

# 抗癌剤感受性試験法に基づいた テーラーメイド癌化学療法に関する研究

## 学位論文内容の要旨

抗癌剤感受性試験とは手術や生検によって採取した患者の腫瘍細胞を *ex vivo* で培養し、抗癌剤を作用させることによって癌細胞の抗癌剤に対する感受性を判定することを目的としている。しかし現在に至るまで患者検体の確保の難しさや基礎的な検討が十分に行われていないなどの理由から抗癌剤感受性試験は十分普及するには至っていない。そこで現在臨床研究に広く用いられている抗癌剤感受性試験法である collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test (CD-DST) 法<sup>1)</sup>を用いた場合の基礎的知見についてまとめるため、まずヒト固形癌由来株化細胞を用いて癌種ごとの CD-DST 抗癌剤感受性パターンの検討を行った。さらに、株化細胞から genome DNA を抽出し array comparative genomic hybridization (aCGH)<sup>2)</sup>による解析を行い、感受性データベースとリンクさせることで癌細胞の染色体不安定性と抗癌剤感受性との関連について考察した。これらの知見をもとに抗癌剤の接触濃度や接触時間などを変化させた場合に感受性判定に及ぼす影響、さらに抗癌剤耐性細胞を用いた検討を行い、癌化学療法のテーラーメイド化の一助となりえる知見が得られたので報告する。ヒト固形癌由来株化細胞全 64 種について CD-DST のためのコラーゲンゲル包埋培養を試みたところ、54 種で増殖が認められたことからこれらを用いて各種抗癌剤に対して感受性スクリーニングを行った。抗癌剤には次の 11 種を選定した。シクロホスファミド、フルオロウラシル (5-FU)、ゲムシタピン (GEM)、マイトマイシン C (MMC)、アドリアマイシン (ADR)、エピルピシン (EPI)、ビンクリスチン (VCR)、パクリタキセル (PTX, TXL)、ドセタキセル (DTX, TXT)、イリノテカン (活性体 SN-38)、シスプラチン (CDDP)。これらを二次元でクラスター解析した結果、隣接した細胞株同士が同じ部位由来となったクラスターはわずか 4 つにとどまっており、抗癌剤に対する感受性パターンに癌の原発部位が及ぼす影響は強くないことが示された。しかしその一方で細胞株を大きく 2 群に分類した場合、一般的に化学療法の感受性が高い膀胱癌や卵巣癌は耐性群にはほとんど含まれていないことから、これらの癌種においては非特異的に抗癌剤感受性が高いことが示された。一方、耐性群に多く見出された大腸癌由来の細胞株では、大腸癌に対して効果の低い CDDP をはじめとする多くの薬物で他の細胞株よりも有意に高い耐性を示したが、大腸癌の治療に広く用いられている 5-FU では他の細胞株との感受性に差は見られなかった。これは大腸癌に対して CDDP などが効きにくいのは癌部に薬剤が到達しにくいといった体内動態的な点からではな

く、癌細胞自体の性質によるものであると考えられる。

癌細胞では見出される染色体の一部の欠失や増幅が見出されるが、このパターンを分析することで癌の性質を明らかにできれば癌治療をより患者ごとに個別化でき、治療の最適化につながると考えられる。そこで各細胞株の感受性スペクトルと癌の染色体不安定性との関連を明らかにすることを試みた。多くの細胞株で染色体の増幅、欠失 (gene dosage の変化) が見られた領域が存在したが、抗癌剤感受性と gene dosage に相関性が見出された領域との同一性は低かった。また相関の見出された領域は同時に複数の抗癌剤の感受性とも相関しているものが多い一方、特定の抗癌剤の耐性にのみ関連している部位もあり、これらの部位の gene dosage から抗癌剤感受性を予測することも可能であると考えられる。また、5-FU において既に負の相関の報告のある 18p13 については 5-FU 高濃度では負の相関が得られたが低濃度では相関は認められなかった。この領域では 5-FU の細胞内活性化酵素である thymidylate synthase が耐性に関与すると考えられるが、抗癌剤の濃度によって異なる遺伝子が耐性に関与することは十分に考えられることであり今後は抗癌剤の濃度も考慮した遺伝子探索の必要性を示唆するものであると考えられる。CD-DST の臨床検体のアッセイ濃度は当初血中 AUC と同程度と説明されていたが、近年は適用薬剤や部位により治療結果と大きく乖離する場合が知られてきた。そこで実際の治療における奏効率よりも遥かに高率で感受性と判定される GEM を例に CD-DST における抗癌剤の接触条件について詳細に検討した。IC<sub>50</sub> による比較を行ったところ、従来から *in vitro* 抗腫瘍活性の測定に汎用される Mosmann による MTT 法<sup>3)</sup>は抗癌剤の接触時間と抗腫瘍活性のあいだにタイムラグが生じたが、抗癌剤除去後にコロニーを増殖させる CD-DST 法によって算出した IC<sub>50</sub> 値では抗腫瘍効果と接触時間の間にはタイムラグのない比例関係を見出すことができた。さらに直線に近似されたことは、GEM 接触時間と IC<sub>50</sub> の積で表される値 (AUC と同単位) をその接触条件における抗腫瘍活性と定義した場合、接触時間を変化させると抗腫瘍活性が変化することを意味している。従って CD-DST 法は MTT assay に比較して有用であることが示唆された。

抗癌剤は種々の ABC トランスポーターにより輸送されることが知られている。従ってこれらのトランスポーターの過剰発現が抗癌剤感受性と相関することが考えられた。そこで培地にこれらの基質となる抗癌剤を加えトランスポーターの発現を誘導した細胞株を用いて感受性パターンの変化について検討した。EPI を接触させて作成した耐性株 (HLE-EPI) および MIT を接触させて作成した耐性株 (HLE-MIT) において MDR1 および BCRP mRNA 発現量は 20 倍前後まで上昇した。またこれら耐性株について CD-DST を用いて各種抗癌剤に対する耐性度を求めたところ、それぞれの細胞で過剰発現したトランスポーターにより交叉耐性が生じていることを強く示唆する結果が得られた。このなかで EPI は両耐性株に対して耐性を有していたことから、この耐性獲得がトランスポーターによる抗癌剤細胞内蓄積量の減少によるものであるかを明らかにするため、EPI を用いて細胞内蓄積量の推移を確認したところ、耐性株ではどちらも親株よりも有意に細胞内蓄積量が減少していることが示された。

#### Reference

- 1) 小林利運, 谷坂圭造, 近藤直人, 水戸欣子, 肥塚正博, 横内秀起, 東山聖彦, 児玉憲, 土井修, 山田正信, 中山秀光, 家木良彰, 糸井真一, 三宅正幸, 瀧俊彦, 原聡, 安富正幸, 福田義孝. Jpn J Cancer Chemother 22: 1933-1939 (1995)
- 2) Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T and Lichter P. Genes Chromosomes Cancer 20:399-407 (1997)
- 3) Mosmann T. J Immunol Methods 65:55-63 (1983)

# 学位論文審査の要旨

|    |     |    |           |
|----|-----|----|-----------|
| 主査 | 教授  | 井関 | 健         |
| 副査 | 教授  | 藤堂 | 省 (医学研究科) |
| 副査 | 助教授 | 菅原 | 満         |
| 副査 | 講師  | 平野 | 剛         |

学位論文題名

## 抗癌剤感受性試験法に基づいた

## テーラーメイド癌化学療法に関する研究

この論文は癌化学療法において患者ひとりひとりに最適な治療法を見つけ出し実践するいわゆるテーラーメイド化を実現するため、抗癌剤感受性試験法に着目した研究結果について論じている。抗癌剤感受性試験とは手術や生検によって採取した患者の腫瘍細胞を *ex vivo* で培養し、抗癌剤を作用させることによって癌細胞の抗癌剤に対する感受性を判定することを目的としており、主に臨床の外科領域を中心に研究が行われてきた。しかし現在に至るまで患者検体の確保の難しさや基礎的な検討が十分に行われていないなどの理由から抗癌剤感受性試験は十分普及するには至っていない。この論文では現在臨床研究に広く用いられている抗癌剤感受性試験法である collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test (CD-DST) 法を用いた場合の基礎的知見についての検討がなされている。

まず第1章では54種という多種にわたるヒト固形癌由来株化細胞を用いて癌種ごとのCD-DST抗癌剤感受性パターンの検討を行い、株化された癌細胞において癌種ごとの特徴を見出すためのスクリーニングについて詳細に報告し、クラスター解析の手法でパターンを検討した。その結果、癌種によって抗癌剤に感受性がパターン化される可能性は低く、むしろ細胞株ごとの差のほうが大きくなると結論している。このことは、化学療法の内容を決定するうえで患者ごとに抗癌剤感受性試験を行う必要性を示唆すると考えられる。

第2章ではこれら細胞株ごとの差について、さらに株化細胞から genome DNA を抽出し array comparative genomic hybridization (aCGH) による解析を行い、癌細胞の染色体不安定性と抗癌剤感受性との関連について具体的な染色体領域を見出している。相関の見出された領域は同時に複数の抗癌剤の感受性とも相関しているものが多い一方、特定の抗癌剤の耐性にのみ関連している部位もあり今後これらの部位の gene dosage から抗癌剤感受性の予測へも発展可能であるとしている。

第3章では CD-DST 法を実地にさまざまな抗癌剤へと応用するために抗癌剤の接触濃度や接触時間などを変化させた場合に感受性判定に及ぼす影響について近年上市され、未だ統一した試験法が確立していない塩酸ゲムシタピン（商品名ジェムザール®）を用いた検討を行っている。その結果、ゲムシタピンの感受性は24時間から0.5時間という短時間の接触時間に至るまで、 $IC_{50}$ は接触時間に依存的事であることを示し、さらに細胞株ごとに抗腫瘍効果の時間依存性が異なることを CD-DST 法を用いて示した。すなわちこの原理を用いれば抗癌剤の低濃度長時間投与に対する患者ごとの適否を判定することができるため、CD-DST 法が抗癌剤の選択だけでなくそれぞれの抗癌剤の投与方法の至適化にも利用可能なものであることが示唆するものであり、他に例を見ない。

また、第4章では抗癌剤との接触によって生じた抗癌剤耐性細胞について、細胞増殖抑制能の観点から交叉耐性を測定し、その交叉耐性の要因として抗癌剤に誘導される MDR1 および BCRP 等の ABC トランスポーターの過剰発現が関与することを示している。

以上を以下にまとめる。

- ヒト固形癌由来培養細胞の抗癌剤に対する感受性は原発部位よりも細胞株ごとの差が大きいことが明らかになった。
- aCGH 法と抗癌剤感受性試験の結果から、抗癌剤感受性と関連のある染色体領域が特定された。
- CD-DST は抗癌剤接触時間を検討するうえで有効な手法であり、投与方法の選択にも応用できる可能性が示された。
- 抗癌剤の細胞増殖抑制に対する交叉耐性の要因として、抗癌剤に誘導されるトランスポーターの過剰発現が関与することが示された。

以上により本論文は CD-DST 法を用いた抗癌剤感受性試験法を用いることで癌化学療法の特長・短点の一助となりえる知見を報告したものであるといえる。