Osaka University Knowledge Archive

Title	Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer
Author(s)	近藤, 純平
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58931
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【16】

氏　　名	近　藤　純　平（こん どう じゅん ぺい）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学 位 記 番 号	第　２４８８８　号
学位授与年月日	平成23年９月20日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer （細胞接着の維持により高純度の大腸癌初代スフェロイド培養が可能となる）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　竹原　徹郎 （副査） 教　授　森　　正樹　　教　授　月田早智子

論 文 内 容 の 要 旨

〔　目　　的　〕

個々の患者腫瘍の性質を反映する癌細胞の初代培養法は、癌の個別化医療に有用であると期待されてきた。しかし癌細胞の初代培養法は、煩雑な取り扱い、癌以外の細胞混入、癌細胞の低い生存率や増殖率、再現試験が困難など多くの技術的な問題が未だ解消しておらず、広く臨床応用されるには至っていない。従来の初代培養法では、多くの報告において癌細胞を単細胞化して培養を行われてきた。一方で正常の腸上皮や癌細胞では、細胞間質接着の喪失がanoikisと呼ばれるアポトーシスを引き起こすこと、細胞間接着がanoikis回避に寄与するということが報告されている。今回我々は大腸癌検体を適切に処理することで癌細胞が細胞間接着を維持したまま細胞塊として回収できること、この細胞塊は速やかに球状の形態へ変化し浮遊状態で安定して培養できることを見出した。またさらに、その性質及び応用の可能性についても検討を行った。

〔　方　　法　〕

大腸癌手術検体もしくは生検組織を機械的に細断後、酵素処理を行いフィルターに捕捉された細胞塊を回収することで、上皮細胞に富んだ細胞集団を回収した。この細胞塊を血清不含培地に浮遊させることで、翌日には球状の細胞塊が得られた。この球状の細胞塊をCTOS（cancer tissue-originated spheroids）と命名し、その純度、生存性、また臨床応用の可能性につき検討した。

〔　成　　績　〕

CTOSの調製は手術・生検を合わせて96.2%（113/117例）の症例で可能であり、検体中の癌細胞のうち14.9～62.8%がCTOSとして回収された。酵素処理により単細胞まで分解された腫瘍細胞の殆どが、処理の翌日にはアポトーシスを起こすのに対し、CTOSは高い生存性を保っていた。またCTOSはトリプシンによる単細胞への分散や、E-cadherin中和抗体存在下の培養によりアポトーシスを来たし、細胞間接着の維持が生存性に寄与していると考えられた。

次にCTOSを構成する細胞につき検討した。FACSによる表面抗原の検討では、CTOSを構成する細胞はEpCAM陽性率が高く(98.4 ± 0.4%; n = 5)、CD45+の血球細胞やCD31+の血管内皮細胞が殆ど検出されない、高度に純化された上皮細胞集団であった。また免疫組織染色では、CD68+の血球やαSMA+の線維芽細胞なども検出されなかった。さらにCTOSは免疫不全マウスでの皮下腫瘍形成能をもち、H.E染色、アルシアンブルー染色、免疫組織染色によるp53蛋白の検出により、移植腫瘍は元の腫瘍の遺伝的・組織学的特徴を維持していた。

さらにCTOSのin vitroでの増大について検討した。CTOSは血清含培地や浮遊培養と比較して、幹細胞培地による三次元培養が最も効率よい増大率を示した。また培地が与えるCTOS増大への影響を検討するため、細胞増殖に関連する重要なシグナル因子であるAKT、及びERKのリン酸化を検討した。幹細胞培地では、血清含培地と比べ、強いAKTのリン酸化を認めた。一方、ERKのリン酸化へは殆ど影響しなかった。さらにPI3K阻害剤であるLY294002により、濃度依存的にAKTのリン酸化が減少し、それに一致してCTOSの増大抑制が認められた。幹細胞培地によるAKTリン酸化がCTOSの良好な増大に寄与しているものと考えられた。

またCTOSを用いた薬剤治療の効果予測の可能性について検討を行った。三次元培養下のCTOSに0.1-10μg/mlの5-FUを投与し、増大の抑制率により感受性を評価したところ、異なる症例由来のCTOS間で感受性の個人差が検出された。以上により、CTOSは薬剤応答の研究に応用できる可能性が示された。

〔　総　　括　〕

大腸癌臨床検体から、高い確率でCTOSを形成することが可能で、得られた細胞塊は純度と生存性の高い癌細胞の集団であることが明らかとなった。以上のようなCTOSを用いることで治療効果予測などの個別化医療やバイオマーカー探索など広い臨床応用が可能と考えられた。

論文審査の結果の要旨

患者個々の腫瘍の性質を反映する癌細胞の初代培養法は、癌の個別化医療に有用であると期待されてきた。しかし従来の初代培養法は、癌以外の細胞混入、癌細胞の低い生存率や増殖率、再現試験が困難など多くの問題があり、広く臨床応用されるには至っていない。申請者は細胞間接着を維持した回収法により、癌細胞を球状の細胞塊として浮遊状態で安定して培養できることを見出し、この球状の細胞塊をCTOS (cancer tissue-originated spheroid)と命名した。CTOSの調製は手術検体の99%で可能であり、また高度に純化された上皮細胞の集団で、さらにin vitroで増殖培養することが可能であった。またCTOSは免疫不全マウスでの皮下腫瘍形成能をもち、移植腫瘍は元の腫瘍の遺伝的・組織学的特徴を維持していた。さらにCTOSを用いることで抗癌剤感受性の症例差が反映された。本研究の成果は、今後個別化医療やバイオマーカー探索など広い臨床応用につながるものであり、学位に値するものと認める。