

令和 2 年 6 月 27 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08764

研究課題名(和文) 膠芽腫の悪性形質に対する多面的アプローチ

研究課題名(英文) Multifaceted approach for understanding of malignant phenotype of glioblastoma

研究代表者

福島 剛 (Fukushima, Tsuyoshi)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：10452913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫は極めて予後不良の脳腫瘍である。網羅的および機能解析により悪性形質関連遺伝子を見出すことを目的に、CD24、MALAT1、MET に着目して進めた。CD24 が膠芽腫で発現しており、増殖、浸潤、造腫瘍能を促進することを示した。発現プロファイル解析により、下流の機能因子候補として、MALAT1 を含む遺伝子、miRNAを同定した。アンチセンス核酸で MALAT1 を抑制したところ、膠芽腫細胞の増殖が抑制された。HGF 活性化酵素の調節因子である SPINT2 が膠芽腫の約 3/4 でエピジェネティックに抑制されており、HGF/METシグナルを介して予後を増悪させていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は、他の癌と比較すると多くはないが、原発性脳実質腫瘍では最も高頻度の悪性腫瘍である。生存期間が2年に満たない、極めて予後の悪い難治性腫瘍であり、新たな治療の糸口やブレイクスルーを見出すことはアカデミアの急務である。CD24には、幹細胞性や分化への関与、エクソソームおよび内包する miRNAの質的、量的調節との関連、長鎖非翻訳 RNA である MALAT1には様々なタンパク質や RNA との相互作用による未知の細胞内調節機構への関連、SPINT2 には、(単なる増殖因子の存在ではなく)その活性化機構による細胞周囲微小環境の制御への関与が疑われ、治療に繋がる知見の糸口となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma (GBM) is a malignant neoplasm with the highest frequency and the most miserable prognosis in brain. Novel therapeutic clues and breakthrough are desired. We have performed exploratory and functional analysis for novel genes which are involved in the aggressive features of GBM and focused on CD24, MALAT1, and MET pathway. It was revealed CD24 is involved in proliferation, invasion, and tumorigenicity of GBM. We analyzed cDNA and miRNA profiles in control and CD24 knockdown GBM cells using microarrays to identify downstream factors of CD24. Several genes and miRNA including MALAT1 were identified as candidate progression-associated genes/miRNAs. MALAT1 knockdown using antisense locked nucleic acids resulted in decreased proliferation of glioblastoma cells. Regarding MET, we showed that SPINT2 is epigenetically silenced in most GBM cell lines and about three quarters of GBM tissues and suggested to get involved in prognosis of GBM patients via HGF/MET signaling.

研究分野：病理学

キーワード：膠芽腫 浸潤性増殖 細胞周囲微小環境 プロテアーゼ活性調節 CD24 MET SPINT2 MALAT1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

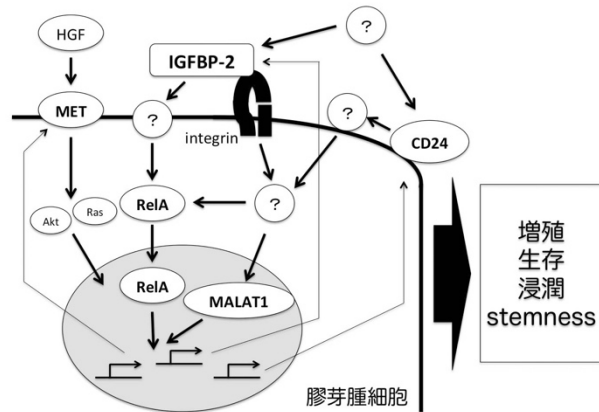
## 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫において高頻度の遺伝子異常や、シグナル伝達異常はかなり詳細に解明されてきたにも関わらず、依然として膠芽腫の予後を決定的に改善する治療は見出されていない。これは、既存のアプローチにとらわれないブレークスルーが必要であることを示している。

申請者は、膠芽腫で高発現しているが、その意義、機能が解明されていない分子の一つとして、**insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP2)** に注目し、解析してきた。IGFBP2 は膠芽腫細胞の浸潤性増殖を促進しており、それを抑制することで膠芽腫の進展を抑制できたため、網羅的解析を行い、IGFBP2 と連動して発現が変化する遺伝子として **CD24**、**RELA**、**MALAT1**、を見出した。さらに **CD24** に連動して発現が変化する遺伝子群 (**MET**、**MALAT1**、**ADAM10** 等) を同定した。これらのうち、**RELA (NF- $\kappa$ B サブユニット)** に関しては、その核内移行を阻害する低分子化合物である **DHMEQ (dehydroxymethylepoxyquinomicin)** によって膠芽腫の増殖を抑制できることを明らかにし、その治療応用の可能性を示した。

### (1) 膠芽腫悪性形質制御標的候補 1 ; CD24

**CD24** は GPI アンカー型の糖蛋白で、細胞内ドメインを持たないが、細胞膜上で **P-セレクチン** や **L1CAM** を初めとする接着因子と結合することが知られている。近年、肺癌、乳癌、大腸癌、卵巣癌、膵癌を初めとして様々な悪性腫瘍での発現と、浸潤性や不良予後との関連が報告されている。また、乳癌細胞では **CD24** の発現低下が、大腸癌細胞では逆に **CD24** の発現が、癌幹細胞の **hallmark** とされ、**stemness** や分化に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。さらに、**CD24** が膵管癌患者の膵液、卵巣癌患者の腹水中のエクソソームに豊富に存在することが報告されており、癌細胞と宿主細胞の相互作用の担い手として近年注目されているエクソソームの形成や機能に関わっている可能性もある。

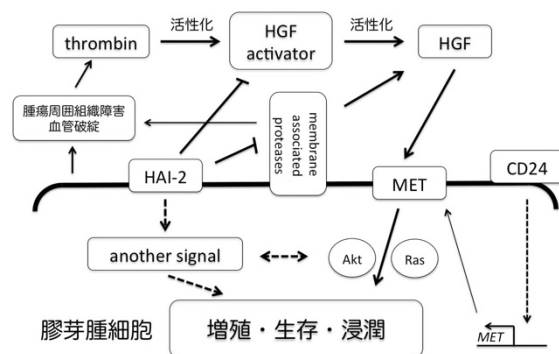


### (2) 膠芽腫悪性形質制御標的候補 2 ; MALAT1

**IGFBP2**、**CD24** 双方に連動して発現が変化した **MALAT1** は、肺癌を初めとする悪性腫瘍との関連が報告されている 長鎖非翻訳 RNA (**lncRNA**) である。miRNA を初めとする短鎖 RNA の転写調節機能や癌との関わりの報告が数多くなされている一方で、膠芽腫における **lncRNA** 発現の意義については未だ明らかにされていない。

### (3) 膠芽腫悪性形質制御標的候補 3 ; MET/HGF signal

**MET** は 肝細胞増殖因子 (**HGF**) の特異的受容体チロシンキナーゼであり、その膠芽腫における発現やがん幹細胞における意義、その活性抑制の臨床応用については盛んに研究されてきた。一方で、過剰発現した **MET** を抑制しても、腫瘍細胞周囲微小環境における **HGF** を介したわずかな **MET** シグナルが腫瘍細胞を生存させることが知られている (*Cancer Res* 74:6598-609, 2014)。HGF は活性のない前駆体で分泌されることから、細胞外環境においてプロテアーゼ (**HGF activator** あるいは **matriptase**) によって活性化される必要がある。この活性化機構を標的とすることは、**MET** シグナル制御ストラテジーにおける新たな観点となり得る。申請者におけるこれまでの予備実験および申請者の教室の過去の報告から、膠芽腫細胞には **matriptase** の発現は見られず、**HGF activator** が発現していること、中枢神経系では **HGF activator** の阻害蛋白としては **HAI-2 (HGF activator inhibitor type 2)** が発現しており、グリオーマではこの発現が進展とともに著明に低下していることを見出している



## 2. 研究の目的

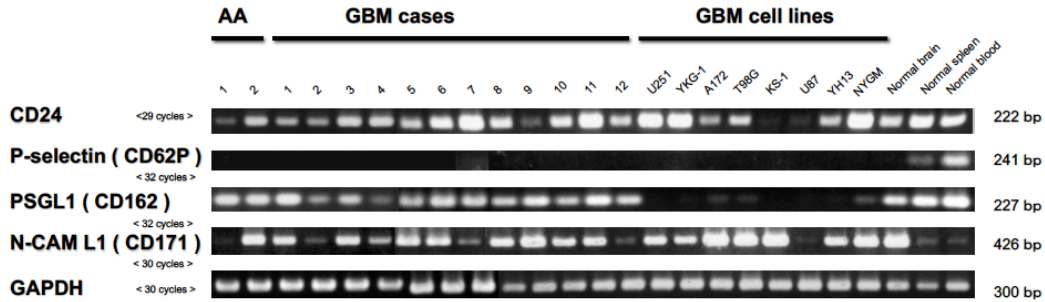
本研究は膠芽腫の悪性形質を左右する新たな機能遺伝子を探索し、新規治療標的を見出すことを目的とする。既存の知見にとらわれない新たな発見を得るため、網羅的解析と機能解析の両面からアプローチする。さらに、これまで我々が膠芽腫以外のがんにおいて解析してきた、プロテアーゼ活性調節による細胞周囲微小環境制御に関する知見が膠芽腫にも当てはまるのか、新たな治療への糸口を探索する。

### 3. 研究の方法

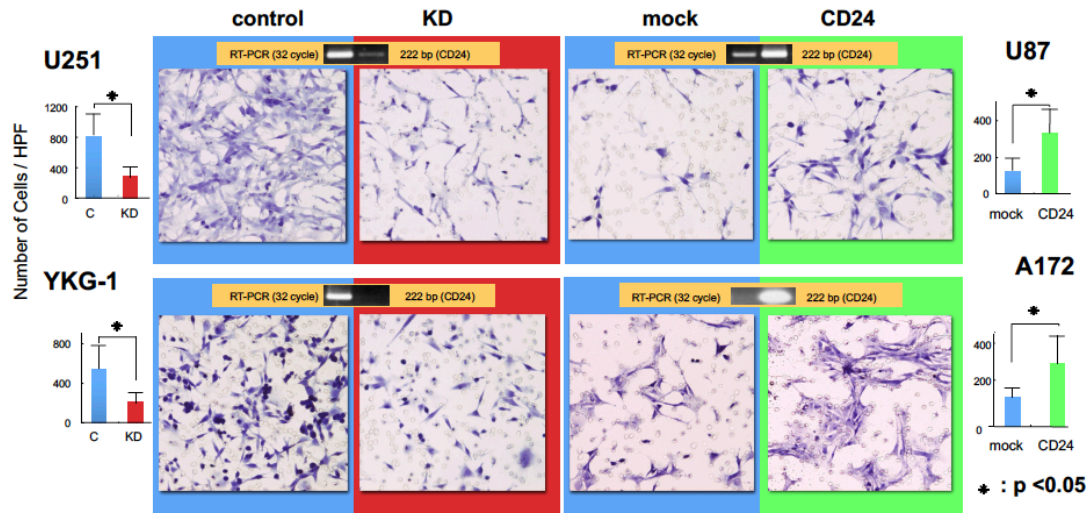
悪性形質制御因子の候補遺伝子について、培養細胞における遺伝子抑制・改変・強制発現を主たる方法として、遺伝子発現プロファイル、エクソソーム、lncRNA、glioma stem cell 分画が如何に変化するかに着目し、膠芽腫の増殖、浸潤の機序を解明する。また、膠芽腫、星状膠細胞での HGF/MET シグナルの活性化状態を確認し、そこへの HAI-2 の関与を解析する。膠芽腫で機能している膜型プロテアーゼがあれば、その関与を合わせて解析する。神経組織特異的 HAI-2 欠失マウスを作成し、HGF/MET シグナルの状態を調べるとともに、悪性形質への影響を解析する。

