

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06823

研究課題名(和文) グリオブラストーマ由来血管の発生機序とその性質がもたらす悪性度への影響

研究課題名(英文) Developmental mechanisms of glioblastoma-derived blood vessels and their effect on malignancy

研究代表者

山下 年晴 (Yamashita, Toshiharu)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：50400677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠芽腫(グリオブラストーマ：GBM)は高い増殖性と浸潤性を有しており予後が非常に悪い疾患である。これらの性質には微小環境が重要であることが分かっている。特に微小環境の構成要素である血管内皮細胞は重要な働きを担っており、近年注目されている。この機能解析を目的としてGBM原発腫瘍より血管内皮細胞を単離し、関連因子の発現解析を行ったところSDF-1の発現が亢進していることが分かった。この因子は病的な血管特異的であり、正常血管では発現が見られない。またこの因子は低酸素応答性の因子であることから、低酸素刺激と血管内皮細胞の性質の関連を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma (GBM) is a disease with very poor prognosis, because GBM has high proliferative and invasive activities. The microenvironment of tumor is important for these phenomenon. Vascular endothelial cells, which are components of the microenvironment have an important role. For the purpose of functional analysis of endothelial cells, I analyzed the expression of related factors using endothelial cells derived from GBM patients. As a result, the expression of SDF-1 was increased in GBM derived endothelial cells. SDF-1 is specific expressing in pathological endothelial cells, and this factor is respond to hypoxic stimulation. In this research project, I clarified the relation between hypoxic stimulation and endothelial function for tumor environment in the research term.

研究分野：分子生物学

キーワード：低酸素 がん 血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

神経膠芽腫 (GBM) は数あるがんの中でも特に予後が非常に悪いことが知られており、5年生存率は10%以下ととりわけ低い。これはGBMの特長である高い浸潤性と増殖性に起因している。固形腫瘍の増殖には血管新生が必要であるが、この新生血管は通常の血管とは異なる性質を有していることが分かっている。この特異的な性質を持って血管が浸潤や増殖を促進する微小環境を構築していることは容易に推測できる。またGBMの特長として浸潤性が高いために手術による残存の問題や抗がん剤抵抗性が挙げられる。GBMの治療においてVEGF (血管内皮増殖因子) に対する阻害剤が治療初期には高い抗腫瘍効果を示すものの時間経過と共に効果がなくなってしまうことが、しばしば臨床の現場では問題となっている。この現象は腫瘍内の血管内皮細胞の性質が変性していくことに起因していると考えている。この仮説を証明するデータが得られつつあり、腫瘍血管の性質を知ることが効果的な治療法を開発するためには必須であると我々は考えている。

この解析を詳細に行う上で重要となるのが、腫瘍環境の *in vitro* 構築である、分子機構解析の為の様々なアッセイを効率よく実施するためには *in vitro* の実験系が有効である。しかしこれまでの実験系はライン化されたGBM細胞株を用いて解析を行うことが一般的であった。この問題点は実際の腫瘍と比較して発現している増殖因子を始めとする各種因子の発現が大きく異なっており、生体における現象を反映している実験系であるとは言いがたかった。このため抗がん剤の効果や治療効果の結果が実際と一致していなかった。私達はこの問題を解決するためにGBM患者由来の検体組織より初代培養GBMを樹立しその性質および細胞治療法を研究してきた (Akimoto et al. 2013)。この我々の実験系では、GBMに対する細胞治療法の解析において *in vitro* の結果と *in vivo* の結果が一致したことから、この実験系はより実態を反映している系であると考えられる。

## 2. 研究の目的

がん微小環境は腫瘍細胞、血管内皮細胞、周皮細胞 (ペリサイト)、間葉系細胞、免疫細胞などから構築される特殊な環境である。特に腫瘍血管内皮細胞は正常血管内皮細胞と性質が異なることが知られている。近年さらにGBM細胞から血管内皮細胞や周皮細胞が分化してくる報告がなされた (Cheng et al. 2013, Soda et al. 2011)。これはがん微小環境の最も重要な構成要素である血管の性質を解析する上で非常に興味深い報告である。これまでに手術検体であるGBM原発腫瘍よ

り単離した血管内皮細胞における関連因子発現を解析したところ、SDF-1の発現が亢進していることが分かった。通常この因子は正常血管では発現しておらず腫瘍血管特異的な特長である。この因子は低酸素応答性の因子であることから、血管の形質転換には低酸素が関与している事が示唆された。そこで我々は低酸素刺激と血管内皮細胞および周皮細胞の形質転換の関連を明らかにし、がん微小環境の解明をめざす。

研究期間中においては、がん微小環境を構成する重要要素である血管内皮細胞および周皮細胞に着目し、手術検体から直接単離したGBMECとGBM腫瘍細胞由来の血管内皮細胞の性質の違いを検証する。また血管内皮細胞としての機能性の違いを詳細に検証するべく正常血管細胞 (HUVEC) および血管内皮前駆細胞 (EPC) と比較検討する。これまでの報告から、初代培養GBM細胞全てに形質転換能があるとは考えにくく、腫瘍内部に幹細胞様の性質を有する細胞が存在していると我々は予想している。そこで形質転換のメカニズムを明らかにすると共に、この形質転換能を有する細胞の単離法も合わせて解析する。このことによって新たな治療の標的が見いだせると考えている。

本研究を遂行するために手術検体からGBM細胞を単離・培養する必要が有る。腫瘍の初代培養は性質を維持したまま培養することが難しいのであるが、我々の研究グループでは前述のようにその技術を既に獲得しており実際にGBMの細胞治療法を研究してきた実績がある。また今回仮説として提唱している形質転換が低酸素刺激によって誘発されるという点においては、さらに、低酸素に対する生理応答の要である低酸素応答転写因子 (HIF: hypoxia inducible factor) の遺伝子改変マウスを所有しており、*in vivo* での低酸素応答解析に対してより詳細な解析に直ちに取りかかることが可能である。また初代培養腫瘍細胞に shRNA を導入して HIF の活性を下げることも成功している。

我々の研究の特長は既に実用可能な *in vitro*、*in vivo* の両方の実験系を有している事である。詳細な解析手法は次項の研究計画・方法に記載するが、*in vitro* で腫瘍細胞から血管内皮細胞・周皮細胞への形質転換の分子機構を明らかにし、相互作用によって悪性度増大にどのように関与しているのか明らかにする。これだけではなくこの現象をさらに *in vivo* のモデルで再現し証明する。このモデルを使い形質転換自体を抑制もしくは形質転換能を有する細胞を標的とした新しい分子標的治療法の提唱を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究課題遂行により、GBM微小環境を構築する腫瘍血管の性質を知ることが可能

となる。これは今まで外科的手術や既存の抗 VEGF 抗体製剤などの抗がん剤では限界であった GBM に対する治療に関して新しい知見を得ることが出来ると考えている。がん微小環境を対象とした分子標的治療法の改善および GBM の予後不良において、最も大きな課題である浸潤に対して新しいモデルが提唱できると見込まれる。つまり GBM の浸潤には、腫瘍細胞だけでなく腫瘍血管内皮細胞や周皮細胞も積極的に関与しているという考え方である。この時に作用する血管内皮細胞の機能は前述のように正常血管内皮細胞や血管内皮前駆細胞とは異なった性質を有している。そこで我々は腫瘍血管内皮細胞がどのようなメカニズムで発生するのか、そしてその機能はどのように異なり、どのように作用するのかを明らかにする。具体的には以下の研究計画・方法に従って遂行した。

これまでに予備的な実験により、初代培養ヒト GBM 細胞をマトリジェルと共に免疫不全マウスの皮下に移植し形成させた腫瘍において、移植したヒト GBM 細胞から血管内皮細胞の性質を有する細胞が出現することが認められた。

このように GBM 細胞から血管内皮細胞が得られる事は我々の実験系で確認は出来ているが、どのような機序で形質転換が起こっているのかは、未だ誰も明らかにしてはいない。また血管を構築する上でもう一つ重要な周皮細胞への形質転換に関しては情報が無い。腫瘍内部は低酸素環境であることはよく知られているが、前述のように腫瘍血管特異的に低酸素応答性の因子の発現が認められていることから、この実験系を応用することによって生体から培養系そして再び生態での検証を行い、低酸素応答と形質転換を多様な手法で解析し、その分子機構を明らかにし、GBM 細胞とどのような相互作用をするのか解明していくために、以下の実験を行った。

1) *in vivo* モデルにおける形質転換の誘発を証明した

この実験系はヒト由来の GBM 細胞をマウスに移植するモデルであるので、マウス由来、ヒト由来の血管をモノクローナル抗体で識別し解析が可能である。またこの実験系では GBM 細胞に GFP (緑色蛍光) で標識を施し FACS 解析可能に工夫してある。

) 皮下移植担がんモデルにて形成した腫瘍に対するヒトおよびマウス特異的抗体による病理解析

) 宿主由来および GBM 由来細胞を FACS にてマーカー発現解析

) 多重染色法を利用し低酸素応答性との関連性の明確化

) 腫瘍塊から RNA, タンパクを抽出し遺伝子発現解析を行い関与する因子を推測

2) GBM 由来の目的細胞を単離・培養し、形質転換の分子機構を明らかにした

*in vitro* で効率よく条件や発現因子の解析が可能となる培養系の実験系を確立し、この

系を駆使して様々な条件を設定し、形質転換を *in vitro* で再現した。

) GBM 細胞を低酸素環境下(酸素濃度・継続時間を変化させて)で培養し細胞の形質転換を観察

) 形質転換した細胞およびそれ以外の細胞個々における発現因子の解析

) 形質転換前後で発現因子を比較し、形質転換をおこす GBM 細胞はどのような性質を有しているか検証

3) 培養実験系における *in vitro* 機能解析  
GBM 細胞と GBM 由来血管内皮細胞の共培養実験を行った。

) GBM 由来血管内皮細胞の増殖能、遊走能、管腔形成能の検証

) GBM 細胞との共培養による GBM に対する生理作用(増殖・遊走等)解析

) 上記実験を他血管関連細胞と組合せて遺伝子発現解析

4) *in vivo* 実験系を用いた腫瘍血管が GBM 細胞に与える影響の解析

) 共移植モデルにて検証

) 他種血管内皮細胞との組合せを組んで比較・検討

) 腫瘍を摘出し、各特異的マーカーで細胞種を解析

#### 4. 研究成果

神経膠芽腫(グリオブラストーマ: GBM)は予後が非常に悪いことが知られている。これは主に高い増殖性と浸潤性によるものである。増殖や浸潤といった現象にはがん細胞をとりまく微小環境が重要であることが指摘されている。特に血管内皮細胞はがん微小環境を構成する要素のなかで最も重要である。腫瘍血管内皮細胞には腫瘍血管内皮細胞は正常血管とは性質が大きく異なりがんの浸潤や増殖を支持する役割を担っていると考えられる。この血管内皮細胞が既存の血管からの新生だけでなく、腫瘍細胞から形質転換し血管内皮細胞や周皮細胞としてがん微小環境を構築していることが近年注目されている。我々はこの細胞の性質を解析することによって GBM に対するこれまでにない効率的な新しい分子標的を見いだすことを目的として、この細胞の形質転換の分子機構、由来となる細胞の解析を実施する。特に腫瘍血管内皮細胞は正常血管内皮細胞と性質が異なることが知られている。近年さらに GBM 細胞から血管内皮細胞や周皮細胞が分化してくるという報告がなされており、その機能解析が重要実を帯びている。そこで本研究にて手術検体である GBM 原発腫瘍より単離した血管内皮細胞における関連因子発現を解析したところ、SDF-1 の発現が亢進していることが分かった。通常この因子は正常血管では発現しておらず腫瘍血管特異的な特長である。この因子は低酸素応答性の因子

であることから、血管の形質転換には低酸素が関与している事が示唆された。そこで我々は低酸素刺激と血管内皮細胞および種皮細胞の形質転換の関連を明らかにした。

初代培養ヒト GBM 細胞をマトリジェルと共に免疫不全マウスの皮下に移植し形成させた腫瘍において、移植したヒト GBM 細胞から血管内皮細胞の性質を有する細胞が出現することが表面抗原の解析よりその存在が認められた。さらに前述のように微小環境を構築するこれらの腫瘍血管内皮細胞において低酸素応答性のサイトカインである SDF-1 の発現が亢進していることが確認できた。この因子は通常では見られないものであり、特徴的な現象であるといえる、このことが腫瘍の浸潤や増殖を促進している事が示唆された。

将来構想として今回得られた知見は以下の要件の応用に有用である。具体的には、GBM がどのようにして血管内皮細胞や周皮細胞としての性質を獲得するのか、その機構を明らかにするために、その条件を詳細に探ると共に関与する因子をスクリーニングする。これまでに SDF-1 の発現亢進が確認されているが、これだけで説明できるわけでないため、その他の関連因子に関してもスクリーニングを行う。また形質転換をおこして血管内皮細胞様の性質を獲得した細胞機能が元になった腫瘍細胞と元から血管であった腫瘍内の血管内皮細胞とどのような違いを有するのか検証する。そのために共培養、細胞生物学的解析、分子生物学的解析を行う。この解析によって、最新の治療法でもってしても治療効果が得られにくい GBM に対して、新しい治療標的を提案することが出来ると考えている。また GBM 転移とは関連があまりないが、がん微小環境は転移にも大きな相関性をもっており、他のがん種においても応用出来る。この現象を明らかにすることは医療技術の発展に大いに貢献できることであるということが強く示唆される。

## 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 11 件)

1. Kato T, Khanh VC, Sato K, Kimura K, Yamashita T, Sugaya H, Yoshioka T, Mishima H, Ohneda O. Elevated Expression of Dkk-1 by Glucocorticoid Treatment Impairs Bone Regenerative Capacity of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 2018 Jan 15;27(2):85-99. doi: 10.1089/scd.2017.0199. (査読有り)
2. Kato T, Khanh VC, Sato K, Takeuchi K, Carolina E, Yamashita T, Sugaya H, Yoshioka T, Mishima H, Ohneda O. SDF-1

improves wound healing ability of glucocorticoid-treated adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Nov 18;493(2):1010-1017. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.100. (査読有り)

3. Khanh VC, Ohneda K, Kato T, Yamashita T, Sato F, Tachi K, Ohneda O. Uremic Toxins Affect the Imbalance of Redox State and Overexpression of Prolyl Hydroxylase 2 in Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Involved in Wound Healing. *Stem Cells Dev.* 2017 Jul 1;26(13):948-963. doi: 10.1089/scd.2016.0326. (査読有り)

4. Shiraishi A, Tachi K, Essid N, Tsuboi I, Nagano M, Kato T, Yamashita T, Bando H, Hara H, Ohneda O. Hypoxia promotes the phenotypic change of aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells. *Cancer Sci.* 2017 Mar;108(3):362-372. doi: 10.1111/cas.13147. (査読有り)

5. Fukuda S, Okuda K, Kishino G, Hoshi S, Kawano I, Fukuda M, Yamashita T, Beheregaray S, Nagano M, Ohneda O, Nagasawa H, Oshika T. In vivo retinal and choroidal hypoxia imaging using a novel activatable hypoxia-selective near-infrared fluorescent probe. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2016 Dec;254(12):2373-2385. Epub 2016 Aug 29. PubMed PMID: 27572140. (査読有り)

6. Tu TC, Yamashita T, Kato T, Nagano M, Trinh NT, Hamada H, Sato F, Ohneda K, Matsuo-Takasaki M, Ohneda O. Microvesicles derived from Alde-Low EPCs support the wound healing capacity of AT-MSCs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Aug 12;477(1):68-75. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.022. (査読有り)

7. Trinh NT, Yamashita T, Tu TC, Kato T, Ohneda K, Sato F, Ohneda O. Microvesicles enhance the mobility of human diabetic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in vitro and improve wound healing in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 May 13;473(4):1111-1118. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.04.025. (査読有り)

8. Trinh NT, Yamashita T, Ohneda K, Kimura K, Salazar GT, Sato F, Ohneda O. Increased Expression of EGR-1 in Diabetic Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Reduces Their Wound Healing Capacity. *Stem Cells Dev.* 2016 May 15;25(10):760-73. doi: 10.1089/scd.2015.0335. (査読有り)

9. Tachi K, Shiraishi A, Bando H, Yamashita T, Tsuboi I, Kato T, Hara H,

Ohneda O. FOXA1 expression affects the proliferation activity of luminal breast cancer stem cell populations. *Cancer Sci.* 2016 Mar;107(3):281-9. doi: 10.1111/cas.12870. (査読有り)

10. Tu TC, Nagano M, Yamashita T, Hamada H, Ohneda K, Kimura K, Ohneda O. A Chemokine Receptor, CXCR4, Which Is Regulated by Hypoxia-Inducible Factor 2 $\alpha$ , Is Crucial for Functional Endothelial Progenitor Cells Migration to Ischemic Tissue and Wound Repair. *Stem Cells Dev.* 2016 Feb 1;25(3):266-76. doi: 10.1089/scd.2015.0290. (査読有り)

11. Tsuboi I, Yamashita T, Nagano M, Kimura K, To'a Salazar G, Ohneda O. Impaired expression of HIF-2 $\alpha$  induces compensatory expression of HIF-1 $\alpha$  for the recovery from anemia. *J Cell Physiol.* 2015 Jul;230(7):1534-48. doi: 10.1002/jcp.24899. (査読有り)

〔学会発表〕(計5件)

1. Khanh Vuong Cat, 佐藤和聡, 木村健一, 山下年晴, 菅谷久, 吉岡友和, 三島初, 大根田修, ステロイド性大腿骨頭壊死における間葉系幹細胞の骨再生に与える影響, 第16回日本再生医療学会総会(2017)

2. 加藤俊貴, Khanh Voung, 竹内航介, 山下年晴, 佐藤藤夫, 平松祐司, 大根田修, ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞のベージュ細胞分化機構解析, 第16回日本再生医療学会総会(2017)

3. 山下年晴, 坪井一輝, 平松大宗, 加藤俊貴, 大根田修, HIF-2 $\alpha$  発現低下によって惹起される HIF-1 $\alpha$  代償作用の解析, 第89回日本生化学大会(2016)

4. 山下年晴, 坪井一輝, 平松大宗, 加藤俊貴, 大根田修, HIF-2 $\alpha$  発現低下によって惹起される HIF-1 $\alpha$  代償作用の解析, 第14回がん&ハイポキシア研究会(2016)

5. Khanh C. Vuong, Toshiki Kato, Toshiharu Yamashita, Fujio Sato, Osamu Ohneda, Chronic kidney disease affects the overexpression of prolyl hydroxylase 2 in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells involved in tissue repair, The 89th Annual Meeting of JBS(2016)

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

該当なし

○取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/re-med/stemcell/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 年晴 (YAMASHITA, toshiharu)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号: 50400677