

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09152

研究課題名（和文）NFATc4に焦点を当てた膠芽腫の壊死周囲微小環境の腫瘍幹細胞誘導能解析

研究課題名（英文）Analysis of Cancer Stem Cell Induction Ability in the Microenvironment of Glioblastoma Focused on NFATc4

研究代表者

崔丹（Cui, Dan）

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40346549

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）：膠芽腫は予後不良で難治性の悪性腫瘍である。膠芽腫の治療抵抗性や再発の原因には腫瘍幹細胞がある。腫瘍幹細胞の誘導メカニズムがまだ、完全に解明されていない。我々は今回、ヒト膠芽腫細胞株U87を用いて、ヒト膠芽腫組織の微小環境を再現するSpheroidを作製した。低酸素条件下で培養したSpheroidの中心部に壊死が見られ、壊死周囲に腫瘍幹細胞の核には高頻度にNFATc4の発現もみられた。さらに、NFATc4を高発現するSpheroidをヌードマウス脳に移植した。移植後、経時的にIVISシステムにて観察し、腫瘍の増殖が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は悪性度が高く、放射線療法および化学療法に抵抗性を示す極めて予後不良な悪性腫瘍である。本研究計画では、壊死周囲ニッチにおけるNFATc4の果たす役割を中心に解析し、治療標的分子としてのNFATc4の有用性を明らかにすることで、患者の予後改善さらには腫瘍の根治に向けた新規治療法開発につながる。

研究成果の概要（英文）：Glioblastoma is one of the most malignant primary brain tumors with a poor prognosis and is refractory to treatment. Accumulative evidence indicates that tumor stem cells are a cause of the treatment resistance and recurrence of glioblastoma. The induction mechanism of tumor cells has not yet been fully understood. Here, we have produced a spheroid that reproduces the microenvironment of human glioblastoma tissue using the human glioblastoma cell line U87. Necroses was observed in the central part of the spheroid cultured under hypoxic, and a high frequency of NFATc4 expression was also seen in the nuclei of cancer stem cells surrounding the necroses. Furthermore, we transplanted spheroids with high expression of NFATc4 into the brains of nude mice.

研究分野：実験病理

キーワード：膠芽腫 腫瘍幹細胞 低酸素 低栄養

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫 (glioblastoma) は神経膠腫 (glioma) の中で最も悪性度が高く、高い浸潤能のため手術療法による根治が困難であるとともに、放射線療法および化学療法に抵抗性を示す極めて予後不良な悪性腫瘍である¹⁾。患者の予後改善さらには腫瘍の根治のに向けた新規治療法開発の基盤となる研究成果が待たれている²⁾。近年、膠芽腫細胞を含む種々の悪性腫瘍において、腫瘍幹細胞の存在など腫瘍細胞の heterogeneity が腫瘍病態に強く関与することが明らかにされ、さらに腫瘍細胞の heterogeneity が腫瘍組織内微小環境の heterogeneity に依存する動的形質である点にも注目が集まっている³⁾。これまで我々は、膠芽腫の予後不良を規定する腫瘍細胞として、HIF-1 を発現するとともに幹細胞性質を示し静止期にある腫瘍細胞 [HIF-1 + Sox2⁺/Nanog⁺RNApIIS2P^{-/low} (以下、H⁺S⁺/N⁺R^{-/low}細胞)] を特定した (Sox2 および Nanog は幹細胞マーカー、RNApIIS2P は増殖期マーカー)。さらに、この H⁺S⁺/N⁺R^{-/low}細胞がヒト膠芽腫組織の虚血性壊死巣周囲に特異的に存在すること、虚血性壊死巣の環境を模倣した条件下 (無血清且つ低酸素) で培養した腫瘍細胞が高い sphere-forming 活性を示したことから、膠芽腫の予後を規定する微小環境として '壊死周囲ニッチ' と命名し報告した^{4,5)}。従来から、虚血性壊死巣の存在は膠芽腫の予後不良因子とされていることから、壊死周囲ニッチの重要性は支持されると考えられた。

NFAT (nuclear factor of activated T cells) は、悪性黒色腫、卵巣癌など様々な悪性腫瘍において、腫瘍幹細胞の維持、腫瘍細胞の浸潤・転移能に関与する分子として報告されている^{6,7)}。NFAT ファミリーとしては5分子 (NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4, NFAT5) が特定・単離されており、リン酸化状態で細胞質内に存在し、脱リン酸化により核内移行する転写制御因子である⁸⁾。これまで我々は、NFAT ファミリーに注目し解析を進めてきた。まず、ヒト膠芽腫細胞における発現を検索したところ、NFATc4 (NFAT, cytoplasmic 4) の高発現が確認された。さらに、壊死周囲ニッチに相当する病的刺激である低酸素刺激、低栄養刺激 (無血清培養刺激) により NFATc4 発現が亢進すること、脱リン酸化による核内移行が亢進することが示された。この NFATc4 脱リン酸化した後、核内移行に伴い、膠芽腫細胞が静止期に入るとともに幹細胞マーカーが発現することも示され、壊死周囲ニッチに入った膠芽腫細胞が H⁺S⁺/N⁺R^{-/low}細胞へと変化する過程に NFATc4 が関与することを強く示唆する知見と考えている。

2. 研究の目的

- (1) ヒト膠芽腫組織および平面 (2次元) 細胞培養系を用い得られた知見を発展させ、より生体内を模した実験系である spheroid (3次元) 細胞培養系を確立し、膠芽腫病態における壊死周囲ニッチの意義・重要性を、NFATc4 の果たす役割を中心に解析し明らかにする。
- (2) マウス脳への移植系を確立するために、可視化できるヒト膠芽腫を作製する。
- (3) マウスの脳へ spheroid を移植する実験計を確立し、膠芽腫の予後改善さらには根治に向けた治療標的としての NFATc4 の有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 膠芽腫細胞および spheroid の培養

ヒト膠芽腫由来細胞株 U87 を使用した。細胞は 10% fetal bovine serum (FBS) を添加した Minimum essential Medium (MEM) にて 37 °C、5% CO₂ の条件下で培養を行った。spheroid を作製するために、超低接着性の U 字型 96 well plate (住友ベークライト株式会社; MS-9096U) を使用した。U87 を 5000 個/well 個ずつまき、上記培地 (通常培地) で 72 時間培養した後、幹細胞を誘導する培地 (幹細胞培地) を使用した。幹細胞培地として、B-27 supplement (Gibco)、20 ng/ml epidermal growth factor (EGF) (Protech) と 20 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Protech) を加えた Minimum essential Medium (血清無添加) 培地を用いた。生体内の膠芽腫 '壊死周囲ニッチ' を模した条件で培養するために、spheroid を酸素濃度 20% の通常酸素条件下 (Normoxia) と酸素濃度 1% 条件下 (Hypoxia) で 48 時間、36 時間、または 24 時間で培養した。得られた spheroid をホルマリンにて固定し、パラフィン切片を作製した。

(2) 多重免疫蛍光染色

Spheroid のパラフィン切片を用いて、多重免疫蛍光染色を行った。pH9.0 のヒストファイン抗原賦活化液にて、10 分間マイクロウェーブ (500w) で加熱して抗原賦活を行った。goat anti-NANOG (1:250; Novus Biologicals)、mouse anti-HIF-1 (1:20; BD Biosciences) および phosphorylation-specific rat polyclonal antibody to detect RNApII-S2P (1:100; Active Motif, Carlsbad) および rabbit anti-NFATc4 (1:100; Santa cruz Biotechnologies) を一次抗体として、それぞれを加えて 4 °C で一晩または室温 30 分 (RNApII-S2P) インキュベートした。すべての一次抗体の反応が終え、それぞれ一抗体に対する二次抗体を加え、室温にて 30 分間反応させた。HIF-1 の二次抗体として Alexa Fluor 546 donkey anti-mouse (1/200; invitrogen)、RNApII-S2P の二次抗体として Alexa Fluor 488 chicken anti-rat 488 (1/200; invitrogen) を

使用した。Nanog の二次抗体として Alexa Fluor 405 donkey anti-goat IgG (1:200; invitrogen)NFATc4 の二次抗体として Alexa Fluor 647 donkey anti-rabbit (1/200; invitrogen)を使用した。切片を共焦点レーザー顕微鏡(META)で観察した。

(3) 可視化細胞の作製

BLIV-MSCV-Luciferase-EF1a-copGFP-T2A-Puro (BLIV2.0:Plasmid. System Biosciences)を Stbl2TM competent cell (derivative of JM109) にて増やし、cDNA を得た。得られた cDNA と human immunodeficiency virus (HIV) lentiviral packaging plasmids (pPACKH1-REV, pPACKH1-GAG, pVSV-G plasmid. System Biosciences) と共に HEK293T 細胞に導入し、レンチウイルスを作らせた。レンチウイルス粒子を含む HEK293T 細胞の培養上清を U87 に導入し、蛍光タンパク GFP およびルシフェラーゼを安定的に発現する細胞を樹立した。遺伝子導入した U87 を上記 (1) と同じ方法で spheroid を作製し、ヌードマウス脳への移植に用いた。

(4) マウスの移植モデル

6~7 週齢のヌードマウスを用いた。移植の方法は以前に報告した手順に準じて行った⁹⁾。マウスに麻酔をかけ、固定装置に固定した。頭部の皮膚を切開して、頭蓋骨を露出させ、プレグマから右に 2mm、前に 1mm の位置にドリルを当てて硬膜まで穴を開けた。注射器に spheroid を一つ吸い取り、注射器を硬膜から脳実質へ 2mm 差し込み、spheroid を注入した。その後 10 分間そのまま放置してからゆっくりと注射針を抜き、骨蠟を用いて穴を塞いで、皮膚を閉じた。移植 1 日目、7 日目、14 日目...移植してから一週間ごとに IVIS Imaging System にて経時的にモニターした。移植 28 日以降、脳に腫瘍増殖の確認を行った。動物実験は山口大学動物実験管理委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) 壊死周囲ニッチ' を模した最適な Spheroid 培養条件

超低接着性 U 字型 96 well plate を用いて培養し、細胞は球状な spheroid を形成した。各 well で形成した spheroid のサイズは均等であった。この spheroid の中心部では大きな壊死巣が見られ、ヒト膠芽腫の組織学的な特徴が再現できた。低酸素条件下で 36 および 24 時間の培養では壊死面積の大きさは 48 時間 (図 1) よりやや小さかった。

'壊死周囲ニッチ' に幹細胞性質を持つ腫瘍細胞が誘導されるかどうかを調べるために、まず、HIF-1、RNAP II および Nanog について三重免疫染色をおこなった。Normoxia では HIF-1⁺/RNAP II⁻/S2P⁻/low/NANOG⁺ 腫瘍幹細胞はみられなかった。Hypoxia で 36 時間培養した spheroid では壊死周囲周辺部に HIF-1⁺ 陽性の細胞が見られたが、1つの spheroid に HIF-1⁺/RNAP II⁻/S2P⁻/low/NANOG⁺ 腫瘍幹細胞は数個みられる程度であった。しかし、低酸素刺激時間を 36 時間から 48 時間に延長すると、Normoxia では HIF-1⁺/RNAP II⁻/S2P⁻/low/NANOG⁺ 腫瘍幹細胞はみられなかったことに対し、Hypoxia では壊死程度の強い spheroid が出現し、HIF-1⁺/RNAP II⁻/S2P⁻/low/NANOG⁺ 腫瘍幹細胞が多数みられた (図 2 a)。この spheroid に NFATc4 を重ねて染色すると、壊死周囲ニッチに HIF-1⁺/RNAP II⁻/S2P⁻/low/NANOG⁺ 腫瘍幹細胞の核に NFATc4 も発現する細胞が高頻度に見られた (図 2 b, c)。

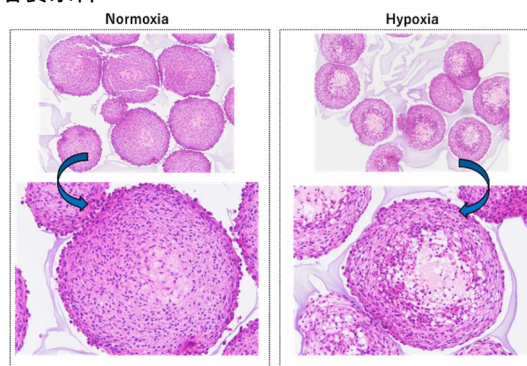


図 1 . Spheroid の HE 染色

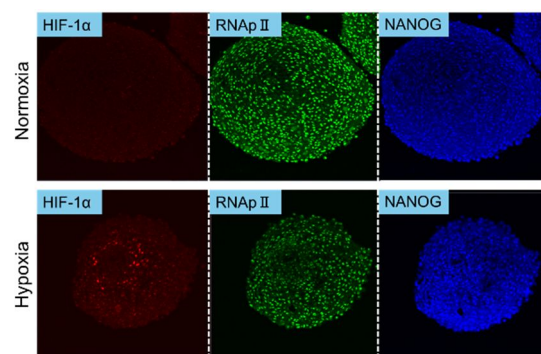


図 2a . Spheroid の三重免疫蛍光染色

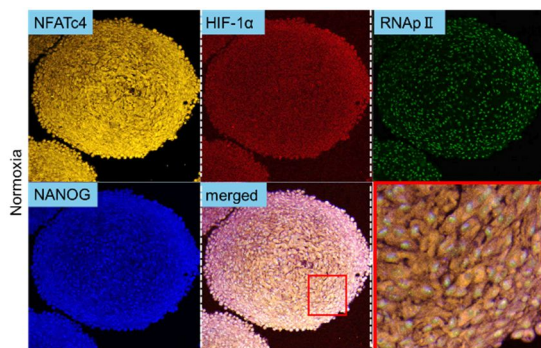


図 2b . Spheroid の四重免疫蛍光染色

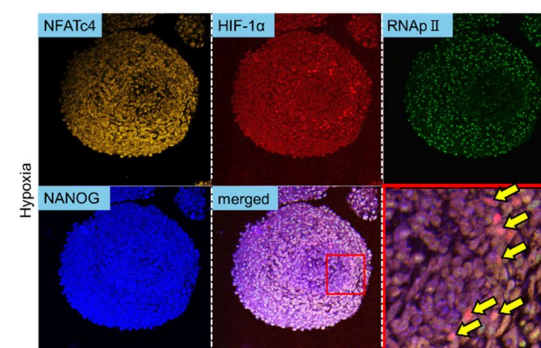


図 2c . Spheroid の四重免疫蛍光染色

(2) 移植実験の結果

In vitro 実験の結果は生体内に再現ができるかを検討する目的で、spheroid をヌードマウスの脳に移植した。また、移植後に腫瘍の形成を追跡することができる可視化システムを構築した。Spheroid を移植した1日目、以降一週間おきに IVIS Imaging System にて、マウスを観察した。図3に移植4週目の結果を示した。図3a(Normoxia), f(Hypoxia)は IVIS Imaging System の画像で、いずれのマウスにおいて脳に移植したルシフェラーゼを発現した腫瘍細胞の発光が見られ、腫瘍の増殖が推測される。観察後、マウスを安楽死させ、脳を摘出した。図3c,h に示したように大脳半球に腫瘍の形成を認め、ヒト膠芽腫のように肉眼的に出血が見られるものもある。図3d,e,i,j は組織学的所見を示す。Normoxia の Spheroid を移植したマウスの脳腫瘍と比較し、Hypoxia の Spheroid を移植したマウスの脳腫瘍ほうが腫瘍中心部に明瞭な壊死が出現しやすい傾向がある。腫瘍形成能、浸潤転移、薬剤耐性等について両群間での差はさらに検討する必要がある。

