

博士論文

NOG マウスを用いた
patient-derived xenograft (PDX) モデルにおける
ヒト移植組織中リンパ球がモデル樹立に及ぼす影響

藤井悦子

目次

緒言	1
第1章 NOG マウスへのヒト腫瘍組織移植による PDX モデルの樹立と その特徴	8
第2章 非腫瘍組織を用いた NOG マウスにおけるヒト組織移植成立条件の検討	28
第3章 ヒト腫瘍組織移植 PDX モデルの樹立阻害要因の解析と、 lymphoproliferative lesion に対する対処法の検討	46
第4章 初代移植におけるヒト腫瘍組織由来 tumor infiltrating lymphocytes の移植 組織生着への影響	66
総合考察	89
謝辞	95
参考文献	97

緒 言

腫瘍細胞は増殖活性が高く DNA 合成を盛んに行うため、正常細胞に比べ DNA 傷害を受けやすく、その傷害に伴う細胞死を起こしやすい (Cheung-Ong K *et al.*, 2013)。この腫瘍細胞の特徴に着目し、1) adduct 形成による DNA の直接傷害、2) 核酸代謝阻害や DNA-タンパク複合体形成阻害による DNA の合成抑制、3) tublin などの細胞分裂に関わるタンパク質の機能阻害による細胞分裂抑制などの作用機序を持つ化合物が抗がん剤として開発されてきた。これらの化合物を複数組み合わせ、腫瘍細胞の増殖を抑制し、死滅させる多くの標準的な腫瘍治療法が確立されてきた (Chabner BA and Roberts TG Jr., 2005; Minotti G *et al.*, 2004; Dasari S *et al.*, 2014; Wilson PM *et al.*, 2014)。これらの治療法は多くの患者に同じ治療法を提供する「one size fits all」の概念に立脚しており、一定の治療効果収めてきた (Kalia M, 2013) が、副作用や薬剤耐性のため十分な治療効果が得られない場合があり、個々の患者に最も適した治療法、すなわち「personalized treatment」の概念に立脚した新たな治療法が模索されている (Chabner BA and Roberts TG Jr., 2005; Cheung-Ong K *et al.*, 2013; de Gramont *et al.*, 2013; Kalia M, 2013)。

近年、分子生物学的な研究手法の発達に伴い腫瘍細胞の網羅的な遺伝子解析が進み、細胞増殖亢進やアポトーシス耐性など、腫瘍細胞の生存に有利な形質獲得に関わる「driver mutation」とよばれる遺伝子異常が一部の患者群に見出された (Torkamani A *et al.*, 2009; Martini M *et al.*, 2012)。また、これらの遺伝子変異を標的とすることで腫瘍細胞を死滅させる personalized treatment の概念に立脚した分子標的治療薬が新たに開発された (Torkamani A *et al.*, 2009; Martini M *et al.*, 2012)。実際に Her2 を標的とする trastuzumab による乳癌治療、c-Kit を標的とする imatinib による慢性骨髄性白血病や gastrointestinal stromal tumor (GIST) の治療、epidermal growth factor receptor を標的とする cetuximab による大腸癌治療など、腫瘍治療に変革が起こりつつある (Martini M *et al.*, 2012; Arnedos M *et al.*, 2014)。また、腫瘍により抑制された免疫機能を再活性化することで腫瘍細胞を排除する、いわゆる「immune checkpoint blockade」療法も一部の患者群に有効であることが示され、抗 CTLA-4 抗体の ipilimumab、抗 PD-1 抗体の pembrolizumab

が実際に治療に適用されている (Arnedos M *et al.*, 2014; Moffat JG *et al.*, 2014; Postow MA *et al.*, 2015)。

こうした目覚ましい腫瘍治療研究の進歩を受け、さらなる分子標的治療薬の開発に向けた積極的な研究が世界規模で展開されている。しかしながら、分子標的治療薬の研究開発において、非臨床研究の成果が臨床での治療に結びつくことは稀であり、その大きな要因として、これまで腫瘍の多様性・複雑性を兼ね備えた適切な非臨床モデルがなかったことが指摘されている (Tentler JJ *et al.*, 2012, Stock JK *et al.*, 2015)。すなわち、従来の DNA 傷害性の抗がん剤は、腫瘍細胞の高い増殖活性を標的とした比較的普遍的かつ単純なメカニズムに基づいており、腫瘍細胞の増殖が恒常的に起こるモデルにより解析が可能であった (Moffat JG *et al.*, 2014)。一方、分子標的治療薬は多様・複雑な腫瘍の特定の分子を標的とするため、標的分子が腫瘍細胞に適切に発現し、かつ機能するモデルがその研究・開発に必要となる (Ruggeri BA *et al.*, 2013; Williams SA *et al.*, 2013)。

腫瘍研究における *in vivo* モデルとして、腫瘍組織から樹立した培養細胞株を免疫不全マウスに移植する *xenograft* モデルが汎用されている (Ruggeri BA *et al.*, 2013; Williams SA *et al.*, 2013)。このモデルでは、*in vitro* モデルと同様に恒常的な腫瘍細胞の増殖が維持される。従って、増殖する細胞を傷害することで抗腫瘍効果を発揮する抗がん剤については非臨床と臨床の予測性がある程度確保されてきた (Kerbel RS *et al.*, 2003)。また、一部の *driver mutation* を持った細胞株の *xenograft* モデルを用いた研究の成果は臨床的有効性と相関することが知られている (Wilding JL *et al.*, 2013; Ruggeri BA *et al.*, 2014)。しかし、培養細胞株は生体内の環境と大きく異なる培養条件に適応した一部の腫瘍細胞のみで構成されることから、培養細胞の *xenograft* モデルでは腫瘍の多様性・複雑性が反映されていないと考えられている (Wilding JL *et al.*, 2013; Ruggeri BA *et al.*, 2014)。

この課題を解決すると期待されるモデルのひとつとして、腫瘍組織を *in vitro* で培養せずに直接免疫不全マウスに移植する *patient derived xenograft* (PDX) モデルがある (Figure I-1) (Tentler JJ *et al.*, 2012)。PDX モデルでは腫瘍の分子生物学的、遺伝子生物学的、組織学的な特性が保持され (Dong X *et al.*, 2010; DeRose

YS *et al.*, 2011; Monsma DJ *et al.*, 2012; Lin D., 2013; Burgenske DM *et al.*, 2014)、さらに複数症例の PDX モデルを比較することも可能であり、腫瘍の多様性や複雑性を反映した研究に即座に応用できるものと考えられている (Dong X *et al.*, 2010; Burgenske DM *et al.*, 2014; Malaney P *et al.*, 2014)。また、PDX モデルで得られた知見をモデルの由来となった患者腫瘍組織で確認することも可能であり、非臨床と臨床の橋渡しをする translational research にとっての有用なツールとして期待されている (Tentler JJ *et al.*, 2012; Dorshow JH *et al.*, 2014; Malaney P *et al.*, 2014)。

PDX モデルは腫瘍研究における新たな研究ツールとして期待されているが、同時にいくつかの課題も指摘されている。PDX モデルはすべての患者の腫瘍から樹立できるわけではなく、モデルの樹立が困難な腫瘍組織もあることが指摘されている (Tentler JJ *et al.*, 2012; Williams SA *et al.*, 2013)。また、PDX モデルの作出には費用、時間、人員などで莫大なリソースを要する (Tentler JJ *et al.*, 2012; Williams SA *et al.*, 2013)。従って、PDX モデルを広く腫瘍研究に用いるためにはより多くの腫瘍組織を用いてより効率的にモデルを作出することが、不可欠と考えられている (Tentler JJ *et al.*, 2012; Williams SA *et al.*, 2013; Ruggeri BA *et al.*, 2014)。

一方、PDX モデルの樹立ならびに研究への活用には免疫不全マウスの開発も寄与してきた。免疫不全マウス開発の歴史は 1960 年代の nude マウスの発見に始まる (Giovanella BC *et al.*, 1985; Schultz LD *et al.*, 2007; Ito M *et al.*, 2008)。nude マウスは先天的に胸腺を欠損し、T リンパ球が存在せず、異種組織の移植が可能である (Giovanella BC *et al.*, 1985; Ito M *et al.*, 2008)。その後、移植効率を向上させるため更なる研究が重ねられ、T 細胞および B 細胞を欠損する scid マウス (Bosma GC *et al.*, 1983, McCune JM *et al.*, 1988; Mosier DE *et al.*, 1988)、T 細胞・B 細胞欠損に加え NK 細胞の機能不全など複合的な免疫不全を持つ NOD-scid マウスが開発された (Lowry PA *et al.*, 1996; Pflumio FB *et al.*, 1996; Koyanagi Y *et al.*, 1997; Ueda T *et al.*, 2000)。そして、2000 年代にはさらなる移植効率向上を目指した NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug}/Jic マウス (NOG マウス) が開発された

(Ito M et al., 2002; Ito M et al., 2008)。NOG マウスは NOD-*scid* (NOD/Shi-*scid*) マウスと IL-2R γ ^{null} マウスをかけ合わせて作製したマウスで、T、B、NK 細胞欠損、樹状細胞、マクロファージの機能不全を示し、複合的な免疫不全状態にある (Schutz LD et al., 2007; Zhou Q et al., 2014) (Figure I-2)。このような特性から、NOG マウスはヒト組織の移植宿主として最も適した免疫不全動物と考えられている (Tentler JJ et al., 2012; Zhou Q et al., 2014)。

そこで本研究では、NOG マウスを用いた PDX モデルの腫瘍医学研究分野での役割・意義を明らかにしていくために、その特徴ならびに、モデル作出過程での留意点を検討した。第 1 章ではヒト全身諸臓器・組織に発生した様々な固形腫瘍を移植した NOG マウスを用いた PDX モデルの病理学的特徴ならびに樹立効率について検討した。第 2 章では、PDX モデル樹立に影響する要因として NOG マウスの宿主としての安定性について検討した。第 3 章ではさらに PDX モデル樹立の過程における樹立阻害要因を解析し、その中で阻害要因として見出されたリンパ増殖性病変の特徴ならびに PDX モデル樹立効率向上のための対処法について検討した。最後に、第 4 章では PDX モデルにおいて腫瘍細胞とともに移植される腫瘍浸潤リンパ球が腫瘍細胞の生着・増殖に及ぼす影響を検討した。

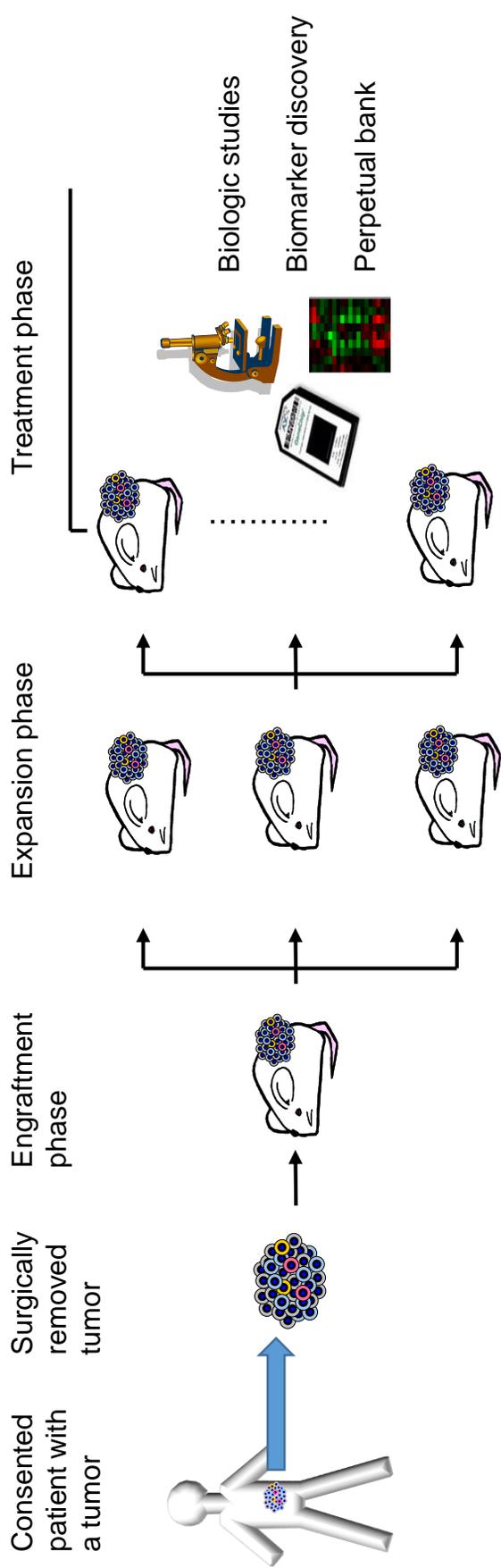
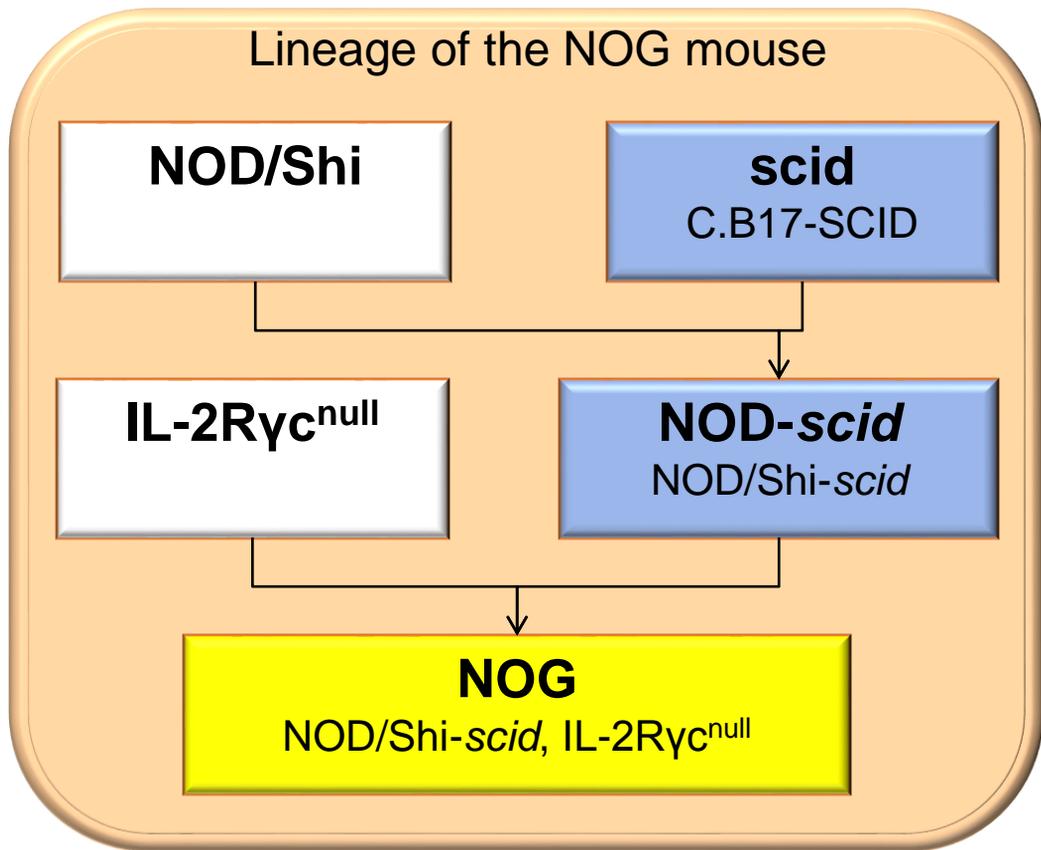


Figure I-1. Establishment and utilization of PDX models in oncology research



Strain	Characteristics
nude	T cell: — / B cell: → NK cell: ↑
scid	Mature T and B cell: — NK cell: ↑
NOD-scid	Mature T and B cell: — NK cell function: ↓ Early death due to thymic lymphoma
NOG	Mature T and B cell: — NK cell: — / other innate immune defects Long lifespan

Figure I-2. Characteristics of the NOG mouse. The lineage of the NOG mouse (upper), and a comparison of immunological features among different immunodeficient mouse strains (lower).

第 1 章 NOG マウスへのヒト腫瘍組織移植による PDX モデルの樹立とその特徴

はじめに

NOG マウスはヒト細胞・組織の移植効率の向上を目的として新たに開発された実験動物である。T、B リンパ球およびNK 細胞欠損、マクロファージ・樹状細胞やサイトカインの複合的な機能不全があることから異種組織を排除する力が極めて弱いとされ、移植されたヒト細胞・組織が高率に生着・増殖することが期待されている (Ito M *et al.*, 2002; Schultz LD *et al.*, 2007; Ito M *et al.*, 2008; Zhou Q *et al.*, 2014)。

Machida らは *in vitro* 腫瘍細胞株である HeLa 細胞を NOG マウス、nude マウス、scid マウスに移植し、腫瘍の形成状況を比較した (Machida K *et al.*, 2009)。移植後 22 日において nude マウスで 0%、scid マウスで 20%の腫瘍形成が認められたのに対し、NOG マウスでは 100%の腫瘍が形成され、NOG マウスがヒト腫瘍細胞の移植宿主として優れている可能性が示された (Machida K *et al.*, 2009)。Ninomiya らはこれまで *in vivo* 継代による維持が困難と言われていた myeloid leukemia を NOG マウスに移植したところ長期間維持され、臨床腫瘍の特徴が良く保持されていたと報告している (Ninomiya M *et al.*, 2006)。このように細胞株や血液腫瘍で NOG マウスの宿主としての有用性が報告されている。

一方、NOG マウスへのヒト固形腫瘍の移植に関する詳細な報告は少なく、わずかに GIST や子宮平滑筋腫について、移植腫瘍でも病理組織学的特徴や分子発現が良く保持されていることが報告されている (Tsuiji K *et al.*, 2010; Fukuda K *et al.*, 2013)。また、NOG マウスと同様の性質を有する NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) マウスでは、肺癌、乳癌、卵巣癌などの上皮系腫瘍の移植が可能であるとの報告もある (Simpson-Abelson MR *et al.*, 2008; Bankert RB *et al.*, 2011, Zhang X *et al.*, 2013) が、NOG マウスへの固形腫瘍移植に関する知見は未

だ十分に蓄積されていない。

そこで、本章では由来や細胞生物学的特徴の異なる様々なヒト腫瘍を NOG マウスに移植し、PDX モデルの樹立を試みた。また、樹立された PDX モデルの特徴を病理学的に解析した。

材料および方法

動物

実験動物中央研究所 (Kanagawa, Japan) より 5-6 週齢の NOG マウスを入手し、馴化期間の後 6-12 週齢で移植実験に供した。動物は bioBubble system (bioBubble, Fort Collins, CO, USA) にて病原菌フリーの状態、室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 60-80%、12 時間照明/12 時間消灯のサイクルの条件下で飼育した。飼育はペレット (CE-2, CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) を不断給餌し、蒸留水を不断給水した。動物実験操作は PharmaLogicals Research 社 (PLR, Singapore) の Animal Care and Use Committee にて審査・承認されたものであり、PLR の Animal Research Guideline を遵守して行われた。

ヒト腫瘍組織

本章の実験で使用したヒト腫瘍組織は全て実験に供されることに同意した患者のものであり、その使用について PLR および Parkway Laboratory Services 社 (Singapore) の倫理委員会にて審査・承認された。

PLR の契約医療機関に所属する病理医が診断した 326 例の外科的摘出腫瘍組織を移植実験に用いた。原発部位の腫瘍組織の他、腫瘍隣接リンパ節および遠隔転移腫瘍組織を含めた。

移植実験に供した腫瘍組織は無菌的に 3 分割し、1 分割片は 5% penicillin、streptomycin、neomycin 混合剤を含む Hanks balanced salt solution に浸漬して移植実験に供し、2 分割片は病理組織学的解析に用いた。移植用の分割片は 5 mm^3 に細切し、移植対象 NOG マウス 1 頭あたり 200 mm^3 程度を移植した。移植は移植針を用いて NOG マウス腰背部皮下に行った。移植後、移植部位における腫瘍形

成を観察し、腫瘍径が約 1 cm³に達した場合に継代を行った。継代時には、NOG マウスを深麻酔下にて腹大動脈からの放血により安楽死処置し、腫瘍組織を採取した。採取した組織は分割し、1 分割片は継代に、2 分割片は病理組織学的解析にそれぞれ供した。なお、腫瘍隣接リンパ節は組織の量が少なく、同一リンパ節の分割が困難であった。このため、同時に摘出された複数のリンパ節を用いて実験を行った。NOG マウスへのさらなる移植は最初の移植と同様の方法で行った。もとの腫瘍組織を NOG マウスに移植し形成された腫瘍を初代組織、初代組織を移植して形成された腫瘍を 2 代組織、2 代組織を移植して形成された腫瘍を 3 代組織とした。3 代以上の継代が認められた場合を PDX モデル樹立とした (Figure 1-1)。また、移植部位での腫瘍形成が認めらなかった場合には、腫瘍の増殖がないものと判断した。

病理組織学的解析

ヒト腫瘍組織および NOG マウス移植組織の一部を 4%パラホルムアルデヒド (PFA) 溶液にて 4°Cで 16-24 時間固定し、AMeX 法 (Suzuki M *et al.*, 2002; Sato Y *et al.*, 1986) にてパラフィン包埋した。パラフィンブロックは 4°Cにて保管した。パラフィンブロックより定法に従い厚さ 3-5 μm 薄切標本作製し、HE 染色を施した。

免疫組織化学的検索

ヒト腫瘍組織および NOG マウス移植組織の一部を、Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura finetechnical, Tokyo, Japan) に包埋し、ドライアイス・アセトンにて冷却したヘキサン中で凍結した。凍結ブロックは-80°Cにて保管した。

凍結ブロックより定法に従い厚さ 3-5 μm の薄切標本作製し、4%PFA

溶液にて固定後、免疫組織化学的検索に供した。免疫組織化学的染色には Ventana HX Discovery System (Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA) を用い、labeled streptavidin-biotin (LSAB) 法により染色を行った。一次抗体としてマウス抗ヒト HLA-ABC モノクローナル抗体 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) を用いた。非特異反応を抑えるための protein block (Dako Cytomation) 処理と内因性 peroxidase 除去のための 0.3% H₂O₂ メタノール溶液処理を行った後、一次抗体とビオチン化二次抗体 (Universal secondary antibody, Ventana Medical Systems) を順次反応させ、horse radish peroxidase (HRP) 標識 streptavidin (Ventana Medical Systems) を反応させた。抗体反応可視化は 0.2% diaminobenzidine (DAB) 溶液 (Ventana Medical Systems) を用いた DAB-peroxidase 反応により行った。核染色をヘマトキシリンにて行い、封入した。

結果

ヒト腫瘍組織の移植および継代による PDX モデルの樹立

胃癌、大腸癌、乳癌をはじめとする上皮系組織由来の腫瘍および、血液腫瘍、骨肉腫などの非上皮系組織由来の腫瘍を含む 326 症例の腫瘍組織を NOG マウスの皮下に移植した (Table 1-1)。このうち、原発腫瘍が 259 症例、腫瘍隣接リンパ節が 51 症例および遠隔転移巣が 16 症例であった。3 回以上継代され、PDX モデルとして樹立されたものは、326 症例中 54 症例 (16.6%) であった (Table 1-1)。原発巣からは 41/259 症例 (15.8%)、腫瘍隣接リンパ節からは 8/51 症例 (15.6%)、遠隔転移組織からは 5/16 症例 (31.3%) でモデルが樹立された。腫瘍の種類として腺癌、移行上皮癌、扁平上皮癌などの上皮系腫瘍および GIST、横紋筋肉腫などの間葉系腫瘍、星状膠細胞腫から PDX モデルが樹立された (Table 1-2)。また、大腸癌は 21/62 症例 (34%) で樹立が成功したのに対し乳癌ではわずか 3/72 症例 (4.2%) の樹立で、精巣、前立腺、血液系由来の腫瘍では PDX モデルを樹立できなかった (Table 1-1)。PDX モデルを樹立できなかった症例の多くで、初代で腫瘍が形成されないか、あるいは触知可能な腫瘍は形成されるが腫瘍組織がリンパ増殖性病変 (lymphoproliferative lesion, LPL) に置換されていた。また、LPL は NOG マウスへの移植により継代されることが確認された。

ヒト腫瘍と PDX モデルとの病理組織学的比較

PDX モデルは移植原腫瘍の構造および腫瘍細胞形態を良く保っていた。PDX モデル組織の間質量は移植・継代によりやや減少する傾向にあった。

代表例として大腸癌症例の移植結果を以下に記載する (Figure 1-2)。分化度の異なる大腸癌 3 症例において、移植初代組織、3 代組織ともにヒト腫瘍組織

の病理学的特徴を良く保持していた。高分化型大腸癌移植組織ではわずかな細胞異型を伴う高円柱上皮が極性を有して配列する管腔構造が保持されていた。腫瘍細胞の核は紡錘形で一部の細胞は核小体明瞭であった。中分化型大腸癌組織では細胞異型を伴う円柱上皮より成る管腔構造、あるいはそれらが癒合したような篩状構造が保持されていた。腫瘍細胞の核は短紡錘形から類円形でクロマチン粗造、核小体明瞭で、核異型を示した。低分化型大腸癌組織では管腔構造が認められず、充実性、索状あるいは単細胞性に腫瘍細胞が間質内に浸潤増殖する発育様式を保持していた。腫瘍細胞は多形で、核は類円形、クロマチン粗造、核小体が明瞭で、より強い異型を示した。

大腸癌以外の腫瘍移植モデルでもそれぞれの移植原腫瘍の特徴を良く保持していた (Figure 1-3)。すなわち、肺扁平上皮癌の移植組織では、基底側から胞巣の中心部へ向かって腫瘍細胞が分化する傾向が認められ、胞巣中心部に角化層、いわゆる癌真珠の形成が認められた。腎明細胞癌の移植組織では大型の淡明細胞の充実性増殖と毛細血管網がみられた。また、横紋筋肉腫の移植組織では円形核を持つ細胞接着が乏しい腫瘍細胞がび漫性に増殖する像が認められ、時にラケット様を呈する横紋筋肉腫に特徴的な腫瘍細胞がみられた。加えて、消化管間葉系腫瘍の移植組織では密に配列する紡錘形細胞のび漫性増殖像が認められた。

移植組織の組織学的分化度の変化

PDX モデルが樹立された 54 例中 49 例で初代移植組織が移植原腫瘍組織と同じ分化度を示した (Table 1-3)。これに対し、他の 5 例で分化度が異なっており、大腸癌 (2 例)、由来不明腺癌 (1 例)、卵巣嚢胞腺癌 (1 例) では移植原腫瘍組織に比べると初代組織は低分化であり、肺扁平上皮癌 (1 例) では初代

組織は高分化であった。低分化になった移植組織では、間質の減少が顕著であった。移植初代と 3 代組織とを比較したところ、53/54 例で同じ分化度を示した (Table 1-4)。

HLA-ABC 抗原の発現

移植組織の腫瘍細胞では初代および 3 代組織ともに HLA-ABC の発現が保持されていた (Figure 1-4)。これに対し、間質の線維芽細胞、血管内皮細胞、白血球では、HLA-ABC 発現細胞が移植原腫瘍組織に比べて初代組織で減少し、3 代では消失していた (Figure 1-4)。すなわち、PDX モデルの腫瘍細胞はヒトの細胞が維持されるのに対し、間質細胞は移植・継代によりヒト細胞から NOG マウス細胞に置換された。

考察

様々なヒトの腫瘍組織を NOG マウスに移植し、PDX モデルの樹立を試みた結果、繰り返し継代可能な PDX モデルの樹立が可能であることが示された。これらの PDX モデルは移植原腫瘍の組織構造および細胞形態を保持しており、組織学的分化度は概ね良く保たれていた。NOG マウスにおいて移植組織中のがん幹細胞が保持されることが報告されている (Kobayashi S *et al.*, 2012) ことより、がん幹細胞からの分化細胞の創出維持が、継代後の組織形態の保持に寄与していると考えられる。

一方、5/54 例では移植原腫瘍組織と移植初代組織の分化度が異なっていた。また、初代と 3 代との比較では 1/54 例で分化度が異なっていた。これら分化度が異なっていた理由として以下の 3 点が考えられる。すなわち、1) 分化度の低い細胞が PDX モデル樹立過程で選択的に増殖した、2) 間質が著しく減少し、腫瘍巣の形態が変化して、より低分化の腫瘍と判断された、および 3) 移植原腫瘍組織の観察部位と移植部位が同一でない、である。これらのことから、移植原腫瘍と樹立された PDX モデルとの病理組織学的特徴を十分に比較し、モデルの特徴を確認した上で腫瘍研究に適用していくことが必要と考えられた。また移植モデルでは、腫瘍細胞はヒトの細胞が維持されるが、間質細胞はヒト細胞からマウス細胞へと置換されていくため、腫瘍細胞と間質との相互作用を研究する際には注意深く行う必要があると思われた。

PDX モデルが樹立できなかった例の一部では、腫瘍組織が LPL に置換される現象が観察された。LPL 発生例では移植部位に触知可能な腫瘤が形成され、継代により別のマウスにも移植されることから移植成立例と誤って判断される可能性が高く、モデル樹立時には注意が必要と考えられた。

NOD-*scid*マウスを用いた移植実験では、抗asialo-GM-1抗体や抗IL-2R抗体などの抗NK細胞抗体投与により移植効率が向上することが報告されている (Koyanagi Y *et al.*, 1997; Ueda t *et al.*, 2000)。また、NK細胞欠損マウスであるNOD/SCID/ $\beta 2m^{null}$ マウスとの比較においてもNOGマウスの移植効率が高いことが報告されている (Ito M *et al.*, 2002)。NK細胞欠損に加え、複合的な免疫不全状態にあるNOGマウスでは移植効率の大幅な向上が期待されていた (Ito M *et al.*, 2002; Ito R *et al.*, 2012) にもかかわらず本章におけるPDXモデル樹立率は16.6%であり、これまで他の様々な免疫不全動物を用いたモデルの樹立率を上回ることはなかった (Siolas D *et al.*, 2013; Ruggeri BA *et al.*, 2014)。このことから、様々な腫瘍のPDXモデルの樹立効率の向上を目指すためには、その阻害要因を明らかにし、これらを解決することが重要と考えられた。

要約

NOG マウスはヒト細胞・組織の移植効率向上を目的として新たに開発された重度の免疫不全実験動物である。NOG マウスにヒトの様々な腫瘍を移植し、PDX モデルの樹立を試みた。様々なヒト腫瘍の移植を行ったところ、継代可能な PDX モデルが樹立され、その樹立率は 54/326 (16.6%) であった。樹立された PDX モデルは移植原腫瘍の組織構造・細胞の形態および分化度を良く保持していた。移植初代組織ではヒトの間質組織が確認されたが、3 代組織ではマウス組織に置換されていた。以上の結果から、NOG マウスを用いることで種々のヒト腫瘍の形態学的特徴を良く保持した PDX モデルの樹立が可能であり、ヒト腫瘍モデルとしての有用性が示された。しかし、その樹立率は 16.6% と期待を大きく下回るものであり、今後樹立効率を向上させることが大きな課題として明らかとなった。

Table 1-1. Establishment of PDX models by direct engraftment of surgically removed patient tumor tissues into NOG mice

Organ	No. of tissues engrafted ^a			No. of tissue lines ^b		
	Pr	LN	Me	Pr	LN	Me
Large intestine	48	14	0	17	4	0
Kidney	18	0	0	3	0	0
Mammary gland	57	13	2	3	0	0
Stomach	18	2	3	3	1	1
Ampulla of Vater	4	0	0	2	0	0
Bladder	7	0	0	2	0	0
Uterus	10	1	0	2	0	0
Brain	6	0	0	1	0	0
Lung	2	3	1	1	0	0
Ovary	18	0	2	1	0	1
Pancreas	6	1	0	1	1	0
Cervix	4	2	0	0	1	0
Bone	3	0	0	0	0	0
Hematopoietic	6	0	0	0	0	0
Prostate	12	0	0	0	0	0
Skin	10	1	0	0	0	0
Testis	3	1	0	0	0	0
Thyroid	7	1	0	0	0	0
Others	20	3	1	5	0	0
Primary unknown	0	9	7	0	1	3
Subtotal	259	51	16	41	8	5
Total			326			54

^a Total number includes cases terminated due to infection.

^b Tissues serially engrafted for 3 generations were considered as tissue lines.

Abbreviations: Pr, tumor tissue originating from primary site; LN, lymph node tissue adjacent to tumor tissue (involvement of tumor unknown); Me, tumor tissue originating from metastatic site (excluding lymph nodes).

Table 1-2. Tissue types of established PDX models

Tissue type	Tumor type	No. of tissue lines
Gastrointestinal		
Large intestine	Adenocarcinoma	17
Gastric	Adenocarcinoma	3
Ampulla of Vater	Adenocarcinoma	2
Gastric	Gastrointestinal stromal tumor	1
Female genital		
Breast	Ductal carcinoma	3
Uterus	Adenocarcinoma	1
Uterus	Mixed Mullerian tumor	1
Ovary	Adenocarcinoma	1
Urethral		
Kidney	Renal cell carcinoma	2
Bladder	Transitional cell carcinoma	2
Kidney	Transitional cell carcinoma	1
Other		
Lung	Squamous cell carcinoma	1
Pancreas	Adenocarcinoma	1
Brain	Astrocytoma	1
Other tissue	Rhabdomyosarcoma	1
Other tissue	Leiomyosarcoma	1
Other tissue	Synovial sarcoma	1
Other tissue	Soft tissue sarcoma	1
Metastatic		
Ovary	Adenocarcinoma	1
Stomach	Adenocarcinoma	1
Primary Unknown	Adenocarcinoma	3
Lymph node		
Large intestine	Adenocarcinoma	4
Cervix	Adenosquamous carcinoma	1
Gastric	Adenocarcinoma	1
Pancreas	Adenocarcinoma	1
Primary Unknown	Squamous cell carcinoma	1
Total		54

Table 1-3. Comparison of tumor differentiation between the original tissue and first generation engrafted tissue

		Engrafted tissue		
		First generation (n = 54)		
		Poor	Moderate	Well
Original tissue (n = 54)	Poor	28	1	
	Moderate	4	19	
	Well			2

Table 1-4. Comparison of tumor differentiation between the first and third generation engrafted tissue

		Third generation (n = 54)		
		Poor	Moderate	Well
First generation (n = 54)	Poor	33		
	Moderate	1	18	
	Well			2

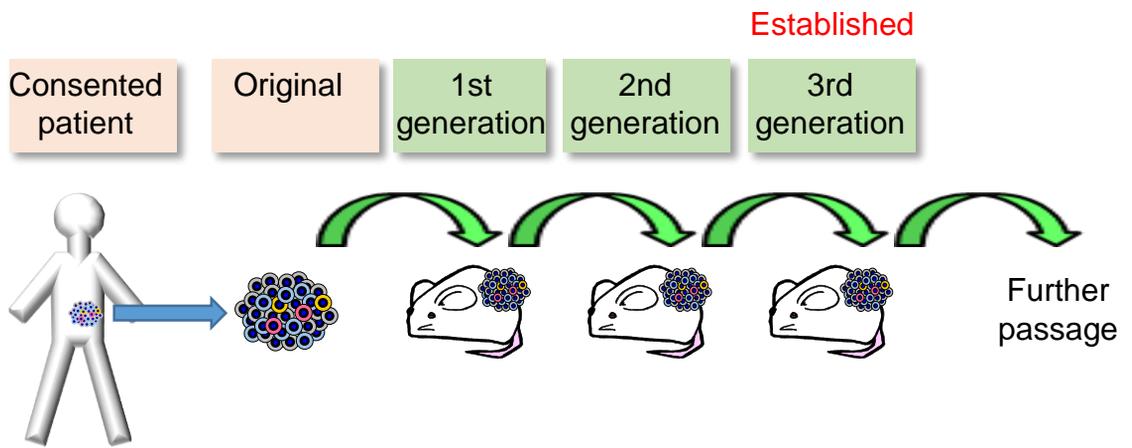


Figure 1-1. Study scheme for establishment of PDX models. Original, original tumor tissue that was surgically removed from a consenting patient; 1st-3rd generation, engrafted tissue from the primary-3rd generation.

Differentiation of colorectal adenocarcinoma

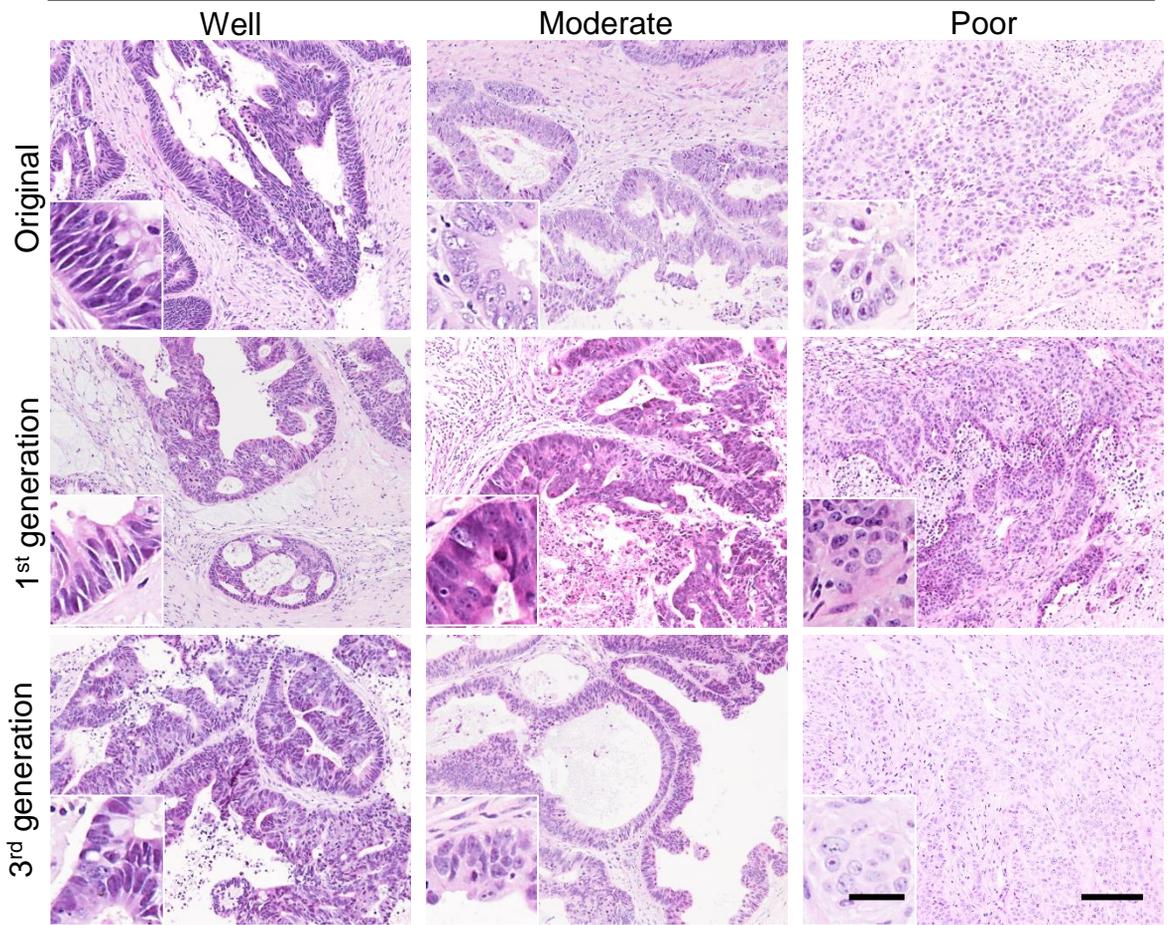


Figure 1-2. Comparison of original and transplanted tissues of colorectal cancer. Original, surgically removed original patient tissue; 1st, engrafted tissue from the primary generation; 3rd, engrafted tissue from the 3rd generation. Ductal structures are maintained with tall columnar cells in the well differentiated case and shorter columnar cells in the moderately differentiated case. Small nests of epithelial cells are formed in the poorly differentiated case. Bar=110 μ m (inserts, Bar=27.5), H&E stain.

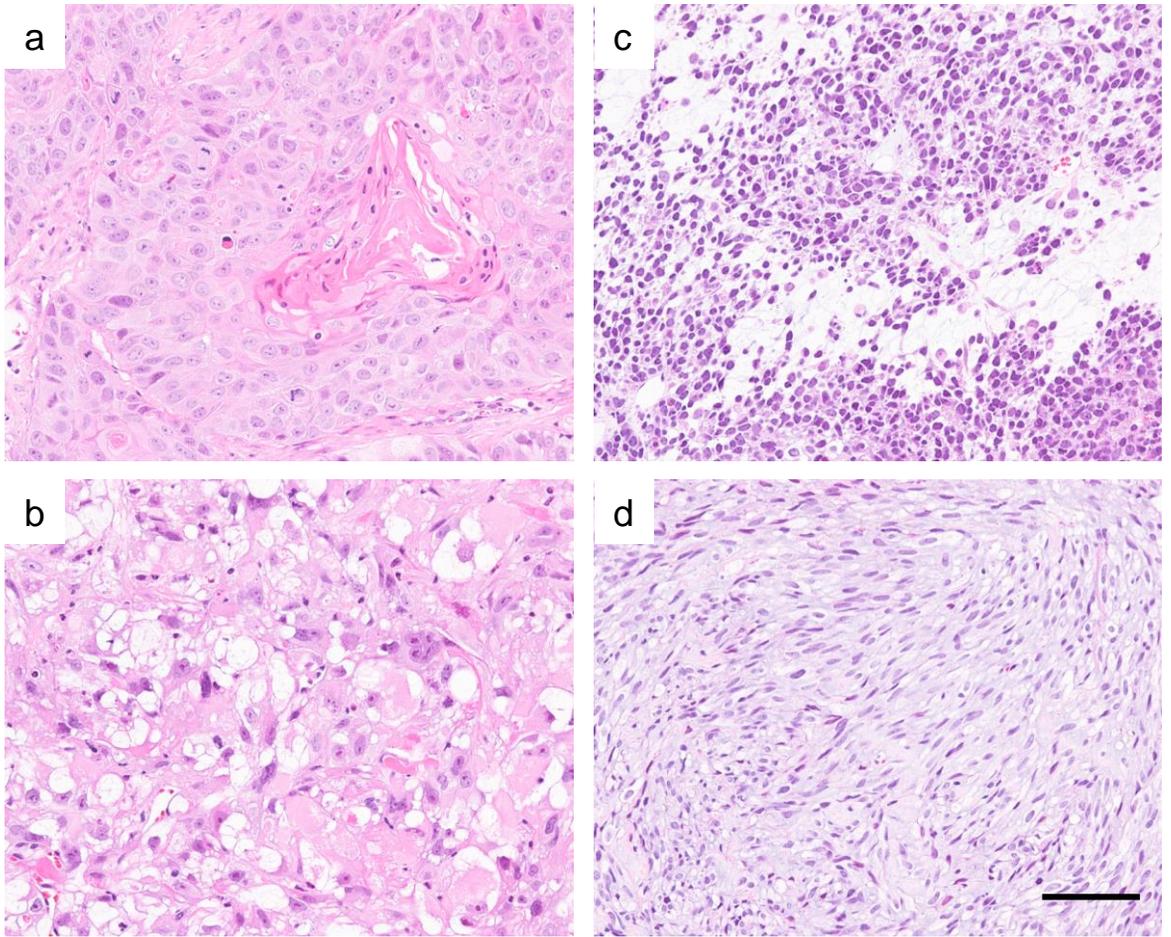


Figure 1-3. Characteristics of representative epithelial and mesenchymal PDX models established in the NOG mouse. Left hand panels show 3rd generation tissue from a case of lung squamous cell carcinoma with characteristic cancer pearls (a), and renal clear cell carcinoma with sarcomatous features (b). Right hand panels show 3rd generation tissues from a case of embryonic rhabdomyosarcoma with poorly adhering, round-shaped cells and occasional racquet shaped or myofibroblast-like features (c), and gastrointestinal stromal tumor (GIST) with an interlacing growth pattern of spindle cells (d). Bar=70 μ m, H&E stain.

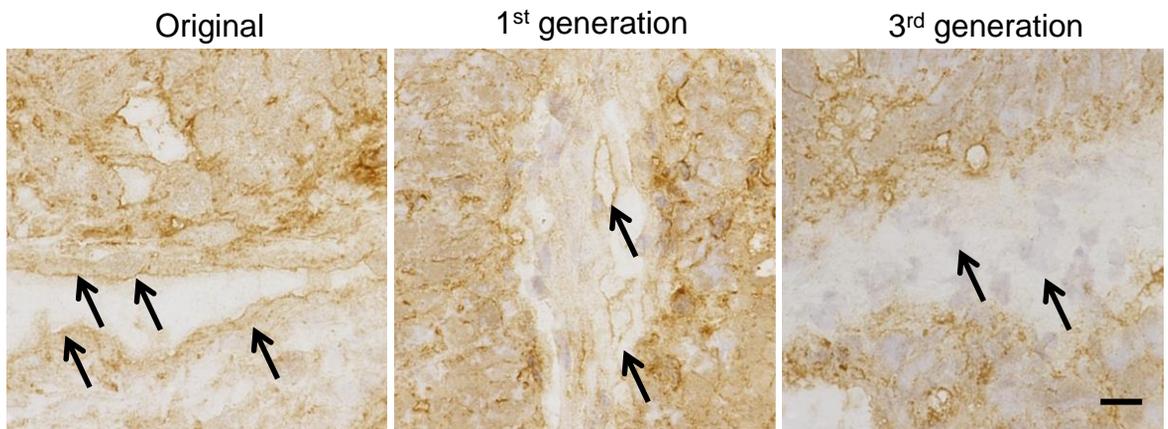


Figure 1-4. Expression of human HLA-ABC in the original and engrafted tissues of a case of colorectal cancer.

