

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成23年4月5日提出

対象研究テーマ：MT1-MMPの機能解析と分子標的治療法の開発

研究期間：2010年4月8日～2011年3月31日

研究題目：悪性脳腫瘍におけるMT1-MMPとCD133との相互作用の解析

研究代表者：金沢大学医薬保健研究域医学系 助教 中田光俊

研究成果の概要：

本研究では、CD133をマーカーとする幹細胞様グリオーマ細胞の高い浸潤能を規定する分子を探索した。グリオーマ組織中のCD133陽性細胞において普遍的にMT1-MMPとintegrin $\alpha 3$ が高発現していることを見出した。ヒト膠芽腫組織において、浸潤グリオーマ細胞にMT1-MMPとintegrin $\alpha 3$ の局在を認めた。Integrin $\alpha 3$ の発現とグリオーマ細胞の浸潤能は正の相関を示し、その下流のシグナルとしてextracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2が示された。integrin $\alpha 3$ はERK1/2の活性を介して幹細胞様グリオーマ細胞の遊走・浸潤能を亢進させることが示唆された。

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：グリオーマ、幹細胞、浸潤、MT1-MMP、integrin

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は浸潤性増殖が顕著で、手術で全部摘出することは不可能である。悪性神経膠腫の治療開発を考える場合、浸潤に寄与する分子の同定は必須と考えられる。一方で近年、悪性神経膠腫に内在する腫瘍幹細胞が分離され脳腫瘍研究領域が新たな局面を迎えている。悪性神経膠腫幹細胞は脳内への浸潤能が極めて高くかつ放射線、抗がん剤に抵抗性を示すため、これが腫瘍再発の原因になっていると推測される。悪性神経膠腫幹細胞の浸潤メカニズムを明らかにすることは悪性脳腫瘍の治療開発を行う上で急務であると言える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、悪性神経膠腫において、腫瘍幹細胞を分離抽出し浸潤能に関与する分子の探索を行い、候補分子の機能解析を行うとともに腫瘍組織における発現と局在を検討し、真の浸潤関連分子を同定することから治療標的分子を探ることにある。

3. 研究の方法

本研究では、グリオーマ細胞株および手術検体を使用し、neurosphere法およびCD133陽性細胞磁気分離法により幹細胞様グリオーマ細胞濃縮集団を得た。グリオーマ細胞株および手術検体よりCD133陽性細胞と陰性細胞とを分離し、定量的RT-PCRを行うことで、CD133陽性細胞において普遍的に発現してい

る幹細胞様グリオーマ細胞浸潤関連分子の同定を試みた。次に免疫組織学的にヒトグリオーマ組織における候補分子の発現を検討した。複数のグリオーマ細胞株を用いて候補分子が細胞の遊走・浸潤能、および増殖能に与える影響を検証し、そのメカニズムを検討した。候補分子の細胞遊走・浸潤を亢進させるメカニズムを解明するために下流のシグナル伝達を解析した。

4. 研究成果

グリオーマ手術検体並びに細胞株より幹細胞様グリオーマ細胞濃縮集団を抽出し、その集団の接着分子に関し検討を行うことにより幹細胞様グリオーマ細胞の特徴の一端として下記の2点を明らかにした。

1. CD133陽性細胞磁気分離法により得た幹細胞様グリオーマ細胞濃縮集団では、全ての細胞種においてCD133陰性細胞分画と比較しMT1-MMPとintegrin $\alpha 3$ のmRNAの発現が高かった。
2. ヒトグリオーマ組織において浸潤グリオーマ細胞および、幹細胞様グリオーマ細胞がプールの存在するとされる腫瘍血管周囲に存在するグリオーマ細胞にintegrin $\alpha 3$ の局在を認めた。

続いてグリオーマ細胞株を用いintegrin $\alpha 3$ の遊走・浸潤・増殖能を検討し、さらにそのシグナル伝達を解析し下記の3点の知見を得た。

1. Integrin $\alpha 3$ を強制発現させた全ての細胞の遊走能および浸潤能は有意に亢進し、内因性 integrin $\alpha 3$ の発現を低下させた細胞では低発現株以外の細胞株において遊走能および浸潤能は有意に低下した。
2. integrin $\alpha 3$ の発現上昇に伴い細胞増殖能が有意に亢進し、発現量の低下によって増殖能は有意に低下した。
3. Integrin $\alpha 3$ の発現量を上昇させることで ERK1/2 の活性は上昇し、Integrin $\alpha 3$ の発現を低下させると ERK1/2 の活性も低下した。

以上より、integrin $\alpha 3$ は幹細胞様グリオーマ細胞において強く発現し、主として ERK1/2 の活性上昇を介して遊走・浸潤能を亢進させることが示唆された。近年、がん幹細胞を標的とする新たな治療法が模索されている。Integrin $\alpha 3$ の制御により幹細胞様グリオーマ細胞の浸潤を阻害することで画期的なグリオーマ治療につながる可能性があると考えられる。同様に幹細胞様グリオーマ細胞に高発現する MT1-MMP について、その機能を検討している。

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 4 件)

1. Nakada M, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Teng L, Pyko IV, Hamada JI. Target signaling pathways in glioma. *Cancers* in press 査読有
2. Misaki K, Nakada M, Mohri M, Hayashi Y, Hamada JI. MGMT promoter methylation and temozolomide response in choroid plexus carcinoma. *Brain Tumor Pathol* Mar 26, 2011 [Epub ahead of print] 査読有
3. Tanaka S, Nakada M, Hayashi Y, Nakada S, Kitamura-Sawada S, Furuyama N, Suzuki T, Kamide T, Hayashi Y, Yano S, Hamada JI. Epithelioid glioblastoma changed to typical glioblastoma: the methylation status of MGMT promoter and 5-ALA fluorescence. *Brain Tumor Pathol* 28:59-64, 2011 査読有
4. Suzuki T, Nakada M, Yoshida Y, Nambu E, Furuyama N, Kita D, Hayashi Y, Hayashi Y, Hamada JI. The correlation between promoter methylation status and the expression level of O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase in recurrent glioma. *Jpn J*

Clin Oncol 41:190-6, 2011 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. Nakada M, Nambu E, Furuyama N, Yoshida Y, Kita D, Hayashi Y, Hayashi Y, Hamada JI. Integrin alpha3 is involved in the invasive behavior of glioma stem-like cells. Society for Neuro-Oncology 15th Annual Meeting 2010, November 18-21, 2010, Le Centre Sheraton Hotel (Canada・モントリオール)
2. Nakada M, Hayashi Y, Miyashita K, Kita D, Hayashi Y, Uchiyama N, Kawakami K, Minamoto T, Hamada JI. Targeting glycogen synthase kinase 3 β in adult recurrent glioblastomas. 7th Meeting for the Asian Society for Neuro-Oncology, June 10-12, 2010, JW Marriott Hotel (韓国・ソウル)

[図書] (計 1 件)

1. Nakada M, Minamoto T, Pyko IV, Hayashi Y, Hamada JI. The pivotal role of GSK3 β in glioma biology. *Brain Tumor/Book 2*, ed. Miklos Garami, InTech, 2011 in press

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：脳腫瘍治療用キット及び脳腫瘍治療方法
 発明者：中田光俊、源利成、林裕、濱田潤一郎
 権利者：金沢大学
 種類：特許
 番号：特願 2010-18569
 出願年月日：2010 年 8 月 22 日
 国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金沢大学医薬保健研究域医学系・助教
 中田光俊

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

細胞機能統御・教授 佐藤 博