

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19851

研究課題名(和文)免疫不全豚を用いた肝癌新規実験モデルにおける血流動態/画像-病理相関の妥当性検討

研究課題名(英文) Validation of hemodynamic/radiologic-pathological correlation in a novel experimental model of hepatocarcinoma using immunodeficient pigs

研究代表者

田村 全 (Tamura, Masashi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50594602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：重度免疫不全ブタ、I12rg-KOブタに対してヒト肝癌細胞株を移植し、肉眼的にびまん型および多発肝内転移型を示す低分化肝細胞癌モデルの作成に成功した。このモデルでは血管造影下CTにおける画像所見がヒト肝細胞癌と一致し、実験モデルとして妥当であることが確認された。また、単結節型についてもヒト肝細胞癌と画像所見の一致する実験モデルを作成できる可能性があることが示された。今後、抗癌剤、TACE、RFAなどの局所治療、外科的切除など多様な肝細胞癌治療に対する精度の高い実験を可能とする、再現性の高い肝細胞癌モデル作製のプロトコール完成が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重度免疫不全ブタに対してヒト肝癌細胞株を移植することにより、実験モデルとして妥当な、肉眼的にびまん型および多発肝内転移型を示す低分化肝細胞癌モデルの作成に成功した。また、単結節型についてもヒト肝細胞癌と画像所見の一致する実験モデルを作成できる可能性があることが示された。今後、再現性の高い肝細胞癌モデル作製のプロトコール完成が期待される。このような人に近い大動物モデルの完成により、臨床研究の無駄を省き、動物および被験者の負担を軽減し、臨床応用への時間を短縮し、今後の肝癌治療の効率的な新規治療導入に応用することが可能となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines were transplanted into severely immunocompromised pigs, I12rg-KO pigs, and a poorly differentiated HCC model with grossly diffuse tumor or multiple intrahepatic metastases was successfully created. In this model, imaging findings on angiographic CT were consistent with human HCC and this model was validated as an experimental model. It was also shown that a single-nodular HCC experimental model with consistent imaging findings with human HCC could be created. The study could lead to a protocol of making a highly reproducible HCC model, which enable accurate experiments for various HCC therapies such as anticancer drugs, TACE, local treatments such as RFA, and surgical resection.

研究分野：放射線医学

キーワード：肝細胞癌 血管造影下CT 実験モデル

1. 研究開始当初の背景

現在の癌治療の目覚ましい進歩は、動物モデルを用いた基礎実験に支えられている。特に齧歯類など小動物を用いた担癌動物モデルは発癌のメカニズムの解明からそれを基にした創薬や投与方法の開発に現在も大きな役割を担っている。しかし、小動物と人間との差は大きくほとんどが臨床研究ではネガティブな結果となり、臨床応用にはなかなか結びつかない。また長い期間がかかり、医療経済を大きく圧迫する一面もある。またいまだに外科的手技を用いた実験が可能な大動物担癌モデルが存在しないため、臨床の現場で科学的根拠の少ないまま経験則にて行われている治療が数多く存在する。新規治療開発には臨床研究が必須であり、倫理面、医療経済面において制約が厳しくなるなか、それを補完する効率的なプレ臨床研究実験系が必要である。

ブタは生理学的、解剖学的、遺伝的にヒトに近く、手術実験などで以前より用いられている。しかし、遺伝子組み換えブタの開発は安定して信頼性の高いES細胞の欠如が大きな障害になってきた。研究協力者の大西は、体細胞クローンブタの作出に成功し、その後10種類に上る遺伝子組み換えブタを樹立してきた。2012年にT,NK,B細胞の分化増殖に関わるX-linked interleukin 2 receptor (Il2rg)を標的とした免疫不全ブタの開発に世界で初めて成功した。このブタが担癌大動物モデルの作出には最適のプラットフォームとなっており、すでに研究協力者の板野により、ヒト肝細胞癌のIl2rg-K0ブタへの生着に成功していた。しかし実際に生着した肝癌モデルがヒト肝癌と同様な血流動態を示すかは全く不明であり、実験モデルとしての妥当性は検討されていなかった。

2. 研究の目的

重度免疫不全ブタ、Il2rg-K0ブタを用いて作成したヒト肝細胞癌ブタ実験モデルを用いて、血管造影下CT(肝動脈造影下CT: CTHAおよび経動脈性門脈造影下CT: CTAP)を行い、ヒト肝癌と同様の所見を呈するかを画像から検討し、さらに血管造影下CTHA/CTAPの画像と病理検体を比較し病理との相関および血流動態を明らかにし、実験モデルとしての妥当性を検討する。

3. 研究の方法

(1) Wild type ブタでの予備実験

肝動脈造影手技の確立

腫瘍の画像的評価を行うために必須となる肝動脈造影の手技を確立した。鼠径部カットダウン法による血管確保し、4Fr.シースを挿入した。血管造影用カテーテルにより腹腔動脈および上腸間膜動脈を選択し、血管造影を施行した。

(2) 超音波ガイド下癌細胞株注入による免疫不全ブタでのゼノグラフト作製および血管造影実験 Il2rg-K0ブタを用いた担癌モデル作製

生後4-6週の免疫不全ブタの肝実質内に癌細胞株(HepG2)をMatrigelに溶解(1×10⁷個/ml)した液体0.5mlを超音波ガイド下で局注した。

血管造影による画像評価及び摘出検体の病理学的評価

局所注射より5週間で画像評価(血管造影および血管造影下CT検査)を行った。その後肝全摘を行い、生着腫瘍の肉眼的、病理学的評価を行った。

(3) 単結節型肝細胞癌モデル作成のための予備実験

ヌードマウスの皮下にA431(類上皮細胞株)を接種し、2週間後に4mm角に切り出して採取した。採取当日、全身麻酔・小開腹下に生後4-6週の免疫不全ブタの肝に小切開を加え、2mm程度にトリミングした腫瘍を肝実質内に植え込んで縫合、閉腹した。2週後に超音波により腫瘍の生着有無を評価した。

(4) 小開腹下癌細胞株植え込みによる免疫不全ブタでのゼノグラフト作製および画像評価実験

ヌードマウスによる小腫瘍塊作成

ヌードマウスの皮下にHepG2を接種し、適宜大きさの評価を行い、4週間後に5mm角に切り出して採取した。

Il2rg-K0ブタを用いた担癌モデル作製

生後4-6週の免疫不全ブタの全身麻酔・小開腹下に肝に小切開を加え、2mm程度にトリミングした腫瘍を肝実質内に植え込んで縫合、閉腹した。

生着腫瘍の超音波画像フォローアップ

2週間毎に超音波によるフォローアップを行い、植え込み部位への腫瘍細胞の生着の有無を評価した。

血管造影による画像評価

局所注射より7週間で画像評価を行った。血管造影および血管造影下CTを施行予定であった

が、施設の都合により当日カテーテル室を使用することができなかつたため、造影 CT による評価を行った。

4. 研究成果

(1) Wild type ブタでの予備実験

肝動脈造影手技の確立

鼠径部カットダウン法による血管確保、4Fr. シースを挿入、血管造影用カテーテルによる腹腔動脈および上腸間膜動脈の選択、血管造影が可能であることを確認した。

(2) 超音波ガイド下癌細胞株注入による免疫不全ブタでのゼノグラフト作製および血管造影実験

2頭の免疫不全ブタにおいて血管造影および血管造影下 CT を施行した。いずれも CTHA では内部壊死を伴う早期濃染、corona sign、wash out を認め、CTAP では Perfusion defect を示し、びまん型もしくは多発肝内転移型の肝細胞癌に一致する画像所見であった。病理学的評価では腫瘍は低分化肝細胞癌に一致する所見であり、著しい門脈および静脈腫瘍栓を認めた。CTHA および CTAP の所見はこの病理学的所見と相関すると思われ、実験モデルとして妥当と思われた。

(3) 単結節型肝細胞癌モデル作成のための予備実験

3頭の免疫不全ブタに対して上記による予備実験を行った。2週後の超音波による観察により、それぞれ単発の腫瘍が観察された。

(4) 小開腹下癌細胞株植え込みによる免疫不全ブタでのゼノグラフト作製および画像評価実験

1頭の免疫不全ブタに対して実験を行った。4、6週後の超音波で観察し、単発の低エコー腫瘍を認めた。7週後に CT で画像評価を行い、一部に早期濃染、遅延相では周囲肝よりも低吸収を示し、肝細胞癌に一致する所見と思われた。

(5) 総括および今後の展望

超音波ガイドした癌細胞株注入により免疫不全ブタにおいて肉眼的にびまん型・多発肝内転移型を示す低分化肝細胞癌の腫瘍モデルが作成可能で、CTHA・CTAP の所見より、ヒト肝細胞癌に対する実験モデルとして妥当であることが確認された。このモデルは抗がん剤などの内科的治療や TACE の効果判定には有用と思われる。この結果を受け、外科的切除や RFA などの局所治療の対象となる単結節型肝細胞癌モデルの作成に移行した。免疫不全ブタの供給などによる問題で、1頭、また造影 CT での評価を施行し、単結節型肝細胞癌モデル作成の可能性が示された。今後、継続した実験により多様かつ再現性の高い肝細胞癌モデル作製のプロトコール完成を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中塚 誠之 (Nakatsuka Seishi)		
研究協力者	板野 理 (Itano Osamu)		
研究協力者	大西 彰 (Ohnishi Akira)		
研究協力者	井上 政則 (Inoue Masanori)		
研究協力者	小黒 草太 (Oguro Sota)		