

Histological Characterization of the Tumorigenic “Peri-Necrotic
Niche” Harboring Quiescent Stem-like Tumor Cells
in Glioblastoma

(膠芽腫における増殖静止期の幹細胞様腫瘍細胞を含む
「壊死巣周囲ニッチ」の組織学的検討)

山口大学大学院医学系研究科 情報解析医学系専攻

医学博士課程

病理形態学分野（病理学第一）

石井 文彩

平成 28 年 1 月

目次

要約	3
Introduction	4
方法	6
腫瘍の切除検体	6
幹細胞性および静止期の指標	6
免疫単染色	6
色素法を用いた免疫多重染色	7
多重蛍光染色	7
細胞培養	8
スフェア形成アッセイ	8
統計処理	9
結果	10
考察	26
謝辞	29
参考文献	30
補足データ	34

要約

背景：幹細胞様の腫瘍細胞のニッチを解明することは、膠芽腫の病態を理解し、制御するために重要である。正常あるいは腫瘍組織の幹細胞において、幹細胞機能を長期にわたって維持するための共通の機序として、細胞周期が静止期にあることが推測されている。我々は以前の研究で、hypoxia-inducible factor (HIF) -1α によって造血幹細胞の細胞周期が静止期に誘導され、長期にわたる高い骨髄再構築能を示すことを明らかにした。この研究結果に基づき、我々はヒト星細胞系腫瘍においても HIF- 1α に制御された静止期の幹細胞様の腫瘍細胞が存在していて、長期にわたる腫瘍形成能を維持しているのではないかと考え、その細胞のニッチを組織学的に検討した。

方法：星細胞系腫瘍 (WHO grade II-IV) の組織切片において、HIF- 1α 陽性の静止期の幹細胞様の腫瘍細胞およびそのニッチを可視化するために、免疫多重染色を用いた。更に、膠芽腫の培養細胞のスフェロイドを用いてこのニッチのモデルを作製し、スフェア形成アッセイによりこのニッチが腫瘍形成能におよぼす影響を評価した。

結果：HIF- 1α 陽性の静止期の幹細胞様の腫瘍細胞を膠芽腫に少数認めたが、grade II, III の星細胞系腫瘍には認めなかった。これらの細胞は、大きな壊死巣と血管の間に局在しており、血管より壊死巣に近接していた。これは、これらの細胞が適度な低酸素環境をニッチとしていることを示唆している。我々は、膠芽腫の培養細胞のスフェロイドを適度な低酸素条件下で培養することにより、HIF- 1α 陽性の静止期の幹細胞様の腫瘍細胞を含むニッチのモデルを作製した。このモデルにおいて、HIF- 1α 陽性の静止期の幹細胞様腫瘍細胞の出現はスフェア形成能の亢進と関連していた。

結論：これらの結果は、膠芽腫において、HIF- 1α 陽性の静止期の幹細胞様腫瘍細胞を含む「壊死巣周囲ニッチ」が高い腫瘍形成能に寄与している可能性を示しており、膠芽腫を制御するための新たな治療標的として期待される。

Introduction

星細胞系腫瘍は、中枢神経系のなかでもっとも発生頻度の高い腫瘍である。WHO 分類によると⁽¹⁾、浸潤性の星細胞腫瘍は、びまん性星細胞腫 (grade II)、退形成性星細胞腫 (grade III)、膠芽腫 (grade IV) に分類されている。この grading は、星細胞腫瘍の生物学的悪性度を反映しており、その中でも膠芽腫はもっとも予後不良である。手術や放射線治療、化学療法に進歩に関わらず、膠芽腫の予後は不良であり、2 年生存率は 3.3% と報告されている⁽²⁾。それゆえに、腫瘍細胞を根絶させるために、真の治療標的細胞の同定を含めた膠芽腫の病態生理の理解が早急に必要とされる。

癌幹細胞とは、自己複製能を有する幹細胞の性格をもった腫瘍細胞の一群であり、腫瘍を構成するヘテロな細胞集団をつくることができる⁽³⁾。そして、この癌幹細胞が、腫瘍形成能や腫瘍の維持、再発に関与していると考えられている。グリオーマに関しては、グリオーマ幹細胞についての報告があり^(4, 5)、これらは、CD133⁽⁵⁾ や CD15⁽⁶⁾、CD44⁽⁷⁾ といった“幹細胞マーカー”の発現や、フローサイトメトリ⁽⁸⁾ を用いた side population の評価に基づき解析されてきた。しかしながら、グリオーマ幹細胞のマーカーとしてコンセンサスが得られているものはない^(3, 9)。それゆえに、膠芽腫の予後不良な病態を規定していると考えられるグリオーマ幹細胞の可視化の成功には未だに至っていないのが現状である。病態生理学的な見地からみると、膠芽腫の極めて重要な特徴は、腫瘍内の微小環境の多彩さである⁽¹⁰⁾。例にとると、血管に富む領域から、極めて低酸素である壊死巣領域まで、様々な領域で構成されている。この微小環境の多彩さが、腫瘍細胞に様々な作用を及ぼし、腫瘍の病態生理に影響を与えている。グリオーマ幹細胞は、腫瘍組織内で無秩序に局在しているわけではなく、特定のニッチに存在していて、高い腫瘍形成能を有するのだと考えられている^(3, 11)。近年の報告では、膠芽腫の病態生理のなかで、血管周囲ニッチ⁽¹²⁾ や低酸素ニッチ⁽¹³⁾ の役割について述べられているが、実際の膠芽腫の組織標本上、グリオーマ幹細胞を有するニッチを正確に可視化して特徴付けるといことは十分にされていない。

成人の組織において、組織の再構築能を維持するためには幹細胞が静止期にあることがいかに重要かということが強調されており、骨髄移植を含め^(14, 15)、これを裏付ける報告が次々になされている。同様に、白血病⁽¹⁶⁾、膀胱癌⁽¹⁷⁾、乳癌⁽¹⁸⁾、悪性黒色腫⁽¹⁹⁾、膠芽腫⁽²⁰⁾ における癌幹細胞においても、静止期にある腫瘍細胞の一群が、腫瘍の増生能に関わっているとの報告がなされている。自然にグリオーマを発症するマウスモデルを用いた研究によると、化学療法後の腫瘍の再増大に関与するのは Ki-67 陰性の静止期の腫瘍細胞の一群であることが報告されている⁽²¹⁾。これらの一連の報告から、膠芽腫の振る舞いを制御している最も重要な細胞を含むニッチを同定するためには、静止期の幹細胞様腫瘍細胞を組織切片上で調べるのが重要と考えられる。Hypoxia-inducible factor (HIF) -1 のサブユニットの一つである HIF-1 α は、細胞の低酸素反応における主要な制御因子であるが⁽²²⁾、グリオーマ細胞の幹細胞細胞の維持や発生にも関わっているとの報告が次々になされている⁽²³⁻²⁵⁾。更に、我々は、造血幹細胞が長期の骨髄再構築能を維持するためには HIF-1 α の適度な発現

により造血幹細胞が静止期に維持されることが必須であることを明らかにした⁽²⁶⁾。これらの知見から、我々はグリオーマ幹細胞細胞においても同様に、HIF-1 α の適度な発現により細胞周期が静止期に維持されており長期の腫瘍再構築能に関与しているのではないかと仮説をたて、星細胞系腫瘍の切除検体を用いて、これらの細胞やニッチの可視化を試みた。

本研究では、我々は免疫多重染色による解析により膠芽腫の組織標本上、HIF-1 α 陽性の静止期の幹細胞様細胞が、大きな壊死巣と血管との間に存在することを見出した。この細胞は、血管より壊死巣に近接してみられた。また、膠芽腫由来細胞のスフェロイドを低酸素環境下で培養すると、低酸素依存性にHIF-1 α 陽性の静止期の幹細胞様細胞が出現し、その存在がスフェア形成能の増強と関連することが明らかになった。これらの発見から、我々は、高い腫瘍形成能をもたらす膠芽腫の病態を規定していると考えられる新しいグリオーマ幹細胞のニッチとして、「壊死巣周囲ニッチ」を提唱したい。

方法

腫瘍の切除検体

山口大学医学部附属病院で手術を施行された浸潤性星細胞系腫瘍 40 例を検討した。これらの症例は、10 例のびまん性星細胞腫(grade II)(平均 [範囲] 年齢)、55 [20-70] 歳、男女比、7:3)、9 例の退形成性星細胞腫(grade III)(49 [17-78] 歳、7:2)、21 例の膠芽腫(grade IV)(67 [48-81] 歳、15:6)から構成されている。全ての症例は、WHO 分類⁽¹⁾に基づき病理診断された。腫瘍を緩衝ホルマリンで固定後、作製したパラフィン切片が免疫組織学的解析に用いられた。この臨床研究は、山口大学医学部附属病院の臨床研究審査委員会で承認されている。また、全ての患者から書面にて同意を得ている。

幹細胞性および静止期の指標

腫瘍細胞の幹細胞性を評価するために、SOX2 と NANOG を選択した。これらは胎児の幹細胞において、自己複製能と多分化能に関わる主要な転写因子としてよく知られており⁽²⁷⁾、膠芽腫では腫瘍形成の主要な役割を担っていると報告されている^(28, 29)。細胞周期が静止期であることを示す指標として、我々は RNA ポリメラーゼ II の C 末端にある 2 番目のセリン残基のリン酸化が抑制されていることを用いた。以降、RNA ポリメラーゼ II の C 末端にある 2 番目のセリン残基のリン酸化を RNApII-S2P と略する。RNA ポリメラーゼ II の C 末端は、7 つのアミノ酸から構成されるペプチド鎖のリピート構造 Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7⁽³⁰⁾ を有している。5 番目のセリン残基のリン酸化 (RNApII-S5P) は、翻訳開始に必要とされる。一方で、RNApII-S2P は mRNA の生成とともに翻訳伸長に必要とされる⁽³⁰⁾。近年、様々な正常組織の静止期の幹細胞において、RNApII-S2P の抑制 (RNApII-S2P^{low}) されていることが報告され⁽³¹⁾、静止期の幹細胞を増殖期の幹細胞や最終分化細胞や老化細胞から識別できるマーカーになるのではないかと考えられている^(14, 31)。RNApII-S5P が陽性であることは、RNApII-S2P^{low} 細胞が生きている指標として用いた。

免疫単染色

抗 carbonic anhydrase IX (CA IX) 抗体以外の一次抗体では、脱パラフィン後の切片は pH9 の抗原賦活化溶液 (ニチレイ) を用いて加熱による賦活化を行った。抗 CA IX 抗体は賦活化処理を行わなかった。内因性ペルオキシダーゼブロックはペルオキシダーゼブロック溶液 (DAKO) を用いた。一次抗体は以下のものを用いた。抗 HIF-1 α (1:20; マウスモノクローナル; clone 54/HIF-1 α ; BD Biosciences), 抗 HIF-2 α (1:400; マウスモノクローナル; clone 190b;

Millipore), 抗 SOX2 (1:100; ヤギポリクローナル; Santa Cruz Biotechnology), 抗 NANOG (1:250; ヤギポリクローナル; Novus), 抗 RNaPII-S2P を特異的に認識する抗リン酸化抗体 (1:6000; ラビットポリクローナル; Abcam), 抗 Ki-67 (1:1000; ラビットモノクローナル; clone EPR3610; Epitomics), 抗 CA IX (1:200; ラビットポリクローナル; Novus) 抗体。Horscradish peroxidase (HRP)-標識の二次抗体は以下のものを用いた。マウスやラビットの一次抗体には EnVision+ (Dako)、ヤギの一次抗体には anti-goat immunoglobulins/HRP (Dako) を二次抗体として用いた。発色は 3,3'-diaminobenzidine (DAB) で行い、ヘマトキシリンで核染色を行った。NANOG 免疫染色のコントロールにはヒトの精巣のセミノーマを、CA IX 免疫染色のコントロールには腎細胞癌をそれぞれ用いた。

色素法を用いた免疫多重染色

グリオーマの組織標本やスフェロイドを用いた SOX2、HIF-1 α 、RNaPII-S2P あるいは NANOG、HIF-1 α 、RNaPII-S2P の免疫三重染色は、抗原賦活化を行い、内因性ペルオキシダーゼをブロックした後、抗 SOX2 あるいは抗 NANOG 抗体でインキュベートし二次抗体はアルカリフォスファターゼ (AP) 標識のロバ抗ヤギ抗体(Jackson)を用いた。発色は、Vulcan Fast Red (Biocare Medical)を用いた。交叉反応を防ぐために denaturing Solution (Biocare Medical)で処理後、抗 HIF-1 α 抗体と RNaPII-S2P のリン酸化を認識する抗リン酸化抗体を反応させ、カクテル二次抗体である MACH 2 Double Stain 1 (AP-標識のヤギ抗マウス抗体+HRP 標識のヤギ抗ラビット抗体) (Biocare Medical)を反応させた。HIF-1 α の発色は Perma Blue/AP (Diagnostic BioSystems)で行い、RNaPII-S2P の発色は DAB を用いた。

乳癌の組織標本におけるエストロゲンレセプター(ER)、プロゲステロンレセプター (PgR)、Ki67 の免疫染色は、前述の賦活化処理や内因性ペルオキシダーブロックを行った後、抗 ER 抗体 (1:80; マウスモノクローナル; clone 1D5; Dako)を反応させた。AP 標識のロバ抗マウス二次抗体 (Jackson)を反応させた後、Vulcan Fast Red 発色した。交叉反応を防ぐため、Denaturing Solution を用いた後、一次抗体の抗 PgR 抗体 (1:100; マウスモノクローナル clone PgR 636; Dako) と 抗 Ki-67 抗体 を反応させた。続いて、カクテル二次抗体 MACH 2 Double Stain 1 を用い、PgR を Perma Blue/AP で発色させ、Ki-67 を DAB で発色させた。

免疫多重染色における各抗体の染色性は、同じ抗体の免疫単染色の染色性と比較して、妥当な染色性であることを確認した。

多重蛍光染色

賦活化後の切片を一次抗体で反応させた後、以下の二次抗体を用いた。SOX2 あるいは

NANOG に対しては Alexa Fluor 546- or Alexa Fluor 633-標識のロバ抗ヤギ抗体 (Molecular Probes) 、 HIF-1 α に対してはビオチン標識のロバ抗マウス抗体(Jackson)と Alexa Fluor 488-標識のストレプトアビジン(Molecular Probes)を用いた。RNApII-S2P に対しては、Alexa Fluor 635- あるいは Alexa Fluor 405-標識のヤギ抗ラビット抗体 (Molecular Probes)を用いた。RNApII-S5P を特異的に認識する抗リン酸化抗体(1:1000; Abcam) には、Zenon Alexa Fluor 546 rabbit IgG labeling キット (Molecular Probes)を用いて直接蛍光標識した。核染色は、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を用いた。染色後の切片は共焦点顕微鏡、LSM510META (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) で観察した。また、微分干渉像も得た。撮像した蛍光写真は Zeiss LSM Image Browser software (Carl Zeiss Microscopy)を用いて処理した。色素法を用いた免疫多重染色結果を確認するために、代表的な膠芽腫 3 例を検討した。それぞれの症例で、2 視野から 20 視野を観察し、一視野あたり 100 から 300 個の細胞を解析した。

細胞培養

ヒト膠芽腫の培養細胞である T98G (American Type Culture Collection) を用いた。細胞培養は、minimum essential medium (Gibco, Life Technologies) に 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; HyClone, South Logan)を添加して行った。多数の細胞から構成されるスフェロイドを作製するために、細胞を poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA; Sigma-Aldrich)でコーティングされた 60-mm culture dish に細胞を 1×10^6 cells/dish の濃度でまいて、B-27 supplement (Gibco, Life Technologies)、20 ng/ml epidermal growth factor (Peprotech)、20 ng/ml basic fibroblast growth factor (Peprotech)を添加した serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 (Gibco, Life Technologies) (stem cell medium)⁽³²⁾で培養した。3 日間の培養後、直径 400–800 μ m のスフェロイドが形成された。さらに、正酸素(5% CO₂ and 95% atmospheric air) あるいは低酸素条件 (5% CO₂ and 5% O₂ balanced with N₂) で 9 もしくは 24 時間培養を行った。低酸素培養には、O₂ コントールシステムをついたマルチガスインキュベーター (APM-50DR, ASTEC) を用いた。

スフェア形成アッセイ

限界希釈法を用いたスフェア形成アッセイは過去の論文で記載されている手法で行った^(33, 34)。スフェロイドは、0.25% (w/v) trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution (Sigma-Aldrich)と 25G 針を付けた注射器により細胞を single cell に分散させた。トリパンブルー色素排除を用いて、生きている細胞数を計測し、stem cell medium を含む pHEMA-coated 96-well plate を用いて 1024 から 0.5 cells/well まで 8 組ずつ 2 倍ごとに希釈していった。正

酸素条件下で7日間培養し、各 well における直径 50 μm 以上のスフェアの有無を記録した。スフェア形成効率は過去の論文に記載されている方法⁽³³⁾で評価した。

統計処理

星細胞系腫瘍の外科病理標本における grade II、III、IV の比較は Mann-Whitney *U* test を用いて行った。異なったパラメータ間の関連性を評価するために直線回帰とピアソンの相関係数を用いた。培養細胞を用いた実験において、統計的有意性は Student's *t* test を用いて評価した。

結果

膠芽腫細胞のなかに、HIF-1 α 陽性となる静止期の幹細胞様細胞が少数含まれている

我々は、星細胞系腫瘍の組織標本において、HIF-1 α によって調節されている静止期の幹細胞細胞の同定を試みた。具体的には、SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} あるいは NANOG⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} という表現型を示す細胞の同定を試みた。まず、最初に膠芽腫の組織標本において SOX2、NANOG、HIF-1 α 、RNApII-S2P の免疫単染色を行った(Fig 1a)。

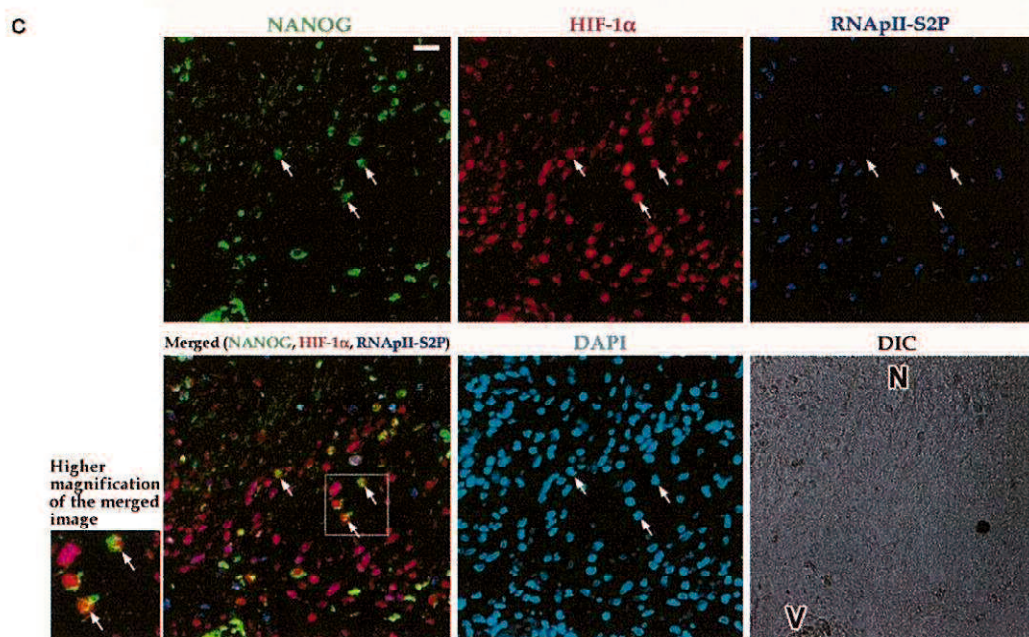
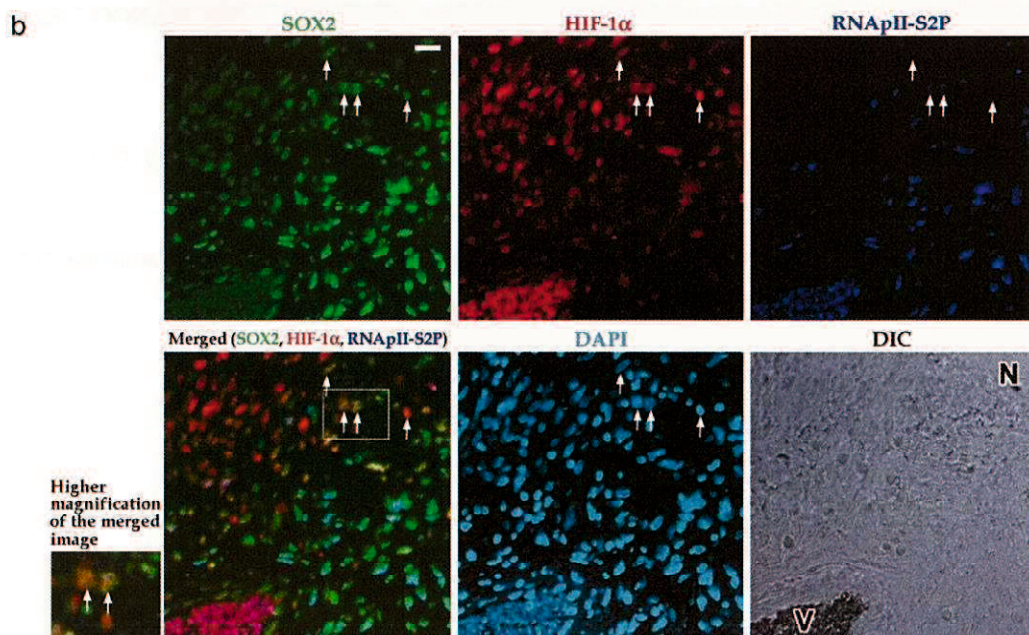
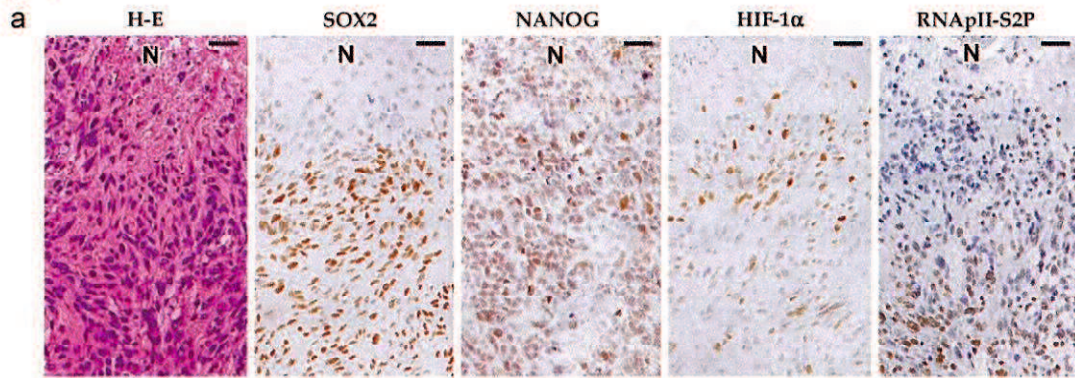
SOX2 と NANOG は腫瘍細胞の核に高頻度に陽性となった。HIF-1 α は壊死巣に近接した部において多数の腫瘍細胞の核に陽性となった。RNApII-S2P に対する特異的な抗リン酸化抗体はほぼすべての腫瘍細胞の核に陽性となったが、壊死巣周囲では発現が抑制されていた。我々は、細胞低酸素の他のマーカーである CA IX の発現も検討した。CA IX は、低酸素で誘導される膜貫通型酵素として知られており、微小環境の pH を調節している^(35,36)。(S1 Fig)で示しているように、壊死巣周囲における HIF-1 α ⁺ 細胞と CA IX⁺細胞の分布は類似している。

予備実験として、RNApII-S2P に対する特異的な抗リン酸化抗体が適切な静止期のマーカーであるかどうかを確認するために、RNApII-S2P^{low} 細胞と Ki-67 陰性(Ki-67⁻)細胞の分布を比較した。*In vitro* の実験において、RNApII-S2P^{low} 細胞と Ki-67⁻ 細胞いずれも静止期の培養条件下(血清の枯渇)で出現したが、増殖を亢進させる条件下では出現しなかった(S2a Fig)。*In vitro* の静止期の条件では、RNApII-S2P^{low} 細胞は Ki-67⁻ 細胞よりも乏しかった。膠芽腫の組織標本においても RNApII-S2P^{low} 細胞は Ki-67⁻ 細胞より乏しかった(S2b Fig)。これらの所見から、RNApII-S2P^{low} という表現型を示す静止期の細胞は、組織の幹細胞と類似して、転写が抑制されたより特異性が高いものだと考えられた。

続いて、SOX2、HIF-1 α 、RNApII-S2P の蛍光 3 重染色を行ったところ、SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} という表現型を示す細胞を壊死巣周囲に少数認めた(Fig 1b)。SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} 細胞が生存しているかどうかに関しては蛍光 4 重染色を行い、これらの細胞が RNApII-S2P⁺ という表現型を示していることを確認した(S3 Fig)。SOX2 を NANOG に置き換えた蛍光 3 重染色においても NANOG⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} という表現型を示す細胞を壊死巣周囲に少数認めた(Fig 1c)。

壊死巣周囲の蛍光染色画像の細胞数を計測したところ、SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} 細胞や NANOG⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} 細胞はそれぞれ一視野あたり 0~6.3%、0~4.7%であった。

Fig. 1



d

Primary antibodies	Secondary antibodies
1. Goat anti-SOX2 or Goat anti-NANOG	Donkey anti-goat IgG (Alexa Fluor 546)
2. Rabbit anti-RNAPII-S2P	Goat anti-rabbit IgG (Alexa Fluor 635)
3. Mouse anti-HIF-1α	Donkey anti-mouse IgG (Alexa Fluor 488)

