

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06187

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍治療の新規標的分子の発見をめざしたメチオニン集積機構の分子細胞学的検討

研究課題名(英文) Molecular mechanism of uptake of Methionine for malignant glioma

研究代表者

壽美田 一貴 (Sumita, Kazutaka)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70752830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：平成27年、28年度における当科での神経膠腫の手術の際はMET-PETが集積する部位を、ナビゲーションシステムを使用して摘出した。当研究期間で5名の患者(15検体)の腫瘍検体を採取しRNA sequenceにより発現量を解析した。パスウェイ解析により多くの治療ターゲットの候補となる分子があがっており、現在も検討中であるが、その一つに以前より当科で取り組んでいるGuanosine triphosphateの合成経路の酵素が上昇していることが判明した。この酵素を抑制する薬剤を脳腫瘍細胞株に投与すると、細胞の増殖抑制がみられ、今後これらの増殖抑制の分子メカニズムをさらに検討していく予定である。

研究成果の概要(英文)：When I performed the surgery for malignant glioma in 2015 and 2016, I removed the part of tumors that MET-PET accumulated using navigation system. I took the 15 pieces of tumor of five patients in this study period. mRNA expression of these samples was analyzed by RNA sequence. I found the candidate of the targets of the treatment. One of them is the enzyme of metabolic pathway of Guanosine triphosphate. The inhibitor of this enzyme cause cell cycle arrest, and I am focusing on the mechanism of cell cycle arrest. I will examine the clinical application of this drug in future.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：悪性神経膠腫 PET メチオニン

1. 研究開始当初の背景

本邦における原発性脳腫瘍の罹患数は4年間で13431人(2001-2004年 脳腫瘍統計)であり、そのうち神経膠腫は2678人で19.9%をしめる。この中でもっとも悪性度の高い神経膠芽腫(1455人 10.9%)では近年化学療法の発展に伴ってその予後は改善しつつあるものの、生存期間中央値は15ヶ月たらずであり未だに治療困難な疾患である。この悪性脳腫瘍の治療困難な原因は脳の局在機能による腫瘍全摘出の限界、脳腫瘍の生物学的特性による治療抵抗性や、脳血流閉塞などによる薬剤デリバリーの問題が考えられる。そのため治療成績の向上のためには新規治療法につながる分子の発見が重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、悪性脳腫瘍、とくに悪性神経膠腫において Positron emission tomography (PET) で L- [methyl-¹¹C] methionine (MET) が集積する部位の分子細胞学的特徴を調べることである。MET 集積部位と腫瘍幹細胞との関連や、同一腫瘍内のより悪性度の高い部位を識別するためのバイオマーカーを解明することを目的とした。これまでに当教室において MET-PET は腫瘍摘出に対して有用であることを報告しているが MET 集積部位とそれ以外の Magnetic Resonance Imaging (MRI) の造影部位の分子細胞学的な差異は明らかになっていない。画像検査、手術支援機器の進歩により MET の高集積部位を区別して摘出できるようになり、摘出検体の遺伝学的解析が可能となった。MET-PET の術前評価の有用性の確証を得るためだけでなく、その遺伝学的プロファイルから治療ターゲットとなる新たな分子の発見が期待できる。

3. 研究の方法

本研究は悪性神経膠腫の患者から採取した検体をもとに解析を行った。

(1) 悪性神経膠腫の患者に術前検査としてガドリウム造影を行った MRI と Methionine を使用した PET を撮影する。それらを術中に fusion 画像として使用し腫瘍を以下のように分けて保存する。

MRI にて Gd で造影され、かつ PET にて Methionine の集積が高い部分

MRI にて Gd で造影されず PET にて Methionine の集積が高い部位

(2) 検体の解析方法としては microarray もしくは RNA sequencing による mRNA レベルでの発現量の比較を行った。

4. 研究成果

当科において以前、悪性神経膠腫では術前検査である Positron emission tomography (PET) で L- [methyl-¹¹C] methionine (MET) 集積部位をより多く

