

前立腺癌の軟寒天培養

—とくに testosterone 添加の影響について—

横浜市立大学医学部泌尿器科学教室 (主任：穂坂正彦教授)

桜	本	敏	夫
窪	田	吉	信
北	島	直	登
穂	坂	正	彦

SOFT AGAR CULTURE OF HUMAN PROSTATIC CARCINOMA

—EFFECT OF TESTOSTERONE ON THE CLONAL GROWTH OF THE CELLS—

Toshio SAKURAMOTO, Yoshinobu KUBOTA, Naoto KITAJIMA
and Masahiko HOSAKA*From the Department of Urology, School of Medicine, Yokohama City University
(Director: Prof. M.Hosaka)*

Soft agar cultures of human prostatic carcinoma cells obtained from prostates with needle biopsy and metastatic lymph nodes were examined. Colony formation were observed in 2 of the 4 needle biopsy specimens and in 7 of the 10 lymphatic nodes specimens. The plating efficiency was 0.04 to 0.43%. The effect of testosterone on the clonal growth of these cells in soft agar culture was studied. In half of the cases, colony formation was increased by the addition of testosterone. Whereas in the other cases, colony formation was not influenced by the testosterone. Clinically, most of the former cases responded well to the anti-androgen therapy. Neither EGF nor hydrocortisone showed any effect on the colony formation of the prostatic cancer cells in soft agar.

These results suggest that primary culture of human prostatic cancer is possible in soft agar medium, and that androgen dependency of these cells can be examined in vitro.

Key words: Stem cell assay, Prostatic carcinoma, Testosterone

緒 言

ヒト前立腺癌の内分泌環境をめぐる諸問題や再燃癌の病態などについてはさまざまな検討がなされているが、いまだ解決すべき未知の問題は数多くある。これらを解決し、実際の臨床に役立つための方法のひとつは良いモデル系を用いることである。しかし現在ヒト前立腺癌の *In vitro* のモデル系はほとんどなく、いくつかのヒト前立腺癌由来の株細胞があるのみである。これらの株細胞はそれぞれ特有の性質を保持しているものの、樹立まで数カ月から数年の長期間の時間を要し、また株化にともなう操作のためもとの腫瘍の

性質を必ずしも有していない。そのため株細胞を用いて得られた数々の実験での成績はもとの患者の治療や病態の理解にはほとんど役立っていないのが現状である。

Salmon と Hamburger によって開発された human tumor stem cell assay^{1,2)} は個々の患者より得られた癌細胞を二層軟寒天培地中に播種し、抗癌剤処理後のコロニー形成を評価するものである。この培養法の特徴は短期間で個々の患者からの癌細胞を培養できる点である。そこでわれわれは今回この二層軟寒天培地を用いてヒト前立腺癌の培養の可否について検討し、その培養におよぼすホルモンなどの影響を観

察したので報告する。

材料および方法

培養組織

横浜市立大学医学部病院泌尿器科にて得られた前立腺癌組織14例を用いた。組織採取の方法は経会陰的針生検(4例)によるものと、骨盤内転移リンパ節生検(10例)によるものである。

培養方法

Stem cell assay とその尿路性器癌への応用の具体的方法についてはすでに報告している^{3,4)}が、簡単に述べると。

1. 細胞採取 無菌的に得られた前立腺癌組織をハサミで細切し0.2% collagenase (TypeIV: Sigma 社)あるいは0.2% collagenase+0.02% DNAase (Sigma 社)溶液中で37°C, 1~2時間処理した。その後白金メッシュと26Gの注射針を通し癌細胞を単離した。得られた細胞を0.4% trypan blue 液(GIBCO 社)にて生細胞数を算定した。

2. 細胞培養 単離した癌細胞を培養液に agarose (TypeI: Sigma 社) 0.4% を加えた下層および0.24%の上層で構成された二層軟寒天培地の上層に播種し、5% CO₂-air incubator 中で培養した。そして3~4週間後の培地中に増殖してくるコロニーを観察した。

3. 薬剤処理 コロニー形成におよぼす影響を調べるための各種薬剤、ホルモンは軟寒天培地の上層に添加した。使用した薬剤はつぎのとおりである。testosterone (Sigma 社), hydrocortisone (Sigma 社), epidermal growth factor (EGF: Collaborative Research 社)。単離後の癌細胞浮遊液にこれらの薬剤を加え、軟寒天培地に播種した。3~4週間後のコロニー形成を観察し薬剤添加の影響を検討した。

