

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19073

研究課題名(和文) グリオーマ発生初期の浸潤部位におけるガングリオシドの機能と作用機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of gangliosides in invasion front in early stage glioma

研究代表者

大川 祐樹 (OHKAWA, Yuki)

中部大学・生命健康科学部・研究員

研究者番号：40723896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：酸性スフィンゴ糖脂質ガングリオシドGD3/GD2は正常脳組織にはほとんど発現しておらず、グリオーマ(脳腫瘍)特異的に強く発現している。本研究では、グリオーマモデルマウスを用いて、グリオーマ発生初期の腫瘍細胞浸潤領域におけるガングリオシドの機能解明を目指した。結果よりガングリオシドGD3/GD2の発現が、転写因子Ap2を介して細胞外マトリックス分解酵素Mmp9の発現を誘導し、細胞浸潤能を亢進していることを明らかにした。この結果よりガングリオシドGD3/GD2を標的にした新規治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Acidic glycosphingolipids, ganglioside GD3 and GD2 are expressed in gliomas strongly, while expression levels of them in normal brain tissues are minimal. In this study, we tried to clarify functions of GD3 and GD2 in invasion front in early stage of gliomas using gene-engineered murine glioma model. Results indicated that GD3 and GD2 enhanced invasion activity by inducing over-expression of matrix metalloproteinase, Mmp9 via activation of a transcriptional factor Ap2. These data suggest advantages to establish GD3- or GD2-targeted therapies for glioma patients.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：ガングリオシド グリオーマ マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

酸性スフィンゴ糖脂質ガングリオシド GD3 および GD2 はヒト悪性グリオーマ組織において特異的に強く発現しているが、その機能は明らかになっていなかった。研究代表者は以前、RCAS/Gtv-a システムを用いたマウスモデルにて、マウスグリオーマ細胞に発現する GD3 が血小板由来成長因子受容体 PDGFR α と Yes kinase の複合体形成を促進し、腫瘍悪性度を増強することを明らかにした。さらに、グリオーマ組織における GD3 の発現パターンを時空間的に解析したところ、腫瘍発生後期では腫瘍組織一様に GD3 の発現が観察されたが、一方、腫瘍発生初期においては、腫瘍の辺縁部位のみに GD3 の発現が観察された。このことは、腫瘍発生初期において GD3 の発現が腫瘍の浸潤・進展に強く関与することを示唆していた。

2. 研究の目的

グリオーマ進展における GD3 の機能を明らかにする。特に腫瘍浸潤能を亢進する GD3 の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

RCAS/Gtv-a システムを用いたマウスモデルで作出したグリオーマについて、GD3 の機能解析を行う。RCAS は Replication - Competent Avian leukemia virus Splice acceptor の略でラウスサルコーマウイルス由来のトリレトロウイルスベクターである。血小板由来成長因子 PDGFB cDNA を組み込んだ RCAS とその受容体である tv-a を glial fibrillary acidic protein (GFAP) プロモーターで発現するトランスジェニックマウス (Gtv-a) と組み合わせることによって、アストロサイト系列細胞由来のグリオーマを発生させることができる。

(1) グリオーマ発生および進展における GD3 の関与を明らかにするために、GD3 合成酵素遺伝子欠損マウスと Gtv-a マウスを交配させた GD3 合成酵素遺伝子欠損グリオーマモデル (GD3S-KO) マウスにおける腫瘍悪性度を GD3 合成酵素遺伝子野生型グリオーマモデル (GD3S-WT) マウスと比較する。

(2) GD3S-KO マウスおよび GD3S-WT マウスで作出したグリオーマ組織における遺伝子発現パターンを、DNA マイクロアレイで網羅的に解析する。結果より、腫瘍浸潤能に寄与すると推測される候補遺伝子群を同定する。

(3) GD3 の発現と上記遺伝子群の発現の相関を、初代培養グリオーマ細胞を用いて再解析する。GD3S-KO マウスおよび GD3S-WT マウスで作出したグリオーマ由来初代培養細胞、また GD3S-KO マウス由来初代培養細胞に GD3 合成酵素遺伝子 cDNA を遺伝子導入した細胞 (KO-GD3S) を解析する。

