

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591908

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治療実験

研究課題名(英文) Pancreatic cancer model with in vivo imaging and therapeutic trial

研究代表者

内田 英二 (UCHIDA, EIJI)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70176684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ハムスター膵癌細胞株PGHAM-1にルシフェラーゼ遺伝子を導入したPGHAM-1/Luc細胞を用いて、各種膵癌実験モデルを作成し、その進展・転移経過のIVIS systemによるin vivo imagingを試みた。また、同細胞に対するgemcitabineの効果を、in vitroおよびin vivoで検討した。Gemcitabineの抑制効果はin vitroで見られ、癌の進展・転移はIVIS systemによりin vivo imagingとして捉えられたが、その効果の定量化には至らなかった。今後より安定したin vivo imaging定量化システムの確立およびその応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We established several pancreatic cancer models using hamster pancreatic cancer cell line, PGHAM-1. PGHAM-1 cells with luciferase activity transduced by viral vectors (PGHAM-1-Luc) were used for in vivo imaging of cancer proliferation and metastasis using IVIS system by measuring the bioluminescent signals. Using this system, the effect of gemcitabine on pancreatic cancer model was investigated in vitro and in vivo. Anti-tumor effect of gemcitabine was found in vitro but not in vivo by using IVIS system quantitative analysis. This cancer model is suitable for detecting the new therapeutic agents, although improved in vivo imaging system and its application are needed in the near future.

研究分野：医歯薬学

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 治療実験

1. 研究開始当初の背景

膵癌は予後不良で、診断治療に難渋している。膵癌の治療戦略確立には、その生物学的特性の検討、治療法の開発のための優れた実験モデルが必要である。われわれは、ヒト膵癌に酷似するハムスター膵発癌を進展させ、短期間で原発腫瘍、肝転移、腹膜播種を発生させるモデルを検討してきた。実験モデルを用いて、化学療法剤、分子標的物質、免疫療法剤などによる種々の治療実験を可能とし、臨床応用への糸口が求められている。しかも動物愛護の点から、屠殺剖検することなく、リアルタイムに経時的に観察できる実験モデルが望まれている。

2. 研究の目的

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による膵癌実験モデルを開発し、同細胞を用いた IVIS system イメージ実験モデルおよび派生する膵癌モデルにおいて膵癌の特性解明や効果的な治療法を実験的に検討できるシステムを構築し、応用することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ハムスター膵癌細胞株(PGHAM-1)による膵癌実験各モデルの作成

当施設で BOP 発癌モデルより PGHAM-1 細胞株の同種移植により下記の3つの実験モデルの確立。

同種膵内移植による原発巣、肝転移、(腹膜播種)モデル

同種脾内移植による肝転移モデル

同種腹腔内移植による腹膜播種モデル

(2) PGHAM-1 細胞にルシフェラーゼ遺伝子の導入による PGHAM-1/Luc 細胞の作成

当初 PGHAM-1 細胞へのルシフェラーゼ遺伝子の導入は AAV ベクターおよびレンチウイルスベクターにてルシフェラーゼ遺伝子を導入し、PGHAM-1/Luc を作成し、実験に供した。

(3) IVIS システムによる移植モデルの経時的生体観察

同種膵内移植モデルを用い、移植後の経過観察をルシフェリン投与と IVIS system(Xenogen)にて、麻酔下に生体観察を行い、発光強度と腫瘍・転移の発育経過を比較検討した。

(4) Gemcitabine による治療実験

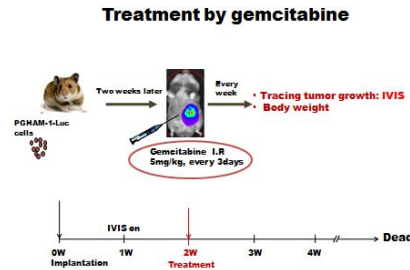
in vitro における gemcitabine の PGHAM-1 に及ぼす効果

PGHAM-1 細胞培養液中に gemcitabine を添加し、増殖および apoptosis に及ぼす効果を検討した。

in vivo における gemcitabine の PGHAM-1/Luc 細胞に及ぼす効果の生体観察
膵内移植モデルを用い、移植 2 週間後から

gemcitabine 5mg/kg を投与し、IVIS system により、経過を生体観察した。(図1)

図1 Gemcitabine による治療実験



(5) Gemcitabine 投与による有害事象の検討
主に体重測定、一部採血による検討。

4. 研究成果

(1) ハムスター膵癌細胞株(PGHAM-1)による膵癌実験各モデルの作成

当施設で BOP 発癌モデルより作成した PGHAM-1 細胞の同種移植により下記の3つの実験モデルが確立された。

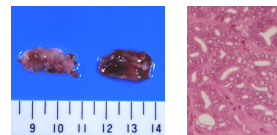
同種膵内移植による原発巣(図2)、肝転移、(腹膜播種)モデル

同種脾内移植による肝転移モデル

同種腹腔内移植による腹膜播種モデル

それぞれ各 20~80%の頻度で癌の発生が認められた。

図2: 膵原発巣とその組織像



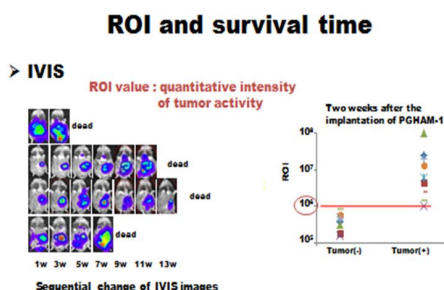
(2) PGHAM-1 細胞にルシフェラーゼ遺伝子の導入による PGHAM-1/Luc 細胞の作成

当初 PGHAM-1 細胞へのルシフェラーゼ遺伝子の導入は AAV ベクターを用いていたが、同細胞の継代によって移植成功率、転移能の低下が見られた。このため、あらためてレンチウイルスベクターにてルシフェラーゼ遺伝子を導入し、PGHAM-1/Luc を作成し、実験に供した。

(3) IVIS システムによる移植モデルの経時的生体観察

PGHAM-1/Luc 細胞 5×10^6 個を膵脾葉に移植後の腫瘍の状態を IVIS システムで経時的検討したものを図3に示す。ROI の強度と腫瘍の存在(ROI 1×10^6 以上)・大きさおよび生存が反映されている。しかし、正確な腫瘍径は ROI では測定不可能で存在の有無は判断できたが、詳細な状況については今回の生体観察では判断は難しかった。しかし、腹部に腫瘍を触知する以前より、腫瘍の存在が確認されることもあった。(図3)

図3：ROI と腫瘍の大きさおよび生存



(4) Gemcitabine による治療実験

in vitro における gemcitabine の PGHAM-1 に及ぼす効果 (図 4,5)

Gemcitabine 3ng/ml より増殖が抑制された。

Tunnel 法によるアポトーシスの検討では gemcitabine 3.0mg/ml で 23%が誘導された。

図4 Gemcitabine による増殖抑制効果

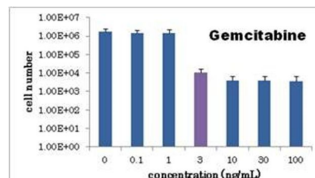
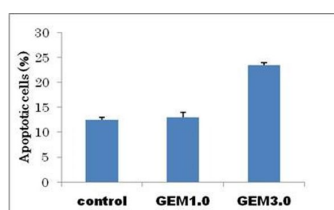


図5 Gemcitabine による apoptosis 誘導



in vivo における gemcitabine の PGHAM-1/Luc 細胞に及ぼす効果

Gemcitabine 投与群の腫瘍移植群の平均生存期間は 8.75 週間で、非投与群の 8.5 週間に比べ、やや延長したが有意の差はえられなかった。生体観察における ROI による治療効果判定は大きさの正確な測定が困難であり、不可であった。

(5) 有害事象

Gemcitabine 投与中にハムスターに特に異常は見られず、問題となる顕著な有害事象はなかった。但し、体重の増加は抑制されていたが、癌の増大によるもので明らかに gemcitabine によるとは考えられなかった。

(6) 得られた成果の国内外の位置づけとインパクト

今回の研究では、PGHAM-1/Luc 細胞の安定性およびその生体観察の実現性が問題となったが、PGHAM-1 細胞系はヒト膵癌と生物学的特性が類似する上に、gemcitabine による抑制効果を予想させる結果をも得ることができた。現時点で明らかに有用な膵癌実験モデルが存在しないため、本モデルは極めて有用と考えられた。また、PGHAM-1/Luc 細胞に

よって、その効果を生体観察することの可能性が示唆された。

(7) 今後の展望

今後、ハムスター膵癌細胞株に対する gemcitabine と他の抗癌剤の併用での in vitro における増殖抑制・アポトーシス誘導の相乗効果を検討する予定である。さらに、実験膵癌モデル (in vivo) における gemcitabine を中心とした多剤併用療法による腫瘍抑制効果、転移抑制効果、そして相乗効果なども検討する。

膵癌は現時点で最も難治性の高い癌と考えられ、様々な新しい診断・治療アプローチが求められる。しかし、症例数は限られており、実験的アプローチが必須となり、今後本モデルを用いた治療実験が重要となると考えられた。そのためにも、より安定したルシフェラーゼ遺伝子を導入した PGHAM-1/Luc 細胞および、その生体観察・定量方法の改善が望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

(雑誌論文)(計 20 件)

Yamagishi A, Matsumoto S, Uchida E (13 人, 13 番目): Gene profiling and bioinformatics analyses reveal time course differential gene expression in surgically resected colorectal tissues. *Oncol Rep* 査読有 31, 2014, 1531-1538.

Kawano Y, Ishikawa N, Uchida E (13 人, 10 番目): Q-FISH measurement of hepatocyte telomere lengths in donor liver and graft after pediatric living-donor liver transplantation: Donor age affects telomere length sustainably. *PLoS One* 査読有 9, 2014, e93749.

Shinozuka E, Miyashita M, Uchida E (11 人, 10 番目): SnoN/SKIL modulates proliferation through control of has-miR-720 transcription in esophageal cancer cells. *BBRC* 査読有, 430, 2013, 101-106.

Matsuda A, Kishi T, Uchida E (7 人, 7 番目): The effect of intraoperative rectal washout on local recurrence after rectal cancer surgery: Meta-Analysis. *Ann Surg Oncol* 査読有 20, 2013, 856-863.

Matsutani T, Matsuda A, Uchida E (7 人, 7 番目): Resection of skeletal muscle metastases from squamous cell carcinoma of the esophagus: case report and literature review. *Esophagus* 査読有 10, 2013, 42-45.

Iwaki J, Kikuchi K, Uchida E (6 人, 5 番目): MiR-376c down-regulation accelerates EGF-dependent migration by targeting GRB2 in the HuCCT1 human intrahepatic cholangiocarcinoma cell line *PLoS One* 査読有 8, 2013, e69496

Matsushita A, Nakamura Y, Uchida E (6 人,

6 番目) : A pilot study-neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine and S1 in patients with resectable and borderline resectable pancreatic cancer. J Carcinogene Mutagene 査読有 2013, S9.
Nakamura K, Matsushita A, Uchida E(6 人、6 番目) Laparoscopic pancreaticoduodenectomy:our reliable techniques as a standardized operation J Carcinogene Mutagene 査読有 2013, S6.
Matsuda A, Matsumoto S, Uchida E (8 人、8 番目) Does postoperative complication have a negative impact on long-term outcomes following hepatic resection for colorectal liver metastasis?: A meta analysis. Surg Oncol 査読有 20, 2013, 2485-2492
Bou H, Suzuki H, Uchida E (6 人、6 番目): Estimation physiologic ability and surgical stress scoring system appraises laparoscopy-assisted and open distal gastrectomy in treatment of early gastric cancer. J Cancer Therapy 査読有 4, 2013, 1-5.
Matsuda A, Miyashita M, Uchida E (9 人、9 番目) Hepatic pedicle clamping does not worsen survival after hepatic resection for colorectal liver metastasis: Results form a systematic revies and meta-analysis. Ann Surg Oncol 査読有 20, 2013, 3771-3778.
Ueda J, Yoshida H, Uchida E (10 人、10 番目) Surgical resection of solitary metastatic liver tumor arising from lung cancer: A case series. Hepato-Gastroenterol 査読有 59, 2012, Ahead of print
Matsuda A, Jacob A, Uchida E (9 人、8 番目) Novel Therapeutic Targets for Sepsis: Regulation of Exaggerated Inflammatory Responses. J Nippon Med Sch 査読有 79, 2012,4-18.
Tsuboko Y, Takeda S, Uchida E (7 人、6 番目) Clinical evaluation of sivelestat for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome following surgery for abdominal sepsis. Drug Design Develop Ther 査読有 6, 2012,273-278
Nakamura Y, Matsumoto S, Uchida E (6 人、6 番目)Successful Laparoscopic Pancreaticoduodenectomy for Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm: A Case Report and a Reliable Technique for Pancreaticojejunostomy. J Nippon Med Sch 査読有 79, 2012,218-222.
Sasaki J, Matsumoto S, Uchida E (10 人、10 番目) Objective Assessment of Postoperative Gastrointestinal Motility in Elective Colonic Resection Using a Radiopaque Marker Provides an Evidence for the Abandonment of Preoperative Mechanical Bowel Preparation. J Nippon Med Sch 査読有 79, 2012, 259-266.

山初和也、松田陽子、内田英二 (11 名、11 番目) 新たな分子標的治療としての Nestin による膵癌の腫瘍新生血管増殖抑制. 査読無 癌の臨床 58, 2012, 355-360
Yamahatsu K, Matsuda Y, Uchida E (5 人、4 番目) Nestin as a novel therapeutic target for pancreatic cancer via tumor angiogenesis. Int J Oncol 査読有 40, 2012,512-523.
Aimoto T, Uchida E, Nakamura Y (8 人、2 番目): Current Surgical Treatment for Chronic Pancreatitis. J Nippon Med Sch 査読有 78, 2011, 352-359.
Katsuno A, Aimoto T, Uchida E, Tabata Y, Miyamoto M, Tajiri T: The controlled release of basic fibroblast growth factor promotes a rapid healing of pancreaticojejunal anastomosis with potent angiogenesis and accelerates apoptosis in granulation tissue. J Surg Res 査読有 167, 2011, 166-172.

