

令和元年6月20日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16636

研究課題名(和文) 膠芽腫細胞株におけるEphB4受容体のシグナル解析及び前臨床試験

研究課題名(英文) Activation of Ligand-dependent EphB4 signal in glioma cells

研究代表者

河原 庸介 (Kawahara, Yosuke)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：80646688

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)：膠芽腫細胞株及び膠芽腫幹細胞株においてEphB4シグナルは遊走能、浸潤能を有意に抑制した。細胞表現型の変化とAktリン酸化に相関関係を認めた。EphB4は腫瘍内部でのみ確認され浸潤膠芽腫細胞では確認できなかった。これより腫瘍細胞密度の高い腫瘍内部ではephrin-B2によるEphB4シグナルがAktの脱リン酸化を介してグリオーマ細胞の遊走能、浸潤能を抑制することが示唆された。一方、腫瘍と正常脳の境界ではEphB4による細胞停留シグナルが解除されると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EphB4シグナルが腫瘍中心部で腫瘍細胞の浸潤能を抑制することを明らかにした。腫瘍浸潤部ではこのシグナルから解放され、腫瘍細胞が周囲へと浸潤することを促進している可能性がある。この機構を利用し、EphB4を標的とした膠芽腫治法開発へとつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：EphB4 was highly expressed in glioma cell lines and glioma stem cell lines. EphB4 phosphorylation by ephrin-B2 suppressed migration and invasion and downregulation of EphB4 using small interfering RNA negated the suppression of migration and invasion induced by ephrin-B2. Stimulation of glioma cells with ephrin-B2 reduced the phosphorylated Akt levels dose dependently, which was abrogated by siRNA for EphB4. EphB4-positive cells existed only at the tumor core, whereas Ephrin-B2-positive cells existed both at invasive area and the tumor core. Ligand dependent EphB4 signaling plays a role as “stay there” signaling. Extinction of its signaling promotes the release of tumor cell on its location.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：EphB4 膠芽腫 ephrin-B2 invasion

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は原発性脳腫瘍の中で最も悪性である。摘出術、放射線、化学療法を駆使しても生存期間は 18 か月と短く、新たな治療法の確立は重要な課題である。膠芽腫細胞の特性はその高い遊走性、浸潤性、増殖性にある。それら細胞特性が変化する要因として細胞間接触、細胞運動性、微小環境作用などがあげられる。

細胞間接触によりシグナル伝達を惹起する Eph 受容体は細胞増殖、分化、アポトーシス、血管新生など様々な機能を制御する。種々の悪性腫瘍で高発現し、腫瘍増大、転移、血管新生などに関与している。Eph 受容体のうち、特に EphB4 受容体は様々な悪性腫瘍で高発現しており、治療標的として注目されつつある。しかしながら EphB4 受容体の機能解明は途上であり、膠芽腫での報告はほとんどない。

2. 研究の目的

膠芽腫における EphB4 の作用機序、作用部位を解明するとともに抗腫瘍効果を引き起こすシグナルを見出し、動物実験を行うことによって膠芽腫に対する新たな分子標的療法の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 膠芽腫細胞株 (T98, U87, A138, A172, SNB19) における EphB4 発現とリン酸化を western blotting と免疫沈降法で確認する。

(2) EphB4 シグナルによる細胞特性変化を解析する。遊走能は scratch migration assay と transwell migration assay で評価する。浸潤能は transwell invasion assay、増殖能は AlamarBlue を用いた proliferation assay にて評価する。siRNA による EphB4 の knockdown に伴う形質の変化も評価する。

(3) 細胞特性変化に関連するシグナル経路を探索する。

(4) 膠芽腫幹細胞株 2 種類 (KGS01, 06) を用いて EphB4 シグナルによる細胞特性変化評価を行う。

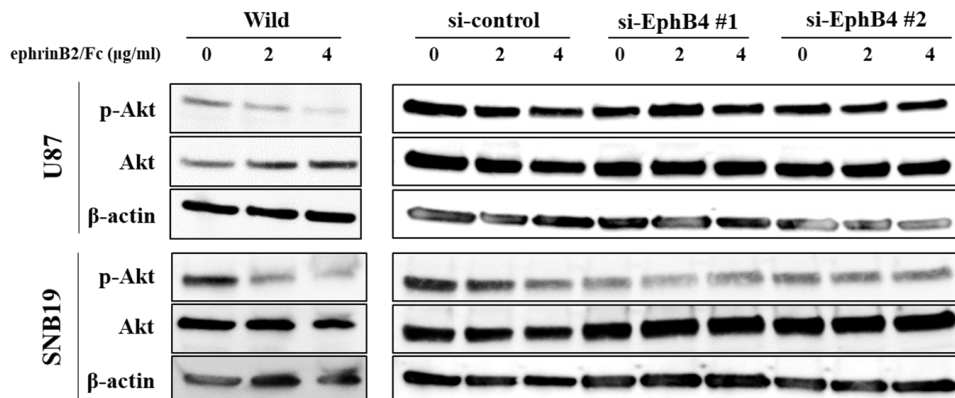
(5) 当施設で樹立した膠芽腫幹細胞株をマウスに植え込んだのち 60 日後に摘出した標本膠芽腫摘出検体およびヒト摘出検体を免疫染色し EphB4、ephrin-B2 の腫瘍組織内局在を評価する。

4. 研究成果

(1) U87 及び SNB19 にて EphB4 が高発現していた。またリガンドである ephrin-B2/Fc chimera にて EphB4 がリン酸化することが確認された。

(2) EphB4 リン酸化シグナルにより、遊走能、浸潤能は抑制された。増殖能は変化しなかった。EphB4 を knockdown すると遊走能、浸潤能の抑制はキャンセルされた。

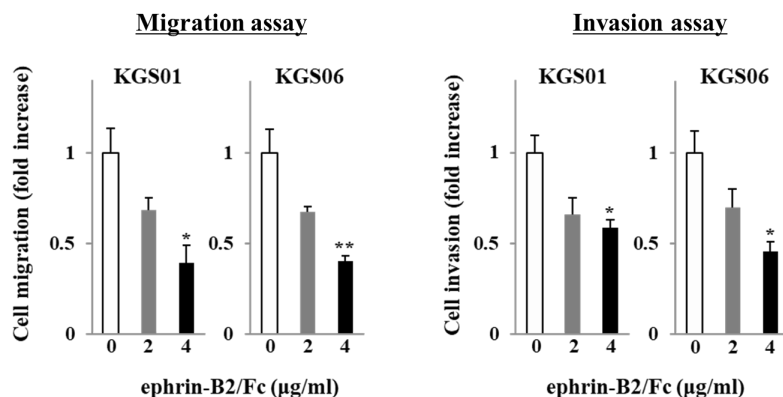
(3) ephrin-B2 濃度依存性にリン酸化 Akt 発現量が減少しているのが確認された。一方 EphB knockdown 細胞では ephrin-B2 によるリン酸化 Akt の変化は認めなかった。



