

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10860

研究課題名(和文) グリオーマ上皮間葉転換と治療抵抗性の機序解明- 薬剤耐性と幹細胞性維持への関与

研究課題名(英文) Analysis of Epithelial mesenchymal transition in glioma

研究代表者

川瀧 智之 (KAWATAKI, Tomoyuki)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：20303406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト膠芽腫における上皮間葉転換(EMT)の機序について検討した。4種類の細胞株を用いて定量的PCRにより転写因子であるZEB1およびZEB2の高発現を確認した。また、悪性グリオーマ細胞株におけるZEB1 / 2転写因子の発現阻害は、相乗あるいは相加的に浸潤抑制効果を認めた。さらに、組織における発現と悪性度との相関が認められた。しかしながら、in vivoにおけるマウス皮下移植モデルでは、腫瘍の増大には、明らかな相乗効果はなかった。また、Bevacizumab依存的なグリオーマ細胞株の浸潤能とこれらの転写因子との関連性については現在、検討中であり今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本検討では、グリオーマが上皮間葉転換(EMT)という形質転換により、組織における微小環境を巧みに変えて、浸潤や増殖し、これが薬剤抵抗性の根幹であるという仮説に基づき研究を始めた。グリオーマ株やヒトグリオーマ組織におけるEMT関連因子であるZEB1/2の発現が更新し、間葉系の形質を発現し浸潤能を更新している可能性が示唆されたが、Bevacizumab依存性浸潤能には、さらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the pathogenesis of epithelia mesenchymal transition (EMT) in malignant glioms. We confirmed high expression of EMT transcription factors ZEB1 and ZEB2 with qPCR in 4 kind of human glioblastoma cell lines. In addition, we observed the synergistic inhibition of glioma migration by the siRNA inhibition of ZEB1/2 expression in vitro. Furthermore, a correlation between expression of ZEB1/2 and histological malignancy was observed in immunohistochemical staining analysis. However, there was no sygnificant synergistic anti- tumor effect of ZEB1/2 inhibition on in the mouse subcutaneous implantation gloma model in vivo. We are going to focus on the relationship between bevacizumab-dependent invasion and these transcription factors.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：グリオーマ 上皮間葉転換 浸潤能 ZEB

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は、可及的な摘出後に化学放射線治療を行っても再発はほぼ必発であり、現行治療の限界は明らかである。その原因として、悪性グリオーマが有する周辺組織への高い浸潤能と化学放射線療法に対する治療抵抗性の2点が重要である。2004年に、初めてグリオーマ幹細胞が同定され、治療抵抗性との関連性が指摘された。2012年には、膠芽腫の網羅的マイクロアレイ解析により4つの subtype の存在が明らかになり、遺伝子変異のパターンから proneuronal type(神経上皮系)と mesenchymal type(間葉系)に大別された。さらに、膠芽腫の同一組織内に、これらの遺伝子変異の異なるサブタイプの細胞群の存在が指摘され、腫瘍の heterogeneity (不均一性)と plasticity (可塑性:同一細胞が形質転換する現象)を示唆する知見が報告された。一方、細胞が上皮系と間葉系にダイナミックに形質転換する現象は、上皮間葉転換 Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)と定義され、癌の治療戦略上、浸潤能、薬剤抵抗性、幹細胞性維持への関与が指摘されている。EMT では、TGF-beta や Wnt などの多くの生理活性因子や増殖因子が複雑に作用し Snail ファミリー (Snail/Slug)や EF1 ファミリー (ZEB1/2)等の細胞内転写調節因子が活性化し、細胞間接着をなす E-カドヘリンの転写レベルを抑制し、ビメンチンや N-カドヘリンなどの多種の細胞外基質の産生が亢進する。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。我々は、ヒトグリオーマにおけるグリオーマの heterogeneity と plasticity が、治療抵抗性の原因であるという視点から、EMT 転写因子の発現と薬剤耐性に着目した。上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)とは、上皮細胞がより浸潤性の高い間葉細胞に形質変化する現象で、胚発生や腫瘍進展・転移に関し提唱された概念である。昨年、EMT が肺癌及び膵癌の抗癌剤耐性ならびに幹細胞の発生・維持に深く関与することが相次いで報告されたが、詳細な機序やグリオーマにおける関与は不明である。EMT と薬剤抵抗性に関して、乳癌において細胞膜蛋白で薬物輸送に関与し、抗癌剤の細胞内濃度を規定する ATP-binding cassette transport family (ABC 輸送体)が、EMT 転写因子により高発現すること、肺癌では、EGFR の分子標的薬の効果が、EMT により阻害された現象が報告された。近年、膵臓癌や肺癌に EMT を生じた細胞が化学療法に抵抗性を有するという新知見や EMT と幹細胞性維持との関連性が、Nature 誌に相次いで発表され非常に注目されているが、機序は十分に解明されていない。一方、膠芽腫では、ZEB1 により幹細胞マーカーである Sox2 の発現が上昇する機序が報告されており、グリオーマ細胞が浸潤する invasion front において EMT 転写因子の高発現と幹細胞の存在が示唆されている。また、EMT と薬剤抵抗性の関与が予測されるが、その関連性は全く検討されていない。グリオーマ細胞は、化学療法のストレスや劣悪な環境に対して適応するため EMT による形質転換をしながら、生存し続け、再発の温床になっている可能性がある。我々は、グリオーマにおける EMT の阻害が、浸潤能、薬剤感受幹細胞性維持を抑制し、治療の有効な標的となるという仮説に基づき研究を行った。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、グリオーマにおける EMT 関連因子の発現と阻害及び薬剤感受性の関与を明らかにし、グリオーマの治療抵抗性の機序に迫り新規治療としての可能性を探索することが目的である。

3. 研究の方法

- (1) 使用細胞株 A172, KG1C, T98G, U251 ヒト悪性グリオーマ細胞株を使用した。
- (2) 定量的 RT-PCR ZEB1/2 転写因子の RT 定量的 PCR を行った。mRNA は、GAPDH をコントロールとして定量化した。

- (3) ウェスタンブロッティング α -tubulin をコントロールとして ZEB1/2 の発現を検証し、siRNA によるタンパク発現の阻害効果を比較した。
- (4) 細胞浸潤能 transwell を使用したプレートを使用して 12h 後にした面に遊走した細胞を顕微鏡でカウントした。また、スクラッチ法にて浸潤した細胞の移動距離を計測した。コントロールに比し siRNA により ZEB1/2 の阻害効果を比較した。
- (5) 動物モデルでの検討 GL261 マウスグリオーマ細胞を C57BL6 の蓋内に 1.0×10^5 細胞移植するモデルを用いて生存期間を検証した。
- (6) ヒトグリオーマ組織を用いて ZEB1/2 の免疫組織化学染色を行った。

4. 研究成果

- (1) RT-qPCR の結果からは、悪性グリオーマ細胞株における EMT 関連転写因子の発現から ZEB1 および ZEB2 の高発現を確認した。
- (2) この発現は、通常高発現していると報告されている乳がん細胞株よりもかなり高いレベルであった。
- (3) タンパク発現においても高発現を確認した。この発現は、siRNA により有意な抑制を確認し、この細胞株を用いて以下の実験を行った。(図 2 A,B)
- (4) コントロール細胞株、ZEB1 siRNA, ZEB2 siRNA, ZEB1/2 siRNA 細胞株における増殖能は有意差がなかった。Transmigration assay では、ZEB1 および ZEB2 siRNA 単独な阻害でも浸潤能が抑制されたが、両者の阻害により 90% 程度の浸潤抑制が確認された ($P < 0.01$)。なお、増殖能については、細胞株間の有意差は認められなかった。(図 1 C,D)
- (5) ヌードマウスにおける頭蓋内移植実験では、コントロール群に比べて ZEB1/2 ダブルノックダウン細胞群で、生存期間が長い傾向を認めたが、有意差を認めなかった ($P=0.2$)。

