

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：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463110

研究課題名(和文)新規培養法CTOSを用いた口腔癌に対する抗癌剤感受性試験の開発と耐性機構の解明

研究課題名(英文)Development of the anticancer drug sensitivity testing and elucidation of the resistance mechanism for oral cancer using new cultural method CTOS

研究代表者

高丸 菜都美 (TAKAMARU, Natsumi)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：40513031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：2011年にKondoらによって開発されたがん細胞塊(スフェロイド)培養法に従った。徳島大学病院倫理委員会で承認されたのち、患者への説明と同意を得た上で、CTOSのプロトコールに従って培養を行った。CTOS形成は20例中2例のみで確認できた。ゲル内にCTOSを埋入し、増大を試みたが、いずれの症例も増殖することはなかった。CTOS形成は大腸癌や肺癌では調整できることが報告されているが、咽頭癌などでは形成・培養されないことが報告されている。口腔癌でも形成・培養が困難であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We followed the spheroid cultural method developed in 2011 by Kondo et al. We cultured it according to protocol of CTOS after having obtained the informed consent to the patients after it was approved in University of Tokushima Hospital Ethics Committee.

We were able to confirm the CTOS formation only in two of 20 cases. We perform impaction of CTOS in gel and tried an increase, but both cases did not multiply. As for the CTOS formation, what we can regulate is reported for colorectal cancer and lung cancer, but a dumb person is reported not being cultured formation for the pharyngeal cancer. It was suggested for oral cancer that formation, culture was difficult. It suggests us for oral cancer that formation of CTOS and culture are difficult.

研究分野：口腔外科学

キーワード：CTOS スフェロイド

1. 研究開始当初の背景

化学療法の大きな問題点の一つは、癌に対して感受性のない抗癌剤を投与する可能性である。感受性がない抗癌剤を投与された患者は、強い副作用のみが生じて、生命予後の改善を図ることができない。すなわち患者にとって有益な化学療法とは、最も感受性のある抗癌剤を選択し、投与することである。しかし、これまでにさまざまな抗癌剤感受性試験が行われてきているが、臨床的にはほとんど普及していない。この原因は従来の抗癌剤感受性試験の精度が低いことにある。

精度が低い理由として、従来のがん細胞の培養法は、がん細胞を培養皿の平面上で培養しているため、生体内における癌の本来の特性が反映されていないことが指摘されてきた。

そこで、申請者は2011年 Kondo らによって開発されたがん細胞塊(スフェロイド)培養法(Cancer tissue originated spheroid: CTOS法)(Proc Natl Acad Sci USA;108(15): 6235-40, 2011)に注目している。CTOS法は、癌組織を、酵素で分解した後、遠心沈渣をメッシュフィルターに通し、フィルター上に残ったオルガノイドを回収、培養する方法である(図1)。CTOS培養法を用いると、線維芽細胞、血管内皮細胞、血球細胞は除去され、純粋な癌細胞のみ培養することが可能で、さらに立体構造を持つ生体内腫瘍に最も近似した環境を再現できる。またCTOS法で培養した細胞をマウスに移植すると、原発腫瘍の形質をほぼ再現した病理組織学的形態・特性を示すことが報告され(表1)、現在、最も生体内の癌組織に類似した培養法であると考えられる。すなわち、申請者は、CTOS法を口腔癌に応用し、抗癌剤感受性試験をおこなうと、より本来の癌の特性を反映した結果が得られる可能性が高いと考えている。CTOS法を応用すれば、従来の治療法とは

異なる視点の革新的な治療法、つまり患者にあったオーダーメイド化学療法が確立できるのではないかと考えている。

さらに、抗癌剤による化学療法の2つ目の問題点として、癌細胞の抗癌剤耐性の獲得がある。口腔扁平上皮癌においては、5-fluorouracil(5-FU)や cisplatin(CDDP)に対する抗癌剤耐性が、各々の代謝関連酵素活性の異常や excision repair cross-complementation group 1の発現上昇によって引き起こされることが報告され(J Proteome Res.7: 4784-91, 2008, Int J Oncol. 36: 1277-84, 2010)、その機序は少しずつ明らかにされている。しかし、開発から期間が短い Docetaxel (DOC)は、口腔癌に対して高い抗腫瘍効果を示すが(*Clin Cancer Res.* 15: 4228-4233, 2009)、DOCに対する耐性化機構については、乳癌細胞で ribophorin の発現が耐性化に関与すると報告されている(Nat Med 14: 939-948, 2008)のみで、口腔癌での報告は未だない。そこで、生体内の環境を反映するCTOS法を用いて遺伝子解析を行うと、今までの方法より生体に近い情報を得られることから、耐性化機構のメカニズムもより正確に解明できるのではないかと考える。すなわち、CTOS法によって得られた細胞を用いて、5-FU, CDDP, DOCにそれぞれ感受性のある細胞群と耐性を示した細胞群でマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現プロファイルを作成することによって、薬剤感受性および薬剤耐性に関連する原因遺伝子が見つかる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

