

平成 2 7 年 6 月 1 7 日現在

機関番号： 1 2 1 0 2

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2011 ~ 2014

課題番号： 2 3 5 9 2 4 3 4

研究課題名 (和文) オーダーメイド化学療法を目指した抗癌剤感受性検査の判定基準の策定

研究課題名 (英文) The establishment of the sensitivity criteria in in vitro chemosensitivity test for clinical application

研究代表者

沖 明典 (Oki, Akinori)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号： 6 0 3 3 4 0 6 7

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 4,000,000 円

研究成果の概要 (和文) : 婦人科癌患者から樹立した 9 細胞株を用いて、実臨床で投与され効果判定されたpaclitaxel : PTXを代表抗がん剤としてin vitro感受性検査を行った。その結果50%細胞増殖阻止 (I50) が得られなかった細胞株由来の癌症例では化学療法が奏効しなかった。I50が得られた症例ではSD以上と奏効判定された。そのうち著効例ではI90が達成され、50%細胞増殖阻止濃度 (IC50) は、感受性株と耐性株では103以上の差がみられた。臨床運用上は実際に体内で達成できる濃度でのI50の達成が目安になると考えられた。

研究成果の概要 (英文) : Nine cell lines, established from Gynecologic cancer patients, treated with paclitaxel (PTX), performed in vitro chemosensitivity test against Paclitaxel (PTX). As a result, three patients whose cell lines were not obtain 50% cell growth inhibition (I50) in in vitro, were diagnosed as not effective for chemotherapy with PTX. In constant, cases, which obtained I50, were judged effective as beyond SD status in RECIST criteria. In CR case, not only I50 but I90 were achieved and she got cured. In conclusion, the achievement of I50 in vitro test might be a predict factor for the clinical result of the chemotherapy

研究分野： 婦人科悪性腫瘍

キーワード： 抗がん剤感受性検査 婦人科悪性腫瘍 化学療法感受性 完全奏効 パクリタキセル

1. 研究開始当初の背景

ヒト悪性腫瘍から樹立された細胞株の *in vitro* 抗がん剤感受性検査を行う報告は多い。また、細胞株の特徴を形容するものとして、抗がん剤耐性株 / 感受性株を名乗るものも多いが、そのほとんどは、naïve の細胞株に抗がん剤を低濃度暴露後に生き残った細胞を継代して得られたものを耐性株と称する。たしかに臨床において化学療法施行後に再発・再燃した腫瘍の獲得耐性のメカニズムを *in vitro* で反映しているとおもわれるが、未治療の腫瘍についての原腫瘍の本来持っている感受性・耐性を反映しているわけではない。また、獲得耐性ではない、化学療法抵抗性が特徴の例えば卵巣明細胞腺癌の細胞株の報告はあるが、反対に臨床で化学療法感受性の細胞株樹立は、一部がん種の細胞株以外は知られていなかった。

2. 研究の目的

今回、我々は癌性胸膜炎や鎖骨上リンパ節転移を病理学的に確認された卵巣癌 4 期症例から初代培養を行い、細胞株を樹立したが、臨床では、施行された化学療法 (Paclitaxel: PTX/ Carboplatin: CBDCA :: TC 療法) が奏功し、画像的のみならず病理学的に CR となり、治療終了後長期無再発で治癒したと考えられた症例を経験した。この細胞株 TXO203 は特に PTX に対して著しい感受性を持つと考えられた。そこで、我々は教室内で樹立された、婦人科悪性腫瘍由来細胞株を用いて、抗がん剤に暴露されたことのない細胞株の *in vitro* 感受性検査を行い、当該症例が臨床で施行された化学療法の効果との間に相関があるのか、あるとしたら *in vitro* の感受性結果で臨床結果の予測ができるような、感受性判定基準を策定することを目的として研究を開始した。

3. 研究の方法

・細胞株

治療前に informed consent を得た、8 症例の婦人科癌患者から樹立した 10 細胞株を用いた。内訳は子宮頸癌 3 症例、子宮体癌 2 症例 (3 株)、卵巣癌 3 症例 (4 株) である。このうち、子宮体癌 1 例で、子宮体部の原発病巣とリンパ節転移病巣から独立して細胞株が樹立され、卵巣癌の 1 例は、前述の TXO203 であるが、低濃度 PTX 暴露によって得られた PTX 耐性である TXO203R を参考として検査している。また、PTX の interview form から得られた情報により、薬剤開発に用いられ感受性株と称された細胞株 A2780 を PTX 感受性の bench mark として加えている。

