

Title	グリオーマの化学療法における抗癌剤耐性機構とその克服の可能性
Author(s)	吉田, 達生
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33970">https://hdl.handle.net/11094/33970</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	よし 吉	だ 田	たつ 達	お 生
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6418	号	
学位授与の日付	昭和59年3月24日			
学位授与の要件	医学研究科 外科系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	グリオーマの化学療法における抗癌剤耐性機構とその克服の 可能性			
論文審査委員	(主査) 教授	最上平太郎		
	(副査) 教授	坂本 幸哉	教授	森 武貞

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### (目 的)

癌化学療法中における抗癌剤耐性の問題は現在さまざまな角度から研究が進められているが、血液脳関門の存在やリンパ組織の欠如した脳実質内のグリア細胞から発生した脳腫瘍に関しては、化学療法による一時的寛解がようやく達せられた段階であり、寛解後に再発する抗癌剤抵抗性グリオーマに対する対策はほとんど立てられていない。脳腫瘍の治療関門の存在などの理由からニトロソウレア系薬剤が主に使われているが、本邦で開発された1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride (ACNU)は強い抗腫瘍効果を有するにもかかわらず、再発グリオーマに対しては無効なことが多く、再発グリオーマにおけるACNU耐性が示唆されている。そこで我々はラットグリオーマを用いてACNUに対する耐性細胞株を樹立するとともに、耐性機構の解明およびその治療法について検討を行った。

#### (方法ならびに成績)

腫瘍細胞として、ラットC6および9Lグリオーマ細胞を用いた。

#### 1. ACNU耐性グリオーマ株の樹立

1×10<sup>7</sup>個のC6および9L細胞をそれぞれWistarおよびFisher 344ラットの大槽内へ移植してmeningeal gliomatosis (MG)ラット(それぞれC6MG, 9LMGと略記)を作成し、C6MGラットは腫瘍移植後1日目にACNU/kg itで、9LMGラットは5日目にACNU15mg/kg ivで治療した。治療後に増殖してくる腫瘍を採取し、再びラットの大槽内に移植してMGラットを作成し同様に治療を行った。このような継代と治療を5代繰り返して得られた細胞のin vitroでのACNUに対す

る感受性は、各親細胞に対する  $1 C_{50}$  の比で表すと C 6 由来細胞で75であり、ACNUに対し高度の耐性を有することが証明された。これらのACNU耐性細胞を各々C 6 / ACNUおよび9 L / ACNU細胞と命名し、以下の実験に用いた。

## 2. 耐性細胞におけるACNUのuptakeとretention

Falcon 24 well plateにてC 6 / ACNU, 9 L / ACNU およびこれらの親細胞を24時間培養したのち、Ethylene [ $^{14}C$ ] ACNU ( $10 \mu g / ml$ )を加え、一定時間毎に [ $^{14}C$ ] ACNUを含む培養液を捨て、PBSで洗浄後IN Na OHで細胞を溶解してシンチレーションカウンターにて放射活性を測定することによりACNUの細胞内uptakeを調べた。C 6 / ACNU および9 L / ACNU細胞内ACNU量は、親細胞に対し5時間で、それぞれ24.2%および24.6%まで低下していた。そこで9 Lおよび9 L / ACNU細胞における細胞膜透過性を [ $^{14}C$ ]  $\cdot \alpha$ -aminoisobutylic acidの細胞内uptakeで比較したが、両者に有意差は見られなかった。このことからACNU耐性細胞における細胞内ACNU量の低値は、細胞膜透過性の低下によるinfluxの減少よりも、むしろeffluxの亢進に原因があることが示唆された。そこでこれらの細胞におけるeffluxについて検討した。各細胞を24時間培養したのち [ $^{14}C$ ] ACNU ( $10 \mu g / ml$ )を加え、さらに3時間培養した。ここで [ $^{14}C$ ] ACNUを含む培養液を新しい培養液に換えて、一定時間毎に培養液を捨て、IN Na OHで細胞を溶解したのち細胞内に残存する [ $^{14}C$ ] ACNUを測定した。その結果C 6 / ACNU および9 L / ACNU細胞は、親細胞に対し5時間でそれぞれ3.3%および16.7%の細胞内ACNU量を示し、ACNU耐性細胞におけるeffluxが親細胞に比べ亢進していることが示唆された。さらにsodium azide, 2,4-dinitrophenol, oligomycinなどの代謝阻害剤などにより細胞内エネルギーをブロックすると、9 L / ACNU細胞におけるACNUの細胞外effluxは、57%減少した。このことから、ACNU耐性細胞におけるeffluxはエネルギー依存性のactive transportによるものと推測された。

## 3. 耐性克服の可能性

今回樹立されたACNU耐性細胞の耐性機構は、主にeffluxの亢進によることが示唆されたため、細胞膜代謝に影響を及ぼすnicardipine, verapamilなどのカルシウム拮抗剤や、細胞膜からカルシウムを放出させる作用のあるreserpineの存在下で培養したところ、C 6 / ACNU細胞におけるACNUのeffluxは有意に抑制された。そこで、in vivoモデルとしてC 6 / ACNU細胞を用いてMGラットを作成し、腫瘍移植後1日目に、nicardipine  $500 \mu g / kg$ , verapamil  $500 \mu g / kg$ , reserpine  $250 \mu g / kg$ のうち一剤とACNU  $1 mg / kg$ との併用による髄腔内治療を行ったところ、MGラットの生存日数は% increased life span (ILS)で各々24%, 22%, 41%と有意に延長した。このことから、これらの薬剤が耐性グリオーマの治療に有用である可能性が示唆された。

(総括)

1) ラットC 6および9 Lグリオーマをin vivoで継代と治療を繰り返すことにより、ACNU耐性細胞株を樹立した。

2) 両ACNU耐性株における耐性機構として、細胞外effluxの亢進が示唆され、これはカルシウム拮抗剤により抑制された。

3) C6/ACNU細胞を用いて作成した meningeal gliomatosis (MG) ラットモデルの生存日数は, nicardipine, verapamil や reserpine と ACNU の併用により有意に延長し, これらの薬剤が抗癌剤耐性グリオーマの治療に有用である可能性が示唆された。

#### 論文の審査結果の要旨

本論文では, ラット9LおよびC6グリオーマからACNU耐性株を樹立し, その耐性機構および耐性の克服の可能性について検討した。その結果, ACNU耐性細胞では, ACNUの細胞外 efflux が亢進していることが耐性の一因子であると示唆され, さらに耐性の克服の可能性として, カルシウム拮抗剤の併用が有用であることが示された。

本研究は, 脳腫瘍における抗癌剤耐性について新たな知見を提示するとともに, 将来臨床応用へ発展可能な意義のある研究と考えられる。