

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 06 月 14 日現在

機関番号：84409  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011年～2012年  
 課題番号：23659766  
 研究課題名（和文）スフェロイドによる新規初代培養系を用いた薬剤感受性試験の膀胱癌治療への臨床応用  
 研究課題名（英文）The clinical usefulness of a chemosensitivity assay using a new primary culture system with spheroids on the bladder cancer  
 研究代表者  
 中山 雅志（NAKAYAMA MASASHI）  
 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）・泌尿器科・副部長  
 研究者番号：40379178

研究成果の概要（和文）：スフェロイドによる新規初代培養系を用いた薬剤感受性試験の膀胱癌治療への臨床応用を目指し、種々の実験を行った。この薬剤感受性試験は、進行性膀胱癌における全身化学療法（シスプラチン、ジェムシタビン）の治療効果予測に有用である可能性が示唆された。経尿道的膀胱腫瘍切除直後の膀胱内注入化学療法における再発予防効果を予測する新規バイオマーカーの検索に関しては、研究期間内に有用なマーカーの同定はできなかった。

研究成果の概要（英文）：The aim of the study is to show the clinical usefulness of a chemosensitivity assay using a new primary culture system with spheroids on the bladder cancer. On muscle-invasive bladder cancer, this chemosensitivity assay may predict the effect of systemic chemotherapy with cisplatin and gemcitabine. We tried to identify a marker to predict the effect of intravesical chemotherapy immediate after transurethral resection of the bladder cancer. However, we have not found it yet.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：膀胱癌、テーラーメイド医療

## 1. 研究開始当初の背景

研究者らは、手術で採取した大腸癌組織から高効率で純粋な癌細胞を安定してスフェロイドとして初代培養を行う系（cancer tissue-originated spheroid:CTOS）を確立した。これまでに、泌尿器科領域の腫瘍でもCTOSは継代可能であること、マウスの皮下移植モデルにおいてもとの腫瘍の組織構築と非常に類似した腫瘍を形成すること、またCTOSには癌幹細胞に近い細胞（Tumor-initiating cells: TICs）が豊富に含まれている可能性を報告している。

本研究では、膀胱癌を対象としてCTOSを用いた薬剤感受性試験の臨床応用を目指す。膀胱癌の全身化学療法は術前補助療法とし

ても施行されているが、効果のない症例は手術施行時期が遅れるという不利益を被る。本研究により化学療法の無効症例を予測することが可能となれば、その臨床的意義は非常に大きいと考える。また、経尿道的膀胱腫瘍切除術直後の膀胱内注入化学療法は、その再発予防効果より現在標準治療となっているが、使用される薬剤は様々である。仮に、症例ごとに、より効果的な薬剤の選択が可能となれば、さらなる治療効果の向上が期待できるため、その臨床的意義は大きいと考える。

## 2. 研究の目的

(1) 膀胱癌の手術検体を用いてCTOSを安定して作成する方法を樹立する。

(2) CTOS を用いた抗癌剤感受性試験結果より、進行性膀胱癌に対する全身化学療法の治療効果が予測できるか検討する。

(3) CTOS を用いて経尿道的膀胱腫瘍切除術直後抗癌剤膀胱内注入療法の再発予防効果を予測する候補遺伝子の同定を行う。

### 3. 研究の方法

(1) CTOS の作成は、手術で採取した腫瘍をコラゲナーゼにて分解し、その後メッシュフィルターを用いて組織片を回収し、培養液中で培養した。

(2) 進行性尿路上皮癌より作成した CTOS を用いて、シスプラチンとジェムシタビンに対する薬剤感受性試験を行い、実臨床におけるシスプラチンとジェムシタビンを用いた全身化学療法の抗腫瘍効果と比較検討した。

(3) 予備実験として、筋層非浸潤性膀胱癌の手術検体から作成した CTOS 9 例を用いて、ピノルビシンと MMC に対する薬剤感受性試験を行った。

次に、筋層非浸潤性膀胱癌より作成した CTOS より mRNA を抽出し、cDNA アレイにて遺伝子の発現を解析した。臨床的に 2 年以上膀胱癌の再発を認めなかった症例から作成した CTOS と術後 1 年以内に再発した症例から作成した CTOS の遺伝子発現を比較し、術直後膀胱注入化学療法の治療効果予測に対するマーカー候補遺伝子を選択した。CTOS におけるマーカー候補遺伝子の発現を quantitative RT-PCR 法にて解析し、臨床的な膀胱癌の再発の有無と比較検討した。

また、高濃度の抗癌剤を曝露した場合の殺細胞作用機序を解明するために、発光シグナルを用いた細胞内 ATP の測定、フローサイトメトリーを用いたミトコンドリア膜電位の測定、Western blot 法を用いたカスパーズ関連蛋白の発現解析、Southern blot 法による DNA の断片化の解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 膀胱癌の手術検体からの CTOS 培養法の確立

135 例の膀胱癌手術検体より 110 例 (85.2%) で CTOS の培養が可能であった。

筋層非浸潤性膀胱癌では 108 例中 98 例 (90.7%) で CTOS 培養が可能であったのに対し、筋層浸潤性膀胱癌では 27 例中 17 例 (63.0%) しか CTOS 培養は可能でなかった。異型度や腫瘍形態などによる CTOS 培養成功率は以下に示す。

膀胱尿路上皮癌TUR検体からのCTOS培養成功率

		成功 / 全体 (n)	成功率 (%)
内視鏡所見	Papillary	100 / 110	90.9
	Nodular	15 / 24	62.5
	不明	0 / 1	0
異型度	Low	39 / 41	95.1
	High	76 / 94	80.9
病理学的病期	Ta	68 / 71	95.8
	T1	30 / 37	81.1
	T2 以上	17 / 27	63.0
Total		115 / 135	85.2

筋層浸潤性膀胱癌における CTOS 作成率はまだ満足できるものではなく、今後培養条件などさらなる検討が必要であると考えられた。

(2) CTOS を用いた抗癌剤感受性試験結果により全身化学療法の臨床効果が予測できるか検討する。

全身化学療法の治療効果の予測に関しては、局所進行性尿路上皮癌に対し GC 療法 (ジェムシタビン+シスプラチン) を施行した 7 例における解析結果において、いずれかの薬剤に感受性を認めた 4 例中 3 例は腫瘍の 30% 以上の縮小を認めた。一方、2 剤ともに感受性試験耐性であった 3 例中 2 例は化学療法施行中に腫瘍の増大を認めた。

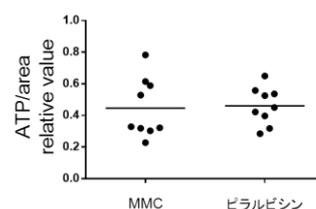
GC療法の治療効果と薬剤感受性試験結果

症例	性別	年齢	施行 サイクル数	シスプラチン 感受性	ジェムシタビン 感受性	GC療法治療効果
症例 1	F	62	3	あり	あり	腫瘍縮小
症例 2	M	59	3	あり	少しあり	腫瘍消失
症例 3	M	67	2	なし	なし	腫瘍増大
症例 4	M	80	3	なし	あり	変化なし
症例 5	M	64	2	なし	なし	腫瘍増大
症例 6	M	71	3	なし	なし	変化なし
症例 7	M	67	3	なし	少しあり	縮小後わずかに増大

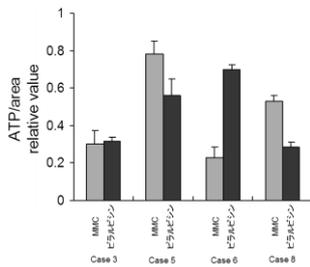
検討症例数が少なく、今後さらなる検討が必要ではあるが、今回の検討結果より CTOS を用いた薬剤感受性試験は、尿路上皮癌に対する全身化学療法の治療効果予測に有用である可能性が示唆された。

(3) CTOS を用いて抗癌剤の膀胱内注入療法の再発予防効果を予測する候補遺伝子の同定を行う。

筋層非浸潤性膀胱癌の手術検体から作成した CTOS 9 例を用いたピノルビシンと MMC に対する薬剤感受性試験では、腫瘍間で抗癌剤暴露後の生物活性の差が認められた。



また、同じ腫瘍でも薬剤間で抗癌剤暴露後の生物活性に差が認められた。以下に代表的な4症例を示す。



以上の結果より、症例ごとに適切な抗癌剤を選択することで経尿道的膀胱腫瘍切除直後の膀胱内注入化学療法での再発予防効果が改善できる可能性があると考えられた。

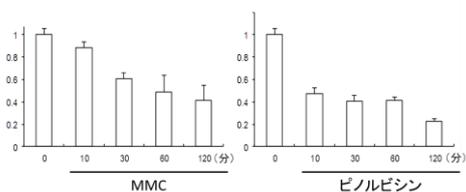
経尿道的膀胱腫瘍切除直後の膀胱内注入化学療法における治療効果を予測する新規バイオマーカーの検索では、臨床的に2年以上膀胱癌の再発を認めなかった症例から作成したCTOSと術後1年以内に再発した症例から作成したCTOSの遺伝子発現CTOSを用いたcDNAアレイ解析を行い、発現遺伝子の解析結果よりマーカー候補遺伝子の選定を行った。しかし、本研究期間中に有効なマーカーの同定はできなかった。

(現在もマーカー遺伝子の同定実験は継続しているため、cDNAアレイ解析結果は記載していません。)

そこでcDNAアレイ解析以外の方法でも、マーカー遺伝子の同定を行うことにした。具体的には、膀胱内注入化学療法では高濃度の抗癌剤が直接癌細胞に曝露されるため、抗癌剤全身投与とは異なる殺細胞作用機序を持つ可能性があると考え、その殺細胞作用機序を解明することにより、膀胱内注入化学療法の再発予防効果を予測する候補遺伝子の同定することとした。

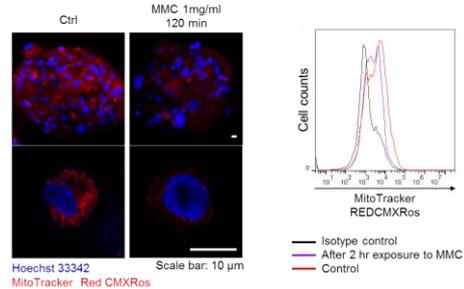
膀胱癌より作成したCTOSに膀胱内注入化学療法で用いる高濃度のピノルビンやMMCを曝露し、経時的に細胞内ATPを測定した。曝露後10-30分で細胞内ATPの低下が認められた。

高濃度抗癌剤曝露による細胞内ATPの変化



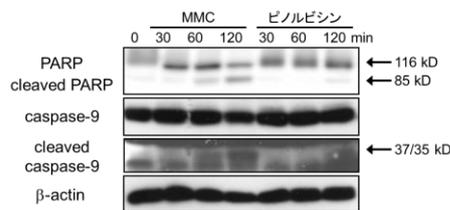
次に高濃度MMC曝露によるミトコンドリア膜の変化を調べたところ、曝露後早期にミトコンドリア膜電位の低下が起こっていることがわかった。

高濃度抗癌剤曝露によるミトコンドリア膜電位の変化

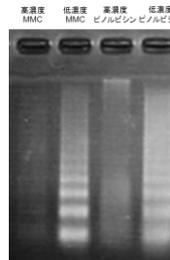


また、高濃度抗癌剤の曝露では、カスパーシ経路の活性化および、DNAの断片化も生じていなかった。

高濃度抗癌剤曝露によるカスパーシ経路の変化



抗癌剤曝露によるDNAの断片化



以上の結果より、膀胱内注入化学療法では高濃度の抗癌剤が直接癌細胞に曝露されるため、抗癌剤全身投与で生じるようなアポトーシスによる殺細胞効果とは異なるネクローシス様の殺細胞作用機序が起こっていると考えられた。

研究期間内に、膀胱内注入化学療法効果予測マーカー遺伝子の同定はできなかった。今後もcDNAマイクロアレイ解析結果を用いて膀胱内注入化学療法効果予測マーカー遺伝子の同定する実験は継続していくが、それ以外に高濃度の抗癌剤が直接癌細胞に曝露した際の殺細胞作用機序をさらに解明することで膀胱内注入化学療法効果予測マーカー遺伝子の同定を行う予定である。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

発表者名：吉田 栄宏

発表標題：膀胱癌臨床検体由来スフェロイドを用いた膀胱内注入療法のための抗癌剤感受性試験

学会名：第 101 回 日本泌尿器科学会総会

発表年月日：2013 年 04 月 28 日

発表場所：北海道 札幌市

[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]

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山 雅志 (NAKAYAMA MASASHI)

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)・泌尿器科・

副部長

研究者番号：40379178

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし