられている。

グリオーマにおいても、2013 年になり、重要な知見が報告された。EMT の転写因子の一つである ZEB-1 の免疫染色グリオーマ症例で検討され、WHO grade との相関や MGMT の発現との相関が示された⁴。

また、SNAIL1 の調節因子である Frizzled 4 は、グリオーマ幹細胞での発現が高く、これをノックダウンすると sphere 形成能と浸潤能が低下した⁵。

これらの報告から、グリオーマにおける EMT は、細胞浸潤の中心的な役割を果たすだ

けではなく、幹細胞性維持や化学療法抵抗性などにも関与していることが示唆される。しかしながら、現時点では、EMT がグリオーマの進展に対してどの程度関与しているかについては、定説がなく、詳細な検討が必要である。

本研究の目的は、in vitro と in vivo 実験により グリオーマの EMT の機序と腫瘍浸潤能への関与を解明することである。

3. 研究の方法

標的とする EMT 関連転写因子は、ZEB1/2 とした。マウスグリオーマ細胞 GL261 を使用して EMT 関連転写因子をノックダウンして、浸潤能や増殖能に与える影響を検討した。増殖能としては、MMT assay により、増殖能を比較して siRNA による ZEB1/2 ノックダウンを行いその影響をコントロール細胞と検討した。また、浸潤能は、transmigration assay (TMA) により、8 μm ポアサイズのポリカルボネートフィルターの上に細胞を浮遊させて、膜の下側に移動した細胞の数をカウントした。さらに、この細胞を用いて、マウスの皮下および脳内に細胞を移植して生存に与える影響を検討した。手術摘出されたヒトグリオーマ組織における標的蛋白の発現と組織学的悪性度との相関を検討した。

4. 研究成果

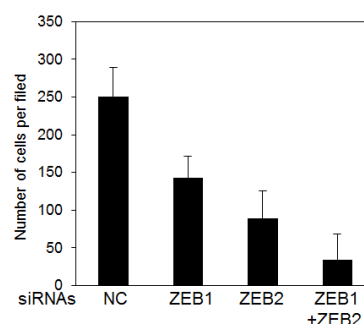
(1) マウスグリオーマ細胞への ZEB ノックダウンによる増殖能と浸潤能に与える影響

マウスの GL261 細胞に、siRNA を用いて ZEB1、ZEB2、ZEB1+2、それぞれのノックダウン効果を検討した。(図 1) これらとコントロール細胞を用いて浸潤性と増殖能を検討した。

増殖能には有意差がみられなかった。

(図 1)

(図 1)



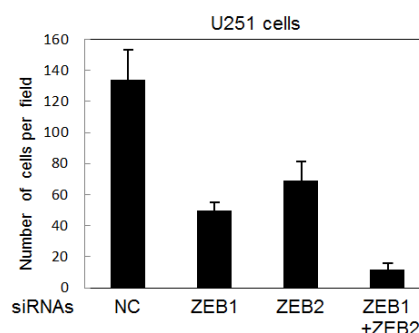
TMA による浸潤能は、有意に ZEB1, 2 の単独による浸潤能の低下かつ、両者のノックダウンにより浸潤能が相乗的に減少した(図 1)。

(2) ヒトグリオーマ細胞への ZEB ノックダウンによる増殖能と浸潤能に与える影響

ヒトグリオーマ細胞株 U251 に、siRNA を用いて ZEB1、ZEB2、ZEB1+2、それぞれのノックダウン効果を検討した。これらとコントロール細胞を用いて浸潤性や増殖能を検討した。

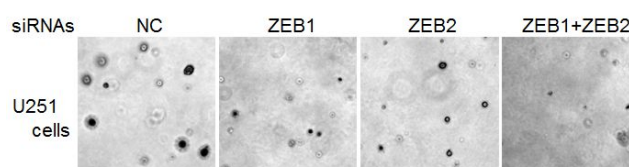
増殖能にはいずれも差がみられなかったが、浸潤能はコントロールに比し ZEB1/2 をノックダウンすると有意に減少した。(図 2-1)。

(図 2-1)



また、ZEB1/2 ノックダウンにより紡錘構造をもつ間葉系細胞から上皮様の形態に変化した。(図 2-2)。

(図 2-2)

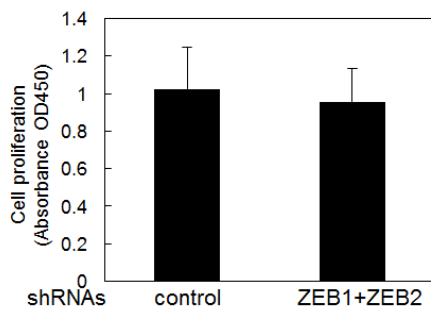


(3) ヒトグリオーマ細胞への ZEB shRNA 導入による抗腫瘍効果

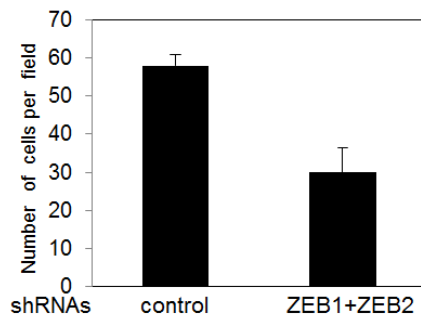
レンチウイルスを用いて、shRNA をヒトの U87 細胞に導入し、ZEB1/2 のノックダウン細胞を製作した。この細胞とコントロール細胞を用いて浸潤性や増殖能を検討した。

増殖能にはいずれも差がみられなかった(図 3-1)が、浸潤能は ZEB1/2 ノックダウン細胞では、抑制された(図 3-2)。

(図 3-1)



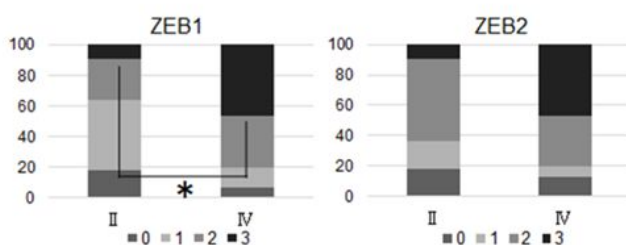
(図 3-2)



(4) ヒトグリオーマ手術検体における ZEB の発現

山梨大学医学部附属病院脳神経外科で手術を行ったグリオーマ患者の手術検体を染色し、ZEB1、ZEB2 の発現を検討した。発現なし(0)~強発現(3)の 0、1、2、3 でスコアリングをした。グレード のグリオーマではグレード のグリオーマに比べ、ZEB1、ZEB2 が高発現していた(図 4)。

(図 4)



<引用文献>

1. De Craene B, et al: Nat Rev Cancer 13:97-110, 2013
2. Kawataki T, et al: Exp Cell Res 313:3819-3831, 2007
3. Rhim AD, et al: Cell 148:349-361, 2012
4. Siebzehnrubl FA, et al: EMBO Mol Med 5:1196-1212, 2013
5. Jin X, et al: Cancer Res 71:3066-3075, 2011

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)

[学会発表](計 1件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

川瀧 智之 (KAWATAKI, Tomoyuki)
山梨大学・総合研究部・准教授
研究者番号：20303406

(2)研究分担者

齋藤 正夫 (SAITOH, Masao)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号：90345041