

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07735

研究課題名(和文)患者由来肝細胞癌を肝移植した肝ラットPDXモデルでのオーダーメイド治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of order-made treatment using liver tumor PDX rad model which were implanted patient-derived HCC

研究代表者

影山 健 (Kageyama, Ken)

大阪公立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：70791862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト腫瘍異種移植動物(PDX)モデルは、患者から切除した腫瘍を直接免疫不全動物に移植し、癌治療スクリーニングプラットフォームである。実際の患者腫瘍を用いて、経カテーテル的に動脈内投与可能なラット上でPDXモデルを確立し、癌治療における経動脈治療の有効性を評価する。2つの研究を行う。手術で摘出された患者由来の肝細胞癌(HCC)組織を直接免疫不全ラットの肝臓に同所性移植した肝細胞癌PDXモデルを作成する。このHCC-PDXモデルで、患者個人に代わって、肝動注療法や肝動脈塞栓術といったIVR治療(インターベンショナルラジオロジー：画像下低侵襲治療)や分子標的薬投与を実施し、効果的な治療を探索する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究により、患者それぞれの肝細胞癌治療に、最良の治療法を還元でき、患者個人に特化したオーダーメイド治療の実践を可能とする。

研究成果の概要(英文)：Patient-derived tumor xenograft (PDX) model is a cancer therapy screening platform in which tumors removed from patients are transplanted directly into immunocompromised animals. PDX model will be established on rats capable of transcatheter intra-arterial administration to evaluate the efficacy of transarterial therapy in cancer treatment. (1) To create a PDX model of hepatocellular carcinoma (HCC) in which patient-derived hepatocellular carcinoma (HCC) tissue removed by surgery is directly transplanted orthotopically into the liver of immunocompromised rats. (2) To use this HCC-PDX model to replace individual patients in the treatment of HCC with IVR (interventional radiology) such as hepatic arterial injection and hepatic arterial embolization. (2) The HCC-PDX model will be used to explore effective treatments by administering IVR and molecular targeted drugs on behalf of individual patients.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：PDXモデル

キーワード：PDX 肝細胞癌

## 1. 研究開始当初の背景

従来、抗癌剤開発において、培養皿で飼育されたヒト癌細胞株で、抗癌剤の抗腫瘍効果判定試験が行われてきた。しかし、抗癌剤スクリーニング検査では、培養皿で効果が認められても、ヒト臨床試験では効果が見られないことが多い。新規に開発された抗癌剤のうち、およそ 80%の薬剤が、ヒト臨床試験の段階で、抗腫瘍効果がないと判定される。この主な理由は、継代された細胞株は変性により、本来の癌の性質(組織形態、遺伝子、蛋白)や薬剤感受性において実際の腫瘍と異なっている。同一の癌腫でも個人間で腫瘍の性質は異なっていることも、効果に乖離を生む要因である。近年、ヒト腫瘍異種移植(Patient-Derived tumor Xenograft: PDX)動物モデルで、抗癌剤の効果判定をする動きが高まっている。PDX モデルとは、手術や生検で摘出された患者腫瘍を、直接免疫不全動物に移植したモデルを指す。患者内に存在した腫瘍の性質を、PDX モデル内でそのまま再現できる。PDX モデルは、患者に代わり、前もって癌治療を動物上で行うことができる、世界で期待されている癌治療スクリーニング法である。ただし、ほとんどの PDX モデルは、マウス皮下に異所性に腫瘍移植したモデルである。皮下移植モデルは、腫瘍生着率が極めて悪く、時間を要し、オーダーメイド治療への障壁となっている。皮下ではなく、本来腫瘍が存在する同所性に移植した PDX モデルでは、抗癌剤の効果は臨床と同等の効果を示す。

肝細胞癌(HCC)治療の第一選択は手術や局所穿刺治療である。これらの治療が不能となった場合、HCC には IVR(インターベンショナルラジオロジー:画像下治療)領域の肝動脈化学塞栓術(TACE)や分子標的薬のソラフェニブやレンバチニブが予後延長に寄与する。肝機能が低下した患者においては、TACE や分子標的薬の適応に限界がある。その点で肝動脈動注療法(TAI)も HCC 治療の重要な選択肢の一つになる。しかし TAI は腫瘍抑制効果があるものの、十分な生存期間延長を示した報告はない。その一つの理由に、感受性のある抗癌剤の選択ができず、奏効率が低いことが考えられる。感受性のある抗癌剤があらかじめ把握できれば、動注療法により HCC の制御が可能となり、ひいては患者の予後延長に寄与できる。

マウスより体格の大きいラットは、IVR 治療で使われるカテーテルでの血管内治療が可能である。2018 年に供給可能となった重症免疫不全ラットを用いれば、肝 PDX ラットモデルが確立でき、IVR 治療開発推進の有効なモデルとなる。このラットモデルを用いて、IVR 治療および分子標的薬での治療効果判定試験を実施する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、凍結保存した患者由来原発 HCC を用いて、動脈内投与可能なラット上で PDX モデルを確立し、HCC における TACE・TAI・分子標的薬の有効性を比較検討することである。段階的に 2 つの研究を行う。実験 1:手術で摘出された患者由来の原発 HCC 組織を、一時凍結保存の過程を経て、免疫不全ラットの肝臓に移植して、同所性肝 PDX モデルを作成する。実験 2:肝 PDX モデルで、患者個人に代わって、IVR 治療や分子標的薬投与を実施し、効果的な治療を探索する。

## 3. 研究の方法

【実験計画】動物は免疫不全ラットを使用する。組織は手術で得た患者原発 HCC 組織 20 例を使用する。摘出した患者腫瘍を凍結保存液に入れて、1 週間程、液体窒素タンクで保存する。下記の通り、実験を実施する。

【腫瘍移植】腫瘍移植は、麻酔下でラット腹部を開腹して、肝臓左葉に切開を入れる。切開部を入口とした肝臓ポケットを作成し、凍結保存から解凍した 1mm 角腫瘍をポケット内に移植する。移植後止血剤で切開部を覆い、止血とともに、切開部を閉じる。先行研究で開発した術式 Liver pocket method を用いる。

【造影 CT での腫瘍検出】ラット正常肝臓が高濃度に造影効果を示す造影剤を用いて、低濃度として描出される肝臓腫瘍の検出を図る。移植 4 週後に CT を撮像し、腫瘍の有無と腫瘍サイズを測定する。既に予備実験で CT 撮像技術を習得している。

【HCC 治療効果判定試験】移植 4 週後、造影 CT で最大径 3mm 以上の腫瘍が確認されたラットを 7 種の群に割り付ける。移植 4 週後に下記のとおり治療を実施する。全例、移植 8 週後に屠殺する。腫瘍増大・縮小の経過は、将来多発肝内再発を来した患者治療に適応可能な技術や情報となりえる。

コントロール群 TACE(エンボスフィア 40um)群 TAI(シスプラチン 2 mg/kg)群

TAI(ドキシソルピシン 1.5 mg/kg)群 TAI(5-FU 5 mg/kg)群 分子標的薬(レンパチニブ 0.2mg/kg)群 TACE+分子標的薬併用群

【IVR 治療】ラット大腿動脈から 1.6Fr カテーテルを肝動脈まで挿入し、それぞれ動注や塞栓を実施する。既に予備実験でカテーテル操作を習得した。

【組織検査】患者と実験の腫瘍標本は、組織免疫染色(Ki67・CD31・CD14)、逆相蛋白アレイ(RPPA)解析(チロシンキナーゼカスケード等の活性化評価)を行い、細胞増殖能を評価する。屠殺時には各群標本の腫瘍サイズを測定する。

#### 4. 研究成果

(1) 実験 1。冒頭で述べた通り、現在実験 1 を終了した段階である。HCC 組織をラットの肝臓に移植して、大部分のラットで腫瘍の生着に成功した。患者腫瘍 10 例の癌組織検体を重症免疫不全ラットに各 3 匹ずつ計 30 匹に移植したところ、20%の確率で腫瘍の生着を得られた。生着が上手くいった症例と上手くいかなかった症例について解析したところ、患者癌の悪性度との関連が見られることがわかった。免疫不全ラットの肝臓に患者由来腫瘍を生着した試みが初めてである。これらの成果については、学会・論文等での発表を予定している。

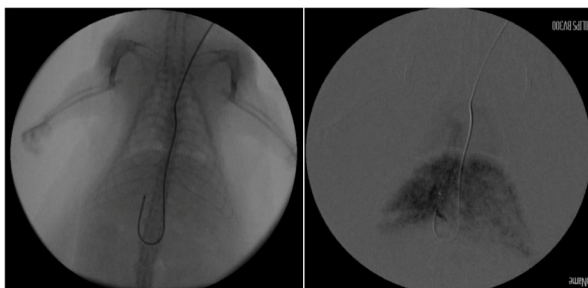
(2) 実験 2。実験 2 の IVR 治療による抗腫瘍効果の判定は、現在実験中である。暫定的なデータであるが、肝動脈塞栓試験を実施した。コントロール群と肝動脈塞栓群と各 5 匹ずつ割付を行った。それぞれ移植 4 週後に造影 CT を施行して、腫瘍の生着を確認して、治療を行った。治療後の 4 週間、すなわち移植から 8 週後に治療後の評価 CT を撮影した。コントロール群は治療前 CT で腫瘍体積平均 9.56mm<sup>3</sup> で、治療後 CT では腫瘍体積平均 189.49 mm<sup>3</sup> と 19.8 倍の増大が見られた。肝動脈塞栓群は治療前 CT で腫瘍体積平均 9.20 mm<sup>3</sup> で、治療後 CT では腫瘍体積平均 28.42 mm<sup>3</sup> と 3.0 倍の増大が見られた。以上の通り、肝動脈塞栓は腫瘍制御能を有することが示唆された。今後も各実験群の試験を実施していく予定である。

(3) 考察。現在、実験は途中の段階である。現時点までの成果について考察する。患者由来の HCC 腫瘍の生着確認実験を行なった。患者から手術によって摘出した腫瘍を直接移植するのではなく、一旦凍結保存という過程を経て、移植を行なった。我々は先行実験で原発肝癌の肝臓移植モデルの作成に成功(DOI: 10.1038/s41598-024-61142-y)したが、HCC の生着は先行実験と比較すると極めて悪い結果になっている。生着した腫瘍と生着しなかった腫瘍には病理学的にどのような違いがあるかは今後の検討課題である。

HCC 腫瘍生着できた症例において、経カテーテル的に肝動脈塞栓肝動脈塞栓治療群はコントロール群と比較して有意に腫瘍増大の抑制が見られた。病理学的にも、ヘマトキシリンエオジン染色で、動脈塞栓による壊死を確認した。抗癌剤の追加で、さらなる腫瘍縮小効果が得られたかもしれない。その点では、さらなる検討が必要である。

しかし、PDX モデル上で抗癌剤効果判定を行えた点では極めて意義が大きいと考える。患者にとっては、一生に一度の抗癌剤治療であり、患者自身に代わり、ラットが代替えとなり、抗癌剤効果判定試験を実施できたことは、オーダーメイド治療を推進する役割となる。抗癌剤効果判定の精度を高めるためには、患者の腫瘍から多数の腫瘍移植ラットを用意して、判定試験を行うほうが良いと考える。しかし、患者から摘出された腫瘍に限りがある場合、同じ治療法を何匹にも試すより、多数の治療法、多数の抗癌剤で効果判定試験をする方が、患者が享受する利益は大きいと考える。

以上、実験途中での報告であるが、引き続き実験を継続し、患者由来腫瘍を用いての抗癌剤効果判定を実施し、オーダーメイド治療の確立を図っていく。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 EGUCHI SHIMPEI, KIMURA KENJIRO, KAGEYAMA KEN, TANI NAOKI, TANAKA RYOTA, NISHIO KOHEI, SHINKAWA HIROJI, OHIRA GO, AMANO RYOSUKE, TANAKA SHOGO, YAMAMOTO AKIRA, TAKEMURA SHIGEKAZU, YASHIRO MASAKAZU, KUBO SHOJI	4. 巻 42
2. 論文標題 Optimal Organ for Patient-derived Xenograft Model in Pancreatic Cancer and Microenvironment that Contributes to Success	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2395 ~ 2404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.15718	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------	---------