

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06809

研究課題名(和文)免疫不全ブタを用いた癌治療実験モデルの開発と応用

研究課題名(英文)Development of xenograft model for cancer treatment with immunodeficient pigs

研究代表者

板野 理 (Itano, Osamu)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：90265827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生後4-6週の免疫不全ブタの肝実質内にヒト肝細胞癌株HepG2を超音波ガイド下で局注し、ヒト肝細胞癌ゼノグラフトモデルの作製に成功した。超音波検査で腫瘍の生着を確認した後に、血管造影検査および造影CT検査を施行し、早期濃染、washoutといったヒト肝細胞に矛盾しない画像所見が得られた。また病理学的に中-低分化型肝細胞癌に矛盾しない所見が得られた。今後は本モデルを使用した治療実験を行うことで、ヒト肝細胞癌に対する新たな治療モダリティの開発や、現存治療の有用性評価などへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We succeeded the development of xenograft model of hepatocellular carcinoma (HCC) by ultrasonography(US)-guided implantation of human HCC cell line "hepG2" into the liver parenchyma of immunodeficient pigs. We demonstrated angiography and contrast CT scan after confirming the engraftment of tumor by US and early enhancement and washout were observed, which was compatible with human HCC. Furthermore, the engrafted tumor was pathologically compatible with poorly to moderately differentiated HCC. This model can be applied to development of novel treatment modality for human HCC or evaluation of efficacy of current treatments.

研究分野：外科学

キーワード：肝細胞癌 免疫不全ブタ ゼノグラフトモデル

### 1. 研究開始当初の背景

現在の癌治療の目覚ましい進歩は、動物モデルを用いた基礎実験に支えられている。特に齧歯類など小動物を用いた担癌動物モデルは発癌のメカニズムの解明からそれを基にした創薬や投与方法の開発に現在も大きな役割を担っている。しかし、いまだに外科的手技を用いた実験が可能な大動物担癌モデルが存在しないため、臨床の現場で科学的根拠の少ないまま経験則にて行われている治療がいくつも存在する。また数多くの臨床検体を用いた新たなバイオマーカー候補の発見および小動物実験による検証が行われているが、小動物と人間との差は大きくほとんどが臨床研究ではネガティブな結果となり、臨床応用にはなかなか結びつかない。また長い期間がかかり、医療経済を大きく圧迫している。今後、新規治療開発には臨床研究が必須であり、倫理面、医療経済面において制約が厳しくなるなか、それを補完する効率的なプレ臨床研究実験系が必要である。

ブタは生理学的、解剖学的、遺伝的にヒトに近く、手術実験などで以前より用いられている。しかし、遺伝子組み換えブタの開発は安定して信頼性の高いES細胞の欠如が大きな障害になってきた。研究協力者の大西は、体細胞クローンブタの作出に成功し、その後10種類に上る遺伝子組み換えブタを樹立してきた。2012年にT,NK,B細胞の分化増殖に関わるX-linked interleukin 2 receptor (Il2rg)を標的とした免疫不全ブタの開発に世界で初めて成功した。このブタが担癌大動物モデルの作出には最適のプラットフォームとなる。

### 2. 研究の目的

本研究では、体細胞クローン技術により作成された重度免疫不全ブタ、Il2rg-KOブタに対してヒト癌細胞を移植することにより、大動物ではなければ困難な抗腫瘍治療実験に適した動物モデルを開発し、その有用性を検証する。現在大動物担癌モデルは存在せず、既に臨床に用いられている治療も科学的論拠もなく経験や治療成績に基づいたトライアンドエラーの結果行われているものが多い。当モデルではいままでも不可能であったIVR治療や、リンパ節郭清・肝切除・ラジオ波焼灼術などの外科手技、内視鏡治療や全身化学療法の治療効果およびその組み合わせ治療の相乗効果の実験が、採血データや病理組織、分子生物学的手法など科学的データに基づいて検討可能となり、新規治療開発を容易にし、臨床研究を効率化して医療の進歩と経済に大きな変化をもたらす可能性を持つ。

### 3. 研究の方法

#### (1) 癌細胞株の皮下生着実験

##### 皮下局注実験

免疫不全ブタへの生着を確認するため、各種癌細胞株(細胞数 $1 \times 10^7$ 個)をブタの皮下に

局所注射した。使用した癌細胞株はTE4, TE14, AH130, Capan-1, TGBCTKB, MZCHA2, A431, FM3A, BxPC-3, PANC-1, SKCHA-1, HepG2, SK-MES-1, BT20, MH-1, MDA-MB-361, 4T1, MCF7の計18種類、ヒト肝細胞癌株としてHepG2を使用した。

#### 腫瘍径の測定と病理学的評価

4週後の生着の有無と腫瘍径を測定した。生着した腫瘍を切片化し、HE染色による病理学的評価を行った。

#### (2) Wild type ブタでの予備実験

肝内への超音波ガイド下局注手技の確立  
生後4-6週のWild typeブタを使用して超音波ガイド下での経皮的な局注手技を行った。22GのPTCD針を使用して墨汁を注入することにより、肝実質内での注入した液体の広がりかた、また穿刺部から肝表面への液体漏出を可視化し、適切な液体注入量と速度、穿刺針の抜去方法を確立した。

#### 肝動脈造影手技の確立

腫瘍の画像的評価を行うため、必須となる肝動脈造影の手技を確立した。鼠径部カッタウン法による血管確保により、確実な大腿動脈へのカニューレ挿入を可能とした。

#### (3) 免疫不全ブタでのゼノグラフト作製実験

Il2rg-KOブタを用いた担癌モデル作製  
生後4-6週の免疫不全ブタの肝実質内に癌細胞株(HepG2)をPBS液またはMatrigelに溶解( $1 \times 10^7$ 個/ml)した液体0.5mlを超音波ガイド下で局注した。

#### 生着腫瘍の超音波画像フォローアップ

1週間毎に画像フォローアップを行い、穿刺部位への腫瘍細胞の生着の有無を評価した。同時に血液検査による腫瘍マーカー(AFP)の測定を行った。

#### 画像評価及び摘出検体の病理学的評価

局所注射より5週間で画像評価(血管造影、造影CT検査)を行い、その後肝全摘を行い、生着腫瘍の肉眼的、病理学的評価を行った。

#### (4) 治療実験

肝細胞癌モデルを用いたカテーテル治療の条件の検討を行った。ヒト肝細胞癌に対する治療と同様、肝動脈塞栓化学療法を肝細胞癌モデルに対して行った。短期的な治療効果判定として、治療後の肝臓を摘出し、病理学的評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 癌細胞株の皮下生着実験

免疫不全ブタの皮下へ注入した各種癌細胞株はほぼ全て生着が確認された。形成した腫瘍体積の中央値は $200(50-1700)\text{mm}^3$ であり最も大きな腫瘍を形成したのは類上皮癌の細

胞株である A431 であった。ヒト肝細胞癌株である HepG2 は 300mm<sup>3</sup> と比較的良好な生着を認めた。生着腫瘍の切片を作成し HE 染色を行うと中分化型肝細胞癌に矛盾しない病理学的所見が得られた。

## (2) Wild type ブタでの予備実験

### 穿刺実験

全身麻酔下にて心窩部から 22G の PTCO 穿刺針を使用することで、肝実質への超音波ガイド穿刺が可能となった。腫瘍な脈管を避けて 1ml の墨汁を注入し、その後穿刺針先端を肝実質内で手前まで引くことによって抜去前に穿刺ルートの血餅形成による閉鎖し、抜去後の肝表面からの漏出を防ぐことが可能であった。

### 血管造影手技の確立

鼠径部カットダウン法により大腿動脈より血管シースを留置して肝動脈造影が可能であることを確認した。生後 8 週のブタ動脈はヒトと比較して細く造影時の攣縮も強いいため、攣縮予防としてプロスタグランジン製剤を使用することが肝要であることが分かった。

## (3) 免疫不全ブタでの肝細胞癌株生着実験

### 細胞株の溶解液変更による生着率の改善

予備実験で獲得した手技により安定して生後 4-6 週の免疫不全ブタの肝実質内にヒト肝細胞癌株である HepG2 を超音波ガイド下で局注した。その後経時的な画像フォローアップを行い、腫瘍形成が得られたタイミングで血管造影や造影 CT 検査などの画像検査を行い、肝全摘による形成腫瘍の確認を行った。当初、PBS 液を使用して細胞を局所注射していたが、安定した腫瘍の生着が得られず当初 3 頭の免疫不全ブタに対して 1 頭のみ (33.3%) であり、得られた腫瘍の病理学的評価では主要成分の中で肝細胞癌の成分は極わずかで周囲に郵送されてきたリンパ球が主体の腫瘍であった。その後、生着率向上のため細胞外マトリックス製剤である Matrigel に変更することで、穿刺部位での良好な生着が得られた。これにより腫瘍形成率は向上し、その後 6 頭の免疫不全ブタに対して、5 頭 (83.3%) と生着を認めた。このうち 4 頭では多発する腫瘍形成を認め、中分化型肝細胞癌に矛盾しない所見を認めた。

### 画像所見 (超音波、血管造影、CT 検査)

超音波画像検査：画像上周圍肝実質に対して hypoechoic lesion として描出が可能であった。

血管造影検査：肝細胞癌の特徴であるコロナサインが得られた。

造影 CT 検査：早期濃染、washout といったヒト肝細胞に矛盾しない画像所見が得られた。

## (4) TACE 治療実験

多発腫瘍の生着が得られたモデルに対して治療実験として TACE 治療実験を行った。血管造影検査と同様、鼠径部カットダウン法で大腿動脈を確保し、肝動脈へのカニューレション後に DEB-TACE を行った。治療後 2 日での肝全摘を行ったところ、治療部位の壊死を認め、良好な治療効果を確認した。

## (5) 今後の課題

本研究では生着した腫瘍が肝内両葉多発性に認められており、抗がん剤や TACE 治療などの内科的治療の効果判定には有用と思われるが、切除や局所治療などの外科的切除の対象となる単発腫瘍の形成は得られていない。この原因として局注時の圧入により肝内類洞を介した細胞株を含む液体が、広く肝内に広がっている、もしくは腫瘍生着後の多発肝内転移などが考えられる。より高い再現性をもった肝細胞癌モデル作製のプロトコルの完成が今後の課題である。

## 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)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

板野 理 (ITANO, Osamu)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・准教授  
研究者番号：90265827

### (2) 研究分担者

鈴木 俊一 (SUZUKI, Shunichi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主任研究員  
研究者番号：90391581

淵本 大一郎 (FUCHIMOTO, Daiichiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員  
研究者番号：10343998

北郷 実 (KITAGO, Minoru)  
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・講師  
研究者番号 : 70296599

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
大西 彰 (OHNISHI, Akira)  
中塚 誠 (NAKATSUKA, Makoto)  
井上 政則 (INOUE, Masanori)  
松田 裕子 (MATSUDA, Sachiko)  
三島 江平 (MISHIMA, Kohei)