

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592129

研究課題名(和文) 生体イメージングを用いたグリオーマ幹細胞と血管新生・癌微小環境ダイナミズムの解明

研究課題名(英文) Oct-3/4 promotes tumor angiogenesis through VEGF production in glioblastoma

研究代表者

高橋 寿明(Hisaaki, Takahashi)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20363228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞性の維持に必須の転写因子であるOct-3/4が膠芽腫を含む各種固形癌の悪性度と相関して発現が強まる事が知られてきた。膠芽腫は高度な腫瘍血管新生が病理的な特徴の1つであるものの、Oct-3/4との関係は不明である。本研究においてOct-3/4がAKT-HIF1 シグナリングを介してVEGFを誘導し、腫瘍血管新生を積極的に促進する事で腫瘍増大に関わっている事を明らかにした。したがってOct-3/4の発現を抑制することで、膠芽腫の治療効果の改善が予想され、今後さらに研究を進展させて行く必要がある。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence shows that the expression level of Oct-3/4, a self-renewal regulator in stem cells, is positively correlated with the progression of various solid tumors. However, little is known regarding the influence of Oct-3/4 in the tumor angiogenesis of glioblastoma. In this study, we subcutaneously transplanted U251/EGFP-Oct-3/4 cells into nude mice to evaluate the roles of Oct-3/4 in the tumor angiogenesis. Both tumor size and the number of large vessels growing in the tumor were markedly increased. In an in vitro model of angiogenesis, conditioned media from U251/EGFP-Oct-3/4 cells significantly accelerated capillary-like tube formation. In U251/EGFP-Oct-3/4 cells, VEGF mRNA was upregulated under the control of HIF1a, and enhanced protein expression and nuclear translocation of HIF1a were observed. Our results demonstrate that Oct-3/4-expressing glioma cells have the ability to adapt to low-oxygen environments of tumor by promoting tumor angiogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：膠芽腫 Oct-3/4 血管新生 VEGF HIF1 AKT

1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍幹細胞が発見されたことから腫瘍組織は均一な集団ではなく、腫瘍幹細胞とその子孫細胞が混在する複雑な集団であることが明らかとなった。その後、腫瘍幹細胞における遺伝子・分子レベルでの解明が急速に進み、薬剤・放射線耐性能や造腫瘍能などの様々な生物学特性が解明されてきた。さらに最近になって腫瘍幹細胞性の維持やグリオーマ由来Sphereの形成には低酸素誘導因子(HIF)が重要であるとの報告がなされ、血管や間質などの腫瘍を取り巻くガン微小環境が腫瘍幹細胞性を支えるニッチ(niche)として重要であるという認識も定着しつつある。

この様に、今後のグリオーマ浸潤の病態解析には細胞外基質のみならず腫瘍幹細胞、微小環境を含めた腫瘍組織全体の中で時間的・空間的に考えていく必要が出てきている。

2. 研究の目的

我々は腫瘍血管新生阻害による低酸素領域の拡大に幹細胞性の維持に必須の転写因子Oct-3/4が大きく関与している可能性を示唆する研究成果を得た。したがって、本研究は以下の項目について検討し、癌微小環境の中でOct-3/4を中心とした腫瘍幹細胞性誘導・維持機構の分子基盤を解明し、近年脳外科領域で注目されている「遠位での浸潤性再発や低酸素反応性の血管新生」に対して、新たな治療法の開発を目指すものである。

(1) Oct-3/4 陽性細胞の樹立

Oct-3/4 陽性細胞を樹立し、形態や腫瘍幹細胞マーカーの発現などを検討する。

(2) 腫瘍形成時の Oct-3/4 の役割を検討

移植モデルを作製し、詳細な病理組織解析を行う。

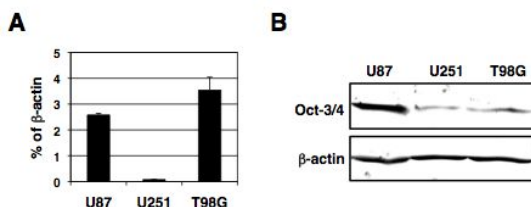
(3) 腫瘍血管新生との関係を検討

HIF や VEGF に注目し、Oct-3/4 との関わりを明らかにしていく。

3. 研究の方法

(1) Oct-3/4 陽性細胞の樹立

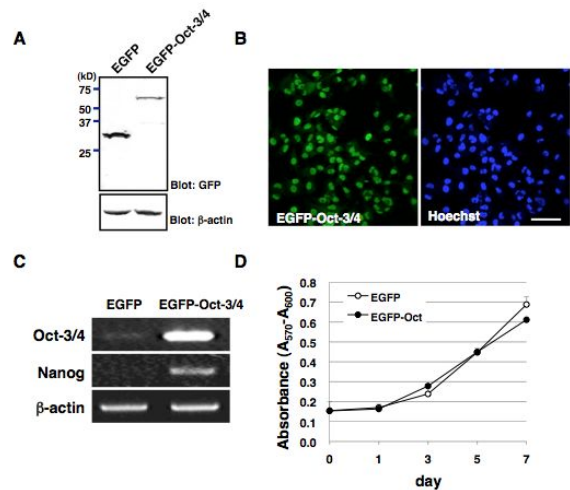
図 1



まず各種グリオーマ細胞株における Oct-3/4 の mRNA 発現 (A) と蛋白発現 (B) を検討し、Oct-3/4 の発現が極めて低い U251 細胞に EGFP-Oct-3/4 遺伝子を導入し、安定発現細胞

株を樹立する事にした。

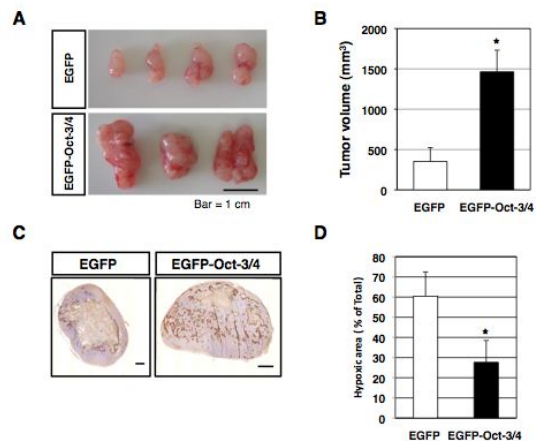
図 2



EGFP-Oct-3/4 発現を蛋白 (A) および免疫染色 (B) で確認した。Oct-3/4 陽性細胞では Oct-3/4 の標的遺伝子である Nanog mRNA の発現が誘導されており、機能的な蛋白が発現されていることを確認した。一方で血清存在化における細胞増殖能には大きな差が認められなかった。

(2) 腫瘍形成時の Oct-3/4 の役割を検討

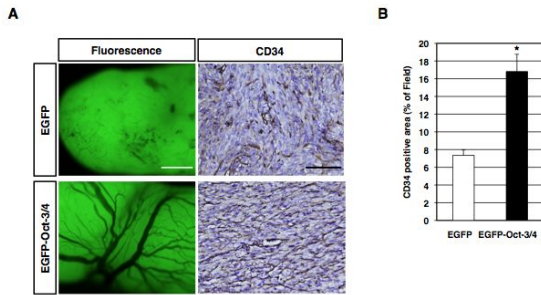
図 3



ヌードマウスの皮下に細胞 ( $1 \times 10^6$ ) を移植し、2ヶ月後に腫瘍を摘出した。Oct-3/4 陽性細胞は細胞増殖能は大差がないのにも関わらず、コントロール細胞に比べて非常に大きな腫瘍をつくった (A, B)。通常、大きな腫瘍の場合、腫瘍の増殖に酸素供給が追いつかず、主要内部は壊死を起こすのが一般的である。そこで低酸素領域を検出するピモニダゾールをマウスに投与し、1時間後に腫瘍を摘出し低酸素領域の検出を試みた。すると意外な事に、Oct-3/4 発現細胞では低酸素領域が顕著に少ない (コントロールの約 3 分の 1) ことが明らかとなった (C, D)。

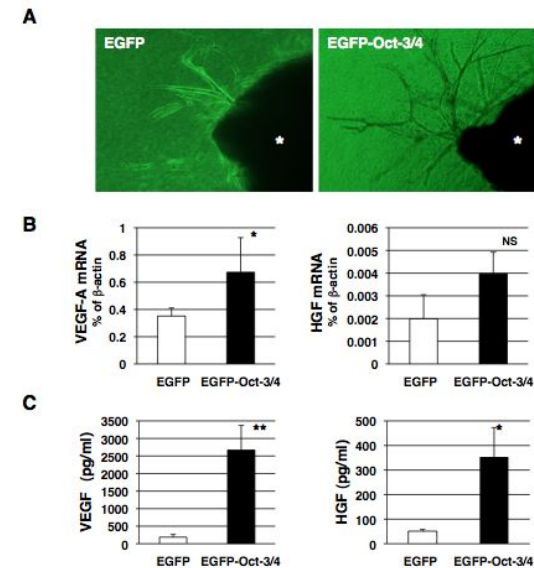
そこで腫瘍血管が発達していると考え、蛍光イメージングおよび組織免疫染色により腫瘍血管を観察した。

図 4



蛍光イメージング解析から Oct-3/4 由来の腫瘍では太く多様に分岐した腫瘍血管が観察された (A 左下)。内部の血管状態について CD34 抗体を用いた免疫染色法で解析したところ、予想通り非常に多くの血管が腫瘍内部に認められた (A 右、B)。

図 5

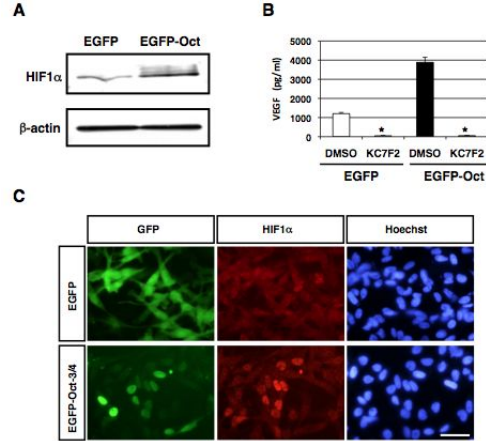


そこで Oct-3/4 発現細胞における血管新生能について検討した。まず Oct-3/4 細胞が血管新生因子を分泌しているか、培養液を用いてラット腹部大動脈コラーゲン培養法による血管新生アッセイを行った (A)。Oct-3/4 発現細胞由来の培養上清で培養すると、動脈片より多数の血管新生が認められた。そこで代表的な血管新生因子である血管内皮増殖因子 (VEGF) と肝細胞増殖因子 (HGF) の mRNA 発現 (B)、蛋白質の分泌量 (C) を測定したところ、特に VEGF の発現が顕著に亢進していた。従って Oct-3/4 による腫瘍血管新生の亢進は主に VEGF を介している事が示唆された。

(3) 腫瘍血管新生との関係を検討

VEGF の発現誘導には HIF1 が強く関与していることが知られているので、HIF1 に注目して検討を行った。

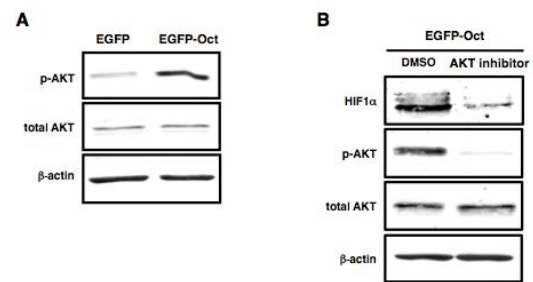
図 6



Oct-3/4 発現細胞では HIF1 $\alpha$ 蛋白質の蓄積が亢進していることが明らかとなった (A)。そこで図 5 で明らかとなった Oct-3/4 による VEGF の発現上昇が HIF1 を介しているか HIF1 $\alpha$ 翻訳阻害剤を用いて確認した。Oct-3/4 細胞における VEGF の分泌は HIF1 $\alpha$  阻害剤でほぼ完全に抑える事が出来た (B)。HIF1 $\alpha$  は分解されずに蓄積すると核内移行するが、Oct-3/4 発現細胞で HIF1 $\alpha$ の核内移行も確認出来た (C)。以上の結果から、Oct-3/4 が HIF1 $\alpha$  を介して VEGF を誘導している事が明らかとなった。

