

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K16639
研究課題名(和文) 髄膜腫の進展を制御するがん関連線維芽細胞への分化を司る足場メカノセンサー機構

研究課題名(英文) Mechano-sensor system of extracellular matrix to control cancer-associated fibroblast differentiation regulating meningioma progression

研究代表者
棚橋 邦明 (Tanahashi, Kuniaki)
名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90790717
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：頭蓋底部に発生する髄膜腫はNF2遺伝子変異を起源とせず、機能的予後不良の進展様式を示すため、その機序解明が望まれる。頭蓋底部に発生した髄膜腫の免疫組織染色において、間葉系幹細胞の未分化マーカーとして報告されているMeflinの発現が有意に高いことが示された。また、髄膜腫組織のHippo pathway関連タンパク発現パターンや、NF2遺伝子変異のない髄膜腫細胞株における細胞外基質硬度調整によるYAPの活性化所見と合わせ、NF2遺伝子が機能する髄膜腫は細胞の足場硬度を感知する発育進展様式を示すこと、それに対する未分化間葉系幹細胞の関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭蓋底部に発生する髄膜腫は、外科的な摘出が難しいことに加え、硬膜に沿って進展し脳神経を巻き込み障害するため、組織学的に良性であっても機能的予後不良となる。頭蓋底部に発生する髄膜腫は髄膜腫に代表的なNF2遺伝子変異とは異なる遺伝子変異を起源とすることが報告されているが、進展様式との関連は明らかにされていない。本研究により、機能的予後不良の髄膜腫進展様式の解明へ向けた第一歩となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Meningiomas that arise from skull base regions show poor functional prognosis because they grow along dura mater and involve cranial nerves. They do not have NF2 gene mutations and mechanisms of the growth pattern should be clarified. Immunohistochemistry of meningiomas from skull base regions showed high expression of Meflin which is reported to be an undifferentiation marker of mesenchymal stem cells. The expression pattern of Hippo pathway-related proteins showed normal NF2 gene function in those meningiomas. Stiffness modulation of extracellular matrix of meningioma cell lines without NF2 mutation implied mechanosensor function for their growth pattern. The results implied Meningiomas without NF2 mutation has mechanosensor function which is related to mesenchymal stem cells for their growth pattern.

研究分野：脳神経外科学関連

キーワード：髄膜腫 間葉系幹細胞 癌関連線維芽細胞 Meflin Mechanosensor Hippo pathway

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭蓋底部に発生する髄膜腫は脳表部に発生する髄膜腫に比べ、その局在から外科的切除が困難である場合が多い。中でも硬膜に沿った進展様式を示す en plaque meningioma は、脳神経を巻き込んで発育するため、組織学的に良性であっても機能的予後不良である (Whittle et al. The Lancet, 2004)。髄膜腫は約 60% が *NF2* 遺伝子変異をもつとされる一方、頭蓋底部に発生する髄膜腫の組織型サブタイプは多くが *NF2* 遺伝子変異のない Meningothelial meningioma とされている。*NF2* 遺伝子変異を原因とする神経線維腫症 II 型においても、頭蓋底部の髄膜腫発生は少ない。en plaque meningioma の発育様式をもたらす機構は *NF2* 変異ではなく、その詳細は解明されていない。

当研究室では en plaque meningioma の進展様式のメカニズム解明のため、Hippo pathway とその下流構成分子である Yes-associated protein (YAP) に着目した (Sekido, Pathol Int. 2011)。Hippo pathway は胎生期に臓器の大きさと形を制御し、上流には *NF2* 遺伝子がコードする Merlin が細胞膜関連分子として局在し、下流に位置する YAP による転写促進を制御する。Merlin 発現陽性の髄膜腫組織検体と細胞株を用いた検証 (Tanahashi et al. J Neuropathol Exp Neurol. 2015) では、細胞密度の高い腫瘍中心部の Merlin 高発現と YAP 低発現、および細胞密度の低い腫瘍辺縁部における Merlin の低発現と YAP 高発現の局在パターンが確認された。更にアクリルアミドゲルを用いた検証により、髄膜腫細胞において硬い足場が YAP を活性化し細胞増殖を促進することが示された。

NF2 変異のない髄膜腫における Hippo pathway の正常機能が確認されたため、本課題では (1) 腫瘍細胞の足場すなわち腫瘍内微小環境の構成因子としての間葉系幹細胞 (MSC) の役割を解明する。MSC は全身に分布して各種病態の形成に関わり、特に癌関連線維芽細胞 (CAF) として腫瘍増殖に果たす役割が注目されている。細胞表面マーカー (CD105/CD73/CD90) により同定された骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC) がグリオーマや他の癌腫での幹細胞性回復機能に寄与することが既に報告されており、髄膜腫検体においても BM-MSC が分離培養されたことが報告されている (Lim et al. Int J Oncol. 2013)。また、特異的な識別マーカーを持たないとされてきた MSC の特異マーカーとして近年報告された Meflin は、MSC の未分化の指標としての役割を持ち、腫瘍微小環境の中で癌抑制性 CAF から癌促進性 CAF への形質転換に伴い、発現が低下するとされる (Maeda et al. Sci Rep. 2016)。この形質転換には、細胞の足場・基質の硬さから Mechano-sensor としての YAP を介したシグナルの関与が示唆されている。細胞外基質の硬度が MSC の分化を誘導することは既に知られており (Halder et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012)、(2) 足場環境による腫瘍促進性 CAF への分化に果たす役割を解明することが重要と考えられる。

2. 研究の目的

頭蓋底部に発生する髄膜腫 (en plaque meningioma) が呈する硬膜に沿った進展様式を制御する腫瘍細胞の Mechano-sensor の機構解明のため、Hippo pathway の下流構成分子である Yes-associated protein (YAP) の機能に着目している。YAP は細胞の足場の硬さを反映して腫瘍増殖を制御することが報告されており、(1) YAP とその関連分子がこの進展様式をもたらす機構を明らかにすること、および (2) 腫瘍細胞の足場環境すなわち腫瘍内微小環境を作り出す間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell, MSC) が担う役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、髄膜腫 (特に en plaque meningioma) において MSC が腫瘍増殖および進展促進に果たす役割を明らかにする。まず髄膜腫組織検体において Meflin、YAP の免疫組織染色を行い、髄膜腫組織内の MSC 由来細胞の存在やその局在パターンにつき調査する。髄膜腫の組織型、発生部位ごとに染色パターンの変化を明らかにする。また、摘出難易度が高い頭蓋底部髄膜腫の摘出・検体採取方法の工夫を検討する。髄膜腫組織内 MSC の存在が確認されたら、髄膜腫検体から Meflin を識別マーカーとして、MSC を抽出し分離培養できることを確認する。従来の BM-MSC マーカーを用いた報告では、組織学的に悪性の髄膜腫からの分離培養に成功している。次に in vitro において髄膜腫細胞株を MSC と共培養する。MSC における Meflin 発現の経時的低下を指標として、腫瘍促進性 CAF への分化・形質転換が腫瘍増殖促進に果たす役割を明らかにする。同時に MSC と髄膜腫細胞の双方における YAP と関連タンパク発現を免疫細胞染色法、ウェスタンブロットティング法、定量 PCR 法を用いて解析し、YAP が MSC から CAF の形質転換と腫瘍増殖促進に果たす役割を明らかにする。さらにアクリルアミドゲルを用いて、髄膜腫と MSC の共培養における細胞の足場 (細胞外基質) の硬度調節を行うことで、基質硬度の変化が Mechano-sensor としての YAP signal を介して CAF の分化に果たす役割を検証する。in vivo においては、髄膜腫細胞株を MSC と共培養後、胸腺欠損マウスの頭蓋内に接種し髄膜腫モデルを作成する。腫瘍移植部位を脳表硬膜下と頭蓋底部に分けてマウスモデルを作成する。腫瘍促進性 CAF が髄膜腫の成長や進展様式にもたらす作用、頭蓋底部および脳表で髄膜腫成長の足場となる硬膜からの Mechanical な刺激が YAP を介して腫瘍進展様式に果たす役割を明らかにする。

4. 研究成果

髄膜腫摘出検体における免疫染色では、Meflin 発現の局在パターンに特異性は認めなかった。髄膜腫の組織グレード、増殖能(Ki-67)、初発・再発で検討した結果、Meflin 発現には有意差を認めなかった。髄膜腫発生部位として頭蓋底正中部とその他で分類すると、Meflin 発現に有意差を認めた(図1)。頭蓋底正中部発生の髄膜腫の免疫染色において、腫瘍辺縁部におけるYAP発現および腫瘍中心部でのMerlin発現のパターンが認められ、NF2機能の保持が示唆された。また、摘出難易度の高い頭蓋底部発生髄膜腫の検体採取法につき、安全性の高い新たな手法を開発した。

髄膜腫の初代培養を複数症例で試みたものの、安定した培養は困難であった。また、フローサイトメトリーを用いたMSCの分離培養についても、安定した培養は困難であった。NF2遺伝子変異のない既存の髄膜腫細胞株を用いたアクリルアミドゲル上での培養実験では、複数株(IOMM-Lee、HKBMM)において細胞外基質硬度に応じてYAPの核内発現すなわちその活性化が示された(図2)。NF2遺伝子が機能する髄膜腫細胞株において、Mechanicalな刺激を感知して細胞増殖する機構が示唆された。髄膜腫の初代培養が困難であったため、それに代わる培養方法につき検討した結果、新規培養方法確立し複数株の培養維持に成功している。

胸腺欠損マウスにおける髄膜腫モデル作成において、既存の細胞株(IOMM-Lee、HKBMM)の脳表部および頭蓋底部への生着が確認され、今後新規培養細胞における解析およびマウスモデル作成に期待される。

以上の結果より、頭蓋底正中部に発生する髄膜腫はNF2機能を維持するとともに、細胞の足場環境(足場硬度)が成長様式に関わる可能性があること、そこにMSCが関連する可能性が示唆された。

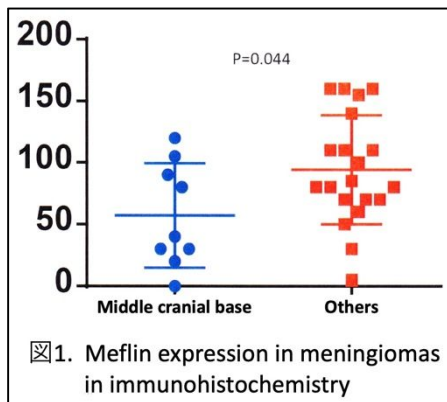


図1. Meflin expression in meningiomas in immunohistochemistry

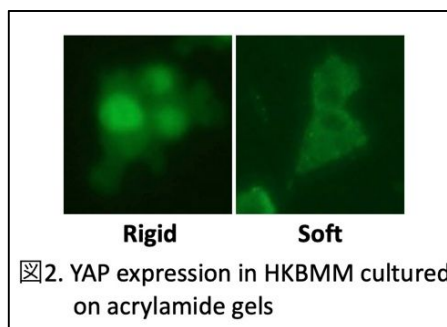


図2. YAP expression in HKBMM cultured on acrylamide gels

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 Tanahashi Kuniaki, Uda Kenji, Araki Yoshio, Takeuchi Kazuhito, Choo Jungsu, Chalise Lushun, Motomura Kazuya, Ohka Fumiharu, Wakabayashi Toshihiko, Natsume Atsushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Trautmann-focused mastoidectomy for a simple, safe presigmoid approach: technical note	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/2020.1.JNS193179	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 棚橋 邦明
2. 発表標題 鞍結節部髄膜腫に対する開頭術と経鼻内視鏡手術の術後成績の検討
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 棚橋 邦明
2. 発表標題 最小錐体骨削除によるpresigmoid approach
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanahashi Kuniaki
2. 発表標題 Usefulness of simple presigmoid exposure for cerebellopontine angle and brain stem lesions
3. 学会等名 WFNS SPECIAL WORLD CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 棚橋 邦明
2. 発表標題 経鼻開頭同時手術を行った頭蓋底腫瘍2症例の検討
3. 学会等名 第30回日本頭蓋底外科学会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----