

平成22年 5月21日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790999

研究課題名（和文） ヒト肺癌培養細胞株 NOG マウス肺葉内移植モデルの確立

研究課題名（英文） Development of human lung cancer model using NOD/SCID/ γ C null mouse

研究代表者

井上 芳正（INOUE YOSHIMASA）

東海大学・医学部・講師

研究者番号：30306716

研究成果の概要（和文）：

ヒト癌細胞のマウス体内移植モデルにおいて病変の進展を非侵襲的に評価する手法は確立されていない。ヒト肺癌株をNOGマウス尾静脈に投与し形成させた肺腫瘍のMRI画像を撮影し、肺固定標本と画像との対比を行った。MRIにおいて時間経過とともに肺病変の形成・伸展を反映する浸潤陰影の出現と増悪が確認され、病理所見と一致していた。本実験でマウス体内移植モデルにおける病変の変化の非侵襲的評価法の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

We studied a noninvasive method to evaluate tumor growth in the lung of mice. Xenotransplant model of lung cancer (NSCLC) using NOD/SCID/ γ C^{null} (NOG) mice was developed by tail vein injection of human lung cancer cell line (A549). The lung consolidation detected by MRI (magnetic resonance imaging) deteriorated in parallel with intrapulmonary tumor growth. MRI may be useful to noninvasively evaluate tumor growth in lung of mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：NOG mouse, MRI (magnetic resonance imaging), 非小細胞肺癌,

1. 研究開始当初の背景

日本における癌死の第1位は肺癌である。

現在毎年約 65000 人が肺癌に罹患し、約

56000人が死亡する。肺癌の80%を占める非小細胞肺癌は早期のものでは根治手術が可能である。根治的な外科的切除術の対象となるI期からIIIA期の症例は年間20000人程度に過ぎない。進行癌と再発癌は化学療法・放射線療法の対象となる。しかし治療効果は限定的で、奏効率は高くとも30%程度である。長期生存は現状では望めない。この状況を打開するためには、新たな薬剤の開発に加え、抗癌剤耐性機構の阻害・転移機構の抑制などによる治療法の開発が必要である。

上記を踏まえ、我々は、標的遺伝子の検索・標的遺伝子の発現と腫瘍の進展・転移、化学療法による治療効果・予後等との関連についての検討を、*in vitro*、*in vitro*、臨床検体のレベルで行ってきた(Inoue et al. International Journal of Oncology 2003; 23: 1333-1339, Inoue et al. Oncology Reports 2005; 13: 259-264, Fujimori, Inoue et al. International Journal of Oncology 2004; 25: 413-418, Nishiumi N, Inoue Y et al. Clin Cancer Res. 2003; 15: 5616-9, Nakagawa, Inoue et al. Oncology Reports 2008; 20: 265-70, Inoue et al. Oncology Letters 2010; 1: 279-282.) 以上のような成果をさらに発展させ、成果を基にした新たな治療法の開発を目指すためには、上記のような細胞株を用いた *in vitro* level の研究や、臨床検体を用いた retrospective な検証だけでは不十分で、より臨床に近い良質な動物モデルを用いた、候補となる標的・機構の効果の検証を行うことが望まれる。

実験動物を用いた *in vivo* 移植癌モデルは、培養細胞株を用いた *in vitro* の研究と臨床検体を使用した研究の間を埋める重要な役割を担う。一般的には、悪性腫瘍の *in vivo*

モデルとしては、ヌードマウスを含む免疫不全マウスにヒト癌組織を移植した移植癌 (xenograft) が用いられている。*In vivo* 移植癌モデルとしては、皮下移植によるものが最も多い。このモデルはすでに完全に確立されている。腫瘍は体表から観察可能であり、増殖の評価が容易である。しかし、皮下移植モデルは、非小細胞肺癌の *in vivo* モデルとしては以下の問題点がある。

まず、皮下組織と同じ体循環の支配を受ける消化器・乳腺・婦人科系の癌と異なり、肺癌は、肺循環・肺内リンパ管系の複雑に絡み合った環境において発生するという特異性がある。そのため、腫瘍周囲の投与薬物動態、増殖・進展にあたっての腫瘍周囲の環境は、皮下移植モデルと実際とは全く異なる可能性がある。この問題点に対する1つの解決策として、非小細胞肺癌の細胞をマウスの胸腔内に移植する正所性モデルがすでに考案され、一部施設からの報告が散見されている。しかし従来の正所性モデルは、皮下移植モデルと異なり、腫瘍を体表から確認できず、犠牲死させることによってしか腫瘍の生着・進展を評価ができない。そのため、同一個体における主要病変の経時的変化を観察することが不可能であるため、実験結果の再現性・信頼性の検証が難しい。したがって、1実験あたりの必要マウス数は多くせざるを得ない。

また、使用する実験動物についても、これまでに存在したいずれのマウスにも natural killer 活性をはじめ多くの innate immunity が残存しているという問題があり、これが移植癌細胞の生着や増殖・転移能に影響を及ぼしている可能性は否定できない。以上の背景から、問題点を克服するべくあらたな非小細胞肺癌の *in vivo* モデルの可能性について検討するべく研究を計画した。

動物としては、NOG マウス (NOD/SCID/ γ C null mouse) を用いる。NOG マウスとは、最近 (財) 実験動物中央研究所で伊藤守らによって開発された、T、B、NK 細胞機能、樹状細胞、補体活性が従来に比べ極めて低いマウスである。この NOG マウスの肺内にヒト NSCLC 細胞株を生着させ、腫瘍移植後にマウス肺の MRI (magnetic resonance imaging) 画像を定期的に撮影し、腫瘍進展による画像変化を観察した。また、画像と組織の所見との対比も併せて行ない、非侵襲的なマウス体内の腫瘍病変の評価の可能性について検討を行った。

2. 研究の目的

NOG マウスの肺内に移植した肺癌細胞の経時的な変化を、非侵襲的な方法 MRI (magnetic resonance imaging) を用いて評価し、非小細胞肺癌の *in vivo* モデルへの応用の可能性について検討する。

3. 研究の方法

実験開始当初は、ヒト肺癌細胞をマウス肺内に移植する手技として、Matrigel に混合した細胞浮遊液をマウス胸郭から肺内に直接注入する方法を計画したが、手技的の安定性・煩雑さの問題とマウスへの負担の問題があり、実験が伸展しなかった。そのため計画を変更し、マウス尾静脈へヒト非小細胞肺癌細胞株を移植する方法へ変更した。

実験 1.

<目的>

ヒト肺癌細胞がマウス肺内で腫瘍性病変を形成するか確認し、最適な移植細胞数を決定する。

<材料と方法>

細胞：非小細胞肺癌細胞株 (A549)

移植細胞数： 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5

1×10^6 cells/n

動物：NOG マウス 11-12 週齢、♂15 匹 (各細胞株、各細胞数あたり 3 匹)

移植部位：マウス尾静脈

概要：ヒト非小細胞肺癌細胞株 A549 (DMEM+10%FBS+1%PS, 37°C、5%二酸化炭素にて培養) を trypsin 処理後、 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 cells に調整した細胞浮遊液を NOG マウス尾静脈に注入する。

3、4、5 週後に犠牲死させ、肺内への腫瘍の生着を評価する。

実験 2.

<目的>

NOG マウスの肺内に移植した肺癌細胞の経時的な変化を、MRI を用いて評価する。

<材料と方法>

細胞：非小細胞肺癌細胞株 (A549)

移植細胞数： 1×10^5 1×10^6 cells/n

動物：NOG マウス 11-12 週齢、♂20 匹 (各細胞株、各細胞数あたり 10 匹)

移植部位：マウス尾静脈

使用機器 (MRI) : Biospec 70/16 MRI (Bruker biospin MRI GmbH; Ettlingen, Germany)

最大傾斜磁場強度：740mT/m

送受信コイル：内径 38mm ボリュームコイル

T2 強調画像：RAREst 法、TE = 4.2 ms, TR = 1500 ms, 加算回数 = 50 回、FOV = 21 mm × 21 mm, 画像マトリックス

ス = 256 × 256, スライス厚 = 0.23 mm, 計測時間 = 3 時間

概要：実験 1 の結果を踏まえて、ヒト非小細胞肺癌細胞株 A549 (DMEM+10%FBS+1%PS, 37°C、5%二酸化炭素にて培養) を trypsin 処理後、 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 cells に調整した細胞浮遊液を NOG マウス尾静脈に注入する。

1, 2, 3, 4, 5 週後に犠牲死させ、直後に MRI を用いて画像撮影を行った。撮影後に肺固定標本を作製し、MRI 画像と組織所見の対比を行う。

4. 研究成果

実験 1 の結果

1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 いずれの細胞数を移植した群でも 4 週目から顕微鏡的に肺内への癌病巣が確認された (形成率 100%)。

腫瘍形成数は移植細胞数に比例して増加する傾向があり、腫瘍形成数は同一移植細胞数群内で安定していた。結果をもとに、移植する細胞数と MRI の撮影時期を実験 2 のごとく定めた。

実験 2 の結果

固定標本では 1×10^5 , 1×10^6 個の両条件とも 2 週目より肺内の腫瘍病変を顕微鏡的に確認した。実験 1 と同様、肺内に形成されている腫瘍病変数は注入細胞数に応じて増減しており、同じ注入細胞数の群では各個体間では犠牲死の時期に応じて病変の増大・融合所見はあるものの、形成される病変数に明らかなばらつきはなかった (図 1)。MRI 画像では 1×10^5 注入群では 4 週目、 1×10^6 注入群では 3 週目より肺野全体の濃度上昇所見が確認され、時間経過とともに病変の融合を反映すると思われる濃度上昇と浸潤陰影の出現が確認された (図 2)。

本実験により、NOG マウスの肺内に安定してヒト癌細胞が安定して生着しうることが示され、MRI を用いることによるマウス体内病変の解剖学的な変化の非侵襲的な検査が可能であることが示唆された。

これまでに、NOG マウスを用いた肺癌移植モデルの報告はなく、移植癌の進展の評価に MRI を用いた報告は存在しない。今回検討したアプローチを発展させることにより、

in vivo のヒト癌モデル系への応用が期待される。本法により同一個体における腫瘍増殖の経時的な観察が可能になれば、1つの実験系に必要なとされるマウスの数と実験に必要な労力を減少させることが期待される。本法を応用することで、細胞レベルと実臨床レベルでの新たな知見 (抗癌剤耐性因子、転移関連因子) の in vivo で検証がよりスムーズになることが期待され、非小細胞肺癌の病態・治療の研究に貢献しうると考えている。

今後施設の体制をさらに整え、in vivo における画像撮影、マウス肺内への直接移植した腫瘍病変の経時的变化の評価、抗癌剤治療の効果判定等への応用を進めていく予定である。

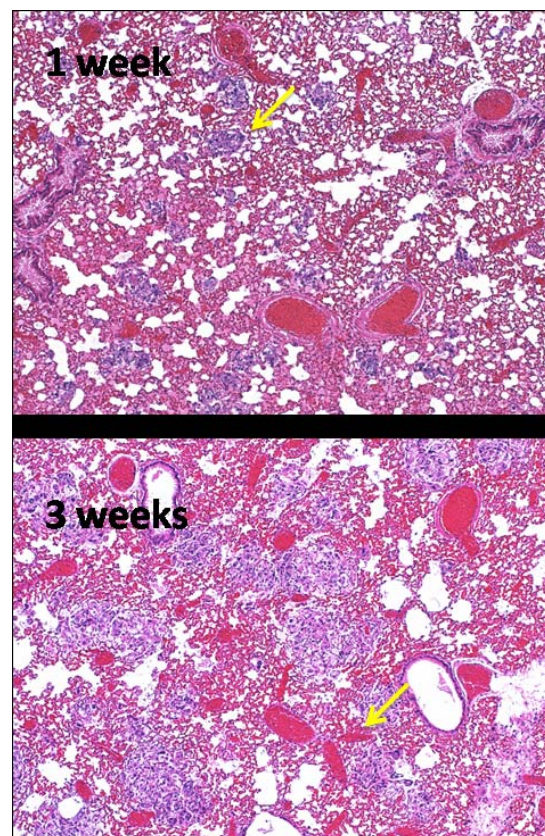


図 1. A549 細胞 1×10^6 移植後 1 週目の肺切片 (上段) と 3 週目の肺切片 (下段)。ともに癌結節の形成がみられ (黄色矢印)、各結

節の融合はあるものの、結節の数は同程度である。

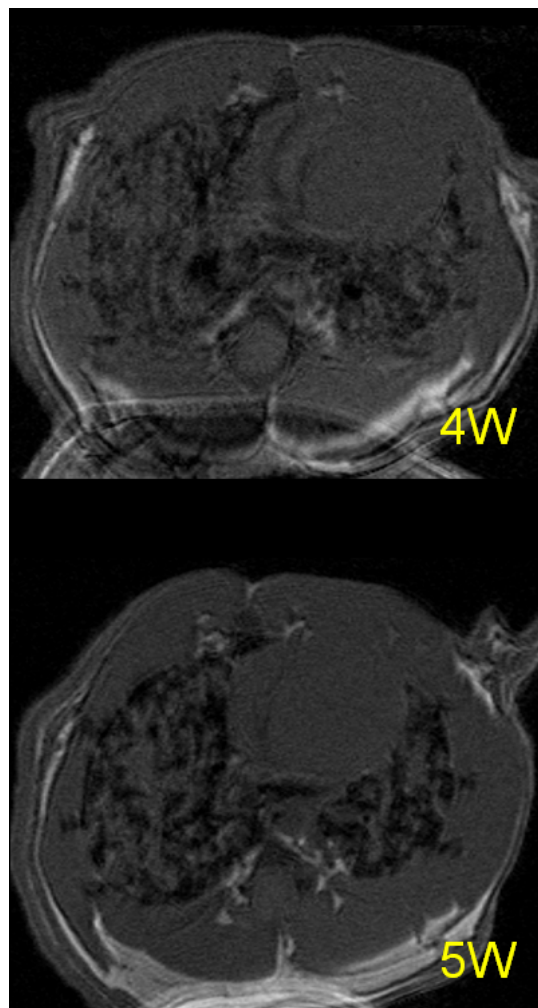
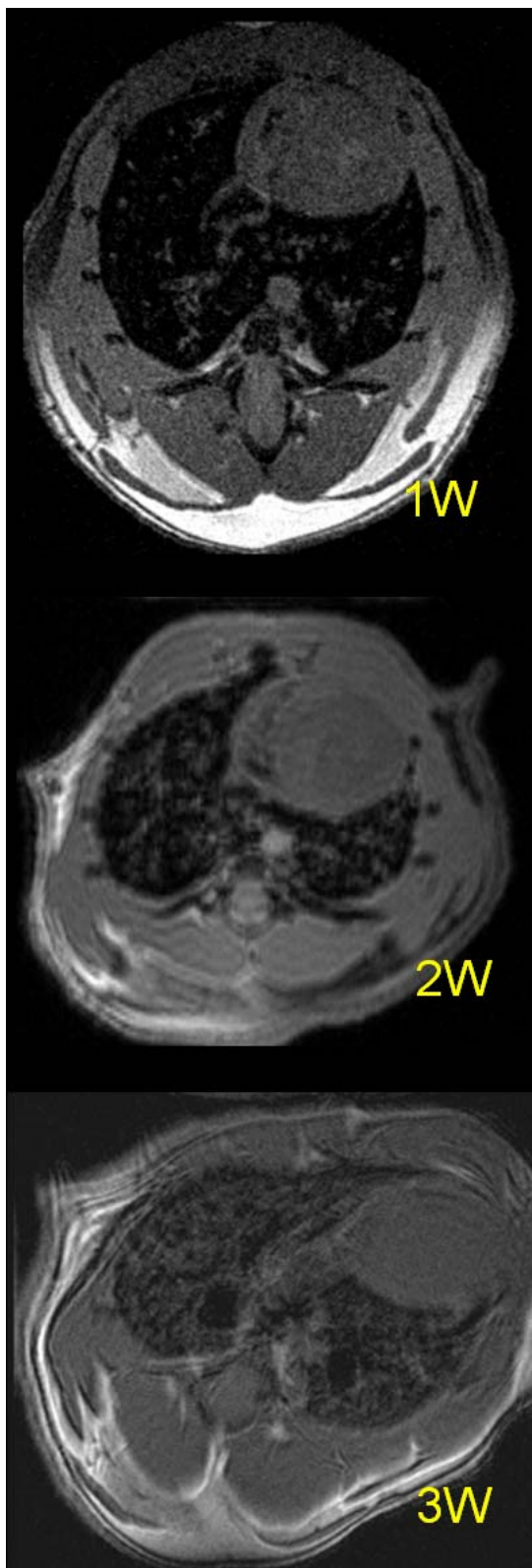


図2. A549 細胞 1×10^6 移植後 1 週目(1W)から 5 週目(5W)の MRI 画像。3 週目(3W)より肺野全体の濃度上昇所見が確認され、時間経過にしたがい病変の増大と融合を反映すると思われる濃度上昇と浸潤陰影の増強を認める。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 芳正 (YOSHIMASA INOUE)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：30306716

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：