

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16201

研究課題名(和文) 膠芽腫の低酸素誘導S100A4/NMII系によるがん幹細胞化と血管新生機構の解明

研究課題名(英文) A functional role of S100A4/non muscle myosin IIA axis for pro&amp;#8209;tumorigenic vascular functions in glioblastoma

研究代表者

犬飼 円 (Inukai, Madoka)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：10525695

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)：膠芽腫におけるS100A4/NMIIA軸の新たな機能的役割を示唆している。低酸素環境下において、S100A4はNMIIAと相互作用する。これによりNMIIAの活性が阻害され、腫瘍細胞の移動が促進される。S100A4(+)/HIF-1 (+) 膠芽腫細胞によって細胞外VEGFが産生され、S100A4(+)/HIF-1 (-) 腫瘍細胞は、既存の血管を足場として移動する。血管新生により膠芽腫細胞は進展するのである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病理組織標本上で可視化した膠芽腫組織内の血管ニッチの分布を応用して、新規予後予測システム等の臨床病理学的因子を構築することができる。S100A4膠芽腫細胞が血管新生のソースであることを明らかにすることによって、血管新生を基軸とした膠芽腫の新たな腫瘍進展機構を提唱できる。S100A4の血管新生などの新たな分子機能を明らかにすることで、様々な悪性腫瘍の発生・進展過程の解析に応用できる。様々な悪性腫瘍のS100A4/NMIIシグナル系による血管新生をターゲットとした治療戦略に応用することができる。

研究成果の概要(英文)：Our results suggest a novel functional role of the S100A4/NMIIA axis in Glioblastoma. Following severe hypoxia, S100A4 is upregulated and interacts with NMIIA; this inhibits NMIIA activity and thus derepresses tumor cell migration. S100A4(+)/HIF-1 (-) tumor cells are subsequently recruited to, and migrate along, preexisting vessels in the presence of extracellular VEGF released by S100A4(+)/HIF-1 (+) Glioblastoma cells. This in turn results in tumor progression through acceleration of vascularization.

研究分野：Glioblastoma

キーワード：Glioblastoma Hypoxia Vascular S100A4 NM A

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国で年間2千人の患者が発生する膠芽腫は、5年生存率が10%前後と極めて予後不良である。原因の一つに、がん幹細胞の存在があり、微小環境 (ニッチ)にて形成・維持されている。膠芽腫では、低酸素ニッチ・血管ニッチ・浸潤部ニッチが存在し、膠芽腫幹細胞形成に関与するとされるが、その制御を司る分子の同定には至っていない。申請者は先行研究で、膠芽腫組織内の低酸素ニッチ領域の可視化を試みた。その結果、虚血性壊死部周辺に膠芽腫細胞が密に集簇する偽柵状配列部は、HIF (hypoxia inducible factor)-1 や様々な幹細胞マーカーが高発現する領域で、低酸素ニッチであると結論付けた (Inukai et al, Hum Pathol,2015)。腫瘍壊死近傍の小動脈周囲にも HIF-1 陽性膠芽腫細胞を認め、同血管周囲は相対的低酸素領域に反応した血管ニッチである可能性を得た。

また、膠芽腫の悪性度と臨床的予後は、血管に富む特徴と相関している。血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF)が豊富に産生され、VEGFに反応した血管増殖が特徴的である。腫瘍血管は形態的にも機能的にも正常血管とは異なっており、無秩序で透過性が高く、血管壁・内皮等に異常がある。

S100A4はカルシウム依存性結合タンパク質で、様々な悪性腫瘍の細胞増殖・細胞移動・血管新生制御・がん幹細胞マーカーとしての有用性が指摘されている。一般に、S100A4は様々なパートナー分子に結合して非酵素的にその機能を制御する。そのパートナー分子として、non-muscle myosin A (NM A)がある。

### 2. 研究の目的

膠芽腫の腫瘍形成におけるS100A4/NM A関与についてはほとんど知られていない。腫瘍の進展と血管新生におけるS100A4/NM Aの役割を検証した。

### 3. 研究の方法

(1)材料として、臨床検体として北里大学病院にて2008年~2020年の間で外科的に切除された94例の膠芽腫 (Glioblastoma, IDH-wildtype)のホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いた。本研究は、北里大学医学部倫理委員会にて承認を得た (B20-197)。

#### (2)細胞株:

膠芽腫培養細胞のKS-1細胞を使用した。S100A4を標的とするshRNAを用いて、S100A4ノックダウンKS-1細胞 (S100A4の発現が比較的高い)を作成した。低酸素実験では、細胞を37℃, 5%CO<sub>2</sub>下で100µMまたは200µM CoCl<sub>2</sub>で処理した。

(3)抗体と試薬:抗hypoxia-inducible factor (HIF)-1抗体 (BD Biosciences)、anti-aldehyde dehydrogenase (ALDH)1抗体 (BD Biosciences)、抗CD34抗体 (Dako)、抗CD44s抗体 (Dako)、抗glial fibrillary acid protein (GFAP)抗体 (Dako)、抗human smooth muscle actin (SMA)抗体 (Dako)、抗Snail抗体 (Cell Signaling Technology)、抗Slug抗体 (Cell Signaling Technology)、抗Sox2抗体 (Abcam)、抗S100A4抗体 (Abcam)、抗Twist 1抗体 (Abcam)、抗Nestin (Abcam)、抗CD44v6抗体 (Abcam)、抗S100A4抗体 (Proteintech)、抗carbonic anhydrase (CA)9抗体 (Proteintech)、抗NM A抗体 (Proteintech)、抗ZEB 1抗体 (Sigma-Aldrich Chemicals)、抗-actin抗体 (Sigma-Aldrich Chemicals)、Blebbistatin (Toronto Research Chemicals)、cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>) (Toronto Research Chemicals)を購入した。

(4)免疫組織染色:マイクロウェーブ加熱法とポリマー免疫複合体 (Envision, Dako)法の組み合わせで行った。所見の評価は、細胞質または核の陽性細胞を、その割合と免疫強度に基づいてスコアリングした。血管は、ランダムに選んだ高倍率5視野 (hyper field)でのCD34陽性血管数を計測した。

(5)免疫蛍光法:細胞を抗S100A4抗体・抗SMA抗体・抗GFAP抗体をインキュベートした。

(6)In situ proximity ligation assay (PLA)法: Duilink Detection kit と PLUSoyobi MINUS プローブを用いて、細胞を抗S100A4抗体・抗NM A抗体とインキュベートした。

(7)RNAscope assay for VEGFA mRNA in situ hybridization: VEGFA mRNAの発現をRNAscope assayを用いて解析した。

(8)Reverse transcription (RT)-PCR: cDNAは2µgのtotal RNAから合成した。RT-PCRによる増幅は、特定のプライマーを用いて同一の反応から合成したcDNA同士の比較を可能にするため、指数関数的な段階で行った。

(9)Western blot assayと免疫沈降: Western blot assayは、RIPA bufferで抽出・調整したタンパク質を、SDS-PAGEで展開後、PVDF膜へ転写した。PVDF膜はブロッキングを行い、各タンパク質に対する一時抗体溶液に浸して一晩静置、次に二次抗体に浸した後にシグナルの検出を行った。免疫沈降は、1mM CaCl<sub>2</sub>の存在下で、IP bufferで溶解させた。抗S100A4抗体・抗NM A抗体とインキュベートし、抗S100A4抗体・抗NM A抗体を用いてWestern blot assayを実施した。

(10)創傷治癒アッセイ: 200µlチップでスクラッチ傷をつけ、その面積をImageJソフトウェア

バージョン 1.41 (NIH)により解析した。

(11)Migration assay : 径 8  $\mu$ m の 24 ウェルトランスウェルチャンバーを用いて測定した。

(12)TCG データ解析 : 144 例の S100A4 と NM A の mRNA 発現データ (RNA Seq V2 PSEM)をキャンサーゲノミクスバイオポータルから抽出し (<http://www.cbioportal.org/>)、全生存期間 や無増悪期間との相関を検討した。

(13)統計情報 : 比較データは、Mann-Whitney U-test、Spearman の相関係数を用いて解析した。統計学的有意差のカットオフは  $p < 0.05$  とした。

#### 4 . 研究成果

(1)膠芽腫組織内壊死部周囲の低酸素領域の膠芽腫細胞では、低酸素マーカーである HIF-1 , CA 発現と共に、S100A4 や NM A 発現を多数認めた。

(2)塩化コバルトによる疑似低酸素環境下で、膠芽腫培養細胞 KS-1 は、低酸素マーカーである HIF-1 の発現増加と共に、S100A4 の増加を認めた。

(3)S100A4 ノックダウン KS-1 細胞は、Snail, Slug 等の間葉系マーカー発現の低下と細胞遊走能の低下を認めた。Blebbistatin によって NM A 機能抑制した KS-1 細胞は細胞遊走能が上昇した。

(4)地図状壊死周囲の低酸素領域において、膠芽腫細胞の細胞質で高頻度に S100A4/NM A 結合が生じた (図 1)。偽柵状配列壊死周囲では S100A4/NM A 結合は乏しかった。

(5)地図状壊死周囲では、低酸素マーカーである HIF-1 の高発現領域の外側に、CD34 陽性血管の増生を認めた。その血管周囲・血管壁に接して、S100A4/SMA 陽性の腫瘍細胞を認めた。血管壁は S100A4/NM A 結合腫瘍細胞で構成されていた (図 2, 3)。

(6)地図状壊死周囲では、低酸素マーカーである HIF-1 の高発現領域に一致して、血管新生因子 VEGFA mRNA の発現を認めた。塩化コバルトによる疑似低酸素環境下で、膠芽腫培養細胞 KS-1 は、VEGFA の発現増加を認めた。

(7)膠芽腫の S100A4 発現は、無増悪期間・全生存期間を短縮させ、予後不良因子であった。NM A 発現との関連はなかった。

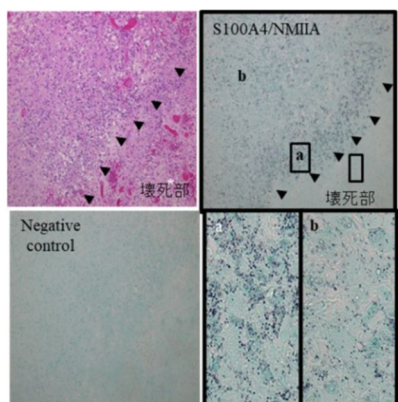


図 1

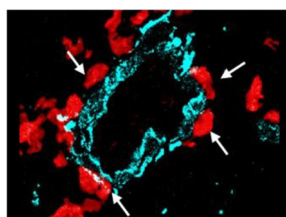


図 2. 小動脈周囲の S100A4 陽性膠芽腫細胞 (矢印)

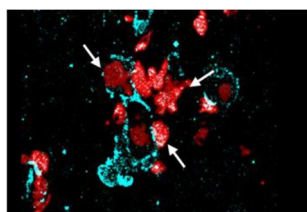


図 3. 毛細血管周囲の S100/SMA 陽性膠芽腫細胞 (矢印)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Madoca Inukai	4. 巻 Apr 7;20(1)
2. 論文標題 A functional role of S100A4/non-muscle myosin IIA axis for pro-tumorigenic vascular functions in glioblastoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Commun Signal .	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12964-022-00848-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石塚結喜、犬飼 円、三枝 信
2. 発表標題 膠芽腫におけるS100A4/ミオシン 9 axisの機能解析
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------