

(豊田 啓介) 論文内容の要旨

主 論 文

Initial Contact of Glioblastoma Cells with Existing Normal Brain Endothelial Cells Strengthen the Barrier Function via Fibroblast Growth Factor 2 Secretion: A New In Vitro Blood-Brain Barrier Model.

新規血液脳関門 in vitro 再構成モデルにおいて、膠芽腫細胞が正常脳毛細血管内皮細胞に接触した初期反応として、膠芽腫細胞が分泌する Fibroblast Growth Factor 2 を介し正常脳毛細血管内皮細胞の血液脳関門機能は強化される。

豊田 啓介、田中 邦彦、中川 慎介、Dinh Ha Duy Thuy、氏福 健太、鎌田 健作、林 健太郎、松尾 孝之、永田 泉、丹羽 正美

Cellular and Molecular Neurobiology volume33, p489-501, 2013

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：永田 泉 教授)

※主任指導教員が不在の場合は、教室主任代理を記入すること。

緒 言

膠芽腫は最も悪性度の高い脳腫瘍の一つで、根治治療は確立されていない。膠芽腫は血管内腔への浸潤および全身転移は来さず、神経線維や正常脳毛細血管などの既存構造物に沿ったびまん性脳浸潤を特徴とする。組織学的には、臨床的に腫瘍範囲として同定される MRI T2 強調画像の高信号域を超えて、画像上正常脳所見を呈する部分にまで浸潤しているとされる。そのため外科的に腫瘍塊を摘出した後にも正常脳実質に浸潤している腫瘍細胞は残存するので、いずれ再発を来すと考えられる。従って放射線治療や化学療法といった残存腫瘍細胞に対する術後追加治療が再発予防には重要となる。一方で正常脳毛細血管には血液脳関門(Blood-Brain Barrier; BBB)という機能が存在する。この機能による著しい薬物脳内移行制限が脳腫瘍に対する治療を困難としている一つの原因である。膠芽腫は新生血管に富む腫瘍であり、腫瘍血管の BBB は破綻しているとされ、その破綻部位における薬剤移行性はあるとされる。しかし手術後にも残存する、正常脳毛細血管に沿って脳浸潤をしている膠芽腫細胞が正常脳毛細血管の BBB に与える影響や、同部位の薬剤移行性に関しては定かではない。我々はこの点が残存腫瘍の治療に重要であると考え、正常脳毛細血管に沿って浸潤する膠芽腫を見立てた新規血液脳関門 in vitro 再構成モデルを作成し、膠芽腫細胞が正常脳毛細血管の BBB に与える影響を検討した。

対象と方法

BBB を機能的に再現した、ラット由来の脳毛細血管内皮細胞 (RBEC)、pericyte、astrocyte を用いた二重腔構造の立体培養モデル (BBB モデル) は確立されている。経内皮電気抵抗 (TEER) の測定により BBB の主体である tight junction (TJ) 機能を客観的に評価できるため、BBB 関連疾患の病態解明や薬物脳内移行性の検討など *in vitro* での研究が可能となる。この BBB モデルは $0.4\ \mu\text{m}$ の小孔を持つインサート膜の上室を血管腔側と見立てて RBEC を、下室を脳実質側と見立てて pericyte および astrocyte を培養しており、上室に薬物等を投与することで、血管腔側からの物質が BBB に与える影響を評価できる。一方で膠芽腫細胞は脳毛細血管の基底膜側に沿って浸潤するため、我々は上室側のインサート膜に pericyte および astrocyte を、下室側のインサート膜に RBEC を培養した新規モデルを作成し、上室側から green fluorescent protein (GFP) を transfection したヒト由来膠芽腫 (LN-18) を投与することで BBB への影響を評価することとした。

結 果

正常脳毛細血管に沿って浸潤する膠芽腫を見立てた新規モデルの条件は、十分な BBB 機能を有することと、膠芽腫細胞が脳毛細血管内皮細胞の基底膜側に直接接触することである。そのためインサート膜は腫瘍細胞の通過を妨げない $8\ \mu\text{m}$ 小孔を使用した。このインサート膜を使用した RBEC 単層もしくは RBEC および pericyte と astrocyte を組み合わせた BBB モデルで十分な TEER 上昇を認めた。またこれらモデルの脳実質側に LN-18 を投与しても血管腔側への腫瘍浸潤は認めず、膠芽腫の特徴が再現されていた。この新規 RBEC 単層および BBB モデルの脳実質側に LN-18 を投与すると TEER 上昇を来した。間接接触モデルと見立てた $0.4\ \mu\text{m}$ 小孔の RBEC 単層モデルでは TEER は低下したことから、RBEC 基底膜側に直接膠芽腫細胞が接触した場合に限り BBB は強化されると判断し、RBEC 単層モデルと膠芽腫との関係を詳しく調べた。

上記結果が膠芽腫のみに特徴的かを調べるため、*in vivo* で脳転移能を有する非小細胞肺癌 (NCI-H1299) を用いて比較した。すると NCI-H1299 も同様に TEER 上昇を来したが、後に血管腔側に浸潤し TEER 低下をもたらした。LN-18 の BBB 強化は NCI-H1299 との共通因子が関与すると考え、LN-18 および NCI-H1299 とともに分泌する vascular endothelial growth factor (VEGF) と fibroblast growth factor 2 (FGF2) に着目した。RBEC 単層モデルにおいてヒト由来 VEGF は TEER 低下を来したが、ヒト由来 FGF2 は TJ 構成蛋白の occludin と ZO-1 の発現を増強し TEER 上昇を来すことが確認された。これら結果から腫瘍由来 FGF2 が BBB 強化に関与すると考え、抗 FGF2 抗体を LN-18 とともに RBEC 単層モデルの脳実質側に投与したところ、TEER 上昇の抑制が確認された。

考 察

膠芽腫は正常脳毛細血管内皮細胞の基底膜側に直接接触した場合に限り、FGF2 を介して BBB を強化することが確認された。この結果は、組織学的な膠芽腫浸潤最前線における MRI 所見は BBB 破綻を示唆する造影効果や脳浮腫など認めないといった実際の臨床所見と合致しており、浸潤最前線膠芽腫への薬剤移行性制限が示唆される。また腫瘍血管新生や腫瘍微小環境形成の最初期段階における FGF2 関与も推測される。膠芽腫と正常脳毛細血管の FGF2 を介した相互作用は、浸潤最前線における新たな病態解明や治療開発につながる可能性がある。

(備考) ※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。