



Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer

Imamura, Yoshinori

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6454号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006454>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms
in breast cancer

乳癌における薬理試験プラットフォームとしての 2 次元培養モデルと 3 次元培養モデルの比較

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

腫瘍・血液内科学

(指導教員：南 博信教授)

今村 善宣

新規抗悪性腫瘍薬の開発は、古典的に、細胞株を用いた薬理試験の結果を基に行われてきた。しかし、2次元培養下で樹立した細胞株は、間質を失い均質な腫瘍細胞で構成されるため、前臨床試験のプラットフォームとして理想的ではないことが指摘されている。このことは、前臨床試験で有効性が示唆されても臨床試験を経て新薬として承認されるのはごく一部に過ぎないという事実からも明らかである。一方、患者腫瘍が有する間質との相互作用や多様性を反映されるべく、がん微小環境の立体的再構成を可能にした3次元培養モデルが、近年盛んに開発されている。そこで本研究では、抗悪性腫瘍薬の薬効試験における3次元培養モデルの有用性を評価すべく、乳癌細胞株と乳癌患者由来ゼノグラフト (patient-derived xenograft, PDX) を用いて、2次元培養モデルとの比較・検討を行った。

まず、乳癌細胞株を用いて、抗悪性腫瘍薬に対する薬剤感受性を2次元、3次元培養 (NanoCluture Plate®) 間で比較した。3次元培養下で密な多細胞スフェロイドを形成した3つの乳癌細胞株 (BT-549、BT-474、T-47D) では、パクリタキセルやドキシソルビシンに対して2次元培養下よりも薬剤抵抗性を示した。一方、3次元培養下で疎な多細胞スフェロイドしか形成しなかった3つの乳癌細胞株 (MCF-7、HCC-1954、MDA-MB-231) では、同薬剤に対する薬剤感受性は2次元培養下と同程度であった。

次に、3次元培養下で密な多細胞スフェロイドを形成した BT-549 と BT-474 と、疎な多細胞スフェロイドしか形成しなかった MCF-7 を用いて、パクリタキセルに誘導されるアポトーシスを定量するため、cleaved PARP の発現レベルを Western blot 法を用いて評価した。その結果、パクリタキセル曝露により誘導される cleaved PARP の発現レベルは、BT-549 と BT-474 では2次元培養下に比べて、3次元培養下で低かったのに対し、MCF-7 では両培養環境間で同程度であった。これらの結果から、3次元培養モデルにおける密な多細胞スフェロイドの形成が、パクリタキセル誘発性のアポトーシスに対して保護的に働くことが示唆された。

続いて、多細胞スフェロイドでは *in vivo* 腫瘍のように内部は低酸素状態にある、ならびに低酸素状態は薬剤抵抗性に関与しているとの既報に基づき、両培養環境における酸素状態を低酸素プローブ (LOX-1®) を用いて評価した。その結果、BT-549 と BT-474 の3次元培養下で形成された密な多細胞スフェロイド内部では低酸素状態が確認されたが、2次元培養細胞や MCF-7 では低酸素状態は確認されなかった。これらの結果から、密な多細胞スフェロイド内部の低酸素状態が、薬剤抵抗性に関与していることが示唆された。

さらに、低酸素状態が腫瘍細胞の G0 細胞休止に関与する、ならびに低酸素状態におけるカスパーゼ 3、8 の抑制が乳癌細胞におけるパクリタキセル抵抗性に関与する、との既報に基づき、両培養環境間における Ki-67、カスパーゼ 3、8 の発現レベルを免疫組織化学染色法で検討した。その結果、Ki-67 陽性細胞の割合は BT-549、BT-474、MCF-7 のいずれの細胞株においても3次元培養下で2次元培養下に比べて低かった。

また、カスパーゼ 8 の発現レベルは、いずれの細胞株でも両培養環境間で明らかな差は認められなかったが、カスパーゼ 3 の発現レベルは、唯一 BT-474 の 3 次元培養下で 2 次元培養下よりも低かった。これらの結果から、3 次元培養下では 2 次元培養下に比べて G0 休止期にある細胞が増加し、一部は抗アポトーシスに傾いていることが示唆された。

最後に、3 次元培養が 2 次元培養に比べて、*in vivo* における腫瘍の状態をより反映しているかを探索するため、独自に作製した PDX 腫瘍を用いて、Ki-67、カスパーゼ 3、8 の発現レベルを免疫組織化学染色法で検討した。その結果、Ki-67 陽性細胞の割合は 2 次元初代培養細胞 (77.4%)、3 次元初代培養細胞 (57.4%)、PDX 腫瘍検体 (41.6%)、患者腫瘍検体 (34.1%) の順に低かった。また BT-474 と同様に、カスパーゼ 3 の発現レベルは、3 次元初代培養細胞で 2 次元初代培養細胞よりも低かった。これらの結果は、3 次元培養モデルが 2 次元培養モデルよりも *in vivo* 腫瘍の G0 細胞休止や抗アポトーシス状態をより反映していることを示唆し、乳癌細胞株で得られた結果と一貫していた。

以上より、3 次元培養モデルで密な多細胞スフェロイドの形成した乳癌細胞では、低酸素状態、G0 細胞休止、抗アポトーシスといった *in vivo* 腫瘍で認められる重要な特性を 2 次元培養細胞よりも再現できていること、またそれらが薬剤耐性に関与していることが示唆された。細胞ベースの薬理試験プラットフォームとして、3 次元培養モデルの活用が期待される。