

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07323

研究課題名(和文) 悪性グリオーマの浸潤性を標的とし、受容体を中心に据えた分子治療戦略の基礎構築

研究課題名(英文) Base construction for the development of therapeutic strategies for targeting the invasiveness in malignant glioma

研究代表者

飯島 幹雄 (IIJIMA, Mikio)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：00305111

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)：グリオーマやエナメル上皮腫は高い浸潤能を特徴とするが、その浸潤機構については不明な点が多い。細胞外マトリックスの分解制御は、これらの治療ターゲットになり得る。MMP-2発現亢進が浸潤性を増悪させる。Rykは、グリオーマにおいて、Wnt-5a依存性のMMP-2発現増強に重要である。グリオーマの浸潤性に対する分子治療戦略の基礎構築のため、酵母two-hybrid法と断片化cDNAライブラリーを使用してRyk結合タンパク質候補を同定した。エナメル上皮種において、IL-1は微小環境と局所浸潤性の制御に重要である。破骨細胞由来の因子が、エナメル上皮種によるMMP-2産生を誘導することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高い浸潤能を特徴とするグリオーマやエナメル上皮種において、その浸潤能を制御できれば、病態の制御が容易になると考えられる。グリオーマ細胞でのWnt-5aによるRyk受容体を介したMMP-2発現上昇とエナメル上皮腫由来IL-1刺激による骨芽細胞由来の因子を介したMMP-2発現上昇が示された。これらのシグナル経路の詳細が明らかになれば、学術的意義のみならず、治療のための新たなターゲットが得られるという罹患者にとっての意義が提供できると思われる。

研究成果の概要(英文)：Glioma and ameloblastoma is characterized by marked invasiveness, but little is known about the mechanism of invasion in glioma cells and ameloblastoma cells. Controlling the degradation of extracellular matrix by proteases could be a candidate for novel glioma and ameloblastoma management. Up-regulation of MMP-2 has been reported and suggested to deteriorate tumor invasiveness in glioma. Ryk is important for the Wnt-5a-dependent induction of MMP-2 and invasive activity in glioma-derived cells. To construction for the development of therapeutic strategies for targeting the invasiveness in malignant glioma, we identified RYK-associated proteins by using yeast two-hybrid system and fragmented length cDNA libraries. In ameloblastoma cells, IL-1 is a key mediator to control its microenvironment and local invasion. Osteoblast-derived factors induced the production of MMP-2 by ameloblastoma cells.

研究分野：シグナル伝達

キーワード：グリオーマ 浸潤性 受容体 MMP-2

1. 研究開始当初の背景

グリオーマは、65歳以上の高齢者に発症例が多い。初発時は、腫瘍の外科的除去後、放射線療法と化学療法を同時に行う。一方、残っていた腫瘍が再び大きくなったり、摘出したのち再発したりした腫瘍に対する標準治療は、まだ確立していない。グリオーマのうち最も悪性度の高いグリオブラストーマの特徴は、高い浸潤能である。この高い浸潤能には、細胞外マトリクスの分解に働く MMP-2 の発現亢進が重要な役割を担っている。そのため、MMP 阻害薬の開発が多数試みられてきた。しかし、関節痛や筋肉痛などの重篤な副作用等のため、MMP 阻害薬開発は頓挫し現在までに医薬品としての承認を受けたものはない。申請者らと他のグループは、Wnt-5a に依存してグリオーマ由来細胞の遊走と浸潤が増大することを見いだした (Cancer Sci., 102, 540-548, 2011; Cancer Lett., 257, 172-181, 2007)。また、申請者らは、グリオーマ細胞で MMP-2 が Wnt-5a シグナルを介して発現亢進していることを見いだした。さらに、この MMP-2 発現亢進に関わる Wnt-5a シグナルに、Wnt 受容体 RYK が必要 (図 1) であり、ヒトのグリオーマの悪性度と Wnt-5a、Fz-2、RYK と MMP-2 の発現が相関していると報告した (J Biochem. 56, 29-38, 2014)。前立腺がんや胃がんの場合では、Wnt-5a シグナルは受容体 Fz-2 と ROR2 を介して JNK 系を活性化し、MMP-1 や MMP-13 の発現を亢進することが知られている。しかしながら、ヒトのグリオーマにおいて、Wnt-5a シグナルが Fz-2/RYK 受容体を介したのち、どのようなシグナルメカニズムにより MMP-2 の発現と浸潤能を亢進させるのかについては不明である (図 2)。

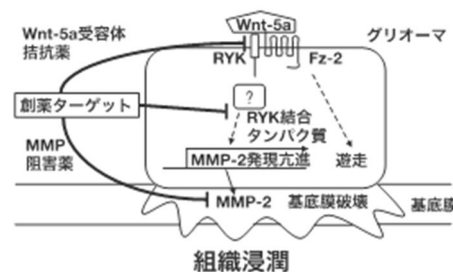


図 1 Wnt-5a/RYKシグナルを介したMMP-2発現制御

2. 研究の目的

本研究の目的は、悪性グリオーマの浸潤性を標的とし、受容体を中心に据えた分子治療戦略の基礎を構築することである。グリオーマの予後不良の主要因となる高い浸潤能を抑えることができれば予後が改善し余命を伸ばすことが期待できる。一方、MMP 阻害薬の開発は、前述のように成功していない。また、Wnt は発生や細胞増殖など多彩な作用を示すため、単なる Wnt-5a 受容体拮抗薬では影響が広範にわたり、実用化は困難と予測される。新たな浸潤能抑制の標的を探索するためには、申請者らが見いだした Wnt-5a/RYK シグナルメカニズムによる MMP-2 の発現増大に注目する必要がある (図 1, 2)。シグナルメカニズムの解明には、タンパク質同士の相互作用に基づいた探索は不可欠であるが、従来では、RYK に関して目立った成果が上がっていない。申請者らは、この限界を打破するため、検出力の高い酵母 two-hybrid システムを用いることとした。ただし、この方法では酵母の核内でおとりタンパク質とライブラリー側タンパク質が結合することが必要であるため、膜局在シグナル等は、両タンパク質の核内での結合を障害する可能性がある。そのため、シグナル部位を除いた機能性ドメインを含む断片化 cDNA ライブラリーを使用することにより、膜タンパク質やオルガネラタンパク質を含めた網羅的かつ効果的なスクリーニングが可能となる (特許第 6998056 号)。新たに開発した方法により、RYK と相互作用するタンパク質の機能性ドメインを検索し、組織浸潤に関わる新しいシグナルメカニズムを明らかにする点が高い学術的独自性と創造性を有する。また、グリオーマ以外のがんに対しても浸潤性を標的とする新たな治療戦略を提供できる発展性がある。



図 2 グリオーマにおける新規 RYK 結合タンパク質と組織浸潤に関わるシグナル分子

3. 研究の方法

RYK 結合タンパク質の探索で重要なライブラリーについては、グリオーマ細胞から発現遺伝子を網羅した断片化 cDNA 発現ライブラリーを作製した。このライブラリーを用いて、RYK 細胞内ドメイン断片をおとりタンパク質とした酵母 two-hybrid システムにより、RYK 結合タンパク質候補を同定した。この候補タンパク質断片の塩基配列を Genebank 情報と照合することにより全長 cDNA 情報を得た。

上記で同定した RYK 結合タンパク質候補分子の全長 cDNA をクローニングして、培養細胞 (ヒトグリオーマ細胞株 U251 細胞等) 用のタグ付き発現ベクターに組み込み、候補タンパク質発現ベクターを構築した。RYK との結合検証は、RYK と候補タンパク質発現ベクターを培養細胞に導入し、免疫沈降により回収した RYK に候補タンパク質が結合しているか否かをウェスタンブロットにて検出することにより実施した。あるいは、作製した候補タンパク質発現ベクターを培養細胞に導入した後、細胞を回収して、抗 RYK 抗体を用いた免疫染色、または膜画分に含

まれる候補タンパク質と RYK をウェスタンブロットで定量することにより、結合の有無を解析した。さらに、受容体以降のシグナルメカニズムを探索するため、網羅的な遺伝子発現を調べるマイクロアレイ法を行った。

4. 研究成果

網羅的かつ効果的なスクリーニングのために、検出力の高い酵母 two-hybrid システムと機能性ドメインを含む断片化 cDNA ライブラリーを組み合わせた方法を開発し、特許を取得した(特許第 6998056 号)。新たに開発した方法で RYK 受容体を標的として、マウス脳ならびにヒト培養細胞株由来断片化 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、RYK 結合タンパク質候補を 15 種類得た。この 15 種類の中には、RYK との結合が報告されている Dvl3 が含まれていた。Dvl3 では異なる 2 種類のクローンが得られ、共に PDZ ドメインが含まれていた。15 種類のうちの候補 A では、異なる 5 クローンが得られ、すべてに PDZ ドメインが含まれていた。また候補 B では、PDZ ドメインを含むクローンが得られた。これらを含む 15 種類の遺伝子を哺乳類細胞発現ベクターに組み込み、RYK 発現ベクターと共にヒト細胞に導入発現させた。細胞内での RYK タンパク質と候補タンパク質との結合を検討したが、細胞レベルでの結合を確認することができなかった。

エナメル上皮種は、良性の歯原性腫瘍であり、顎骨への強い浸潤を特徴とする疾患である。この骨浸潤には、エナメル上皮種による MMP 発現増強が関与していると考えられている。そこで、エナメル上皮種由来細胞株 AM-3 細胞とマウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて、両者の相互作用を検討した。その結果、MC3T3-E1 細胞が分泌するサイトカインが、AM-3 細胞の MMP 発現を増強することをマイクロアレイ法などにより明らかにした(Biochemistry and Biophysics Report, 30, 101233, 2022 (<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101233>))。

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 Chairani Elissa, Fuchigami Takao, Koyama Hirofumi, Ono Yusuke, Iijima Mikio, Kishida Michiko, Kibe Toshiro, Nakamura Norifumi, Kishida Shosei | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 Intercellular signaling between ameloblastoma and osteoblasts | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports | 6. 最初と最後の頁 101233 ~ 101233 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2022.101233 | 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0件

〔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 | 岸田 昭世 (KISHIDA Shosei) (50274064) | 鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701) | |

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 |
|---------|---------|
| | |