

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16595

研究課題名（和文）脳腫瘍における上皮間葉系移行分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Clarifying the mechanism of epithelial to mesenchymal transition in brain tumors

研究代表者

永石 雅也（NAGAISHI, MASAYA）

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40364632

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：今回の研究にて、神経膠腫細胞の肉腫様形質変化、及び播種・転移に上皮間葉系移行メカニズムが関与していることが分かった。転写因子としては、これまでに関係性が示されていたSlug, TWISTに加え、ZEB2高発現が関与していることが分かった。下流因子としては、MMP9が蛋白分解に作用していると考えられた。細胞間結合の減衰を引き起こす主要メカニズムと考えられているcadherinの発現及び発現スイッチが、神経膠腫の形質転換に関与していないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍細胞が他臓器へ転移、浸潤するには、浸潤先の環境に適応する必要がある。細胞自体の形質を転換する上皮間葉系移行は、この環境適応のために重要なメカニズムの一つと考えられている。本研究の結果は、脳悪性腫瘍の代表である神経膠腫において、この間葉系メカニズムが腫瘍浸潤に関与していることを示唆した。上皮間葉系移行関連転写因子である、Slug, TWIST, ZEB2、その下流因子であるMMP9が重要因子として同定された。腫瘍浸潤に関連する分子同定は、将来の分子標的治療へと繋がる研究結果である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we identified that epithelial-mesenchymal transition mechanism is associated with the transition to a sarcoma-like phenotypic, dissemination, and metastasis of glioblastoma cells. In addition to the transcription factors Slug and TWIST, which have previously been implicated, the high expression of ZEB2 was found in glioblastoma cells. MMP9 was considered to act as a downstream factor of Slug, TWIST and ZEB2. The cadherin switching is considered to be the important mechanism causing the reduce of intercellular adhesion in tumor invasion, but not in the phenotypic transformation of glioblastomas.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：上皮間葉系移行 神経膠腫 ZEB MMP9

## 1. 研究開始当初の背景

EMT は、上皮型細胞が間葉型細胞への形質変化によって運動、遊走能が高まるメカニズムであり、近年がん細胞の浸潤・転移において重要な役割を担っていることが明らかにされ大きな topic の一つとなっている<sup>1</sup>。Snai1、Slug、SIP1、Twist などの転写制御因子は重要な EMT 誘導分子であり、MMPs(matric metalloproteinase)分泌を介し基底膜タイプ IV コラーゲンを分解、また cadherin 分泌調整により細胞の遊走能を促進させる。癌細胞では転移・浸潤能の獲得に関与すると考えられている。脳腫瘍における上皮間葉系移行メカニズムの関連性については未だ明らかではなく、我々はこれまでに神経膠肉腫における EMT 関連転写制御因子の発現を研究し、その高発現を明らかにしてきた<sup>2</sup>。神経膠肉腫は組織学的に、膠腫成分と間葉系成分の 2 層性パターンを特徴としている。両腫瘍成分間の形態的な違いとは対照的に、分子学的解析では両成分に観察される遺伝子異常はほぼ同様であり、両者の成分は monoclonal origin であると考えられ、神経膠腫の variant に分類されている。我々は、間葉系成分に限局する Slug、Twist、MMPs の発現を証明し、脳腫瘍における EMT メカニズムの関連性を示した。一方で EMT 関連転写制御因子が高発現している腫瘍細胞に GFAP 発現が観察され、astrocyte へ分化した腫瘍細胞が、活動性の高い間葉系細胞へ形態変化を示すと考えられた。その後の研究で、ependymosarcoma や再発神経膠芽腫における上皮間葉系移行関連転写制御因子の高発現が報告されており、多種の脳腫瘍において浸潤・増殖能の獲得に関与している可能性が示されつつある。

## 2. 研究の目的

上皮間葉系移行(Epithelial to mesenchymal transition: EMT)は、上皮系細胞が運動性の高い間葉系細胞に移行するメカニズムを指し、がん細胞の転移・浸潤能獲得において EMT の関与が明らかにされている。我々は代表的悪性脳腫瘍である神経膠腫の一部において、EMT メカニズムの関与を前研究で示した。ここ数年の研究で、同メカニズムを誘導するシグナル経路、microRNA(miRNA)による誘導メカニズムの調整が報告されてきた。本研究は、前研究で EMT の関連性が示された神経膠腫症例を使用し、その他 miRNA を含めた EMT 関連因子の同定することで、神経膠腫における上皮間葉系移行誘導メカニズム全容の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経膠腫における ZEB1, ZEB2 の発現解析, EMT 誘導シグナルの発現解析

