

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20970

研究課題名(和文)低酸素応答分子Tetを介する癌微小環境構築機構の解明とその制御

研究課題名(英文)Elucidation of the role of oxygen-dependent dioxygenases on the development of tumor microenvironments

研究代表者

梶 康一 (Tabu, Kouichi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：10466469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は癌進展に寄与する微小環境の発生機構の解明を目的として実施され、以下の成果を得た。(1)鉄欠乏環境下において神経膠腫(グリオーマ)細胞中の一部の亜集団が鉄リサイクル能を有するマクロファージ(M₂)を誘導することが明らかとなり、微小環境の形成にグリオーマ細胞自身のストレス応答が密接に関与している可能性が示唆された。(2)このM₂誘導にはグリオーマ細胞における単球動員因子CCL2、およびM₂分化誘導因子GM-CSFのエピジェネティックな遺伝子発現制御が関与していることが示唆された。これらは微小環境構築を標的とした新たな癌治療戦略の確立へと展開の期待できる有益な成果と考える。

研究成果の概要(英文)：This study has been carried out with the aim of elucidating the mechanisms how tumor microenvironments are developed during tumor progression. We have revealed that a subpopulation of glioma cells induces macrophages expressing iron-recycling genes under the iron-deficient stress, which suggests that stress response by tumor cells plays important roles in the development of tumor microenvironments. We also found that the induction of macrophages is potentially mediated by the epigenetic upregulation of CCL2 and GM-CSF genes in tumor cells. Our findings could help establish new strategies for cancer therapy targeting microenvironments.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌 微小環境 マクロファージ 鉄 ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌進展に重要な役割を果たす癌微小環境は血管構成細胞や免疫担当細胞など様々な種類の細胞から構成されているが、それら微小環境の発生する仕組みについては十分に解明されていなかった。

(2) 腫瘍内に新生する血管内皮細胞の一部が癌細胞自身の分化した細胞に由来することや、腫瘍内に浸潤している骨髄由来の単球・マクロファージ (Mφ) が癌細胞自身によって誘導されていることが知られていたが、どのような仕組みで癌細胞による微小環境形成が惹き起こされるかについては明らかにされていなかった。

(3) 腫瘍組織中には低酸素・低栄養など癌細胞自身の増殖に伴う様々な環境ストレスが存在し、癌細胞はそれらを克服しながら癌進展に寄与している。例えば血管新生は低酸素ストレスに対する癌の適応病態の一つとして捉えることができるが、微小環境の発生と癌細胞のストレス応答との因果関係は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究は微小環境の発生が環境ストレスに対する癌の適応病態であるとの仮説の下、癌細胞による微小環境形成機構の解明を目的として実施された。特に未解明の部分が多く残されている腫瘍随伴 Mφ の発生について、癌細胞による腫瘍内への単球動員と Mφ への分化誘導を惹き起こす環境ストレスの同定を行った。さらに微小環境形成を標的とする治療戦略の分子細胞基盤の確立へ向けて、ストレス応答を担う細胞画分の単離とストレスセンサー分子の同定を目指した研究を展開した。

3. 研究の方法

(1) ラット神経膠腫 (グリオーマ) 細胞株 C6 を低酸素 [1%O₂ 培養]、低血清 [無血清培地]、低 pH [pH6.5 調整培地]、低グルコース [透析血清培地]、酸化ストレス [H₂O₂ 添加培地]、および鉄欠乏 [鉄キレート剤 deferoxamine (DFO) 添加培地] などのストレス環境存在下で培養し、リアルタイム PCR による単球動員関連因子および Mφ 分化関連因子の発現解析を行って、Mφ 誘導に関わるストレス因子を探索した。

(2) C6 細胞を免疫不全 (NOD/SCID) マウスの大脳線条体に移植して形成したグリオーマ組織における 3 価鉄 (貯蔵鉄) の局在を、既知の腫瘍随伴 Mφ マーカー CD204 に対する免疫組織化学染色と Prussian blue 染色によって検証した。

(3) C6 細胞の培養上清を用いて骨髄単球より誘導した Mφ における鉄放出分子

ferroportin (FPN) と鉄貯蔵分子 ferritin (FTN) の遺伝子発現を解析した。また、グリオーマ患者の遺伝子発現データベース解析ツール GlioVis (文献①) を用いて、FPN および FTN の CD204 との 2 遺伝子間発現相関や予後との相関を解析した。

(4) 鉄欠乏環境下の C6 細胞における CCL2 蛋白質の発現を intracellular FACS 法により 1 細胞レベルで解析した。

(5) CCL2 陽性画分、すなわち微小環境形成細胞を分離するため、GlioVis 解析ツールを用いて CCL2 や CD204 遺伝子と幾つかのグリオーマ関連細胞表面分子との 2 遺伝子間発現相関を解析した。

(6) C6 細胞を DNA メチル化阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC)、およびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 valproic acid (VPA) で処理し、CCL2 および GM-CSF の発現におけるエピジェネティック制御の関与を検証した。

4. 研究成果

(1) 鉄欠乏環境下のグリオーマ細胞における CCL2 および GM-CSF 遺伝子の発現上昇：癌細胞による Mφ 誘導における環境ストレスの関与を検証するため、始めに C6 細胞を低酸素 (1%O₂) 環境下で培養し、単球動員因子 CCL2・CXCL12、および Mφ 分化誘導因子 MCSF・GM-CSF の遺伝子発現変化を解析したところ、GM-CSF の発現が通常酸素 (21%O₂) 下と比較して 2.0 倍上昇したものの顕著な変化は見られなかった。そこで低血清・低 pH・低グルコース・酸化ストレス・鉄欠乏など、低酸素以外のストレスの影響についても検証したところ、鉄キレート剤 DFO の添加によって CCL2 遺伝子の発現が 13.1±2.8 倍、GM-CSF の発現が 17.2±7.8 倍と顕著に亢進することが明らかとなった。この DFO 添加による CCL2 と GM-CSF 遺伝子の発現上昇は硝酸鉄 (III) の同時添加によって低下したことから、細胞外 3 価鉄の欠乏がグリオーマ細胞による単球・Mφ の誘導に関与していることが示唆された。

(2) グリオーマ組織中の CD204 陽性 Mφ における鉄の蓄積：腫瘍組織内での鉄の供給源を明らかにするため、マウス移植グリオーマ組織を用いて Prussian blue 染色を行ったところ、主に壊死 (ネクローシス) 部と腫瘍の辺縁部、および出血部位において CD204 陽性の Mφ 中に 3 価鉄の蓄積が観察され (図 1)、腫瘍組織内で CD204 陽性の Mφ が鉄の貯蔵庫として機能していることが示唆された。

(3) グリオーマ細胞により誘導される Mφ における鉄リサイクリング遺伝子の発現：癌細胞によって誘導された Mφ の鉄リサイクリング能を検証するため、マウス骨髄由来単球か

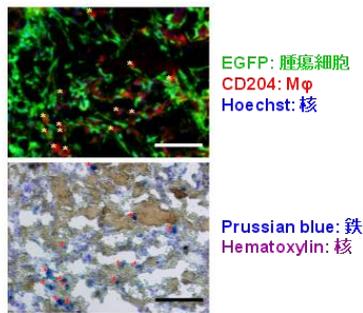


図1 C6グリオーマ組織中のCD204陽性Mφ(上段*)における鉄の蓄積(下段*)。scale bar=400 μm。

ら C6 細胞の培養上清 (馴化培地) を用いて誘導した CD204 陽性 Mφ を用いて、分化に伴う鉄放出分子 FPN および鉄貯蔵関連分子 FTH1・FTL の遺伝子発現変化を確認したところ、単球と比較して馴化培地誘導 Mφ では FPN の発現が 9.6 ± 6.9 倍に、FTH1 と FTL の発現がそれぞれ 3.7 ± 2.6 倍と 1.5 ± 1.1 倍に上昇していることが明らかとなり、癌細胞により誘導される Mφ が鉄リサイクル能を有していることが示唆された。さらにグリオーマ患者の遺伝子発現データベース REMBRANDT の Gliovis 解析から、グリオブラストーマ患者 (WHO グレード IV) において CD204 と FPN の発現が相関することや、アストロサイトーマ (WHO グレード II/III) 患者 104 症例のうち FPN の発現が比較的高いグループで予後が悪いことが明らかとなり (図 2)、Mφ による鉄供給がグリオーマの悪性化に関与している

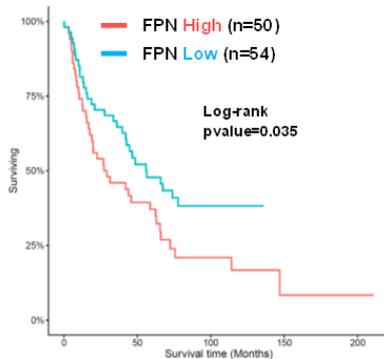


図2 FPN遺伝子の発現とアストロサイトーマ患者の予後との関係。可能性が示唆された。

(4) グリオーマ細胞において Mφ 誘導を担う亜集団：癌細胞がストレス応答性に微小環境を形成する分子機構を明らかにするため、始めに鉄欠乏環境下の C6 細胞における CCL2 蛋白質の発現を intracellular FACS 法により検証したところ、1 細胞あたりの発現レベルに大きな変化はなかったものの、CCL2 陽性細胞の割合が通常環境下と比較して有意に増加しており、鉄欠乏環境下では単球動員を担う細胞集団が優先的に出現することが明らかとなった。

(5) グリオーマ患者において CCL2 と発現相関を示す分子の同定：鉄欠乏応答性の細胞画分の分離を行うため、REMBRANDT データベースの Gliovis 解析によりグリオブラストーマ

患者における CCL2 あるいは CD204 遺伝子と他の遺伝子との 2 遺伝子間発現相関を調べたところ、既報のグリオーマ関連の細胞表面分子の中から CD44 および CXCR4 分子が抽出された。ゲノム編集で CCL2 遺伝子座にレポーター分子をノックインした可視化細胞の樹立も試みており、今後鉄欠乏応答性 Mφ 誘導細胞の性状解析へと展開が可能になると考える。

(6) CCL2 および GMCSF 遺伝子の発現におけるエピジェネティック制御の関与：C6 細胞を DNA メチル化阻害剤 5-Aza-dC およびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 VPA で処理したところ、鉄欠乏応答分子 CCL2 および GMCSF の発現が 10.1 ± 2.9 倍および 11.1 ± 1.0 倍に上昇することが明らかとなり、癌細胞の鉄欠乏応答にエピジェネティック制御が関与している可能性が示唆された。鉄要求性エピジェネティック因子として DNA 脱メチル化酵素 Tet ファミリーやヒストン脱メチル化酵素 Jmjc ファミリーなどが知られているが、CCL2 および GMCSF 遺伝子のプロモーター領域には CpG アイランドが存在しないことから、鉄欠乏応答による CCL2・GMCSF 遺伝子の発現上昇にはヒストンメチル化の関与が示唆される。

本研究は当初予定していた低酸素ストレス下で Mφ 関連遺伝子の発現に顕著な変化が見られなかったことから、新たなストレス要因の探索を行い、鉄欠乏ストレスの関与を見出した。鉄欠乏に応答した癌細胞は単球動員因子 CCL2 および Mφ 誘導因子 GMCSF の発現を介して Mφ を腫瘍内へと誘導し鉄を補給していると考えられる。今後ヒストン脱メチル化酵素を始めとするストレスセンサー分子を同定することで、微小環境の発生を標的とした新たな癌治療戦略の確立を期待できる。

<引用文献>

①Bowman R. et al. Gliovis data portal for visualization and analysis of brain tumor expression datasets. Neuro-Oncology, Vol. 19, No. 1, 2017, pp139-141.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

①Wang W, Tabu K, Hagiya Y, Sugiyama Y, Kokubu Y, Murota Y, Ogura SI and Taga T. Enhancement of 5-aminolevulinic acid-based fluorescence detection of side population-defined glioma stem cells by iron chelation. Scientific Reports, 査読有, Vol. 7, 2017, p42070. DOI: 10.1038/srep42070

