

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460222

研究課題名(和文) 神経接着分子Casprを介したグリオーマ浸潤機構の解明と新規治療戦略

研究課題名(英文) Analysis of Caspr in glioma invasion

研究代表者

武田 泰生 (Takeda, Yasuo)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・教授

研究者番号：60245462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： Casprファミリーは一回膜貫通型のニューレキシンスーパーファミリーの一種であり、脳においてミエリン形成に寄与しているが、近年、がんにおいても報告され始めている。本研究では、膠芽腫におけるCasprファミリーの機能解析を行った。細胞株においてCaspr1が発現しており、発現を抑制すると細胞移動や浸潤が低下した。また、MMP-9及びp-JNKの発現量が増加し、JNK阻害剤の処理によりMMP-9や移動・浸潤の増加が抑制されたことから、Caspr1がJNK/MMP-9経路を介した膠芽腫細胞の移動・浸潤を抑制することが示唆された。なお、EMTへの影響や神経膠腫のグレードとの関連性は見出せなかった。

研究成果の概要(英文)： Caspr family molecules are transmembrane glycoproteins of neurexin superfamily which play a role for myelination of axons in brain. Recently, it has been reported about functions of Caspr family molecules in cancer cells. However, it is unclear about roles of Caspr molecules in cancer cells. In this study, we surveyed expression of Caspr in human glioblastoma cell-lines, and found expression of Caspr1. Secondly, we investigated relation of Caspr1 expression levels and cells proliferation, migration, invasion. In the results, suppression of Caspr1 by treatment with Caspr1-targeted siRNA promoted T98G glioblastoma cells invasion, migration and increased MMP-9 expression levels. Moreover, knockdown of Caspr1 increased JNK phosphorylation, and JNK inhibitor blocked MMP-9 up-regulation and cells invasion, migration by knockdown of Caspr1. Thus, these results suggest that Caspr1 negatively regulates for T98G glioblastoma cells invasion and migration via down-regulation of JNK pathway.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Caspr1 膠芽腫 移動・浸潤 JNK MMP-9

### 1. 研究開始当初の背景

近年、グリア細胞由来の腫瘍である神経膠腫(グリオーマ)が増加しており、脳腫瘍のうちの約20%を占めている。特に小児では約40%と高い割合である。さらに、アストロサイト・オリゴデンドロサイト・上皮細胞由来のグリオーマが報告されているが、この中で最も多いのはアストロサイト由来のグリオーマである星状細胞系腫瘍であり、WHO分類においてその悪性度により大きく4段階(グレード ~ )に分けられる。最も悪性度の高いグレード の膠芽腫(グリオブラストーマ、以下 GBM)は、グリオーマの中で最も頻度が高い。GBMは脳実質や脳幹に浸潤しながら増殖することにより、境界線が不明瞭であることから、腫瘍を完全に摘出することが困難であり、摘出後に放射線療法や化学療法を追加して行うことが多いが、5年生存率が10%未満(The Committee of Brain Tumor Registry of Japan, 2003)と極めて予後が不良で、临床上問題となっている。

以前より我々の研究室では、細胞接着分子群であるコンタクチン分子群(GPIアンカー型接着分子)及びCaspr(Contactin associated protein)分子群に着目して、神経回路網形成における機能の解析を行ってきた。Caspr分子群はニューレキシンファミリーに属する一回膜貫通型のタンパク質であり、現在5つのサブタイプが哺乳動物において同定されており、Caspr1及びCaspr2はミエリン形成に関与していることが明らかにされている。

近年、Caspr分子の腫瘍における発現や機能解析についても報告がなされており、シスプラチン耐性の卵巣癌細胞株におけるCaspr3の発現量がシスプラチン感受性の細胞株の13.3倍であること(Stewart *et al.*, 2006)、Caspr2の強制発現によりグリオーマ細胞のアポトーシスが誘導されることが明らかになった(Bralten *et al.*, 2010)。

### 2. 研究の目的

まずCaspr分子のグリオーマ細胞株での発現を検討した結果、Caspr1の発現が高かった。そこで、グリオーマ細胞におけるCaspr1の発現機構及び浸潤抑制機構を明らかにし、さらにCaspr1発現を調節する分子並びに薬剤を検討することで、Caspr1シグナルによる新たなグリオーマ治療戦略の可能性を追求していく。

### 3. 研究の方法

(1)siRNA導入によるCaspr1ノックダウン細胞株作成及びプラスミド導入によるCaspr1強制発現細胞株を用いて、増殖(MTT assay)、浸潤(BD BioCoat マトリゲルインベジョンチャンバーアッセイ)、移動(チャンバーアッセイ)を調べる。

(2)Caspr1ノックダウン細胞株及び強制発現

細胞株を用いて、浸潤・移動に関する分子の発現状況をRT-PCR法及びウェスタンブロット法にて調べる。

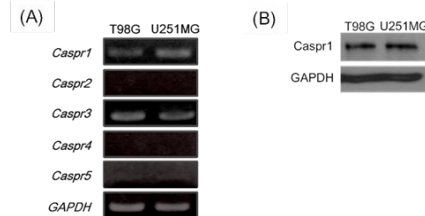
(3)Caspr1ノックダウン細胞株及び強制発現細胞株を用いて、EMT関連遺伝子の発現変動についてRT-PCR法及びウェスタンブロット法にて調べる。また、EMT誘導因子であるTGF- $\beta$ 処理によるCaspr1への影響について検討する。

(4)グリオーマ患者手術後摘出脳のサンプルにおいて免疫組織学的手法を用いて、Caspr1の発現状況及び局在を調べると共に、WHO分類においてその悪性度により大きく4段階(グレード ~ )のグレード別のCaspr1の発現レベルを詳細に検討し、グレードとCaspr1の発現量との相関性を検討する。

### 4. 研究成果

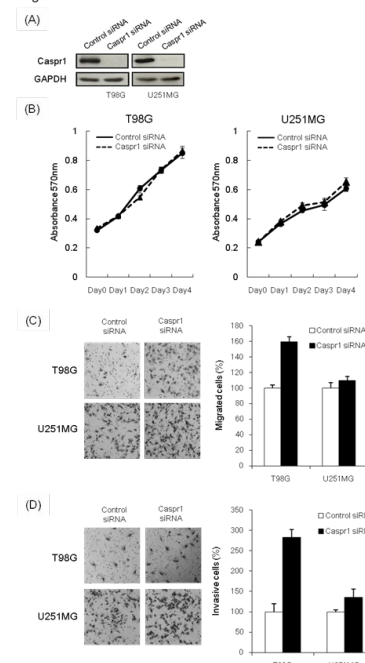
(1)膠芽腫T98G、U251MG細胞株においてCaspr1 mRNA発現及びタンパク質発現を確認した(Fig 1、(A)RT-PCR、(B)ウェスタンブロット)。

Fig 1



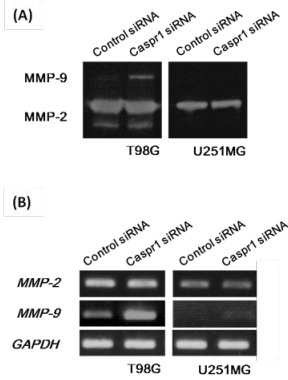
(2)T98G、U251MG細胞株いずれにおいてもCaspr1ノックダウンによる増殖の変化は認められなかった(B)。一方、T98Gにおいてのみ細胞移動(C)及び浸潤(D)の増加が認められた(Fig 2)。

Fig 2



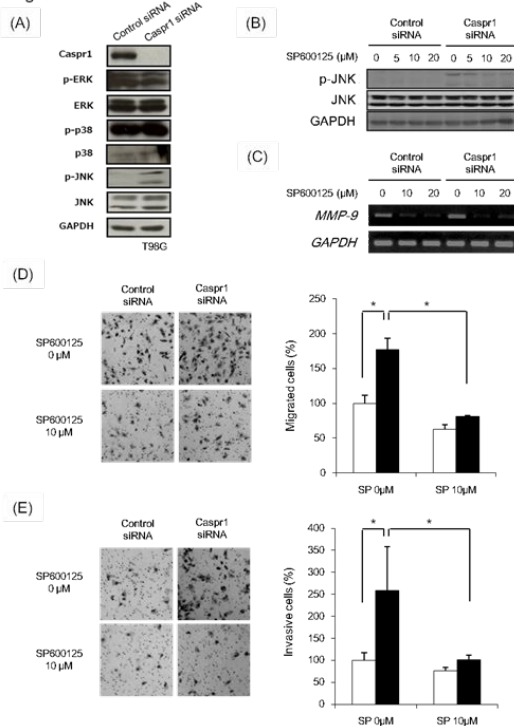
(3) T98G 細胞株において Caspr1 ノックダウンにより MMP-9 の活性化(A)及び発現(B)が顕著に亢進した ( Fig 3 )

Fig 3



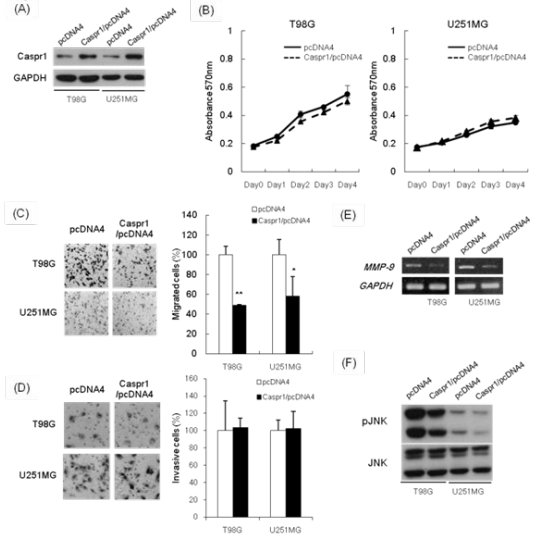
(4) T98G 細胞株において Caspr1 ノックダウンにより JNK リン酸化の亢進が認められた (A)。JNK 阻害剤である SP600125 を処理したところ、Caspr1 ノックダウンによる JNK リン酸化亢進及び MMP-9 発現増加が抑制され (B、C)、移動・浸潤亢進も抑制された (D、E) ( Fig 4 )

Fig 4



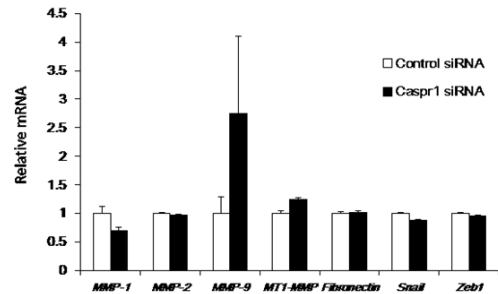
(5) Caspr1 強制発現により細胞移動(C)及び MMP-9 発現 (E)、JNK リン酸化(F)が抑制されたが、細胞浸潤(D)は変化しなかった ( Fig 5 )

Fig 5



(6) Caspr1 ノックダウンにより、EMT 関連遺伝子である Fibronectin、Snail、Zeb1 の mRNA 発現は変化しなかった ( Fig 6、real-time PCR )

Fig 6



(7) T98G 細胞に TGF-β1 10ng/mL を 48 時間処理したところ、Caspr1 のタンパク質発現が低下した ( Fig 7 )

Fig 7



(8) グリオーマ患者脳における Caspr1 の発現状況をスコア化した ( Score0: 陽性率 0%、1:1-25%、2:26-50%、3:51%以上 )。Caspr1 の陽性率と WHO グレード分類との相関性は認められなかった ( Table 1 )

	Grade II (n=10)	Grade III (n=9)	Grade IV (n=14)
Score0	8	2	4
Score1	0	4	4
Score2	0	1	1
Score3	2	2	5

今回の結果より、Caspr1 が MMP-9/JNK 経路を抑制することで膠芽腫細胞の移動・浸潤を抑制することが示唆された。Caspr1 が EMT を

制御している可能性は見出せなかったが、TGF- $\beta$ により EMT 誘導条件にすると Caspr1 の発現が低下している結果が得られた。通常、TGF- $\beta$ により EMT 関連遺伝子の発現が上昇すると、EMT 抑制遺伝子である E-カドヘリンの発現を抑制するが、これには E-カドヘリンのプロモーターに存在する E-box に結合して転写抑制するメカニズムが明らかとなっている。そこで、TF search にて Caspr1 のプロモーター配列を調べたところ、E-box の存在が明らかとなった。今後は、Caspr1 のプロモーター解析を行い、EMT との関連性を明らかにしていきたい。

#### 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)

Yokoyama Y, Matsumoto K, Ikawa K, Watanabe E, Yamamoto H, Imoto Y, Morikawa N, Takeda Y. The pharmacokinetics of ampicillin-sulbactam in anuric patients: dosing optimization for prophylaxis during cardiovascular surgery. *Int J Clin Pharm*. 2016 Aug;38(4):771-5. (査読有)

Kondo T, Kondo Y, Orita Y, Mitarai F, Ishitsuka Y, Irikura M, Shimodozono Y, Douchi T, Takeda Y, Irie T. Predictive Factors for Efficacy and Safety of Prophylactic Theophylline for Extubation in Infants with Apnea of Prematurity. *PLoS One*. 2016 Jul 7;11(7) (査読有)

Matsumoto K, Watanabe E, Kanazawa N, Fukamizu T, Shigemi A, Yokoyama Y, Ikawa K, Morikawa N, Takeda Y. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of teicoplanin in patients with MRSA infections. *Clin Pharmacol*. 2016 Mar 30;8:15-8. (査読有)

Watanabe E, Nishikawa T, Ikawa K, Yamaguchi H, Abematsu T, Nakagawa S, Kurauchi K, Kodama Y, Tanabe T, Shinkoda Y, Matsumoto K, Okamoto Y, Takeda Y, Kawano Y. Trough level monitoring of intravenous busulfan to estimate the area under the plasma drug concentration-time curve in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *Int J Hematol*. 2015 Nov;102(5):611-6. (査読有)

Yin FT, Futagawa T, Li D, Ma YX, Lu MH, Lu L, Li S, Chen Y, Cao YJ, Yang ZZ, Oiso S, Nishida K, Kuchiiwa S, Watanabe K, Yamada K, Takeda Y, Xiao ZC, Ma QH. Caspr4 interaction with LNX2 modulates the proliferation and neuronal

differentiation of mouse neural progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2015 Mar 1;24(5):640-52. (査読有)

Tabata S, Ikeda R, Yamamoto M, Shimaoka S, Mukaida N, Takeda Y, Yamada K, Soga T, Furukawa T, Akiyama S. Thymidine phosphorylase activates NF B and stimulates the expression of angiogenic and metastatic factors in human cancer cells. *Oncotarget*. 2014 Nov 15;5(21):10473-85. (査読有)

Minami K, Kamiyo Y, Nishizawa Y, Tabata S, Horikuchi F, Yamamoto M, Kawahara K, Shinsato Y, Tachiwada T, Chen ZS, Tsujikawa K, Nakagawa M, Seki N, Akiyama S, Arima K, Takeda Y, Furukawa T. Expression of ABCB6 is related to resistance to 5-FU, SN-38 and vincristine. *Anticancer Res*. 2014 Sep;34(9):4767-73. (査読有)

[学会発表](計3件)

Cancer stem-like cells における S100A16 の役割  
富山成章、池田龍二、西澤由紀彦、益田将吾、武田泰生  
第32回日本薬学会九州支部大会、九州保健福祉大学(宮崎県延岡市) 2015年11月28日

神経接着関連分子 Contactin associated protein (Caspr)4 の機能解析  
二川俊隆、益田将吾、高濱和弘、池田龍二、武田泰生  
第37回神経組織培養研究会、霧島観光ホテル(鹿児島県霧島市) 2015年11月8日

Contactin associated protein (Caspr)4/LNX2 signaling pathway modulates neuronal differentiation of mouse neural progenitor cells  
二川俊隆、益田将吾、高濱和弘、Quan-Hong Ma, Zhi-Cheng Xiao, 武田泰生  
第58回日本神経化学大会、大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市) 2015年9月2日

[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]  
ホームページ等:なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武田 泰生 (TAKEDA YASUO)  
鹿児島大学 医歯学域附属病院 教授  
研究者番号：60245462

### (2) 研究分担者

池田 龍二 (IKEDA RYUJI)  
鹿児島大学 医歯学域附属病院 准教授  
研究者番号：50398278

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

二川 俊隆 (FUTAGAWA TOSHITAKA)  
鹿児島大学病院 薬剤師

高濱 和弘 (TAKAHAMA KAZUHIRO)  
鹿児島大学病院 薬剤師

益田 将吾 (MASUDA SHOGO)  
鹿児島大学病院 薬剤師