Ligand-dependent EphB4 signaling by ephrin-B2/Fc blocked Akt signaling

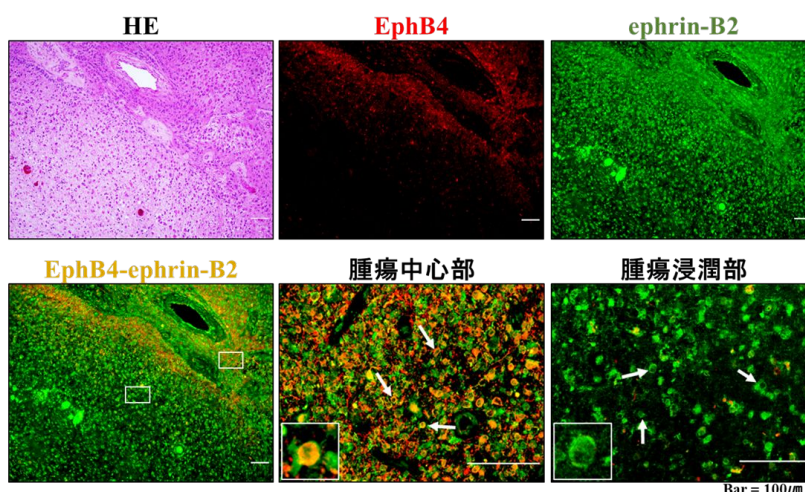
We found that ephrin-B2/Fc inhibited p-Akt levels in the U87 and SNB19 cells in a concentration-dependent manner (left). The si-control-treated U87 and SNB19 cells demonstrated a similar concentration-dependent tendency for lower p-Akt levels after ephrin-B2/Fc treatment. In contrast, the p-Akt levels were not altered by ephrin-B2/Fc in the si-EphB4 #1- and #2-transfected cells..

(4) 膠芽腫幹細胞株においても ephrin-B2 による刺激は遊走能・浸潤能を抑制した。



The results of experiments using glioma stem-like cell lines, KGS01 and KGS06
Cell migration and invasion were inhibited in a concentration-dependent manner by ephrin-B2/Fc.

(5) マウス摘出検体およびヒト摘出検体ともに、腫瘍中心部では EphB4, ephrin-B2 共発現を認める一方、腫瘍浸潤部では EphB4 の発現は認めなかった。



Immunofluorescent staining of gliomas with antibodies against EphB4 and ephrin-B2
The upper right region of each image shows the tumor core. The lower left area shows the invasion area.

上記より ephrin-B2 依存性 EphB4 シグナルは、遊走能・浸潤能を抑制する停留シグナルであり、浸潤領域での停留シグナルの解除が腫瘍細胞の周囲組織への浸潤を促進すると考えられた。ephrin-B2 による EphB4 リン酸化シグナルは癌腫によって作用が異なることが言われている。膠芽腫細胞および膠芽腫幹細胞においてリガンドである ephrin-B2 にて遊走能、浸潤能が低下することを示したのは本研究が初めてである。EphB4 シグナルを標的とした治療が膠芽腫に対して有効である可能性が高く、今後動物実験などを通して臨床応用への足掛かりを構築していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kawahara Y, Furuta T, Sabit H, Tamai S, Dong Y, Jiapaer S, Zhang J, Zhang G, Oishi M, Miyashita K, Hayashi Y, Nakada M: Ligand-dependent EphB4 activation serves as an anchoring signal in glioma cells. *Cancer Lett.* 2019 May 1;449:56-65. 査読あり
doi: 10.1016/j.canlet.2019.02.021. Epub 2019 Feb 15

〔学会発表〕(計 3 件)

河原庸介、古田拓也、淑瑠 ヘムラサビット、玉井翔、Yu Dong、Jiapaer Shabierjang、大石正博、宮下勝吉、林康彦、中田光俊

細胞外微小環境依存性の EphB4 介在グリオーマ細胞間相互作用 (Symposium)
第 37 回日本脳腫瘍病理学会 令和 1 年 5 月 31 日 - 6 月 1 日 愛知

河原庸介、古田拓也、淑瑠 ヘムラサビット、Dong Yu、大石正博、中田光俊
グリオーマ浸潤における Ephrin-B2 依存性 EphB4 シグナルの役割
第 77 回日本脳神経外科学会学術総会 平成 30 年 10 月 10 日 - 10 月 13 日 仙台

Kawahara Y, Furuta T, Sabit H, Dong Y, Miyashita K, Nakada M
The ligand dependent EphB4 signaling is anchoring signaling in glioma (Symposium)
19th International Congress of Neuropathology, September 23-27 Japan

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織
(1)研究分担者

(2)連携研究者
中田 光俊 (NAKADA Mitsutoshi)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：20646690

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。