一般的に HIF1 $\alpha$ は低酸素下で安定する事が知られているが、図 6 の実験は通常酸素下での結果である。そこでどのようなメカニズムで HIF1 $\alpha$ の発現が亢進しているのか検討した。

図 7



PI3K/AKT シグナルが HIF1 $\alpha$  の発現上昇に関与している事が知られていることから、Oct-3/4 発現細胞での AKT (Protein kinase B) のリン酸化状態を検討した。Oct-3/4 発現細胞では AKT のリン酸化が亢進しており (A)、そのリン酸化を AKT 阻害剤で抑制すると HIF1 $\alpha$  の発現亢進も抑制されることが判明した (B)。

<まとめ>

以上の結果より Oct-3/4 は AKT-HIF1a シグナリングを介して VEGF を誘導し、腫瘍血管新生を促進する事で腫瘍増大に関わっている事が明らかとなった。また幹細胞性の維持のために積極的に血管新生を誘導し、ニッチ環境を作り出していることも考えられる。したがって Oct-3/4 の発現を抑制することで、膠芽腫の治療効果の改善が予想され、今後さらに研究を進展させて行く必要がある。

#### 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 5 件)

(1) Kobayashi K, Takahashi H, Inoue A, Harada H, Toshimori S, Kobayashi Y, Goto K, Sugimoto K, Yano H, Ohnishi T, Tanaka J.

Oct-3/4 promotes migration and invasion of glioblastoma cells.

J Cell Biochem. 査読有 (2012) 113(2):508-517.

(2) Hino H, Takahashi H, Suzuki Y, Tanaka J, Ishii E, Fukuda M.

Anticonvulsive effect of paeoniflorin on experimental febrile seizures in immature rats: possible application for febrile seizures in children. PLoS One 査読有 (2012) 7:e42920.

(3) Tei N, Tanaka J, Sugimoto K, Nishihara T, Nishioka R, Takahashi H, Yano H, Matsumoto S, Ohue S, Watanabe H, Kumon Y, Ohnishi T.

Expression of MCP-1 and fractalkine on endothelial cells and astrocytes may contribute to the invasion and migration of brain macrophages in ischemic rat brain lesions. J Neurosci Res. 査読有 (2013) 91:681-693.

(4) Fukuda M, Hino H, Suzuki Y, Takahashi H, Morimoto T, Ishii E.

Postnatal interleukin-1 enhances adulthood seizure susceptibility and neuronal cell death after prolonged experimental febrile seizures in infantile rats. Acta Neurologica Belgica 査読有 (2013 in press) PMID: 24002650

(5) Sugimoto K, Nishioka R, Ikeda A, Mise A, Takahashi H, Yano H, Kumon Y, Ohnishi T, Tanaka J.

Activated microglia in a rat stroke model express NG2 proteoglycan in peri-infarct tissue through the involvement of TGF-1. GLIA 査読有 (2014) 62, 185-198.

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) Takahashi H, Kawabe Y, Iwata S, Sugimoto K, Yano H, Tanaka J.

Oct-3/4 promotes tumor angiogenesis in glioblastoma through VEGF production.

日本生理学会 2014 年 3 月 16-18 日 (鹿児島)

(2) Takahashi H, Inoue A, Kobayashi Y, Hosokawa Y, Harada H, Ohnishi T, Sugimoto K, Yano H, Tanaka J.

Oct-3/4 induces CpG demethylation in MGMT promoter to acquire temozolomide resistance in glioblastoma cells.

日本生理学会 2013 年 3 月 27-29 日 (東京)

(3) Takahashi H, Kobayashi K, Inoue A, Harada H, Sugimoto K, Yano H, Ohnishi T, Tanaka J.

Oct-3/4 promotes migration and invasion of glioblastoma cells.

日本生理学会 2012 年 3 月 29-31 日 (松本)

〔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:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://hgyano.jimdo.com/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 寿明 (Takahashi, Hisaaki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 20363228

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

( )