結 果

コロニー形成について

検討症例の培養成績を Table 1, 2に示した。針生検4例中2例(50%), リンパ節10例中7例(70%)にコロニー形成を認めた。播種細胞数あたりのコロニー形成数(plating efficiency)は0.04~0.43%であった。

針生検例では組織はすべて true cut 針にて経会陰的におこない2~3個の生検組織を用いた。1検体につき得られた単離生細胞数は1~3.6×10⁵個であり、4例中2例は細菌汚染によりコロニーが得られず、残りの2例のうち1例は十分な数の評価可能なコロニー

Table 1. 検討症例とコロニー形成

材 料	症例数	コロニー形成例	P.E. (%)
前立腺(針生検)	4	2	0.09~0.28
転移リンパ節	10	7	0.04~0.43

P.E.: plating efficiency(コロニー形成数/播種細胞数)

Table 2. 検討症例とコロニー形成におよぼす testosterone の影響

Case	Age	Site [*]	Histology [*]	Colony formation	Effect of testosterone
1	54	P	Ad. Ca. W	+	N.D. [*]
2	82	P	Ad. Ca. ?	-	N.D.
3	60	P	Ad. Ca. P	-	N.D.
4	74	P	Ad. Ca. M	+	+
5	54	LN	Ad. Ca. M	+	+
6	63	LN	Ad. Ca. P	-	N.D.
7	67	LN	Ad. Ca. P	+	+
8	76	LN	Ad. Ca. W	+	-
9	79	LN	Ad. Ca. M	+	+
10	68	LN	Ad. Ca. W	+	-
11	63	LN	Ad. Ca. M	-	N.D.
12	75	LN	Ad. Ca. M	+	-
13	79	LN	Ad. Ca. M	+	-
14	75	LN	Ad. Ca. P	-	N.D.

Site^{*} P: prostate. LN: lymph node

Histology^{*} Ad. Ca.: Adenocarcinoma. W: well differentiated.

M: moderately differentiated. P: poorly differentiated

N.D.^{*}: not determined

形成が認められたが、1例は1 dish あたり数個程度のコロニーしか得られなかった。

リンパ節組織より採取した検体は外科的に外腸骨、内腸骨および閉鎖リンパ節より得られた前立腺癌転移組織を用いた。1検体につき得られた単離生細胞数は3×10⁵~7.5×10⁶個であった。成績は Table 1のごとく10例中7例(70%)にコロニーを認め(Fig. 1)、そのすべてに十分なコロニー形成が得られた。

薬剤添加の影響

1. testosterone: 培地中に testosterone を添加しそのコロニー形成におよぼす影響を検討できたのは、針生検からの1例とリンパ節組織からの7例計8例である。針生検検体の1例(Case 4)は組織学的には中等度分化型の腺癌で、testosterone 添加によりコロニー数の増加が認められた。リンパ節検体の7例中3例(Case 5,7,9)が testosterone 添加によりコロニー数の増加とコロニー形態の増大が認められたが残りの4例は反応を示さなかった。(Fig. 2) これら testosterone 反応例(針生検1例、リンパ節3例)4

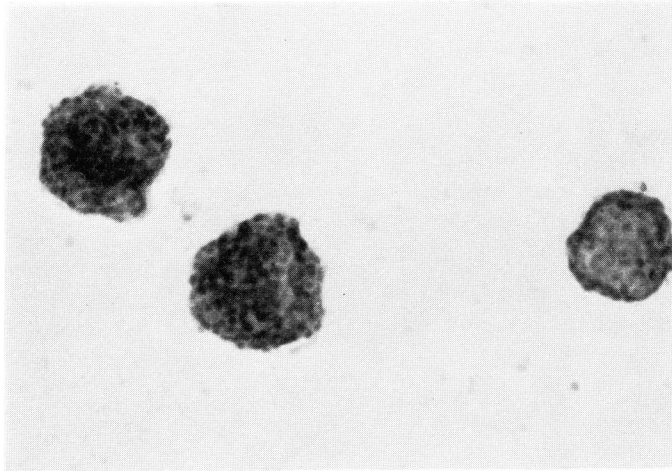


Fig. 1. 前立腺癌コロニー (パパニコロー染色)

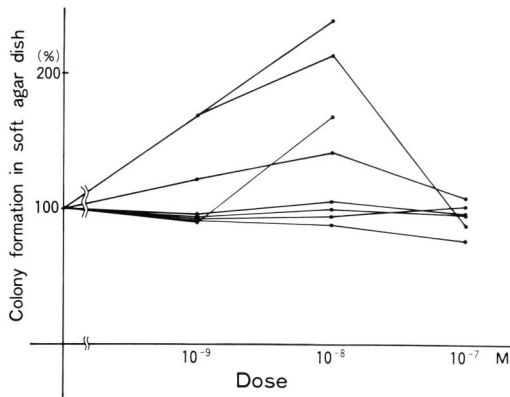


Fig. 2. Testosterone 添加におけるコロニー形成

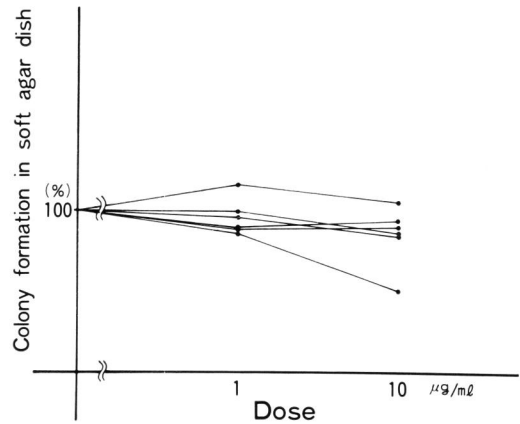


Fig. 4. Hydrocortisone 添加におけるコロニー形成

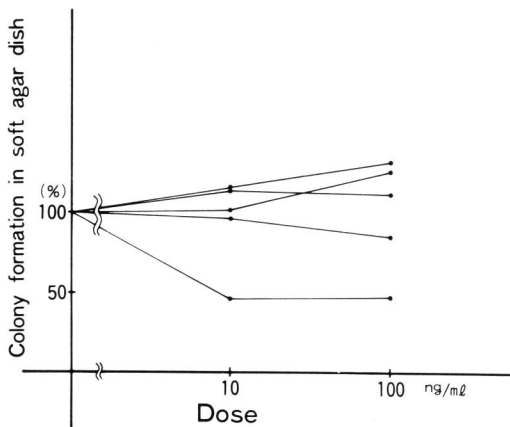


Fig. 3. EGF 添加におけるコロニー形成

例のうち3例は臨床的に抗アンドロジェン療法 (diethylstilbestrol sodium phosphate, hexestrol) に反

応し酸性フォスファターゼ、前立腺酸性フォスファターゼの低下や腫瘍の縮小を認め臨床状態の改善が得られた。残りの1例は当初より酸性フォスファターゼ、前立腺酸性フォスファターゼが正常値を示し評価可能な臨床所見がなく、抗アンドロジェン療法の効果判定はできなかった。testosterone 添加によりコロニー形態に変化のなかった4例中2例は臨床的に抗アンドロジェン療法の効果は不明であり、残りの2例のうち1例は抗アンドロジェン療法にまったく反応しなかったが、他の1例は抗アンドロジェン療法により酸性および前立腺酸性フォスファターゼの正常化を示した。

2. epidermal growth factor (EGF) および hydrocortisone : Fig 3,4 のごとく EGF 添加では5例中1例にコロニー数の低下を示す症例を認めたが他はほぼ不変であると考えられた。また hydrocortisone 添加でも6例中1例に 10 μg/ml の濃度でコ

コロニー数の低下を示すものが残りは hydrocortisone 無添加に比してほとんど差が見られなかった。

考 察

Stem cell assay 法を用いてヒト前立腺癌細胞の二層軟寒天培養を検討したが、14例中9例にコロニー形成を認めた。とくにリンパ節より得られた組織で高いコロニー形成率が認められ各種ホルモン添加の影響を検討できた。testosterone 添加の検体の中にはコロニー形成の増大を示すものがあり、臨床的に抗アンドロゲン療法に対する反応と相関を示すと考えられるものがあった。

軟寒天培地は癌細胞のみをほぼ特異的に増殖させる性質があり^{4,2)} この培養法による各癌腫の制癌剤感受性試験がおこなわれている^{5,6)}。われわれも腎細胞癌、尿路上皮癌や膀胱剝離癌細胞での検討をおこなってきた^{3,4)}。前立腺癌に関する軟寒天培養では、ラット前立腺癌を用いた検討や^{7,8)}、ヒト前立腺癌株細胞による実験の報告があるが^{9,10)}、ヒト前立腺癌の初代培養による検討はほとんどなされていない。また前立腺癌の各種ホルモンに対する反応は軟寒天培養を用いて検討されたことはない。

今回前立腺癌組織の採取法として、経会陰的前立腺針生検によるものと、骨盤内リンパ節生検の2法をおこなった。針生検は比較的容易であり、対象症例も得やすい利点があるが細菌汚染がおこりやすく、十分な癌細胞数が集められないことが短所と考えられる。いっぽう骨盤内転移リンパ節採取の場合十分な癌細胞数を得ることが可能であるが、開腹が必要であり適応症例が限られることが欠点であると思われる。Sarosdyらは経尿道的または開腹により得られた前立腺癌組織を用いて stem cell assay 法による制癌剤感受性試験成績を報告しているが¹¹⁾、それによると34例中22例(65%)にコロニー形成を認め、30個以上のコロニーがあり感受性試験をおこないえたのは15例(44%)で、コロニー形成率は0.01~0.12%と報告している。われわれの検討では0.04~0.43%というコロニー形成率であり、彼らの報告とほぼ同程度の値である。

ホルモン添加の影響ではとくに testosterone において 10^{-8} M の testosterone 添加濃度を中心に約2倍程度のコロニー数の増加とコロニー形態の増大を示すものがあり、コロニー増加傾向を示したものは不変のものと比較し、臨床的にも抗アンドロゲン療法に反応を示すものが多く興味ある相関を示唆している。hydrocortisone や EGF 添加ではコロニー形成数

の低下を示すものが散見されたが全体的にはほぼ不変であると考えられた。

Stem cell assay 法による制癌剤感受性試験をおこなううえでは、その低いコロニー形成率が多種の薬剤検討をおこなう場合にその実施を困難にさせているひとつの要因である。コロニー形成率が倍化すれば必要な採取癌細胞数は半分よく、また検討薬剤も多くすることができる。したがってコロニー増殖を促進させる添加剤が得られればその意義は大きい。今回われわれの実験では前立腺癌の症例の中に testosterone 添加により Stem cell assay 法の成績の向上を望めるものがあると考えられた。

また前立腺癌症例の中にはこのような testosterone 添加時における軟寒天培養を検討することによりその症例の臨床的な性質、とくにアンドロゲン依存性のある程度予測できることを示唆していると思われる。今後さらに症例を増やし、また臨床像との相関を調べることにより、この *in vitro* における testosterone の要求性と臨床でのアンドロゲン依存性との関係をさらにあきらかにしたいと考えている。

文 献

- 1) Hamburger AW and Salmon SE: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**: 461~463, 1977
- 2) Hamburger AW and Salmon SE: Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J Clin Invest* **60**: 846~854, 1977
- 3) 桜本敏夫・三浦 猛・窪田吉信: Stem cell assay による制癌剤感受性試験—第1報 軟寒天培地を用いた腎細胞癌の初代培養について. *日泌尿会誌* **74**: 1081~1085, 1983
- 4) 石橋克夫・桜本敏夫・三浦 猛・窪田吉信: 軟寒天培地を用いた膀胱剝離細胞の培養の検討. *日泌尿会誌* **75**: 1208~1211, 1984
- 5) Fleischmann J, Heston WDW and Fair WR: Renal cell carcinoma and the clonogenic assay. *J Urol* **130**: 1060~1062, 1983
- 6) Bertelsen GA, Sondak VK, Mann BD, Korn EL and Kern DH: Chemosensitivity testing of human solid tumors. *Cancer* **53**: 1240~1245, 1984
- 7) Kirkels WJ, pelgrim OE, Hoogenboom AMM, Aalders MW, Debruyne FMJ, Vooijs GP and Herman CJ: Patterns of tumor colony development over time in soft-agar

- culture. *Int J Cancer* **32**: 399~406, 1983
- 8) Dibner JJ and Nakeff A: Proliferative properties of the clonogenic cells of the R 3327 prostate adenocarcinoma. *In Vitro* **19**: 179~190, 1983
- 9) Kirk D, Szalay MF and Kaighn ME: Modulation of growth of a human prostatic cancer cell line (PC-3) in agar culture by normal human lung fibroblast. *Cancer Res* **41**: 1100~1103, 1981
- 10) Metcalfe SA, Whelan RDH, Masters JRW and Hill BT: In vitro response of human prostate tumor cell lines to a range of antitumor agents. *Int J Cancer* **32**: 351~358, 1983
- 11) Sarosdy MF, Lamm DL, Radwin HM and Von Hoff DD: Clonogenic assay and in vitro chemosensitivity testing of human urologic malignancies. *Cancer* **50**: 1332~1338, 1982

(1985年2月4日受付)