癌化学療法施行前後で分離培養した頭頸部 扁平上皮癌細胞の抗癌剤感受性

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座

美馬孝至 小倉孝文
白砂兼光 松矢篤三

論文要旨

下顎歯肉癌患者 ($T_1N_0M_0$) において、ペブロマイシン (PEP), ビンクリスチン (VCR), マイトマイシン C (MMC), シスプラチン (CDDP) を用いた POMP 療法 2 クール施行前後で外科的に切除された転移巣より 2 株の扁平上皮癌細胞株を分離培養し、それぞれ SCCNI-pre, SCCNI-post と命名した。両細胞株は類似した細胞形態と性格を示し、ヌードマウスでの造腫瘍性と軟寒天中でのコロニー形成能を有した。抗癌剤感受性を 50% 細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) により検討すると SCCNI-post は SCCNI-pre に比し、PEP に対し 9.3 倍, CDDP に対し 4.7 倍低感受性だが、5-FU, ADR, MMC, VCR と MTX に対しては近似した値を示した。化学療法後の再発腫瘍では、投与された薬剤に対し低感受性腫瘍細胞が存在することが示唆された。

Key words: 癌化学療法 (Anticancer chemotherapy), 扁平上皮癌 (Squamous cell carcinoma), 腫瘍細胞分離 (Tumor cell isolation), 抗癌剤感受性 (Anticancer drug sensitivity)

緒言

癌治療において、当初有効であった化学療法剤を反復して用いると、効果が減弱することは臨床上しばしば経験する事実である。これは腫瘍の抗癌剤に対する薬剤耐性といわれ、この耐性獲得機構を解明するため当教室を含む多施設において、株化細胞から人為的に薬剤耐性株を樹立し解析が行われてきた^{1)~4)}。しかし実際の固形癌の臨床例において、経過を追って癌細胞を分離培養し *in vitro* で抗癌剤感受性の変遷について解析を行った報告はない。

われわれは、68 歳女性の下顎歯肉癌症例 ($T_1N_0M_0$) で、初回手術切除材料に腫瘍のリンパ節外浸潤が認められたためペブロマイシン (PEP), ビンクリスチン (VCR), マイトマイシン C (MMC), シスプラチン (CDDP) を用いた POMP 療法⁵⁾を 2 クール施行したが、約 1 カ月を経て頸部リンパ節転移をきたしたため腫瘍切除術ならびに全頸部郭清術を施行した症例を経験した。この化学療法施行前後で外科的に切除された転移巣より *in vitro* への腫瘍細胞の分離培養に成功し、両細胞株の生物学的性状ならびに、抗癌剤に対する感受性について解析を行ったので報告する。

研究材料および方法

(1) 症例

患者は 68 歳女性の未治療下顎歯肉癌症例 ($T_1N_0M_0$) で、初診時より患側リンパ節転移を認めた。原発巣は小さいにもかかわらず、不動性顎下リンパ節転移があったのでまず患側上頸部郭清術を施行したが、病理組織的には節外浸潤をとともなう扁平上皮癌の転移巣であった (図 1A)。原発巣に対しての抗腫瘍効果ならびに頸部リンパ節転移予防を目的として、PEP, VCR, MMC, CDDP を用いた POMP 療法⁵⁾ (1 日あたり CDDP 16mg の静脈投与と PEP 5mg の持続皮下投与を連続 7 日間継続し、最終日に MMC 11mg, VCR 1.1mg を静脈投与) を 2 クール施行した。しかし約 1 カ月を経て頸部リンパ節転移をきたしたため下顎骨切除術を含む腫瘍切除術ならびに全頸部郭清術を施行した症例を経験した。病理組織的には、化学療法の効果があり原発巣においては腫瘍細胞は消失していたが、患側リンパ節には扁平上皮癌の転移巣が認められた (図 1B)。今回われわれは、この化学療法施行前後で外科的に切除された転移巣より腫瘍細胞の分離を行った。

(2) 切除腫瘍からの腫瘍細胞分離および培養法

著者らが過去に報告した方法⁶⁾に準じて、腫瘍細胞の分離培養を行った。細胞培養液としては、5% 牛胎児血清 (FBS, M. A. Bioproducts, Walkersville, M D., USA), 4 mM L-グルタミン (和光純薬, 大阪)

別刷請求先:

〒565 吹田市山田丘 1-8

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座
美馬孝至

図1 初回手術時切除された転移巣 (A) ならびに化学療法施行後に切除された転移巣 (B) の病理組織写真。ともに角化傾向をともなう扁平上皮癌が認められた。(H&E, ×100)。

図2 SCCNI-pre (A) ならびに SCCNI-post (B) の位相差顕微鏡写真 (×200)。

および重曹を添加したダルベッコ変法イーグルの MEM 培地 (DMEM, ニッスイ製薬, 東京) を用い, 37℃ に調整した 5 % 炭酸ガス培養器中で培養した。

(3) ノードマウスでの造腫瘍性の検討

本細胞株の造腫瘍性を検索するため, 前述の培養腫瘍細胞 1×10^7 個を, 0.2ml の DMEM に浮遊させ, 6 週齢・雌ノードマウス (Balb/c nu-nu, 静岡実験動物, 静岡) 背部皮下に移植し, 移植部位における腫瘍形成の有無を観察した。

(4) 軟寒天培地中でのコロニー形成法

60mm 径ディッシュ (Corning, N. Y., USA) において 0.6% および 0.3% の寒天 (Agar Noble, Difco 社製, USA) を含む 5 % FBS 添加 DMEM を用いた 2 層培養方法を用いた。5 % 炭酸ガス培養器中で 37℃ にて 6 週間培養後, 位相差顕微鏡観察により, 50 個以上からなる細胞集落をコロニーと判定した。

(5) 薬剤および培養細胞の抗癌剤感受性測定法

抗癌性抗生物質として PEP (日本化薬, 東京), プレオマイシン (BLM, 日本化薬), アドリアマイシン (ADR, 協和発酵, 東京), および MMC (協和発酵) を, 白金の錯塩である CDDP (日本化薬), 代謝拮抗剤の 5-フルオロウラシル (5-FU, 協和発酵), メソ

トレキセート (MTX, 日本レダリー, 東京), 植物アルカロイドの VCR (塩野義, 大阪) の計 8 種類の抗癌剤を本実験に用いた。

培養細胞の抗癌剤感受性測定法は小倉の方法⁷⁾ に準じて行った。すなわち腫瘍細胞を所定密度でまき, 24 時間培養後各薬剤を所定濃度で含む増殖培養液に交換し, 60 時間培養後薬剤非処理の対照細胞数に対する薬剤処理した細胞数より生残率を求め, 各薬剤の 50% 増殖抑制濃度 (IC_{50}) を算定した。

結 果

(1) 腫瘍細胞分離

化学療法施行前後で外科的に切除された転移巣より分離培養した両細胞株は, 継代 8 代目から安定した増殖を示し, 均一な立方型の細胞形態を呈した。前者を SCCNI-pre と後者を SCCNI-post と称する (図 2)。細胞倍加時間は, SCCNI-pre は 40.5 時間, SCCNI-post は 40.1 時間とほぼ類似した値であった。

(2) ノードマウスでの造腫瘍性

ノードマウスでの造腫瘍性について検索すると, SCCNI-pre と SCCNI-post はともに 1×10^7 細胞をノードマウス皮下に接種すると, 4 週間で皮下に腫瘍を

図3 SCCNI-pre (A) ならびに SCCNI-post (B) 接種により形成されたヌードマウス腫瘍の病理組織写真 (H&E, $\times 200$)。

図4 SCCNI-pre (A) ならびに SCCNI-post (B) の軟寒天培地中で形成されたコロニーの位相差顕微鏡写真 ($\times 100$)。

形成した。ヌードマウス腫瘍は、切除腫瘍と同様角化傾向を示す扁平上皮癌であった (図3)。

(3) 軟寒天培地中でのコロニー形成能

軟寒天中でのコロニー形成能について検索すると、両細胞株とも約8週間でコロニーを形成した。コロニー形成率は SCCNI-pre, SCCNI-post ともに0.2~0.3%であった (図4)。

(4) 抗癌剤に対する感受性

SCCNI-pre および SCCNI-post 両細胞株の抗癌剤に対する感受性を検討すると、SCCNI-post は、臨床において持続的投与をした PEP に対しては9.3倍、また反復的投与をした CDDP に対しては4.7倍 SCCNI-pre に比較して感受性は低かった。一方 VCR ならびに MMC に対しては、両細胞株は近似した生残曲線を示した (図5)。各種の抗癌剤に対する感受性について検索すると、BLM に対しては SCCNI-post は8.3倍低感受性であったが、ADR, 5-FU, MTX については大差はなかった (表1)。

図5 SCCNI-pre (○-○) ならびに SCCNI-post (●-●) の (A: PEP, B: CDDP, C: VCR, D: MMC) に対する感受性

表1 SCCNI-pre ならびに SCCNI-post
の各種抗癌剤に対する感受性

Drug	IC ₅₀ (μg/ml)		Ratio of IC ₅₀ post. / pre.
	SCCNI-pre	SCCNI-post	
PEP	0.044	0.41	9.3
CDDP	0.32	1.50	4.7
MMC	0.075	0.089	1.19
VCR	0.0085	0.0075	0.88
ADR	0.080	0.072	0.90
5FU	0.082	0.078	0.95
BLM	0.063	0.529	8.4
MTX	0.039	0.038	0.97

考 察

癌化学療法の進歩はめざましく、頭頸部腫瘍においても、CDDP ならびに PEP を中心とした多剤併用療法の臨床応用により、治療成績の向上が報告されている^{5,6)}。一方、化学療法に抵抗性を示す腫瘍が存在することも、日常臨床上しばしば経験する事実である。今回報告した SCCNI-pre および SCCNI-post は、同一患者から化学療法施行前後で分離培養された細胞株であり、ともに腫瘍原性を有し類似した増殖能を示した。抗癌剤に対する感受性は、SCCNI-post は SCCNI-pre に比較して、臨床において少量連日投与した CDDP と持続皮下投与を行った PEP に対しては感受性が低下していたが、単回投与した VCR ならびに MMC に対しては感受性の差はなかった。この両細胞株における感受性の変化は *in vivo* での抗癌剤の反復あるいは持続投与により、薬剤感受性の低下が誘導されたと考えられるが、SCCNI-post は多種類の抗癌剤に対して多剤耐性の形質を示すものではなかった。本症例において、化学療法後に行った腫瘍切除術で原発巣においては腫瘍細胞は消失していたことより、POMP 療法⁵⁾は十分な臨床効果をもつものであると考えられる。SCCNI-post は転移巣より分離された細胞株であるが、原発巣と転移巣ではそもそも腫瘍細胞の性格が異なるものなのかは不明であるが、興味ある問題点である。

抗癌剤の薬剤耐性に関与する因子としては、薬剤の細胞内取り込み機構、細胞内解毒機構、DNA 障害からの修復機構、p-glycoprotein の発現等が関与するとされている^{1-4,7)}。今回特に、p-glycoprotein の発現について western blot 法により検索したが、SCCNI-pre・SCCNI-post ともに本蛋白の発現は認められなかった(データ示さず)。以前より腫瘍を構成する細胞集団には、正常組織に比較して細胞不均一性があり、異なる抗癌剤感受性を有するクローンが存在することが報告されている⁹⁾。また Shoemaker らはヒト肺小細胞癌から腫瘍細胞分離を行い、コロニー法で解析し、過去に化学療法を施行されていない腫瘍中にも多剤耐性の表現形質を有

する細胞が存在したことを報告している¹⁰⁾。抗癌剤の耐性獲得過程においては、化学療法により高感受性細胞集団が死滅し、低感受性細胞集団が選択的に増殖する過程が第一段階であり、さらにこの低感受性細胞集団から突然変異的にまた変異原作用により耐性形質が誘導され、腫瘍は獲得耐性を示すものと推察される。低濃度の抗癌剤反復処理により薬剤耐性が誘導される事実としては、上松らは抗癌剤 BLM に注目し、*in vitro* で口腔扁平上皮癌培養細胞に対して、高濃度少数回投与よりも低濃度 BLM の反復処理により容易に耐性誘導が可能であったと報告している¹¹⁾。本細胞株は、化学療法後の再発腫瘍においては薬剤感受性が低下をきたしている事実を *in vitro* で再現する興味ある1つのモデルと考えられ、さらに今後の解析が期待される。

文 献

- 1) Urade M. Sugi M. et al: Establishment of three bleomycin-resistant human carcinoma cell lines and their cross-resistance to other antitumor agents. *Cancer* 61: 1501-1507, 1988.
- 2) Tsuruo T.: Mechanisms of multidrug resistance and implications for therapy. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 79: 285-296, 1988.
- 3) Urade M. Ogura T. et al: Establishment of human squamous carcinoma cell lines highly and minimally sensitive to bleomycin and analysis of factors involved in the sensitivity. *Cancer* 69: 2589-2597, 1992.
- 4) 立川拓也, 熊澤博文 他: CDDP 耐性 KB 細胞における交叉耐性. *耳鼻臨床* 85: 1003-1009, 1992.
- 5) 白砂兼光, 小倉孝文 他: 口腔扁平上皮癌に対する POMP (Peplomycin, Vincristine, Mitomycin C, Cisplatin) 療法の臨床および組織学的評価. *癌と化学療法* 22: 53-58, 1995.
- 6) 美馬孝至, 浦出雅裕 他: 全身皮下に多発性転移をきたした舌扁平上皮癌の1症例. *日口外誌* 34: 1976-1981, 1988.
- 7) 小倉孝文: ヒト口腔扁平上皮癌細胞のプレオマイシン (BLM) 高感受性および低感受性株の分離と感受性に関与する因子の解析. *阪大歯学誌* 36: 121-147, 1991.
- 8) Inuyama Y. Fujii M. et al: Combination chemotherapy with cisplatin and bleomycin in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Auris Nasus Larynx* 13: 191-198, 1986.
- 9) Komiya S. Matsui K. et al: Establishment of tumor cell lines from a patient with head and neck cancer and their different sensitivities to anti-cancer agents. *Cancer* 63: 675-681, 1989.
- 10) Shoemaker RH. Curt GA. et al: Evidence for multidrug-resistant cells in human tumor cell populations. *Cancer Treat Rep*, 67: 883-888, 1983.
- 11) 上松隆司, 浦出雅裕 他: 低濃度プレオマイシン (BLM) 反復処理による口腔扁平上皮癌培養細胞の耐性誘導. *口腔組織培養研究会誌* 2: 1-7, 1993.

ANTICANCER DRUGS SENSITIVITIES OF SQUAMOUS CELL CARCINOMA
CELLS ISOLATED IN VITRO FROM HEAD AND NECK
CANCER BEFORE AND AFTER CHEMOTHERAPY

Takashi MIMA, Takafumi OGURA,

Kanemitsu SHIRASUNA and Tokuzo MATSUYA

The First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Osaka University
Faculty of Dentistry

Two squamous cell carcinoma cell lines, SCCNI-pre and SCCNI-post, were obtained from metastatic lymph nodes of a patient with gingival carcinoma ($T_1N_3M_0$) before and after two courses of adjuvant chemotherapy with peplomycin (PEP), vincristine (VCR), mitomycin C (MMC) and cisplatin (CDDP), respectively. Both tumor cell lines exhibited similar cell characteristics including morphology, tumorigenicity in nude mouse and colony forming ability in semisolid agar. Analysis sensitivities to antitumor agents showed that PEP and CDDP sensitivities of SCCNI-post were 9.3 times and 4.7 times less than those of SCCNI-pre as judged by IC_{50} respectively, while sensitivities of SCCNI-pre to 5-FU, ADR, MMC, VCR and MTX were comparable to those of SCCNI-post. It seems possible that recurrent tumor, after chemotherapy, contains low sensitive cells to clinically used anticancer drugs.