

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18420

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫のアクアポリン1発現意義の解明と機能制御による新規治療への応用

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of aquaporin 1 expression in malignant glioma and new target potential by regulation of AQP1

研究代表者

大石 正博(Masahiro, Oishi)

金沢大学・附属病院・特任助教

研究者番号：50646693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は悪性神経膠腫におけるAQP1発現の意義を解明し、AQP1阻害剤によるAQP1発現・機能調節することで血管新生から繋がる増殖・浸潤を制御する新たな治療を追求するものである。先行研究ではGBMはグルコース代謝によりAQP1の発現が亢進し、AQP1の発現上昇はGBMの浸潤・遊走能を亢進し、さらに血管新生抑制因子であるTHSD7Aを抑制することで、血管新生を促している可能性を見出した。今回の研究で複数の浸潤・遊走に関わる分子がAQP1発現量依存的に発現亢進していることを示し、これまでの研究結果をまとめCancer Med. 2020 Jun;9(11):3904-3917. に発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性神経膠腫の研究は世界中で多くなされている現在においても、予後不良な脳腫瘍である。既存の概念に囚われない、新規治療法の開発が必要不可欠であり、腫瘍の増殖・進展に関わる分子メカニズムの解明は重要である。悪性神経膠腫とAQP1に関連した報告は少なく、本研究を論文として発表できたことは、腫瘍の悪性度に関わるメカニズム解明の一助になったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to reveal the mechanism of AQP1 expression in malignant glioma. Regulation of AQP1 expression and function by AQP1 inhibitors may be a new therapeutic approach to control proliferation and invasion associated with angiogenesis. In our previous project, we found that glucose metabolism increases AQP1 expression in GBM, and that increased AQP1 expression enhances GBM invasion and migration, and may promote angiogenesis by suppressing THSD7A, an angiogenesis inhibitor. In this research, we confirmed that several molecules involved in invasion and migration are upregulated in a dose-dependent manner with AQP1 expression level. We published the results of our study in Cancer Med. 2020 Jun;9(11):3904-3917.

研究分野：脳神経外科

キーワード：アクアポリン1 悪性神経膠腫 Glioblastoma 血管新生 THSD7A 浸潤 AQP1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グルコースを主なエネルギー源とする脳腫瘍、特に悪性神経膠腫では、グルコース代謝(解糖系)は腫瘍の増大・進展に重要な要素である。悪性神経膠腫では、グルコースを基質とした解糖系が活性化されることにより、乳酸アシドーシスとなり、細胞内酸化および細胞性腫脹が発生し、これらを緩和するために細胞膜上に発現する選択的水チャネルである AQP1 が増加、それに伴い H₂O が細胞外に放出され、細胞膜に存在する carbonic anhydrase (CA) によって H⁺ が生じて (H₂O+CO₂ ⇌ HCO₃⁻+H⁺) 細胞外が酸性環境下に置かれることで、cathepsin B が活性化され、血管周囲の細胞外基質を溶解し血管新生と細胞浸潤を促進させることを報告した(図 1、Hayashi Y, Neoplasia 2007, 9, 777-87)。

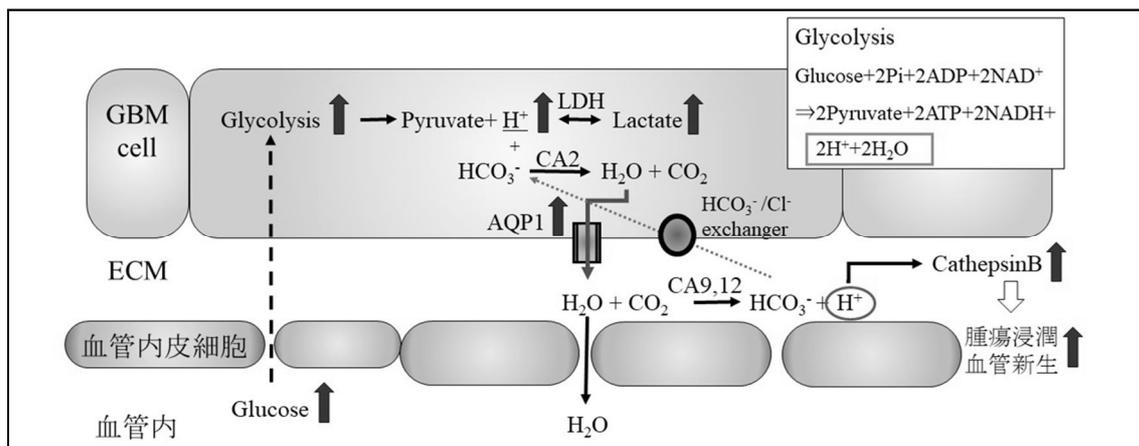


図 1 Aquaporin(AQP)1 の発現と血管新生・腫瘍浸潤の機序

また、この悪性腫瘍の進展形式として、腫瘍と正常脳の境界領域において血管周囲に腫瘍細胞群が島状に多数存在していることが観察され、この腫瘍細胞群では AQP1 が強く発現している。これは腫瘍による細胞外環境の酸性化と血管新生が相まって生じ、腫瘍の正常組織内への浸潤に AQP1 が強く関与しているためと考えられた。

これらの背景に基づき、申請者は先行研究を行い、平成 29 年度より『脳腫瘍を構成する細胞群における Aquaporin-1 発現意義の解明と新規治療戦略(科研費若手 B)』の研究を開始した。その結果、in vitro においてはヒト由来 glioblastoma 細胞株である U251、U87 には AQP1 の発現を認めないことが確認されたため、AQP1 を transfection して AQP1 強制発現細胞株を作成した。さらに AQP1 強制発現細胞群の cloning を行い、AQP1 の発現レベルをコントロールした当教室オリジナルの AQP1 発現調節モデル細胞株を樹立した。樹立した各々の細胞株において腫瘍増殖能、浸潤能、遊走能を評価したところ、増殖能に差は認めなかったが、AQP1 発現上昇の程度に応じて遊走能・浸潤能が亢進していることが示された。

GBM の AQP1 発現が血管内皮細胞に及ぼす影響および血管新生に関しては、AQP1 発現調節細胞株と ECV304 (human umbilical vein-EC-derived cell line) を共培養し管腔形成能を評価した。AQP1 発現亢進株と直接共培養した血管内皮細胞において管腔形成の亢進を認め、血管新生抑制因子である thrombospondin type 1 domain containing 7A (THSD7A) の発現が AQP1 の発現と負の相関関係を示しており、そのメカニズムの一端であると考えられた。

つまり、GBM はグルコース代謝により AQP1 の発現は上昇し、AQP1 の発現上昇は GBM の浸潤能・遊走能に関わる可能性があり、さらに血管新生抑制因子である THSD7A を抑制することで、血管新生を促している可能性を見出した。

2. 研究の目的

上記を背景として、本研究では、悪性神経膠腫における AQP1 発現の意義の解明および腫瘍の AQP1 発現・機能調節により生じる変化因子の解明を核心となす学術的な問いとし、悪性神経膠腫における血管新生から繋がる増殖および浸潤のメカニズムを解明して、AQP1 が新たな治療ターゲットとなることを証明するものである。

3. 研究の方法

先行研究において AQP1 発現調整細胞株とコントロール細胞に対して GeneChip® を行ったところ、THSD7A の発現低下が確認されたが、その他複数の関連候補因子が見出された。それらに対して文献検索および PCR、Western blotting 法を行い、スクリーニングを行った。

GBM 細胞の遊走能、浸潤能の亢進に参与する分子を同定した。

免疫不全マウス (SCID-NOD マウス) の脳に AQP1 発現調節腫瘍細胞株およびコントロール群を移植し、腫瘍体積や血管新生の程度を比較して、腫瘍細胞の AQP1 発現量の変化による腫瘍形成の差を in vivo においても検証した。

当教室において樹立した GBM stem cell line を用いて、AQP1 の発現を検証した。

4. 研究成果

1) AQP1 発現調整細胞株とコントロール細胞に対して施行した GeneChip®の結果および文献検索の結果、その他複数の関連候補因子が見出された。AQP1 発現調整細胞株を用いて候補因子の PCR を行い、スクリーニングを行った。いずれの因子も AQP1 発現量依存的な発現レベルの変化を認めず、新たな候補因子の同定には至らなかった (図 2、PCR の結果の一部を供覧)

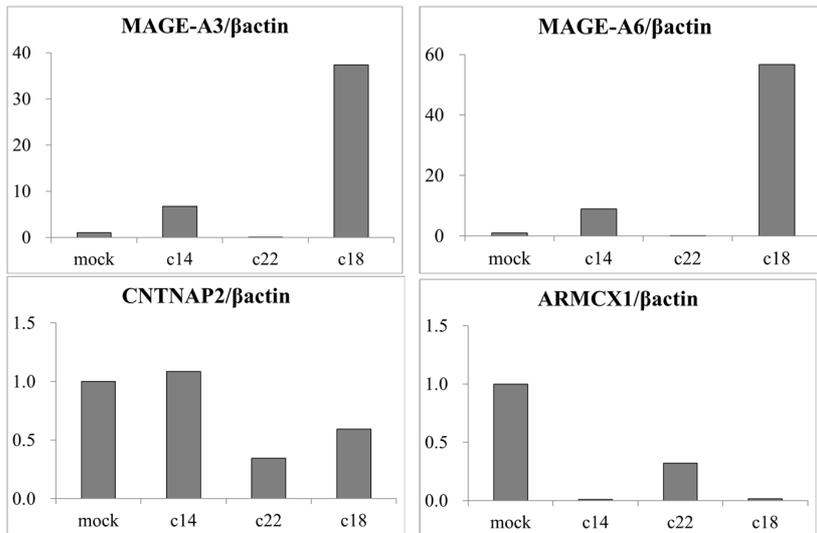


図 2 AQP1 発現と相関関係を認める可能性のある候補分子の PCR の結果

2) AQP1 発現上昇により GBM 細胞の遊走能、浸潤能の亢進が示された。AQP1 上昇に伴い変化を認めた signal pathway を探索し、FAK (focal adhesion kinase) の上昇、MMP-9 の活性の亢進を確認した (図 3)。

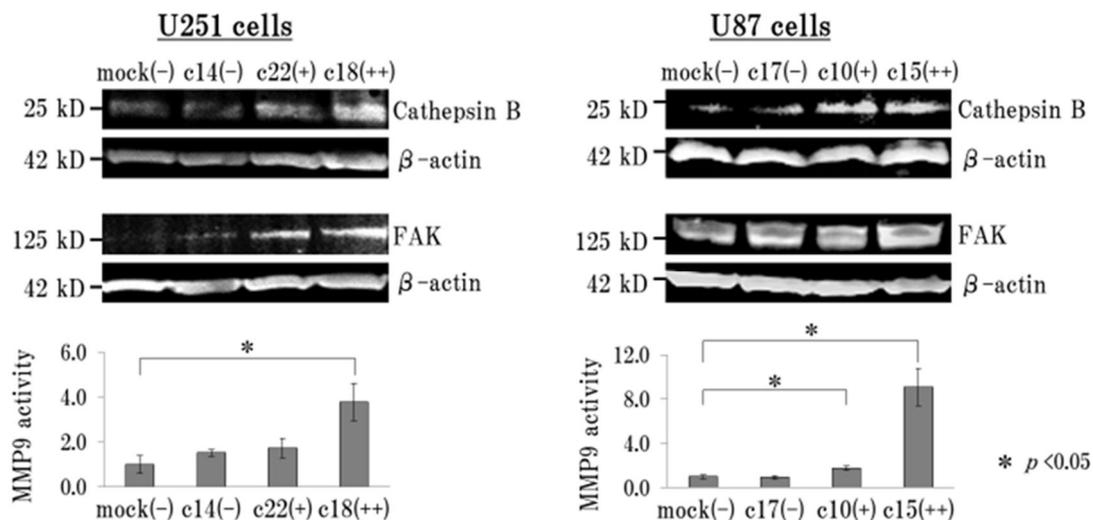


図 3 AQP1 発現と Cathepsin B、FAK、MMP9 活性の相関関係

3) 免疫不全マウス (SCID-NOD マウス) の脳に AQP1 発現調節腫瘍細胞株およびコントロール群を移植し、腫瘍体積や血管新生の程度を比較する予定であったが、腫瘍細胞の定着に問題があり、本研究期間内に有意な結果には至らなかった。

4) 手術で得られた GBM の病理標本においては腫瘍細胞の AQP1 の発現を認めるが、今回の研究で使用した U251、U87、T98 細胞株には AQP1 の発現が確認されず、実臨床と *in vitro* の間に解離がある。また AQP1 の発現は GBM の stem cell マーカーとしての可能性が報告されている (Cancer Inform. 2015; 14: 95-103.)。当教室で樹立した GBM stem cell line を用いて、AQP1 の発現を検証したが、stem cell においても AQP1 の発現は確認されなかった (図 4)。

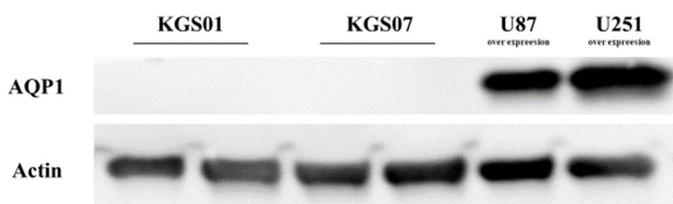


図 4 GBM stem cell の AQP1 発現

5) 研究の成果と問題点・展望

これまでの研究結果を論文として、Cancer Med. 2020 Jun;9(11):3904-3917. に発表した。本研究のうち論文化し得たものは *in vitro* での成果が主である。今後、*in vivo* の研究を進める必要がある。また近年新規の AQP1 阻害薬が報告されており、現在研究用として購入可能となった。今後臨床応用への期待が高まっていくと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oishi Masahiro, Munesue Seiichi, Harashima Ai, Nakada Mitsutoshi, Yamamoto Yasuhiko, Hayashi Yasuhiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Aquaporin 1 elicits cell motility and coordinates vascular bed formation by downregulating thrombospondin type 1 domain containing 7A in glioblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 3904 ~ 3917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ichinose Toshiya, Hayashi Yasuhiko, Sasagawa Yasuo, Oishi Masahiro, Higashi Ryo, Nakada Mitsutoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 A case of rapid deterioration in a subacute period after endoscopic third ventriculostomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1 ~ 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/02688697.2021.1885624	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sasagawa Yasuo, Aburano Hiroyuki, Oiso Kazumasa, Oishi Masahiro, Hayashi Yasuhiko, Nakada Mitsutoshi	4. 巻 163
2. 論文標題 Oculomotor nerve palsy in pituitary apoplexy associated with pituitary adenoma: a radiological analysis with fast imaging employing with steady-state acquisition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neurochirurgica	6. 最初と最後の頁 383 ~ 389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00701-020-04632-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ichinose Toshiya, Miyashita Katsuyoshi, Tanaka Shingo, Oikawa Nozomu, Oishi Masahiro, Nambu Iku, Kinoshita Masashi, Nakada Mitsutoshi	4. 巻 138
2. 論文標題 Recurrent Spinal Intramedullary Arachnoid Cyst: Case Report and Literature Review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 68 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2020.02.106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Yu, Harashima Ai, Munesue Seiichi, Oishi Masahiro, Hattori Tsuyoshi, Hori Osamu, Kitao Yasuko, Yamamoto Hiroshi, Leerach Nontaphat, Nakada Mitsutoshi, Yamamoto Yasuhiko, Hayashi Yasuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Neuroprotective Effects of Endogenous Secretory Receptor for Advanced Glycation End-products in Brain Ischemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aging and disease	6. 最初と最後の頁 547 ~ 547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14336/AD.2019.0715	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Ryouken, Hayashi Yasuhiko, Sasagawa Yasuo, Kobayashi Masaaki, Oishi Masahiro, Kinoshita Masashi, Nakada Mitsutoshi	4. 巻 135
2. 論文標題 Progressively Enlarged Convexity Arachnoid Cysts in Elderly Patients: A Report of 2 Cases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 253 ~ 258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2019.12.112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakaguchi Maki, Nakano Yoshiko, Honda-Kitahara Mai, Kinoshita Masashi, Tanaka Shingo, Oishi Masahiro, Noguchi Kazuhiro, Fukuda Masaki, Maeba Hideaki, Watanabe Takuya, Hayashi Yutaka, Ikeda Hiroko, Minato Hiroshi, Ichimura Koichi, Nojima Takayuki, Nakada Mitsutoshi	4. 巻 36
2. 論文標題 Two cases of primary supratentorial intracranial rhabdomyosarcoma with DICER1 mutation which may belong to a "spindle cell sarcoma with rhabdomyosarcoma-like feature, DICER1 mutant"	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology	6. 最初と最後の頁 174 ~ 182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-019-00352-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Yasuhiko, Kobayashi Masaaki, Sasagawa Yasuo, Oishi Masahiro, Tachibana Osamu, Nakada Mitsutoshi	4. 巻 126
2. 論文標題 Entirely Suprasellar Rathke Cleft Cysts: Clinical Features and Surgical Efficacy of Endoscopic Endonasal Transtuberulum Sellae Approach	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 e921 ~ e929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2019.03.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawahara Yosuke, Furuta Takuya, Sabit Hemragul, Tamai Sho, Dong Yu, Jiapaer Shabierjiang, Zhang Jiakang, Zhang Guangtao, Oishi Masahiro, Miyashita Katsuyoshi, Hayashi Yasuhiko, Nakada Mitsutoshi	4. 巻 449
2. 論文標題 Ligand-dependent EphB4 activation serves as an anchoring signal in glioma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 56 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2019.02.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Yasuhiko, Sasagawa Yasuo, Oishi Masahiro, Misaki Kouichi, Kozaka Kazuto, Tachibana Osamu, Nakada Mitsutoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Radiological and endocrinological evaluations with grading of hypothalamic perifocal edema caused by craniopharyngiomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pituitary	6. 最初と最後の頁 146 ~ 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11102-019-00945-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大石正博、林 康彦、棟居聖一、山本靖彦、中田光俊
2. 発表標題 アクアポリン1が膠芽腫細胞の運動能の亢進とTHSD7Aの抑制を介した腫瘍血管床形成に関わる
3. 学会等名 第79回脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	林 康彦 (Hayashi Yasuhiko)	金沢医科大学・脳神経外科・特任教授	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山本 靖彦 (Yamamoto Yasuhiko)	金沢大学・血管分子生物学・教授	
研究協力者	棟居 聖一 (Munesue Seiichi)	金沢大学・血管分子生物学・助教	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関