

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08721

研究課題名(和文) 浸透圧応答性転写因子NFATに着目した膠芽腫の壊死周囲微小環境の病態解析

研究課題名(英文) Analysis of peri-necrotic microenvironment of glioblastoma via NFAT family transcription factors

研究代表者

木村 徳宏 (KIMURA, Tokuhiko)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：40445200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫は予後不良な脳腫瘍であり、壊死が組織学的特徴のひとつである。壊死の周囲では死細胞から放出された物質により細胞外液が高浸透圧となり、浸透圧応答性の転写因子NFATファミリー分子を介して膠芽腫細胞に特有の変化が生じ、病態を形成している可能性がある。そこで、ヒトグリオーマ細胞株を高浸透圧の培養液に曝露すると、主にNFAT5の発現量が上昇し、血清欠乏や低酸素の条件で培養するとNFATc4の発現量が増加した。また、培養液の浸透圧が細胞のコロニー形成能に影響することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は難治性の脳腫瘍であり、新規治療法の開発のために病態の解明が急務である。本研究では、膠芽腫の組織学的特徴のひとつである壊死に関連する病態を、細胞外液の浸透圧と細胞が持つ浸透圧応答分子に着目して検討した結果、NFAT5とNFATc4が注目すべき分子であるという知見を得て、今後の研究の足掛かりとなると思われる。膠芽腫に限らず、これまで腫瘍細胞の浸透圧応答についてはほとんど未解明であり、本研究はこの分野を解明する端緒となる。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is a highly malignant brain tumor, and necrosis is one of the histological characteristics of glioblastoma. In the peri-necrotic area of glioblastoma tissue, extracellular osmotic pressure might be elevated by substances released from dead cells, and hyperosmotic stress might induce changes in the tumor cell function via NFAT family transcription factors. In this study, when we exposed human glioma cell lines to hyperosmotic media, the expression levels of NFAT5 were elevated. When we cultured the cells in serum-free or hypoxic conditions, the expression levels of NFATc4 were elevated. Colony formation ability were influenced by osmolarity of the media.

研究分野：病理学

キーワード：病理学 脳腫瘍 膠芽腫 浸透圧 微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、悪性度の指標である WHO grade は IV に分類されている。治療は現在でも極めて困難で、手術・化学療法・放射線療法等の集学的治療にもかかわらず、2 年生存率は 5% 以下と報告されており (Ohgaki et al. *Cancer Res* 64:6892-9, 2004) 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増殖能を示して浸潤性に増殖し、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) と膠芽腫を区別する指標となっており、膠芽腫に特有の病態を反映する組織所見と考えられる。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いることも (Hammoud et al. *J Neurooncol* 27:65-73, 1996) この腫瘍における壊死の重要性を示唆している。

われわれはこれまで、低酸素生物学と腫瘍幹細胞の概念をとり入れた病理組織学的研究を行い、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 (SOX2 または NANOG 陽性) の腫瘍細胞が、WHO grade II ~ IV のアストロサイト系腫瘍の中で膠芽腫にのみ認められ、主に壊死巣の周囲に局在していることを最近報告した (Ishii et al. *PLoS One* 11:e0147366, 2016)。われわれが新規に開発した、膠芽腫由来細胞株を用いたスフェロイド培養法により、培養皿の中で腫瘍組織に類似した細胞集塊を形成させると、上記の発現パターンを示す腫瘍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、膠芽腫の壊死周囲の微小環境 (ニッチ) 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が示唆された。そこでわれわれは、膠芽腫の中心的な病態として、壊死周囲の微小環境が viable な腫瘍細胞に働きかけ、腫瘍細胞の性質を変化させることで、腫瘍の形成や長期にわたる維持、治療抵抗性などに関与しているのではないかと考えている。

壊死巣では細胞膜の破綻した死細胞から様々な物質が放出され、さらに壊死周囲の血流に乏しい領域ではそれらの物質の拡散・流出が起こりにくく、壊死周囲では細胞外液の浸透圧が上昇していると考えられる。細胞が高密度に存在し細胞死が頻繁に起こるもうひとつの病態である急性炎症の局所では、微小環境の浸透圧が高い (400 ~ 600 mOsm/l) ことが報告されている (Schwartz et al. *J Inflamm* 6:21, 2009) (正常な細胞外液の浸透圧はほぼ 300 mOsm/l である)。環境の浸透圧による腫瘍細胞の機能調節については研究報告が乏しく、特にそのメカニズムについてはほとんど解明されていないが、前立腺癌細胞株では細胞外液の浸透圧により dormancy (細胞休眠) が調節されているという報告がある (Havard et al. *J Biol Chem* 286:44177-86, 2011)。これらの知見からわれわれは、壊死周囲の高浸透圧環境が細胞内の浸透圧シグナル系を介して腫瘍細胞機能に重要な変化をもたらすのではないかと着想している。

