

くらしま あきひこ

氏名	倉島昭彦
学位	博士(医学)
学位記番号	新大博(医)第1692号
学位授与の日付	平成17年12月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博士論文名	ラット悪性脳腫瘍における血管構築, 血管透過性 および糖輸送担体 (GLUT)
論文審査委員	主査 教授 田中隆一 副査 教授 高橋均 副査 教授 西澤正豊

博士論文の要旨

【序説】脳腫瘍が存続・増大するための第1のエネルギー源はブドウ糖である。Transformed cell や腫瘍細胞は糖利用率, すなわち糖代謝が亢進していることが知られている。腫瘍にブドウ糖を到達させる一番の推進力は血流であり, それを支える血管系はグリオーマでは悪性度が増すほど透過性の亢進した異常な新生血管が観察される。ブドウ糖は polar な分子であるため血管内皮や細胞の形質膜を透過するには, 形質膜に存在しブドウ糖と結合して脂肪層を横断させる糖輸送担体 (GLUT) が必要で, このうち GLUT 1, 3, 4 遺伝子の発現が glioblastoma multiforme では報告されているが, 腫瘍細胞自体には主に GLUT3 蛋白の高発現が確認されている。このようにブドウ糖をエネルギー源として腫瘍が増殖していくためには, 血管新生, 血管透過性の亢進, 血管壁・腫瘍細胞におけるブドウ糖膜輸送の亢進などの現象がお互い関連性をもって出現し, 遺伝子レベルでは GLUT が深く関わって糖代謝の亢進を支えている可能性が高いと考えられる。そこで我々はラット悪性脳腫瘍における血管構築や血管透過性と GLUT との関連について検討した。

【方法】ラットにおける悪性脳腫瘍モデルとして Watanabe らが Rous Sarcoma Virus (RSV) で Fischer 344/DuCrj ラットに誘発・株化した RSV 細胞株と 9L 細胞株 (以下 9L) を Fischer ラットの右大脳半球に定局的に注入接種して脳腫瘍モデルを作製した。Horseradish peroxidase (HRP) による tracer study と, 外因性 HRP と血管内皮細胞マーカーである von Willebrand 因子を2重免疫染色して, 血管の密度や形態と HRP 分布との関係を観察した。正常成熟ラット脳、腫瘍近接部脳 [Brain adjacent to tumor (BAT)], 移植脳腫瘍組織 [RSV 腫瘍, 9L 腫瘍] 培養腫瘍細胞 [RSV cells, 9L cells] で GLUT3 mRNA の発現の有無と発現量を Northern blotting で解析し, HRP 分布を調べた切片の隣接切片で in situ hybridization を行い GLUT3 mRNA の発現・分布を観察した。

【結果】RSV 腫瘍は, 腫瘍の辺縁から中心に向かって以下の3つの部分に分けられた。Peripheral zone: 異形成のつよい腫瘍細胞が高密度に存在する部分, intermediate zone: 細胞間隙が開き, 拡張した異常血管や腫瘍内出血が観察される部分, central zone: 大

半が壊死巣で、細胞の破壊や空洞化、その部分への macrophage や顆粒球の浸潤が目立つ部分。9L 腫瘍では、全体的に血管が豊富で、細胞の異形成は高度であるが壊死が少ない特徴があった。von Willebrand 因子染色による血管の形態・分布・密度の観察では、BAT には正常血管と正常よりわずかに径の大きく HRP の漏出する血管存在した。Peripheral zone は血管が乏しく、intermediate zone では血管密度が減少し、大きな径で異形成が強い腫瘍血管が観察された。この異形血管周囲の腫瘍細胞は拡大した細胞外腔をもち、血管から遠ざかるにつれ壊死部が存在した。HRP 漏出はほとんどがこの異形成の強い腫瘍血管からで、拡大した細胞外腔を充填するように漏出した HRP が遠心性に広がる現象が観察された。Central zone は壊死巣が主体で、顆粒球とマクロファージの浸潤が特徴的だった。9L 腫瘍では腫瘍の大小に関係なく異形成のつよい腫瘍血管が BAT から腫瘍中心部に至るほぼ全域に存在していて、血管周囲性に強い HRP の漏出と細胞外腔への拡がりをも認めた。Northern blotting では正常成熟ラット脳、腫瘍近接部脳、腫瘍組織と培養腫瘍細胞で 4.1kb の GLUT3 mRNA の発現を認めた。GLUT 3 mRNA の組織内分布は、正常脳では海馬、小脳、大脳皮質などにおいて発現が高く、アンモン角の CA1 から CA4、歯状回の神経細胞で特徴的な高い発現を認めた。特徴的な分布を示したのは RSV 腫瘍で、ほぼびまん性に腫瘍細胞で高い発現を示したが、特に壊死部に面する腫瘍細胞に顕著な高い発現が確認された。HRP 染色隣接切片で組織像を比較すると、HRP が漏出する intermediate zone の血管から離れて壊死部に移行する直前の腫瘍細胞に GLUT3 mRNA の高い発現が確認された。

【考察と結論】実験脳腫瘍の peripheral zone は、異形成が強い腫瘍細胞が高密度に存在するが血管に乏しいことから、BAT に存在する血管からエネルギーや酸素の直接供給がある部分と考えられた。Intermediate zone における新生血管は HRP の透過性が亢進していて、周囲の腫瘍細胞は拡大した細胞外腔をもち遠心性に HRP の充填像が見られたことから推測して、この細胞外腔を拡散していく浮腫液が中心部の腫瘍細胞の細胞維持や増殖のために必要なエネルギー供給の役割を担っているのではないかと考えられた。また、今回の実験で壊死部に面した腫瘍細胞に GLUT3 mRNA の高い発現を認めた。同系の継代細胞株で作製した RSV 腫瘍で、血流量の低下した異常な腫瘍血管の集簇の周囲に S 期細胞が多数存在し、その存在に一致して糖代謝の亢進があることを教室の Watanabe が報告しており、これは我々が観察した intermediate zone の腫瘍血管とその遠位の壊死部を囲むように GLUT3 mRNA の発現が亢進していた腫瘍細胞との関係に極めて類似している。以上よりこれら壊死に面した腫瘍細胞は低酸素/虚血/低血糖の条件が GLUT 遺伝子を誘導した可能性が高いと考えられた。さらに、これらの腫瘍細胞は厳しい条件から survive した強靱で viable な細胞である可能性も示唆された。今後は GLUT 3 のみならず他の GLUT isoform の蛋白や遺伝子発現をさらに詳細に分析することが必要と考えられた。

論文審査の要旨

申請者は、糖代謝の亢進が知られている悪性脳腫瘍における血管構築・密度、血管透過性および糖輸送担体遺伝子(GLUT)などの関連について検討した。【方法】RSV 腫瘍細胞および 9L 細胞移植ラット脳腫瘍モデルにおける血管構築・密度、および horseradish peroxidase 血管透過性を観察し、あわせて悪性脳腫瘍細胞との関連が指摘されている GLUT3 mRNA の

発現・分布を in site hybridization にて検索した。【結果と考察】腫瘍の peripheral zone では、異形成の強い腫瘍細胞が密に存在するが血管に乏しかった。腫瘍の intermediate zone では血管透過性の亢進が著しい異常血管の増生が顕著であり、腫瘍細胞は拡大した細胞外腔に囲まれていた。このことから、細胞外腔を埋める浮腫液が腫瘍細胞へのエネルギー供給の役割を担っている可能性が推測された。また、GLUT3 mRNA は腫瘍細胞とくに intermediate zone から central zone (壊死部) に移行する直前の腫瘍細胞に強い発現が認められ、GLUT3 発現に腫瘍細胞の低酸素・虚血などの条件が関与していることが推測された。

以上、本研究は悪性脳腫瘍における血管構築・密度、血管透過性および GLUT3 mRNA の発現が腫瘍部位によって著しく異なることを明らかにした点に学位論文としての価値を認める。