

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08104

研究課題名(和文) 免疫不全豚を用いた結節型肝癌実験モデル作成と血流動態-病理相関の検討

研究課題名(英文) Evaluation of hemodynamic/radiologic-pathological correlation in a novel experimental model of nodular hepatic carcinoma using immunodeficient pigs

研究代表者

井上 政則 (Inoue, Masanori)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・専任講師

研究者番号：30338157

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)：肝癌の低侵襲性治療は、ラジオ波、マイクロ波焼灼術に加えて、凍結治療も適応拡大が期待されている。治療の有効性を検討する大動物担癌モデルは存在しない。我々は体細胞クローン技術により作成した免疫不全ブタ、RAG2-KOブタに対し類上皮癌細胞株(A431)を用いて、結節型肝細胞癌動物モデルの作成を行った。腫瘍は乏血性腫瘍であり、Squamoidな腫瘍細胞が密に増殖し中心部には壊死を認めた。CTでは動脈相でリング状濃染を呈し、中心部には壊死を認めた。CT画像、病理学的には肝転移等の治療の治療効果判定を予測するためにモデルとして使用可能であると判断された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重度免疫不全ブタに対して類上皮癌細胞株(A431)を移植することにより、実験モデルとして妥当な、肉眼的に結節型を示す乏血性肝細胞癌モデルの作成に成功した。消化管腫瘍の転移性肝癌と同様の乏血性腫瘍であるため、このモデルを用いて様々な低侵襲性治療であるラジオ波、マイクロ波焼灼術、凍結治療の効率的な治療プロトコール作成に臨床導入前に検討を行える可能性がある。結果として臨床応用への時間を短縮し、今後の転移性肝癌治療の効率的な新規治療導入に応用することが可能となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In addition to radiofrequency and microwave ablation, cryoablation is expected to be increasingly indicated for minimally invasive treatment of liver cancer. However, there are no large animal models of hepatocellular carcinoma to evaluate the efficacy of cryoablation, making pre-clinical evaluation difficult. We made an animal model of nodular hepatocellular carcinoma using an epithelial carcinoma cell line (A431) in immunodeficient pigs and RAG2-KO pigs generated by somatic cell cloning technology. The hepatocellular carcinoma models were compared with dynamic computed tomography (CT) and pathological findings. The tumor was hypovascular, with a dense proliferation of squamoid tumor cells and numerous abnormal mitosis. The CT images showed ring enhancement on arterial phase and necrosis in the center, which were consistent with metastatic hepatocarcinoma.

It was judged that the model could be used to predict the efficacy of treatment for liver metastasis.

研究分野：放射線医学

キーワード：肝癌 焼灼術 実験モデル 造影CT

1. 研究開始当初の背景

現在の癌治療の進歩において動物モデルを用いた基礎実験は極めて重要である。発癌メカニズムの解明のみならず、抗癌剤を含めた創薬の開発においても、齧歯類など小動物の担癌動物モデルを用いた臨床研究前の安全性、有効性の検討は重要なステップである。すなわち開発の最終段階において、実験動物モデルは現在も大きな役割を担っている。近年、肝癌の低侵襲性治療は癌治療の一角を担いその重要性は増している。ラジオ波、マイクロ波焼灼術に加えて、今後凍結治療やエレクトロポレーションも適応拡大が期待されている。多血性腫瘍である原発性肝癌に治療に於いては既にラジオ波、マイクロ波焼灼術に関してはその焼灼プロトコールもある十分に検討がなされているが、凍結治療やエレクトロポレーション等の新規治療に関してはこれからプロトコールの作成が必要である。また転移性肝癌に於いてはすべての治療で十分な検討はなされていない。今後凍結治療やエレクトロポレーションといった新しい経皮的治療の適応拡大が期待されている中で、臨床応用される前にある程度の治療プロトコールを設定することは極めて重要である。しかし現状の小動物のモデルでは十分な検討が困難である。このため大動物を用いた担癌実験動物モデルの作成は、今後の低侵襲性治療の発展に極めて重要である。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。このような背景の中、臨床前段階での治療プロトコール作成、治療効果判定を行える大動物担癌モデルの作製が重要である。

2. 研究の目的

RAG2-KO免疫不全豚を用いて、結節型肝癌モデルの作成を行い、作製したヒト肝細胞癌ブタ実験モデルを用いて経静脈的ダイナミックCTを行い、画像と病理所見を検討し、実験モデルとしての妥当性を検討する。

3. 研究の方法

(1) Wild type ブタでの予備実験

経静脈的ダイナミックCT撮影

腫瘍の画像的評価を行うために必須となるダイナミックCT撮影の手技を確立した。鼠径部カットダウン法による大腿静脈確保を行いサーフローを挿入、もしくは外頸静脈から中心静脈カテーテルを右房に挿入した。いずれの方法でも撮影可能であった。また造影タイミングは造影後25秒、60秒、120秒とした。

(2)開腹、肝臓小切開による癌細胞株移植による免疫不全ブタでの肝癌モデル作成

RAG2-KO免疫不全を用いた担癌モデル作製

ヌードマウスの皮下にA431類上皮癌株を接種し、固形化させた。この固形化させたA431類上皮癌株を2mm角に切り出し、採取した。生後4.5ヶ月の免疫不全豚に全身麻酔を行い、開腹下に肝臓2か所に小切開を入れて肝実質内に植え込んで縫合、閉腹を行った。

ダイナミックCT造影の画像評価及び摘出検体の病理学的評価

移植後4週間で、超音波で肝内の腫瘍の発育を確認し最終的にCTの撮影を行ったその後肝全摘

を行い、生着腫瘍の肉眼的、病理学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) Wild type ブタでの予備実験

経静脈的ダイナミックCT撮影

いずれの方法でも静脈の確保は可能であった。また造影剤の急速静注でも問題を認めず、ダイナミックCTの3相撮影が適切なタイミングであることを確認した。

(2) 小開腹、肝臓小切開による癌細胞株移植による免疫不全ブタでの肝癌モデル作成

5頭の免疫不全ブタにおいて癌細胞株移植を行い、3頭でダイナミックCTを施行した。全ての豚でA431類上皮癌株は肝内で生着し孤立性腫瘍として認識が可能であった。また3頭全例でダイナミックCTも撮影可能であった。

いずれも単純CTでは低吸収として描出され(図1矢印)、動脈相ではring状の増強効果を伴った(図2矢印)。門脈相(図3矢印)、平衡相(図4矢印)では内部の造影効果が辺縁より内部に進展したが、中心部は低吸収のままであり、壊死が示唆される所見であった。転移性肝癌に合致する画像所見であった。

図1 (単純CT)

図2 (動脈相25秒後)

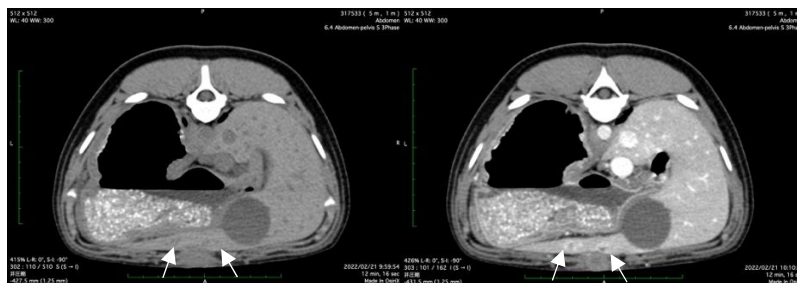
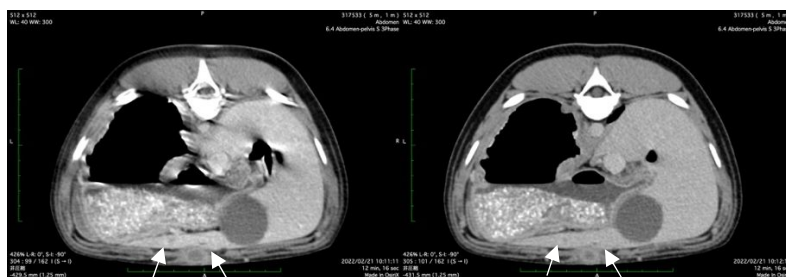


図3 (門脈相60秒後)

図4 (平衡相120秒後)



現在、2頭でH.E染色による病理標本の作製を行った。いずれも肝内に5~7mm程度の低分化な扁平上皮癌様の細胞の増殖を認め類上皮癌の増殖として矛盾しない所見であった(図5矢印)。結節の大部分は圧排性に門脈域で増殖しており(図6矢印)、Squamoidな腫瘍細胞が密に増殖、核分裂像多数類上皮癌の増殖として矛盾せず、核分裂像を多数認めた(図7)。増殖能の高い腫瘍であることが示唆される所見であった。

一部に宿主由来の線維性間質を伴った増殖もみられ(図8)。ごく一部に肝小葉への浸潤も見られている点から、豚肝に生着し増殖しているとしてよい所見であった。血管中心部には壊死を見

られていた(図9)．栄養血管は少ない印象であるが，腫瘍のサイズが小さく断定できる所見ではなかった．

CT画像の所見では中心部壊死が疑われる所見を呈しており，病理学的にもこれに合致する所見を認めた．また辺縁部の造影効果も，病理所見からは妥当な所見であると考えられた．

いわゆる転移性肝癌として，CT画像所見，病理所見も類似する所見を呈していると判断された．

図5

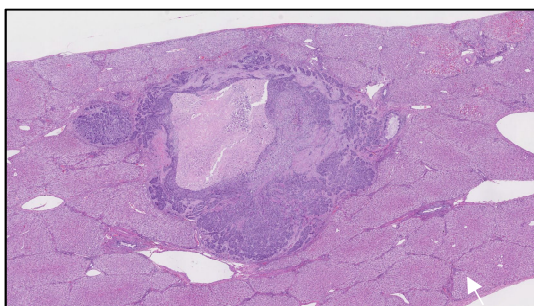


図6 周囲肝を圧排性に発育

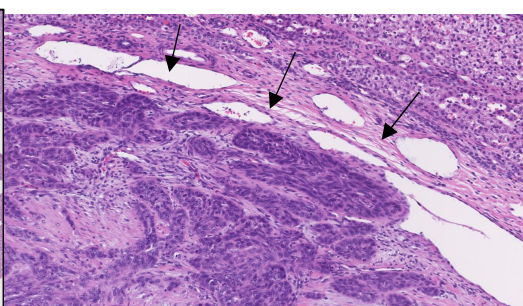


図7 Squamoidな腫瘍細胞が密に増殖

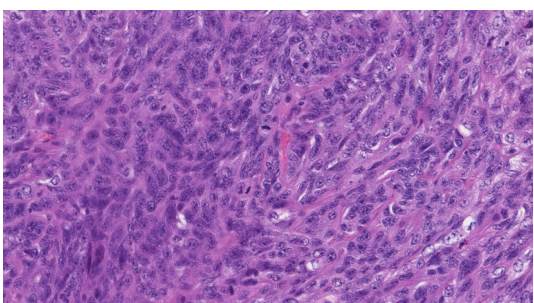


図8

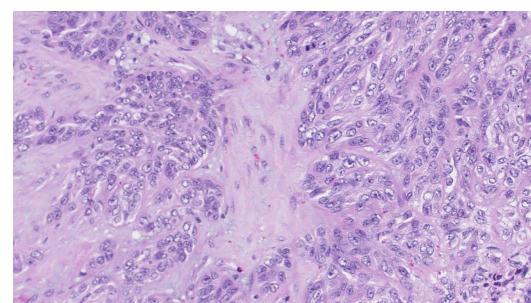
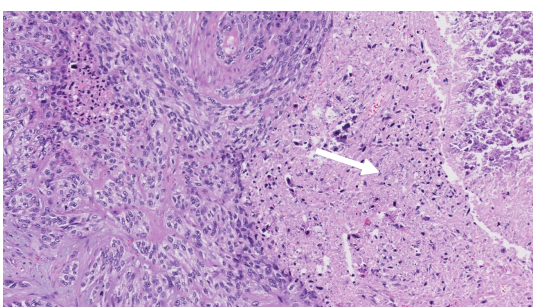


図9



(3)総括および今後の展望

ヌードマウスの皮下で固形化させたA431類上皮癌株を免疫不全豚の肝臓に移植することで生着することが確認された．CT画像，病理像共に転移性肝癌モデルとして妥当であると判断された．このためこれを用いて様々な治療の効果判定や治療プロトコール作成に用いることができる可能性が示唆された．今後，さらにサイズの大きな腫瘍モデルの作製を行い，再現性の高い大型動物の肝癌モデル作製のプロトコール完成を目指す．

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
研究分担者	淵本 大一郎 (Fuchimoto Daiichiro) (10343998)	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 (82111)	
研究分担者	中塚 誠之 (Nakatsuka Seishi) (50188984)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	
研究分担者	上野 彰久 (Ueno Akihisa) (80348755)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	
研究分担者	板野 理 (Itano Osamu) (90265827)	国際医療福祉大学・医学部・主任教授 (32206)	
研究分担者	鈴木 俊一 (Suzuki Syunichi) (90391581)	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 (82111)	
研究分担者	松田 祐子 (Matsuda Sachiko) (90534537)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任講師 (32612)	

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