

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659694

研究課題名(和文) 星細胞腫に対する悪性転化抑制を目的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment against malignant transformation of astrocytoma

研究代表者

谷川 元紀 (Tanikawa, Motoki)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20343402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：ethyl nitrosourea誘導グリオーマラットに、生後90日よりp53非依存性に細胞周期を停止させる化合物を投与し、45日後に、腫瘍部分のgradeの判定とMIB-1 LIの計測を行い悪性転化に対する効果を判定した。期間中全20化合物に関して解析したが、残念ながら、これらの化合物はコントロール群と比較して有意な効果を示す物はなかった。一方、コラーゲンゲル内3次元グリオーマ細胞浸潤モデルを用いた解析では、グリオーマ細胞の浸潤に関連する反発因子は、その産生に酸素の供給が影響を与え、その作用は一旦惹起されると、周辺環境の物理化学的変化などがない限り続くと考えられる結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We tried to confirm effects of compounds, which arrest cell cycle through p53-independent pathway, against the malignant transformation of ethylnitrosourea induced glioma by identifying WHO grade and measuring MIB-1 labeling index. Although totally 20 compounds were examined for these term, there was no compound, which showed significant effect comparing with control compound. On the other hand, we achieved analyses for the repellent in glioma cell invasion by using 3-dimensional glioma cell invasion model in collagen gel. The production of repellent was considered to be affected by oxygen supply. Furthermore, the effect of repellent might continue unless physicochemical modulation of circumference environment occurred.

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：astrocytoma chemotherapy p53

1. 研究開始当初の背景

星細胞腫(WHO grade II)に対する後療法のあり方には議論がある。星細胞腫は p53 の変異の下に、遺伝子変異が蓄積されて、悪性転化して行くと考えられているが、このように、その後の遺伝子変異の蓄積によって悪性転化が危惧される星細胞腫に対して、場合によってはそれを助長しかねない化学療法や放射線治療を行うのは、理に叶っていないように考えられる。また、その悪性転化の鍵となる遺伝子の検索を試みた研究は後を絶たないが、それらの結果は一定しない。これは、悪性転化への経路が多岐に渡っていることを示しており、それを少数の遺伝子に帰結させて治療に利用しようというのには無理があり、少なくとも今現在直面している実際の臨床の場とはかけ離れたものであると言わざるを得ない。

2. 研究の目的

本研究では、星細胞腫の治療法に於いて、p53 非依存性に細胞周期を停止する作用を持つ化合物を用いて、腫瘍細胞における遺伝子変異の惹起、延いては悪性転化を押さえるという方法論に至った。これまでの殺細胞を目的としたものとは一線を画する治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

妊娠ウイスターラットの腹腔内に ethylnitrosourea (ENU) を投与して得られた ENU 誘導グリオーマラット(妊娠 18 日目に 75mg/g の高容量を投与することで、生後 90 日程度高率に grade II グリオーマを発症し、その後 180 日までに、grade III、IV へと悪性転化するとされている (Sareddy GR et al., Neurochem Res 34: 1278-88, 2009) に、生後 90 日の時点で定位脳手術装置で、Bregma から頭側に 0.8mm、右外側に 1.3mm、深さが 3mm の位置に、Plastic ONE 社製の浸透圧ポンプ用シングルカニューラを留置して、p53 非依存性に細胞周期を呈しさせるとされている化合物の投与を行い、その効果と安全性の評価を行った。評価は生後 135 日(処置後 45 日)に、脳を採取固定し、プレパラートを作成し、HE 染色で腫瘍部分を確認、腫瘍部分が確認できた物は、WHO の規定に従って、grade を判定すると共に、それに対応する連続切片を、抗 Ki-67 抗体(MIB-1)で染色し、MIB-1 labeling index を計測し、その平均値を算出した。使用した化合物は、最近報告された、p53 非依存性に細胞周期を停止させる効果を持つ 20 化合物 (5-azo-2'-deoxycytidin AsparaninA Chalcones Chlorophyllin luteolin diphenyleneiodonium Naringin benzimidazo[1,2-alpha]quino A674563 Ly294002 lithium esculetin diallyl disulfide deoxynivalenol paeoniflorin psammaplin A Sulforaphane cryptolepine Prodigiosin dactylone Prostaglandin A1 analog) を用いた。また、中枢神経系の発達段階においては分泌タンパクが細胞の migration の方向性に与ることが確認されているが、最近グリオーマ細胞の浸潤に関しても反発因子(chemorepellent)の存在が想定されてきている。そこで、ラットグリオーマ細胞株 C6 コラーゲンゲル内 3 次元グリオー

マ細胞浸潤モデルを用いて、その反発因子に関する研究も施行した。具体的には、低酸素状態にした場合の浸潤スピードに及ぼす影響、細胞塊を近接させて培養した際の浸潤様式、周囲への浸潤が進んだ段階で中心部細胞塊を除去し、その後の浸潤スピードがどのように変化するかなどを評価した。

4. 研究成果

ラット 1 匹辺りの平均の腫瘍数、WHO grade の分布(図 1)および平均 MIB-1 LI(図 2)いずれにおいても、コントロール群(平均の腫瘍数 10.0、GII: 4.3、GIII: 4.7、GIV: 1.0、平均 MIB-1 LI: 8.8%)と比較して有意な効果は示した化合物はなく、この実験系においてそれ以上の検討を行うことは不可能となった。

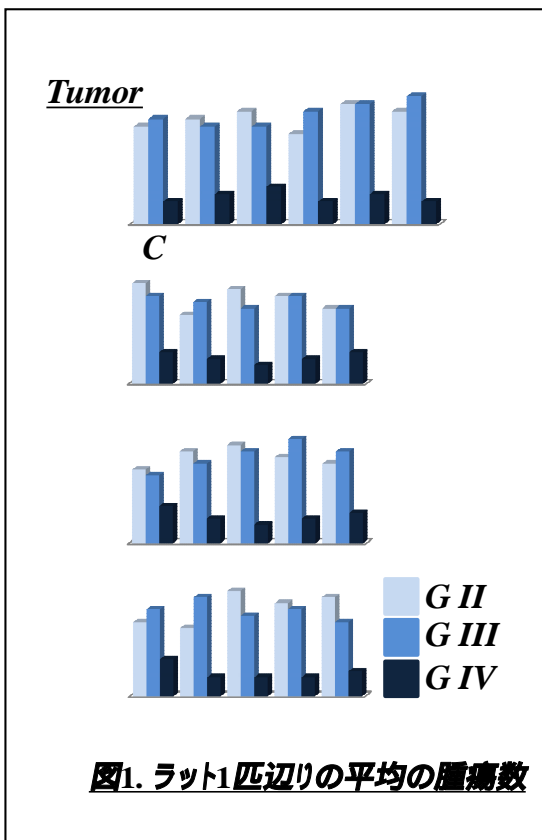
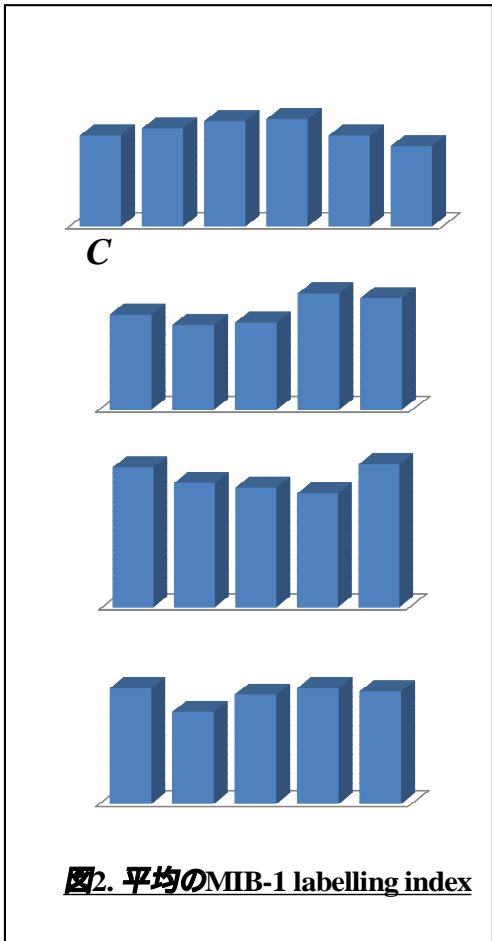
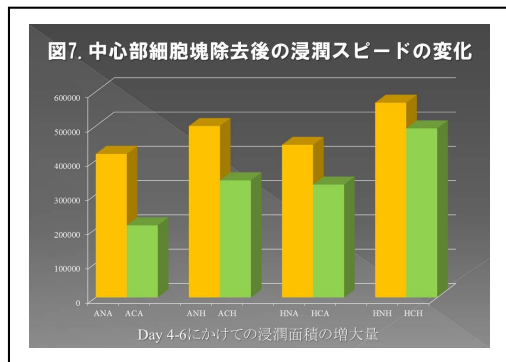
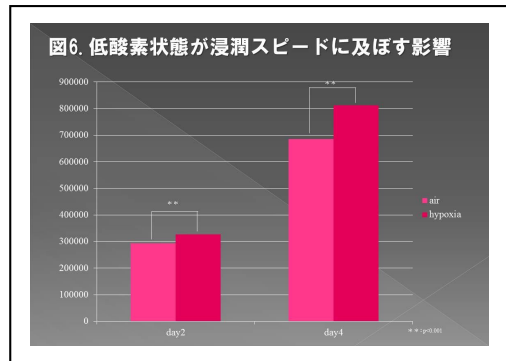
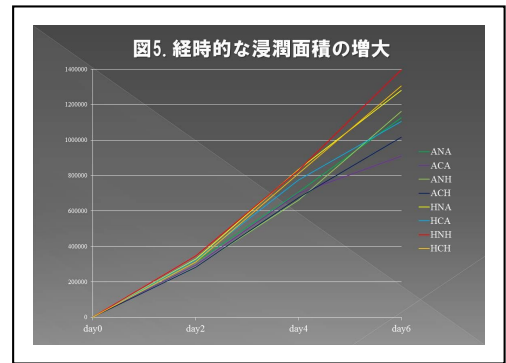
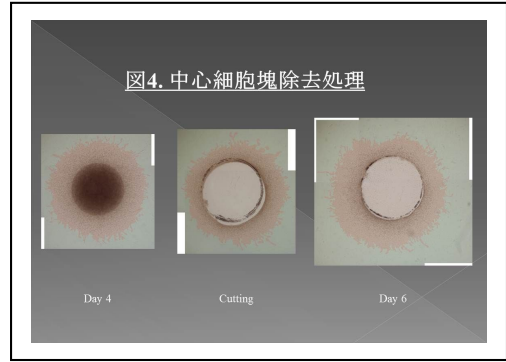
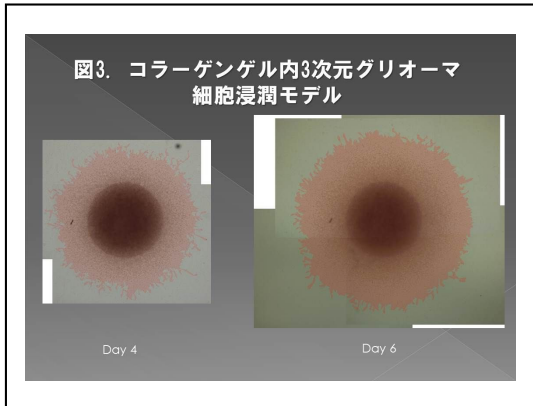


図1. ラット1匹辺りの平均の腫瘍数

一方、グリオーマ細胞の浸潤における反発因子の検索においては(図 3, 4)、低酸素状態で培養した場合、そうでないものと比較して周囲への浸潤スピードは増加していた。細胞塊を近接して培養したものでは、浸潤を開始しても他方の中心部に向かって行くのではなく、互いを避けるように浸潤していくことが観察された。ある程度周囲へ浸潤した段階で中心部を除去したのものについては、除去後に浸潤のスピードは低下するものの、引き続き拡散していくことが観察された。また初期に低酸素にしていたもののほうが中心部除去後に低酸素にしたものよりも浸潤速度は速かった(図 5, 6, 7)。



低酸素状態にした場合に浸潤スピードが速くなることから、低酸素が反発因子の産生に影響を与えている可能性が考えられた。近接して培養した場合、相互の中心部を避けるように拡散していったことから、細胞塊の中心部は低酸素状態になることで反発因子が多く存在していると推測され、また反発因子を産生していると考えられる中心部の細胞塊を除去した後も周囲への浸潤が停止することはなかったことや初期に低酸素状態にしたもののほうが以後の浸潤速度も速かったことから、一旦反発因子がきっかけとなって浸潤を開始した細胞は、それらが消失後も一定の速度で停止することなく動き続けることなどが考えられた。



培養系を低酸素状態にすることで浸潤の速度が速くなったことから、酸素の供給が反発因子の産生に影響を与えていると考えられた。また、

反発因子は中心細胞塊において産生されていると考えられるが、その中心細胞塊を除去した後も浸潤を開始した細胞群は同方向への浸潤を継続した。このことから、反発因子による作用は一旦惹起されると、周辺環境の物理化学的变化などが無い限り続くと考えられた。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

坂田知宏、谷川元紀、山田和雄.
in vitro におけるラットグリオーマ細胞株
C6 周辺浸潤能の評価. 日本脳神経外科
学会第 72 回学術総会. 2012.10.16-18.
パシフィコ横浜(神奈川県)

[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]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷川 元紀 (Tanikawa, Motoki)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号:20343402