

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月28日現在

機関番号：84409

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22791240

研究課題名（和文） 新しい癌細胞初代培養系（CTOS法）を用いた放射線感受性試験の確立

研究課題名（英文） Establishment of radio sensitivity assay with a novel primary culture system from cancer patients

研究代表者

遠藤 洋子（Hiroko Endo）

地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪府立成人病センター（研究所）研究所・研究員

研究者番号：20359300

研究成果の概要（和文）：

我々の研究室では、新しいがん細胞初代培養系を確立し、Cancer Tissue-Originated Spheroid法；CTOS法として報告した。本研究では、肺癌のCTOSを用いて放射線感受性試験の確立を試みた。In vitroでCTOSにX線を照射すると、患者間に放射線感受性の差が認められた。この感受性の差は、in vivoの放射線治療応答性を反映していた。臨床検体を用いた感受性試験として、個別化医療につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：

We reported a novel primary culture system, Cancer Tissue-Originated Spheroid (CTOS) method. In the present study, we tried to establish the radio sensitivity assay using CTOSs from lung cancer patients. CTOSs from different patients showed a variety of radiosensitivity, which reflected the therapeutic effect in mice tumors. CTOS would be applicable for predicting individual radio sensitivity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成23年度	900,000	270,000	1,170,000
平成24年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

放射線治療はがん治療に広く用いられている治療法であるが、癌の種類によってはその治療効果・副作用の程度に個人差があり、治療効果を事前に予測することは困難である。放射線治療の有効性・安全性を高めるためにも、治療効果予測のための効率的な評価

系の確立が望まれている。

我々は、新しいがん細胞初代培養系をプラットフォームとして、臨床検体を用いた放射線感受性試験を確立することを試みた。

2. 研究の目的

新しく開発した癌細胞初代培養系（Cancer Tissue-Originated Spheroid法；CTOS法）を用

いて放射線感受性試験を確立することを目的とした。

放射線治療効果を予測するための CTOS 評価系を確立し、個別化診療へつなげることを目標とした。

また、CTOS を用いて放射線化学療法の効果および低酸素標的 radiosensitizer の効果を検証し、臨床検体を用いた薬剤評価のプラットフォームを作製することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)CTOS の調製

大阪府立成人病センターにてインフォームドコンセントにより同意を得られた患者より、肺癌の臨床検体の供出を受けた。外科的手術検体をスカルペルにて 1mm 角程度に細分化し、Hank's balanced salt solution (HBSS)で洗浄して夾雑物を取り除いた。検体を 100mL の蓋付き三角フラスコに移し、0.26U/mL Liberase DH (Roche ; 5401089)を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)中で 37°C 1 - 2 時間、マグネットスターラーにて攪拌した。酵素的に分散された検体を 500 μ m, 250 μ m の金属メッシュに通し、大きな断片を取り除いた。その後、さらに 100 μ m, 40 μ m のセルストレイナー (BD FALCON)を通過させ、セルストレイナーの上に残った小断片 (Organoid)と、セルストレイナーを通過した flow through をそれぞれ別のチューブに回収した。HBSS で各分画を洗浄したのち、non-treated dish (EIKEN)にて StemPro® hESC (GIBCO)中で培養した。

肺癌胸水の検体は、50mL チューブに分注したのち 200xg で遠心して、ペレットを 40 μ m のセルストレイナーに通した。その後、外科的手術検体と同様に細胞の回収、培養を行った。

(2)CTOS を用いた放射線感受性試験

CTOS をマトリゲル growth factor reduced (GFR)に包埋し、StemPro で培養した。X 線照射装置 (日立)にて X 線を照射した。放射線感受性は、7 日間の CTOS 面積の増大率で評価した。

(3)免疫不全マウスを用いた放射線治療実験

ヌードマウスに CTOS を移植し、移植腫瘍を形成させ、5Gy の X 線を照射した。照射部位以外は、銅板で遮蔽した。

4. 研究成果

(1)肺癌 CTOS 培養系の確立

調製直後の Organoid 分画には多数の癌組

織の小断片が存在するが、StemPro® hESC 中で O/N 培養すると、spheroid 状の癌細胞塊が形成されることが観察された (図 1)。胸水検体は酵素処理を必要とせず、遠心と filtration にて同様の spheroid 状の細胞塊が得られた。我々は、この癌細胞塊を Cancer Tissue-Originated Spheroid ;CTOS と名付けた。

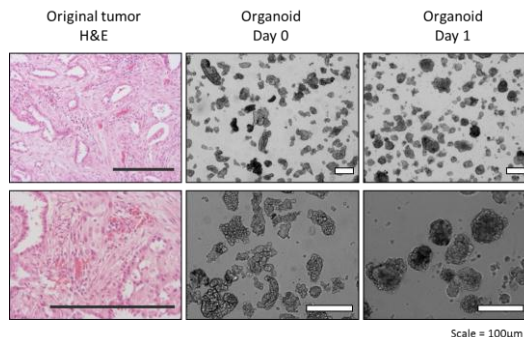


図 1. 肺癌症例からの CTOS 調製 (Endo 2013 JTO)

CTOS を構成する細胞を、免疫組織学的染色にて検討した。original tumor に α -SMA 陽性の myofibroblast や CD68 陽性の macrophage が含まれるのに対し、CTOS は E-cadherin 陽性の上皮細胞のみで構成されていた (図 2)。これらのことから、CTOS は高い純度の上皮細胞で構成されていることが明らかとなった。

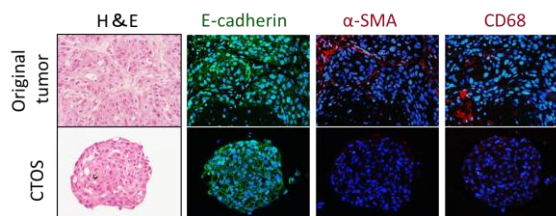


図 2. Original tumor および CTOS の免疫染色。E-cadherin (緑)、 α -SMA (赤)、CD68 (赤) (Endo 2013 JTO)

肺癌手術症例 125 例のうち、100 例 (80.0%)、および肺癌胸水 18 例のうち 8 例 (44.4%) 検体より CTOS の調製が可能であった。

肺癌 CTOS を免疫不全マウスに移植すると、33.3% (6 例/18 例) の割合で移植腫瘍を形成した。得られた移植腫瘍は、由来する患者の臨床検体と同様の組織型を示した (図 3)。

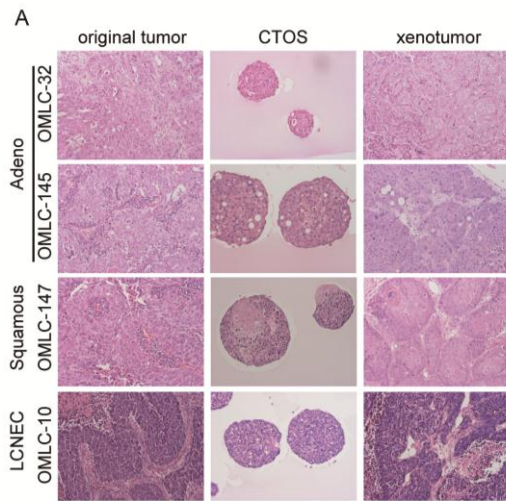


図 3. Original tumor (左)、CTOS (中央)、マウス移植腫瘍 (右) の HE 染色。(Endo 2013 JTO)

(2) CTOS を用いた in vitro 放射線感受性試験

肺癌症例 7 症例より得られた CTOS を用いて、in vitro の放射線感受性試験を実施した。放射線の用量依存的に CTOS の面積増大率が低下した (図 4)。また、放射線感受性には検体間で差が認められた。

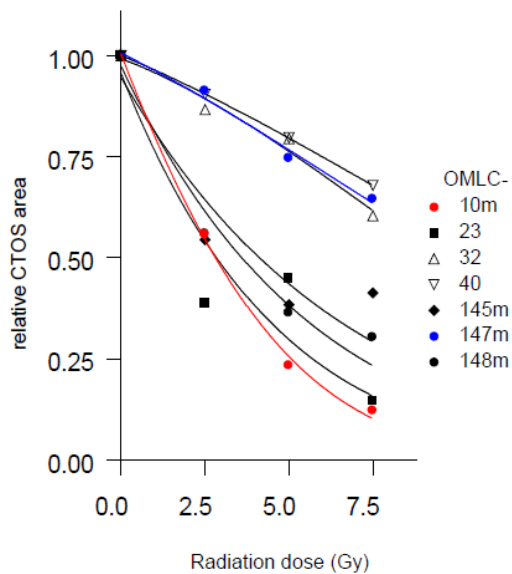


図 4. 肺癌 CTOS 7 症例の in vitro 放射線感受性試験

(3) in vivo 放射線治療実験

In vitro の放射線感受性試験が in vivo の治療応答性を反映するかどうかを調べるため、ヌー

ドマウスに CTOS を移植して腫瘍片を作製し、X 線を照射した。5Gy 照射後の腫瘍増大率を経時的に観察したところ、in vitro で放射線感受性が高いと予想した症例 (OMLC-10) は腫瘍径の縮小が認められた (図 5)。これに対して、in vitro の感受性試験で放射線抵抗性であると予想した症例 (OMLC-147m) は X 線照射後も腫瘍径の縮小は見られず、継続的に腫瘍が増大した。少なくともこれら 2 症例において、in vitro の放射線感受性試験が in vivo の治療応答性を反映していることが示された。

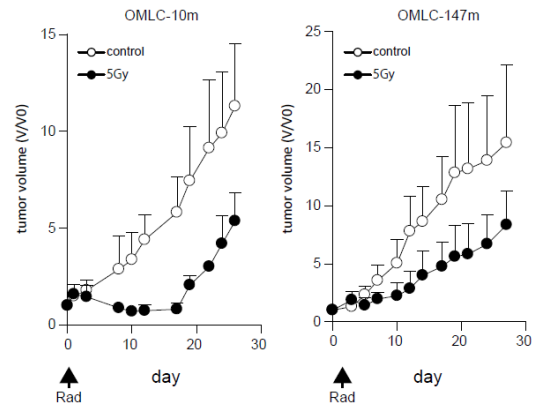


図 5. 肺癌 CTOS 移植腫瘍 2 症例の in vivo 放射線応答性。Day0 に 5Gy を照射し、腫瘍増大率 (V/V0) で評価した。(n=4)

以上のことから、肺癌 CTOS が in vitro, in vivo の放射線感受性試験に応用可能であることが示された。また、CTOS は in vitro の放射線増感剤のプラットフォームとして応用可能であると考えられる。子宮頸癌 CTOS を用いて数種類の薬剤と放射線の併用を行ったところ、mTORC 阻害剤に放射線増刊作用があることが示された (未発表データ)。

癌細胞の放射線治療に対する応答、また放射線増感剤のスクリーニングは、従来癌細胞株を用いて行われてきた。しかし、癌細胞株は長年血清含有培地で継代され、遺伝子変異が蓄積している。また、増殖に特化した癌細胞が選択されているため、様々な増殖動態を示すと考えられる腫瘍組織全体の放射線感受性を反映することが困難である。これに対して、CTOS 法は、患者検体を用いて直接放射線感受性試験を実施できることや、癌組織の heterogeneous を反映していることから、より臨床に近いプラットフォームとなりうると思われる。今後、臨床治験と組み合わせることで、臨床の放射線治療成績と CTOS の放射線感受性データを比較し、実証する必要がある。

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) Endo H, Okami J, Okuyama H, Kumagai T, Harada J, Kondo J, Takehara T, Nishizawa Y, Imamura F, Higashiyama M, and Inoue M

Spheroid Culture of Primary Lung Cancer Cells with Neuregulin 1/HER3 Pathway Activation

Journal of Thoracic Oncology 査読(有)、2013, 2, 131-9

doi: 10.1097/JTO.0b013e3182779ccf

- (2) Okuyama H, Yoshida T, Endo H, Nakayama M, Nonomura N, Nishimura K, and Inoue M

Involvement of heregulin/HER3 in the primary culture of human urothelial cancer. **J. Urol.** 査読(有)、2013 Epub ahead of print

doi:pii: S0022-5347(13)00008-6

- (3) Kondo J, Endo H, Okuyama H, Ishikawa O, Iishi H, Tsujii M, Ohue M, and Inoue M

Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer

Proc Natl Acad Sci U S A 査読(有)、2011;108:6235-40

doi: 10.1073/pnas.1015938108

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 遠藤 洋子 A novel primary culture system of cancer cells from lung cancer patients
第 69 回日本癌学会学術総会、平成 22 年 9 月 24 日、大阪国際会議場
- (2) 遠藤 洋子 Prediction of therapeutic effect of EGFR TKI on lung cancer by a novel primary culture system
第 70 回日本癌学会学術総会、平成 23 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場
- (3) 遠藤洋子 低酸素によるがん細胞休眠状態の誘導
第 9 回がんとハイポキシア研究会、平成 23 年 11 月 26 日、学習院大学目白キャンパス

- (4) 遠藤 洋子 Hypoxia-induced tumor dormancy promotes cell survival through suppression of energy metabolism.

第 71 回日本癌学会学術総会、平成 24 年 9 月 20 日、ロイトン札幌

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

大阪府立成人病センター ホームページに掲載

<http://www.mc.pref.osaka.jp/omc2/biochemistry.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 洋子 (Hiroko Endo)

地方独立行政法人 大阪府立病院機構

大阪府立成人病センター (研究所)・

研究所・研究員

研究者番号：20359300

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし