

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462176

研究課題名(和文) 脳腫瘍幹細胞におけるLAT1の幹細胞性維持機構への関与の検討

研究課題名(英文) Is LAT1 associated with regulatory mechanisms of stem-like cancer cell in high grade glioma?

研究代表者

櫻田 香 (SAKURADA, KAORI)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：60312732

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)：メチオニンのuptakeに関与すると考えられるアミノ酸トランスポーターLAT1が glioma stem-like cellの維持に関与しているのではないかと仮定した。gliomaの手術サンプルにおいて、LAT1、SOX2、HIF-1 の発現を免疫染色にて解析した。WHO grade 3/4のgliomaを比較したが、LAT1、HIF-1、SOX2発現に差は認めなかった。また全サンプルにおいてLAT1陽性率は5%未満と低く、メチオニンPETの集積と3つのタンパク質発現に相関は見られなかった。以上より、gliomaにおけるLAT1タンパク質発現は低く、研究仮説を支持する結果は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that L-type amino acid transporter (LAT1), which is thought to be involved in the uptake of methionine, is involved in the maintenance mechanisms of glioma stem-like cells. Expressions of each of LAT1, SOX2 and HIF-1 in gliomas were analyzed by immunostaining. We compared World Health Organization grade 3/4 glioma, but no difference was seen in expressions of the three proteins. In addition, the LAT1-positive rate was low in all samples, at <5%, and no correlations were seen between methionine accumulation on positron emission tomography and expression of any of the three proteins. Based on these findings, LAT1 protein expression in glioma was considered low, and no results in support of the research hypothesis were obtained.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：glioma stem-like cancer cell LAT1

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は極めて予後不良な腫瘍であり、その再発、播種に腫瘍幹細胞が関与していると考えられる。そこで、神経膠腫の腫瘍幹細胞の増殖、幹細胞性維持機構を解明し、有効な治療法を開発することが課題となっている。研究代表者は、先行研究において、c-mycの腫瘍幹細胞への関与を検討した。その結果、high grade gliomaの方がlow grade gliomaよりも幹細胞マーカーCD133とc-mycのタンパク質発現が高いことを報告した(山形医学)。

アミノ酸トランスポーターLAT1 (L-type amino acid transporter 1) はがんにおいて発現が上昇していることが知られ、これにより神経膠腫でもメチオニンPETの高集積が見られると考えられている。近年LAT1発現にc-myc、mTORが関与していること、LAT1の細胞内シグナル伝達系の下流にmTORが存在することが明らかとなってきた。c-myc、mTORともに幹細胞性維持への関与が報告されていることからLAT1もがん幹細胞の幹細胞性維持に関与している可能性が考えられる。また、c-mycは低酸素環境での幹細胞性維持に関与していることも報告されていることからLAT1とHIF-1 にも

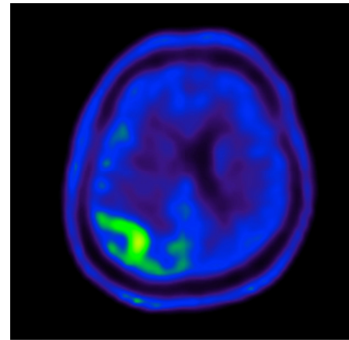
2. 研究の目的

そこで本研究では、LAT1の幹細胞性維持機構への関与を明らかとすること、さらに関与が示唆されたならば、LAT1阻害薬によるグリオーマ幹細胞の増殖、生存への影響を検討し新たな治療法の可能性につなげることを目的とした検討を行った。

3. 研究の方法

神経膠腫の手術症例において、術前メチオニンPETを施行した。術前の3.0T高磁場MRIによる解剖学的情報とメチオニンPETの結果をニューロナビゲーションに取り込みregistration、統合した。手術中にニューロナビゲーションを用いてメチオニンPETの集積度の情報を連結させた腫瘍標本を採取した。10%ホルマリン固定の後、パラフィン切片を作成し免疫染色を行った。抗LAT1抗体(トランスジェニック)抗LAT2抗体(abcam)、抗mTOR抗体(cell signaling technology)、抗c-myc抗体(abcam)抗HIF-1 抗体(abcam)

抗SOX2抗体(R&D systems)抗mTOR抗体(abcam)抗c-myc抗体(abcam)抗CD133抗体(MACS)を用いて検討した。陽性率は、患者の臨床情報をもたない病理医が10視野の陽性細胞の割合を計算し、これを平均して用いた。メチオニンPETの集積はKinoshitaらの方法(J Nucl Med 2012)を用いて対側の正常皮質の比Tmax/NmeanをMATLAB R2013bを用いて算出した。



Tmax/Nmean マップ

悪性神経膠腫35例の検討を行った。統計解析はStatFlex ver6.0を使用した。

4. 研究成果

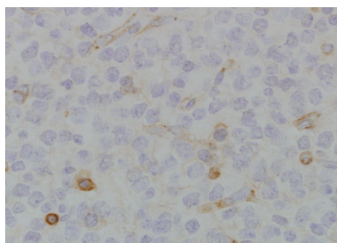
まず最初に免疫染色の条件検討を行った。病理学講座の協力により様々ながんや正常臓器を用いて条件検討しpositive controlの評価を行った。検討を重ねたが、免疫組織染色で抗LAT2抗体、抗mTOR抗体、抗c-myc抗体、抗CD133抗体での陽性細胞の検出が困難であった。そのため、腫瘍幹細胞マーカーとして抗CD133抗体の代わりに同じく腫瘍幹細胞マーカーとして使用されている抗SOX2抗体を用いた。c-mycは低酸素環境での幹細胞性維持に関与しているとの報告があるため、低酸素マーカーである抗HIF-1 抗体を用いて検討した。

(1)メチオニン集積とLAT1発現の検討
LAT1高発現の腫瘍ではメチオニンuptakeが亢進していると考えられたが、メチオニン集積Tmax/NmeanとLAT1の陽性細胞割合に相関は見られなかった($r=-0.033$)。

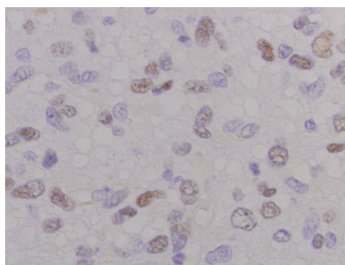
(2)悪性度とLAT1、HIF-1、SOX2陽性細胞率の関係

WHO grade3とgrade4の腫瘍間での、LAT1、HIF-1、SOX2の陽性細胞率に差が見られるかを検討した。いずれの抗体の陽性細胞率も、grade3/4間での統計学的優位な差は認められなかった。LAT1陽性細胞はいずれの標本でも5%未満であり、予想に反してgrade3よりもgrade4で陽性細胞が低い傾向がみられた。

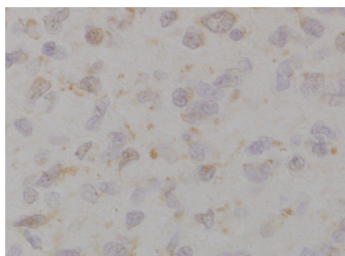
LAT 1 免疫染色



SOX2 免疫染色 核が陽性



HIF-1



(3) LAT 1 と幹細胞マーカー-SOX2 の発現の検討

LAT 1 陽性率と SOX2 陽性率に優位な相関は認められなかった($r=-0.277$)。

以上より、免疫染色のみでの検討ではあるが今回は本研究の作業仮説である LAT 1 が幹細胞性維持、増殖に關与することをサポートする結果は得られなかった。

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)

1: Kanoto M, Kirii K, Hiraka T, Toyoguchi Y, Sugai Y, Matsuda K, Sakurada K, Sonoda Y, Hatazawa J, Hosoya T. Correlation between hypoxic area in primary brain tumors and WHO grade: differentiation from malignancy using 18F-fluoromisonidazole positron emission tomography. *Acta Radiol*. 2017 Jan 1;284185117711474. doi: 10.1177/0284185117711474. [Epub ahead of print] 査読あり

2: Sonoda Y, Shibahara I, Matsuda KI, Saito R, Kawataki T, Oda M, Sato Y, Sadahiro H, Nomura S, Sasajima T, Beppu T, Kanamori M, Sakurada K, Kumabe T, Tominaga T, Kinouchi H, Shimizu H, Ogasawara K, Suzuki M.

Opening the ventricle during surgery diminishes survival among patients with newly diagnosed glioblastoma treated with carmustine wafers: a multi-center retrospective study. *J Neurooncol*. 2017 May 22. [Epub ahead of print] 査読あり

3: Kanoto M, Kirii K, Toyoguchi Y, Nishihara M, Sakurai K, Murayama K, Noguchi T, Matsuda K, Sakurada K, Sonoda Y, Hosoya T. Radiological imaging features of glioblastoma with oligodendroglioma component: a comparison with conventional glioblastoma. *Acta Radiol Open*. 2016 Nov 22;5(11)査読あり

4: Tanji K, Sakurada K, Funiu H, Matsuda K, Kayama T, Ito S, Suzuki K. Functional significance of the electrocorticographic auditory responses in the premotor cortex. *Front Neurosci*. 2015 Mar 16;9:78. 査読あり

5: Yamaki T, Kokubo Y, Saito Y, Matsuda K, Funiu H, Sakurada K, Sato S, Kayama T. A case of Langerhans cell histiocytosis of the skull in which preoperative methionine positron emission tomography was useful in comprehending the spreading of the lesion. *Surg Neurol Int*. 2014 Feb 26;5:27. 査読あり

6: Matsuda K, Sakurada K, Kokubo Y, Sato S, Nakazato Y, Kayama T. Esophageal neuroendocrine tumor metastatic to the pineal region. *Brain Tumor Pathol*. 2014 Jul;31(3):192-7. 査読あり

7: Uzuka T, Asano K, Sasajima T, Sakurada K, Kumabe T, Beppu T, Ichikawa M, Kitanaka

C, Aoki H, Saito K, Ogasawara K, Tominaga T, Mizoi K, Ohkuma H, Fujii Y, Kayama T; Tohoku Brain Tumor Study Group. Treatment outcomes in glioblastoma patients aged 76 years or older: a multicenter retrospective cohort study. J Neurooncol. 2014 Jan;116(2):299-306. 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

1. 櫻田香、次世代シーケンサーを用いた初発/再発膠芽腫の遺伝子異常の検討、第75回日本脳神経外科学会学術集会、2016年9月30日、福岡国際会議場、福岡
2. 櫻田香、メチオニンPETにおける再発glioblastomaのBevacizumab療法効果予測についての検討、第33回日本脳腫瘍学会学術集会、2015年12月2日、グランドプリンスホテル京都、京都
3. Sakurada K、Choice of intraoperative MRimage sequences during brain tumor surgery、15th interim meeting of the world federation on neurosurgical societies. 2015年9月8日、ローマ(イタリア)
4. Sakurada K、Usefulness of intraoperative diffusion-weighted imaging. 4th Asian Australian Congress of Neurological Surgeons、2015年4月15日、Jeju, Korea

〔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

櫻田 香 (SAKURADA Kaori)
山形大学医学部看護学科・教授
研究者番号：60312732

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

松田 憲一郎 (MATSUDA Kenichiro)
山形大学医学部脳神経外科・講師
研究者番号：90536971

(4) 研究協力者 なし