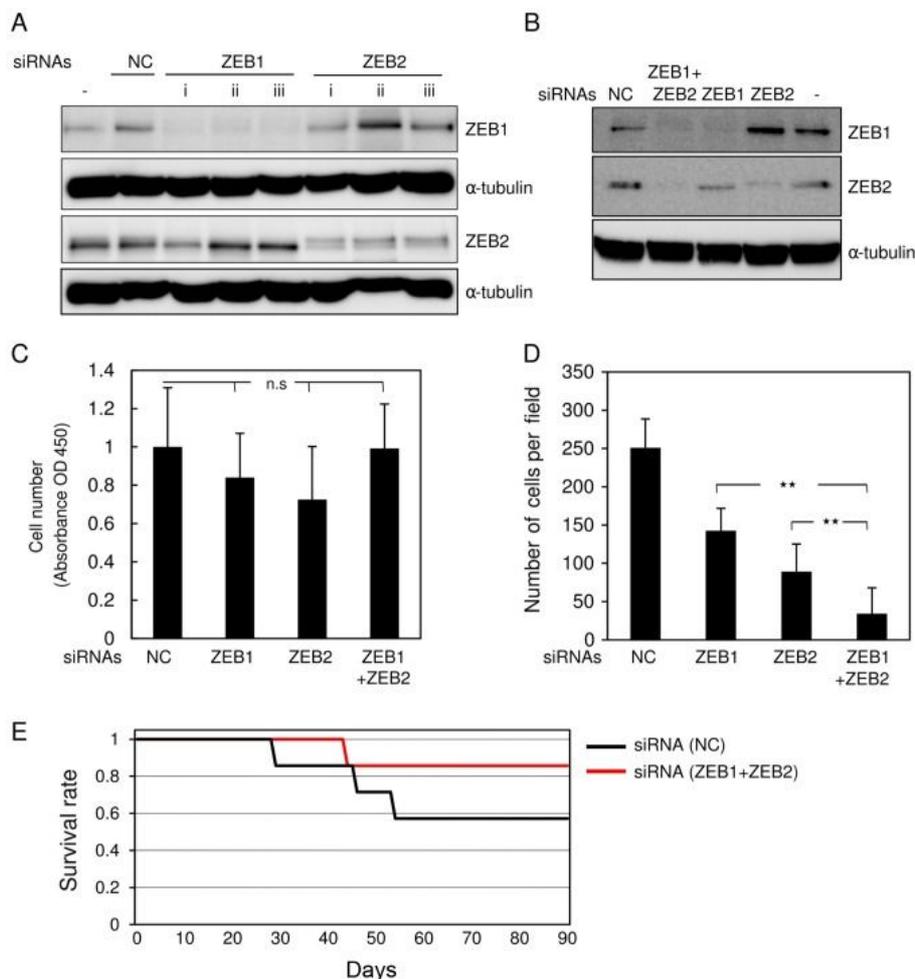


図 1

(6) 免疫組織化学染色

ZEB1 および ZEB2 の発現は、悪性グリオーマで強い傾向を認めた。また、ZEB1 および ZEB2 の発現の相関を認めた。(図 2 A-D)

以上より、EMT 関連転写因子である ZEB1/2 はグリオーマに高発現しており、浸潤能に関与していた。今後は、薬剤耐性や治療依存性の浸潤能との関連性が重要な治療標的になり得る。

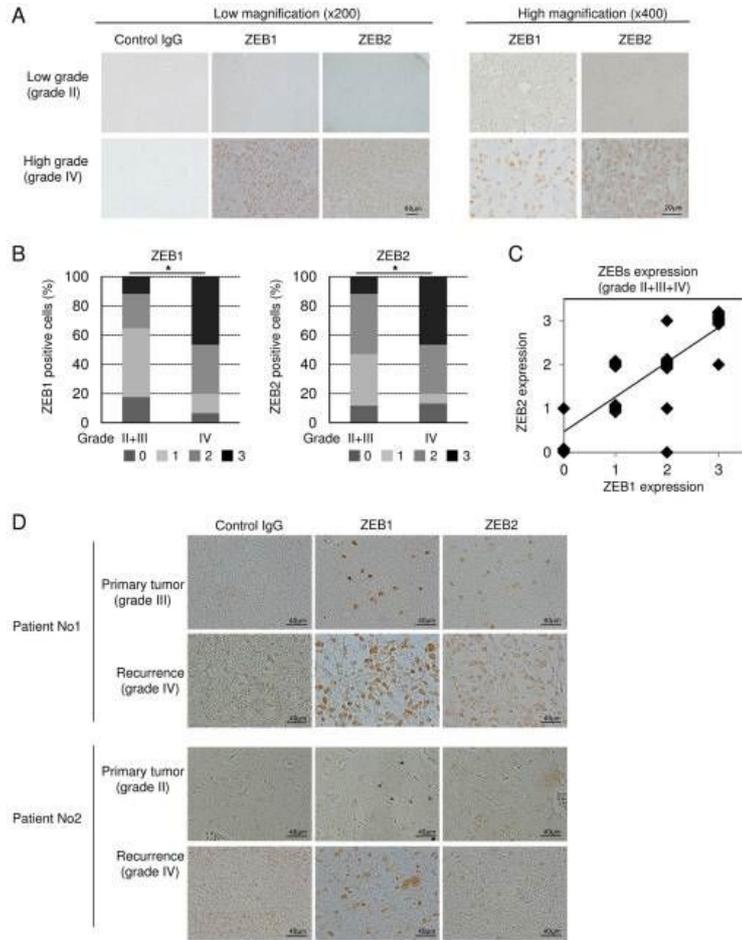


図 2

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 Suzuki Keiko, Kawataki Tomoyuki, Endo Kaori, Miyazawa Keiji, Kinouchi Hiroyuki, Saitoh Masao.	4. 巻 16
2. 論文標題 Expression of ZEBs in gliomas is associated with invasive properties and histopathological grade	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ONCOLOGY LETTERS	6. 最初と最後の頁 1758-1764
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2018.8852	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川瀧智之、鈴木景子、齋藤正夫、宮澤恵二、木内博之
2. 発表標題 グリオーマにおけるZEB1/2の発現と浸潤能および病理学的悪性度との相関
3. 学会等名 第19回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木景子、川瀧智之、宮澤恵二、齋藤正夫、木内博之
2. 発表標題 上皮間葉転換転写因子とグリオーマ浸潤能への関与
3. 学会等名 第18回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	齋藤 正夫 (SAITO Masao) (90345041)	山梨大学・大学院総合研究部・教授 (13501)	