

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592116

研究課題名(和文) 悪性グリオーマにおける ARF - BP1 抑制効果の基礎的研究

研究課題名(英文) ARF-BP1 expression in malignant brain tumors

研究代表者

鷲山 和雄 (Kazuo, Washiyama)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：00183715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：頭蓋内腫瘍での ARF-BP1 蛋白発現の役割を検討した。まず、グリオーマ生検組織や培養細胞株を用いて検討したところ、グリオーマ細胞に種々の程度の ARF-BP1 の発現を認めたが、グリオーマの組織学的分化度、悪性度、p53 変異、mdm2 増幅とは、有為な相関はなく、グリオーマでの発現レベルは必ずしも高くはなかった。そこで、その他の頭蓋内原発腫瘍を検索したところ、胚細胞性腫瘍、特に胚腫に高頻度かつ強い発現を認めた。混合型の胚細胞性腫瘍での検討でも、胚腫に強く発現していた。すなわち、ARF-BP1 は、頭蓋内腫瘍では胚細胞性腫瘍、特に胚腫の造腫瘍性に関与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：ARF-BP1 was expressed in parts of glioma tissues, and glioma-derived cell lines in each levels. But there was no relationship between ARF-BP1 expression and the histological differentiation, the histological malignancy, the status of p53 gene mutation, or the status of mdm2 expression of glioma. ARF-BP1 was highly and frequently expressed in germ cell tumors, especially in Germinoma. ARF-BP1 seems to be one of the key molecules in the pathogenesis of germ cell tumors in the brain.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：ARF-BP1 mdm2 p53 glioma germ cell tumor germinoma

### 1. 研究開始当初の背景

ARF-BP1 (あるいは Mule, UREB1) は、主要な癌抑制遺伝子である ARF (p14ARF) の結合蛋白の解析過程で発見された。ARF-BP1 は、ARF による抑制的な調節を受けつつ、mdm2 と同様 p53 のコヒキチンリガーゼ活性を有し、p53 との相互作用を介して、または p53 経路と独立して細胞の増殖やアポトーシスに関与することが知られている。更に、ARF-BP1 発現を抑制すると癌細胞の著しい増殖抑制効果をもたらされることがあることも判明し、臨床腫瘍学の観点でも注目されている。

しかし、脳腫瘍に関してはこれまで調べられておらず、神経系組織での発現に関しては、全く報告がなかった。脳腫瘍には、ARF(p14ARF)の遺伝子異常の報告のある頭蓋内胚細胞性腫瘍や悪性グリオーマが存在し、それらの異常に関係して、他の癌腫と同様に、ARF-BP1 が高発現している可能性がある。そこで、脳腫瘍における ARF-BP1 について、先ずグリオーマを対象に、次いで胚細胞性腫瘍を対象に、発現解析を試みることにした。

### 2. 研究の目的

悪性グリオーマや胚細胞性腫瘍増殖における ARF-BP1 発現様式を明らかにする。また、p53、ARF など、関連する遺伝子変異を十分に検索済みのヒトグリオーマ培養細胞株や胚細胞性腫瘍細胞株を対象に、多面的に解析し、将来の新しい創薬開発に繋げる。

### 3. 研究の方法

手術時に採取された正常ヒト脳組織、腫瘍組織、およびそれら由来の細胞株を対象に、ウェスタンブロット法および免疫組織化学的に、ARF-BP1 の発現様式を観察した。ヒトグリオーマでは、10 株の細胞株を対象に検索した。頭蓋内胚細胞性腫瘍では、ヌードマウス皮下で継代移植可能な 4 つの細胞株を用い、検索した。胚細胞性腫瘍では、必要に応じ、HCG、AFP、PLAP、c-kit、CK、GP3、Oct4、Sox2 に対する免疫染色も併用し、WHO 睾丸腫瘍組織分類に準拠し、組織分類した。

