

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462268

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍におけるハイパーメタボリズムを標的にした新たな診断、治療戦略の考案

研究課題名(英文) Development of the novel diagnostic and treatment strategies targeting at the hyper-metabolism in malignant brain tumors

研究代表者

牧野 敬史 (Makino, Keishi)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90381011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：悪性脳腫瘍における新たな診断および治療標的を探索する目的で、中枢神経悪性リンパ腫の臨床サンプルを用いて、増殖、浸潤に関するケモカイン(CXCL12/CXCL13)と受容体(CXCR4/CXCR5)およびそのシグナル分子の発現解析を行った。脳原発リンパ腫ではCXCL12およびその受容体であるCXCR4の発現も高く、CXCL12/CXCR4の増殖、浸潤への関与が示唆された。さらに下流のシグナル分子として、翻訳開始因子であるeIF4Eの活性型であるリン酸化eIF4Eの高発現がみられ、eIF4Eは細胞の代謝に関与する分子の発現調節にも関与しており、リンパ腫の新たな治療標的と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In order to identify the novel diagnostic and treatment targeting molecules in the malignant brain tumors, we investigated the expression of chemokines (CXCL12/CXCL13) and their receptors (CXCR4/CXCR5) in the central nervous system (CNS) lymphomas. In the cases with CNS lymphomas, higher expression of CXCL12 and CXCR4 was found. Furthermore, positive expression of their signaling molecules (eIF4E) was also found. Since eIF4E regulated expression of the molecules related cellular metabolism, the CXCL12/CXCR4 pathways might be novel therapeutic targets for malignant brain tumors, especially in CNS lymphomas.

研究分野：脳神経外科学、脳腫瘍学

キーワード：悪性脳腫瘍 治療標的分子 浸潤 代謝亢進

1. 研究開始当初の背景

がん細胞がグルコースを活発に取り込み解糖系を亢進し、エネルギーの産生に利用することは、Warburg 効果として知られている。このようながん細胞における代謝の亢進（ハイパーメタボリズム）には、(1) 代謝の基質となる栄養素の細胞内への取り込みの増加、(2) 代謝を制御する関連分子の高発現や機能亢進、(3) がん特異的な代謝経路へのシフトが関与している。具体的には、(1) 細胞内への取り込みの増加：悪性腫瘍では、細胞内へ代謝の基質となるブドウ糖やアミノ酸の取り込みを増加させるために、GLUT1(グルコーストランスポーター)、LAT1(アミノ酸トランスポーター)などのトランスポーターの高発現。(2) 代謝を制御する関連分子の高発現や機能亢進：悪性腫瘍では、糖代謝関連(hexokinase, AMP kinase, TKTL1 pyruvate kinase, G6PD など)、脂質代謝関連(FAS など)分子の腫瘍細胞内での高発現。(3) がん特異的な代謝経路へのシフト：悪性腫瘍ではグルタミン酸代謝やチミジン代謝亢進がみられ、悪性脳腫瘍であるグリオーマでは解糖系に続く TCA 回路に關与する酵素である IDH1 遺伝子の変異がみられる。

2. 研究の目的

脳腫瘍における悪性度の指標としては、組織中の細胞密度の増加、異型細胞の出現、核分裂像、壊死、微小血管増殖などの存在が用いられる。しかしながら、組織診断ではこれらの指標を満たさないために低悪性度と診断された腫瘍が、早期に再発、進行することがあり、組織学的悪性度と生物学的悪性度が一致しない場合もある。本研究では悪性脳腫瘍において亢進している代謝経路に着目し、悪性脳腫瘍において発現亢進や活性化しているメタボリック関連分子を見出し、それらの分子を標的にして、腫瘍の生物学的悪性度の評価、腫瘍細胞特異的な治療法の開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 臨床的研究：悪性脳腫瘍である膠芽腫は可及的な摘出が必要であるが、リンパ腫は診断が確定できれば化学療法や放射線療法の効果が期待できるため、組織確認の生検術が計画されるため、手術前の画像診断はきわめて重要である。MRI 検査により腫瘍の血流を評価する perfusion imaging と細胞密度を評価する diffusion imaging を組み合わせた鑑別法の有用性を検討した。

(2) 基礎的研究：中枢神経系悪性リンパ腫は、腫瘍細胞が脳深部に浸潤することで広範囲に脳を障害し、高度の認知障害等を生じる悪性脳腫瘍である。脳内に生じるケモカイン

