HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ハイドロゲルを用いた星状膠細胞と膠芽腫幹細胞の相互作用の検討
Author(s)	白井, 裕介
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16898号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16898
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99743
Type	doctoral thesis
File Information	SHIRAI_Yusuke_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　白井　裕介

学 位 論 文 題 名

ハイドロゲルを用いた星状膠細胞と膠芽腫幹細胞の相互作用の検討

(Studies on the interactions between astrocytes and glioblastoma stem cells using hydrogel)

【背景と目的】膠芽腫は悪性度の高いびまん性グリア腫瘍で、予後改善のため新規治療法の開発が望まれる。がん再発や治療抵抗性に寄与するがん幹細胞（Cancer Stem Cells, CSCs）は自己複製能や多分化能を有する細胞集団で、がん組織内にごく少数しか存在せず、治療標的の開発が難しい。我々は、最近、ハイドロゲルにより CSCs を迅速に創成、維持する技術（hydrogel-activated reprogramming (HARP) phenomenon）を開発した。膠芽腫幹細胞の腫瘍内微小環境として血管周囲ニッシェや低酸素ニッシェが挙げられ、周囲正常細胞との相互作用により幹細胞ニッシェが形成されると考えられるが、その詳細な分子メカニズムは不明である。本研究では、膠芽腫微小環境において星状膠細胞に着目し、ハイドロゲルで誘導した膠芽腫幹細胞と星状膠細胞の相互作用を解析し、新規治療の標的となりうる機構を探索することを目的とした。

【材料と方法】膠芽腫細胞株 KMG4 と不死化した星状膠細胞株 Normal Human Astrocyte-TS（NHA-TS）を、PNaSS ゲル、DN ゲル、PCDME ゲルで培養し、細胞増殖、形態、幹細胞マーカーの発現を real-time PCR で解析した。共培養において、KMG4 細胞と NHA-TS 細胞を PKH-26（赤色）、PKH-67（緑色）で染め分け、タイムラプス顕微鏡で観察した。培養上清を吸着した Conditioned ハイドロゲルを用いて、液性因子による膠芽腫細胞と星状膠細胞の幹細胞マーカー（*SOX2*、*Nanog*、*Oct3/4*）の発現を real-time PCR で解析した。液性因子内の機能成分として細胞外小胞を単離し、PNaSS ゲル上で KMG4 細胞と NHA-TS 細胞の培養液に添加し、遺伝子発現変化を RNAseq により解析した。さらに、細胞外小胞に含まれるタンパク質を電気泳動で分離後、質量分析により解析した。同定した分子に着目して、ヒト膠芽腫組織切片上での空間トランスクリプトーム解析を実施した。最後に、ハイドロゲル上培養で NHA-TS 細胞由来の細胞外小胞の有無による、KMG4 細胞での周皮細胞マーカー遺伝子の発現変動を解析した。

【結果】ハイドロゲル上での KMG4 細胞と NHA-TS 細胞の共培養において、KMG4 細胞は旺盛に増殖する一方、NHA-TS 細胞は減少した。幹細胞マーカー遺伝子（*SOX2*、*Nanog*、*Oct3/4*）の発現は、時間依存的に増加した。PNaSS ゲル上での KMG4 細胞と NHA-TS 細胞の共培養において、上皮間葉転換関連遺伝子（*FN1*）の発現が増加した。さらに、PKH で蛍光標識した細胞膜由来の粒状成分が、互いの細胞質内や培養液中で流動する様子が確認され、細胞外小胞による相互作用が生じていることを認めた。一方、NHA-TS 細胞由来の液性因子は、PCDME ゲル上において KMG4 細胞の幹細胞マーカー遺伝子の発現をさらに亢進した。NHA-TS 細胞由来の細胞外小胞を KMG4 細胞に添加することで、PNaSS、DN ゲル上での幹細胞マーカー遺伝子の発現（*Nanog*、*Oct3/4*）は亢進した。一方、KMG4 由来の細胞外小胞は、NHA-TS 細胞の幹細胞マーカー遺伝子の発現を抑制した。

KMG4 細胞を PNaSS ゲル上で培養することによって、*COL1A1* を含む細胞外マトリクス関連の遺伝子が、エンリッチメント解析により、発現変動遺伝子群として検出された。さらに PNaSS ゲル上で、NHA-TS 由来の細胞外小胞の添加により、細胞増殖に関連した遺伝子群が抑制され、幹細胞性の亢進が支

持された。一方で、NHA-TS 細胞においては、PNaSS ゲル上培養時に、KMG4 細胞由来の細胞外小胞を添加することで、*THBS1*、*ANGPT1* などの腎発生に関与する遺伝子群や、血管内皮制御に関わる遺伝子群が発現変動遺伝子として抽出された。KMG4 細胞と NHA-TS 細胞の PNaSS ゲル上での共培養下において、上清内の細胞外小胞に含まれるタンパク質として、*THBS1* と *COL1A1* が同定された。膠芽腫検体の空間トランスクリプトーム解析では、微小血管増殖の発達とともに、*COL1A1* の高発現を示す細胞のクラスターが血管周囲に局在し、周皮細胞と同様の形質を有する細胞集団と示唆された。*THBS1* の発現を示すグリア細胞のクラスターは、微小血管の周囲領域に認められた。星状膠細胞由来の細胞外小胞を含むハイドロゲル上培養において、KMG4 細胞の周皮細胞マーカーの発現が誘導されることを確認した。

【考察】本研究では、ハイドロゲルにより迅速に癌幹細胞性が誘導される HARP 現象を用いて創成された膠芽腫幹細胞と星状膠細胞を用いて、両細胞の直接的な接触や細胞外小胞を含む液性因子による相互作用を検討した。星状膠細胞由来の液性因子や細胞外小胞の添加により、膠芽腫の幹細胞性の誘導は亢進することが明らかとなった。PNaSS ゲルにより誘導された膠芽腫幹細胞は、*COL1A1* や *COL3A1* を始めとした細胞外マトリクス（extracellular matrix, ECM）タンパク質の発現を亢進し、これらは細胞外小胞にも含有されていることが示された。ヒト膠芽腫組織を用いた空間トランスクリプトーム解析により、これらの ECM は膠芽腫組織に特徴的な血管周囲領域に局在していることが明らかとなった。膠芽腫の細胞外小胞の添加によって、星状膠細胞は血管制御に関連する遺伝子群の発現が変動し、星状膠細胞が膠芽腫細胞の存在下で血管形成の制御に関与することが示唆された。膠芽腫由来の細胞外小胞の添加によって、発現量と発現変動が大きかった遺伝子として選出された *THBS1* は、膠芽腫においては、腫瘍増殖や浸潤を亢進する因子として報告される一方で、抗血管新生因子として報告されている。膠芽腫組織においては、微小血管増殖の形成に従い、血管周囲に *COL1A1* を発現する細胞集団の増加が確認されており、周皮細胞様の形質を有する細胞が増殖している可能性が示唆された。膠芽腫の血管周囲ニッシェにおいて、周皮細胞様の形質に形質転換を誘導することで微小血管増殖の形成に寄与していると考えられる。星状膠細胞の細胞外小胞成分を含むハイドロゲル上での培養により、膠芽腫細胞が周皮細胞マーカー遺伝子の発現の増加を引き起こすことが示され、この仮説を支持する。

以上より、膠芽腫細胞と星状膠細胞との相互作用により膠芽腫の幹細胞性が誘導され、血管周囲に局在する細胞外マトリクスの形成や、星状膠細胞による血管形成制御に機能変化を引き起こし、さらに血管周囲において膠芽腫細胞を血管周皮様に形質転換が誘導されることで、血管周囲の微小環境を形成することが考えられた。これらの微小環境の形成や膠芽腫細胞の周皮細胞様の形質転換は、脳血管の薬剤到達や免疫細胞浸潤の抑制により膠芽腫の治療抵抗性や幹細胞性の獲得に繋がり、腫瘍再発に寄与していると考えられる。

【結論】膠芽腫細胞と星状膠細胞のハイドロゲル上での共培養により、細胞外マトリクスの形成や特徴的な微小血管増殖の形成、膠芽腫細胞の幹細胞性の誘導、周皮細胞様分化により、血管周囲の微小環境の形成に寄与することが示された。以上より、膠芽腫幹細胞と星状膠細胞の相互作用をさらに検討することで、膠芽腫の新規治療標的の開発の一助となることが期待される。