Fig 1. ヒトの膠芽腫の組織標本において $SOX2^+$ (あるいは $NANOG^+$) $HIF-1\alpha^+$ $RNApII-S2P^{low}$ という表現型を示す細胞を見出した

a: 膠芽腫の代表的な組織標本を用いたヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、 $SOX2$ 、 $NANOG$ 、 $HIF-1\alpha$ 、 $RNApII-S2P$ (serine 2 phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II)の免疫単染色。壊死巣(N)周囲において、 $RNApII-S2P$ の発現の減弱がみられる。

b: $SOX2$ 、 $HIF-1\alpha$ 、 $RNApII-S2P$ を用いた蛍光 3 重染色。壊死巣(N)周囲に $SOX2^+$ $HIF-1\alpha^+$ $RNApII-S2P^{low}$ 細胞(矢印)がみられる。

c: $NANOG$ 、 $HIF-1\alpha$ 、 $RNApII-S2P$ を用いた蛍光 3 重染色。壊死巣(N)周囲に $NANOG^+$ $HIF-1\alpha^+$ $RNApII-S2P^{low}$ 細胞(矢印)がみられる。

b と c のパネルの左下にある挿入図は merged image の四角形で囲んだ部分の拡大写真である。

N、壊死巣；V、血管；DAPI、4',6-diamidino-2-phenylindole (核染)；DIC、differential interference contrast image。スケールバー、25 μ m。

d: b と c の染色方法の要約。

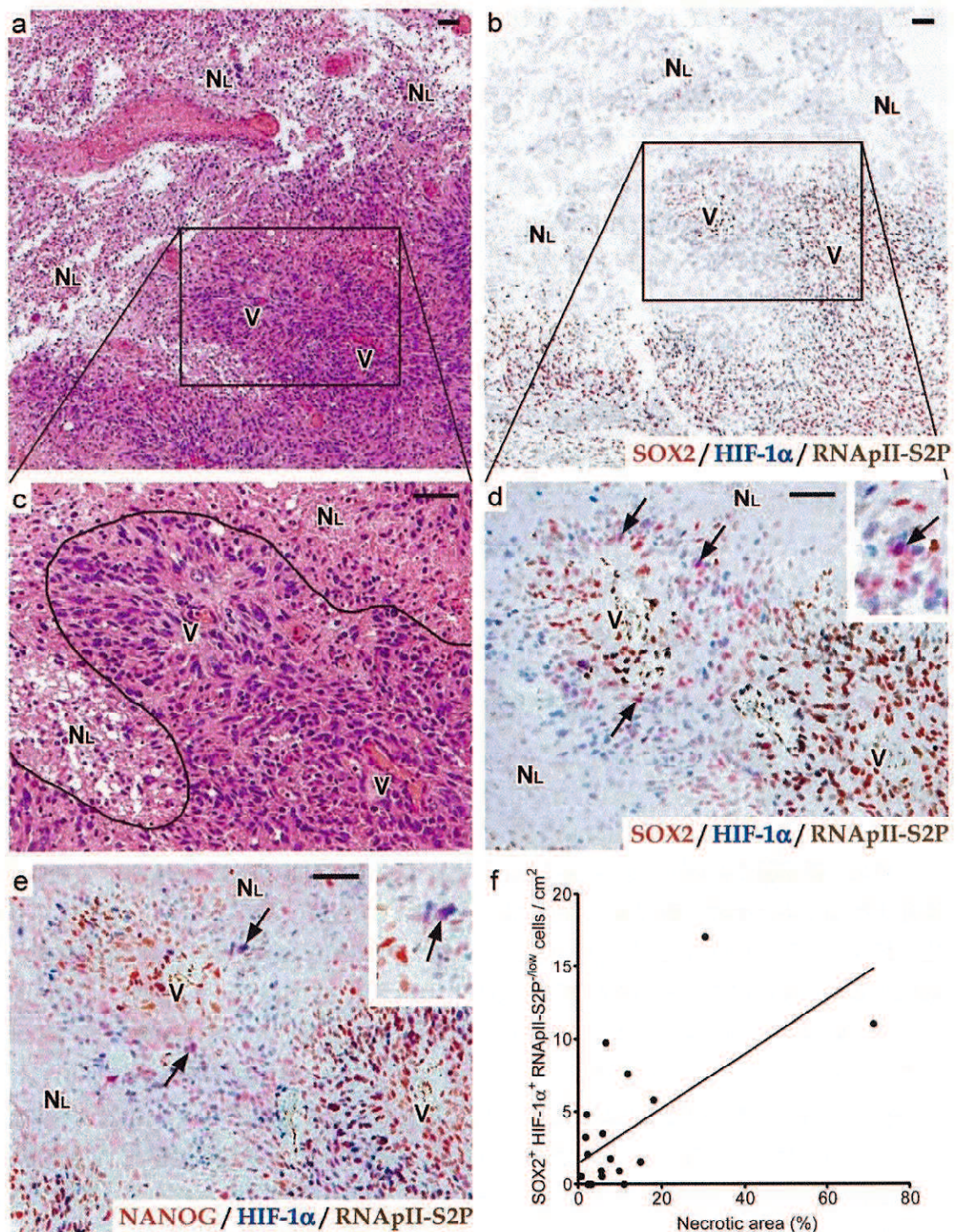
SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞と NANOG⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞は、大きな虚血性壊死巣に近接しており、膠芽腫のみに認められる

共焦点顕微鏡下観察による暗視野の蛍光染色は、数多くの組織標本を用いて SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞や NANOG⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞の分布を解析する手法としては適していないため、蛍光染色から、明視野の色素法を用いた免疫多重染色へと方法を変更した(Fig 2)。SOX2、HIF-1 α 、RNApII-S2P をそれぞれ Vulcan Fast Red (明るい赤)、Perma Blue (明るい青)、DAB (茶)で発色することで、目的とする SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞は紫色として示された。色素の色の重なりが正しく評価できているかどうかに関しては、予備実験として乳癌の組織標本を用いて ER、PgR、Ki-67 免疫染色を行い確認した(S4 Fig)。ER、PgR、Ki-67 はそれぞれ Vulcan Fast Red、Perma Blue、DAB で発色した。ER⁺ PgR⁺ Ki-67 細胞は核が紫色を呈する細胞として容易に認識できた(S4e Fig)。このことから、明視野の色素法を用いた免疫3重染色は、星細胞系腫瘍で SOX2⁺ (NANOG⁺) HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞を同定するのに適切な方法であることが示された。

Figs 2a-d で示しているように、膠芽腫の大きな虚血性壊死巣周囲に少ないながら SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞が同定された。SOX2 の代わりに NANOG を用いて検討しても同様の所見が得られた(Fig 2e)。膠芽腫 21 例のうち、大きな虚血性壊死巣は 20 例に含まれており、その中の 16 例において大きな虚血性壊死巣周囲に SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞が含まれていた。大きな虚血性壊死巣周囲に SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞が含まれていなかった 4 例に関しては、SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞自体の数が乏しいことを考慮すると、免疫染色で用いた切片内には含まれていなかったものと考えられた。

更に、膠芽腫において、大きな虚血性壊死巣と SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞との関連を評価するために、膠芽腫 21 例を用いて SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞の陽性頻度と壊死巣面積との関連をプロットした。その結果、壊死巣と SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞の陽性頻度の間には高い相関関係があることが判明した(Fig 2f; $y = 0.188x + 1.46$; ピアソンの相関係数 $r = 0.64$, $n = 21$, $P < 0.01$)。対照的に、SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞は、膠芽腫のもう一つのタイプの壊死巣である偽柵状壊死といった小さな壊死巣周囲^(1, 37, 38)(Figs 3a and b)、あるいは壊死巣のない領域には認められなかった(Fig 4)。蛍光多重染色において、小さな偽柵状壊死周囲の細胞を 1200 個、壊死巣のない領域の細胞を 4600 個解析したが、SOX2⁺ (or NANOG⁺) HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞は認められなかった。更に、診断基準上、壊死巣を欠如しているとされる星細胞系腫瘍 grade II-III においても SOX2⁺ (or NANOG⁺) HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞は認められなかった。これらの所見から、SOX2⁺ (or NANOG⁺) HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞は膠芽腫に特異的であると考えられた(Figs 3e-g)。

Fig. 2



g	Primary antibodies	Secondary antibodies	Chromogens
1.	Goat anti-SOX2 or Goat anti-NANOG	Donkey anti-goat IgG	Vulcan Fast Red
2.	Mouse anti-HIF-1α	MACH 2 Kit (goat anti-mouse IgG)	Perma Blue
3.	Rabbit anti-RNAPII-S2P	MACH 2 Kit (goat anti-rabbit IgG)	Diaminobenzidine

Fig 2. ヒト膠芽腫の組織標本にて、色素法を用いた免疫多重染色によって $SOX2^+$ (あるいは $NANOG^+$) $HIF-1\alpha^+$ $RNApII-S2P^{/low}$ となる腫瘍細胞を同定し、その細胞が大きな虚血性壊死巣に近接して局在していることを明らかにした

a-e: 膠芽腫の連続切片における大きな虚血性壊死巣周囲。HE 染色(a・e)、 $SOX2$ 、 $HIF-1\alpha$ 、 $RNApII-S2P$ の免疫三重染色(b・d)あるいは $NANOG$ 、 $HIF-1\alpha$ 、 $RNApII-S2P$ の免疫三重染色(c)を示す。(SOX2 あるいは $NANOG$ 、赤; $HIF-1\alpha$ 、青; $RNApII-S2P$ 、茶)。a と b の四角で示した領域が、c と d の拡大写真に相当する。c の曲線は、大きな虚血性壊死巣と viable な腫瘍組織との境界線を示している。d と e の矢印は、それぞれ $SOX2^+HIF-1\alpha^+RNApII-S2P^{/low}$ 細胞、あるいは $NANOG^+HIF-1\alpha^+RNApII-S2P^{/low}$ 細胞を示している。d と e の挿入図は、これらの細胞の拡大像を示している(矢印)。

N_L 、大きな虚血性壊死巣; V、血管; スケールバー50 μ m。

f: 膠芽腫 21 症例における、壊死巣の面積と $SOX2^+HIF-1\alpha^+RNApII-S2P^{/low}$ 細胞頻度の相関を示した。直線は回帰直線である ($y=0.118x+1.46$ 、ピアソンの相関係数 $r=0.64$)。

g: b と d-f の染色方法の要約。

Fig. 3

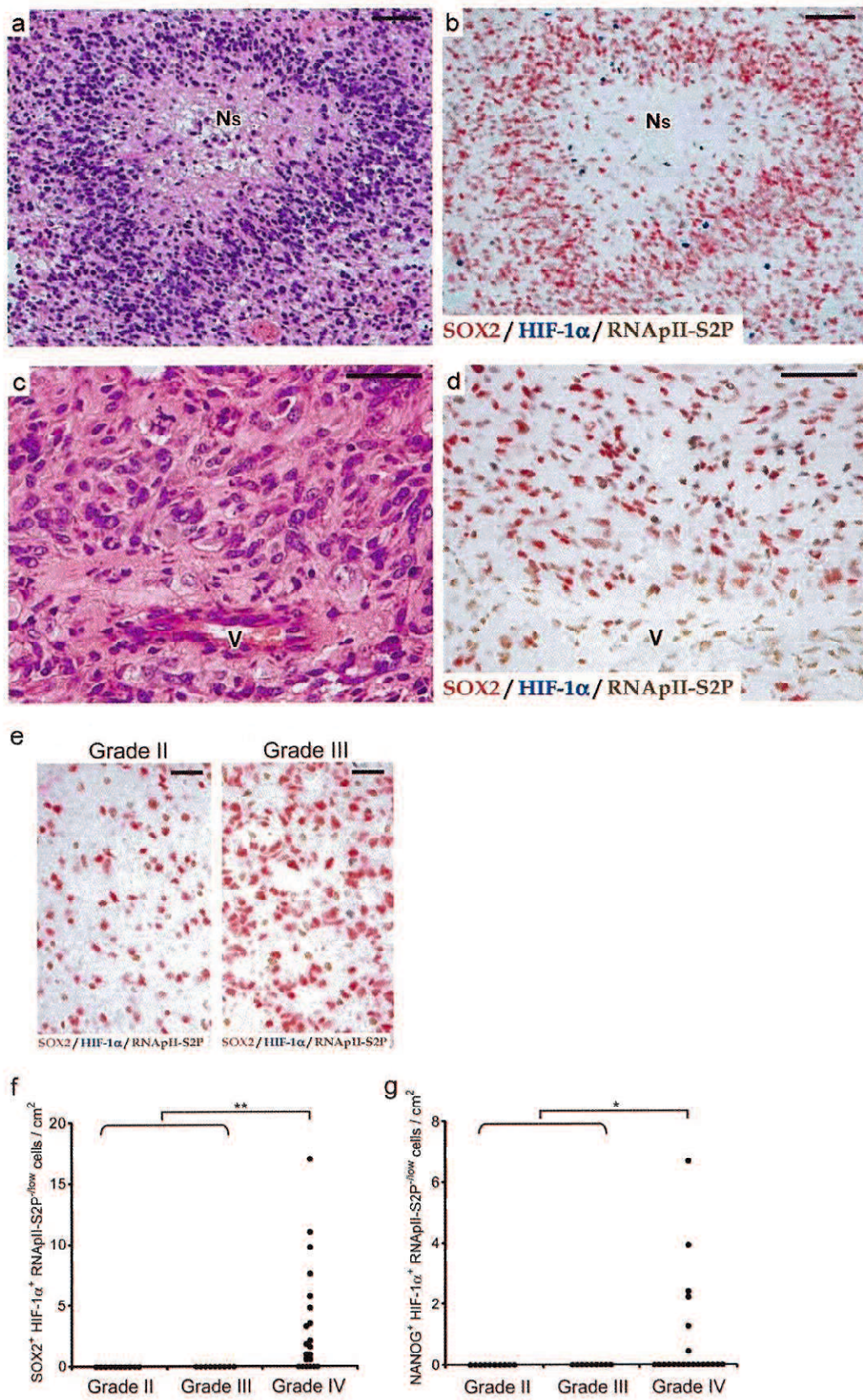


Fig 3. SOX2⁺ (あるいは NANOG⁺) HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} となる腫瘍細胞は、小さな偽柵状壊死の周囲や非壊死領域にはみられなかった。これらの細胞は、膠芽腫 (grade IV) にはみられたが、びまん性星細胞腫 (grade II)、退形成性星細胞腫 (grade III) には認められなかった

a-b: 膠芽腫の連続切片における小さな偽柵状壊死巣。

c-d: 膠芽腫の連続切片における非壊死領域。

HE 染色(a・c)、免疫三重染色(b・d)。SOX2⁺ かつ/あるいは HIF-1 α ⁺ 細胞はみいだされるものの、これらの細胞は RNApII-S2P⁺である。従って、SOX2⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞はみられない。

N_s、小さな偽柵状壊死巣; V、血管; スケールバー50 μ m。

e: 星細胞系腫瘍 (WHO grade II, III)における SOX2、HIF-1 α 、RNApII-S2P の免疫三重染色。SOX2⁺HIF-1 α ⁺RNApII-S2P^{-low} 細胞は見出されない。スケールバー25 μ m。

f ,g:星細胞系腫瘍 WHO grade II-IV における SOX2⁺HIF-1 α ⁺RNApII-S2P^{-low} 陽性細胞頻度(f)と、NANOG⁺HIF-1 α ⁺RNApII-S2P^{-low} 陽性細胞頻度(g)。*, $P<0.05$; **, $P<0.01$. (grade IV vs grade II と grade III を合わせてグループとしたもの)

Fig. 4

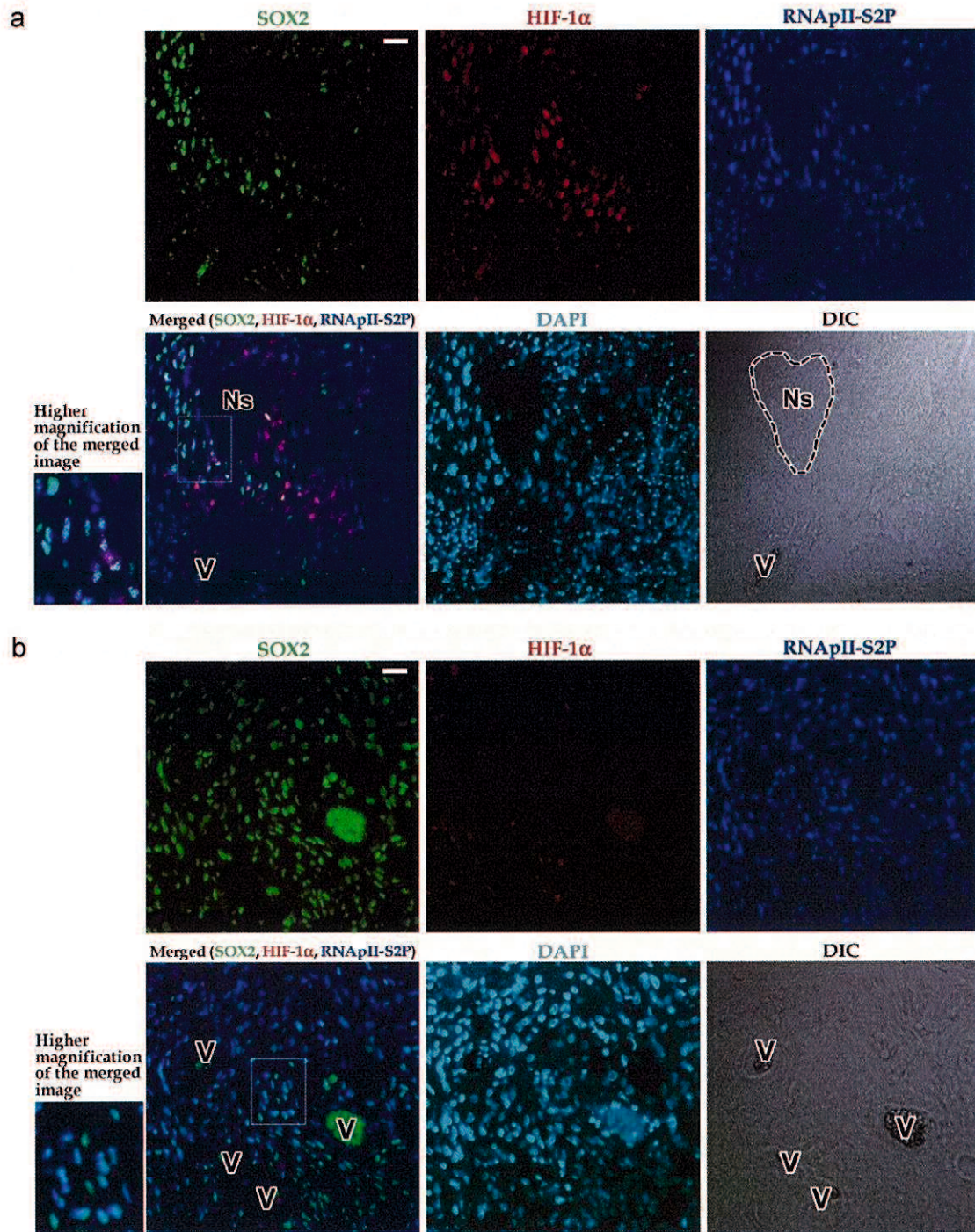


Fig 4. 膠芽腫の小さな偽柵状壊死の周囲あるいは非壊死領域における SOX2、HIF-1 α 、RNApII-S2P の蛍光 3 重染色

a: 小さな偽柵状壊死を含む膠芽腫の組織標本。SOX2⁺ かつ/あるいは HIF-1 α ⁺ 細胞はみいだされるものの、これらの細胞は RNApII-S2P⁺である。従って、SOX2⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} 細胞はみられない。

b: 非壊死領域の膠芽腫の組織標本。SOX2⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} 細胞はみられない。

a・b パネルの左下にある挿入図は、merged image の四角形で囲んだ部分の拡大写真である。

N_s、小さな偽柵状壊死巣；V、血管；DIC、differential interference contrast image。

スケールバー、25 μ m。

HIF-1 α と RNApII-S2P の免疫二重染色において、大きな虚血性壊死巣周囲において比較的広範囲に HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} 細胞を認めた(Fig 5a における核の青い細胞)。これは、SOX2、HIF-1 α と RNApII-S2P の免疫三重染色において、SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} 細胞が少ないことと対照的である(Fig 5b における核の紫の細胞)。この知見は、HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} 細胞のなかの一部の細胞のみが、組織内の特殊な微小環境に反応して、幹細胞マーカーを発現することを示唆している。

SOX2⁺ (NANOG⁺) HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} 細胞が、壊死巣周囲かつ血管から一定の距離を保った部に局在していることも注目値する。その領域の腫瘍細胞は、適度な低酸素環境下にあり、適度な HIF-1 α 蛋白を発現していると考えられる。SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} 細胞の出現が、壊死巣や血管からの距離に依存しているかどうかをみるために、組織標本を用いて SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} 細胞と、大きな虚血性壊死巣あるいは最も近接した血管との距離を計測した。Fig 5c では、膠芽腫で認められた 135 個の SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} 細胞を示しているが、この細胞が 2 つの変数によって規定されている傾向が明らかになった($y = 0.205x + 17.4$; $r = 0.34$, $n = 135$, $P < 0.01$)。ほとんどのプロット (80.7%)が、直線 $y = x$ の下(Fig 5c における灰色領域)に分布していることから、ほとんどの SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} 細胞が、大きな虚血性壊死巣と近接した血管との間に局在していて、血管よりも壊死巣に近接して存在しているということが示された。この結果から、HIF-1 α によって制御される静止期の幹細胞様細胞を有するニッチは、大きな虚血性壊死巣周囲(壊死巣周囲ニッチ)にあり、血管からの酸素の拡散の影響を受けている可能性が示唆された。

Fig. 5

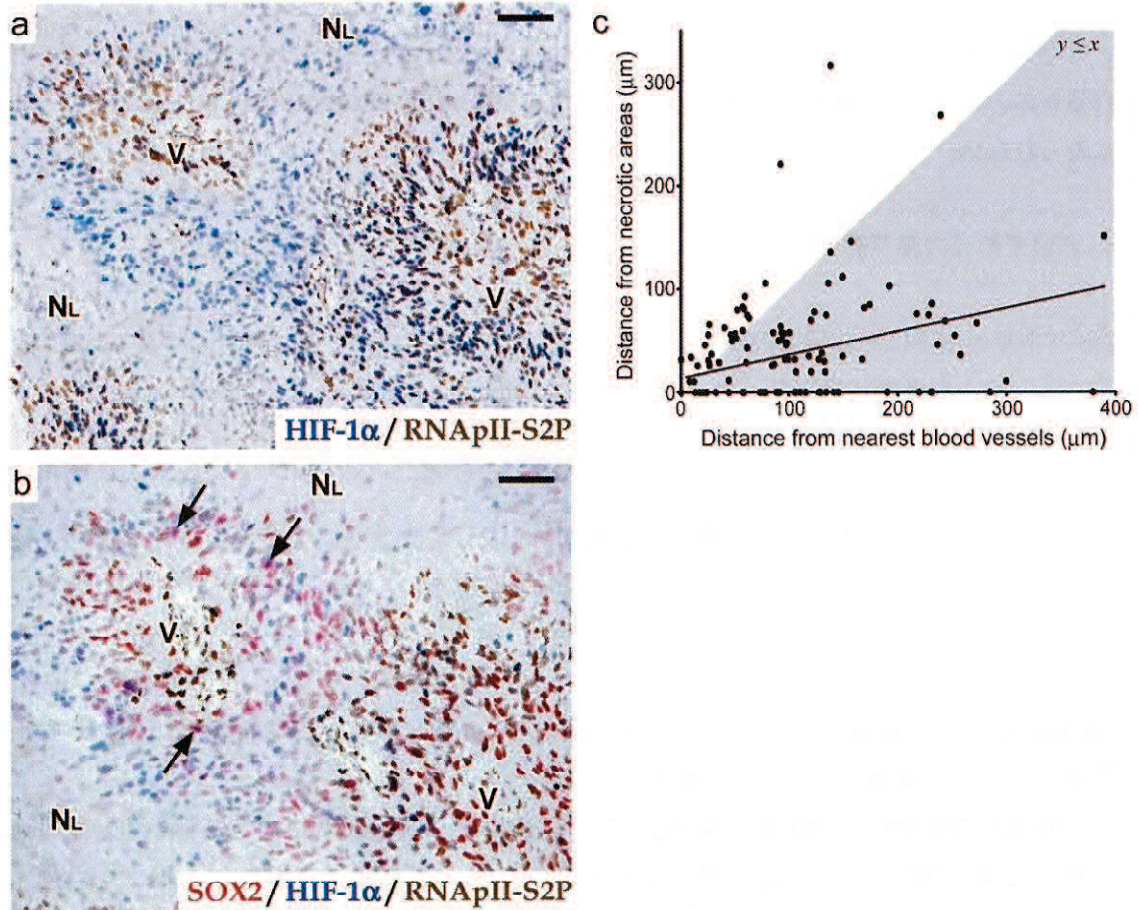


Fig 5. $SOX2^+HIF-1\alpha^+ RNApII-S2P^{low}$ 細胞の局在性は、壊死巣や血管からの距離と関係している

a・b: 大きな虚血性壊死巣を含む膠芽腫標本の連続切片。SOX2 と HIF-1 α を用いた免疫二重染色 (a)、SOX2、HIF-1 α 、RNApII-S2P を用いた免疫三重染色(b)。(SOX2、赤; HIF-1 α 、青; RNApII-S2P、茶)。b の矢印は $SOX2^+HIF-1\alpha^+ RNApII-S2P^{low}$ 細胞を示している。

N_L、大きな虚血性壊死巣; V、血管; スケールバー50 μ m。

c: $SOX2^+HIF-1\alpha^+ RNApII-S2P^{low}$ 細胞から最も近接している血管および壊死巣までの距離との関連を示した図。膠芽腫 12 症例の 135 個の $SOX2^+HIF-1\alpha^+ RNApII-S2P^{low}$ 細胞の局在性をプロットした。直線は回帰直線を示している。(y=0.205x+17.4, r=0.34)。y \leq x となる領域を灰色で示している。

我々は、代表的な膠芽腫 3 例において SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞以外の表現型を示す細胞の頻度と局在性についても調べた($n=3$)。細胞頻度の乏しい SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞(0–17 cells/cm²; Fig 3f)とは対照的に、SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P⁺ 細胞(1.9×10^5 – 4.0×10^5 cells/cm²) や SOX2⁻ HIF-1 α ⁻ RNApII-S2P⁺ cells (1.1×10^5 – 2.7×10^5 cells/cm²)は、血管周囲や壊死巣のない領域に頻度高く認められた。SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P⁺ 細胞(0– 2.8×10^4 cells/cm²)と SOX2⁻ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P⁺ cells (3.1×10^2 – 2.1×10^4 cells/cm²) 細胞に関しては、症例間でばらつきがあったが、これらの細胞は壊死巣と近接した血管との間に局在する傾向があった。SOX2⁻ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞 (1.4×10^1 – 1.4×10^2 cells/cm²)と SOX2⁺ HIF-1 α ⁻ RNApII-S2P^{-low} cells (2.0×10^1 – 1.1×10^2 cells/cm²)細胞の陽性頻度は乏しかったが、SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞よりは多かった。これらの静止期の RNApII-S2P^{-low} 細胞は SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞と同様、主に壊死巣周囲に認められた。

HIF ファミリーの他のメンバーである HIF-2 α は、グリオーマにおいて幹細胞様細胞を制御しているのではないかと考えられている⁽²³⁾。我々は、膠芽腫の連続切片を用いて SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞と HIF-2 α ⁺ 細胞との局在性を比較した(S5 Fig)。HIF-2 α ⁺ 細胞は、壊死巣周囲と血管周囲領域の両方に認められた。ごくたまに、HIF-2 α ⁺ 細胞と大きな虚血性壊死巣周囲にある SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞の局在性が近接していることがある(S5a and b Figs)。しかしながら、壊死巣周囲(S5c and d Figs)や非壊死領域(S5e and f Figs)において HIF-2 α ⁺ 細胞と SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞の分布は大部分が異なっており、HIF-2 α を発現している細胞群は SOX2⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞とは異なった細胞群と考えられた。

膠芽腫細胞のスフェロイドにおいて、低酸素依存性に NANOG⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞が出現し、その細胞の出現とスフェア形成能が関連している

次に、我々は、上記のニッチのモデルをスフェロイド培養によって *in vitro* で作製した。ヒトの膠芽腫細胞である T98G を正酸素(20% O₂)で培養してスフェロドを作製した。更に 9 時間あるいは 24 時間、正酸素あるいは低酸素条件(5% O₂)で培養した(Fig 6a)。正酸素では、スフェロイドはびまん性に RNApII-S2P 陽性細胞から構成されていた。HIF-1 α は陰性あるいは弱陽性であった(Fig 6e)。HIF-1 α の亢進は、低酸素条件で 9 時間あるいは 24 時間培養した場合に認められた(Figs 6f and g)。低酸素 9 時間ではスフェロイドを構成するほぼすべての細胞が RNApII-S2P⁺細胞であったが(Fig 6f)、低酸素 24 時間では、スフェロイド中心部にのみ RNApII-S2P^{-low} 細胞が出現した(Fig 6g)。NANOG、HIF-1 α 、RNApII-S2P の免疫三重染色では、NANOG⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞が 24 時間低酸素条件においてのみ明瞭に出現した(Fig 6j)。興味深いことに、NANOG⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞はもっとも低酸素である

と考えられるスフェロイド中心部と、5% O₂ にさらされていると考えられるスフェロイド表層部との中間部に認められた。NANOG⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞を含む領域は、膠芽腫組織における「壊死巣周囲ニッチ」のモデルと考えられる。次に、スフェロイドをバラバラに個細胞化して、正酸素下で以下の3条件でスフェア形成アッセイを行った。正酸素のコントロールと、低酸素9時間でのスフェア形成効率は大差なかった。一方で、低酸素24時間でのスフェア形成効率は正酸素のコントロールと比べて有意に亢進していた($P < 0.05$) (Fig 6k)。これらの結果から、5%低酸素条件下で24時間培養したスフェロイドにおいて腫瘍形成能の亢進が示された。これは、NANOG⁺ HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} という表現型を示す細胞を有する適度な低酸素ニッチが存在しているためと推測される。

総括すると、これらの結果から、膠芽腫組織において、腫瘍内の低酸素勾配によって形成される「壊死巣周囲ニッチ」にHIF-1 α ⁺となる静止期幹細胞様細胞があり、腫瘍形成能の亢進に関与することを示唆された(Fig 7)。

Fig. 6

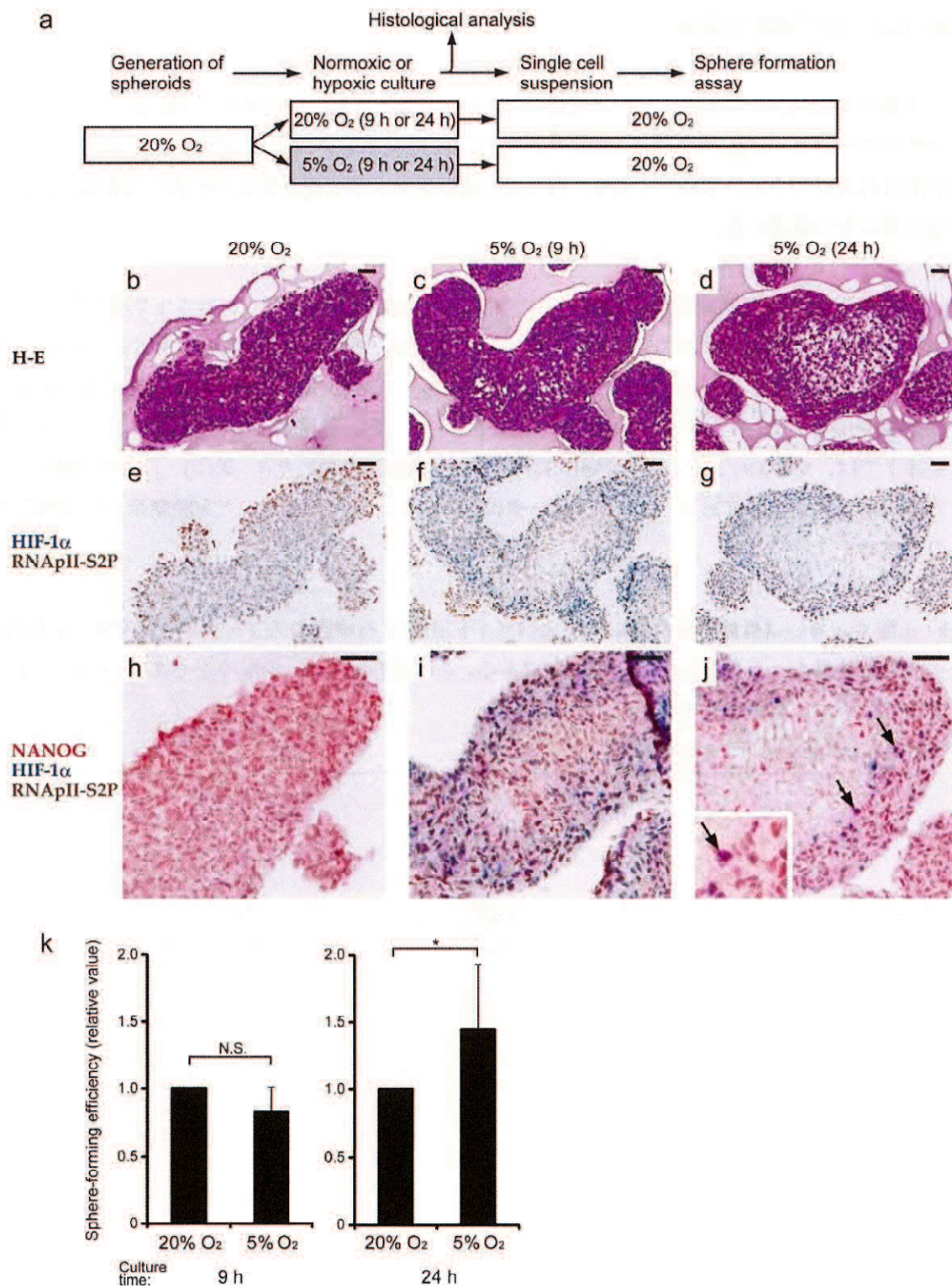


Fig 6. T98G 膠芽腫細胞から作製したスフェロイドにおいて出現した NANOG⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low} 細胞の意義

a: 実験の概略図。スフェロイドは正酸素(20% O₂)で作製し、その後正酸素と低酸素の二つの培養条件群に分けた。正酸素あるいは低酸素(5% O₂)で9時間あるいは24時間培養した後に、組織学的解析およびスフェア形成アッセイを行った。低酸素および正酸素条件の結果の比較は、同じ培養時間のものを用いた。

b-j: 正酸素あるいは低酸素培養条件下のスフェロイドの組織像の解析。正酸素で培養した群は、培養9時間、24時間いずれも類似した所見を示したため、24時間の結果のみを示している。HE染色(b-d)、HIF-1 α とRNApII-S2Pの免疫二重染色(e-g)、NANOG、HIF-1 α 、RNApII-S2Pの免疫三重染色(h-j)。(NANOG、赤; HIF-1 α 、青; RNApII-S2P、茶)。低酸素24時間のスフェロイド培養条件下では、NANOG⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{low}(紫色の細胞)を認めた(j、矢印)。jの挿入図は、この紫の細胞の拡大図である。これらのデータは、少なくとも3回の独立した実験結果の代表的なものである。

k: 正酸素あるいは低酸素条件群のスフェロイドに由来する細胞のスフェア形成効効率。数値は、正酸素の結果を1とした上での相対的値である。これらの結果は、少なくとも7回の独立した実験結果の平均±標準偏差である。

N.S., not significant; **P*<0.05

Fig. 7

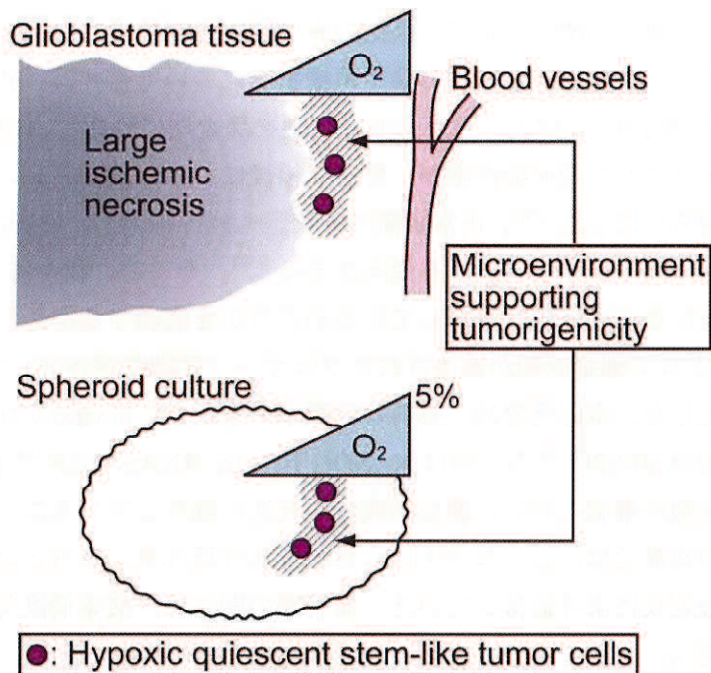


Fig 7. 本研究結果をまとめたモデル図

本研究における、 $SOX2$ (あるいは $NANOG$) $^+$ $HIF-1\alpha$ $^+$ $RNApII-S2P^{low}$ 細胞は、低酸素状態で静止期にある幹細胞様細胞を表している。そして、この表現型を示す細胞の出現は、スフェア形成能の亢進と関連している。この細胞は、膠芽腫内の大きな虚血性壊死巣周囲に局在しており（壊死巣周囲ニッチ）、また 5% O_2 の低酸素条件で培養したスフェロイドの表層部と中心部との中間領域に出現した。これらの部位に、腫瘍形成能を支持する微小環境があることが示唆される。膠芽腫やスフェロイド内において O_2 の濃度勾配があるため、適度な低酸素によりこの微小環境が形成される。

考察

膠芽腫細胞を根絶するための新しい標的として、長期の高い腫瘍形成能を持つグリオーマ幹細胞を有するニッチが挙げられる。造血細胞の骨髓再構築能について言えば、我々は、以前の研究において、適度な HIF-1 α 蛋白の発現が造血幹細胞を静止期に維持し、HIF-1 α によって細胞周期が静止期に維持された造血幹細胞が、骨髓移植後において長期の高い骨髓再構築能に関与することを明らかにした⁽²⁶⁾。正常組織の幹細胞も癌幹細胞も、幹細胞としての性格を維持できる背景には同じ機序を共有する傾向がある⁽³⁹⁾。そこで、我々は、同様のニッチが膠芽腫の病態生理に重要な役割を果たしているかどうかを解明するため、グリオーマにおいても HIF-1 α によって細胞周期が維持されたグリオーマ幹細胞が存在しているという概念を適応することとした。本研究では、外科病理標本の解析と、*in vitro* の実験の二つを行い、SOX2⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} あるいは NANOG⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} といった表現系を示す静止期の幹細胞様細胞を有し、腫瘍形成能の亢進に関与しているニッチについて述べている。膠芽腫の組織では、このニッチは大きな虚血性壊死巣と血管との間に局在しており、血管よりも壊死巣により近接していた。血管間の間には、酸素濃度勾配があり相対的に高い酸素濃度を示し、壊死巣では高度の低酸素となっているが(Fig. 7)、SOX2(あるいは NANOG)⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞を含む領域は、適度な低酸素環境にあると考えられ、適度な HIF-1 α 蛋白の発現を維持することで、腫瘍細胞を静止期に維持し、高い腫瘍形成能を維持していると推測される。組織標本上、壊死巣周囲領域の腫瘍細胞に HIF-1 α および CA IX の発現を認めたことから、同部位の HIF-1 α の活性化が低酸素によるものであることが示された。なお、*in vitro* の実験上、スフェロイド表層部では相対的に高い酸素の濃度を示すが中心部では高度な低酸素状態となり、表層部から中心部にかけて酸素濃度勾配が生じている。NANOG⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞を含む領域は、適度な低酸素環境にあると考えられる領域に出現するという組織所見は、スフェロイドでも示されている(Fig. 7)。スフェロイドでは、正酸素(20% O₂)培養条件下では、NANOG⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞は検出されない。しかし、20%から5%の低酸素条件下で24時間培養すると、中心部に静止期の細胞(HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞)から構成される明瞭な領域を認め、NANOG⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞がスフェロイド表層部と中心部との間にみられた。NANOG⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞は表層部より中心部に近接して局在していた。一方で、5%の低酸素条件下で9時間培養した場合、HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞から構成される明瞭な領域は出現しなかった。NANOG⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞が出現した24時間低酸素条件下では、スフェア形成能は亢進していた。一方で、この細胞が出現しなかった9時間低酸素培養条件下では、スフェア形成能の亢進はみられなかった。このことから、HIF-1 α の発現が亢進しただけでは、膠芽腫の腫瘍形成能を亢進させるのに不十分であり、静止期に誘導されることが腫瘍形成能に必須であると考えられた。SOX2(あるいは NANOG)⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞の生物学的重要性は、この細胞が、膠芽腫においての

みに出現し、WHO grade II-III の星細胞腫瘍にはみられないことから裏付けられる。従って、この表現型を示す細胞を含むニッチの存在は、膠芽腫固有の微小環境の不均一さを反映しているのかもしれない。総括すると、膠芽腫の大きな虚血性壊死巣周囲(壊死巣周囲ニッチ)にみられる適度な低酸素環境は、高い腫瘍形成能に関与する幹細胞様細胞のニッチであると結論付けることができる(Fig. 7)。

膠芽腫の組織では、大きな虚血性壊死巣と小さな偽柵状壊死という2種類の壊死巣がある^(1,37,38)。そして、大きな虚血性壊死巣の程度は予後不良因子になると報告されている^(40,41)。この大きな虚血性壊死巣が壊死巣周囲ニッチをもたらしているとする我々の組織学的知見は、大きな虚血性壊死巣を強調している臨床病態生理学的な関連性からも裏付けられる。SOX2⁺ (あるいは NANOG⁺) HIF-1 α ⁺ RNAPII-S2P^{-low} 細胞は、大きな虚血性壊死巣周囲に見出されるが、小さな偽柵状壊死の周囲にはみられない。この2種類の壊死巣間にみられる違いは、その背景にある異なった発症機序を反映している。Brat らは、偽柵状壊死周囲の細胞は、低酸素領域から逃れようとしている活発な腫瘍細胞から構成されており、高頻度にアポトーシスに陥っていると報告している⁽⁴²⁾。これは、大きな虚血性壊死巣周囲の細胞とは対照的である。本研究においても、この2種類の壊死巣周囲の細胞にみられる細胞周期の状態は異なっていた。大きな虚血性壊死巣周囲では腫瘍細胞は RNAPII-S2P^{-low} であるのに対して、小さな偽柵状壊死周囲の細胞は、RNAPII-S2P⁺ である。過去に、偽柵状壊死周囲の細胞がグリオーマ幹細胞のマーカーとされる CD133 陽性を示すという報告があるが⁽⁴³⁾、小さな偽柵状壊死は静止期の幹細胞様細胞のニッチを形成する大きな虚血性壊死巣とは異なっていることを考慮すると、理にかなう。

我々の *in vitro* のスフェロイド実験で得られた知見から、膠芽腫細胞の微小環境依存性の静止期と腫瘍形成能の亢進とが密接に関与していることが明らかになった。このことから、膠芽腫細胞は低酸素条件下のスフェロイドでは静止期になり、微小環境が変化すると増殖活性を有しスフェア形成能を亢進するというように、順応性に富むことが示される。静止期とは細胞周期における G₀ 期の一つである。静止期の細胞は、細胞周期から外れた最終分化段階の細胞や老化細胞とは区別される。静止期とは、適切な刺激があれば再び細胞周期に戻れる能力のある状態として特徴付けられる⁽¹⁴⁾。静止期の細胞は、最終分化段階の細胞や老化細胞とは、翻訳が開始されているが翻訳後の伸長が抑制されている状態である RNA ポリメラーゼ II のリン酸化パターン(RNAPII-S2P^{-low} かつ RNAPII-S5P⁺)で区別することができる⁽¹⁴⁾。Ki-67 細胞と RNAPII-S2P^{-low} 細胞は G₀ 期の異なった時期を反映しており、我々の免疫染色結果では、RNAPII-S2P^{-low} となる Ki-67 細胞は少数であった。Ki-67 細胞は、静止期細胞だけではなく、最終分化細胞や老化細胞も含む。一方で、RNAPII-S2P^{-low} 細胞は静止期の細胞に特異的である。低酸素で誘導される細胞周期の停止は、HIF-1 α の働きによって c-Myc 機能の阻害や、cyclin D の発現の抑制や、p21^{Cip1} の誘導がおきることによってもたらされていると報告されている^(44,45)。一方で、HIF-1 α がどのようにして幹細胞性を維持しているか機序に関してはほぼ解明されていない。

グリオーマ幹細胞のニッチとしては、血管周囲領域を強調する報告が数多くなされてきた^(12, 46-48)。グリオーマ幹細胞における血管周囲ニッチ重要性は、グリオーマ幹細胞が血管周囲に局在している正常神経幹細胞と共通の機序を有しているに違いないという概念に基づいている。正常神経幹細胞は、血管周囲に局在することで、血管内皮細胞や血管周囲細胞から分泌される、一酸化窒素⁽⁴⁶⁾ やオステオポンチン⁽⁴⁷⁾、ソニックヘッジホッグ⁽⁴⁸⁾ といったパラクリン因子の影響を受けて幹細胞性の強化や維持を行っていると考えられている。血管周囲領域は酸素や栄養に富んでいることから、細胞増殖に適した環境だと考えられていた。一方で、我々の研究で具体的に示された壊死巣周囲ニッチとは、酸素や栄養が欠乏しており、低酸素依存性に静止期や幹細胞性の増強をもたらす。このことから、血管周囲ニッチの細胞は増殖期の細胞と密接に関与しており、壊死巣周囲ニッチの細胞は休止状態で長期に幹細胞性を維持できる性質を有し、微小環境の変化によって増殖能を得ていると考えられる。

HIF-1 α が低酸素依存性にグリオーマ細胞の幹細胞性格を調節していることを示す報告がいくつかあるが^(24, 25)、HIF-2 α がグリオーマ幹細胞の病態に関与しているとの報告もある。Liらは、CD133⁺のグリオーマ幹細胞と考えられる細胞において低酸素環境下でも正酸素環境下でもHIF-2 α が有意に発現していることを報告した⁽²³⁾。一方で、HIF-1 α は低酸素のみで誘導され、CD133⁺細胞だけではなくCD133⁻細胞にも認められた。HIF-1 α とHIF-2 α は、いずれも*in vitro*のスフェア形成能の亢進や細胞増殖、CD133⁺細胞の生存に深く関わっていることが示されている⁽²³⁾。我々が今回焦点を当てている膠芽腫の壊死巣周囲ニッチにおける幹細胞性格や静止期の維持に関して、HIF-2 α の意義はどうかを検討するために、SOX2⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low}細胞との局在性を比較した。過去の報告と同様⁽²³⁾、HIF-2 α ⁺細胞はHIF-1 α ⁺細胞よりも少なく、これらの細胞は壊死巣周囲や血管周囲のいずれにも認められた。大きな虚血性壊死巣周囲でのみ、HIF-2 α ⁺細胞とSOX2⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low}細胞との局在性が稀に重複することがあるが、全体的にこの2種類の細胞の分布は本質的に異なっていた。HIF-2 α はHIF-1 α と異なり、正酸素や軽度の低酸素条件下でもCD133⁺細胞において発現しているとの報告されており⁽²³⁾、血管周囲に局在しているHIF-2 α ⁺細胞の所見は過去の報告とも矛盾しないと考えられた。なお、HIF-2 α は低酸素環境でc-Mycの活性や他の機序を通して増殖能を亢進させることが報告されており、低酸素で誘導される静止期に関してHIF-2 α はHIF-1 α に拮抗するような作用をもつと推測されている^(49, 50)。以上のことから、我々は、膠芽腫においてSOX2⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low}細胞とHIF-2 α ⁺細胞は生物学的に異なった役割を担っていると考えた。今後、膠芽腫において、HIF-1 α とHIF-2 α が静止期や腫瘍形成にどのように関わっているかを解明するために更なる研究が必要である。

最後に、本研究では、腫瘍内の大きな虚血性壊死巣周囲に、ニッチとして機能する静止期の維持や腫瘍形成能の亢進に関与するための適切な微小環境が存在していることを明らかにした。この「壊死巣周囲ニッチ」は、膠芽腫の治療抵抗性を克服して膠芽腫細胞を根絶させるための前途有望な新たな治療標的になる可能性がある。

謝辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜った山口大学大学院医学系研究科病理形態学分野（第一病理）の池田栄二教授、木村徳宏講師に感謝致します。また、実験の技術補佐をして下さった病理形態学分野（I 病理）の村上喜信技師、和木崇技師、共焦点レーザー顕微鏡の技術指導をして下さった山口大学総合科学実験センター 生体分析実験施設の有働公一准教授に深謝いたします。

参考文献

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds. World Health Organization classification of tumours of the central nervous system. IARC: Lyon 2007.
2. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004; 64: 6892-6899.
3. Chen J, McKay RM, Parada LF. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell.* 2012; 149: 36-47.
4. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004; 64: 7011-7021.
5. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004; 432: 396-401.
6. Son MJ, Woolard K, Nam DH, Lee J, Fine HA. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell.* 2009; 4: 440-452.
7. Anido J, Saez-Borderias A, Gonzalez-Junca A, Rodon L, Folch G, Carmona MA, et al. TGF-beta receptor inhibitors target the CD44(high)/Id1(high) glioma-initiating cell population in human glioblastoma. *Cancer Cell.* 2010; 18: 655-668.
8. Bleau AM, Hambardzumyan D, Ozawa T, Fomchenko EI, Huse JT, Brennan CW, et al. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell.* 2009; 4: 226-235.
9. Sundar SJ, Hsieh JK, Manjila S, Lathia JD, Sloan A. The role of cancer stem cells in glioblastoma. *Neurosurg Focus.* 2014; 37: E6.
10. Vartanian A, Singh SK, Agnihotri S, Jalali S, Burrell K, Aldape KD, et al. GBM's multifaceted landscape: highlighting regional and microenvironmental heterogeneity. *Neuro Oncol.* 2014; 16: 1167-1175.
11. Filatova A, Acker T, Garvalov BK. The cancer stem cell niche(s): the crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1830: 2496-2508.
12. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell.* 2007; 11: 69-82.
13. Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, von Stechow L, Schanzer A, Meletis K, et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain.* 2010; 133: 983-995.
14. Cheung TH, Rando TA. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 14: 329-340.
15. Li L, Bhatia R. Stem cell quiescence. *Clin Cancer Res.* 2011; 17: 4936-4941.

16. Holyoake TL, Jiang X, Jorgensen HG, Graham S, Alcorn MJ, Laird C, et al. Primitive quiescent leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia spontaneously initiate factor-independent growth *in vitro* in association with up-regulation of expression of interleukin-3. *Blood*. 2001; 97: 720-728.
17. Dembinski JL, Krauss S. Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subpopulation in pancreas adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis*. 2009; 26: 611-623.
18. Pece S, Tosoni D, Confalonieri S, Mazzarol G, Vecchi M, Ronzoni S, et al. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell*. 2010; 140: 62-73.
19. Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC, Zabierowski SE, Brafford PA, Vultur A, et al. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell*. 2010; 141: 583-594.
20. Deleyrolle LP, Harding A, Cato K, Siebzehnrubl FA, Rahman M, Azari H, et al. Evidence for label-retaining tumour-initiating cells in human glioblastoma. *Brain*. 2011; 134: 1331-1343.
21. Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*. 2012; 488: 522-526.
22. Ikeda E. Cellular response to tissue hypoxia and its involvement in disease progression. *Pathol Int*. 2005; 55: 603-610.
23. Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell*. 2009; 15: 501-513.
24. Qiang L, Wu T, Zhang HW, Lu N, Hu R, Wang YJ, et al. HIF-1alpha is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating Notch signaling pathway. *Cell Death Differ*. 2012; 19: 284-294.
25. Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD, et al. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene*. 2009; 28: 3949-3959.
26. Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, et al. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010; 7: 391-402.
27. Heng JC, Orlov YL, Ng HH. Transcription factors for the modulation of pluripotency and reprogramming. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2010; 75: 237-244.
28. Gangemi RM, Griffiero F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, et al. SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells*. 2009; 27: 40-48.
29. Zbinden M, Duquet A, Lorente-Trigos A, Ngwabyt SN, Borges I, Ruiz i Altaba A. NANOG regulates glioma stem cells and is essential *in vivo* acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *EMBO J*. 2010; 29: 2659-2674.

30. Heidemann M, Hintermair C, Voss K, Eick D. Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1829: 55-62.
31. Freter R, Osawa M, Nishikawa S. Adult stem cells exhibit global suppression of RNA polymerase II serine-2 phosphorylation. *Stem Cells*. 2010; 28: 1571-1580.
32. Qiang L, Yang Y, Ma YJ, Chen FH, Zhang LB, Liu W, et al. Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett*. 2009; 279: 13-21.
33. Rota LM, Lazzarino DA, Ziegler AN, LeRoith D, Wood TL. Determining mammosphere-forming potential: application of the limiting dilution analysis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2012; 17: 119-123.
34. Shaw FL, Harrison H, Spence K, Ablett MP, Simoes BM, Farnie G, et al. A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2012; 17: 111-117.
35. Beasley NJ, Wykoff CC, Watson PH, Leek R, Turley H, Gatter K, et al. Carbonic anhydrase IX, an endogenous hypoxia marker, expression in head and neck squamous cell carcinoma and its relationship to hypoxia, necrosis, and microvessel density. *Cancer Res*. 2001; 61: 5262-5267.
36. Kaluz S, Kaluzova M, Liao SY, Lerman M, Stanbridge EJ. Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show? *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1795: 162-172.
37. Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, Yonekawa Y, Di Patre PL, Franceschi S, et al. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006; 65: 846-854.
38. Tonn JC, Westphal M, Rutka JT, Grossman SA, eds. *Neuro-oncology of CNS tumors*. Springer: Berlin 2006.
39. Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 2010; 7: 150-161.
40. Hammoud MA, Sawaya R, Shi W, Thall PF, Leeds NE. Prognostic significance of preoperative MRI scans in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 1996; 27: 65-73.
41. Mashiko R, Takano S, Ishikawa E, Yamamoto T, Nakai K, Matsumura A. Hypoxia-inducible factor 1alpha expression is a prognostic biomarker in patients with astrocytic tumors associated with necrosis on MR image. *J Neurooncol*. 2011; 102: 43-50.
42. Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, Pecot M, Cohen C, Hammond EH, et al. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res*. 2004; 64: 920-927.
43. Christensen K, Schroder HD, Kristensen BW. CD133 identifies perivascular niches in grade II-IV astrocytomas. *J Neurooncol*. 2008; 90: 157-170.
44. Ortmann B, Druker J, Rocha S. Cell cycle progression in response to oxygen levels. *Cell*

Mol Life Sci. 2014; 71: 3569-3582.

45. Wen W, Ding J, Sun W, Wu K, Ning B, Gong W, et al. Suppression of cyclin D1 by hypoxia-inducible factor-1 via direct mechanism inhibits the proliferation and 5-fluorouracil-induced apoptosis of A549 cells. *Cancer Res.* 2010; 70: 2010-2019.

46. Charles N, Ozawa T, Squatrito M, Bleau AM, Brennan CW, Hambardzumyan D, et al. Perivascular nitric oxide activates Notch signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells. *Cell Stem Cell.* 2010; 6: 141-152.

47. Pietras A, Katz AM, Ekstrom EJ, Wee B, Halliday JJ, Pitter KL, et al. Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell Stem Cell.* 2014; 14: 357-369.

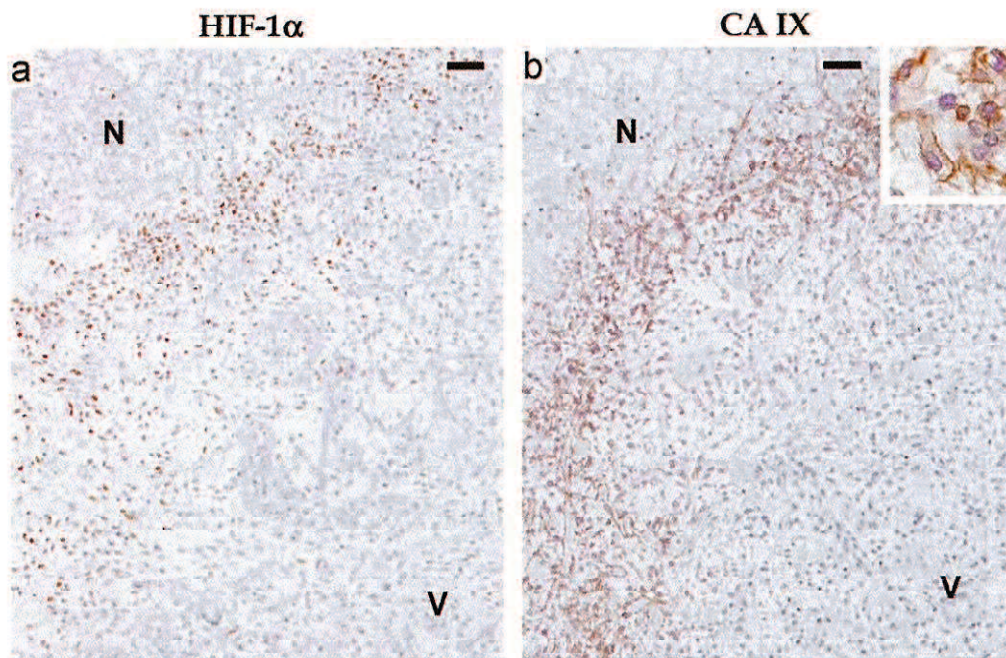
48. Yan GN, Yang L, Lv YF, Shi Y, Shen LL, Yao XH, et al. Endothelial cells promote stem-like phenotype of glioma cells through activating the Hedgehog pathway. *J Pathol.* 2014; 234: 11-22.

49. Elorza A, Soro-Arnaiz I, Melendez-Rodriguez F, Rodriguez-Vaello V, Marsboom G, de Carcer G, et al. HIF2alpha acts as an mTORC1 activator through the amino acid carrier SLC7A5. *Mol Cell.* 2012; 48: 681-691.

50. Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell.* 2007; 11: 335-347.

補足データ

S1 Fig

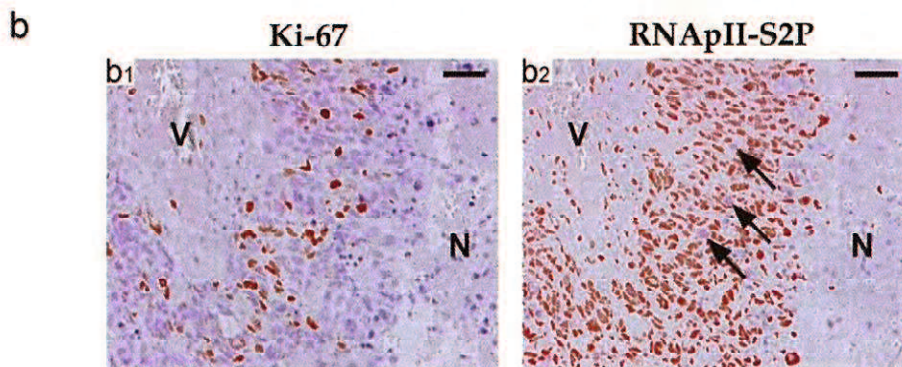
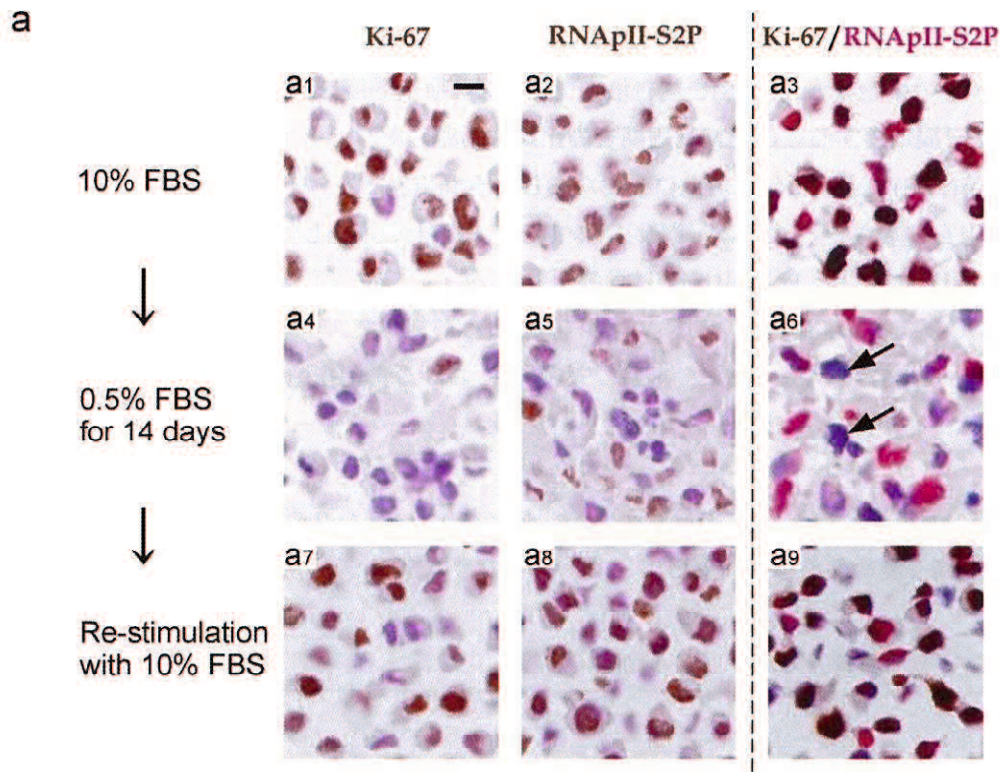


S1 Fig. 膠芽腫の組織標本における HIF-1 α と carbonic anhydrase IX (CA IX)の発現

代表的な膠芽腫の連続切片を用いた HIF-1 α と CA IX の免疫単染色。b の挿入図は、CA IX 陽性となる腫瘍細胞の拡大図であり、細胞膜の陽性像が認められる。

N、壊死巣； V、血管；スケールバー50 μ m。

S2 Fig



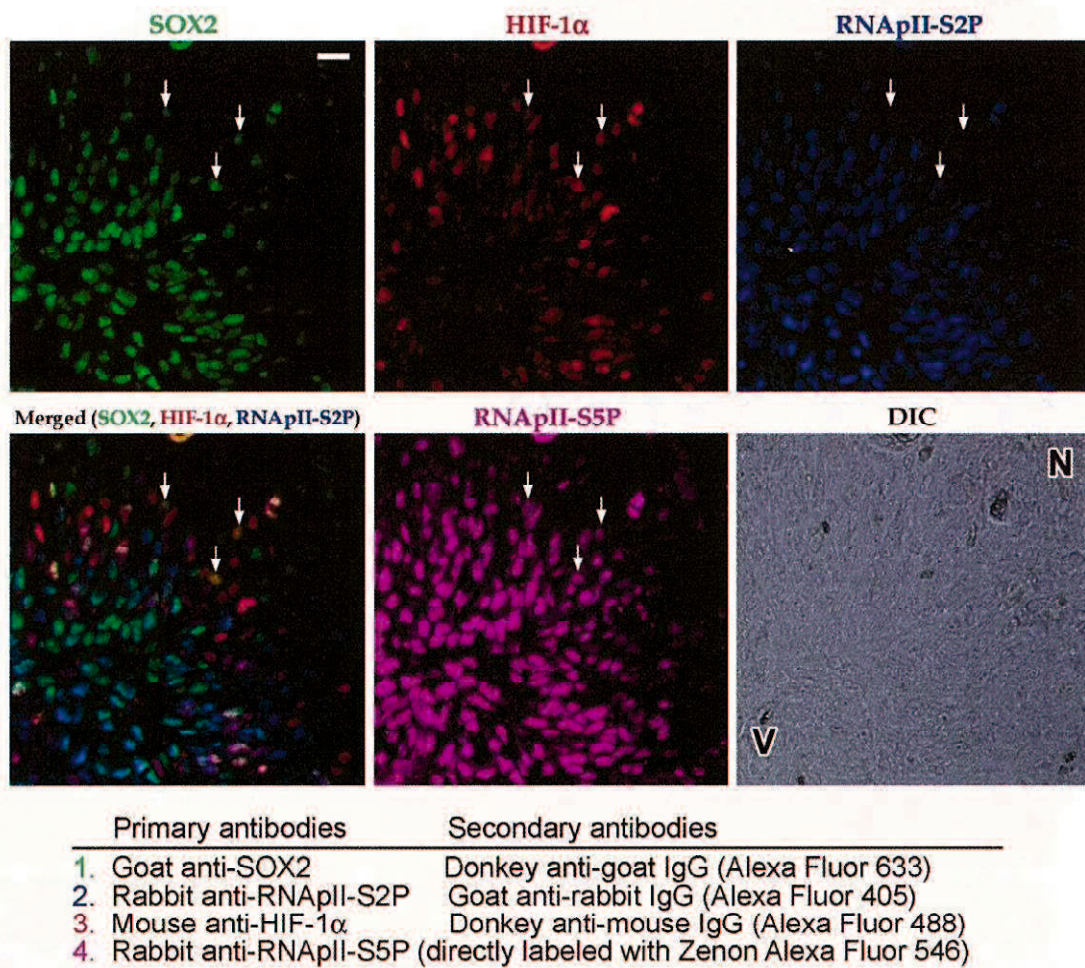
S2 Fig. RNAPII-S2P^{low} 細胞と Ki-67 陽性細胞との比較

a: T98G 膠芽腫細胞における、増殖期と静止期における Ki-67 と RNAPII-S2P の制御。T98G 細胞は、10%(v/v)の牛胎児血清(FBS)を含む培地で培養し、血清濃度を 0.5%(v/v)に下げて血清を枯渇化させ 14 日間培養することで細胞周期を静止期に誘導した。そして、1:5 の割合で 10%(v/v)の牛胎児血清(FBS)を含む新しい培地にまきなおし 3 日間培養した。その後、trypsin-EDTA 溶液を用いて細胞を剥離させ、10%(v/v)緩衝ホルマリンで固定し、遠心した。ペレットをパラフィン包埋し、薄切後、Ki-67 と RNAPII-S2P は免疫単染色(茶; a₁, a₂, a₄, a₅, a₇, a₈)、および免疫二重染色(Ki-67、茶; RNAPII-S2P、赤; a₃, a₆, a₉)により解析した。ヘマトキシリン(青)は核染色として用いた。Ki-67RNAPII-S2P^{low} 細胞(二重染色における青色細胞)は、静止期の条件でのみ出現した(a₆, 矢印)。スケールバー、10μm。

b: 膠芽腫の連続切片における Ki-67 の免疫単染色(b₁)と RNAPII-S2P の免疫単染色(b₂)。Ki-67 細胞は頻度高く認められるのに対して、RNAPII-S2P^{low} 細胞(矢印)は少数、壊死巣周囲に局在していた。

N、壊死巣; V、血管; スケールバー50μm。

S3 Fig

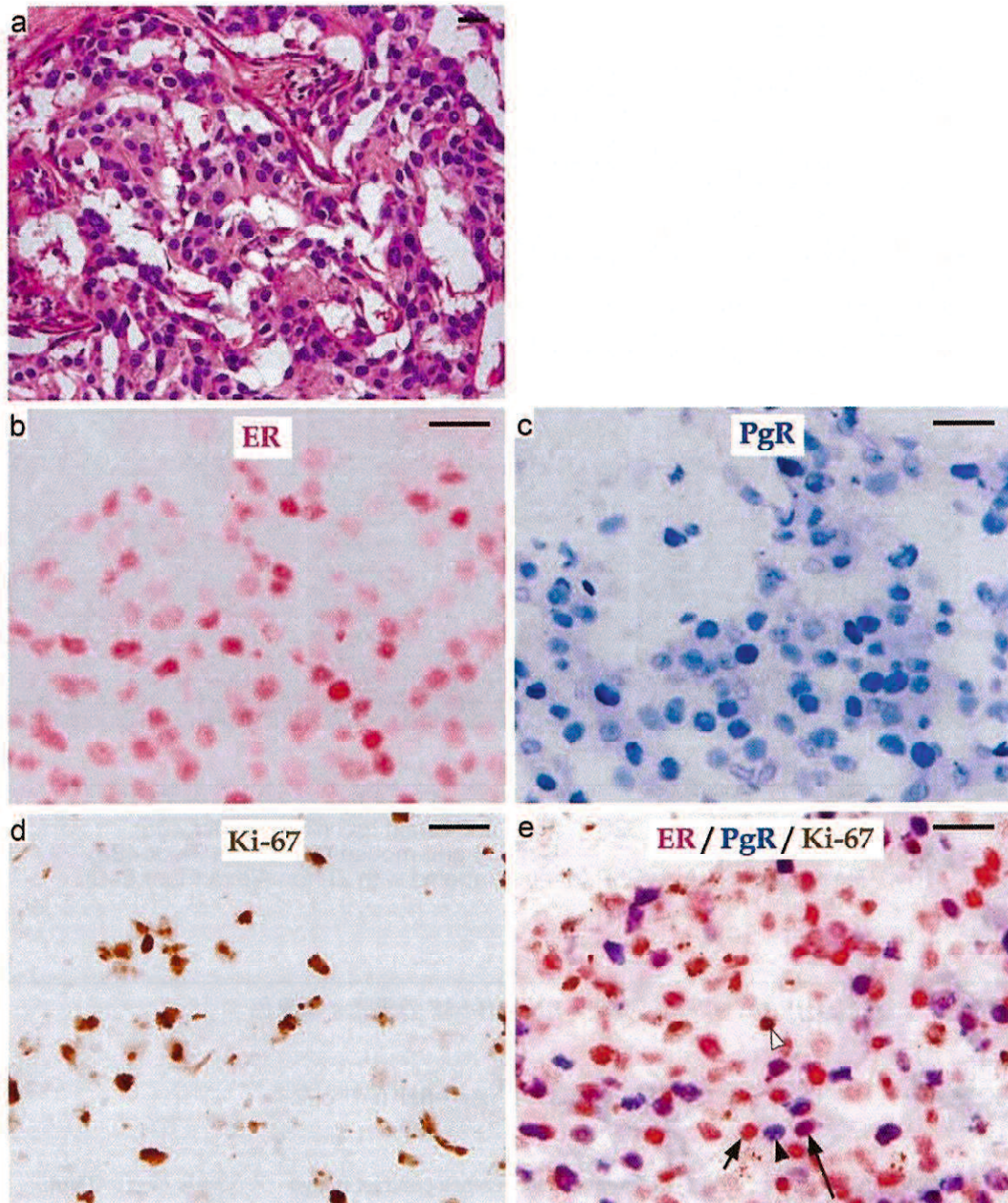


S3 Fig. SOX2、HIF-1α、RNAPII-S2P、RNAPII-S5P の蛍光 4 重染色

SOX2⁺HIF-1α⁺ RNAPII-S2P^{low} 細胞(矢印)は、RNAPII-S5P 陽性となる。

N、壊死巣； V、血管； DIC、differential interference contrast image. スケールバー、25μm。

S4 Fig



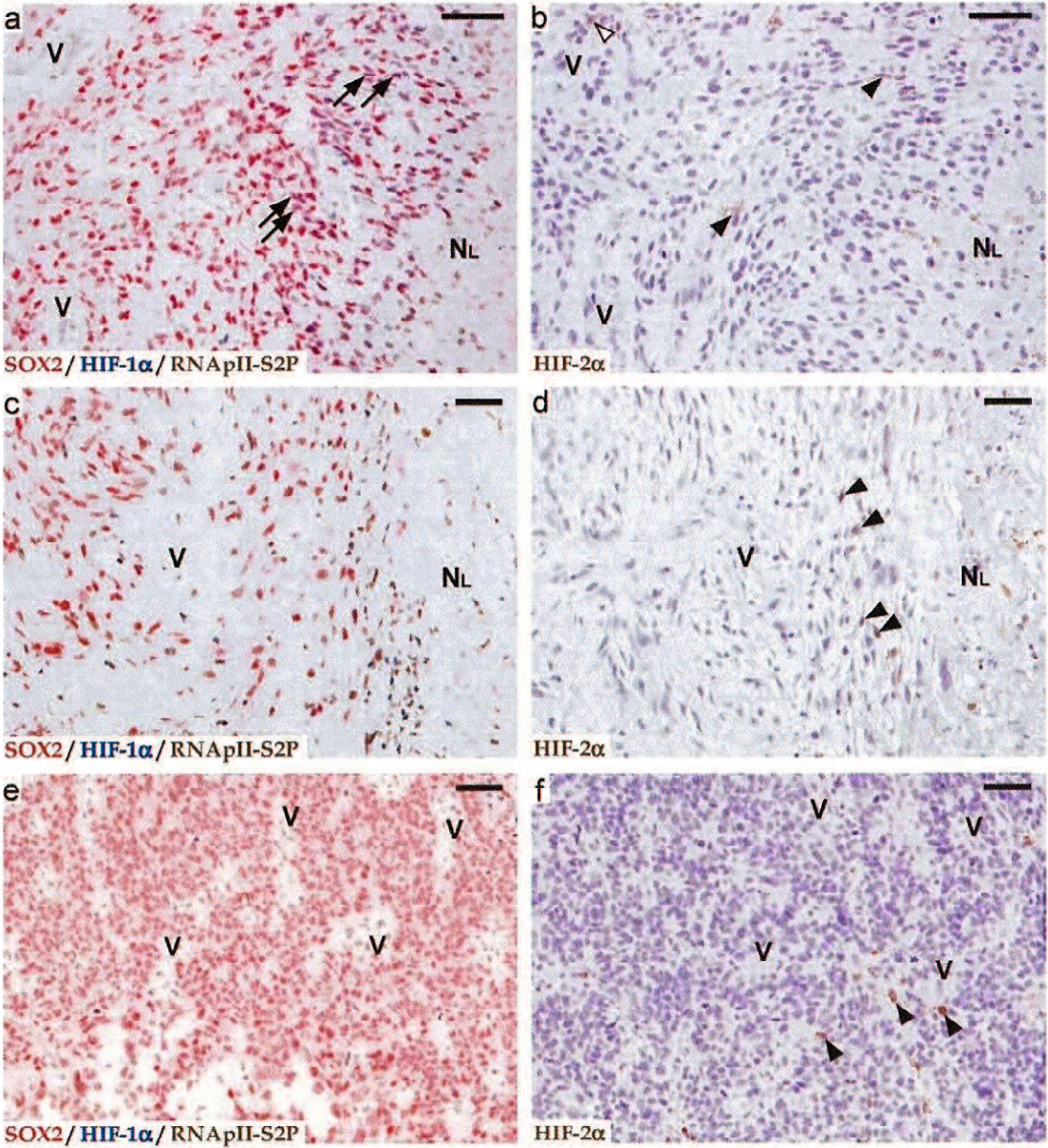
f

Primary antibodies	Secondary antibodies	Chromogens
1. Mouse anti-ER	Donkey anti-mouse IgG	Vulcan Fast Red
2. Mouse anti-PgR (after denaturing)	MACH 2 Kit (goat anti-mouse IgG)	Perma Blue
3. Rabbit anti-Ki-67	MACH 2 Kit (goat anti-rabbit IgG)	Diaminobenzidine

S4 Fig. 色素法による免疫三重染色の妥当性を確認するために行った、乳癌組織を用いたエストロゲンレセプター(ER)、プロゲステロンレセプター (PgR) 、 Ki-67 を用いた色素法による免疫三重染色

a: ヘマトキシリン・エオジン染色(H-E)染色。b-e: 連続切片を用いた免疫染色。ER(b)、PgR(c)、Ki-67(d)の免疫単染色、ER、PgR、Ki-67 の免疫3重染色(e) (ER、赤; PgR、青; Ki-67、茶)。免疫3重染色(e)では、ER⁺PgR⁺Ki-67⁺細胞は赤色(短い矢印)、ER⁺PgR⁺Ki-67⁻細胞は青色(黒い矢頭)、ER⁺PgR⁻Ki-67⁻細胞は紫色(長い矢印)、Ki-67⁺細胞は茶色(白い矢頭)を示す。これらの色は容易に識別できる。スケールバー、25μm。

S5 Fig



S5 Fig. 膠芽腫の組織標本における、SOX2⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞と HIF-2 α 陽性細胞の局在性

SOX2、HIF-1 α 、RNApII-S2P の免疫三重染色(a、c、e)と HIF-2 α の単染色(b、d、f)を示す。

a・b: 大きな虚血性壊死巣(N_L)周囲の連続切片。HIF-2 α ⁺細胞(b の黒い矢頭)は SOX2⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞(a の矢印)に近接した部にも認められるが、これは稀に認められる所見である。HIF-2 α ⁺細胞は、血管周囲領域にも認められる(b の白い矢頭)。一方で、SOX2⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞は血管周囲領域にはみられない。

c・d: 他の大きな虚血性壊死巣周囲の連続切片。HIF-2 α ⁺細胞を認めるが(d の矢頭)、SOX2⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞は、この領域にはみられない(c)。

e・f: 壊死巣のない部の連続切片。血管周囲に HIF-2 α ⁺細胞を認めるが(f の矢頭)、SOX2⁺HIF-1 α ⁺ RNApII-S2P^{-low} 細胞は、この領域にはみられない(e)。

N_L、大きな虚血性壊死巣; V、血管; スケールバー50 μ m。