

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06972

研究課題名（和文）メカニズム解析および治療法の開発を目指した世界初の胸膜悪性中皮腫動物モデルの確立

研究課題名（英文）Establishment of animal model of pleural malignant mesothelioma for mechanism analysis and development of treatment methods

研究代表者

横平 政直（Yokohira, Masanao）

香川大学・医学部・教授

研究者番号：70403780

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：独自に開発した胸腔内投与法を用い、野生動物における胸膜悪性中皮腫の高率発症を目的とした。針状粒子のTISMOを用いて、AJ雌性マウスにおける胸膜悪性中皮腫の高確率での発症を目的とする実験1、および、pirfenidone（PFD）の胸膜肥厚抑制効果を明らかにする実験2を行った。実験1ではTISMOにより肺胸膜肥厚を認めたが、明らかな異型を伴う中皮細胞の腫瘍性病変は確認できなかった。実験2では胸膜肥厚のマウスあたりの平均面積について、144ppm PFD投与により減少傾向が認められた。PFDの抗線維化作用が針状粒子による胸膜肥厚の進展を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の実験1から、野生動物における胸膜悪性中皮腫の高率発症モデルの確率を得ることはできなかったが、低用量の針状粒子でも胸膜の肥厚をきたすことが明らかとなった。さらに、実験2の結果から、PFDの抗線維化作用が針状粒子による胸膜肥厚の進展を抑制する可能性が判明した。PFDはすでに臨床で用いられている間質性肺炎に対する内服治療薬であり、副作用も少ない。この治療薬が胸膜悪性中皮腫における腫瘍進展抑制に寄与する可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this experiment is to increase the incidence of pleural malignant mesothelioma in wild animals. Experiment 1 aimed at increasing the incidence of pleural malignant mesothelioma in AJ female mice using TISMO, a needle-like particle, and Experiment 2 aimed at elucidating the effect of pirfenidone (PFD) on suppressing pleural thickening. In Experiment 1, pulmonary pleural thickening was observed by TISMO, but no malignant lesions of mesothelial cells with obvious atypia could be confirmed. In Experiment 2, there was a tendency for the average area of pleural thickening per mouse to decrease with the administration of 144 ppm PFD. It was suggested that the antifibrotic effect of PFD may suppress the development of pleural thickening caused by needle-like particles.

研究分野：実験病理学

キーワード：中皮腫 針状粒子 胸膜

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胸膜悪性中皮腫はアスベストや多層カーボンナノチューブ(MWCNT)などの針状粒子の吸入暴露によって、胸膜の中皮細胞が酸化ストレスによる DNA 損傷を来し発症するとされている。胸膜悪性中皮腫の発生メカニズムおよび治療法は何か?という問いについて、それを解明するためには動物モデルの確立が重要であると考え研究を行ってきた(Yokohira M et al., *Cancer Sci.*, 2016)。動物において、腹膜の中皮腫モデルは存在するものの、ヒトで問題となる胸膜悪性中皮腫のモデルは未だに確立されていない。近年、動物の胸膜悪性中皮腫は、針状粒子を気管内投与した実験での報告が散見されるが、発症率は非常に低い。ヒトにおいて悪性胸膜中皮腫はその前癌病変である胸膜肥厚状態(プラーク)を経て発症するとされており、我々の2008年から行っているマウス、ラットを用いた実験ではヒトでの「プラーク」に相当する病変が得られている。我々が開発したマウスおよびラットの胸腔内に直接被検物質を投与する方法によって、人工的に全例においてプラークを発生させることに成功した。麻酔下に左胸部を開胸し、被検物質投与後、皮膚をクリップで閉鎖する(Yokohira M et al., *Oncol. Lett.*, 2010)。

この方法を用いた実験では、針状粒子のチタン酸カリウム針状粒子($K_2O \cdot 6TiO$ fiber: TISMO) (自動車用摩擦材や精密フィルターなどが用途)をマウス・ラットの胸腔内投与後、12週間で全例に胸膜肥厚(プラーク)を確認している。しかし、浸潤や転移を示す「悪性」の胸膜中皮腫の所見は得られていない。これまでの我々の実験では、悪性病変の発症を目指して被検物質(TISMO)をできるだけ高用量(3mg/mouse)で投与してきたが、過大投与量による毒性のために、実験途中(1年強)で屠殺せざるを得なかった。これが悪性病変を確認できていない一因と考える。今回、報告例(Suzui M., et al., *Cancer Sci.*, 2016)を参考に、マウスへの胸腔内投与量を1/10および1/100の低用量に設定し、2年間の長期の被検物質暴露により悪性病変を誘発する。さらに、間質性肺炎治療薬であるpirfenidone(以下、PFD)(総称名:ピレスパ錠)の胸膜中皮腫抑制作用の可能性に注目している。PFDは、特発性間質性肺炎の線維芽細胞において、主にTGF- β 産生を抑制することにより、線維化の進行を抑制するとされている。中皮腫においても同様のTGF- β を介した機序で線維化が起こるとされている。既報(Chang Li et al., *Sci Rep.*, 2018)では、ヒト中皮腫細胞株において、PFD投与によりTGF- β および細胞増殖の抑制が確認された。我々の胸膜肥厚モデルは、12週後に全例に線維芽細胞と中皮細胞の増生を示すため、本モデルを用いることでPFDの胸膜肥厚抑制効果の有無について明らかにできる。

2. 研究の目的

動物実験における胸膜悪性中皮腫の発症率の低さから、モデルとしては未だに確立されていないが、本研究は世界初の胸膜悪性中皮腫モデルを目指すものである。独自に開発した胸腔内投与方法を用いることが本研究の独自性であり、これまでの研究では得られなかった胸膜悪性中皮腫の高率発症を目的とする。悪性病変発生を目的としたその他の方法としては、p53ノックアウトマウスの使用(Johnsma J et al., *Cancer Cell.*, 2008)が挙げられる。しかし、ヒトの胸膜悪性中皮腫発症において、p53の変異の頻度は低いとされている。できるだけヒトに近いモデルを確立するため、野生型動物を用いて針状粒子投与のみでの悪性中皮腫の高率発生を目指す。このモデルは、ヒトでの中皮腫発生メカニズム解明と治療法の開発に重要となる。

これまで検討を重ねてきた針状粒子のTISMOを用いて、AJ雌性マウスにおける胸膜悪性中皮腫の高確率での発症を目的とする(実験1)。本研究で悪性の胸膜中皮腫が得られなかった場合にも、これまでにcrocidoliteとTISMOの胸膜肥厚所見を比較した研究はなく、胸膜プラークを詳細に調べることで、中皮腫の悪性化メカニズムについて明らかにできる。さらに、独自に開発・確立した胸膜肥厚モデルを用いて、PFDの胸膜肥厚抑制効果を明らかにする(実験2)。

3. 研究の方法

(図1参照)

実験1: 7週齢のA/Jマウス(雌性)を用い、TISMOを0.3mgおよび0.03mgの用量(前回実験の1/10および1/100の用量)で胸腔内投与する。A/J雌性マウスを用いる理由としては、肺腫瘍の好発系であることと、これまで当教室で飼育や実験の経験が蓄積されていることである。実験期間は1年および2年を予定しているが、1回/月の体重測定時に、極端な体重減少や瀕死例が多発した場合にはその時点で剖検を行い胸膜を観察する。

実験2: 7週齢のA/Jマウス(雌性)を用い、TISMOを0.3mgおよび0.03mgの用量で実験開始時に胸腔内投与する。PFDのlow dose群はヒトの常用量相当の144ppmを、high dose群はlow dose群の10倍の1440ppmを混餌投与する(基礎食はOriental MF)。12週後に屠殺剖検し、肺、肝、腎を摘出し、病理組織学的解析を行い胸膜肥厚の抑制効果を検索する。

4. 研究成果

実験1(A/J雌性マウスによる胸膜悪性中皮腫発症実験)

83 週目に Group1 (0.3mg TISMO) 8 匹、Group2 (0.03mg TISMO) 5 匹、Group3 (Saline) 5 匹、Group4 (無処置) 5 匹の剖検を、98 週目に Group2 (0.03mg TISMO) 7 匹、Group3 (Saline) 6 匹、Group4 (無処置) 5 匹の剖検を行った。83 週目および 93 週目とも体重、相対臓器重量に有意な差は認められなかった(表 1)。肺の肉眼像と病理組織像を図 2,3 に示す。肺のすべての葉より病理組織学標本作製し、HE 染色を行った。HE 標本はすべてスキャン (NanoZoomer S60、浜松ホトニクス) してデジタルデータ化した。肺胸膜肥厚部では投与した TISMO 粒子の沈着、炎症細胞浸潤、線維化を伴っていたが、明らかな異型を伴う中皮細胞の腫瘍性病変は確認できなかった。肺胸膜肥厚の病変はほぼすべての動物に認められた。マウスあたりの病変数は TISMO 投与群で有意に増加していたが、肥厚部の厚さと TISMO 投与量に有意な差は認められなかった(表 2)。肺増殖性病変は 83 週目および 98 週目で Hyperplasia から Bronchioalveolar adenocarcinoma まで認められたが、発生率に TISMO 投与による影響は認められなかった(表 3)。

実験 2 (PFD の胸膜肥厚抑制実験)

実験期間中のマウスの体重変化は PFD 摂取群と PFD 非摂取群で有意な差が認められた(図 4)。1 日あたりの PFD 摂取量は当初の予定通り PFD high dose 群 (G2) では PFD low dose 群 (G1) のおよそ 10 倍量の PFD が摂取されていた(表 4)。TISMO 投与後 12 週目の解剖時における臓器重量では PFD high dose 群 (G2) の肝臓相対重量が PFD 非摂取群 (G3) と比較して有意に増加していたが、PFD 投与量との相関性は認められず、また、肺および腎臓の相対重量に群間での有意な差は認められなかった(表 5)。肺の肉眼像と病理組織像を図 5 に示す。肺の肉眼像において、TISMO 投与群では実験開始時に胸腔内に注入した TISMO の付着を認めた。肺のすべての葉より病理組織学標本作製し、HE 染色を行った。HE 標本はすべてスキャン (NanoZoomer S60、浜松ホトニクス) してデジタルデータ化し、胸膜肥厚の病変数、厚さ、面積を測定した。マウスあたりの胸膜肥厚の平均病変数は G1 (TISMO+PFD 144ppm):15.2 個、G2 (TISMO+PFD 1440ppm):10.5 個、G3 (TISMO+PFD 0ppm):10.6 個、G4 (無処置):0.9 個であり、TISMO の投与により有意に病変数は増加したが、PFD 用量での差は認められなかった(表 6)。また胸膜肥厚の平均厚さについても TISMO 投与による増加が認められたが、PFD 用量相関性は認められなかった。胸膜肥厚のマウスあたりの平均面積は TISMO 投与により有意に増加し、144ppm PFD 投与により減少傾向 ($p=0.056$ vs G3, $p=0.070$ vs G4) が認められた(表 6)。以上の結果より、PFD の抗線維化作用が TISMO による胸膜肥厚の進展に影響している可能性が示唆された。

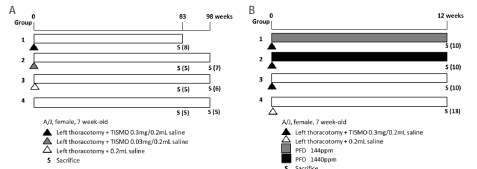


図1 実験デザイン (A)実験1: A/L雌性マウスによる胸膜悪性上皮腫発症実験. (B)実験2: PFDの胸膜肥厚初期実験

表1 TISMO投与後83および98週目のマウス体重と臓器重量

Group	Week	Treatment		No. of mice	Final body weight (mean ± S.D.)	Organ weight (mean ± S.D.)			
		TISMO (mg/mouse)	thoracotomy			Liver	Spleen	Kidney R	Kidney L
83	1	0.3	+	8	24.04 ± 3.23	0.80 ± 0.10	4.82 ± 0.40	0.63 ± 0.06	0.64 ± 0.04
	2	0.03	+	5	21.30 ± 3.90	1.02 ± 0.16	5.06 ± 0.46	0.72 ± 0.05	0.71 ± 0.05
	3	0	+	5	24.86 ± 1.29	0.81 ± 0.18	4.64 ± 0.29	0.63 ± 0.05	0.65 ± 0.04
	4	0	-	5	24.45 ± 1.69	0.84 ± 0.13	5.24 ± 1.06	0.67 ± 0.08	0.70 ± 0.11
98	2	0.03	+	7	27.54 ± 3.64	0.86 ± 0.09	4.61 ± 0.71	0.68 ± 0.07	0.66 ± 0.08
	3	0	+	6	26.30 ± 1.43	1.23 ± 0.46	4.74 ± 0.44	0.69 ± 0.04	0.67 ± 0.06
	4	0	-	5	25.71 ± 2.20	0.93 ± 0.27	5.24 ± 0.83	0.73 ± 0.06	0.74 ± 0.04

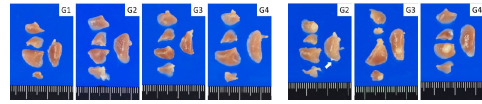


図2 肺肉眼像 (矢印: 胸腔内に注入したTISMOの付着をみる)

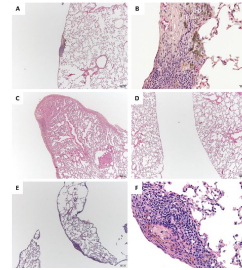


図3 肺の病理組織像 (A, B: 83週 Group1 (TISMO 0.3mg), C, D: 83週 Group2 (TISMO 0.03mg), E, F: 98週 Group2 (Saline), E, F 対物レンズ×10)

表2 TISMO投与後83および98週目の胸膜肥厚所見

Week	Group	Treatment		No. of mice	Pleural thickening		
		TISMO (mg/mouse)	thoracotomy		Incidence, %	No. of lesions /mouse (mean ± S.D.)	Absolute mm (mean ± S.D.)
83	1	0.3	+	8	100.0 (8/8)	19.1 ± 10.08 ^a	80.5 ± 26.0
	2	0.03	+	5	100.0 (5/5)	15.8 ± 12.4	103.3 ± 56.1 ^b
	3	0	+	5	40.0 (2/5)	0.8 ± 1.3	21.4 ± 32.9
	4	0	-	5	80.0 (4/5)	2.8 ± 2.6	59.4 ± 43.3
98	2	0.03	+	7	85.7 (7/7)	25.1 ± 8.9 ^c	74.9 ± 13.8
	3	0	+	6	100.0 (6/6)	7.5 ± 6.9	92.8 ± 22.2 ^d
	4	0	-	5	80.0 (4/5)	4.2 ± 4.4	45.1 ± 26.1

a: p<0.05 vs Group 3 and 4 (83 week) b: p<0.05 vs Group 3 (83 week)
c: p<0.05 vs Group 3 (98 week) d: p<0.05 vs Group 4 (98 week)

表3 TISMO投与後83および98週目の肺増殖性病変

Week	Group	Treatment		No. of mice	Lesion and/or hyperplasia (% of total)					
		TISMO (mg/mouse)	thoracotomy		Total	Hyperplasia	Bronchioles hyperplasia	Alveolar hyperplasia	Simple adenocarcinoma	Complex adenocarcinoma
83	1	0.3	+	8	62.5 (5/8)	0.81 ± 0.61	0.03 ± 0.06	0.17 ± 0.17	0.80 ± 0.80	4.13 ± 3.55
	2	0.03	+	5	100.0 (5/5)	1.63 ± 0.81	1.00 ± 1.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	4.80 ± 4.00
	3	0	+	5	100.0 (5/5)	3.00 ± 2.43	1.00 ± 1.00	0.40 ± 0.35	0.40 ± 0.40	4.80 ± 4.00
	4	0	-	5	100.0 (5/5)	1.63 ± 0.77	0.60 ± 0.30	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	4.80 ± 4.00
98	2	0.03	+	7	100.0 (7/7)	2.57 ± 1.88	1.43 ± 1.42	0.86 ± 0.89	0.86 ± 0.89	4.76 ± 4.09
	3	0	+	6	100.0 (6/6)	3.57 ± 1.68	2.00 ± 1.26	0.87 ± 0.82	0.87 ± 0.82	4.50 ± 4.50
	4	0	-	5	100.0 (5/5)	2.50 ± 0.64	2.20 ± 1.30	0.40 ± 0.35	0.40 ± 0.35	4.80 ± 4.00

a: p<0.05 vs Group 3 and 4 (83 week) b: p<0.05 vs Group 3 (83 week)
c: p<0.05 vs Group 3 (98 week) d: p<0.05 vs Group 4 (98 week)

表4 1日あたりのPFD摂取量

Week	G1	G2
1	0.40	3.69
2	0.77	8.29
3	0.92	8.54
5	0.60	5.94
6	0.75	6.19
7	0.70	6.74
8	0.68	6.74
9	0.58	6.06
10	0.59	6.40
11	0.55	5.60
12	0.67	6.40

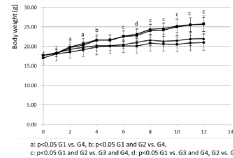


図4 実験期間中のマウス体重推移

表5 TISMO投与後12週目のマウス体重と臓器重量

Group	Week	TISMO (mg/mouse)	thoracotomy	No. of mice	Final body weight (mean ± S.D.)	Organ weight (mean ± S.D.)			
						Liver	Spleen	Kidney R	Kidney L
83	1	0.3	+	8	24.84 ± 1.84 ^a	0.71 ± 0.12	4.73 ± 0.26	0.67 ± 0.09	0.71 ± 0.02
	2	0.03	+	5	25.72 ± 1.80 ^b	0.82 ± 0.24	5.00 ± 0.60 ^c	0.67 ± 0.07	0.72 ± 0.02
	3	0	+	5	25.75 ± 1.40 ^b	0.81 ± 0.32	4.95 ± 0.38	0.65 ± 0.01	0.72 ± 0.04
	4	0	-	5	25.12 ± 2.11	0.93 ± 0.49	5.71 ± 0.29	0.68 ± 0.02	0.72 ± 0.08

^ap<0.05 compared with G2

^bp<0.05 compared with G3

^cp<0.05 compared with G3

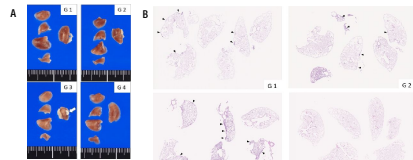


図5 肺の病理学的所見 (A) 肉眼像 (矢印: 胸腔内に注入したTISMOの付着をみる) (B) H&E染色像 (矢頭: 増殖性病変)

表6 TISMO投与後12週目の胸膜肥厚所見

Group	Week	Treatment		No. of mice	Pleural thickening		
		TISMO (mg/mouse)	thoracotomy		Incidence, %	Absolute mm (mean ± S.D.)	Area mm ² (mean ± S.D.)
83	1	0.3	+	10	100.0 (10/10)	15.2 ± 4.0 ^a	17743.8 ± 6545.6
	2	0.03	+	10	100.0 (10/10)	10.5 ± 6.5 ^b	59.5 ± 15.1 ^b
98	3	0	+	10	100.0 (10/10)	10.6 ± 4.0 ^b	67.9 ± 19.5 ^b
	4	0	-	13	61.5 (8/13)	0.9 ± 0.9	30.6 ± 27.6

^ap<0.0001, ^bp<0.05, ^cp<0.0001 vs G4

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------