

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592095

研究課題名(和文) 神経膠芽腫の獲得薬剤耐性に関する miR-195 の機能解析

研究課題名(英文) To explore miR-195 mechanisms of acquired resistance against TMZ in glioblastoma.

研究代表者

氏福 健太 (UJIFUKU, Kenta)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・客員研究員

研究者番号：20437867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究の当初の目的は、神経膠芽腫(以下GBM)のtemozolomideに対する獲得薬剤耐性に関するマイクロRNA、miR-195の機能解析であった。予想外の研究結果に直面し、研究が難航した。現時点で論文は未発表である。

本研究がうまくいかない場合の対応として、GBMの浸潤先端における微小環境(niche:ニッチ)の研究を行い、興味深い結果が得られた。In vitroの脳血管関門(以下BBB)モデルを用いて、GBM細胞がBBBに与える影響を調べると、GBMがBBBに接触した早期の反応として、BBB機能が強化され、そのメカニズムにFGF-2が主要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The initial purpose of this study was to explore miR-195 mechanisms of acquired resistance against TMZ in glioblastoma (GBM). Unexpected results have been obtained and they have not been published yet.

Alternative study approach has been performed and intriguing results have been obtained. This study was examined to explore the mechanism of invasion front niche of GBM. Using new in vitro blood brain barrier (BBB) models, interaction between BBB and GBM was explored. In acute phase of the interaction, GBM could strengthen BBB, and FGF-2 might be implicated in the process. These results have been published.

研究分野：医歯薬学

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：脳腫瘍 神経膠芽腫 脳血管関門 FGF-2 Niche 脳血管関門モデル

1. 研究開始当初の背景

脳原発悪性腫瘍である神経膠腫のうち、最も悪性度の高い神経膠芽腫 (GBM) は 5 年生存率約 7%、生存中央値 14.6 ヶ月と予後不良である。浸潤能が非常に高いため、脳実質が機能を保ったまま、神経膠芽腫細胞の浸潤を受ける。そのため手術治療で術後神経脱落症状を起こさない範囲で最大限に腫瘍を摘出し、術後放射線化学療法を行うのが GBM の標準治療である。Temozolomide (TMZ) を用いた放射線化学療法で、生存中央値が約 2 ヶ月向上したという結果が、ここ 30 年の GBM の研究成果の中で、最も大きな進歩であった (N Engl J Med. 2005 Mar 10;352(10):987-96)。

しかし、従来の治療法でも認められていた通り、(1) GBM が再発する、(2) 再発した時点でほとんどの場合薬剤耐性を獲得している、という問題は解決していない。

2. 研究の目的

研究の究極の目的は、難治性の GBM の治療法の確立である。

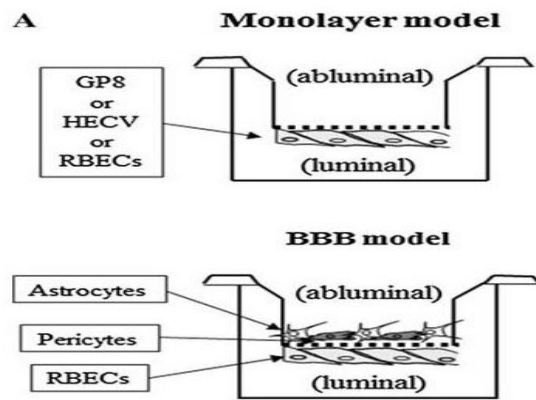
そのひとつの方法として、マイクロ RNA(miRNA) に注目した。われわれは先行研究において、GBM の TMZ 獲得耐性に miRNA が関係することを見出し、特に miR-195 に注目して機能解析、臨床検体での検証、in vivo モデルでの検証などを行う計画を立てた。

上記計画がうまくいかなかった場合の対応策として、複数の研究を同時並行で進めた。具体的には、脳腫瘍のマイクロキメリズムと、GBM と脳血管関門 (BBB) についての研究を行った。このうち、後者で興味深い結果が得られ、学術誌に公表済みである (Cell Mol Neurobiol. 2013 May;33(4):498-501)。本研究成果報告書では、主にその結果について報告する。

3. 研究の方法

(1) miR-195 に着目し、分子生物学的手法、臨床検体、in vivo モデルを駆使して、機能解析を行う予定であったが、予想外の結果がでて研究は難航。本報告書までにまとまった成果を報告することができなかった。

(2) BBB と GBM の相互作用を検討するべく、既存の BBB in vitro モデルを改良した系を作成した。具体的には、先行研究で確立済みの、ウイスターラットの脳から得られた血管内皮細胞 (RBECs) の初代培養を用いた単層モデル、およびペリサイト (pericytes)、アストロサイト (astrocytes) の共培養を加えた BBB モデルをもとに、GBM の微小環境を模したモデルを作成し、in vitro での BBB と GBM の相互作用の研究を行った (図 1)。Luminal side が血管内、abluminal side が血管外の空間に相当するモデルである。



<図 1 A:単層モデル B:BBB モデル>

4. 研究成果

(1) 既存モデルの改良

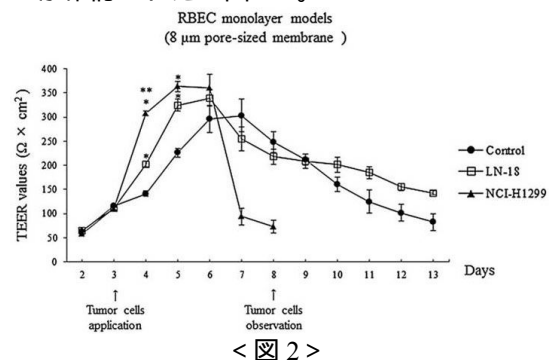
GBM の特徴として、体のほかの部分に転移することは極めてまれで、それは BBB が腫瘍の血管内浸潤を防いでいると考えられている。そのため、基板の役割を果たす膜の孔の大きさの検討から開始し、膜のみでは腫瘍が浸潤するが、血管内皮単層モデルにすると腫瘍の浸潤が起こらないよう、元の 0.4 μ m の膜から 8 μ m の膜に変更し、モデルの適正化を行った (図 1 で、点線のように表示される部分が膜構造である)。

(2) GBM 細胞株との相互作用の検討

上記モデルに、GBM 細胞株の LN-18 を加え、電気抵抗 (TEER) などを計測する方法で、BBB の強度を検討すると、コントロールに対し、BBB 機能の強化が認められた。また、GBM 細胞は BBB を超えて浸潤することがないことも確認された。GBM は最終的には血管新生などを通して BBB を破壊することが知られているが、少なくとも接触初期には BBB 機能を強化することが示唆された (図 2)。

(3) 肺癌細胞株との比較検討

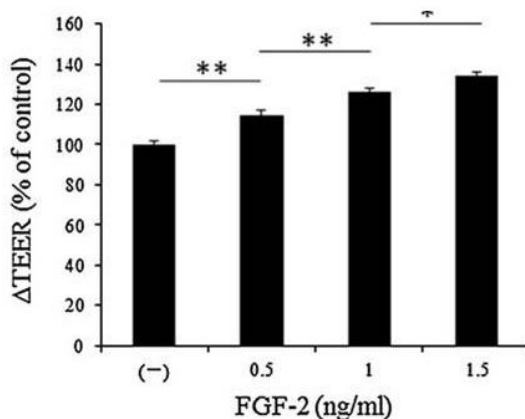
さらに、上記モデルに、脳に転移することが確認済みの肺癌細胞株 NCL-H 1299 を用いて同様の検討を行った。両者で早期に BBB の機能を強化する現象が認められたが、肺癌細胞株はその後、BBB を破壊して浸潤することが確認され、GBM との生物学的挙動の違いが確認された (図 2)。



<図 2>

(4) FGF-2 による BBB の強化

先行研究より、BBB を強化するサイトカインとして、FGF-2 の関与が示唆されていたため、これに注目して研究を進めた。LN-18, NCL-H 1299 とともに、FGF-2 を分泌することを確認した。また、上記モデルに、FGF-2 のみを添加し、検討すると、濃度依存性に BBB の強化が認められた<図 3>。ウエスタンブロット法で ZO-1 および occludin の発現増強が確認され、これらの発現上昇による BBB 機能強化と考えられた。



< 図 3 >

(5) FGF-2 除去による BBB 強化効果の消失
さらに、抗 FGF-2 抗体で、培養培地より FGF-2 を除去することで、上記 BBB の強化が消失することが確認され、FGF-2 以外の因子による効果が否定された。

通常、GBM は造影 MRI 画像で、造影される病変として認められるが、すでにその周囲に顕微鏡レベルで腫瘍が浸潤していることが分かっている。造影される病変は、新生血管が発達し、すでに BBB が破たんしているが、その周囲の、浸潤先端(invasion front)では、GBM が BBB を強化し、薬剤通過などを防ぐことで、微小環境(niche)を形成し、治療抵抗性の一因になっている、と考えられている。本研究の in vitro モデルは、この浸潤先端の in vitro モデルとして今後有用であると考えられる。また、その薬剤耐性機構の一端が FGF-2 によって担われている可能性を示唆するものとして、貴重な成果であると思われる。GBM の治療抵抗性、薬剤耐性に対する対策として、今後、FGF-2 の阻害による治療法の開発などが期待され、今後の検討課題と思われる。

< 追記 > 詳細は省略するが、micro RNA に関する当初の研究コンセプトは、fibroblast や esophageal squamous cell carcinoma の細胞株を用いた研究に反映され、成果を出している(発表論文、参照)。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Toyoda K, Tanaka K, Nakagawa S, Thuy DH, Ujifuku K, Kamada K, Hayashi K, Matsuo T, Nagata I, Niwa M. Initial Contact of Glioblastoma Cells with Existing Normal Brain Endothelial Cells Strengthen the Barrier Function via Fibroblast Growth Factor 2 Secretion: A New In Vitro Blood-Brain Barrier Model. *Cell Mol Neurobiol*. 査読あり、2013, 33(4), 489-501. DOI: 10.1007/s10571-013-9913-z.

Ujifuku K, Matsuo T, Toyoda K, Baba S, Okunaga T, Hayashi Y, Kamada K, Morikawa M, Suyama K, Nagata I, Hayashi N. Repeated delayed onset cerebellar radiation injuries after linear accelerator-based stereotactic radiosurgery for vestibular schwannoma: case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 査読あり、2012, 52(12), 933-936. DOI: なし URL : https://www.jstage.jst.go.jp/article/nmc/52/12/52_2947/_article

氏福健太、福田修志、豊田啓介、畑地豪、中尾健次郎、中嶋秀樹、立石洋平、馬場史郎、猪熊孝実、浅原智彦、山下和範、林健太郎、余縄雅彦、陶山一彦、長谷敦子、澄川耕二、永田泉、長崎大学病院救命救急センター設立前後における脳神経外科救急の動向、*Neurosurg Emerg*、査読あり、2012、17、8-14 DOI:なし。URL：無料のものはなし。紙媒体での発行。

Kashiyama K, Mitsutake N, Matsuse M, Ogi T, Saenko VA, Ujifuku K, Utani A, Hirano A, Yamashita S. miR-196a Downregulation Increases the Expression of Type I and III Collagens in Keloid Fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 査読あり、2012, 132(6), 1597-604. DOI: 10.1038/jid.2012.22.

Matsushima K, Isomoto H, Yamaguchi N, Inoue N, Ujifuku K, Mitsutake N, Machida H, Nakayama T, et al. MiRNA-205 modulates cellular invasion and migration via regulating zinc finger E-box binding homeobox 2 expression in esophageal squamous cell carcinoma cells. *J Transl Med*. 査読あり、2011, 9, 30 DOI: 10.1186/1479-5876-9-30

Kamada K, Tanaka Y, Matsuo T, Baba S, Ujifuku K, Suyama K, Nakazato Y, Nagata I. A case of multinodular high-grade neuroepithelial tumor with ependymal differentiation. *Brain Tumor Pathol*. 査読あり、2011, 28(3), 253-7. DOI: 10.1007/s10014-011-0032-6

[学会発表] (計 7 件)

出端亜由美、馬場史郎、氏福健太、吉田光

一、鎌田健作、松尾孝之、永田 泉、林徳眞吉、脳腫瘍におけるfetal cell microchimerism、第30回日本脳腫瘍学会学術集会、2012年11月26日、グランドプリンスホテル広島。

氏福健太、鎌田健作、定方英作、出端亜由美、馬場史郎、吉田光一、松尾孝之、森川実、下川功、安部邦子、中里洋一、永田泉、Aggressive intracranial fibromatosisの一部検例、第30回日本脳腫瘍学会学術集会、2012年11月25日、グランドプリンスホテル広島。

氏福健太、定方英作、前田肇、山口将、馬場史郎、吉田光一、堀江信貴、出雲剛、鎌田健作、角田圭司、林健太郎、松尾孝之、森川実、永田泉、最近7年間における慢性硬膜下血腫治療の現状 - 長崎大学病院の場合、日本脳神経外科学会第71回学術総会、2012年10月17日、大阪国際会議場。

氏福 健太、高田 正史、出端 亜由美、豊田 啓介、馬場 史郎、吉田 光一、鎌田健作、松尾 孝之、陶山 一彦、永田 泉、澄川 耕二、北條 美能留、脳神経外科悪性腫瘍臨床における緩和ケアの役割~長崎大学病院の場合、第29回日本脳腫瘍学会学術集会、2011年11月27日、下呂温泉 水明館。

Kenta Ujifuku, Masafumi Takada, Ayumi Debata, Keisuke Toyoda, Shiro Baba, Koichi Yoshida, Kensaku Kamada, Takayuki Matsuo, Kazuhiko Suyama, Izumi Nagata, Koji Sumikawa and Minoru Hojo. Palliative care for patients with malignant tumor in the Department of Neurosurgery, Nagasaki University Hospital. The 12th Young-Honam and Kyushu Neurosurgical Joint Meeting in Kitakyushu. 2011年11月12日。リーガロイヤルホテル小倉

氏福 健太、林 之茂、山口 将、豊田 啓介、馬場 史郎、吉田 光一、鎌田 健作、森川 実、林 徳眞吉、陶山 一彦、永田 泉、松尾 孝之、5-aminolevulinic acidを用いた術中蛍光診断の感度と特異度長崎大学病院において、原発性脳腫瘍をターゲットとした場合、(社)日本脳神経外科学会 第70回学術総会、2011年10月13日、パシフィコ横浜。

氏福 健太、馬場 史郎、畑地 豪、中尾 健次郎、中嶋 秀樹、立石 洋平、猪熊 孝実、浅原 智彦、林 健太郎、山下 和範、余縄 雅彦、陶山一彦、長谷 敦子、澄川 耕二、永田 泉、長崎大学病院救命救急センター設立前後における脳神経外科救急の動向、第15回日本救急医学会九州地方会、2011年5月28日、アルカス佐世保。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

長崎大学脳神経外科ホームページ
<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/nsurgery/link/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

氏福 健太 (UJIFUKU, Kenta)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科展開
医療科学講座脳神経外科学・客員研究員
研究者番号: 20437867

(2)研究分担者

松尾 孝之 (MATSUO, Takayuki)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科展開
医療科学講座脳神経外科学・准教授
研究者番号: 00274625

林 健太郎 (HAYASHI, Kentaro)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科展開
医療科学講座脳神経外科学・講師
研究者番号: 40404222

鎌田 健作 (KAMADA, Kensaku)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科展開
医療科学講座脳神経外科学・助教
研究者番号: 30549655

(3)連携研究者

光武 範吏 (MITSUTAKE, Norisato)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・社会医学部門放射線災害医療研究分野・准教授
研究者番号: 50404215