

論 文 要 旨

The Role of Wnt-5a and MMP-2 in Human Glioma

〔ヒトグリオーマにおける Wnt-5a と
MMP-2 の役割の検討〕

神野 真幸

【序論および目的】

Wntはヒトで19種類存在する分泌糖タンパク質ファミリーで、細胞の増殖や分化、運動、運命を決定し、初期発生期から成体の腫瘍形成にわたるまで機能していることが知られている。Wnt-5aは主要な神経性腫瘍のグリオーマにおいて、細胞増殖との関わりが報告されている。しかし、グリオーマの特徴的な病態である浸潤や転移とWntの関わりについては未だに解明されていない。そこで本研究では、グリオーマの病態におけるWntシグナルの生理的な働きを明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

材料は5種類のヒトグリオーマ細胞株 (U87MG、U105、U251) や鹿児島大学病院での症例から得たG5M、G24Mと鹿児島大学脳神経外科で手術を行った33例の患者の組織切片である。

遺伝子発現はreal time RT-PCR法で解析した。組織学的解析はWnt-5a抗体や β -catenin抗体を用いた免疫染色法で、Dvlタンパク質の発現はウエスタンブロット法で解析しました。Wnt-5aのノックダウンはリポフェクタミン2000を用いたdouble strand DNAの導入により行った。細胞の運動はwound healing assay (いわゆるscratch assay) やボイデンチャンバーを用いたmigration assayで解析した。細胞浸潤能はマトリゲルコート済みチャンバーを用いたinvasion assayで解析した。MMP (Matrix metalloproteinase) の酵素活性は酵素電気泳動法 (in-gel-gelatinase assay) で解析した。

【結 果】

5種類のヒトグリオーマ細胞株についてWntファミリー (19種類) とWntの7回膜貫通型受容体であるFrizzledファミリー (10種類) の全てについて、遺伝子発現をreal time RT-PCRで測定し、正常脳組織と比較した。その結果、Wnt-5aやFrizzled-2、-6、-7の発現が全ての細胞株において亢進していた。また、ヒトグリオブラストーマの腫瘍組織では免疫組織染色にてWnt-5aの発現が亢進していたが、大腸癌でしばしば認められる β -cateninの蓄積は認められなかった。U87MGやU105、U251、G24M株でWnt-5a遺伝子のノックダウンを行うと、細胞増殖能は影響を受けなかったが、

wound healing assay や migration assay の結果から細胞運動能の低下が明らかとなり、マトリゲルチャンバーを用いた invasion assay の結果から、細胞浸潤能が低下する事が明らかとなった。また、U251 細胞で Wnt-5a 遺伝子のノックダウンを行うと real time RT-PCR と酵素電気泳動法により MMP-2 の遺伝子発現と酵素活性の低下が認められた。一方、U87MG や U105、U251、G5M、G24M 株を精製 Wnt-5a タンパク質により刺激すると、細胞運動能や浸潤能、MMP-2 発現の上昇が認められた。これらの結果から、Wnt-5a はグリオーマ細胞の細胞運動能や浸潤能、MMP-2 産生を亢進させることが明らかとなった。さらに U251 株を Wnt-5a 蛋白質で刺激した際に認められる浸潤能亢進は、特異的 MMP-2 阻害剤処理によりほぼ完全に消失することから、Wnt-5a 刺激による細胞浸潤能亢進は MMP-2 産生亢進に大きく依存する事が明らかとなった。

【結論及び考察】

近年では、Wnt-5a は、Frizzled-2 や 1 回膜貫通型受容体 Ror2 を介して MMP の発現を促し、前立腺癌や骨肉腫の浸潤を促進することが報告されている (Yamamoto H *et al.*, 2010、Enomoto M *et al.*, 2009)。また、Wnt-5a シグナルは Ror と同様の 1 回膜貫通型受容体である RYK を介して神経軸索の誘導や反発を引き起こすことも報告されており (Li L *et al.*, 2009)、Wnt-5a は多様な受容体を刺激して細胞の反応を調節していることが明らかになりつつある。

その他、Wnt-5a が結合する受容体として報告があるのは、Frizzled-5、-8 と Ror-2 であるが、本研究によりヒトグリオーマ細胞株で Frizzled-2、-6、-7 の発現が高いことが認められている。

これらを総合すると、グリオーマでは Wnt-5a は Frizzled-2 や一回膜貫通型群 (Ror2 や RYK) を介して、今回明らかとなった細胞運動能や MMP-2 の発現の上昇を制御することにより、グリオーマの浸潤・転移に関わっているのではないかと考えられるが詳細は不明であり、病態の解明と治療開発につながる知見を求めて、今後はさらに詳しく Wnt-5a 受容体の同定、MMP-2 発現や細胞運動を制御する細胞内情報伝達機構を解明する必要がある。