### 4. 研究成果

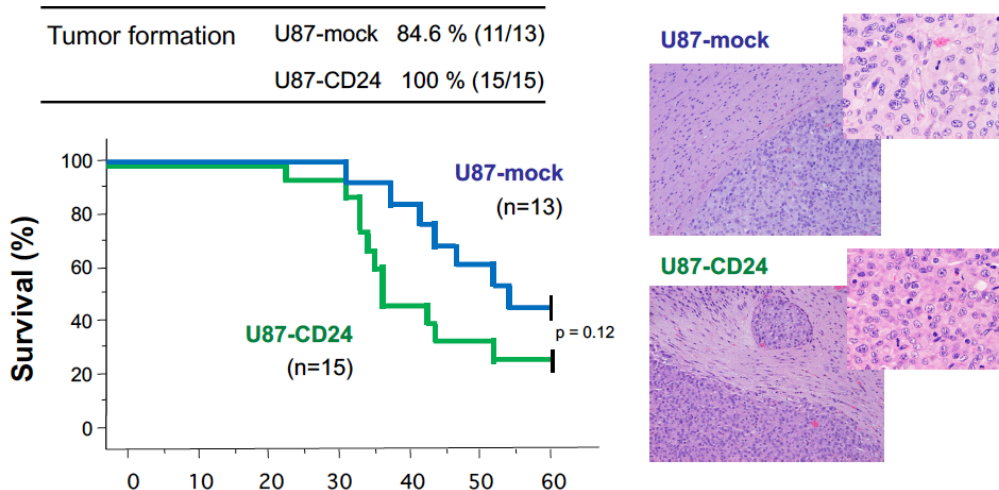
(1) 膠芽腫組織、細胞における CD24 および関連因子の発現を確認した。



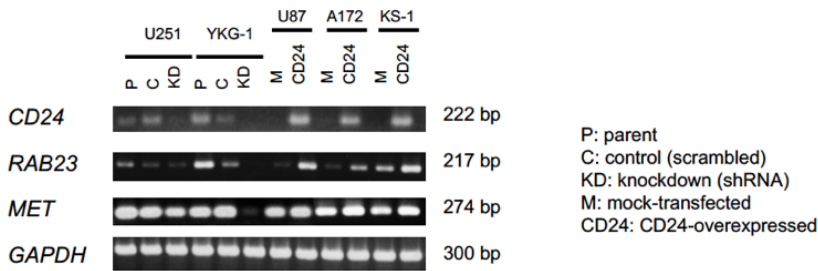
(2) 培養細胞において、CD24 をノックダウンすると in vitro Matrigel invasion assay における浸潤能が減弱し、強制発現すると亢進した。



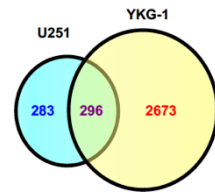
(3) 培養細胞において CD24 を強制発現すると、ヌードマウス脳への膠芽腫細胞移植による in vivo 腫瘍形成能が亢進し、生存期間が悪化した。



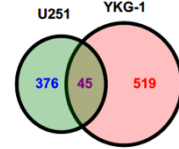
(4) 膠芽腫細胞株 U251, YKG1 において CD24 ノックダウンに伴って共通して発現低下した遺伝子群、発現増加した遺伝子群を同定した。発現低下した（すなわち CD24 に正に連動して変化する遺伝子）の中に MET が含まれていた。



A) Genes whose expression was decreased by CD24-knockdown (< 25 %)