(4) 同定遺伝子群の転写調節に寄与する転写因子を同定し、グリオーマにおける GD3 発現と転写因子活性の関係性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) PDGFB cDNA を RCAS を用いてマウス右脳大脳皮質に遺伝子導入し、経過を観察したところ、GD3S-KO マウスでは GD3S-WT マウスと比較し、腫瘍進展の遅延、病理学的解析による腫瘍悪性度の低下(図 1)、および個体寿命の延長が観察された(図 2)。

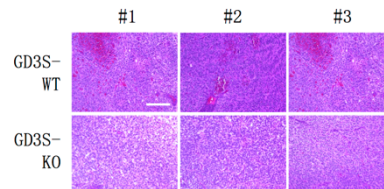


図1. GD3S-KOマウスにおける腫瘍悪性度の低下。GD3S-KOおよびGD3S-WTマウスにPDGFB cDNAを遺伝子導入後2週間後のグリオーマ組織のHE染色像。GD3S-KOマウスについてはOligodendrocytoma (gradeIII)-likeの所見が、GD3S-WTマウスについてはGlioblastoma multiforme(GradeIV)-likeの所見が観察された。Bar, 200 μ m.

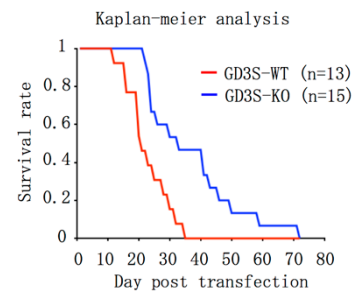


図2. GD3S-KOマウスにおける寿命の延長。GD3S-KOマウスについては15匹を、GD3S-WTマウスについては13匹を解析した。

(2) GD3S-KO および GD3S-WT マウス由来グリオーマ組織の DNA マイクロアレイ解析の結果、GD3S-KO マウス由来グリオーマでは、GD3S-WT マウス由来グリオーマと比較し、Cyclin 関連遺伝子群、Matrix metalloproteinase (Mmp) family 遺伝子群の顕著な低発現を明らかにした。

(3) 腫瘍浸潤能の亢進に対する GD3 の機能を明らかにするために、Mmp family 遺伝子群に注目して解析を進めた。上述の 3 種の初代培養グリオーマ細胞 (GD3S-KO, GD3S-WT および KO-GD3S) における Mmp family 遺伝子群の発現を qRT-PCR 法で解析したところ、Mmp9、Mmp12 の発現が GD3S 合成酵素遺伝子の発現パターンと正の相関を示していた(図 3)。また GD3S-KO マウス由来グリオーマ組織においては、Mmp3、Mmp9、Mmp10、Mmp13、Mmp15 および Mmp25 の発現が顕著に低発現であった(図 4)。これら結果より、Mmp9 がグリオーマにおいて GD3 の発現特異的に発現誘導される遺伝子であると結論した。

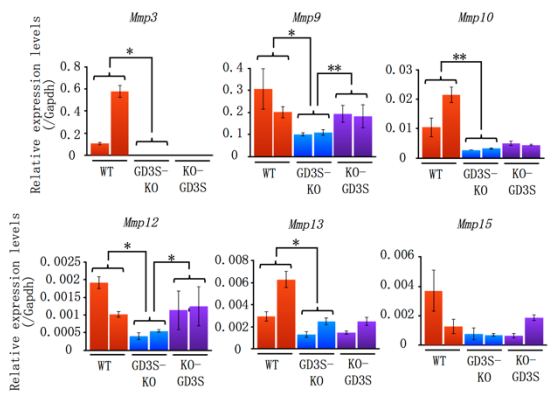


図3. 初代培養グリオーマ細胞におけるMmp family 遺伝子群の発現。Mmp family 遺伝子群の発現レベルをqRT-PCRにて解析した。発現レベルはGapdh遺伝子発現レベルで補正した。各種細胞群は独立して調整した2群ずつを解析した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

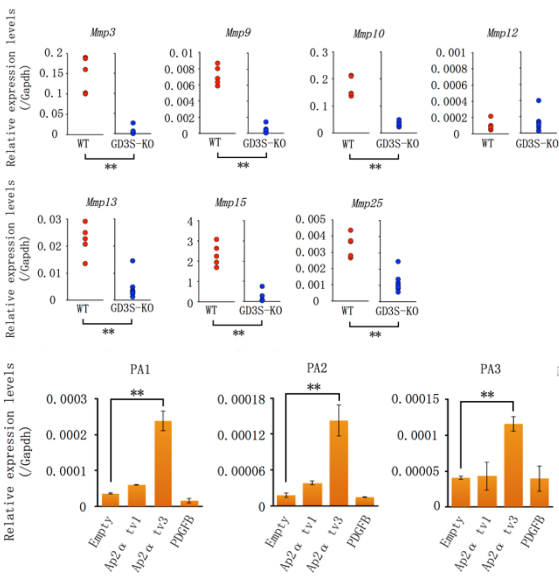


図5. Ap2 α 強制発現後の初代培養アストロサイトにおけるMmp9遺伝子の発現レベル。初代培養アストロサイト (PA1, PA2およびPA3) にAp2 α -tv1 cDNA, Ap2 α -tv3 cDNAおよびempty vector, PDGFB cDNAを強制発現させた後のMmp9遺伝子の発現レベルをqRT-PCR法で解析した。発現レベルはGapdh遺伝子で補正した。** $P < 0.01$ 。

(4) 文献検索およびGD3発現初代培養アストロサイトを用いたqRT-PCR解析より、Mmp9の発現調節分子の候補として、転写因子Ap2 α を同定した。Ap2 α のtranscript variant 1(tv1)と3(tv3)について解析したところ、特にAp2 α tv3を初代培養アストロサイトに強制発現させるとMmp9遺伝子の発現誘導が観察された(図5)。またChIP-PCR法にてAp2 α のMmp9プロモーター領域への結合、またルシフェラーゼレポーターアッセイによりAp2 α のMmp9遺伝子転写活性を証明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

① Ohkawa Y., Momota H., Kato A., Hashimoto N., Tsuda Y., Kotani N., Honke K., Suzumura A., Furukawa A., Ohmi Y., Natsume A., Wakabayashi T. and Furukawa K.
Ganglioside GD3 enhances invasiveness of gliomas by forming a complex with

platelet-derived growth factor receptor α and Yes kinase.
The Journal of Biological Chemistry
290(26)、2015年、査読有り
DOI:10.1074/jbc.M114.635755

[学会発表] (計6件)

① Ohkawa Y., Noda S., Momota H., et al.
Identificatin of GD3-regulated genes in GD3-expressing gliomas.
第75回 日本癌学会学術総会
2016年10月6日
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

② 大川 祐樹, 百田 洋之, 加藤 彰, その他
グリオーマにおいてガングリオシドGD3はPDGFR α の発現を誘導する。
第35回 日本糖質学会年会
2016年9月2日
文化プラザ かるぽーと (高知県・高知市)

③ Ohkawa Y., Momota H., Kato A., et al.
Loss of b-series gangliosides attenuates glioma development and expansion.
The 3rd International Symposium on Glyco-Neuroscience
2016年1月14日
淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県・淡路市)

④ Ohkawa Y., Momota H., Kato A., et al.
Expression of ganglioside GD3 promotes development and expansion of gliomas in glioma model mice.
第74回 日本癌学会学術総会
2015年10月10日
名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

⑤ Ohkawa Y., Momota H., Kato A., et al.
Ganglioside GD3 promotes development and invasion of gliomas.
第34回 日本糖質学会年会
2015年8月1日
東京大学安田講堂 (東京都・文京区)

⑥ Ohkawa Y., Ohkochi T., Esaki N., et al.
Analysis of mechanisms for induction of GD3 in astrocytes and glioma cells.
平成27年度 神経糖鎖生物学 夏の班会議
2015年6月25日
とりぎん文化会館 (鳥取県・鳥取市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
大川 祐樹 (OHKAWA, Yuki)
中部大学・生命健康科学部・研究員
研究者番号: 40723896

(2) 連携研究者

古川 鋼一 (FURUKAWA, Koichi)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号：80211530

百田 洋之 (MOMOTA, Hiroyuki)
東京大学・医科学研究所・講師
研究者番号：60469971

夏目 敦至 (NATSUME, Atsushi)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：30362255

若林 俊彦 (WAKABAYASHI, Toshihiko)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：50220835

(3) 研究協力者

加藤 彰 (KATO, Akira)
名古屋大学・医学系研究科・研究員

橋本 登 (HASHIMOTO, Noboru)
徳島大学・医歯薬学研究部・助教

大海 雄介 (OHMI, Yuhsuke)
中部大学・生命健康科学部・助手