哺乳類の細胞が細胞外液の浸透圧に応答する仕組みは完全には解明されていないが、NFAT (nuclear factor of activated T cells) ファミリーに属する転写因子 NFAT5 (TonEBP) が中心的な役割を演じると考えられている (Cheung et al. *J Mol Signal* 8:5, 2013)。NFAT5 は高浸透圧により核移行、発現量の増加を示し、細胞を浸透圧ストレスから守る BGT1, SMIT 等のトランスポーターをはじめとする種々の遺伝子の転写を活性化することが、主に腎臓の細胞で研究されてきた (Burg et al. *Physiol Rev* 87:1441-74, 2007)。しかし、腫瘍細胞での発現や機能については、腎細胞癌・大腸癌細胞株等で細胞の生存・遊走に関わるという報告 (Kuper et al. *Front Physiol* 5:293, 2014; Chen et al. *Am J Physiol Cell Physiol* 300:C1155-63, 2011) が少数あるほかは、ほとんど未解明である。また哺乳類 NFAT ファミリーには NFAT5 以外に NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4 の 4 個の分子種が知られているが、これらが浸透圧応答性を有するかどうか不明であり、膠芽腫細胞において検討の必要がある。近年、マウスのマクロファージ系細胞では、NFAT5 が正常浸透圧下において TLR (Toll-like receptor) シグナルにより活性化されることが報告され (Kim et al. *Eur J Immunol* 44:2721-36, 2014) 壊死周囲の膠芽腫細胞では高浸透圧を介する経路とは別に、HMGB1, S100 蛋白等の DAMPs (damage-associated molecular patterns) (Venereau et al. *Front Immunol* 6:422, 2015) と総称される死細胞由来物質が TLR を介して NFAT 発現を刺激している可能性もあろう。

そこで本研究では、浸透圧応答性 NFAT の視点から、壊死周囲の微小環境が腫瘍細胞機能に及ぼす影響を明らかにすることを目指すことにした。

2. 研究の目的

哺乳類細胞の浸透圧応答に重要な NFAT5 を含む NFAT ファミリー転写因子群に着目し、ヒト膠芽腫細胞ではどの NFAT 分子種が浸透圧応答性を特定した後、壊死周囲微小環境に存在する腫瘍細胞においてその NFAT が果たす役割を明らかにし、膠芽腫の病態解明に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒトグリオーマ細胞株 (T98G, U87, U251MG, YKG-1) を、通常の培養液 (10% ウシ胎仔血清添加培地。浸透圧は約 300 mOsm/l) で培養しておく。通常の培養液に NaCl またはラフィノースを加え、350 ~ 500 mOsm/l の高浸透圧培養液を作製する。これらの培養液で細胞を 3 ~ 48 時間培養し、RNA またはタンパク質を抽出し、NFAT ファミリー分子 (NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4, NFAT5) の発現量の変化をリアルタイム RT-PCR 法 (mRNA レベル) Western blot 法 (タンパク質

レベル)により検討する。NFAT ファミリー分子の細胞内局在の変化については、蛍光免疫染色法により検討する。

(2) 高浸透圧以外の細胞へのストレス因子として、血清欠乏、低酸素、低 pH、グルコース欠乏をとりあげ、細胞に作用させ、NFAT ファミリー分子の発現量の変化を検討する。血清欠乏については無血清培地で、グルコース欠乏についてはグルコース低減培地で培養を行う。低酸素については、1%酸素に調整したアステック社マルチガスインキュベーター内で培養を行う。低 pH については、HCl 添加により pH 6 に調製した培地を用いる。

(3) NFAT 分子に対する siRNA もしくは non-targeting control RNA を Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)を用いて細胞に導入し、NFAT 発現を抑制した細胞と対照の細胞との間にどのような機能の差が生じるか検討する。

(4) コロニー形成アッセイを次のように行う。10cm 培養皿に細胞を 1×10^2 個まき、10 日間培養し、固定後、ギムザ染色を行う。径 1mm 以上のコロニーを数え、 1×10^2 で割り、コロニー形成率を算出する。

(5) 死細胞から放出される物質の生細胞に与える影響を調べるためのモデルを開発する。培養細胞を培地に懸濁した液を液体窒素により凍結・融解し細胞死を起こしたのち、遠心により得た上清を「死細胞上清」、遠心により得た細胞ペレットを培地中で超音波破碎処理し液状にしたものを「死細胞ライセート」と呼ぶことにする。浸透圧計(アークレイ社オズモステーション)で浸透圧を測定し、別に培養しておいた細胞に作用させ、NFAT 分子の発現変化を検討する。

4. 研究成果

(1) ヒトグリオーマ細胞株を用いて、細胞を高浸透圧(500 mOsm/l)の培養液に曝露した時の NFAT ファミリー分子群(NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4, NFAT5)の発現量(mRNA レベル)の変化をリアルタイム RT-PCR 法で検討した。T98G, U87 細胞株では、曝露後 3 時間で NFAT5 発現量が上昇し始め、以後 48 時間まで上昇していた。U87 では NFATc1 発現量の上昇も見られた。他の NFATs には大きな変動は認めず、NFAT5、場合によっては NFATc1 が高浸透圧応答性 NFAT であると考えられた。他のグリオーマ細胞株(U251MG, YKG-1)および HeLa においても、高浸透圧に応答して NFAT5 発現の増加を認めた。次に、高浸透圧以外の細胞へのストレス因子として、血清欠乏、低酸素、低 pH をとりあげ、これらに対する NFAT 発現変化を T98G, U87 を用いて検討した。無血清培地で培養すると NFATc4 と NFATc2 の発現が上昇し、1%酸素環境下で培養すると NFATc4 の発現が上昇した。また、培地を pH 6 とした場合には、U87 では NFATc4 の上昇を認めた。これらの結果から、ストレス因子の種類により応答する NFAT 分子種が異なり、主として NFAT5 が高浸透圧、NFATc4 がそれ以外のストレスに応答している可能性が示唆された。

(2) ヒトグリオーマ細胞株を高浸透圧の培養液に曝露した時の NFAT 分子のタンパク量の変化を、Western blot 法により検討した。NFAT5 は 400 ~ 500 mOsm/l の高浸透圧で 24 時間処理すると、タンパク量が増加していた。高浸透圧以外の細胞へのストレス因子として、無血清培地、グルコース低減培地、低 pH 培地(pH 6)、低酸素条件(1%酸素)で細胞培養を行ったところ、グルコース欠乏、低 pH、低酸素においても NFAT5 タンパクの増加が観察され、NFAT5 が様々なストレス因子に対して反応している可能性が示唆された。NFATc4 については、無血清培地、低酸素条件(1%酸素)での培養によりタンパク量の増加を認め、Western blot 上では分子量がやや低下しているようなバンドパターンを示していた。蛍光免疫染色での検討によって、これらの条件下では、核内の NFATc4 が増加していることが示唆された。

(3) U87 細胞株では、無血清または低酸素条件によって幹細胞マーカー-NANOG の発現が誘導されるが、細胞に NFATc4 の siRNA を導入しておくこと、無血清または低酸素条件下での NANOG 発現が抑制された。無血清または低酸素条件下では、NFATc4 が腫瘍形成能の維持に関与している可能性が推測された。

(4) ヒトグリオーマ細胞株(T98G, U251MG)を用い、高浸透圧がコロニー形成におよぼす影響を検討した。培養皿に細胞を十分少数まき、10 日間培養し、形成された径 1mm 以上のコロニーの個数を数え、コロニー形成率を測定した。通常の培養液で培養していた細胞を、高浸透圧(350 ~ 400 mOsm/l)の培養液中でコロニー形成させた場合、T98G, U251MG とともに、コロニー形成率は浸透圧が高いほど低下した。一方、細胞を通常または高浸透圧の培養液で 3 日間前処理してから、通常の培養液中でコロニー形成させた場合には、T98G ではコロニー形成率の変化は目立たなかったが、U251MG では、高浸透圧で前処理した細胞では通常の培養液で前処理した細胞よりもコロニー形成率が上昇しており、高浸透圧による何らかの細胞変化がその後のコロニー形成能を亢進させる可能性が示唆された。

(5) 死細胞から放出される物質の生細胞に与える影響を調べるためのモデルとして、培養細胞を培地に懸濁した液を凍結・融解し細胞死を起こしたのち、遠心により得た上清を「死細胞上清」、遠心により得た細胞ペレットを培地中で超音波破碎処理し液状にしたものを「死細胞ライセート」と呼ぶことにした。浸透圧計測を行ったところ、この方法によって得た死細胞上清では浸透圧は通常の培地とほぼ同じであったが、死細胞ライセートでは浸透圧は 400 ~ 500 mOsm/l に

上昇していた。生細胞に死細胞ライセートを添加して培養した場合には NFAT5 タンパクの発現量の変化は少なかったが、死細胞上清を添加して培養した場合には NFAT5 タンパク量の増加が見られた。

(6) 研究期間全体を通じて、ヒトグリオーマ細胞では、高浸透圧、血清欠乏、低酸素等の環境因子に対し NFAT ファミリー分子群（特に NFAT5 と NFATc4）が応答していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	池田 栄二 (IKEDA Eiji) (30232177)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	