

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462522

研究課題名(和文) 新しい初代3次元培養法を用いた子宮体癌の再発・播種に関するバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Drug screening and identification of biomarkers using sensitivity assay with a panel of primary cultured cancer spheroids derived from endometrial cancer

研究代表者

吉野 潔 (Yoshino, Kiyoshi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90362730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：子宮体がんの手術検体119例よりCTOS (Cancer Tissue-Originated Spheroid)を作成した。1例のCTOSを用いて79種の分子標的阻害剤による薬剤スクリーニングを行った。腫瘍増殖抑制効果を認めた薬剤を用い、複数例由来のCTOSにおける感受性試験を行った。everolims、YM155は複数例CTOS間で大きな感受性の差があり、耐性例と感受性例を区別することができた。薬剤感受性は、それぞれの標的であるmTORシグナル伝達経路の阻害や、survivinの発現とは相関しなかったが、YM155では、組織型や遺伝子変異との相関が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We successfully prepared and cultured cancer tissue-originated spheroids (CTOS) from endometrial cancers. Then, we screened 79 molecular targeting drugs using two CTOSs. Among several hits, we focused on everolimus and YM155, a survivin inhibitor. When sensitivity to everolimus or YM155 was assessed in 12 CTOSs, the sensitivity varied substantially. The phosphorylation status of the mammalian target of rapamycin complex 1 downstream molecules before and after everolimus treatment did not predict the effect of the drug. In contrast, the CTOS sensitive to YM155 showed remarkable cell death. The effect of YM155 was also confirmed in vivo. The histological type correlated with YM155 sensitivity; non-endometrioid adenocarcinomas were sensitive and endometrioid adenocarcinomas were resistant. Thus, sensitivity assays using cancer tissue-originated spheroids from endometrial cancers may be useful for screening drugs and finding biomarkers.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：婦人科腫瘍 子宮体癌 CTOS 播種 バイオマーカー YM155

1. 研究開始当初の背景

本邦において子宮体癌は罹患率・死亡率ともに上昇する傾向にある。年齢調整罹患率は2006年に人口10万人あたり10.1人と1975年に比べ6倍に増加している。播種を伴う進行期子宮体癌および再発子宮体癌に対する有効な治療手段の開発が急務である。

2. 研究の目的

新たに開発された初代培養法:CTOS (cancer tissue-originated spheroid)を子宮体癌に応用し、播種を伴う進行期症例、再発癌に対し有効な薬剤をスクリーニングすること。およびそのバイオマーカーを同定し、オーダーメイド治療の基礎を築くことを目的とした。

3. 研究の方法

子宮体癌組織からのCTOS作製
 連携研究者である大阪府立成人病センター研究所の井上らの指導のもと、手術で採取した子宮体癌組織からCTOSを調製する。簡潔に述べると、手術で摘出した子宮体癌組織を機械的・科学的に細断しフィルターに通す。フィルター上に残った細胞集塊を幹細胞用の無血清培地で24時間培養すると、上皮のみで形成される球状のCTOSが形成される。

薬剤スクリーニング

1例の子宮体癌CTOSを用いて79種の分子標的阻害剤(10nM, 100nM)に対する感受性試験を行い、増殖抑制効果のある薬剤を抽出した。抽出した薬剤を用い、複数例からのCTOSにおける感受性試験を行った。具体的には一定の大きさのCTOSをピックアップし96wellplateに移し写真撮影の後1週間薬剤に暴露した。1週間後にルシフェラーゼを用いてATP活性を測定し、day0の断面積を用いて標準化し暴露前後でのATP値の比較解析を行った。

4. 研究成果

子宮体癌手術検体からCTOS作成を行った119例中、70例(58.8%)が長期培養継続可能であった。66例、33例にNOD/SCIDマウスでの腫瘍形成がみられた。

子宮体癌CTOSの薬剤スクリーニングで、3剤を感受性のある薬剤として抽出した(図1)。その中でエベロリムス、YM155について、複数例のCTOSでの感受性試験の結果から症例間で大きな感受性の差があり、耐性例と感受性例を区別することができた(図2)。薬剤感受性は、それぞれの標的であるmTORシグナル伝達経路の阻害や、survivinの発現とは相関しなかったが、YM155のIC50値は組織型(非類内膜癌において有効)との相関が認められ、病理組織型がバイオマーカーとなる可

能性が示唆された(図3)。

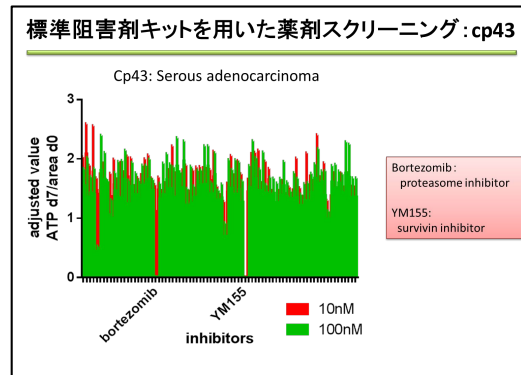


図1

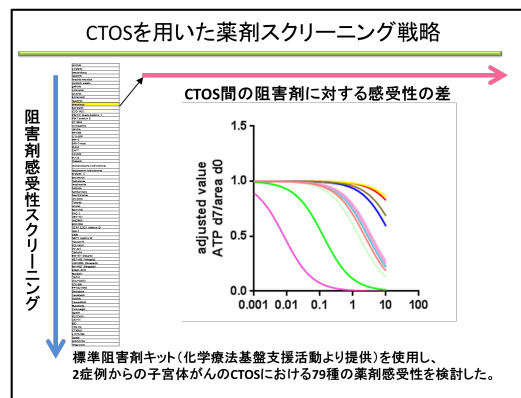


図2

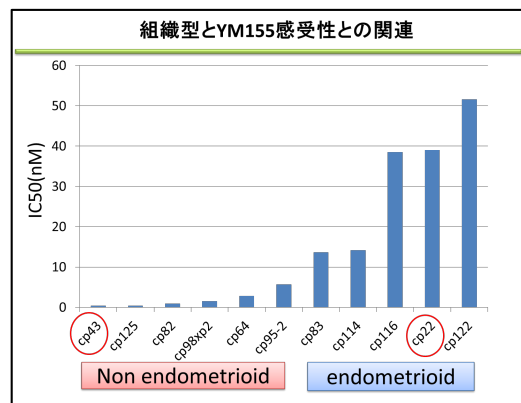


図3

マウス Xenograft を用いてYM155のCTOS由来子宮体癌への治療効果をin vivo実験系で解析を行った。その結果in vitro実験系で感受性の高いCTOS由来腫瘍はIn vivoにおいてもYM155により腫瘍縮小効果を認めた。一方、in vitroで低感受性と判定されたCTOS由来子宮体癌ではin vivoにおいても腫瘍増殖抑制効果は認められず、CTOSを用いたin vitro感受性試験はin vivo実験系と相関していると考えられ、今後実臨床におけるprecision medicineを進めていくうえで発展させていく価値があると考えられた

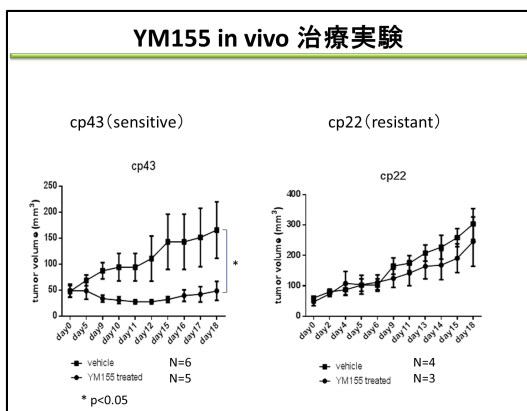


図 4

まとめ

CTOS を用いた薬剤感受性試験を複数例で大規模スクリーニングとすることで、バイオマーカーの検出に寄与する可能性がある。CTOS 法を用いて、高率に子宮体部がんの 3 次元初代培養を確立できた。またその一部で xenograft tumor の形成が確認できた。CTOS 法を用いた感受性試験により、複数の症例間の薬剤感受性の差を検出することが出来た。YM155 に関して、類内膜腺癌以外の組織型であることがバイオマーカーとなる可能性がある。

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 2 件)

1. Kiyohara, Y. Yoshino, K. Kubota, S. Okuyama, H. Endo, H. Ueda, Y. Kimura, T. Kamiura, S. Inoue, M., Drug screening and grouping by sensitivity with a panel of primary cultured cancer spheroids derived from endometrial cancer, *Cancer Sci*, 査読有, 17(4):452-60, 2016
DOI:10.1111/cas.12898
2. Matsuzaki, S. Serada, S. Morimoto, A. Ueda, Y. Yoshino, K. Kimura, T. Naka, T., Annexin A4 is a promising therapeutic target for the treatment of platinum-resistant cancers, *Expert Opin Ther Tar*, 査読有, 18(4):403-14, 2014
DOI:10.1517/14728222.2014.882323

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 久保田哲 中嶋綾 清原裕美子 遠藤洋子 奥山裕照 吉野潔 木村正 井上正宏, CTOS 法による子宮頸部小細胞がん・腺がん混合腫瘍の解析, 第 74 回日本癌学会学術総会, 10.8-10/'15, 名古屋

2. 久保田哲 清原裕美子 上田豊 吉野潔 井上正宏 木村正, CTOS 法による子宮頸部小細胞がん・腺がん混合腫瘍のクロナリチーの解析, 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会, 4.9-12/'15, 横浜
3. Takata, T. Kiyohara, Y. Endo, H. Okuyama, H. Yoshino, K. Kimura, T. Inoue, M., Screening of molecular targeting drugs and exploring biomarkers for uterine corpus carcinoma using CTOS method, The 19th Japan-Korea Cancer Research Workshop, Jeju, Korea, 11.28-29/'14
4. Kiyohara, Y. Yoshino, K. Hiramatsu, K. Takata, T. Matsuzaki, S. Kimura, K. Kobayashi, E. Ueda, Y. Inoue, M. Kimura, T., Preparation of primary culture cells from a LCNEC of uterine corpus using CTOS (Cancer Tissue-Originated Spheroid) method, The 15th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, Melbourne, Australia, 11.6-11/'14
5. Hiramatsu, K. Enomoto, T. Serada, S. Yoshihara, K. Hori, Y. Fujimoto, M. Ueda, Y. Yoshino, K. Fujita, M. Morii, E. Naka, T., A proteomic analysis demonstrates similar expression pattern between ovarian and endometrial high-grade serous carcinoma beyond an organ, The 15th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, Melbourne, Australia, 11.6-11/'14
6. 清原裕美子 遠藤洋子 吉野潔 木村敏啓 上田豊 藤田征巳 木村正 井上正宏, 子宮体がんの新規三次元培養 CTOS 法における mTOR 阻害剤感受性の多様性, 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜, 9.25-27/'14
7. 松崎聖子 吉野潔 堀由美子 高田友美 上田豊 和田直樹 池田純一郎 藤田征巳 森井英一, 子宮体部漿液性腺癌 32 例における子宮頸部細胞診と臨床所見の検討, 第 52 回日本臨床細胞学会春期大会, 横浜, 6.5-7/'14
8. 清原裕美子 吉野潔 木村正 井上正宏, 新規 3 次元癌細胞初代培養 (CTOS) 法を用いた子宮体癌に対する mTOR 阻害剤感受性試験, 化学療法基盤支援活動第 3 シンポジウム, 沖縄, 5.12/'14
9. 清原裕美子 藤田征巳 吉野潔 上田豊 木

村敏啓 松崎慎哉 木村正, 子宮体癌に対するオーダーメイド分子標的治療のためのCTOSを用いた基礎的研究, 第66回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 4.18-20/'14

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉野 潔 (Yoshino, Kiyoshi)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 90362730

(2) 研究分担者

藤田 征巳 (FUJITA, Masami)
大阪大学・大学院医学系研究科・招へい准教授
研究者番号: 60303963

上田 豊 (UEDA, Yutaka)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 10346215

木村 敏啓 (KIMURA, Toshihiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員
研究者番号: 90584524

小林 栄仁 (KOBAYASHI, Eiji)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 50614773

松崎 慎哉 (MATSUZAKI, Shinya)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 00467565

(3) 連携研究者

井上 正宏 (INOUE, Masahiro)
大阪府立成人病センター研究所・生化学部門・部長
研究者番号: 10342990

仲 哲治 (NAKA, Tetsuji)
医薬基盤研究所・免疫シグナルプロジェクト・プロジェクトリーダー
研究者番号: 30303936