

## 論 文 要 旨

Ryk is essential for Wnt-5a-dependent invasiveness  
in human glioma〔 Ryk はヒトグリオーマでの  
Wnt-5a 依存性の細胞浸潤に必須の受容体である 〕

羽生 未佳

## 【序論および目的】

Glioblastoma (GBM)は、中枢神経系腫瘍で最も悪性度が高く、予後不良な疾患で、その最大の特徴は周囲組織への浸潤である。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 (ECM) を分解する Matrix metalloproteinases (MMPs)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 Science 102 巻 540-8 (2011 年)) で、GBM 組織や GBM 由来細胞で、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きた。Wnt は、多様な受容体を介したシグナル伝達により細胞の増殖や発がん、運動、分化など様々な反応を引き起こす分泌性糖蛋白質群である。中でも Wnt-5a はチロシンキナーゼ型 orphan 受容体 2 (Ror2) を介して、腫瘍細胞の運動や浸潤を制御していることが判明している。

Wnt-5a はこの他にも Frizzled (10 種類) や Ror1、Ryk など様々な受容体と結合することや神経線維の進展など多様な作用を示すことが知られているものの、GBM (由来細胞も含め) における Wnt-5a の作用の分子機構は不明であった。

そこで我々は、Wnt-5a がどの受容体を介して、GBM における細胞の運動や浸潤を制御しているのかを解明することを目指した。

## 【材料および方法】

1. GBM 由来細胞株である U251 株 (実験によっては U105 株も併用) を使用して以下の実験を行った。

(1) 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て、各細胞株の MMP-2 mRNA の発現量の変化を解析した。

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

(3) U251 株において、Ryk を siRNA を用いてノックダウンしたうえで、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。

(4) U251 株と U105 株で Wnt-5a、Fz-2、Ror2 や Ryk をそれぞれ siRNA を用いてノックダウンしたうえで、Wnt-5a 存在下または非存在下で、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 抗体でそれぞれ染色し、Fz-2 と Ryk については、その陽性細胞率と WHO Grade との相関を解析した。Glioma は WHO 分類に基づいて悪性度別に分類されており、GBM は Grade4 である。

#### 【結果】

1- (1) 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。

1- (2) 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。

1- (3) 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。

1- (4) U251 と U105 株において、Fz-2 をノックダウンした場合でのみ、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。

2. ヒト glioma 標本を免疫染色した結果、GBM では Wnt-5a や Fz-2、Ryk、MMP-2 抗体での濃染像が認められた。悪性度 (WHO Grading) と、Fz-2、Ryk 発現率 (抗体陽性細胞率) との間には有意な正の相関が認められた。

#### 【結論および考察】

腫瘍細胞の組織への浸潤には、細胞の運動と ECM の分解の両方が必要だと考えられる。Wnt-5a は、腫瘍細胞の組織への浸潤を促進するので、細胞の運動と ECM の分解の両方を促進する。実験 1- (1) ~ (4) の結果より、Fz-2 受容体は Wnt-5a 依存性の細胞運動促進へのシグナルを伝えるが、Wnt-5a 依存性の MMP-2 産生促進には関わらないことと、Ryk 受容体は Wnt-5a 依存性の細胞運動促進へのシグナルには関与しないが、Wnt-5a 依存性の MMP-2 産生促進へのシグナル (ECM の分解につながる) は必須であった。

したがって、GBM での 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。多くの腫瘍では Wnt-5a は Ror2 を介したシグナルにより MMP の発現と細胞浸潤を起こすことが報告されていることを鑑みると、本研究で見出された GBM での Wnt-5a から Ryk 受容体を介して MMP-2 へのシグナルは、これまで不明だった Ryk 受容体の細胞内での新しい機能であり、GBM に特異性が高い可能性がある。

また、Glioma のグレードと Fz-2 および Ryk の陽性率の間には正の相関が認められた。

これらのことを総合すると、Fz-2 や Ryk をターゲットとした創薬により、「浸潤を抑制する」という戦略の新しい glioma の治療を開発できる可能性があると考えられる。