

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460434

研究課題名(和文)スフェロイド培養法と病理組織学の対比から迫る膠芽腫の腫瘍内微小環境の病態

研究課題名(英文) Analysis of pathophysiology of intratumoral microenvironments in glioblastoma using spheroid culture and histopathology

研究代表者

木村 徳宏 (KIMURA, Tokuhiko)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40445200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫はきわめて予後不良な脳腫瘍であり、病態の解明が急務である。壊死の存在は膠芽腫の組織像の特徴であるが、壊死周囲などの微小環境を試験管内で再現する実験法は確立していない。我々は今回、ヒト膠芽腫由来細胞株(T98G、U87等)を用い、細胞をスフェロイド(細胞集塊)の形で培養する方法を確立し、膠芽腫の組織像と比較した。スフェロイドの中心部では、膠芽腫の壊死巣に類似した細胞死領域が出現し、それは低酸素とグルコース欠乏を基盤としていることが明らかとなった。また、膠芽腫細胞において、低酸素、グルコース欠乏により発現が低下する幹細胞関連タンパク質としてPSF1を見出した。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is one of the most intractable neoplasms of the brain, and understanding its pathophysiology is important. Although the presence of necrosis is characteristic of glioblastoma, the in vitro experimental methods for modeling intratumoral microenvironment around necrosis have not been established. In this study, we established the method for culturing human glioblastoma cell lines as spheroids (cell clusters), and compared their histological findings with those of glioblastoma tissues. The area of cell death resembling necrotic foci of glioblastoma tissues emerged at the center of the spheroids. The cell death was found to be based on hypoxia and glucose shortage. We also found that PSF1, a protein related to stem-cell functions, was down-regulated by hypoxia and glucose shortage in glioblastoma cells.

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

膠芽腫 (glioblastoma) は代表的な脳腫瘍のひとつであり、神経膠腫 (glioma) の中で最も悪性度が高く、悪性度のグレードである WHO grade は IV に分類されている。その治療はきわめて困難で、手術・化学療法・放射線療法などの集学的治療にもかかわらず、2年生存率は5%以下というのが現状であり、この腫瘍の病態の解明が急務である。

膠芽腫の病理組織像の特徴は、アストロサイト様の腫瘍細胞が高い細胞密度で浸潤性に増殖し、壊死や微小血管増殖を伴うことである。特に、壊死と微小血管増殖は、びまん性星細胞腫 (WHO grade II) や退形成性星細胞腫 (WHO grade III) には見られないもので、膠芽腫の組織像あるいは病態の際立った特色と考えられる。膠芽腫の腫瘍組織の中には、血流が豊富に供給される部位がある一方で、血流が不足し低酸素・低栄養状態となり壊死に陥る部位がある。血管と壊死巣の間の組織には、酸素や栄養分の濃度勾配がある。このように、ひとつの腫瘍の中に様々な条件の微小環境が存在しており、それぞれの部位に位置する腫瘍細胞は微小環境の影響を強く受けて性質を変化させ、その環境にある程度適応していると考えられる。このような腫瘍内微小環境の多様性が、腫瘍細胞の性質の多様性と直結しており、膠芽腫の病態の中心をなすとともに、治療抵抗性の大きな原因となっていると推測される。

近年、腫瘍の病態を幹細胞生物学の視点から解明しようとする研究が発展しつつある。フローサイトメトリーを使用した研究により、ヒト膠芽腫の腫瘍細胞の中に、神経幹細胞と類似したマーカー分子発現を示す細胞が比較的少数含まれており、自己複製能・多分化能・腫瘍形成能を持っているとする報告が多くなされ、腫瘍幹細胞 (がん幹細胞) の概念が注目されている。膠芽腫では、腫瘍幹細胞を維持している微小環境 (幹細胞のニッチ) として血管周囲ニッチや低酸素性ニッチなどが提唱されているが、いまだ確立には至っていない。正常組織の幹細胞 (神経幹細胞、造血幹細胞など) とは異なり、腫瘍幹細胞とそれ以外の腫瘍細胞との区別は絶対的なものではなく、腫瘍細胞の置かれた微小環境が特定の条件を満たすと幹細胞の役目をする細胞となる (すなわち環境により stemness が亢進・低下する) というモデルも考えられている。これらのことから、腫瘍内の多様な微小環境の中で、どの条件がグリオーマ幹細胞機能に重要かを解明することが、膠芽腫の病態を理解し、腫瘍を制御するために必須であるとわれわれは考えている。研究分担者の池田らは、造血組織において、造血幹細胞が低酸素環境に存在しており、低酸素に应答する分子 HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1) が適度に発現することが幹細胞の機能に重要と報告してきた (Takubo K et al. Cell Stem Cell 7:391-402, 2010)。これを

踏まえ、われわれは、酸素濃度などの微小環境による幹細胞機能調節が、造血系だけでなく膠芽腫の腫瘍組織においても行われていると考えるに至った。

今までのグリオーマ幹細胞研究は、手術で切除した腫瘍組織を用いた免疫組織化学的な研究と、細胞培養による in vitro の実験に分断されてしまっている傾向があり、in vitro の知見がどこまで実際の腫瘍の病態を反映しているのか不明な点が多い。その原因は、実際の腫瘍内の多様な微小環境 (あるいは微小環境因子の濃度勾配) を試験管内で再現する実験系がなく、in vitro の知見と病理組織学的所見を有機的に統合できなかったためと思われる。そこでわれわれは、従来、単に幹細胞培養法・アッセイ法と見なされてきたニューロスフェア (neurosphere) アッセイに着目し、これを改変したスフェロイド (spheroid) 培養法を新たに開発しつつある。この培養法により、膠芽腫の細胞株から形成されたスフェロイド (細胞集塊) を組織学的に観察すると、培養条件により中心部に壊死巣が出現するなど、膠芽腫の病理組織像の再現が可能となってきている。本研究では、このスフェロイド培養法を活用することにより、腫瘍幹細胞の機能に重要な腫瘍内微小環境因子を解明することを目指す。

2. 研究の目的

(1) 膠芽腫の培養細胞のスフェロイド培養法を確立し、再現性よく、実際の膠芽腫の病理組織像に類似した組織所見を示すスフェロイドを作製する方法を開発する。

(2) スフェロイドを低酸素や種々の栄養条件で培養することにより、スフェロイド内部の微小環境の濃度勾配を変化させ、スフェロイドの組織像がどのように変わるか検討する。それによって、実際の膠芽腫の病理組織像を最もよく反映する培養条件を明らかにする。

(3) スフェロイドと、膠芽腫切除検体の組織切片を用いて、幹細胞マーカー等の免疫染色を行い、陽性細胞の分布の類似性・特徴を調べ、その生物学的意義を検討する。

3. 研究の方法

(1) 膠芽腫細胞株を用いたスフェロイド培養法の確立

ヒト膠芽腫由来細胞株 T98G、U87、A-172、U251MG、YKG-1 を使用した。培養ディッシュを $2\text{mg}/\text{cm}^2$ の poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (polyHEMA) でコーティングし、種々の細胞数の上記の細胞を播種し培養した。経時的に観察し、スフェロイドが形成される過程を調べた。培地は、10%FBS含有MEM培地や、B-27、EGF、basic FGF を添加したDMEM/F-12培地を使用した。形成されたスフェロイドを10%ホルマリンで固定後、パラフィン切片を作製し組織学的に観察した。これらの検討により、組織学的観察に適したスフ

ェロイドが再現性よく形成される培養条件を明らかにした。

(2) 酸素濃度、培地によるスフェロイドの組織像の変化

上記のようにスフェロイドを形成させ、マルチガスインキュベーターを使用して酸素濃度 1~5%の低酸素条件下で培養した。また、培地として、10%FBS 含有 MEM 培地、10%FBS 含有 DMEM/F-12 培地、10%FBS 含有 MEM 培地にグルコースを 3151mg/l となるように加えたものを用いて、スフェロイド培養を行った。培養後のスフェロイドの組織像を検討した。

(3) スフェロイド、膠芽腫切除検体の組織切片を用いた免疫染色

スフェロイド、膠芽腫切除検体のパラフィン切片を用い、NANOG、PSF1 などの免疫染色を行った。

(4) 低酸素、グルコース欠乏による PSF1 発現の変化

T98G 細胞株を、低酸素、グルコース欠乏の各条件で単層培養し、PSF1 分子の発現を定量 RT-PCR 法、Western blot 法により検討した。

4. 研究成果

(1) 膠芽腫細胞株を用いたスフェロイド培養法の確立

まず、T98G、U87 細胞株を用いて、スフェロイド培養法の確立を行った。polyHEMA コーティングディッシュに細胞を 5×10^4 個/cm² の密度で播種すると、3 日以内に径 400~800 μm のスフェロイドが多数、再現性よく形成されることがわかった。一方、細胞密度を数千個/cm² 以下とすると、形成されるスフェロイドの径は著明に減少した。培地に関しては、10%FBS 含有 MEM 培地、B-27、EGF、basic FGF を添加した DMEM/F-12 培地のいずれにおいても、スフェロイドの形成は可能であった。また、A-172、U251MG、YKG-1 細胞株においても、同様の方法によりスフェロイドの形成が可能であった。

形成されるスフェロイドの組織像は細胞株によって特徴があり、T98G は中心部に細胞死(組織像は壊死に似ている)を起こしやすい一方で、U87、A-172 は細胞死を比較的起こしにくい傾向が見られた。U251MG はスフェロイドの大きさが小さい傾向があった。YKG-1 のスフェロイドでは細胞間の接着がゆるく、透き間のあるスフェロイドが形成された。スフェロイド培養の後、個々の細胞に解離させ単層培養を行うと、少なくとも 3 回の継代が可能であり、スフェロイド培養の過程で細胞が増殖能を失っていないことが示唆された。

(2) 酸素濃度、培地によるスフェロイドの組織像の変化

低酸素(1~5%酸素)条件下でスフェロイド培養を行うと、スフェロイド中心部に細胞死が起こりやすくなった。一方、培地として 10%FBS 含有 MEM 培地を用いた場合には、T98G のスフェロイドは通常酸素濃度においても中心部に細胞死を起こしたが、10%FBS 含有

DMEM/F-12 培地を用いると細胞死が抑制された。DMEM/F-12 培地は MEM よりグルコースを多く含む(3151mg/l)ため、MEM にグルコースを加えて 3151mg/l とした培地に 10%FBS を加えてスフェロイド培養を行ったところ、細胞死の軽減が観察された。

これらのデータから、スフェロイド中心部に出現する細胞死は低酸素状態とグルコース欠乏を基盤として起こる可能性が示唆された。

(3) スフェロイド、膠芽腫切除検体の組織切片を用いた免疫染色

幹細胞マーカーのひとつである NANOG について検討すると、T98G のスフェロイドでは多くの細胞が NANOG 陽性となり、膠芽腫切除標本の組織切片での所見と類似していた。

幹細胞の増殖機能との関連が報告されている PSF1 は、膠芽腫切除標本では、壊死巣の周囲の領域では壊死のない領域に比べて、陽性率が著明に低下していた。

(4) 低酸素、グルコース欠乏による PSF1 発現の変化

スフェロイド中心部に出現する細胞死の主要な原因と判明した低酸素、グルコース欠乏の条件下で T98G 細胞株を培養すると、PSF1 発現量が低下することが定量 RT-PCR 法、Western blot 法により明らかとなった。一方、低酸素あるいはグルコース欠乏下で培養した細胞を、再び通常の酸素濃度や通常のグルコース濃度に曝露すると、PSF1 発現量は上昇したことから、上記の PSF1 発現の変化は可逆的であることが示唆された。膠芽腫切除標本の壊死巣周囲での PSF1 発現の低下に、低酸素とグルコース欠乏が関与している可能性が考えられた。

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3件)

木村 徳宏、石井 文彩、高倉 伸幸、河野 裕夫、池田 栄二、Glioblastoma 細胞における GINS 複合体構成タンパク質の発現調節、第 105 回日本病理学会総会、2016 年 5 月 12~14 日、仙台国際センター(宮城県)

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、HIF-1 陽性 G0 期腫瘍幹細胞から

みた膠芽腫の腫瘍内微小環境、第 33 回日本
脳腫瘍病理学会、2015 年 5 月 29～30 日、JR
ホテルクレメント高松（香川県）

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 24～26 日、広島国際会議場・ANA クラウン
プラザホテル広島（広島県）

〔その他〕

ホームページ

<http://ds22.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~patho11/>

6．研究組織

(1)研究代表者

木村 徳宏 (KIMURA, Tokuhiro)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：4 0 4 4 5 2 0 0

(2)研究分担者

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：3 0 2 3 2 1 7 7

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