は、腫瘍細胞の浸潤に關与し、細胞内のシグナル分子を活性化することが知られている。まず脳原発悪性リンパ腫組織において、B 細胞リンパ球の遊走に關与するケモカインである CXCL12 および CXCL13 とその受容体の発現を解析した。さらにカテプシン S は、細胞内リソソームに局在するシステインプロテアーゼの一つであり、近年グリオーマ細胞の脳内浸潤や乳がんの脳転移に關与するとの報告があり、脳原発悪性リンパ腫組織において、カテプシン S の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 臨床的研究：膠芽腫は perfusion imaging にて灌流が亢進しており、リンパ腫は diffusion imaging にて拡散制限が優位にみられた。この結果を利用して 87 例(膠芽腫；54 例、リンパ腫；33 例)を 4 グループに分類することで、鑑別診断に用いることができることを示した。

(2) 基礎的研究：中枢神経系リンパ腫では脳原発および二次性の脳内浸潤例共に、CXCL12(85.7%,100%) と CXCL13(76.2%,75%)は高発現し、また脳原発リンパ腫では CXCL12 受容体である CXCR4 の発現も高く(61.9%)、一方で脳浸潤を伴わない全身性リンパ腫では CXCR4 の発現がなく、CXCL12/CXCR4 がリンパ腫の脳内浸潤に關与する可能性が示唆された(図 1)。さらに下流のシグナル分子として、翻訳開始因子である eIF4E の活性型であるリン酸化 eIF4E の高発現(100%)がみられた。eIF4E は細胞の代謝に關与する分子の発現調節にも關与しており、リンパ腫の新たな治療標的と考えられた。

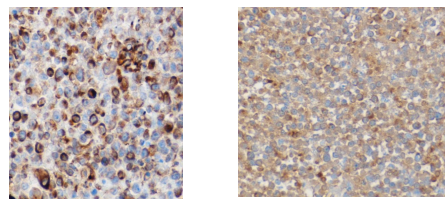


図 1：組織中の CXCL12(左)および CXCR4(右)発現

中枢神経系リンパ腫では脳原発および二次性の脳内浸潤例共に、カテプシン S は高発現(90%, 100%)していた(図 2)。組織中の局在として、特に血管周囲に集簇した浸潤マクロファージに強い発現があったことは、リンパ腫の血管周囲腔を介した脳内への浸潤に關与する可能性が示唆された。

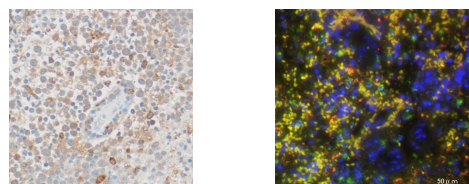


図2：組織中のカテプシン S (左) の発現と浸潤マクロファージ (右緑) とカテプシン S (右赤) の組織中の発現分布

以上の結果は、まず始めに脳内にマクロファージが浸潤しカテプシン S を発現することでリンパ腫細胞を浸潤させ、浸潤したリンパ腫細胞からはケモカインである CXCL12 が産生されること、さらにマクロファージからのカテプシン S の発現を亢進させ、リンパ腫の浸潤を亢進させる可能性が示唆された。ケモカインの産生は、細胞代謝の亢進にも関与するため、カテプシン S の阻害剤を使用することで、リンパ腫の浸潤を抑制だけでなく、代謝の制御による新規治療へもつながる可能性が示唆された (図 3)。

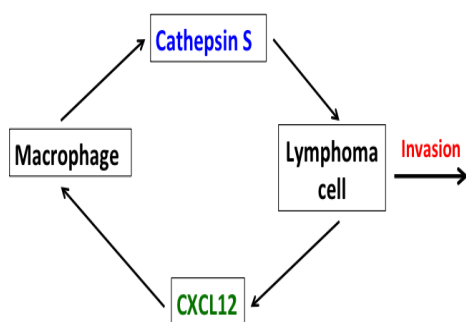


図3：浸潤マクロファージとリンパ腫細胞のケモカインおよびカテプシン S を介した相互関係

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 14 件)

Azuma M, Hirai T, Shigematsu Y, Kitajima M, Kai Y, Yano S, Nakamura H, Makino K, Iryo Y, Yamashita Y. Evaluation of Intracranial Dural Arteriovenous Fistulas: Comparison of Unenhanced 3T 3D Time-of-flight MR Angiography with Digital Subtraction Angiography. *Magn Reson Med Sci.* 14 (4): 285-293. 2015 査読有

Kidoh M, Hirai T, Oda S, Utsunomiya D, Kawano T, Yano S, Nakamura H, Makino K, Iryo Y, Azuma M, Hayashida E, Nakaura T, Yamashita Y. Can CT angiography reconstructed from CT perfusion source data on a 320-section volume CT scanner replace conventional CT angiography for the evaluation of intracranial arteries? *Jpn J Radiol.* 33(6):353-359. 2015 査読有

Ali TF, Iwamaru K, Ciftci HI, Koga R, Matsumoto M, Oba Y, Kurosaki H, Fujita M, Okamoto Y, Umezawa K, Nakao M, Hide T, Makino K, Kuratsu J, Abdel-Aziz M,

Abuo-Rahma Gel-D, Beshr EA, Otsuka M. Novel metal chelating molecules with anticancer activity. Striking effect of the imidazole substitution of the histidine-pyridine-histidine system. *Bioorg Med Chem.* 23(17):5476-5482. 2015 査読有

Makino K, Nakamura H, Hide T, Kuroda JI, Yano S, Kuratsu JI. Prognostic impact of completion of initial high-dose methotrexate therapy on primary central nervous system lymphoma: a single institution experience. *Int J Clin Oncol.* 20: 29-34. 2015 査読有

Yamamoto T, Kuroda J, Takezaki T, Shinojima N, Hide T, Makino K, Nakamura H, Yano S, Nishi T, Kuratsu J. Characteristics of brain metastases from esophageal carcinoma. *Surg Neurol Int.*;5: 137. doi:10.4103/2152-7806.141468. 2014 査読有

Takahashi Y, Makino K, Nakamura H, Hide T, Yano S, Kamada H, Kuratsu J. Clinical characteristics and pathogenesis of cerebellar glioblastoma. *Mol Med Rep.* 10 (5): 2383 - 2388. 2014 査読有

Anai S, Hide T, Takezaki T, Kuroda JI, Shinojima N, Makino K, Nakamura H, Yano S, Kuratsu JI. The anti-tumor effect of fibrin glue containing Temozolomide against malignant glioma. *Cancer Sci.* 105 (5): 583-591. 2014 査読有

Makino K, Nakamura H, Yano S, Kuratsu JI. Incidence of Primary Central Nervous System Germ Cell Tumors in Childhood: A Regional Survey in Kumamoto Prefecture in Southern Japan. *Pediatr Neurosurg.* 49: 155 - 158. 2013 査読有

Takahashi Y, Nakamura H, Makino K, Hide T, Muta D, Kamada H, Kuratsu J. Prognostic value of isocitrate dehydrogenase 1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation, and 1p19q co-deletion in Japanese malignant glioma patients. *World J Surg Oncol.* 11(1):284. doi: 10.1186 / 1477 - 7819-11-284. 2013 査読有

Hide T, Makino K, Nakamura H, Yano S, Anai S, Takezaki T, Kuroda JI, Shinojima N, Ueda Y, Kuratsu JI. New Treatment Strategies to Eradicate Cancer Stem Cells and Niches in Glioblastoma. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 53(11), 764-772. 2013 査読有

Fujimoto K, Kuroda JI, Makino K, Hasegawa Y, Kuratsu JI. Skull Metastasis From Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Report of 3 Cases and Review of the Literature *Neurol Med Chir (Tokyo)* 53(10), 717-721. 2013 査読有

Niibori-Nambu A, Midorikawa U, Mizuguchi S, Hide T, Nagai M, Komohara Y, Nagayama M, Hirayama M, Kobayashi D, Tsubota N,

Takezaki T, Makino K, Nakamura H, Takeya M, Kuratsu J, Araki, N. Glioma initiating cells form a differentiation niche via the induction of extracellular matrices and integrin alpha V PLoS One 8(5); e59558, doi: 10.1371/journal.pone.00595582013. 2013 査読有

Uetani H, Akter M, Hirai T, Shigematsu Y, Kitajima M, Kai Y, Yano S, Nakamura H, Makino K, Azuma M, Murakami R, Yamashita Y. Can 3T MR Angiography Replace DSA for the Identification of Arteries Feeding Intracranial Meningiomas? AJNR Am J Neuroradiol. 34(4):765-772. 2013 査読有

Makino K, Nakamura H, Hide TI, Yano S, Kuroda JJ, Takahashi Y, Iyama KI, Kuratsu JJ. Usefulness of immunohistochemical expression analysis of metabolic-related molecules to differentiate between intracranial neoplastic and non-neoplastic lesions. Brain Tumor Pathol. 30(3): 144-150, 2013 査読有

[学会発表](計20件)

牧野敬史, 再発脳原発悪性リンパ腫に対する大量メソトレキセート再投与治療の検討、第33回日本脳腫瘍学会学術総会、2015.12.6-8、グランドプリンスホテル京都(京都)

牧野敬史, 脳原発悪性リンパ腫に対する大量メソトレキセート・プロカルバジン併用療法による治療成績と今後の課題、社団法人日本脳神経外科学会、第74回学術総会、2015.10.14-16、ロイトン札幌(札幌)

Makino K, Population-based epidemiological study of primary intracranial tumors in childhood in Kumamoto Prefecture in southern part of Japan, 15th Interim Meeting of The World Federation of Neurosurgical Societies, 2015.9.8-12, Rome Marriott Park Hotel, Rome (Italy)

牧野敬史, 小児症候性キアリ型奇形に対する治療成績の成人例との比較検討、第43回日本小児神経外科学会、2015.6.12-13、海峡メッセ下関(下関)

牧野敬史, 中枢神経系リンパ腫組織におけるカテプシンSの発現解析、第33回日本脳腫瘍病理学会、2015.5.29-30、JRホテルクレメント高松(高松)

Makino K, Incidence of primary central nervous system germ cell tumors in Kumamoto Prefecture in southern part of Japan: A 25 years study, 4th International CNS Germ Cell Tumor Symposium, 2015.4.12-15, Happa-en, Tokyo (Japan)

Makino K, Population-based Epidemiological Study of Primary Intracranial Tumors in Childhood in Kumamoto Prefecture JAPAN, 1st Congress

of Asian-Australasian Society for Pediatric Neurosurgery and Inaugural Meeting, 2015.3.20-22, Evergreen International Convention Center, Taipei (Taiwan)

牧野敬史, 脳原発悪性リンパ腫に対する大量メソトレキセート療法の効果はMRIにて予測できるか、第32回日本脳腫瘍学会学術総会、2014.11.30-12.2、シェラトングランドトーキョーベイホテル(浦安)

Makino K, Population-based epidemiological study of primary intracranial tumors in childhood; a regional survey in Kumamoto Prefecture in southern part of Japan, XIII Kyushu and Ho-Youngnam Neurosurgical Joint Meeting, 2014.11.7-8, Hotel Inter-Burgo, Daegu (Korea)

牧野敬史, 膠芽腫と悪性リンパ腫の鑑別診断におけるMR灌流画像および拡散強調画像を用いた診断チャート作製の試み、社団法人日本脳神経外科学会 第73回学術総会、2014.10.9-11、グランドプリンスホテル高輪(東京)

Makino K, Investigation of CXCL12/CXCR4 signaling pathways in central nervous system lymphomas, 11th Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology, 2014.9.11-14, Hilton Convention Center, Istanbul (Turkey)

Makino K, Treatment results of childhood intracranial ependymomas in Kumamoto University Hospital, Kumamoto Japan, 16th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology, 2014.6.28-7.2, Suntec Singapore International Convention & Exhibition Center, Singapore (Singapore)

牧野敬史, 小児上衣腫症例の治療成績の検討、第42回日本小児神経外科学会、2014.5.29-30、江陽グランドホテル(仙台)

牧野敬史, 中枢神経系リンパ腫におけるCXCL12/CXCR4シグナル経路の検討、第32回日本脳腫瘍病理学会、2014.5.23-24、あわぎんホール(徳島)

牧野敬史, 中枢神経系リンパ腫におけるケモカイン及びケモカイン受容体の発現解析、第31回日本脳腫瘍学会学術総会、2013.12.8-10、フェニックスシーガイアリゾート(宮崎)

Makino K, Evaluation of fatty acid synthase expression as predictive factor for aggressiveness in meningiomas, 4th Quodrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology, 2013.11.21-24, Marriott Marquis Hotel, San Francisco (U.S.A.)

牧野敬史, 再発脳原発悪性リンパ腫の治療法の検討、社団法人日本脳神経外科学

会 第72回学術総会、2013.10.16-18、
パシフィコ横浜（横浜）

牧野敬史、びまん性脳幹部神経膠腫の治
療成績の検討、第41回日本小児神経外
科学会、2013.6.7-9、大阪国際会議場（大
阪）

牧野敬史、髄芽腫の免疫組織染色による
グループ分類とその問題点、第31回日
本脳腫瘍病理学会、2013.5.24-25、KFC
Hall 国際ファッションセンター（東京）

Makino K. Incidence of primary central
nervous system germ cell tumors in
childhood; a regional survey in Kumamoto
prefecture in southern part of Japan, 3rd
International CNS Germ Cell Tumour
Symposium, 2013.4.17-20, Corpus Christi
College, Cambridge (UK)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 敬史 (MAKINO KEISHI)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90381011

(2) 研究分担者

倉津 純一 (KURATSU JUNICHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：20145296

中村 英夫 (NAKAMURA HIDEO)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30359963

秀 拓一郎 (HIDE TAKUICHIRO)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40421820

黒田 順一郎 (KURODA JUNICHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：90536731