Original, surgically removed original patient tissue; 1st, engrafted tissue from the primary generation; 3rd, engrafted tissue from the 3rd generation. Arrows show endothelium of the tumor interstitium.

Bar= 30 μ m, labeled streptavidin-biotin method.

第2章 非腫瘍組織を用いた NOG マウスにおける ヒト組織移植成立条件の検討

はじめに

第1章でヒトの様々な腫瘍を NOG マウスに移植し PDX モデル樹立を試みた結果、もとのヒト腫瘍の形態学的特徴を良く保持した PDX モデルが樹立された。しかし、PDX モデル樹立の割合は 16.6%と期待を大きく下回る結果となり、PDX モデル樹立を阻害する要因を解析し、樹立効率を向上させることが大きな課題として残った。

NOG マウスではこれまでに固形腫瘍の移植効率に関する詳細な報告はないが、非腫瘍細胞・組織（正常細胞・組織）の移植が高率に成立することは報告されている。ヒト臍帯血由来の CD34+血液幹細胞を NOG マウスに移植した場合、移植率は 89-100%とされ (McDermott SP *et al.*, 2010; Katano I *et al.*, 2014)、また、NOG マウスはヒト血液細胞の移植宿主として最も適した免疫不全動物と考えられている (Ito M *et al.*, 2008; Manz MG *et al.*, 2009、McDermott SP *et al.*, 2010; Katano I *et al.*, 2014)。さらに、ヒト子宮内膜組織や卵巣皮質組織の NOG マウスへの移植率も 80-90%と高く、性周期に関わる組織・細胞の動態が再現されることも報告されている (Matsuura-Sawada R *et al.*, 2005; Terada Y *et al.*, 2008; Kikuchi-Arai M *et al.*, 2010)。このように、非腫瘍組織では NOG マウスの移植率の高さが立証されたため、自立増殖や浸潤性といった特性を持つ腫瘍組織は (Hanahan D *et al.*, 2011) 非腫瘍組織と比べてより移植されやすいと推測されることから、PDX モデル樹立も容易であると考えられていた。しかし、第1章の株樹立実験では期待を下回る結果となった。

本研究において PDX モデル樹立実験を行った PharmaLogicals Research 社は中外製薬株式会社、実験動物中央研究所、三井物産株式会社のジョイントベンチャーとしてシンガポールに設立されたばかりで、NOG マウスの日本からの

空輸によるストレス、新規立ち上げ施設の環境条件、現地採用アシスタントの手技レベルなどが PDX モデル樹立効率に影響している可能性が懸念された。一方、これまでの論文報告とは異なり、第 1 章の実験では腫瘍組織を移植したため、腫瘍組織特有の移植阻害要因が存在する可能性も考えられた。そこで、第 2 章では非腫瘍組織を用いて移植実験を行い、PDX 樹立効率の低さが実験環境による移植率の低下に起因するのか、あるいは腫瘍組織固有の要因によるものなのかを検討した。

非腫瘍組織としては、PharmaLogicals Research 社の提携先病院で手術摘出された adenomatous goiter 組織が本検討に最も適していると判断し、本章の移植実験に用いた。非腫瘍性の甲状腺組織（adenomatous goiter 組織）を PDX モデル樹立時と同一の移植手技で NOG マウスに移植し、初代移植組織の移植率を検討した。この際、移植成立の指標として移植組織の組織形態ならびに甲状腺機能タンパク質発現を評価し、移植期間との関係性も検討した。さらに、個体差を検討するために同一患者の組織を複数の NOG マウスに移植し、NOG マウスのヒト組織移植宿主としての安定性を確認した。

材料および方法

動物

実験動物中央研究所より 5-6 週齢の NOG マウスを入手し、馴化期間の後 6-12 週齢で移植実験に供した。動物は bioBubble system (bioBubble) にて病原菌フリーの状態、室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 60-80%、12 時間照明/12 時間消灯のサイクルの条件下で飼育した。ペレット (CE-2、CLEA Japan, Inc.) を不断給餌し、蒸留水を不断給水した。動物実験操作は PLR の Animal Care and Use Committee にて審査・承認されたものであり、PLR の Animal Research Guideline を遵守して行われた。

ヒト *adenomatous goiter* 組織

本章の実験で用いたヒト *adenomatous goiter* 組織は全て実験に供されることに同意した患者のものであり、その使用については PLR および Parkway Laboratory Services 社の倫理委員会にて審査・承認された。

PLR の契約医療機関に所属する病理医が診断した 9 例の *adenomatous goiter* 組織を移植実験に用いた。移植実験に供した組織は無菌的に分割し、1 分割片は 5% penicillin、streptomycin、neomycin 混合剤を含む Hanks balanced salt solution に浸漬して移植実験に供し、1 分割片は病理組織学的解析に用いた。移植用の分割片は 5 mm^3 に細切し、移植対象 NOG マウス 1 頭あたり 200 mm^3 程度を移植した。移植は移植針を用いて NOG マウス腰背部皮下に行った。

病理組織学的解析

もとのヒト *adenomatous goiter* 組織および NOG マウス移植組織を 4%PFA

溶液にて 4°C で 16-24 時間固定し、AMeX 法 (Suzuki M *et al.*, 2002; Sato Y *et al.*, 1986) にてパラフィン包埋した。パラフィンプロックは 4°C にて保管した。パラフィンプロックより定法に従い厚さ 3-5 μm 薄切標本を作製し、HE 染色を施した。なお、移植部に腫瘍形成が認められない場合は相当部位の組織を採取した。

免疫組織化学的検索

パラフィンプロックより定法に従い厚さ 3-5 μm の薄切標本を作製し、免疫組織化学的検索に供した。一次抗体にはウサギ抗ヒト thyroglobulin モノクローナル抗体 (クローン EPR3614, abcam, Cambridge, UK)、マウス抗ヒト thyroperoxidase (TPO) モノクローナル抗体 (クローン TPO47, Enzo Life Sciences, Framigdale, NY, USA)、マウス抗ヒト vimentin 抗体 (クローン V9, Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) を、二次抗体として EnVision+ System-HRP Labeled Polymer 抗ウサギあるいは抗マウス抗体 (Dako Cytomations) を用いた。脱パラフィン後、マイクロウェーブオーブン (H2800, Energy Beam Sciences, East Granby, CT, USA) を用いて、0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 内で 98°C の熱処理による抗原賦活化を行った。非特異反応を抑えるために Protein block (Dako Cytomation) 処理、内因性 peroxidase 除去のために 0.3% H_2O_2 メタノール溶液処理をそれぞれ行った後、一次抗体、二次抗体を順次反応させた。抗体反応可視化は 0.02% DAB (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 溶液を用いた DAB-peroxidase 反応により行った。核染色をヘマトキシリンにて行い、封入した。

In situ hybridization (ISH)

薄切脱パラフィン切片を 60°C にて前処理後、室温にて 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。次にマイクロウェーブオーブン (H2800, Energy Beam Sciences)

を用い、Pretreatment solution (Panomics Srl, Vignate-Milano, Italy) 中で熱処理 (100°C) を行った。その後、protease による消化、標識したヒト thyroglobulin mRNA に対するカスタム・プローブ (VERITAS Corporation, Tokyo, Japan) との反応 (40°C) を行い、QuantiGene® ViewRNA kit (Panomics Srl) と反応させ、最後に Fast red solution (Panomics Srl) で発色し、ヘマトキシリンで核染した。標識プローブを除外して染色した標本を陰性対照とした。プローブの特異性は移植原組織の濾胞上皮細胞の陽性反応により確認した。

実験デザイン

adenomatous goiter 患者 9 症例の外科的摘出甲状腺組織を 13 頭の NOG マウスに移植した。移植後 24-44 週の間複数のタイムポイントで移植組織を採取し、観察を行った。さらに、同一患者からの組織を複数マウスに移植し、同一のタイムポイント、あるいは2つの異なるタイムポイントに移植組織を採取し、病理組織学的に観察をした (Figure 2-1)。移植原組織および移植組織の個別番号および移植期間の一覧を Table 2-1 に示した。

移植スコア

NOG マウスに移植した組織を病理組織学的に評価した。移植組織全体に対する adenomatous goiter 実質組織の割合 (1:0-20%、2:>20%-60%、3:>60%-100%)、濾胞構造の有無 (0:なし、1:あり)、濾胞内のコロイドの有無 (0:なし、1:あり) をスコア化した。それぞれのマウスについてこれらのスコアの合計を移植スコア (engraftment score) とした。

移植原組織の正常度スコアと移植スコアとの関係

移植原組織の完全性と移植成立の関係を明らかにするために、9 例全例の移植原組織を、正常度スコア (integrity score) を用いて評価した。adenomatous goiter に関連する病理組織学的変化 (Maitra A and Abbas AK, 2005) として観察される濾胞上皮の扁平化、濾胞の破綻、出血の出現頻度について 0 から 3 (0: frequent、1: occasional、2: rare、3: not observed) のスコアを付与し、スコアの和を正常度スコアとした。このスコアと前述した移植スコアとの関係を各例について比較した。

結果

NOG マウスにおける *adenomatous goiter* 組織移植成立の評価

adenomatous goiter 移植マウスの 13 頭中 11 頭 (84.6%) でコロイドを貯留した濾胞構造を特徴とする甲状腺組織が認められた。濾胞構造は移植後 24 週から 44 週までの各期間で観察された (Fig 2-2)。同一症例の *adenomatous goiter* 組織を複数のマウスに移植し、同一期間 (hH1、hH2 と hI1、hI2) あるいは異なる期間 (hB1、hB2 と hC1、hC2) で観察した移植組織においても病理学的に類似した濾胞構造が認められ、移植スコアにも差はみられなかった (Fig 2-2)。

移植組織の機能性関連タンパク質および mRNA 発現

濾胞上皮の機能性を検討するために免疫組織化学法により *thyroglobulin* および TPO タンパク質の、ISH により *thyroglobulin mRNA* の発現解析を行った。7 症例の移植原組織をマウス 7 例に移植したところ、同一ドナーから複数マウスに移植した場合にはマウス間で移植スコアの差がなかったことから代表移植組織についてのみ評価を行った。さらに複数マウス移植例のうち移植期間が異なる場合には移植期間が長い移植組織 (hB2、hC2) を評価した。移植スコアが 0 であった 2 例 (hD、hG) は評価から除外した。

免疫組織化学的検索の結果、濾胞上皮細胞および濾胞内に貯留したコロイドにヒト *thyroglobulin* タンパク質の陽性反応が認められた (Table 2-2、Fig 2-3)。また ISH によって濾胞上皮細胞内に *thyroglobulin mRNA* が検出された (Table 2-2、Fig 2-3)。濾胞上皮細胞はヒト TPO も陽性で、一部の濾胞上皮細胞では管腔側の細胞膜にも強い陽性反応が認められた (Table 2-2、Fig 2-3)。いずれの分子についても発現の減弱はみられなかった。

移植原組織由来間質細胞の移植状況の評価

ドナー由来間質細胞の移植状況を評価するために移植原組織および移植後組織におけるヒト vimentin の免疫組織化学的検索を行った。また、抗ヒト vimentin 抗体の NOG マウス組織との反応性を確認するために NOG マウス皮膚組織の染色性を評価した。

ヒト adenomatous goiter 組織において、全ての血管内皮細胞がヒト vimentin 陽性であった (Fig 2-3)。また、既報 (Miettinen M *et al.*, 1984; Wick MR and Sawyer MD, 1989) と同様に、濾胞上皮細胞もヒト vimentin 陽性であった。これに対して NOG マウスの表皮、真皮、皮下組織 (血管内皮細胞を含む) においてヒト vimentin 陽性細胞は認められなかった (Fig 2-3)。

移植が成立した adenomatous goiter 組織においては、移植後の期間に関わらず全例でヒト vimentin 陽性の血管内皮細胞が認められた (Table 2-2, Fig 2-3)。移植組織中の血管のすべてがヒト vimentin 陽性の症例と vimentin 陽性と陰性の血管が混在する症例とがみられた。濾胞上皮は、移植組織においても、移植原組織と同様にヒト vimentin 陽性であった。

移植原組織の正常度と移植成立との関係

ヒト adenomatous goiter 原組織には、濾胞上皮の扁平化、濾胞の破綻、出血が様々な程度で認められた。一部の症例ではマクロファージの浸潤など濾胞の破綻に対する生体反応もみられた (Fig 2-4)。移植成立例の場合、その移植原組織には、このような変化が少なく、正常度スコアは高かった (Fig 2-4)。一方、移植非成立例の場合は移植原組織の正常度スコアは低かった。

考察

本章ではヒト甲状腺の非腫瘍性病変組織 (adenomatous goiter) を第 1 章の PDX モデル作製時と同一の移植手技で NOG マウスに移植したところ、約 85% で移植が成立した。移植組織では濾胞構造やコロイドの貯留など甲状腺の特徴構造が移植後 44 週間保持された。また、移植組織でのヒト thyroglobulin および TPO の発現分布は、ヒト甲状腺組織で報告されている発現分布 (Papotti M *et al.*, 1997; Faggiano A *et al.*, 2007) と一致していた。thyroglobulin については mRNA の発現も確認され、タンパク質合成が移植組織でも保持されていることが示唆された。さらに、移植組織の間質は、ヒト由来の間質細胞が保持されていた。

これらの結果から、PDX モデル樹立時と同一の移植手技で NOG マウスに非腫瘍組織を移植した場合、移植期間に関わりなく機能を保持しつつ、高率に移植が成立することが示された。また、同一症例の移植原組織を複数マウスに移植したところ、用いた NOG マウスの個体による差もみられなかった。このことから、第 1 章の実験環境下で非腫瘍組織を移植した場合、NOG マウスがヒト組織の宿主として安定であることが示された。

移植原組織の正常度と移植成立の有無との関係を調べた結果、原組織の病変が重度であるほど移植が成立しない傾向にあった。今回移植原組織として用いた adenomatous goiter では組織の正常度が移植に影響する可能性が高かったことから、移植を行うに当たっては移植する組織の状態を良く把握し、その取扱いに注意する必要があるものと考えられた。

以上より、移植期間による差異や宿主の個体差によらずヒト非腫瘍組織の移植が高率に成立することが確認され、第 1 章の実験環境下で NOG マウスがヒト組織の宿主として安定であることが確認された。このことから、NOG マウ

スを用いた PDX モデル樹立においては、実験環境より、むしろ移植した腫瘍組織特有の移植阻害要因が存在すると考えられ、その要因を明らかとしていく必要があるものと結論した。

要約

第1章のPDXモデル樹立実験条件下でのNOGマウスのヒト組織宿主としての安定性を検討するために腫瘍組織に換えて非腫瘍組織を移植し、PDX樹立効率の低さが実験環境による移植率の低下に起因するのか、あるいは腫瘍組織固有の要因によるものなのかを検討した。非腫瘍組織であるadenomatous goiter組織を、PDXモデル樹立時と同一の手法でNOGマウスに移植したところ、高率に移植が成立した。移植組織ではadenomatous goiterの形態学的特徴および甲状腺機能タンパク質の発現が移植後44週まで保持されていた。また、同一のgoiter組織を複数のNOGマウスに移植した場合移植期間にかかわらず移植成立状況は同様であった。以上より、第1章の実験環境下でNOGマウスはヒト組織宿主として安定しており、移植成立に影響する要因として腫瘍組織特有の要因が存在すると考えられた。

Table 2-1. Patient and mouse ID and duration of engraftment

Patient ID	Corresponding mouse ID	Weeks after transplantation
dA	hA	24
dB	hB1	28
	hB2	43
dC	hC1	29
	hC2	44
dD	hD	32
dE	hE	32
dF	hF	33
dG	hG	36
dH	hH1	37
	hH2	37
dI	hI1	40
	hI2	40
Total: 9 cases	Total: 13 cases	Range: 24-44 weeks

Table 2-2. Results of immunohistochemistry and *in situ* hybridization in engrafted thyroid tissues

	Mouse ID	hA	hE	hF	hH1	hI1	hB2	hC2	
	Weeks	24	32	33	37	40	43	44	
Follicular epithelium	Thyroglobulin	IHC	+	++	+	++	+	+	+
		ISH	++	+	++	+++	+++	+	+++
	TPO	IHC	+++	+	++	+++	+++	+	+++
Endothelial cell	hVimentin*	IHC	+++	+++	+++	++	+++	++	++

Results of staining in follicular epithelium are shown by the intensity and frequency of positive reaction: -, negative; +, weak/frequent-constant; ++, moderate/frequent-constant; +++, strong/frequent-constant.

Results of positivity to human vimentin in endothelial cells are shown by staining frequency of endothelial cells: -, negative; ++, frequently positive; +++, constantly positive.

*: hVimentin: human vimentin.

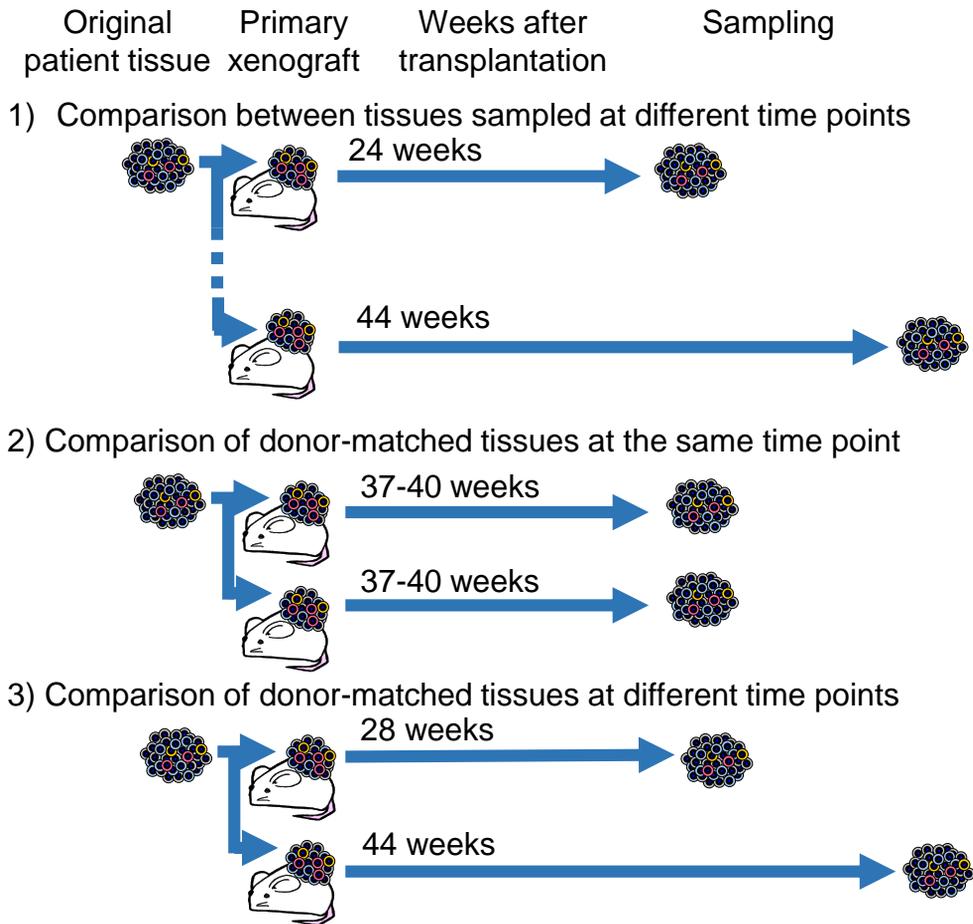


Figure 2-1. Study designs for the histopathological observation of engrafted human adenomatous goiter tissues. Engrafted tissues from multiple patients were examined and compared at different time points after engraftment (1). In addition, patient-matched tissues were examined either at the same time point (2), or at 2 different time points (3).

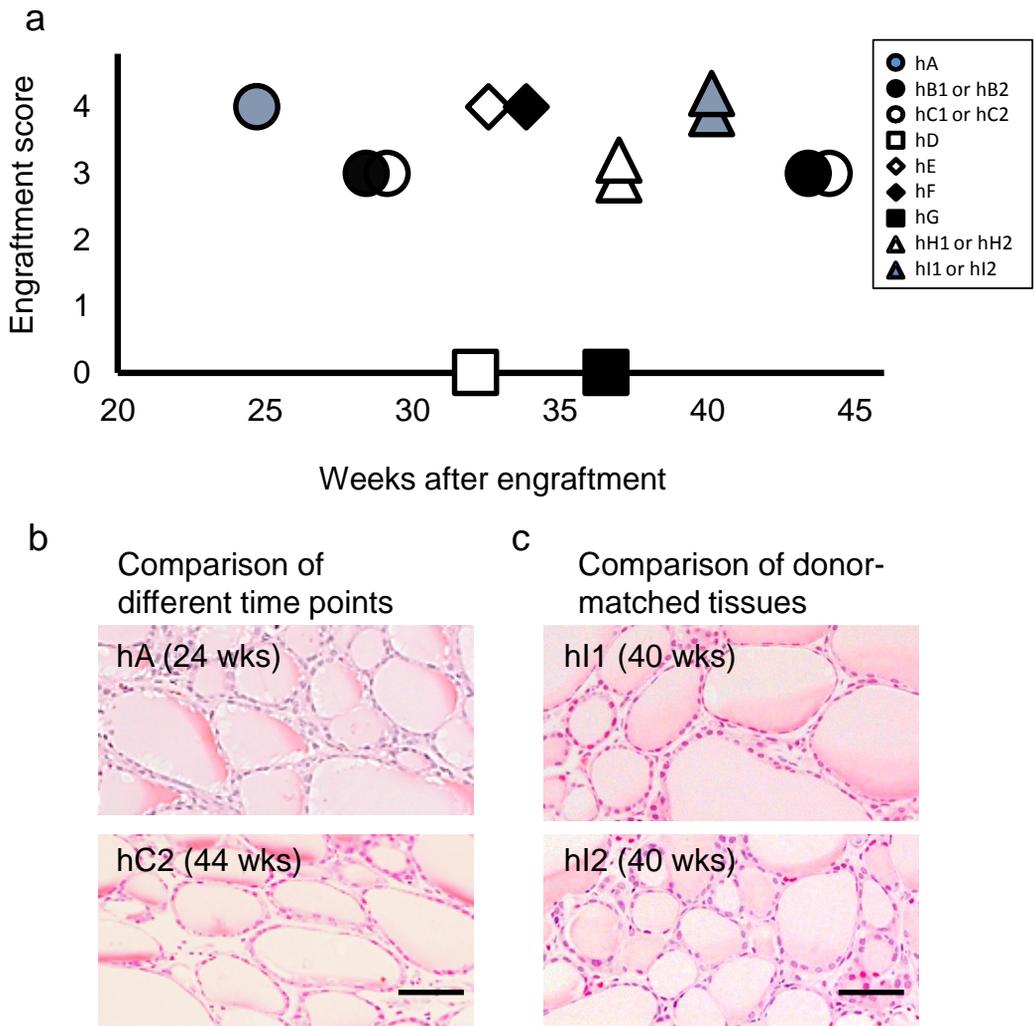


Figure 2-2. The engraftment scores were evaluated for all tissues ($n = 13$) at the respective time points. Each symbol stands for 1 mouse (a). Representative images of the parenchymal cell areas in engrafted tissues from hA (24 weeks after engraftment) and hC2 (44 weeks after engraftment) are shown (b). Follicular structures containing colloid are observed as parenchymal tissue. Representative images of the parenchymal cell areas in tissues from hI1 and hI2 are shown with the same findings (c). H&E stain, bar = 50 μm .

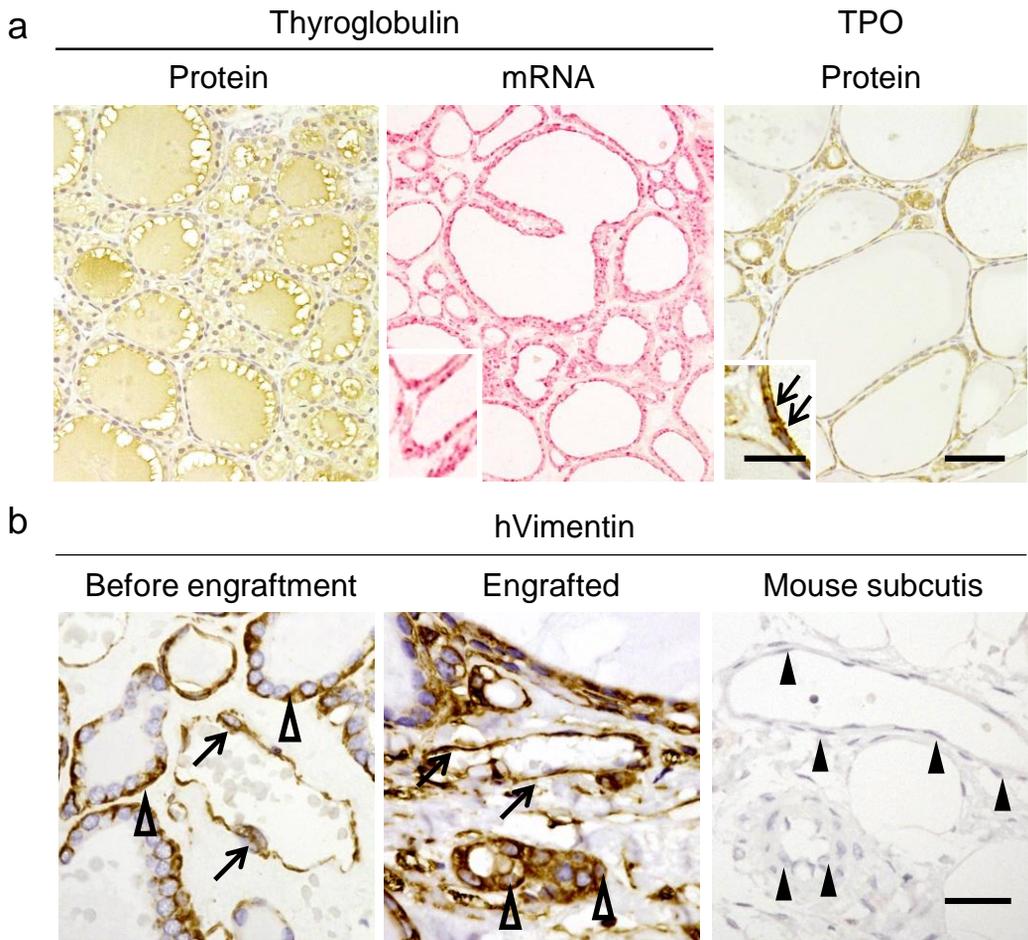


Figure 2-3. Immunohistochemical and *in situ* hybridization staining. The evaluation of the protein and mRNA expressions related to the functionality of the engrafted tissue are shown in (a). Positive staining for thyroglobulin is observed by immunohistochemistry (hF, left) and for mRNA by *in situ* hybridization (hH1, middle) in follicular epithelial cells. The follicular epithelial cells are also positive for thyroperoxidase (TPO) (hA, right). Arrows indicate occasional intense staining in the apical membrane of TPO (inset). Bars = 50 μ m. Immunohistochemistry for human vimentin (b). The endothelial cells (arrows) in a tissue from dG (left) and in a transplanted thyroid tissue from hA (middle) are positive for vimentin. Mouse endothelial cells (closed arrow heads) were negative (right). Follicular epithelial cells are also positive for vimentin before and after engraftment (open arrow heads, left and middle), bar = 25 μ m.

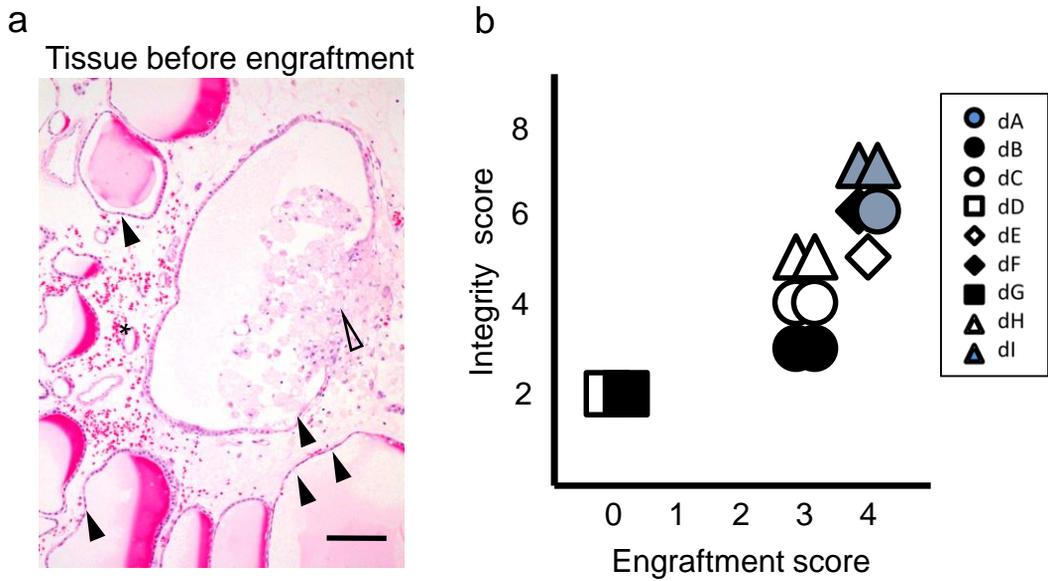


Figure 2-4. Relationship of the condition of the donor tissue before engraftment with the engraftment score. Epithelial thinning (closed arrowheads), rupture of follicles with infiltration of macrophages (open arrow head), and hemorrhage (asterisk) are observed in a tissue from dD (a). H&E stain, Bar=100 μ m. The integrity score of the donor tissues before engraftment are compared with the engraftment score of the respective transplanted tissues. Each symbol represents 1 donor (n=9) (b).

第3章 ヒト腫瘍組織移植 PDX モデルの樹立阻 害要因の解析と、lymphoproliferative lesion に対 する対処法の検討

はじめに

NOG マウスを用いた PDX モデルの樹立において、非腫瘍組織である adenomatous goiter 組織が腫瘍組織と比較して高率に移植されることを第 2 章で明らかにした。このことから、PDX モデルの樹立には腫瘍組織特有の阻害要因が存在し、その要因を明らかとしていく必要性が示された。

阻害要因の一つとして移植した腫瘍組織が LPL に置換される現象を第 1 章で示したが、NOD-*scid* マウス、NSG マウスなどの高度免疫不全動物への前立腺癌、肝臓癌、尿道系の癌、肺癌の移植時にも同様の現象が報告されており、本現象には Epstein-Barr ウイルス (EBV) 感染ヒトリンパ球の関与が示唆されている (Abe T *et al.*, 2006; Chen K *et al.*, 2012; John T *et al.*, 2012; Wetterauer C *et al.*, 2015)。LPL は、高度免疫不全動物へのヒト腫瘍移植時に起こり、移植部に腫瘍が形成されるため移植成立と誤って判断される可能性が高く、PDX モデル樹立過程で適切な対処法の確立が必要と考えられた。

そこで本章では PDX モデル樹立阻害要因を検討することを目的に、大腸癌、胃癌、乳癌、肺癌について PDX モデル樹立過程を解析し、阻害要因の洗い出しを行った。また、LPL の発生状況や特徴を明らかとし、対処法を検討した。

材料および方法

動物

5-6 週齢の NOG マウスを実験動物中央研究所より入手し、馴化期間の後 6-12 週齢で移植実験に供した。動物は bioBubble system (bioBubble) にて病原菌フリーの状態、室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 60-80%、12 時間照明/12 時間消灯のサイクルの条件下で飼育した。飼育はペレット (CE-2、CLEA Japan, Inc.) を不断給餌し、蒸留水を不断給水した。動物実験操作は PLR の Animal Care and Use Committee にて審査・承認されたものであり、PLR の Animal Research Guideline を遵守して行われた。

ヒト腫瘍組織

本章の実験で使用されたヒト腫瘍組織は全て実験に供されることに同意した患者からのものであり、その使用について PLR および Parkway Laboratory Services 社の倫理委員会にて審査・承認された。

PLR の契約医療機関に所属する病理医が診断した 182 例の腫瘍組織を移植実験に用いた。移植実験に供した腫瘍組織は無菌的に分割し、1 分割片は 5% penicillin、streptomycin、neomycin 混合剤を含む Hanks balanced salt solution に浸漬して移植実験に供し、1 分割片は病理組織学的解析に用いた。移植用の分割片は 5 mm^3 に細切し、移植対象 NOG マウス 1 頭あたり 200 mm^3 程度を移植した。移植は移植針を用いて NOG マウス腰背部皮下に行った。移植後、移植部位における腫瘍の形成を観察し、腫瘍体積が約 1 cm^3 に達した場合に継代を行った。継代時には、NOG マウスをエーテル深麻酔した後に腹大動脈からの放血により安楽死処置し、腫瘍組織を採取した。採取した組織は分割し、1 分割片は継代に、

1 分割片は病理組織学的解析にそれぞれ供した。NOG マウスへのさらなる移植は最初の移植と同様の方法で行った。もとの腫瘍組織を NOG マウスに移植し形成された腫瘍を初代組織、初代組織を移植して形成された腫瘍を 2 代組織、2 代組織を移植して形成された腫瘍を 3 代組織とした。また、移植部位での腫瘍形成が認められなかった場合には、腫瘍の増殖がないものと判断した。

病理組織学的解析

移植原腫瘍組織および NOG マウス移植組織の一部と、移植した NOG マウスの脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓およびその他肉眼的に観察された腫瘍を 4%PFA 溶液にて 4°C で 16-24 時間固定し、AMeX 法 (Suzuki M *et al.*, 2002; Sato Y *et al.*, 1986) にてパラフィン包埋した。パラフィンプロックは 4°C にて保管した。パラフィンプロックより定法に従い厚さ 3-5 μm 薄切標本を作製し、HE 染色を施した。

免疫組織化学的検索

パラフィンプロックより定法に従い厚さ 3-5 μm の薄切標本を作製し、免疫組織化学的解析に供した。免疫組織化学的解析には Ventana HX Discovery System (Ventana Medical Systems) を用い、labeled streptavidin-biotin (LSAB) 法により行った。一次抗体として抗ヒト CD3 (clone F7.2.38、DakoCytomation)、抗ヒト CD20 (clone L26、DakoCytomation)、抗ヒト CD68 (clone KP1、DakoCytomation)、抗 EBV-encoded nuclear antigen 2 (EBNA2、clone PE2、DakoCytomation)、抗 latent membrane protein 1 (LMP1、clone CS1-4、DakoCytomation) の各マウスモノクローナル抗体を用いた。非特異反応を抑えるための protein block (Dako Cytomation) 処理と内因性 peroxidase 除去のための 0.3% H_2O_2 メタノール溶液処理を行った

後、上記一次抗体とビオチン化二次抗体 (Universal secondary antibody, Ventana Medical Systems) を順次反応させ、HRP 標識 streptavidin (Ventana Medical Systems) を反応させた。抗体反応可視化は 0.2% DAB 溶液 (Ventana Medical Systems) を用いた DAB-peroxidase 反応により行った。核染色をヘマトキシリンにて行い、封入した。

EBV DNA の PCR 解析

DNA の抽出は QIAmp DNA Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) を用いて使用説明書に従って行った。EBV の BamC 遺伝子に対する primer set (Virus, Epstein-Barr virus BamC, Primer set kit; Maxim Biotech, Rockville, MD, USA) を用い、使用説明書に従って Perkin Elmer 9600 Gene Amp PCR system (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) により PCR 増幅を行った。最後に増幅産物の有無を Agilent 2100 Bioanalyzer と DNA500 LabChip kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて評価した。

PDX モデル樹立過程における阻害要因の解析

ヒト大腸癌 (n=50)、胃癌 (n=32)、乳癌 (n=76) および肺癌 (n=24) のうち、モデル樹立に至らなかった症例について、樹立阻害要因を LPL による移植組織の置換 (LPL)、腫瘍増殖なし (NT)、マウスの途中死亡・感染症・事故 (DSI) に分類した (Figure 3-1a)。このうち、病理組織学的に LPL によって移植原組織が置換されていた 7 頭について、さらに増殖リンパ球の細胞表面マーカー (ヒト CD3、CD20、CD68) を免疫組織化学的に解析した。加えて EBV 関連抗原 (EBNA2、LMP-1) の免疫組織化学的検出と EBV DNA の PCR による検出も行った (Figure 3-1b)。

NOG マウスにおける *LPL* の分布

初代大腸癌移植 *NOG* マウスで移植部位に生じた palpable mass に *LPL* がみられた 6 頭について *LPL* の全身分布を肉眼的に観察した (Figure 3-1b)。次に、移植組織、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓およびその他肉眼的に腫瘤として確認された組織を病理組織学的に解析した。脾臓と移植組織については *EBV* 感染の有無を確認するために *PCR* による *EBV* DNA の検出も行った。

レトロスペクティブな手法による *LPL* の簡易検出方法の検討

大腸癌を移植した *NOG* マウスで、*LPL* を発症した 7 症例と移植が成立した 8 症例をそれぞれ選択し、初代および 2 代目移植マウスの移植腫瘍と脾臓について病理組織学的に検索した (Figure 3-1b)。

LPL 予防法の可能性検討

移植組織に *LPL* が発生した大腸癌 1 症例の移植原組織を 4 等分に切り分け、抗ヒト *CD20* 抗体である rituximab (F. Hoffmann-La Roche、Basel, Switzerland) を含む溶液 (rituximab 0.3 ml と Hank's Solution 2.7 ml の混合溶液) あるいは Hank's Solution に 5 分間浸漬した後、4 頭の *NOG* マウス (rituximab-treated: n=2、vehicle-treated: n=2) に移植した (Figure 3-2)。移植腫瘍体積が 1cm³ 程度に達した時点でマウスをエーテルによる深麻酔下での腹大動脈からの放血により安楽死させ、剖検し、脾臓重量を測定し、移植部腫瘍と脾臓について病理組織学的に検索した。

結果

PDX モデル樹立を阻害する要因

PDX モデル樹立率は移植した腫瘍の種類ごとに異なり、3%から 28%であった (Table 3-1)。阻害要因は、大腸癌・胃癌では LPL (それぞれ 38%と 41%)、肺癌・乳癌では腫瘍の増殖がみられない NT (それぞれ 54%と 84%) が主であった。LPL はいずれの癌でも認められた (3%~41%)。主として細菌感染に起因すると考えられる DSI もいずれの癌でもみられ 11~21%であった。

LPL 例の移植腫瘍では、主にリンパ芽球様異型リンパ球を主体としたリンパ様細胞の広範な増殖が認められた (Figure 3-3)。検索した全例で PCR により EBV DNA が検出され、免疫染色により EBV 関連抗原である EBNA2 および LMP1 陽性の異型リンパ球が認められた (Figure 3-3)。異型リンパ球はヒト CD20 が陽性、ヒト CD3 および CD68 が陰性であり、B 細胞由来と考えられた。

NOG マウスにおける LPL の全身分布

大腸癌を移植した *NOG* マウスでは、移植部位に LPL を発症した 6 頭のうち 5 頭には同部に大腸癌細胞が認められ、1 頭でわずかに認められたのみであった。異常リンパ球は前述した形態学的特徴を示し、PCR により EBV の存在が確認された。

これらのマウスでは 6 頭全例で脾腫が認められた。さらに、4 頭で腋窩、胸腔、腸管壁に結節が、1 頭で肝臓に白色巣がみられたが、いずれも病理組織学的には、異型リンパ球増殖巣であった (Figure 3-4)。この病変は組織学的に腎臓と肺でも観察された (Figure 3-4)。脾臓の LPL は中心動脈周囲に認められ、病変が進んだ例では脾臓の既存構造を完全に置換していた (Figure 3-4)。なお、全例

で PCR により脾臓から EBV DNA が検出された。

LPL の簡易検出方法の検討

大腸癌移植例のうち LPL が発生した 7 例およびモデルが樹立された 8 例の初代移植組織と 2 代移植組織を解析した (Table 3-2)。その結果、初代移植 NOG マウスでは、移植部位に LPL が発生した例の 6/7 頭およびモデルが樹立された 3/8 頭で脾腫が認められた。病理組織学的には LPL 発生例では 7 頭全てで脾臓に LPL が観察されたのに対して、樹立例で脾腫がみられた 3 頭のうち 2 頭で、軽度ではあるが LPL が認められた。他の 1 頭に LPL はみられず、顕著な髄外造血亢進が脾腫の原因であった。2 代移植 NOG マウスでは、移植部に LPL が発生した 6/7 頭に脾腫がみられたが、樹立例には認められなかった。脾腫の原因はすべての例で LPL であった。

抗 B リンパ球抗体を用いた LPL の予防

大腸癌症例 1 例の移植原腫瘍組織を rituximab で処理したのちに NOG マウスに移植した結果、対照群 2 頭では剖検時に脾腫が認められ、移植部腫瘍および脾臓に LPL が観察された。一方、rituximab 処置群では脾腫は認められず、脾臓・移植部腫瘍に LPL は観察されなかった (Table 3-3)。Rituximab 処理した組織の移植部腫瘍では大腸癌細胞の増殖がみられ、LPL の発症を伴うことなく継代が可能であった。

考察

NOG マウスを用いた PDX モデル樹立過程におけるモデル樹立阻害要因を、LPL による腫瘍組織の置換 (LPL)、感染症などによる継代の中止や宿主の死亡 (DSI)、および腫瘍の増殖が認められない (NT) の 3 つに分類した。移植した癌の種類により各阻害要因の頻度は異なっていたが、LPL と NT が主な阻害要因であった。大腸癌・胃癌組織の移植においては、LPL の発生が移植症例の 40%程度にみられ、これらの癌での PDX モデル樹立効率を低下させる大きな要因であった。

LPL における増殖リンパ球は、ヒト CD20 に陽性で、ヒト B リンパ球由来であることが示された。さらにこれらの細胞には、EBV 関連抗原および EBV DNA が検出された。したがって LPL は NOG マウスに腫瘍組織とともに移植された EBV 感染リンパ球の異常増殖に起因すると判断された。

ヒトにおいて、EBV 感染に関連した病態のひとつとして lymphoproliferative disorders が知られている (Heslop HE *et al.*, 2009; Morscio J, *et al.*, 2015; Tse E *et al.*, 2015)。ヒトに感染した EBV は、生体の免疫系が機能している場合にはその増殖が抑制されているが、臓器移植患者など、免疫抑制剤投与により免疫系が著しく抑制された状態では、感染 B リンパ球の異常増殖を引き起こす (Niller HH *et al.*, 2008)。EBV 感染の宿主細胞としては、ヒト B リンパ球、特にメモリー B リンパ球が知られている (Thorley-Lawson DA *et al.*, 2008)。これらの感染リンパ球は生体の様々な臓器・組織に分布しており、ヒト腫瘍組織とともに NOG マウスに移植されうるものと考えられる。NOG マウスは重度の免疫不全状態にあるため、腫瘍とともに移植された EBV 感染 B リンパ球が異常増殖を起こし、ヒトの lymphoproliferative disorder を呈したと考えられた。

人類の 90% は EBV に感染し、生涯感染が持続すると言われている (Niller HH *et al.*, 2008)。移植における LPL を回避するために EBV 感染患者を除外することは困難であり、PDX 樹立過程では一定の割合で LPL が発生することを常に考慮しておく必要があると考えられる。そこで、PDX モデル樹立過程の早期に LPL を検出し、発症した症例を淘汰することでモデル樹立の効率化を図る必要があると考えた。

LPL を確定診断するためには免疫組織化学的解析を含む病理組織学的検査が必要となる。しかし、病理組織学的解析を継代作業と同時に行うことは困難である。そこで、肉眼的に LPL 発症例を見分ける方法を検討したところ、移植部の LPL と脾腫の発生とが良く相関した。すなわち、初代と 2 代移植 NOG マウスの脾腫を指標に今後の継代を判断することが可能と考えられた (Figure 3-5)。初代および 2 代移植ともに脾腫がみられない場合には、LPL 発症はないものと判断し、3 代への継代を実施する。2 代移植で脾腫がみられた場合には LPL と判断し、継代を中止する。初代で脾腫がみられたにもかかわらず 2 代ではみられなかった場合には、3 代への継代を実施しつつ、速やかに 2 代組織の病理組織学的解析を実施し、LPL が確認された場合に 3 代組織を淘汰する。この手法により、大規模な PDX 樹立プロジェクトの推進において、要員、NOG マウス頭数、実験室のスペースならびに研究費用などを効率化できると考えられる。

上記は LPL の簡易検出方法であるが、より精度の高い診断方法は病理組織学的解析である。試験規模が比較的小さく、移植組織全ての速やかな病理組織学的検査が実施可能な場合には初代移植組織の病理組織学的解析を行い、2 代組織淘汰の判断を行うことが望ましい。

LPL への対応として、前述の早期発見・淘汰法に加え、LPL の発症を予防する方法を検討した。ヒトリンパ腫の治療には抗ヒト CD20 抗体 (rituximab)

が用いられている (Cang S *et al.*, 2012; Morscio J *et al.*, 2015; Tse E *et al.*, 2015)。そこで、rituximab による EBV 感染リンパ球を含む CD20 陽性 B 細胞の除去が LPL の予防に有用であると考えた。同一患者からの腫瘍組織を用いて rituximab 処置群と対照群とを比較検討した結果、対照群は LPL を発症したが、rituximab 処置群に LPL の発症はみられなかった。この結果から、rituximab による EBV 感染リンパ球の除去が LPL の予防に有用であることが示された。

NOG マウスでみられた LPL と同様の事象が NOD-*scid* マウス、NSG マウスでも報告されている (Abe T *et al.*, 2006; Chen K *et al.*, 2012; John T *et al.*, 2012; Wetterauer C *et al.*, 2015)。いずれの報告例でも移植腫瘍が増殖し、PDX モデル樹立と判断した例のうち 16-80%で腫瘍組織がリンパ増殖性病変に置換されていた (Abe T *et al.*, 2006; Chen K *et al.*, 2012; John T *et al.*, 2012; Wetterauer C *et al.*, 2015)。LPL が PDX モデル樹立を阻害する影響は大きく、今回明らかにした手法による早期発見、淘汰あるいは感染リンパ球の予防的除去は PDX モデル樹立に大きく寄与するものと考えられる。

さらに本章では上述した LPL のほかに、腫瘍が増殖しないという現象もモデル樹立阻害要因として重要であることが明らかとなった。モデル樹立効率をより向上させるためには、さらに移植した腫瘍が増殖しないという現象についても検索する必要があると考えられた。

要約

本章では、PDX モデル樹立阻害要因を検討した。阻害要因を、LPL による移植組織の置換 (LPL)、腫瘍の増殖なし (NT)、感染症などによる継代の中止や宿主の死亡 (DSI) の3つに分類したところ、LPL と NT が主要な要因であった。LPL は病理組織学的にヒト B 細胞由来リンパ球の異常増殖巣より成っていた。増殖細胞は EBV 関連抗原および DNA 陽性であったことから LPL はヒトの lymphoproliferative disorder に類似した病態であり、移植腫瘍組織中の EBV 感染ヒトリンパ球に起因すると考えられた。LPL は移植 NOG マウスの全身諸臓器に発生するので、継代時に脾腫を指標とすることで LPL の早期発見・淘汰ができる可能性が示された。また、rituximab (抗ヒト CD20 抗体) 処置により EBV 感染リンパ球を除去することでモデルの樹立効率を向上できることも示された。

Table 3-1. Fate of engrafted tissue in NOG mice

Fate	Tumor			
	Colorectal	Gastric	Breast	Lung
EST ^{a)}	14 (28) [*]	4 (13)	2 (3)	2 (8)
LPL ^{b)}	19 (38)	13 (41)	2 (3)	4 (17)
NT ^{c)}	3 (6)	9 (28)	64 (84)	13 (54)
DSI ^{d)}	14 (28)	6 (19)	8 (11)	5 (21)
Total examined	50	32	76	24

*: The number of cases (% in parentheses).

^{a)} Established as PDX models, ^{b)} replaced by lymphoproliferative lesion, ^{c)} no tumor tissue detected in the engrafted site, ^{d)} passage terminated because of death or infection in host.

Table 3-2. Comparison of gross and histopathological findings in the mass

		EST ^{a)}		LPL ^{b)}	
		1st ^{c)}	2nd ^{d)}	1st	2nd
No. examined		8	8	7	7
Mass					
Histological finding	LPL	0	0	7	7
Spleen					
Histological finding	LPL	2	0	7	7
Gross finding	Enlarged	3 ^{e)}	0	6	6
Organ Weight (mg)					
	Mean	90	25	122	389
	Maximum	233	37	303	822
	Median	42	24	72	477
	Minimum	17	19	34	35

- ^{a)} Established tissue line, ^{b)} Lymphoproliferative lesion, ^{c)} 1st generation of serial passage,
^{d)} 2nd generation of serial passage, ^{e)} Severe extramedullary hematopoiesis was observed
in 1 animal.

Table 3-3. Effects of rituximab-treatment to prevent LPL

Organ/Tissue	Treatment	Vehicle		Rituximab	
	Generation	1st	1st	1st	2nd
	No. of mice	2	2	2	2
Mass at engrafted site	Engrafted CRC ^{a)}	0	2	2	2
	LPL ^{a)}	2	0	0	0
Spleen	Enlarged ^{b)}	1	0	0	0
	LPL ^{a)}	2	0	0	0

Generation: 1st, 1st generation of serial passage; 2nd, 2nd generation of serial passage;
LPL, Lymphoproliferative lesion; CRC, Colorectal cancer.

a) Histopathological examination, b) Gross examination.

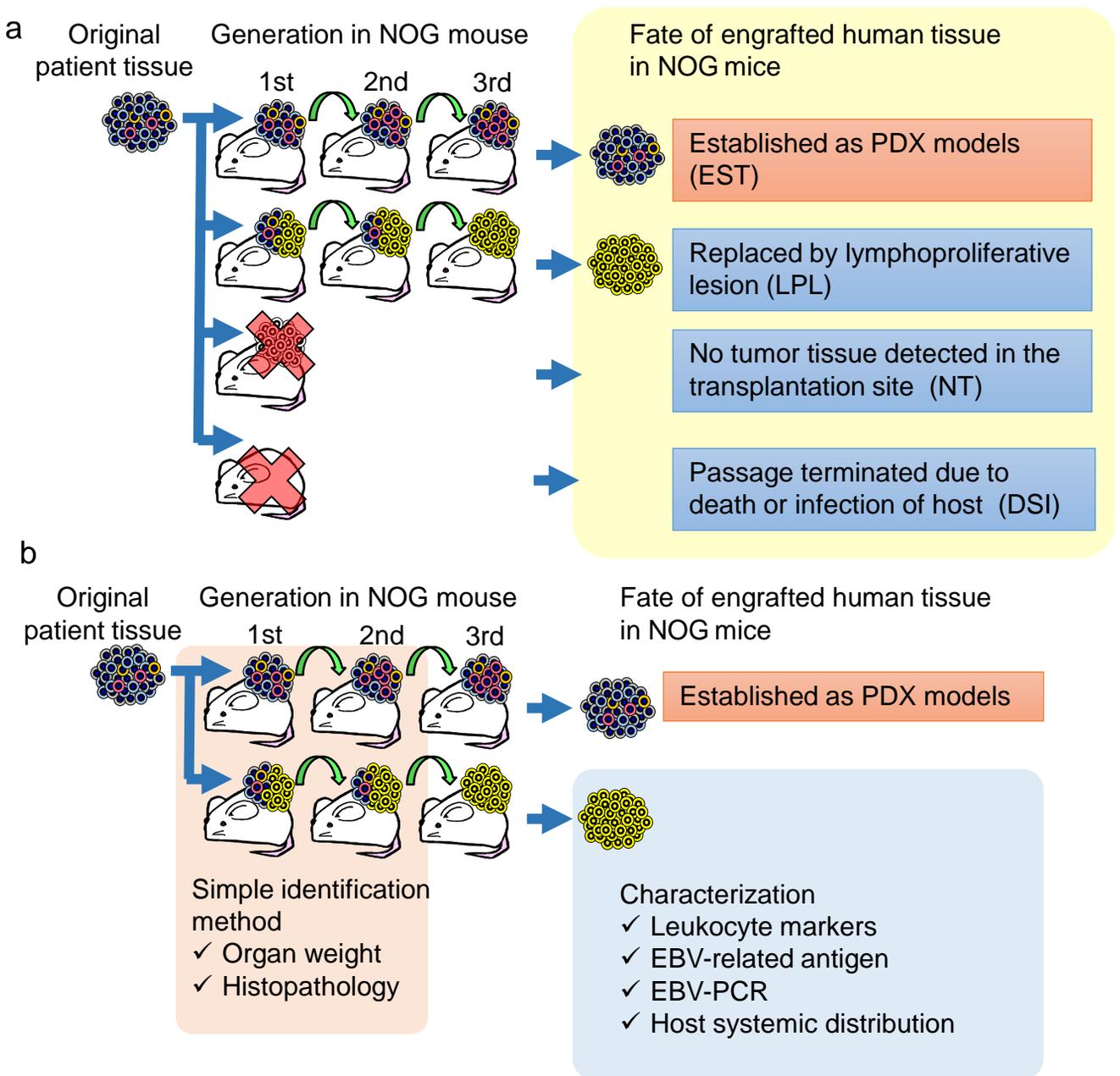


Figure 3-1. Study scheme. Analysis of the outcome of engrafted human tumor tissues (a). The tissues were passaged through 3 generations for establishment. In some cases, the palpable mass formed after engraftment consisted of a lymphoproliferative lesion (LPL) that was thought to replace the original tumor cells. In other cases, establishment was unsuccessful because no palpable mass was formed after engraftment or because of unscheduled death of the mouse. Analysis of LPL (b). The LPL was characterized by examining leukocyte markers and EBV-related antigen, and by detection of the virus. The systemic distribution of LPL in the affected NOG mouse was also determined.

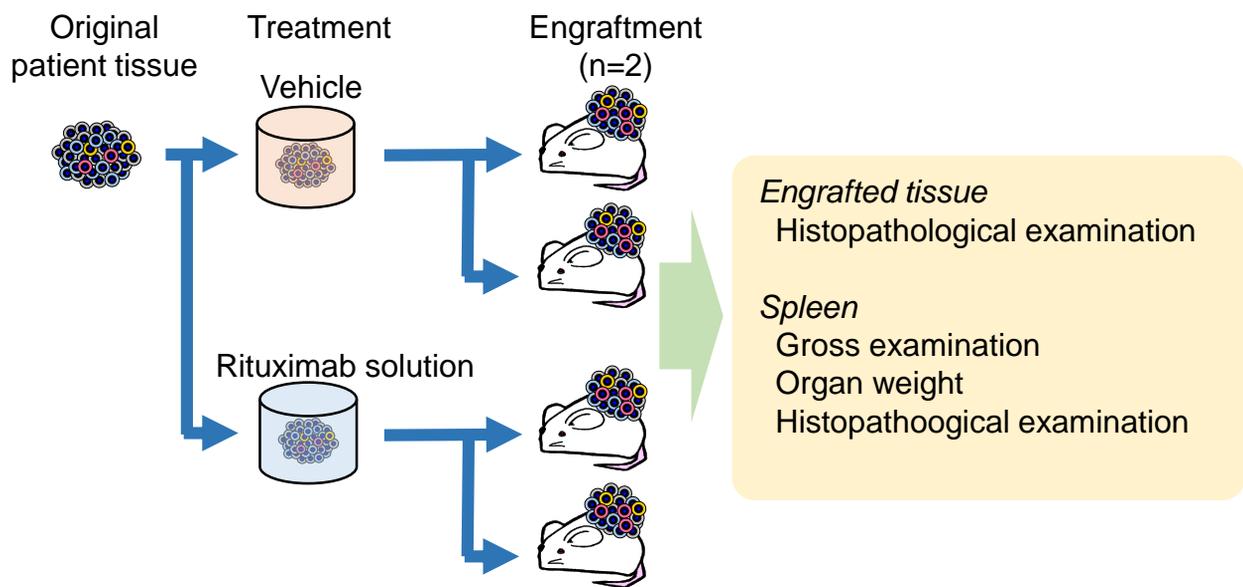


Figure 3-2. Preventive treatment with rituximab. The original patient tissues were soaked in the vehicle or rituximab solution prior to engraftment. Two mice were allocated to the vehicle and rituximab group respectively. At necropsy, the spleen was grossly examined and weighed. The engrafted tissue and spleen were collected and examined histopathologically.

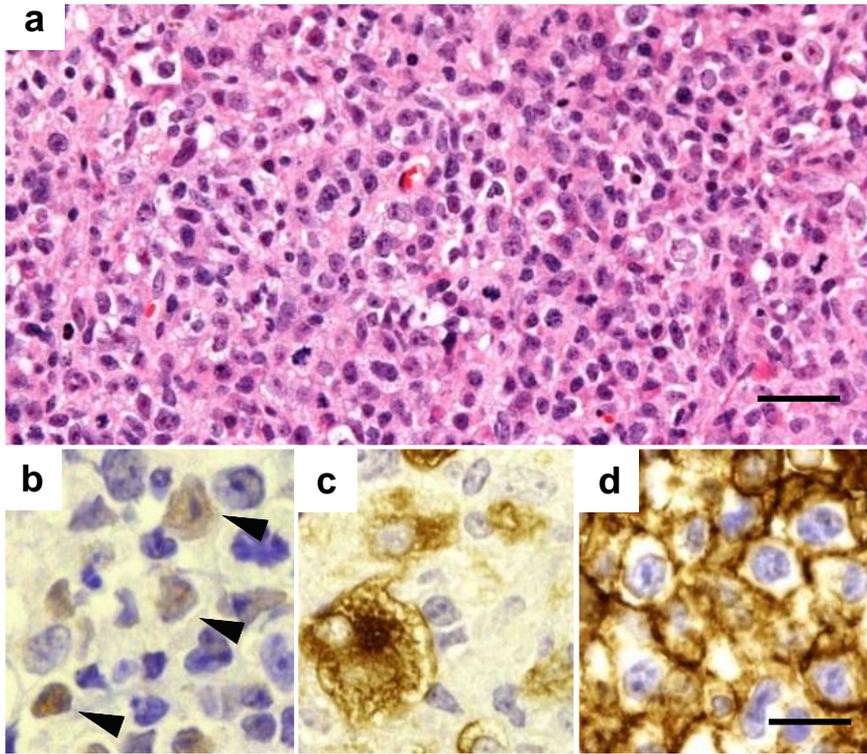


Figure 3-3. Characterization of LPL in the palpable mass. A mixed population of lymphoid cells is observed in the palpable mass of an affected case (a). The lymphoid cells are positive for EBNA2 (b), LMP-1 (c) and human CD20 (d). Arrowheads in (b) indicate positive cells. Bars=25 μ m (a) and 15 μ m (b, c, d), respectively. H&E stain (a) and immunohistochemistry by the labeled streptavidin-biotin method (b, c, d).

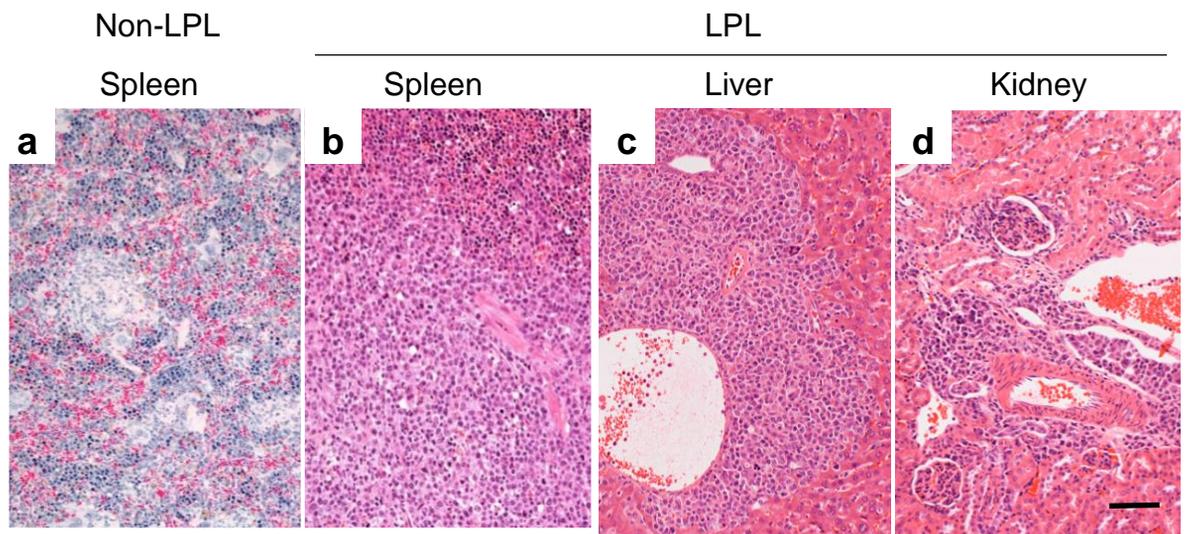


Figure 3-4. Distribution of LPL in NOG mice. Unaffected (a) and affected (b) spleens, respectively. LPL is also seen in the Glisson's sheath of the liver (c) and in the perivascular area in the renal cortex (d). Bar=50 μ m. H&E stain.

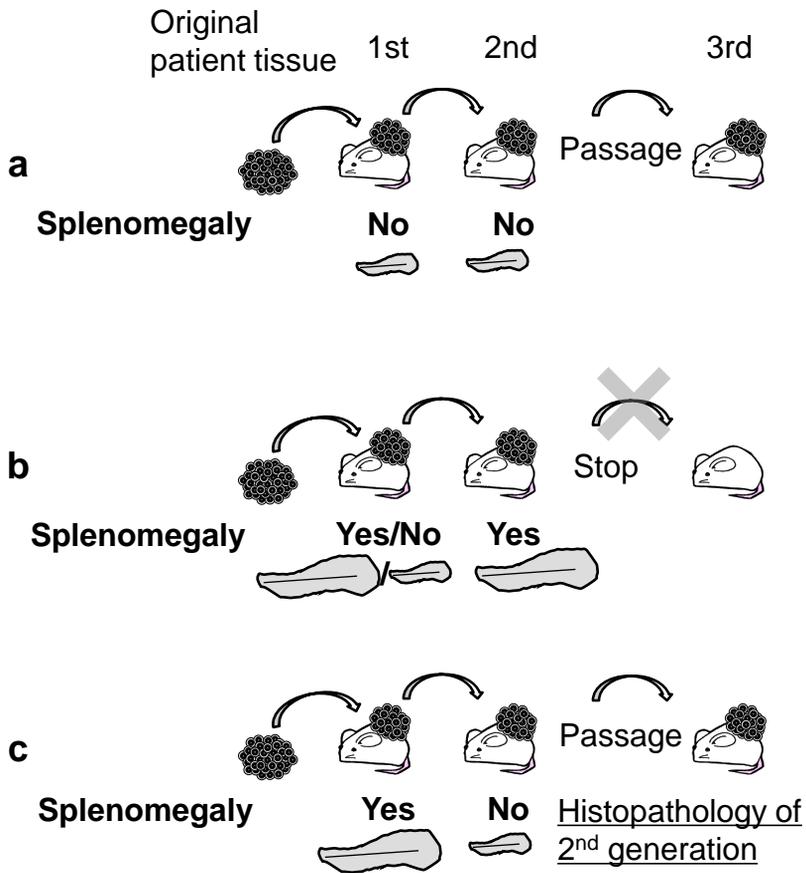


Figure 3-5 Proposal of a method of early detection and early termination of LPL cases at necropsy. The following decisions can be made at necropsy by gross examination of the mouse spleen: If there is no splenomegaly in the 1st and 2nd generation, passage should proceed (a), but if there is splenomegaly in the 2nd generation regardless of the results of the 1st generation, further passage should be terminated (b). If there is splenomegaly in the 1st generation but not in the 2nd generation, the tissue should be passaged, and the spleen of the 2nd generation should be examined histopathologically (c).

第4章 初代移植におけるヒト腫瘍組織由来
tumor infiltrating lymphocytes の移植組織生着へ
の影響

はじめに

第3章ではLPLと移植した腫瘍が増殖しないという現象が主要なPDXモデル樹立阻害要因であることを明らかにした。LPLについては早期発見・淘汰、あるいはEBV感染リンパ球の除去により樹立効率の向上が望めることが明らかとなった。本章では、PDXモデル樹立阻害のもうひとつの主要要因である「移植した腫瘍が増殖しない」という現象について検討した。具体的には、腫瘍の悪性度（腫瘍の分化度、臨床的進行度）ならびに腫瘍の免疫環境の構成要素である腫瘍浸潤リンパ球 tumor infiltrating lymphocytes (TIL) の腫瘍生着・増殖への影響を検討した。

これまでの研究により、原発腫瘍の悪性度と移植腫瘍組織の生着・増殖との関連が指摘されている (Tentler JJ *et al.*, 2012; Williams SA *et al.*, 2013)。例えば、大腸癌、非小細胞肺癌、乳癌を免疫不全マウスに移植した際の移植原腫瘍の組織学的分化度や腫瘍径あるいは当該患者の生存率と移植成立との関連が報告されている (DeRose Y *et al.*, 2011; John T *et al.*, 2011; Julien S *et al.*, 2012; Lin D *et al.*, 2014)。また、上記を含めた40種類以上の癌を nude マウスに移植した場合でも同様な結果が示されている (Monsma DJ *et al.*, 2012)。

今回用いた PDX モデル樹立のための移植手法では腫瘍細胞とともに TIL を含む間質構成細胞も移植されている。間質構成細胞は重度の免疫不全マウスに移植することで生着することが報告されており (Williams SS *et al.*, 1996; Simpson-Abelson *et al.*, 2008)、本研究においても血管内皮細胞など間質構成細胞が NOG マウスに移植生着することを示してきた。また、scid マウスに移植した TIL が immunoglobulin や IFN- γ を産生することも示されている (Bankert RB *et al.*, 1989; Sugiyama Y *et al.*, 2001)。さらに、scid マウスよりも重度の免疫不全状態に

あり、NOG マウスと同様の免疫学的性質を有する NSG マウスにおいても同じ現象が報告されている (Simpson-Abelson *et al.*, 2008)。したがって、腫瘍組織とともに移植された TIL と移植腫瘍の生着・増殖との関連を研究する必要があると考えた。

移植された TIL と腫瘍の生着・増殖との関連についての報告は非常に少なく、ヒト肺癌移植マウスにおいて TIL が産生する IgG の血中濃度が移植腫瘍の増殖と関連するとの報告があるのみである (Williams SS *et al.*, 1996; Mizukami M *et al.*, 2006)。TIL と移植腫瘍の生着・増殖との関連を知るためには液性免疫ばかりでなく細胞性免疫をも含む移植組織の免疫環境を解析する必要があると考えられる。移植組織の免疫環境と移植成立の関係を直接解析した報告はないが、複数種類の癌で腫瘍の免疫環境が移植組織の生着・増殖に影響することが示されている (Monsma DJ *et al.*, 2012)。近年、腫瘍の免疫微小環境を表す概念として immune contexture が提唱されている。immune contexture はヒト腫瘍における浸潤 T 細胞のタイプ、局在、密度の記述により構成される (Galon J *et al.*, 2006; Camus M *et al.*, 2009)。

本章ではまず初めに、ヒト大腸癌組織を用いて、移植原腫瘍の分化度・臨床的進行度と移植腫瘍の生着・増殖の関係を解析した。次に、大腸癌を移植した NOG マウスにおける TIL 産生 immunoglobulin と移植原腫瘍の immune contexture を解析し、移植腫瘍の生着・増殖との関係を検討した。

材料および方法

動物

実験動物中央研究所より 5-6 週齢の NOG マウスを入手し、馴化期間の後 6-12 週齢で移植実験に供した。動物は bioBubble system (bioBubble) にて病原菌フリーの状態、室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 60-80%、12 時間照明/12 時間消灯のサイクルの条件下で飼育した。飼育はペレット (CE-2、CLEA Japan) を不断給餌し、蒸留水を不断給水した。動物実験操作は PLR の Animal Care and Use Committee にて審査・承認されたものであり、PLR の Animal Research Guideline を遵守して行われた。

ヒト腫瘍組織

本章の実験で使用されたヒト腫瘍組織は全て実験に供されることに同意した患者のものであり、その使用について PLR および Parkway Laboratory Services 社の倫理委員会にて審査・承認された。

PLR の契約医療機関に所属する病理医が診断した 48 例のヒト大腸癌組織を移植実験に用いた。移植実験に供した腫瘍組織は無菌的に分割し、1 分割片は 5% penicillin、streptomycin、neomycin 混合剤を含む Hanks balanced salt solution に浸漬して移植実験に供し、1 分割片は病理組織学的解析に用いた (Figure 4-1)。移植用の分割片は 5 mm^3 に細切し、移植対象 NOG マウス 1 頭あたり 200 mm^3 程度を移植した。移植は移植針を用いて NOG マウスの腰背部皮下に行った。移植後、移植部位における腫瘍の形成を観察し、腫瘍体積が約 1 cm^3 に達した場合に腫瘍組織を採取した。採取は NOG マウスをエーテル深麻酔下にて腹大動脈からの放血により安楽死処置して行った。採取した組織は病理組織学的解析に供し

た (Figure 4-1)。

病理組織学的解析

移植原大腸癌組織および NOG マウス移植組織を 4%PFA 溶液にて 4°C で 16-24 時間固定し、AMeX 法 (Suzuki M *et al.*, 2002; Sato Y *et al.*, 1986) にてパラフィン包埋した。パラフィンブロックは 4°C にて保管した。パラフィンブロックより定法に従い厚さ 3-5 μm の薄切標本を作製し、HE 染色を施した。

免疫組織化学的検索

パラフィンブロックより定法に従い厚さ 3-5 μm の薄切標本を作製し、免疫組織化学的検索に供した。免疫組織化学的検索には Ventana HX Discovery System (Ventana Medical Systems) を用い、labeled streptavidin-biotin (LSAB) 法により行った。一次抗体として抗ヒト CD3 (クローン F7.2.38, Dako Cytomation) と抗ヒト CD8 (クローン C8/144B, Dako Cytomation) マウスモノクローナル抗体を用いた。非特異反応を抑えるための protein block (Dako Cytomation) 処理と内因性 peroxidase 除去のための 0.3% H_2O_2 メタノール溶液処理を行った後、一次抗体と二次抗体 (Universal secondary antibody, Ventana Medical Systems) を順次反応させ、peroxidase (HRP) 標識 streptavidin (Ventana Medical Systems) を反応させた。抗体反応可視化は 0.02% DAB 溶液 (Ventana Medical Systems) を用いた DAB-peroxidase 反応により行った。核染色をヘマトキシリンで行い、封入した。

NOG マウス血清中のヒト immunoglobulin の測定

大腸癌移植 NOG マウスの血清は、眼窩採血にて経時的に採取した。剖検時は腹大動脈から採血した (Figure 4-1)。NOG マウス血清中のヒト

immunoglobulin 濃度は sandwich ELISA 法により測定した。抗ヒト IgG 抗体 (Dako Cytomation) または抗ヒト IgM 抗体 (Dako Cytomation) をそれぞれ 100 μ l/well ずつ 96-well のプレートに添加し、4°Cで一晩静置することにより固相化した。次に、100 μ l の NOG マウス血清または標準溶液を各 well に添加し、37°Cで 45 分間反応させた。さらに、100 μ l の HRP 標識抗ヒト IgG (または IgM) 抗体を添加し、37°Cで 45 分間反応させた。測定は一点希釈法とし、n=2 で実施した。波長 492 nm における吸光度 (OD) を測定し、標準溶液の測定値より得られた検量線を用いて血清中の抗体量を算出した。OD の測定及び抗体量の定量には Tecan Sunrise RC Automated Microplate Reader with Magellan Data Reduction Software (Endotoxin Testing Solutions LLC., Charleston, SC, USA) を使用した。

統計学的解析

移植成立例と非成立例間の移植後同一時点における immunoglobulin 濃度の差について Wilcoxon 順位和検定を行い、5% 水準で判定した。

移植組織の移植成立評価と形態学的特徴

NOG マウス 74 頭に移植したヒト大腸癌組織 48 症例について病理組織学的に解析した。移植部にヒト大腸癌特有の管状あるいは胞巣状の構造を形成する腫瘍細胞が観察される場合を移植成立、腫瘍細胞が認められない、あるいはごく少数の腫瘍細胞が不完全な構造を形成している場合を非成立とした。

まず初めに、移植成立に影響する宿主側の要因を検討するために、同一ヒト症例から 2-4 頭の NOG マウスに移植した組織の移植成立の有無を比較した。この検討には大腸癌 20 症例の組織を 46 頭の NOG マウスに移植した組織を用いた。同一ドナーの組織を複数の NOG マウスに移植した場合、いずれかのマウスで生

着腫瘍細胞がみられた場合に移植成立例とした。

次に、移植原腫瘍の悪性度と移植成立との関係を検討するために、移植原腫瘍の組織学的分化度および臨床的進行度を示す病期ステージと移植成立状況を解析した。組織学的分化度と病期ステージは病理医による診断によった。ヒト大腸癌の組織学的分化度はGrade 1: 高分化 (well differentiated)、Grade 2: 中分化 (moderately differentiated)、Grade 3: 低分化 (poorly differentiated) とし、病期ステージはTNM分類に従ってステージIからIVとした。

さらに、移植組織の詳細な病理組織学的観察を行い、腫瘍細胞の生着もしくは変性・壊死、リンパ球浸潤の有無および線維化などを評価した。

NOG マウス血清中のヒトimmunoglobulinの解析

ヒト大腸癌を移植した NOG マウスの血清中ヒト immunoglobulin 濃度を経時的に測定した。本解析には 9 症例のヒト組織を 16 頭の NOG マウスに移植し、そのマウス血清を用いた。移植後 1-6 週に採取した血清中のヒト IgG および IgM 濃度を測定した。さらに、移植が成立した 11 症例の大腸癌組織が移植されていた 18 頭の NOG マウスと、移植が非成立であった 8 症例の大腸癌組織が移植されていた 12 頭の NOG マウスの血清 immunoglobulin 濃度を、移植後 3 週及び 6 週に測定した。

移植原腫瘍組織におけるT cellのタイプ、組織内局在および細胞密度の免疫組織化学的解析

Camusらの方法 (Camus M *et al.*, 2009) に準じて、ヒト大腸癌組織中のT細胞のタイプ、組織内局在、細胞密度を解析することでimmune contextureを評価した。

ヒト大腸癌 48 症例について前章と同様の方法でパラフィン切片を作製し、免疫組織化学的に CD3 陽性細胞の密度および CD8 陽性細胞の CD3 陽性細胞に対する割合を *invasive margin* (IM) と *center of tumor mass* (CT) について評価した。この結果から症例を 4 群に分類した (Figure 4-2)。i 群は腫瘍細胞を抑制する適切な免疫反応がある例、iv 群は腫瘍に対する免疫反応が不十分な例、ii 群と iii 群はこれらの 2 群の間に位置づけられる例とした。

結果

移植原腫瘍の組織学的分化度・病期ステージと移植成立との関係

移植したヒト大腸癌組織 48 例のうち、35 例 (73%) で病理組織学的に移植組織の生着・増殖がみられた (Table 4-1)。移植原腫瘍の組織学的悪性度と移植成立との関連では、Grade 3 症例で移植成立例の割合が 9/10 例 (90%) と高率であった。Grade 2 症例では 25/36 例 (69%)、Grade 1 症例では 1/2 症例 (50%) と Grade 3 に比べ低率であった (Table 4-1)。病期ステージについてもより病期が進行したステージで移植成立が高率である傾向にあった (Table 4-1)。なお、同一患者の大腸癌組織を複数の NOG マウスに移植した 20 症例の移植成立状況について確認したが、20 症例中 19 症例で移植成立の有無はマウスの個体によらず一致していた (Table 4-2)。

NOG マウス移植組織の病理組織学的特徴

移植原腫瘍の悪性度以外の移植組織の生着・増殖に影響する要因を明らかにするために移植組織を病理組織学的に解析した。移植が成立した NOG マウス 55/74 頭のうち、30 頭でリンパ球浸潤が認められた。このうち 26 頭ではリンパ球が間質にび漫性に認められたが、腫瘍細胞の退行性病変は認められなかった。残りの 4 頭では生着した腫瘍細胞に隣接してリンパ球が浸潤し、一部の腫瘍細胞で変性・壊死と線維化が認められた (Figure 4-3a, b)。

次に、移植非成立例 19/74 頭を解析した結果、6 頭では変性・壊死細胞を含むわずかな腫瘍細胞の残存とそれを取り囲むリンパ球浸潤が認められた。10 頭では移植部位に腫瘍細胞を認めず、線維化のみがみられ、うち 6 頭では線維化巣を取り囲んでリンパ球浸潤が認められた (Figure 4-3c, d)。残りの 3 頭では

明瞭な線維化・リンパ球浸潤はみられず、腫瘍細胞がわずかに残存していた。

NOG マウス血清中のヒト immunoglobulin

血清中のヒト immunoglobulin 濃度の経時的推移について検討したところ、少なくとも 1 時点で 100 µg/mL を超える血清ヒト IgG 濃度の上昇が 13/16 頭でみられた (Figure 4-4)。血清 IgG 濃度は移植 1-2 週で低く、4-6 週にかけて上昇、あるいはピークを迎えた。血清 IgG 量と移植成立の関連性を検討するために、移植成立例と非成立例の血清 IgG 濃度を移植後 3 および 6 週の 2 タイムポイントで解析したところ (Figure 4-5)、いずれの時点でも群間で有意差は認められなかった。

血清ヒト IgM 濃度は IgG 濃度と比較して低かったが、経時的な上昇が認められたという点では IgG と同様であった (Figure 4-4)。移植非成立群は成立群と比較して血清 immunoglobulin 濃度が低い傾向にあり、特に IgM 濃度は低かった (Figure 4-5)。

移植原腫瘍組織における T cell のタイプ、局在および密度

移植原大腸癌組織と NOG マウス移植組織の両方にヒト CD3 または CD8 陽性細胞が認められ、NOG マウスには腫瘍組織とともに T リンパ球も移植されることが確認された (Figure 4-6)。

移植原大腸癌組織を Figure 4-2 に示した immune contexture 分類に従って 4 グループに分類し、腫瘍の生着・増殖との関連性を解析した。移植非成立例は Group i および Group ii のみに分類され、Group i はほとんどが移植非成立例であった (Table 4-3)。一方、移植成立例は全てのグループに認められ、Group ii のほとんどの例と Group iii および iv の全例で移植が成立していた (Table 4-3)。

考察

本章ではヒト大腸癌組織を用いて移植腫瘍が増殖しないという現象について検討した。初めに、原腫瘍の悪性度と移植成立の関係について解析した。大腸癌の悪性度は一般に腫瘍の組織学的分化度と、粘膜内での腫瘍の深達度およびリンパ節や遠隔臓器への転移で示される病期ステージによって判断される (Edge SB *et al.*, 2010)。本章の検討では、大腸癌細胞の分化度が低く、浸潤・転移が進んでいる症例で移植が成立しやすい傾向にあった。これらの結果は他系統のマウスを用いた大腸癌 PDX モデルの報告 (John T *et al.*, 2011; Julien S *et al.*, 2012) と同様であり、移植原腫瘍の悪性度が NOG マウスにおける移植成立に影響することが確認された。しかし、同一分化度・病期ステージの大腸癌例でも移植の成立状況が異なる場合があり、移植原腫瘍の悪性度以外にも移植の成立に関わる要因が存在すると考えられた。他の要因を探るために移植組織の詳細な病理組織学的解析を行ったところ、リンパ球の浸潤を伴う腫瘍細胞の変性・壊死、あるいは腫瘍細胞の完全な消失、線維化が観察され、腫瘍細胞の排除には原腫瘍組織由来のリンパ球が関与している可能性が示唆された。

腫瘍組織局所では、腫瘍細胞と免疫系細胞によって免疫微小環境が形成され、腫瘍の進展・増殖に関わっていると考えられている (Hanahan D *et al.*, 2011; Schreiber RD *et al.*, 2011; Mittal D *et al.*, 2014)。また、腫瘍局所には腫瘍免疫微小環境の重要な構成要素として TIL が存在する (Fridman WH *et al.*, 2012; Fridman WH *et al.*, 2013)。TIL として腫瘍組織局所に存在する B 細胞は、産生する抗体により標的タンパクの機能阻害、腫瘍抗原のオプソニン化、補体制御性腫瘍細胞傷害あるいは抗体依存性細胞傷害などの抗腫瘍作用を示すと考えられている (Nelson BH *et al.*, 2010)。ヒト肺癌組織を移植した免疫不全マウスにおいてもヒ

ト由来の B 細胞が存在し、血中には TIL-B 細胞由来のヒト IgG が検出される (Simpson-Abelson MR *et al.*, 2008)。さらに、マウス血中のヒト IgG には腫瘍細胞に反応する抗体が含まれ、血中抗体濃度が高いほど移植腫瘍は増殖しないとの報告がある (Imahayashi S *et al.*, 2000; Yasuda M *et al.*, 2002; Yasuda M *et al.*, 2006、Williams SS *et al.*, 1996; Mizukami M *et al.*, 2006)。TIL-B 細胞が産生する抗体の機能は明確にされていないが、抗腫瘍的に作用しているものと考えられている (Imahayashi S *et al.*, 2000; Yasuda M *et al.*, 2002; Yasuda M *et al.*, 2006、Williams SS *et al.*, 1996; Mizukami M *et al.*, 2006)。

そこで、今回ヒト大腸癌を移植した NOG マウスにおいて TIL 産生 immunoglobulin の血中濃度と移植成立との関連を検討した。その結果、ヒト大腸癌移植 NOG マウスにおいても TIL が産生したヒト immunoglobulin が確認された。移植成立例では、有意差はないものの、非成立例に比べて血中ヒト IgG 濃度および IgM 濃度がむしろ高い傾向が認められた。従って、ヒト大腸癌移植 NOG マウスにおいて TIL 産生 immunoglobulin が腫瘍の生着・増殖を阻害するとは判断できなかった。免疫不全マウスにヒト肺癌組織を移植した場合、血中 immunoglobulin 濃度が高いほど腫瘍が増殖しないという報告が 2 つの研究グループから出されているが、原発の肺癌の組織型との関係については結果が一致していない (Williams SS *et al.*, 1996; Mizukami M *et al.*, 2006)。ヒト腫瘍組織を移植したマウスにおける血中ヒト immunoglobulin 濃度と腫瘍の生着・増殖との関連性については今後より詳細な検討が必要と考えられた。

腫瘍組織に浸潤する T 細胞と移植腫瘍生着との関連についてこれまで報告はない。しかしながら Galon らはヒト大腸癌組織の浸潤先端と腫瘍中心部で T 細胞密度が高く、腫瘍細胞を排除する免疫環境にある症例の予後は良好であり、免疫環境の解析により予後を予測できることを報告した (Galon J *et al.*, 2006;

Fridman WH *et al.*, 2012)。さらに、Camus らは、ヒト大腸癌において浸潤している T 細胞の immune contexture と腫瘍の進展・増殖・転移との関係を明らかにした (Camus M *et al.*, 2009; Fridman WH *et al.*, 2012; Fridman WH *et al.*, 2013)。

そこで、移植原腫瘍組織における免疫微小環境が NOG マウスへの移植腫瘍の生着・増殖に影響する可能性を考え、原腫瘍組織に浸潤する T 細胞のタイプ、局在、細胞密度と移植成立との関係を解析した。その結果、移植非成立例では、移植原腫瘍組織が Group i もしくは ii に分類され、腫瘍の進展・増殖を抑制する免疫環境にあった。一方、移植成立例は Group iii または iv であることが多く、免疫反応が腫瘍の進展・増殖を抑制していないことが示された。これらの結果から、TIL-T 細胞に関連する immune contexture など移植原腫瘍組織の免疫微小環境が移植成立に影響することが明らかとなった。

本章の結果から、移植組織内のリンパ球を制御することで移植効率を向上させることが可能と考えられた。具体的には、リンパ球をソーティングなどによって排除し、腫瘍細胞のみを NOG マウスに移植することも一例と考えられる。また、NOG マウスに移植されたリンパ球を制御する方法として、抗炎症ステロイド剤、calcineurin 阻害剤、シクロフォスファミドなどの免疫抑制剤投与によるリンパ球機能の抑制、あるいはリンパ球表面抗原に対する抗体の投与によるリンパ球の除去などが考えられる (Alpdogan O *et al.*, 2012; Lee RA *et al.*, 2012)。

要約

NOG マウスにおける PDX モデル樹立効率向上を目指し、移植腫瘍が増殖しない現象についてヒト大腸癌を用いて検討を行った。移植原腫瘍の悪性度が高い症例で移植が成立する傾向にあったが、同一の悪性度でも移植成立例と非成立例が認められた。さらに、移植腫瘍組織内のヒトリンパ球が腫瘍細胞の生着の有無に関与する可能性が強く示唆された。また、腫瘍組織とともに移植されたヒトリンパ球の影響として移植マウスの血中ヒト immunoglobulin 濃度と移植成立の関係を解析したところ、IgG、IgM 濃度が高い症例ほど移植が成功する傾向にあり、移植阻害要因とは判断されなかった。次に、immune contexture の影響を検討するために移植原腫瘍組織における T 細胞の状況を調べた結果、腫瘍の進展・増殖を抑制する免疫環境にある腫瘍は移植非成立例、そうでない腫瘍は成立例である割合が高かったことが示された。以上より、ヒト大腸癌組織の移植では、その悪性度に加えて移植原腫瘍組織の immune contexture も生着の有無と関係することが明らかとなった。従って、ヒト大腸癌 PDX モデルにおいては、移植原腫瘍とともに移植されたヒトのリンパ球を制御することにより移植効率向上の可能性が見出された。

Table 4-1. Relationship of the aggressiveness of the original patient tumor and engraftability

	Tumor grade			Total
	G1 (well)	G2 (moderate)	G3 (poor)	
Successful	1*	25	9	35
Unsuccessful	1	11	1	13

*Number of original donor cases.

Successful, successful engraftment; Unsuccessful, unsuccessful engraftment.

Comparison of disease stage of the donor with engraftability

	Disease stage (TMN classification)				Total
	I	II	III	IV	
Successful	0*	7	19	9	35
Unsuccessful	3	3	5	2	13

*Number of original donor cases.

Successful, successful engraftment; Unsuccessful, successful engraftment.

Table 4-2. The fate of donor-matched tissues engrafted into NOG mice

Fate	Patient ID	No. of mice	
		Positive	Negative
All successful	d1	3	0
	d2	2	0
	d4	2	0
	d5	2	0
	d6	2	0
	d7	2	0
	d8	2	0
	d9	2	0
	d11	2	0
	d12	2	0
	d13	4	0
	d14	4	0
	d16	2	0
	d17	3	0
Both outcomes	d3	1	1
All unsuccessful	d10	0	2
	d15	0	2
	d18	0	2
	d19	0	2
	d20	0	2

The numbers in the table show the number of mice.
 Positive, positive engraftment; Negative, negative engraft

Table 4-3. Comparison of the outcome of engraftment with the immune contexture of original donor tissues

Immune contexture	Outcome of engraftment	
	Successful	Unsuccessful
Group i	1*	3
Group ii	6	1
Group iii	4	0
Group iv	1	0

* Number of original donor cases.

Successful, successful engraftment; Unsuccessful, unsuccessful engraftment.

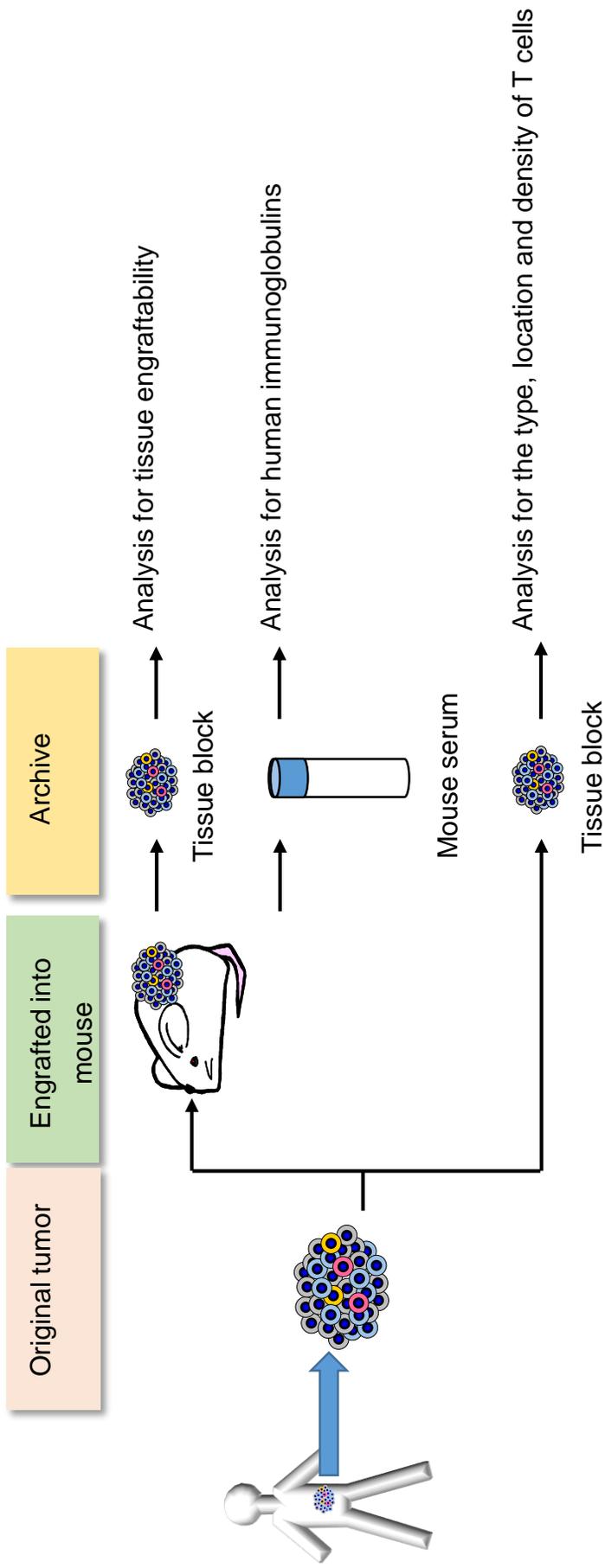


Figure 4-1. Scheme of sample collection. Original tumor tissues (tissues before engraftment) and engrafted tissues (tissues after engraftment) were selected from the tissue archive at PharmaLogicals Research Pte.

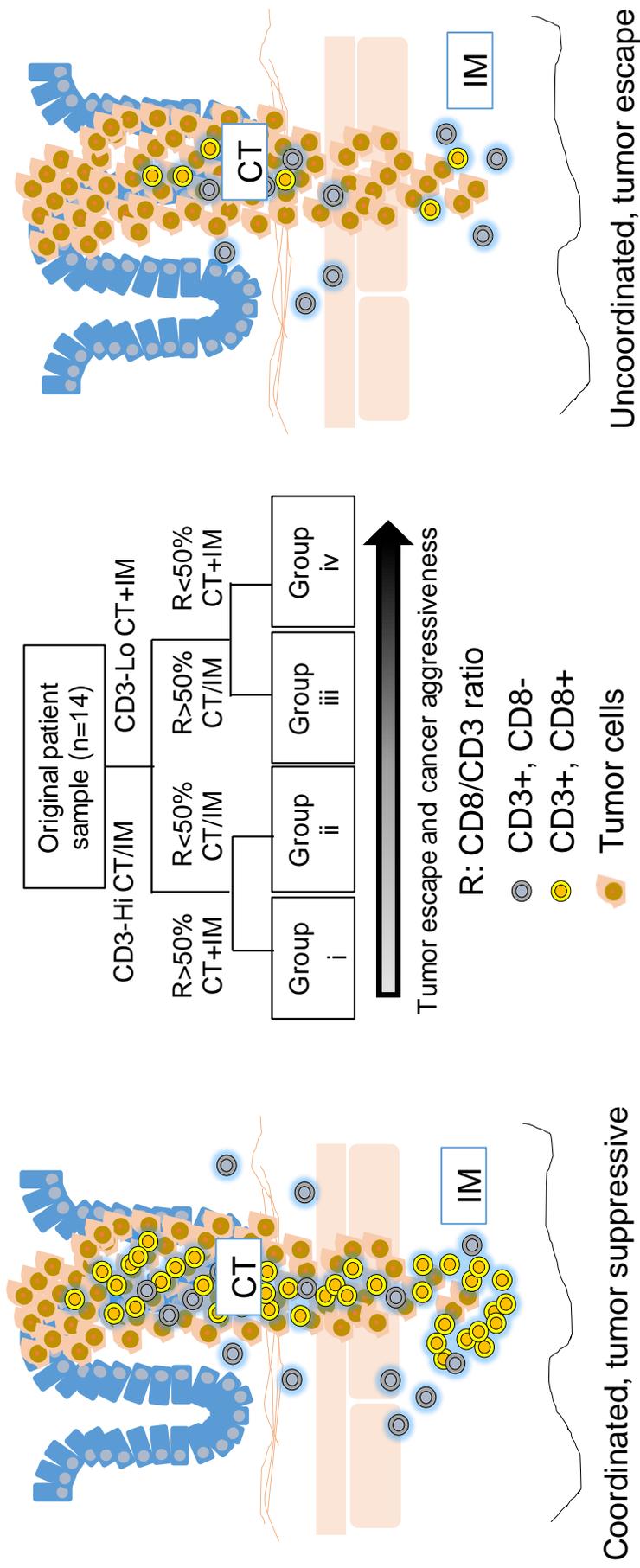
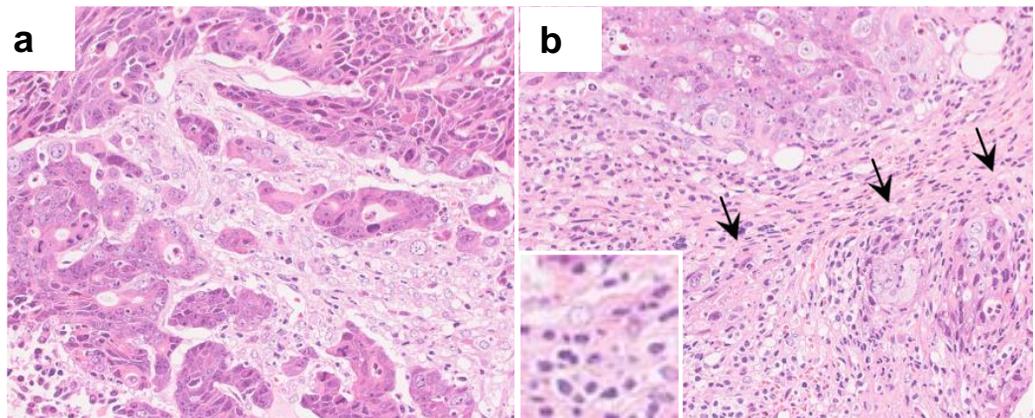


Figure 4-2. Decision tree for analysis of T cells in original tumor tissues. The cases were grouped into Groups i to iv according to the analysis of T cells. CT, center of tumor; IM, invasive margin; CT+IM, both CT and IM; CT/IM, CT and/or IM; CD3-Hi, higher density of CD3-positive cells; CD3-Lo, lower density of CD3-positive cells. R, ratio of CD8-positive cells to CD3-positive cells.

Successful engraftment



Unsuccessful engraftment

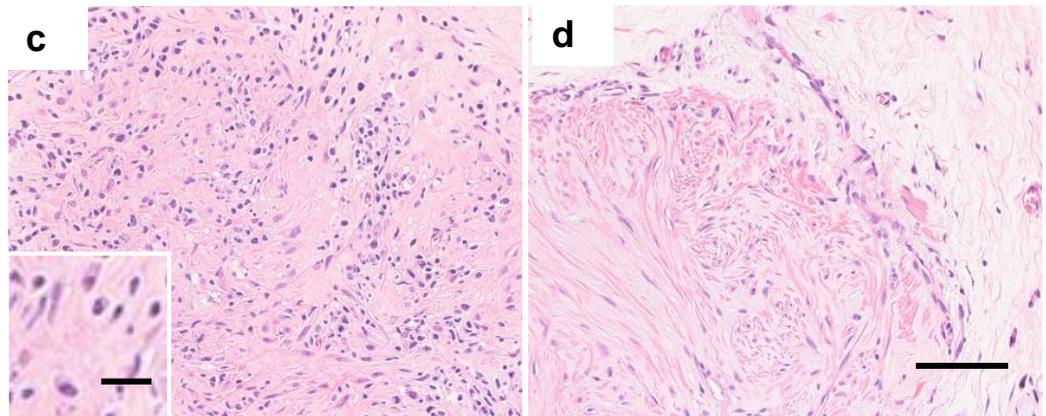


Figure 4-3. Representative images of engrafted tumor cells and lymphocytes, and host tissue reaction (fibrosis) in the engrafted tissues. Two images from the same slide of a successful-engraftment tissue (h13c) with an area of viable tumor growth and scattered infiltration of lymphocytes in the stroma (a), and an area with infiltration of lymphocytes, degeneration and necrosis of tumor cells (arrows), and fibrosis (b) are shown. Images from tissues of unsuccessful-engraftment cases with no tumor cells with (c) or without (d) lymphocyte infiltration are also shown (c, h10b, d, h20b). The inserts show a high magnification of the infiltrating lymphocytes, and plasma cells (b, c). H&E stain. Bar = 40 μm (Inserts, Bar=10 μm).

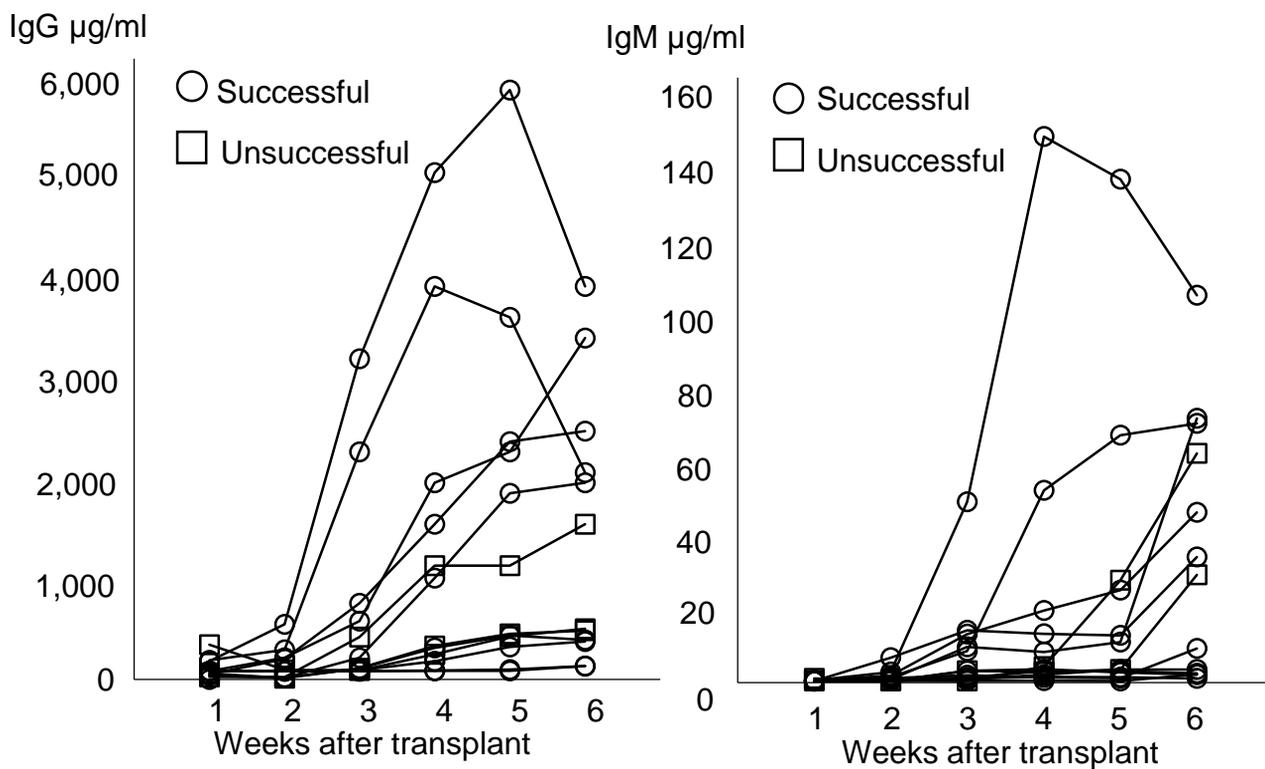


Figure 4-4. Time course observation of human immunoglobulin concentration in the NOG mouse sera. Each line represents 1 mouse.

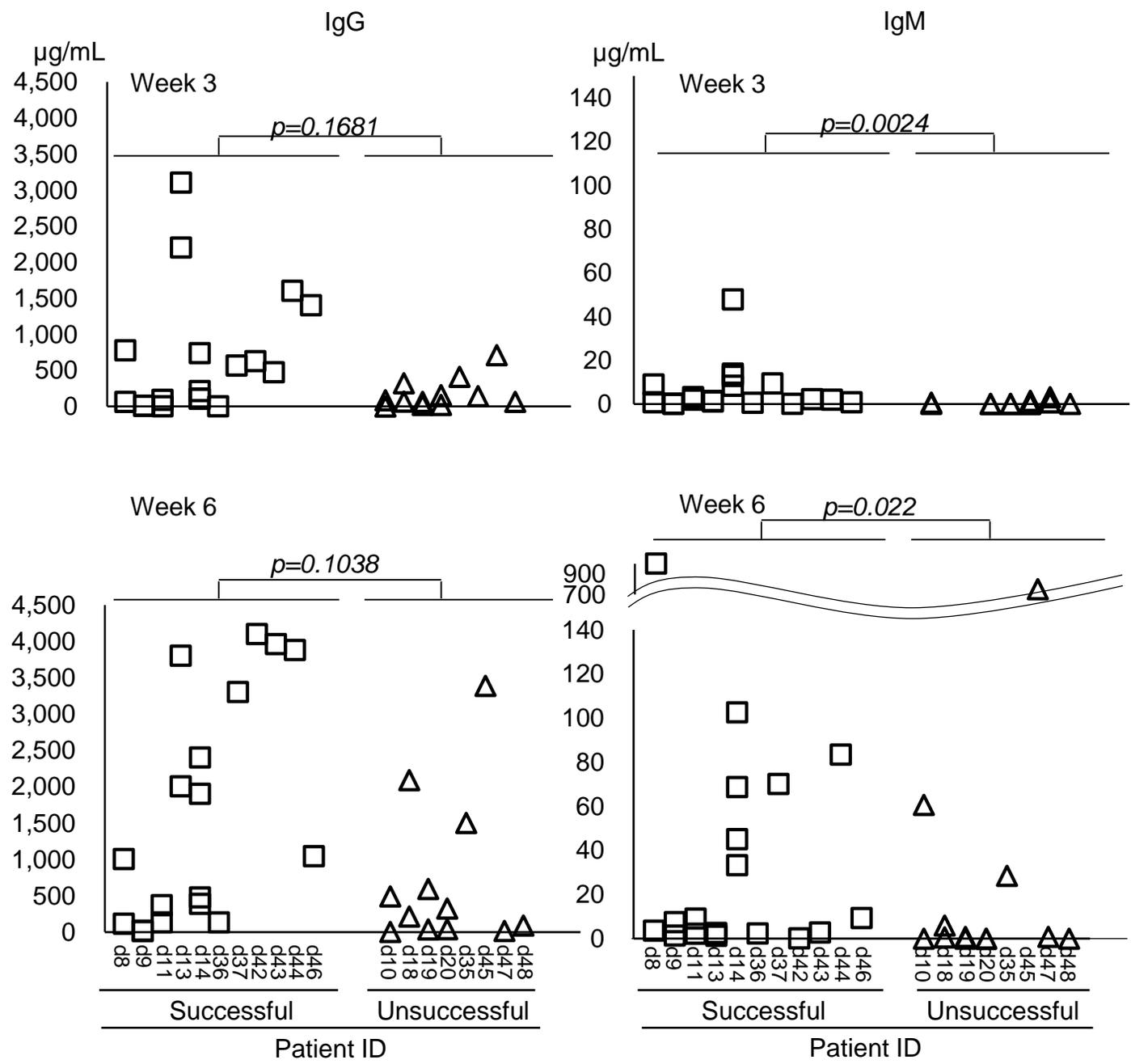


Figure 4-5. Immunoglobulin concentration in NOG mouse serum. Three and 6 weeks after engraftment of human tumor tissues. Wilcoxon rank sum test. Each column represents one patient, and each symbol one mouse.

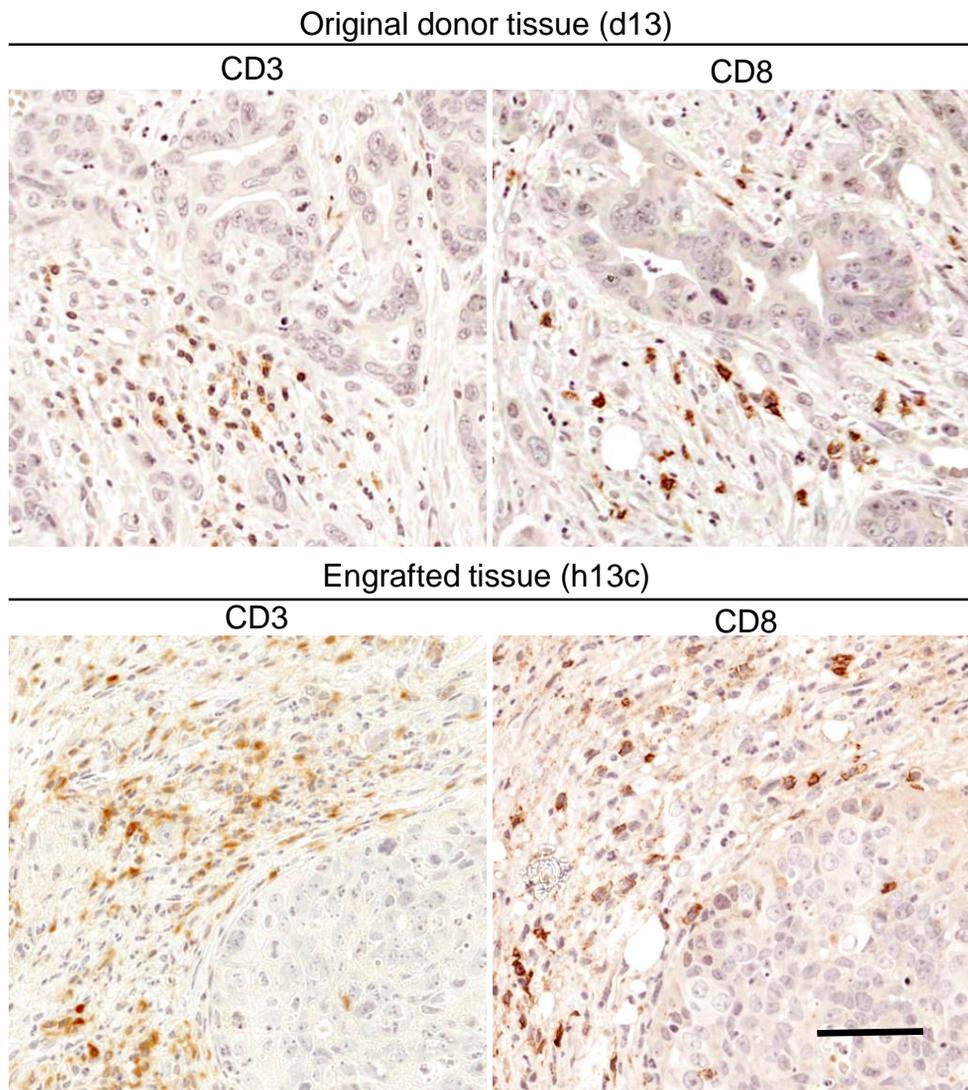


Figure 4-6. Existence of human T cells (CD3 or CD8-positive cells) in an original tumor tissue (d13, upper row) and an engrafted tissue (h13c, bottom row). CD3- or CD8-positive lymphocytes were observed not only in original tumor tissues but also in engrafted tissues. Labeled streptavidin-biotin method, bar=55 μ m.

総合考察

ヒト腫瘍組織を免疫不全マウスに移植することで作出される PDX モデルは、もとのヒト腫瘍の多様性・複雑性を反映するものと考えられており、腫瘍研究における非臨床と臨床をつなぐ重要なモデルとして期待されている。しかし、移植する腫瘍組織の種類によっては移植効率が低いこと、モデル作出のためには莫大なりソースを要することなどから、樹立効率の向上が課題と考えられている。NOG マウスはヒト組織の移植効率向上を目的として開発された実験動物であり、T、B、NK 細胞の欠損、樹状細胞、マクロファージの機能不全といった複合的な免疫不全状態にあることからヒト組織の移植に最も適している免疫不全マウスと考えられている。そこで本研究では、NOG マウスを用いた PDX モデルの医学研究分野における役割・意義を確立するために、その特徴ならびにモデル作出過程での留意点を検討した。

1. NOG マウスへのヒト腫瘍組織移植による PDX モデルの樹立とその特徴

ヒトの細胞・組織移植効率向上を目的として開発された NOG マウスに、ヒト全身諸臓器に由来する様々な腫瘍を移植し、PDX モデルの樹立を試みた。上皮系および非上皮系の腫瘍から繰り返し継代可能な PDX モデルが樹立され、その樹立効率は 54/326 (16.6%) であった。樹立された PDX モデルは移植原腫瘍の組織構造・細胞の形態および分化度を良く保持していた。移植初代組織ではヒトの間質が確認されたが、3 代組織ではマウスの組織に置換されていた。以上の結果から、NOG マウスを用いることで種々のヒト腫瘍の形態学的特徴を良く保持した PDX モデルの樹立が可能であり、ヒト腫瘍の特徴を再現できるモデルとしての有用性が示された。しかし、その樹立効率は 16.6% と期待を大きく下回るものであり、様々な腫瘍の安定した PDX モデルを樹立するには、その阻害要因を明らかにし、樹立効率を向上させることが大きな課題としてあげられた。

2. 非腫瘍組織を用いた NOG マウスにおけるヒト組織移植成立条件の検討

第1章の PDX モデル樹立実験条件下での NOG マウスのヒト組織宿主としての安定性を検討するために腫瘍組織に換えて非腫瘍組織を移植し、PDX モデル樹立効率の低さが実験環境による移植率の低下に起因するのか、あるいは腫瘍組織固有の要因によるものなのかを検討した。非腫瘍組織として過形成性甲状腺組織 (adenomatous goiter) を、PDX モデル樹立時と同一の手法で NOG マウスに移植した。その結果、高率に移植が成立し、移植組織では adenomatous goiter の形態学的特徴および甲状腺機能タンパクの発現が移植後 44 週まで維持されていた。また、同一移植原組織を複数の NOG マウスに移植した組織を比較したところ、移植期間が異なっても移植成立状況は同様であった。以上より、第1章の実験環境下で NOG マウスがヒト組織の宿主として安定であることが確認された。このことから、NOG マウスを用いた PDX モデル樹立においては、実験環境より、むしろ移植した腫瘍組織特有の移植阻害要因が存在すると考えられ、その要因を明らかとしていく必要があるものと結論した。

3. ヒト腫瘍組織移植 PDX モデルの樹立阻害要因の解析と、lymphoproliferative lesion に対する対処法の検討

PDX モデルの樹立阻害要因を、リンパ増殖性病変 (lymphoproliferative lesion、LPL) による移植組織の置換、腫瘍の増殖なし (NT)、感染症などによる継代中止や宿主の死亡 (DSI) の3つに分類したところ、LPL と NT が主要な要因であった。LPL は病理組織学的にヒト B 細胞由来リンパ球の異常増殖巣であった。増殖細胞は EBV 関連タンパクおよび DNA 陽性であったことから、LPL はヒトの lymphoproliferative disorder に類似した病態であり、移植腫瘍組織中の EBV 感染リンパ球に起因すると考えられた。LPL は移植 NOG マウスの全身諸

臓器にも発生したことから、継代時に脾腫を指標とすることで LPL の早期発見、淘汰ができる可能性が示された。また、rituximab (抗ヒト CD20 抗体) 処置により EBV 感染リンパ球を除去することで予防できる可能性も示された。

4. 初代移植におけるヒト腫瘍組織由来 tumor infiltrating lymphocytes の移植組織生着への影響

NOG マウスにおける PDX モデル樹立効率向上の可能性を検討するために、主要樹立阻害要因のうち腫瘍が増殖しない現象について検討を行った。ヒト大腸癌において、移植原腫瘍の悪性度が高い症例で移植が成立する傾向にあったが、同一の悪性度でも移植成立例と非成立例が認められた。さらに、移植組織内にリンパ球浸潤を伴う腫瘍細胞の変性・壊死などの像が認められたことから、移植腫瘍組織内のヒトリンパ球が腫瘍細胞の生着の有無に関与する可能性が強く示唆された。ヒト大腸癌移植マウスで血中ヒト immunoglobulin 濃度と移植成立の関係を解析したところ、IgG、IgM 濃度が高いほど移植が成立する傾向にあり、ヒトのリンパ球が産生する immunoglobulin が移植阻害要因とは判断されなかった。次に、immune contexture の影響を検討するために移植原腫瘍組織の T 細胞を解析したところ、腫瘍細胞を排除する免疫環境にある腫瘍は移植非成立例であり、そうでないものは成立例である割合が高いことが示された。以上よりヒト大腸癌組織の移植では、その悪性度に加えて、もとのヒト腫瘍組織の immune contexture も生着に関連することが示された。従って、ヒト大腸癌 PDX モデルにおいては移植原腫瘍組織とともに移植されたヒトのリンパ球を制御することで移植効率を向上できると考えられた。

以上本研究で得られた成果から、NOG マウスにおいて、様々な臓器・組

織由来ヒト腫瘍の形態学的特徴を反映した PDX モデル樹立が可能であることが示された。一方その樹立効率は低く、PDX モデルを医薬研究分野で活用していくためには樹立効率の向上が大きな課題として示された。この問題を解決するために本研究では NOG マウス PDX モデルの特徴を研究し、樹立効率向上のための手段を提案した。

NOG マウスは重度免疫不全動物であり、免疫系が異物を排除する機能が著しく低下しているため異種組織を容易に受け入れることができる (Zhou Q *et al.*, 2014)。特に血液系細胞の移植効率が高く、血液幹細胞を移植した免疫系再構築モデルの作出も可能である (Manz MG *et al.*, 2009; Katano I *et al.*, 2014)。固形組織についても子宮内膜や卵巣上皮について研究が進められており、移植効率が高いことが立証されている (Matsuura-Sawada R *et al.*, 2005; Terada Y *et al.*, 2008; Kikuchi-Arai M *et al.*, 2010)。また、本研究でも非腫瘍性ヒト甲状腺組織の移植率が高いことを示し、NOG マウスのヒト組織移植宿主としての安定性が確認された。

本研究ではさらに、NOG マウスにヒト腫瘍組織を移植した際に腫瘍細胞に加え、線維芽細胞、血管内皮細胞、リンパ球などのヒト間質細胞が移植されることを明らかにした。NOG マウスに移植された腫瘍細胞は分化度で代表される移植原腫瘍細胞の形態学的特徴を良く反映し、継代後もその特徴は保持された。また、腫瘍細胞を支持する間質も初代移植組織では保持されており、マウス細胞に置換するまでの移植初期の腫瘍細胞の生着や組織構築保持に寄与していると考えられた。NOG マウスのヒト組織を容易にかつ安定的に受け入れるという特性がこれらの腫瘍構成成分の移植・保持を可能とし、移植原腫瘍の組織形態をよく反映したモデルの作出に貢献していると考えられた。

一方で、本研究では腫瘍組織の間質構成成分であるリンパ球が様々な形

でモデル樹立阻害に関与していることも明らかとなった。移植したヒト腫瘍組織内の EBV 感染 B リンパ球由来の LPL は移植した腫瘍細胞を置換して腫瘍を形成するため、移植成立と誤認される。加えて EBV 感染症例を実験から除外することは難しいことから、LPL は移植効率を阻害する大きな要因となり得ることが示された。また、初代移植組織には腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) が含まれており、移植原腫瘍の免疫微小環境の immune contexture を反映して腫瘍細胞の進展・増殖を抑制する場合があることも示した。

このように、NOG マウスを用いた PDX モデル樹立過程ではヒト腫瘍の様々な構成成分が移植されるため、それらの影響を十分に考慮して実験条件を最適化していくことが必要と考えられる。本研究ではその方策の一環としてリンパ増殖性病変の対処法を提唱した。すなわち、継代時の脾腫を指標としたリンパ増殖性病変の早期発見・淘汰および rituximab 処置による予防の可能性を示した。また、TIL が腫瘍細胞の進展・増殖抑制に働くことから、TIL の制御による移植効率向上の可能性もあるかもしれない。

これら一連の研究成果は、腫瘍研究の新たなツールとして期待されている NOG マウス PDX モデルの医学研究分野での活用を促進し、腫瘍治療の進展に貢献するものである。

謝 辭

本研究の遂行と論文作成にあたり、終始ご指導、ご鞭撻をいただきご校閲を賜った東京大学・中山裕之教授ならびに内田和幸准教授に深甚なる感謝の意を表します。また同様に種々のご指導・ご援助を頂いた中外製薬株式会社・鈴木雅実博士、加藤淳彦博士に深謝の意を表します。

加えて、本研究を遂行する機会と継続的なご支援を頂いた中外製薬株式会社・山崎達美博士、岡部尚文博士、千葉修一博士、PharmaLogicals Research 社・松原亨一博士、および実験動物中央研究所・大西保行博士に心から深謝致します。

最後に、本研究を進めるにあたり、種々のご援助を頂いた中外製薬株式会社・安全性研究部、株式会社中外医科学研究所、株式会社未来創薬研究所ならびに PharmaLogicals Research 社の皆様に深く感謝致します。

参考文献

- Abe T, Tada M, Shinohara N, Okada F, Itoh T, Hamada J, Harabayashi T, Chen Q, Moriuchi T, and Nonomura K (2006). Establishment and characterization of human urothelial cancer xenografts in severe combined immunodeficient mice. *Int J Urol* 13: 47-57.
- Alpdogan O, van den Brink MR (2012). Immune tolerance and transplantation. *Semin Oncol* 39: 629-642.
- Arnedos M, Soria JC, Andre F, Tursz T (2014). Personalized treatments of cancer patients: a reality in daily practice, a costly dream or a shared vision of the future from the oncology community? *Cancer Treat Rev* 40: 1192-1198.
- Bankert RB, Balu-Iyer SV, Odunsi K, Shultz LD, Kelleher RJ Jr, Barnas JL, Simpson-Abelson M, Parsons R, Yokota SJ (2011). Humanized mouse model of ovarian cancer recapitulates patient solid tumor progression, ascites formation, and metastasis. *PLoS One* 6: e24420.
- Bankert RB, Umemoto T, Sugiyama Y, Chen FA, Repasky E, Yokota S (1989). Human lung tumors, patients' peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes propagated in scid mice. *Curr Top Microbiol Immunol* 152: 201-210.
- Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301: 527-30.
- Burgenske DM, Monsma DJ, Dylewski D, Scott SB, Sayfie AD, Kim DG, Luchtefeld M, Martin KR, Stephenson P, Hostetter G, Dujovny N, MacKeigan JP (2014). Establishment of genetically diverse patient-derived xenografts of colorectal cancer. *Am J Cancer Res* 4: 824-837.
- Camus M, Tosolini M, Mlecnik B, Pagès F, Kirilovsky A, Berger A, Costes A, Bindea G, Charoentong P, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J (2009).

- Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence. *Cancer Res.* 69: 2685-2693.
- Cang S, Mukhi N, Wang K, Liu D (2012). Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. *J Hematol Oncol* 5: 64.
- Chabner BA, Roberts TG Jr (2005). Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 65-72.
- Chen K, Ahmed S, Adeyi O, Dick JE, Ghanekar A (2012). Human solid tumor xenografts in immunodeficient mice are vulnerable to lymphomagenesis associated with Epstein-Barr virus. *PLoS One* 7: e39294.
- Cheung-Ong K, Giaever G, Nislow C (2013). DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. *Chem Biol* 20: 648-659.
- Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action (2014). *Eur J Pharmacol* 740: 364-378.
- de Gramont A, Watson S, Ellis LM, Rodón J, Tabernero J, de Gramont A, Hamilton SR. Pragmatic issues in biomarker evaluation for targeted therapies in cancer (2014). *Nat Rev Clin Oncol* Epub ahead of print.
- DeRose YS, Wang G, Lin YC, Bernard PS, Buys SS, Ebbert MT, Factor R, Matsen C, Milash BA, Nelson E, Neumayer L, Randall RL, Stijleman IJ, Welm BE, Welm AL. Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes (2011). *Nat Med* 17: 1514-1520.
- Dong X, Guan J, English JC, Flint J, Yee J, Evans K, Murray N, Macaulay C, Ng RT, Gout PW, Lam WL, Laskin J, Ling V, Lam S, Wang Y (2010). Patient-derived first generation xenografts of non-small cell lung cancers: promising tools for

- predicting drug responses for personalized chemotherapy. *Clin Cancer Res* 16: 1442-1451.
- Doroshov JH, Kummar S. Translational research in oncology — 10 years of progress and future prospects (2014). *Nat Rev Clin Oncol* 11: 649-662.
- Edge, S.B., Byrd, D.R., Compton, C.C., Fritz, A.G., Greene, F.L., Trotti III, A. eds (2010). pp. 1-22. General Information on Cancer Staging and End-Results Reporting. In: *Cancer Staging Handbook From the AJCC Cancer Staging Manual, 7th Edition*. Springer New York Dordrecht Heidelberg London.
- Faggiano A, Caillou B, Lacroix L, Talbot M, Filetti S, Bidart JM, Schlumberger M. Functional characterization of human thyroid tissue with immunohistochemistry (2007). *Thyroid* 17: 203-211.
- Fridman WH, Dieu-Nosjean MC, Pagès F, Cremer I, Damotte D, Sautès-Fridman C, Galon J (2013). The immune microenvironment of human tumors general significance and clinical impact. *Cancer Microenviron* 6: 117-122.
- Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12: 298-306.
- Fukuda K, Saikawa Y, Sako H, Yoshimura Y, Takahashi T, Wada N, Kawakubo H, Takeuchi H, Ohmori T, Kitagawa Y (2013). Establishment and characterization of novel cell lines and xenografts from patients with gastrointestinal stromal tumors. *Oncol Rep* 30: 71-78.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313: 1960-

1964.

Giovanella BC, Fogh J (1985). The nude mouse in cancer research. *Advances in cancer research. Adv Cancer Res* 44: 69-120.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation (2011). *Cell* 144: 646-674.

Heslop HE (2009). How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood* 114: 4002-4008.

Imahayashi S, Ichiyoshi Y, Yoshino I, Eifuku R, Takenoyama M, Yasumoto K. Tumor-infiltrating B-cell-derived IgG recognizes tumor components in human lung cancer (2000). *Cancer Invest* 18: 530-536.

Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T (2002). NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100: 3175-3182.

Ito M, Kobayashi K, Nakahata T. NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models (2008). *Curr Top Microbiol Immunol* 324: 53-76.

Ito R, Katano I, Ida-Tanaka M, Kamisako T, Kawai K, Suemizu H, Aiso S, Ito M (2012). Efficient xenoengraftment in severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2rynull mice is attributed to a lack of CD11c+B220+CD122+ cells. *J Immunol* 189: 4313-4320.

John T, Kohler D, Pintilie M, Yanagawa N, Pham NA, Li M, Panchal D, Hui F, Meng F, Shepherd FA, Tsao MS (2011). The ability to form primary tumor xenografts is predictive of increased risk of disease recurrence in early-stage non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 17: 134-141.

- John T, Yanagawa N, Kohler D, Craddock KJ, Bandarchi-Chamkhaleh B, Pintilie M, Sykes J, To C, Li M, Panchal D, Chen W, Shepherd FA, Tsao MS (2012). Characterization of lymphomas developing in immunodeficient mice implanted with primary human non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 7: 1101-1108.
- Julien S, Merino-Trigo A, Lacroix L, Pocard M, Goéré D, Mariani P, Landron S, Bigot L, Nemati F, Dartigues P, Weiswald LB, Lantuas D, Morgand L, Pham E, Gonin P, Dangles-Marie V, Job B, Dessen P, Bruno A, Pierré A, De Thé H, Soliman H, Nunes M, Lardier G, Calvet L, Demers B, Prévost G, Vrignaud P, Roman-Roman S, Duchamp O, Berthet C (2012). Characterization of a large panel of patient-derived tumor xenografts representing the clinical heterogeneity of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 18:5314-5328.
- Kalia M (2013). Personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism* 62 Suppl 1:S11-14.
- Katano I, Ito R, Kamisako T, Eto T, Ogura T, Kawai K, Suemizu H, Takahashi T, Kawakami Y, Ito M (2014). NOD-Rag2null IL-2R γ null mice: an alternative to NOG mice for generation of humanized mice. *Exp Anim* 63: 321-330.
- Kerbel RS (2003). Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer Biol Ther* 2:S134-139.
- Kikuchi-Arai M, Murakami T, Utsunomiya H, Akahira J, Suzuki-Kakisaka H, Terada Y, Tachibana M, Hayasaka S, Ugajin T, Yaegashi N (2010). Establishment of long-term model throughout regular menstrual cycles in immunodeficient mice. *Am J Reprod Immunol* 64: 324-332.
- Kobayashi S, Yamada-Okabe H, Suzuki M, Natori O, Kato A, Matsubara K, Jau Chen Y,

- Yamazaki M, Funahashi S, Yoshida K, Hashimoto E, Watanabe Y, Mutoh H, Ashihara M, Kato C, Watanabe T, Yoshikubo T, Tamaoki N, Ochiya T, Kuroda M, Levine AJ, Yamazaki T (2012). LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution. *Stem Cells* 30: 2631-2644.
- Koyanagi Y, Tanaka Y, Kira J, Ito M, Hioki K, Misawa N, Kawano Y, Yamasaki K, Tanaka R, Suzuki Y, Ueyama Y, Terada E, Tanaka T, Miyasaka M, Kobayashi T, Kumazawa Y, Yamamoto N (1997). Primary human immunodeficiency virus type 1 viremia and central nervous system invasion in a novel hu-PBL-immunodeficient mouse strain. *J Virol* 71:2417-2424.
- Lee RA, Gabardi S (2012). Current trends in immunosuppressive therapies for renal transplant recipients. *Am J Health Syst Pharm* 69: 1961-1975.
- Lin D, Wyatt AW, Xue H, Wang Y, Dong X, Haegert A, Wu R, Brahmabhatt S, Mo F, Jong L, Bell RH, Anderson S, Hurtado-Coll A, Fazli L, Sharma M, Beltran H, Rubin M, Cox M, Gout PW, Morris J, Goldenberg L, Volik SV, Gleave ME, Collins CC, Wang Y (2014). High fidelity patient-derived xenografts for accelerating prostate cancer discovery and drug development. *Cancer Res* 74: 1272-1283.
- Lowry PA, Shultz LD, Greiner DL, Hesselton RM, Kittler EL, Tiarks CY, Rao SS, Reilly J, Leif JH, Ramshaw H, Stewart FM, Quesenberry PJ (1996). Improved engraftment of human cord blood stem cells in NOD/LtSz-scid/scid mice after irradiation or multiple-day injections into unirradiated recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2: 15-23.
- Machida K, Suemizu H, Kawai K, Ishikawa T, Sawada R, Ohnishi Y, Tsuchiya T (2009). Higher susceptibility of NOG mice to xenotransplanted tumors. *J Toxicol Sci* 34:

123-127.

Maitra A, Abbas AK. The endocrine system. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, eds (2005). pp. 1173–1175. In: Robbins and Cotran pathologic basis of disease, 7th Edition. ElsevierSaunders, Philadelphia.

Malaney P, Nicosia SV, Davé V (2014). One mouse, one patient paradigm: New avatars of personalized cancer therapy. *Cancer Lett* 344: 1-12.

Manz MG, Di Santo JP (2009). Renaissance for mouse models of human hematopoiesis and immunobiology. *Nat Immunol* 10:1039-1042.

Martini M, Vecchione L, Siena S, Tejpar S, Bardelli A (2011). Targeted therapies: how personal should we go? *Nat Rev Clin Oncol* 9: 87-97.

Matsuura-Sawada R, Murakami T, Ozawa Y, Nabeshima H, Akahira J, Sato Y, Koyanagi Y, Ito M, Terada Y, Okamura K (2005). Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue in immunodeficient mice. *Hum Reprod* 20: 1477-1484.

McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL (1988). The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241: 1632-1639.

McDermott SP, Eppert K, Lechman ER, Doedens M, Dick JE (2010). Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains. *Blood* 116: 193-200.

Miettinen M, Franssila K, Lehto VP, Paasivuo R, Virtanen I (1984). Expression of intermediate filament proteins in thyroid gland and thyroid tumors. *Lab Invest* 50:262–270.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L (2004). Anthracyclines: molecular

- advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56: 185-229.
- Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 27: 16-25.
- Mizukami M, Hanagiri T, Shigematsu Y, Baba T, Fukuyama T, Nagata Y, So T, Ichiki Y, Sugaya M, Yasuda M, So T, Takenoyama M, Sugio K, Yasumoto K (2006). Effect of IgG produced by tumor-infiltrating B lymphocytes on lung tumor growth. *Anticancer Res* 26: 1827-1831.
- Moffat JG, Rudolph J, Bailey D (2014). Phenotypic screening in cancer drug discovery — past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 13: 588-602.
- Monsma DJ, Monks NR, Cherba DM, Dylewski D, Eugster E, Jahn H, Srikanth S, Scott SB, Richardson PJ, Everts RE, Ishkin A, Nikolsky Y, Resau JH, Sigler R, Nickoloff BJ, Webb CP (2012). Genomic characterization of explant tumorgraft models derived from fresh patient tumor tissue. *J Transl Med* 10:125.
- Morscio J, Dierickx D, Tousseyn T (2013). Molecular pathogenesis of B-cell posttransplant lymphoproliferative disorder: what do we know so far? *Clin Dev Immunol* 2013: 150835.
- Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB (1988). Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 1988 335:256-259.
- Nelson BH (2010). CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 185: 4977-4982.
- Niller HH, Wolf H, Minarovits J (2008). Regulation and dysregulation of Epstein-Barr

- virus latency: implications for the development of autoimmune diseases. *Autoimmunity* 41: 298-328.
- Ninomiya M, Abe A, Yokozawa T, Ozeki K, Yamamoto K, Ito M, Ito M, Kiyoi H, Emi N, Naoe T (2006). Establishment of a myeloid leukemia cell line, TRL-01, with MLL-ENL fusion gene. *Cancer Genet Cytogenet* 169:1-11.
- Papotti M, Volante M, Negro F, Eusebi V, Bussolati G (2000). Thyroglobulin mRNA expression helps to distinguish anaplastic carcinoma from angiosarcoma of the thyroid. *Virchows Arch.* 437: 635-642.
- Pflumio F, Izac B, Katz A, Shultz LD, Vainchenker W, Coulombel L (1996). Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood* 88: 3731-3740.
- Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD (2015). Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol* Epub ahead of print.
- Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S (2014). Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochem Pharmacol* 87: 150-161.
- Sato Y, Mukai K, Watanabe S, Goto M, Shimosato Y (1986). The AMeX method. A simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining. *Am J Pathol* 125: 431-435.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331: 1565-1570.
- Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research

(2007). *Nat Rev Immunol* 7: 118-130.

Simpson-Abelson MR, Sonnenberg GF, Takita H, Yokota SJ, Conway TF Jr, Kelleher RJ Jr, Shultz LD, Barcos M, Bankert RB (2008). Long-term engraftment and expansion of tumor-derived memory T cells following the implantation of non-disrupted pieces of human lung tumor into NOD-scid IL2Rgamma(null) mice. *J Immunol* 180:7009-7018.

Siolas D, Hannon GJ (2013). Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. *Cancer Res* 73: 5315-5319.

Stock JK, Jones NP, Hammonds T, Roffey J, Dillon C (2015). Addressing the Right Targets in Oncology: Challenges and Alternative Approaches. *J Biomol Screen* 20: 305-317.

Sugiyama Y, Kato M, Chen FA, Williams SS, Kawaguchi Y, Miya K, Jong YS, Mathiowitz E, Egilmez NK, Bankert RB (2001). Human inflammatory cells within the tumor microenvironment of lung tumor xenografts mediate tumor growth suppression in situ that depends on and is augmented by interleukin-12. *J Immunother* 24: 37-45.

Suzuki M, Katsuyama K, Adachi K, Ogawa Y, Yorozu K, Fujii E, Misawa Y, Sugimoto T (2002). Combination of fixation using PLP fixative and embedding in paraffin by the AMeX method is useful for histochemical studies in assessment of immunotoxicity. *J Toxicol Sci* 27: 165-172.

Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, Arcaroli JJ, Messersmith WA, Eckhardt SG (2012). Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol* 9: 338-350.

Terada Y, Terunuma-Sato Y, Kakoi-Yoshimoto T, Hasegawa H, Ugajin T, Koyanagi Y, Ito

- M, Murakami T, Sasano H, Yaegashi N, Okamura K (2008). Development of human Graafian follicles following transplantation of human ovarian tissue into NOD/SCID/gammac null mice. *Am J Reprod Immunol* 60:534-540.
- Thorley-Lawson DA, Allday MJ (2008). The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Microbiol* 6:913-924.
- Torkamani A, Verkhivker G, Schork NJ (2009). Cancer driver mutations in protein kinase genes. *Cancer Lett* 281: 117-127.
- Tse E, Kwong YL (2015). Epstein Barr virus-associated lymphoproliferative diseases: the virus as a therapeutic target. *Exp Mol Med* 47:e136.
- Tsuiji K, Takeda T, Li B, Kondo A, Ito M, Yaegashi N (2010). Establishment of a novel xenograft model for human uterine leiomyoma in immunodeficient mice. *Tohoku J Exp Med* 222: 55-61.
- Ueda T, Yoshino H, Kobayashi K, Kawahata M, Ebihara Y, Ito M, Asano S, Nakahata T, Tsuji K (2000). Hematopoietic repopulating ability of cord blood CD34(+) cells in NOD/Shi-scid mice. *Stem Cells* 18: 204-213.
- Wetterauer C, Vlajnic T, Schüller J, Gsponer JR, Thalmann GN, Cecchini M, Schneider J, Zellweger T, Püschel H, Bachmann A, Ruiz C, Dirnhofer S, Bubendorf L, Rentsch CA (2015). Early development of human lymphomas in a prostate cancer xenograft program using triple knock-out immunocompromised mice. *Prostate* Epub ahead of print.
- Wick MR, Sawyer MD (1989). Antigenic alterations in autoimmune thyroid diseases. Observations and hypotheses. *Arch Pathol Lab Med* 113: 77-81.
- Wilding JL, Bodmer WF (2014). Cancer cell lines for drug discovery and development. *Cancer Res* 74: 2377-2384.

- Williams SA, Anderson WC, Santaguida MT, Dylla SJ (2013). Patient-derived xenografts, the cancer stem cell paradigm, and cancer pathobiology in the 21st century. *Lab Invest* 93: 970-982.
- Williams SS, Chen FA, Kida H, Yokata S, Miya K, Kato M, Barcos MP, Wang HQ, Alosco T, Umemoto T, Croy BA, Repasky EA, Bankert RB (1996). Engraftment of human tumor-infiltrating lymphocytes and the production of anti-tumor antibodies in SCID mice. *J Immunol* 156: 1908-1915.
- Wilson PM, Danenberg PV, Johnston PG, Lenz HJ, Ladner RD (2014). Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 11: 282-298.
- Yasuda M, Mizukami M, Hanagiri T, Shigematsu Y, Fukuyama T, Nagata Y, So T, Ichiki Y, Sugaya M, Takenoyama M, Sugio K, Yasumoto K (2006). Antigens recognized by IgG derived from tumor-infiltrating B lymphocytes in human lung cancer. *Anticancer Res* 6: 3607-3611.
- Yasuda M, Takenoyama M, Obata Y, Sugaya M, So T, Hanagiri T, Sugio K, Yasumoto K (2002). Tumor-infiltrating B lymphocytes as a potential source of identifying tumor antigen in human lung cancer. *Cancer Res* 62: 1751-1756.
- Zhang X, Claerhout S, Prat A, Dobrolecki LE, Petrovic I, Lai Q, Landis MD, Wiechmann L, Schiff R, Giuliano M, Wong H, Fuqua SW, Contreras A, Gutierrez C, Huang J, Mao S, Pavlick AC, Froehlich AM, Wu MF, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Chen ES, Zuloaga P, Shaw CA, Rimawi MF, Perou CM, Mills GB, Chang JC, Lewis MT (2013). A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models. *Cancer Res.*;73: 4885-4897.

Zhou Q, Facciponte J, Jin M, Shen Q, Lin Q (2014). Humanized NOD-SCID IL2rg^{-/-} mice as a preclinical model for cancer research and its potential use for individualized cancer therapies. *Cancer Lett* 344:13-19.