

論文内容の要旨

氏 名 奥 田 武 司

学位の種類 博 士 (医学)

学位記番号 医 第 9 4 3 号

学位授与の日付 平 成 19 年 3 月 22 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 神経膠芽腫におけるミクログリアとインターフェロンによる誘導型一酸化窒素合成酵素発現に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 種 子 田 護

(副主査) 教 授 植 村 天 受

(副主査) 教 授 奥 野 清 隆

【目的】

神経膠芽腫に対するインターフェロン (IFN) 療法は既に有効性の認められた治療であるが、その効果のメカニズムは明らかではない。このメカニズムは IFN 刺激による活性化ミクログリアの誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 発現、高濃度の一酸化窒素 (NO) 誘導などが関与していると推測されるが実証されていない。その解明には病理組織学的及び分子生物学的分析が適切な手段と考えられる。

【方法】

神経膠芽腫 20 例の抽出標本を用いて、活性化ミクログリア、iNOS の免疫組織化学染色を行った。IFNβ は術前に 300 万単位を 5 例に静脈内投与、2 例に腫瘍内投与した。次に培養神経膠腫細胞に対して、NO 刺激による抗腫瘍効果を DNA マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。NO 濃度は高濃度を 0.5mM、低濃度は 0.005mM と設定し、それぞれコントロールと比較した。

【結果】

20 例中 17 例に活性化ミクログリアの出現を認めたが、iNOS の発現は腫瘍内投与を行った 2 例のみであった。この 2 例に対して iNOS 発現細胞を同定するため二重染色を行った。この結果、iNOS 発現細胞の大部分は活性化ミクログリアであることが判明した。DNA マイクロアレイでは、高濃度 NO 刺激例では複数の遺伝子の発現増減を認めたが、低濃度例での遺伝子発現変化は極めて少なかった。高濃度 NO 例での遺伝子変化として、高度の発現増加を認めた遺伝子群には apoptosis や cell cycle などの腫瘍増殖抑制効果をもつ複数の遺伝子が認められた。また、高度の発現減少を認めた遺伝子群には regulation of progression through cell cycle や cell adhesion などの腫瘍増殖促進に関する機能を有する複数の遺伝子が抽出された。

【考察】

本研究では神経膠芽腫に対する IFN 療法の一つの効果として、活性化ミクログリアによる iNOS 発現を認めた。iNOS は高濃度の NO を誘導し、その高濃度 NO による腫瘍増殖抑制効果は他悪性腫瘍においては既に認められている。本研究における DNA マイクロアレイを用いた解析では、高濃度 NO 刺激により腫瘍増殖抑制遺伝子の発現増加、腫瘍増殖促進遺伝子の発現減少を認めた。従って、高濃度 NO は神経膠腫細胞においても腫瘍増殖抑制効果をもつ可能性が考えられた。膠芽腫に対する IFN 療法の効果は複数の機能による複合的な作用によるものとされるが、本研究により、その一経路として IFN 刺激によりミクログリアが iNOS を産生し、この結果、高濃度 NO が誘導され、腫瘍増殖抑制に働く機序が示唆された。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	平成19年 月 日 公表予定	出版物名
	公 表 内 容	近畿大学医学雑誌 第31巻 第4号
	全 文	平成19年 月 日 発行予定

## 論文審査結果の要旨

神経膠芽腫(膠芽腫)は治療困難な悪性脳腫瘍である。外科摘出・放射線治療・化学療法を組み合わせ、治療成績の改善が試みられているが、十分な治療効果を得るまでには至っていない。神経膠芽腫治療に用いられているインターフェロン(IFN)は脳内免疫炎症反応を担うミクログリアを賦活化させる働きを持つことが報告されている。本論文はIFNとミクログリアが神経膠芽腫にどのような影響を与え、さらにはそれが治療効果に結びつくのかについて検討している。ミクログリアは、成熟脳ではラミファイド型ミクログリアとして存在し、外傷、虚血などの脳内環境変化に対して活性化型に変化する。この活性化ミクログリアは多彩な組織障害因子、神経栄養/保護因子を産生した結果、脳に対して有益、有害の二面性の作用をもつとされる。最近では膠芽腫内にもミクログリアの存在が報告されており、その機能は注目されつつある。また、ミクログリアはこれまでの基礎培養実験において、インターフェロン(IFN)+リポポリサッカライド刺激にて高度の誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)を発現することが報告されている。一般的にiNOSは高濃度の一酸化窒素(NO)を誘導し、悪性腫瘍に対して腫瘍増殖抑制に働くと考えられる。そこで本論文では、IFN投与によって神経膠芽腫内のミクログリアが刺激され、iNOSが高度発現された結果、高濃度のNOが誘導されて、腫瘍増殖抑制効果が発現

すると考えられるが、実証されていない。

本研究では手術を行った膠芽腫20例中、7例に対して術前48時間前にIFN $\beta$ の投与を行い、IFNの影響を免疫組織学的に検討した。同時に培養神経膠腫細胞を用いて、低濃度、高濃度NO刺激下での各種遺伝子変化をDNAマイクロアレイ法で解析し、NOの神経膠腫に対する影響を分子生物学的に検討した。免疫染色では、活性化ミクログリア、iNOSに関して検討した。術前のIFN投与を行った7例では2例が腫瘍内投与であり、5例が静脈内投与であった。ミクログリアは20例中17例(85%)に陽性所見を認めたと、iNOSはIFN腫瘍内投与を行った2例のみに高度の陽性所見を認めた。このため、このiNOS陽性であった2例に対して活性化ミクログリアと二重染色した結果、iNOS陽性細胞の大部分が活性化ミクログリアであった。次に培養神経膠腫細胞であるU-251MG, human astrocytomaを使用し、NO刺激下での遺伝子発現変化を検討した。NO供与体としてsodium nitroprussideを用い、濃度は低濃度を0.005mM、高濃度を0.5mMと設定し、刺激後24時間経過した時点でRNAの抽出を行った。DNAマイクロアレイはAffymetrix社のGeneChipを使用した。解析を行った結果、高濃度NOでは多数の遺伝子発現変化があり、高度の腫瘍増殖遺伝子のdown-regulation、腫瘍増殖抑制遺伝子のup-

regulationを認めた.低濃度NOでは遺伝子発現変化は少なく,特定の方向性は認められなかった.

以上のように,本研究より膠芽腫にIFNが直接投与された場合,腫瘍内に存在する多数のミクログリアは高濃度NOを誘導するiNOSを発現することが明らかとなった.さらに,高濃度NOは神経膠腫細胞に対して抗腫瘍効果を示すことを明らかにした.

本研究は膠芽腫におけるIFN効果のメカニズムの一経路を新たに提示した.よって,審査委員は規定の各審査試験ならびに博士学位論文公聴会(平成19年2月6日)を行って,慎重に審査した結果,本論文を博士(医学)学位論文に十分に値すると認めた.

氏名	中川修宏
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医第944号
学位授与の日付	平成19年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	悪性グリオーマに対する硼素中性子捕捉療法の治療効果の検討:ラットC6 gliomaモデルを用いた基礎研究

論文審査委員(主査)	教授	種子田	護
(副主査)	教授	楠	進
(副主査)	教授	細野	真