

3次元培養における前立腺がん細胞の生物学的特性

渡邊昌俊,^{*,a} 高木陽光^b

The Biological Behavior of Prostate Cancer Cells in 3D Culture Systems

Masatoshi WATANABE^{*,a} and Akimitsu TAKAGI^b

^aLaboratory for Medical Engineering, Graduate School of Engineering, Yokohama National University, 79-5 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240-8501, Japan and ^bYakult Central Institute for Microbiological Research, 1796 Yaho, Kunitachi City 186-0011, Japan.

(Received August 1, 2007)

Prostate cancer is the most common non-cutaneous malignant neoplasm in men in Western countries. In Japan, the number of afflicted men has been increasing although it is still low compared with Western countries. One of the most important problems in prostate cancer patients is treatment for hormone-refractory prostate cancer (HRPC). Although docetaxel is considered as a first-line chemotherapeutic option in patients with HRPC in the USA, it is still necessary to search and develop new drugs. Spheroid culture models have an invaluable role in tumor biology or drug screening. Characteristics of cancer cells in three-dimensional (3D) culture, especially spheroid culture, differ dramatically from those in two-dimensional (2D) culture. Spheroid culture models appear to be an ideal tool, however, their models have not been incorporated in drug screening. In this article, we demonstrate characterization of prostate cancer spheroids including chemo-resistance compared with 2D culture and xenograft models. Prostate cancer cells except PC-3 formed E-cadherin-mediated spheroids. An immunocytochemical analysis of the spheroids revealed that cells showing Ki-67 were localized in the peripheral layer and the intermediate zone cells showed p27 and poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), suggesting quiescent cell character. Prostate cancer cells acquired resistance to most agents when grown as spheroids, but not to all of the anticancer agents tested. This article also attempts to provide up-to-date information about spheroids, especially quiescent cells as therapeutic targets and the involvement of genetics and epigenetics in forming spheroids.

Key words—prostate cancer; spheroid; quiescent cell; genetics; epigenetics

1. はじめに

がんは日本人死亡原因の3大疾患の1つで、高齢化社会を迎えてますます増加していくと考えられる。がんの予防、診断、治療戦略の上で、発がん及びがんの進展・転移機構を解明することが必要である。その1つの手段が細胞株を用いる基礎的研究である。多くは、樹立された細胞株を平面状のシャーレなどで培養する単層培養あるいは2次元培養である。一方、原発巣及び転移巣において、がん細胞は組織あるいは器官中で3次元構造を取って存在する。そこでは、がん細胞同士、がん細胞と周囲の細

胞との相互作用が生じ、微小環境を形成している。がん細胞の形質は変わり易く、がん細胞の遺伝子発現様式やがん細胞の挙動は細胞外の微小環境あるいは培養条件で修飾される。2次元培養における遺伝子発現様式や薬剤に対する反応が動物実験や臨床でのデータと乖離することが知られている。個体のシステムにおける薬剤の代謝なども関与するが、基本的に抽出された細胞が特殊な環境で培養されることも一因と考えられている。これらの問題を少なからず解決できる手段の1つとして、3次元培養が考えられている。今回、この3次元培養を用いた前立腺がん細胞の生物学的特性と可能性について報告する。

2. 前立腺がんについて

2-1. 疫学 前立腺がんは欧米、特に米国男性において肺がんについて第2位の死亡率が報告されている。悪性黒色腫を除けば、いわゆるがんの中で

^a横浜国立大学大学院工学研究院・医工学 (〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5), ^b㈱ヤクルト本社中央研究所 (〒186-0011 東京都国立市谷保 1796)

*e-mail: mawata@ynu.ac.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウム S45 で発表したものを中心に記述したものである。

最も高頻度に発生している。年齢調整罹患率（/10万人/年）では、米国では93.4と高く、日本では8.5と低い。¹⁾しかし、本邦では、生活、特に食生活の西洋化及び高齢化により、罹患率は年々増加し、現在、本邦の罹患率の第6位であり、本邦のがん死亡率の第8位である²⁾。2020年には、前立腺がんは本邦男性の罹患率の第2位となると予測されている。³⁾

前立腺がんの原因は十分には解明されていないが、年齢、民族、家族歴、食事などの危険因子が認められている。前立腺がん罹患率の民族差は有名であり、食生活を含めた環境因子及び遺伝的背景が重要であることが報告されている。⁴⁾

2-2. 発がん機構 ジョンホプキンス大学のグループが感染症や食物などの環境因子とホルモンバランスの崩れが前立腺上皮細胞に障害を与え、慢性炎症や再生性病変が生じがんの発生・進展する仮説を提案している。⁵⁾われわれも病理学的病変に外的・内的因子が係わり、遺伝子及びエピジェネティクスの異常が集積し、がんへ発生・進展すると仮説を出している (Fig. 1)。⁶⁾

前立腺がんは7p, 7q, 8q, Xqでの増加, 8p, 10q, 13q, 16qでの欠失という染色体レベルでの異常や個々の遺伝子の機能異常などが報告されている。⁷⁾

エピジェネティクスは塩基配列の変化によらない形で遺伝子発現情報が支配される現象を対象にし、がんへの関与が研究されている。異常なDNAメチル化には低メチル化, 高メチル化, インプリンティング消失の3種類があり、前立腺がんでも解析され

ている。進行及び転移性前立腺がんでもゲノム全体の低メチル化が報告されている。^{7,8)}多くはグルタチオンS-転移酵素π (GSTP1) 遺伝子などの特定遺伝子のサイレンシングに関係するプロモーター領域の高メチル化についての報告である。臨床病理学的因子とDNAメチル化との関係も報告されてい。^{7,8)}ヒストンのアセチル化は転写活性に重要な役割を果たしている。例えば、前立腺がんにおけるインスリン様成長因子結合タンパク (IGFBP) 発現への関与が報告されている。⁸⁾これらエピジェネティクスを前立腺がんの診断への応用することもいろいろ試されている。

3. 前立腺がんの治療について

前立腺がんの治療法には、待機療法, 手術療法, 放射線療法, 内分泌療法がある。⁹⁾発見時の前立腺特異抗原 (PSA) 値, 組織学的悪性度 (グリソンスコア), 病期, 年齢などから治療法が選択される。前立腺がんが局所に留まるとき, 手術療法が標準的治療法とされているが, 他のがんと同様に放射線療法及び化学療法がある。放射線療法も進歩し, 現在では前立腺全摘術に並ぶ療法とされている。

1941年に進行性前立腺がん患者に対する去勢術が施され, 自覚・他覚所見の改善が得られた。^{10,11)}以後, 去勢術に替わり, 黄体形成ホルモン放出ホルモン (LH-RH) アゴニスト及び抗アンドロゲン剤の併用あるいは単独療法が一般的に行われる。病期は別として, ホルモン療法により, 前立腺がんの多くは縮小する。しかし, 同療法後, ホルモン不応性を獲得し, 約80%は再発・再燃し, 最終的には患者は不幸な転帰を取る。このようなホルモン不応性を獲得した腫瘍や転移性腫瘍に対して, 抗がん剤は十分な効果を発揮していない。最近米国では, ドセタキセルが最初に使われる抗がん剤として, また他の抗がん剤と併用して用いられ, 効果を上げていると言われ,¹¹⁾本邦でも承認審査中にある。

4. 前立腺がん細胞株について

前立腺がんの研究において, ヒト由来前立腺がん樹立細胞株は非常に有用である。しかし, 大腸がんなどに比べて, 前立腺がんの研究で利用できる細胞株は限定されている。よく使われる細胞株は, LNCaP, DU-145, PC-3である。¹²⁾これら細胞株は, 前立腺がんの性質, 特にアンドロゲンに対する反応性, アンドロゲン受容体の発現, 前立腺特異抗原の

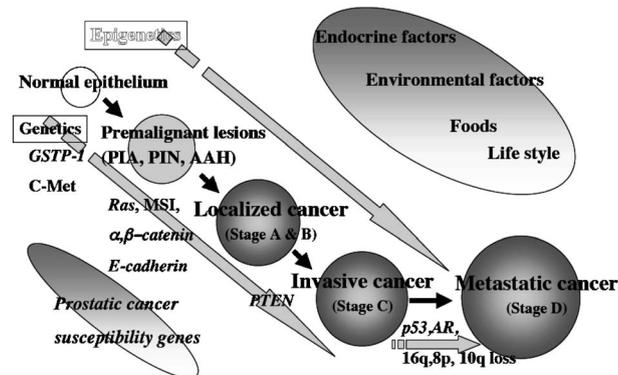


Fig. 1. A Model for Carcinogenesis of the Prostate

Multiple genetic and epigenetic events that contribute to the transformation of a normal prostate epithelial cell to prostate cancer cell have been identified, and we propose a model combined with environmental factors and susceptibility genes.

発現から特徴付けられる。LNCaP (FGC&FGC.10) は 1977 年に 50 歳の鎖骨上リンパ節転移巣より樹立され、アンドロゲン受容体を有し、前立腺特異抗原を示す。特に FGC.10 はアンドロゲン感受性細胞株として利用される。同細胞株は、アンドロゲン受容体遺伝子のホルモン結合部位に変異を有し (コドン 877, ACT-GCT, Thr-Ala)、アンドロゲン以外のエストラジオールやプロゲステロンとも結合し、細胞増殖を刺激する。DU-145 は 1975 年に 69 歳の前立腺がん脳転移巣から樹立され、アンドロゲンに反応せず、前立腺特異抗原も発現していない細胞株である。PC-3 は 62 歳の腰椎転移巣から樹立され、アンドロゲンに反応せず、前立腺特異抗原も発現していない細胞株である。DU-145 では、その培養中に形態が変化していくことや PC-3 も含めてアンドロゲン受容体及び前立腺特異抗原は弱いながらも発現していく場合もあり、*in vitro* でのクローナル選別あるいはヘテロな集団の影響が認められている。¹²⁾ 現実的には、アンドロゲン依存性として LNCaP、アンドロゲン非依存生及び悪性度の高い細胞株として DU-145, PC-3 が使われる。

以前 TSU-Pr1 という前立腺がん細胞株が使われていた。1983 年に 73 歳の頸部リンパ節より樹立され、アンドロゲン受容体及び前立腺特異抗原を発現していない細胞株である。¹²⁾ また、H-ラス遺伝子のコドン 12 に変異を持つ特徴があった。しかし、2001 年に、細胞遺伝学的及び分子生物学的解析により、¹³⁾ 同細胞株は JCA-1 とともに膀胱がん細胞株 T24 の交差汚染の可能性も含めて、前立腺がん由来細胞株として疑義が示され、現在この細胞株は前立腺がん細胞株としては利用されていない。

5. 2次元培養と3次元培養について

腫瘍の基礎研究あるいは抗がん剤感受性の試験等において、現在も2次元培養はコストと簡便性において勝る系であり、重要な役割を果たしている。腫瘍自体はその発生・進展の過程でヘテロな細胞集団となっている。使用される細胞株はそのヘテロな腫瘍細胞集団から樹立され、さらに継代中にセレクションが係っている。また、腫瘍細胞以外の間質細胞など他の多くの細胞が取り除かれた特殊な環境である2次元培養のため、本来の組織特異的な遺伝子発現が消失していると報告されている。¹⁴⁾ 加えて周辺の細胞の喪失だけでなく、極性を含む立体構造の喪

失による影響も大きい。このため、生体と2次元培養では、細胞間のシグナルパターンが異なっている。生体より得られた腫瘍組織と細胞株の遺伝子発現パターンを比較すると、細胞株の遺伝子発現パターンは約30%程度生体での腫瘍と異なると報告されている。¹⁴⁾ 細胞株では細胞周期、代謝、高分子交替に係わる遺伝子発現の上昇、成長、接着に係わる遺伝子発現の抑制が報告されている。他の固形腫瘍と同様に、われわれが使用している前立腺がん細胞株においては組織特異的な遺伝子発現がほとんど失われているとも報告されている。¹⁴⁾ 腫瘍組織と比較して、細胞株の2次元培養では、細胞周期、代謝、巨大分子の変換に関係する遺伝子発現が上昇していると報告されている。一方、細胞接着分子、細胞-細胞外基質及び細胞膜に関係したシグナル分子の遺伝子発現の低下が報告されている。¹⁴⁾

In vitro 系において生体システムを再構成することは簡単にはできない。2次元培養は上述した生体の3次元構造に由来する腫瘍微小環境の消失 (腫瘍細胞同士、腫瘍細胞-間質細胞・基質の相互作用、酸素栄養成分・代謝物の濃度勾配など) が大きな弱点となっている。本来は、微小環境を維持している器官/組織培養系が望ましいと考えられるが、入手のし易さや系の維持などに問題がある。^{14,15)}

しかし、生体内での腫瘍細胞の挙動は、腫瘍細胞自身に由来するものだけではなく、腫瘍周囲の微小環境との相互作用に影響される、すなわち腫瘍細胞は微小環境によりその成長や分化なども影響を受けていると考えられている。古くは、がんの転移を説明する“種子と土壌理論 (環境適所説)”に代表されるように、宿主における内部環境の重要性が唱えられている。*In vitro* 系に間質成分を加えることにより、腫瘍細胞の増殖や浸潤能に影響を与えるなどの報告がある。^{14,16)}

腫瘍と微小環境の相互作用を基盤にした様々な培養系は行われ、細胞生物学的研究などに利用されてきた。古くは1944年、ホルトフレターが研究に球形の再凝集の培養法を利用することから始まり、1970年代にサザーランドらのスフェロイドによる基本的な仕事が行われた。^{15,17,18)} その後、各種3次元培養方法が開発され、近年、細胞接着に係わる新素材の開発などを含む生体材料及び組織工学の発達により、3次元培養、特にヘテロ多細胞腫瘍共培養

系の更なる展開が期待されるようになってきた。^{16,19)}

3次元培養には、1) 多細胞スフェロイド、2) 細胞多層培養、3) マトリックス包埋培養、4) ホロファイバーバイオリクター、5) *ex vivo* 培養などがある (Table 1).^{16,19)} 2次元培養の欠点を補うべく用いられるも、簡便性の欠如、制御並びにバリデーションの困難さなどにより薬剤感受性のハイスクリーンングには広く用いられていない。

一方、インビトロで生体内の構造を再現するため、さらに3次元培養が改良されている。例えば、腫瘍細胞以外の細胞を加え、極性の再現を目指した3次元共培養系が開発されている。

6. 前立腺がんスフェロイド培養における特性について

3次元培養、特にスフェロイド培養法には以下に示す方法がある。¹⁹⁾ 自発的細胞凝集は3次元培養 (スフェロイド培養) の中で古典的な手法である。元来、腫瘍細胞は凝集あるいは球状の密集体になる傾向がある。細胞診断学の領域では、乳がんあるいは卵巣がんは体腔水中にまじりも状集塊を作ることが知られ、腺がんの診断に重要な所見となっている。ある種の前立腺がん、乳がんの細胞株は2次元培養においても凝集することが観察される。多くの細胞株から得られた多細胞スフェロイドは腫瘍の無血管病巣あるいは上皮内腫瘍病変に類似している。リキッドオーバーレイ法は腫瘍細胞同士の結合が播種された基盤の基質との結合よりも接着力が上回ればスフェロイドが形成されることを利用している。腫瘍細胞が培養液を浸したアガロースやマトリゲル上でスフェロイドが形成される。回転及びスピナーラスコ法は静置型のリキッドオーバーレイ法と異な

り、培養液中にがん細胞が希釈され、回転培養される。例えば、この方法で、大量のスフェロイドが培養され、96 ウエルプレート上でリキッドオーバーレイ法を行い、分析などに用いられる。マイクロキャリアーズ法は自発的に凝集できない細胞に対して支持体として使われる方法である。さらに特殊な培養条件が必要な細胞に対して効果的であり、共培養系の基盤として利用できる。スキャフォールドを用いた培養法はコラーゲンなどの細胞外基質で作られたものから、最近では合成された高分子ポリマーにより作られた3次元構造のスキャフォールドを利用した培養方法である。上述の方法で、前立腺がん細胞をスフェロイド培養し、スフェロイドの細胞生物学的解析や抗がん剤感受性解析等に応用した報告がされている。¹⁹⁾

われわれは当初リキッドオーバーレイ法でスフェロイド培養を行っていたが、スフェロイドの大きさ、形態の制御が困難であることが判明した (Fig. 2).²⁰⁾ 研究の性格上、多量かつ均一のスフェロイド形成を必要とするために、ポリ (2-ハイドロキシエチルマタクリレート) 試薬による培養器コーティングによる細胞無吸着処理を用いた。LNCaP、DU-145、PC-3 の3種類の前立腺がん細胞株を使用した。この手法により、LNCaP 及び DU-145 はスフェロイドを形成したが、PC-3 は形成しなかった (Fig. 3)。PC-3 は E-カドヘリン- β カテニン系の異常が報告されており、本法ではスフェロイド形成能に細胞株間に差異が生じると考えられた。経時的に

Table 1. Summary of 3D Cell Culture Systems

System	Comments
Cellular multilayer	Layers of cells cultured on top a porous membrane
Matrix-embedded culture	Single cells or aggregates embedded in a porous extracellular matrix
Multicellular spheroid	Spheroid formed in static or stirred suspension culture
Hollow-fiber bioreactor	Cells cultured within a network of perfused artificial capillaries
<i>Ex-vivo</i> culture	Piece of excised tumor tissue cultured <i>in vitro</i>

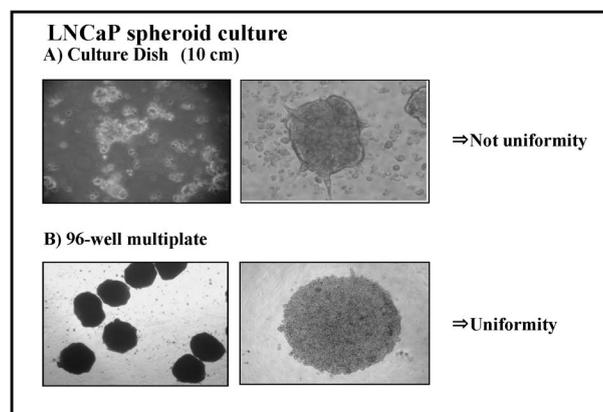


Fig. 2. Morphology of Prostate Cancer Cells in Spheroid and 2D Cultures

(A) Spheroids were formed by liquid-overlay culture. (B) Spheroids were formed on SUMILON Celltight X.

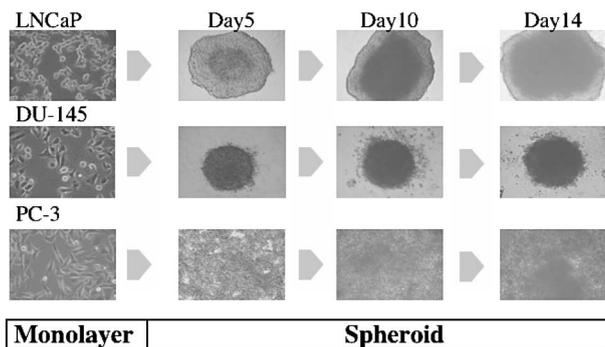


Fig. 3. Morphological Changes of Prostate Cancer Spheroids
In LNCaP and DU-145, spheroids were formed while PC-3 did not form spheroids.

LNCaP, DU-145 のスフェロイドは成長するも、スフェロイド細胞数・最大径の変化では LNCaP が DU-145 より大きく、14 日でのスフェロイド最大径は LNCaP では $1000\ \mu\text{m}$ になったが、DU-145 では $500\ \mu\text{m}$ 程度であった。LNCaP は 5 日（最大径約 $500\ \mu\text{m}$ ）で、中心部に壊死領域を生じ始め、7 日には最大径の $1/2$ 程度に壊死領域を認めた。細胞動態を確認する Ki-67, p27, bcl-2 免疫細胞化学的染色により、Ki-67 はスフェロイド表層の細胞を主体に染色され、p27 はスフェロイド表層と壊死部分の間に挟まる細胞に染色された。以前報告されているように表層（細胞増殖帯）、中間層（静止細胞）、壊死層の 3 層に分かれているのが確認された。²⁰⁻²² Bcl-2 は表層の細胞を主体に染色され、特に壊死層周囲の細胞に染色されることはなかった。一方、DU-145 では十分な壊死層は形成されなかったが、細胞増殖帯や静止細胞の存在は確認された。腫瘍細胞の特性にもよるが、 $500\ \mu\text{m}$ を境に壊死が生ずる可能性があると考えられた。

2 次元培養とスフェロイド培養時における抗がん剤の感受性試験（CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay）を行った。²⁰ 例として、LNCaP に対する結果を示す。抗がん剤には、シスプラチン（CDDP）、オキサリプラチン（L-OHP）、5-フルウロウラシル（5-FU）、ゲムシタピン（GEM）、メトトレキサート（MTX）、パクリタキセル（TXL）、ドセタキセル（DTX）を用いた。白金系では、オキサリプラチンが有効であり、スフェロイド培養時には効果は低下する。代謝拮抗系、5-フルウロウラシル及びゲムシタピンでは、2 次元培養及びスフェロイド培養における差は認められな

った。トポイソメラーゼ阻害系では、メトトレキサートが有効であるが、スフェロイド培養時には効果は低下する。微小管作用系では、2 次元培養でいずれも低濃度域より効果を示したが、スフェロイド培養で効果は著しく低下した。このようにすべてではないが、スフェロイドの抗がん剤感受性は低下することを認めた。例えば、スフェロイドに対する微小管作用系の効果の低下はいくつかの機構が考えられるが、主としてスフェロイド全体の細胞増殖能の低下及び静止細胞の存在が関係すると考えられる。現在、スフェロイド形成による抗がん剤抵抗性の獲得は遺伝子変異及びエピジェネティクスの面から解析しているところである。2 次元培養及び 3 次元培養、さらに 3 次元培養の階層性及びその柔軟な遺伝子発現プロファイリングの変化より、エピジェネティクスの関与を推察している。微小環境との相互作用でがん細胞のメチル化変化による遺伝子発現の変化や低酸素状態によるヒストン H3 リシン 9 の脱メチル化が報告されている。^{23,24} 現在、前立腺がんに関連するメチル化で制御されている遺伝子群の解析を行っているが、低メチル化に関しては一時の変動があり、検討中である（Fig. 4）。

2 次元培養、スフェロイド培養と異種移植片時の各腫瘍の遺伝子プロファイリングの比較を行った。²⁰ 2 次元培養とスフェロイド・異種移植片の間では、発現の増減に関係なく変動した遺伝子は DNA 修復や細胞分裂など多岐に認められた。スフェロイドと異種移植片の間では、血管新生及び低酸素に関連する遺伝子発現で差を認めた（Fig. 5）。スフェロイドは当初から、腫瘍血管の入る前の無血管病巣のモデルと考えられており、低酸素に関連する遺伝子はスフェロイドで高く発現し、血管新生に関連する遺伝子は異種移植片で高く発現しているというデータはこのモデルの特性を裏付けると考えられた。²⁰

7. マルチセルラーレジスタンス（MCR）と静止細胞について

スフェロイド培養により、腫瘍細胞はマルチセルラーレジスタンスという状態になる。マルチセルラーレジスタンスの機構として、コンタクトレジスタンスとスフェロイド構造とによるものがあると考えられている。²¹ コンタクトレジスタンスは 2 次元培養で、いわゆるコンフルエンスでも起こり、細胞

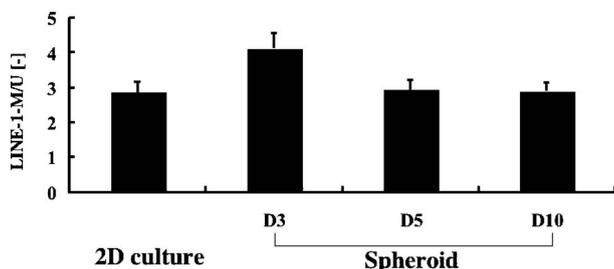


Fig. 4. Promoter Hypomethylation of the LINE-1 Retrotransposable Elements

There was not significant difference of LINE-1 hypomethylation between 2D culture and spheroid culture of LNCaP.

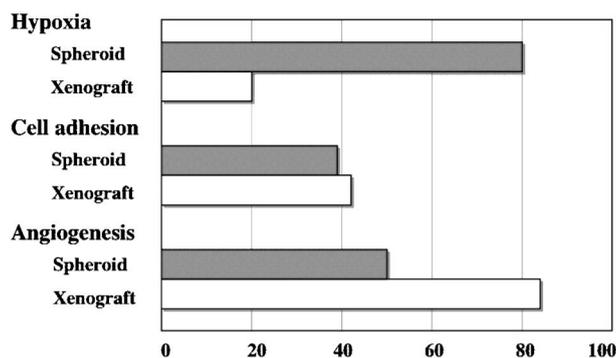


Fig. 5. Gene Expression Profiles in Spheroids and Xenografts
The percentages of up-regulated (more than 2-fold) genes are shown when compared with monolayer cultures.

間あるいは細胞-細胞外基質接着によるアポトーシス抑制に基づく機構が知られている。一方、スフェロイド構造による機構は、浸透性、静止細胞出現等がある。

形成されたスフェロイドの構成はヘテロであることが特徴である。前述している通りに典型的なスフェロイドでは、細胞増殖動態から増殖細胞からなる表層帯、静止細胞からなる中間帯、中心部壊死帯からなる。物質移動から、表層から深部に向けて、代謝産物、酸素、二酸化炭素などの勾配が生じている。細胞増殖の指標である 3H-チミジン標識指標は、表層から急激に減少していく。スフェロイドにおいて、どの程度の部分が中間帯であるのか、静止細胞がどのくらいの割合で存在するのかわかりきったことは示されていない。静止細胞では、サイクリン依存性キナーゼインヒビター p27 が強発現していると報告され、p27 遺伝子の発現が、スフェロイドの抗がん剤や放射性感受性に影響していると考えられている。^{22,25)} EMT-6 スフェロイドで、p27 のア

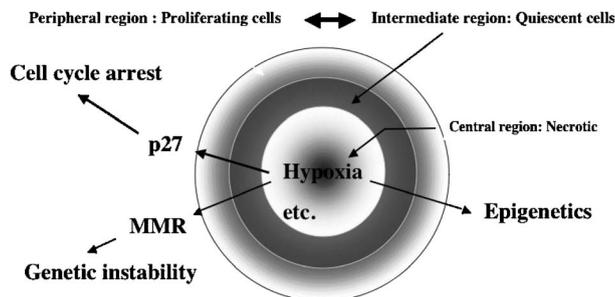


Fig. 6. Structure of the Spheroid and Microenvironment.
Spheroid structure leads to genetic and epigenetic alterations.

ンチセンス・オリゴヌクレオチドで発現を抑制させると、アルキル化剤に対して感受性が上がると報告されている。²⁵⁾ われわれの作製した LNCaP スフェロイドにおいても、p27 免疫細胞化学的染色により壊死層周囲から表層から 1/2 程度の深さまで、陽性細胞を認めた。²⁰⁾ この部分が中間帯で、陽性細胞が静止細胞と考えられる。また、同中間帯で多数のポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP) 陽性細胞が認められた。ポリ (ADP-リボシル) 化反応は DNA 修復、転写、細胞周期、細胞死、遺伝子安定性等多くの生体内活動に関与し、それに関与する酵素はポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼである。PARP の阻害剤、PARP-1 ノックアウトの実験より、PARP の活性を落とすことにより DNA 阻害剤に対する感受性が増加することが報告されている。²⁶⁾ このことより、静止細胞の抗がん剤あるいは低酸素に対する抵抗性に重要な役割を果たしている可能性が認められた (Fig. 6)。

スフェロイドが抗がん剤や放射線に抵抗性を示すのはリグロースレジスタンスによるものとも考えられている。すなわち、増殖期に入っていない静止細胞は影響を受けず、死滅した表層の細胞に代わって新たに増殖期に入っていく。このように静止細胞はスフェロイドの特性を決定するのに重要な役割を果たしていると考えられている。

腫瘍細胞同士、あるいは腫瘍細胞と間質細胞等の腫瘍細胞が微小環境と接することにより、マルチセルラーレジスタンスは獲得される。このマルチセルラーレジスタンスは E-カドヘリンにより主として媒介されると報告されている。²⁷⁾ マルチセルラーレジスタンスは可逆性であり、スフェロイド培養を始めて 24 時間以内で獲得し、3-5 日で定常状態に達

するとされている。正常細胞と細胞外基質との相互関係が破綻することによるアポトーシス、すなわち腫瘍細胞は bcl-2 の発現上昇により、アノイキスに対しての抵抗性を生ずる。この発現上昇には接着斑キナーゼ (FAK) が関与していることが報告されている。²⁸⁾ この経路がマルチセラーレジスタンス獲得機構の 1 つと考えられている。

8. まとめ

細胞株はその樹立した時点及びその後の継代で、原発巣の性質を失っているとも報告されている。がん研究には、細胞株を利用した研究は避けられない。がんは正常細胞が遺伝子変異を起こし、がん抑制遺伝子やがん遺伝子の活性が変化し、増殖能に異常を来し発生し、浸潤能や転移能などを獲得し進展するという多段階発がん説が主流となっている。最近、白血病、脳腫瘍、乳がん、肝がんなどの腫瘍において、自己複製能及び多分化能を有する幹細胞、すなわちがん幹細胞の存在が報告されている。²⁹⁾ このがん幹細胞の同定に各種の細胞株が使われている。同定に細胞株を使用する手法が正しいかは不明であるが、今後 3 次元培養、スフェロイド培養などが同定に使われる可能性がある。

今までスフェロイド培養についていろいろ報告され、多くのデータが集積されている。今回、十分に紹介及び自己のデータとの研究比較ができなかったが、今後スフェロイド培養の手法及び特性を統合的に行う必要があり、個々の細胞株におけるスフェロイドの抗がん剤感受性についてデータを集積し、パネルを作る必要があると考える。

REFERENCES

- 1) Parkin D. M., Pisani P., Ferlay J., *CA Cancer J. Clin.*, **49**, 33–64 (1999).
- 2) Foundation for Promotion of Cancer Research: (<http://www.fpcr.or.jp/publication/statistics.html>) (2005).
- 3) Ohno Y., Nakamura T., Murata K., Tsukuma H., Ajiki W., Oshima A., *Gann · Toukei-hakusyo*, 201–217 (2004).
- 4) Yatani R., Shiraishi T., Nakakuki K., Kusano I., Takanari H., Hayashi T., Stemmermann G. N., *J. Natl. Cancer Inst.*, **80**, 683–687 (1988).
- 5) De Marzo A.M., Platz E.A., Sutcliffe S., Xu J., Gronberg H., Drake C. G., Nakai Y., Isaacs W. B., Nelson W. G., *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 256–269 (2007).
- 6) Watanabe M., *J. Colon Exam.*, **23**, 107–111 (2006).
- 7) De Marzo A. M., Nelson W. G., Isaacs W. B., Epstein J. I., *Lancet*. **361**, 955–964 (2003).
- 8) Watanabe M., Takagi A., Mastuzaki T., Kami D., Toyota M., Hirokawa Y., Shiraishi T., *Curr. Cancer Drug Targets*, **6**, 365–384 (2006).
- 9) Hara I., *Gan To Kagaku Ryoho*, **33**, 178–182 (2006).
- 10) Hellerstedt B. A., Pienta K. J., *CA Cancer J. Clin.*, **52**, 154–179 (2002).
- 11) Pienta K.J., Smith D. C., *CA Cancer J. Clin.*, **55**, 300–318 (2005).
- 12) Webber M. M., Bello D., Quader S., *Prostate*, **30**, 58–64 (1997).
- 13) Van Bokhoven A., Varella-Garcia M., Korch C., Miller G. J., *Cancer Res.*, **61**, 6340–6344 (2001).
- 14) Birgersdotter A., Sandberg R., Ernberg I., *Semin. Cancer Biol.*, **15**, 405–412 (2005).
- 15) Muller-Klieser W., *Am. J. Physiol.*, **273**, C1109–1123 (1997).
- 16) Kunz-Schughart L. A., Freyer J. P., Hofstaedter F., Ebner R., *J. Biomol. Screen.*, **9**, 273–285 (2004).
- 17) Holtfreter J., *J. Exp. Zool.*, **95**, 171–212 (1944).
- 18) Sutherland R. M., McCredie J. A., Inch W. R. J., *Natl. Cancer Inst.*, **46**, 113–120 (1971).
- 19) Kim J. B., *Semin. Cancer Biol.*, **15**, 365–377 (2005).
- 20) Takagi A., Watanabe M., Ishii Y., Morita J., Hirokawa Y., Matsuzaki T., Shiraishi T., *Anticancer Res.*, **27**, 45–53 (2007).
- 21) Desoize B., Jardillier J. -C., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **36**, 193–207 (2000).
- 22) Mellor H. R., Ferguson D. J. P., Callaghan R., *Br. J. Cancer*, **93**, 302–309 (2005).
- 23) Graff J. R., Gabrielson E., Fujii H., Baylin S. B., Herman J. G., *J. Biol. Chem.*, **275**, 2727–2732 (2000).
- 24) Chen H., Yan Y., Davidson T. L., Shinkai Y., Costa M., *Cancer Res.*, **66**, 9009–9016 (2006).
- 25) Xing H., Wang S., Hu K., Tao W., Li J., Gao Q., Yang X., Weng D., Lu Y., Ma D., *J. Can-*

-
- cer Res. Clin. Oncol.*, **131**, 511–519 (2005).
- 26) Tentori L., Graziani G., *Pharmacol. Res.*, **52**, 25–33 (2005).
- 27) Dimanche-Boitrel M.T., Genne P., Duchamp O., Chauffert B., *Cancer Lett.*, **85**, 171–176 (1994).
- 28) Reddig P. J., Juliano R. L., *Cancer Metastasis Rev.*, **24**, 425–439 (2005).
- 29) Nikitin A. Y., Matoso A., Roy-Burman P., *Histol. Histopathol.*, **22**, 1043–1049 (2007).