### 4. 研究成果

#### (1) 正常ヒト脳組織での ARF-BP1 の発現：

手術時に採取されたヒト正常大脳(頭頂葉)および小脳から蛋白質を抽出し、Western Blot 法で解析したが、ARF-BP1 は殆ど検出されなかった。免疫組織化学的検索でも、小脳のプルキニエ細胞の細胞核や分子層の星細胞とかご細胞の核に軽度から中程度の ARF-BP1 発現が認められるみであり、グリア細胞や小脳の顆粒細胞には ARF-BP1 の発現を

殆ど確認できなかった。

#### (2) グリオーマ組織での ARF-BP1 の発現：

手術時に採取されたグリオーマ組織 5 例で ARF-BP1 の発現を検索した。うち 3 例で、軽度の ARF-BP1 の発現が、細胞核に認められた。しかし、ARF-BP1 の発現と腫瘍細胞の悪性度、分化度との相関は認められなかった。

#### (3) グリオーマ細胞株での ARF-BP1 の発現：

一部の細胞株で、ARF-BP1 の発現が軽度認められたが、p53 遺伝子変異との相関は認められなかった。

#### (4) 頭蓋内原発胚細胞性腫瘍組織での ARF-BP1 発現：

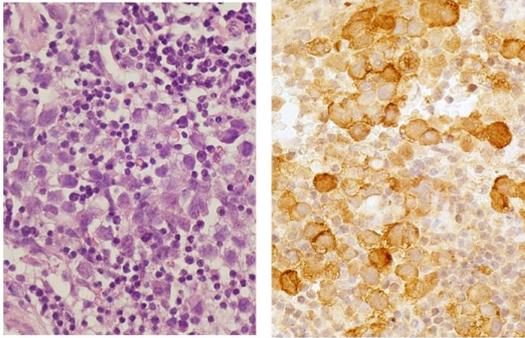
34 例の頭蓋内原発胚細胞性腫瘍手術標本を用いて検索したところ、29 例で ARF-BP1 の高発現がみられ、うち、胚腫 Germinoma 20 例中 18 例、卵黄嚢腫 Yolk sac tumor 4 例中 3 例、絨毛癌 Choriocarcinoma 2 例中 2 例、混合型胚細胞性腫瘍 6 例中全例で強い ARF-BP1 発現を認めた。しかし、2 例の成熟型奇形腫ではいずれにも ARF-BP1 を検出できなかった。(表 1)

Summary of the positivity of ARF-BP1 expression in 34 Intracranial germ cell tumors

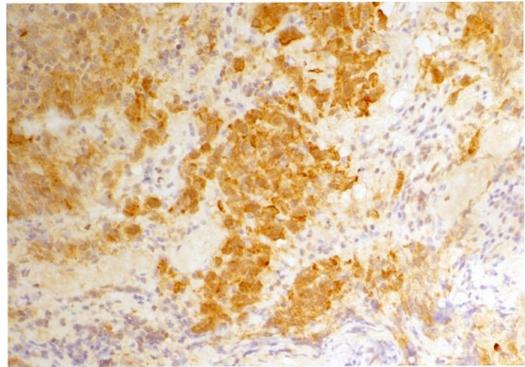
Germinoma(G)	18/20
Yolk sac tumor(YST)	3/4
Embryonal carcinoma(EC)	0/0
Choriocarcinoma	2/2
Teratoma(T)	0/2
T and G	3/3
YST and G	1/1
EC and YST	1/1
T and EC and G	1/1
<b>Total</b>	<b>29/34 cases</b>

#### (5) 胚腫での ARF-BP1 の発現様式：

(a) 胚腫では、ARF-BP1 が強く発現していた。混在するリンパ球では ARF-BP1 の発現を確認できなかった。ARF-BP1 陽性染色の分布と強度は、その他の胚細胞性腫瘍に比べ、胚腫で高頻度かつ強い染色性を示す傾向にあった。(図 1)

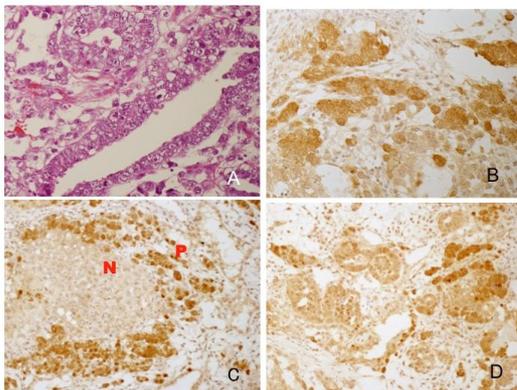


(b) 胚腫の腫瘍細胞内における ARF-BP1 の発現分布は、細胞核にも細胞質にも認められたが、概して細胞内に発現するものの、その頻度と染色強度は、症例により様々であった。(図 2)



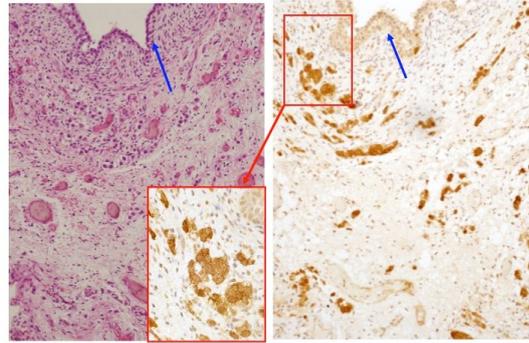
(6) その他の胚細胞性腫瘍における ARF-BP1 の発現様式：

卵黄嚢腫では、ARF-BP1 の過剰発現は不均一な分布を示していた。その発現分布は、PLAP, AFP, HCG, CK, Sox2, など、既存の分化あるいは幹細胞マーカーの発現分布との相関は見られなかった。(図 3)



(7) 胚腫と奇形腫の混合型における AFP-BP1 の発現様式：

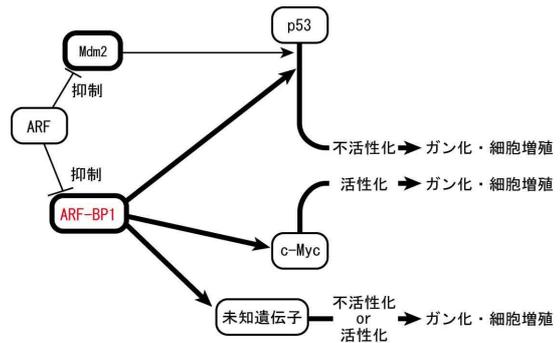
ARF-BP1 は、胚腫の腫瘍細胞にのみ認められ、奇形腫成分での発現は認められなかった。(図 4)



(8) 頭蓋内胚細胞性腫瘍細胞株での ARF-BP1 発現：

異種移植可能細胞株では 4 例とも ARF-BP1 陽性を示したが、卵黄嚢腫の 1 例では多様な染色態度を示した。ARF-BP1 は大部分の腫瘍細胞の細胞核に発現し、一部では胞体内でも発現が見られた。

(9) まとめと考察



ARF-BP1 蛋白は、頭蓋内腫瘍ではグリオーマやグリオーマ由来細胞株でも発現が見られるが、発現レベルは概して低く、組織学的な分化度や悪性度との相関はみられなかった。また、p53 遺伝子の変異や mdm2 の増幅や発現亢進との相関もみられなかった。それに比べて、頭蓋内原発胚細胞性腫瘍では、概して、高頻度かつ強く ARF-BP1 の発現が認められる傾向にあり、胚細胞性腫瘍、特に胚腫の増殖や分化の病態と深く関係する重要な分子の一つであると推測された。(図 5)

ARF-BP1 高発現の理由として、頭蓋内胚細

胞性腫瘍における ARF(p14ARF)遺伝子異常により、恒常的に ARF-BP1 が高発現している可能性が示唆された。正常神経系での ARF-BP1 発現が少なく、また、奇形腫成分での ARF-BP1 発現もほとんど見られないことから、ARF-BP1 は、頭蓋内胚細胞性腫瘍の治療ターゲットとしても考慮されるべきことが示唆された。

#### 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. Miyazaki T, Yamasaki M, Hashimoto K, Yamazaki M, Abe M, Usui H, Kano M, Sakimura K, and Watanabe M: Cav2.1 in Cerebellar Purkinje Cells Regulates Competitive Excitatory Synaptic Wiring, Cell Survival, and Cerebellar Biochemical Compartmentalization. 査読有, The Journal of Neuroscience 32(4), 2012, 1311-1377. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2755-11.2012
2. John A. Gray, Yun Shi, Usui H, Matthew J. During, Sakimura K, and Roger A. Nicoll: Distinct Modes of AMPA Receptor Suppression at Developing Synapses by GluN2A and GluN2B: Single-Cell NMDA Receptor Subunit Deletion In Vivo. 査読有, Neuron 71, 2011, 1085-1101. DOI:10.1016/j.neuron. 2011.08.007. Epub 2011 Sep 21

[学会発表](計 7 件)

1. 鷺山和雄、熊西敏郎. 頭蓋内原発胚細胞性腫瘍と ARF-BP1. 第 56 回日本神経病理学会総会 2015 年 6 月 4 日 九州大学医学部百年講堂(福岡県博多市)
2. Kazuo Washiyama, Toshiro Kumanishi. ARF-BP1 Expression in Primary Intracranial Germ Cell Tumors. 4th International CNS Germ Cell Tumor Symposium 2015 年 4 月 13 日 八方苑(東京都港区)
3. 熊西敏郎、鈴木諭、若宮富浩、竹下岩男、薄井宏、鷺山和雄、丸山暁、竹内幸美: 実験的マウス脳腫瘍の発生母細胞(第三報): 神経幹細胞マーカー Sox2 発現からみた解析. 日本脳腫瘍病理学会、2014 年 5

月 23 日~24 日、あわぎんホール(徳島県徳島市)

4. 熊西敏郎、鈴木諭、若宮富浩、竹下岩男、薄井宏、鷺山和雄、丸山暁、竹内幸美: 実験的マウス脳腫瘍の発生母細胞: 免疫染色による解析(第二報). 日本脳腫瘍病理学会、2013 年 5 月 24 日~25 日、KFC Hall 国際ファッションセンター(東京)
5. 熊西敏郎、丸山暁、竹内幸美、薄井宏、鷺山和雄: 実験的マウス脳腫瘍の発生母細胞: 免疫染色による解析. 日本脳腫瘍病理学会、2012 年 5 月 24 日~26 日、名古屋国際会議場(名古屋)
6. 熊西敏郎、丸山暁、竹内幸美、薄井宏、鷺山和雄: 実験的マウス脳腫瘍の発生母細胞: 免疫染色による解析. 日本脳腫瘍病理学会、2012 年 5 月 24 日~26 日、名古屋国際会議場(名古屋)
7. 薄井宏、鷺山和雄、市川富夫、小林一雄、阿部学、夏目里恵、崎村建司: Trp53 及び選択的 Nf1 遺伝子欠損マウスに発生した多彩な脳腫瘍の解析. 日本脳腫瘍病理学会、2011 年 5 月 20 日~21 日、タワーホール船堀(東京)

[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:  
出願年月日:  
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

鷲山 和雄 ( WASHIYAMA, Kazuo )  
新潟大学・脳研究所・准教授  
研究者番号： 00183715

(2) 研究分担者

薄井 宏 ( USUI, Hiroshi )  
新潟大学・脳研究所・非常勤研究員  
研究者番号： 20192510

(3) 連携研究者

(        )

研究者番号：