

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10869

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫浸潤開始因子の脳血液関門モデルを用いた探索

研究課題名(英文) Exploration of malignant glioma infiltration factor using a blood-brain barrier model

研究代表者

松尾 孝之 (MATSUO, TAKAYUKI)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：00274655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：悪性神経膠腫は高い増殖能力および浸潤能力をもち、5年生存率8%未満の難治性腫瘍である。本研究は、腫瘍浸潤を規定するたんぱく質を同定し治療薬の開発へ繋ぐことを目標とした。規定タンパクの候補を探索するため脳血液関門モデル腫瘍細胞株に虚血下で起こる遺伝子発現およびタンパク発現を解析しpaxillinを選出した。本タンパクの浸潤性への関与を実験的に確認した後、これを抑制する事で浸潤能が低下するかどうかを検討したが、運動量が、低下することは確認できたが、統計学的および病理組織学的な検討では有意な浸潤の抑制は確認できなかった。しかし、本タンパクは細胞浸潤に関わる重要なタンパクである事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性神経膠腫に対して2013年抗VEGF抗体が保険認可され、その血管新生阻害作用による抗腫瘍効果が期待されている。しかし本腫瘍が本来持つ治療抵抗性を考えた場合、血管新生阻害に伴う虚血環境に反応し、腫瘍細胞が浸潤能を高めて脳内への浸潤・転移をすることにある。腫瘍細胞の浸潤規定因子については、現在まで解明されていない。本研究では、腫瘍細胞が虚血に伴い細胞浸潤の開始行動を規定するタンパクを同定し、これを阻害する事で悪性神経膠腫治療法の開発に繋げるためのトランスレショナルリサーチである。

研究成果の概要(英文)：Malignant glioma is a refractory tumor with very high proliferative and infiltrative capacity. The 5-year survival rate is less than 8%. This study aimed to identify the proteins that regulate tumor infiltration, and develop therapeutic agents. We selected paxillin as a candidate for the defined protein based on the gene and protein expression analysis under ischemia in tumor cell lines on the cerebral blood barrier model. The involvement of this protein in infiltration was experimentally confirmed. Next, we examined whether the infiltration ability of the tumor was lost by suppressing paxillin. As a result, it was confirmed that the motor ability of the tumor decreased. However, statistical and histopathological studies did not confirm a significant suppression of infiltration capacity. This protein may be an essential protein involved in cell infiltration from these results.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：グリオーマ 腫瘍浸潤 脳血液関門

## 1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は、原発性脳腫瘍の中で比較的高頻度に遭遇する腫瘍で、非常に高い増殖能をもち、病理学的には pseudopalisading と necrosis がみられるのが特徴である。周囲脳への浸潤能が強く、腫瘍の境界が存在しないため手術のみで完全に摘出することは不可能である。このために、放射線照射と化学療法を組み合わせた集学的治療が行われている。また、豊富な血管新生能を持ち、腫瘍周囲には豊富な腫瘍血管網をはじめとした腫瘍微小環境が形成されている。診断や治療技術が進歩しているにもかかわらず 5 年生存率は 7.2% 程度であり、いまだ十分な治療成績が得られていないのが現状である。2013 年には、血管新生の抑制を目的とした VEGF を標的とする分子標的薬である bevacizumab が保険収載され臨床でつかえるようになった。bevacizumab には、血管新生抑制作用の他に、腫瘍血管の血管透過性を改善して浮腫を改善させるスーパーステロイドとしての働きも期待されている。しかしながら、VEGF 以外の FGFs や angiopoietin, epharin などの血管新生経路による代償がおこったり、骨髄からの血管内前駆細胞が動員されたり、腫瘍の浸潤能が増強することなどによって治療抵抗性発現がみられる。このために bevacizumab を用いた悪性神経膠腫の治療をおこなっても平均生存期間は 15 カ月程度であり満足のいく状態ではない。

## 2. 研究の目的

今回の目的は、腫瘍細胞が虚血に伴い細胞浸潤開始のために発現するシグナルを新たに脳血液関門モデル上で明らかにすることである。腫瘍の浸潤能亢進に関与するタンパクの中から候補タンパクを絞り、これを siRNA で阻害する治療実験を in vivo で行う。浸潤抑制という新たな悪性神経膠腫治療法へのトランスレーショナルリサーチをめざす。

## 3. 研究の方法

すでに悪性神経膠腫に関して、腫瘍細胞の浸潤性を亢進させる insulin-like growth factor や Integrin, Crkl などの複数のタンパクが知られている。いままで調べられていない腫瘍細胞と血管内皮細胞やペリサイトとの inter-action を脳血液関門モデルで調べることで、虚血時に起こる浸潤メカニズムを明らかにする。

- (1) 抗血管新生薬使用に伴う虚血で特異的に発現がみられるタンパクを網羅的に調べる。この中から、腫瘍細胞の浸潤能亢進と関係が強いものを絞り込んでいく。
- (2) 抗血管新生薬使用に伴う虚血で腫瘍細胞の浸潤性亢進の原因となるタンパクを固定する。
- (3) このタンパクの機能を確認するために、in vitro で腫瘍細胞株の migration assay を行い、このタンパクで浸潤のスイッチが入るか、また、用量依存性に浸潤能亢進が起こるか観察を行う。
- (4) このタンパクの働きを阻害するため siRNA の作成を行う。さらに in vitro でこのタンパクによって亢進した浸潤能が siRNA を行うことによって抑制することが可能であるのかを確認する。
- (5) in vivo での治療実験は臨床で使用されている抗血管新生薬である bevacizumab と今回作成した浸潤能を制する siRNA を concomitant に使用することで抗腫瘍効果の増強が得られるか Kaplan-Meyer を作成し調べる。

## 4. 研究成果

### (1) 脳血液関門モデル腫瘍細胞株に虚血下で起こる遺伝子発現およびタンパク発現の解析

アストロサイトとペリサイトの間の接着に注目し、虚血などによって誘導させる浸潤を開始するためのシ

グナルを探索するために、細胞株(U87 EGFR)を従来の cell culture 上および脳血関門モデル上において虚血下で培養を行い両細胞株のそれぞれでプロテオミクス解析を行った。Cell culture モデルから 1,485 種、脳血関門モデルから 1,035 種のタンパク分子を同定し、その中で脳血関門モデル群と cell culture モデル群の 2 群間で 2 倍以上かつ Wilcoxon 検定  $p < 0.05$  と統計学的優位に発現量が異なるタンパク 49 種を同定した。更にデータ検索等により浸潤機能亢進の原因となる候補タンパク 6 種を絞り込んだ。更に脳血関門モデル群において高値を示した 3 種、低値を示した 2 種を候補タンパクとして絞り込んだ。候補タンパクにそれぞれに対して腫瘍細胞、血管内皮細胞および基底膜細胞それぞれから mRNA を抽出し qPCR にて mRNA レベルでの標準酸素状態と虚血時での発現を定量化した。

#### (2)候補タンパクの絞り込み

前実験で得られた腫瘍細胞の浸潤脳亢進に関する候補タンパクに対して、標準時と虚血時での mRNA レベルの差を ANOVA with Bonferroni's post-test の結果をもとに、コントロールとの有意差が大きいものから順に、可能性の高い、annexin と paxillin の 2 種類のタンパクを候補タンパクとして絞り込んだ。annexin はエネルギー代謝に関与することが知られているタンパクであり、また、paxillin は細胞骨格である actin の形成にかかわるタンパクであることが知られている。いずれのタンパクも、今までの論文を検索する中では glioma の浸潤に直接かかわることが示されておらず、新たな脳血液関門をもつ脳に特異的な浸潤に関与するタンパクである可能性を考えた。ここで、我々は、「血管と接着しているグリオーマ細胞は、虚血下における浸潤開始時に paxillin を発現して、actin を細胞接着型から浸潤型へ変化させている」との新たな仮説をたて vivo の実験へと進むこととした。

#### (3)候補タンパクの confirmation

GFP (Glial fibrillary acidic protein) を導入した U87 EGFR-GFP を使用した。一方で、プラスミドベクターを用いた paxillin を強制発現させた U87 EGFR-paxillin DeRed を作成して比較実験を行った。U87 EGFR-paxillin DeRed はその分裂能は U87 EGFR-GFP と比べて著しく損なわれていた。このために U87 EGFR-paxillin-GFP を作成した。しかしながら U87 EGFR-paxillin-GFP の分裂能も U87 EGFR-GFP と比較して損なわれていた。トランスフェクションの操作そのものによる細胞の機能障害の可能性を考えた。このため、ほかのトランスフェクションの方法も検討したが行なわず、(4)抑制実験での証明を行うこととした。また、マトリジェル上で細胞移動距離をタイムプラスで観察を行ったが、U87 EGFR-paxillin-GFP の細胞移動能は、U87 EGFR-GFP に著しく劣っていた。この原因もトランスフェクションそのものによる問題の可能性を考えた。

#### (4)候補タンパクの抑制実験

paxillin の発現を抑制するために、siRNA の手法を用いて U87 EGFR-si-paxillin-GFP を作成した。U87 EGFR-si-paxillin-GFP と比較して細胞分裂能にはほとんど差は見られなかった。このために、マトリジェル上での細胞移動を観察する Cell viability assay に移行した。タイムラプスの手法を用いて観察を行ったが、U87 EGFR-si-paxillin-GFP のほうが細胞移動能力が有意に低下していることを確認できた。このために、U87 EGFR-si-paxillin-GFP を nude mouse の脳内に transplantation して腫瘍を作成し、day28 で sacrifice して取り出した脳組織からスライスカルチャーを行い、タイムラプスの腫瘍で GFP 陽性細胞の動きの観察を行った。ここでも、U87 EGFR-si-paxillin-GFP は U87 EGFR-GFP と比較して細胞移動能力を失っていることが確認できた。この結果をもって survival 実験に進むこととした。

#### (5)抗浸潤薬を使用することによる病理像の変化

まずは nude-mouse の脳内に U87 EGFR-si-paxillin-GFP を transplantation することで腫瘍モデルの作成を行った。先ほどのスライスカルチャーの実験でも腫瘍モデルの作成を行っているが、腫瘍を形成するために必要な細胞数は、U87 EGFR-GFP と比較して  $10^2$  必要であった。また、腫瘍が大きくなるのにも時間がかかり、Day28 で 4mm 径の腫瘍を形成することができた。その辺縁を観察したが、腫瘍

の境界は従来の腫瘍モデルと同様であり、腫瘍細胞の脳実質内への浸潤や脳梁を超えての対側への浸潤は観察することができなかった。できた腫瘍細胞の病理組織学的検討を行った。ヘマトキシリンエオジン染色での所見は U87 EGFR-GFP と U87 EGFR-si-paxillin-GFP で差が見られなかった。Mib1-LI や GFAP の発現、paxillin の発現などについても検討を行ったが、いずれの細胞でも paxillin は染色されず明らかな差を認めることはできなかった。

#### (6)Survival 実験

対照との腫瘍形成に必要な細胞数が異なるために、survial 実験での Kaplan-Meier を作成しなかった。U87 EGFR-si-paxillin-GFP を transplantation した mouse の生存は、腫瘍形成に時間がかかることもあって生存期間が長い傾向にあることが確認できている。

#### まとめ

グリオーマ細胞株 (U87 EGFR) が虚血下で血管内皮細胞および血管周皮細胞との接着を離し浸潤を開始するときに発現するタンパクを同定するために、通常培養および低酸素培養下それぞれでマトリジェル上と脳血液関門モデル上の細胞株のプロテオミクス解析を行った。2DGE 上に抽出したタンパクで、培地条件で差があり、かつ脳血液関門の培養条件で差が得られた 49 種に qPCR で定量化を行なった。Wilcoxon 検定を行い 2.5times を cut off 値として候補タンパクを絞り込み、最終的に ANOVA with Bonferroni post-test の結果をもとに paxillin に対して研究を進めることとした。paxillin の機能の confirmation 目的で siRNA の手法を用いて U87 EGFR-si-paxillin を作成し、cell viability assay と scratch assay を行い機能が失われていないことを確認した。次に U87 EGFR-si-paxillin-GFP を作成して mouse 脳内に移植。腫瘍形成後に MCA 一時閉塞による虚血群と sham operation 群それぞれの組織を slice culture として U87 EGFR-si-paxillin-GFP の運動を timelapse で観察した。U87 EGFR-si-paxillin-GFP の運動低下は U87 EGFR-GFP と比較して明らかであったが、虚血群と sham op 群での U87 EGFR-si-paxillin-GFP の運動の差を統計学的に証明することはできなかった。U87 EGFR-si-paxillin-GFP を移植した nude mouse の病理組織像の観察を行ったが、虚血群と sham op 群では腫瘍辺縁の性状や腫瘍塊の外にある細胞数、核分裂数、Mib1-LI などに差を認めなかった。このために survival 実験は行っていない。paxillin は actin の形成にかかわり細胞浸潤に重要なタンパクであると考えられ、今後遠隔再発を認める臨床症例での発現を観察するなど研究を続けていく。

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 0件）

1. 著者名 Ujifuku K, Fujimoto T, Sato K, Morofuji Y, Muto H, Masumoto H, Nakagawa S, Niwa M, Matsuo T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Exploration of Pericyte-Derived Factors Implicated in Lung Cancer Brain Metastasis Protection: A Pilot Messenger RNA Sequencing Using the Blood-Brain Barrier In Vitro Model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Mol Neurobiol.	6. 最初と最後の頁 997-1004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10571-020-00988-y.	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 -

〔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 吉田光一、吉田道春、馬場史郎、氏福健太、日宇健、松尾孝之
2. 発表標題 Neurofibromatosis Type I を合併する high grade glioma 症例の検討
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsunaga Y, Nakagawa S, Morofuji Y, Fujimoto T, Sato K, Watanabe D, Horie N, Izumo T, Niwa M, Matsuo T.
2. 発表標題 A cell culture based model of the blood-brain barrier to study brain metastatic potential
3. 学会等名 2nd Mini-symposium on the blood brain barrier from basic to clinical research
4. 発表年 2020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	梅野 哲也 (UMENO TETSUYA) (00737273)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・研究協力員  (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	吉田 光一 (YOSHIDA KOICHI)  (20393457)	長崎大学・病院（医学系）・助教  (17301)	
研究分担者	氏福 健太 (UJIFUKU KENTA)  (20437867)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・助教  (17301)	
研究分担者	馬場 史郎 (BABA SHIRO)  (30530430)	長崎大学・病院（医学系）・助教  (17301)	
研究分担者	鎌田 健作 (KAMADA KENSAKU)  (30549655)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・講師  (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関