ZEB1, ZEB2 抗体を使用し免疫染色、蛍光抗体法を用いて神経膠肉腫の検体における間葉系成分と神経膠腫成分の発現の違いを検討する。同様の手法で EMT 誘導分子である MAPK, PI3K/Akt, Smad, TGF $\beta$ , FGF, VEGF の限局性発現を検証する。また蛋白発現が確認された分子は、PCR 法による mRNA の定量解析を行う。臨床所見(発症時の播種病変の有無、最終 MRI 検査での播種病変の有無、脳室壁の造影効果の有無)による、発現の違いを検討する。

頭蓋外転移を来した症例の、原発・転移巣における EMT 関連分子の発現の違いを検証する。

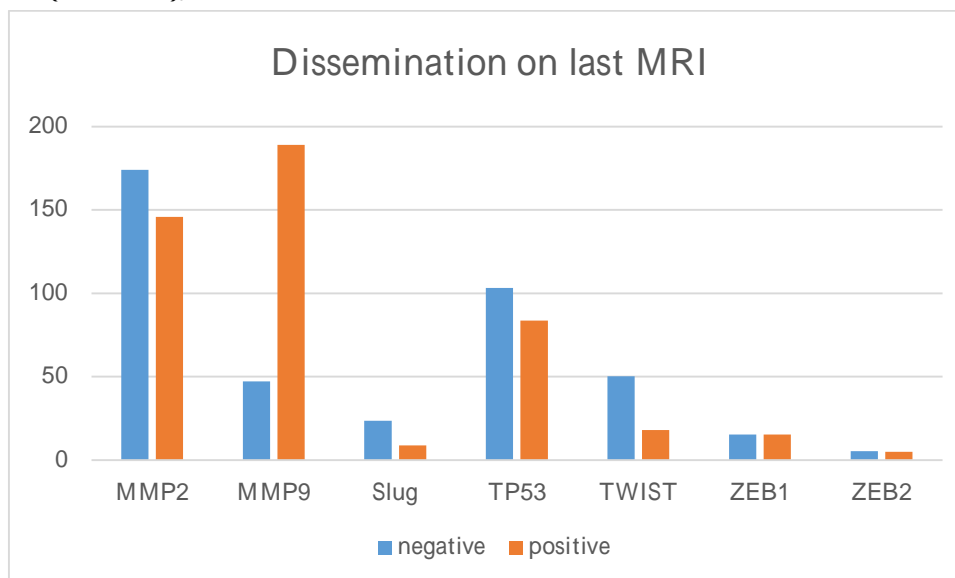
## (2) 神経膠肉腫に関連した miRNA の同定

神経膠肉腫、神経膠芽腫(IDH wild type)、正常脳組織を用いて miRNA Microarray を使用し網羅的 miRNA 発現解析を行う。神経膠腫と比較して発現の高いあるいは低い miRNA を 5-10 抽出し検証する。miR-130b, miR-194 は EMT 関連転写制御因子の調整を行っていると考えられており、今回のターゲット分子となる。<sup>3</sup>

## 4 . 研究成果

数症例において他癌種にてその発現が確認されている EMT 関連制御因子である ZEB1/ZEB2 の発現解析を行い、ZEB1 発現は通常の神経膠腫細胞で発現が確認されたが、ZEB2 の発現は限定的であった。間葉系移行に関連する転写因子 ZEB1 は通常の神経膠腫細胞にも発現しており、形質転換への関連性は薄いと考えられた。一方で ZEB2 は神経膠腫細胞での発現はなく、同分子の形質転換への関連性が示唆された。

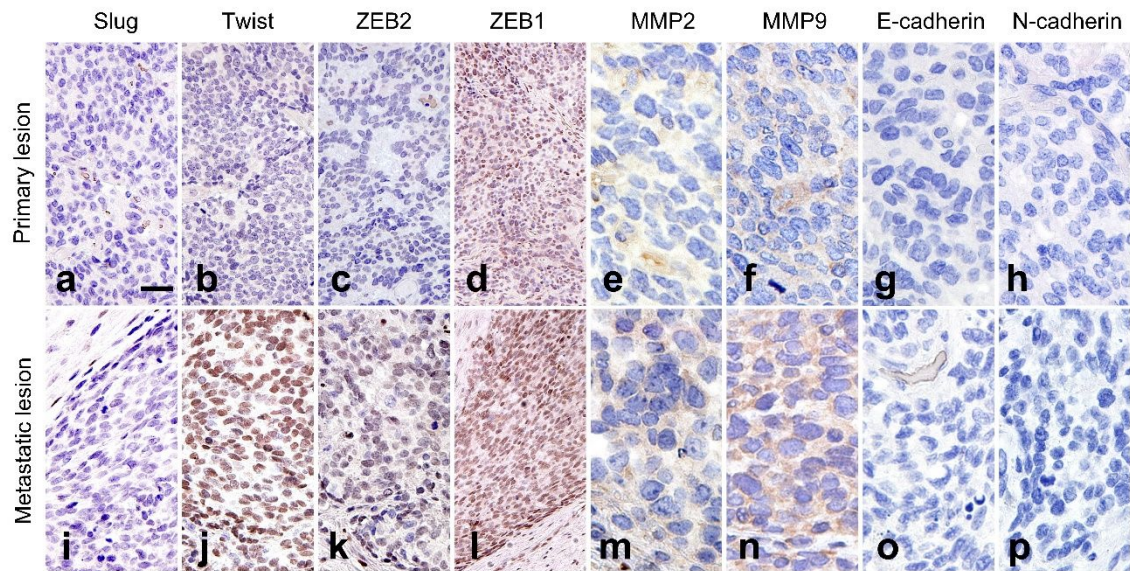
神経膠腫 48 症例における上皮間葉系以降関連転写因子及びその下流の分子の発現解析を行った。結果 Slug, Twist は全例で発現がなく、ZEB1 は全例 50%以上の腫瘍細胞で発現、ZEB2 は 30%の症例で 50%以上の腫瘍細胞発現が観察された。下流分子である E-cadherin, N-cadherin, MMP2 の発現はいずれも観察されず、MMP9 が 40%の症例で観察された。また上流因子として MAPK, PI3K/Akt, Smad, TGF, FGF, VEGF 発現解析を行ったが、肉腫細胞に限局的に発現する分子は認められなかった。cDNA の定量解析では、正常脳と比較し Slug, Twist, ZEB1, ZEB2, MMP9 はそれぞれ 6, 9.4, 15, 4.5, 12.5 倍の発現が確認された。臨床所見による解析では、最終 MRI で播種病変が存在する症例では有意に MMP9 の発現が高かった (P=0.043)。



播種病変の有無で、Slug, Twist, ZEB1, ZEB2 に発現の違いは見られなかった。また脳室壁の増強効果の有無での比較検討では、すべての分子で発現の違いは認められなかった。遺伝子異常との関連性評価では、TP53 と ZEB2 発現に正の相関が認められた (P<0.0001)。Mutant p53 は miR-130b を介して Slug, ZEB, E-cadherin を調整するが、今回の研究では miR-130b の発現は検出できなかった。

頭蓋外転移を来した神経膠芽腫症例の分子発現解析では、転移病巣において Twist, ZEB2,

MMP2, MMP9 の有意な高発現が確認できた。Slug, E-cadherin, N-cadherin は原発巣、転移巣ともに発現が認められなかった。また、転移巣の間質細胞では Slug, Twist, ZEB1, ZEB2 の高発現が観察された。



神経膠腫における EMT 関連因子の発現解析では、mRNA レベルでは正常脳に比しいずれも高発現を示したが、蛋白発現は ZEB1, ZEB2, MMP9 のみで観察された。ZEB1 蛋白発現は全例で 50%以上の細胞で確認され、mRNA 発現も正常脳の 15 倍と高値であった。ZEB1 は神経膠腫の形成、進行に関与している可能性が示唆された。一方、ZEB2, MMP9 発現は症例によって異なっており、播種病変形成への関与が考えられた。EMT における上・下流分子の解析では、TP53 と ZEB2 発現に相関性がみられたが、その他の関連分子の同定には至らなかった。一般的な上皮間葉系移行メカニズムである cadherin の発現・スイッチが、神経膠腫の形質転換に関与していない可能性が示唆された。本研究で神経膠腫における形質転換が、播種や転移に関与している可能性があり、TP53, ZEB2, MMP9 が重要な関連因子であることがわかった。

#### 引用文献

- 1 . Grünert S, Jechlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(8):657-65.
- 2 . Nagaishi M, Paulus W, Brokinkel B, Vital A, Tanaka Y, Nakazato Y, Giangaspero F, Ohgaki H: Transcriptional factors for Epithelial-Mesenchymal Transition are Associated with Mesenchymal Differentiation in Gliosarcoma. *Brain Pathol Sep;* 22(5): 670-6, 2012.
- 3 . P Dong, M Karaayvaz, N Jia, M Kaneuchi, J Hamada, H Watari, S Sudo, J Ju, N Sakuragi: Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. *Oncogene;* 32, 3286-3295, 2013.

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 Nagaishi M, Fujii Y, Sugiura Y, Takano I, Takigawa T, Yokoo H, Suzuki K	4. 巻 40
2. 論文標題 Increased Twist and ZEB2 Expression in a Cutaneous Metastasis of High-Grade Glioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 196-201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/neup.12621	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0件

〔図書〕 計2件

1. 著者名 永石雅也	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 2
3. 書名 Medical Science Digest	

1. 著者名 永石雅也	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 3
3. 書名 Precision Medicine	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------