

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15203

研究課題名(和文)悪性グリオーマに対するケモタキシスを応用した細胞誘殺療法の研究

研究課題名(英文)Attract to kill therapy applying chemotaxis for malignant glioma

研究代表者

茂木 洋晃(Motegi, Hiroaki)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：40748844

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文): 膠芽腫治療は手術や放射線治療といった局所治療と抗がん剤投与による全身治療で行われているが治療成績の目立った進歩はない。新たな治療コンセプトとして、ケモタキシスを応用して意図した部位へ誘導し、より濃厚な局所治療へ暴露させる“誘殺療法”のコンセプトの可能性に着目し、研究を開始した。グリオーマ細胞株にて一定のケモカインレセプターが発現していることを確認し、そのリガンド(ケモカインX)によって細胞遊走が刺激されることを確認した。以上により、誘殺療法のコンセプトの根幹をなすグリオーマの細胞誘導が可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、新たな治療コンセプトである“誘殺療法”の可能性が示唆された。同部実験によっても細胞移動が確認された場合、誘導部位へ濃厚な治療を加える事で、腫瘍縮小や予後延長効果などが期待できる。脳実質内へケモカインXを注入する際の基材の研究を行う事で、より効率的なケモカインの留置が可能となり、実際の治療へ応用できた場合、他の癌腫への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文): Glioblastoma treatment is performed by local treatment such as surgery and radiation therapy and systemic treatment by administration of anticancer drugs, but there is no remarkable improvement in treatment results. As a new treatment concept, we focused on the possibility of the concept of "attract to kill therapy" in which chemotaxis is applied to guide the glioma to the intended site and expose it to more concentrated local treatment. It was confirmed that chemokine receptors were expressed in the glioma cell line, and that the ligand, one chemokine, "chemokine X", stimulated cell migration. From the above, it was suggested that it may be possible to attract and trap glioma cells to the area of intensive topical treatment, which forms the root canal of the concept of "attract to kill therapy".

研究分野：脳神経外科学

キーワード：glioma chemotaxis

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

浸潤性の高悪性度腫瘍、神経膠芽腫に対する研究は世界中で行われている。が従来の主な治療は手術による可及的な腫瘍の切除であり、局所の放射線治療を術後に追加したものであった。2005年のテモゾロミド登場以降、約2カ月の中央全生存期間延長効果が得られたが、それ以降は目立った発展はなかった。様々な分子標的治療薬や免疫療法の治験も行われたが、RCTで効果を示すことができたものはない。これらの背景もあり、新規の抗腫瘍療法の開発が熱望されていた。

これまでの治療のコンセプトは、手術と放射線治療という局所治療に化学療法や免疫療法といった全身治療を組み合わせる事が基本となっていた。手術による広範囲の脳の摘出は、麻痺や失語症といった重大な合併症を招くリスクが高くなるため、おのずと限界がある。生体内の幹細胞や免疫細胞などはケモカインといわれる一群の物質の刺激により、生体内をダイナミックに移動している(ケモタキシス)。乳がんを始めとした悪性腫瘍にもケモタキシスの現象が報告されたことを皮切りに膠芽腫にもケモカインとケモカインレセプターの関係を指摘する報告がなされた。そこで、手術によって取り切れず、放射線治療が及ばない領域まで深く浸潤した腫瘍を、ケモタキシスを応用して意図した部位へ誘導し、より濃厚な局所治療へ暴露させる“誘殺療法”のコンセプトの可能性に着目し、研究を開始した。

2. 研究の目的

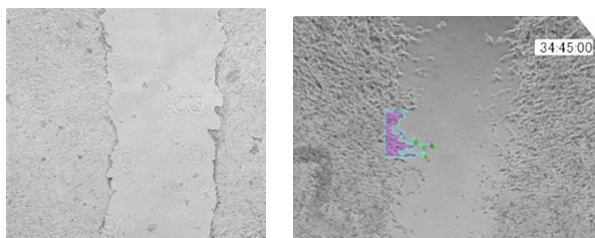
膠芽腫細胞のケモタキシスを応用し、実際に細胞の移動を促し、より濃厚な局所治療部位へ誘導し、予後延長効果を確認することが最終目的となる。そのために、まずは最適なケモカインとケモカインレセプターの組み合わせを探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 幹細胞や悪性腫瘍で報告されているケモカインレセプターの発現を検討する。

(2) chemotaxis assay : 悪性神経膠腫の細胞株であるF98 ラットグリオーマ細胞株を様々な濃度のケモカイン添加溶液に暴露し、移動能が刺激されるかを検討する。

(3) scratch assay (右図) : F98 細胞株を semi confluent にし、様々な濃度のケモカイン溶液に暴露し、細胞の移動能を検討する。移動能の分析にはキーエンス BZ x700 で 37°C、48 時間のタイムラプス撮影を行い、10 時間、20 時間経過時の移動細胞被覆面積を比較検討する。

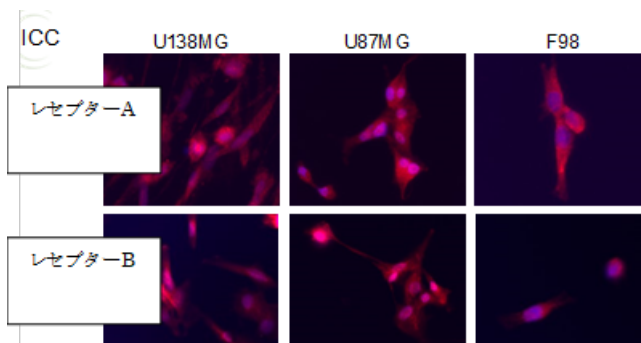


(4) ケモカインによる細胞増殖能の評価 : 細胞遊走を刺激すると同時に腫瘍細胞の増殖も促す危険性も想定される。そこで、ケモカインによって、腫瘍細胞が増殖しないかどうかを WST-1 assay にて検討する。

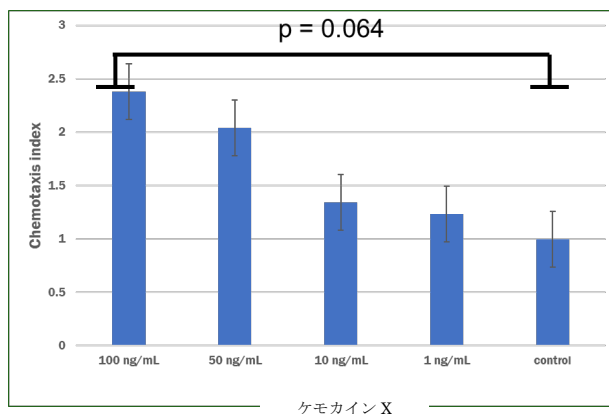
(5) F98 細胞株を移植したラット脳に対し、候補ケモカインを注入し細胞の移動が実際に誘導されるかを検討する。候補ケモカインの種類や濃度、ケモタキシスを誘導可能な距離も併せて検討する。

4. 研究成果

(1) ケモカインレセプターA, B の発現を、当科で手術で得られた悪性神経膠腫の保存検体を用いて免疫組織学的検討を行ったが、免疫染色の条件を確立する事ができず、有意な結果は得られていない。そこで、U138MG、U87、F98 細胞株を用いた免疫細胞染色を行い、A, B の発現を確認した。

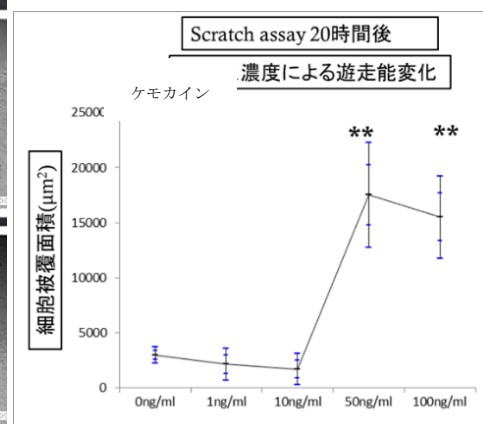
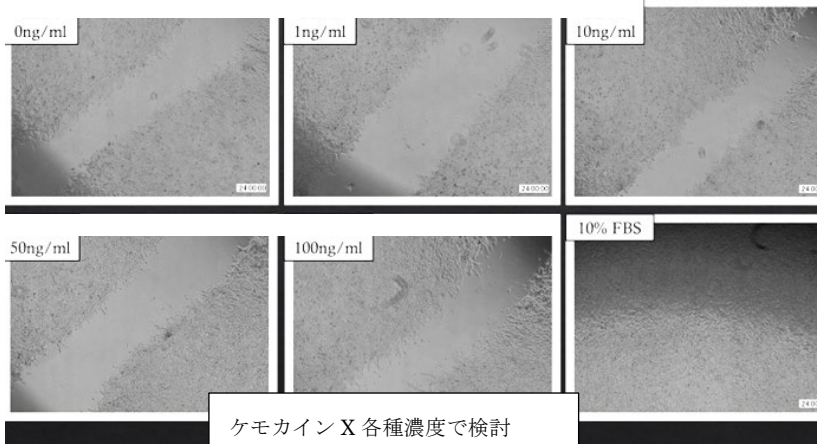