表 1 に使用した細胞株を示す。

・ *in vitro* 薬剤感受性検査

96well microtiter plate を用い、各細胞株を passage し、PTX を 0.01~10 $\mu\text{g/ml}$ の 9 濃度、時間を 1~48 時間の 6 段階で接触させて、薬剤を洗浄除去ののち、WST-1 assay 法で薬剤未接触コン

トロールに対する各接触時間毎の生細胞割合を求めて細胞増殖阻止曲線 (surviving curve) を描出し、50% 及び 90% 増殖阻止 (I50, I90) が得られた場合、その最低濃度を確認し、各々の接触時間での増殖阻止濃度 IC50, IC90 とした。

name	origin	stage	TC	RECIST	prognosis
TXO203	Ov ca	IV	+	CR	NER-DOO
TXO238	Ov ca.	IIIc	+	PD	DOD
TXC234	Cx ca.	Ib2	+	PD	DOD
TXE145	Em ca.	IV	+	SD	DOD
TXO46	Ov ca.	Ia	-	-	NED
TXC244a	Cx ca.	Ib1	+	effective?	NED
TXE232a	Em ca	IVb	+	SD	DOD
TXE232b	Em ca	↓	+	SD-PD	↓
TXC154	Cx ca.	IVb	+	SD	DOD
A2780	Ov ca.	-	n. t	-	-
TXO203R	Ov ca.	-	n. t	-	-

注) Ov ca: 卵巣癌
Em ca.: 子宮体癌
Cx ca.: 子宮頸癌
TC: PTX/CBDCA 併用療法
NER: no evidence of recurrence
NED: no evidence of disease
DOD: Dead of disease
DOO: Dead of other disease

表 1 細胞株と由来となる臨床背景

・ *in vitro* 薬剤感受性検査

96well microtiter plate を用い、各細胞株を passage し、PTX を 0.01~10 $\mu\text{g/ml}$ の 9 濃度、時間を 1~48 時間の 6 段階で接触させて、薬剤を洗浄除去ののち、WST-1 assay 法で薬剤未接触コントロールに対する各接触時間毎の生細胞割合を求めて細胞増殖阻止曲線 (surviving curve) を描出し、50% 及び 90% 増殖阻止 (I50, I90) が得られた場合、その最低濃度を確認し、各々の接触時間での増殖阻止濃度 IC50, IC90 とした。

・ *in vitro* 感受性・耐性の指標

従来我々が感受性を判定していた基準を用いた。すなわち、

- ◆ 感受性: I50 が得られる、また、臨床投与量での末梢への薬剤分布の指標である、AUC (Area Under the Curve: 単位は $\mu\text{g/ml}\cdot\text{hr}$) と、*in vitro* での薬剤接触時の AUC 近似値: eAUC (experimental AUC: 接触時間 x 接触濃度) を比較して、I50 が得られた場合 eAUC を求め、臨床投与量での AUC (PTX では 180mg/m^2 投与時に $16.5\mu\text{g/ml}\cdot\text{hr}$) を下回っている。

- ◆ 耐性: 感受性をみたくないこと

・細胞株由来症例の臨床データ解析

診療録から臨床診断、臨床進行期、治療歴、PTX 投与の有無、PTX 投与後の効果判定 (RECIST 効果判定基準 ver1.1)、予後を抽出した。今回は特に、PTX 投与直後の RECIST 判定結果を CR (完全奏効)、PR (部分奏効) & SD (安定)、PD (進行) に分類して検討した。残存腫瘍がない症例については RECIST 判定に適さないため、その後の治療や疾患の進展度、予後から総合的に判断した。

4. 研究成果

TXO203 は感受性が確認された重要な細胞株であるが、TC 療法が行われており、PTX と CBDCA の感受性を個別に確認した(図1、表2) CBDCA では I50, I90 はいずれも達成されたが、投与量での AUC ではいずれも達成されていないことから、PTX が奏功の中心的役割を果たしたものと考えられる。

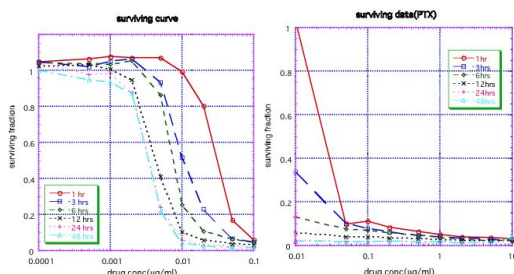


図1 CBDCA(左) / PTX(右)の surviving curve

TXO203		IC50						IC90					
drug	AUC(μ g/ml \cdot hr)	1(hr)	3	6	12	24	48	1(hr)	3	6	12	24	48
PTX	16.5	0.05	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.1	0.1	0.05	0.02	0.01	0.01
CBDCA	100	200	100	50	10	10	5	—	—	100	50	50	20

表 2 2031におけるPTX、CBDCAの薬剤感受性

										AUC以下で達成			
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----------	--	--	--

表2 203におけるPTX, CBDCAの薬剤感受性

cell line	cancer origin	IC50						IC90					
		1(hr)	3	6	12	24	48	1(hr)	3	6	12	24	48
TXO203	Ov ca	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.1	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
TXO238	Ov ca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TXC234	Cx ca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TXE145	EM ca	-	-	-	-	10	5	-	-	-	-	-	-
TXO46	Ov ca	-	-	-	5	n.t.	n.t.	-	-	-	n.t.	n.t.	-
TXC244a	Cx ca	10	10	5	10	5	10	-	-	-	-	10	10
TXE232a	Em ca	0.2	0.1	0.1	0.05	0.05	0.05	-	-	-	-	-	-
TXE232b	Em ca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TXC154	Cx ca	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-
A2780	Ov ca	0.05	0.05	0.05	0.05	0.01	0.01	-	-	-	-	-	-
TXO203R	-	5	5	5	1	0.1	0.05	-	-	-	-	5	0.1

AUCは以下で算出
n.t.: n.t. tested

表3 各細胞株のPTX感受性

各細胞株を用いて PTX の感受性を検討した(表3) この結果、A2780 は I50 が全ての接触時間で臨床投与時の AUC 以下で達成された TXO203 も同様に I50(図2)更に、90%増殖阻止(I90)も AUC 以下で達成され(図3)、また、その誘導耐性株である TXO203R では AUC 以下の I50 は達成されていないかった。同様に、今回臨床的には PTX の奏功が確認されていないが、TXO46 は卵巣癌のなかでも化学療法抵抗性であることが知られている明細胞腺癌由来であり、IC50 が達成されているものの、AUC では達成されていないかった。これらにより、検査手技および、検査結果の解釈に I50 や AUC を参照することは妥当性が確認された。

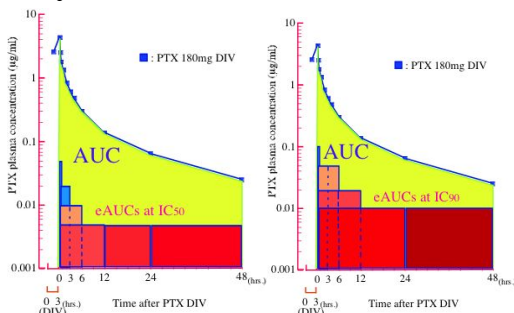


図2

TXO203 の I50, I90 時の eAUC

十分 AUC 以下で達成されていることがわかる

図3

その他の細胞株の試験結果では、TXO238, TXC234, TXE232b は I50 が得られずに耐性、TXE145, TXC154 は一部 I50 が達成されるも AUC 以下ではないため、耐性、一方で TXC232a, TXC244a は感受性と判定された。

臨床成績

表1に細胞株の由来となった症例カルテを参照結果の概略を示す。TXO46 以外は全て TC 療法が施行されて、画像評価で判定 RECIST 治療効果判定がされていた。TXO46 は Ia 期卵巣明細胞腺癌由来で、初期のため化学療法を施行しておらず、無病生存で今回の臨床での化学療法奏功検討からは除外した。

TXO203 は IV 期卵巣未分化癌で遠隔転移を有する症例であり、救命目的の初回腫瘍減量手術時にサンプリングされた検体から細胞株樹立、その後 TC 療法 2 コースで CR となり、第二回目の減量手術で腫瘍の消失を確認(病理学的 CR)、その後 7 回の TC 療法追加後再発を認めず卵巣癌は治療判定とした症例である。TXC244a は Ib 期子宮頸癌ではあったが、術前から傍大動脈リンパ節転移を指摘されており、手術で 68/118 のリンパ節転移を認め廓清断端も陽性のため、TC 療法と放射線治療を追加後 5 年以上の無病生存している症例で、臨床的には全身療法である化学療法の奏功が強く推定される症例である。TXE232 は原発巣(232a)、リンパ節転移巣(232b)同時に採取されて別々に細胞株が樹立されたものだが、最終的には癌死したものの、原発巣は TC 療法で SD 判定、リンパ節は PD 判定と別れた。

【考察】

今回の研究を開始するきっかけは臨床現場で治療中に TXO203 が樹立され、化学療法で IV 期症例が治療過程を目の当たりにしたことに他ならない。結果的には臨床の追試となったが、樹立された TXO203 の *in vitro* 感受性検査結果ではこれまでに経験したことのないような低濃度の PTX で細胞増殖阻止が得られたことは非常に衝撃的であった。接触時間を 30 分に短縮しても、体内で実現される PTX の最大血中濃度以下で I90 が得られた。薬剤感受性についての論文の多くは *in vitro* で原細胞株に低濃度の薬剤を接触させるなどして樹立した人工耐性株とその原株を感受性と呼んでおり、直接臨床に feedback できるような感受性・耐性の基準はないことがわかった。我々は以前より臨床現場から採取された婦人科由来細胞株の初代培養・樹立を行っており、その感受性判定に I50 および、薬剤の AUC を用いてきた。今回はその効果判定の絶対的感受性が担保された TXO203 を得て、これまでの仮説を validate する

ことを試みたものである。

今回の検査では、我々の感受性判定基準を満たしたものは3株で、満たさなかった株が6であった。満たした株の由来となった3症例は2症例が奏効したものと判定もしくは推定され、1症例では腫瘍採取部位はSDであった。また、耐性と判断されたなかで臨床評価がSDだった2株はいずれもI50は得られていた。PD判定だった症例由来の3株はいずれもI50が得られていないことから、細胞株でI50が得られなかった症例は耐性だったと言える。

臨床現場ではRECIST効果判定基準により、化学療法の効果をCR, PR, SD, PDの4段階に分類するが、実際にはCRはほぼ皆無で、良くてPR、SD評価は初回治療においては、治癒を目指す場合は効果不十分と考えるが、進行例で延命目的の場合や再発例では腫瘍の増大を阻止したことを重視して、有効(non-PD)と判断して治療を継続する場合も多い。PD評価で初めて無効と判定して治療を切り替えるか終了とする。このように我々が化学療法に求めている結果は、CRが理想ではあるが、現実的にはnon-PDである。なぜなら、初回治療例であれば、手術療法や放射線療法の併用により、腫瘍を直接減量することが可能であり、再発例では、長期間のSDが延命に繋がるからである。このような治療上有用性が予測できる条件として、PTXに関しては十分に体内で到達可能な薬剤濃度50%以上の増殖抑制が得られることが条件であることが推測された。残念ながら、RECIST判定PR症例がなかったため、腫瘍が縮小する最低条件は得られなかったが、無効症例回避を目的であれば、I50の達成が最低条件であると考えられる。AUC/eAUCは重要な因子であると考えられるが、今後新たな症例を検討することにより、有用性を検証する必要がある。

今回の研究でもう一つ特徴的だったのは、TXE232a/bである。NAC後にサンプリングされたものだが、232aは子宮体癌の原発巣から、232bは転移巣から採取されて樹立された。両者のPTX感受性が著しく異なり、232aはI50がAUC以下で得られているが、232bではI50が得られなかった。NAC後の腫瘍のRECIST評価では、原発巣はSD、リンパ節転移巣ではPDであり、感受性テストの結果に合致する臨床経過であった。

血液系のがん以外や胚細胞性腫瘍など一部のがん種以外では希有とされる化学療法のみで治癒してしまうような著効例は実験室ではI90をAUC以下で得られ、PR/SDの株に比べると 10^3 以上の濃度差があることがわかった。いずれにしても、

時折臨床で遭遇する、化学療法の著効例が実験室で再現することができ、今後さまざまなin vitroでの感受性検査、特に臨床応用される検査が開発される時には、TXO203は感受性のbench markとなることが期待される。

今回臨床ではPTXだけではなく、CBDCAも同時投与するTC療法が施行されていた。本来であれば、今回の検討も両者の併用で検討するべきだったが、両者の濃度の設定など実験系が複雑になること、TXO203という絶対的にPTX感受性を持つ細胞株が存在していたことから、TC療法ではkeydrugと言われるCBDCAの効果を無視した形で結論づけした。今後同様の検討をCBDCAについても行い、可能であれば両者併用の検討もなされるべきであると思われる。

【結論】

in vitro抗剤感受性検査の結果において、由来となる腫瘍が化学療法の奏効するかどうかを推定する、一つの基準として、での体内で達成可能な薬剤濃度における50%細胞増殖阻止が得られるかどうかである。その奏効程度の推定に関しては、薬剤標準投与量に対するAUCと実験系での近似値eAUCが参考になる可能性が示唆された。

【終わりに】

進行婦人科癌では最近の研究で化学療法先行して奏効を待って手術を行うという術前化学療法(NAC)が、有益であると報告されている。臨床現場では化学療法の奏効予知法の開発が待たれており、今回の研究がその礎となることを祈念するものである。

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 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖 明典 (OKI, Akinori)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：60334067

(2) 研究分担者

吉川 裕之 (YOSHIKAWA, Hiroyuki)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：40158415

水口 剛雄 (MINAGUCHI, Takeo)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：40372396

(3) 連携研究者

()

研究者番号：