

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590486

研究課題名(和文) 膠芽腫の悪性形質の鍵となる遺伝子の探索

研究課題名(英文) Exploratory analysis for functional genes which play critical roles in malignant features of glioblastoma

研究代表者

福島 剛 (Fukushima, Tsuyoshi)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：10452913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)： 膠芽腫(Glioblastoma)は、極めて予後不良の悪性脳腫瘍であり、ブレイクスルーが待望されている難治性癌である。浸潤、増殖、造腫瘍能に対して促進的に作用していたIGFBP-2とCD24との関連を中心として膠芽腫の悪性形質の鍵となる機能遺伝子およびシグナル伝達を探索した。

膠芽腫の抗癌剤感受性の耐性機序の一部が明らかになった。また、膠芽腫ではIGFBP-2の発現をRelAが促進しており、その抑制によって、増殖能が低下し、生体移植モデルでの造腫瘍性が抑制された。また、膵臓癌においても、IGFBP-2、CD24が高発現しているものがあることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is a malignant brain tumor with miserable prognosis, and breakthrough on treatment against this malignant tumor is required. We performed exploratory analysis for novel functional genes which play important roles in malignant features of glioblastoma with a central focus on IGFBP2 and CD24.

Several mechanisms of chemoresistance of glioblastoma are discovered. It was revealed that RelA enhances the expression of IGFBP2 in glioblastoma cells, and inhibition of RelA reduced in vitro-proliferative activity and in vivo-tumorigenicity of glioblastoma cells. Not a few pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines also express IGFBP2 and CD24.

研究分野：医歯薬学

キーワード：癌 遺伝子 細胞・組織 病理学 脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫 (Glioblastoma) は、極めて予後不良の悪性脳腫瘍であり、治療標的について、最もブレークスルーが待望されている難治性がんの一つである。

膠芽腫に高頻度に見られる遺伝子異常や、EGFR 経路や PI3K-Akt 経路といった悪性形質に重要な役割を果たすシグナル伝達経路はかなり明らかになってきている。また、近年、癌幹細胞仮説が提唱され、癌幹細胞もしくは tumor initiating cell が、化学療法や放射線療法への耐性を解決するための治療標的として取り沙汰されるようになってきている。しかし、依然として膠芽腫の予後を決定的に改善する治療標的分子は見出されていない。これは、既知のシグナル伝達や既存の治療・アプローチにとらわれない、何らかのブレークスルーが必要であることを示している。本研究は、膠芽腫での高発現が報告されているが、その意義や機能が未だよくわかっていない遺伝子を解析し、その下流または上流のシグナル伝達に関わる新規機能遺伝子を探索して、膠芽腫の新規治療標的を見出そうとするものである。

申請者は、膠芽腫で高発現しているが、その真の機能は未知である遺伝子の一つとして、insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP2) に注目し、その発現、生体内機能について解析してきた。IGFBP-2 は従来、胎児期に高発現して脳の発達に関与し、insulin-like growth factors (IGFs) の調節に抑制的に働く因子とされてきた。一方で、膠芽腫を含む様々な悪性腫瘍において腫瘍進展に伴う高発現が報告されてきており、IGFs のシグナルから独立した未知の機能も有している可能性が強く示唆されてきている。

申請者は、膠芽腫組織および培養細胞株における IGFBP-2 の高発現を確認し、short hairpin RNA (shRNA) 発現レトロウイルスを用いたノックダウン系を試みて、IGFBP-2 は膠芽腫細胞の形態と増殖、更に運動能と浸潤能にも重要な役割を果たしており、膠芽腫細胞の浸潤性増殖を促進すること、また、IGFBP-2 を抑制することで、in vitro および in vivo において膠芽腫の進展を抑制できることを明らかにした。さらに cDNA マイクロアレイを用いて、IGFBP-2 抑制に伴う遺伝子発現プロファイルを解析したところ、IGFBP2 と連動して発現が変化する遺伝子として CD24 を見出した (Fukushima T et al., J Biol Chem 282:18634-44, 2007)。さらに、やはりレトロウイルスを用いて CD24 のノックダウンを行い、CD24 を抑制することで膠芽腫細胞の浸潤を抑制出来ることを示し、cDNA マイクロアレイを用いて、CD24 抑制に伴う遺伝子発現プロファイルを解析し、CD24 に連動して発現が変化する遺伝子群 (c-Met、MALAT-1、ADAM10 等) を同定した。

2. 研究の目的

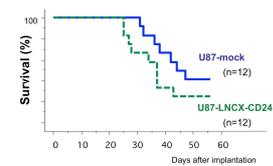
本研究は膠芽腫の悪性形質を左右する新たな機能遺伝子およびシグナル伝達を探索し、新規治療標的を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

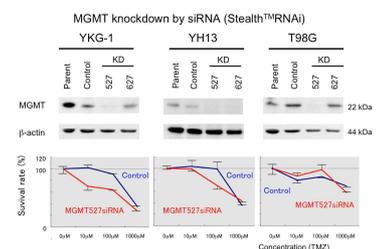
既存の知見にとらわれない新たな発見を得るため、網羅的解析と機能解析の両面からアプローチする。まず、すでに得られているノックダウン細胞を用いて、IGFBP-2 や CD24 の発現変化に伴う表現型の変化や、そこに加えた刺激や治療の効果を詳細に解析すると共に、新たなヒト膠芽腫細胞や他の癌細胞に対しても shRNA 発現レトロウイルスを用いてノックダウンを行い、これまでに得られた IGFBP-2 や CD24 の発現変化に伴う表現型、遺伝子発現の変化が膠芽腫特有のものか、癌に一般化できるものか検証する。さらに、stemness における IGFBP-2、CD24 の意義を解析する。次に、マイクロアレイで得られた候補遺伝子を検証して絞り込んでいき、治療標的となりうると思われた遺伝子については、そのノックダウン系、強制発現系を確立し、詳細な機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) CD24 をノックダウンした細胞はコントロールも含め、ヌードマウスの脳に定着せず、in vivo における腫瘍形成の変化は見出せなかった。一方で、プロモーターメチル化により CD24 が発現していない U87 細胞に強制発現させたところ、移植したヌードマウスの生存率が悪化した。このことより、CD24 は in vivo における膠芽腫の悪性形質を増強することが示唆された。



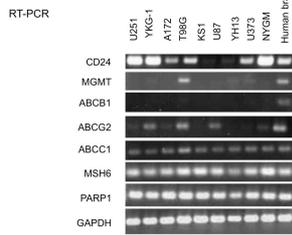
(2) 膠芽腫各種細胞におけるアルキル化剤 temozolomide (TMZ) の効果を解析したところ、耐性を示したのは YKG-1, T98G, YH13 であり、この中で CD24 を発現していたのは T98G であった。さらにこれらの細胞株に対して MGMT を siRNA でノックダウンしたところ、YKG-1, YH13 では TMZ 耐性が低下したにも関わらず、T98G では変化なかった。



そこで、T98G における薬剤耐性関連遺伝子の発現を解析したところ、複数の因子

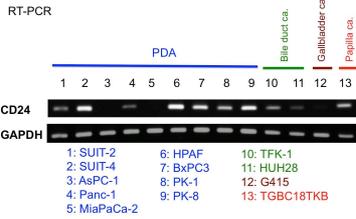
(ABCG2, ABCC1, MSH6, PARP1) が発現していた。

Expressions of drug resistance-related genes in glioblastoma cells

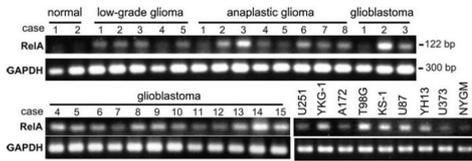


(3) IGFBP-2, CD24 の脳腫瘍以外の癌での発現を解析したところ、膵臓癌 (膵管癌) における CD24 発現が認められた。

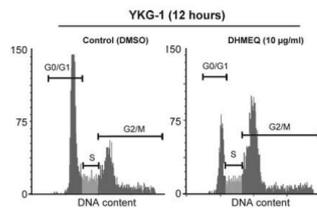
Expression of CD24 in PDA and biliary tract carcinoma cell lines



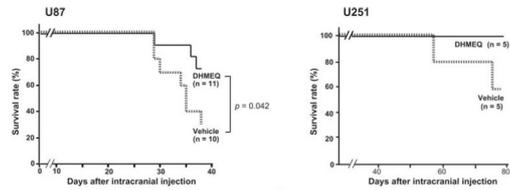
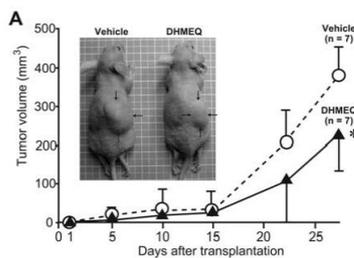
(4) IGFBP-2 と連動して発現が変化していた遺伝子 RelA の発現を解析したところ、膠芽腫組織、細胞で高頻度に発現していた。



(5) RelA 阻害剤である DHMEQ を添加して膠芽腫細胞を培養したところ、増殖が抑制され、細胞周期解析で G2 arrest が認められた。



(6) さらに、ヌードマウス皮下に膠芽腫細胞を移植し、DHMEQ を投与したところ、造腫瘍性の抑制効果が認められた。また、ヌードマウスの生存曲線についても、改善効果が認められた。これらのことより、DHMEQ および、その他の NFkappa B シグナルを抑制する薬剤の膠芽腫の治療への応用可能性が示されたと考えられる。



一方で、IGFBP2、CD24 が RelA の発現を増大させる機序、glioma initiating cell に関わる機序については十分な成果に至らず、本研究計画開始当初にマイクロアレイ解析で渉猟されていた治療標的候補遺伝子群のうち、RelA や薬剤耐性遺伝子群以外のものについても、解析するための準備 (ノックダウン細胞・強制発現細胞の作成、glioma initiating cell 取得方法、培養条件・方法の確立) に留まってしまい、膵臓癌における IGFBP2, CD24 発現の意義の解析と合わせて、今後の課題となった。

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 6 件) 全て査読有

- Ye J, Kawaguchi M, Haruyama Y, Kanemaru A, Fukushima T, Yamamoto K, Lin CY, Kataoka H. Loss of HAI-1 participates in metastatic spreading of human pancreatic cancer cells in a mouse orthotopic transplantation model. *Cancer Sci.*, 105;44-51, 2014
- Hoshiko S, Kawaguchi M, Fukushima T, Haruyama Y, Yorita Y, Tanaka H, Seiki M, Inatsu H, Kitamura K, Kataoka H. Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (Hai-1/Spint1) is a suppressor of intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.*15;2659-2670, 2013
- Kohama K, Kawaguchi M, Fukushima T, Lin C-Y, Kataoka H. Regulation of pericellular proteolysis by hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) in trophoblast cells. *Hum. Cell* 25;100-110, 2013
- Fukushima T, Kawaguchi M, Yorita K, Tanaka H, Umezawa K, Takeshima H, Kataoka H. Antitumor effect of dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), a small molecule inhibitor of nuclear factor-kB, on glioblastoma. *Neuro. Oncol.*14;19-28, 2012
- Baba T, Kawaguchi M, Fukushima T, Sato Y, Orikawa H, Yorita K, Tanaka H, Lin C-Y, Sakoda S, Kataoka H. Loss of membrane-bound serine protease

inhibitor HAI-1 induces oral squamous cell carcinoma cells invasiveness. J. Pathol. 228;181-192, 2012

