

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670274

研究課題名(和文) 脂質結合蛋白質を標的にした神経膠腫診断と腫瘍増殖制御の試み

研究課題名(英文) Possibility of fatty acid binding protein as a diagnostic and therapeutic target in glioma

研究代表者

大和田 祐二(Owada, Yuji)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20292211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪酸結合蛋白質(FABP7)に着目し、膠芽腫の診断薬開発および腫瘍増殖制御の可能性を検証した。具体的には、1)ヒトFABP7に対する高力価のポリクローナルおよびモノクローナル抗体を樹立し最適化しELISA系を構築した。2)ELISA法により、原発性脳腫瘍並びに脳血管障害の患者特に、低分化で悪性度が高い神経膠腫において、有意に髄液中のFABP7レベルが高いことを見出した。3)病理学的検討では、FABP7の発現は神経膠腫の悪性度と有意な相関を示すことが判明した。4)ヒトグリオーマ幹細胞株でのFABP7の発現をsiRNAにより抑制すると、幹細胞の増殖が有意に抑制されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to develop the sensitive diagnostic tool for glioblastoma focusing on fatty acid binding protein (FABP7), and examined the possibility as a regulator of glioma proliferation. We firstly established the sensitive ELISA assay system to detect FABP7 and measured its concentration in the cerebro-spinal fluid (CSF) samples from the patient suffering from glioma. As a result, FABP7 concentration in the CSF was markedly elevated in the glioblastoma patients compared with healthy controls. In the pathological examination in glioma samples, levels of FABP7 expression were significantly correlated with their malignancy grade. Furthermore, suppression of FABP7 expression in glioma stem cell lines by siRNA transfection resulted in the decreased proliferation.

研究分野：組織学、解剖学、分子生物学

キーワード：FABP 脳腫瘍 診断マーカー 増殖

1. 研究開始当初の背景

神経膠種 (GM) の中で最も多い神経膠芽腫 (GBM) の 5 年生存率は 10% 以下と低く、早期の診断と治療介入が予後改善のカギとなる。そのためには放射線診断との併用により高精度で診断を可能にするバイオマーカーの確立が急がれていた。さらに、GBM の増殖を制御する分子基盤の解明が求められていた。

2. 研究の目的

本申請は、グリオーマの診断・悪性度評価、および予後判定の上で有用な、高感度かつ簡便な血清 FABP7 検出試薬の開発を目指すとともに、GM の再発および治療抵抗性発現因子として注目されている GM 癌幹細胞 (GMCS) における FABP7 の生物学的特性を併せて検討し、GMCS の検出法への応用と、FABP7 を標的にした創薬への端緒を開くことを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) FABP7 の特異抗体および検出系 (ELISA 系) の樹立。
- 2) GM 患者の髄液および血清中の FABP7 定量。
- 3) GM および GMCS における FABP7 の生物学的意義を siRNA を用いて検討する。

4. 研究成果

- 1) ヒト FABP7 を大腸菌および sf9 細胞で発現させ、リコンビナントタンパク質を得た。さらに、複数のウサギに免疫することで、複数種のポリクロナル抗体を得ることができた。同時に、モノクローナル抗体の作成も行った。もっとも特異性の高い抗体をスクリーニングした結果、研究に使用するための高力価抗体を取得することができた。
- 2) 種々の脳疾患患者から採取した体液中の FABP7 量を測定し比較した結果、原発性及び転移性の脳腫瘍並びに脳血管障害の患者では、他の脳疾患患者と比較して有意に体液中の FABP7 レベルが高いことを見出した。特に、低分化で悪性度が高い神経膠腫において、感度・疾患特異性とも優れていた。我々は、これらの知見に基づいて、体液中の FABP7 をマーカーとして用いた、脳腫瘍をはじめとする特定の脳疾患の早期発見及び治療効果の判定に有用な臨床検査システムを構築することに成功した。
- 3) 膠芽腫患者より得られた病理標本に対して、樹立した特異抗体を用いた免疫染色を施行した。まずコントロールとして使

用した小脳では、既報の通り、FABP7 の発現は小脳バーグマングリア細胞に認められた。一方で、膠芽腫症例では、FABP7 の強い発現を細胞質および核に認めた。複数症例の検討の結果、FABP7 の発現は神経膠種の悪性度と優位な相関を示すことが判明した (図 1, 図 2 参照)。転移性脳腫瘍 (大腸腺癌) では、まったく発現が認められなかった。

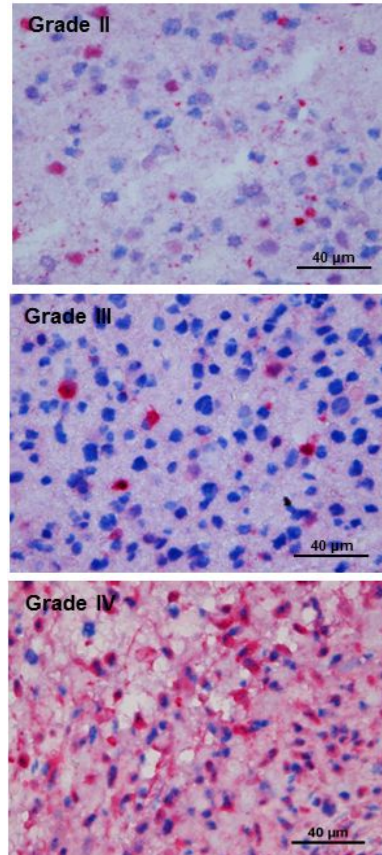


図 1 ヒトグリオーマにおける FABP7 の免疫染色像

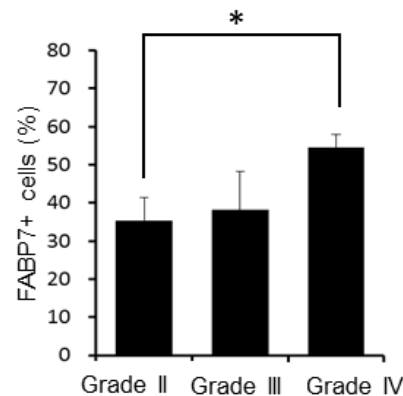


図 2 ヒトグリオーマにおける FABP7 陽性細胞の割合 *P<0.05

- 4) ヒトグリオーマ幹細胞株での FABP7 の発現を siRNA により抑制すると、幹細胞の増殖が有意に抑制されることが明らかになった。

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 7 件)

Nomura, S., Fujii, M., Inoue, T., He, Y., Maruta, Y., Koizumi, H., Suehiro, E., Imoto, H., Ishihara, H., Oka, F., Matsumoto, M., Owada, Y., Yamakawa, T. and Suzuki, M. (2014): Changes in glutamate concentration, glucose metabolism, and cerebral blood flow during focal brain cooling of the epileptogenic cortex in humans. *Epilepsia*, 55, 770-776. (査読有)

Sadahiro, H., Yoshikawa, K., Ideguchi, M., Kajiwar, K., Ishii, A., Ikeda, E., Owada, Y., Yasumoto, Y. and Suzuki, M. (2014): Pathological features of highly invasive glioma stem cells in a mouse xenograft model. *Brain Tumor Pathol*, 31,77-84. (査読有)

Morihiro, Y., Yasumoto, Y., Koshy, V.L., Sadahiro, H., Uchida, T., Inamura, A., Sharifi, K., Ideguchi, M., Nomura, S., Tokuda, N., Kashiwabara, S., Ishii, A., Ikeda, E., Owada, Y. and Suzuki, M. (2013): Fatty acid binding protein 7 as a marker of glioma stem cells. *Pathol Int*, 63,546-553. (査読有)

Sharifi, K., Ebrahimi, M., Kagawa, Y., Islam, A., Tuerxun, T., Yasumoto, Y., Hara, T., Yamamoto, Y., Miyazaki, H., Tokuda, N., Yoshikawa, T. and Owada, Y. (2013): Differential expression and regulatory roles of FABP5 and FABP7 in oligodendrocyte lineage cells. *Cell Tissue Res*, 354,683-695. (査読有)

Kida, H., Nomura, S., Shinoyama, M., Ideguchi, M., Owada, Y. and Suzuki, M. (2013): The effect of hypothermia therapy on cortical laminar disruption following ischemic injury in neonatal mice. *PLoS One*, 8,e68877., DOI: 10.1371/journal.pone.0068877 (査読有)

Inamura, A., Adachi, Y., Inoue, T., He, Y., Tokuda, N., Nawata, T., Shirao, S., Nomura, S., Fujii, M., Ikeda, E., Owada, Y. and Suzuki, M. (2013): Cooling treatment transiently increases the permeability of brain capillary endothelial cells through translocation of claudin-5. *Neurochem Res*. 38: 1641-1647. (査読有)

He, Y., Fujii, M., Inoue T., Nomura, S., Maruta, Y., Oka, F., Shirao, S., Owada, Y., Kida, H., Kunitsugu, I., Yamakawa, T., Tokiwa, T., Yamakawa, T. and Suzuki, M. (2013): Neuroprotective effects of focal brain cooling on photochemically-induced cerebral infarction in rats: analysis from a neurophysiological perspective. *Brain Res*.1497:53-60. (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

神経膠腫幹細胞における FABP7 および FASN の役割
安本有希、貞廣浩和、内田智之、鈴木倫保、池田栄二、大和田祐二
第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会
2014 年 3 月 29 日 自治医科大学(栃木県下野市)

脳型脂肪酸結合蛋白質(FABP7)によるエピジェネティックな遺伝子発現制御
香川慶輝、大和田祐二
第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会
2014 年 3 月 28 日 自治医科大学(栃木県下野市)

FABP7 is involved in epigenetic modification in astrocytes.

Kagawa, Y., Yasumoto, Y., Sharifi, K., Ebrahimi, M., Islam, A., Miyazaki, H., Kawamura, S., Yamamoto, Y., Yoshikawa, T., Kogo, H., Sato, S., Sugino, N., Fujimoto, T., Owada, Y.
第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 5 日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

FABP7-deficiency altered membrane lipid raft formation in astrocytes.

Kagawa, Y., Ebrahimi, M., Sharifi, K., Islam, A., Yasumoto, Y., Miyazaki, H., Kawamura, S., Yamamoto, Y., Sawada, T., Tokuda, N., Owada, Y.
Neuroscience 2013 2013 年 11 月 10 日 (San Diego, USA)

Expression and function of fatty acid binding protein 7 in glioma stem cells.

Yasumoto, Y., Sadahiro, H., Sharifi, K., Kagawa, Y., Ebrahimi, M., Islam, A., Miyazaki, H., Kawamura, S., Yamamoto, Y., Sawada, T., Suzuki, M., Owada, Y.

Neuroscience 2013 2013 年 11 月 10 日 San Diego, USA)

Fatty acid-binding protein 7 (FABP7) regulates lipid raft formation in astrocytes.

Kagawa, Y., Ebrahimi, M., Sharifi, K., Islam, A., Yasumoto, Y., Miyazaki, H., Kawamura, S., Yamamoto, Y., Sawada, T., Tokuda, T., Kogo, H., Fujimoto, T., Yoshikawa, T., Owada, Y.

第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 17 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

神経膠腫幹細胞における FABP7 の発現について

安本有希、Linda Koshy Vaidyan、貞廣浩和、徳田信子、澤田知夫、鈴木倫保、大和田祐二
第 118 回日本解剖学会総会・全国学術総会
2013 年 3 月 28 日 サンポート高松 (香川県高松市)

〔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

大和田 祐二 (OWADA, Yuji)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20292211

(2)研究分担者

鈴木 倫保 (SUZUKI, Michiyasu)
山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80196873

(3)連携研究者
なし