

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16590

研究課題名(和文) glioblastomaにおけるFMNL1を中心とした新規浸潤・遊走機構の解明

研究課題名(英文) New invasion and migration mechanisms associated with FMNL1 in glioblastoma

研究代表者

比嘉 那優大(HIGA, Nayuta)

鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員

研究者番号：90792200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：217例の自験例とTCGAのデータでは、共にFMNL1は予後不良因子であった。GSEAではFMNL1は浸潤や遊走、アクチン重合に関連していた。FMNL1をノックダウンすると膠芽腫の浸潤・遊走能が抑制され、アクチン重合が阻害されることにより形態学的変化をもたらした。この時、mDia1とGM130は発現が低下しており、mDia1を介して遊走能を、GM130を介して浸潤能を制御していることを見出した。さらにFMNL1をノックダウンすることによる浸潤能抑制効果は、MMP9活性の低下と相関していた。FMNL1は膠芽腫の浸潤・遊走能を制御しており、治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は、悪性脳腫瘍の中で最も頻度が高く、高い増殖能、遊走・浸潤能が特徴である。FMNL1は、膠芽腫が悪性性質を獲得する上で重要な役割を果たしている可能性がある分子として我々が見出したアクチン重合因子である。膠芽腫の治療において、高い浸潤・遊走能は克服しなければならない大きな問題である。本研究は、これまで明らかにされていないFMNL1を中心とした新規の浸潤・遊走機構を解明することで、膠芽腫の新たな治療標的を同定できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to elucidate the FMNL1 function in the acquisition of malignant features of GBM. Our study showed FMNL1 was an independent predictor of poor prognosis in a cohort of 217 glioblastoma multiforme cases ($P < 0.001$). Furthermore, FMNL1 expression was significantly higher in the mesenchymal subtype. FMNL1 upregulation and downregulation were associated with mesenchymal and proneural markers in the GSEA, respectively. These data highlight the important role of FMNL1 in neural-to-mesenchymal transition. Contrarily, FMNL1 downregulation suppressed glioblastoma multiforme cell migration and invasion via DIAPH1 and GOLGA2, respectively. FMNL1 downregulation also suppressed actin fibers assembly, induced morphological changes, and diminished filamentous actin. FMNL1 is a promising therapeutic target and a useful biomarker for GBM progression.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：膠芽腫 FMNL1 浸潤・遊走能

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Glioblastoma (GBM) は、悪性脳腫瘍の中で最も頻度が高く、予後の悪い腫瘍である。現在使用可能な治療のみでは GBM を治療することが困難であり、さらなる新しい治療を模索することが必要な状況である。GBM は浸潤性に増大し、しばしば eloquent area に及ぶため、手術で除去できず、腫瘍細胞が浸潤・遊走して転移巣が出現し、腫瘍増大し死に至る。そのため GBM の治療において、高い浸潤・遊走能は克服しなければならない大きな問題である (J Neurooncol. 2004;70 (2):217-28)。腫瘍細胞の浸潤・遊走には運動能の亢進が重要であり、細胞動にはアクチン線維などから構成される細胞骨格のダイナミックな変化が関わっている。細胞遊走時にはアクチン線維の伸長が細胞膜を突出させる原動力となる。そして、多くのアクチン細胞骨格調節タンパク質が協調的に働き細胞遊走を制御しているが、腫瘍細胞においては、悪性化に伴いアクチン細胞骨格の動態を司る分子システムに異常が生じ、高い浸潤・遊走能を獲得すると考えられている (Oncogene (2005), 24, 1309-1319)。細胞浸潤に関して、腫瘍細胞は浸潤突起と呼ばれる構造を形成して細胞外基質を破壊し、浸潤・転移することが明らかになっている。浸潤突起の中心構造はアクチン線維であり、これを制御する様々なアクチン細胞骨格制御タンパク質が局在する。フォルミンファミリーは、細胞質分裂や細胞極性、アクチンストレス線維形成に必要なアクチン線維を供給するアクチン重合促進因子であり、腫瘍細胞の浸潤・遊走に関わる (Cell Cycle. 2015 Sep;14:17, 2835-2843)。フォルミンファミリーには 15 種類のタンパク質が存在し、7つのサブグループに分類される。The Cancer Genome Atlas (TCGA) のデータを用いてフォルミンファミリーを網羅的に解析を行い、FMNL1 が予後不良因子であることを同定した。

