

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791703

研究課題名(和文) 初代培養細胞塊をもちいた子宮肉腫の新しい治療戦略の樹立

研究課題名(英文) Establishment of a new therapeutic strategy of uterine sarcoma using a primary culture cell mass

研究代表者

木村 敏啓 (Kimura, Toshihiro)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90584524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：婦人科領域において子宮平滑筋肉腫は稀な疾患ではあるが、最も予後の最も悪い疾患のひとつである。化学療法の効果が高いことがその要因の一つと考えられる。近年他の癌種で報告された新しい培養方法を用いて子宮平滑筋肉腫患者検体の初代培養細胞塊の作成を試みた。書面にてインフォームドコンセントの得られた数名の患者より子宮平滑筋肉腫の検体を採取しそれをもとに初代培養細胞塊を作成した。すべての症例において24時間後に初代培養細胞塊はスフェロイドを形成し、報告された方法で初代培養細胞塊を作成できることを確認した。続いて無血清培地に成長因子を加えた培養液を用いて子宮平滑筋肉腫の初代培養細胞塊の長期培養に成功した。

研究成果の概要(英文)：Uterine leiomyosarcoma is a rare disease in gynecology, but it is one of the worst disease prognosis. I considered that the effect of chemotherapy is low is one of the factors. I tried to create a primary culture cell mass of uterine leiomyosarcoma patient specimen using a new culture method that has been reported in other types of cancer recently. I have made a primary culture cell mass from collected samples of uterine smooth muscle tumors from several patients obtained informed consent in writing. It was confirmed that the primary cell masses to form spheroids within 24 hours in all cases, it is possible to create a primary cultured cell mass by reported methods. And succeeded in long-term culture of primary cells mass uterine leiomyosarcoma using the culture medium plus growth factors in serum-free medium and subsequently

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

## 1. 研究開始当初の背景

子宮平滑筋肉腫は婦人科腫瘍領域において予後不良の疾患である。これまでの様々な報告より、腫瘍の stage が独立した予後因子として報告されている。Stage で 5 年生存率が 50-55%、それ以上の stage では 5 年生存率は 8-12% と報告されており子宮頸癌・子宮内膜癌・卵巣癌に比べてその予後は悪い。

子宮肉腫に対する治療は手術療法が第一選択である。追加治療としての化学療法が様々な薬剤で試みられ、報告されている。

再発子宮平滑筋肉腫に対してジェムシタビンとドセタキセルの併用化学療法で 53% の奏効率と比較的良好な報告があるが、PFS は高々 6 ヶ月で、生存率の改善にいたっていない。

その他多くの報告では 10-30% 程度の奏効率となっており、子宮平滑筋肉腫に統一した抗癌剤を選定するのは難しいのが現状である。様々なレジメンにおいて、低い奏効率しか得られていない現状で、より効果的な治療法を施行するためには個々の症例に対して最適な抗癌剤を選択するテーラーメイド医療が最も適していると考えられる。

## 2. 研究の目的

子宮平滑筋肉腫に対する最適な抗癌剤を選択するため、抗癌剤感受性試験を確立することを目的とする。本研究では、症例に応じて最適な抗癌剤を選択するため、患者検体を用いた初代培養細胞塊を用いて研究を進める。癌の研究をすすめるにあたって細胞株を利用した研究データは不可欠なものとなっている。多くは樹立された細胞株を平面状のシャーレなどで培養する単層培養あるいは二次元培養である。二次元培養における遺伝子の発現や、薬剤感受性などは動物実験や臨床データと乖離することもしばしばであり、二次元培養では原発巣や転移巣の環境を再現できていない点が多いことが考えられる。

これらの問題点を解決する方法として腫瘍微小環境を維持し培養する三次元培養が試みられている。

近年、大阪府立成人病センター研究所の井上らは新しい三次元培養として CTOS(cancer tissue originated spheroid)の作成および解析、抗癌剤感受性試験についてはじめて報告した。

CTOS とは各種がん手術検体を化学的、機械的処理して得られた新しい初代培養細胞である。

この手法で得られた初代培養細胞塊の特徴として、原腫瘍細胞の細胞間相互作用が維持され、スフェロイド形成する スフェロイドそのものが培養により成長を認める。マウスなどに皮下移植することにより腫瘍を形成し原腫瘍と同組織系の腫瘍を形成する。

抗癌剤感受性試験に用いることができる、などの特徴がある。

本研究では、大阪府立成人病センター研究所の井上らの協力を得て、CTOS を用いて子宮平滑筋肉腫の培養方法の確立と、抗癌剤感受性試験の確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

子宮肉腫組織から初代培養細胞塊を作成、解析を行う。

手術により得られた腫瘍組織サンプルをもとに子宮肉腫初代培養細胞塊を作成する。プロトコールは大阪府立成人病センター研究所で確立、報告されたもので、採取した組織を物理的、化学的な処置を行い、無血清培地で浮遊培養を行う

得られた子宮肉腫初代培養細胞塊をシャーレで培養し培養細胞塊の発育する条件を設定する。発育の評価は )顕微鏡下に腫瘍径を測定し、サイズの変化にて評価する。 )細胞塊の ATP 法 ( cell death assay のひとつを行い、細胞塊の大きさと、ATP 法の値との相関を示す。この結果はのちに行う抗癌剤感

受性試験の評価方法の一つのコントロールとして用いる

マウスへの皮下移植を行う。

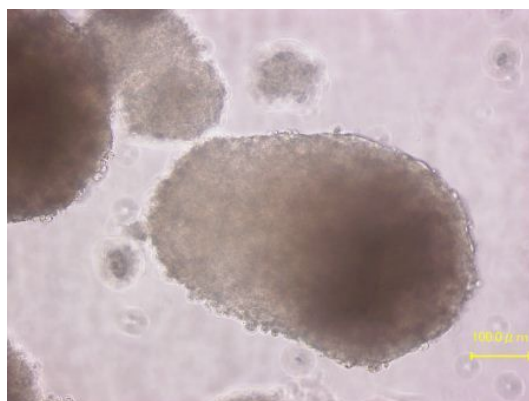
NOD SCID mouse に皮下移植し、腫瘍を形成するかどうかを見る。形成した腫瘍は摘出し、一部を再度、培養細胞塊を作成する。作成した培養細胞塊は assay に用いるもの以外は培養を継続もしくは凍結保存し、今後の研究に用いる。残りの腫瘍を HE staining や IHC を行い、原腫瘍との組織型について比較検討する。

#### (B) 抗癌剤感受性試験の確立

96well プレートを用いる。1 つの細胞塊 /well をマトリゲル中で固定させる。様々な抗癌剤で調整した培養液に暴露ののち、1 週間程度培養する。1 週間後に細胞塊のサイズ測定、ATP 法を行い、抗腫瘍効果について評価する。

#### 4. 研究成果

本研究は当研究室で先に開始した子宮内膜癌に対する初代細胞培養塊の研究と並行して行い、子宮内膜癌での結果を比較として用いた。



(図 1)子宮肉腫初代培養細胞塊  
スフェロイドを形成

子宮平滑筋肉腫 5 例に対し初代培養細胞塊の作成を試みた。前例においてスフェロイドが形成され、分離精製は十分可能であることが示せた。その後培養を継続したところ、腫瘍径や ATP アッセイにて腫瘍の増大を見ること

はできなかった。さまざまな成長因子を培養液に加えることにより、2 週間程度の細胞塊の維持が可能であることがわかった。培養方法として、浮遊培養、マトリゲルやコラーゲンの中に埋没させて培養することで腫瘍細胞塊を維持することも可能であった。

マウスへの皮下移植は採取した検体すべてで試みた。初代培養細胞塊作成後 2 日目に皮下移植を行ったが皮下腫瘍の形成は認めなかった。同時に行った子宮内膜癌由来のスフェロイドでは、症例により、皮下腫瘍を形成し原腫瘍の性質(組織型、分化度)を再現するものが得られた。子宮平滑筋肉腫においても症例を重ね、条件の検討を試みることで、マウスの皮下で腫瘍を再現できるものが得られるものと考えている。

子宮平滑筋肉腫は比較的まれな腫瘍のため本研究期間中に得た症例数は十分といえるものではなかったため、条件を確定させるには至らなかった。また、本研究期間中に得た検体については期間が短いため予後の評価ができない。そのため、抗癌剤感受性試験の検討については、予備実験として行ったが、結果の解析をするには至っていない。今後も検討を重ねて、抗癌剤感受性試験を確立し、予後不良な子宮平滑筋肉腫への新しい治療戦略となるよう進めていく予定である

#### 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)  
なし

〔学会発表〕(計 2 件)

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  
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

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔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

木村 敏啓 (Kimura Toshihiro)

大阪大学医学部附属病院・助教

研究者番号：90584524

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし