

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893188

研究課題名(和文) ヒトグリオーマ初代培養株を用いた悪性グリオーマに対する局所治療法の開発

研究課題名(英文) developing a novel strategy for preventing local recurrence of human glioma with human primary xenografts

研究代表者

竹崎 達也 (Takezaki, Tatsuya)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：50712402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の主たる目的は、血液脳関門の存在により薬剤の到達性が限られる悪性グリオーマ局所に対し、抗癌剤などの治療薬剤を効率よく至適濃度に到達させる新しいドラッグデリバリーシステムを開発し、臨床応用を目指すことである。この目的を達成するために「ヌードマウスに移植された患者検体由来グリオーマ初代培養株移植片内にテモゾロミド混合フィブリン糊製剤を局所投与したとき腫瘍増大抑制効果を期待できる」ことを本研究で明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to develop a novel strategy for preventing local recurrence of malignant glioma, because it is usually difficult due to blood-brain barrier. I investigated that local administration of high concentration of temozolomide with fibrin glue could prevent tumor growth of primary malignant glioma xenografts derived from human glioblastoma.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：悪性グリオーマ ドラッグデリバリーシステム フィブリン糊 局所治療 初代培養株 テモゾロミド

## 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫(悪性グリオーマ)は極めて予後不良の疾患で、摘出術と放射線化学療法を併用しても平均生存期間は約14か月であり、新規治療法開発の必要性に迫られている。グリオーマ研究は近年まで市販のグリオーマ細胞株(U87MGなど)に依存していたが、実際に治療成績を改善する研究成果は未だ得られていない。これは市販のグリオーマ細胞株が脳内に移植されても境界明瞭な腫瘍を形成するのみで、実際に臨床で見られる浸潤性病変を再現できていないためと考えられる。

膠芽腫は腫瘍摘出腔周囲からの再発が圧倒的に多く、これは腫瘍境界部に治療抵抗性のグリオーマ幹細胞と膠芽腫ニッチが存在することを示唆する。「膠芽腫患者の手術摘出腔にテモゾロミド混合フィブリン糊製剤を散布すれば、徐放性にテモゾロミドが摘出腔周囲のグリオーマ幹細胞および膠芽腫ニッチに作用し、局所コントロール(再発予防)できる」と仮説をたてた。

## 2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、血液脳関門の存在により薬剤の到達性が限られる悪性グリオーマ局所に対し、抗癌剤などの治療薬剤を効率よく至適濃度に到達させる新しいドラッグデリバリーシステムを開発し、臨床応用を目指すことである。この目的を達成するためにまず「ヌードマウスに移植された患者検体由来グリオーマ初代培養株移植片内にテモゾロミド混合フィブリン糊製剤を局所投与したとき腫瘍増大抑制効果を期待できる」ことを本研究で明らかにしたい。

## 3. 研究の方法

本研究では市販のグリオーマ細胞株では動物実験にて再現できない浸潤性腫瘍を再現することのできる患者検体由来「皮下連続継代モデル」を用いた。この「皮下連続継代モデル」では皮下腫瘍においても脳内に移植されたときと同様の病理学的特徴、遺伝子情報を維持しているため膠芽腫ニッチを再現しているものと考えられる。

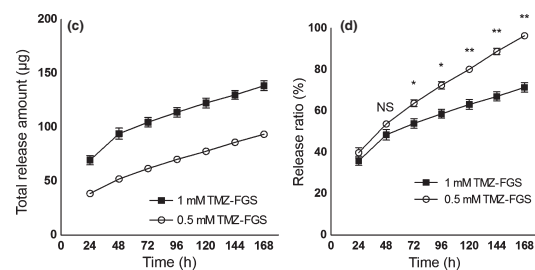
皮下で増大した腫瘍片は細分したあと、血清加培地で短期間培養可能である。テモゾロミド

ド混合培地内にてMTT assay、テモゾロミド混合寒天培地内にてコロニー形成能を評価する。結果を総合しテモゾロミド至適濃度を検討する。つづいて動物実験の第一段階として形成された皮下腫瘍内にin vitro実験にて検討されたテモゾロミド濃度に調整したテモゾロミド混合フィブリン糊を局所注入し、数日後(定時的に)サンプル(腫瘍)を回収し、病理学的評価を行う。第2段階として脳内移植モデルを作成する。4~6週齢ヌードマウス(メス)にガイドスクリューを留置する。短期培養された初代培養株の細胞数を100,000~500,000個に調整し、脳内に移植する(n=10)。腫瘍形成過程を追跡するために2~4週間毎に脳腫瘍移植脳を2サンプルずつ回収し、病理学的評価を行う。

「皮下連続継代」初代培養株は樹立までに6~12ヶ月の期間を要するため、その間はグリオーマ幹細胞株を用いて実験を先行した。

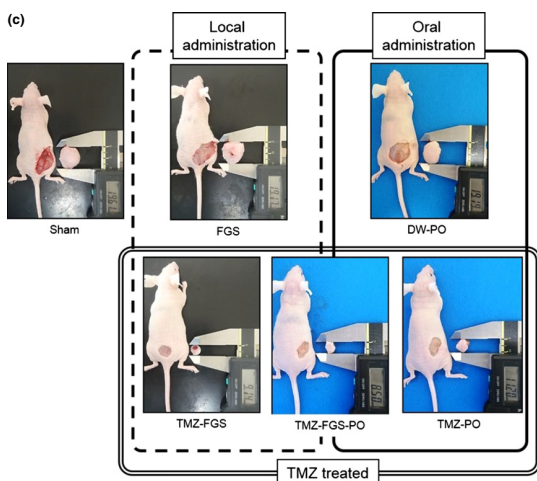
## 4. 研究成果

1-1) フィブリン糊に0.5mMおよび1.0mMになるようにテモゾロミドを混合した時、テモゾロミドが168時間後まで徐放性に培地内に放出されることを高速液体クロマトグラフィーを用いて観測した。



1-2) テモゾロミド添加フィブリン糊の生体内での腫瘍抑制効果を確認するために、1つの市販グリオーマ細胞株(U87G)および熊本大学脳神経外科にて樹立された2つのグリオーマ幹細胞株をヌードマウス皮下に移植した。テモゾロミド経口摂取群(TMZ-PO)、テモゾロミド添加フィブリン糊局所治療群(TMZ-FGS)、テモゾロミド経口摂取およびテモゾロミド添加フィブリン糊局所治療群

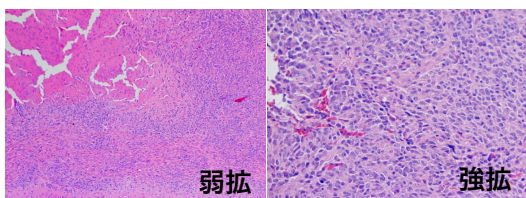
(TMZ-FGS-PO)に分けて各々腫瘍体積を測定すると、テモゾロミド経口摂取およびテモゾロミド添加フィブリン糊局所治療群(TMZ-FGS-PO)、テモゾロミド添加フィブリン糊局所治療群(TMZ-FGS)、テモゾロミド経口摂取群(TMZ-PO)の順に腫瘍増大抑制効果を認め、免疫染色を行うとテモゾロミド添加フィブリン糊周囲では細胞増殖能の抑制(Ki67陽性率低下)、アポトーシスの誘導(Cleaved caspase-3陽性率上昇)を認めた。



1-3) テモゾロミド添加フィブリン糊の頭蓋内使用での安全性を確認するためにテモゾロミド添加フィブリン糊をヌードマウス脳表に直接留置した。経時的に病理学的評価を行ったが特異的な変化は見られなかった。

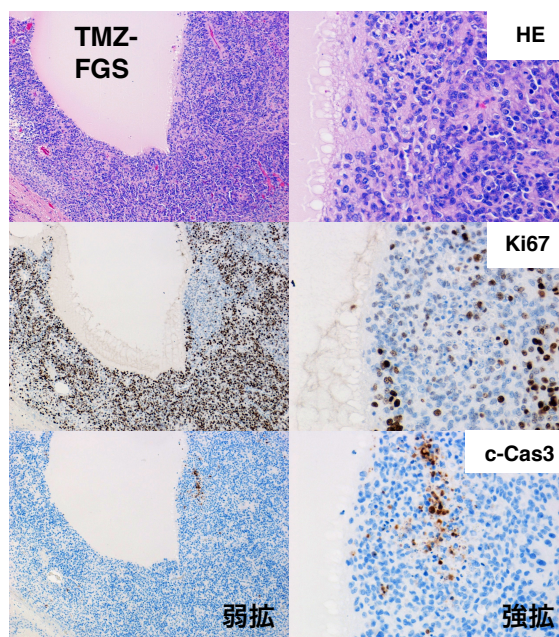
2-1) 熊本大学医学部附属病院脳神経外科にて摘出された新鮮なヒト神経膠芽腫組織をメスにて細分し、基底膜マトリクスと1:1の比にて混合しヌードマウス皮下に注射した。27症例のうち、13症例でヌードマウス皮下にて継代継続中である。

うち1症例では第10継代まで行い、ヌードマウス脳内に細胞100,000個を移植すると、30~40日でヌードマウスは腫瘍死に至る。脳



内移植腫瘍を病理学的に評価すると、患者組織と同様に核の大小不同のある腫瘍細胞が高密度に増殖し、脳実質内に浸潤性に広がり、核分裂像も認める。血管新生や壊死巣も認め、膠芽腫と診断した。

2-2) 腫瘍細胞100,000個をヌードマウス脳内に移植し、30日後にテモゾロミド添加(1mM)フィブリン糊をガイドスクリーシステムを用いて腫瘍内に注入した。注入後3日目にマウス脳を回収し病理学的に評価するとテモゾロミド添加フィブリン糊に接する腫瘍の一部に細胞核のクロマチンが凝集し壊死に陥っている病巣を認めた。免疫染色を行うと同部位は細胞増殖能が低下し(Ki67陽性率低下)、アポトーシスが誘導されていた(Cleaved Caspase-3 陽性率上昇)。



各「皮下連続継代」グリオーマ細胞株の脳腫瘍形成能を評価し、適切な時期にテモゾロミド添加フィブリン糊を注入することによって腫瘍増大抑制を期待することができる。また現在継代継続中の13症例中、MGMT遺伝子プロモーター領域のメチル化など検討すると興味ふかい結果が得られると期待している。

## 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)

1. Shigeo Anai, Takuichiro Hide, Tatsuya Takezaki, Jun-ichiro Kuroda, Naoki

Shinojima, Keishi Makino, Hideo Nakamura,  
Shigetoshi Yano and Jun-ichi Kuratsu,  
Antitumor effect of fibrin glue containing  
temozolomide against malignant glioma,  
Cancer Science, 査読有、May 2014,  
583-591 DOI: 10.1111/cas.12397

〔学会発表〕（計 1 件）

1. Shigeo Anai, Takuichiro Hide, Tatsuya Takezaki et al., 4th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology held in conjunction with the 2013 Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology, November 21-24, 2013, San Francisco, California

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

竹崎達也 (TAKEZAKI, Tatsuya)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：50712402

### (2)研究協力者

穴井茂雄 (ANAI, Shigeo)

熊本大学・医学部附属病院特任助教