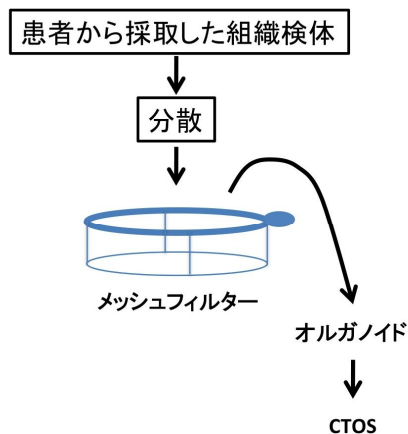
本研究では、患者より採取した口腔癌組織を用い、CTOS法にて培養を行い、由来腫瘍に類似した癌細胞を樹立する。樹立した癌細胞で、抗癌剤感受性試験を行い、臨床データと比較する。さらに、抗癌剤感受性群と非感受性群両者の遺伝子と miRNA

の発現変化を網羅的にマイクロアレイ解析で検討することによって、薬剤感受性と耐性化に関わる標的遺伝子と miRNA を同定し、バイオマーカーになりうるか否かについて臨床検体を用いて、明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

CTOS 法での癌細胞の初代培養の確立

本研究が徳島大学病院倫理委員会で承認されたのち、患者への説明と同意を得た上で、CTOS のプロトコルに従って培養をおこなった。すなわち、臨床検体(手術検体および生検)の一部を機械的かつ酵素的に処理した上で、3種類の mesh filter (500 μ m~40 μ m) を順に通していき、organoid fraction と flow through fraction に分け、organoid を stem cell 培養用の medium で培養し、CTOS 形成を確認する。CTOS 法で樹立した癌細胞をヌードマウス(日本クレア)の背中に移植し、移植腫瘍の組織像が、原発腫瘍と類似するかどうかを病理組織学的に検討する。

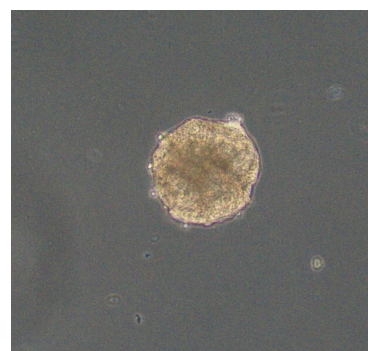


4. 研究成果

2011年にKondoらによって開発されたがん細胞塊(スフェロイド)培養法に従った。

徳島大学病院倫理委員会で承認されたのち、患者への説明と同意を得た上で、CTOS のプロトコルに従って培養を行った。CTOS 形成は 20 例中 2 例のみで確認できた。通常、大腸癌や肺癌において、CTOS 法は 24 時間で

形成される。COOS が形成された 2 例では、24 時間では形成されず、72 時間後に球形の CTOS が形成された。



COOS 形成された 2 例について、CTOS 増殖を図った。プロトコル通りにハイグルコース入りのゲルを作成し、ゲル内に CTOS を埋入し、増大を試みたが、いずれの症例も増殖することはなかった。ゲルの成分配分を何パターンか改善してみたが、結果は同じであった。CTOS 形成は大腸癌や肺癌では調整できることが報告されているが、咽頭癌などでは形成・培養されないことが報告されている。口腔癌でも形成・培養が困難であることが示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者

高丸 菜都美 (TAKAMARU, Natsumi)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：40513031

(2)研究分担者

宮本 洋二 (MIYAMOTO, Youji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：20200214

永井 宏和 (NAGAI, Hirokazu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授

研究者番号：50282190

玉谷 哲也 (TAMATANI, Tetsuya)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：30274236

内田 大亮 (Uchida, Daisuke)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20335798