

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592164

研究課題名(和文) HIF-1 発現幹細胞の動態・可視化に基づくグリオーマ病理組織診断基準の確立

研究課題名(英文) Establishment of histopathological diagnostic criteria based on the visualization of HIF-1 α -expressing quiescent stem-like tumor cells

研究代表者

池田 栄二 (IKEDA, Eiji)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30232177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：グリオーマは、いまだ予後不良な腫瘍である。本研究において、低悪性度グリオーマには存在せず最も悪性度の高い膠芽腫特異的に存在する細胞として、HIF-1 α を発現し静止期にある腫瘍幹細胞が特定された。それらは虚血性壊死巣と血管の間の領域(ニッチ)に局在していた。そのニッチを培養膠芽腫細胞spheroid内に再現したところ、HIF-1 α 発現静止期腫瘍幹細胞が出現し、spheroidの造腫瘍能が増強された。本研究により特定された腫瘍幹細胞とそのニッチは、グリオーマの予後不良な病態の中核を担うと考えられ、その可視化に基づく新たな病理組織診断基準の確立は、グリオーマの予後改善への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Despite advances in therapy, the clinical course of glioma still remains unfavorable. In this study, we aimed to determine the therapeutic targets for improving the prognosis of glioma. A small subpopulation of HIF-1 α -expressing quiescent stem-like tumor cells were successfully specified and visualized exclusively in glioblastoma, the highest grade of glioma, as the candidate for real culprit of its unfavorable prognosis. These cells were concentrated in the zone between a large ischemic necrosis and blood vessels, suggesting that moderately hypoxic microenvironment is their niche. By modelling their niche with spheroids of cultured glioblastoma cells, the emergence of HIF-1 α -expressing quiescent stem-like tumor cells was shown to enhance the tumorigenicity. Therefore, a small subpopulation of tumor cells and their niche which were visualized in this study must be the foci of new histopathological diagnostic criteria reflecting real therapeutic targets to eradicate glioma cells.

研究分野：病理学

キーワード：グリオーマ 腫瘍幹細胞 低酸素 ニッチ

1. 研究開始当初の背景

グリオーマは、高い浸潤能とともに放射線療法・化学療法抵抗性を示す予後不良な難治性腫瘍である。手術による摘出が治療の根幹をなすが、グリオーマ患者の根治が困難である理由として、外科的治療後の高率な再発が挙げられる。病理組織学的検査にて腫瘍が全て摘出されたと判断される症例においても、高率に再発をきたす。こうしたグリオーマの予後不良は、幹細胞性格を有する少数の腫瘍細胞の動態に規定されることが提唱されているが、それら細胞の特定には至っていない。

腫瘍幹細胞は、胎児組織を含む正常組織の構築に関与する幹細胞と同様、自己複製能と多分化能という特性を有する細胞として認識されている。この腫瘍の発生や増殖の原因となる腫瘍幹細胞の概念自体は古く、約150年前には既に提唱されていたが、1990年代より、再度、その概念が注目されるようになった。腫瘍幹細胞が初めて特定されたのは白血病だが、その後、種々の固形腫瘍において、幹細胞としての性格を有する腫瘍細胞の存在が示された。腫瘍幹細胞は、全腫瘍細胞の極一部にすぎないが、免疫不全マウスを用いた研究から、その極一部である幹細胞のみが造腫瘍能を有しており、放射線療法・化学療法などに対する抵抗性をはじめとした腫瘍の生物学の根幹を担っている細胞と考えられている。従って、腫瘍の治療成績を向上させるためには、腫瘍幹細胞を特定し、その動態を把握することが必須といえる。さらに、組織内に存在する幹細胞には階層性があり、より階層の上位に位置する未分化な幹細胞が組織再構築の主役となるため、グリオーマ治療成績の向上には、階層上位にある組織再構築能の高いグリオーマ幹細胞を特定し除去することが重要となる。

今日まで、腫瘍幹細胞の特定を目的とした多くの研究成果が国内外から報告されている。特に、CD133のマーカーとしての有用性については多くの研究者が注目し解析を行ってきた。しかしながら、グリオーマにおいては、CD133陽性細胞のみならずCD133陰性細胞にも幹細胞としての特性が証明されており、グリオーマ幹細胞の特異的マーカーとはなり得ない可能性が高い。その他、ALDH1などの多くの分子が、腫瘍幹細胞マーカーとして報告されているが、幹細胞の階層性を考慮に入れた解析は少なく、従って、腫瘍の病態を規定する主役となる高い組織再構築能を有する幹細胞の表現型(発現マーカー)は特定されていない。また、それら階層上位の腫瘍幹細胞が潜む組織内微小環境(ニッチ)についても確定的な報告はなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、グリオーマの予後を規定する階層上位の腫瘍幹細胞の表現型を特定し、それらを組織切片上にて可視化する系を確立する。この可視化により、それら腫瘍幹細胞が潜むニッチも明らかにする。そして、グリオーマの真の病態を反映するとともに、治療標的を明確に描出

する新たな組織診断基準を提唱し、グリオーマ患者の予後改善に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)臨床検体

山口大学医学部附属病院にて手術により摘出された星状膠細胞腫40例[grade II, 10例: grade III, 9例: grade IV(膠芽腫 glioblastoma) 21例]を検索対象とした。診断は、WHO Classification(2007)に準拠した。摘出腫瘍組織は、中性緩衝ホルマリンにて固定後、パラフィン包埋切片を作製した。なお、本研究計画は、山口大学医学部附属病院研究及び人を対象とする医学系研究等倫理審査委員会にて承認され、個々の症例については患者様のインフォームドコンセントを得ている。

(2)幹細胞性の指標

腫瘍細胞の幹細胞性については、SOX2およびNANOGの発現を指標とした。

(3)静止期の指標

本研究では、RNA polymerase II (RNAPII)のC末端繰り返し配列C-terminal domain (CTD) [Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7]に存在するSer2の脱リン酸化状態を、静止期の指標とした。Ser2のリン酸化状態(RNAPII-S2P)により、静止期細胞と増殖期細胞の識別のみならず、静止期にある細胞を最終分化細胞あるいは老化細胞から鑑別することが可能とされている。RNAPII-S2Pを特異的ポリクローナル抗体にて解析し、リン酸化状態の消失もしくは減弱(RNAPII-S2P^{low})した細胞を、静止期にある細胞と判断した。

(4)免疫染色-1(単染色)

摘出された腫瘍組織のパラフィン包埋切片について、脱パラフィンおよび抗原賦活化後、下記の1次抗体、2次抗体を用い染色を行った。DABにて発色後、ヘマトキシリンにて核染色を行った。

[SOX2]

1次抗体: Goat polyclonal antibody against SOX2 (Santa Cruz Biotechnology)

2次抗体: Anti-goat immunoglobulins/HRP (DAKO)

[NANOG]

1次抗体: Goat polyclonal antibody against NANOG (Novus Biologicals)

2次抗体: Anti-goat immunoglobulins/HRP (DAKO)

[HIF-1 α]

1次抗体: Mouse monoclonal antibody

against HIF-1 α (BD Biosciences)
 2次抗体: EnVision+ (DAKO)
 [RNAPII-S2P]
 1次抗体: Phosphorylation-specific rabbit polyclonal antibody against RNAPII-S2P (Abcam)
 2次抗体: EnVision+ (DAKO)

(5)免疫染色-2(蛍光抗体法による多重染色)
 摘出された腫瘍組織を材料とした3重染色 [SOX2/HIF-1 α /RNAPII-S2P もしくは NANOG/HIF-1 α /RNAPII-S2P] には、下記の抗体を用いた。核染色は、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) にて行った。

[SOX2]

1次抗体: Goat polyclonal antibody against SOX2

2次抗体: Anti-goat immunoglobulins/Alexa Fluor 546 (Molecular Probes) もしくは Anti-goat immunoglobulins /Alexa Fluor 633 (Molecular Probes)