[学会発表](計 27 件)

内田英二 : 長鎖 non-coding RNA H19 の膵癌における発現とその意義についての検討、日本膵臓学会大会(第 44 回)、2013 年 7 月、仙台
内田英二 : 膵癌に対する術前化学療法としての GS 療法の意義と問題点、日本膵臓学会大会(第 44 回)、2013 年 7 月、仙台
内田英二 : 膵癌における繊維芽細胞増殖因子受容体(FGFR-2)発現制御機構と治療応用の検討、日本膵臓学会大会(第 44 回)、2013 年 7 月、仙台
内田英二 : 膵癌における epithelial splicing regulatory protein1(ESRP1)の発現の検討、日本膵臓学会大会(第 44 回)、2012 年 6 月、山形
内田英二 : 膵癌に対する左方アプローチ膵頭十二指腸切除術、日本臨床外科学会総会(第 74 回)、2012 年 12 月、東京
内田英二 : 膵癌に対する左方アプローチ膵頭十二指腸切除術、日本消化器外科学会大会(第 10 回)、2012 年 10 月、神戸
内田英二 : 膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)由来浸潤癌に対する治療戦略、日本消化器外科学会総会(第 67 回)、2012 年 7 月、富山
Uchida E : Left posterior approach for pancreaticoduodenectomy for pancreatic head cancer, 44th meeting of the European Pancreatic Club, 2012.6, Prague, Czech
内田英二 : 切除可能膵癌に対する Gemcitabine を用いた術前化学療法、日本肝胆膵外科学会・学術集会(第 24 回)、2012 年 5 月、大阪
内田英二 : 膵頭十二指腸切除術に対する行程別教育プログラムの実際と成果、日

本外科学会(第 112 回)、2012 年 4 月、千葉

Uchida E : Hamster pancreatic cancer model for research on metastasis and its in vivo imaging, 米国膵臓学会国際膵臓学会合同大会、2012 年 11 月、米国、マイアミ市

内田英二 : 当科における膵頭十二指腸切除術に対する教育プログラム、日本消化器外科学会大会(第 9 回)、2011 年 11 月、福岡

内田英二 : グループ膵癌、日本癌学会学術総会(第 70 回)、2011 年 10 月、名古屋

内田英二 : 切除可能膵癌に対する術前化学療法、日本癌治療学会学術集会(第 49 回)、2011 年 10 月、名古屋

内田英二 : 膵頭十二指腸切除術後の膵液瘻に対するドレーン管理、日本消化器外科学会総会(第 66 回)、2011 年 7 月、名古屋

内田英二 : 切除可能膵癌に対する gemcitabine を用いた術前化学療法、日本膵臓学会大会(第 42 回)、2011 年 7 月、青森

内田英二 : Neuropilin-1 を標的とした新たな膵癌治療法の開発、日本膵臓学会大会(第 42 回)、2011 年 7 月、青森

内田英二 : 腫瘍新生血管マーカー Nestin に対する膵癌分子標的治療戦略、日本膵臓学会大会(第 42 回)、2011 年 7 月、青森

内田英二 : 浸潤性膵管癌組織における epithelial splicing regulatory protein1 の発現の検討、日本膵臓学会大会(第 42 回)、2011 年 7 月、青森

内田英二 : 膵癌幹細胞における nestin の発現と役割の検討、日本膵臓学会大会(第 42 回)、2011 年 7 月、青森

21 内田英二 : 切除可能膵癌に対する術前化学療法、日本膵臓学会大会(第 42 回)、2011 年 7 月、青森

22 内田英二 : ESRP1 による FGFR2 の選択的スプライシングの膵癌における役割、日本膵臓学会大会(第 42 回)、2011 年 7 月、青森

23 内田英二 : 膵癌の新規分子標的としての線維芽細胞増殖因子受容体 2(FGFR2)、日本膵臓学会大会(第 42 回)、2011 年 7 月、青森

24 内田英二 : 膵癌血管内皮細胞における Nestin の発現と役割、日本膵臓学会大会(第 42 回)、2011 年 7 月、青森

25 Uchida E : Efficacy of a fluted drain with continuous suction on pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy. 43rd meeting of the European Pancreatic Club, 2011.6, Magdeburg, Germany

26 内田英二 : PD 術後膵液瘻に対するドレ

ーン管理 : 基礎的実験と臨床例の検討、日本肝胆膵外科学会・学術集会(第 23 回)、2011 年 6 月、東京

27 Uchida E : Hamster pancreatic cancer model for research on metastasis and its in vivo imaging, 米国膵臓学会、2011 年 11 月、米国、シカゴ市

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

内田 英二 (UCHIDA EIJI)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号 : 70176684