HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

Nicotine does not affect stem cell properties requisite for suicide gene therapy against glioma

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2020-12-17 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 釼持, 博昭 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003780

博士（医学）　　釼持　博昭

論文題目

Nicotine does not affect stem cell properties requisite for suicide gene therapy against glioma

（ニコチンはグリオーマの自殺遺伝子療法に必要な幹細胞特性に影響しない）

論文の内容の要旨

［はじめに］

悪性グリオーマは脳実質内を急速かつ浸潤性に発育する予後不良な脳腫瘍であり、有効な治療法の確立が切望されている。その中で、腫瘍組織へ高い遊走能を有する幹細胞を自殺遺伝子の運び屋として利用する自殺遺伝子幹細胞療法は新たな治療戦略として注目され、臨床応用に向けて研究が進んでいる。本治療では投与された遺伝子導入幹細胞は速やかに腫瘍周辺に遊走し、抗がん剤のプロドラッグの全身投与により腫瘍局所において遺伝子導入細胞のみならず非導入細胞へも強い殺細胞効果を発揮する（バイスタンダー効果）。

一方、タバコの健康への影響が広く認識され喫煙率は減少したが、世界的には喫煙習慣を有する患者は少なくない。タバコの主要な成分であるニコチンは多くの生物学的作用を有するが、幹細胞を使用する本治療法への影響は明らかでない。そこで本治療に重要な幹細胞特性、即ち、幹細胞が持つグリオーマ細胞への遊走能と、バイスタンダー効果の主要な作用機序であるギャップ結合を介した幹細胞／腫瘍細胞間および腫瘍細胞同士の細胞間コミュニケーション（GJIC）についてニコチンが及ぼす影響を in vitro で検討した。

［材料ならびに方法］

マウス人工多能性幹細胞由来神経幹細胞（iPS-NSCs）とヒト歯髄幹細胞（DPSCs）、マウスグリオーマ細胞株（GL261）とヒトグリオーマ細胞株（U251）を使用した。各細胞についてニコチンの細胞毒性を MTT assay で確認し、非細胞毒性のニコチン濃度で以下の検討を行った。

1. 幹細胞がグリオーマ馴化培養液（CM）へ向かう遊走能: Matrigel Invasion Chamber を使用し、CM へ向けて移動する幹細胞を 24 時間後に観察し細胞数を測定した。
2. 幹細胞とグリオーマ細胞の GJIC: グリオーマ細胞と幹細胞を 5 対 1 の割合で共培養し、24 時間後に scrape loading/dye transfer assay（SL/DT）を行った。ギャップ結合通過性蛍光色素（Lucifer yellow）を使用し scrape 1 mm あたりの蛍光細胞数を high-content analysis で測定した。またギャップ結合構成タンパク質のコネキシン 43（Cx43）の発現をウエスタンブロット法で評価した。
3. グリオーマ細胞間の GJIC: ギャップ結合通過性蛍光色素（Calcein-AM）と非通過性蛍光色素（DiI）で二重標識したドナー細胞（D）、蛍光標識していな

いレシピエント細胞（R）を 1 対 20 の割合で混合してパラシュート法を行い、混合から 6 時間までの蛍光細胞数を high-content analysis で測定し R/D 比を求めた。

［結果］

各細胞に共通する非細胞毒性のニコチン最大濃度は 1 μM であった。喫煙者や電子タバコ、ニコチンパッチ使用時のニコチンの生理的血中濃度が $1x10^{-7}$ M から $1x10^{-6}$ M であることを考慮し、以下の実験では 1 または 0.1 μM のニコチンを用いた。幹細胞の遊走能の評価では、GL261-CM に対する iPS-NSC の遊走能、U251-CM に対する DPSC の遊走能は共に無血清培地に対する遊走能に比較し有意に高く、これはニコチン 0.1 μM、1 μM で抑制されなかった。SL/DT による GJIC の評価では、U251 単独培養と比較し DPSC/U251 共培養で有意に高く、iPS-NSC/GL261 共培養でも GL261 単独培養と比較し高い傾向が見られた。ニコチン 1 μM はこれらの GJIC に影響を与えず、Cx43 発現量へも影響しなかった。パラシュート法による GJIC の評価では、GL261 細胞間または U251 細胞間の GJIC は共にギャップ結合阻害剤であるカルベノキソロンで有意に抑制されたが、ニコチン 1 μM で抑制されなかった。

［考察］

ニコチンの幹細胞に対する非細胞毒性最大濃度は 1 μM であったが、報告による非細胞毒性濃度やニコチン摂取時の血中濃度と同等であった。幹細胞の遊走能とニコチンについて、自発的な遊走を促進するか抑制するかについては未だ議論の余地がある。一方、化学遊走因子が関わる遊走についてはニコチン 1 μM がニコチン性アセチルコリン受容体（α7-nAChR）を介して抑制するという報告がある。本研究では幹細胞のグリオーマ指向性はニコチンの影響を受けなかったが、幹細胞の腫瘍指向性と α7-nAChR の関連について更なる検証が必要である。また、GJIC に関するニコチンの研究は少ないが、血管内皮細胞においてニコチンは Cx43 の発現を阻害し GJIC を抑制するという報告が散見される。本研究は幹細胞の特性に着目し、非細胞毒性のニコチンは幹細胞とグリオーマ細胞の GJIC に影響しないことを新たに示した。

［結論］

グリオーマに対する自殺遺伝子幹細胞療法において、喫煙時の血中濃度レベルのニコチン（0.1～1 μM）は 1. 幹細胞のグリオーマ細胞への遊走能、2. 幹細胞とグリオーマ細胞またはグリオーマ細胞間の GJIC に影響しないことが示された。このことから、本自殺遺伝子幹細胞療法は喫煙習慣を有する患者へも施行可能と考えられる。