- ②Murota Y, Tabu K and Taga T. Requirement of ABC transporter inhibition and Hoechst 33342 dye deprivation for the assessment of side population-defined C6 glioma stem cell metabolism using fluorescent probes. *BMC Cancer*, 査読有, Vol.16, No.1, 2016, p847.
DOI: 10.1186/s12885-016-2895-8
- ③Tabu K, Muramatsu N, Mangani C, Wu M, Zhang R, Kimura T, Terashima K, Bizen N, Kimura R, Wang W, Murota Y, Kokubu Y, Nobuhisa I, Kagawa T, Kitabayashi I, Bradley M and Taga T. A synthetic polymer scaffold reveals the self-maintenance strategies of rat glioma stem cells by organization of the advantageous niche. *Stem Cells*, 査読有, Vol.34, No.5, 2016, pp1151-1162.
DOI: 10.1002/stem.2299
- ④Kokubu Y, Tabu K, Muramatsu N, Wang W, Murota Y, Nobuhisa I, Jinushi M and Taga T. Induction of protumoral CD11c(high) macrophages by glioma cancer stem cells through GM-CSF. *Genes to Cells*, 査読有, Vol.21, No.3, 2016, pp241-251.
DOI: 10.1111/gtc.12333
- ⑤Inagaki T, Kusunoki S, Tabu K, Okabe H, Yamada I, Taga T, Matsumoto A, Makino S, Takeda S and Kato K. Up-regulation of lymphocyte antigen 6 complex expression in side-population cells derived from a human trophoblast cell line HTR-8/SVneo. *Human Cell*, 査読有, Vol.29, No.1, 2016, pp10-21.
DOI: 10.1007/s13577-015-0121-7
- ⑥Kimura T, Wang L, Tabu K, Tsuda M, Tanino M, Maekawa A, Nishihara H, Hiraga H, Taga T, Oda Y and Tanaka S. Identification and analysis of CXCR4-positive synovial sarcoma-initiating cells. *Oncogene*, 査読有, Vol.35, No.30, 2016, pp3932-3943.
DOI: 10.1038/onc.2015.461

[学会発表] (計 9件)

- ①Tabu K and Taga T. Self-maintenance strategies of glioma stem cells (GSCs) involving GSC-induced protumoral macrophages. 第11回研究所ネットワーク国際シンポジウム 2017年1月26日～2017年1月27日 徳島大学 徳島県徳島市
- ②Tabu K, Wang W, Murota Y and Taga T. Adaptive response of C6 glioma stem cells to iron deprivation through macrophage induction. 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月6日～2016年10

- 月8日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市
- ③Wang W, Tabu K, Hagiya Y, Murota Y, Ogura SI and Taga T. Enhancement of 5-aminolevulinic acid-based fluorescence detection of glioma stem cells by chelating iron. 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月6日～2016年10月8日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市
- ④Tabu K, Kokubu Y, Muramatsu N, Nomoto S, Wang W and Taga T. Adaptive response of rat C6 glioma stem cells to iron deprivation by which the development of tumor infiltrating macrophages is induced. 第14回幹細胞シンポジウム 2016年5月20日～2016年5月21日 淡路夢舞台国際会議場 兵庫県淡路市
- ⑤Wang W, Tabu K, Sugiyama Y, Hagiya Y, Ogura SI and Taga T. Resistance of glioma stem cells to 5-aminolevulinic acid (ALA)-based detection due to enhanced metabolic conversion of protoporphyrin IX. 第14回幹細胞シンポジウム 2016年5月20日～2016年5月21日 淡路夢舞台国際会議場 兵庫県淡路市
- ⑥Murota Y, Tabu K and Taga T. C6 glioma stem cell-derived extracellular vesicles promote the development of macrophages. 第14回幹細胞シンポジウム 2016年5月20日～2016年5月21日 淡路夢舞台国際会議場 兵庫県淡路市
- ⑦Tabu K, Muramatsu N, Taga T. Synthetic polymer-based approach revealed an adaptive capacity of glioma stem cells by inducing tumor-infiltrating and iron-accumulating macrophages. 第38回日本分子生物学会年会 2015年12月1日～2015年12月4日 神戸ポートアイランド 兵庫県神戸市
- ⑧Wang W, Tabu K, Kokubu Y, Hagiya Y, Ogura SI and Taga T. Splenic abnormal erythropoiesis in C6 glioma-bearing mice: an implication for their environment of cancer stem cells. 第74回日本癌学会学術集会 2015年10月8日～2015年10月10日 名古屋国際会議場 愛知県名古屋市
- ⑨Taga T and Tabu K. Characterization of C6 glioma cancer stem cells and their niche. Seoul National University, Cancer Research Institute (SNUCRI) Annual Symposium 2015 'Innovative Approaches to Explore Novel Druggable Targets' 2015年4月1日～2015年4月4日 Hwasun Kumho Resort, Hwasun Korea

[図書] (計 1件)

- ①榎 康一 他、日本バイオマテリアル学会誌、合成ポリマーを用いた癌幹細胞ニッチの特性解明 (バイオマテリアル-生体材料-)、

2017、82.

[その他]

東京医科歯科大学プレスリリース

<http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20160129.pdf>

http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20170207_1.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎 康一 (TABU, Kouichi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：10466469

(2) 研究協力者

田賀 哲也 (TAGA, Tetsuya)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：40192629

木村 太一 (KIMURA, Taichi)

北海道大学・医学研究科・特任助教

研究者番号：90435959