

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：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462591

研究課題名(和文) 初代培養細胞塊をもちいた子宮体部癌肉腫の新しい治療戦略の樹立

研究課題名(英文) Investigation of new treatment strategy for uterine carcinosarcoma by using cancer tissue originated spheroid

研究代表者

藤田 征巳 (FUJITA, MASAMI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・招へい准教授

研究者番号：60303963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：子宮体部癌肉腫は難治性の疾患で、進行した症例ではその治療法は確立されていません。本研究では、子宮体部癌肉腫について、手術で採取した組織から新しい培養法；CTOS (Cancer tissue- originated spheroid) 法で癌細胞を培養が可能であるか、また治療法のスクリーニングが可能かどうかを検討しました。その結果、子宮体部癌肉腫はCTOS法で培養できることが明らかとなりました。また薬剤スクリーニングキットを、このCTOS法で培養した癌細胞に用いることにより、個々の症例に対する薬剤感受性テストができる可能性が示されました。

研究成果の概要(英文)：Advanced uterine carcinosarcoma is difficult to cure and the standard treatment is not determined. We searched if we can establish primary culture of uterine carcinosarcoma by cancer tissue-originated spheroid (CTOS) method and if we can use drug screening kit for uterine carcinosarcoma by using CTOS method. One of the results is that we established primary culture of uterine carcinosarcoma by CTOS method. And the other result is that we found we can screen effective drugs for uterine carcinosarcoma by CTOS method and drug screening kit. We could not proceed to animal model. However we showed personalized medicine is also feasible by CTOS methods.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：婦人科腫瘍 子宮体部癌肉腫

1. 研究開始当初の背景

子宮体部癌肉腫は間葉系成分の由来によって同所性 (homologous) と異所性 (heterologous) に分類される。同所性の腫瘍として線維肉腫 (fibrosarcoma)、子宮間質肉腫 (endometrial stromal sarcoma)、平滑筋肉腫 (leiomyosarcoma) が含まれる。異所性の腫瘍としては横紋筋肉腫 (rhabdomyosarcoma) が最も頻度が高く、軟骨肉腫 (chondrosarcoma)、骨肉腫 (osteosarcoma)、脂肪肉腫 (liposarcoma) の順の頻度である。

子宮体部癌肉腫の発生起源については衝突腫瘍説、混合腫瘍説、複合腫瘍説の3つの仮説が提唱されてきた。衝突腫瘍説は癌成分と肉腫成分はそれぞれ異なる細胞由来であり、同時発生したとする説である。混合腫瘍説は癌成分と肉腫成分は共通の幹細胞由来、すなわち単一細胞由来で、上皮様形態を示す部分と間質様形態を示す部分に分化したとする説である。複合腫瘍説は癌成分は真の悪性腫瘍であるが、肉腫成分は間質の反応性変化であるとする説である。これまでさまざまな手法により検討され、混合腫瘍説が有力とされていた。

われわれは、分子生物学的手法を用いたクロナリティ解析によりその発生起源は、子宮体部癌肉腫の多くは混合腫瘍であることを証明し、一部に衝突腫瘍として発生しているものがあることを証明した。(Wada H, Enomoto T, Fujita M et al. Cancer Res. 1997;57: 5379-5385)

子宮体部癌肉腫に対する有効な化学療法は未だ確立していない。他の軟部組織の肉腫に有効である doxorubicin はあまり有効でないのに対し、軟部組織の肉腫に対してあまり有効でないプラチナ製剤は比較的有效である。(Gershenson DM, et al. J Clin Oncol. 1987; 5:618-621) 進行子宮体部癌肉腫に対する ifosfamide 単独療法と ifosfamide + cisplatin 併用療法のランダム化比較試験の結果では、併用療法の有用性が認められたが、併用群の全生存期間は 13.5 ヶ月と短い。(Homesley HD et al. J Clin Oncol. 2007;25:526-31.)

いずれのレジメンにおいても高い奏効率は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レジメンを設定するテーラーメイド医療が求められる。

癌研究をすすめるに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、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。(Kondo J et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011,108(15),6235-40)

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複数のがん細胞よりなる細胞塊を上記論文にて名づけ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は、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。In vitro において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。

2. 研究の目的

子宮体部癌肉腫の有効な治療法を探索するため、以下の3点を目的とした。

子宮体部癌肉腫の CTOS の確立

CTOS を用いた in vitro における薬剤感受性スクリーニング

in vivo における薬剤感受性スクリーニング

3. 研究の方法

(A) 子宮体部癌肉腫組織から初代培養細胞塊を作成および解析

手術により得られた腫瘍組織サンプルをもとに子宮体部癌肉腫初代培養細胞塊を作成。プロトコールは大阪府立成人病センター研究所で確立、報告されたものを使用した。

得られた子宮体部癌肉腫初代培養細胞株をシャーレで培養し培養細胞塊の発育する条件を設定した。

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。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した。この結果はのちに行う抗癌剤感受性試験の評価のコントロールとして用いた。

NOD SCID mouse に皮下移植し、腫瘍を形成するかどうかを観察した。形成した腫瘍は摘出し、一部を再度培養細胞塊の作成に用いた。

(B) 抗癌剤感受性試験の確立

In vitro による抗癌剤感受性試験は、96well プレートを用い、1つの細胞塊/well をマトリゲル中で固定。様々な抗癌剤で調整した培養液に暴露のち、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した。

4. 研究成果

1. CTOS の確立: 子宮体部癌肉腫の三次元培養

として CTOS(cancer tissue originated spheroid)の作成を行った。これまで子宮体部癌肉腫 11 症例について、初代培養細胞の作成を行い、11 例全てで spheroid 形成を認め、55%にあたる 6 例では 2 週間培養を維持できた。このことより子宮体部癌肉腫初代培養細胞の CTOS 培養条件についてはほぼ確立された。

2. *in vitro* における薬剤感受性スクリーニング: spheroid 形成を確認した培養細胞 3 例を用いて標準阻害剤キットを用いて、薬剤感受性試験 (*in vitro*) を行い、効果の期待できる既存の薬剤をスクリーニングで選択した。mTOR 阻害剤、survivin 阻害剤、NF-Kb 阻害剤による CTOS 増殖抑制効果が認められた。

3. *in vivo* における薬剤感受性スクリーニング: 形成された CTOS 8 例をマウスに移植し 3 例で腫瘍形成を認めたが、実験の遅れのため、*in vivo* における薬剤効果判定を行うことができなかった。

今回、*in vivo* での実験を行うことができなかったが、手術検体からの子宮体部癌肉腫の CTOS 作成が可能であることが明らかとなった。また CTOS を用いて、薬剤感受性をスクリーニングすることが可能であることが明らかとなり、今後、患者個人ごとのオーダーメイド治療を行う際に CTOS が一つの方法となり得ることを示した。

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 7 件)

1. Kiyohara, Y. Yoshino, K. Kubota, S. Okuyama, H. Endo, H. Ueda, Y. Kimura, T. Kimura, T. Kamiura, S. Inoue, M., Drug screening and grouping by sensitivity with a panel of primary cultured cancer spheroids derived from endometrial cancer., 査読有, 107(4): 452-60, 2016
doi: 10.1111/cas.12898.
2. Otake, A. Yoshino, K. Ueda, Y. Sawada, K. Mabuchi, S. Kimura, T. Kobayashi, E. Isobe, A. Egawa-Takata, T. Matsuzaki, S. Fujita, M. Kimura, T., Usefulness of duloxetine for Paclitaxel-induced peripheral neuropathy treatment in gynecological cancer patients, Anticancer Res, 査読有, 35: 359-363, 2015
URL:
<http://ar.iiarjournals.org/content/35/1/359.long>
3. Morimoto, A. Ueda, Y. Enomoto, T. Takata-Egawa, T. Matsuzaki, S. Kobayashi, E. Kimura, T. Yoshino, K.

Fujita, M. Kimura, T., Management of advanced stage endometrial cancer , Endometrial Cancer: Current Epidemiology, Detection and Management, Chapter12, 査読有 , 207-228, 2014

4. Morimoto, A., Serada, S. Enomoto, T. Kim, A. Matsuzaki, S. Takahashi, T. Ueda, Y. Yoshino, K. Fujita, M. Fujimoto, M. Kimura, T. Naka, T., Annexin A4 induces platinum resistance in a chloride-and calcium-dependent manner, Oncotarget, 査読有, 5(17), 7776-87, 2014
URL:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4202160/>
 5. Yokoyama, T. Enomoto, T. Serada, S. Morimoto, A. Matsuzaki, S. Ueda, Y. Yoshino, K. Fujita, M. Kyo, S. Iwahori, K. Fujimoto, M. Kimura, T. Naka, T., Plasma membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer, Int J Cancer, 査読有, 132(2): 472-84, 2013
doi: 10.1002/ijc.27679
 6. Matsuzaki S, Enomoto T, Serada S, Yoshino K, Nagamori S, Morimoto A, Yokoyama T, Kim A, Kimura T, Ueda Y, Fujita M, Fujimoto M, Kanai Y, Kimura T, Naka T., Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A, Int J Cancer, 査読有, 134(8):1796-809, 2014
doi: 10.1002/ijc.28526
 7. Yokoyama, T. Enomoto, T. Serada, S. Morimoto, A. Matsuzaki, S. Ueda, Y. Yoshino, K. Fujita, M. Kyo, S. Iwahori, K. Fujimoto, M. Kimura, T. Naka, T., Plasma membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer, Int J Cancer, 査読有, 132(2): 472-84, 2013
doi: 10.1002/ijc.27679
- [学会発表](計 19 件)
1. Hiramatsu, K. Yoshino, K. Serada, S. Yoshihara, K. Fujimoto, M. Ueda, Y. Morii, E. Enomoto, T. Naka, T. Kimura, T., 【Free communications】A proteomic analysis demonstrates similar expression pattern between ovarian and endometrial high-grade serous carcinoma beyond an organ, 24th Asian

- & Oceanic Congress of Obstetrics & Gynecology, 6.3-5/'15, Kuching, Malaysia
2. Nakagawa, S. Ueda, Y. Matsuzaki, S. Takata, T. Kobayashi, E. Yoshino, K. Kimura, T., Phase I trial of glif for taxane/platinum-resistant endometrial cancer, 19th International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology (ESGO 2015), 10.24-27/'15, Nice, France
 3. 松崎慎哉 角田守 松崎聖子 久保田哲 中川慧 清原裕美子 平松宏祐 森本晶子 高田友美 小林栄仁 上田豊 吉野潔 木村正, プラチナ耐性因子である Annexin A4 はプラチナ耐性癌の治療ターゲットとなりうる, 第3回婦人科がんバイオマーカー研究会, 2.21/'15, 福岡
 4. 角田守 松崎慎哉 高田友美 小林栄仁 上田豊 吉野潔 木村正, ATP7B は平滑筋肉腫の治療標的である, 第67回日本産科婦人科学会, 4.9-12/'15, 横浜
 5. 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ティーの解析, 第67回日本産科婦人科学会, 4.9-12/'15, 横浜
 6. 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
 7. 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
 8. 平松宏祐 吉野潔 高田友美 松崎慎哉 木村敏啓 小林栄仁 上田豊 藤田征巳 仲哲治 木村正, 網羅的タンパク解析およびバイオインフォマティクスを用いた類内臓癌発生臓器の鑑別マーカーの探索, 第66回日本産科婦人科学会学術講演会, 4.18-20/'14, 東京
 9. 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, 6.5-7/'14, 横浜
 10. 鶴房聖子 吉野潔 木村敏啓 小林栄仁 磯部晶 上田豊 馬淵誠士 澤田健二郎 藤田征巳 筒井建紀 木村正, 卵巣癌肉腫の1症例, 第130回近畿産科婦人科学会学術集会, 6.28-29/'14, 大阪
 11. 中川慧 上田豊 木村敏啓 小林栄仁 磯部晶 馬淵誠士 澤田健二郎 吉野潔 藤田征巳 筒井建紀 木村正, プラチナ抵抗性の再発子宮体癌に対して GLIF 療法が著効した1例, 第130回近畿産科婦人科学会学術集会, 6.28-29/'14, 大阪
 12. 平松宏祐 榎本隆之 世良田聡 吉原弘祐 上田豊 藤本穰 吉野潔 藤田征巳 森井英一 仲哲治 木村正, 網羅的タンパク解析およびバイオインフォマティクスを用いた子宮体部および卵巣原発の high-grade serous carcinoma の組織類似性の証明, 第2回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会, 7.5/'14, 東京
 13. 中川慧 上田豊 平松宏祐 清原裕美子 森本晶子 松崎慎哉 高田友美 小林栄仁 木村敏啓 磯部晶 馬淵誠士 澤田健二郎 吉野潔 藤田征巳 筒井建紀 木村正, タキサン・プラチナ抵抗子宮体癌に対するGLIF療法の有効性と有害事象の検討, 第56回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 7.17-19/'14, 栃木
 14. 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, 11.6-11/'14, Melbourne, Australia
 15. 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, 9.25-27/'14, 横浜
 16. Matsuzaki, S. Morimoto, A. Serada, S. Yokoyama, T. Kimura, T. Kobayashi, E. Ueda, Y. Yoshino, K. Fujita, M. Enomoto,

T. Naka, T. Kimura, T., Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A, The 104th Annual Meeting American Association for Cancer Research, 4.6-10/'13, Washington DC, U.S.A

17. 松崎慎哉 森本晶子 横山拓平 小林栄仁 木村敏啓 上田豊 吉野潔 藤田征巳 榎本隆之 木村正 仲哲治, Annexin A4 の発現は銅のトランスポーターでありプラチナの排出に関与すると知られる ATP7A を介して,耐性獲得に関与する, 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会, 5.10-13/'13, 札幌

18. プラチナ耐性に関与する Annexin A4 の機能領域解析, 森本晶子 榎本隆之 松崎慎哉 横山拓平 小林栄仁 木村敏啓 上田豊 吉野潔 藤田征巳 仲哲治 木村正, 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会, 5.10-13/'13, 札幌

19. 森本晶子 榎本隆之 平松宏祐 松崎慎哉 横山拓平 小林栄仁 木村敏啓 上田豊 吉野潔 藤田征巳 仲哲治 木村正, Annexin A4 の機能領域解析を用いた癌細胞プラチナ耐性機構の解明, 第 54 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 7.19-21/'13, 東京

〔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

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: 6 0 3 0 3 9 6 3

(2)研究分担者

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: 9 0 3 6 2 7 3 0

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: 1 0 3 4 6 2 1 5

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: 5 0 6 1 4 7 7 3

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: 9 0 5 8 4 5 2 4

(3)連携研究者

なし