

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861325

研究課題名(和文) 卵巣粘液性腺癌に対する新しい培養法の確立と抗癌剤感受性試験への応用

研究課題名(英文) Establishment of a new strategy of ovarian mucinous adenocarcinoma using primary culture cell mass

研究代表者

木村 敏啓 (KIMURA, TOSHIHIRO)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・招へい教員

研究者番号：90584524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：上皮性卵巣悪性腫瘍は、化学療法に対する奏効率が高い腫瘍として考えられている。しかしその中でも卵巣粘液性腺癌においては化学療法の奏効率が他の組織型に比べて明らかに低いことが報告されている。近年他の癌腫において報告されている新しい三次元培養法を用いて、粘液性腺癌の初代培養細胞塊を作成し、研究を進めた。書面にてインフォームドコンセントの得られた患者の腫瘍組織をもとに初代培養細胞塊を作成し、無血清培地内で長期培養、保存することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Epithelial ovarian malignancies, response rate to chemotherapy is considered as a high tumor. However response rate of chemotherapy has been reported to be significantly lower than other tissue types in ovarian mucinous adenocarcinoma among them. We create a primary culture cell mass of mucinous adenocarcinoma with recent new three-dimensional culture method reported in other carcinomas. It is possible to create a primary culture cell mass from the tumor tissue of a patient obtained with informed consent in writing, long-term culture in a serum-free medium, and to save.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：婦人科腫瘍 難治性卵巣悪性腫瘍 初代培養細胞塊

## 1. 研究開始当初の背景

上皮性卵巣悪性腫瘍に対する治療戦略として我が国のガイドラインでは初回治療として手術による完全摘出（不可能な場合はできる限りの腫瘍減量手術）により、進行度、組織型、分化度の正確な評価とそれに続く術後化学療法が、基本的な治療法として推奨されている。

術後標準化学療法としてすべての組織型でパクリタキセル+カルボプラチンの併用療法が初回化学療法とされており、評価可能症例における奏効率は 80%と非常に高く卵巣癌は抗癌剤に対して感受性の高い癌とされている。

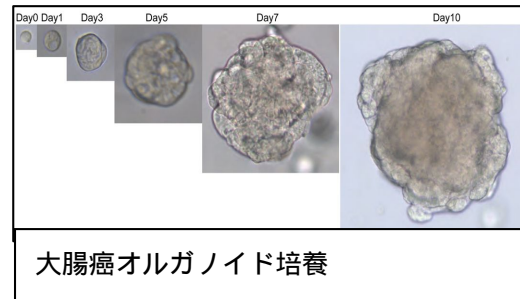
しかしながら、上皮性卵巣悪性腫瘍の組織型別に抗癌剤の効果をみると卵巣粘液性腺癌においては初回化学療法としてのパクリタキセル+カルボプラチンの併用療法の奏効率は 12.5% - 45.0%と明らかに低いことが報告されている。

卵巣粘液性腺癌は卵巣癌の 7-14%を占める比較的頻度の低い組織型で、期の早期癌での発見が多く、その予後は一般に良好である。しかし、進行卵巣粘液性腺癌の予後は上述のように標準化学療法に対する抵抗性がその一因となり他の組織型に比して明らかに不良であるとされている。

これまでの臨床試験では卵巣粘液性腺癌に対しての化学療法のレジメンの検討はなく、症例数も比較的少ないことより、卵巣粘液性腺癌は卵巣癌に対する標準化学療法としてまとめて検討されてきたが今後は卵巣粘液性腺癌に関しては組織型に基づく化学療法個別化および、症例ごとによるテーラーメイド医療の必要性が指摘されている。

近年 Sato 等はヒト腸管上皮幹細胞の長期間大量培養に世界で初めて成功した。マウスの小腸を用いた腸管上皮幹細胞培養に成功し、3つの増殖因子、EGF、Noggin、R-spondin1 を含んだ無血清培地により幹細胞

を効率的に増やす技術を開発。この培養法では、腸管上皮細胞が立体的な組織構造体（オルガノイド）を形成し、腸管上皮幹細胞を増やすと同時に腸管上皮細胞機能も維持することができた。



我々はこの報告をもとに2つの点に着目した。

ヒトの腸管上皮細胞の増殖に Wnt、ニコチンアミド、アクチビン様キナーゼ阻害剤、p38 阻害剤が必要であること。

腸管上皮幹細胞を増殖させることで、腸管上皮の大量、長期培養が可能となったこと

卵巣粘液性腫瘍の初代培養において、腸管上皮幹細胞の長期大量培養がほぼ同じ条件で可能であろうと推測している

そこで、今回我々は、卵巣粘液性腺腫、境界悪性粘液性腫瘍、卵巣粘液性腺癌の三次元培養を確立することを考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では卵巣粘液性腫瘍のあらたな初代培養系および抗癌剤感受性試験を確立し、抗癌剤や分子標的薬の選択を可能にし難治性卵巣悪性腫瘍の治療に寄与することを目的とする。

## 3. 研究の方法

1) 卵巣粘液性腫瘍の三次元培養の確立 (CTOS の培養)

我々の研究室でこれまで進めてきた CTOS (cancer tissue originated spheroid) 培養の手法を用いて、卵巣粘液性腺癌の CTOS

作成を試みる

2) 1)において得られた CTOS の長期培養、増殖に最適な条件を見つけ出す。腸管上皮細胞の培養に必要とされる上記因子 (Wnt, ニコチンアミド、アクチビン様キナーゼ阻害剤、p38 阻害剤) を加えてこれまで用いてきた無血清培地との培養とを比較する。

3) 培養、増殖が確認されたのち、様々な抗がん剤を様々な条件で加えることにより、抗がん剤感受性試験の手技を確立する。

#### 4. 研究成果

書面にてインフォームドコンセントの得られた患者検体 4 例を用いて卵巣粘液性腺癌組織より CTOS の作成を行った。全例 Spheroid を形成し、無血清培地中で比較的長期間 (1 か月程度) Spheroid 構造を維持した。Spheroid のサイズは変化なく、無血清培地では増殖しなかった。

続いて腸管上皮細胞の培養に必要とされる因子の加減により CTOS の状態を観察した。腸管上皮細胞の培養で報告された因子のうち Wnt については入手できなかった。残りの 3 因子を用いて様々な条件で試みた。長期維持は可能であったが増殖する条件を見出すことはできなかった。

卵巣粘液性腺腫、卵巣境界悪性腫瘍に対する研究を進めた。腸管上皮幹細胞に当たる幹細胞の存在を見出すことを目標に研究を進めたが、現段階では確認が取れておらず、オルガノイドの作成の段階には至っていない。粘液性腺癌は抗癌剤感受性が低く、最適な化学療法のレジメンを見出すことが重要であり、粘液性境界悪性腫瘍は再発頻度は低いものの、その抗癌剤感受性が低いことを考慮すると新しい治療戦略や腫瘍の性質を解明することは非常に重要なことと考えている。臨床において貢献できるよう研究を継続していく予定である。

#### 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)

[学会発表](計 4 件)

1. 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, 4.9-12/'15, 横浜
2. 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
3. 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, 4.18-20/'14, 東京
4. 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, 9.25-27/'14, 横浜

[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

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

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし