

—臨床医のために—

悪性脳腫瘍における化学療法とアポトーシス

志村 俊郎 寺本 明 吉田 大蔵 足立 好司

日本医科大学脳神経外科学教室

Apoptosis in Malignant Brain Tumor and Application of Chemotherapy

Toshiro Shimura, Akira Teramoto, Daizo Yoshida and Koji Adachi

Department of Neurosurgery, Nippon Medical School

はじめに

近年アポトーシスの研究があらゆる分野で進歩し、これらの研究によりアルツハイマー病にみられる神経細胞死や AIDS による T 細胞の減少もアポトーシスの亢進、逆に自己免疫疾患や癌はアポトーシスの抑制によるという病態の解明がなされ、さらに治療にも貢献してきた¹。そして癌細胞においてもアポトーシスが正常に進行出来なくなる疾患として捉えられている。この過程には、アポトーシスの誘導に関与する c-myc, c-fos, c-jun などの癌原遺伝子, p 53 癌抑制遺伝子, さらにアポトーシス抑制 bcl-2 遺伝子などが重要な役割を果たしている。一方、生体内の酸素濃度, pH, ホルモン, 蛋白などの生理的因子の他に、温熱, 紫外線, 抗癌剤などの物理的的刺激も細胞にアポトーシスを誘導する。そして太田² はアポトーシスのシグナル伝達機構の中心的役割をになっている細胞内小器官のミトコンドリアが、これらアポトーシス誘導因子の貯蔵の役割をになっていることを述べている。そこでなんらかの薬剤により癌細胞にアポトーシスを誘導し治療できる可能性が考えられ、実際に固形腫瘍の縮小あるいは消失がみられれば、癌治療の理想と思われる。本稿では悪性脳腫瘍の治療面からみたアポトーシスの形態を中心に臨床医に役立つと思われる些かの知識を述べる。

1 頭蓋内悪性脳腫瘍のアポトーシス

がん遺伝子の Bcl-2 蛋白が細胞のアポトーシスを抑制して癌化がおこるのは広く知られている。さてこの Bcl-2 遺伝子はヒト濾胞性リンパ腫にみられる t-転座

の転座点近傍に存在するがん遺伝子として見つけれられたのが最初である。また、bcl-2 蛋白の発現レベルが高い癌は予後が悪いと言われている。そもそも腫瘍には自然にアポトーシスは生じていて、その程度は腫瘍によって異なる。脳腫瘍については、25 例に TUNEL 法でアポトーシス細胞を観察した Nakagawa ら³ の研究によるとリンパ腫は 8.2%, 髄芽腫は 2.4% と述べ MIB-1 index の高い脳腫瘍は apoptotic index も高い傾向を示したと報告されている。最初に我々が経験した抗癌剤およびステロイド療法と放射線療法が、それぞれ著効した 2 例の頭蓋内原発悪性リンパ腫を供覧する。

抗癌剤著効例：症例 1, 59 歳, 女性, 左不全片麻痺にて当科に入院した。MRI にて右側脳室近傍に T1 協調 Gd 増強画像にて高信号域として認められた。腫瘍摘出後、ステロイド療法と 3 クールの MTX 大量療法を行い残存腫瘍はほぼ消失した(図 1 ABCD)。本腫瘍の組織像では、腫瘍細胞は大型で核小体が目立ち細胞質に乏しい。核の環状の凝縮を示す好酸性小体が散見される(図 2 A)。壊死巣および炎症細胞浸潤は見られない。免疫染色では L-26 陽性の diffuse large cell B cell lymphoma であった。本腫瘍の TUNEL 法ではクロモゾーム DNA の断片化を示す多数の陽性細胞が見られた(図 2 B)。

放射線療法著効例：症例 2, 70 歳, 女性, 右不全片麻痺, 運動性失語にて当科に入院した。MRI にて左頭頂葉に T1 協調 Gd 増強画像にて高信号域として認められた。腫瘍全摘出術を施行、術後に放射線療法を全脳に 30.8 Gy, 局所に 20 Gy 行い、さらに CHOP 療法を 1 クール追加した。残存腫瘍は、著しく減少し、神経症状も改善した。患者は術後 2 年 6 カ月生存し現在有意な社会生活を行っている。本腫瘍の組織像は、くびれた細胞が多数みられ、鍍銀染色で細網線維の産生が強く、免疫染色では LCA, L-26 陽性であった。WF およ

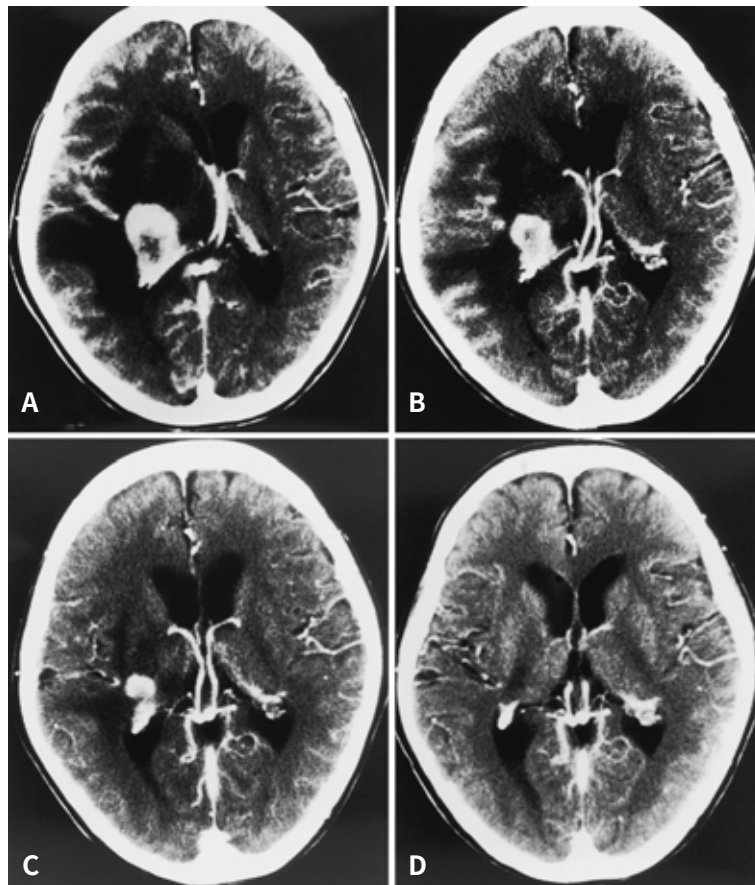


図1 A: 摘出術後初回 CT (造影後). B: post steroid therapy. C: post MTX therapy (1 クール目). D: post MTX therapy (3 クール目).

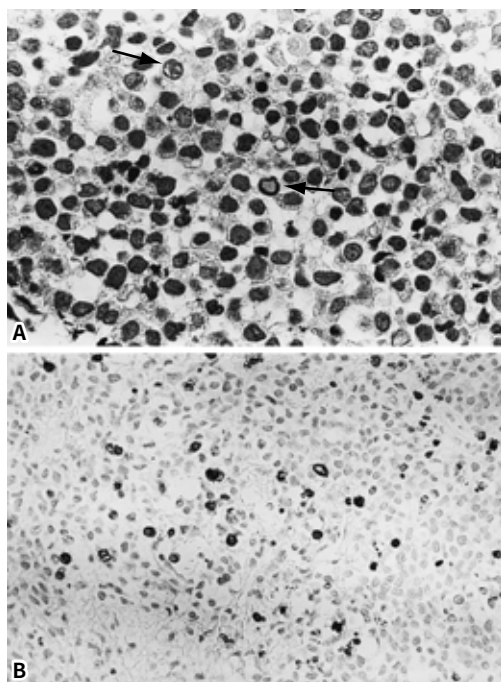


図2 A: 悪性リンパ腫に見られる核クロマチンの三日月状凝集を呈した apoptosis 細胞 (矢印)(HE $\times 400$). B: TUNEL 法による染色で陽性を示した apoptosis 細胞 ($\times 200$).

び LSG 分類では, Dmix の diffuse large cell B cell lymphoma と診断された. 本腫瘍の電子顕微鏡学的検索では, 三日月型の核クロマチンの凝集がみられ, 核小体は見られない. 細胞容積の減少, Budding やアポトーシス小体の形成が多数見られた. 一方, 細胞膜およびミトコンドリアの形態は良く保持されていた (図 3 AB).

以上の頭蓋内原発悪性リンパ腫の治療著効例に見た. 特に各種治療に伴うアポトーシスの誘導体について臨床病理学的に若干の考察を加える.

抗癌剤とアポトーシス: 現在, 我々が実験段階で研究用に行うアポトーシス誘導体はアクチノマイシン D, Etoposide, Dexamethasone など種々の薬剤があげられ, これらを利用し in vitro でアポトーシスの誘導が容易にみられるが in vivo では少ない. そして一般的には臨床データからはアポトーシスと抗癌剤感受性の関係を正確にみることは困難とされている. また, アポトーシスになりにくい癌細胞のアポトーシス抵抗性も近年注目されていて, これは一つの抗癌剤耐性機構とも言われている. 特に固形癌におけるアポトーシス耐性は形成時における低酸素, 低グルコースが寄与

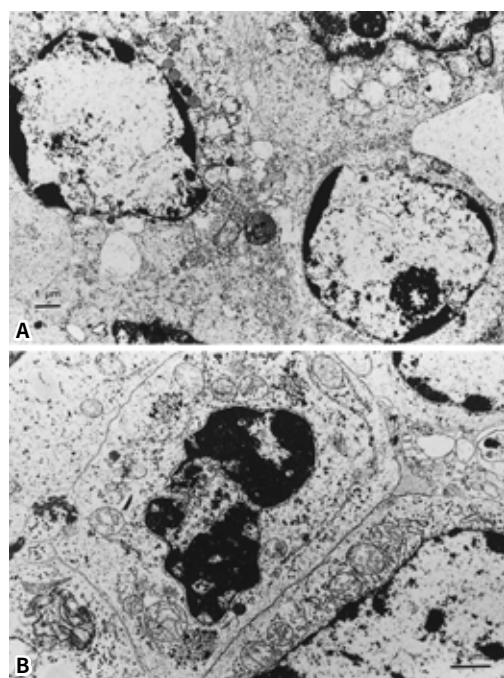


図3 A: 悪性リンパ腫細胞に見られた核クロマチンの凝集スケールは1 μm . ($\times 5000$) B: 同細胞に見られた核の断片化スケールは1 μm . ($\times 8000$)

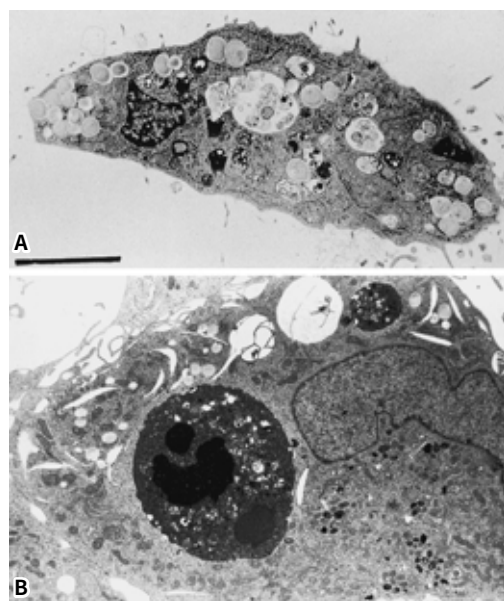


図4 A: EM 投与における培養ヒト悪性グリオーマ細胞に見られた核の断片化とオートファジー小体, B: 同細胞に見られた細胞膜で覆われたアポトーシス小体.

しているともいわれている¹。さらに注目すべきことは、先にも述べた癌遺伝子や癌抑制遺伝子などアポトーシス制御にかかわる分子のうちアポトーシス抑制タンパク質の切断と不活化は薬剤による、アポトーシス耐性細胞にもアポトーシスを誘導する可能性を示し

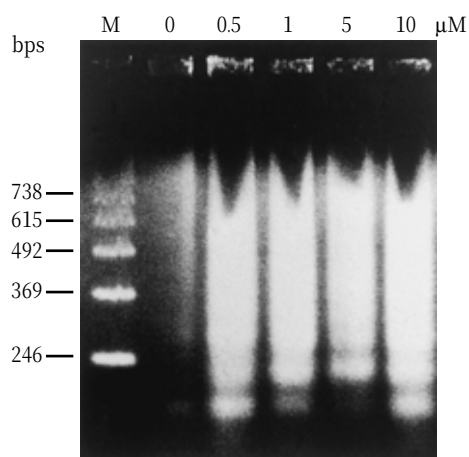


図5 EM 投与における培養ヒト悪性グリオーマ細胞のアガロースゲル電気泳動. DNA ラダーが観察される.

ている。実際には種々の drug delivery system を用いた局所化学療法、特にこの手技を応用したあらかじめ薬剤代謝を促進する遺伝子を癌細胞に導入しておいて、代謝後のみ毒性を示す抗癌剤を投与するいわゆる遺伝子療法がある。固形、浸潤性の悪性脳腫瘍はこの治療法に適していると思われるが、しかしながらこれらの研究の脳腫瘍の報告は未だ極めて少ない。そこで、我々はそれらの機序を解明する目的で次項に述べる Estramustine (以下 EM と略す) 投与による培養グリオーマ細胞におけるアポトーシスの形態学的実験を行った⁴。

放射線療法とアポトーシス：放射線による細胞死は数回までの細胞周期の回転の後に死ぬ増殖死と細胞周期に関係なく死ぬ間期死がある。放射線感受性の要因としては、酸素レベル、DNA 損傷修復能力、生き残ったクローンが増殖していく能力、分裂細胞の量、細胞周期の分布などがある⁵。そこで放射線感受性のある腫瘍では、培養細胞でもアポトーシスを誘導でき、放射線抵抗性のある腫瘍細胞は、放射線の誘導するアポトーシスになりにくい。この分野でも脳腫瘍での研究は少ない。

2. 培養ヒト悪性グリオーマ細胞における EM 誘発アポトーシス

EM は、estradiol と nitrogen mustard の合剤で、細胞膜表面にある estrogen 受容体を介して nitrosourea を癌細胞に選択的に作用させるミサイル療法として前立腺癌、乳癌および卵巣癌に用いられてきた。しかしながら、近年この薬剤は、選択的に癌細胞の細胞骨格の一種である微小管を解縮することが明らかになって

きた。この実験で意図したことは微小管は、細胞の運動や浸潤さらに細胞分裂に強い関連を有している点に着目し、EM 磷酸塩によってグリオーマ細胞の浸潤や細胞遊走を抑制したり、細胞分裂の際の紡錘糸形成を抑制し、さらに細胞周期を G 2/M 期に止め放射線感受性を高めることである。さらには Bcl-2 蛋白のリン酸化誘導をおこし Bcl-2 蛋白の機能を阻害してアポトーシスをおこすことを培養グリオーマ細胞で電顕的に証明した。使用培養細胞は、ヒト悪性グリオーマ細胞 U 251 MG である。使用薬剤は EM で各 10 μ M を 24 hr, 48 hr, 72 hr 加えたものを投与群、薬剤非投与群を対照群として 2% PFA に 1 時間固定後に Anti-bcl-2 で over night し常法にしたがい超薄切片を作成し、グリオーマ細胞中のアポトーシスの形態学的変化を電顕観察した。

結果：EM 投与群では、腫瘍細胞の核内クロマチンの核膜周辺への凝集を示し、細胞体は円形に変形し軽度の収縮像を多く示していた。また、細胞の微絨毛様突起の減少も見られている。48 時間投与群では細胞質の突出、核の断片化、アポトーシス小体も散見された(図 4 AB)。これらの所見はグリオーマ細胞群の投与時間の長さに比例し、72 時間群では貪食除去の像も稀に見られた。これらの EM 投与群の DNA 採取後のアガロースゲル電気泳動では、連続の濃度による DNA

の Laddering formation を示す(図 5)。

おわりに

臨床家に役に立つ悪性脳腫瘍の治療面より見たアポトーシスの一般的知識を概説しましたが、アポトーシスの分子機構は総説を御参照ください。

文 献

1. 藤田直也, 鶴尾 隆: がんにおけるアポトーシス. 最新医学 1999; 54: 877-883.
2. 太田成男: アポトーシスにおけるミトコンドリアの新たな役割. 最新医学; 1999; 54: 853-860.
3. Nakagawa S, Shiraishi T, Kihara S, Tabuchi K: Detection of DNA strand breaks associated with apoptosis in human brain tumors. Virchows Arch 1995; 427: 175-179.
4. Yoshida D, Hoshino S, Shimura T, Takahashi H, Teramoto A: Drug-induced apoptosis by anti-microtubule agent, estramustine phosphate on human malignant glioma cell line, U 87 MG; in vitro study. J Neurooncol 2000; 47: 133-140.
5. 高橋 玲: 癌とアポトーシス. 第 363 回学際セミナー, アポトーシスの各種検索法と臨床分野への応用. プランナー, 小路武彦. 2000 年 5 月.

(受付: 2000 年 9 月 12 日)

(受理: 2000 年 10 月 11 日)