

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10759

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 to prevent local recurrence of malignant glioma using primary human glioblastoma xenografts

研究代表者

竹崎 達也 (Takezaki, Tatsuya)

熊本大学・病院・助教

研究者番号：50712402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000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い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫(悪性グリオーマ)患者の平均生存期間は摘出術と放射線化学療法を併用しても約14ヶ月であるが、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。局所再発を防ぐことができれば膠芽腫の治療成績の向上が期待でき、その学術的意義、社会的意義は非常に大きいと考えられる。

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 テモゾロミド 局所再発 初代培養株

## 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。

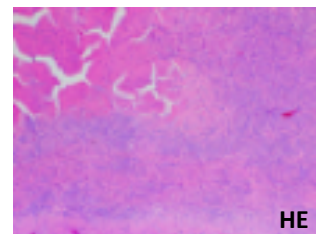
## 3. 研究の方法

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。

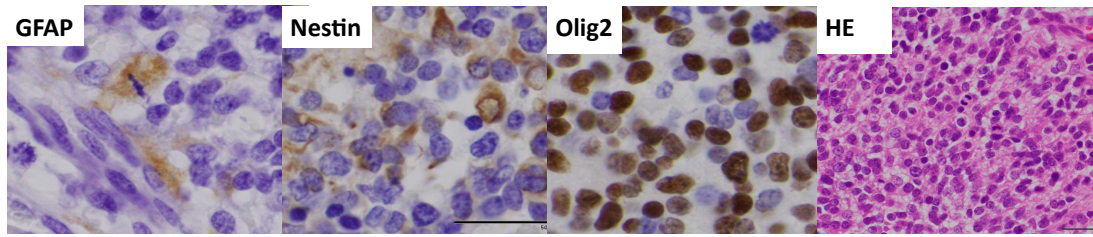
皮下で増大した腫瘍片は細分したあと、血清加培地で短期間培養可能である。テモゾロミド混合培地内にてMTT assay、テモゾロミド混合寒天培地内にてコロニー形成能を評価する。結果を総合しテモゾロミド至適濃度を検討する。つづいて動物実験の第一段階として形成された皮下腫瘍内にin vitro実験にて検討されたテモゾロミド濃度に調整したテモゾロミド混合フィブリン糊を局所注入し、数日後(定時的に)サンプル(腫瘍)を回収し、病理学的評価を行う。第2段階として脳内移植モデルを作成する。4~6週齢ヌードマウス(メス)にガイドスクリューを留置する。短期培養された初代培養株の細胞数を100,000~500,000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。

## 4. 研究成果

1) 熊本大学病院脳神経外科にて樹立されたヒト神経膠芽腫組織由来「皮下連続継代株」のうち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生し、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、膠芽腫と診断できる。



2) 「皮下連続継代」初代培養株では継代を行う際に腫瘍サンプルをパラフィン包埋したり、凍結保存したりして保存している。各継代ごとにパラフィン包埋サンプルを薄切しGFAP、Nestin、Olig2などの分化マーカーとp53、ATRAX、p16、PDGFR $\alpha$ 、EGFR、IDH-1、MGMTなどの悪性グリオーマに特異的に発現する遺伝子マーカーを免疫組織学的に評価し、樹立した悪性グリオーマ初代培養株が臨床応用できるのか妥当性を検討した。



継代可能であったいずれの初代培養株においてもパラフィン包埋した皮下腫瘍のHE染色では大小不同の核を有する異型細胞が増殖し、核分裂や壊死、微小血管増殖を認め悪性グリオーマに矛盾しない所見であった。またGFAP、Nestin、Olig2など分化マーカーにて免疫染色を行うと継代が進んでも各初代培養株での発現パターンは一定であった。またp53、p16を代表するがん抑制遺伝子や、EGFRやPDGFR $\alpha$ などのシグナル伝達回路の発現パターンは、継代が進んでもやはり各初代培養株において一定であり、特に臨床でテモゾロミドの有効性に関与するMGMT(O[6]-methylguanine-DNA methyltransferase)プロモーターのメチル化の状態も各初代培養株において維持されていた。これらの所見は今回樹立したヒト神経膠芽腫組織由来「皮下連続継代株」は適切に各腫瘍の表現系が維持されていることが確認でき、今後臨床応用できると期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----