

後藤 久美子 氏の学位論文審査の要旨

論文題目

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)

本研究は、がん治療を新規マウスにおける分子イメージングにより評価する実験系を確立するための基礎研究である。第一に対象のがん細胞として primary effusion lymphoma (PEL) に対する治療法に関して研究を行い、第二に PEL のマウス移植実験モデルでの腫瘍進展の解析に必要な高度な免疫不全ヌードマウスの作製を行っている。PEL は、体腔内に胸水あるいは腹水をともなって増殖する悪性リンパ腫で、一般的な制癌化学療法に耐性を示す。そこで、従来の化学療法とは全く異なった作用機序による抗がん薬剤のメチル- β -シクロデキストリン(M- β -CyD)の PEL に対する抗腫瘍効果について *in vitro* と *in vivo* の両面から検討した。がん細胞移植マウス実験モデルとして生体分子イメージング法が有用と考えられたので、光イメージング法による生体情報を得るためのマウスとして、無毛で高度免疫不全マウスの作製を行った。

PEL に対する M- β -CyD の抗腫瘍効果を明らかにするために、*in vitro* で5種類のヒト PEL 培養細胞に M- β -CyD を培地中に添加し、MTT assay やフローサイトメトリーにより PEL の生存率を解析した。M- β -CyD は濃度依存性に細胞障害性を示し、アポトーシスの亢進を伴っていた。一方で、リン酸化 AKT の発現は抑制され、腫瘍細胞からのコレステロールの引き抜き作用が、この細胞傷害に関わることが示された。次に、NOD/Scid/Jac3 欠損マウスにヒト PEL 培養細胞株 (BCBL-1) を腹腔内に移植し、移植後3日後から21日間 M- β -CyD (500mg/kg 体重) を腹腔内投与し、PBS 投与対照マウスと比較することで、M- β -CyD の治療効果の *in vivo* 実験を試みた。M- β -CyD 腹腔内投与により、有意に腹水貯留が減少し、PEL 細胞の肺転移も減少した。光イメージング法による担ヒト癌マウスの解析のために、無毛の高度免疫不全マウスの作製を試みた。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で樹立した。このマウスの有効性を、これまで移植、生着が多くの研究で確認されている腫瘍株を用いて検証した。Nude-RJ マウスとヌードマウスの皮下に K562 細胞株を移植したところ、Nude-RJ マウスの方により大きな固形腫瘍が形成された。また、フローサイトメトリーで免疫表現型について解析すると、Nude-RJ マウスでは、リンパ球と NK 細胞が完全に欠損していることが確認された。更に、Nude-RJ マウスから EGFP を発現するマウス (Nude-R/J-EGFP マウス) を開発した。このマウスに、mCherry 遺伝子 (赤色蛍光) を導入した胆管がん細胞株 (KKU-M213) を左右脇腹皮下に移植し、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) を使い撮像を試み、形成された固形腫瘍の描出と腫瘍内新生血管の可視化に成功した。以上、M- β -CyD は、PEL 細胞のコレステロール引き抜きによりアポトーシスを誘導し、治療薬となりうるということが明らかになった。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できた。これらのマウスを用いて PEL 移植モデルマウスを作製し、光イメージング法を応用することで、今後、PEL に対して有効な治療法の開発が可能となると期待された。

本発表に対して、1) 学位論文内容と発表内容の不一致に関して学位論文の修正指導、2) 二種類の研究テーマが申請者の学位論文と整合するかどうかの確認がなされた。更に、1) M- β -CyD の生体への影響、2) 副作用の解析の必要性、3) *in vivo* 実験での体重推移の意味、4) 実験観察期間、5) 他の腫瘍への M- β -CyD の効果、6) PEL の発生部位、7) PEL の薬剤耐性機構、8) AKT 以外のシグナル経路の解析、9) EGFP マウスの作製法、10) PEL の光イメージング法の結果の有無、などの質疑がなされた。本研究は、PEL への M- β -CyD の治療効果について検討から、新たな *in vivo* 治療解析法のためのマウス開発まで、幅広い視点からのヒト腫瘍治療モデルの開発を目指した研究で、学位論文に価すると判断された。

審査委員長 機能病理学担当教授

伊藤 隆明