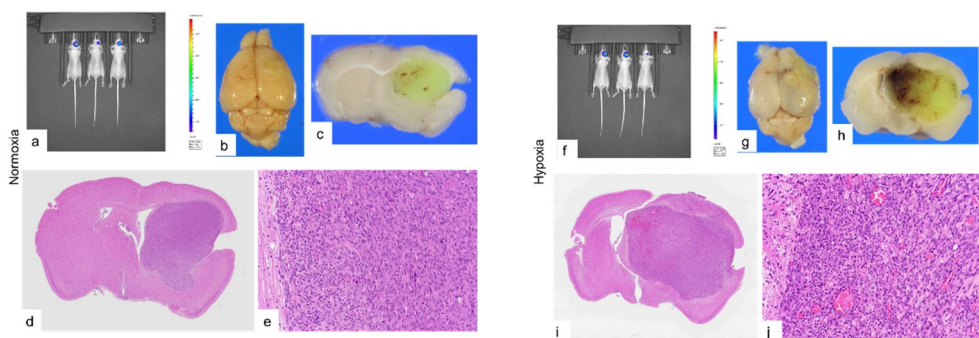


図3a~e. Normoxia Spheroid の移植モデル

図3f~j. Hypoxia Spheroid の移植モデル

考察

膠芽腫は予後不良な脳腫瘍の一つである。膠芽腫は、治療において可能な限り腫瘍を取り除き、術後に放射線・化学治療を追加しても、治療抵抗性を示すために、ほかの腫瘍と比較して再発率が高い。したがって、膠芽腫に有効な治療法の開発は急務である。膠芽腫の治療抵抗性を示す理由の一つは腫瘍幹細胞の存在である。これまでの我々の膠芽腫組織を用いた研究では膠芽腫の壊死周囲に出現した HIF-1^{+/} RNAp⁻ S2P^{-/low}/ NANOG⁺ 腫瘍幹細胞は腫瘍の再発に関わり、腫瘍幹細胞の性質を有することが分かってきた⁵⁾。したがって、HIF-1^{+/} RNAp⁻ S2P^{-/low}/ NANOG⁺ 腫瘍幹細胞の誘導機序を解明することは膠芽腫の治療法の開発に役立つと考えられる。

膠芽腫の腫瘍細胞は浸潤性増殖する。腫瘍中心部の大きな虚血性壊死巣は膠芽腫の組織学的な特徴の一つで、予後不良因子と言われている。このような虚血性壊死の微小環境の再現は膠芽腫の研究に欠かせないことである。今回の研究では、我々はまず、ヒト膠芽腫腫瘍細胞を用いて中心部に壊死を示す三次元培養モデルを構築し壊死周囲ニッチを再現した。その後、この三次元培養モデルを利用し、HIF-1^{+/} RNAp⁻ S2P^{-/low}/ NANOG⁺ 腫瘍幹細胞の誘導に関わる分子を解析した。

超低接着性 U 字型 96 well plate にヒト膠芽腫細胞株 U87 を接種すると、平面培養と異なり、細胞は球状 (spheroid) になって増殖していた。ヒト膠芽腫組織の低栄養低酸素を特徴とする壊死周囲ニッチを再現するために spheroid を通常の幹細胞培地で 72 時間培養後、血清を除いた幹細胞培地 (spheroid を低栄養状態にする) に変えると同時に低酸素刺激 (spheroid を低酸素状態にする) を加えた。このような条件で培養した spheroid の中心部に壊死が見られ、壊死周囲に HIF-1^{+/} RNAp⁻ S2P^{-/low}/ NANOG⁺ 腫瘍幹細胞が発現していた。HIF-1^{+/} RNAp⁻ S2P^{-/low}/ NANOG⁺ 腫瘍幹細胞の数や壊死の程度は酸素濃度および低酸素状態で培養した時間に依存していた。酸素濃度 1% の条件下で 48 時間培養した spheroid の中心部の壊死程度が最も強く、その周辺部により多くの HIF-1^{+/} RNAp⁻ S2P^{-/low}/ NANOG⁺ 腫瘍幹細胞が出現した。この低栄養・低酸素状態を示す微小環境は腫瘍幹細胞を生み出す環境であることが示唆された。そこで、我々はこの膠芽腫の壊死周囲ニッチを再現するモデルを用いて HIF-1^{+/} RNAp⁻ S2P^{-/low}/ NANOG⁺ 腫瘍幹細胞の誘導に関わる分子の解析を行った。

近年、NFAT は腫瘍幹細胞の誘導・維持に重要な因子であることで注目されている^{6,7)}。我々の U87 を用いた平面培養の実験系では、U87 は NFATc4 がもっとも強く発現され、無血清培養または低酸素条件で培養すると NFATc4 は脱リン酸化を介して細胞核に移行することが確認できた。さらに、NFATc4 は細胞核に移行することにより、細胞核の cyclinD1 および MIB-1 の発現が消失し、細胞は静止期に入ることが示唆された。無血清または低酸素の刺激により、活性化された NFATc4 は膠芽腫の腫瘍幹細胞の誘発に関連する可能性があると考えられる。そこで、低栄養・低酸素条件下で培養した spheroid の壊死周囲ニッチに出現した HIF-1^{+/} RNAp⁻ S2P^{-/low}/ NANOG⁺ 腫瘍幹細胞における NFATc4 の発現を解析した。HIF-1^{+/} RNAp⁻ S2P^{-/low}/ NANOG および NFATc4 について四重免疫蛍光染色を行ったところ、HIF-1^{+/} RNAp⁻ S2P^{-/low}

$-/low/$ NANOG⁺ 腫瘍幹細胞の一部の細胞に NFATc4 も発現していたことが分かった。以上の結果から、膠芽腫において、転写因子 NFATc4 は HIF-1⁺/RNAp⁻S2P^{-/low/} NANOG⁺ 腫瘍幹細胞の誘導に関わっているのではないかと考えられる。

上記の培養した spheroid ではヒト膠芽腫の「壊死周囲ニッチ」を再現することは生体内でも再現できるかについて検討を行った。これまでの研究では、二次元培養で得られた腫瘍細胞をヌードマウスの脳に移植することはほとんどで、移植した腫瘍細胞の腫瘍形成能や浸潤・転移能、治療効果の判定などに向くモデルであるが、生体内の微小環境に依存性し、可塑性を持つ腫瘍幹細胞³⁾の研究に向いていないと考えられる。そこで、我々は今回、「壊死周囲ニッチ」に腫瘍幹細胞(HIF-1⁺/RNAp⁻S2P^{-/low/} NANOG⁺/NFATc4⁺)を多く発現するシングル spheroid をヌードマウスの脳に移植するモデルを作製することを試みた。Normoxia Spheroid または Hypoxia Spheroid のいずれに移植したマウスの脳に腫瘍の増殖が見られた。一部の腫瘍において、出血や腫瘍中心部の壊死が見られ、ヒト膠芽腫に類似する所見が認められた。今後の腫瘍幹細胞の誘導・維持における NFATc4 の関与に検討するために、有用な実験系が樹立できた。

引用文献

- 1) Schaff LR, Mellinghoff IK. Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review. JAMA. 2023 Feb 21;329(7):574-587. doi: 10.1001/jama.2023.0023
- 2) Shah S. Novel Therapies in Glioblastoma Treatment: Review of Glioblastoma; Current Treatment Options; and Novel Oncolytic Viral Therapies. Med. Sci. 2024, 12(1), 1; <https://doi.org/10.3390/medsci12010001>
- 3) Batlle E & Clevers H. Cancer stem cells revisited. Nat Med. 2017; 23(10):1124-1134
- 4) Takubo K, Goda N, Yamada W, et al. Regulation of the HIF-1a Level Is Essential for Hematopoietic Stem Cells. Cell Stem Cell 2010; 7: 391-402
- 5) Ishi, A, Kimura T, et al. Histological Characterization of the Tumorigenic “Peri-Necrotic Niche” Harboring Quiescent Stem-Like Tumor Cells in Glioblastoma. Plos One 2016; 57: 585-590
- 6) Lin YB, Song YF, et al. NFAT signaling dysregulation in cancer: Emerging roles in cancer stem cells. Biomed Pharmacother. 2023; 165:115167
- 7) Alexander J.C, Mangala I, et al. NFATc4 promotes quiescence and chemotherapy resistance in ovarian cancer. Jci Insight. 2020;5(7): e131486. <https://doi.org/10.1172/jci.131486>
- 8) Ranger AM, Grusby MJ, et al. The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. Nature. 1998; 392: 186-190.
- 9) Sadahiro H, Yoshikawa K, et al. Pathological features of Highly invasive glioma stem cells in a mouse xenograft model. Brain Tumor Pathol 2014; 31: 77-84

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 崔丹、吉富千尋、田中瑛、池田栄二
2. 発表標題 膠芽腫における静止期腫瘍幹細胞の誘導機序について
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉富千尋、崔丹、田中瑛、河野裕夫、池田栄二
2. 発表標題 NFATc4によるヒト神経膠芽腫の壊死周囲ニッチにおける静止期幹細胞様の腫瘍細胞の誘導
3. 学会等名 111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022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
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)	
研究分担者	吉富 千尋 (Yoshitomi Chihiro) (50819323)	山口大学・大学院医学系研究科・助教 (15501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	田中 瑛 (Tanaka Akira) (60913936)	山口大学・大学院医学系研究科・助教 (15501)	

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