2. 研究の目的

以上の結果から、FMNL1 の機能に着目して、GBM の浸潤・遊走能におけるメカニズムとその意義を解明することを目的とした。

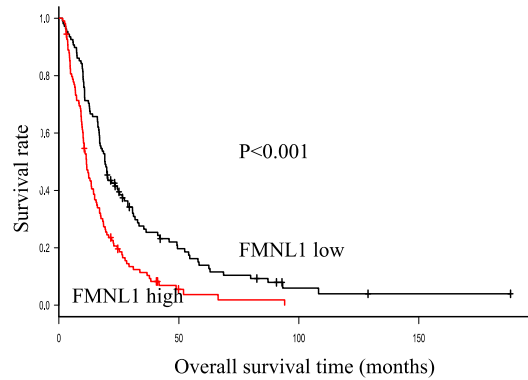
3. 研究の方法

- (1) 217 例の GBM 患者の病理検体を用いて、FMNL1 の免疫染色を行いその発現と臨床病理的因子と予後との関連の検討を行った。
- (2) The Cancer Genome Atlas (TCGA) の発現データベースを用いて予後解析や Gene set enrichment analysis (GSEA) を行った。
- (3) *in vitro* で FMNL1 をノックダウンし、遊走・浸潤能、Matrix metalloproteinases (MMP) 活性、重合アクチン (F アクチン) の染色と F アクチン/G アクチンの量的比較、形態学的変化の検討を行った。
- (4) FMNL1 を過剰発現させ、遊走・浸潤能の検討を行った。
- (5) FMNL1 の下流分子である DIAPH1 と GOLGA2 をノックダウンし同様の解析を行った。

4. 研究成果

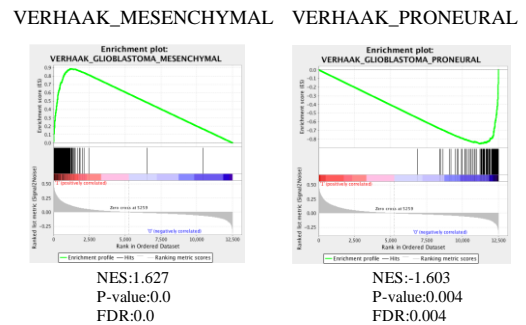
(1) FMNL1 発現と臨床学的特徴との検討

217 例の GBM 患者の病理検体を用いて、FMNL1 の免疫染色を行い FMNL1 の発現を検討した。FMNL1 高発現群では有意に予後不良であった。また FMNL1 高発現群では、高齢であり ($p=0.006$)、KPS が低く ($p=0.039$)、手術摘出度が低い ($p=0.01$) という特徴を有していたが、性差や腫瘍局在には差は見られなかった。



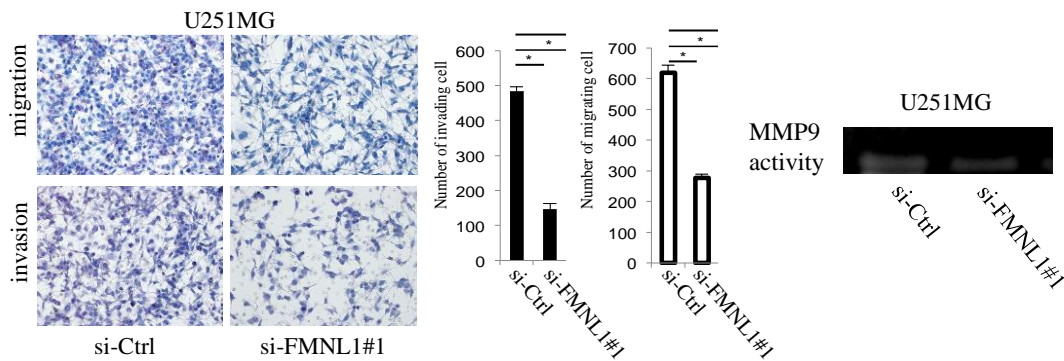
(2) TCGA データベースを用いた in silico 解析

TCGA データベースを用いて予後解析を行ったところ、FMNL1 高発現群は予後不良であった。また GSEA では FMNL1 は浸潤や遊走、アクチン重合に関連していた。また、FMNL1 高発現群は mesenchymal subtype に関連し、FMNL1 低発現群は proneural subtype に関連していた。



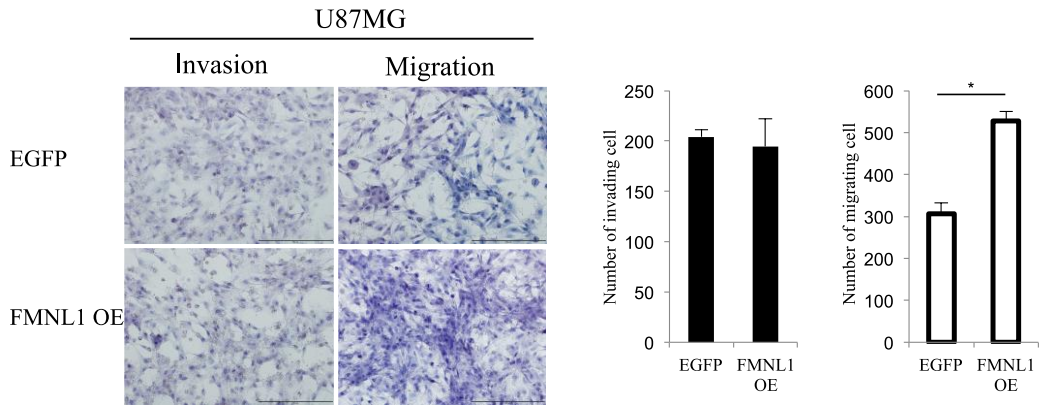
(3) FMNL1 の発現抑制による細胞への影響

FMNL1 が高発現している U251MG 細胞株と DBTRG-05MG 細胞株で、siRNA を用いて FMNL1 をノックダウンすると浸潤能、遊走能共に低下を認めた。またこの時、MMP9 活性も低下していた。また FMNL1 をノックダウンすると DIAPH1 と GOLGA2 の発現が低下した。



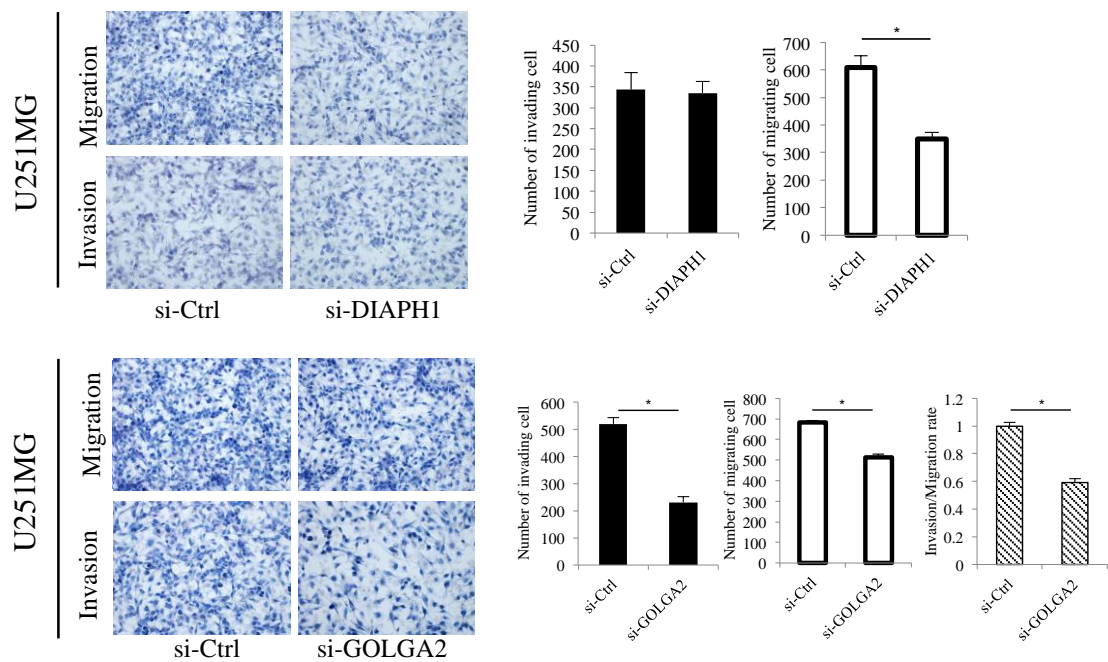
(4) FMNL1 の過剰発現による細胞への影響

FMNL1 の発現が低い U87MG 細胞株と KNS81 細胞株で、FMNL1 を過剰発現させると浸潤能は変化を認めなかったが、遊走能の亢進を認めた。この時、DIAPH1 の発現は亢進したが、GOLGA2 の発現は変化を認めなかった。また、FMNL1 過剰発現細胞株では mesenchymal subtype のマーカーの mRNA の上昇を認めた。



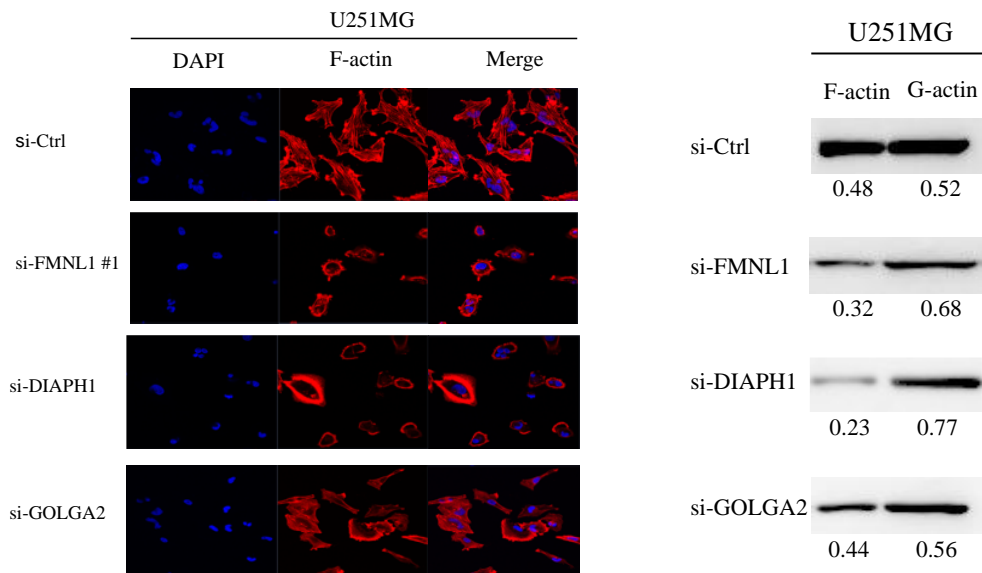
(5) DIAPH1 および GOLGA2 の発現抑制による細胞への影響

FMNL1 の下流分子である DIAPH1 をノックダウンすると遊走能のみが抑制され、FMNL1 の下流分子である GOLGA2 のノックダウンでは、主に浸潤能が抑制された。



(6) アクチン重合および細胞形態に及ぼす影響

FMNL1 をノックダウンすると、アクチン重合が減少し、形態学的変化を伴っていた。また FMNL1 の下流分子である DIAPH1 および GOLGA2 に対する siRNA を用いた検討の結果、DIAPH1 のノックダウンでアクチン重合が減少し、FMNL1 ノックダウン時と同様の細胞形態の変化を認めたのに対し、GOLGA2 のノックダウンではアクチン重合、細胞形態共に変化を認めなかった。



上記の研究成果より、本研究は、GBMにおけるFMNL1の発現と臨床学的因子の関連を検討したものであり、その結果FMNL1はGBMでの予後不良因子であった。In vitroではFMNL1の発現上昇はDIAPH1を介して遊走能を、GOLGA2を介して浸潤能を亢進させていた。またFMNL1はmesenchymal subtype GBMの良い分子マーカーであり、治療標的となる可能性が示唆された。

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 Nayuta Higa et al.	4. 巻 20
2. 論文標題 Formin-like 1 (FMNL1) Is Associated with Glioblastoma Multiforme Mesenchymal Subtype and Independently Predicts Poor Prognosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 6355
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20246355	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 1件）

1. 発表者名 比嘉 那優大
2. 発表標題 Glioblastomaにおけるアクチン重合因子であるFormin-like 1 (FMNL1)の機能解析
3. 学会等名 日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nayuta Higa
2. 発表標題 Function of Formin-like 1 (FMNL1) in Glioblastoma Multiforme
3. 学会等名 Society for neurooncology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 比嘉 那優大
2. 発表標題 Formin-like1(FMNL1)はGlioblastomaの独立した予後不良因子であり、浸潤・遊走能を促進させる
3. 学会等名 第77回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 比嘉 那優大
2. 発表標題 GlioblastomaにおけるFormin-like1(FMNL1)の機能について
3. 学会等名 第36回日本脳腫瘍学会
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
研究協力者	平野 宏文 (HIRANO Hirofumi)		
研究協力者	新里 能成 (SHINSATO Yoshinari)		
研究協力者	ムハンマド カミール (Muhammad Kamil)		
研究協力者	高城 朋子 (TAKAJO Tomoko)		