Osaka University Knowledge Archive

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	https://hdl.handle.net/11094/33970
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【38】

氏名・(本籍)	吉田達生（よしだ たつお）
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

1×10^7 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。治療後に増植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Ｃ６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Ｃ６／ＡＣＮＵおよび９Ｌ／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 uptke と retention

Falcon 24 well plate にてＣ６／ACNU，９Ｌ／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（10μg／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。Ｃ６／ACNU および９Ｌ／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９Ｌおよび９Ｌ／ＡＣＮＵ細胞における細胞膜透過性を〔^{14}C〕・α－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（10μg／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Ｃ６／ACNU および９Ｌ／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，９Ｌ／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，Ｃ６／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Ｃ６／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 500μg／kg，verapamil 500μg／kg，reserpine 250μg／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Ｃ６および９Ｌ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。