

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791001

研究課題名（和文） グリオーマの浸潤制御による新たな治療法の開発

研究課題名（英文） Development of new therapy targeting glioma invasion

研究代表者

松本 健一（MATSUMOTO KENICHI）

九州大学・医学研究院・共同研究院

研究者番号：80423581

研究成果の概要：

axon guidance molecule である Netrin-1 及び DCC の発現を mRNA レベルでヒトグリオーマ細胞株、ヒトグリオーマ摘出標本にて確認した。複数のヒトグリオーマ細胞株で Netrin-1 の発現が見られ、U87 では DCC の発現も見られた。ヒトグリオーマ摘出標本でも同様に、Netrin-1 及び DCC の発現が見られ、組織型や症例ごとにその発現プロファイルは一様ではなかった。ヒトグリオーマの biology に axon guidance molecule である Netrin-1 及び DCC が何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：glioma, invasion, migration, Netrin-1, DCC, axon guidance molecule

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性グリオーマの予後は今日において

も依然不良であり、その治療成績の向上は脳神経外科学分野における重要な課題である。

悪性グリオーマの治療を困難なものとする主な因子として、グリオーマ細胞の浸潤性とそれによる切除不可能性が挙げられる。

(2) 悪性グリオーマの浸潤に関する研究は、これまで専ら細胞外マトリックス、メタロプロテアーゼなどの蛋白分解酵素、細胞接着因子などの側面からアプローチされてきた。われわれは、axon guidance molecule として知られる Netrin-1 が複数のヒトグリオーマ細胞株に発現していることを見出した。また、近年 Netrin-1 とその受容体である DCC が中枢神経系の発生過程において、軸索の伸長のみならず、神経細胞やグリア細胞の移動に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。具体的には中枢神経発生過程において、マウス線条体神経細胞の subventricular zone (SVZ) からの移動に際し、DCC を発現した線条体神経細胞に対して Netrin-1 が repulsive agent として作用すること、一方で視神経へのオリゴデンドロサイト前駆細胞の移動においては、Netrin-1 が attractive agent として作用し DCC を発現したオリゴデンドロサイト前駆細胞の移動を促すと考えられていることなどである。この様に Netrin-1 は中枢神経発生過程において、その受容体である DCC を発現した細胞に対し repulsive agent あるいは attractive agent として作用し、細胞の移動を調節していると考えられる。グリオーマの起源と考えられるグリア細胞の発生過程において、特に細胞の移動に Netrin-1 が関与していること

は、グリオーマ細胞の浸潤過程においても Netrin-1 が何らかの役割を果たしている可能性を多いに示唆する。

2. 研究の目的

悪性グリオーマの予後は今日においても依然不良であり、その治療成績の向上は脳神経外科学分野における重要な課題である。悪性グリオーマの治療を困難なものとする主な因子として、グリオーマ細胞の浸潤性とそれによる切除不可能性が挙げられる。グリオーマ細胞の浸潤性を制御し、治療成績の向上につながる新たな治療方法を開発することが本研究の主要目的である。悪性グリオーマ細胞の浸潤メカニズムにおいて、Netrin-1 とその受容体である Deleted in colorectal cancer (DCC)の関与を解明し、グリオーマ細胞の浸潤制御法開発の端緒としたい。

3. 研究の方法

(1)ヒトグリオーマ細胞株における Netrin-1、DCC 発現の確認

RT-PCR 法を用いて複数のヒトグリオーマ細胞株における Netrin-1、DCC の発現を確認する。

(2)U87 など DCC を発現したヒトグリオーマ細胞株を用いての invasion および migration assay

DCC を発現したヒトグリオーマ細胞を Matrigel 中で培養しその浸潤能を、また微小孔のあいた membrane を用いて遊走能を評価

する。Netrin-1 の存在下、非存在下でその影響を比較する。

(3)Netrin-1、DCC のプラスミドベクターの作成

(4)DCC を発現しないヒトグリオーマ細胞株 (U251、U373 など) に DCC を導入し と同様の invasion および migration assay を行う。

4 . 研究成果

(1)ヒトグリオーマ細胞株における Netrin-1、DCC 発現の確認

ヒトグリオーマ細胞株における各 axon guidance molecule の発現を、RT - PCR 法を用いて確認した。ヒトグリオーマ細胞株として U87、U251、U373、KNS81 を使用した。また Netrin-1 発現の positive control として、ヒト線維芽細胞株 HEK293 を使用した。DCC 発現の positive control としてはヒトグリオーマ細胞株 U87 を使用した。まず、各培養細胞より QIAGEN RNeasy Mini kit を用いて RNA を抽出した。Netrin-1、DCC の primer をそれぞれ 設定し、invitrogen Superscript one-step RT-PCR kit を用いて RT-PCR を行った。次いで RT-PCR 産物を 1 %アガロースゲル上で電気泳動した。その結果、ヒトグリオーマ細胞株では U87、U251、U373 に Netrin-1 のバンドが検出され、KNS81 では Netrin-1 のバンドは検出されなかった。一方、DCC は U87 (先行実験で確認済み) でバンドが検出され、U251、U373、KNS81 のヒトグリオーマ細胞株では検出されなかった。これより、少なくとも

も mRNA レベルでは U87、U251、U373 に Netrin-1 の発現があり、U87 には Netrin-1 および DCC の両方の発現があることがわかった。以上により、ヒトグリオーマ細胞株における axon guidance molecule である Netrin-1、DCC の発現プロファイルは一様ではないことが明らかとなった。

(2)ヒトグリオーマ抽出サンプルにおける

Netrin-1、DCCの発現の確認

ヒトグリオーマ抽出サンプルにおける各axon guidance moleculeの発現をRT-PCR法を用いて確認した。ヒトグリオーマサンプルとして、glioblastoma2例、anaplastic astrocytoma2例、diffuse astrocytoma2例、oligodendroglial tumor2例、pilocytic astrocytoma1例、pleomorphic xanthoastrocytoma2例の凍結標本を用いた。またNetrin-1発現のpositive controlとして、ヒト線維芽細胞株HEK293を使用した。DCC 発現のpositive controlとしてはヒトグリオーマ細胞株U87を使用した。まず、QIAGEN RNeasy Mini kitを用いてRNAを抽出した。Netrin-1、DCCのprimerをそれぞれ設定し、invitrogen Superscript one-step RT-PCR kit を用いてRT-PCRを行った。次いでRT-PCR産物を 1 %アガロースゲル上で電気泳動した。結果は以下の通りであり、ヒトグリオーマ抽出サンプルにおけるmRNAレベルでの各種axon guidance moleculeの発現プロファイは、組織型ごと、症例ごとに一様でないことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 健一 (MATSUMOTO KENICHI)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80423581

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：