6. Yamagata Y, Aikou S, Fukushima T, Kataoka H, Seto Y, Esumi H, Kaminishi M, James R, Goldenring JR, Nomura S. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.303;G1254-1261, 2012

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 福島剛, 上原久生, 梅北佳子, 頼田顕辞, 秋山裕, 赤木真由美, 田中弘之, 片岡寛章:高い増殖能を示す下垂体腺腫の検討, 第 104 回 日本病理学会総会(名古屋市, 2015.4.30-5.2)
2. Fukushima T, Haruyama Y, Kawaguchi M, Kanemaru A, Yamamoto K, Tanaka H, and Kataoka H. Silencing of membrane-bound serine protease inhibitor, HAI-1, enhances metastatic capability of pancreatic cancer cells in mouse models. 第 37 回 日本分子生物学会年会(横浜市, 2014.11.25-27)
3. Fukushima T, Haruyama Y, Kawaguchi M, Tanaka H, and Kataoka H:Effect of CD24 silencing on pancreatic ductal cell adenocarcinoma cells. 第 73 回 日本癌学会学術総会(横浜市, 2014.9.25-27)
4. 福島剛, 片岡寛章:膠芽腫細胞株における抗癌剤耐性, 第 32 回 日本ヒト細胞学会学術集会(東京都港区, 2014.8.30-31)
5. 福島剛, 春山幸洋, 片岡寛章:CD24 ノックダウンによる膵管癌細胞の転移・浸潤能の変化 (Effect of CD24 knockdown on the invasiveness of pancreatic ductal adenocarcinoma cells) 第 23 回 日本がん転移学会学術集会(金沢市, 2014.7.10-11)
6. Tsuyoshi Fukushima, Yukihiro Haruyama, Makiko Kawaguchi, Kenji Yorita, Hiroyuki Tanaka, and Hiroaki Kataoka. Roles of CD24 in pancreatic ductal cell adenocarcinoma cells. 第 72 回 日本癌学会学術総会(横浜市, 2013.10.3-5)
7. 福島剛, 横上聖貴, 竹島秀雄, 片岡寛章:ヒト膠芽腫細胞株(MGM7 および MGM7SF)の樹立とその特徴, 第 31 回 日本ヒト細胞学会学術集会(所沢市, 2013.8.10-11)
8. 福島剛, 春山幸洋, 片岡寛章:CD24 ノックダウンによる膠芽腫細胞の抗癌剤感受性の変化, 第 22 回 日本がん転移学会学術集会(松本市, 2013.7.11-12)
9. 福島剛, 川口真紀子, 金丸愛, 春山幸洋, 片岡寛章:膠芽腫細胞の抗癌剤感受性に対する CD24 発現の影響(late

breaking abstract, 1LBA-0782) 第 35 回 日本分子生物学会(福岡市, 2012.12.11-14)

10. Fukushima T: Roles of membrane-bound serine protease inhibitor, HAI-1, in invasion and metastasis of cancers. 14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society (MRS 2012) (Brisbane, QL, Australia, Sep 2-5, 2012)
11. 福島剛:癌の浸潤転移における膜型プロテアーゼインヒビターの役割, 第 21 回 日本がん転移学会学術集会(広島市, 2012.7.12-13)

〔図書〕(計 1 件)

Fukushima T: Chaptor 5; Alkylating Agents and Treatment of Gliomas. pp. 145-171 . In: Yildiz Dincer eds. Alkylating Agents as Environmental Carcinogen and Chemotherapy Agents. ISBN: 978-1-62618-487-9, Nova Science Publisher, Inc. (2013) 総ページ数 194 ページ

〔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

福島 剛 (FUKUSHIMA, Tsuyoshi)

宮崎大学医学部病理学講座腫瘍・再生病態学分野・助教

研究者番号: 10452913

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし