

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19055

研究課題名(和文) 腫瘍壊死が引き起こす栄養シグナル・浸透圧シグナルに着目したヒト膠芽腫の病態

研究課題名(英文) Pathophysiology of human glioblastoma from the viewpoint of nutrient and osmotic signals caused by tumor necrosis

研究代表者

石井 文彩 (ISHII, Aya)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50634747

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)：膠芽腫は脳腫瘍の中で最も悪性度の高いもののひとつであり、腫瘍組織に壊死が見られるのが特徴である。本研究では、細胞外液の浸透圧の変化や栄養因子の欠乏が、膠芽腫細胞にどのような変化を起こすかを検討した。高浸透圧ではNFAT5タンパク質の発現が増加することが明らかとなり、一部の細胞株では、高浸透圧の培地で前処理した細胞は、コロニー形成能が上昇した。また、グルタミン、グルコースを欠乏させると、GINSタンパク質の発現が低下することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is one of the most malignant tumors in the brain. Necrosis in the tumor tissue is characteristic of glioblastoma. In this study, we examined the functional changes of glioblastoma cells caused by osmotic pressure and nutrient shortage. The expression levels of NFAT5 protein were elevated in hyperosmolarity. In a cell line, colony-forming activity was elevated when the cells were pretreated in hyperosmolarity. The expression levels of GINS proteins were down-regulated in a shortage of glutamine or glucose.

研究分野：病理学

キーワード：病理学 癌 細胞・組織 脳神経疾患 脳腫瘍

1. 研究開始当初の背景

ヒト原発性脳腫瘍の中でアストロサイト系腫瘍は代表的なもののひとつである。その中でも膠芽腫 (glioblastoma) は最も悪性度が高く、WHO grade IV に位置付けられている。膠芽腫の2年生存率は5%以下と報告されているように非常に予後が悪く、外科的切除、化学療法、放射線療法の進歩した現在でも最も難治性の悪性腫瘍のひとつと言える。この腫瘍の病態の解明が急務である。

膠芽腫の病理組織学的特徴は、アストロサイトへの分化を示す腫瘍細胞が増殖し、細胞分裂能が高く、壊死や微小血管増殖を伴っているというものである。この中で壊死または微小血管増殖の存在は、星細胞腫 (WHO grade II~III) と膠芽腫とを区別する重要な組織所見であり、膠芽腫独特な病態を反映するものと考えられる。さらに、膠芽腫において壊死巣が大きいほど予後が不良であることが報告されており、病態における壊死の重要性が示唆される。

研究代表者らはこれまで、低酸素生物学と腫瘍幹細胞の概念をとり入れて、アストロサイト系腫瘍の免疫組織化学的研究を行ってきた。その過程で、低酸素応答性の転写因子である HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) を発現し、細胞周期が静止期にある、幹細胞様の (SOX2 陽性または NANOG 陽性) 腫瘍細胞が、WHO grade II~IV の腫瘍の中で膠芽腫にのみ認められ、主として壊死巣の周囲に分布していることを最近論文発表した (Ishii A et al. PLoS ONE 11: e0147366, 2016)。膠芽腫由来の培養細胞を用いた実験においても、上記の発現パターンを示す細胞が出現する条件では *in vitro* の腫瘍形成能の亢進が認められ、膠芽腫の壊死周囲という環境が腫瘍形成能の高い細胞を生み出す温床となっている可能性を考えている。他の研究者は vascular niche と hypoxic niche という言葉で、腫瘍内の特定の環境に幹細胞様の腫瘍細胞が存在しているという概念を提唱しており、われわれの得た知見と一部オーバーラップする部分がある。

われわれは上記の研究成果を踏まえ、壊死巣の周囲という特殊な環境が、何らかの物質を介して viable な腫瘍細胞に働きかけ、腫瘍細胞の性質 (増殖、分化、幹細胞的性質 [stemness]、代謝、浸潤能など) に変化を引き起こし、膠芽腫に特有の病態を形成しているのではないかと着想した。壊死巣の周囲では、血流が不足し、本来は血流により運ばれてくる栄養物質が欠乏していることが考えられる。壊死巣周囲の腫瘍細胞は、分子の発現を変化させてそのような条件に適応し、栄養の豊富な部位の腫瘍細胞とは異なった性質を持つようになっていられる。一方、壊死巣では細胞の崩壊により、細胞内のタンパク質の分解産物、アミノ酸、糖類、脂質、核酸などが放出され、有機物に富んだ環境を形成していると考えられる。壊死巣は物質

(溶質) に富んでいるだけでなく、微小循環が破綻しているために溶質の拡散・流出の起こりにくい環境と考えられ、細胞外液の浸透圧が上昇していることが予想される。腫瘍細胞がこのような浸透圧ストレスを受け、それに対する適応反応が腫瘍の病態に関与している可能性も興味深い。

栄養物質に対する細胞の応答として「栄養シグナル」という概念が近年注目されている。栄養物質があると活性化される「正のシグナル」として mTOR シグナル系、栄養欠乏時に活性化される「負のシグナル」として GCN2/eIF2 の系などが注目されている。mTOR は環境中の糖やアミノ酸に反応して TSC 複合体や Rag GTPase を介して活性化されるキナーゼであり、標的分子である 4E-BP1 や ribosomal S6K をリン酸化し、最終的にはタンパク質の翻訳を亢進させる働きがある。GCN2 はアミノ酸の欠乏時に活性化されるキナーゼであり、標的分子の eIF2 をリン酸化することでタンパク質翻訳の大部分を抑制するが、アミノ酸のとり込みに必要な SNAT2 アミノ酸トランスポーターなどの発現は亢進させることが報告されている。これらのシグナル系が腫瘍の病態にも関与している可能性が言われ始めている。

一方、環境の浸透圧によるストレスに対する応答には、多くの細胞で転写因子 NFAT5 (TonEBP) が中心的に関与していると考えられている。NFAT5 は主として腎臓の細胞で研究されてきており、高浸透圧により活性化され、トランスポーターなど種々の遺伝子の発現を調節し、浸透圧ストレスへの適応を誘導する。われわれによる予備実験で、複数の膠芽腫細胞株において NFAT5 の発現が確認されている。

われわれが着目するこれらの分子のうち、mTOR 系の分子は膠芽腫での発現が報告されているものの、壊死巣との関係についてはいまだ解明されていない。他の分子については、膠芽腫での発現・機能ともにほとんど報告されていないのが現状である。

本研究は、壊死巣が引き起こす栄養シグナル・浸透圧シグナルが、膠芽腫細胞の性質にどのような変化を及ぼし、膠芽腫の病態に関与するかを解明することを目指すものである。

2. 研究の目的

(1) ヒト膠芽腫由来細胞株を、種々の浸透圧に調製した培地で培養し、NFAT5 等の発現の変化を明らかにする。

(2) ヒト膠芽腫由来細胞株を、種々の浸透圧に調製した培地で培養し、コロニー形成能の変化を明らかにする。

(3) 培地の浸透圧以外に、NFAT5 発現を変化させる因子がないか検討する。

(4) ヒト膠芽腫由来細胞株を、種々の栄養欠乏培地で培養し、増殖と stemness に関与す

る分子の発現の変化を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト膠芽腫由来細胞株を用いた、細胞外液の浸透圧の変化に対する浸透圧シグナル系分子の反応様式の検討

ヒト膠芽腫由来細胞株 (T98G, U251MG, YKG-1, U87) を実験に用いた。

NaCl、ラフィノースを溶解させることで種々の浸透圧 (通常の培養液より 50 ~ 100mOsmol/l 上昇させる) に調製した培地を用意し、ヒト膠芽腫由来細胞株を 24 時間培養した。タンパク質抽出バッファーを用いて whole cell lysate を作製し、タンパク質濃度の定量後、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い、タンパク質を PVDF メンブレンに転写した。このメンブレンを Western blot 法による解析に用いた。抗 NFAT5 抗体、抗 STAT3 抗体を用いて、NFAT5、STAT3 タンパク質の発現量の変化を検討した。ローディングコントロールとして、 β -アクチニンを用いた。

同様に種々の浸透圧に調製した培地で培養した細胞から、RNeasy Mini Kit (Qiagen 社) を使用して RNA を抽出し、バイオアナライザー (Agilent 社) を用いて RNA 濃度を測定後、ReverTra Ace (東洋紡) を用いて逆転写を行い cDNA を作製した。NFAT5 遺伝子を増幅するプライマーを設計し、Ex Taq (タカラバイオ) を使用して PCR 反応を行い、NFAT5 の mRNA レベルでの発現を検討した。

(2) ヒト膠芽腫由来細胞株を用いた、細胞外液の浸透圧によるコロニー形成能の変化の検討

ヒト膠芽腫由来細胞株を培養ディッシュからトリプシン-EDTA を用いてはがして回収し、トリパンブルーを加えて血球計算板で生細胞数をカウントした。細胞浮遊液を培地で希釈し、10cm ディッシュに細胞数 1×10^2 個となるように細胞を播種した。1 日後、培地を、種々の浸透圧に調製した培地に交換し、播種後 10 日まで培養した。培養後のディッシュを phosphate-buffered saline で洗浄してからメタノールで 10 分間 (室温) 固定し、乾燥させた。ギムザ染色液を入れ、30 分間 (室温) 染色を行った。水洗後、乾燥させた。細胞が紫色に染色されるので、直径 1mm 以上の細胞集団をコロニーと定義し、ディッシュ上のコロニーの数をカウントした。コロニー数を 1×10^2 で割ったコロニー形成率を算出した。

次に、あらかじめ種々の浸透圧の培地で 3 日間培養しておいたヒト膠芽腫由来細胞株を、上記と同様の方法で 10cm ディッシュに細胞数 1×10^2 個となるように播種した。1 日後、培地を、通常の培地に交換し、播種後 10 日まで培養し、上記と同様に固定・染色を行ってコロニー形成率を検討した。

(3) 培地の浸透圧以外の、NFAT5 発現を変化させる因子の探索

ヒト膠芽腫由来細胞株を、浸透圧を変化させていない通常の培地で培養し、マルチガスインキュベーター (アステック) を用いて低酸素 (1%酸素) 下で 24 時間培養した。また、serum free 培地で 24 時間培養した。これらの細胞からタンパク質を抽出し、Western blot 法により NFAT5 タンパク質の発現変化を検討した。

(4) ヒト膠芽腫由来細胞株を用いた、栄養欠乏による増殖・stemness 関連分子の発現変化の検討

増殖および stemness に関連する分子として報告されている GINS タンパク質群 (PSF1、PSF2、PSF3、SLD5) を中心に検討した。

ヒト膠芽腫由来細胞株を、アミノ酸欠乏の例としてグルタミン欠乏培地 (10% FBS 添加)、糖欠乏の例としてグルコース欠乏培地 (10% FBS 添加) で 1~3 日間培養し、タンパク質を抽出し、Western blot 法により PSF1、PSF2、PSF3、SLD5 タンパク質などの発現量の変化を検討した。ローディングコントロールとして、チューブリンを用いた。

4. 研究成果

(1) ヒト膠芽腫由来細胞株である T98G、U251MG、YKG-1 細胞株を用いて、培地の浸透圧の変化に対する細胞の応答について検討した。他の細胞種 (腎臓の細胞、肝細胞) では、浸透圧応答に関与する分子として、高浸透圧の時に発現が上昇する NFAT5 分子と、発現が低下する STAT3 分子が報告されているので、細胞を通常の培地より 50 ~ 100mOsmol/l 上昇させた培地で培養し、Western blot 法により NFAT5、STAT3 タンパク質の発現レベルを調べた。その結果、STAT3 の発現量はあまり変化しなかったが、NFAT5 は高浸透圧時に発現が上昇することが明らかとなった。また、RT-PCR 法により、高浸透圧時には NFAT5 遺伝子の mRNA レベルが上昇していることが示唆された。

(2) 通常の培地と高浸透圧培地中でコロニー形成アッセイを行ったところ、高浸透圧培地ではコロニー形成が抑制された。一方、高浸透圧培地で 3 日間培養した細胞を用いて通常の培地中でコロニー形成を行うと、U251MG 細胞株ではコロニー形成率の上昇が観察された。T98G 細胞株では、高浸透圧による前処理はコロニー形成に大きな影響を与えなかった。このことから、培養環境の高浸透圧のコロニー形成能への影響のしかたは、細胞株によって異なっている可能性が示唆された。

(3) 高浸透圧に反応して発現が上昇する分子 NFAT5 について、浸透圧以外の環境因子に

よって発現が変化するかどうか検討したところ、低酸素（1%酸素）下で培養した時に発現の上昇が起こることが明らかとなった。培地を serum free とした時の発現量は変化に乏しかった。

(4) ヒト膠芽腫由来細胞株の栄養欠乏に対する反応については、T98G、U87 細胞株をグルタミン欠乏培地、グルコース欠乏培地で培養したところ、GINS タンパク質(PSF1、PSF2、PSF3、SLD5) の発現の低下を認めた。特にグルタミン欠乏時には、比較的早期より発現低下が始まることが示唆された。

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 1 件)

Ishii A, Kimura T, Sadahiro H, Kawano H, Takubo K, Suzuki M, Ikeda E. Histological Characterization of the Tumorigenic “ Peri-Necrotic Niche ” Harboring Quiescent Stem-Like Tumor Cells in Glioblastoma. PLoS ONE, 査読有, 11:e0147366, 2016, DOI: 10.1371/journal.pone.0147366

[学会発表] (計 0 件)

[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]

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

石井 文彩 (ISHII, Aya)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 5 0 6 3 4 7 4 7

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし