

氏 名 ひらの かつひさ
平野 勝久

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 184 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 **Establishment and characterization of two novel pancreatic carcinoma cell lines**
(新たに樹立した膵癌細胞株の生物学的特性の解析)

論文審査委員

(主査)	教授	野口 誠
(副査)	教授	井ノ口 馨
(副査)	教授	西田 尚樹
(副査)	教授	嶋田 豊
(指導教員)	教授	塚田 一博

論文内要の要旨

<目的>

膵癌は世界的に最も予後不良な癌の一つである。膵癌は診断時に進行例であることが多く、治癒切除可能な症例が多くない。また化学療法に対しても抵抗性であることが予後不良な原因として考えられている。今回の研究では、詳細な症例背景が判明している症例を用いて新たに膵癌細胞株 (TYPK-1, TYPK-2) を樹立した。さらにその生物学的特性について解析した。

<方法並びに成績>

1. 患者背景

TYPK-1

症例は 82 歳の男性で、膵癌 (T4, N1, M0, UICC 第 7 版) と診断された。門脈、肝動脈への浸潤が疑われ、治癒切除困難と判断された。消化管通過障害に対して姑息的手術(胃空腸バイパス、空腸空腸バイパス、空腸瘻造設)が施行された。その後、積極的な治療は行わず原病死した。

TYPK-2

症例は 55 歳の男性で、肝転移を認め、切除不能膵癌 (T4, N1, M1, UICC 第 7 版) と診断された。GS 療法 (Gemcitabine + TS-1) が開始されたが、肝転移の増大と癌性腹水の出現を認めたため、FOLFIRINOX 療法 (5-FU, leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin) に変更された。その後も腫瘍は増大傾向を認め、骨転移も出現し、原病死した。

2. 初代培養

TYPK-1, TYPK-2 ともに培地は 5% の fetal bovine serum (FBS; GIBCO, Grand Island, NY, USA) を加えた Dulbecco's modified Eagles' medium plus Ham's F12 (DMEM/Ham's; Wako, Osaka, Japan) を用いて、37°C, 5% CO₂ の環境で培養した。

TYPK-1

手術時にサンプリングしたリンパ節を phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した後に、剪刀を用いて細かく細断し、これを培養した。

TYPK-2

腹水穿刺によって採取した 50ml の癌性腹水を 1600G, 10 分間遠心分離した。上清を取り除き、ペレットを回収し培養した。

3. 継代方法

Subconfluent となった細胞は、PBS (-) で洗浄した後に 0.25% Trypsin-EDTA (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) を加え、37°C, 5% CO₂ で 5 分間インキュベートして、細胞を剥離した。細胞懸濁液に 5ml の培地を加え、1600G, 5 分間の遠心分離を行った。上清を除去してペレットを回収した。これを 4 等分に分けて培地を加えて継代した。

4. 細胞増殖曲線

5×10⁴ cells の細胞懸濁液を 35mm-dish に播種し培養した。24 時間ごとに 0.25% Trypsin-EDTA を用いて細胞を剥離し、細胞数を計算した。9 日間の細胞数をもとに細胞増殖曲線を作成した。そこから doubling time を計算したところ、TYPK-1 と TYPK-2 それぞれ 22.1 時間と 40.4 時間であった。

5. マウス皮下移植

生後 6 週の雌ヌードマウス (BALB/CAN, Cg-Foxn1^{nu}/CrlCrlj; Charles River Laboratories, Yokohama, Japan) の皮下に 1×10⁷ cells の TYPK-1, TYPK-2 をそれぞれ移植した。3 か月後にともに直径 1 cm 大の皮下腫瘍を形成しこれを摘出し、10%ホルマリンで固定した後に HE 染色を行った。TYPK-1, TYPK-2 ともに腺癌の形態を認めた。

6. 遺伝子解析

TYPK-1 および TYPK-2 の TP53、KRAS の変異を direct-sequencing analysis によって解析した。TP53 の exon5-8、KRAS の codon12 の変異について解析した。その結果、TYPK-1 は KRAS、TP53 とともに wild type であった。TYPK-2 について TP53 は wild type であったが、KRAS の codon12 に GGT→CGT の変異を認めた。

7. コロニー形成率 (Colony formation efficiency; CFE)

TYPK-1、TYPK-2 それぞれの細胞を 300cells, 500cells, 1000cells ずつ 60mm-dish に播種し 5ml の培養液を加え 7 日間培養した。その後 Diff-Quick で染色し、10cells 以上を含むコロニーの数を測定した。形成したコロニー数から CEF を計算すると、TYPK-1 と TYPK-2 はそれぞれ 10.8% と 19.9% であった。

8. Cell migration assay and Matrix invasion assay

Cell culture insert 用 24well-plate と Cell culture insert を用いて cell migration assay と matrix invasion assay を行った。Cell migration assay では upper chamber に FCS を含まない DMEM/Ham' s F12 培地を 250 μ L と 1×10^6 cells を播種、Lower chamber には DMEM/Ham' s F12+50% FCS 750 μ L を加えた。Matrigel invasion assay では upper chamber に希釈した Matrigel (Corning, LA, USA) を 100 μ L 加えて 8 時間培養しゲル化させた。以下は cell migration assay と同様のプロトコールで行った。Migration assay では TYPK-1 と TYPK-2 において同程度であったが、matrigel invasion assay では TYPK-2 のほうが高い浸潤能を示した。

9. 抗癌剤感受性

膵癌治療に用いられる gemcitabine (GEM), 5-fluorouracil (5-FU), oxaliplatin (L-OHP) のそれぞれに対する薬剤感受性を MTT assay により解析した。この実験には既存の膵癌細胞株である KMP-2 を TYPK-1、TYPK-2 の比較として用いた。それぞれ細胞株について GEM, 5-FU, CDDP, L-OHP に対する IC50 を計算したところ、TYPK-1 はこれまでに報告されている膵癌細胞株と比較しても高い GEM 耐性を示した。また TYPK-2 は L-OHP に抵抗性を示した。

10. 薬剤感受性関連遺伝子

GEM は hENT1 によって細胞内に取り込まれ dCK によってリン酸化を受けることにより活性を得る。5-FU は DPD によって失活される。白金製剤により架橋形成された DNA は ERCC1 によってヌクレオチド除去修復を受ける。今回はこれら hENT1, dCK, DPD, ERCC1 の発現について real-time PCR によって解析した。TYPK-1, TYPK-2, KMP-2 で比較したときに、GEM の感受性と hENT1, dCK の発現には相関を認めた。5-FU に最も抵抗性を示した KMP-2 は最も DPD の発現が高い結果であった。しかし、TYPK-1 と TYPK-2 を比較すると、TYPK-2 が 5.9 倍と高い DPD 発現を認めたが、5-FU に対する感受性は同程度であった。L-OHP に最も感受性の高い KMP-2 では最も ERCC1 の発現が低い結果であった。しかし TYPK-1 と TYPK-2 を比較すると、TYPK-2 の L-OHP に対する感受性は低いが、ERCC1 の発現については TYPK-1 の 0.19 倍であった。

<総括>

今回我々は新たな膵癌細胞株である TYPK-1, TYPK-2 を樹立した。両細胞株ともヌードマウスへの移植が可能であった。TYPK-1 は GEM に、TYPK-2 は L-OHP に対して抵抗性を示した。TYPK-1 は TP53 wild type の細胞株であり、これまでに GEM 耐性株として知られている PANC1 などは TP53 変異株であり、比較することで TP53 に依存しない薬剤耐性機構を解明できる可能性がある。TYPK-2 は高い増殖能力と浸潤能を認め、転移性膵癌の性質を反映していることと考えられた。局所進行膵癌から樹立した TYPK-1 と比較することにより、転移のメカニズムを解明する一助となる可能性がある。

学位論文審査の要旨

【目的】

膵癌は悪性腫瘍のなかで最も予後が不良である。膵癌の基礎研究は膵癌治療の改善のために重要である。癌基礎研究においては細胞株が有用な研究材料であるが、長期間の培養などにより遺伝子変異が起こることが知られている。そのため、新たな細胞株を樹立することは、臨床への橋渡しの為の基礎研究を行ううえで極めて重要である。そこで、平野勝久君は、症例背景の詳細が明らかな患者由来の新たな膵癌細胞株を樹立し、その生物学的特性について検証した。

【材料・方法】

1. 患者背景・細胞培養

患者背景

TYPK-1: 82 歳男性、切除不能膵癌 T4N1M0(UICC 第 7 版)。

TYPK-2: 55 歳男性、切除不能膵癌 T4N1M1(UICC 第 7 版)。化学療法として GS 療法 (Gemcitabine+S-1)、次いで FOLFIRINOX 療法(5FU+Leucovorin+Irinotecan+Oxaliplatin)を施行されたがいずれも効果を認めなかった。

初代培養

TYPK-1: 転移性リンパ節を 1mm 程度に細断し、コラゲナーゼ/ディスパーゼで 37°C 30 分攪拌することで結合組織を分解したのちに細胞培養を行った。

TYPK-2: FOLFIRINOX 療法中に採取した癌性腹水 150ml を遠心分離し回収した癌細胞を培養した。

培養には両者とも DMEM/Ham's+5% FCS+1% Antibiotic/antimycotic を用いて、37°C、5% CO₂、湿潤環境で培養した。

2. 細胞株の生物学的特性の検証

コロニー形成率: 300 個、500 個、1000 個の細胞をそれぞれ 6 cm ディッシュに播種し 7 日間培養して 10 個以上の細胞を含むコロニー数を計測した。

遊走能・浸潤能: セルカルチャーインサートを用いて migration assay/invasion assay を行った。

マウス皮下腫瘍形成: 生後 6 週ヌードマウスの皮下に 1×10^7 個の細胞を移植し腫瘍形成能を評価した。

遺伝子変異: direct-sequence 法により TP53 の Exon5-8、KRAS の codon12 の塩基配列を解析した。

染色体検査: 分染法(G-band、Q-band 解析)により染色体数と構造異常について検索した。

3. 抗癌剤感受性とそれに関連する遺伝子発現

TYPK-1, TYPK-2 と比較するために既存の膵癌細胞株 KMP-2 を用いた。MTT assay により Gemcitabine(GEM), 5-FU, Cisplatin(CDDP), Oxaliplatin(L-OHP)の感受性について解析し、IC50 値を求めた。GEM の感受性に関わる hENT1 と dCK、5-FU に関わる DPD、白金製剤に関わる ERCC1 それぞれの mRNA の発現を real-time PCR により解析した。

4. 膵癌幹細胞性の検証

TYPK-2 を FACS Aria により CD133+細胞と CD24+CD44+EpCAM+細胞を分離した。

コロニー形成能：35mm ディッシュにそれぞれの細胞と親株を 400 個播種し、14 日間培養した後 50 個以上の細胞を含むコロニー数を評価した。

マウス腫瘍形成アッセイ：生後 6 週のヌードマウスに 100 個、300 個、1000 個、10000 個の細胞を皮下移植し腫瘍形成能について評価した。

幹細胞マーカーの発現：CD133+細胞と CD133-細胞の Bmi-1, Nanog, p63 の mRNA の発現を real-time PCR により解析した。

【結果】

新たな膵癌細胞株 TYPK-1, TYPK-2 を樹立した。それぞれの細胞の倍化時間は 22.1 時間と 40.4 時間であった。コロニー形成率は 10.8%と 19.8%であった。Invasion assay で TYPK-2 のほうが高い浸潤能を示した。いずれの細胞株もヌードマウスへの移植は可能で、ともに分化型腺癌の形成を認めた。染色体は TYPK-1 が 65X、TYPK-2 が 84XX であった。遺伝子変異については、TYPK-1 が TP53, KRAS ともに wild type, TYPK-2 では TP53 は wild type であったが、KRAS に変異を認めた。抗癌剤感受性については、TYPK-1 が GEM に対して高い耐性を示し、TYPK-2 は L-OHP について 3 株中最も抵抗性を示した。3 株では GEM 感受性と hENT1, dCK の発現に相関を認めた。5-FU に対する抵抗性が最も高い KMP-2 は DPD の発現が最も高く、TYPK-1 と比較して TYPK-2 の DPD 発現が 5.9 倍高値であるが、感受性については同程度であった。3 株とも CDDP には耐性であった。L-OHP の感受性が最も高い KMP-2 は ERCC1 の発現が最も低かった。TYPK-2 は L-OHP に対して最も高い抵抗性を示したが、ERCC1 発現については TYPK-1 の 0.19 倍と低値であった。

TYPK-2 において CD133+細胞は親株と比較して高いコロニー形成能を示した(有意差なし)。しかし、ヌードマウスへの移植実験では CD133+細胞のみ 100 個、300 個の腫瘍細胞から腫瘍の形成を認めた。また Bmi-1, Nanog, p63 の発現が有意に高い結果であった。

【総括】

本研究で平野勝久君は、新たな膵癌細胞株である TYPK-1, TYPK-2 を樹立した。TYPK-1 は GEM に、TYPK-2 は L-OHP に対して抵抗性を示した。TYPK-1 は TP53 wild type であり、これまでに樹立された GEM 耐性株は TP53 変異株であることから、これらと比較することで TP53 非依存性の薬剤耐性機構を解明できる可能性がある。TYPK-2 は高い増殖能力と浸潤能を認め、転移性膵癌の特性を反映していると考えられた。局所進行膵癌から樹立した TYPK-1 と比較することにより、転移のメカニズムを解明する一助となる可能性がある。

以上のことから、これまでに樹立された膵癌細胞株とは異なった新たな細胞株を樹立し、それらの生物学的特性を明らかにしたことは、医学における学術的重要性が高く、また、難治癌のひとつである膵癌の新たな特性診断と治療法の開発への発展性が期待できる。

以上より本審査会は本論文を博士(医学)の学位に十分値すると判断した。