

氏名	鈴木 景子
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	医工博4甲 第261号
学位授与年月日	平成31年3月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	先進医療科学専攻
学位論文題名	Expression of ZEBs in gliomas is associated with invasive properties and histopathological grade (グリオーマにおける上皮間葉転換転写因子 ZEBs と浸潤能及び病理学的悪性度との相関)
論文審査委員	委員長 教授 犬飼 岳史 委員 教授 上木 耕一郎 委員 講師 萩原 明

学位論文内容の要旨

(研究の目的)

成人大脳半球で最も高頻度に発生する悪性グリオーマは、外科的治療に加え放射線化学療法を行っても極めて予後が不良である。グリオーマ細胞が有する高い浸潤性が治療抵抗性の主因となっており、この克服が臨床上的喫緊の課題である。一方、上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition, 以下EMT) とは、上皮細胞がより運動性の高い間葉系細胞に変化する現象で、胚形成や創傷治癒に関し提唱された概念である。悪性腫瘍においては、細胞間接着を調節し、細胞浸潤や転移などの機序との関連性が注目されている。その中でも、細胞間接着に働く Epithelialカドヘリン (E-カドヘリン) の発現調節が重要であり、グリオーマでは、E-カドヘリンの発現が抑制され細胞浸潤に有利な環境が構築されている。E-カドヘリンの転写抑制には、Zinc-finger E-box-binding homeobox (ZEB) の関与が指摘されており、このうち、ZEB1及びZEB2 (以下ZEB1/2) が、key moleculeと考えられている。しかしながら、グリオーマにおける浸潤能と悪性度に関してZEB1/2の相互的な関与については、詳細に検討されていない。そこで、転写因子ZEB1/2に着目し、グリオーマにおける両者の発現と浸潤能及び病理学的な悪性度との相関について検討した。

(方法)

ヒトグリオーマ細胞株 (A172, KG1C, T98G, U251, U87) とマウスグリオーマ細胞株 (GL261) を用い、EMT 転写因子 ZEB1/2 の発現をウエスタンブロット法により検討した。次に、T98G、U251、GL261 細胞株を用いて ZEB1/2 の si RNA のシングル及びダブルノックダウン細胞を作成し、増殖能を検討した上で、transmigration assay (TMA) にて浸潤能をコントロールと比較した。またヒトグリオーマ組織における ZEB1/2 の発現を免疫組織化学的染色後、陽性率を0、1、2、3の4段階に点数化し、定量し、WHO grade とスコアの相関および ZEB1/2 のスコアの相関について検討した。

(結果)

ヒト及びマウスグリオーマの全ての細胞株において ZEB1/2 は高発現していた。TMA では、ZEB1/2 単独のノックダウンでは、40~70 %程度の浸潤抑制能を示すのみであったが、両者のノックダウンにより最大約 85%の相乗的な抑制効果が示された (P<0.01)。ヒトグリオーマ組織の免疫組織学的な検討では、WHO grade II (n=11), III (n=4), IV (n=15) における ZEB1/2 の平均スコアは、WHO grade II/III では ZEB1; 1.27, ZEB2; 1.54, grade IV では ZEB1; 2.20, ZEB2; 2.13 であり Grade IV における両者の発現は有意に高かった (p<0.05)。また、ZEB1/2 の発現強度は、正の相関関係を認めた (R*2=0.809, P<0.01)。

(考察)

ZEB の活性化機構については、まだ不明な点が多い。TGF- β は、EMT を調節する重要なサイトカインであり、ZEB の発現を誘導する。グリオーマにおいては、TGF- β および間葉系タンパクの発現と病理学的悪性度が相関しており、EMT の関与が推測されている。本研究では、ZEB1/2 がともに病理学的悪性度と相関し、再発症例における発現上昇が示され、臨床的に重要な知見であった。その機序の一つとして、MEK-ERK1/2 経路の活性化が考えられている。しかし、先行研究の結果からは ERK1/2 経路のみが ZEB を誘導しているのではなく、未知の経路の関与が予測されている。食道癌において p53 は、ZEB1 を介して EMT に寄与する可能性が指摘されている。実際、二次性膠芽腫では、p53 変異が高率に認められるが、EMT への関与は不明である。グリオーマの ZEB 活性化の機序としては、MEK-ERK1/2 経路が、p53 および TGF- β と関係し、ZEB の発現調節を行い、EMT に寄与している可能性が考えられ、今後の検討課題である。

(結論)

EMT に関連した転写調節因子である ZEB1 及び ZEB2 は、グリオーマ浸潤能と悪性化への関与が示唆された。グリオーマの不均一性や治療抵抗性との関連から ZEB1/2 は悪性グリオーマに対する有望な治療標的になる可能性がある。

論文審査結果の要旨

本研究 Expression of ZEBs in gliomas is associated with invasive properties and histopathological grade (グリオーマにおける上皮間葉転換転写因子 ZEBs と浸潤能及び病理学的悪性度との相関) は、悪性グリオーマの病期の進展における上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition; EMT) の関与を、その制御因子とされる E-box 結合転写因子である Zinc-finger E-box-binding homeobox の ZEB1 および ZEB2 の発現に焦点を当てて解析した研究である。本研究は、2018 年 8 月号の Oncology Letters(1758-1764)に掲載された。

まずは Western blot 法によって、ZEB1 および ZEB2 タンパクが悪性グリオーマの細胞株で強く発現されていることを確認した。そこで、ZEB1 および ZEB2 に特異的な siRNA をウイルスベクターを用いて複数の悪性グリオーマの細胞株に導入し、それぞれの単独及び両者のノックダウン細胞を樹立した。その結果、いずれの細胞株においても、細胞の増殖能には明らかな影響が認められなかった一方で、transmigration assay による評価において、ZEB1 単独および ZEB2 単独のノックダウンで細胞浸潤能の有意な低下を認めた。さらに、両者のノックダウン細胞において、相加的な有意な細胞浸潤能の低下が認められた。また、ZEB1 と ZEB2 のダブル・ノックダウンのグリオーマ細胞株を頭蓋内に移植されたマウスにおいて、野生型のグリオーマ細胞株を移植されたマウスに比べて、生存期間が延長する

傾向が確認された。最後に、グリオーマの臨床検体における ZEB1 および ZEB2 タンパク発現を組織染色によって評価したところ、WHO の grade が進んだ悪性度の高い症例において、発現レベルが有意に高いことが確認された。

本研究は、極めて予後が不良な悪性グリオーマの細胞浸潤に、ZEB1 および ZEB2 を介した上皮間葉転換が関与していることを明らかにした意義のある研究であると言える。これまでに ZEB1 単独および ZEB2 単独の影響を検討した研究はいくつか報告されているが、ZEB1 と ZEB2 の両方に焦点を当てた研究はなく、その点でも新規性のある研究であると言える。さらに、細胞株を用いて *in vitro* のみならず *in vivo* でも実験を行っていることに加えて、臨床検体を用いて病期進展との関連性を検証している点は高く評価できる。悪性グリオーマにおける ZEB1 および ZEB2 の発現には MEK/ERK 経路も関与することから、本研究結果から ZEB1 と ZEB2 および MEK/ERK 経路が悪性グリオーマに対する分子標的療法の標的として有効である可能性も示唆され、今後の発展が期待される研究である。

本研究においては、市販の ZEB1 および ZEB2 に対する抗体を用いて解析を進めているが、ZEB1 と ZEB2 は相互に非常に相同性が高い一方で、抗体を樹立するのに用いられたペプチドの配列情報が明らかにされておらず、抗体の特異性に疑念が残る。このため、ノックダウンの実験で認められた ZEB1 と ZEB2 に対する siRNA の相加的効果が、確かに ZEB1 と ZEB2 とに起因するものかどうかは、厳密には遺伝子の再導入によるレスキュー実験などによって検証される必要があると考えられる。

臨床検体を用いた解析では、WHO の病理学的な悪性度と ZEB1 および ZEB2 の発現レベルが関連し、grade IV の症例で高発現を示す症例の割合が有意に高いことが示されたが、同一 grade 症例における ZEB1 および ZEB2 の発現レベルと治療成績との関連性が検証されれば臨床的な意義がより明確になると期待される。

上皮間葉転換の臨床的な意義については議論があり、グリオーマ細胞の ZEB1 および ZEB2 の抑制によって細胞浸潤性がコントロールされるだけで治療成績の向上が得られるのかどうかには疑問が残る。悪性グリオーマの臨床像には MGMT 遺伝子のメチル化や IDH 遺伝子変異などが関与することが明らかにされている。したがって、今後は ZEB1 および ZEB2 の過剰発現と、MGMT 遺伝子のメチル化や IDH 遺伝子変異などの既知の予後因子との関連性を明らかにすることで、今回の知見の臨床的な意義がより明確になると期待される。悪性グリオーマ症例に対しては、外科的切除に加えて、テモゾロミドの投与および放射線照射が行われている。こうした視点からは、樹立されたノックダウン細胞のテモゾロミドおよび放射線に対する感受性を解析し、ZEB1 および ZEB2 の発現の治療への影響を直接的に検証することは、今後の研究において意義深いと考えられる。

以上のように、本研究では得られた結果の ZEB1 と ZEB2 との特異性にはやや疑念が残るが、悪性グリオーマの臨床的な重要性を鑑みると今後の発展性と臨床的な意義が大いに期待され、学位論文として相応しい内容であると言える。