

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10863

研究課題名(和文) グリオーマの髄腔播種促進因子の同定・機能解析と診断・治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of dissemination factor of glioma cells

研究代表者

篠山 隆司 (Sasayama, Takashi)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10379399

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)：転移・播種を起こした膠芽腫組織を用いてマイクロRNAの網羅的発現解析を行い、8つのマイクロRNAを同定し、その標的分子としてstanniocalcin-1 (STC1)を同定した。STC1はmiR-29b, miR-34a, miR-101, miR-137によって直接制御され、播種を起こした膠芽腫組織で高発現し、膠芽腫細胞の運動能・浸潤能を制御した。さらに、STC1は分泌糖タンパクであるため、髄液中のSTC1濃度を調べると、播種を起こす膠芽腫では有意に高値であった。さらに、STC1発現が高値な膠芽腫では生存期間が有意に短期間であり、STC1は播種を促進する因子で予後因子でもあることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は治療経過中に脳内や脊髄にしばしば播種を起こして、治療困難となり、不良な転機をとることがしばしばある。播種を促進する因子は全く同定されておらず、播種の予測も困難である。今回STC1が播種を促進する因子であり、さらに播種を起こしやすい膠芽腫では髄液STC1濃度が高いことが明らかとなったので、事前に播種を予測できることが可能となった。STC1をターゲットとした治療薬も今後作成、検討する必要がある。膠芽腫の播種を予測・予防できれば、予後の改善も期待でき、臨床的意義は非常に高いものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Using 76 GBM tissues, we examined the expression levels of 23 GBM-related miRs and compared the miRs' expression levels between GBMs with metastatic dissemination and GBMs without metastatic dissemination. By the bioinformatics analysis, we identified stanniocalcin-1 (STC1) as the most probable target gene. mRNA expression of STC1 was downregulated by miRs. Also, mimics of these miRs and knockdown of STC1 by siRNA suppressed invasion in GBM cells. GBM with metastatic dissemination had significantly higher levels of STC1 than GBM without metastatic dissemination. Finally, Kaplan-Meier analysis demonstrated that GBMs with high STC1 level had significantly shorter survival than GBMs with low STC1 level.

STC1 may be a novel metastatic dissemination promoting factor regulated by several miRs in GBM. Because STC1 is a secreted glycoprotein and functions via the autocrine/paracrine signals, inhibiting STC1 signal may become a novel therapeutic strategy for GBM.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：glioblastoma dissemination STC1 microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫 (glioblastoma multiforme; GBM) の頭蓋外転移は極めてまれであるが、頭蓋内・脊髄転移あるいは転移性播種はしばしばみられる。そして、転移・播種を起こした GBM の予後は極めて不良であり、それ故、転移・播種の抑制が GBM に対する重要な治療戦略となる。

転移・播種の過程は、1) 組織からの detachment、2) 転移・播種部での細胞外マトリックスへの付着、3) 細胞外マトリックスの分解、4) 組織内への invasion と migration であり、転移・播種の因子としては他に細胞増殖や抗アポトーシス、血管新生なども重要である。IL-6, IL-8, CD44, MMP-2/-9 など、いくつかのサイトカインやプロテアーゼが神経膠腫において転移・播種を促進することが報告されており、GBM の頭蓋内播種は抗血管内皮増殖因子 (VEGF) 治療後に頻繁に見られることが知られているが、GBM の他部位への転移・播種の病因は不明である。microRNA (miR) は small non-coding RNA で、mRNA 3' 非翻訳領域の相補的配列を認識してその標的 mRNA と結合し、標的 mRNA を不安定化し、翻訳の制御、タンパク質合成を阻害する。miR は広範囲のターゲットを有し、癌の進行・悪性化に関わる多くの経路を調節している。GBM においてもいくつかの miR が異常な発現パターンを示すことが報告されており、我々の研究室でも以前よりグリオーマにおける miR の異常や悪性化の機能について研究を行ってきた。具体的には、GBM において高発現している miR-10b が invasion を促進すること、また、miR-183 がイソクエン酸脱水素酵素 2 (IDH2) の発現を調節して、グリオーマ細胞の HIF1A、VEGF の発現を亢進させることを報告している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、GBM において miR により制御される転移・播種促進因子を同定することである。

3. 研究の方法

まず、GBM における転移・播種を制御する miR を同定するために、GBM において浸潤、血管新生、増殖を調整することが過去に報告されている 23 個の miR を選択した。miR のターゲット検索は、バイオインフォマティクス web サイト miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) を用いて検索した。

2007 年 1 月から 2013 年 7 月の間に当院と他施設で治療および追跡された初発 GBM 患者を対象とした。延髄・脊髄に転移あるいは播種を起こした群 (M/D(+)) 群) およびそれを起こさなかった群 (M/D(-)) 群) の 2 群に分け解析を行った。延髄あるいは脊髄への転移・播種の有無は治療経過中に撮影した造影 MRI T1 強調画像で判断した。ほとんどの患者で GBM の標準的な治療 (放射線治療 60Gy + テモゾロミド) がなされ、外来フォローアップは 1~2 ヶ月間隔で行い、MRI は少なくとも 3~4 ヶ月ごとに実施された。

腫瘍組織中の miR 発現量および mRNA 発現量の解析は、初発時に手術摘出した組織の残余検体を使用し、免疫組織学的解析も初発時の腫瘍組織検体を用いた。

培養細胞を用いた実験は、U87、A172 グリオーマ細胞を用いて、miR mimic, miR inhibitor, siRNA の導入には HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN) を用いた。組織内 miR 発現量および mRNA 発現量の測定は、TaqMan® Gene Expression assays をもちいて real-time RT-PCR にて測定した。細胞増殖実験は WST アッセイを用いて、浸潤能や運動能の解析は matrigel/transwell invasion (migration) assay あるいは wound healing assay を用いて、細胞周期の解析には FACS calibur を用いたフローサイトメトリー解析で施行した。

髄液に関する分析には当院で 2010 年 1 月から 2017 年 12 月に初発 GBM と診断・治療された患者のうち、術前に診断目的で採取した髄液の残余検体が保存されていたものを使用した。生存解析では、手術日から死亡日までを生存期間とし、Kaplan-Meier 法を用いて M/D(+)) 群と M/D(-)) 群を比較し、Log-rank テストを用いて検定した。また、The Cancer Genome Atlas (TCGA) のデータ (<http://www.cbioportal.org/>) を用いて播種因子が予後因子となるかどうかも検討した。

4. 研究成果

転移・播種を伴う GBM 22 例 (M/D(+)) 群) および転移・播種のない GBM 53 例 (M/D(-)) 群) を用いて、23 個の miR の発現量を real-time PCR で解析したところ、8 個の miR (miR-7, miR-29b, miR-34a, miR-101, miR-124, miR-128a, miR-137, miR-218) が転移・播種例で有意に減少していた。(Figure 1)

そこで、バイオインフォマティクス web サイト (miRanda) を用いて、これら 8 個の miR の組み合わせに対する最も可能性の高い標的遺伝子を検索すると stanniocalcin-1 (STC1) が抽出できた。STC1 は分泌型蛋白で、カルシウムとリンの恒常性を調整している。STC1 は乳がんや卵巣癌

などいくつかの癌で高発現し、腫瘍の増殖と転移に関係があることが報告されている。そしてその8個のうち4個のmiR (miR-29b, miR-34a, miR-101, miR-137) はSTC1 の mRNA に結合部位を有することが予測された。(Figure 2)

リアルタイム RT-PCR 分析によって、これら4個のmiR mimicによりSTC1 の mRNA 発現抑制が確認できた。反対に、miR-29b, miR-34a, miR-101 の inhibitor により、STC1 の mRNA 発現量は上昇した。STC1 は分泌蛋白であるため、GBM 細胞の培養液中の STC1 濃度を ELISA で測定すると、時間経過とともに増加がみられたが、miR-29b, miR-34a, miR-101, miR-137 の mimic は培養液中の STC1 濃度を減少させた。一方で、miR inhibitor では miR-29b と miR-34a のみ STC1 の増加を見なかったが、これは U87 細胞中に miR-101 および miR-137 の発現がもともと低いためと考えられた。この結果より、これら4個のmiR の組み合わせが GBM 細胞における STC1 発現レベルを調整していることが確認できた。(Figure 2)

次に、U87 細胞を用いて migration assay および invasion assay を行った。siRNA で STC1 をノックダウンした U87 細胞では、STC1 をノックダウンしなかったコントロールと比較し、migration および invasion を有意に減少させた。(Figure 3)

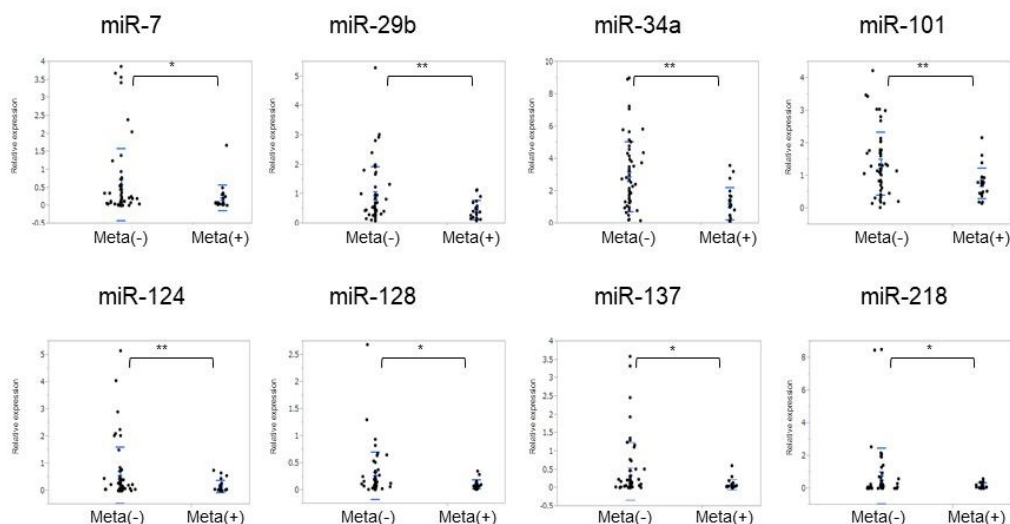
前述の76例のGBMについて、real-time RT-PCR を用いて転移・播種を伴うGBM と転移・播種を伴わないGBM との間で STC1 の mRNA 発現量を比較した。結果は、転移・播種を伴うGBM では転移・播種を伴わないGBM に比べ STC1 mRNA 発現量が有意に高いことが示された。免疫組織染色においては、転移・播種を伴うGBM の多くが、腫瘍細胞中に STC1 の強発現がみられた。一方で、腫瘍周囲組織においては STC1 蛋白の発現レベルはすべてにおいて低かった。これらの結果より、STC1 が GBM における転移・播種を促進する分子の一つであることが示唆される。(Figure 4)

STC1 の下流分子を同定するために、U87 細胞に STC1 リコンビナント蛋白を投与し、microarray 解析を行ったところ、PRDM6、PPF1A2、BTNL3、AXDND1、RUFY4、RBMXL3 などの分子の発現上昇を認め、SMCR8、BCL2L15、SLC5A7、MRGPRG、C2、MYBPH、COLQ、PDPK1 の発現低下を認めた。

STC1 は分泌型糖蛋白であるため、様々なグレードの神経膠腫患者において治療前の髄液中の STC1 濃度を測定したところ、低悪性度神経膠腫患者と比較して高悪性度神経膠腫患者では髄液中の STC1 濃度が有意に高いことが分かった。(Figure 5) さらに、GBM の中でも、転移・播種を起こしたGBM は起こしていないGBM と比較すると髄液中 STC1 レベルは有意に高かった。(Figure 5)

最後に、GBM 患者を STC1 発現量の中央値によって2群(高発現群、低発現群)に分けて、Kaplan-Meier 法で STC1 mRNA 発現レベルと予後との関連を分析したところ、STC1 の高発現群では全生存期間が有意に短かった。The Cancer Genome Atlas (TCGA) においても、STC1 高発現群は有意に生存期間が短かった。(Figure 6)

Figure 1



M/D(+)群で有意に低下していたmiRs

Figure 2

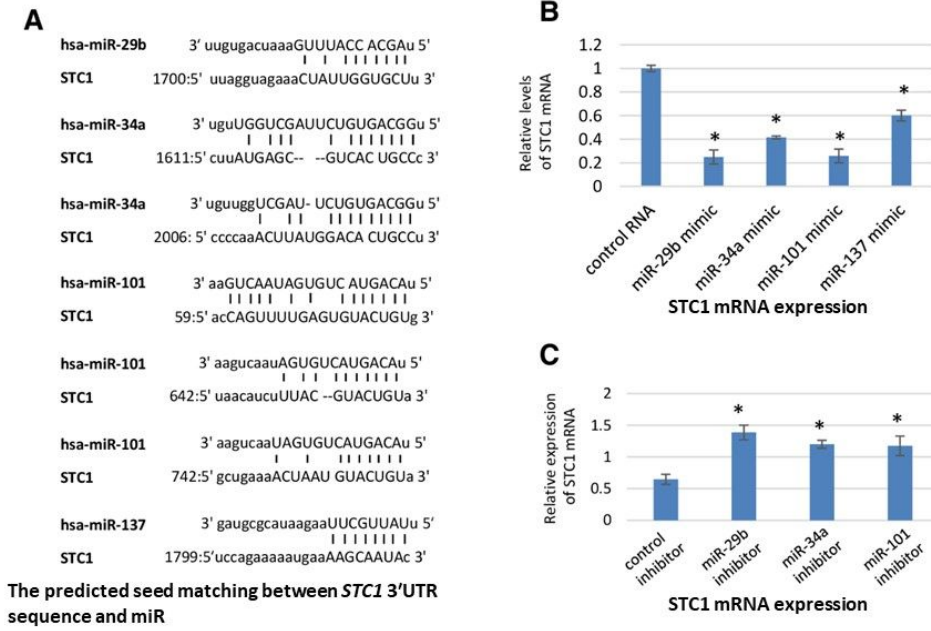


Figure 3

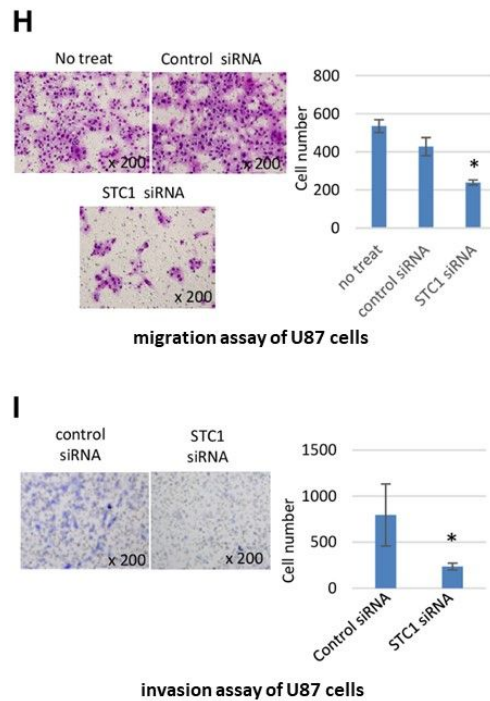


Figure 4

結果

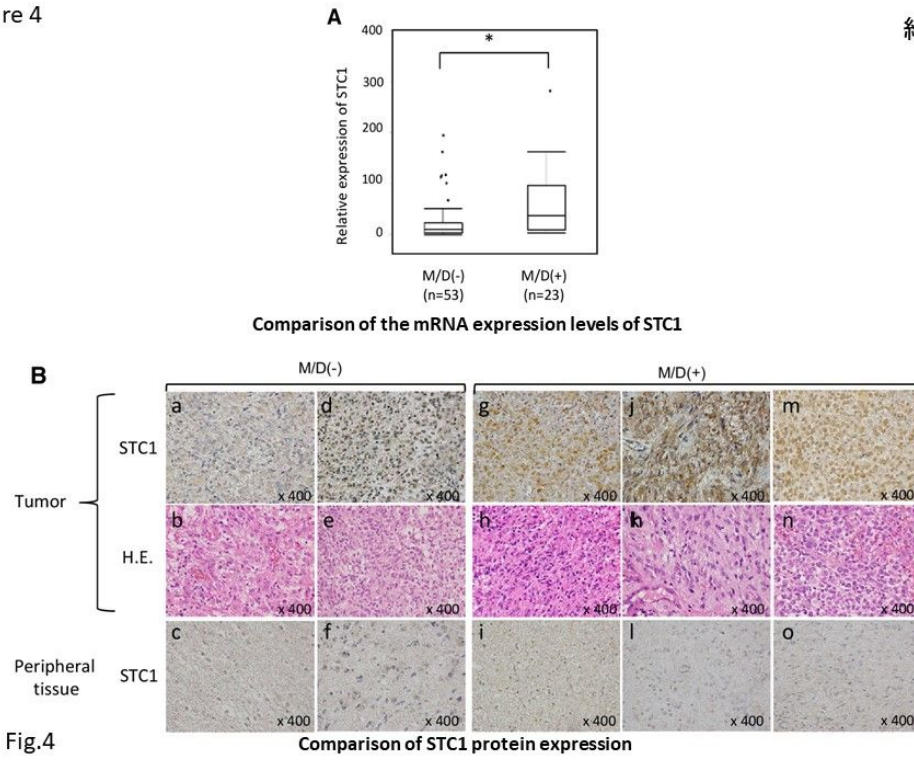


Figure 5

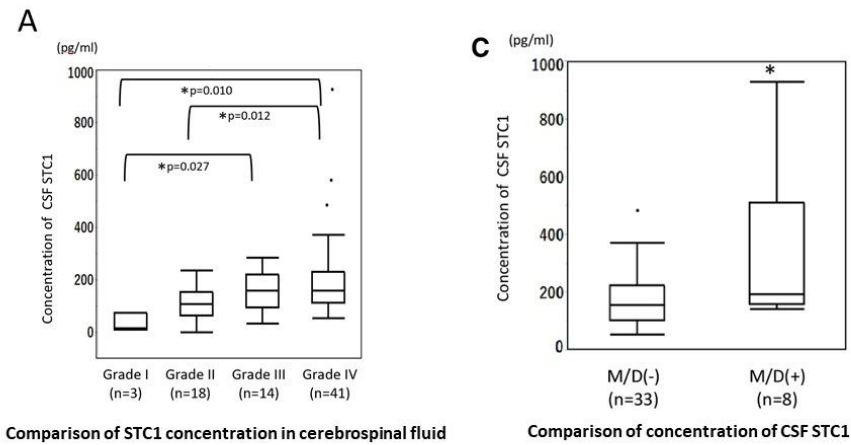
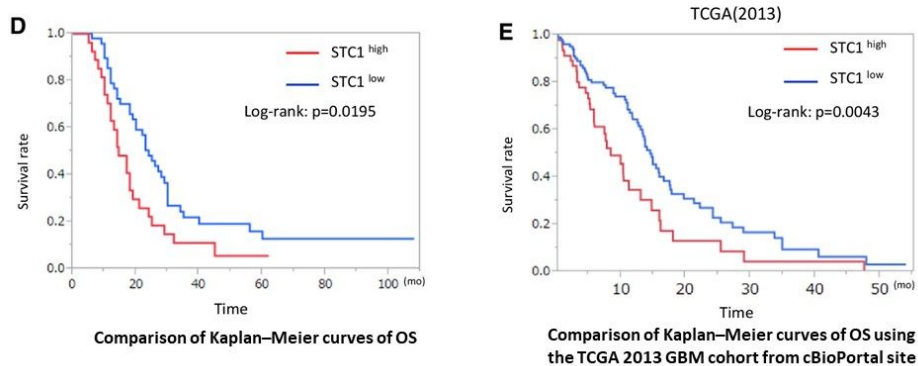


Figure 6



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12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 Junichi Sakata, Takashi Sasayama, Kazuhiro Tanaka, Hiroaki Nagashima, Mitsutoshi Nakada, Hiroto Tanaka, Naoya Hashimoto, Naoki Kagawa, Manabu Kinoshita, Satoshi Nakamizo, Masahiro Maeyama, Masamitsu Nishihara, Kohkichi Hosoda, Eiji Kohmura	4. 巻 142
2. 論文標題 MicroRNA regulating stanniocalcin-1 is a metastasis and dissemination promoting factor in glioblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurooncol.	6. 最初と最後の頁 241-251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11060-019-03113-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka H, Yamamoto D, Mizukawa K, Kanamori A, Chihara N, Matsuoka R, Hara S, Hirose T, Sasayama T, Kohmura E.	4. 巻 28
2. 論文標題 A 39-year-old female with cerebellar tumor and visual disturbance.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Pathol.	6. 最初と最後の頁 1027-1028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bpa	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka H, Yamamoto D, Ikeda M, Morikawa M, Ueda K, Tanaka K, Sasayama T, Kohmura E	4. 巻 54
2. 論文標題 Embryonal brain tumor with unknown primary lesion and massive cerebrospinal fluid dissemination: A case report.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Neurosci.	6. 最初と最後の頁 125-128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jocn	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kimura H, Taniguchi M, Hayashi K, Fujimoto Y, Fujita Y, Sasayama T, Tomiyama A, Kohmura E.	4. 巻 121
2. 論文標題 Clear Detection of Thin-Walled Regions in Unruptured Cerebral Aneurysms by Using Computational Fluid Dynamics.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurg.	6. 最初と最後の頁 e287-e295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2018.09.098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Y, Hosoda K, Imahori T, Tanaka J, Matsuo K, Nakai T, Irino Y, Shinohara M, Sato N, Sasayama T, Tanaka K, Nagashima H, Kohta M, Kohmura E.	4. 巻 1687
2. 論文標題 Pentose phosphate pathway activation via HSP27 phosphorylation by ATM kinase: A putative endogenous antioxidant defense mechanism during cerebral ischemia-reperfusion.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Res.	6. 最初と最後の頁 82-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2018.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Y, Hosoda K, Imahori T, Tanaka J, Matsuo K, Nakai T, Irino Y, Shinohara M, Sato N, Sasayama T, Tanaka K, Nagashima H, Kohta M, Kohmura E.	4. 巻 1687
2. 論文標題 Pentose phosphate pathway activation via HSP27 phosphorylation by ATM kinase: A putative endogenous antioxidant defense mechanism during cerebral ischemia-reperfusion.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Res	6. 最初と最後の頁 82-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2018.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kohta M, Fujita A, Tanaka J, Sasayama T, Hosoda K, Kohmura E.	4. 巻 S1878
2. 論文標題 Novel Segmentation of Placed Coils in the Treatment of Cavernous Sinus Dural Arteriovenous Fistulas Provides a Reliable Predictor of the Long-Term Outcome in Abducens Nerve Palsy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World Neurosurg	6. 最初と最後の頁 30179-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2018.01.136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto H, Fujita A, Imahori T, Sasayama T, Hosoda K, Nibu KI, Kohmura E.	4. 巻 8
2. 論文標題 Focal hyperintensity in the dorsal brain stem of patients with cerebellopontine angle tumor: A high-resolution 3T MRI study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-19232-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagashima H, Sasayama T, Tanaka K, Kyotani K, Sato N, Maeyama M, Kohta M, Sakata J, Yamamoto Y, Hosoda K, Itoh T, Sasaki R, Kohmura E.	4. 巻 136
2. 論文標題 Myo-inositol concentration in MR spectroscopy for differentiating high grade glioma from primary central nervous system lymphoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurooncol.	6. 最初と最後の頁 317-326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11060-017-2655-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imahori T, Hosoda K, Nakai T, Yamamoto Y, Irino Y, Shinohara M, Sato N, Sasayama T, Tanaka K, Nagashima H, Kohta M, Kohmura E.	4. 巻 349
2. 論文標題 Combined metabolic and transcriptional profiling identifies pentose phosphate pathway activation by HSP27 phosphorylation during cerebral ischemia.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuroscience.	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2017.02.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minami N, Maeda Y, Shibao S, Arima Y, Ohka F, Kondo Y, Maruyama K, Kusuhara M, Sasayama T, Kohmura E, Saya H, Sampetean O.	4. 巻 11
2. 論文標題 Organotypic brain explant culture as a drug evaluation system for malignant brain tumors.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Me	6. 最初と最後の頁 2635-2645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.1174	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maeyama M, Sasayama T, Tanaka K, Nakamizo S, Tanaka H, Nishihara M, Fujita Y, Sekiguchi K, Kohta M, Mizukawa K, Hirose T, Itoh T, Kohmura E.	4. 巻 10
2. 論文標題 Multi-marker algorithms based on CXCL13, IL-10, sIL-2 receptor, and 2-microglobulin in cerebrospinal fluid to diagnose CNS lymphoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Med	6. 最初と最後の頁 3048-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3048	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 篠山隆司、田中一寛、前山昌博、藤田祐一、西原賢在、甲村英二
2. 発表標題 膠芽腫における髄腔内播種の予測因子と予防手段
3. 学会等名 一般社団法人 日本脳神経外科学会 第77回学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠山隆司、田中一寛、前山昌博、甲村英二
2. 発表標題 当院における悪性グリオーマに対するペバシズマブ治療の現状と課題
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第76回学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takashi Sasayama ¹ , Kazuhiro Tanaka ¹ , Masamitsu Nishihara ² , Satoshi Nakamizo ³ , Hiroaki Nagashima ⁴ , Eiji Kohmura ¹
2. 発表標題 CXCL13 in cerebrospinal fluid (CSF) as a biomarker for primary central nervous system lymphoma (PCNSL).
3. 学会等名 The 14th Meeting of the Asian Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takashi Sasayama, Masaaki Kohta, Kazuhiro Tanaka, Masahiro Maeyama, Hiroaki Nagashima, Tomoaki Nakai, Eiji Kohmura
2. 発表標題 Intraoperative magnetic resonance spectroscopy (iMRS) for glioma surgery
3. 学会等名 the 22nd Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology (国際学会)
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	甲村 英二 (Kohmura Eiji) (30225388)	神戸大学・医学研究科・教授 (14501)	
研究分担者	田中 一寛 (Tanaka Kazuhiro) (70467661)	神戸大学・医学研究科・助教 (14501)	
研究分担者	水川 克 (Mizukawa katsu) (80403260)	神戸大学・医学部附属病院・非常勤講師 (14501)	