

いね なが ちか のり

氏 名 稲 永 親 憲
学 位 博 士 (医学)
学 位 記 番 号 新大院博(医)第1171号
学 位 授 与 の 日 付 平成16年 9月30日
学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名 培養グリオーマ細胞の移動動態の観察:血管内皮細胞
株との共培養下でみられたリアルタイム・ダイナミクス

論文審査委員 主査 教授 高 橋 均
副査 教授 田 中 隆 一
副査 教授 西 澤 正 豊

博士論文の要旨

グリオーマは、活発な遊走/浸潤能を有する悪性の脳腫瘍である。グリオーマ細胞が浸潤する際に示す基本動態を知ることは、今後、治療戦略を思考する上でも、極めて重要なポイントである。そこで、グリオーマ細胞(GC)の移動動態を明らかにし、その遊走が血管内皮細胞(EC)の存在によってどのような影響を受けるのかを知る目的で、両細胞株を共培養し、GCの動態をリアルタイムで長時間観察した。

まずGC株(ラットC6)にGFP-レトロウィルスを感染させ、蛍光シグナルを安定かつ強発現する細胞をクローニングした。レトロウィルスを用いる利点は、GFP遺伝子を組み込まれた細胞が分裂後もGFP遺伝子を伝えるため、ほぼ永続的に同じ強度の蛍光シグナルを発現する点にある。標識されたGCをEC株(ラット大脳由来)と共培養し、その動きをTime-lapse顕微鏡システムを用いてデジタルイメージとして2-5時間記録し、得られた動画による解析をおこなった。

最初に、EC単層培養上でのGCの動きを調べた。ECを単層培養し、その後GCを追加すると、定着後のGCは様々な形態を示し、多数の突起を持つものや紡錘形単極あるいは双極性のものが観察された。これらGCの移動には基本的に3種類のパターンが認められた。単一の先導突起を収縮することにより胞体を素早く移動させるパターン、先導突起の長さを変えずに胞体と突起が同期して移動するパターンと、突起は動かすものの核が殆ど動かないパターンである。これらの移動動態は、発生期終脳におけるグリア芽細胞が示すそれと類似していた。

また、EC上でのGCの動きの特徴を明らかにする目的で、異種細胞株であるラット線維芽細胞(NIH3T3)上でのGCの動きと比較したところ、2時間でのGCの平均移動距離はEC上で19.8 μm (n=627)、3T3上で32.8 μm (n=616)であり、有意差(P<0.001)をもってEC上の方が動きに乏しかった。さらに、ECと3T3の培地上清をGCを加える直前に交換して同様の実験をおこなったところ、ECと3T3上でのGCの動きに明らかな違いは認められず、両細胞株から放出された液性因子よりも、細胞膜におけるGCとECの親和性がこのようなGCの動きに関わっていると考えられた。

次に、ECが形成する毛細血管様のネットワーク上でのGCの動きを調べた。再構成基底膜であるmatrigelを薄くコーティングしたシャーレにECを播き、その後、GCの培養上

清のみを添加すると毛細血管様のネットワークが形成された。このことから、GC から出された何らかの液性因子が、EC の管腔形成の促進に関与している可能性が考えられた。ネットワーク形成状態で GC を加えると、それらは紡錘形を示しつつネットワークに沿って移動した。指向性は示さず、交差あるいは途中で逆行する場合もあった。またネットワーク上を著しく速く(56 $\mu\text{m}/\text{h}$)移動する細胞の存在が初めて観察された。先の実験で EC 上での平均移動速度が 9.9 $\mu\text{m}/\text{h}$ であったことをふまえると、ガイドとなる構造が存在することにより、移動速度が速くなる特異な GC が存在するものと考えられた。このように GC が脳内で浸潤する際の移動動態は一様ではなく、それらは、増生した EC が作る管腔に沿って積極的に移動し得るものと考えられた。

本研究結果は、ヒト脳におけるグリオーマ細胞の浸潤メカニズムを知る上で極めて重要と考えられた。

審査結果の要旨

グリオーマは、活発な遊走/浸潤能を有する悪性の脳腫瘍である。グリオーマ細胞が浸潤する際に示す基本動態を知ることは、今後、治療戦略を思考する上でも、極めて重要なポイントである。そこで、グリオーマ細胞(GC)の移動動態を明らかにし、その遊走が血管内皮細胞(EC)の存在によってどのような影響を受けるのかを知る目的で、両細胞株を共培養し、GC の動態をリアルタイムで長時間観察した。

まず GC 株(ラット C6)に GFP-レトロウィルスを感染させ、蛍光シグナルを安定かつ強発現する細胞をクローニングした。レトロウィルスを用いる利点は、GFP 遺伝子を組み込まれた細胞が分裂後も GFP 遺伝子を伝えるため、ほぼ永続的に同じ強度の蛍光シグナルを発現する点にある。標識された GC を EC 株(ラット大脳由来)と共培養し、その動きを Time-lapse 顕微鏡システムを用いてデジタルイメージとして 2-5 時間記録し、得られた動画による解析をおこなった。

最初に、EC 単層培養上での GC の動きを調べた。EC を単層培養し、その後 GC を追加すると、定着後の GC は様々な形態を示し、多数の突起を持つものや紡錘形単極あるいは双極性のものが観察された。これら GC の移動には基本的に 3 種類のパターンが認められた。単一の先端突起を収縮することにより胞体を素早く移動させるパターン、先端突起の長さを変えずに胞体と突起が同期して移動するパターンと、突起は動かすものの核が殆ど動かないパターンである。これらの移動動態は、発生期終脳におけるグリア芽細胞が示すそれと類似していた。

また、EC 上での GC の動きの特徴を明らかにする目的で、異種細胞株であるラット線維芽細胞(NIH3T3)上での GC の動きと比較したところ、2 時間での GC の平均移動距離は EC 上で 19.8 μm (n=627)、3T3 上で 32.8 μm (n=616)であり、有意差(P<0.001)をもって EC 上の方が動きに乏しかった。さらに、EC と 3T3 の培地上清を GC を加える直前に交換して同様の実験をおこなったところ、EC と 3T3 上での GC の動きに明らかな違いは認められず、両細胞株から放出された液性因子よりも、細胞膜における GC と EC の親和性がこのような GC の動きに関わっていると考えられた。

次に、EC が形成する毛細血管様のネットワーク上での GC の動きを調べた。再構成基底膜である matrigel を薄くコーティングしたシャーレに EC を播き、その後、GC の培養上清のみを添加すると毛細血管様のネットワークが形成された。このことから、GC から出された何らかの液性因子が、EC の管腔形成の促進に関与している可能性が考えられた。ネットワーク形成状態で GC を加えると、それらは紡錘形を示しつつネットワークに沿って移動した。指向性は示さず、交差あるいは途中で逆行する場合もあった。またネットワーク上を著しく速く(56 $\mu\text{m}/\text{h}$)移動する細胞の存在が初めて観察された。先の実験で EC 上での平均移動速度が 9.9 $\mu\text{m}/\text{h}$ であったことをふまえると、ガイ

ドとなる構造が存在することにより、移動速度が速くなる特異な GC が存在するものと考えられた。このように GC が脳内で浸潤する際の移動動態は一樣ではなく、それらは、増生した EC が作る管腔に沿って積極的に移動し得るものと考えられた。

本研究結果は、ヒト脳におけるグリオーマ細胞の浸潤メカニズムを知る上で極めて重要と考えられた。

以上、本研究は生きたグリオーマ細胞が示す多彩な移動動態を初めて明らかにし、ヒト悪性グリオーマにおける浸潤メカニズムを思考する上で極めて重要な基礎的知見を提起した。この点に学位論文としての価値を認める。