

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 藤井悦子

腫瘍研究の分野では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。分子標的治療薬は腫瘍細胞の特定の分子を標的とすることにより、その増殖を抑える。したがって、ヒト腫瘍の特徴を反映し、分子標的治療薬の標的分子が適切に発現・機能するモデルが研究に不可欠と考えられている。そのひとつとして、ヒトの腫瘍組織を免疫不全マウスに直接移植することで作出される patient-derived xenograft (PDX) モデルが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、移植率が低い腫瘍組織があること、モデル作出のための費用、時間、人員が莫大であることなどから、樹立効率の向上が課題と考えられている。

一方、免疫不全マウスの開発は PDX モデルの樹立ならびにその研究への活用に寄与してきた。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り、その後移植率を向上させるための研究が重ねられた。scid マウス、NOD-scid マウスの開発を経て、2000 年代に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。NOG マウスは 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す複合的な免疫不全状態にあり、ヒト組織の移植宿主として最も適している免疫不全動物と考えられている。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、NOG マウスにヒト腫瘍組織を移植した PDX モデルの樹立とそのモデルの特徴を解析した。ヒト全身諸臓器に由来する様々な腫瘍を移植した結果、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 モデルはヒト腫瘍組織の組織構造・細胞の形態および分化度を良く保持していた。なお、移植初代組織中にはヒト由来の間質細胞が存在したが、3 代目の組織ではマウス由来細胞に置換されていた。以上の結果から、NOG マウスを用いて、種々のヒト腫瘍組織の形態学的特徴を保持した PDX モデルの樹立が可能であり、腫瘍組織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 PDX モデルを樹立するには、樹立を阻害する要因を明らかにし、その効率を向上させることが大きな課題であることが明らかとなった。

PDX モデルの樹立効率は低かったが、NOG マウスでは非腫瘍組織が高率に移植される。このことから、本研究が行われた実験施設の様々な実験環境条件が NOG マウスの移植宿主としての安定性に影響を与え、移植阻害の原因となっていることが懸念された。そこで、第 2 章では第 1 章と同一の移植手技を用い、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のか、あるいは腫瘍組織固有の要因によるのかを検討した。甲状腺の過形成性疾患である adenomatous goiter を非腫瘍組織として用い、NOG マウスに移植したところ、組織形態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、高率（85%）に移植が成立していた。さらに、複数の NOG マウスに同一ドナーの甲状腺組織を移植したところ、個体差は認められなかった。以上のことから、本研究の実験環境下では移植期間による差異や宿主の個体差はなく、NOG マウスはヒト組織の宿主として安定していることが示された。このことより、NOG マウスを用いた PDX モデルでは、移植成立に影響する要因として、実験環境よりむしろ腫瘍組織特有の要因を検討する必要性が示された。

次に第 3 章では、腫瘍組織の PDX モデルを樹立する際の阻害要因を検討するため、PDX モデル樹立の過程を解析した。樹立阻害要因として、リンパ増殖性病変 (lymphoproliferative lesion、LPL) による移植ヒト組織の置換、感染症などによる継代中止や宿主マウスの死亡、移植腫瘍組織の増殖不全の 3 つが示され、とくに LPL による移植組織の置換が多かった。NOG マウスに生じた LPL はヒト由来 CD20 陽性 B リンパ球の異常増殖巣より成り、増殖細胞は Epstein-Barr ウイルス (EBV) 関連タンパク質を発現し、EBV の DNA も確認された。EBV が関与するヒトの疾患として臓器移植に伴う免疫抑制状態時に誘発されるリンパ球の異常増殖性疾患が知られている。このことより、高度の免疫不全状態にある NOG マウスに移植された EBV 感染ヒトリンパ球が異常増殖し LPL が発生したと考えられた。人類の 90% は EBV に感染し、生涯感染が持続する。ほとんどの移植腫瘍組織に EBV 感染リンパ球が含まれていると考えられるので、PDX 樹立過程において一定の割合で LPL が発生することを考慮する必要がある。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方法を検討した。その結果、LPL は移植腫瘍組織に加え NOG マウスの脾臓に好発することが明らかとなり、継代時に脾腫を指標とすることで LPL の早期発見、淘汰が可能であることを示した。また、LPL の予防方法として、B リンパ球の細胞表面抗原 CD20 に結合し、細胞死を誘導する抗体 (rituximab) で移植組織片を処理することで EBV 感染 B リンパ球を除去することが有用な対処法である可能性も示した。以上より、NOG マウスにおける PDX モデル樹立の主要阻害要因のひとつが LPL であり、継代時に脾腫を指標とした早期発見、淘汰と EBV 感染リンパ球除去による樹立効率向上の可能性が示された。

最後に第4章では、更なる PDX モデル樹立効率向上の可能性を検討するために、移植した腫瘍が増殖しない現象について検討した。移植組織の詳細な病理組織学的解析を行ったところ、ヒト由来リンパ球の浸潤を伴う腫瘍細胞の変性・壊死像が認められ、ヒト由来リンパ球が腫瘍細胞の生着を阻害することが強く示唆された。リンパ球の影響をみるためヒト大腸癌移植マウスの血中ヒト immunoglobulin 濃度と移植成立との関係を検討した結果、IgG、IgM 濃度が高い症例ほど移植が成功する傾向があり、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) 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、移植組織の免疫環境が移植腫瘍の進展・増殖に影響することが報告されていることから、もとのヒト腫瘍組織中の T 細胞のタイプ、局在、密度 (immune contexture) と NOG マウスにおける腫瘍組織生着との関連性を検討した。その結果、腫瘍細胞がリンパ球を含む免疫機構により排除されやすい症例では移植が成立せず、一方、腫瘍細胞が免疫機構による排除を逃れ、増殖する症例では移植が成立する割合が高いことが示された。このことより NOG マウス PDX モデルにおいて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が向上する可能性が見出された。

本研究の結果から NOG マウスを用いることで、様々な臓器・組織由来の腫瘍の形態学的特徴を反映した PDX モデルの樹立が可能であることが示された。一方、その移植効率は低く、PDX モデルとして活用するためには樹立効率の向上が大きな課題として示された。それを解決する方策の一環として、LPL の早期発見、淘汰、移植組織中のリンパ球の除去により移植効率が向上する可能性を示した。これらの研究は、腫瘍研究の新たな研究ツールとして期待されている PDX モデルの医学研究分野における活用の促進につながり、腫瘍の生物学的研究の進展に貢献するものと考えられた。(3216 字)