摘出することが、全生存期間の延長につながることを報告しており (Fig.1) その分子機構を調べるために患者からの腫瘍摘出検体を用いた。

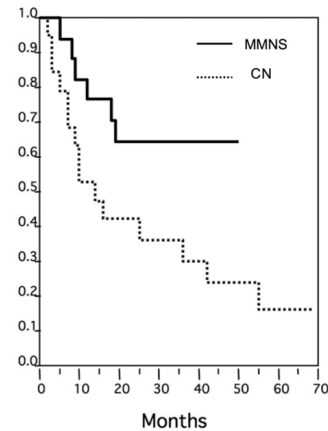


Figure 1 悪性神経膠腫の患者に対して術中に Multimodal navigation system (MMNS) と Conventional navigation (CN) を使用したときの生存曲線。

平成 27 年、28 年度における当科での神経膠腫の手術の際は MET-PET が集積する部位を、ナビゲーションシステムを使用して摘出し、当研究期間で 5 名の患者 (15 検体) の腫瘍検体を採取した。腫瘍内部の heterogeneity が最近報告されているがこれらの検体間で遺伝子変異ではなく、分子の発現量にどのような違いがあるかを解析した。実際には検体から mRNA を抽出し RNA sequence により発現量を解析した。

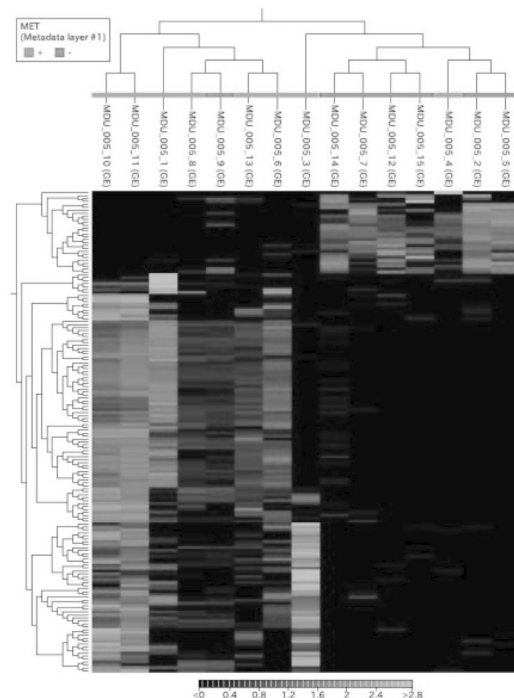


Fig.2 5名の患者15検体の RNA sequence のクラスタリングした結果

Fig.2 のように MET-PET における集積部位では明らかな mRNA の発現パターンが異なっていた。パスウェイ解析により多くの治療ターゲットの候補となる分子があがっており、現在も詳細に検討中であるが、その一つに以前より当科で取り組んでいる Guanosine triphosphate の合成経路の酵素である Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (IMPDH2) が上昇していることが判明した。(代表的な 2 検体の発現量を fig.3 に示す。)

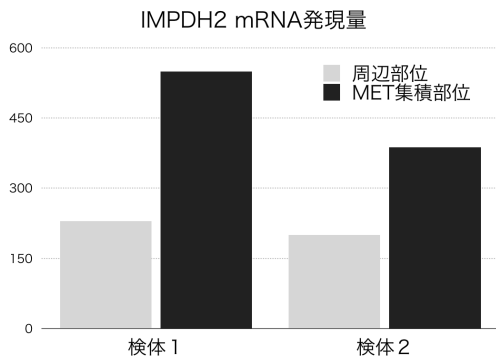


Fig.3 MET 集積部位とその周囲の IMPDH2 の mRNA 発現量の比較

GTP 合成経路は Figure4 で示すように 1 つはグルコースから作られる de novo 経路、もう一つはグアノシンから再合成される salvage 経路がある。腫瘍細胞中では salvage 経路のみでは GTP が不足して de novo 経路を使用するようになると考えられている。

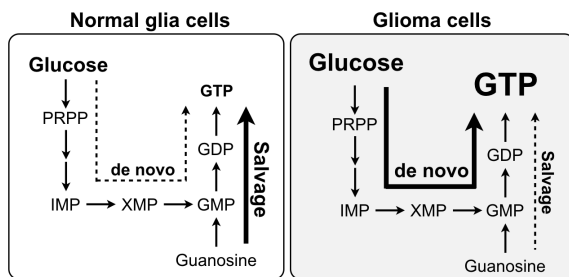


Fig.4 正常グリア細胞と神経膠腫における GTP 代謝経路

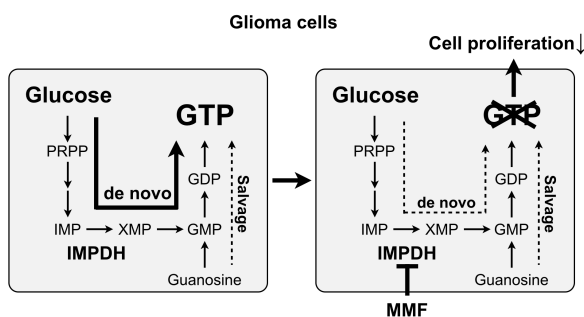


Fig.5 IMPDH 阻害剤投与による GTP 合成経路の抑制

我々は MET-PET 集積部位により多くのエネルギーを必要とする細胞群が存在し、これらは特異的に GTP の代謝を活性化させていると考えている。そのため、これらの結果からこの GTP 代謝経路は悪性神経膠腫特異的な治療標的となると考えて、この IMPDH2 を抑制する薬剤を脳腫瘍細胞株に投与した。(Fig.5) これらの細胞は薬剤投与後 48 時間程度で扁平化し、腫大するように変化して、増殖抑制がみられた。(Fig.6) フローサイトメトリーの結果ではほとんどが G0-1 phase で停止していることが判明した。

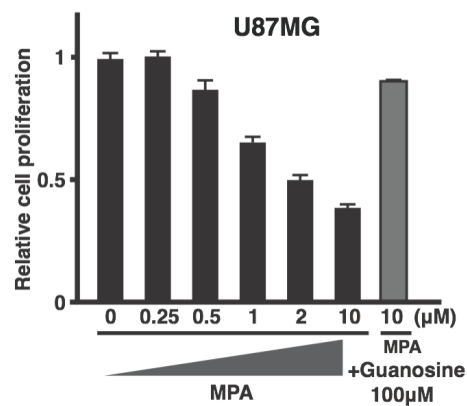


Fig.6 IMPDH 阻害剤 (MPA) 投与 48 時間後の細胞増殖

今後これらの増殖抑制の分子メカニズムをさらに検討していく予定である。同時にマウス脳腫瘍モデルにおけるこの酵素の阻害剤の検討もはじめており、腫瘍増殖の抑制効果がみられている。

本研究期間では MET-PET 集積部位に、GTP 代謝経路に関係する分子の発現上昇がみられていたが、その他にも治療標的となりうる分子の候補が見つかってきている。引き続きこれらの分子の詳細をさらに検討すると同時に、GTP 代謝経路の阻害剤の臨床応用を検討していく。

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 4 件)

Mukawa M, Nariyai T, Onda H, Yoneyama T, Aihara Y, Hirota K, Kudo T, Sumita K, Maehara T, Kawamata T, Kasuya H, Akagawa H. Exome Sequencing Identified CCER2 as a Novel Candidate Gene for Moyamoya Disease. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2016 Oct 4. S1052-3057(16)30330-5 査読あり

Arita H, Tamura K, Sumita K, Ichimura K. A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. Acta Neuropathol Commun. 2016 Aug 8;4(1):79 査読あり

Sumita K, Sasaki AT. The Lipid Kinase PI5P4K Is an Intracellular GTP Sensor for Metabolism and Tumorigenesis. Molecular Cell. 2016 Jan 21;61(2):187-98 査読あり

Watanabe M, Sumita K, Flake AW. Complete tissue coverage achieved by scaffold-based tissue engineering in the fetal sheep model of Myelomeningocele. Biomaterials. 2016 Jan;76:133-43 査読あり

〔学会発表〕(計 3件)

壽美田一貴 悪性神経膠腫に対するGTP代謝経路の治療標的としての可能性 ニューロオンコロジーの会 2016年8月21日 先端生命医科学センター(東京都新宿区)

壽美田一貴 カルムスチン脳内留置用剤を使用した神経膠腫 50 例の検討 第 75 回日本脳神経外科学会学術総会 2016 年 9 月 29-10月1日 福岡国際会議場(福岡県博多区)

壽美田一貴 神経膠腫に対するカルムスチン脳内留置用剤の治療成績と有害事象の検討 第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会 2016 年 12 月 4-6 日 甲府富士屋ホテル(山梨県甲府市)

〔図書〕(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 とくになし

6. 研究組織

(1)研究代表者

壽美田 一貴 (SUMITA, Kazutaka)

東京医科歯科大学・脳神経外科・助教

研究者番号：70752830

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者