

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592118

研究課題名(和文) グリオーマの浸潤機構の解明とその阻害方法

研究課題名(英文) Mechanism of glioma invasion and its inhibition

研究代表者

北井 隆平 (Kitai, Ryuhei)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：80251990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：A172、U87、T98G細胞株、患者摘出初代培養細胞などのグリオーマ細胞株、それぞれの運動能力を連続ビデオ撮影にて定量化した。細胞の外的環境を低酸素、低pHで刺激すると、刺激された生存した細胞は運動能力が高まることが分かった。浸潤先端のサイトカインについては有意差を証明できなかった。脳腫瘍で臨床使用しているインターフェロンベータによりグリオーマの走化性の低下を証明することができた。グリオーマでの浸潤先端を可視化するために、5ALAを指標とした解析を行った。実験で浸潤細胞の密度と5ALAの蛍光強度が連続変数的に変わることを見出し、浸潤先端肉眼判定の指標を作成した。

研究成果の概要(英文)：The motility of cultured glioma cells were estimated by video monitor. The glioma cell line A172 was the most moving cells in other cells such as U87, T98G and primary glioma cell culture. The cells stimulated by low Oxygen chamber and low pH showed initial cell halt and following high motility. The inhibition of these motility was blocked by interferon beta. As for the detection of invasion front, recently 5ALA photodynamic diagnosis was introduced in glioma surgery. Using cultured cells, the fluorescent intensity and cell density were determined. The detection limit by the operator's naked eyes was reported.

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：Glioma Brain tumor Invasion Detection

1. 研究開始当初の背景

グリオーマは浸潤性であり完全摘出は不可能で局所残留腫瘍の再発により不幸な転機をとる。腫瘍浸潤を制御出来れば、局所の再発に対し再摘出術、放射線照射の工夫で患者予後は改善するはずである。テモゾロマイド、血管新生阻害、分子標的治療の現代治療において残された最大のグリオーマ研究課題は腫瘍浸潤の制御である。

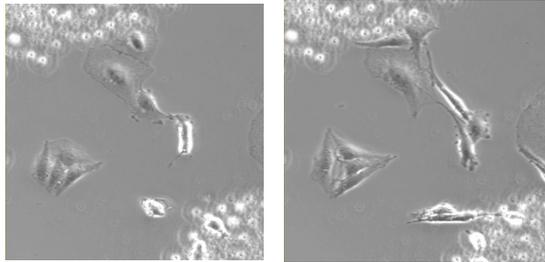
2. 研究の目的

グリオーマの浸潤機構を明らかにし、先端浸潤グリオーマ細胞の同定方法、浸潤阻害に注目した薬剤をスクリーニングすることで新しい視点からの治療方法を提案する。

3. 研究の方法

(1) 培養グリオーマ細胞を用いた細胞運動のビデオ観察とその定量化

T98G, A172, U87, 摘出初代培養膠芽腫細胞株を MEM+10%FBS 中にて培養した。対数増殖期の細胞をガラスチャンパー中に培養し、自動ビデオ撮影装置にて72時間の撮影を行った。100個以上の細胞の核の位置をコンピュータ上で測定し、細胞の平均移動距離とした。



(写真培養開始 12時間目と48時間目、特定の細胞に着目して移動距離を測定)

(2) 細胞外環境の変化による細胞の走化性変化、低酸素による刺激、低pHによる刺激

低酸素チャンパーを用いた細胞への低酸素負荷を行う。酸素モニターの上、30分間の低酸素を負荷し、細胞の生存率をLDH assayで測定、細胞のmotilityを上記1の手法で測定した。(写真:低酸素チャンパーとそこにある酸素計、ならびにタイマー)

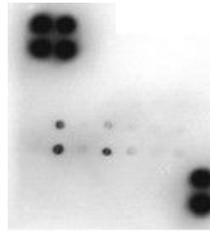


低pH負荷は25mMのNaHCO₃と25mMのHEPESのそれぞれのバッファーを入れた培養液を混合し、pH6.8、7.0、7.2の環境を作成し、細胞へ負荷した。

(3) 臨床例におけるグリオブラストーマ腫

瘍中心部分のサイトカイン、ケモカイン濃度と周辺浸潤部分での測定

手術で摘出する際に腫瘍中心部ならびに周辺部分を分けて採取、凍結した。組織をビーズによるホモジェネーを行い、タンパク採取、その組織中サイトカインをタンパクアレイにて検討した。



(写真:サイトカインアレイ)

(4) 薬剤スクリーニングによる腫瘍細胞走化性低下の検討

グリオーマの臨床で使用されているテモゾロマイド、ACNU、シスプラチン、エトポシド、インターフェロンベータ、イーケプラなど臨床使用可能な薬剤を培養液中に添加、走化性をビデオで観察した。

(5) 浸潤先端の同定法 5ALAによる蛍光強度と細胞密度の検討

T98G, U87, U251, C6 グリオーマ細胞、SW 胃癌、HCT 大腸癌細胞株を使用した。培養液中に5-ALAを0.03%の濃度で添加し、4時間後1%Agarで固定した。腫瘍標本に青色レーザー光を照射し、励起光を肉眼で観察し、spectrophotometerで測定した。

(6) 浸潤先端臨床症例の検討

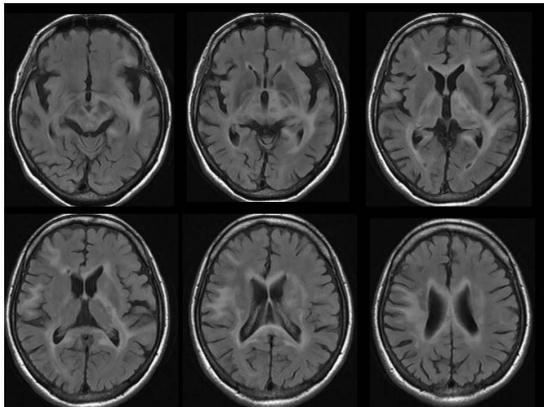
福井大学先進医療承認のもと患者に5-ALAを服用、脳腫瘍摘出時に蛍光の確認と青色レーザー光励起による蛍光スペクトラムを測定した。protoporphyrin IXの組織内濃度を定量した。

4. 研究成果

A172細胞株の運動能力がU87、およびT98Gに比較して高いことを見出した。細胞に外的環境を変化させ、運動能力、浸潤能力を検討した。低酸素チャンパーにて1%酸素分圧、30分間の低酸素条件にしたところ、一旦細胞は停止するが、生存した細胞は運動能力が高まることが分かった。インターフェロンによる細胞運動への影響を3日間ビデオ観察下培養で見たところ、コントロールでは細胞一個当たりの移動距離は835.1+-260.4μmが、インターフェロン2000U/mlを添加では467.7+-183.5 インターフェロン8000U/mlでは631.3+-177.0と低下した。インターフェロンの多面的作用としてグリオーマの走化性の低下を証明することができた。なお、インターフェロン2000U/mlは細胞死や細胞回転に影響を与えない濃度である。Wound healing modelによる検討でも同様でインタ

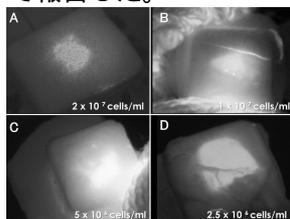
ーフェロンベータ添加で走化性の低下が証明された。

臨床症例で腫瘍中心部分のサイトカイン、ケモカイン濃度と周辺浸潤部分での測定を行ったが、症例数が少なく有意な差のあるケモカインは同定することができなかった。この過程で、非常に浸潤能が亢進していると考えられている gliomatosis cerebri と思われた症例が、本研究の精細な検討により中枢神経原発悪性リンパ腫であることが分かり、lymphomatosis cerebri として論文報告した。さらに悪性リンパ腫におけるサイトカイン sIL-2receptor による診断意義とその産生細胞が明らかになり、論文発表した。



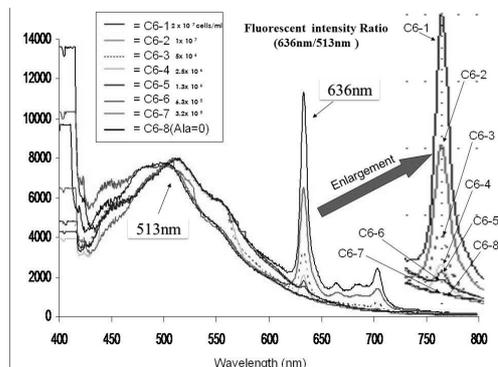
(写真：Lymphomatosis cerebri の浸潤部位) 浸潤の著しいグリオーマ細胞でも同様の手法で研究されるといって有意義であった。

臨床標本で臨床例では浸潤先端を可視化するために、5 ALA を指標とした浸潤先端組織ならびに大切片の腫瘍バンクを作製した。実験で浸潤細胞の密度により 5 ALA の蛍光強度が連続変数的に変わることを見出し、浸潤先端の定量化を行い臨床症例と合わせて学会で報告した。



その結果は、肉眼では見えない蛍光強度であっても波長 632/508nm 比で 0.65 を超えると

(写真：細胞密度と蛍光) 肉眼で蛍光陽性と判断されるが、その浸潤細胞密度は 1×10^7 cell/ml 程度存在することを証明した。



5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 11 件)

1) Tumor cell density required for macroscopic observation of 5-ALA-induced fluorescence of protoporphyrin-IX: Measurement in cultured glioma cells and clinical cases. Kitai R, Takeuchi H, N Miyoshi, et al, No Shinkei Geka. 2014 in press. Japanese. (査読有)

2) A Large Intramedullary Neurofibroma in the Thoracic Spinal Cord: Case Report. Arishima H, Kitai R, Kodera T, Yamada S, Kikuta KI. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2014 (査読有)

3) Frontal meningioma incidentally detected in the routine preoperative assessment of tongue cancer: a case report and literature review. Sano K, Kitai R, Yoshimura H, Ohba S. *J Oral Maxillofac Surg*. 2013 :2195.e1-6. (査読有)

4) Intraoperative computed tomography for cervicomedullary decompression of foramen magnum stenosis in achondroplasia: two case reports. Arishima H, Tsunetoshi K, Kodera T, Kitai R, Takeuchi H, Kikuta K. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2013;53:902-6. (査読有)

5) The adaptation of a neuroendoscopic sheath to a Leksell stereotactic frame to make it suitable for approaching small ventricles: a technical note. Kitai R, Nakano K, Hashimoto N, Arishima H, Yamauchi T, Higashino Y, Takeuchi H, Kikuta K. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg*. 2014 75:151-4. (査読有)

6) Coincident choroid plexus carcinoma and adrenocortical tumor in an infant. Yoshida K, Sato K, Kitai R, Hashimoto N, Kubota T, Kikuta K. *Brain Tumor Pathol*. 2013 Apr;30(2):104-8. (査読有)

7) Clinicopathological features in the recurrence of oligodendroglioma and diffuse astrocytoma. Takeuchi H, Hosoda T, Kitai R, Kodera T, Arishima H, Tsunetoshi K, Neishi H, Yamauchi T, Sato K, Imamura Y, Itoh H, Kubota T, Kikuta K. *Brain Tumor Pathol*. 2012 3:140-7. (査読有)

8) Glioblastoma with oligodendroglial components: glioblastoma or anaplastic oligodendroglial tumors. Takeuchi H,

Hosoda T, Kitai R, Kodera T, Arishima H, Tsunetoshi K, Neishi H, Yamauchi T, Sato K, Imamura Y, Itoh H, Kubota T, Kikuta K. Brain Tumor Pathol. 2012 (3):154-9. (査読有)

9) Measurement and cellular sources of the soluble interleukin-2 receptor in primary central nervous system lymphoma.

Kitai R, Sasaki H, Matsuda K, Tsunetoshi K, Yamauchi T, Neishi H, Matsumura K, Tsunoda A, Takeuchi H, Sato K, Kikuta K. Brain Tumor Pathol. 2013 (1):34-9. (査読有)

10)Lymphomatosis cerebri: clinical characteristics, neuroimaging, and pathological findings. Kitai R, Hashimoto N, Yamate K, Ikawa M, Yoneda M, Nakajima T, Arishima H, Takeuchi H, Sato K, Kikuta K. Brain Tumor Pathol. 2012 (1):47-53. (査読有)

11) Usefulness of intraoperative computed tomography in surgery for low-grade gliomas: a comparative study between two series without and with intraoperative computed tomography. Hosoda T, Takeuchi H, Hashimoto N, Kitai R, Arishima H, Kodera T, Higashino Y, Sato K, Kikuta K. Neuro Med Chir (Tokyo). 2011;51(7):490-5. (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

1) High Grade Glioma 術中 5 ALA 蛍光診断における限界 蛍光強度の定量化 細胞培養と臨床検体の対比 北井隆平 他 日本脳神経外科学会総会(大阪) 2012年10月18日

2) 病理組織からみた膠芽腫の浸潤境界および再発 G B Mにおける 5 A L A 蛍光手術の限界 脳腫瘍病理学会(名古屋) 2012年5月25日 北井隆平 他

〔図書〕(計 1 件)

病気の分子形態学 Central neurocytoma 学際企画 2011年 神経の疾患 central neurocytoma pp163-165

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-fukui.ac.jp/NOUGE/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北井隆平 (KITAI, Ryuhei)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：80251990