

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591731

研究課題名(和文) 悪性腫瘍の抗癌剤抵抗性に及ぼす腫瘍内微小環境の関与の解析とその治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of the effects of tumor microenvironment on the susceptibility of malignant tumors to anticancer drugs – its therapeutic application

研究代表者

竹永 啓三 (TAKENAGA KEIZO)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：80260256

研究成果の概要(和文)：悪性脳腫瘍及び転移性脳腫瘍の抗癌剤抵抗性に及ぼす腫瘍内微小環境(アストロサイトとの相互作用、低酸素)の関与を検討するために、ラット脳アストロサイトとラット及びヒトグリオーマ細胞並びにヒト乳がん細胞の共培養系を用い、種々の抗癌剤の細胞増殖抑制作用を単独培養の場合と比較した。その結果、常酸素下及び低酸素下での共培養系において、グリオーマ細胞や乳がん細胞に対する抗癌剤 temozolomide (TMZ) の増殖抑制効果が、細胞接着や炎症性サイトカイン非依存性に減弱することが判った。また、アストロサイト自身による TMZ の不活化がその主要原因になっていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To examine whether tumor microenvironment (e.g., astrocytes and hypoxia) influence the susceptibility of glioblastoma and metastatic brain tumors to anticancer drugs, we tested cytotoxic activity of various anticancer agents against rat and human glioma cells and human mammary carcinoma cells in cocultures with rat astrocytes under normoxic and hypoxic conditions. The results showed that temozolomide (TMZ) becomes less effective against glioma cells and metastatic brain tumor cells in the presence of astrocytes, which depends not on cellular interactions or soluble factors such as inflammatory cytokines but primarily on the ability of astrocytes to reduce the efficacy of TMZ.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
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：脳腫瘍、薬剤抵抗性、微小環境、アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫(グリオーマ)の治療は、手術を主体とし放射線治療と化学療法を補助療法とするが、それによる患者生存期間はこの数十年間ほとんど変わらず、今なおもっとも治療困難な腫瘍と位置づけられている。転

移性脳腫瘍(体の他の場所にできた悪性腫瘍が脳に転移したもの)の場合も5年生存率は低く、これら悪性脳腫瘍の効果的な治療の開発が今後の課題となっている。

悪性脳腫瘍に対して化学療法が効きにくい理由の一つとして、脳血管関門(血液と脳

の間にある関所みたいなもので、血液中の物質を簡単には脳に通さないしくみになっている)の存在が示唆されていたが、悪性脳腫瘍中では、周辺の正常脳組織と比較して、血管密度は低いものの、血管は拡張しており、分裂中の内皮細胞(血管の内表面を構成する細胞)も多く、leakyであることが示されている。このことから、抗癌剤は脳腫瘍組織中に拡散するにも拘らず、悪性脳腫瘍細胞はなんらかの原因で抗癌剤に対して抵抗性を示すことが推察されている。この原因の解明につながる実験的証拠は未だ論文として報告されていないが、悪性脳腫瘍中の微小環境が主要因となる可能性がある。

悪性脳腫瘍の微小環境を考えた場合、腫瘍細胞を囲むアストロサイト(星状膠細胞ともいう。中枢神経系に存在するグリア細胞の1つ)との相互作用や腫瘍内で必ず生じる低酸素環境が大切であろうことは想像に難くない。我々はこれまでに、ラット悪性グリオーマ C6 細胞を単層培養したラット白質アストロサイト上で培養する共培養系で、C6 細胞の細胞形態や運動能がアストロサイトにおけるカルシウム結合蛋白質 S100A4 遺伝子の発現状況により顕著に影響されることを見出し、アストロサイトとの細胞接触が C6 細胞の性状を変化させることを報告して来た。また、この共培養系で C6 細胞の薬剤感受性が変わることを予備的に見出している。さらに、転移性ヒト肺癌細胞を低酸素(1-2%酸素濃度)下で培養すると、細胞増殖は常酸素下とほぼ同様であるにも拘らず、低酸素誘導性転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF)依存性に幹細胞関連遺伝子である CD133、Oct-4 や Musashi-1 遺伝子を発現するようになると共に転移能が亢進すること、ある種の抗癌剤に対して抵抗性になること、HIF 阻害効果を示す日本独自に開発された低分子化合物 TX-402 がこれらの変化を抑制することを報告して来た。我々はこれらの研究成果を踏まえ、悪性脳腫瘍の微小環境のうちでアストロサイトとの相互作用と腫瘍内低酸素環境に焦点を絞り、これら微小環境の複合的な作用による遺伝子発現の変化が抗癌剤感受性の変化を惹起すると考え、本研究を遂行した。

