

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17981

研究課題名(和文) グリオーマの根治療法の開発に向けたTRPMLの分子基盤と創薬基盤

研究課題名(英文) Molecular basis and drug discovery of TRPML for the treatment of glioblastoma

研究代表者

李 一 (LI, Yi)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：20757596

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)：グリオーマは脳の正常組織に浸潤するため、外科的に全摘出ができず、再発する。がんの再発の原因として、がん幹細胞の存在が注目されている。報告者らはグリオーマのがん幹細胞においてTRPMLサブファミリーのイオンチャネル機能を見いだした。本研究では、RNAシーケンス解析により、TRPMLをコードする遺伝子の変異を同定した。また、TRPMLの遮断薬はグリオーマモデル動物の生存期間を延長させた。以上の成果は、TRPMLがグリオーマの治療の標的に成り得る可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリオーマは外科手術、化学療法および放射線治療の集学的治療を行っても、治療に抵抗するがん幹細胞が増殖を繰り返し、再発する。再発の根源であるがん幹細胞をターゲットとした治療法は有効であると考えられる。本研究成果は、がん幹細胞が発現するイオンチャネルの遮断薬がグリオーマモデル動物の治療に有効であることを明らかにした。この薬物はグリオーマの治療に適応できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Glioma invades the normal tissues of the brain and cannot be completely removed surgically. The cancer stem cells have been attracting attention as a cause of cancer recurrence. We had found the function of TRPML channels in glioma cancer stem cells. In this study, we identified mutations in the gene encoding TRPML using RNA sequencing analysis. In addition, TRPML blockers prolonged the survival of glioma model animals. These results suggest that the TRPML may be a potential therapeutic target for glioma.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：グリオーマ ドラッグリポジショニング

1. 研究開始当初の背景

悪性度の高いグリオーマ(膠芽腫)は、治療後にかならず再発し、平均余命は約1年である。ここ30年間、生存期間がほとんど延長しておらず、根治療法の確立にはさらなる病態の解明が必要である。最近、がんの再発や転移の原因としてがん幹細胞の存在が注目されている。グリオーマは強い浸潤能がある。そのため、腫瘍細胞は脳の正常部位に深く染み渡り、外科手術では全摘出できない。さらに化学療法(テモゾロミド)と放射線治療の集学的治療を行っても、治療抵抗性をもつがん幹細胞が増殖をくりかえす。再発の根源であるがん幹細胞をターゲットとした治療法は有効であると考えられる。しかし、特異性の高いバイオマーカーは不明のままである。テモゾロミドの効果を上回る薬物を見出すことができれば、根本的な治療法となることが期待される。

報告者らの研究グループはこれまでに、グリオーマの患者の外科切除検体から、がん幹細胞を樹立している(Neuro Oncol 22(3): 333-44, 2020)。そして、がん幹細胞の細胞膜において、一過性受容体電位型チャネル(TRP)の一種であるTRPMLが局在することを薬理的に同定した。さらに、TRPMLの遮断薬のなかから13種類の薬物が、がん幹細胞を2日間で死滅させることを見いだした。それらから、ヒト神経幹細胞への影響が低かった候補薬を決定した。

2. 研究の目的

報告者らが発見したイオンチャネルのTRPMLは、生体内においてはNaイオンとKイオンを透過すると考えられる。つまり、電気化学ポテンシャルに従い、Naイオンが細胞内に流入する。NaイオンはClイオンの細胞内への流入と水の浸透流を引き起こすため、細胞容積が増加すると考えられる。細胞容積は細胞の増殖や遊走に密接に関連する(J Cell Biol 206(2): 151-62, 2014)。がん幹細胞の増殖能や遊走能は、がんの再発や浸潤に関わると考えられる。それ故に、TRPMLに特異的な薬剤はグリオーマの制圧に有効と考えられる。

以上の成果を踏まえて本研究は、グリオーマの再発予知と早期治療法の開発を最終目標とした。そのために、がん幹細胞において新しい再発予測バイオマーカーとなりうるTRPMLの分子基盤を解析した。脳には脳血管関門が存在し、化学療法剤が到達しにくい。それゆえに薬物の効果判定にはグリオーマのモデル動物が不可欠である。本研究では、*in vitro*実験で有効性を認めた血液脳関門透過性がある医薬品が、モデル動物において有効であるか検証した。

3. 研究の方法

(1) グリオーマ由来のがん幹細胞は三次元スフェア培養法を用いて樹立した(Neuro Oncol 22(3): 333-44, 2020)。手術で切除されたがん組織(0.1-1 g)をはさみにより細かく刻んだ。細切された組織を細胞剥離液(Accumax(TM); ナカライテスク)2 mLをいれた試験管に移し、37度の恒温槽で5分間振盪(20回/分)した。細胞培養液8 mLを加え混和し、遠心(40 ×g, 5分)した。上清を捨て、細胞培養液10 mLを加え混和し、超低接着表面ディッシュ(100 mm; Corning)で培養した。培養は、5% CO₂/95%空気、37度の湿潤な環境で行った。細胞培養液は、D-MEM/Ham's F-12(和光純薬)に、NaHCO₃(49 mM)、グルコース(26 mM)、L-グルタミン(3 mM)、MACS NeuroBrew-21(5 mL; Miltenyi Biotec)、上皮成長因子(EGF, 20 ng/mL; PeproTech)、線維芽細胞増殖因子(bFGF, 20 ng/mL; PeproTech)、およびペニシリン(100 U/mL)とストレプトマイシン(0.1 mg/mL)を添加したものを使用した。

(2) RNeasy Mini Kit(Qiagen)を用いて、がん幹細胞からRNAを抽出した。バイオアナライザ電気泳動システム(Agilent 2100; Agilent)を用いて、RNAの品質を確認した。strand-specificライブラリー調製法(NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module; New England Biolabs)でシーケンスライブラリーを作製した。次世代シーケンサー(NovaSeq 6000; Illumina)を用いて、ライブラリー調製したサンプルの塩基配列を1検体あたり12 GBで取得した。ソフトウェアFastQCを用いて、クオリティスコアを確認し、シーケンスの品質に問題がなかった。ソフトウェアTrimmomaticを用いて、シーケンスリードをトリミングした。ソフトウェアHISAT2を用いて、トリミング後のシーケンスリードをリファレンスゲノム(hg38)へマッピングした。リードのマッピング率は86-98%であった。ソフトウェアfeatureCountsを用いて、マッピングされたrawリード数をカウントした。ソフトウェアfeatureCountsを用いて、マッピングされたフラグメントのカウントを行い、TPM値を算出した。ソフトウェアbcftoolsを用いて、マッピングされたリードにおいて、リファレンスゲノムと異なる塩基を変異として抽出した。

(3) グリオーマモデル動物を作製し、薬物の有効性を検証した(Neuro Oncol 22(3): 333-44, 2020)。免疫不全マウス(BALB/cAJcl-nu/nu, 7-8週齢, 雌)は三種混合麻酔(ドミツール0.75 mg/kg +ミダゾラム4 mg/kg +ベトルファール5 mg/kg)で苦痛を与えないよう配慮したうえで、処置した。脳定位固定装置(SR-6M-HT; 成茂科学器械研究所)を用いて頭部を保持し、プレグマより2 mm右側方・1 mm前方で、3 mmの深さにて、がん幹細胞(10万細胞/5 µl)を5分かけて注入した。注入終了後、50ナイロンで閉創した。移植後7日目から、ゾンデ(FTP-20-38-50; Instech Laboratories)を用いて、被験薬を5日間連続で経口投与した。被験薬は0.5 w/v%メ

チルセルロース 400 溶液 (富士フィルム和光純薬) に調整した。陰性コントロールには、被験薬の溶媒に用いたジメチルスルホキシド (ナカライテスク) を投与した。薬物の有効性を全生存期間 (Kaplan-Meier 曲線) で評価した。統計解析は、log-rank 検定にて行った。

4. 研究成果

TRPML をコードする MCOLN について、RNA シーケンス解析で、遺伝子発現量および点変異を調べた。グリオーマの 8 患者由来のがん幹細胞株における、分子の発現量は、MCOLN1 (19 TPM) > MCOLN2 (16 TPM) > MCOLN3 (7 TPM) の順位であった (図 1)。さらに、4 患者に共通して、MCOLN2 において、アミノ酸置換の変異 (V20I および A504V) を発見した。この変異体はグリオーマの病態発生に関与する可能性が示唆された。

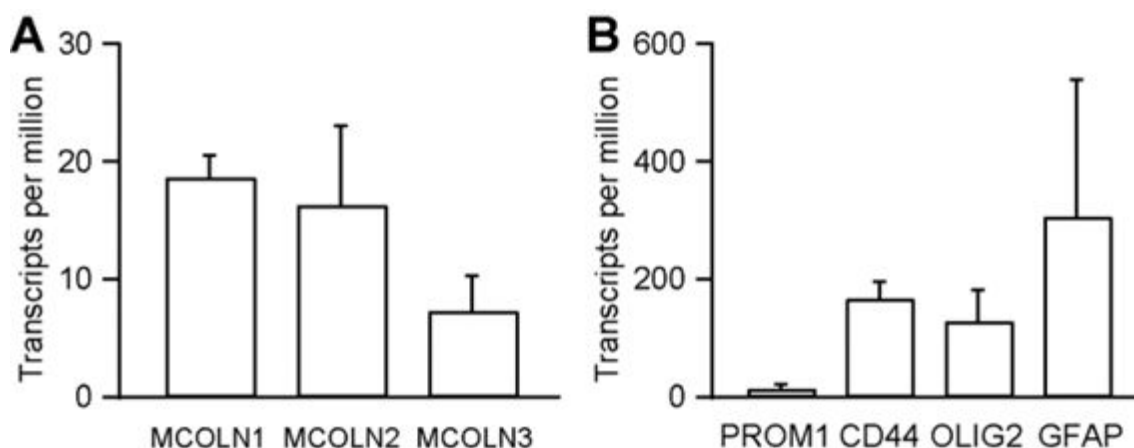


図 1 グリオーマ由来がん幹細胞における MCOLN 遺伝子 (A) および幹細胞マーカー (B) の発現

グリオーマモデル動物における TRPML 遮断薬の有効性を検証した。血液脳関門透過性が認められている医薬品を試験した。がん幹細胞をマウスの頭蓋内に移植した後に腫瘍が形成する期間内に、薬物を 3 mg/kg 体重で、5 日間連続で経口投与すると、生存期間は有意に延長した (図 2)。この医薬品はグリオーマの治療薬に適應できる可能性が示唆された。

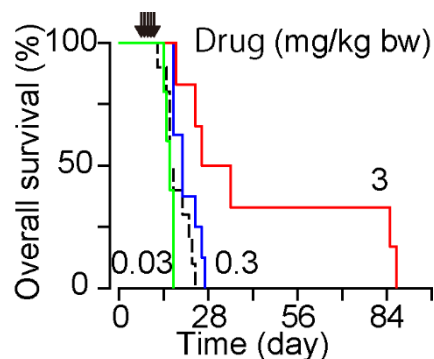


図 2 グリオーマモデル動物における生存曲線。矢印は薬物の経口投与を示す

< 引用文献 >

Iwata R, Lee JH, Hayashi M, et al. ICOSLG-mediated regulatory T cell expansion and IL-10 production promote progression of glioblastoma. *Neuro-Oncology*. 2020; 22(3):333-344.

Huang X and Jan LY. Targeting potassium channels in cancer. *The Journal of cell biology*. 2014; 206(2):151-162

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Li Y, Nonaka M, Kanemura Y, Kodama Y, Mano M, Asai A	4. 巻 37
2. 論文標題 A case of medulloblastoma in a patient with fetal ventricular enlargement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Child's nervous system : ChNS	6. 最初と最後の頁 977-982
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00381-020-04725-0	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 -

1. 著者名 松田渉, 尾崎吉郎, 重坂実, 石井睦康, 田中晶大, 西澤徹, 安室秀樹, 孫瑛洙, 野村昌作, 李一, 吉村晋一, 中山健太郎	4. 巻 33(5)
2. 論文標題 髄膜炎で発症し髄液中抗シトルリン化ペプチド抗体が臨床経過の推移と一致したリウマチ性髄膜炎の一例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床リウマチ	6. 最初と最後の頁 213-220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14961/cra.33.213	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 -

1. 著者名 Yamamura Natsumi, Iwata Ryoichi, Suyama Takehiro, Ueno Katsuya, Kawano Haruka, Naito Nobuaki, Li Qiang, Miyata Mayuko, Li Yi, Fukuda Akihiro, Hashiba Tetsuo, Yoshimura Kunikazu, Nonaka Masahiro, Asai Akio	4. 巻 15(7)
2. 論文標題 破裂脳底動脈幹部血豆状動脈瘤に対してステント支援下コイル塞栓術を行った一例 Stent-Assisted Coil Embolization of Ruptured Blood Blister-Like Aneurysm of the Basilar Artery: A Case Report and Literature Review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JNET:Journal of Neuroendovascular Therapy	6. 最初と最後の頁 449-455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Miyata M, Nonaka M, Ueno K, Naito N, Yamamura N, Li Y, Isozaki H, Kamei T, Iwata R, Takeda J, Hashiba T, Yoshimura K, Asai A	4. 巻 26
2. 論文標題 A ventricular catheter that migrated into the fourth ventricle successfully removed using a neuroendoscope	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British journal of neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/02688697.2021.1900782	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22件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 李一, 羽柴哲夫, 磯崎春菜, 埜中正博, 武田純一, 内藤信晶, 山村奈津美, 前田昌丈, 小森裕美子, 亀井孝昌, 吉村晋一, 浅井昭雄
2. 発表標題 進行性の高次脳機能障害を呈し、画像上髄膜血管腫症が疑われた1例
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村晋一, 前田昌丈, 上野勝也, 内藤信晶, 山村奈津美, 李一, 武田純一, 羽柴哲夫, 埜中正博, 浅井昭雄
2. 発表標題 フローダイバータースtentを用いた脳動脈瘤治療後にマロリーワイス症候群により出血性ショックを生じた1例
3. 学会等名 第27回日本脳神経外科救急学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 羽柴哲夫, 上野勝也, 内藤信晶, 山村奈津美, 李一, 亀井孝昌, 武田純一, 吉村晋一, 埜中正博, 浅井昭雄
2. 発表標題 転移性脳腫瘍術後局所照射後に播種性再発を生じた症例の検討
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 羽柴哲夫, 上野勝也, 内藤信晶, 山村奈津美, 李一, 亀井孝昌, 武田純一, 吉村晋一, 埜中正博, 浅井昭雄
2. 発表標題 tap test後にDat Scanを施行した症例の検討
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須山武裕, 島田志行, 武田純一, 吉村晋一, 山村奈津美, 李一, 川野晴香, 羽柴哲夫, 岩瀬正顕, 浅井昭雄
2. 発表標題 Double jail stent assist techniqueによるコイル塞栓術の検討
3. 学会等名 第37回NPO法人日本脳神経血管内治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田純一, 内藤信晶, 羽柴哲夫, 上野勝也, 山村奈津美, 李一, 亀井孝昌, 吉村晋一, 桢中正博, 浅井昭雄
2. 発表標題 CASにおける外頸動脈遮断なしのflow reversal法は有効か?
3. 学会等名 第37回NPO法人日本脳神経血管内治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 羽柴哲夫, 上野勝也, 内藤信晶, 山村奈津美, 李一, 亀井孝昌, 武田純一, 吉村晋一, 桢中正博, 浅井昭雄
2. 発表標題 iNPHに対するLPシャント後に増大し、経鼻内視鏡的開窓術後の髄液漏治療に難渋したラトケ嚢胞の一例
3. 学会等名 第28回日本神経内視鏡学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田純一, 内藤信晶, 羽柴哲夫, 上野勝也, 山村奈津美, 李一, 亀井孝昌, 吉村晋一, 桢中正博, 浅井昭雄
2. 発表標題 硬膜動静脈瘻治療における3Dプリンタの有用性
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内藤信晶, 羽柴哲夫, 上野勝也, 山村奈津美, 李一, 亀井孝昌, 武田純一, 吉村晋一, 桢中正博, 浅井昭雄
2. 発表標題 乳児脊髄脂肪腫手術時の術中神経生理モニタリング
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村晋一, 武田純一, 上野勝也, 山村奈津美, 内藤信晶, 磯崎春菜, 李一, 亀井孝昌, 羽柴哲夫, 桢中正博, 浅井昭雄
2. 発表標題 大型部分血栓化脳動脈瘤の治療
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 羽柴哲夫, 上野勝也, 内藤信晶, 山村奈津美, 李一, 亀井孝昌, 武田純一, 吉村晋一, 桢中正博, 浅井昭雄
2. 発表標題 髄液シャント術における抗菌カテーテル(バクティシール)の初期使用経験
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 羽柴哲夫, 上野勝也, 内藤信晶, 山村奈津美, 李一, 亀井孝昌, 武田純一, 吉村晋一, 桢中正博, 浅井昭雄
2. 発表標題 Methionine PETにて再発と診断し摘出術を行った脳腫瘍病変の病理学的検討
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍病理学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村晋一, 福田晃大, 上野勝也, 内藤信晶, 宮田真友子, 山村奈津美, 李一, 武田純一, 羽柴哲夫, 須山武裕, 桒中正博, 淺井昭雄
2. 発表標題 クリップとコイルの併用で親動脈閉塞を施行した大型部分血栓化動脈瘤の1例
3. 学会等名 第50回日本脳卒中の外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田純一, 國枝武伸, 上野勝也, 川野晴香, 李強, 李一, 磯崎春菜, 羽柴哲夫, 吉村晋一, 桒中正博, 淺井昭雄
2. 発表標題 Immediate flow restoration確認後の非再開通症例についての検討
3. 学会等名 第50回日本脳卒中の外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村晋一, 武田純一, 上野勝也, 川野晴香, 李強, 磯崎春菜, 李一, 亀井孝昌, 羽柴哲夫, 桒中正博, 淺井昭雄
2. 発表標題 脳梗塞、脳内出血、脳梗塞を繰り返して生じた片側もやもや病の1例
3. 学会等名 第26回日本脳神経外科救急学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 羽柴哲夫, 川野晴香, 上野勝也, 李強, 磯崎春菜, 李一, 亀井孝昌, 武田純一, 吉村晋一, 桒中正博, 淺井昭雄
2. 発表標題 術後照射の観点から見た転移性脳腫瘍の治療成績と再発様式の検討
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮田真友子, 埜中正博, 上野勝也, 川野晴香, 内藤信晶, 山村奈津美, 小森裕美子, 磯崎春菜, 李一, 亀井孝昌, 岩田亮一, 武田純一, 羽柴哲夫, 吉村晋一, 浅井昭雄
2. 発表標題 髄芽腫術後16年で放射線壊死による新規病変を認めた1例
3. 学会等名 第48回日本小児神経外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉村晋一, 羽柴哲夫, 上野勝也, 内藤信晶, 宮田真友子, 山村奈津美, 李一, 岩田亮一, 武田純一, 埜中正博, 浅井昭雄
2. 発表標題 親動脈閉塞による治療を行なった部分血栓化脳動脈瘤の検討
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第79回学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武田純一, 須山武裕, 上野勝也, 内藤信晶, 宮田真友子, 山村奈津美, 福田晃大, 李一, 岩田亮一, 羽柴哲夫, 吉村晋一, 埜中正博, 浅井昭雄
2. 発表標題 破裂脳動脈瘤に対するコイル塞栓術後Subpial hematoma増大因子
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第79回学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉村晋一, 羽柴哲夫, 上野勝也, 内藤信晶, 宮田真友子, 山村奈津美, 李一, 岩田亮一, 武田純一, 埜中正博, 浅井昭雄
2. 発表標題 両側茎状突起過長による無症候性両側頸部内頸動脈解離の1例
3. 学会等名 第45回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野勝也, 吉村晋一, 内藤信晶, 宮田真友子, 山村奈津美, 李一, 岩田亮一, 武田純一, 羽柴哲夫, 埜中正博, 淺井昭雄
2. 発表標題 くも膜下出血と脳梗塞を同時に発症した右前大脳動脈解離の1例
3. 学会等名 第45回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 羽柴哲夫, 上野勝也, 内藤信晶, 宮田真友子, 山村奈津美, 李一, 岩田亮一, 武田純一, 吉村晋一, 埜中正博, 淺井昭雄
2. 発表標題 iNPH疑いとして診療した患者の治療方針についての後方視的検討
3. 学会等名 第21回日本正常圧水頭症学会
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

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