

【要約】

Refractory nature and influences on neural circuits in glioblastoma

pathophysiology

(膠芽腫の病態生理における 2 つの側面：難治性と神経回路への影響)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：樋口 佳則 教授)

吉岡 正揮

【背景】

膠芽腫は高悪性度の原発性脳腫瘍であり、その病態生理を理解するには、内因性の治療抵抗性と腫瘍が脳環境に及ぼす影響の2つを明らかにする必要がある。膠芽腫の標準治療薬であるテモゾロミドはDNAを損傷させて腫瘍細胞にアポトーシスを誘導する。しかし、DNA修復酵素であるO⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ (MGMT) は、テモゾロミドによるDNA損傷をもとに戻し、テモゾロミドの薬効を減弱させる。MGMTプロモーターの非メチル化はMGMTの発現を高め、治療抵抗性につながるため、重要な予後予測因子であることが知られている。これまで、テモゾロミドに対する抵抗性は、手術で切除した腫瘍でのMGMTプロモーターのメチル化に基づいて評価されてきた。しかし、腫瘍再発に大きな役割を果たす膠芽腫幹細胞において、MGMTプロモーターのメチル化が外科的摘出検体と比較してどのように変化しているかは結論が出ていない。本研究では、治療抵抗性を引き起こす内在性因子として、膠芽腫幹細胞におけるMGMTプロモーターのメチル化を評価した。さらに、膠芽腫の浸潤による神経細胞間の接続性の障害は、認知機能障害や精神症状を引き起こす。腫瘍の浸潤から神経回路を保護する治療法を開発するためには、生体脳内における神経接続性障害を評価する技術が必要となる。これまで、神経接続性の評価法として安静時の神経活動の同期性が用いられることが多かったが、機能的な接続を可視化しているわけではなく、間接的であることが課題であった。そこで我々は、2光子励起を利用した光照射により単一細胞の神経活動を制御できる2光子光遺伝学に注目した。2光子光遺伝学では、チャンネルロドプシンを発現した神経細胞を個別に刺激し、その際の周辺の神経応答を観察するため、神経接続性を直接的に評価できる。しかしながら、この手法による生体脳内での神経接続性障害の評価は実現していない。本研究では、2光子光遺伝学を用いた神経接続性障害の評価法の開発を目指した。

【方法1】

無血清培地を用いて、患者から外科的に切除した腫瘍検体から膠芽腫幹様細胞 (Glioblastoma stem-like cells; GSCs) を培養した。さらに、GSCを血清添加培地で培養することで、分化した膠芽腫幹様細胞 (differentiated glioblastoma stem-like cells;

dGSCs) を得た。メチル化特異的リアルタイム PCR 法により、これら 3 種類の腫瘍細胞 (摘出検体, GSC, dGSC) における MGMT プロモーターのメチル化を測定した。

【結果・考察 1】

GSC と dGSC は同一の腫瘍細胞の集団を起源としているため、腫瘍細胞間の DNA メチル化の不均一性による影響が少ないと考えられる。そこで、まず GSC と dGSC の MGMT プロモーターのメチル化を比較した結果、MGMT プロモーターのメチル化は腫瘍細胞の分化によって変化しないことが明らかとなった。この結果をもとに GSC と摘出検体の MGMT プロモーターのメチル化を比較すると、GSC における MGMT プロモーターのメチル化は摘出検体と類似していた。これらの結果は、膠芽腫幹細胞における MGMT プロモーターメチル化の状態は、非幹細胞を含む腫瘍細胞全体のメチル化の状態を反映することを示唆している。

【方法 2】

GCaMP6s (カルシウムインジケーターの 1 種) を発現させた遺伝子組換えマウスに対して、観察用の頭蓋窓を設置する手術を行った。この時、アデノ随伴ウイルスを用いて、チャンネルロドプシン CIV1 を導入した。2 光子励起を利用した単一の標的神経細胞の賦活化を行い、カルシウムイメージングにより神経活動を計測した。標的細胞と周辺細胞の神経活動の相関解析により接続性を評価した。神経接続性の変化を計測するために、片側の総頸動脈を結紮した慢性低灌流モデルマウスを作成した。

【結果・考察 2】

まず、安静時神経活動の同期性は 2 光子光遺伝学によって可視化される真の接続性を反映しているかを検証した。その結果、安静時同期性は自発的な神経活動の影響を受けるため、2 光子光遺伝学的手法は神経接続性をより正確に評価できることが明らかとなった。次に、この手法を用いて病態研究が比較的進んでいる低灌流モデルマウスにおける接続性障害を評価した。虚血 1~4 週後の接続性は虚血前より有意に低下していたが、非虚血群では有意な変化は認められなかった。さらに、慢性低灌流モデルにおける脳血

流減少は軽度であるため、安静時同期性では接続性障害を検出できなかった。2光子光遺伝学的手法は、脳疾患での神経接続性の障害を評価する上で、感度の高い技術である。膠芽腫モデルは腫瘍を移植させる点で複雑なモデルと言えるが、計測精度が実証されたこの技術は膠芽腫モデルでの神経接続性評価にも活用できる。

【結論】

摘出検体の解析から MGMT プロモーターが非メチル化と判断された患者では、テモゾロミド単独による化学療法は膠芽腫幹細胞に無効であるため、有効な治療ではないと考えられる。MGMT プロモーターの非メチル化症例における MGMT の阻害は、膠芽腫幹細胞に有効である可能性がある。また、腫瘍が神経回路に及ぼす影響の観点から膠芽腫病態を評価する上で2光子光遺伝学的手法は有用であり、神経回路の破壊を防ぐ治療法の開発にも役立つことが期待される。膠芽腫の腫瘍内外における病態生理への理解を深めるためには、本研究の更なる発展が望まれる。