

氏名（本籍）	宮 居 雅 文	（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第 1148 号	
学位授与日付	令和 3 年 2 月 17 日	
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
学位論文題目	Glucose transporter Glut1 controls diffuse invasion phenotype with perineuronal satellitosis in diffuse glioma microenvironment	
審査委員	（主査）教授	下畑 享良
	（副査）教授	矢部 大介
		教授 山口 瞬

論文内容の要旨

神経膠腫(グリオーマ)は腫瘍周囲の正常組織内へ浸潤する特徴(びまん性浸潤)を示すことが多く、画像での描出が困難で、外科手術で切除しきれないことが予後不良の原因となっている。この浸潤の特徴は、約 80 年前に病理学者シェーラーによって提唱され、「シェーラーの二次構造」として有名である。しかし、この構造の一つである神経周囲浸潤(perineuronal satellitosis: PS)についての機能的なメカニズムはほとんど不明である。それは、PS を組織形態学的に再現することが未だ困難なことが一因である。そこで、本研究では、PS を伴うびまん性浸潤を再現するマウスモデルを作製し、PS のメカニズムを明らかとし、びまん性浸潤に対する新規治療や画像解析を試みた。

【対象と方法】

びまん性浸潤を特徴とする小児びまん性グリオーマにおいて頻出の histone H3K27M 変異を、マウスグリア細胞へ遺伝子導入した。確立できたマウス H3K27M グリア細胞(IG27 細胞)をマウス頭蓋内へ移植し、IG27 グリオーマモデルを作製した。増殖した腫瘍を免疫組織化学、電子顕微鏡を用いて、病理組織学的にびまん性浸潤および PS の再現性を確認した。In vitro 実験で、IG27 細胞と野生型細胞(H3K27M 変異なし)のマイクロアレイ及びメタボローム網羅的解析を行った。見いだされた解糖系代謝異常、関連遺伝子異常について、過剰発現細胞、遺伝子抑制細胞、阻害剤実験を IG27 グリオーマモデルで行った。さらに、代謝変化による画像を鋭敏に捉えるため、dynamic nuclear polarization (DNP)-MRI による撮影とその評価を行った。また、岐阜大学病院で採取されたヒトグリオーマ組織 66 症例を用いて免疫組織化学を行い、その結果と予後との関連を解析した。

【結果】

IG27 細胞の免疫不全マウスへの生着率は 46 例中 46 例(100%)であり、全例で PS の再現を確認できた。腫瘍細胞と神経細胞の接着をより詳細に検証するために、電子顕微鏡を用いて観察したところ、グリオーマの神経周囲浸潤を初めて 3 次元で撮影することに成功した。次に IG27 細胞の性質について in vitro 実験で検証した。IG27 細胞とマウス神経初代細胞の共培養を行いタイムラプス連続撮影を実施したところ、IG27 細胞は野生型細胞と比較して神経細胞と接しつつ周囲を活発に移動し、神経細胞の周囲で増殖することを認めた。続いて IG27 細胞の PS の原因となる遺伝子変動を特定するため、マイクロアレイで網羅的遺伝子解析を行った。IG27 細胞では野生型細胞と比較して腫瘍幹細胞で認める遺伝子群の上昇および解糖系代謝に関わる遺伝子群の上昇を認めた。この結果より IG27 細胞内の解糖系代謝に注目し、116 の標的代謝物をメタボローム解析で定量化したところ、解糖系代謝産物の上昇を認めた。解糖系制御遺伝子群の中で、グルコーストランスポーター1(Glut1)、低酸素誘

導因子(Hif1)など4種類の発現の上昇に注目し、shRNAを用いたノックダウンIG27細胞、発現プラスミドを用いた発現過剰野生型細胞を作製し、マウス脳に移植した。その結果、Glut1抑制IG27細胞は通常IG27細胞と比較し、生着腫瘍細胞数が有意に減少し(p<0.01)、PSの頻度が有意に減少した(p<0.01)。さらに、Glut1発現過剰野生型細胞でPSの再現性を認めた。続いてGlut1阻害薬(BAY-876)の投与実験を行った。IG27細胞移植2週間後より14日間毎日Glut1阻害薬を腹腔内投与し、移植30日後にマウス脳組織を摘出した。阻害薬投与群で、標本1スライス当たりの腫瘍細胞の数、腫瘍面積、PSの頻度が有意に減少した(p<0.01)。次に、IG27グリオーマモデルを用いてDNP-MRIによる画像評価を行った。従来のMRIでは描出できなかったびまん性浸潤の広がり描出ができた。また、ヒトグリオーマ組織66例でGLUT1の発現を免疫組織化学で評価したところ、44例66.7%で陽性となり、多変量解析の結果、GLUT1陽性症例で有意に無増悪生存期間が短縮した(95%CI:1.32-6.45, p=0.008)。

【考察】

本研究で樹立したびまん性浸潤グリオーマモデルの解析結果から、ヒト小児でみられるhistone H3K27M変異びまん性グリオーマは、周囲環境に依存せずhistone H3K27M変異の獲得により、グリア細胞が解糖系優位の代謝変化を起こし、周囲の神経細胞間にびまん性に広がっていくメカニズムを有する可能性が示唆された。また、グリオーマが、実際には低酸素状態に曝されていなくても、周囲の神経細胞と接触し増殖することは、びまん性に浸潤していく点で有利である。このようにグリオーマの予後不良の原因となる神経周囲浸潤のメカニズムの一端が解明され、新たな治療法の可能性が示されたことは有意義である。また、本研究では、代謝を標的とした薬剤投与を併用することで、外科的切除による腫瘍細胞の取り残しを減らし、予後の改善につながる可能性を示した。さらに、新規代謝イメージングにより、びまん性浸潤を明瞭化し、術前だけでなく、治療効果を含めた正確な病勢を把握できる可能性が示唆された。

【結論】

Glut1がH3K27M変異グリオーマの神経周囲浸潤を伴ったびまん性浸潤を制御していることが示された。新規代謝イメージングにより、びまん性浸潤の広がり描出ができた。

論文審査の結果の要旨

申請者 宮居雅文は、マウスH3K27Mグリア細胞(IG27細胞)を樹立し、グリオーマの予後不良の原因となる神経周囲浸潤のメカニズムとして、histone H3K27M変異の獲得によりグリア細胞が解糖系優位の代謝変化を起こすことを明らかにした。本研究の成果は、Glut1によるグリオーマのびまん性浸潤の制御を示唆するものであり、脳神経外科学ならびに腫瘍学の進歩と発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Masafumi Miyai, Tomohiro Kanayama, Fuminori Hyodo, Takamasa Kinoshita, Takuma Ishihara, Hideshi Okada, Hiroki Suzuki, Shigeo Takashima, Zhiliang Wu, Yuichiro Hatano, Yusuke Egashira, Yukiko Enomoto, Noriyuki Nakayama, Akio Soeda, Hirohito Yano, Akihiro Hirata, Masayuki Niwa, Shigeyuki Sugie, Takashi Mori, Yoichi Maekawa, Toru Iwama, Masayuki Matsuo, Akira Hara, and Hiroyuki Tomita :

Glucose transporter Glut1 controls diffuse invasion phenotype with perineuronal satellitosis in diffuse glioma microenvironment

Neuro-Oncology Advances, (in press)