[NANOG]

1次抗体: Goat polyclonal antibody against NANOG

2次抗体: Anti-goat immunoglobulins/Alexa Fluor 546 (Molecular Probes) もしくは Anti-goat immunoglobulins /Alexa Fluor 633 (Molecular Probes)

[HIF-1 α]

1次抗体: Mouse monoclonal antibody against HIF-1 α

2次抗体: Anti-mouse immunoglobulins /Biotin



Streptavidin/Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)

[RNAPII-S2P]

1次抗体: Phosphorylation-specific rabbit polyclonal antibody against RNAPII-S2P

2次抗体: Anti-rabbit immunoglobulins /Alexa Fluor 635 (Molecular Probes) もしくは Anti-rabbit immunoglobulins /Alexa Fluor 405 (Molecular Probes)

(6)免疫染色-3(色素を用いた多重染色)
 摘出された腫瘍組織、培養 spheroid (下記の 'sphere forming assay' の項参照)を材料とし、3重染色 [SOX2/HIF-1 α /RNAPII-S2P もしくは NANOG/HIF-1 α /RNAPII-S2P] を行った。手順は下記の通りである。

①Goat polyclonal antibody against SOX2 もしくは Goat polyclonal antibody against NANOG と反応

②Anti-goat immunoglobulins/alkaline phosphatase (AP) (Jackson ImmunoResearch

Laboratories) と反応

③Vulcan Fast Red (Biocare Medical, Concord, CA) にて発色

④Denaturing Solution (Biocare Medical) を用いて抗体を除去

⑤Mouse monoclonal antibody against HIF-1 α と反応

⑥Phosphorylation-specific rabbit polyclonal antibody against RNAPII-S2P と反応

⑦Anti-mouse immunoglobulins/AP と Anti-rabbit immunoglobulins/HRP のカクテル(Biocare Medical) と反応

⑧Perma bule/AP (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA) [for HIF-1 α] および DAB [for RNAPII-S2P] にて発色

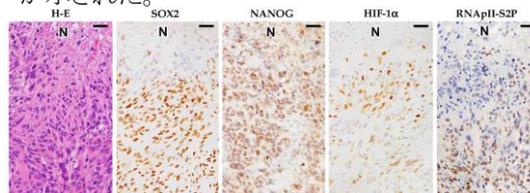
(7)Sphere forming assay

ヒト膠芽腫細胞株 T98G (American Type Culture Collection より購入)を、B-27 supplement (Gibco)、20 ng/ml epidermal growth factor、20 ng/ml basic fibroblast growth factor を添加した無血清 Dulbecco's modified Eagle medium/F12 培地にて浮遊培養し、spheroid (径 400-800 μ m) を作製した。得られた spheroid を正常酸素環境下 (Normoxia: 5% CO₂, 95% atmospheric air) もしくは低酸素環境下 (Hypoxia: 5% CO₂, 5% O₂ balanced with N₂) にて、9 時間あるいは 24 時間培養した後、限界希釈法にて、各々の培養条件下の spheroid 構成細胞が有する sphere 形成能を定量化した。

4. 研究成果

(1)膠芽腫(星状膠細胞腫 grade IV)組織内には HIF-1 α 陽性静止期幹細胞 [SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNAPII-S2P^{low/-} 細胞、NANOG⁺ HIF-1 α ⁺ RNAPII-S2P^{low/-} 細胞] が存在する。

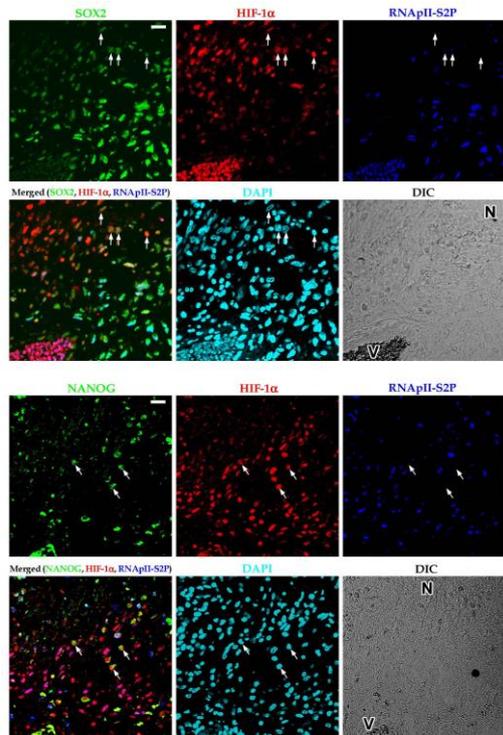
①膠芽腫における SOX2、NANOG、HIF-1 α の発現および RNAPII の Ser2リン酸化状態 (RNAPII-S2P) を免疫染色(単染色)にて検索した(図1)。SOX2 および NANOG は、高頻度に腫瘍細胞の核に陽性所見が得られた。虚血性壊死巣周囲には、核に HIF-1 α 陽性所見を示す腫瘍細胞とともに、RNAPII-S2P が抑制された静止期にある腫瘍細胞の存在が示された。



(図1) 膠芽腫組織における SOX2、NANOG、HIF-1 α の発現および RNAPII-S2P。

②膠芽腫組織における HIF-1 α 陽性静止期幹細胞の存在の有無、その局在について、免疫染色(蛍光抗体法)による多重染色を行い検索した(図2)。少数であるが、SOX2⁺

HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low/-} の形質を示す腫瘍細胞の存在が確認され、それらは虚血性壊死巣近傍に局在する傾向がみられた(図2上段の矢印)。SOX2をNANOGに変えた検索にて、NANOG⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low/-} の形質を示す腫瘍細胞についても、SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low/-} と同様の知見が得られた(図2下段の矢印)。

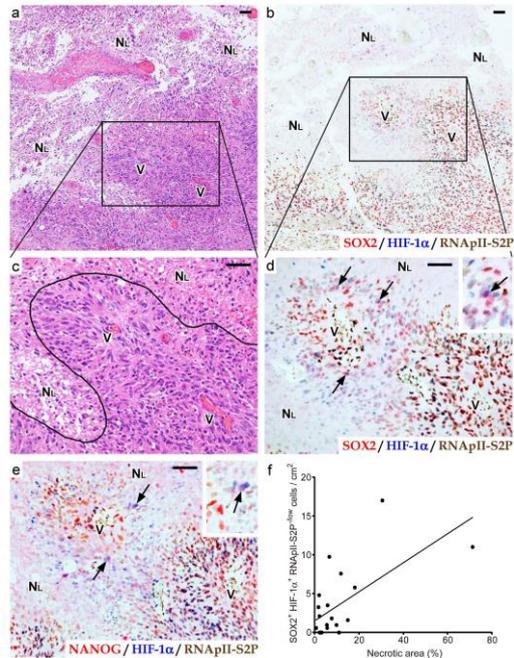


(図2) 上段は、膠芽腫組織における SOX2 (green)、HIF-1 α (red) の発現および RNApII-S2P (blue)。下段は、膠芽腫組織における NANOG (green)、HIF-1 α (red) の発現および RNApII-S2P (blue)。N, 虚血性壊死巣; V, 血管; DAPI, 核染色; DIC, 微分干渉像

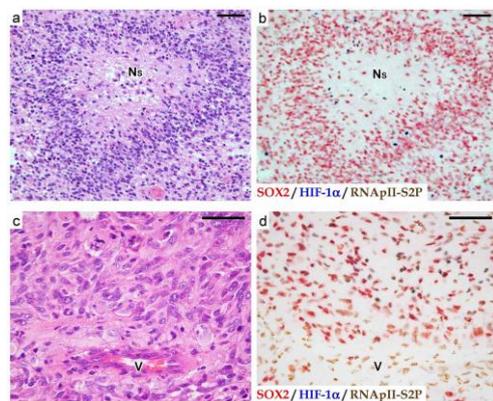
(2)星状膠細胞腫 (grade II、grade III、grade IV) では、HIF-1 α の制御下にある静止期腫瘍幹細胞は、膠芽腫 (grade IV) 組織の虚血性壊死巣近傍に特異的に存在する。

①膠芽腫組織内における SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low/-} 細胞、NANOG⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low/-} 細胞の局在を詳細に検討するため、Vulcan Fast Red、Perma bule/AP および DAB 色素を用いた多重染色を行い明視野下に解析した。HIF-1 α ⁺ 細胞は虚血性壊死巣周囲に認められた。RNApII-S2P については、ほとんどの腫瘍細胞は RNApII-S2P⁺ 所見を示したが、虚血性壊死巣近傍の腫瘍細胞は、RNApII-S2P^{low/-} の表現型を示しており静止期であると判断された。そして、HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low/-} 細胞の極少数が SOX2⁺ および NANOG⁺ であり、SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low/-} 細胞(図3a-d、核が紫色に染色される細胞、矢印)、NANOG⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low/-} 細胞(図3a,c,e、核が紫色に染色される細胞、矢印)であった。SOX2⁺

HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low/-} 細胞および NANOG⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low/-} 細胞は、HIF-1 α の制御下で静止期状態に維持された腫瘍幹細胞と考えられる。それらは、虚血性壊死巣近傍に局在する傾向がみられたため、腫瘍組織に占める虚血性壊死巣の面積比を算出し、SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low/-} 細胞の出現頻度との相関を解析した。その結果、両者には正の相関が認められ(図3f)、HIF-1 α の制御下にある静止期腫瘍幹細胞が、虚血性壊死巣近傍の組織微小環境と密接に関連して出現することが示唆された。



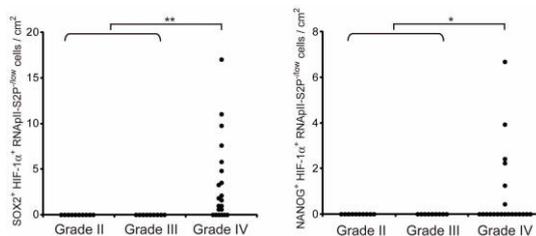
(図3) 膠芽腫組織における HIF-1 α 制御下静止期腫瘍幹細胞の出現と局在。少数であるが、SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low/-} 細胞 (b, d、矢印) および NANOG⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low/-} 細胞 (e、矢印) が出現し、虚血性壊死巣の近傍に局在する傾向がみられる。腫瘍組織に占める虚血性壊死巣の面積比と SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low/-} 細胞の出現頻度には正の相関がみられる(図3f)。N_L, 虚血性壊死巣、V, 血管。



(図4) 膠芽腫組織の柵状配列を伴う小壊死巣 (N_s) 近傍および非壊死領域における HIF-1 α 制御下静止期腫瘍幹細胞の探索。

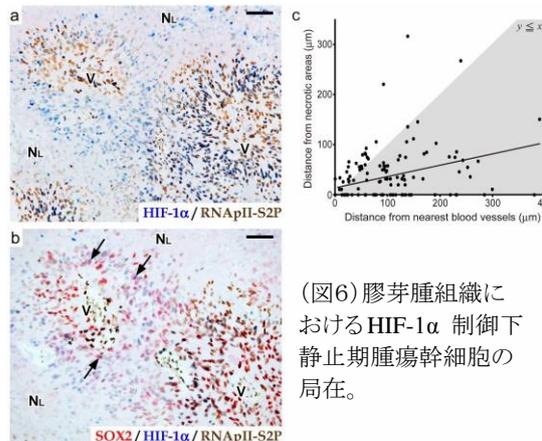
膠芽腫組織にみられる壊死巣には、比較的大型の虚血性壊死巣(図3、 N_L)とともに、腫瘍細胞の柵状配列を伴う小壊死巣(図4a、 N_S)の2種類が知られているが、後者の近傍には $SOX2^+ HIF-1\alpha^+ RNApII-S2P^{low/-}$ 細胞は証明されなかった(図4a,b)。また、壊死のない領域にも $SOX2^+ HIF-1\alpha^+ RNApII-S2P^{low/-}$ 細胞は見出されなかった(図4c,d)。

②星状膠細胞腫 grade II および grade III の組織内における $HIF-1\alpha$ 制御下静止期腫瘍幹細胞の存在について検索した。その結果、 $SOX2^+ HIF-1\alpha^+ RNApII-S2P^{low/-}$ 細胞、 $NANOG^+ HIF-1\alpha^+ RNApII-S2P^{low/-}$ 細胞ともに、星状膠細胞腫 grade II および grade III の組織内には検出されず、膠芽腫に特定に出現する細胞であることが示された(図5)。



(図5) 星状膠細胞腫 grade II、grade III および grade IV (膠芽腫)における $HIF-1\alpha$ 制御下静止期腫瘍幹細胞の存在。

③膠芽腫組織内における $SOX2^+ HIF-1\alpha^+ RNApII-S2P^{low/-}$ 細胞の局在について、形態計測により解析した。 $SOX2^+ HIF-1\alpha^+ RNApII-S2P^{low/-}$ 細胞が、膠芽腫組織内の虚血性壊死巣と血管の間に局在する傾向がみられたため、それら細胞の虚血性壊死巣からの距離および血管からの距離を計測した。その結果、 $SOX2^+ HIF-1\alpha^+ RNApII-S2P^{low/-}$ 細胞は、虚血性壊死巣と血管からの距離に規定されるが、より壊死巣に近い領域に局在することが示された(図6)。



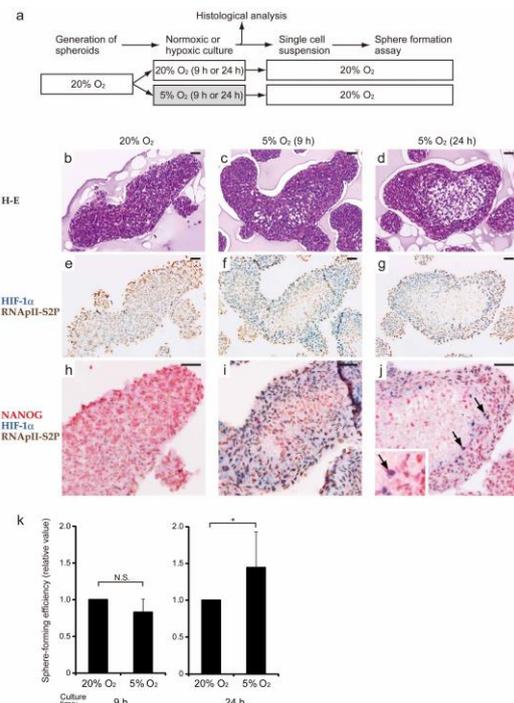
(図6) 膠芽腫組織における $HIF-1\alpha$ 制御下静止期腫瘍幹細胞の局在。

以上の研究成果(1)(2)は、低酸素環境下で壊死に陥る領域の近傍に、腫瘍細胞を静止期に導入・維持するとともに幹細胞性を賦与する組織微小環境(ニッチ)が形成されることを示唆す

る。それらのニッチが膠芽腫に特異的であることから、膠芽腫の予後不良な病態の中核を担っている可能性が高い。そこで我々は、培養膠芽腫細胞 spheroid に同質のニッチを再現し、膠芽腫の病態における $HIF-1\alpha$ 制御下静止期腫瘍幹細胞とそのニッチの意義について解析を進めた。

(3)膠芽腫細胞 spheroid 内において、適度な低酸素環境下にある領域に $NANOG^+ HIF-1\alpha^+ RNApII-S2P^{low/-}$ 細胞が出現し、その sphere 形成能を亢進させる。

ヒト膠芽腫細胞株 T98G を浮遊培養し spheroid を形成させた。得られた spheroid を正常酸素環境下(20% O_2)もしくは低酸素環境下(5% O_2)にて9時間あるいは24時間培養した(図7a)。低酸素環境下(5% O_2)にて24時間培養した spheroid では、中心部が壊死傾向を示し、その壊死傾向領域と表層部の中間部に $NANOG^+ HIF-1\alpha^+ RNApII-S2P^{low/-}$ 細胞が出現した(図7d,g,j)。正常酸素環境下(20% O_2)もしくは低酸素環境下(5% O_2)9時間の培養条件では、中心部の壊死傾向および $NANOG^+ HIF-1\alpha^+ RNApII-S2P^{low/-}$ 細胞の出現はともに認められなかった(図7b,c,e,f,h,i)。そして、 $NANOG^+ HIF-1\alpha^+ RNApII-S2P^{low/-}$ 細胞が出現する条件下の spheroid に、sphere 形成能の亢進が示された。



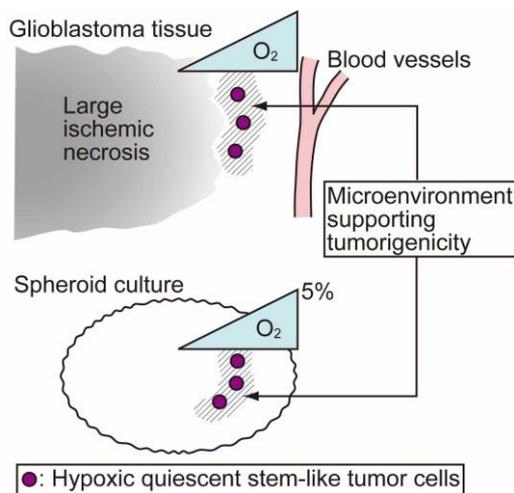
(図7) 正常酸素環境下および低酸素環境下の膠芽腫細胞 spheroid 内における $HIF-1\alpha$ 制御下静止期腫瘍幹細胞の出現と sphere 形成能。

(4)まとめ

ヒト星状膠細胞腫組織について、 $SOX2^+ HIF-1\alpha^+ RNApII-S2P^{low/-}$ あるいは $NANOG^+$

HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low/-} の表現型をもとに、適度な HIF-1 α 発現により制御される静止期腫瘍幹細胞を探索した。その結果、①それらが膠芽腫組織特異的に存在していること、②虚血性壊死巣と血管の両者に規定されるが、より壊死巣に近い領域(ニッチ)に局在することが示された。②のニッチを培養膠芽腫細胞 spheroid 内に再現し、HIF-1 α 制御下静止期腫瘍幹細胞の出現を伴う spheroid の作製に成功し、その spheroid の sphere 形成能亢進が示された。

以上の結果から、本研究において、膠芽腫組織内に可視化された HIF-1 α 制御下静止期腫瘍幹細胞とそのニッチは、膠芽腫の予後不良な病態の中核を担っている可能性が高い。したがって、本研究成果をもとに、膠芽腫の真の病態を反映し、治療標的を明確に描出する新たな組織診断基準の確立が期待される。



(図8) 膠芽腫の病態を規定する腫瘍内ニッチ

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

- ①石井文彩、木村徳宏、貞廣浩和、河野裕夫、田久保圭誉、鈴木倫保、池田栄二：膠芽腫の予後不良な病態に關与する微小環境の可視化。第 11 回日本病理学会カンファレンス、2014 年 8 月 1 日～2 日、六甲山ホテル(兵庫県・神戸市)
- ②木村徳宏、石井文彩、池田栄二：低酸素と腫瘍幹細胞 -腫瘍切除標本からの考察-。第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 24 日～26 日、広島国際会議場・ANA クラウンプラザホテル広島(広島県・広島市)
- ③池田栄二、石井文彩：HIF-1 α 発現腫瘍幹細胞と低酸素ニッチ。第 102 回日本病理学会総会、2013 年 6 月 6 日～8 日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(北海道・札幌市)

[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：
出願年月日：
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

池田 栄二 (IKEDA, Eiji)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30232177

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

鈴木 倫保 (SUZUKI, Michiyasu)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80196873