

氏名(本籍)	あきもとけいこ 秋本恵子(神奈川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第6585号
学位授与年月日	平成25年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	グリオブラストーマ細胞の増殖に対するヒト間葉系幹細胞の作用機構解明

主査	筑波大学教授	医学博士	野口雅之
副査	筑波大学准教授	医学博士	杉山文博
副査	筑波大学准教授	医学博士	鶴嶋英夫
副査	筑波大学講師	博士(医学)	佐藤藤夫

論文の内容の要旨

(目的)

難治性の悪性脳腫瘍であるグリオブラストーマ (GBM) は未分化性が高く、臨床的にも最も悪性度の高い腫瘍である。現在の GBM の治療法として、摘出手術や放射線療法、化学療法による集学的療法が行われているが、5年生存率が低く新規治療法の開発が望まれている。

近年、GBM に対する新規治療法の1つの手段として間葉系幹細胞 (MSC) を用いた細胞治療が考案されている。MSC は腫瘍へ特異的に遊走能をもつほか、MSC 自身が抗腫瘍効果を発揮することから、GBM 周囲に投与することで、MSC が GBM 細胞の増殖を抑制し治療に繋がることが期待されている。

本研究では、臨床応用に向けた点を考慮し、より生体内に近いモデルを確立するため、生体内の性質を維持していると考えられるヒト GBM 初代培養細胞を樹立した後、ヒト MSC による GBM の増殖制御機構における詳細なメカニズムの解明を行う。

(対象と方法)

①患者由来 GBM からの初代培養

手術の際にインフォームドコンセントにて同意が得られた症例より、患者由来ヒト GBM 組織から初代培養を行い、初代培養細胞を得た。

②組織別由来 (臍帯血・脂肪) MSC を用いた GBM の増殖制御機構の解析

臍帯血 (UCB) および脂肪 (AT) 由来の MSC を用いて、GBM 細胞に対する *in vitro* および *in vivo* にて増殖作用効果を比較検討した。

③組織別 MSC における GBM 増殖制御作用因子の探索

各 MSC における GBM 増殖制御因子に関する遺伝子発現を q-PCR 法と ELISA 法にて検討した。

④ CXCL12/CXCR7 における GBM 増殖への影響

MSC において発現に差が認められた CXCL12 およびそのレセプターである CXCR7 による影響を検討するため、リコンビナント因子および shRNA を用いて、GBM に対する増殖制御効果を *in vitro* および *in vivo* にて検討した。

(結果)

患者由来 GBM 組織から GBM の性質を維持している初代培養細胞を用いて、In vitro および in vivo 実験にて MSC における GBM の増殖作用を検討した。

UCB-MSC との共培養において、GBM 細胞は増殖を抑制し、さらに Annexin-5 アッセイおよび TUNEL 染色検討により、細胞がアポトーシスしていることが確認された。一方で AT-MSC との共培養群においては、GBM 細胞が増殖促進した。

MSC 間における遺伝子発現解析により、AT-MSC は UCB-MSC と比較して CXCL12 をはじめとする増殖因子が高いことが示された。その中でも、癌転移やアポトーシスに重要な役割を果たす CXCL12/CXCR7 軸に着目した。CXCL12 を UCB-MSC との共培養群に添加すると、GBM 細胞の増殖がコントロールと同程度まで回復した。さらに shRNA を用いて GBM 側の CXCR7 ノックダウン細胞を作製し、AT-MSC と共培養することで GBM 細胞の増殖抑制およびアポトーシスが増加した。

MSC 間におけるアポトーシス関連因子を検討したところ、TRAIL 発現が UCB-MSC で高いことが示された。しかし培養上清中における分泌タンパク量では得られなかった。そこで TRAIL が増殖抑制作用に影響を及ぼすか、また CXCL12 がそのシグナルを抑制するのか検討を行うため、TRAIL を添加し GBM の増殖作用を検討した結果、GBM 増殖抑制作用が示された。しかし、CXCL12 添加により TRAIL シグナルの経路を阻害し、GBM の増殖抑制作用を阻害したことが明らかになった。

(考察)

本研究で UCB-MSC では GBM に対する増殖抑制効果が得られたが、AT-MSC については発揮されず増殖促進に作用するという、MSC の由来によって GBM に対する増殖抑制効果が異なることが示された。

この要因の1つとして、AT-MSC が過剰発現している CXCL12 が挙げられる。CXCL12 は腫瘍血管新生を誘発し、腫瘍増大へ導く因子の1つである。近年ではレセプターである CXCR7 と結合することでアポトーシス阻害に寄与していると報告されている。実際に、UCB-MSC との共培養群に CXCL12 を添加すると、GBM のアポトーシス率が減少し、GBM shCXCR7 と AT-MSC との共培養により GBM の増殖抑制およびアポトーシス亢進が確認された。以上より、GBM 増殖作用に CXCL12/CXCR7 軸は重要な因子であり、AT-MSC による GBM の増殖促進は CXCL12/CXCR7 を介したアポトーシス阻害、さらに AT-MSC から分泌している増殖因子により GBM の増殖促進に作用したことが示唆された。

一方、UCB-MSC による GBM の増殖抑制はアポトーシスが一因であった。その中でも UCB-MSC は TRAIL 発現が上昇しており、両者が接着することにより GBM の細胞生存に関与することが示された。以上の結果から、TRAIL-TRAILR 経路を介した GBM へのアポトーシスを誘導により増殖抑制に作用したことが示唆された。

審査の結果の要旨

臍帯血由来のヒト間葉系幹細胞 (MSC) はグリオブラストーマ (GBM) に対し、両者が近傍に存在することで TRAIL シグナルを介したアポトーシスが一因となって増殖抑制効果を示した。一方、脂肪由来の MSC は CXCL12/CXCR7 によるアポトーシス阻害および多数の増殖因子が起因となり増殖促進効果を示した。本研究は MSC の組織由来によって性質が異なるため、GBM に対する増殖作用が異なることを明らかにした。今後の幹細胞を用いた悪性腫瘍治療に寄与する結果である。

平成 25 年 1 月 16 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。