

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592135

研究課題名(和文) Wnt / Frizzled系主要メッセージ経路探索による新しい抗グリオーマ戦略

研究課題名(英文) New anti-glioma treatment strategy by clarification of dominant Wnt/Frizzled message

研究代表者

平野 宏文 (Hirano, Hirofumi)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：00264416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：予後不良疾患である膠芽腫は周囲組織への浸潤する時MMPが関与しており、分泌性糖タンパク質であるWntは、受容体Fzd, Ror2, Rykと結合する。先行論文で膠芽腫ではWnt-5aが高発現し、MMP-2を上昇させることを報告した。

今回はMMP-2を介した細胞浸潤は受容体Rykを介していることを発見した。また悪性度とFzd2, Rykの発現が相関することが分かった(J Biochem 2014)。膠芽腫ではFzd2とFzd6の高発現が予後不良因子であることも報告した(Brain Tumor Pathol 2013)。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma, one of the most malignant brain tumors, invade surrounding brain by expression of MMPs. Wnts, secretory proteins bind to their receptors, Fzd, Ror2, and Ryk. We previously reported that Wnt-5a was highly expressed and it up-regulated MMP-2 in glioblastoma.

In this work, we revealed that tumor cell invasion by MMP-2 was achieved via receptor Ryk, and the degree of histological malignancy correlated with expression of Fzd2 and Ryk (J Biochem 2014, doi: 10.1093/jb/mvu015). In another analysis, we reported that high expression of Fzd2 and Fzd6 was poor prognostic factor in glioblastoma patients (Brain Tumor Pathol 2013, 10.1007/s10014-013-0153-1).

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：脳神経外科学

キーワード：glioblastoma Wnt-5a MMP-2 Fzd2 Fzd6 Ryk Ror2 invasion

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は悪性度が高く、予後不良な中枢神経系腫瘍であり、周囲組織への浸潤が激しい主要である。腫瘍細胞の周囲組織への浸潤の過程においては細胞外マトリクスを分解する matrix metalloproteinase (MMP) が重要な役割を担っている。これまでに我々は先行論文 (cancer sci 102, 540-8, 2011) で GBM 組織や GBM 由来細胞では Wnt-5a の発現が亢進していることを見出し、Wnt-5a が GBM 由来細胞の細胞運動や MMP-2 活性に依存する細胞浸潤を促進することを明らかにしていた。Wnt-5a は Frizzled, Ror, Ryk などの受容体と結合することが知られているもののグリオーマにおける Wnt-5a 作用の詳細は不明であった。

2. 研究の目的

Wnt-5a がどの受容体を介して、膠芽腫における細胞の運動や浸潤を制御しているのか、また、患者の生存期間にどの受容体発現が最も影響しているかを解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) GBM 由来細胞株を使用して以下の実験を行った。

U251 株と U105 株で Wnt-5a, Fz-2, Ror2, Ryk を siRNA を用いてノックダウンし、各細胞株の MMP-2 mRNA の発現量の変化を解析した。

U251 株で Wnt-5a, Fz-2, Ror2, Ryk を siRNA でノックダウンし、in gel-gelatinase 解析による MMP-2 活性の変化を解析した。

U251 株で Ryk を siRNA でノックダウンした後、Wnt-3a および Wnt-5a リガンドで刺激し、定量 PCR 法にて MMP-2 mRNA の発現量を解析した。

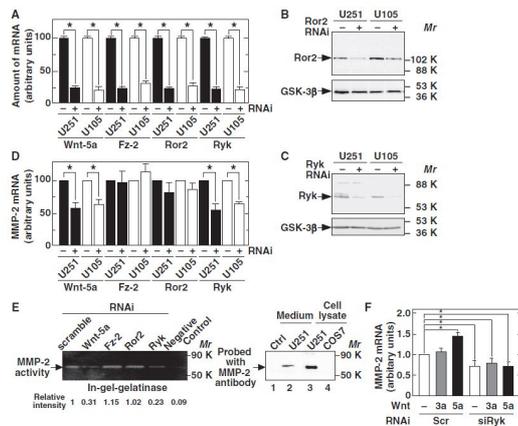
U251 株と U105 株で Wnt-5a, Fz-2, Ror2, Ryk を siRNA でノックダウンした後、Wnt-5a 存在下または非存在下での細胞運動能と細胞浸潤能の解析を行った。細胞運動能は Boyden Chamber を用いて判定し、細胞浸潤能は細胞の基底膜を模したマトリゲルでコーティングされた invasion Chamber を使用して解析した。

(2) ヒト glioma 手術摘出標本を抗 Wnt-5a, Fz2, Ryk, MMP-2 抗体で染色し、Fz-2 と Ryk について、その陽性細胞率と WHO Grade との相関を解析した。

(3) 手術により全摘された膠芽腫 41 例を対象とし、組織中の Wnt5a, Fzd2, Fzd6, Ryk の免疫染色を行った。発現程度を評価するにあたり、画像処理ソフトウェアによる color deconvolution を実施し、染色量を定量的に評価した。また、人的評価によるデータセットも用い、信頼性、有効性を勘案しながら、生存期間に対する影響を検討した。

4. 研究成果

(1) についての結果



上図説明

Wnt-5a シグナル分子のノックダウンを示す。

(A) Wnt-5a, Fz-2, Ror2, Ryk とコントロール dsRNA をトランスフェクトした Wnt-5a シグナル分子の遺伝子発現。mRNA の相対量はコントロール dsRNA をトランスフェクトした U251 グリオーマ(黒)と U105 グリオーマ(白)で標準化した。\*P < 0.05。

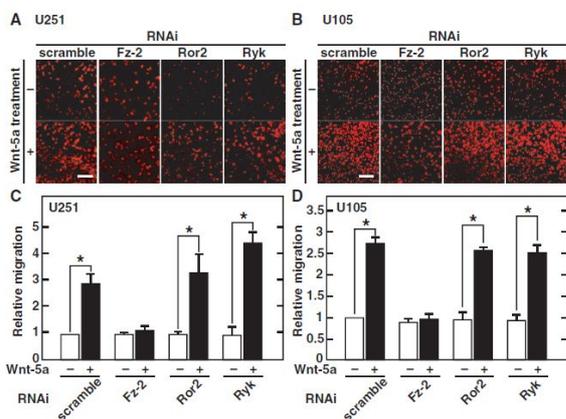
(B, C) コントロール dsRNA をトランスフェクトしたグリオーマにおける Ror2 と Ryk のタンパクレベル。抗 Ror2 と抗 GSK-3 抗体で調べた(B)。抗 Ryk と抗 GSK-3 抗体で調べた(C)。

(D) MMP-2 mRNA 発現に対する Wnt-5a シグナル分子ノックダウンの効果。U251 細胞(黒)と U105 細胞(白)を示す。\*P < 0.05。

(E) 左: Wnt-5a, Fz-2, Ror2, Ryk とコントロール dsRNA を U251 細胞にトランスフェクトした後 SDS-PAGE を実施し、ゲル内ゼラチナーゼアッセイを行った。ネガティブコントロールは新鮮な培地を使用した(RPMI 1640 + 1% FBS)。矢印は MMP-2 の活性場所を示す。

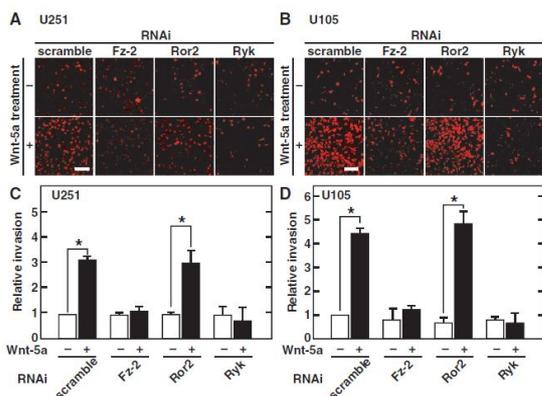
右: MMP-2 のウェスタンブロット。10% FBS 入り RPMI 1640 培地(コントロール)(レーン 1), U251 細胞の培地(レーン 2), U251 細胞溶解物(レーン 3)と COS7 細胞溶解物(lane 4)。SDS-PAGE の後、抗 MMP-2 抗体で解析した。

(F) Wnt-5a-dependent 依存 MMP-2 誘導に対する Ryk の必要性。コントロールと Ryk の dsRNA をトランスフェクトした U251 細胞は、Wnt-3a (500 ng/ml) (灰色)あるいは Wnt-5a (500 ng/ml) (黒)で 48 時間処理され、MMP-2 mRNA の発現が、real-time RT-PCR で調べられた。\*P < 0.05。



**上図説明**

グリオーマ由来細胞の Wnt-5a 依存性細胞運動性に関する Wnt-5a 受容体に対する 2 本鎖 RNA の効果 . U251 細胞 (A) と U105 細胞 (B) に , Fz-2, Ror2, Ryk, 及びコントロールの 2 本鎖 RNA をトランスフェクトし , 48 時間培養した . その後 , transwell chamber に移し , Wnt-5a 依存性細胞移動を評価した . 細胞は 2.5-5 時間後に観察した . 上下の図は , コントロールと Wnt-5a タンパク 500 ng/ml のものである . 3 視野を観察した . 代表的な顕微鏡写真を示している . バーは 100 μm である . U251 細胞 (C) と U105 細胞 (D) の移動能は , コントロール 2 本鎖 RNA をトランスフェクトした細胞のコントロールバッファにおける移動能に対する比で示してある . 結果は , 平均 ± 標準偏差である . \*P < 0.05 .



**上図説明**

Ryk はグリオーマ由来細胞の Wnt-5a 依存性浸潤能に参与していた . U251 (A) 細胞と U105 (B) 細胞に , 提示したように , Fz-2, Ror2, Ryk とコントロール 2 本鎖 RNA をトランスフェクトし , 48 時間培養した . その後細胞は Matrigel でコーティングしてある transwell chambers に移され , invasion assay を行った . 細胞の浸潤時間は 24 時間である . 上下の図は , コントロールと Wnt-5a タ

ンパク 500 ng/ml のものである . 3 視野を観察した .

代表的な顕微鏡写真を示している . バーは 100 μm である . U251 細胞 (C) と U105 細胞 (D) の浸潤能は , コントロール 2 本鎖 RNA をトランスフェクトした細胞のコントロールバッファにおける移動能に対する比で示してある . 結果は , 平均 ± 標準偏差である . \*P < 0.05 .

**(1) の結果のまとめ**

U251 と U105 株において Wnt-5a や Ryk をノックダウンすると , MMP-2 mRNA の発現量が低下したのに対し , Fz-2 や Ror2 のノックダウンでは MMP-2 発現の変化は認められなかった .

U251 株において Wnt-5a や Ryk をノックダウンすると , MMP-2 の活性が低下したのに対し , Fz-2 や Ror2 のノックダウンでは MMP-2 の変化は認められなかった .

U251 株の MMP-2 mRNA の発現量は , Wnt-5a 蛋白質で刺激すると有意に増加したが , Wnt-3a 刺激では変化が認められなかった . さらに , Ryk をノックダウンすると , Wnt-5a 刺激に依存した MMP-2 mRNA 発現量の増加が著明に抑制された .

U251 と U105 株において , Fz-2 をノックダウンした場合のみ Wnt-5a 刺激依存性の細胞運動能の亢進が認められなくなった . また , Fz-2 をノックダウンすると Wnt-5a 刺激依存性の細胞浸潤能の亢進が認められなくなった . Ryk をノックダウンすると Wnt-5a 刺激依存性の細胞運動能亢進が起こるのにもかかわらず , Wnt-5a 刺激依存性の細胞浸潤能の亢進が認められなくなった .

以上より , Wnt-5a の作用は , Fz-2 を介した細胞運動促進と Ryk を介した MMP-2 発現の促進という異なるシグナルにより制御されていることが明らかとなった .

**(2) についての結果**

Table I. Relationship between WHO grading and expression of Wnt-5a receptors in 38 human glioma tissues.

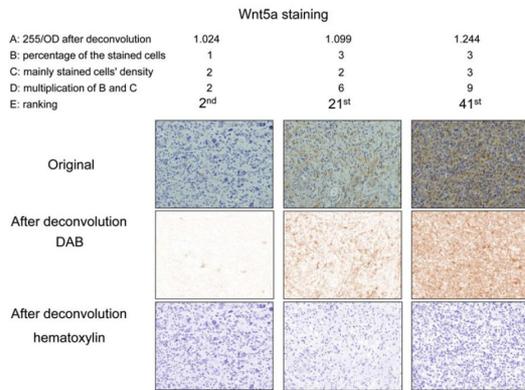
Receptors	Grade II (n=7)		Grade III (n=13)		Grade IV (n=18)	
	Fz-2	Ryk	Fz-2	Ryk	Fz-2	Ryk
Score 0	4	4	1	7	0	2
Score 1	2	1	5	3	3	3
Score 2	1	1	6	2	4	6
Score 3	0	1	1	1	11	7

Statistical significance was analysed by linear-by-linear association test. Grading and Fz-2 (exact P-value, two-sided, P<0.001). Grading and Ryk (exact P-value, two-sided, P=0.008).

**上表についての説明と結果**

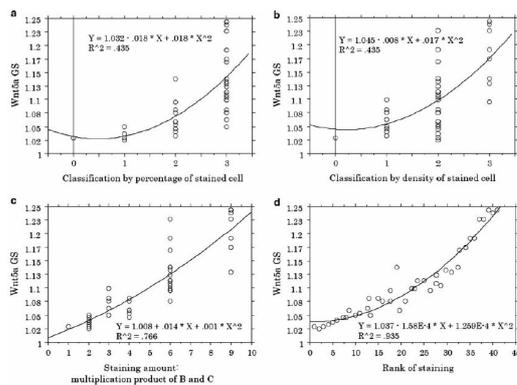
悪性度 (WHO Grading) と Fz-2, Ryk の発現率との間には有意な正の相関が認められた .

### (3) についての結果



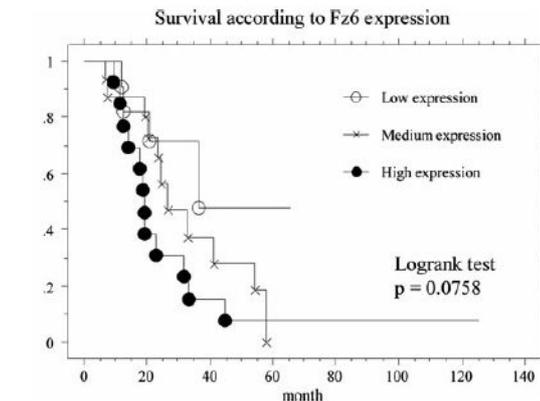
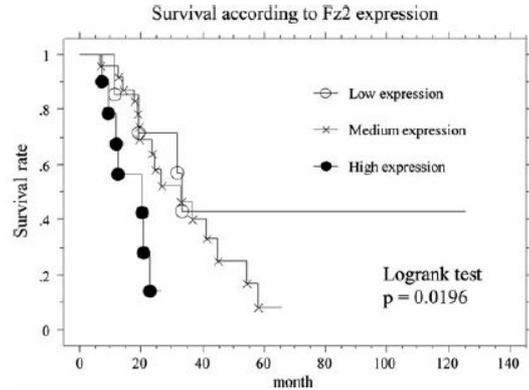
#### 上図説明

DAB 発色とヘマトキシリン核染色を用いた免疫組織学的な染色結果(図の original)は、ImageJ ソフトウェアの color deconvolution 機能で処理を行った。DAB とヘマトキシリンの色は、オリジナルの写真から抽出される(2 段目, 3 段目)。評価法 A は color deconvolution 後の染色量であり, その他, B, C, D, E の方法による評価結果が例として提示されている。左から右へタンパク発現量が増加している。



#### 上図説明

Wnt5a の発現量評価: A の GS (grayscale optical density after color deconvolution) とその他の評価方法 (B, C, D, E) による結果との回帰曲線である。



#### 上図説明

Fz2 の発現, Fz6 の発現で分類した膠芽腫の生存曲線である

### (3) の結果のまとめ

Wnt5a の受容体である Fzd2, Fzd6 の発現が膠芽腫の予後不良因子として確認された。また, color deconvolution 法は免疫染色評価方法として有用であった。

### 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 2 件)

Mika Habu, Hirofumi Koyama, Michiko Kishida, Masayuki Kamino, Mikio Iijima, Takao Fuchigami, Hiroshi Tokimura, Masahiro Ueda, Mai Tokudome, Chihaya Koriyama, Hirofumi Hirano, Kazunori Arita, Shosei Kishida. Ryk is essential for Wnt-5a-dependent invasiveness in human glioma. J Biochem, Epub ahead of print, 2014, 査読有, DOI: 10.1093/jb/mvu015

Hirofumi Hirano, Hajime Yonezawa, Shunji Yunoue, Mika Habu, Hiroyuki Uchida, Takako

Yoshioka, Shosei Kishida, Michiko Kishida, Tatsuki Oyoshi, Shingo Fujio, Sei Sugata, Hitoshi Yamahata, Ryouzuke Hanaya, Kazunori Arita. Immunoreactivity of Wnt5a, Fzd2, Fzd6, and Ryk in glioblastoma: evaluative methodology for DAB chromogenic immunostaining. Brain Tumor Pathol, vol.31(2), 85-93, 2014, 査読有, DOI: 10.1007/s10014-013-0153-1

〔学会発表〕(計 3 件)

Wnt5a, Fzd2, Fzd6, and Ryk expression in glioblastoma : Hirofumi Hirano, Hajime Yonezawa, Mika Habu, Shosei Kishida, Shingo Fujio, Kazunori Arita.  
82nd AANS Annual Scientific Meeting , April 5-6, 2014, The Moscone Center(U.S.A.)

膠芽腫における Wnt5a, Fzd2, Fzd6, Ryk の発現と生存期間への影響 : 平野宏文, 羽生未佳, 米澤 大, 湯之上俊二, 内田裕之, 岸田昭世, 花谷亮典, 時村 洋, 有田和徳.  
第 30 回日本脳腫瘍学会, 2012 年 11 月 26 日, グランドプリンスホテル広島

Glioma 浸潤活性における Wnt シグナルの作用機序 : 羽生未佳, 神野真幸, 岸田想子, 岐部俊郎, 平野宏文, 岸田昭世, 有田和徳.  
第 12 回日本分子脳神経外科学会, 2011 年 10 月 15 日, パシフィコ横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平野 宏文 (Hirano Hirofumi)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師  
研究者番号 : 00264416

### (2) 研究分担者

岸田 昭世 (Kishida Shosei)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号 : 50274064

有田 和徳 (Arita Kazunori)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号 : 90212646

湯之上 俊二 (Yunoue Shunji)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員  
研究者番号 : 20404478