

機関番号：12102
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591923
 研究課題名(和文) 抗癌剤に高感受性の卵巣癌由来細胞株の樹立及び抗癌剤治癒モデルの創出
 研究課題名(英文) The establishment of a novel 'real paclitaxel-sensitive' cell line from a patient suffered from IV stage-ovarian carcinoma.
 研究代表者 沖 明典 (OKI AKINORI)
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
 研究者番号：60334067

研究成果の概要(和文)：

通常治癒することが難しい、IV期卵巣癌の患者から腫瘍を摘出した際に細胞培養を行い、細胞株を樹立した。その後化学療法を主体とした集学的治療により卵巣癌が完治したが、治癒に至った原因を検討するべく、抗癌剤の感受性試験を行ったところ、通常の投与量の1000分の1程度で細胞が傷害され、非常に抗癌剤感受性癌細胞であることが判明した。この細胞株を用いて、抗癌剤に対する「高感受性」という絶対的な基準を創出することが可能になったと思われる。

研究成果の概要(英文)：

Although CBDCA/Paclitaxel (PTX) therapy (CP therapy), or new anti-neoplastic agents such as topotecan and doxil contribute to some improvement on the survival of advanced ovarian carcinomas, it is far from complete control of the disease. However, many of us have been experienced dramatic clinical complete response (CR) cases that resulted to be cured by intensive combination therapy. This is a streak of hope for not only patients, but us as the cancer therapists.

A novel cell line, named Opt203 was established from a patient who was suffered from IV stage ovarian carcinoma and successfully treated with 10 courses of CP therapy and two times of interval cytoreductive surgeries, resulted to complete response and maintained the status of no evidence of recurrence (NER) for 20 months. In the study of the characterization of this cell line, we found that Opt203 was very chemo-sensitive against many anti-neoplastic agents, especially paclitaxel (PTX). This result is closely concerned to the clinical course of the original patient. Thus Opt203 line was regarded as "real PTX-sensitive" cell line, and would be a bench mark of PTX sensitive cell line *in vitro*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：卵巣癌、細胞株、抗癌剤感受性、パクリタキセル

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍、一般的にがんと言われる疾患の治療法は、主に手術療法・放射線療法・化学療法があり、進行がんにおいてはこれらを組み合わせる集学的治療が行われるが、特に原発臓器から遠隔臓器へ転移を来した場合は、延命することはできても治癒する可能性は低いと言わざるを得ないのが現状である。

遠隔転移を来した場合は、手術や放射線療法のように、腫瘍の存在する局所を制御する治療法よりも、抗癌剤を全身投与する化学療法が優先的に選択されるが、その効果は実際に抗癌剤を投与してみないわからず、有効薬剤が同定できずに、病状が進行して治療終了となる症例はしばしば経験される。

卵巣がんを筆頭とした婦人科悪性疾患は比較的化学療法が有効とされるが同様の症例は数多く、現在個々のがん症例で事前に有効な治療薬剤を決定して化学療法を行う、テーラーメイド化学療法が模索されているが、未だに確立されていないのが現状である。

2. 研究の目的

そもそも、化学療法の奏功ということはどういうことなのだろうか？ 文献ではある種の薬剤に対して耐性の細胞とか、感受性の細胞という言葉が出てくるが、この耐性・感受性という言葉の定義が判然としない。今回我々はその、「抗癌剤感受性」という言葉に対して、「ある化学療法で治癒することが可能な程度に薬剤で傷害される」というがん臨床で有意な定義と規定し、実験室で日常的に行われる実験系で、抗癌剤感受性を再現することを通して今後の臨床での薬剤選択に役立つ基準となることを目的とした。

この目的を遂行するために以下の順番で課題を策定した。

- (1) 主に化学療法が奏功して治癒した IV 期卵巣癌症例からの細胞株(TX0 203)の樹立
- (2) TX0 203 からの亜株の樹立
- (3) TX0 203 及びその亜株の *in vitro* での薬剤感受性
- (4) *in vivo* 実験系へ

3. 研究の方法

(1) 症例は 40 歳代で左鎖骨下リンパ節転移陽性の IV 期卵巣癌症例。初回手術（膈上部切断術＋両側付属器切除術：suboptimal、残存腫瘍径 5cm）後 3 コースの TC (PTX*CBDCA) 療法を施行したところ、画像検索で残存腫瘍は消失し（図 1）、interval debulking

surgery で pathological CR と判明した。TC 療法を 7 コース追加後 5 年以上無病生存中で卵巣癌は治癒したものと判定した。

症例の画像経過

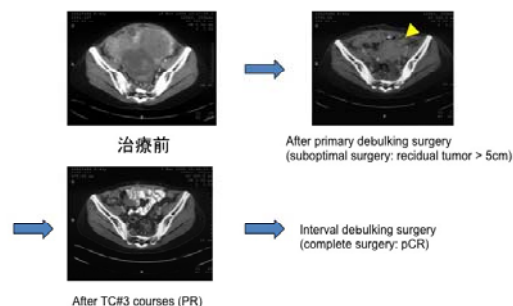


図 1

本症例の初回治療時の原発巣 (20cm 径) から本人同意のもと、採取された腫瘍組織を細切して培養液 (DMEM+HAM F12+10% FBS) に添加して初代培養を行った。病理検査の結果は未分化癌 (undifferentiated carcinoma) だった。腫瘍組織は当初間質細胞と同時に増殖していたが、腫瘍細胞はより増殖力が旺盛だったため、継代を重ねる内に腫瘍細胞のみの集団となり、現在まで 200 代を越えて増殖を続けており、無限増殖系の細胞株の樹立と判定し、TX0 203 と命名した (図 2)。

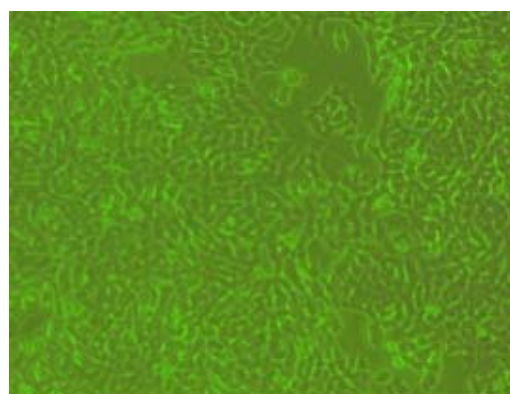


図 2 TX0 203

(2) TX0 203 は非常に大きな腫瘍組織から採取された組織由来の細胞株であり、様々な性質を持った細胞の混合した細胞集団であると考えられる。そこで、この細胞集団を単細胞に戻して同一の細胞からなる、単一 clone の細胞亜株を作成

した。TXO 203 を単細胞となるように十分にトリプシン処理を行って 1cell/ml の濃度の懸濁液を作成した。これを 96 well の microtiter plate に 0.1 cells/well となるように分注し、3 週間培養した(限界希釈法)。そこで検鏡して細胞集団が観察された well からトリプシン処理を行い細胞を回収し継代した。この方法で 10 種の亜株を作成した。

また、TXO 203 に 0.1 μ g/ml の PTX を 1 時間接触させてからうじて生存した細胞を継代し、1 年ごとに同濃度の PTX を接触させて PTX 耐性となった TXO 203R を PTX 耐性株として作成した。

(3) TXO 203 の in vitro での薬剤感受性を確認するために、WST-1 assay を行った。96well の microtiter plate に TXO-203 を 3000 cells/well で撒き、正着後に PTX を 0.01-10 μ g/ml で 1-48 時間の 6 段階で接触させた。2 日後に WST-1 assay によって、PTX 未接触のコントロールに対する生細胞の比率 (survival fraction: SF) を求め、各接触時間毎に 50% 発育阻止濃度 (IC50) を求めた。ここで、IC50 の濃度とその接触時間の積で求められた、50% 細胞阻止時の実験的濃度時間積 ((experimental) eAUC) と実際の人体に PTX が投与されたときに得られている実測 AUC (AUC) を比較して、eAUC が AUC を下回っている場合を感受性ありと判定する定義を用いて判定した。

本法を用いて、PTX に対して感受性として報告されている細胞株また、薬剤耐性として知られている卵巣明細胞腺癌株を用いて PTX に対する各種細胞株の感受性を判定した。

同様に TXO 203 の亜株でも同様に判定した。また、TXO 203 の他抗癌剤に対する感受性検査も行い、本細胞株の一般的な化学療法感受性を検討した。

(4) nude mouse (BALB-C nu/nu) 皮下に TXO 203 を 10^7 個皮下注射し、マウスに対する造腫瘍性を確認した。

同様に亜株に対する造腫瘍性も検討した。

4. 研究成果

(1) TXO 203 の樹立

TXO 203 の諸性格

① 増殖曲線 (図 3)

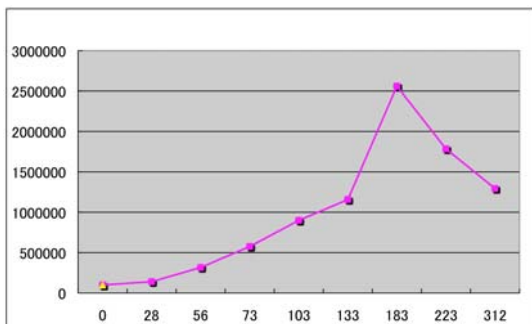


図 3 TXO 203 の増殖曲線

TXO 203 は安定した増殖で対数増殖し、confluent となったあとで培地中に浮遊するようになり、徐々に減少傾向となる。Saturation density は概ね 3.54×10^5 /cm² で細胞倍加時間は 15 時間であった。

② 造腫瘍性

TXO 203 はヌードマウスの背部に容易に腫瘍を形成した。腫瘍は原腫瘍に類似する、小型で多稜型、細胞間の結合は緩く存在するものの、腺などへの分化傾向に乏しく、核異型が高度で比較的 N/C 比の高い細胞集団である (図 4)。

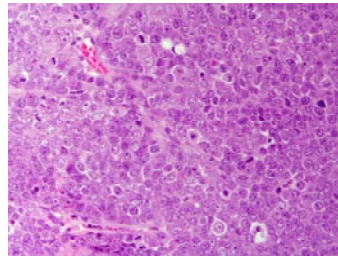


図 4 x400

③ 腫瘍マーカー分泌能

卵巣癌で高頻度に分泌される腫瘍マーカーである CA125, CA19-9 はほとんど分泌されておらず、少量の NSE が検出された

(2) TXO 203 亜株の樹立

限界希釈法で生育してきた microtiterplate の番号に準じて、2C11, 4C5, 6G5, 6D11, 6D12, 7C12, 7E1, 7F3, 7F9, 8G1 の 10 株が樹立された。いずれも、もともとの TXO 203 が様々な形態をした細胞が混在しているのと異なり、比較的特徴的な形態をしていた (図 5)

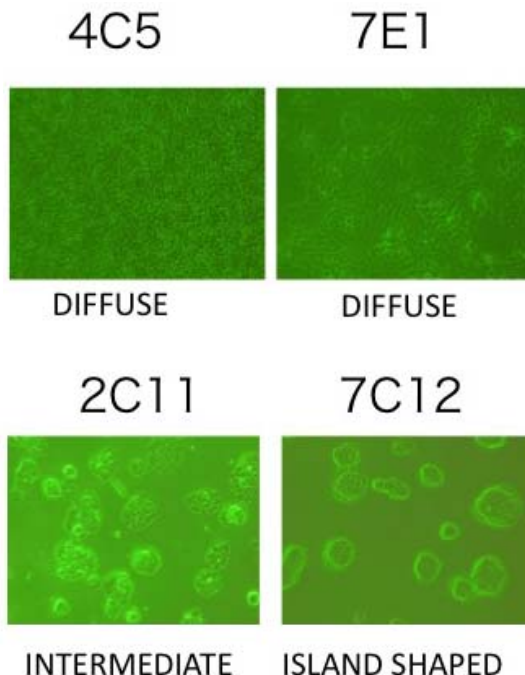


図 5 subclone の形態例 (diffuse 型と Island 型の相違)

これらの clone は細胞を seed して 3 日後の形態を撮影しているが、seed 当初から細胞個々が独立して存在し、互いに独立して増殖しながら、sheet 状に増殖するもの (Diffuse)、また、seed 当初から細胞が島状に増殖して増殖するもの (Island)、またその中間のもの (Intermediate) に分類できた。各々をヌードマウスに移植すると、原細胞株では未分化であるものが、clone によっては腺管を形成しているように見える部位もあり、未分化ながらも、分化傾向を示す部位が認められ、主に Island 型の clone で腺への分化を示唆する所見が認められた (data not shown)

(3) TX0 203 と、subclone の薬剤感受性

① TX0 203 の薬剤感受性

原症例では PTX と CBDCA を投与して CR となった。また、当初は再発時の 2nd, 3rd line に用いる薬剤を選択する目的で 19 種類の抗癌剤を用いて WST-1 assay を行った。例として感受性と判定された PTX に対する raw data を示す (図 6)。

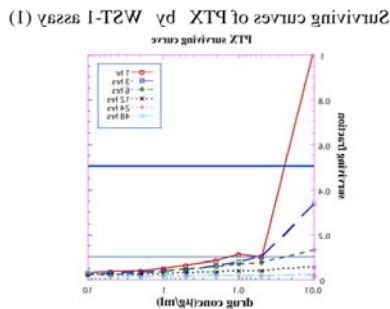


図 6 TX0 203 の PTX 感受性

接触時間を 1~48 時間の 6 グループとして接触濃度を 0.01-10 μg/ml の 9 濃度として細胞生存曲線を描いたが、最小濃度で、最短接触時間以外はほとんどの細胞が死滅していた。より詳しい data をとるために、接触時間を 1-60 分 (濃度を 0.5, 10 μg/ml に固定) と、濃度を 0.0001-0.1 μg/ml に変更して追試したものが、図 7, 8 である。これからわかることはこれを実際の臨床では血液濃度を細胞接触濃度と仮定した場合に実測された AUC 曲線と比較してみると、接触時間 1 時間での IC50 値は 0.005 μg/ml であり、また、濃度を 0.5, 10 μg/ml とした場合の IC50 値はそれぞれ 50 分、30 分だった。

Surviving curves of PTX by WST-1 assay (2)

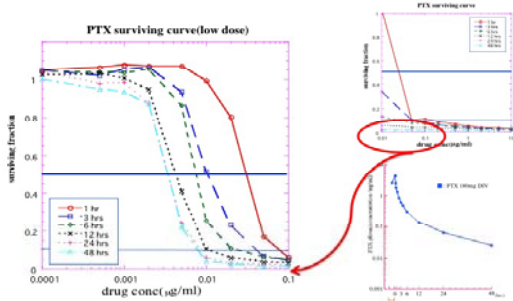


図 7 低 PTX 接触濃度での WST-1 assay

これらの値から、eAUC を求めると、0.05, 0.61, 5 μg · hr/ml となった。

Surviving curves of PTX (short time)

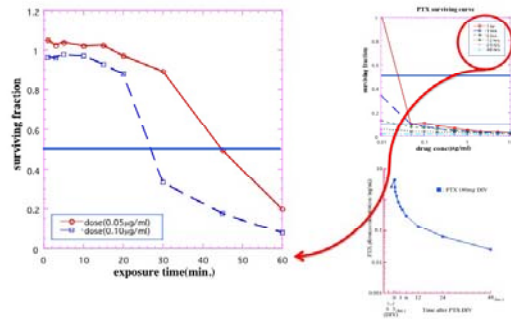


図 8 短 PTX 接触時間での WST-1 assay

ここで、PTX の AUC を薬剤の臨床試験 data から参照すると (薬剤添付文書より) 我々が日常臨床で投与する 180mg/m² では最高血中濃度は 55 μg/ml、AUC は 16.5 μg · hr/ml であり (図 9)、前述のいずれの条件で得られた eAUC よりも高値であり、TX0 203 は PTX 感受性と判定された。さらに、特に 1 時間接触時の eAUC は 0.05 μg · hr/ml であり、実に臨床投与量に比して 1/330 であることが判明した。また、IC50 のかわりに 90% 細胞阻止濃度 IC90 で eAUC を求めても、AUC の 1/100 以下であることがわかった (図 10)。以上から TX0 203 は非常に増殖が旺盛であるが PTX に対して非常に高感受性で会ったことが、実際の臨床において IV 期卵巣癌の治療に寄与したものと考えられた。

Area under the curve(AUC) of PTX

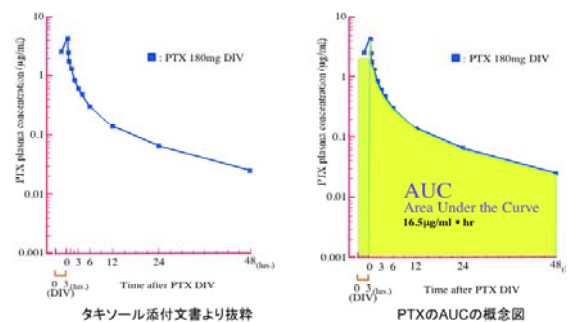


図 9 PTX の AUC

Experimental AUCs (eAUCs)

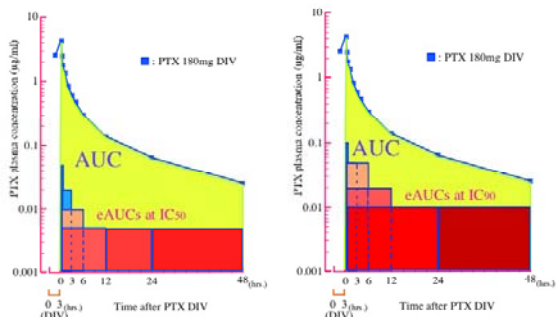


図 10 IC50, IC90 時の eAUC と AUC の比較 (縦軸が対数目盛であることに注意)

同じような手法を用いて 19 種類の抗癌剤に対して WST-1 assay を行い、各々の薬剤投与量での AUC と eAUC を比較した(表 1)。

これによるとオレンジで示された薬剤 14 薬剤で感受性、また、5 薬剤で耐性と判定された。ここで、重要な点は今回臨床で投与された、PTX と CBDCA では後者が耐性と判定されることから、薬剤相互作用については検討する必要があるものの、主な薬効は PTX によってえられたものと推察された。

さて、このように非常に増殖力が旺盛な腫瘍細胞では絶えず細胞に突然変異が生じる可能性がある。WST-1 assay で TXO 203 は PTX で 99%以上の細胞が死滅していることが示されたが、一つ一つの細胞間で微妙な薬剤

各種抗癌剤に対する感受性

drug supplyer	MTD	AUC µg/ml·hr	IC ₅₀ 達成時の各接触時間での薬剤濃度							
			1	3	6	12	24	48		
PTX Bristol-Myers/ Nippon Kayaku	175mg/m ²	16.5	0.05	0.02	0.01	0.005	0.005	0.005		
DOC Aventis	75mg/m ²	3,514	0.5	0.1	0.01	<0.01	<0.01	<0.01		
ETP Nippon Kayaku	360mg/body	270.4	1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1		
CDOP Nippon Kayaku	120mg/body	505.1	2	1	0.5	0.5	0.2	0.5		
CBDCA Bristol-Myers	3450g	200	100	50	10	10	5			
TS4-S Shionogi	100mg/m ²	30	-	10	5	2	0.5	1		
ADM Kyowa	60mg/body	5.45	1	0.5	0.1	0.1	0.05	<0.01		
THP Kyowa	40mg/m ²	1.58	0.05	0.05	0.05	<0.01	<0.01	<0.01		
EPI Nippon Kayaku	165mg/m ²	2.59	0.2	0.05	0.05	<0.01	<0.01	<0.01		
AMR Nippon Kayaku	45mg/m ²	13.49	1	0.5	0.5	0.1	0.1	0.1		
MNC Kyowa	20mg/m ²	1	0.5	0.1	0.05	0.05	<0.01	<0.01		
SN-38 Daiichi-Sankyo	340mg/m ²	0.714	-	-	-	10	2	1		
NOG Nippon Kayaku	1.5mg/m ²	0.0842	0.2	0.1	0.2	0.01	0.005	0.005		
S-FU Kyowa	370mg/m ²	13.61	-	-	10	5	2	2		
VCR Nippon Kayaku	2mg/m ²	0.334	0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01		
HL-CPA Shionogi	20mg/kg	4.66	5	1	1	1	1	1		
IFM Shionogi	5g/m ²	>1000	10	5	5	5	5	2		
BLM Nippon Kayaku	30mg/m ²	6.37	5	2	1	0.5	0.5	0.1		
DTIC Kyowa	750mg/m ²	14.8	-	-	-	-	-	-		

PTX, CBDCAはMTDではなく、TC療法時の投与量換算

表 1 TXO 203 の感受性

感受性に違いがあるとすると、突然変異で耐性が自然に誘導される可能性があると考え、monoclonal である、10 種の clone における PTX 感受性を同様の方法で検討した。この結果、10 種の clone においてほとんど IC50 値で差はなく、感受性を示した(data not shown)。このように、実際に投与されて体内に到達した薬剤濃度に比して十分に低濃度で傷害される細胞では、体内で突然変異によって若干の耐性を獲得した細胞であっても淘汰され本症例のように治癒したものと考えられた。

さて、本研究で用いた、感受性の判定基準の妥当性を婦人科腫瘍由来の細胞株を用いて検討した。PTX 感受性として、開発当初から用いられている卵巣癌由来 A2780、また代表的な子宮頸癌由来 HeLa S3、と薬剤抵抗性癌の代表である卵巣明細胞腺癌由来細胞株である RMG-1、HAC-1、TXO 46 と、TXO 203 を加えた 6 株で WST-1 assay を行ったが、結果は明細胞腺癌の 3 株が耐性で、残り 3 株が感受性という結果であり(表 2)、我々が用いた判定の定義の妥当性を示している。