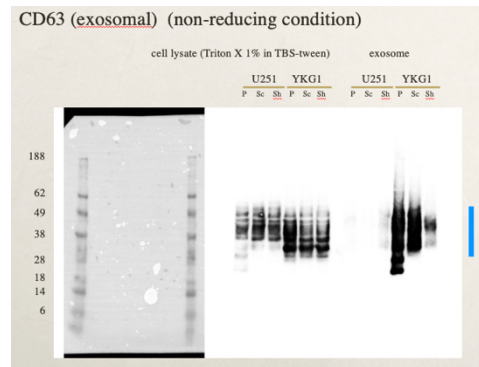


B) Genes whose expression was increased by CD24-knockdown (> 300 %)



(5) さらに、CD24 変動に伴う mRNA 発現に加えて、細胞内、エクソソーム内の miRNA 発現を解析し、包括的な遺伝子発現調節の解析を試みることにした。

様々な培養方法やエクソソームの濃縮方法を試し、解析に足る質と量を満たすエクソソームを得る方法を確立した。すなわち、あらかじめ超遠心を行って牛由来のエクソソームを取り除いた血清を用いて培養し、超遠心分離法で培養上清を濃縮、さらに洗浄して高純度のエクソソームを得た。また、エクソソーム由来の miRNA が微量でも解析できる感度の高いマイクロアレイを準備した。その結果、2 種類の膠芽腫培養細胞に共通して CD24 の発現によって変動する miRNA を、細胞内 miRNA (has-miR-19a-3p, has-miR-18a-5p, has-miR-1229-5p, has-miR-4481 など)、エクソソーム miRNA (has-miR-6870-3p, has-miR-18a-5p, has-miR-4653-3p など)、それぞれ同定した。現在、定量リアルタイム PCR による確認、それぞれの miRNA の mimic, inhibitor を用いた機能解析を進めている。



(6) 長鎖非翻訳 RNA (lncRNA) である MALAT1 については、膠芽腫組織、細胞における MALAT1 とその他の lncRNA の発現を確認した。膠芽腫細胞株において antisense LNA (locked nucleic acid) を用いたノックダウンに成功し、MALAT1 ノックダウンに伴って、膠芽腫細胞の増殖能、浸潤能が低下することがわかった。

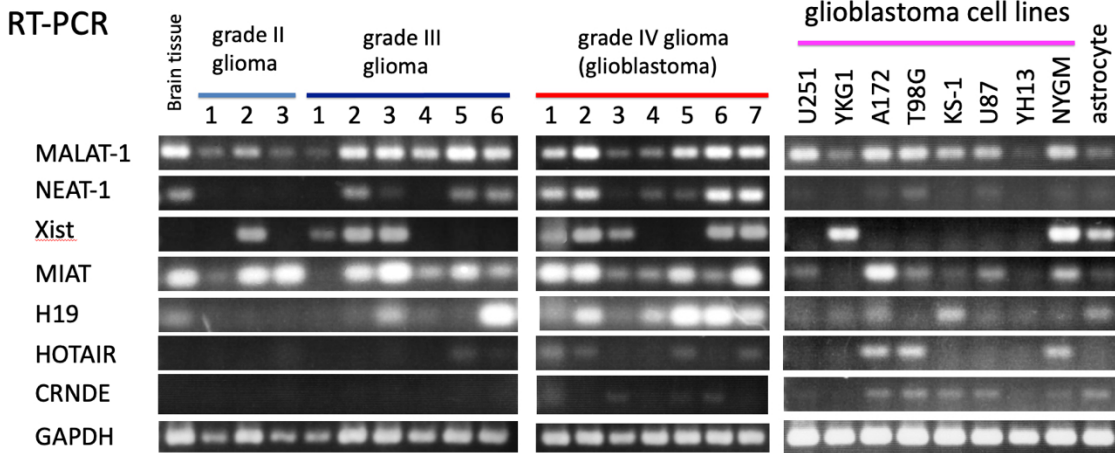
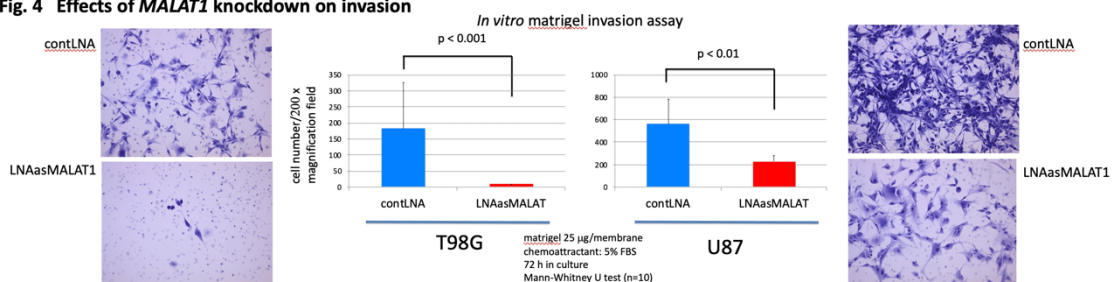