(2) F98 細胞株を用いて、代表的なケモカイン X 溶液へのケモタキシスを確認した。50-100ng/ml の濃度において、細胞の遊走が刺激される傾向があることが確認できた。

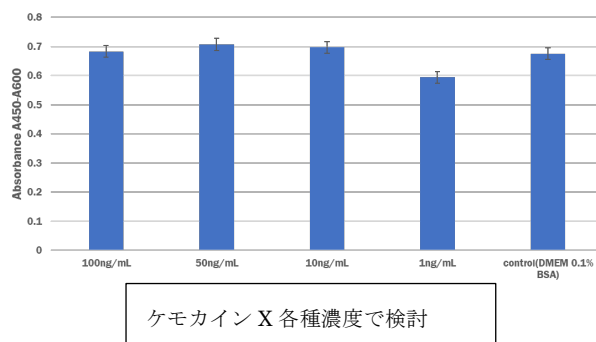


(3) 10 時間、20 時間経過時点では 50ng/ml、100ng/ml のケモカイン X 溶液で、明らかに細胞移動が刺激されていた。特に 20 時間後の分析では、0ng/ml、1ng/ml、10ng/ml 溶液各々に対して、50ng/ml、100ng/ml にて有意な細胞移動が刺激されている事が分かった。

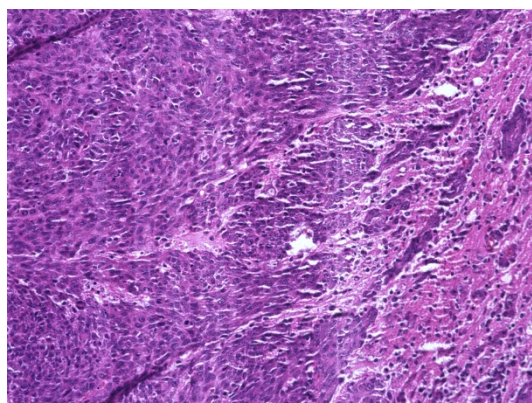
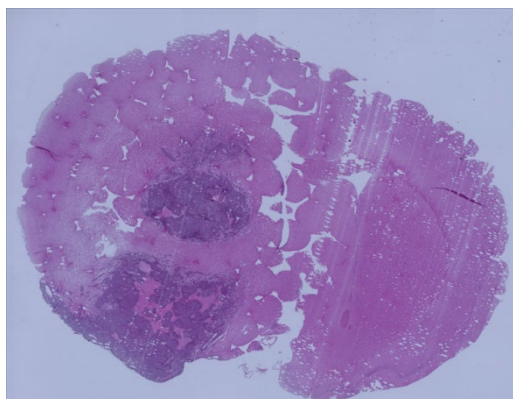
F98細胞 scratch assay タイムラプス撮影 20時間後



(4) 0-100ng/ml の濃度で細胞増殖能を確認したが、細胞遊走能が刺激される 100ng/ml、50ng/ml においても細胞増殖能は刺激されないことが分かった。



(5) F98 細胞株を F344 ラットに移植することで安定した脳腫瘍モデルを作成可能であった。1×10⁴ 個の移植によって、3 週間程度で麻痺などの神経症状を呈し、肉眼的にも明らかな腫瘍を形成した。しかし、in vivo における細胞遊走実験は社会的な諸事情により開始できていない。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------