

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591658
 研究課題名 (和文) 腫瘍幹細胞を治療標的とした低酸素誘導因子制御による治療戦略の開発
 研究課題名 (英文) Experimental studies of CD133(+) glioblastoma stem cells under normoxic and hypoxic conditions
 研究代表者
 笹嶋 寿郎 (SASAJIMA TOSHIO)
 秋田大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：40235289

研究成果の概要：ヒト膠芽腫細胞株から凝集塊を形成する浮遊細胞群を誘導し、抗 CD133 モノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーで CD133 陽性細胞を選別し、CD133 陽性細胞の割合と低酸素負荷との関連を検討した。常酸素細胞群では CD133 陽性細胞の割合は 0.7～4.0% であったが、低酸素負荷 (5% 酸素) 群では 8.4～44.5% まで増加し、低酸素負荷による腫瘍幹細胞の増加が確認された。低酸素負荷による CD133 陽性細胞の増加は、低酸素誘導因子抑制薬であるフラボピリドールにより抑制されなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：悪性脳腫瘍, 低酸素誘導因子, 腫瘍幹細胞, 増殖能

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性脳腫瘍における低灌流域の低酸素細胞の存在は放射線・化学療法に対する腫瘍抵抗性因子の一つとして指摘されてきたが、腫瘍血管増生因子 (VEGF) を誘導して腫瘍の血管新生を促進させたり、腫瘍増殖に寄与する低酸素誘導因子が低酸素細胞に発現しているこ

とが判明し、腫瘍組織における重要な調節転写因子として注目されている。

(2) 最近では悪性脳腫瘍においても自己複製能および多分化能を有する腫瘍幹細胞の存在が確認され、非幹細胞と比較して細胞死抵抗性で、細胞分裂が遅く、薬剤を細胞外に排出する機能があり、放射線

治療や抗腫瘍薬に耐性を示すこと報告された。

(3) 幹細胞は低酸素条件下で分化・増殖能が亢進し、その機序として低酸素誘導因子の関与が示唆されており、低酸素誘導因子は幹細胞における分化・増殖にも寄与している可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では実験脳腫瘍を用いて低酸素細胞における腫瘍増殖能と腫瘍幹細胞の誘導との関連について検討する。

(2) 低酸素誘導因子抑制による腫瘍増殖および腫瘍幹細胞の誘導抑制効果について検討する。

3. 研究の方法

(1) 使用細胞株と薬剤

今回の実験で使用した樹立培養腫瘍細胞株はラットグリオーマ由来のRG2細胞株、C6細胞株、ヒト膠芽腫由来のU87細胞株およびラット乳癌細胞由来のWalker 256 (W256) 細胞株で、悪性脳腫瘍の代表である悪性神経膠腫、ならびに転移性脳腫瘍のモデルとしての乳癌細胞の培養細胞株を用いた。低酸素誘導因子抑制薬としてはフラボピリドールを用いた。

(2) ラット可移植性腫瘍株をマルチガスインキュベーターを用いて低酸素条件下に単層培養し、各培養細胞について三重標識組織放射能測定を(^{14}C -azomycin, methyl- ^3H -thymidine (^3H -TdR), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA)を行い、腫瘍増殖能と低酸素状態との関連を解析した。三重標識組織放射能測定法は10%牛胎児血清添加 MEM を用いて単層培

養した細胞の培養液を三重標識したアミノ酸欠乏 10%牛胎児血清添加 MEM (^3H -TdR; 0.1 μ Ci/ml, ^{14}C -azomycin; 0.01 μ Ci/ml, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA ; 3 μ Ci/ml) に交換し、5分から60分にわたって cell scraper を用いて細胞と培養液を採取し、遠心 (1500rpm, 3 分間) にて細胞と培養液を分離した。60 μ l の培養液採取後に培養液は吸引除去して細胞および採取した培養液の重量を計測した。細胞内および培養液中の各トレーサの濃度は $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA の放射活性をガンマカウンターで測定し、各測定時間における放射活性の減衰を補正して $^{99\text{m}}\text{Tc}$ の放射活性を算出した。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ の放射活性が完全に消失した4日後 (15 半減期) に培養液および細胞に solubilizer 0.5ml を添加し、溶解後にシンチレータ 4.5ml を加えて ^{14}C の放射活性をベータカウンターで測定した。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA は採取による障害細胞および細胞外腔へのトレーサ集積を反映することから各トレーサの細胞/培養濃度比を $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA の集積量を用いて補正し、真の細胞/培養液濃度比 (各トレーサの細胞内集積量) を算出した。各トレーサの真の細胞/培養液濃度比 (C_c/C_m) は以下の式で表される。

$$[C_c/C_m] = C_c/C_m - \{C_c [^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}] / C_m [^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}]\}$$

C_c は採取した細胞の放射活性 (dpm/cell), C_m は培養液の放射活性 (dpm/ml medium), $C_c [^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}] / C_m [^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}]$ は $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA の細胞/培養液濃度比である。腫瘍細胞への ^3H -TdR および ^{14}C -azomycin の集積は真

の細胞／培養液濃度比の経時的変化に基づいて培養液から細胞内へのトレーサ流入を示す速度定数 K_i で評価した。

始めに異なる低酸素状態（2および5%酸素）で、4および24時間目に各速度定数の変化を評価して常酸素細胞（20%酸素）と比較検討した。次いで、慢性的低酸素状態における低酸素負荷の影響を検討するために低酸素状態（5%酸素）で継代培養した細胞株に対して酸素濃度をさらに2%まで低下させ、4および24時間目に各トレーサの細胞内集積速度を同様の方法で算出し、各速度定数の経時的変化を検討した。

(3) ヒト膠芽腫細胞株 (U87) を表皮増殖因子と塩基性線維芽細胞増殖因子を含む無血清培地で、常酸素（20%酸素）および低酸素（5%酸素）状態で培養し、凝集塊を形成する浮遊細胞群を誘導した。次いでフローサイトメトリーで抗 CD133 モノクローナル抗体を用いて CD133 陽性細胞を選別し、CD133 陽性細胞の割合と低酸素負荷（5%酸素）との関連を常酸素細胞（20%酸素）と比較して検討した。

(4) さらに低酸素状態（5%酸素）において低酸素誘導因子抑制薬であるフラボピリドールを添加し、腫瘍幹細胞の誘導抑制効果について検討した。

4. 研究成果

(1) ラット可移植性腫瘍細胞において腫瘍増殖能はいずれも低酸素状態で24時間目には常酸素細胞の50%以下まで低下し、5%酸素で6日間（慢性期）培養されたRG2とW256の増殖

能は持続性に低下していたが、C6は常酸素細胞と同程度まで回復した（図1-3、左）。

(2) 慢性期における低酸素負荷（2%酸素）ではすべての腫瘍細胞株で増殖能が有意に低下した（図1-3、左）。

(3) ^{14}C -azomycinの細胞集積量は常酸素細胞群、5%酸素負荷群、2%酸素負荷群の比較では、いずれの腫瘍細胞株においても、2%酸素負荷群が最も高集積を示し、常酸素細胞群が最も低く、 ^{14}C -azomycinは低酸素状態を反映するトレーサとして有用と考えられた（図1-3、右）。

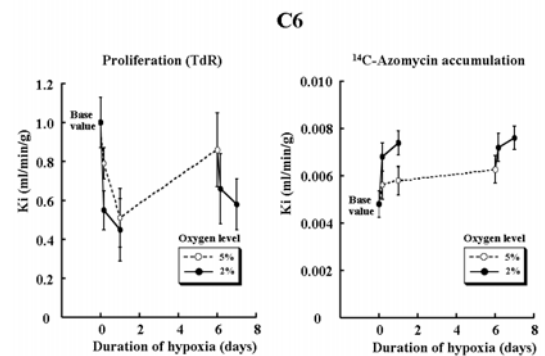


図1 C6における ^3H -TdRおよび ^{14}C -azomycin集積

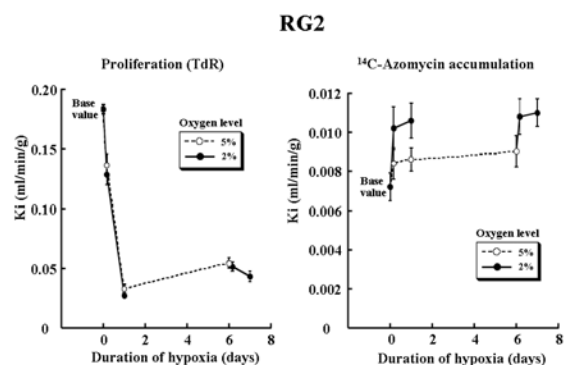


図2 RG2における ^3H -TdRおよび ^{14}C -azomycin集積

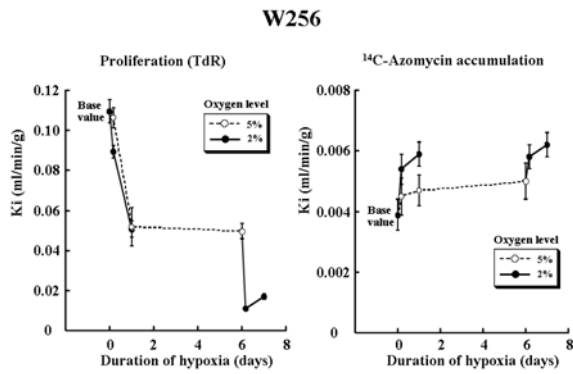


図3 W256における³H-TdRおよび¹⁴C-azacycine集積

(4) ヒト膠芽腫細胞株 (U87) においては常酸素細胞群ではCD133陽性細胞の割合は0.7~4.0%であったが(図4), 低酸素負荷(5%酸素)群では8.4~44.5%まで増加し(図5), 低酸素負荷による腫瘍幹細胞の増加が確認された。

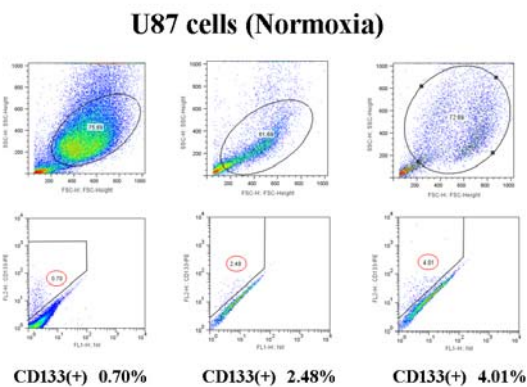


図4 U87におけるCD133陽性幹細胞の割合(常酸素下)

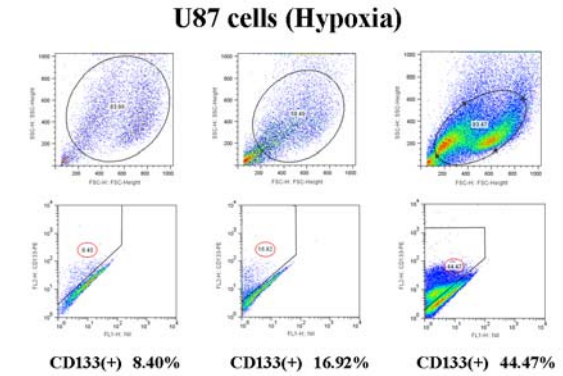


図5 U87におけるCD133陽性幹細胞の割合(低酸素下)

(5) 低酸素負荷によるCD133陽性細胞の増加はフラボピリドールにより抑制されなかった(図6)。

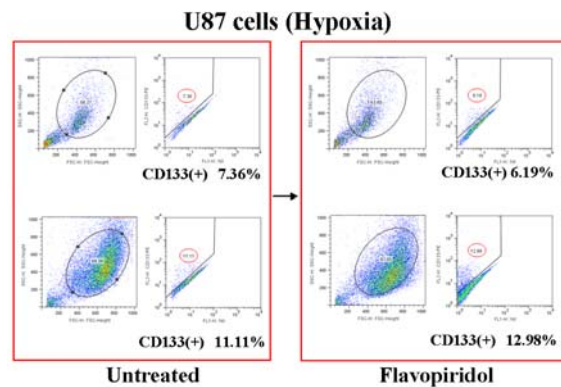


図6 U87におけるCD133陽性幹細胞のフラボピリドール添加前後の変化

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0件)

〔学会発表〕 (計0件)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹嶋 寿郎 (SASAJIMA TOSHIO)

秋田大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40235289

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者