

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09283

研究課題名（和文）卵巣明細胞腺癌の三次元培養モデルを用いた化合物スクリーニング

研究課題名（英文）Compound screening using 3D culture of ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

山口 聡子（Yamaguchi, Satoko）

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：40609872

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、卵巣癌のうち、日本人で頻度が高く、既存の化学療法に抵抗性である、卵巣明細胞腺癌(CCC)に対する新規治療法を開発することである。特に、CCCの臨床像を再現した三次元培養のモデルでハイスループットスクリーニングを行うことと、ドラッグリポジショニングのために既知薬理活性物質のライブラリーを用いることを特徴とする。

まず、CCC細胞株の三次元培養モデルで、病理組織学的な特徴の再現を確認し、生存率アッセイ法を比較検討した。このCCCの3D培養系を用いて、東京大学創薬機構から化合物ライブラリーの提供を受け、既知薬理活性物質のハイスループットスクリーニングを行い、ヒット化合物を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌のうち、卵巣明細胞腺癌は、欧米と比較して日本人で頻度が高いが、現在の標準療法となっている化学療法には抵抗性であることが知られている。今回、卵巣明細胞腺癌の生体内での特徴により近いと考えられる、三次元培養を用いて、既知薬理活性物質のライブラリーのスクリーニングを行った。ヒット化合物は、今後さらに詳しい研究を行い、治療薬の候補となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research is to develop a therapy for ovarian clear cell carcinoma (CCC), which is relatively common among Japanese population and is resistant to current standard chemotherapy. This study takes advantage of 3D culture reflecting the pathological characteristics of CCC. Also, it utilises a validated compound library for drug repositioning. First, 3D culture model was established by confirming pathological characteristics of CCC. Viability assays were tested to determine the most suitable method. Then, a high throughput screening was performed using Validated Compound Library provided by Drug Discovery Initiative of the University of Tokyo, and hit compounds were identified.

研究分野：卵巣癌

キーワード：卵巣癌 三次元培養 明細胞腺癌

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは、婦人科悪性腫瘍の中で最も死亡者数の多い疾患であり、その数は我が国においても年々増加傾向にある。上皮性卵巣癌には4つの組織型がある。漿液性腺癌(SAC)が最も多く、欧米では7-8割程度、日本では4割程度を占める。明細胞腺癌(CCC)は、欧米では5%未満と稀であるが、日本では二番目に多く、25%を占める。病理組織型に関わらず、進行卵巣癌の治療の中心はプラチナ製剤とタキサン製剤を用いた化学療法であり、特にプラチナ製剤はキードラッグである。SACは播種しやすく進行期に診断されることが多いが、初期治療の奏効率は高い。一方、CCCは、早期に診断されることが多いにも関わらず、化学療法の奏効率が極めて低く、再発率も高いため、特に予後不良であり、CCCの新規治療法の開発は、喫緊の課題であった。CCCは、グリコーゲンの蓄積による明るい細胞質、ヒアルロン酸の蓄積による粘液腫様間質などの特徴的な病理組織像を呈し、遺伝子変異や遺伝子発現パターンもSACとは異なることが明らかになってきたことから、SACとは異なる治療法の探索が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、化学療法の奏効性が低いCCCの治療法として、既存の薬物療法とは全く異なる作用機序の化合物を同定することである。
3D培養系は2D培養と比較して生理的な生育条件を反映することが知られており、本研究では、CCCの生体内での病理組織学的な特徴や遺伝子発現パターンをより忠実に再現する3Dモデルを構築する。
また、臨床応用へのプロセスが比較的速やかと考えられるドラッグリポジショニングのため、既知薬理活性物質のライブラリーを用いる。

3. 研究の方法

1) 3D培養モデルの構築、スクリーニングの条件検討：3D培養法では、2D培養ではみられないCCCの病理組織学的な特徴が再現できることが報告されている。HTSに使用可能な3D培養条件でCCC細胞株のパラフィン包埋標本作製し、病理組織学的な特徴をHE染色、PAS染色などにより確認する。培地組成や培養期間、スフェロイドの大きさなどの培養条件による変化を検討し、最適な3D培養条件を確立する。また、生存率アッセイについても複数の方法を比較し、条件検討を行う。

2) 既知薬理活性物質ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニング

上記1)でCCCの臨床的特徴を最も反映すると思われる細胞株2種を選択し、1次スクリーニングを行う。3D培養でスフェロイドを形成させた後、既知薬理活性ライブラリーの化合物を一定の終濃度となるよう添加し、生存率アッセイを行う。比較として、2D培養でも同様に生存率アッセイを行う。

2次スクリーニングでは、2種類の細胞株に有効と考えられる化合物の有効濃度を決定し、不活化した卵巣上皮細胞などの非癌細胞での毒性を確認する。複数のCCC細胞株を用いて、より多くの明細胞腺癌の増殖を抑制する化合物を同定する。

4. 研究成果

1) 超低接着のプレートを用いて、ハイスループットスクリーニングに使用できるCCCの三次元(3D)培養モデルを確立した。パラフィン包埋標本で、HE染色、PAS染色などにより、HE染色で細胞質が明るく、PAS染色陽性など、CCCの病理組織学的な特徴を有することを確認した(図1)。

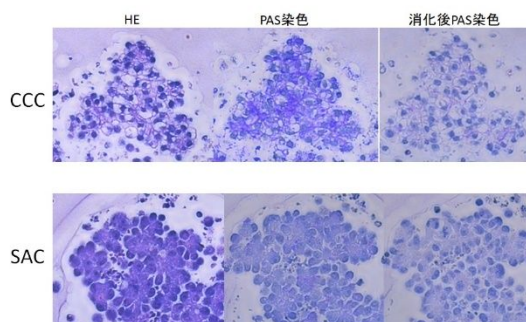


図1. 明細胞腺癌(CCC)と漿液性腺癌(SAC)の3次元培養の染色
CCCではHE染色で細胞質は明るく、PAS染色陽性である。

三次元培養の生存率の評価方法として、複数の定量的な方法を比較し、MTS法が比較的成本も低く、三次元培養の生存率を良好に反映することがわかった(図2)。

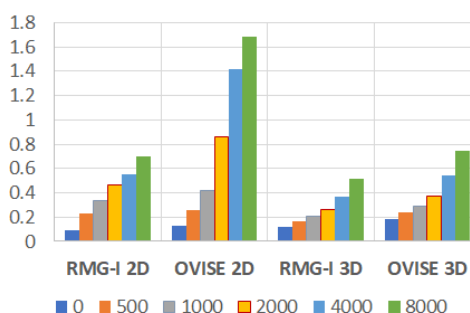


図2. MTS法による2D, 3D培養系の生存率アッセイ

2) 東京大学創薬機構から既知薬理活性物質のライブラリーの提供を受け、2種類のCCC細胞株で、1)の三次元培養系、および通常の二次元培養系でハイスループットスクリーニングを行った。約1500種類の化合物について、三次元培養系および二次元培養系でスクリーニングを行った。多くの化合物について、三次元培養系と二次元培養系では薬剤感受性が異なることが示された。1次スクリーニングで活性がみられた300種類超で再現実験を行い、122種類の化合物を同定した。このうち日本で認可されている薬剤は74種類、うち29種類が抗悪性腫瘍薬、45種類が非抗悪性腫瘍薬であった。これらの薬剤について、有効濃度の決定、4種類のCCC細胞株と1種類の漿液性腺癌(SAC)細胞株を加えた全7種の細胞株での感受性試験や、卵巣表層上皮の非がん細胞を用いた毒性の評価を含む、さらに詳細な解析を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------