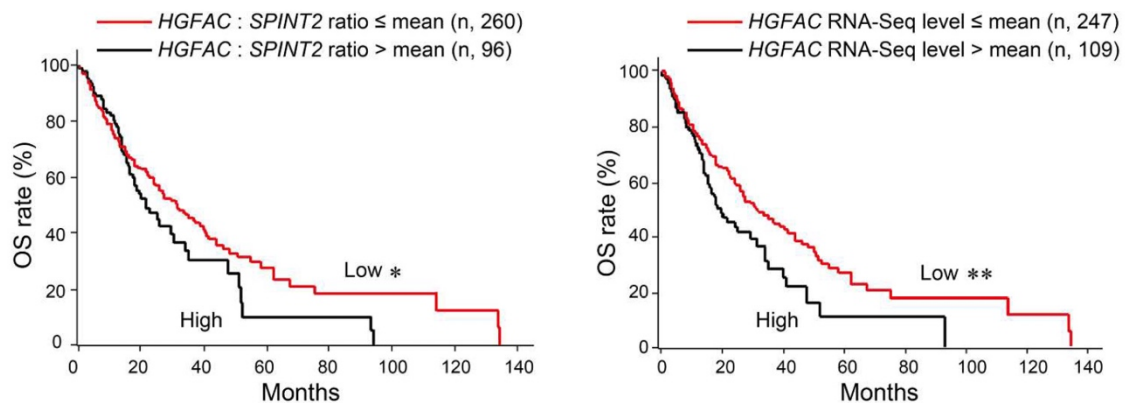
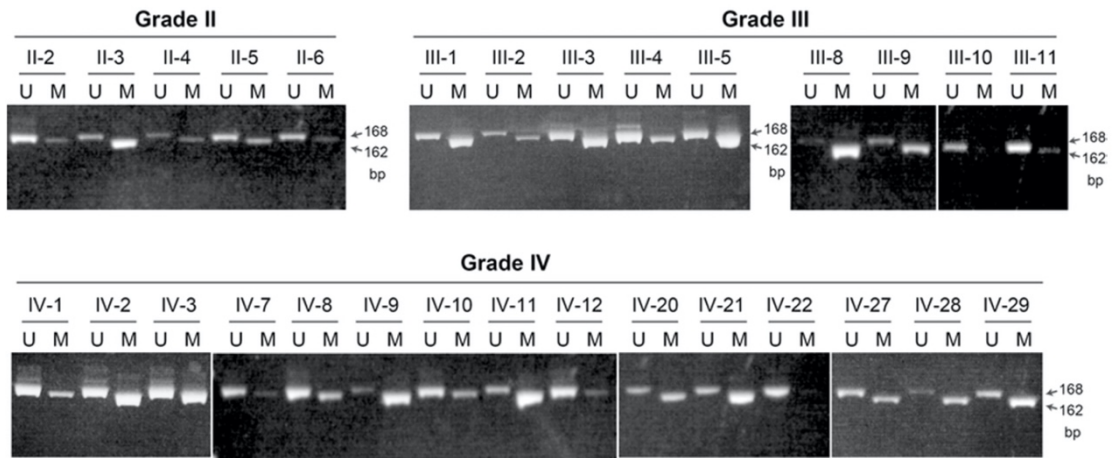
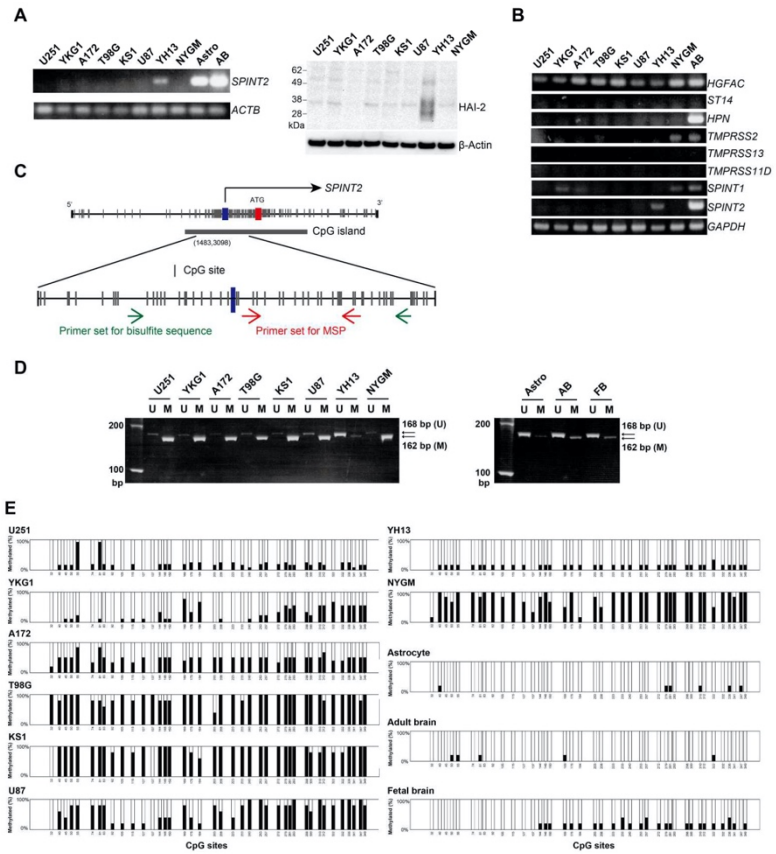
Fig. 4 Effects of MALAT1 knockdown on invasion



(7) MET については、そのリガンドである肝細胞増殖因子 (HGF) 活性化の調節因子の一つである HAI-2 (HGF activator inhibitor type 2; 遺伝子名 SPINT2) の膠芽腫、星状膠細胞での DNA メチル化状態を解析した。培養細胞において、メチル化特異的 PCR、メチル化特異的 sequence を行い、ほとんどの膠芽腫細胞で SPINT2 のプロモーター領域のメチル化が起こっていることを確認すると共に、臨床検体においてメチル化特異的 PCR を解析する条件設定を行った。

(8) 臨床検体 (摘出膠芽腫組織) の約 3/4 でプロモーター領域のメチル化が起こっていた。

(9) HAI-2 の発現抑制は、HGF activator の活性化調節を介して HGF/MET シグナルされていることを確認した。活性化に影響し、膠芽腫の予後に関連している可能性を示唆した。



(10) 神経組織特異的 HAI-2 欠失マウスを作成したところ、形態的には明らかな異常を呈さなかった。現在、欠失を起こす時期や、他の遺伝子抑制や刺激によって脳腫瘍が生じたり、形態異常が起きたりしないか、解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawaguchi Makiko, Yamamoto Koji, Kataoka Hiroaki, Izumi Aya, Yamashita Fumiki, Kiwaki Takumi, Nishida Takahiro, Camerer Eric, Fukushima Tsuyoshi	4. 巻 111
2. 論文標題 Protease activated receptor 2 accelerates intestinal tumor formation through activation of nuclear factor B signaling and tumor angiogenesis in Apc Min/+ mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1193 ~ 1202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14335	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 該当する
1. 著者名 Kawaguchi Makiko, Yamamoto Koji, Takeda Naoki, Fukushima Tsuyoshi, Yamashita Fumiki, Sato Katsuaki, Kitamura Kenichiro, Hippo Yoshitaka, Janetka James W., Kataoka Hiroaki	4. 巻 2
2. 論文標題 Hepatocyte growth factor activator inhibitor-2 stabilizes Epcam and maintains epithelial organization in the mouse intestine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-018-0255-8	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 該当する
1. 著者名 Fukushima T, Kawaguchi M, Yamamoto K, Yamashita F, Izumi A, Kaieda T, Takezaki Y, Itoh H, Takeshima H, Kataoka H	4. 巻 109
2. 論文標題 Aberrant methylation and silencing of the SPINT2 gene in high-grade gliomas.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2970-2979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13732	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 -
1. 著者名 Fukushima Tsuyoshi, Uchiyama Shuichiro, Tanaka Hiroyuki, Kataoka Hiroaki	4. 巻 19
2. 論文標題 Hepatocyte Growth Factor Activator: A Proteinase Linking Tissue Injury with Repair	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3435 ~ 3435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19113435	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12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 福島剛、川口真紀子、山下文希、田中弘之、片岡寛章
2. 発表標題 CD24 抑制は膠芽腫の浸潤を減弱させる
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukushima T, Kawaguchi M, Yamamoto K, Tanaka H, Kataoka H
2. 発表標題 Profile changes of mRNA and miRNA correlating with CD24 silencing in glioblastoma cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawaguchi M, Yamamoto K, Kiwaki T, Fukushima T, Camerer E, Kataoka H
2. 発表標題 Protease-activated receptor 2 promotes intestinal tumorigenesis through activation of NF- $\kappa$ B signaling and tumor angiogenesis in ApcMin/+mice
3. 学会等名 ASBMB Special Symposia Series; Serine Proteases in Pericellular Proteolysis and Signaling (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島剛, 片岡寛章
2. 発表標題 膠芽腫細胞株における抗癌剤耐性機序
3. 学会等名 第37回日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島 剛、川口 真紀子、山本 晃士、山下 文希、田中 弘之、片岡 寛章
2. 発表標題 膵管癌細胞における長鎖非翻訳RNA MALAT-1 抑制の影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fukushima T, Kawaguchi M, Yamamoto K, Tanaka H, Kataoka H
2. 発表標題 CD24 enhances malignant features of glioblastoma
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福島剛、川口真紀子、山本晃士、田中弘之、片岡寛章
2. 発表標題 膠芽腫において HAI-2/SPINT2 はエピジェネティックに抑制されている
3. 学会等名 第36回 日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福島剛、片岡寛章
2. 発表標題 膠芽腫における長鎖非コード RNA の発現と MALAT1 の浸潤への関与
3. 学会等名 第27回 日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 福島剛、田村充、河野朋宏、山下真治、横上聖貴、竹島秀雄、秋山裕、田中弘之、片岡寛章
2. 発表標題 Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant 五例の臨床病理学的検討
3. 学会等名 第107回 日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fukushima T, Kawaguchi M, Yamamoto K, Tanaka H, Kataoka H
2. 発表標題 Epigenetic silencing of SPINT2 enhances tumorigenicity of glioblastoma
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福島 剛,川口 真紀子,山本 晃士,泉 彩,下村 猛,片岡 寛章
2. 発表標題 膠芽腫における長鎖非コードRNA の発現
3. 学会等名 第35回日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福島剛、川口真紀子、山本晃士、田中弘之、下村猛、片岡寛章
2. 発表標題 膵管癌細胞における長鎖非翻訳 RNA MALAT-1 発現の意義
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (第40回日本分子生物学会年会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kataoke H and Fukushima T (Chaptor 9; pp 183-197)	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer, Singapore	5. 総ページ数 218
3. 書名 Regulation of Signal Transduction in Human Cell Research	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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