2. 研究の目的

本研究では、

- (1) C6 グリオーマ細胞、ヒトグリオブラストーマ U87MG 細胞及びヒト乳がん MDA-MB-231 細胞の単独培養系並びにラットアストロサイトとの共培養系でのこれら腫瘍細胞の抗癌剤感受性の変化
- (2) 上記共培養系の低酸素環境下における腫瘍細胞の抗癌剤感受性の変化
- (3) 上記抗癌剤感受性の変化におけるイン

テグリン(細胞表面に存在するタンパク質で細胞接着分子のひとつ)、gap junction intercellular communication (GJIC)(隣接する細胞間のギャップ結合を介した情報連絡)の関与及び各阻害剤の効果

(4) 上記抗癌剤感受性の変化における細胞内シグナル伝達経路

(5) 抗癌剤と上記阻害剤のいずれかとの併用による殺細胞効果と抗腫瘍効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 用いた細胞株

ラット C6 グリオーマ細胞、ヒトグリオブラストーマ U87MG 細胞、ヒト乳がん MDA-MB-231 細胞及びマウス線維芽細胞 NIH3T3 を用いた。

(2) 共培養系の確立

①アストロサイトの分離

ラット脳からアストロサイトを従来の方法に従って分離した。これを10日以上培養することでアストロサイトを増殖させた。アストロサイトは glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体を用いて免疫蛍光染色することにより確認した。

②Enhanced green fluorescence protein

(EGFP) 発現腫瘍細胞の樹立

EGFP(高感度緑色蛍光タンパク質)を恒常的に発現する C6、U87MG、MDA-MB-231 細胞に pCI-neo/E9/EGFP プラスミドを遺伝子導入したのち G418 で選別し、各々の EGFP 発現細胞を樹立した。

③共培養

マルチウェル培養皿中で単層培養したアストロサイト上に EGFP 発現腫瘍細胞を、細胞数比 4:1 (C6 細胞の場合)あるいは 8:1 (U87MG 及び MDA-MB-231 細胞の場合)になるように播き1日間培養した。

(3) 単独培養及び共培養系における抗癌剤感受性の検討

EGFP 発現腫瘍細胞の単独培養系あるいはアストロサイトとの共培養系に、temozolomide (TMZ) (80 μ g/ml)、nimustine (ACNU) (50 μ g/ml)、carmustine (BCNU) (40 μ g/ml)、etoposide (VP-16) (1.2 μ g/ml)、vincristine (VCR) (0.04 μ g/ml)、paclitaxel (PTX) (0.04 μ g/ml)及び cisplatin (CDDP) (10 μ g/ml)を添加した。C6 細胞の場合には2日後、U87MG 及び MDA-MB-231 細胞の場合には4日後に全ての細胞を剥離し、蛍光顕微鏡下で血球計算板を用いて EGFP 陽性細胞数を計測した。細胞生存率は、未処理細胞を100%として表した。

(4) インサートカルチャー

Falcon Cell Culture Insert (1.0 μ m pore size)を用いて行った。インサート中に腫瘍細胞を入れ培養した。

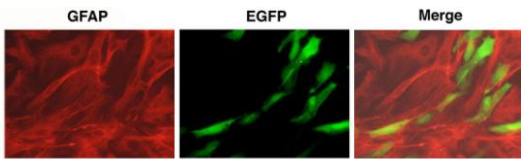
(5) アポトーシスの検出

C6 細胞を Annexin V-PE Apoptosis Detection kit を用いて Annexin V を標識し、フローサイトメーターで EGFP 陽性細胞中における Annexin V 陽性細胞の比率を測定した。

4. 研究成果

ラット脳アストロサイトの分離と EGFP 発現ラット C6 グリオーマ細胞、ヒトグリオブラストーマ U837-MG 細胞及びヒト乳がん MDA-MB-231 細胞の樹立を行い、共培養系を確立した。分離したアストロサイトは GFAP 陽性であることが確認された。

図 1 単離したアストロサイトと EGFP 発現 C6 細胞との共培養



(左) アストロサイトの GFAP 染色 (中) EGFP 発現 C6 細胞 (右) 共培養

この共培養系を用い、C6 細胞に対する抗癌剤 temozolomide (TMZ), ACNU, BCNU, VP-16, VCR, PTX 及び CDDP の殺細胞効果を単独培養の場合と比較した (表 1)。

表 1 C6 細胞の単独培養とアストロサイトとの共培養系における各種抗癌剤に対する感受性の変化

抗癌剤	濃度 (μ g/ml)	細胞生存率 (%コントロール \pm SD)	
		単独培養	共培養
TMZ	80	9.3 \pm 3.9	42.1 \pm 9.5*
ACNU	50	11.5 \pm 2.5	8.0 \pm 2.8
BCNU	40	9.1 \pm 2.0	12.8 \pm 2.9
VP-16	1.2	10.4 \pm 5.5	10.1 \pm 0.8
VCR	0.04	10.9 \pm 1.7	20.0 \pm 2.7
PTX	0.04	17.6 \pm 5.4	37.1 \pm 6.5**
CDDP	10	10.6 \pm 2.7	11.7 \pm 2.4

*P<0.005, **P<0.02

その結果、共培養系において、C6 細胞に対する TMZ と PTX の効果が有意に減弱することが判った。C6 細胞に TMZ を作用させると Annexin V 陽性細胞の割合が増加し、アポトーシスが誘導された。しかし、共培養系ではこの割合が減少し、TMZ の効果の減弱が確認された。他の抗癌剤の効果はほぼ同じであった。共培養系における TMZ の効果の減弱は低酸素下 (1%酸素濃度) でも認められた。また、U87MG あるいは MDA-MB-231 細胞とアストロサイトの共培養系においても TMZ の効果の減弱

が観察された。

脳腫瘍に対しては TMZ が多く場合において使用される現状を踏まえ、以下の実験は TMZ に焦点を絞って行った。まず、共培養系における TMZ の効果の減弱にアストロサイトと C6 細胞の直接的な細胞間接着が必要かどうかを検討するために、GJIC 阻害剤 alpha-glycyrrhetic acid 及び carbenoxolone とインテグリン阻害剤 echistatin の効果を調べた。その結果、これらの薬剤は C6 細胞の TMZ 感受性に何らの作用も示さないことが判った。一方、トランスウェルチャンバーを用い、両者を隔てて培養する実験系 (インサートカルチャー) で検討したところ、TMZ の細胞増殖抑制作用の減弱が認められた。これらの結果から、共培養系では、インテグリンを介した細胞外マトリックスとの接着やギャップ結合非依存性に TMZ の効果が減弱していることが判った。次に、この現象がアストロサイトに特徴的なものであるかどうかを調べるために、マウス線維芽細胞 NIH3T3 と C6 細胞との共培養系における TMZ の効果を調べたところ、TMZ の効果減弱はアストロサイトとの共培養と比較して軽微であることが判った。従って、アストロサイトに比較的特徴的な現象であることが示唆された。

アストロサイトは刺激を受けると様々な炎症性サイトカインを含めた可溶性因子を産生することが知られており、これらの因子が C6 細胞に作用して TMZ 抵抗性を増強させる可能性が考えられた。そこでまず、サイトカインである interleukin-1beta (IL-1beta) 及び tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)、transforming growth factor-beta (TGF-beta) と一酸化窒素の産生を阻害する L-NAME の影響を検討した。C6 細胞に種々の濃度 (0.1~10ng/ml) のサイトカイン存在下で TMZ を作用させ、TMZ 感受性を調べたところ、これらのサイトカインは全く影響を及ぼさないことが判った。また、L-NAME にも効果が認められなかった。さらに、C6 細胞で刺激したアストロサイトの conditioned medium も C6 細胞の TMZ 感受性に影響を与えないことが明らかになった。これらの結果から、アストロサイトが産生する可溶性因子の関与は否定された。

次に、アストロサイト自身が TMZ を不活化する可能性を考え、TMZ をアストロサイトとインキュベートした CM を経時的に採取し、C6 細胞にこの CM を作用させ、細胞増殖抑制活性を調べた。その結果、TMZ の殺細胞活性はアストロサイトとの培養開始 24 時間後までにはほぼ失活することが判明した (表 2)。TMZ を NIH3T3 細胞とインキュベートしてもこのような現象は軽微であった。このことから、アストロサイト自身が TMZ を不活化することが示唆された。

表2 アストロサイトによる TMZ の殺細胞効果の減弱

インキュベーション時間(h)	細胞生存率 (%コントロール±SD)
0	17.0±3.1
24	82.6±9.1
48	89.6±5.9

アストロサイトに TMZ (80 μg/ml)を加え 0～48 時間インキュベーションした培養上清を C6 細胞に作用させ、48 時間後に生存率を計測した。

本研究から、アストロサイトが TMZ の細胞増殖抑制活性を減弱することが判明した。この作用は、細胞接着や分泌因子に依存するのではなく、アストロサイト自身が TMZ を迅速に不活化することに依ることが示唆された。このようなアストロサイトの作用は今までに報告されておらず、脳腫瘍に対する TMZ の治療効果を考える上で重要な知見であると考えられる。今後、アストロサイトにおける TMZ の不活化を選択的に抑制する方法を見出すことにより、TMZ のグリオーマや転移性脳腫瘍に対する増殖抑制効果をより増強することができる可能性が考えられる。

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 Takenaga K. Angiogenic signaling aberrantly induced by tumor hypoxia. Front Biosci., 16, 31-48, 2011.

[学会発表] (計 1 件)

① Takenaga K, Akimoto M, Honma Y. Decrease in chemosensitivity to temozolomide in glioma cells co-cultured with astrocytes. 第 69 回日本癌学会総会、2010 年 9 月 24 日、大阪.

[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

竹永 啓三 (TAKENAGA KEIZO)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号 : 80260256

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :