

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09307

研究課題名(和文) 肺癌同所性移植モデルを使用した癌微小環境の探求

研究課題名(英文) The investigation of the cancer microenvironment using the orthotopic transplantation model of lung cancer

研究代表者

川上 行奎 (KAWAKAMI, Yukikiyo)

徳島大学・病院・特任講師

研究者番号：00596249

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)：肺癌同所移植モデルの技術と、マウス肺移植モデルの技術を組み合わせ、肺癌同所移植マウスへの“抗がん剤、免疫チェックポイント阻害薬投与モデル”や“抗がん剤投与後の肺切除モデル”を作成する研究である。ヒト肺癌細胞株A549を用いた同所移植を免疫不全マウスを用いて開始し、同所移植のモデルの確立に臨んできた。マウスへの手術手技や麻酔内容をトレーニングし確立した。マウス左肺全摘を考えていたが、全摘においては生存が不安定であり、生存モデルに関しては検討中である。またマウス由来の肺癌細胞株を継代培養し、安定した細胞培養手技と移植技術においてB6マウスを用いた的確な皮下投与のモデル作成も確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌同所移植モデルの技術と、マウス肺移植モデルの技術を組み合わせ、これまでにない、肺癌同所移植マウスへの“抗がん剤、免疫チェックポイント阻害薬(IC1)投与モデル”や“抗がん剤投与後の肺切除モデル”を作成し、今まで、ヒトの臨床研究ではなし得なかった、癌切除後の長期経過、癌微小環境、周囲間質の免疫の環境、また、切除肺や真の個別化医療へと繋げ、社会的に有用な恩恵をもたらすことを最終目標としている。

研究成果の概要(英文)：Using the combination of the technique of lung cancer orthotopic transplant and the technique of mouse lung transplant, we are going to make the chemotherapy and immune checkpoint inhibitor administration model or lung dissection model after chemotherapy. First, we started the orthotopic transplantation using human lung cancer cell line A549. And we trained and established the mouse surgery technique and anesthesia methods. We considered left pneumonectomy. But pneumonectomy model has the unstable survival rate. Therefore we are considering that the survival model. And we subcultured lung cancer cell line which derived from B6 mouse, In the stable cell culture technique and transplant technique, we established the making of precise subcutaneous administration model using B6 mouse.

研究分野：医歯薬学 呼吸器外科学

キーワード：肺癌 同所移植 マウス肺移植 化学療法 免疫療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、肺癌の化学療法においては、腫瘍の遺伝子診断、免疫チェックポイント等の機序から様々な化学療法、免疫療法、また両者の複合治療が進んできている。しかし“癌周囲環境の真の免疫状態の変化”や、切除可能な肺癌における薬物療法後の外科治療における役割”に関しては、動物実験、臨床研究のレベルにおいても十分な検討がなされていないのが現状である。これら細胞レベルでの真の因子を明らかにすることが、肺癌の治療をさらに飛躍させることに繋がるのではないかと考えた。

本研究の目的および学術的独自性と創造性として、その目的は、肺癌同所性移植モデルと肺切除モデルを用いて、がん細胞が増殖し治癒していく過程、また多臓器へ転移していく過程で、どのような免疫細胞が遊走し、相互の細胞がどのようなネットワークを持つのか、また、薬物療法後の外科治療における役割について、がん周囲環境の真の役割を探求することである。

(1) [学術的独自性] 我々のグループはヒト肺癌細胞株を SCID マウスの肺に同所移植することで、臨床における肺癌と酷似したリンパ行性、血行性転移様式を示すモデルを確立し報告してきた。(Anticancer Res 20:161-,2000,Ann Thorac Surg 69:1691-,2000)。また同モデルにて、経口抗癌剤 UFT、経静脈抗癌剤 CDDP、分子標的薬 MMI-116 投与によるリンパ節転移抑制効果を確認した。(Clin Cancer Res 7: 4202-, 2001, Mol Cancer Ther 4: 1409-, 2005)。これらの同所移植モデルの作製手技や、その性質、効果に関しては実績があり、安全、迅速に研究に入ることが可能である。また当施設にはこの研究を遂行するために必要な小動物用イメージ施設があり、マウスの CT 及び PET/CT 撮影が可能で、犠牲死させずに効果判定し、長期経過を観察することが可能である。また、グループが研究を重ねてきたマウス肺移植モデルの技術は、日本において施行できる人材は希少であり、薬物治療後の肺切除モデルを確立できる技術を保持し、迅速に利用できる環境にある。そのもとで、ヒトのサンプルでは困難な手術療法の真の役割に関して探求できる可能性を持ち合わせていることから、上記研究に取り組んだ。

2. 研究の目的

肺癌同所性移植モデルと肺切除モデルを用いて、がん細胞が増殖し治癒していく過程、また多臓器へ転移していく過程で、どのような免疫細胞が遊走し、相互の細胞がどのようなネットワークを持つのか、また、薬物療法後の外科治療における役割について、がん周囲環境の真の役割を探求する。

我々のグループが研究を重ねてきた、肺癌同所移植モデルの技術と、マウス肺移植モデルの技術を組み合わせ、これまでにない、肺癌同所移植マウスへの“抗がん剤、免疫チェックポイント阻害薬投与モデル”や“抗がん剤投与後の肺切除モデル”を作成し、今まで、ヒトの臨床研究ではなし得なかった、癌切除後の長期経過、癌微小環境、周囲間質の免疫の環境、また、切除肺や残存肺全体の組織学的検索、相互に作用する血中、組織中のサイトカイン、ケモカインなどの蛋白の変化を探求する。また、これらの探求から、現在の抗癌剤治療に加えて手術療法の真の役割も明らかにしたい。手術手技を組み合わせることで、ヒトの組織では届かなかった、肺全体の免疫環境を把握できることが可能となれば、各種抗癌剤、免疫チェックポイント阻害剤による、癌とその周囲組織環境変化の詳細、また、癌の組織型別、手術療法を加えること等への様々な治療過程の免疫機構の変化を逐次的に探求可能となり、さらなる個別化治療の飛躍につながる、これからの肺癌医療を発展させる新しい技術革新を含んだ研究である。

3. 研究の方法

(1) [実験方法]: 6週齢の SCID マウスに肺癌細胞株を投与し同所性移植モデルを作製する。2週後に抗癌剤(免疫チェックポイント阻害薬)を投与する。A,B,Cの各々の群は4週後、または8週後に犠牲死させ、各種サンプルを採取する。[A群]抗癌剤投与群 [A-1群]抗癌剤投与4週後で犠牲死させサンプルを採取する群 [A-2群]抗癌剤投与し8週後まで観察する群(長期観察群)[B群]抗癌剤投与後、4週後に手術を施行する群 [C群]手術のみの群(抗癌剤投与なし)における組織学的免疫環境と予後を比較検討する。

(2) [採取するサンプル] 癌部、非癌部の肺組織(-80凍結とホルマリン固定) 血液サンプル 右肺組織。画像所見は蛍光顕微鏡画像解析機器を用いて再現性を得る。各々、微小環境や肺組織を免疫染色にて、その細胞環境を確認する。血漿と各々の肺組織の凍結標本(ホモジェナイズ施行)は Multiplex パネルを用いてサイトカインの解析を施行する。

(3) [肺癌細胞株の種類]

表1	腫瘍径>2mmリンパ節転移までの期間	リンパ節転移	血行性転移
Ma-44-3	2週間	++	-
A-549	4週間	++	++
Ma-10	4週間	-	-
Ma-2	3週間	-	-
Ma-25	3週間	++	+

今回は、表1の上段の5種類の細胞株を使用予定である。当施設の実験結果より腫瘍径2mmに達する期間は検討済みである。現在までの我々の実績から下記6種類の抗癌剤を投与予定である。特にこの研究では、免疫チェックポイント阻害薬である Nivolumab を最初に検討したいと考えている。

Nivolumab (オプジーボ) UFT TS-1 パクリタキセル シスプラチン Gefitinib (イレッサ)

(4) [肺内移植手技]

6 週齢の雄性 SCID マウスを、イソフルラン吸入麻酔下に右側臥位に固定。肩甲骨下皮膚に約 1 cm の横切開を加え、直下の筋層を肋骨付着部より切離する。肋間より透見できる左肺に、マトリゲル 10mg/mL を含んだガン細胞懸濁液 (Ma44-3 または A549) を 10 μ l (2.0×10^4 cells) を 30 G 針にて、すばやく注入し、皮膚を縫合する。移植後 2 週目に CT 撮影を施行し状態を確認する。

(5) [肺癌細胞の細胞数調整]

37 の培養器において継代している細胞株を Dish より剥離し、遠心、細胞数を計測した後、約 1 万個/ml の細胞数 (1 匹において) を確保するように調整。これをマトリゲルに懸濁する。

(6) [肺切除手技]

マウスの肺手術の技術を持つものは日本において希少である。この実験では動物愛護の倫理的観点も十分考慮し、鎮静、麻酔器に関してもマウス肺に極力負担をかけない装置と条件にて手術手技を施行する手技を強調したい。マウスを吸入麻酔 (イソフルラン) 下に、キシラジン (0.25mg/body) + ケタミン (0.25mg/body) にて鎮静 (体重 25 g マウスにて)、経口挿管を施行、麻酔器の設定は、TV:220 μ l/回, RR=90 回/分, PEEP 2cmH₂O にて右側臥位にて人工呼吸管理を施行する。麻酔濃度は 2%イソフルランと 20%酸素濃度の Air を混合して換気する。

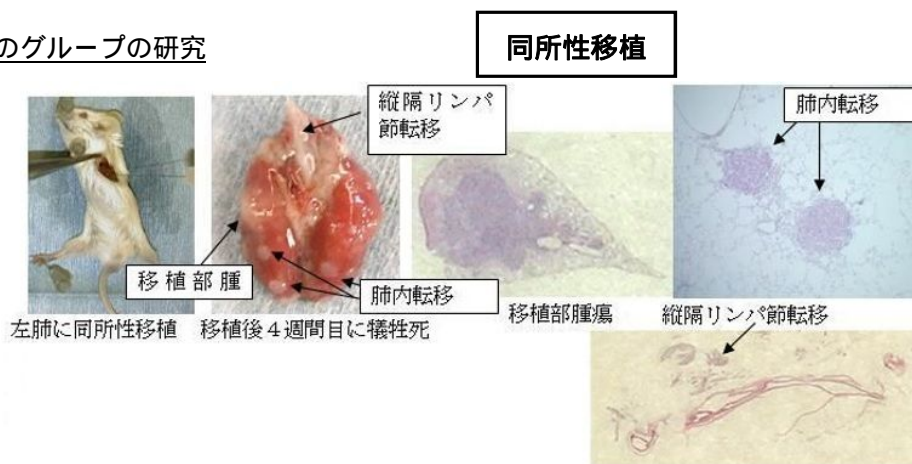
第 4 肋間にて左開胸、肺門部を展開する。頭側から肺動脈、気管支、肺静脈の順に 10-0 バイクリルにて結紮切離し左肺を摘出する (肺全摘術)。部分切除はクリップで腫瘍部中枢側を止めて腫瘍側を摘除する。マウス肺移植の拒絶反応の経験から、一側肺全摘を施行後の予後観察は可能であると考えている。(Yoshida M. et al. Oncotarget.2018;9(9):8489-8501)

4. 研究成果

肺癌同所移植モデルの技術と、マウス肺移植モデルの技術を組み合わせ、これまでにない、肺癌同所移植マウスへの“抗がん剤、免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) 投与モデル”や“抗がん剤投与後の肺切除モデル”を作成し、今まで、ヒトの臨床研究ではなし得なかった、癌切除後の長期経過、癌微小環境、周囲間質の免疫の環境、また、切除肺や真の個別化医療へと繋げ、社会的に有用な恩恵をもたらすことを最終目標としている。残存肺全体の組織学的検索、相互に作用する血中、組織中のサイトカイン、ケモカインなどの蛋白の変化を探求し、真の個別化医療へと繋げ、社会的に有用な恩恵をもたらすことを最終目標としている。

当該年度は、これまで我々が継代してきたヒト肺癌細胞株 A549 を用いた同所移植を免疫不全マウスを用いて開始し、同所移植のモデルの確立に臨んだ。A549 肺癌細胞株は長期継代しているため、増殖速度が遅い細胞株もあり、凍結しているストックから起して再継代し、同所移植を進めてきた。肺切除モデルの作成にあたり、マウスの経口挿管、全身麻酔管理、開胸から閉胸、抜管までの全身麻酔管理を安定させるために技術員とともに回路の設定と換気量、麻酔深度を設定してきた。左肺に抗がん剤を移植した後の左肺全摘を考えており、できるだけマウスに負担をかけない肺門処理 (肺動静脈、気管支) を新たに再確認してきた。麻酔は安定化し、肺門処理にももう少し工夫を加える段階である。同所移植の手技と細胞調整に改善が必要で、肺内での細胞の増殖が不安定な状態で、またマウス由来の肺癌細胞株を継代培養し、安定した細胞培養手技と移植技術において的確なモデル作りに変更続行している。

これまでのグループの研究

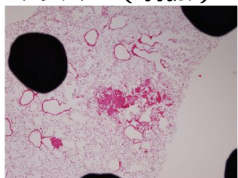


マウス CT を撮影し腫瘍細胞が観察可能か検討してきた。

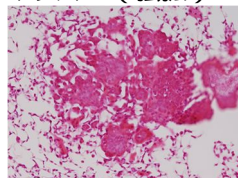


A549 肺癌細胞株の同所移植を施行し病理学的に確認した。

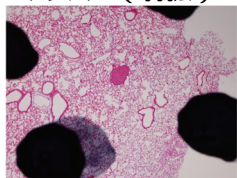
マウス 1 (弱拡)



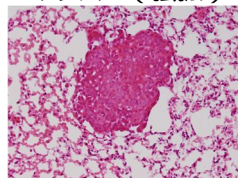
マウス 1 (強拡)



マウス 2 (弱拡)



マウス 2 (強拡)



マウスの全身麻酔手技を訓練してきた。

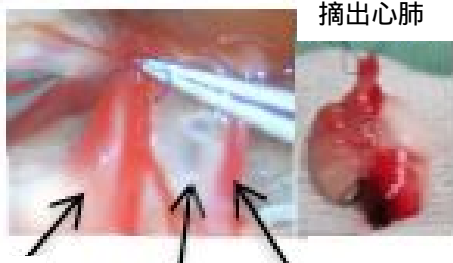
マウス経口挿管



側臥位開胸時



摘出心肺



肺静脈

気管支

肺動脈

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	近藤 和也 (KONDO Kazuya) (10263815)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授 (16101)	
研究分担者	滝沢 宏光 (TAKIZAWA Hiromitsu) (90332816)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授 (16101)	
研究分担者	吉田 光輝 (YOSHIDA Mitsuteru) (30403710)	徳島大学・病院・講師 (16101)	
研究分担者	坪井 光弘 (TSUBOI Mitsuhiro) (10711872)	徳島大学・病院・助教 (16101)	

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