

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591716

研究課題名(和文) 悪性グリオーマにおけるWntシグナル活性化の検討と診断・治療への応用

研究課題名(英文) The study and application of Wnt signaling pathway for the treatment of malignant glioma

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

研究成果の概要(和文)：

グリオーマ由来細胞における Wnt と Fz の発現を調べ、Wnt-5a, -7, Fz-2, -6, -7 の過剰発現を確認した。ヒト腫瘍組織で Wnt-5a は、79%に強発現しており、腫瘍の悪性度と相関していた。また、Wnt-5a の抑制は細胞の移動、浸潤能力の低下と共に、matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) の発現を低下させた。逆に Wnt-5a は、細胞の移動、浸潤能力を刺激した。以上より、Wnt-5a は予後因子であるだけでなく、腫瘍浸潤に関与していることより、これを抑制することで抗腫瘍作用を期待しうる分子標的になる可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：

Gliomas are one of the most common intracranial tumors. Gliomas exhibit a progression associated with widespread infiltration into surrounding neuronal tissues. However, the molecular mechanisms that stimulate the invasion of glioma cells are not fully understood. We established two cell lines from human glioma cases and analyzed the expression of all Wnt and Frizzled members in these cell lines and other well-known glioma cell lines by real-time PCR study. The mRNA of Wnt-5a and -7b and Frizzled-2, -6 and -7 were overexpressed in glioma cells. The elevation of Wnt-5a expression was most remarkable. Although Wnt-5a is reported to have oncogenic and antioncogenic activity in several cancers, the role of Wnt-5a signaling in human glioma cells remains unclear. Immunohistochemical study also revealed high expression of Wnt-5a in 26(79%) of 33 human glioma cases. The positivity of Wnt-5a expression was correlated with the clinical grade. Knockdown of Wnt-5a expression suppressed migration, invasion and expression of matrix metalloproteinase-2 of glioma cells. Reciprocally, treatment with purified Wnt-5a ligand resulted in stimulation of cell migration and invasion. MMP-2 inhibitor suppressed the Wnt-5a-dependent invasion of U251 cells. These results suggested that Wnt-5a is not only a prognostic factor but also a therapeutic target molecule in gliomas for preventing tumor cell infiltration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：glioma, Wnt-5a, Frizzled, invasion, astrocytic tumor

1. 研究開始当初の背景

Wnt はヒトにおいては 19 種類が知られており、細胞の増殖、分化、運動に関与し、発生や腫瘍化に影響を及ぼしている。Wnt は細胞表面に存在する frizzled (Fz) と low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) に結合し、 β カテニン依存性、あるいは非依存性にシグナルを伝達するが、浸潤性に発育する脳腫瘍であるグリオーマにおける Wnt と Fz の発現様式は不明であった。

2. 研究の目的

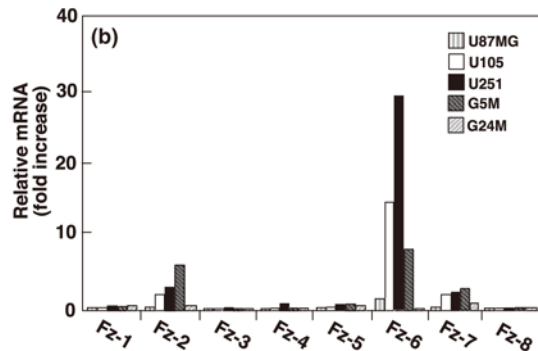
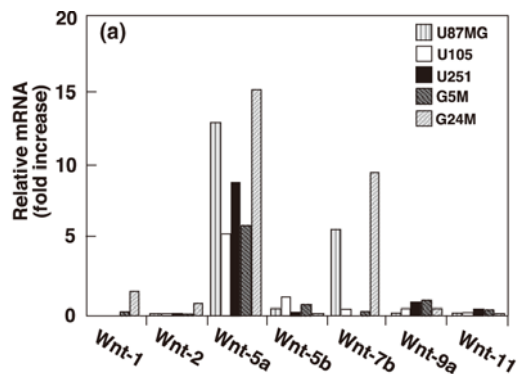
グリオーマにおける Wnt と Fz の発現状況を明らかにし、グリオーマにおける主たる Wnt の作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- ・浸潤性に発育する脳腫瘍であるグリオーマ由来細胞における Wnt と Fz の発現を real-time PCR で調べた。
- ・ヒトグリオーマ組織における主たる Wnt の発現を免疫組織学的に検討した。
- ・Wnt のグリオーマにおける働きを、RNAi によるノックダウンや Wnt タンパクによる刺激により検討した。

4. 研究成果

浸潤性に発育する脳腫瘍であるグリオーマ由来細胞における Wnt と Fz の発現を real-time PCR を用いて調べたところ、Wnt-5a, -7, Fz-2, -6, -7 が過剰発現しており、特に Wnt-5a の上昇は顕著であった。



免疫組織学的な検討では、Wnt-5a は、ヒトグリオーマ 33 例中 26 例(79%)において、強発現しており、腫瘍の悪性度と相関していた。

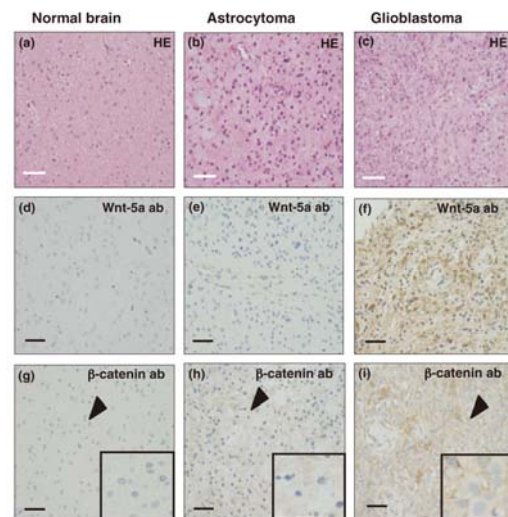
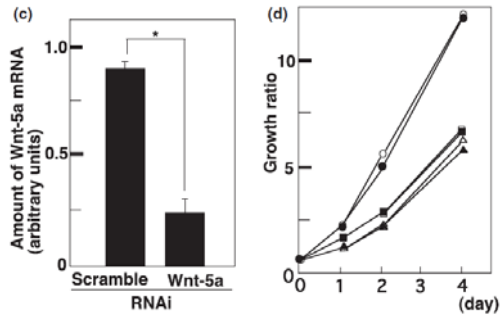


Table 2. Relationship between WHO stage and Wnt-5a protein expression score in human glioma cases

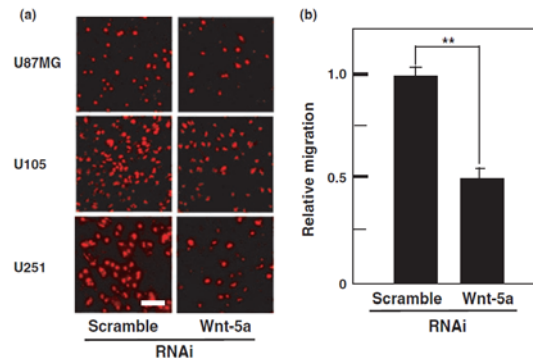
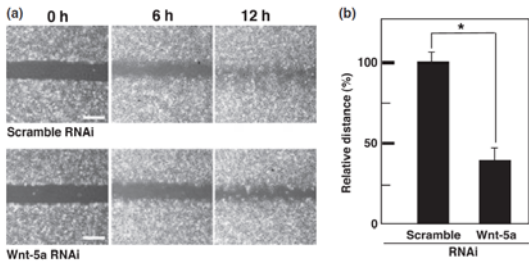
	Grade II	Grade III	Grade IV	Subtotal
Score 0	5 (15%)	4 (12%)	2 (6%)	11 (33%)
Score 1	1 (3%)	2 (6%)	0 (0%)	3 (9%)
Score 2	2 (6%)	5 (15%)	2 (6%)	9 (27%)
Score 3	1 (3%)	1 (3%)	8 (24%)	10 (30%)
Total	9	12	12	33

Statistical significance was analyzed by linear-by-linear association test (exact *P* value, two-sided, *P* < 0.05).

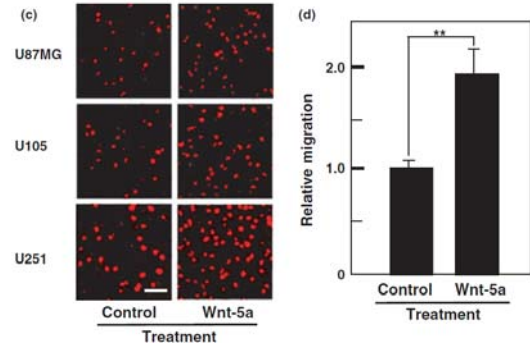
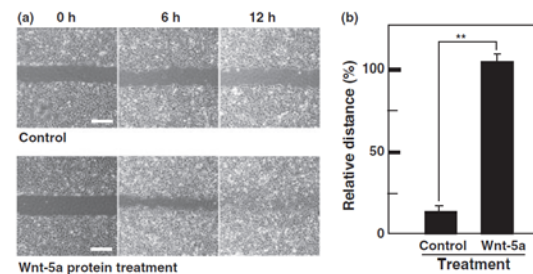
また、Wnt-5a の発現をノックダウンすると、細胞の増殖能が低下した。



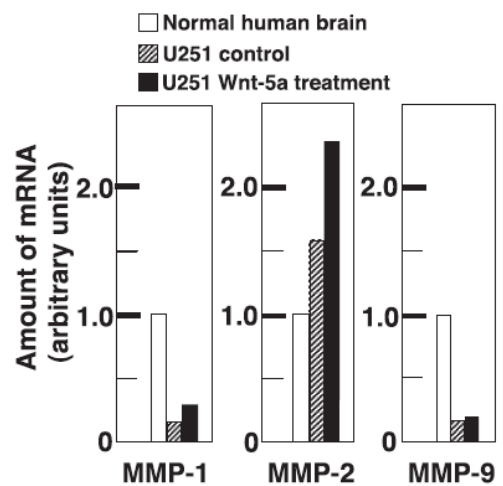
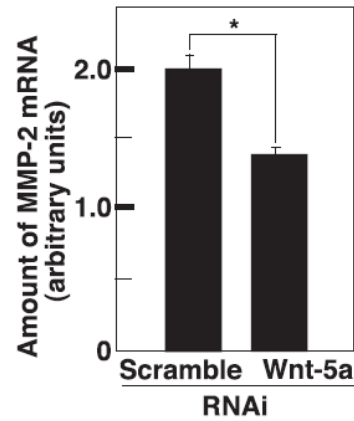
更に Wnt-5a の発現をノックダウンすると、細胞の移動、浸潤能力の低下が認められた。



逆に精製した Wnt-5a を作用させると、細胞の移動、浸潤能力が横狭された。



Wnt-5a のノックダウンは matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) の発現低下を引き起こし、Wnt-5a の添加は、MMP-2 を上昇させた。



結果のまとめ

Wnt-5a はいくつかの癌腫で oncogenic であるとする報告や antioncogenic であるとする報告があるが、ヒトグリオーマにおける役割が明らかになった。すなわち、ヒトグリオーマ腫瘍組織では Wnt-5a が強発現しており、腫瘍の悪性度 (WHO grade) と関連していた。また、Wnt-5a の抑制は細胞の移動、浸潤能力の低下を来たし、その作用機序に matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) の発現低下が拘っている事が分かった。

結論

Wnt-5a は予後因子であるだけでなく、腫瘍浸潤を抑制する分子標的になりうると考えられた。

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 1 件)

① Wnt-5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and MMP-2. Masayuki Kamino, Michiko Kishida, Toshiro Kibe, Kyoko Ikoma, Mikio Iijima, Hirofumi Hirano, Mai Tokudome, Lin Chen, I Chihaya Koriyama, Katsushi Yamada, Kazunori Arita, Shosei Kishida, cancer sci 102(3), 540-548, 2011
査読有り

[学会発表] (計 3 件)

① Wnt-5a signaling is correlated with cellular motility and MMP-2 in human glioma cells

神野真幸, 岸田想子, 岐部俊郎, 生駒今日子, 飯島幹雄, 平野宏文, 徳留舞, 陳琳, 郡山千早, 武田泰生, 山田勝士, 有田和徳, 岸田昭世

第 33 回日本分子生 物学会

2010 年 12 月 8 日 兵庫

② ヒトグリオーマにおける Wnt シグナル分子の発

現解析

神野真幸, 岐部俊郎, 中村葉子, 生駒今日子, 武田泰生, 山田勝士, 岸田想子, 飯島幹雄, 平野宏文, 岸田昭世

第 32 回日本分子生 物学会

2009 年 12 月 10 日 横浜

③ 悪性グリオーマ細胞に対する低分子標的薬の効果

平野宏文, 湯之上俊二, 米澤 大, 新里能成, 有田和徳

第 27 回日本脳腫瘍学会 大阪

2009 年 11 月 8 日

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 SYOSEI)

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 SYUNJI)

鹿児島大学・医学部歯学部附属病院・助教

研究者番号：20404478

(3) 連携研究者

岸田想子 (KISHIDA MICHIKO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40274089

(4) 研究協力者

神野真幸 (KAMINO MASAYUKI)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・大学院生

生