

論 文 要 旨

Establishment of a tumor sphere cell line from a metastatic brain neuroendocrine tumor

(神経内分泌腫瘍の転移脳組織からのがん幹細胞様細胞株樹立)

関西医科大学脳神経外科学講座
(指導：浅井 昭雄 教授)

岩田 亮一

【背景】

神経内分泌腫瘍は、全身に分布する神経内分泌細胞から発生する稀な腫瘍で、神経内分泌マーカーとされるシナプトフィジンやクロモグラニンを発現する。増殖能の高い神経内分泌癌に対しては、化学療法が可能であるが、脳血液関門が存在する脳転移巣に対しては奏功しないことが多い。一方で、がんの治療抵抗性の原因として、がん幹細胞の存在が提唱されている。がん幹細胞を研究対象とすることで、新たな治療法開発への貢献が期待されるものの、これまでに、原発不明神経内分泌癌の脳転移巣から、がん幹細胞を単離した報告はない。テモゾロミドは、進行性神経内分泌癌に対しての有効性が報告されていて、脳血液関門通過性であるために脳転移巣に対してもその有効性が期待される。そこで、本研究では、神経内分泌腫瘍の脳転移巣から、がん幹細胞様株を樹立し、テモゾロミドの治療効果を検証した。

【方法】

倫理規定に則って、外科的に切除し原発不明神経内分泌癌の脳転移腫瘍組織をメスで細切し、EGF と bFGF を添加した無血清培地で浮遊培養することにより、神経内分泌がん幹細胞様株(ANI-27S)を樹立した。ANI-27S における幹細胞マーカーの発現は、フローサイトメトリーおよび免疫組織化学法により解析した。またヌードマウス脳に ANI-27S を移植し、形成させた腫瘍組織に神経内分泌マーカーが認められることを免疫組織化学法にて確認した。さらに、ANI-27S に対するテモゾロミドの殺細胞効果を細胞生存率測定およびアポトーシスアッセイを用いて、検討した。

【結果】

樹立した ANI-27S は、培地中で sphere を形成し、長期間の継代培養が可能であった。ANI-27S は通常の培養条件下で、幹細胞マーカーである CD133、Nestin、Sox-2、ALDH 活性の発現を認めたが、培地にウシ胎児血清を加えたところ、Nestin および Sox-2 の発現が低下し分化誘導されたと考えられた。さらに、ANI-27S を、ヌードマウス脳に移植すると多発性に脳腫瘍が形成され、患者の腫瘍組織と同様に、シナプトフィジンやクロモグラニンの発現がみられた。次に、ANI-27S におけるテモゾロミドの効果を検討した結果、100 μ M テモゾロミド投与により、約 20%の細胞殺傷効果が見られた。グリオーマに対するテモゾロミドの治療効果は、DNA 修復酵素である MGMT 遺伝子の発現が抑制されているときに奏功することが知られている。そこで、MGMT プロモーター領域のメチル化について調べた結果、70.3 \pm 5.1%の高メチル化が見られた。

【考察】

樹立した ANI-27S は、自己複製能及び分化能を有すること、幹細胞マーカー

一を発現すること、マウスに投与すると患者に類似した病理学的所見を示す腫瘍を形成したことなどから、神経内分泌癌由来のがん幹細胞様細胞株であることが示された。テモゾロミドは、ANI-27S に対して、殺細胞効果を示したことから、難治性癌である神経内分泌癌の転移性脳腫瘍に対して、治療の選択肢となる可能性を提示できた。さらに、ANI-27S では、MGMT プロモーター領域が高メチル化していることが、殺細胞効果に重要であることが推察された。