

(甲)

学位論文抄録

PEL 腫瘍マウスモデルを用いた methyl- β -cyclodextrin の抗腫瘍効果と
分子イメージングに最適化された新規無毛高度免疫不全マウスの開発

(The antitumor effect of methyl- β -cyclodextrin against primary effusion lymphoma and
the development of novel immunodeficiency nude mice optimized for
a molecule imaging)

後藤久美子

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻エイズ学Ⅲ

指導教員

岡田 誠治 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻エイズ学Ⅲ

【目的】

本研究では PEL(Primary Effusion Lymphoma)に対する治療モデルを確立させることである。PEL は一般的な化学療法に耐性で、体腔内でリンパ滲出液をともなって増殖する特徴がある。そこで、従来の化学療法とは全く異なった作用機序を持つ、M- β -CyD (メチル- β -シクロデキストリン) を使用し、PEL に対する抗腫瘍効果について *in vitro* と *in vivo* の両面から検証した。また近年、分子イメージングと呼ばれる分野が注目され、基礎医学の分野で新しい実験手法として積極的に取り入れられるようになった。特に、蛍光や発光を利用し、小動物の生体情報をイメージングできる光イメージングは撮像時間が短く、操作も容易なことから最も注目される手技の一つである。しかし、光には弱点があり、マウスなどの体毛が光を吸収してしまうため、実験にはヌードマウスが必要とされる。だが、従来のヌードマウスはヒト腫瘍細胞を移植しても生着率が低いといった問題点があり、移植モデルとしては適していない。そこで、ヒト腫瘍の生着率を改善するためには、より高度な免疫不全ヌードマウスを作製する必要があり、移植効率の高い Nude-RJ マウスを開発した。さらに新しく開発した Nude-RJ マウスに EGFP を発現するよう遺伝子操作したマウスの開発を行った。

【方法】

●PELに対するM- β -CyDの抗腫瘍効果について

in vitro では PEL 細胞株の中に濃度を変えた M- β -CyD を入れ、MTT や フローサイトメトリーで PEL の生存率について検証した。*in vivo* では PEL 発症モデルマウスを作製し、M- β -CyD を投与する治療群と PBS を投与する無治療群に分類し比較することで薬の効果を検証した。

●Nude-RJ マウスの作製について

新規に開発した Nude-RJ マウスは Balb/c Rag-2/Jak3 二重欠損(Rag-2^{-/-}Jak3^{-/-}) マウスとヌードマウスを掛け合わせることによって樹立した。検証実験として、Nude-RJ マウスとヌードマウスの皮下に K562 細胞株を同じ条件で、それぞれの左右脇腹に移植し、腫瘍の形成性について比較実験を行った。また、フローサイトメトリーで免疫表現型について解析した。

●Nude-R/J-EGFP mice の作製について

新規に開発した Nude-RJ マウスを用いて、EGFP を発現する様にマウスに遺伝子を導入し、宿主細胞が緑色の蛍光発色をするように改良した。また、移植細胞に他の蛍光を発する遺伝子を導入し撮像実験を行った。検証実験として、mCherry の遺伝子(赤色蛍光)を導入した胆管がん細胞株(KKU-M213)を左右脇腹に移植し、Maestro(生体蛍光イメージングシステム)とNuance(マルチスペクトルイメージングシステム)を使い撮像した。

【結果】

PEL に対する M- β -CyD の効果として、*in vitro* では M- β -CyD の濃度と時間によって効果が高くなった。*in vivo* では治療群では健康状態が維持されたが、無治療群では日増しに腹水が増えたことによる体重の増加がみられた。新規開発した Nude-RJ マウスはリンパ球と NK 細胞を完全に欠損していることを確認した。また K562 の異種移植片を通常の子マウスに移植したものより、開発した Nude-RJ マウスの方がより大きな固形腫瘍を形成した。

開発した Nude-R/J-EGFP マウスの左右脇腹に移植し、形成された固形腫瘍を検出し、宿主細胞と移植細胞を区別でき、腫瘍にできた新生血管の可視化にも成功した。

【考察】

M- β -CyD が腫瘍細胞からコレステロールを引き出すことでアポトーシスが誘導され、PEL に対する治療法となりえる可能性が示唆された。また移植効率が良い高度免疫不全ヌードマウス(Nude-RJ マウス)の作製に成功した。さらに、Nude-R/J-EGFP マウスでは宿主細胞と移植細胞の割合などを求めることが可能である。