

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15653

研究課題名(和文) 膠芽腫の低酸素誘導癌幹細胞化における多段階制御機構：腫瘍・間質相互作用との関連性

研究課題名(英文) Multi-step regulation mechanism of hypoxia-induced cancer stem cell of glioblastoma: relationship with tumor-stroma interaction

研究代表者

犬飼 円 (Inukai, Madoca)

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫細胞の幹細胞化機構におけるS100A4/Myosin9 (MYH9)系の役割を検索した。その結果、壊死部周囲にS100A4/MYH9陽性膠芽腫細胞を多数認めた。幹細胞マーカーのNestin発現が亢進した。

PLA法で、低酸素領域の膠芽腫細胞で高頻度にS100A4/MYH9結合が生じた。小血管周囲にS100A4/SM-actin陽性の腫瘍細胞を認めた。塩化コバルトによる擬似低酸素下で、膠芽腫培養細胞はS100A4とMYH9発現増加を確認した。以上から、S100A4陽性膠芽腫細胞は、低酸素ニッチや血管ニッチで、S100A4/MYH9との会合を介して膠芽腫細胞の幹細胞化に寄与する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、その原因の一つに自己複製能・多分化能を特徴とするグリオーマ幹細胞の存在がある。膠芽腫の新規治療戦略として、癌幹細胞の“幹”細胞としての形質“stemness”を失わせることができれば、その高い腫瘍原性能(癌細胞集団を供給し再発巣を作る力)を喪失させ全腫瘍細胞集団を死滅させることが可能になる。本研究では、S100A4/MYH9 axisが低酸素・血管ニッチでの幹細胞化機構に密接に関与する可能性を得た。今後、この成果をさらに発展させることで膠芽腫の新規治療法の確立を目指す基礎研究に発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The role of the S100A4 / Myosin9 (MYH9) system in glioblastoma stem cell transformation was investigated. As a result, a large number of S100A4 / MYH9-positive glioblastoma cells were found in the hypoxic region around the necrotic site in the glioblastoma tissue. At the same time, Nestin expression of a stem cell marker was enhanced. (2) S100A4 / MYH9 binding frequently occurred in the cytoplasm of glioblastoma cells in the hypoxic region by the in situ PLA method. (3) S100A4 / SM-actin-positive tumor cells were observed around the small blood vessel and in contact with the blood vessel wall. Under simulated hypoxia caused by cobalt chloride, glioblastoma cultured cells KS-1 showed increased expression of S100A4 and MYH9. From the above, S100A4-positive glioblastoma cells have a possibility of contributing to glioblastoma stem cell transformation through association with S100A4 / MYH9 in a hypoxic niche or a vascular niche.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：膠芽腫 グリオーマ幹細胞 S100A4 Myosin9 低酸素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) がん組織には、間質細胞からなる微小環境(ニッチ)が存在し、がん細胞の“stemness”維持機構として重要な役割を担っている。

(2) 膠芽腫では、低酸素領域、血管周囲、浸潤部にニッチが存在し、グリオーマ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。

(3) 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・移動、血管新生制御、及びEMT/がん幹細胞化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抑制する。そのパートナー分子として、非筋性ミオシンのMyosin9のheavy chain(MYH9)がある。

2. 研究の目的

低酸素・血管ニッチでのグリオーマ幹細胞誘導とその維持機構を、S100A4とMYH9発現の観点から解析する。

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～2017年の間で外科的に切除された50例の膠芽腫のホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いた。膠芽腫培養細胞のKS-1細胞を用いた。

(2) 免疫組織染色：マイクロウェーブまたは圧力鍋での熱処理による抗原賦活化を行った。2次抗体は、ヒストファイン シンプルステインMax-PO(MULTI)(ニチレイ)を使用した。右表に使用した抗体と染色条件を示す。

抗体	希釈	賦活条件	染色時間
S100A4	×100	PH6.0 マイクロウェーブ 5min×3回	24h[4°C]
α-SMA	×100	PH9.0 マイクロウェーブ 5min×3回	24h[4°C]
Nestin	×500	PH6.0 マイクロウェーブ 5min×3回	24h[4°C]
Myosin9	×100	PH6.0 マイクロウェーブ 5min×3回	24h[4°C]
HIF1-a	×1000	PH9.0 マイクロウェーブ 5min×3回	24h[4°C]

(3) 共焦点顕微鏡：蛍光免疫三重染色標本で、Zeiss Conforcal Microscopy「LSM710」を用いた。

(4) Western Blotting法：RIPA bufferで抽出・調製したタンパク質を、SDS-PAGEで展開後、PVDF膜(millipore)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次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。

(5) 統計学的処理：Mann-Whitney U検定及びSpearmanの順位相関で解析を行った。統計ソフトはStat View5.0を使用した。

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HIF1a発現と共にS100A4やMYH9発現を多数認めた。同時に、幹細胞マーカーのNest in発現が亢進した。

(2) *in situ* PLA法(図1)で、低酸素領域の膠芽腫細胞の細胞質で高頻度にS100A4/MYH9結合が生じた。

(3) S100A4陽性膠芽腫細胞が血管周囲、すなわち血管ニッチに特異的に分布していることが示された。小血管周囲やその血管壁に接してS100A4/SM-act in陽性の腫瘍細胞を認めた(図2,3)。

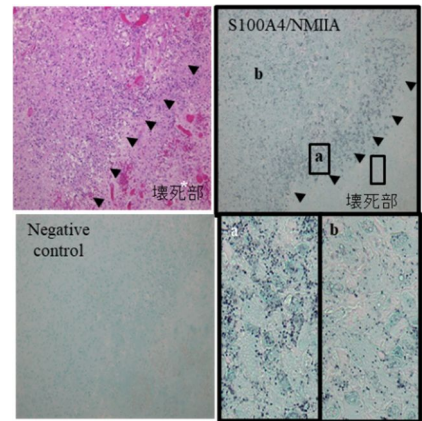


図1. In situ PLA法

(4) 塩化コバルトによる擬似低酸素下で、膠芽腫培養細胞KS-1は、低酸素マーカーであるHIF1aの発現増加と共に、S100A4とMYH9の発現増加を認めた。さらに、幹細胞マーカーのNest inの発現増加を認めた(図4)。

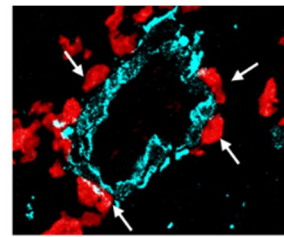


図2. 小動脈周囲のS100A4 (+) 膠芽腫細胞 (矢印)

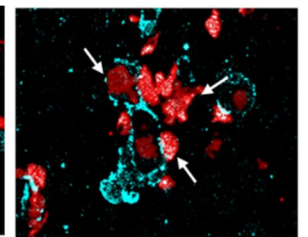


図3. 毛細血管周囲のS100A4 (+) α-SMA (+) 膠芽腫細胞 (矢印)

(5) 考案

低酸素マーカーのHIF1aが高発現する壊死部周囲において、S100A4/MYH9陽性膠芽腫細胞が集簇し、同時にNest inを共発現していることから、低酸素環境に反応した幹細胞化が生じている可能性がある(低酸素ニッチ)。この所見は、膠芽腫培養細胞KS-1の擬似低酸素環境による検索でも裏付けられた。

血管周囲においては血管を囲うようにS100A4(+)細胞が集簇しており、紡錘形の細胞も多く見られたことや、α-SMA(平滑筋マーカー)陽性所見から、血管壁の周皮細胞に分化している可能性やEMTとの関連性が示唆された(血管ニッチ)

今後、S100A4とMYH9の機能解析を行い、グリオーマ幹細胞の生物学的特性等の解明を勧め、この幹細胞をターゲットとした新規治療法の確立を目指した基礎研究に発展させる。

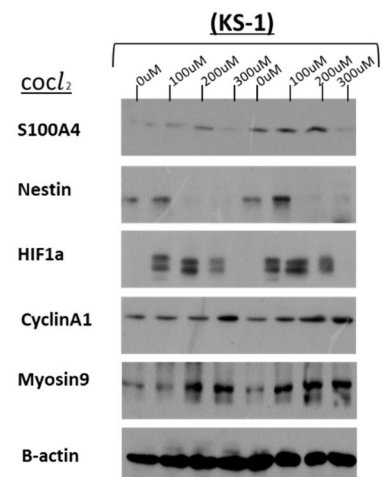


図4. 擬似的低酸素下での各種タンパク発現の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 犬飼 円
2. 発表標題 ・ Hypoxia-related markers and pAkt were expressed in pseudopalisades within glioblastoma
3. 学会等名 日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 犬飼 円、石井冴美、橋村美紀、三枝 信
2. 発表標題 膠芽腫のS100A4によるがん幹細胞化誘導機構の解明
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019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