



# Effect of Dexamethasone on Cell Proliferation of Neuroepithelial Tumor Cell Lines

河村，淳史

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

1999-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1947

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001947>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	かわむらあつふみ 河村 淳 史	（静岡県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1190号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成11年3月31日	
学位論文題目	Effect of Dexamethasone on Cell Proliferation of Neuroepithelial Tumor Cell Lines (神経外胚葉経脳腫瘍細胞の増殖におけるデキサメタゾンの効果)	
審査委員	主査 教授 玉 木 紀 彦 教授 前 田 盛	教授 千原 和 夫

## 論文内容の要旨

### 序

デキサメタゾンは、脳神経外科領域において手術前および手術後の脳腫瘍の治療に広く用いられている薬剤である。しかし脳腫瘍細胞における高価に関しては1988年代頃より、低濃度において細胞増殖を促進し、高濃度において抑制するという増殖制御反応の報告が散見されるようになったが、その機序や詳細について現在なお不明である。本研究では4種類の樹立培養神経外胚葉経脳腫瘍細胞 KNS 42, T98G, A172および U251MG を用いて、デキサメタゾンの腫瘍細胞に対する増殖効果およびその機序を解明するとともにグルココルチコイド受容体の関与、アポトーシスとの関連について検討した。

### 試料と方法

#### 1. 細胞培養

腫瘍細胞は仔ウシ血清(10%), カナマイシン(100mg/l), L グルタミン(2932.3mg/l)を添加した RPMI 1640培養液で37℃, 5%CO<sub>2</sub>の環境下で培養を行った。

#### 2. 細胞増殖に及ぼすデキサメタゾンの効果

デキサメタゾンに対する増殖反応は4種の濃度条件下(10<sup>-7</sup>M, 10<sup>-6</sup>M, 10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-4</sup>M)における細胞数の推移を3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Assay により判定した。

#### 3. グルココルチコイド受容体の発現

グルココルチコイド受容体の検索は抗ヒトグルココルチコイド受容体抗体を用いた Western Blot を施行し解析した。

#### 4. グルココルチコイド受容体の局在

グルココルチコイド受容体の局在は抗ヒトグルココルチコイド受容体抗体を使用した免疫組織化学法により同定した。

#### 5. デキサメタゾン誘導性アポトーシスの発現

デキサメタゾンによる腫瘍細胞増殖抑制効果とグルココルチコイド誘導性アポトーシスとの関係は、2%アガロースゲルを使用した電気泳動における DNA ladder の判定で検討した。

## 結果

### 1. デキサメタゾンによる増殖制御

デキサメタゾンによる増殖制御反応に関しては、KNS42および T98G 細胞ではデキサメタゾン $10^{-7}$  M から $10^{-5}$  M にかけて濃度依存性に有意な増殖促進を示した。しかし $10^{-4}$  M においては急激な細胞数減少を認めた。A172細胞ではデキサメタゾン全濃度において増殖制御を認めた。U251MG 細胞ではデキサメタゾンに対して無反応であり、増殖促進効果も制御効果も認めることができなかった。上記のデキサメタゾン添加による細胞増殖制御反応は、グルココルチコイド拮抗剤 RU38486 の処理により完全に抑制された。

### 2. グルココルチコイド受容体の発現

KNS42, T98G, および A172細胞においてグルココルチコイド受容体は Western Blot により97KDa の分子量のバンドとして認められた。しかし U251MG 細胞では陰性反応であった。

### 3. グルココルチコイド受容体の局在

グルココルチコイド受容体の局在を免疫組織化学法により KNS42, T98G, および A172細胞において細胞質内に優位に存在したが核内でも弱陽性を示した。U251MG 細胞では全く染色を認めなかった。また KNS42, T98G, および A172細胞におけるデキサメタゾン添加2時間後のグルココルチコイド受容体の局在は、核内に優位へと変化を示した。

### 4. デキサメタゾン誘導性アポトーシスの発現

アガロースゲルによる DNA Ladder の判定では、KNS42, T98G, および A172細胞はデキサメタゾンにより増殖障害を示したにもかかわらず、グルココルチコイド受容体を持たない U251MG 細胞と同様にグルココルチコイド誘導性アポトーシスを示さなかった。

## 考察

KNS42と T98G 細胞における $10^{-4}$  M デキサメタゾンの細胞障害効果およびデキサメタゾンによる A172細胞増殖抑制反応は、白血病細胞や甲状腺細胞などで報告されているグルココルチコイド誘導性アポトーシスまたは増殖過剰によるアポトーシスによる機序ではないことが判明した。特に A172細胞においては、デキサメタゾン投与後より細胞数の有意な増加が見られないことにより、細胞死の可能性よりも細胞増殖の抑制または停止効果が示唆された。またそれとは対照的に KNS42および T98G 細胞では生理活性濃度付近で濃度依存性に増殖効果を表すことより、デキサメタゾンは細胞の種類により二相性の効果を発現するものと考えられた。 $10^{-4}$  M デキサメタゾンによる KNS42および T98G 細胞数の減少は、生理的活性濃度より103倍の高濃度であるため受容体を介してではなく直接の細胞膜機能障害によるネクローシスの可能性が高く、デキサメタゾン本来の薬理学的効果とは認めにくい。本実験ではグルココルチコイド受容体陽性脳腫瘍細胞において、投与されたデキサメタゾンが細胞質内に存在する受容体と結合し複合体となり核内へ移動し、細胞増殖に関連した遺伝子の機能を調節していることが示唆された。さらに核内に移行した複合体により活性化される経路は、細胞の種類により増殖刺激と増殖抑制の正反対の経路が存在すると考えられた。

これまで神経膠腫の治療としてグルココルチコイドの大量投与による抗腫瘍効果、低濃度デキサメタゾンの腫瘍細胞増殖効果および高濃度の抑制効果が指摘されてきたが、今後はデキサメタゾンの副作用などの問題もあるため抗腫瘍効果を臨床応用するにあたっては、効果を発現する至適濃度、グルココルチコイド受容体の存在、増殖抑制効果を示す細胞の種類を考慮した上での使用が必要であるこ

とが判明した。さらにグルココルチコイド受容体複合体の構造の解明および本実験で予想される増殖に関与した遺伝子の同定が望まれるところである。

#### 結語

神経外胚葉経グルココルチコイド受容体陽性脳腫瘍細胞に対するデキサメタゾンの効果は、細胞質内に存在する受容体と結合し複合体を形成した後に核内へ移動することによって細胞増殖に関連した遺伝子の機能を調節し発現することが示唆された。さらに核内に移行した複合体により活性化される経路は、細胞の種類により増殖刺激と増殖抑制の正反対の経路が存在すると考えられ、臨床応用の際は至適濃度の検討に加え細胞種の選択が必要であることが判明した。

### 論文審査の結果の要旨

デキサメタゾンの脳腫瘍細胞に対する効果とその機序については、現在不明な点が多い。本研究は、4種類の樹立培養神経外胚葉経脳腫瘍細胞 KNS42, T98G, A172および U251MG に対するデキサメタゾンの増殖効果とその機序を解明するとともに、グルココルチコイド受容体の関与、アポトーシスとの関連について検討した。

#### 方法

1. 腫瘍細胞の培養は仔ウシ血清 (10%), カナマイシン (100mg/l), L グルタミン (2932.3mg/l) を添加した RPMI1640 培養液で 37℃, 5 % CO<sub>2</sub> の環境下で培養を行った。
2. 細胞増殖に及ぼすデキサメタゾンの効果は、デキサメタゾンの 10<sup>-7</sup>M, 10<sup>-6</sup>M, 10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-4</sup>M の4種類の濃度における細胞数の推移を MTT Assay により判定した。
3. グルココルチコイド受容体の検索は、抗ヒトグルココルチコイド受容体抗体を用いた Western Blot で解析した。
4. グルココルチコイド受容体の局在は、抗ヒトグルココルチコイド受容体抗体を使用した免疫組織化学法により同定した。
5. デキサメタゾンによる腫瘍細胞増殖抑制効果とグルココルチコイド誘導性アポトーシスとの関係は、2 % アガロースゲルを使用した電気泳動における DNA ladder の判定で検討した。

#### 結果

1. デキサメタゾンによる腫瘍細胞増殖制御について

KNS42 と T98G に2種類の腫瘍細胞では、デキサメタゾン 10<sup>-7</sup>M から 10<sup>-5</sup>M にかけて濃度依存性に増殖促進を認めた。しかし、さらに高濃度の 10<sup>-4</sup>M では急激な細胞数減少を認めた。A172細胞では、デキサメタゾンの全濃度において増殖抑制を認めた。

一方、U251MG 細胞は、デキサメタゾンに対して無反応であった。

上記のデキサメタゾン添加による細胞増殖制御反応は、グルココルチコイド拮抗剤により完全に抑制された。

2. グルココルチコイド受容体の発現について

KNS42, T98G, A172の3種類の細胞において、グルココルチコイド受容体は Western Blot により 97KDa の分子量のバンドとして認められた。しかし、U251MG 細胞では陰性であった。

3. グルココルチコイド受容体の局在について

グルココルチコイド受容体の局在は、免疫組織化学法により、KNS42, T98G, A172の3種類の細胞において細胞質内に優位に存在したが、核内でも弱陽性を示した。

U251MG 細胞では全く染色を認めなかった。また上記 3 種の細胞におけるデキサメタゾン添加 2 時間後のグルココルチコイド受容体の局在は、核内に優位に認めるように変化した。

#### 4. デキサメタゾン誘導性アポトーシスの発現について

デキサメタゾン誘導性アポトーシスの初店については、DNA Ladder の判定で、KNS42, T98G, A172 の 3 種の細胞は、デキサメタゾンにより増殖障害を示したにもかかわらず、グルココルチコイド受容体を持たない U251MG 細胞と同様にそれを示さなかった。

以上 KNS42, T98G 細胞は生理活性濃度付近で濃度依存性に増殖効果を現し、A172 細胞では、デキサメタゾン投与より、細胞数の有意な増加が見られず細胞増殖の抑制または停止が認められた。このことから、デキサメタゾンは腫瘍細胞の種類により二相性の効果を呈するものと考えられた、また、KNS42, T98G 細胞における  $10^{-4}$ M デキサメタゾンの細胞障害効果および A172 細胞の増殖抑制反応はグルココルチコイド誘導性アポトーシスによる機序ではないことが明らかとなった。 $10^{-4}$ M デキサメタゾンによる KNS42 および T98G 細胞数の減少は、生理的活性濃度より  $10^3$  倍の高濃度であるため受容体を介してではなく直接の細胞膜機能障害によるネクローシスの可能性が高い。また、本実験ではグルココルチコイド受容体陽性脳腫瘍細胞において、投与されたデキサメタゾンが細胞質内に存在する受容体と結合し複合体となり核内へ移動し、細胞増殖に関連した遺伝子の機能を調節していることが示唆された。さらに核内に移行した複合体により活性化される経路は、細胞の種類により増殖刺激と増殖抑制の正反対の経路が存在すること考えられた。以上より、デキサメタゾンの抗腫瘍効果を臨床応用するためには、至適濃度、グルココルチコイド受容体の存在、増殖抑制効果を示す細胞の種類を考慮した使用が重要であることが判明した。すなわち、細胞の種類により増殖刺激と増殖抑制の正反対の経路が存在すると考えられ、臨床応用の際は至適濃度の検討に加え細胞種類の選択が必要である。

本研究は神経外胚葉経脳腫瘍細胞に対するグルココルチコイドの効果を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった脳腫瘍細胞の種類により、同一濃度で増殖刺激と増殖抑制の正反対の効果が存在するという重要な知見を得たもので価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。