

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15596

研究課題名(和文)患者由来膵癌を直接移植した肝転移ラットモデルの確立～オーダーメイドIVR治療へ～

研究課題名(英文)Development of an orthotopic patient-derived pancreatic tumor xenograft (PDX) rat model and evaluation of treatment efficacy of interventional radiology

研究代表者

影山 健 (Kageyama, Ken)

大阪市立大学・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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト腫瘍異種移植(PDX)動物モデルは、患者から切除した腫瘍を免疫不全動物に移植し、癌治療を動物内で試験するスクリーニングプラットフォームである。本研究は、患者腫瘍を用いてラット上でPDXモデルを確立することにより、癌化学療法における動脈内投与の有効性の評価が目的である。2つの研究を行った。手術で摘出された新鮮な患者由来の原発膵癌組織を、直接免疫不全ラットの肝臓に移植した仮想肝転移モデルを作成する。肝転移モデルで肝動注療法を実施する。原発膵癌組織をラットの肝臓に移植して、ラットで腫瘍の生着に成功した。次いで、IVR治療による抗腫瘍効果の判定は、現在実験中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者腫瘍異種移植ラットモデルにおいて、それぞれの患者に見合った抗癌剤選択を可能とする癌治療スクリーニングプラットフォームの確立により、オーダーメイド治療の実践が期待される。

研究成果の概要(英文)：Patient-derived tumor xenograft (PDX) animal model is one of a screening platform in the world, which can be used to replace patients and provide cancer treatment in animals by transplanting patient-derived tumors removed from patients directly into immunocompromised animals. The purpose of this study is to increase the efficacy of transarterial chemo-infusion by establishing the PDX model in rats. We conducted two phase studies. (1) To create a liver metastasis model in which fresh patient-derived primary pancreatic cancer tumors removed by surgery are directly transplanted into the liver of immunodeficient rats; (2) To perform interventional radiology (IVR) treatments such as transarterial chemo-infusion in the model. We completed experiment 1. The primary pancreatic cancer tissue was able to be transplanted into the liver of rats. Next, we are currently conducting experiments to determine the anti-tumor effects of IVR treatment.

研究分野：放射線医学

キーワード：膵癌 異種移植 免疫不全ラット PDX Interventional Radiology

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、本来の癌の性質や薬剤感受性において実際の腫瘍と異なっていることが考えられている。

近年、ヒト腫瘍異種移植 (Patient-Derived tumor Xenograft: PDX) マウスモデルで、抗癌剤の効果判定をする動きが高まっている。PDX マウスモデルとは、手術や生検で摘出された患者腫瘍を、直接免疫不全マウスに移植したモデルを指す。したがって、PDX モデルは患者内に存在した腫瘍の性質を、マウス内でそのまま再現できる。ただし、ほとんどの PDX モデルは、マウス皮下に腫瘍を移植したモデルである。皮下移植モデルは、腫瘍生着率は極めて悪く、時間を要し、次世代への継代も困難で、オーダーメイド治療への障壁となっている。抗癌剤の効果判定でも、実臨床との乖離が生じている。皮下ではなく、本来腫瘍が存在すべき場所に移植した PDX モデルでは、抗癌剤の効果は臨床と同等の効果を示すと考えられている。

肝臓は膵癌、大腸癌といった癌の転移腫瘍標的臓器であり、肝転移の頻度は高い。今回の研究対象とした膵癌においても肝転移は 46%に認められ、60%は肝転移のみの転移で発見される。肝転移症例は局所制御により患者の予後が延長しえることが知られており、肝転移の制御は極めて重要と考えられている。過去に IVR (インターベンショナルラジオロジー: 画像下低侵襲治療) 領域においても肝転移を制御すべく、動注療法がおこなわれてきた。膵癌に対しても比較的良好な成績も認められるが、標準治療となりえていない。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、動注療法により肝転移の制御が望まれ、ひいては患者の予後延長に寄与できる。また感受性のある抗癌剤の把握は、肺などの他部位転移発現時においても全身化学療法の抗癌剤選択に寄与することはいうまでもない。

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。本研究は重症免疫不全ラットの肝臓に原発性膵臓癌を移植する仮想肝転移モデルを作成する。このラットモデルを用いて、IVR 治療で治療効果判定試験を実施する。予後が短い患者にとって、患者自身に代わって、患者の癌を持った動物上で、多岐にわたる治療法を比較試験ができる恩恵は非常に大きい。患者個人に特化したオーダーメイド治療が可能となり、肝転移患者にとって、全身化学療法のみならず、幅広い治療選択肢の提供が可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、段階的に 2 つの研究を行う。実験 1、手術で摘出された新鮮な患者由来の原発膵癌組織を、直接免疫不全ラットの肝臓に移植した仮想肝転移モデルを作成する。実験 2、肝転移モデルで、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 治療を実施し、効果判定を行う。

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膵癌 10 例を使用する。患者腫瘍 1mm 角を、ラット肝臓に移植する。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 2 種の群に割り付ける。下記のとおり、コントロール群と動注療群に振り分けた。全例、移植 8 週後に屠殺する。

【実験群】 コントロール群 シスプラチン(2 mg/kg)肝動注群

【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、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。

【IVR 治療】肝動脈注入については、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、抗癌剤動注を実施する。

【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・8 週後に CT を撮像し、腫瘍の有無と腫瘍サイズを測定する。

【組織検査】患者と各群の腫瘍標本は、組織免疫染色 (Ki67)、DNA 解析 (DNA のコピー数、染色体数、変異)、RNA 解析 (Gene expression 解析)、蛋白解析 (逆相蛋白アレイ解析: RPPA) 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。原発性癌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、60%の確率で腫瘍の生着を得られた(図1)。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2症例に対して、抗癌剤動注投与試験を実施した。1症例に対して、3匹ずつPDXモデルを作成したため、コントロール群とシスプラチン動注群に割付を行った。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週後、すなわち移植から8週後に治療後の評価CTを撮影した。症例1では、コントロール群は治療前CTで腫瘍体積平均 16.27mm^3 で、治療後CTでは腫瘍体積平均 215.91mm^3 と 1326.5% の増大が見られた。シスプラチン動注群は治療前CTで腫瘍体積平均 22.52mm^3 で、治療後CTでは腫瘍体積平均 76.95mm^3 と 341.6% の増大が見られた。症例2では、コントロール群は治療前CTで腫瘍体積平均 5.47mm^3 で、治療後CTでは腫瘍体積平均 10.92mm^3 と 200.7% の増大が見られた。シスプラチン動注群は治療前CTで腫瘍体積平均 8.72mm^3 で、治療後CTでは腫瘍体積平均 5.68mm^3 と 65.8% の縮小が見られた。以上の通り、2症例はともに抗癌剤による腫瘍制御能を有することが示唆された。肝臓腫瘍生着症例については、今後も抗癌剤効果判定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。患者由来腫瘍の生着確認実験を行なった。生着については、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。理想的には、摘出直後の新鮮腫瘍をすぐに移植することである。しかし、摘出直後にすぐに移植を行うには人員確保やラットを手術日に合わせることは困難であった。そのような障害が生じることは事前に想定できていたため、凍結保存腫瘍での生着を試みた。凍結保存をすることで、腫瘍のラット内での生着率は低下したと考える。しかし、生着率が低い、一時凍結保存腫瘍の生着は可能であることがわかった。新鮮腫瘍の移植は、人件費などの労力がかさむため、非効率的である。その点、凍結保存腫瘍での移植腫瘍生着の成功は極めて意義が大きい。

腫瘍生着できた2症例において、経カテーテル的に肝動注療法を行った。生着腫瘍の数に限りがあったため、各1匹ずつコントロール群とシスプラチン肝動注群への割り振りで抗癌剤効果判定を行った。2症例ともにコントロール群よりシスプラチン肝動注群で腫瘍増大の抑制効果が見られた。しかし、2症例ともに移植腫瘍ラットの数に限りがあるため、統計学的な検討はできていない。また、他の抗癌剤では、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た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。

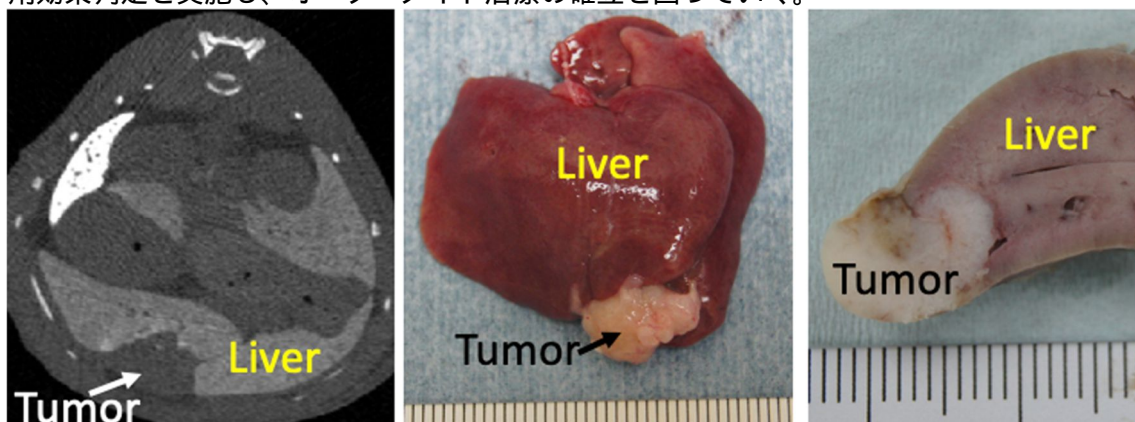


図1 肝臓内に生着した患者由来腫瘍のCT画像と摘出後肝臓標本

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