

2021 年度臨床研究推進研究費報告書

提出年月日: 2022 年 6 月 20 日

代表者	氏名	青島 圭佑	所属	比較病理学教室		
	内線	5193	e-mail	k-aoshima@vetmed.hokudai.ac.jp		
研究課題	動物腫瘍の研究リソース整備					
研究チーム 参加者	氏名	所属		役割		
	青島 圭佑	比較病理学教室		検体採取, 細胞株樹立、PDX 作製 DNA, RNA, タンパク質回収		
	金 尚昊	獣医外科学教室		検体採取		
	横山 望	附属動物病院		検体採取		
	永田 矩之	附属動物病院		検体採取		
研究期間	2021 年 7 月 ~ 2022 年 3 月					
研究目的と 成果の概要 (400 字以内)	本研究ではイヌおよびネコに発生した腫瘍から培養細胞株および患者由来組織モデル (PDX モデル) を作製することを目的とした。本年度は血管肉腫 2 例, 組織球肉腫 1 例, 脾臓肉腫 1 例, リンパ腫 3 例, 腺癌 2 例を採取し, 細胞株分離と PDX 作製を試みた。このうち, 血管肉腫 1 例と脾臓肉腫 1 例でヌードマウスへの腫瘍の生着が認められた。脾臓肉腫例ではマウス間継代を 3 回行い, PDX 樹立に成功した。本 PDX は附属動物病院バイオバンクに登録した (KA-PDX-1~12)。また, 樹立した PDX から細胞培養を行い, 患者由来腫瘍細胞株樹立を行っている。 年度途中より木之下特任助教の尿路系癌 PDX 作製プロジェクトを共同で行うことになり, 移行上皮癌 8 例, 前立腺癌 5 例で NOD/SCID マウスへの移植に成功した。このうち前立腺癌 1 例で PDX 作製に成功している。 上記の成果のほか, 細胞株分離および PDX 作製プロトコルの最適化に努めた。					

研究方法、結果、考察、成果の公表（上記書式、図表を含めて 3 ページ以内に纏めて下さい）

【方法】

附属動物病院において内視鏡術および外科手術によって無菌的に採取された腫瘍組織サンプルを細胞株分離および腫瘍片移植に供した。

細胞株分離においてはハサミによる細断後, コラゲナーゼ処理を行い, 注射針およびセルストレイナーを使用して一細胞単位に分離した。分離した細胞を細胞培養ディッシュに播種し, DMEM にて培養を行った。

腫瘍片移植においてはハサミで 5 mm 角に細断後, ニードマウスまたは NOD/SCID マウスの皮下へ麻酔下で移植した。その後は継続的に観察を行い, 腫瘍体積が 1 cm³ を超えた場合, または移植後 10 ヶ月経過後に腫瘍が認められていた場合に腫瘍組織のマウス間継代を行った。計 3 回の移植を経た腫瘍組織を PDX とし, さらにその組織から腫瘍細胞株分離を試みた。

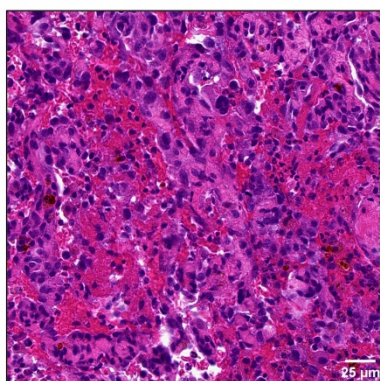
【結果】

腫瘍組織から直接細胞株分離を行った実験では細胞株を樹立することができなかった。

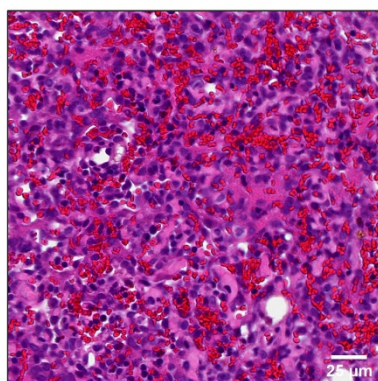
腫瘍片移植においては血管肉腫 1 例と脾臓肉腫 1 例でヌードマウスでの腫瘍の生着が認められた。脾臓肉腫例ではマウス間継代を三回行い, PDX 樹立に成功した。本 PDX は附属動物病院バイオバンクに登録した (KA-PDX-1~12)。また, 木之下特任助教との共同プロジェクトにおいて, 移行上皮癌 8 例, 前立

腺癌 5 例で NOD/SCID マウスでの移植に成功し、このうち前立腺癌 1 例で PDX 作製に成功している。

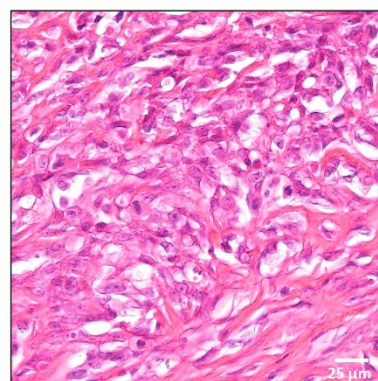
血管肉腫の患者腫瘍、患者由来組織移植腫瘍、既存培養細胞株移植腫瘍の組織像比較



患者から手術で
摘出された腫瘍組織



患者由来腫瘍組織をマウスへ
移植した後に形成された腫瘍
組織



既存の血管肉腫培養細胞株
(JuB2) をマウスへ移植して
形成された腫瘍組織

腫瘍組織をマウスへ直接移植し、その後形成された腫瘍組織 (中央) は患者体内に存在した元の腫瘍組織 (左) と同様の組織像を呈している。一方で、長期培養されている既存の血管肉腫細胞株 (JuB2) をヌードマウスへ移植した場合には血管肉腫とは類似しない組織像が得られた。

【考察】

患者由来組織からの腫瘍細胞の直接分離は今回は成功出来なかった。その理由の一つとして、腫瘍細胞以外に組織中に含まれる赤血球、線維芽細胞の影響が大きい。赤血球は数が多いためディッシュ表面で競合し、腫瘍細胞の接着を阻害する。また、赤血球の細胞死に伴い分泌される物質も腫瘍細胞の増殖へ悪影響を与えていると考えられる。したがって、今後は細胞播種前に溶血処理を行うことが必要であると考えられる。線維芽細胞は腫瘍細胞よりもディッシュ上での生存・増殖度が高く、ディッシュの培養面を一気に覆い尽くしてしまう。このため、こまめに継代を行っていたが、そのせいで腫瘍細胞密度が薄くなり、結果的に腫瘍細胞が生き残ることができなくなってしまったと考えられる。そこで今後は線維芽細胞が増えたとしても継代は行わず、腫瘍細胞が環境に適応し、増殖するまで培養し続けることを試みる。線維芽細胞は接触阻害が働くため、オーバーグロースの心配もないため、1 ヶ月以上の長期培養も視野に腫瘍細胞増殖を試みる。

PDX 作製において、脾臓肉腫や前立腺癌では腫瘍の定着が早く、マウスへの移植後 1 ヶ月程度で腫瘍増生が確認できた。しかしながら、血管肉腫では腫瘍片移植後 3 ヶ月経ってから腫瘍形成が認められ、その後も非常に遅いスピードで増殖を続けた。そこでマウスの寿命も考慮し、マウスが生後 1 年を迎えた段階 (移植後 10 ヶ月) で次のマウスへ移植した。腫瘍によりマウス移植後の腫瘍発生にかなりの時間差があることから、今後は最低でも移植後 4 ヶ月は観察を行い、早期に実験を終了しないようにする。なお、初回のマウスへの移植に成功した場合、継代後は腫瘍増殖スピードが早くなるのがどの腫瘍において観察されたため、まずは最初の移植が成功するように心がける。

血管肉腫のマウス移植組織では、患者から採取された組織と同様の組織像が観察された (上図)。一方で、既存の血管肉腫培養細胞株 JuB2 (Murai et al. 2012) をヌードマウスへ移植後に形成された腫瘍では血管肉腫とは全く異なる組織像が観察された。このことから**腫瘍片移植により形成された腫瘍組織は患者体内の腫瘍組織の特徴を維持している**と考えられ、これは既存の血管肉腫培養細胞株が維持していない特徴である。本血管肉腫症例においては今後も継代を続け PDX 樹立を目指す、3 回の継代を終えても元の腫瘍と同じ組織構造を有しているのであれば、腫瘍本来の特徴を維持した状態での腫瘍研究が可能となる。これは既存の培養細胞株では行うことができない研究であり、新規治療法開発に向けた強力な研究ツールとなり得る。

【成果の公表 (代表的なもの)】

- ・論文発表 該当なし
- ・学会発表 該当なし