

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592448

研究課題名(和文) 新しい細胞塊培養による婦人科癌の抗癌剤感受性試験の確立と応用

研究課題名(英文) Establishment and application of cancer-tissue originated spheroids(CTOSs) of gynecologic cancer

研究代表者

吉野 潔 (Yoshino, Kiyoshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90362730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：婦人科癌の患者に対し予め薬剤感受性を調べることにより効果の期待できる薬剤の選択ができれば大きなメリットがある。本研究は手術で摘出した癌細胞を塊のまま培養するCTOS (cancer tissue-originated spheroid) を用いて薬剤感受性試験を確立し、治療方針決定に役立てることを目的として研究を行った。その結果子宮体癌のうち漿液性腺癌は高率にCTOSが作製・維持されることが明らかとなった。また癌の増殖に関係するシグナルを阻害する薬のうち、mTOR阻害剤、NF-κB 阻害剤による増殖抑制効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：Drug sensitivity test for the patient of gynecology cancer by checking beforehand may give a merit. The aim of this study is establishment of a drug sensitivity examination using CTOS (cancer tissue-originated spheroid) which cultured the cancer cell extracted by an operation. As a result, it was revealed that among endometrial cancer, CTOS derived from the serous adenocarcinoma was prepared and maintained with high success rate. In addition, among the drugs which inhibit a signal related cancer growth, mTOR inhibitor, NF-κB inhibitor showed moderate activity.

研究分野：医歯薬学

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：婦人科腫瘍学 初代培養 子宮体癌 漿液性腺癌 薬剤感受性 3次元培養 CTOS spheroid

1. 研究開始当初の背景

婦人科領域の難治性癌の治療戦略において抗癌剤治療および分子標的治療は重要な役割を果たしている。現在、治療薬の選択は過去の臨床データの蓄積によって行われているが、個々の患者に対し予め感受性試験を行うことにより効果の期待できる治療薬が投与できれば患者および医療サイドの双方に大きなメリットがある。

2. 研究の目的

当研究は、新たに開発された初代培養法：CTOS(cancer tissue-originated spheroid)を婦人科腫瘍に応用し、薬剤感受性試験を確立し難治性婦人科悪性腫瘍患者の治療方針決定に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

腫瘍から得られた組織を細胞-細胞間の接着を保持したまま無血清培地で上皮塊のみを調製・培養することでCTOSを調整する。すなわち手術検体より得られた組織を機械的、酵素的に処理し、細胞塊を調製する初代培養法であり詳細は近藤らにより報告されている(PNAS, 2011)。これらの細胞塊は、24時間以内に spheroid を形成し、これを無血清培地内で培養・増殖させる。培養液に癌増殖に関連したシグナル伝達阻害剤を加えて、96well plate に分注し、浮遊培養しているCTOSを1wellに1個ずつ移して1週間培養する。Cell Titer-Glo™ を使用して蛍光 assay によりそれぞれの細胞の生物活性を測定し、薬剤暴露時の断面積により標準化して、薬剤感受性を測定した。

4. 研究成果

99例の子宮体がん組織から93例(94%)と高率にCTOS形成が認められた。2週間以上の培養が維持できたものは63例(64%)であった。これら調整したCTOSはHE染色、アルシアンブルー染色、estrogen receptor, p53, の免疫染色では摘出腫瘍と同じ染色形式を示した(図1)。その中でも早期から進行が早く、予後不良な組織型である漿液性腺癌由来のCTOSにおいては2週間以上の培養が維持できたものが12/13(92%)と高率であった。この結果から子宮体部漿液性腺癌あるいは低分化型類内膜腺癌などのTypeII子宮体癌と呼ばれる高悪性度の子宮体癌を対象を絞って研究を進めた。

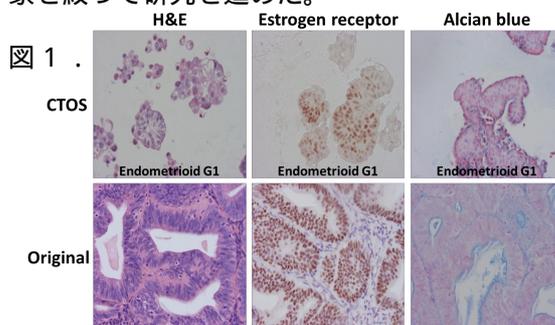


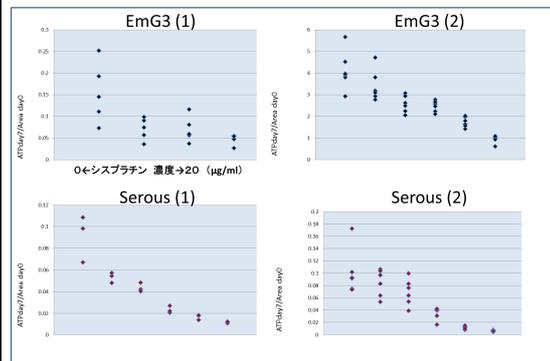
図1. CTOS
Original

また、マウス皮下へ移植されたCTOS49例中22例(49%)で腫瘍形成が認められ、そのCTOS由来移植腫瘍は患者本来の摘出腫瘍と同じ形態を保っていた。PCRおよび免疫染色を用いてマウスに移植し増殖した腫瘍の上皮がヒト由来であり間質はマウス由来であることも確認している。

抗癌剤感受性試験

CTOS培養液に抗癌剤(シスプラチン)を添加しATP法を用いて感受性試験を行った。この方法は細胞のviabilityの判定を細胞内のATPを定量することにより行い抗癌剤非投与のCTOSと比較する。ATP活性は専用のルミノメーターで測定を行った。子宮体部漿液性腺癌あるいは低分化型類内膜腺癌などのTypeII子宮体癌由来のCTOSを用いて抗癌剤感受性試験を行った。その結果シスプラチンの用量依存的に増殖抑制が認められた(図2)。これらの結果から高率にCTOSが維持されるTypeII子宮体癌においては抗癌剤感受性試験が成立すると考えられた。

図2.



阻害剤の実験

作製したCTOSのうち最も増殖速度の速いCTOS(類内膜腺癌G3由来)を用いて種々のシグナル経路を標的とした阻害実験、すなわちNF-κB, mTORC1, mTORC1+mTORC2, RAF, HER2, Src, EGFR, PI3Kを標的とした阻害剤：BMS345541, RAD001, OSI-027, Sorafenib, Lapatinib, Dasatinib, Erlotinib, LY294002を用いて増殖抑制効果を検討した(図3)。阻害実験は薬剤投与1週間後にルシフェラーゼ活性を用いてATP活性を測定し、day0の断面積を用いて標準化し、比較・検討した。このうちNF-κB阻害剤であるBMS345541の用量依存性に細胞増殖を抑えることが確認された。増殖抑制効果の認められたCTOSおよび抑制効果の認められないCTOSを比較検討することによりバイオマーカーの同定ができると考えられ、現在NF-κB経路関連分子のWestern Blotを施行している。他の薬剤についても子宮体癌CTOSに対して増殖抑制効果を示すものがあり、バイオマーカーを同定することにより治療法を個別化できる可能性がある。

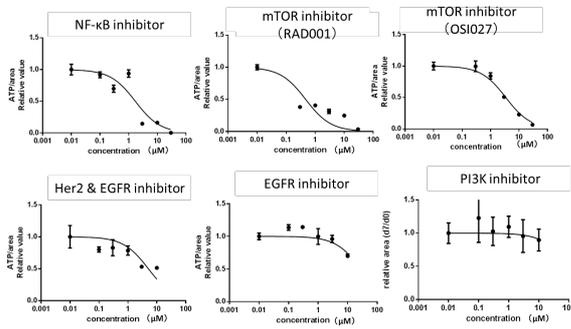


図 3 .

mTOR 阻害剤

子宮体癌 CTOS のうち mTORC1, mTORC1+mTORC2 の阻害剤である RAD001, OSI-027 による増殖抑制効果が認められたものと増殖抑制効果の認められない CTOS が存在することが明らかとなった(図 4)。それらを用いてバイオマーカー探索の目的で阻害剤投与後経時的なシグナル伝達経路の分子のリン酸化を Western Blot で解析した。その結果 AKT, ERK は阻害剤投与でも脱リン酸化を認めず、また S6 は増殖抑制効果とは関連なく阻害剤によって脱リン酸化した。我々の結果からは子宮体癌 CTOS 増殖に対する mTORC1, mTORC1+mTORC2 阻害剤のバイオマーカーは同定されなかった。

すなわち mTOR 伝達経路への依存性は症例により異なっており、標的(下流分子の活性化)の阻害効果では治療効果を予測できないと考えられた。

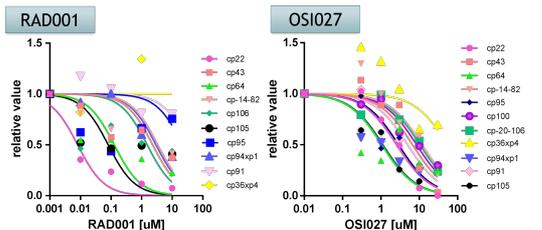


図 4 .

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 4 件)

Ueda, Y., Miyake, T., Egawa-Takata, T., Miyatake, T., Matsuzaki, S., Yokoyama, T., Yoshino, K., Fujita, M., Enomoto, T., Kimura, T., Second-line chemotherapy for advanced or recurrent endometrial carcinoma previously treated with paclitaxel and carboplatin, with or without epirubicin, *Canc Chemot*, 査読有, 67(4), 829-35, 2011, doi: 10.1007/s00280-010-1384-z

Miyake, T., Ueda, Y., Egawa-Takata, T., Matsuzaki, S., Yokoyama, T., Miyoshi, Y.

Kimura, T., Yoshino, K., Fujita, M., Yamasaki, M., Enomoto, T., Kimura, T., Recurrent endometrial carcinoma: prognosis for patients with recurrence within six to twelve months is worse relative at 12 months or later, *Am J Obstet Gynecol*, 査読有, 204(6), 535e-1-5, 2011

Fujiwara, K., Yoshino, K., Enomoto, T., Fujita, M., Ueda, Y., Miyatake, T., Kimura, T., Muraji, M., Fujita, H., Kimura, T., Hori, M., Usefulness of computed tomography in predicting cytoreductive surgical outcomes for ovarian cancer, *Arch Gynecol Obstet*, 査読有, 284(6), 1501-7, 2011, doi: 10.1007/s00404-011-1864-3

Egawa-Takata, T., Ueda, Y., Kuragaki, C., Miyake, T., Miyatake, T., Fujita, M., Yoshino, K., Nakashima, R., Okazawa, M., Tsutsui, T., Morishige, K., Kimura, T., Yamasaki, M., Nshizawa, T., Nagamatsu, M., Ito, K., Asada, M., Ogita, K., Wakimoto, A., Yamamoto, T., Nishio, Y., Enomoto, T., Chemotherapy for endometrial carcinoma(GOGO-EM1 study): TEC (paclitaxel, epirubicin and carboplatin) is an effective remission-induction and adjuvant therapy, *Canc Chemot*, 査読有, 68(6), 1603-10, 2011, doi: 10.1007/s00280-011-1638-4

[学会発表](計 5 件)

Kimura, T., Yoshino, K., Hiramatsu, K., Kiyohara, Y., Morimoto, A., Yokoyama, T., Kobayashi, E., Ueda, Y., Fujita, M., Inoue, M., Enomoto, T., Kimura, T., Establishment of cancer-tissue originated spheroids (CTOSs) and chemo-sensitivity test for endometrial cancer, The 103rd Annual Meeting American Association for Cancer Research, 3.31-4.4/'12, Chicago, U.S.A.

Kiyohara, Y., Kimura, T., Yoshino, K., Morimoto, A., Ueda, Y., Fujita, M., Inoue, M., Enomoto, T., Kimura, T., Chemo-sensitivity test using cancer-tissue originated spheroids(CTOSs) of endometrial cancer, The 14th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, 10.13-16/'12, Vancouver, Canada

Kiyohara, Y., Kimura, T., Yoshino, K., Morimoto, A., Ueda, Y., Fujita, M., Inoue, M., Enomoto, T., Kimura, T., Chemo-sensitivity test using cancer-tissue originated spheroids(CTOSs) of endometrial cancer, 第 71 回日本癌学会学術総会, 9.19-21/'12, 札幌

清原裕美子 木村敏啓 吉野潔 平松宏祐 松崎慎哉 小林栄仁 上田豊 藤田征巳 井上正宏 榎本隆之 木村正, CTOS 培養法を用いた子宮体癌に対する抗癌剤感受性試験, 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会, 5.10-13/'13, 札幌

吉野潔, 難治性子宮体癌に対する治療戦略;基礎と臨床, 第52回日本臨床細胞学会秋期大会, 11.2-4/'13, 大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
なし

取得状況(計 0 件)
なし

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉野 潔 (Yoshino Kiyoshi)

研究者番号: 90362730

(2)研究分担者

榎本 隆之 (Enomoto Takayuki)

研究者番号: 90283754

藤田 征巳 (Fujita Masami)

研究者番号: 60303963

上田 豊 (Ueda Yutaka)

研究者番号: 10346215

木村 敏啓 (Kimura Toshihiro)

研究者番号: 90584524

(3)連携研究者

井上 正宏 (Inoue Masahiro)

研究者番号: 10342990