

機関番号：32666
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591556
 研究課題名 (和文) In vivo イメージングシステムを用いた膵癌実験モデルおよびその応用
 研究課題名 (英文) Experimental pancreatic cancer model using in vivo imaging system and its application

研究代表者
 内田 英二 (UCHIDA EIJI)
 日本医科大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：70176684

研究成果の概要 (和文)：

ハムスター膵癌細胞 PGHAM-1 に Adeno-Associated Vector によってルシフェラーゼ遺伝子を導入し(PGHAM-1-Luc)、同種膵癌移植短期モデルへの応用を試みた。ルシフェリン投与と IVIS Imaging System により、in vivo でリアルタイムに動物を開腹・屠殺することなく腫瘍の経時的観察が可能で、転移・浸潤の機構解明とともに治療実験などにも応用可能と考えられたが、継代による活性の低下など解決すべき問題が明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

We developed short-term pancreatic cancer transplantation models in hamsters using PGHAM-1-Luc, which is luciferase-positive PGHAM-1 cells. Administration of luciferin and usage of IVIS Imaging System could provide us with PGHAM-1 tumor imaging without sacrifice. This system might be useful not only for the research on tumor invasion and metastasis but also for the application to therapeutic trial with new substances. However, decrease of luciferase activity with culture passage is a problem to be solved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：腫瘍外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

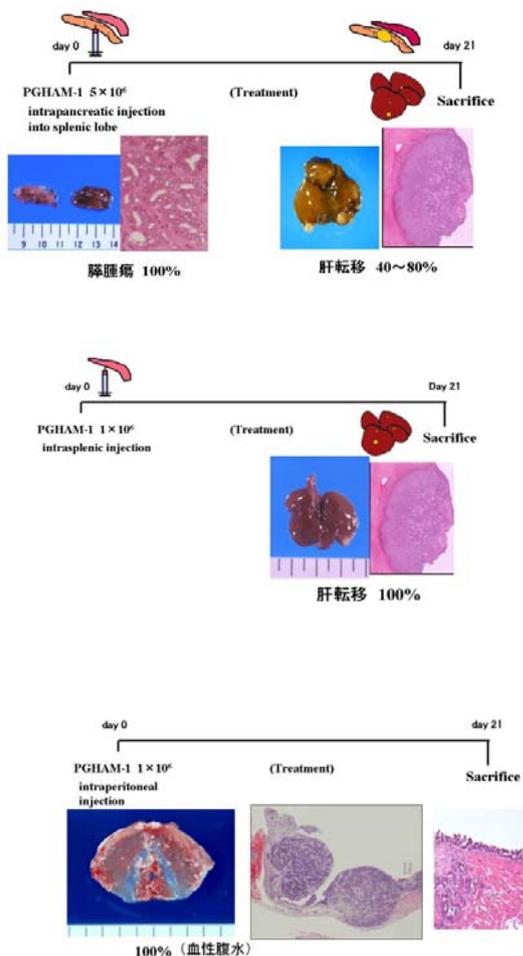
キーワード：膵癌、実験モデル、イメージング

1. 研究開始当初の背景

膵癌は他の消化器悪性疾患と比べて著しく予後が不良であり、膵癌の特性の検討、治療法の開発などには、優れた実験モデルが必要である。実験膵癌モデルにおいては、ラットモデルは膵管癌ではなく腺房細胞癌が発生しヒトのモデルになりえず、犬などの中動物では殆どモデルがない、などハムスターモデ

ルの有用性は十分確認されており、そのなかでもわれわれの開発した PGHAM-1 細胞を用いた 3 週間モデルは比類ないものと自負している。同モデルの概略を以下に図で示す。しかも、リアルタイム in vivo イメージングシステムを導入した研究は膵癌については国内外で全く行なわれておらず、唯一のモデルとなると考え実験を開始した。昨今、動物

実験に対する、動物愛護の観点からも、経時的変化を屠殺剖検することなく観察できることは重要な点である。



2. 研究の目的

本研究の目的は、屠殺剖検することなくリアルタイム観察が可能な膵癌実験モデルを開発することである。今回、ルシフェラーゼの遺伝子を導入したハムスター膵癌細胞 (PGHAM-1-Luc 細胞) と IVIS imaging System を用いたイメージング実験モデルを実用化する。癌の浸潤・転移の機構の解明とともに治療実験としては今後膵癌治療において期待が持たれる抗癌剤について検討する。今回の研究では、Gemcitabine をまず本細胞に対する *in vitro* の効果から検討し、*in vivo* へ展開する予定である。ほかに、今後 TS-1, 白金製剤、代謝拮抗剤、葉酸拮抗剤、微小管作用抗癌剤、および最新の分子標的薬剤の効果を検討する予定である。

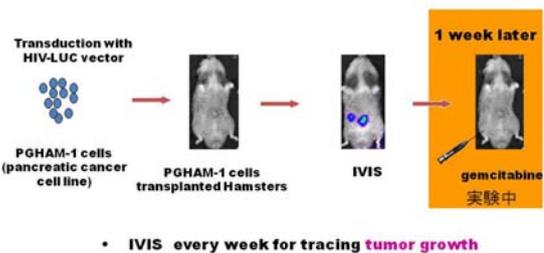
3. 研究の方法

PGHAM-1-Luc細胞を用いた*in vivo*移植モデルの確立

- 1) 膵内移植実験：同細胞を 5×10^6 個を 4 週齢雌性ハムスター膵脾葉に移植し、発生する膵腫瘍、肝転移を観察する
- 2) 脾内移植実験：同細胞を 1×10^6 個を 4 週齢雌性ハムスター脾臓内に移植し、発生する肝転移を観察する
- 3) 腹膜移植実験：同細胞を 5×10^6 個を 4 週齢雌性ハムスター腹腔内に移植し、発生する腹膜播種 (癌性腹膜炎) を観察する

上記モデルにおいて、移植後に経時的にルシフェリン投与後のリアルタイム *in vivo* イメージングを行い、腫瘍の大きさ、発光の程度、体外的腫瘍体積測定、病理組織学的検査、k-ras、MMP などの生物学的特性の検討を行なう。

Experimental design



PGHAM-1 細胞およびPGHAM-1-Luc細胞を用いた*in vitro*実験

現在膵癌に対して使用されている抗癌剤 Gemcitabine、の PGHAM-1 細胞および PGHAM-1-Luc 細胞に対する効果を増殖能、浸潤能、造腫瘍能について検討する。

ハムスター膵癌細胞にルシフェラーゼを導入した細胞 (PGHAM-1-Luc) の再作成および*in vitro*特性の検討

PGHAM-1 細胞に Adeno-Associated Vector にてルシフェラーゼ遺伝子を導入した PGHAM-1-Luc 細胞は長期継代により生物学的特性が変化し、多様性を示すことが明らかとなった。そのため、厳密なクローニングが必要とされ、5つのサブクローンがえられた。この5つの細胞を IVIS Imaging System (IVIS 100 System, Xenogen 社製) を用いて、*in vitro* でリアルタイムに生体反応を観察したところ、そのうちのひとつが一番強い蛍光を発することが明らかとなり、今後の実験では PGHAM-1-Luc-1 を使用することを確認した。しかし、同細胞の継代培養を続けるうちに約

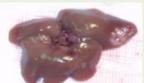
30代を過ぎた頃から、徐々にルシフェラーゼ活性の低下が見られ、今後の *in vivo* の実験には適さないことが判明した。そのため、あらためて、PGHAM-1細胞に新たなAdeno-Associated Vectorを使用してルシフェラーゼ遺伝子を導入し、ルシフェラーゼ陽性のPGHAM-1細胞を再作成し、特性の検討を行っている。

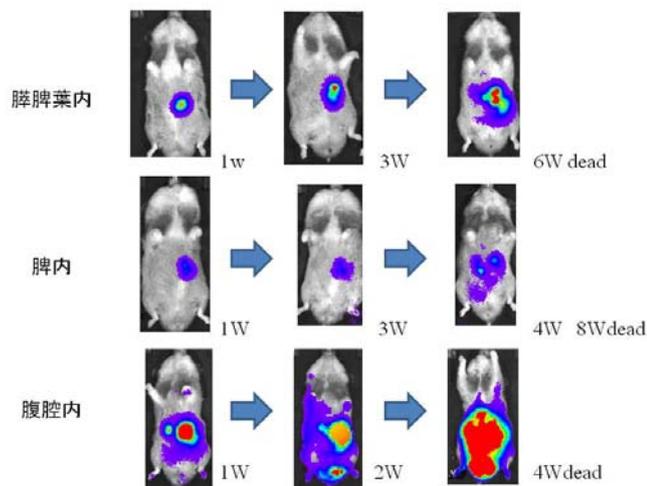
4. 研究成果

継代培養によるルシフェラーゼ活性の低下が見られ、時間の経過とともに今後の *in vivo* の実験には適さないことが判明した。現在よりよいルシフェラーゼ活性を持つ細胞の検索に努めているが、これまでの結果の一部を示す。

膵脾葉、脾内、腹腔内移植それぞれ、生着するとともに、ルシフェリンとIVIS装置を使用することで、体外から観察が可能であった。

PGHAM-1/Luc細胞をハムスターの膵脾葉・脾内・腹腔内に移植し、*in vivo* 移植モデルを作製

膵脾葉内		
	1Weekより確認、75%生着	3Weekより確認、50%
脾内		
	移植翌日より確認、80%生着	10日目より確認、60%
腹腔内	No photo	肝転移、1か月以内に全例死亡
	2weekより播種を確認	

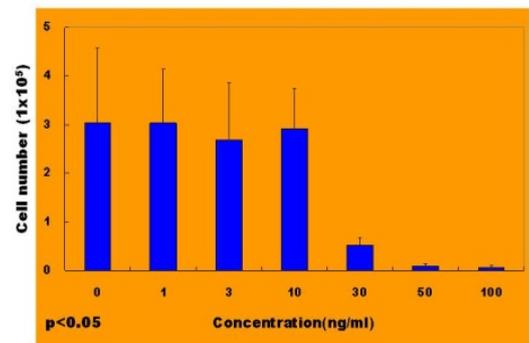


今後、屠殺時の標本と体外からの計測との比較を行う予定である。

また、これらの細胞に対する治療実験を行う予定であったが、ルシフェラーゼ活性の低下によって、Gemcitabineのみしか実施できず、その結果の一部を示す。

Gemcitabineは、明らかに増殖抑制効果をこれらの細胞において示し、今後その効果の機序解明に本システムは役立つと思われる。

Gemcitabineによる増殖能に対する効果を検討し、さらに効果を得るに十分な至適濃度をそれぞれ決定



30ng/ml of gemcitabine: 至適濃度

新規治療について

予後不良の膵癌に対する有効な新規治療法の開発を目的として、血管新生抑制作用とともに癌細胞特異的にアポトーシスを誘導する Melanoma Differentiation Associated Gene-7/Interleukin-24(MDA-7/IL-24) による新規遺伝子治療の有効性を *In vivo* イメージングシステムを用いた実験膵癌モデルによって検討している。ルシフェラーゼ発現膵癌細胞をハムスターに移植し膵癌転移モデル動物の作製し、MDA-7/IL24 発現 AAV ベクターを実験モデルに投与し、腫瘍抑制効果、転移抑制効果を *In vivo* imaging system (IVIS)にて経時的に検討する(ROI 値の変動)とともに、生存期間、血管新生抑制効果、アポトーシスの誘導等を検討する実験を開始している

このように、新規の治療実験においても、本イメージングによって、腫瘍の状態の把握が対外的に行え、動物数、薬品の節約にも繋がるとと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. M. Kawamoto, T. Ishiwata, K. Cho, E. Uchida, M. Korc, Z. Naito, T. Tajiri. Nestin expression correlates with nerve and retroperitoneal tissue invasion in pancreatic cancer. Human Pathol. 査読有、40: 189-198, 2009
2. E. Uchida, A. Matsushita, K. Yanagi, M. Hiroi, T. Aimoto, Y. Nakamura, T. Yokoyama, T. Takashi. Experimental pancreatic cancer model using PGHAM-1 cells: Characteristics and experimental therapeutic trials. J. Nippon Med. School 査読有 75: 325-331, 2008

[学会発表] (計 2 件)

1. E. Uchida, Hamster pancreatic cancer model for research on metastasis and therapeutic trials, 40th Anniversary Joint Meeting of the American Pancreatic Association & Japan Pancreas society. 2009 年 11 月 4 日, Honolulu (Hawaii)
2. 内田英二、相本隆幸、中村慶春、張一光、川本聖郎、山初和也、廣井信、田尻孝、島田隆、イメージングシステムを用いたハムスター膵がんモデル. 第 67 回日本癌学会総会、2008 年 10 月 28 日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 英二 (UCHIDA EIJI)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70176684