興味深いことに、IC90 濃度の接触で生き残った細胞を定期的に低濃度の PTX で刺激した TXO 203R は PTX に対して非常に強い耐性を獲得している(data not shown)。耐性獲得までに 2 年以上の培養時間を要したが、この細胞株の耐性機序を検討することは、特に PTX 耐性に対するメカニズムの解明に役立つものと考えられるが、今後の大きな課題である。

婦人科腫瘍由来細胞株の PTX 感受性

	MTD	AUC µg/ml·hr	cell line	IC ₅₀ 達成時の各接触時間での薬剤濃度			
				1	3	6	12
PTX	175mg/m ²	16.5	TXO203	0.05	0.01	0.01	0.01
			A2780	0.05	0.05	0.05	0.05
			RMG-1	-	-	10	-
			HAC-2	-	-	-	5
			TXO46	-	-	-	5
			HeLa S3	0.05	0.05	0.05	0.01

感受性判定: 感受性 border 耐性

表 2

結語

進行例の癌患者に抗癌剤を投与して腫瘍が縮小もしくは消失することは、我々婦人科医は比較的多く経験する。しかしながら、このような症例では通常、全身状態が不良だったり、手術療法の適応がないとされているために、化学療法前に手術を行うことは稀である。本症例は非常に急速に進行した呼吸不全を軽減する目的で姑息的な手術が施行され、生死の間をさまよいながら化学療法を行い、治癒した症例であり、臨床担当医としても奇跡的という言葉が非常に当てはまる症例であった。また、このような症例から細胞株が樹立されたこともある種奇跡的な出来事である。このような実験材料に対して、本症例の当事者の患者さんは快く実験材料としての提供を承諾してくださり、今回の仕事につながった。これまで、経験的もしくは、獲得された耐性株との相対的な評価のなかで薬剤高感受性という言葉が使われていたが、本症例・TXO 203 を通じて絶対的な薬剤高感受性の基準が定まったことは、今後の化学療法に対する、感受性検査のあり方を大きく変える可能性がある。更に研究を重ねて臨床応用につながる成果を上げていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. K. Matsumoto, A. Oki, T. Satoh, S. Okada, T. Minaguchi, M. Onuki, H. Ochi, S. Nakao, M. Sakurai, A. Abe, H. Hamada, H. Yoshikawa: Interleukin-10 21082 Gene Polymorphism and Susceptibility to

- Cervical Cancer Among Japanese Women Jpn J Clin Oncol 40(11): 1113-1116, 2010 査読有
2. YO Tanaka, S. Okada, T. Yagi, T. Satoh, A. Oki, H. Tunoda, H. Yoshikawa: MRI of Endometriotic Cysts in Association With Ovarian Carcinoma. Am J Roentgenol 194(2): 355-361, 2010 査読有
 3. T. Satoh, K. Matsumoto, K. Uno, M. Sakurai, S. Okada, M. Onuki, T. Minaguchi, YO Tanaka, S. Homma, A. Oki, H. Yoshikawa: Silent venous thromboembolism before treatment in endometrial cancer and the risk factors. Br J Cancer 99 (7): 1034 -1039, 2008 査読有

[学会発表] (計2件)

1. 沖 明典、安部 加奈子、田中 勝洋、岩城 真奈美、安倍 梓、中尾 砂理、小貫 麻美子、水口 剛雄、岡田 智志、松本 光司、佐藤 豊実、吉川 裕之: 化学療法で完全寛解(CR)した進行卵巣癌由来細胞株からの単細胞クローン株の樹立、第62回日本産科婦人科学会学術講演会(東京)4月23日~25日, 2010
2. 沖 明典、田坂 暢崇、中村 優子、櫻井学、安倍 梓、中尾 砂理、小貫 麻美子、水口 剛雄、岡田 智志、松本 光司、佐藤 豊実、吉川 裕之: PTX/CBDCA(TC)療法で寛解した卵巣癌IV期症例由来の癌細胞株の樹立とその抗癌剤感受性、第47回日本癌治療学会学術集会(横浜)10月22日~24日, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖 明典 (OKI AKINORI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号: 60334067

(2) 研究分担者

吉川 裕之 (YOSHIKAWA HIROYUKI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号: 40158415