

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861280

研究課題名(和文) 生体光イメージングを利用した膠芽腫幹細胞の機能解析と分化誘導療法の新規開発

研究課題名(英文) New development of a functional analysis and the differentiation instruction therapy of the glioblastoma stem cells using in vivo light imaging

研究代表者

井上 明宏 (Inoue, Akihiro)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20593403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、幹細胞マーカーの1つであるOct-3/4が膠芽腫の治療抵抗性に関与すると共に、腫瘍辺縁部分に局在していることを明らかにした。また、同部位ではHIF-1、VEGFなどの血管新生因子の発現性が上昇しており、血管新生阻害を行うことが腫瘍幹細胞の破綻に繋がる可能性を考え、Oct-3/4のHIF-1発現誘導機構への関与を検討したところ、AKT阻害剤を使用することでHIF-1発現が低下することを発見した。そこで、in vivo光イメージングにて細胞動態解析を詳細に行い、Oct-3/4陽性細胞の血管新生機構への関与を検討したところ、血管新生阻害時における同細胞の細胞浸潤動態が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we subcutaneously transplanted Oct-3/4-overexpressing human glioblastoma (U251/EGFP-Oct-3/4) cells into the right thighs of nude mice to evaluate the roles of Oct-3/4 in tumor angiogenesis. The conditioned media from U251/EGFP-Oct-3/4 cells significantly accelerated capillary-like tube formation compared with that of U251/EGFP cells. In comparison with U251/EGFP cells, U251/EGFP-Oct-3/4 cells had markedly elevated the expression of vascular endothelial growth factor mRNA under the control of hypoxia-inducible factor (HIF) 1. In U251/EGFP-Oct-3/4 cells, enhanced protein expression and nuclear translocation of HIF1 were observed. Furthermore, we demonstrated that the involvement of AKT, an oncogenic signaling molecule, in the Oct-3/4 induced upregulation of HIF1 protein. Our findings suggest that Oct-3/4-expressing glioblastoma cells have the ability to adapt to low-oxygen environments within tumor masses by promoting tumor angiogenesis through AKT-HIF1 pathway.

研究分野：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

近年、悪性神経膠腫を含む様々な腫瘍組織において幹細胞様の細胞群である腫瘍幹細胞 (cancer stem cell : CSC) が発見されており、新たな治療ターゲットとして注目されている。CSC の発見により、腫瘍組織はモノクローナルな集団ではなく、CSC とその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、CSC 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、腫瘍形成能などの様々な生物学的特性が解明されてきている。さらに、最近では幹細胞性の維持には低酸素誘導因子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微小環境が腫瘍幹細胞性を支えるニッチ (niche) として必須であるという認識も定着しつつある。そのため、悪性神経膠腫の治療抵抗性の主因である細胞浸潤の病態解析には、もはや培養細胞レベルの解析だけでなく、細胞外基質や CSC、微小環境を含めた腫瘍組織全体での浸潤様式を時間的・空間的に考えていく必要が出てきている。これまでに我々は、様々な脳腫瘍の摘出組織中に多分化能を有する細胞群が存在することを確認してきた (2009 年国際脳腫瘍学会発表)。また、ヒトグリオーマ組織より得られた初代培養細胞にも CSC が存在していることを明らかにしており、同細胞群から調整した CSC を用いて *in vitro* (ラット脳スライスモデル) や *in vivo* (ヌードマウス脳内移植) にて CSC の浸潤能についての検討を行っている。その結果、CSC は matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) の活性により、顕著に高い浸潤能を有していることが明らかとなった。本結果は CSC が腫瘍周囲に存在する浸潤細胞であり、悪性神経膠腫の治療抵抗性の主因であることを示唆するものである (A. Inoue et al. *International Journal of Oncology* 37: 1121-1131, 2010)。さらに、我々は、iPS cell の誘導に必要な遺伝子である Oct-3/4、SOX2、c-myc、KLF4 を含む幹細胞マーカーの発現を、ヒト膠芽腫細胞株の CSC において検討した結果、これらの遺伝子群の中で、Oct-3/4 の発現が CSC において顕著に上昇しており、同因子が CSC による腫瘍増殖だけでなく、運動能や血管新生能、薬剤耐性能にも強く関わっている知見を得ており、膠芽腫の新たな治療ターゲットとなり得る可能性が十分に予想される。今後の癌治療においては CSC が治療標的となることは明白であるが、神経膠腫の CSC は未だ不明点が多いのが現状であり、この Oct-3/4 に注目した腫瘍幹細胞性誘導・維持機構の分子基盤解明は必要かつ重要な事象であると考えられる。また、Oct-3/4 の有する血管新生能については、近年脳神経外

科領域で注目されている Bevacizumab の問題点の1つである遠位部での浸潤性再発や低酸素反応性の血管新生に通じるものがあり、腫瘍血管新生阻害による低酸素領域の拡大が Oct-3/4 による CSC の浸潤活性亢進や浸潤先での腫瘍血管新生に伴う腫瘍増大を引き起こしている可能性も推測される。このように血管新生と CSC による腫瘍増大・悪性化は深く関連している可能性が高く、グリオーマ浸潤の動態は時間的・空間的に CSC を含めたガン細胞とガン微小環境との相互関係の中で解

析する必要があると思われ、従って生体イメージングを用いた個体レベルでの CSC の動態解析が最適であると考えた。

2. 研究の目的

Oct-3/4 に着目し、生体イメージングを用いた CSC の運動能獲得や薬剤耐性機序への関与に加え、悪性神経膠腫内での CSC の局在を同定することで、膠芽腫の治療抵抗性メカニズムを明らかにし、CSC を標的とした膠芽腫の新規治療法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) Oct-3/4 プロモーター下で緑色蛍光 (EGFP) を発現する細胞 (Oct-3/4-EGFP) を樹立し、その特性 (浸潤、血管新生、薬剤耐性能) を検討する。さらに、同細胞より sphere 法を用いて CSC を単離、免疫不全マウス脳内へ移植することで、Oct-3/4 を介した細胞浸潤・血管新生の動態を MRI・病理組織を用いて解明する。

(2) 低酸素誘導因子 HIF を遺伝子導入した Oct-3/4-EGFP 由来の CSC を用い、血管新生および低酸素時における幹細胞性の包括的な分子基盤を解明する。

(3) 腫瘍細胞の脳内移植モデルマウスに血管可視化蛍光プローブを投与することで血管イメージングを行い、CSC、ガン微小環境、Oct-3/4-EGFP などの動態を *in vivo* 光イメージングを用いて解明する。

(4) Oct-3/4-EGFP 細胞にリプログラミング操作を加え、同細胞群の幹細胞性に与える影響を解析する。

4. 研究成果

H25 年度にヒト膠芽腫細胞株 (T98G、U251) およびヒト悪性神経膠腫摘出組織由来の初代培養細胞株を用いて樹立した Oct-3/4 遺伝子を過剰発現させた細胞株 (GB/Oct-3/4) を用いて、悪性神経膠腫の治療抵抗性に関わる因子 (浸潤能、遊走能、血管新生能、薬剤耐性能) についての評価を行い、Oct-3/4 が悪性神経膠腫の治療抵抗性に関与している事実を明らかにした。さらに、同細胞株より自己複製能、多分化能、腫瘍形成能を有する

Oct-3/4 陽性の腫瘍幹細胞を単離し、NOD-SCID mouse を用いた in vivo における細胞動態を解析すると、Oct-3/4 陽性細胞は腫瘍辺縁部分に局在して存在することが明らかになった。なお、同部位では HIF-1 および VEGF などの血管新生因子の発現性が高いことも明らかとなり、血管新生阻害を行うことが腫瘍幹細胞の幹細胞性破綻につながる可能性が示唆された。さらに、H26 年度より Oct-3/4 の PI3K/AKT 経路を介した HIF-1 発現誘導機構への関与を検討致したところ、AKT 阻害剤を使用することで HIF-1 発現が低下することがわかり、Oct-3/4 の HIF-1 発現誘導機序には AKT が関与している可能性が示唆された。そこで、H27 年度より in vivo 光イメージングを用いた細胞動態解析を詳細に行うと共に、Oct-3/4 陽性腫瘍幹細胞の血管新生機構への関与を検討することを計画、現在も研究は進行中ではあるが、結果が揃い次第、論文発表を行うことを予定している。

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 4 件)

1. Cancerstem-like cells of glioblastoma characteristically express MMP13 and display highly invasive activity. Inoue A, Takahashi H, Harada H, Kohno S, Ohue S, Kobayashi K, Yano H, Tanaka J, Ohnishi T. Int J Oncol. 37, 1121-1131 (2010). 査読有り
2. Oct-3/4 promotes migration and invasion of glioblastoma cells. Kobayashi K, Takahashi H, Inoue A, Harada H, Toshimori S, Kobayashi Y, Goto K, Sugimoto K, Yano H, Ohnishi T, Tanaka J. J. Cell Biochem. 113, 2, 508-517 (2012). 査読有り
3. Oct-3/4 promotes tumor angiogenesis through VEGF production in glioblastoma. Takahashi H, Inoue A, Kawabe Y, Hosokawa Y, Iwata S, Sugimoto K, Yano H, Yamashita D, Harada H, Kohno S, Ohue S, Ohnishi T, Tanaka J. Brain Tumor Pathology. 32, 1, 31-40 (2014). 査読有り
4. Oct-3/4 modulates the drug-resistant phenotype of glioblastoma cells through expression of ATP binding cassette transporter G2. Hosokawa Y, Takahashi H, Inoue A, Kawabe Y, Funahashi Y, Kameda K, Sugimoto K, Yano H, Harada H, Kohno S, Ohue S, Ohnishi T, Tanaka J. Biochim Biophys Acta. 1850, 6, 1197-1205 (2014).

査読有り

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 第 30 回日本脳腫瘍病理学会 愛知 名古屋国際会議場
H24 年 5 月 24 日～5 月 26 日、全国学会
「膠芽腫の血管新生における Oct-3/4 の関与」
井上明宏、原田広信、高野昌平、大上史朗、大西丘倫、高橋寿明、田中潤也
2. 社団法人日本脳神経外科学会 第 71 回学術総会 大阪 大阪国際会議場
H24 年 10 月 17 日～10 月 19 日、全国学会
「膠芽腫細胞の薬剤耐性と Oct-3/4 の関連性」
井上明宏、原田広信、高野昌平、大上史朗、大西丘倫、高橋寿明、田中潤也
3. 第 30 回日本脳腫瘍学会 広島 グランドプリンスホテル広島
H24 年 11 月 25 日～11 月 27 日、全国学会
「Oct-3/4 の膠芽腫における薬剤耐性機序への関与」
井上明宏、原田広信、高野昌平、大上史朗、大西丘倫、高橋寿明、田中潤也
4. 第 31 回日本脳腫瘍病理学会 東京 KFC HALL 国際ファッションセンター
H25 年 5 月 24 日～5 月 25 日、全国学会
「膠芽腫における Oct-3/4 の MGMT 発現誘導機序への関与」
井上明宏、原田広信、高野昌平、大上史朗、大西丘倫、高橋寿明、田中潤也
5. 社団法人日本脳神経外科学会 第 72 回学術総会 横浜 パシフィコ横浜
H25 年 10 月 16 日～10 月 18 日、全国学会
「Oct-3/4 と膠芽腫に対する Temozolomide 治療効果との関連性」
井上明宏、原田広信、高野昌平、大上史朗、大西丘倫、高橋寿明、田中潤也
6. 第 31 回日本脳腫瘍学会 宮崎 フェニックス・シーガイア・リゾート
H25 年 12 月 8 日～12 月 10 日、全国学会

「Oct-3/4 の MGMT 発現調節機構への関与」
井上明宏、原田広信、高野昌平、大上史朗、
大西丘倫、高橋寿明、田中潤也

7. 第 32 回日本脳腫瘍病理学会 徳島 あ
わぎんホール（徳島県郷土文化会館）
H26 年 5 月 23 日～5 月 24 日、全国学会
「膠芽腫における Oct-3/4 を介した腫瘍増大
機序について -HIF-1 との関連性-」
井上明宏、高野昌平、大上史朗、大西丘倫、
高橋寿明、田中潤也

8. 社団法人日本脳神経外科学会 第 73 回学
術総会 東京 グランドプリンスホテル新高
輪
H26 年 10 月 9 日～10 月 11 日、全国学会
「膠芽腫の血管新生における Oct-3/4 と HIF-1
の関連性」
井上明宏、高野昌平、大上史朗、大西丘倫、
高橋寿明、田中潤也

9. 第 32 回日本脳腫瘍学会 千葉 シェラト
ン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル
H26 年 11 月 30 日～12 月 2 日、全国学会
「膠芽腫における Oct-3/4 と HIF-1 の関連性」
井上明宏、高野昌平、大上史朗、大西丘倫、
高橋寿明、田中潤也

10. 第 33 回日本脳腫瘍病理学会 香川 JR ホ
テルクレメント高松 H27 年 5 月 29 日～5 月
30 日「膠芽腫における Oct-3/4 の ABC
transporter を介した薬剤耐性機序への関与」
井上明宏、高野昌平、大上史朗、大西丘倫、
高橋寿明、田中潤也

11. 社団法人日本脳神経外科学会 第 74 回学
術総会 北海道 ロイトン札幌
H27 年 10 月 14 日～10 月 16 日、全国学会

「膠芽腫の血管新生における Oct-3/4 と HIF-1
の関連性」

井上明宏、高野昌平、大上史朗、大西丘倫、
高橋寿明、田中潤也

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 明宏 (Inoue, Akihiro)
愛媛大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20593403

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし