

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390279

研究課題名（和文） 悪性神経膠腫における COX-2 の発現意義と治療への応用

研究課題名（英文） The significance of COX-2 expression and therapeutic application in malignant gliomas

研究代表者

吉本 幸司 (YOSHIMOTO KOJI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：70444784

研究成果の概要（和文）：

シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現は神経膠腫組織では悪性度の上昇に相関して全体的に発現が上昇していた。また COX-2 の発現は間葉系遺伝子の発現と統計的に有意に相関していることから腫瘍の浸潤、血管新生能などに関与していることが示唆された。一方今回の解析に用いたグリオーマ幹細胞では COX-2 の発現はむしろ消失しており、グリオーマ幹細胞の増殖、自己複製能への関与は低いと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The expression level of COX-2 in glioma tissues positively correlated with tumor malignancy and mesenchymal marker expression. These results suggest that COX-2 induction is associated with the tumor characteristics such as invasion and angiogenesis. By contrast, COX-2 expression in glioma stem cells which grow in neurospheres is decreased or almost absent. Therefore, it can be concluded that COX-2 expression is not implicated in the proliferation and selfrenewal of glioma stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7900000	2370000	10270000
2011年度	2800000	840000	3640000
2012年度	2800000	840000	3640000
年度			
年度			
総計	13500000	4050000	17550000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：悪性神経膠腫・COX-2・mesenchymal

1. 研究開始当初の背景

(1) シクロオキシゲナーゼ (Cyclooxygenase; COX) は、アラキドン酸をプロスタグランジンやトロンボキサンなどに代謝するアラキドン酸カスケードにおいて

重要な役割を担う酵素であり、COX-1 と COX-2 という2つのアイソフォームに分類される。COX-1 は全身の組織に広く分布し、その発現が種々の刺激によっても誘導されることがないため構成型と呼ばれる。一方、

COX-2 は脳や腎臓などでは恒常的に発現が認められるが、その他の組織においては発現が低く、炎症や悪性腫瘍の発生に伴ってその発現が誘導されることから誘導型と呼ばれる。我々はかつて悪性神経膠腫の手術標本を用いて COX-2 の免疫染色を行い、腫瘍周囲の reactive astrocyte の cytoplasmic process (図 1 A) や腫瘍細胞の核および細胞質 (図 1 B)、腫瘍組織の壊死部周辺 (図 1 C) に COX-2 蛋白が強く発現していることを報告した (Shono et al. Cancer Res., 2001)。また COX-2 強発現群と低発現群の 2 群に分けて患者の生存期間を解析したところ、COX-2 低発現群で有意に生存期間が延長していることを確認した (図 2 A)。さらに最も悪性度が高い膠芽腫に限ってもこの傾向は同様であり (図 2 B)、COX-2 の発現が悪性神経膠腫の強力な予後規定因子であることを証明した。

(2) 近年、種々の COX-2 阻害剤が開発され、アラキドン酸カスケード以外の COX-2 の細胞内での機能と、COX-2 阻害剤の分子機序が徐々に解明されてきた。例えば COX-2 阻害剤は細胞増殖や浸潤、アポトーシス抵抗性に関わる転写因子 NF- κ B を抑制し、逆に腫瘍抑制遺伝子である p53 を核内に誘導し活性化することなどである。悪性腫瘍に関しては、多くの癌で COX-2 阻害剤が細胞増殖や血管新生を抑制することが基礎実験で示されている。特に大腸癌に於いては、COX-2 を阻害するアスピリンや COX-2 選択的阻害剤 (celecoxib) の服用によって、前癌段階である大腸腺腫の発生が有意に抑制されることが大規模臨床試験でも示され、近年のトピックスの一つとなっている。悪性神経膠腫に関しても、主に *in vitro* の系で COX-2 阻害剤による細胞増殖抑制効果や放射線感受性増強効果が示さ

れているが、その生体内での効果については不明である。また治療標的としても注目を集めている脳腫瘍幹細胞においても COX-2 の関与を示唆する報告もあるがその機能的な意義とメカニズムについては不明なままである。

2. 研究の目的

(1) 悪性神経膠腫における発現意義とその発現調節機構を明らかにする。具体的には神経膠腫での COX-2 の遺伝子発現を RNA レベルで解析すること、またグリオーマで重要な役割を果たしていると考えられている microRNA の発現も解析することで COX-2 の発現を制御している microRNA を同定し、COX-2 の発現制御メカニズムを同定する。

(2) COX-2 発現がグリオーマ幹細胞の増殖能に与える影響を解析する。

(3) マウス脳腫瘍モデルを作成し、グリオーマに対する COX-2 阻害薬の抗腫瘍効果を解析する。

3. 研究の方法

1) COX-2 の発現レベルをグレードの異なるグリオーマ組織から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法で解析した。解析に用いたのは、82 例のグリオーマ臨床サンプルで、グレード 2 が 14 例、グレード 3 が 16 例、グレード 4 が 52 例であった。COX-2 以外にも YKL-40, CD44, Vimentin などの mesenchymal marker や DLL3, BCAN, OLIG2 などの proneural marker、それ以外に EGFR, FGFR, VEGFR, PDGFR などのチロシンキナーゼ受容体遺伝子、さらには CD133, Nestin, BMI-1, MELK, Notch などの幹細胞マーカーとの発現の相関を解析した。またマイクロ RNA が COX-2 の発現調節メカニズムに関与しているかを解析するためにグリオーマで重要な役割を果たしていると考えられている 21 個のマイクロ RNA (

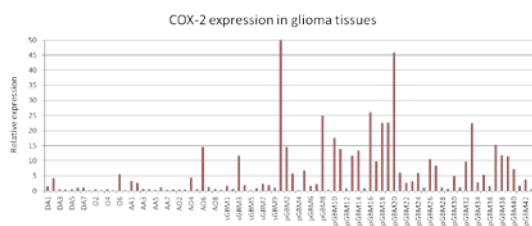
-105, -124a, -128a, -135b, -184, -196a-b, -200a-c, -203, -302a-d, -363, -367, and -504) との発現の相関も解析した。

(2) グリオーマの臨床検体からグリオーマ幹細胞株を樹立する。具体的には手術時に摘出したサンプルを無血清条件で初代培養を行い、EGF や FGF などの成長因子を加えながら培養を継続した。その結果 neurosphere を形成する細胞をグリオーマ幹細胞様細胞として *in vitro* の実験に用いる。これらの細胞における COX-2 の発現を解析し、COX-2 阻害薬を用いて sphere 形成能に対する影響を解析する。

(3) 上記の方法で確立したグリオーマ幹細胞様細胞をヌードマウスの脳内に定位的に注入しマウス脳腫瘍モデルを確立する。マウスに形成された腫瘍の COX-2 の発現を解析し、COX-2 阻害薬の *in vivo* での抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

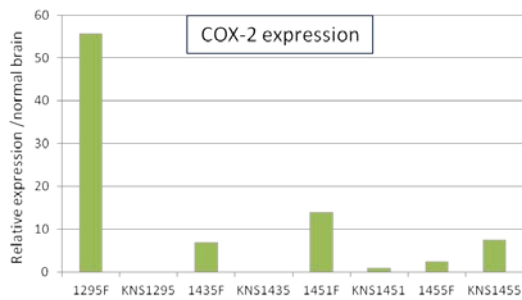
(1) グリオーマにおける COX-2 の発現は下記グラフのように悪性度に一致しては発現の上昇が認められた (左側から右側にかけてサンプルのグレードが高くなっている)。



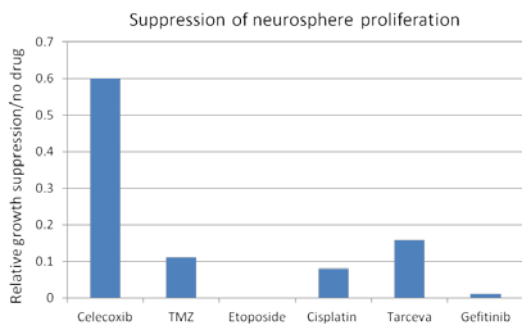
また悪性神経膠腫においては本研究により COX-2 の発現は YKL-40, CD44, Vimentin などの mesenchymal marker の発現と幹細胞マーカーの発現に優位に相関していることを見出した。ノンパラメトリックな解析でスピアマンの順位相関係数は 0.5-0.6 であり、いずれの p 値も 0.0001 以下であった。マイクロ

RNA との相関では miR-21, -34a, -196a の発現と統計学的に優位に相関しており、これらのマイクロ RNA がグリオーマにおける COX-2 の発現を制御している可能性が示唆された。我々は miR-21, -34a, -196a が mesenchymal marker の発現を制御していることをグリオーマ培養細胞を用いて確認している。現在同様な実験を行い COX-2 の発現を制御しているマイクロ RNA を同定することを試みている。

(2) 本研究においてこれまで 4 例のグリオーマ幹細胞様細胞 (KNS1295, KNS1435, KNS1451, KNS1455) を樹立した。興味深いことに KNS1295 と KNS1435 はほとんどの細胞が neurosphere を形成して増殖するのに対して、KNS145 と KNS1455 は多くの細胞は接着して増殖し、一部の細胞のみが neurosphere を形成して増殖する傾向が見られた。遺伝子発現レベルでは neurosphere を形成して増殖する KNS1295 と KNS1435 では proneural marker の発現が高いのに対して、KNS145 と KNS1455 では mesenchymal marker が比較的高発現していた。さらに興味深いことには KNS1295 と KNS1435 では元の腫瘍と比較して mesenchymal marker の発現が低下し、proneural marker の発現が亢進していることから proneural marker を発現している腫瘍細胞が選択されて増殖したことが示唆された。これら 4 例のグリオーマ幹細胞様細胞をそれぞれ元の腫瘍細胞と COX-2 の発現レベルを比較したところ、KNS1295 と KNS1435 では発現が消失しており、臨床サンプルを用いた解析で COX-2 の発現が mesenchymal marker の発現と相関することを裏付ける結果であった (次ページグラフ参照)。

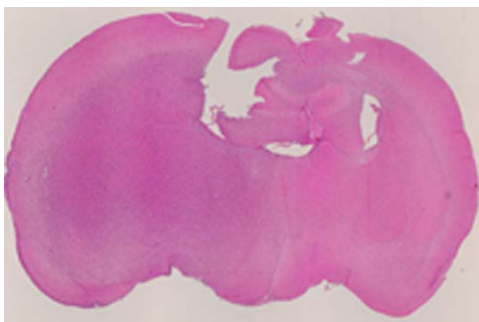


Neurosphere の増殖能に対する COX-2 阻害薬 (Celecoxib) の効果を KNS1295 と KNS1435 を用いて調べたところ、増殖能には有意な影響を与えなかった (下グラフ参照)。



また細胞周期をフローサイトメーターを用いて解析したが、細胞周期に対する影響もほとんど認められなかった。

(3) 4 例のグリオーマ幹細胞様細胞をマウス脳内に定位的に注入し腫瘍形成能を見たところ、in vitro で neurosphere を形成して増殖する KNS1295 と KNS1435 のみに腫瘍形成が認められ、KNS145 と KNS1455 では腫瘍形成が認められなかった。



これは COX-2 の発現が認められないグリオーマ幹細胞様細胞のみが自己複製能を有することを示す結果であり、グリオーマ幹細胞の増殖に COX-2 が関与していることを示す報告とは一致しない結果であった。またマウスに形成された KNS1295 と KNS1435 の腫瘍でも COX-2 の発現は消失したままであった。これらの結果はグリオーマ幹細胞における COX-2 の発現意義は低いものと考えられた。これらの結果を総合的に考えると、COX-2 の発現意義は、腫瘍の発生に関与する幹細胞にあるのではなく、in vivo で微小環境とのクロストークの中で悪性グリオーマとしての形質を獲得して増殖していく過程に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Ma X, Yoshimoto K, Guan Y, Hata N, Mizoguchi M, Sagata N, Murata H, Kuga D, Amano T, Nakamizo A, Sasaki T : Associations between microRNA expression and mesenchymal marker gene expression in glioblastoma. Neuro-Oncology 14(9) : 1153-1162, 2012

② Yoshimoto K, Mizoguchi M, Hata N, Amano T, Nakamizo A, Sasaki T : Molecular biomarkers of glioblastoma: Current targets and clinical implications. Current Biomarker Findings 2: 63-76, 2012

[学会発表] (計 2 件)

① 吉本幸司、Diagnostic significance of microRNA and gene expression in glioma patients, 第 4 回国際脳腫瘍病理シンポジウム、2012 年 5 月 25 日、名古屋

② 吉本幸司、膠芽腫における mesenchymal マーカーの発現と microRNA による発現制御、第 30 回日本脳腫瘍病理学会、2012 年 11 月 25 日、広島

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 幸司 (YOSHIMOTO KOJI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：70444784

(2) 研究分担者

溝口 昌弘 (MIZOGUCHI MASAHIRO)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：50380621

天野 敏之 (AMANO TOSHIYUKI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：70448413

(3) 連携研究者

()

研究者番号：