

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16567

研究課題名(和文) 膠芽腫の新規グリオーマ幹細胞マーカーLEFTYの同定、機能解析、そして臨床応用

研究課題名(英文) Requirements of LEFTY and Nodal overexpression for tumor cell survival under hypoxia in glioblastoma

研究代表者

秋谷 昌史 (Akiya, Masashi)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：80836099

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)：膠芽腫で、LEFTY、Nodalの発現は、及び高アポトーシスと低細胞増殖の所見が偽柵状壊死巣(Ps)や非壊死性腫瘍病巣と比較して、非偽柵状壊死巣(non-Ps)周囲病巣で有意に高地であった。GBM細胞株であるKS-1では、低酸素模倣剤CoCl₂による処理でLEFTYレベルが上昇した。LEFTYとNodalの過剰発現は、増殖率を高め、CoCl₂誘発アポトーシスに対する感受性を低下させ、癌幹細胞関連マーカーの発現を増大させた。LEFTYとNodalは、アポトーシス、増殖、EMT/GCSの特徴を変化させ、non-Psの壊死周囲病変における細胞の生存に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

<学術的意義> 膠芽腫のグリオーマ幹細胞の新規マーカーとしてLEFTYを同定し、LEFTY関連シグナルカスケードの検索から新たなグリオーマ幹細胞の誘導・維持機構を解明した。LEFTY陽性グリオーマ幹細胞による血管新生制御の観点からみた膠芽腫の新たな生物学的特性を解明した。<社会的意義> 小化学化合物などによるLEFTY関連シグナルカスケード阻害によりグリオーマ幹細胞の“幹”形質の消失や血管新生抑制による膠芽腫の分子標的治療の基盤を築くことができる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the roles of LEFTY and Nodal in glioblastoma (GBM) hypoxic foci. In clinical samples, significantly higher expression of LEFTY and Nodal, as well as higher apoptotic and lower proliferation rates, were observed in non-pseudopalisading (Ps) perinecrotic lesions as compared to Ps and non-necrotic tumor lesions. In KS-1, a GBM cell line that lacks endogenous Nodal expression, treatment with the hypoxic mimetic CoCl₂ increased LEFTY expression. LEFTY and Nodal overexpression increased proliferation rates and reduced susceptibility to CoCl₂-induced apoptosis, and increased the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT)/GSC-related markers. An increased ALDH1high population and more efficient spheroid formation was also observed in LEFTY-overexpressing cells. These findings suggest that LEFTY and Nodal may contribute to cell survival in non-Ps GBM perinecrotic lesions, leading to alterations in apoptosis, proliferation, or EMT/GCS features.

研究分野：分子病理学

キーワード：LEFTY Nodal Glioblastoma Hypoxia

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫 (GBM : grade IV astrocytoma) は、最も一般的な原発性脳腫瘍であり、侵襲的で増殖率が高いことが特徴である。全生存期間の中央値は、標準治療 (放射線とテモゾロミド) でわずか 15.6 カ月、腫瘍治療領域の追加治療で 20.5 カ月である。殆どの GBM は、急速な増殖により相対的な低酸素環境により多数の壊死病変を伴う。低酸素状態は、神経膠腫幹細胞 (GSC) の維持に重要な役割を果たす。GSC は自己再生能力を示し、腫瘍増殖と化学療法に対する抵抗性に関与する。左右決定因子 (LEFTY) タンパク質は、TGF- β スーパーファミリーの新規メンバーである。ヒトでは LEFTY1 および LEFTY2 によってコードされる。LEFTY タンパク質は TGF- β 受容体依存の Smad2 リン酸化を抑制し、さらに受容体制御 Smad (R-Smad; Smad 1, 2, 3, 5, and 8) -Smad リン酸化も抑制して TGF- β のシグナル伝達を抑制する。また、LEFTY は幹細胞化や細胞分化との関連性が示唆されている。Nodal も TGF- β スーパーファミリーの一員であり、胚発生期の内胚葉と中胚葉の分化に重要な役割を果たしている。Nodal の発現は一般に分化した組織では見られないが、様々なヒト悪性腫瘍で再発現し、ヒト胚性幹細胞や癌細胞の多能性の維持に関連している。LEFTY は ActRIIA または ActRIIB 受容体に競合的に結合することで Nodal シグナルに拮抗するが、GBM における LEFTY と Nodal の潜在的機能相互作用については不明な点が数多く残されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、GBM 組織において、偽柵状配列 (Ps) を有さない壊死周囲病変において、LEFTY と Nodal の発現変化を検証する。

(2) 低酸素状態における腫瘍細胞のアポトーシス、増殖、幹細胞化の変化に関する 2 つの分子の機能的役割を、臨床サンプルと GBM 細胞株を用いて検証する。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体 : 2006 年から 2017 年の間に北里大学病院で外科的に切除された原発性 GBM の合計 95 例を用いた。患者の平均年齢は 49.2 歳 (範囲 : 14 ~ 79 歳) であった。GBM 組織では、腫瘍病巣内の壊死性病巣は、中央の壊死帯の周囲に腫瘍細胞が集積することを特徴とする Ps 特徴を有するまたは有しない壊死性病巣の 2 つに細分化した。いずれの患者も、腫瘍の外科的切除の前に化学放射線療法を受けたことはない。すべての組織は、10%ホルマリンでルーチンに固定され、パラフィンワックスに包埋するために処理された。本研究は、北里大学医学部倫理委員会 (B19-292) により承認された。

(2) 抗体および試薬 : 抗 LEFTY、抗 Sox2、抗 Smad2、セリン 255 における抗ホスホ Smad2 (pSmad2) 抗 Twist 1、高 Nestin、HIF-1 α 、抗 p27kip1、抗 bax、抗セリン 473 における抗ホスホ Akt (pAkt) 抗 GSK-3 β 、抗 Rb、抗 XIAP) 抗体、抗 bcl2、抗サイクリン D1、抗 p21waf1、抗

p53、抗 Ki-67、抗 Ser9 における抗ホスホ-GSK-3 β (pGSK-3 β)、抗 Akt、Serine807/811 における抗ホスホ-Rb (pRb)、抗 cleaved caspase-3、抗 PARP、抗 Snail、抗 Nodal、抗 β -actin、抗サイクリン A2、CA9、抗 Olig2 抗体を使用した。TGF- β 1 および塩化コバルト (CoCl₂) を使用した。

(3) 免疫組織化学(IHC) : IHC は、マイクロ波-オープン加熱法とポリマー免疫複合体法の組み合わせで行った。カウントした細胞の総数における免疫陽性細胞の割合を、以下のように5つのカテゴリーに細分化した: 0、すべて陰性、1、10%未満、2、10~30%、3、30~50%、4、50%超の陽性細胞。また、免疫強度は4つのグループに分類された: 0、陰性、1、弱い、2、中程度、および3、強い免疫強度。IHC スコアは、2つのパラメーターの値を掛け合わせることで作成した。Ki-67 の核免疫陽性も、選択したフィールドの少なくとも500個の細胞でカウントされた。そして、標識指数(LI)は、100細胞あたりの数として計算した。

(4) アポトーシスアッセイ: アポトーシス細胞は、Kerrらの基準に従って、ヘマトキシリン・エオシン染色した切片で同定した。アポトーシス細胞の数は、5つの高倍率フィールドの下でアポトーシス図形の合計を数えることによって計算した。

(5) プラスミドと細胞株の作製: pGL3B-(-3533/+33) LEFTY1 luc、pGL3B-(-4805/+42) LEFTY2 luc、pGL3B-(-1522/+23) Nodal luc、pcDNA3.1-Smad2、およびpcDNA3.1-HIF1 α を使用した。LEFTY および Nodal の発現プラスミドまたは空ベクターを GBM 細胞株 KS-1 細胞にトランスフェクトし、安定な過剰発現クローンを樹立した。低酸素実験のために、細胞は100または200 μ M CoCl₂ で37、5%CO₂ 下で処理した。

(6) ウェスタンブロットアッセイ: RIPA バッファー [20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate] を用いて細胞内総タンパク質を分離した。タンパク質を SDS-PAGE で分離し、一次抗体でプローブし、ECL 検出システムで検出した。

(7) フローサイトメトリーおよび Aldefluor アッセイ: 細胞は70%アルコールを用いて固定し、細胞周期解析のためにヨウ化プロピジウム(シグマ社)で染色した。生存細胞におけるALDH1酵素活性は、蛍光色素ベースの Aldefluor アッセイを用いて決定した。調製した細胞は、BD FACS Calibur および CellQuest Pro ソフトウェアバージョン3.3を用いてフローサイトメトリーにより解析した。

(8) スフェロイドアッセイ: 細胞 ($\times 10^3$) を96ウェル低細胞結合プレートに無血清培養液または10%ウシ仔牛血清入りイーグルMEMでプレーティングした。最小直径50 μ mの均一なスフ

エロイドを、プレーティングから約2週間後にカウントした。

(9) トランスフェクション：トランスフェクションは、LipofectAMINE PLUSで行い、ルシフェラーゼ活性をアッセイした。

(10) 逆転写 (RT)-PCR：cDNA は、2 μ g の total RNA から合成し、RT-PCR 法により増幅した。定量分析のために、Power SYBR Green PCR Master Mix を用いてリアルタイム RT-PCR も実施した。蛍光シグナルは、ABI 7500 Real-time PCR System SDS Software を用いて検出した。

(11) Cell Counting Kit-8(WST-8)アッセイ：CoCl₂処理後の生細胞の定量は、Cell Counting Kit-8 を用いて、メーカーの説明書に従って実施された。

(12) 統計データ：比較データは、Mann-Whitney U-test、Spearman の相関係数または Kruskal-Wallis test を適宜用いて分析した。統計的有意性のカットオフは、 $p < 0.05$ とした。

研究成果

(1) GBM 細胞では、LEFTY および Nodal の細胞質、HIF-1 α の核、pAkt および pGSK-3 β の核 / 細胞質に免疫染色の陽性所見が観察された。LEFTY、Nodal、pGSK-3 β の平均スコアは、Ps および非壊死性腫瘍病変のスコアと比較して、非 Ps 周囲壊死病変で有意に高かった。HIF-1 α スコアは、非 Ps 壊死周囲病変と Ps 病変の両方で、非壊死腫瘍部よりも有意に高かった。対照的に、pAkt スコアには3病変間で差はなかった。pGSK-3 β スコアは LEFTY、Nodal、pAkt スコアと有意に相関していたが、pAkt スコアは LEFTY や Nodal 状態とは関連していなかった。内因性 Nodal の発現を欠く KS-1 細胞において、低酸素模倣剤 CoCl₂ で処理すると、低濃度では HIF-1 α 、LEFTY、pGSK-3 β の発現が増加したが、高濃度では pAkt のレベルが減少していた。また、LEFTY1、LEFTY2、Nodal 遺伝子の転写開始部位の 1000bp 以内に、5'-A/GCGTG-3' のコンセンサスコアモチーフを有する HIF-1 α 応答性エレメントを見出した。しかし、これらのエレメントを含むレポーターは、HIF-1 α の共トランスフェクション後、予想に反して抑制された。これらの結果は、LEFTY と Nodal、および GSK-3 β の発現が、HIF-1 α と pAkt の状態とは独立して、GBM 組織の非 Ps 周囲壊死病変で発現増加されていることを示唆する。

(2) GBM 組織では、アポトーシス細胞の平均数は、非 Ps 周囲病変と Ps 病変の両方で、非壊死腫瘍部のそれと比較して有意に高かったが、Ki-67 LI は後者で有意に高かった。アポトーシスは LEFTY、pGSK-3 β スコアと正の相関を示した。KS-1 細胞を CoCl₂で処理すると、細胞生存率の低下とともに、紡錘形から円形細胞への用量依存的な形態変化が生じた。また、増殖速度が低下した。細胞周期でサブ G1 期が増加し、S および G2/M 期が減少した。これは、Rb および pRb の発現低下、p53 非依存性の p21waf1 発現上昇と一致した。LEFTY と Nodal が低酸素条件下でのア

ポトーシス感受性に影響するかどうかを調べるために、LEFTY または Nodal のいずれかを安定的に過剰発現させた KS-1 細胞（それぞれ、KS-LEFTY と KS-Nodal）を樹立した。これらの細胞は、コントロール細胞と比較して、CoCl₂ 誘発アポトーシスに対する感受性が低下した。これは、サブ G1 画分の減少や、cleaved caspase-3 発現や cleaved PARP 発現の減少と一致した。KS-LEFTY 細胞および KS-Nodal 細胞は、いずれもコントロール細胞よりも増殖率が高かった。細胞増殖中の細胞周期進行と細胞周期関連分子の発現の変化をさらに調べるため、血清飢餓により細胞を静止状態にし、その後、血清で刺激した結果、KS-LEFTY および KS-Nodal の両細胞は S または G2/M 期の増加を示し、これはこれらの細胞におけるサイクリン A2、サイクリン D1 および p21waf1 の発現増加および p27kip1 発現低下と一致した。これらのことから、LEFTY と Nodal の両方が、GBM におけるアポトーシスの抑制と増殖の促進に密接に関連していることが示唆された。

(3) Nestin スコアは、Ps および非壊死腫瘍病変と比較して、非 Ps の壊死周囲病変で有意に高かったが、Olig2 スコアは、他の 2 病変と比較して、Ps 病変で有意に低値であった。KS-1 細胞を CoCl₂ で処理すると、ALDH1^{high} 集団の増加に伴い、EMT マーカー（Snail と Twist1）および GSC マーカー（Nestin と Sox2）の発現が増加した。これらの EMT/GSC 関連マーカーの発現亢進は、CoCl₂ 処理により KS-LEFTY または KS-Nodal 細胞でも観察され、コントロール細胞と比較すると、両細胞株で Olig2 の基底レベルの発現量が増加した。また、KS-LEFTY 細胞では、ALDH^{high} 集団の増加とともに、KS-Nodal 細胞およびコントロール細胞のものと比較して、50mm 以上の大きさの境界明瞭な円形スフェロイドの数が著しく増加した。これらのことから、LEFTY の過剰発現や低酸素状態が、GBM 細胞の EMT/GSC 特性の確立に寄与していることが示唆されたが、Nodal の場合にはそのような効果は軽微であった。

(4) GBM 組織では、腫瘍細胞において核/細胞質の pSmad2 免疫反応性が認められ、平均 IHC スコアは Ps および非壊死病変と比較して、非 Ps 周囲病変で有意に高かった。pSmad2 スコアは、LEFTY、Nodal、CA9 スコア、およびアポトーシスの状態と正の相関を示した。LEFTY および Nodal の発現が TGF-β1/Smad2 経路によって影響を受けるかどうかを調べるために、LEFTY1/2-および Nodal 駆動ルシフェラーゼレポーターを KS-1 細胞にトランスフェクションした。LEFTY1/2 のプロモーター活性は、Nodal ではなく、Smad2 のトランスフェクションまたは TGF-β1 処理のいずれかによって増強された。TGF-β1 処理後の mRNA 発現のわずかな増加と一致した。さらに、LEFTY および pSmad2 タンパク質レベルは、TGF-β1 および CoCl₂ の両方での処理によって増加した。これらの知見は、GBM の低酸素にตอบสนองして活性化された TGF-β1/Smad2 シグナルが、Nodal ではなく LEFTY の発現増加に寄与していることを示唆している。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Matsumoto T, Chino H, Akiya M, Hashimura M, Yokoi A, Tochimoto M, Nakagawa M, Jiang Z, Saegusa M.	4. 巻 59
2. 論文標題 Requirements of LEFTY and Nodal overexpression for tumor cell survival under hypoxia in glioblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Carcinog.	6. 最初と最後の頁 1409-1419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mc.23265. Epub 2020 Oct 28.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------