

機関番号 : 11101
 研究種目 : 基盤研究 (C)
 研究期間 : 2008~2010
 課題番号 : 20591702
 研究課題名 (和文) 分子標的治療薬とプロテオグリカンによるグリオーマ細胞吸着療法の開発
 研究課題名 (英文) The project of glioma cell absorption therapy using proteoglycan and molecular targeting therapy.
 研究代表者
 浅野 研一郎 (ASANO KENICHIRO)
 弘前大学・医学部付属病院・講師
 研究者番号 : 90312496

研究成果の概要 (和文) :

グリオーマ細胞の浸潤を防止し、一カ所に遊走沈着させることができれば効率的な治療を行うことができると考え実験計画した。

腫瘍摘出術後、前処置としてグリオーマ細胞に間接的細胞接着因子増強作用があることが報告された分子標的治療薬を摘出面に塗布し腫瘍細胞を凝集させ、高濃度プロテオグリカン人工基質を重層し、グリオーマ細胞を吸着させ治療する実験モデルを開発する。

In vitro の実験でプロテオグリカンの入っている人工基質は約 2 倍の細胞吸着率があることを確認した。なお AG1478 の至適濃度は 10nmol/ml である。また至適プロテオグリカン濃度は 50µg/ml であることを確認。

In vivo の実験にてラット脳内に残存している C6-GFP の有無の確認と、高濃度プロテオグリカン人工基質に吸着された C6-GFP の存在の確認が可能であった。以上の実験より、脳内に浸潤している C6-GFP が高濃度プロテオグリカン人工基質に効率よく遊走沈着していることを確認した。

研究成果の概要 (英文) :

My main project is to prevent the tumor cell invasion. And it is very convenient if tumor cell might migrate to only one portion. By using this way, we would treat the remained tumor cell effectively.

My final goal is to product the experimental model of glioma cell absorption model using proteoglycan and molecular targeting therapy after tumor removal operation.

In vitro experiment, I confirmed the effectiveness of C6-GFP cell absorption 2 times higher than artificial basement layer without proteoglycan. And also, most effective concentration is 10nmol/ml of AG1478 and 50mg/ml of proteoglycan.

In vivo experiment, same data of absorption of C6-GFP and the remain in the rat intracereber cortex were confirmed. I also confirmed that C6-GFP tumor cell which had invaded in a brain was carry out to the artificial matrix with proteoglycans.

交付決定額

(金額単位 : 円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2009 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2010 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

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：プロテオグリカン、AG1478、カドヘリン、EGFR、人工基質、悪性グリオーマ

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマは脳腫瘍の中でも発生頻度が高く、術後放射線療法や化学療法など集学的治療が行われるが、生命予後は極めて不良である。その原因としてグリオーマ細胞の浸潤性の強さにより、手術にて全摘したにもかかわらず約9割に局所再発を来すことが考えられる。そこでグリオーマ細胞の浸潤を防止し、一カ所に遊走沈着させることができれば効率的な治療を行うことができると考えた。

また研究代表者のこれまでの研究成果を踏まえた背景として、

- 1) 細胞接着因子の1つである N-カドヘリンがグリオーマ細胞内に存在することを確認した (Asano K, Brain Tumor Pathol 14: 27-33, 1997)。
- 2) N-カドヘリンの発現が低下するとグリオーマ細胞が浸潤性発育となり髄液播種を来しやすいことを臨床症例にて確認した (Asano K, et al. Neurosurgical Rev 23: 39-44, 2000)。
- 3) N-カドヘリン遺伝子を C6 グリオーマ細胞に導入すると、C6 グリオーマ細胞の浸潤を防ぎ、凝集をきたすことに成功した (Asano K, et al. J Neuro-Oncol 70: 3-15, 2004)。
- 4) EGFR チロシンキナーゼ阻害薬の1つである AG1478 には C6 グリオーマ細胞の抗腫瘍効果のみならず、間接的 N-カドヘリン増強作用があることが分かり、C6 グリオーマ細胞の浸潤を効果的に予防することに成功した (Asano K, et al. Neuro-Oncol 16: 34-39, 2006)。
- 5) プロテオグリカンは当大学においてシャケ鼻軟骨から生成量産することに成功しており、C6 グリオーマ細胞を吸着する性質をもつ (Aguilar CB, et al. BMC Cell Biol 19: 6-31, 2005)。

以上を明らかにしている。

したがって、これまでの研究成果を発展させる具体的な方策として、手術にて腫瘍を摘出後、残存腫瘍に対し前処置として AG1478 を局所投与し、本薬剤の抗腫瘍効果のみならず間接的 N-カドヘリン増強作用により予め腫瘍細胞を凝集化し、浸潤を防止する。さらに高濃度プロテオグリカン人工基質を摘出面に塗布し、腫瘍細胞の凝集と人工基質への移動を促し、最終的に手術または放射線にて治療する。

この様な治療の試みは国内外を問わず全くなされておらず、このアイデアを利用することにより研究を推進すれば、より効果のある治療法がみ出せると考えたことが背景にある。

2. 研究の目的

腫瘍摘出術後、前処置としてグリオーマ細胞に間接的細胞接着因子増強作用があることが報告された分子標的治療薬 AG1478 を摘出面に塗布し腫瘍細胞を凝集させ、高濃度プロテオグリカン人工基質を重層し、グリオーマ細胞を吸着させ治療する実験モデルを開発する。

3. 研究の方法

平成 20 年度

in vitro の実験系の確立をめざし以下の実験を行う。

1. あらかじめ C6 グリオーマ細胞を浸潤させておいた人工基底膜に、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬の1つである AG1478 を投与し、C6 グリオーマ細胞の殺細胞効果と間接的 N-カドヘリン増強作用により C6 グリオーマ細胞を凝集させる。
2. C6 グリオーマ細胞を吸着することが確かめられているプロテオグリカンの高濃度人工基質を重層し、人工基質へ腫瘍細胞を遊走沈着させる。
3. 人工基底膜から C6 グリオーマ細胞を高濃度プロテオグリカン人工基質にすべて吸着させることを確認する。

以上を in vitro の実験系を確立する。

平成 21 年度

in vivo の実験系の確立をめざし以下の実験を行う。

前年度 in vitro の実験系の確立として、効率的に腫瘍細胞を凝集させ人工基質に吸着させる様に薬剤の調整を行い、至適濃度を決定することができたため、本年度は in-vivo として動物実験の確立を目指す。腫瘍細胞は同様に C6 を用い、病理検索での腫瘍浸潤の可視化を容易にするため、Green Fluorescein Protein (GFP) 遺伝子を予め導入した C6-GFP を使用する (Asano K, J Neuro-Oncol 170: 3-15, 2004)。

平成 22 年度

in vivo の実験系の確立をめざし以下の実験を行う。

前年度 in vitro の実験系の確立として、効率的に腫瘍細胞を凝集させ人工基質に吸着させる様に薬剤の調整を行い、至適濃度を決定することができたため、本年度は in-vivo として動物実験の確立を目指した。腫瘍細胞は同様に C6 を使い、病理検索での腫瘍浸潤の可視化を容易にするため、Green Fluorescein Protein(GFP) 遺伝子を予め導入した C6-GFP を使用する。

4. 研究成果

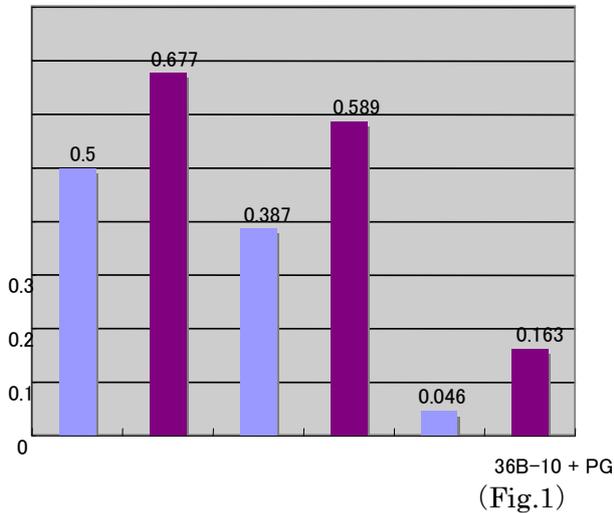
平成 20 年度

(1)2 週間培養にて病理標本が得られた。特に C6 のみならず L9 や 36B-10 など他の腫瘍細胞でも同様の結果であることがわかった。

(2)画像解析ソフトを用いて ECMatrigel に残存する C6-GFP と人工基質に遊走した C6-GFP を cell count するし、プロテオグリカンが入っていない人工基質と比べて約 1~4 倍の細胞吸着率があることを確認した (Fig. 1)。

以上より AG1478 を投与することにより、高濃度プロテオグリカン人工基質への C6-GFP の沈着を確認した。

なお AG1478 の至適濃度は 1~100nmol/ml の範囲で確認したが、10nmol/ml が最適であることがわかった。



平成 21 年度

(1) 前年度の続きとして In Vitro の実験においてプロテオグリカンを加えることにより、物理的な細胞浸潤能力がどのようになるか定性評価をしたところ、Fig. 2 のようにいずれの細胞群においても、プロテオグリカンを加えるとプロテオグリカンへ向かう細胞

浸潤が強くなる傾向となることがわかった (Fig. 2)。

Cell invasion assay

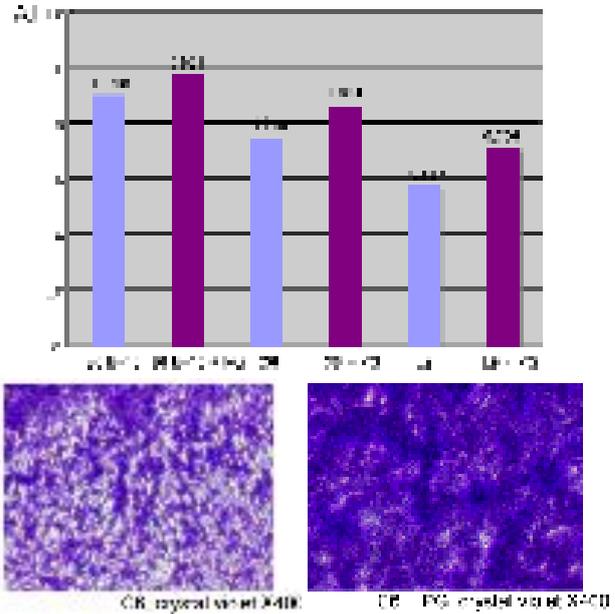


Fig. 2

(2) In vivo の実験として、脳摘出標本の病理標本作成を行い、良好なコントロール標本を作成した。画像解析にて、脳内に残存している C6-GFP の有無の確認と、高濃度プロテオグリカン人工基質に吸着された C6-GFP の存在の確認が可能であった。なお至適プロテオグリカン濃度は 50µg/ml である (Fig. 3)。

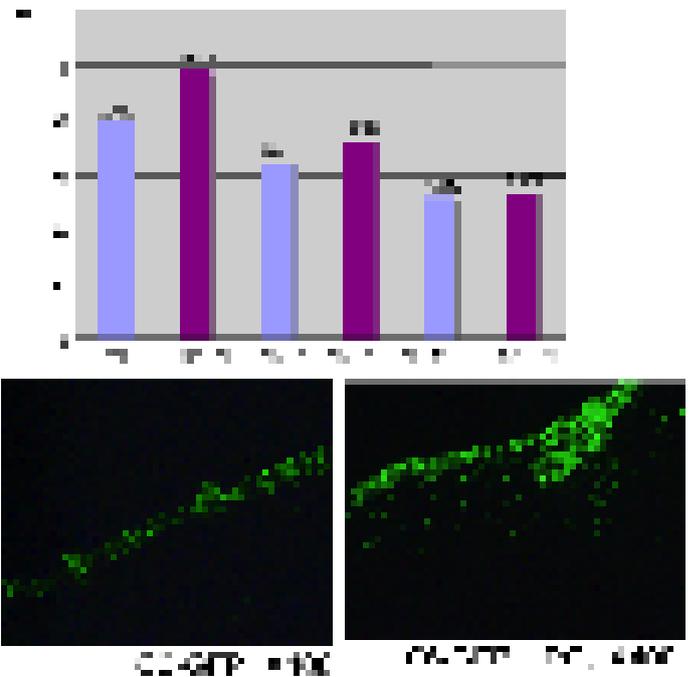


Fig. 3

以上の実験より、脳内に浸潤している C6-GFP が高濃度プロテオグリカン人工基質に効率よく遊走沈着していることを確認し次年度への基礎が完成した。

平成 22 年度

結果として、脳摘出標本の病理標本作成を行い、良好な実験結果が得られた。画像解析にて、ラット脳内に残存している C6-GFP の有無の確認と、高濃度プロテオグリカン人工基質に吸着された C6-GFP の存在の確認が可能であった。

以上の実験より、脳内に浸潤している C6-GFP が高濃度プロテオグリカン人工基質に効率よく遊走沈着していることを確認した。

また生存確認試験では、コントロール群が平均生存日数 29 日に対し、実験群は 45 日と生存日数の延長が見られた。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

Asano K, Ohkuma H. Epithelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor prevents infiltration and cerebrospinal fluid dissemination in malignant glioma: An experimental study. Neurosurgery. 査読あり、Neurosurgery. 2011 Aug; 69(2): 399-410; discussion 410-1.

[学会発表] (計 2 件)

1. 術後良好なりハビリ機能回復をめざした multimodality 手術. 浅野研一郎、菊池潤、奈良岡征都、大熊洋揮. 第 69 回日本脳神経外科学会総会. 2010.10.5 福岡市

2. プロテオグリカンを用いたグリオーマ腫瘍細胞吸着療法の可能性について. 浅野研一郎、片山耕輔、菊池潤、小笠原ゆかり、松田尚也、大熊洋揮. 第 29 回日本脳腫瘍学会. 2011.11.29 下呂市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 研一郎 (ASANO KENICHIRO)

弘前大・医学部付属病院・講師

研究者番号 : 90312496

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :