

学位論文

Doctoral Thesis

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

Gotoh Kumiko

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分野

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分野

2014年3月

目次

要旨	1
発表論文（関連論文およびその他の論文）	3
謝辞	4
略語一覧	5
第1章 研究の背景と目的	
1-1 研究の背景と目的	6
1-2 HIVの現状	
1-2-1 先進国におけるエイズ治療の現状	8
1-2-2 本邦におけるエイズの現状	9
1-3 悪性リンパ腫の標準治療	10
1-5 Primary Effusion Lymphoma (PEL)	13
1-6 M- β -CyD (methyl- β -cyclodextrin) について	14
1-7 実験動物	16
第2章 PELに対するmethyl- β -cyclodextrinの効果	
2-1 実験の目的	18
2-2 実験材料と方法	
2-2-1 細胞株と試薬	19
2-2-2 MTT解析	19
2-2-3 細胞増殖能評価	19
2-2-4 培養液中のコレステロール試験	19
2-2-5 ウェスタンブロット解析	19
2-2-6 異種移植片マウスモデル	20
2-2-7 組織学的分析	20
2-2-8 血球計算と血清LDH	20
2-2-9 統計解析	21
2-3 実験結果	
2-3-1 PEL細胞におけるM- β -CyDの細胞活性阻害効果	22
2-3-2 M- β -CyDによる細胞死およびアポトーシス誘導	23
2-3-3 M- β -CyDによるコレステロール引き抜き能	24
2-3-4 コレステロール添加によるアポトーシス阻害効果	25
2-3-5 M- β -CyDの抗アポトーシス阻害	25
2-3-6 BCBL-1を移植した高度免疫不全マウスにおけるM- β -CyDの効果	

	27
2-4 章総括	31
第3章 蛍光イメージング用ヌードマウスの開発	
3-1 実験の背景と目的	32
3-2 実験材料と方法	
3-2-1 マウス	33
3-2-2 細胞株	33
3-2-3 フローサイトメトリー	34
3-2-4 組織学的な分析	34
3-2-5 異種移植片マウスモデル	34
3-2-6 イメージ取得	34
3-2-7 統計解析	34
3-3 実験結果	
3-3-1 Nude-RJマウスにおける免疫表現型	35
3-3-2 Nude-R/J-EGFPマウスにおける免疫表現型	36
3-3-3 Nude-RJマウスにおける腫瘍細胞移植	37
3-3-4 Nude-RJマウスにおける皮下腫瘍の蛍光検出	38
3-3-5 Nude-R/J-EGFPマウスにおけるEGFP検出	39
3-3-6 Nude-R/J-EGFPマウスにおけるイメージング	41
3-4 章総括	42
第4章 総括および今後の展望	
4-1 総括	43
4-2 今後の展開	45
参考文献	47

要 旨

【背景】

1980年代、初めてエイズ発症例が報告されて以来、HIVの感染は急激に広がり現在も東南アジア、アフリカを中心に感染者が増加している。しかし、様々な抗HIV薬が開発され、それらを3剤以上組み合わせて使用する多剤併用療法（cART : combination antiretroviral therapy）が導入されたことにより、死亡率は大きく改善した。しかしHIV患者の予後が大幅に改善したことにより、エイズに合併する疾患が予後に影響を及ぼすことが新たな問題となってきた。とりわけ悪性腫瘍の一つであるエイズ関連悪性リンパ腫は発生頻度が高く、予後も不良であるため、その対策が求められている。エイズ関連悪性リンパ腫のなかでもPrimary Effusion Lymphoma（PEL）は、化学療法に極めて耐性で、未だに標準的治療法が確立されていない。そこで我々はマウスモデルを用いて新規治療法の確立を目的に研究を行った。また、*in vivo*評価系として、腫瘍担持モデルマウスを非侵襲的に解析できる生体イメージング法が近年注目を浴びている。そのため、生体イメージングに最適化された無毛高度免疫不全ヌードマウスの開発に取り組んだ。

【目的】

本研究の目的は、PELに対する治療モデルを確立し、その治療を分子イメージングにより評価する実験系を確立することである。PELは従来の化学療法に耐性で、体腔内でリンパ滲出液をともなって増殖する。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、*in vivo*の評価系として分子イメージング研究が注目され、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。その一つである光イメージングは生体内における分子活動を可視化し、経時的に観察できることから予後の評価に有用である。そのため光イメージングに適したヒト腫瘍生着率の高い無毛高度免疫不全マウスの樹立を試みた。

【方法】

●PELに対するM- β -CyDの抗腫瘍効果について

PEL細胞株に対するM- β -CyDの有用性をMTT試験やフローサイトメトリーを用いて細胞活性を調べた。また、その作用機序をウエスタンブロット法により検討した。さらにPEL発症モデルマウスを作製し、M- β -CyDを連日投与し、治療効果と副作用について検証した。

●Nude-R/J-EGFP マウスの作製について

Balb/c Rag-2/Jak3 二重欠損(Rag-2^{-/-}Jak3^{-/-}) マウスとヌードマウスを交配することにより、新規無毛高度免疫不全マウス(Nude-RJマウス)を樹立した。さらにNude-RJマウスとEGFPトランスジェニックマウスを交配して高度免疫不全マ

ウス (Nude-R/J-EGFP マウス) を樹立した。mCherry (赤色蛍光) 遺伝子導入した胆管がん細胞株 (KKU - M213) をNude-R/J-EGFP マウス (緑色) の左右側腹部に移植し、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) を使い腫瘍浸潤部を撮像した。

【結果】

PEL細胞株を用いた実験では、M- β -CyDは濃度及び時間依存的に抗腫瘍効果を発揮した。PELマウスモデルを用いた実験では、無治療群において腹水と体重増加が認められたが、M- β -CyD治療群では無治療群に比較し腹水の増加は抑えられた。またその効果機序としてはPI3K-Akt経路を介したアポトーシス誘導であることが分かった。

マウスの作製ではNude-RJマウス及びNude-R/J-EGFPマウスでリンパ球とNK細胞を完全に欠損していることをフローサイトメトリーにより確認した。また、Nude-R/J-EGFPマウスに移植されたmCherry 発現胆管脂肪癌株では、宿主細胞と腫瘍細胞の発する蛍光が異なることにより組織由来を区別できるため、腫瘍内新生血管を容易に可視化できた。

【考察】

M- β -CyDはPEL細胞株にアポトーシスを誘導し抗腫瘍効果を示し、PELマウスモデルを用いた検討でも同様に有用であった。このことからM- β -CyDはPELに対する新規治療薬として期待できる。またヒト腫瘍細胞が高効率で生着し、宿主組織が緑色蛍光を有するため生体イメージングに最適な無毛高度免疫不全マウス (Nude-R/J-EGFPマウス) の樹立に成功した。本マウスによりヒト腫瘍の病態解析や新規治療法の開発が促進されるものと考えられる。

発表論文リスト

本論文は、学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

1. Kumiko Gotoh*, Ryusho Kariya*, Md Masud Alam, Kouki Matsuda, Shinichiro Hattori, Yuki Maeda, Keiichi Motoyama, Akihiro Kojima, Hidetoshi Arima, Seiji Okada.
The antitumor effect of methyl- β -cyclodextrin against primary effusion lymphoma via depletion of cholesterol from lipid rafts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 455(3-4):285-289, 2014.(*equal contribution)
2. Kumiko Gotoh, Ryusho Kariya, Kouki Matsuda, Shinichiro Hattori, Kulthida Vaeteewoottacharn, Seiji Okada.
A novel EGFP-expressing nude mice with complete loss of lymphocytes and NK cells to study tumor-host interactions. *BioScience Trends* 8(4):202-205,2014.
3. Ryusho Kariya, Kouki Matsuda, Kumiko Gotoh, Kulthida Vaeteewoottacharn, Shinichiro Hattori and Seiji Okada.
Establishment of Nude Mice with Complete Loss of Lymphocytes and NK Cells and Application for in vivo bio-imaging. *in vivo* 28:779-784, 2014.

その他の論文

1. Yoshioki Shiraishi, Kumiko Gotoh, Tomomi Towata, Tatsuya Shimasaki, Shinya Suzu, Akihiro Kojima and Seiji Okada.
Therapeutic effects of γ -irradiation in a primary effusion lymphoma mouse model. *Experimental and Therapeutic Medicine* 1(1):79-84, 2010.

謝辞

本研究を行うに際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました熊本大学エイズ学研究センター岡田プロジェクト研究室の岡田誠治教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究は、熊本大学薬学部製剤設計学分野との共同研究であり、本研究を遂行するにあたり、貴重なご意見ならびにご助言賜りました有馬英俊教授、本山敬一講師、熊本大学薬学部製剤設計学分野の諸氏に深謝致します。

また、本研究の基になる投稿論文作成にあたり、御助言、御指導いただきました熊本大学生命資源研究・支援センターRI実験分野の古嶋昭博准教授、島崎達也助教、熊本大学生命資源研究・支援センターアイソトープ総合施設の諸氏に深く感謝致します。

研究を行うに際し、御支援いただきました熊本大学エイズ学研究センター岡田プロジェクト研究室の刈谷龍昇氏、服部真一郎氏、松田幸樹氏に深く感謝致します。

実験をサポートしていただいた熊本大学エイズ学研究センターの鈴郁子氏、藤川佐和子氏、遠藤優佳氏、服部京子氏に深く感謝致します。

最後に、これまで長きに渡る学生生活を励ましてくれた友人、温かく見守ってくれた家族に改めて感謝の念を表したいと思います。

略語一覧

- HSC : Human Hematopoietic Stem Cell ヒト造血幹細胞
- PBMC : Peripheral blood Mononuclear Cell ヒト末梢血単核球
- Nude -RJ : Balb/c Nude mice with Rag-2 and Jak3 double deficiency
(Balb / c nude Rag - 2- / - Jak3- / -)
- Nude-R/J-EGFP: Balb/c Nude mice with Rag-2 and Jak3 double mutants
- PEL : Primary effusion lymphoma 原発性体腔液性リンパ腫
- KSHV/HHV-8 : Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/Human Herpes Virus-8
- M- β -CyD : Methyl- β -cyclodextrin
- NOD: Non-obese diabetic mice
- Sirpa : single-regulatory protein α
- EGFP : Enhanced Green fluorescent Protein
- MTT : Tetrazolium dye methylthiotetrazole
- NOJ mice : NOD/Scid/Jak3 deficient mice
- IC50 : Inhibitory Concentration 50
- Hb : hemoglobin
- LDH : Lactate Dehydrogenase 乳酸脱水素酵素
- BUN : Blood urea nitrogen 尿素窒素
- DM- β -CyD : 2,6-di-*O*-methyl- β -cyclodextrin

第1章 研究の背景と目的

1-1 研究の背景と目的

HIV感染症は、未だ根治薬も予防ワクチンも存在しない。しかし、様々な抗HIV薬の開発により、死亡率は大きく改善している。HIV患者のエイズ発症の抑制が可能になり長期生存が可能になったことから、合併症が予後に大きな影響を及ぼす新たな問題となった。とりわけエイズ関連悪性リンパ腫は発生頻度が高く予後も不良であるため、早急な対策が求められている。特にPrimary Effusion Lymphoma (PEL) はエイズ関連悪性リンパ腫の中でも予後不良であり、新規治療法の開発が求められている。

本研究の目的はPELに対する治療モデルを確立することである。PELは非ホジキンリンパ腫に分類され、KSHV/HHV-8を感染原因とするエイズなど免疫不全患者に多く発症する腫瘍である¹。体腔内でリンパ滲出液を伴って増殖する浸潤性腫瘍で、化学療法に耐性である。PELに対する標準的治療法は未だ確立されておらず、診断からの平均余命は6カ月以下と極めて予後が不良であることが知られている²。

今回、従来の化学療法とは異なった作用機序を持つ、M- β -CyD (methl- β -cyclodextrin) を使用し、PELに対する効果を試みた。M- β -CyDは細胞膜の脂質ラフトに接着し、コレステロールを引き抜く作用がある。また、最近の研究でM- β -CyDに抗腫瘍効果があることが報告されている^{3,4}。M- β -CyDは腫瘍細胞の脂質ラフトに接着し、細胞膜のコレステロールを引き抜くことで腫瘍細胞にアポトーシスが誘導するというユニークな作用機序を有す。そこで、PELに対し、M- β -CyDの抗腫瘍効果をin vitroとin vivoの両面から検証した。

近年、in vivoの評価系として、基礎医学分野において分子イメージングが積極的に取り入れられている。生体情報を画像化できる分子イメージングは、腫瘍研究や幹細胞研究など幅広い分野で有用な研究ツールとなることが期待されている。これらの装置には、MRIやPET、SPECTなどがあるが、中でも蛍光や発光を利用した光イメージングは、他の機器と比べ圧倒的に撮像時間が短く、容易に使用が可能である。また、蛍光タンパクを用いることにより、生体内の情報、例えば浸潤や転移、さらには腫瘍細胞の可動性や治療効果の判定等をリアルタイムに可視化できる。これらにより、PELにおけるM- β -CyDの抗腫瘍効果判定にも、光イメージングは非常に有用であると考えられる。欠点としては、マウスの体毛が体内から出る光シグナルを吸収してしまうため、実験モデルとしてヌードマウスを用いる必要がある。しかし、ヌードマウスはヒト腫瘍移植モデル

としては生着率が25–35%と低く⁵、移植に適したモデルマウスとはいえない。ヒト腫瘍細胞の生着率を改善させるためには、より高度な免疫不全ヌードマウスの開発が必要である。そこで、生体イメージングに最適化された高度免疫不全ヌードマウスの開発に取り組んだ。

1-2 HIVの現状

1-2-1 先進国におけるエイズ治療の現状

近年 HIV の治療として cART（combination antiretroviral therapy）が導入されたことにより、1995 年を境にエイズ患者の予後には大きな改善がみられるようになった。cART は抗 HIV 薬を 3 薬以上組み合わせる多剤併用療法であり、積極的な新薬の開発や薬剤の質的な改善により、薬剤耐性ウイルスが出来難く、服薬回数の減少や重篤な副作用の改善等があり奏功している治療法である。

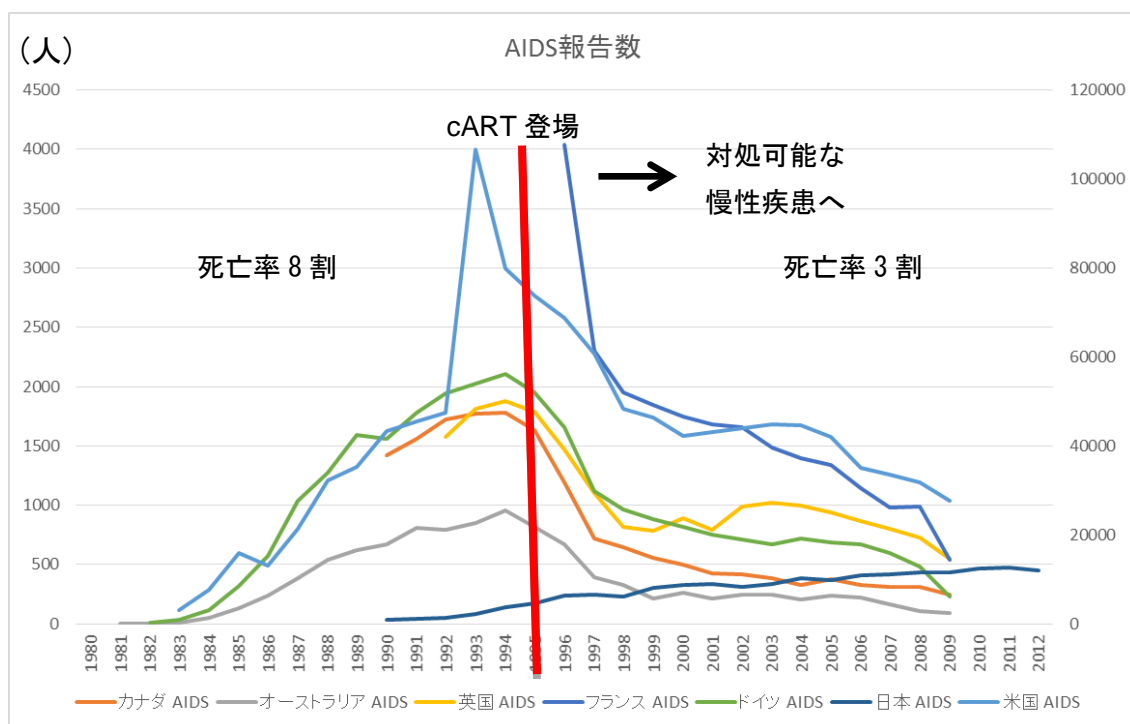


図 1. AIDS 患者数の報告件数の推移⁶

厚生労働科学研究エイズ対策研究事業「国内外の HIV 感染症の流行動向及びリスク関連情報の戦略的収集と統合的分析に関する研究班」

先進国におけるエイズ患者報告件数は、cART 開始以前の 1995 年までは各国で右肩上がりの増加傾向にあったが、1995 年を境に本邦を除く各国で減少傾向を示している（図 1）。また、15 年経過後の死亡率は、1995 年以前は 8 割近くに及び、1995 年以降は 3 割程度まで低下している。1995 年以降、死亡率が大きく下がった背景には、cART によりウイルスのコントロールができるようになったことがあげられ、対処可能な慢性疾患に変貌したと言える。本邦においては、1995 年以降も増加傾向にあり、HIV の感染が未だに広がり続けているという現状があり、感染対策が十分であるとはいえない。

1-2-2 本邦におけるエイズの現状

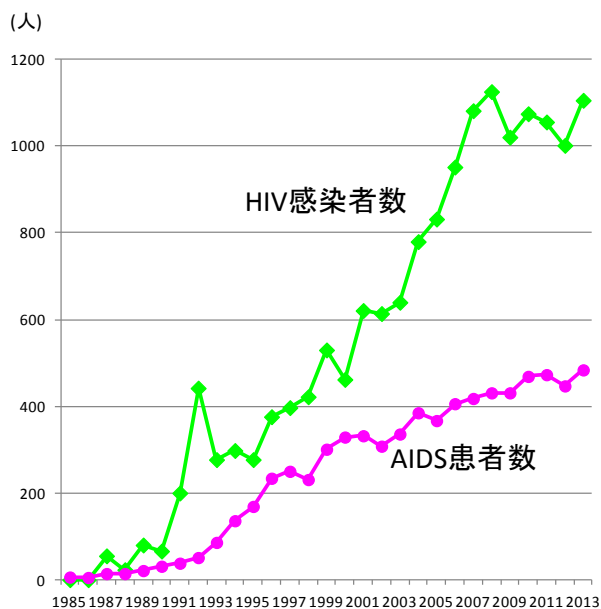


図2-1. 本邦におけるHIV感染者・AIDS患者の年次推移

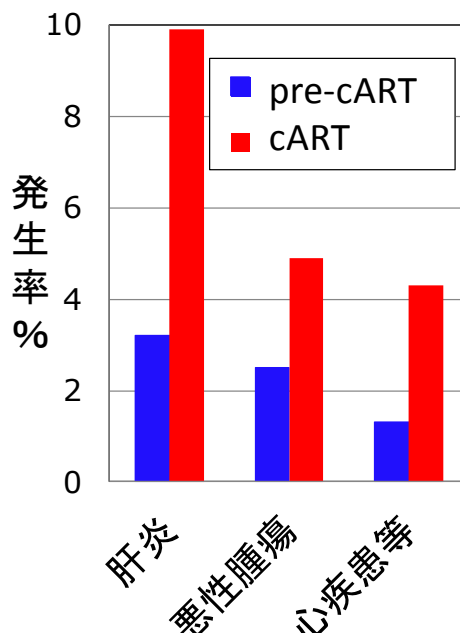


図2-2. エイズ患者において併発する疾患

本邦における、HIV感染者数、AIDS患者数は、ともに増加している（図2-1）。1987年に始まったHIV検査に人々の関心が薄れ、受検者数が減少している事が感染者数増加を食い止められない原因の一つとされている。AIDS患者の死因としては、合併症としての日和見感染によるものが最も多かった。cARTが取り入れられている現在では、日和見感染による死亡者数は大きく減少し、飛躍的に予後が改善している。現在、治療の長期化に伴いAIDS患者に併発する疾患として問題視されているのが、肝炎、悪性腫瘍、心疾患等である（図2-2）。AIDS治療を行う上で併発するこれらの疾患を上手に治療していくことが患者の予後に大きく影響するといっても過言ではない。中でも、最も大きく予後を左右するものが悪性腫瘍であり、現状では、エイズ患者の3人に1人が悪性腫瘍で死亡している⁶。また、悪性腫瘍の中でも、エイズ関連悪性リンパ腫は発生頻度が高く、予後が極めて不良であるとされており、エイズ関連悪性リンパ腫で死亡する人は10人に1人の割合である⁶。

1-3 悪性リンパ腫の標準治療

悪性リンパ腫はリンパ球が腫瘍化したものである。リンパ球は全身に張り巡らされたリンパ管を通り、病原体や異物の体内への侵入を防ぐための免疫細胞である。悪性リンパ腫の多くはリンパ節で発症し、リンパ節に腫瘍を形成することが多い。しかし、リンパ節以外にもあらゆる臓器で発症する可能性がある。

悪性リンパ腫の発症率は近年増加傾向にあり、EBVなどのウイルス感染や細菌感染により発症するものがある。悪性度にはかなりの幅があり、進行が遅く放置してもすぐには影響のないとされるものから、早期に治療を開始しないと生命に係わるものまである。

悪性リンパ腫の治療法としては、化学療法を中心に放射線治療を併用するのが一般的である。

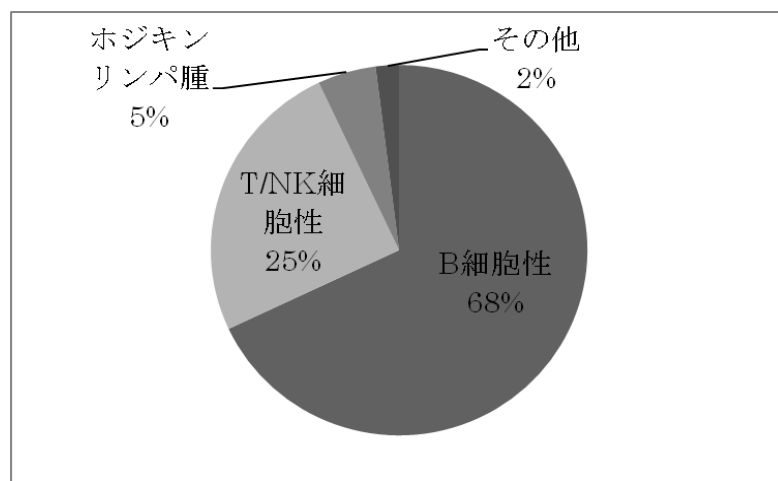


図3 悪性リンパ腫の発生頻度（がん情報センターより引用）⁷

悪性リンパ腫はホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫に分類されている。本邦ではホジキンリンパ腫は1割以下と少なく、非ホジキンリンパ腫が圧倒的に多く発症している。特に非ホジキン腫のB細胞性悪性リンパ腫は全体の7割近くにおよんでいる。（図3）今回の研究対象であるPELもB細胞性非ホジキンリンパ腫に分類される。

悪性リンパ腫の悪性度については概ねその悪性リンパ腫の種類（表1）とステージ（表2）により治療法が決定される。

表 1. 一般的な悪性リンパ腫と悪性度について

悪性度	B細胞性	T/NK細胞性
低悪性度	小細胞性 MALT 濾胞性 (グレード1,2,3a)	菌状息肉腫
中悪性度	形質細胞腫／骨髄腫 マントル細胞 濾胞性 (グレード3b) びまん性大細胞型	末梢T細胞性 血管免疫芽球型 NK/T細胞性鼻型 未分化大細胞型
高悪性度	リンパ芽球型 バーキット	リンパ芽球型 成人T細胞性

表 2. 悪性リンパ腫のステージ

I期	一つのリンパ節領域、またはリンパ組織 (扁桃腺、脾臓、胸腺など) に病変がとどまる場合。リンパ節以外の限局的なリンパ腫病変である場合。
II期	横隔膜を境界として、その上または下いずれか一方に限局した2つ以上のリンパ節領域、リンパ組織の病変。
III期	横隔膜をはさんで両側におよぶリンパ節領域またはリンパ組織における病変。
IV期	リンパ節以外の臓器へ広範な浸潤がみられる場合、たとえば、骨髄、肝臓などの臓器に病変がある場合。

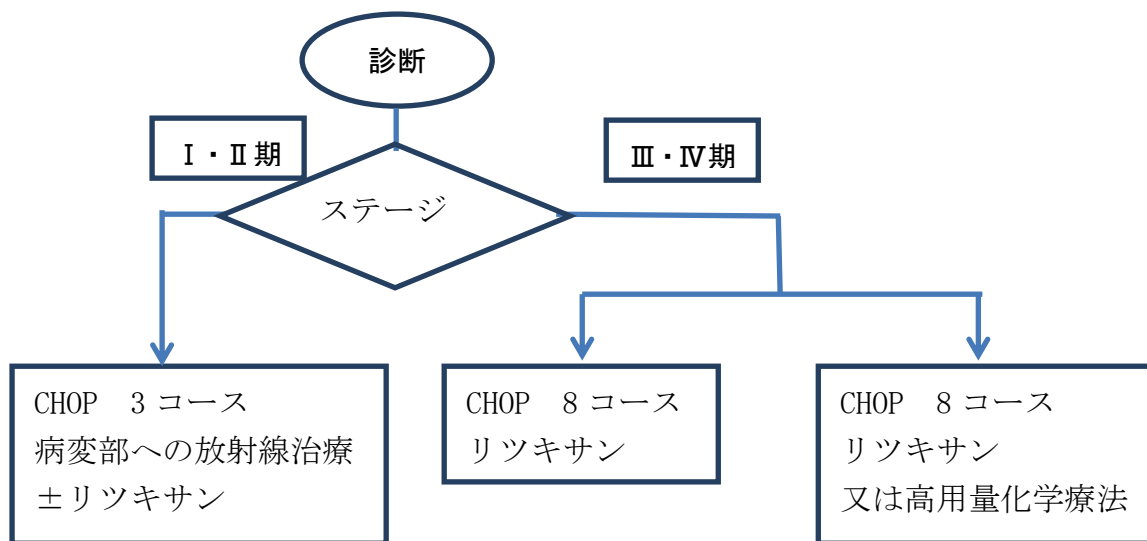


図4. 悪性リンパ腫の治療例（がんサポート情報センターホームページより引用）⁷

図4は悪性度が比較的高い悪性リンパ腫における治療法の一例を示したものである。悪性リンパ腫の標準的な治療法としてはCHOP療法が用いられる。

CHOPは①Cyclophosphamide - シクロフォスファミド ②Hydroxydaunorubicin - ドキソルビシン ③Oncovin®（商品名：オンコビン）の3種の抗がん剤と④Prednisolone - プレドニゾロン（副腎皮質ホルモン）を組み合わせた治療法である。また、CD20陽性のB細胞性悪性リンパ腫ではリツキシマブが有効であることが知られているため、CHOP療法と併用してR-CHOP療法がおこなわれる。しかし、PELにはCHOP療法の効果が乏しく、B細胞性悪性リンパ腫ではあるものの、リツキシマブの効果も期待できないため、PELの治療には通常よく用いられるCHOP療法とは違った治療法の確立が必要である。

1-5 Primary Effusion Lymphoma (PEL)

PELは、HHV-8の感染により発症するとされている。HHV-8は当初、カポジ肉腫から発見されたことから、カポジ肉腫関連ヒトヘルペスウイルス (KSHV) と名付けられた。しかし、その後8番目に見つかったヒトヘルペスウイルスであることからHHV-8と呼ばれるようになり、現在ではこの2つの名称がともに使用されている。

カポジ肉腫はハンガリーの皮膚科医Moritz K.Kaposiにより、皮膚に生じる多発性の色素斑性肉腫として報告され、10年後にGiraldoらによりカポジ肉腫の培養組織からヘルペスウイルス様粒子が同定された。その後、米国の同性愛者の中からもこのウイルスが検出され、カポジ肉腫の他にもカリニ肺炎やサイトメガロウイルス感染症などと合併しているケースが多く、免疫不全症を発症していることは明らかであるため、エイズの合併症として認知されるようになった。しかし、カポジ肉腫は男性の同性愛者のみに発症し、血液製剤でHIVに感染したエイズ患者には見られなかった。またカポジ肉腫は悪性腫瘍であるにもかかわらず、免疫能が回復すると自然治癒することが報告された。このような疫学的観点から、腫瘍ではなく、ウイルスのような病原体が原因ではないかと考えられるようになった。その後、病原体の検出が試みられ、1994年にコロンビア大学のChangらが、カポジ肉腫の病変部からヘルペスウイルス様DNA断片を発見した。さらに、この断片をクローニングした結果、今までに発見されたウイルスとは違うことが分かった。その後、 γ -1ヘルペスウイルス亜科 (lymphocryptovirus属) のEpstein-Barr Virus (EBV)と γ -2ヘルペスウイルス亜科 (rhadinovirus属) のHerpesvirus saimiri(HVS)に相同性がある新種のウイルスであることが確認された。これらのEBVとHVSは、ヒトやサルに悪性リンパ腫を引き起こす癌ウイルスとして知られ、これらのウイルスに類似していることから、この新しく発見されたウイルスも癌ウイルスである可能性が示唆された^{8,9}。また、このウイルスは、カポジ肉腫ではエイズに合併する症例の他に、エイズとは無関係な地中海やアフリカの症例からもほぼ100%の検出率で検出され、カポジ肉腫との関連が決定的となった。このウイルスはカポジ肉腫以外からもウイルス断片が発見され、その疾患の一つにPELと呼ばれる特殊なリンパ腫があり、このウイルスがカポジ肉腫より、さらに高コピー数で感染していることが報告された。その後、このリンパ腫から感染細胞株が樹立され、ウイルスの粒子が同定され、1996年に140 Kbpにおよぶ遺伝子配列が明らかにされた。現在では、カポジ肉腫やPELなどの疾患には170 KbpのHHV-8が関係していることが明らかにされている^{8,9}。

1-6 M-β-CyD (methyl-β-cyclodextrin) について

シクロデキストリンは、デンプンに CyD 生成酵素を作用させて得られる環状構造を持つオリゴ糖であり、環状の内側が親油性、外側が親水性構造になっている (図 5)。これにより、内側に脂溶性の高いものを包接し、包接複合体を形成する。また、シクロデキストリンの大きさは、0.5~1nm と、非常に微小なナノ粒子であり、機能性、生体適合性を利用し、医薬品の安定化や溶解性の調節などに用いられている (図 6)。

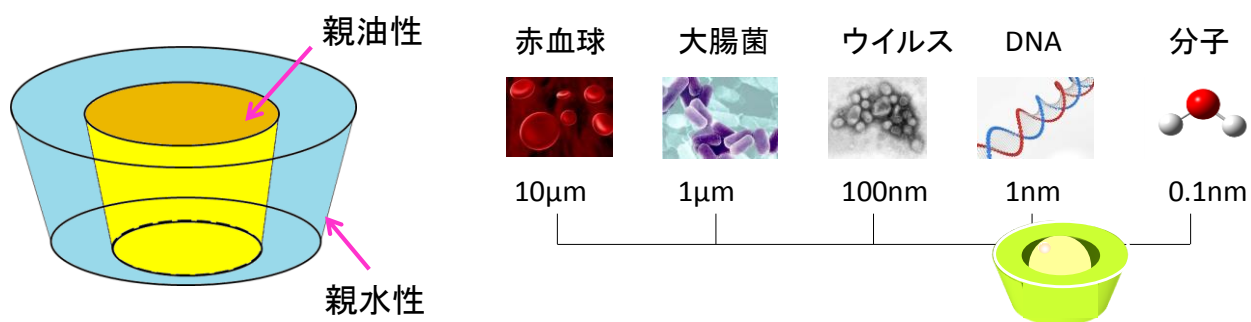


図 5. シクロデキストリンのイメージ構造

図 6. シクロデキストリンのサイズ

シクロデキストリンは大きく三つに分類され、生活用品や薬剤に多く使用されている。様々な用途に使用され、グルコースの数によって次のような特徴がある (表 3)。

	α-CyD	β-CyD	γ-CyD
グルコース (個)	6	7	8
水溶性	○	△	○
消化性	×	×	○
使用例	ダイエット用サプリメント (腸内での動物性脂肪の包接・排泄、整腸作用)	消臭芳香剤 (芳香剤の包接・徐放、悪臭の包接、揮発成分の包接)	栄養サプリメント (腸内での吸収力改善)

表 3. シクロデキストリンの代表的な使用用途

現在、メチル化体やヒドロキシアシル化体など種々のシクロデキストリン誘導体が開発され、包接特性を利用したDDS応用研究が盛んに行われている。最近、担がんマウスにおいてM- β -CyDを腹腔内に単独投与（800mg/kg）することにより、高い抗腫瘍効果を示すと報告された³。

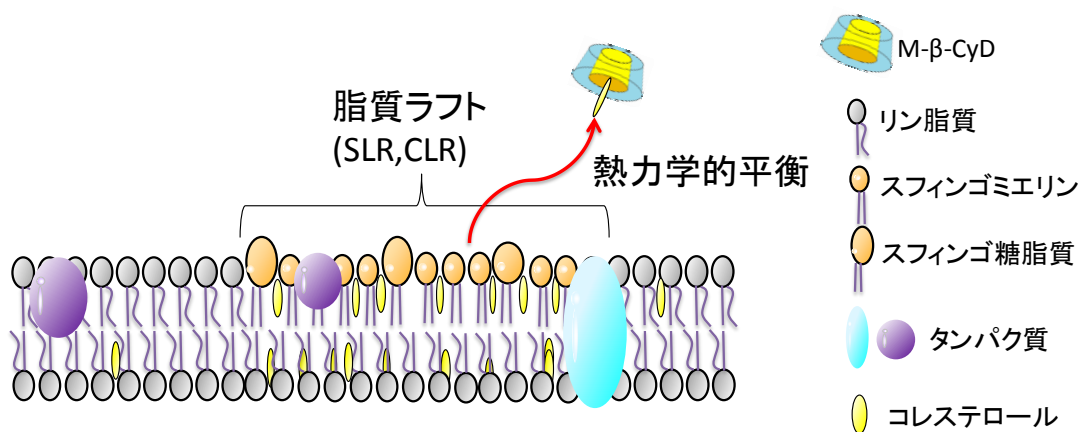


図7. 細胞膜上の脂質ラフトの構造

細胞膜上には、コレステロールやスフィンゴ脂質が局在する脂質マイクロドメインの存在が知られており、近年、少なくとも、スフィンゴ脂質リッチリピッドラフト（SLR）およびコレステロールリッチリピッドラフト（CLR）の2種が存在するとされている。これらは総じて脂質ラフトと呼ばれる。

シクロデキストリンは、細胞膜の脂質ラフトから熱力学的平衡に基づいてコレステロールを引き抜くことが報告されており⁴、また、シクロデキストリンが細胞膜からコレステロールを引き抜くことにより、PI3K-Akt経路を抑制し、アポトーシスが誘導されることも報告されている¹⁰。

1-7 実験動物

生命科学の分野において、実験動物は欠かすことのできない資源である。特にマウスは繁殖能力が高く、近交系のマウスが存在するため実験の再現性が良いことから頻繁に使用される。また、ヒト疾患に類似した疾患を持つマウスが存在し、胚操作や遺伝子改変も行い易いため実験動物として欠かすことのできない存在である。しかし、マウスとヒトでは異なる点も多いことから、マウスの実験結果が必ずしもヒトに応用できるわけではない。

免疫不全マウスの開発の歴史は1962年のNudeマウスの発見にまで遡り、以来、様々な免疫不全マウスが生み出されてきた。1988年のHu-PBL Scidマウスの樹立により、マウスの体内でヒト血液細胞が生着し増殖分化するヒト化マウスが作製された。その後、1995年に機能的なT細胞とB細胞が欠損し、NK活性とマクロファージ機能が障害されたNOD/Scidマウスが樹立され、ヒト血液細胞の生着率が大幅に改善した。さらに、ヒト造血幹細胞の生着とT細胞分化にはNK細胞の活性を抑制することが重要であることが判明し、NK細胞のないNOGマウスやNSGマウスなどが樹立されることとなった。また、Jak3欠損マウスはNK細胞が完全に欠損していることからNOD/Scidと掛け合わせることで、NOD/Scid-Jak3欠損マウス（NOJマウス）が岡田らによって樹立された。しかし、NOGマウスやNOJマウスなどのNOD/Scid系の高度免疫不全マウスは生着率は良いものの繁殖が難しく、寿命が短いという欠点があった。その後、扱いが易しいBalb/c系の高度免疫不全マウス（Balb/c Rag-2/Jak3）が樹立された。

PELなどのヒト腫瘍の研究では、移植した腫瘍の生着率が高いことが重要である。このため、NK細胞の活性が弱い高度免疫不全マウスが必要とされた。また、*in vivo*の評価系として、マウスを生かしたまま腫瘍の進展を解析できる分子イメージングを取り入れることが非常に重要であると考えられた。しかし、無毛マウスには全てのリンパ球が欠損した高度免疫不全マウスは存在しないため、ヌードマウスと高度免疫不全マウスを交配して、高度免疫不全ヌードマウスの開発に着手した。ヒト腫瘍の生着率だけを考えれば、NOD/Scid系のマウスが最も良いが、放射線に弱く、短命で取り扱いも難しいことから、分子イメージングに適したヒト腫瘍モデルマウスとは言い難い。このため、放射線にも強く比較的長寿命であり、取り扱いも容易なBalb/c系の高度免疫不全マウスとヌードマウスを掛け合わせることにより、Nude-RJ及びNude-R/J-EGFPマウスを樹立した。

表4 免疫不全マウスとその特徴

系統	免疫系				体毛	ヒト腫瘍細胞の生着
	T細胞	B細胞	NK細胞	マクロファージ		
Nude	-	+	+	+	-	△
Scid	-	-	+	+	+	△
NOD	-	-	↓	↓	+	△
NOD/Scid	-	-	↓	↓	+	○
NOG,NSG,NOJ	-	-	-	↓	+	◎
Balb/c Rag-2/Jak3	-	-	-	+	+	◎

+ : 陽性 - : 陰性 ◎ : 非常に良好 ○ : 良好 △ : 可

岡田誠治：新規高度免疫不全マウスの樹立と医学・生命科学研究への応用から引用¹¹

第2章

PEL(Primary Effusion Lymphoma)に対する

methy- β -cyclodextrinの効果

2-1 実験の目的

PELは稀に発症する進行性の非ホジキンB細胞性悪性リンパ腫であり、体腔（肋膜、腹膜と心膜）内でリンパ滲出液を伴って増殖する浸潤性の腫瘍である。KSHV/HHV-8に感染することで発症する¹。PELの標準治療は未だ確立されておらず、診断からの平均余命は6か月以下と非常に予後不良であることで知られている²。したがって、これまでの化学療法とは違った作用機序を持つ新しい治療法の確立が早急に必要である¹²。シクロデクストリン (CyD) は薬の溶解率向上のためと生物学的効能を改善する目的で製薬の際の成分として使われてきた。M- β -CyDは細胞膜の脂質ラフトに接着し、コレステロールを細胞外へと引き出すことにより腫瘍細胞膜の構造を破壊し、アポトーシスを引き起こすことで、抗腫瘍効果があることが報告された^{3,4}。本研究では、PEL細胞に対するM- β -CyDの抗腫瘍効果を調べ、M- β -CyDの抗腫瘍剤としての可能性について評価した。

2-2 実験の材料と方法

2-2-1 細胞株と試薬

PEL細胞株として、BCBL-1 (NIH AIDS Reagent Programより入手)¹³、BC-1 (ATCCより入手)¹⁴、BC-3 (ATCCより入手)¹⁵、TY-1 (国立感染症研究所の片野晴隆博士よりご供与)¹⁶、GTO (本研究室で樹立)¹⁷を使用した。これらのPEL細胞はRPMI 1640に56°Cで30分加熱し不活化した10%ウシ胎児血清とペニシリン(100U/ml)及びストレプトマイシン(100 µg/ml)を添加し、37°C、5% CO₂で培養した。Methyl-β-cyclodextrin (M-β-CyD)はシグマから購入した。

2-2-2 MTT解析

MTT法によりPEL細胞株に対する増殖抑制効果について評価した。96穴のマルチプレート上にPEL細胞を播き (5×10^4 /well)、M-β-CyDを0-10mMの濃度で添加した。その後、37°Cで24時間培養し、MTT (最終濃度0.5 mg/ml) をそれぞれのウェルに加え、さらに3時間培養した後、10%SDSに0.01Nの塩酸を含む溶解剤100µlを加えて溶解した。測定にはELISA法で595nmフィルターを使用し、吸光度を測定した。

2-2-3 細胞増殖能の評価

細胞増殖能はヨウ化プロピデューム除去法により評価した¹⁸。BCBL-1 細胞株 (2×10^5 cells/ml)を6穴の培養ディッシュの中で1-6時間の間培養し、培養液中に、M-β-CyDが存在する場合としない場合の違いについて検討した。それぞれ培養した細胞を回収した後、PI染色し、LSR II flow cytometry (BD Bioscience, San Jose, CA)で解析した。データはFlowJo software (Tree Star, San Carlos, CA)で解析した。

2-2-4 培養液中のコレステロール試験

BCBL-1とGTOそれぞれ 1×10^6 個を35mm培養ディッシュで培養し、20mMのM-β-CyD を添加後37°C、1時間培養した。その後、遠心機により10,000 rpmで5分遠心し、培養液中のコレステロールをコレステロール-テスト (和光製) を使用し測定した。

2-2-5 ウェスタンブロット解析

BCBL-1細胞をM-β-CyD存在下、非存在下で培養後回収し、PBSで洗浄し、その後NP40バッファ【50mMのTris-HCl、pH 7.4、150mMのNaCl、1%のNP-40、1mMのNaF (フッ化ナトリウム)、1mMのNa₃VO₄ (オルトバナジン(V)酸ナトリウム) とプロテアーゼ阻害剤】を加えた。1時間氷中で静置後、試料を15分、

15,000rpmで遠心した。その後、上清（細胞可溶化物）を回収し、20 μ g のタンパク質をSDS-pageによって分離し、PVDF膜（GEヘルスケア、バッキンガムシャー、英国）で展開し比較した。使用した主な抗体は、以下の通りである。：抗caspase9 (4502)、抗cleaved caspase8 (9661)、抗caspase3 (9496)、抗Akt (4691)、抗phospho(Thr308)-Akt (2965)（Cell Signaling Technology、Danvers、MA）、抗アクチン(C-2)（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA）。検出用の試薬は、Chemi-Lumi One Super reagents（Nacalai Tesque, Kyoto, Japan）を使用した。ウェスタンブロットは、ImageQuant LAS 4000 system（GE Healthcare）を使用してアクチンをコントロールとして定量化した。

2-2-6 異種移植片マウスモデル

NOD/Rag-2/Jak3 欠損（NRJ）マウスは熊本大学のガイドラインに沿って飼育し、すべての実験手順とプロトコールは学内の動物実験委員会に承認を受けた。8週齢から10週齢のメスのNRJマウスにPBS 200 μ lSにBCBL-1 (7×10^6 個) 懸濁し、攪拌した後に腹腔内へと移植した。その後、PBSを投与する無治療群とM- β -CyD (500 mg/kg per day)を投与する治療群の2つに分けて飼育観察を行った。腫瘍の進行状況は体重と腹水の測定により評価した。

2-2-7 組織学的分析

10%ホルマリンで試料を固定し、パラフィン包埋処理した後、4 μ m厚の切片を作製し、KSHV / HHV-8 ORF73タンパク質 (LANA) の発現について調べた。切片はキシレンとエタノールの順に浸し、パラフィン除去後、蒸留水で洗浄した。15分電子レンジにかけて、抗原を賦活化した。切片を0.6%の過酸化水素を含むメタノールに室温で30分間浸けることにより、内在性のペルオキシダーゼ活性をブロックした。

ラット抗KSHV / HHV-8 ORF73 (Advanced Biotechnologies, Columbia, MD) モノクローナル抗体を5%のウシ血清アルブミンを含むPBSで1/1000に希釈して使用した。切片を4 $^{\circ}$ Cで一晩培養した後、PBSで2度洗浄し、HRP標識抗ラットIgウサギポリクローナル抗体 (DAKO, Copenhagen, Denmark) をメーカーのマニュアル通りに使用した。Histofine SAB-PO(M) kit (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) を使用して可視化した。

2-2-8 血球計算と血清LDH

赤血球数とヘモグロビン濃度は、Sysmex F-520 hematology analyzer (Sysmex Corp., Kobe, Japan) を使用して測定した。血清LDHは、LDH-cytotoxic test wako (Wako chemical, Osaka, Japan) を使用して測定した。

2-2-9 統計解析

すべての分析は3回行われ、平均値±標準偏差で示した。また、実験群の統計的有意差はスチューデント t 検定を用いて、p 値が0.05未満の時、有意差があると判断した。

2-3 実験結果

2-3-1 PEL 細胞における M- β -CyD の細胞活性阻害効果

PEL 細胞株 (BCBL-1, BC-1, BC-3, TY-1, GTO) に対する M- β -CyD の抗腫瘍効果について検討した。PEL 細胞株に M- β -CyD (0-10mM) を加え培養した。その24時間後に MTT 解析で細胞障害活性を検討した。図3で示すように、すべての PEL 細胞株で M- β -CyD の濃度依存的に細胞活性を抑制した。PEL の IC₅₀は 3.33-4.25mM であった。

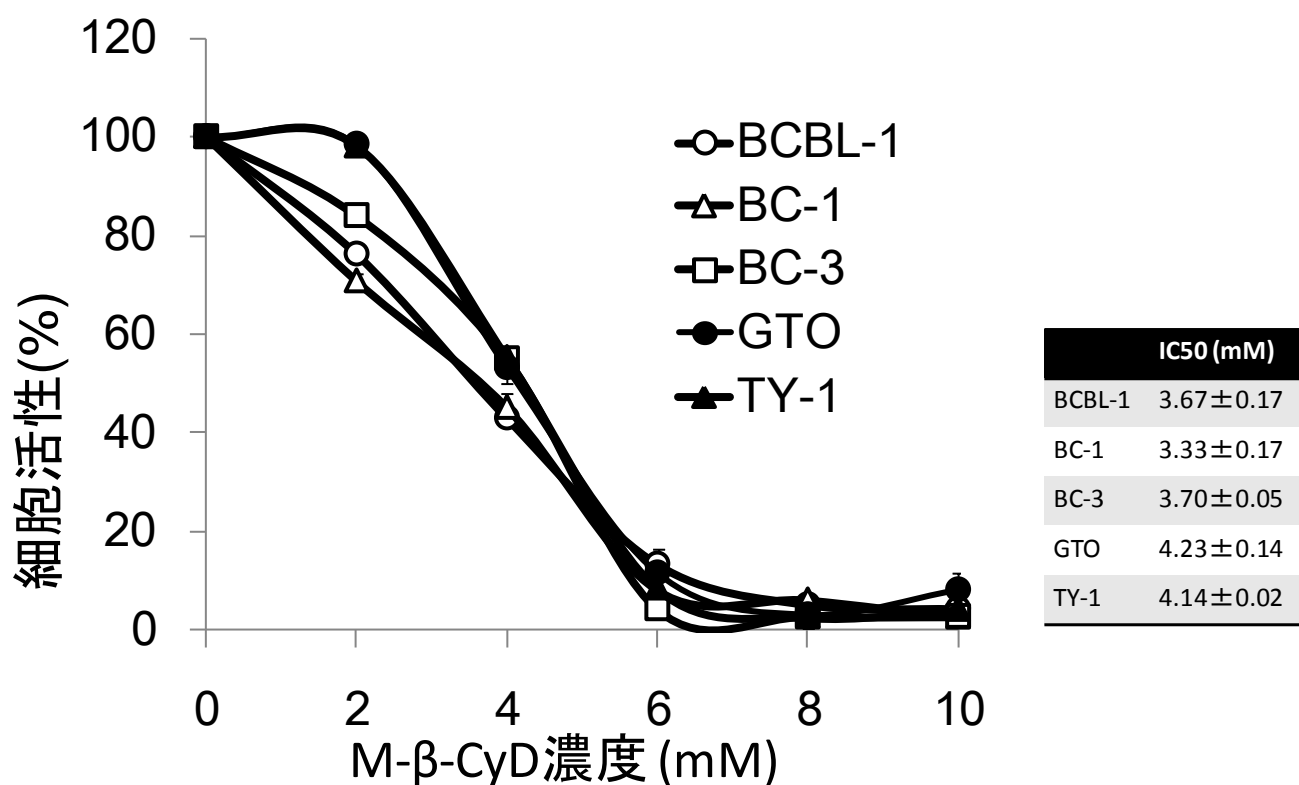


図9. M- β -CyD の PEL 細胞に対する細胞障害活性

BCBL-1, BC-1, BC-3, TY-1, GTO に対し、M- β -CyD 24 時間処理後の細胞障害活性を MTT 解析により検討した。このデータは同一の実験を 3 度行い、そのうちの 1 例を示している。

2-3-2 M-β-CyDによる細胞死およびアポトーシス誘導

図10 a)は、培養6時間後のM-β-CyDの濃度による死細胞率の割合を示す。また、図10 b)は、M-β-CyDを10mM加えた時の、時間による死細胞の割合の変化を示す。PI陽性細胞はM-β-CyDを添加ご時間及び濃度依存性に増殖した。また、細胞死がアポトーシスによるものか否かをウェスタンブロット法により検討した。M-β-CyD添加後、活性化caspaseが検出されたことから、3時間程度でアポトーシスが誘導され始めていることが示唆された(図10 c)。

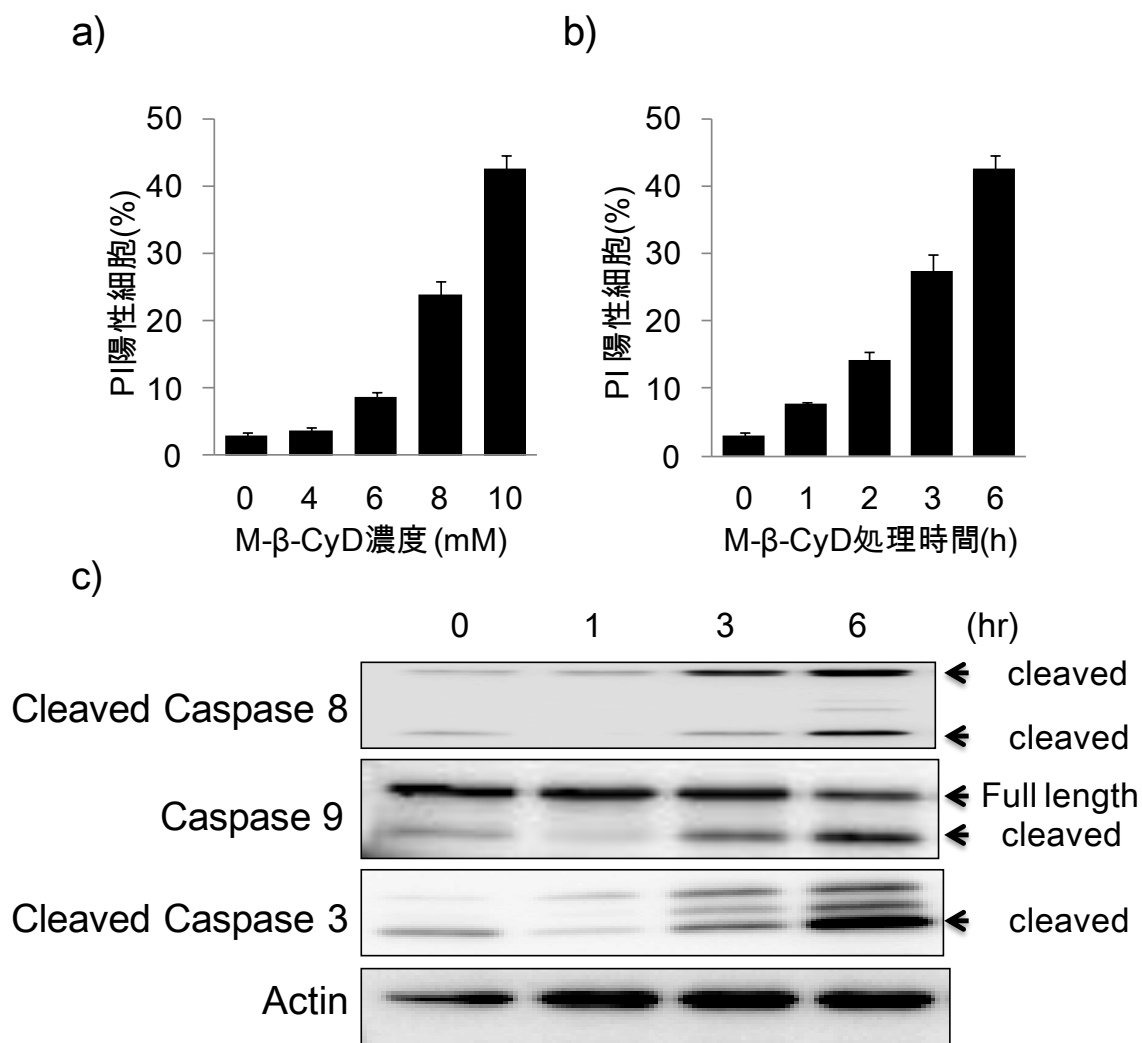


図10. M-β-CyDによるBCBL-1細胞株への細胞死およびアポトーシス誘導

a) 培養6時間後のM-β-CyDの濃度による死細胞率の変化

b) M-β-CyDを10mM加えた時の、時間による死細胞率の変化

c) M-β-CyDを10mM加えた時の、caspaseの活性化

2-3-3 M- β -CyD によるコレステロール引き抜き能

M- β -CyDは腫瘍細胞においてコレステロールを引き抜くことで、アポトーシスを誘発することが報告されている。M- β -CyD によるPEL細胞株でのコレステロール漏出を検討した。10mMのM- β -CyDが入った培養液で1時間培養し、上清中のコレステロール量をBCBL-1とGTOで測定した。

図11に示すように、BCBL-1, GTO細胞株において、M- β -CyD処理により上清中のコレステロール量は明らかに増加した(図11)。この結果より、M- β -CyDがコレステロールを強く漏出させていることが示唆された。

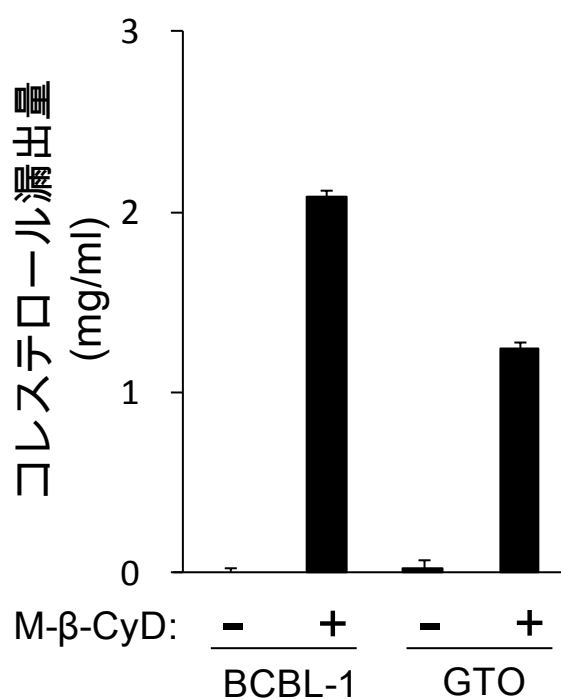


図11. M- β -CyDによるコレステロール引き抜き能

BCBL-1, GTO に対し、10mM の M- β -CyD を添加し、1 時間培養後の上清中コレステロール量を測定した。このデータは同一の実験を 3 度行い、そのうちの 1 例を示している。

2-3-4 コレステロール添加によるアポトーシス阻害効果

次に、M- β -CyDによるアポトーシス誘導と細胞膜からのコレステロールの引き抜き能の関与について評価した。培地にコレステロールを飽和したBCBL-1では、M- β -CyD単独投与と比較して、M- β -CyDによる抗腫瘍効果が有意に抑制されていた(図1 2a))。同じように、コレステロール飽和培地では、M- β -CyD単独投与と比較して、caspaseの活性化が顕著に抑制されたことを確認した(図1 2b))。この結果より、コレステロール添加によるアポトーシス阻害が示唆された。

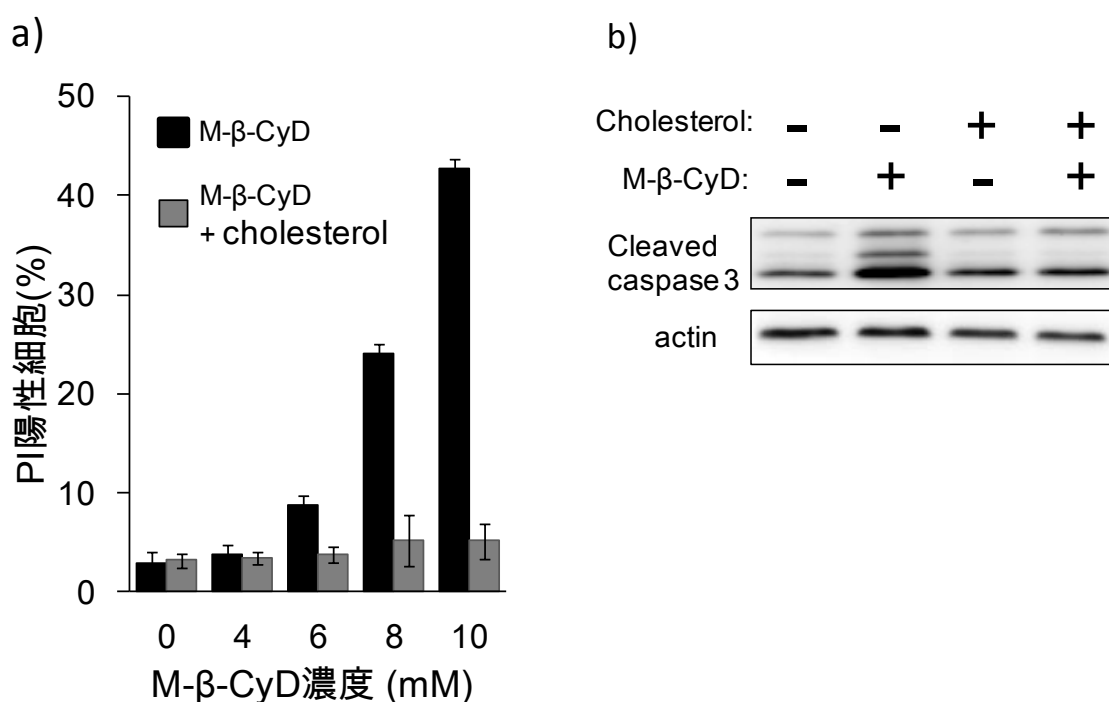


図1 2. コレステロール添加によるアポトーシス阻害効果

- a) BCBL-1 細胞株に対し M- β -CyD (0-10mM) を 6 時間処理した時のコレステロール添加有無における PI 陽性細胞率の変化
- b) BCBL-1 細胞株に対し M- β -CyD (10mM) 6 時間処理した時のコレステロール添加有無における caspase の活性化

2-3-5 M-β-CyD の抗アポトーシス阻害

これまでの結果より、M-β-CyDが細胞膜のコレステロール漏出に寄与していること、また、M-β-CyD 添加によりcaspaseが活性化し、アポトーシス誘導が起こることが明らかとなった。今回使用したM-β-CyDとはメチル基の数が一つ多いDM-β-CyD (di-methyl-β-cyclodextrin) おいて、細胞膜からコレステロールを引き抜くことでAktのリン酸化を抑制することが報告されている。そこで、M-β-CyDがPI3-Akt経路に与える影響を検討した。M-β-CyDは、Aktのリン酸化を強く抑制していた。これにより、M-β-CyDは細胞膜からコレステロールを引き抜くことにより、Aktのリン酸化を抑制し、抗アポトーシス作用が阻害されていると考えられた (図 1 3)。

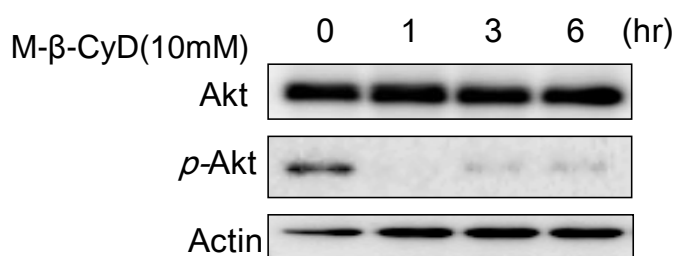


図 1 3. M-β-CyDの抗アポトーシス阻害効果

BCBL-1細胞株にM-β-CyD10mM添加し、0-6時間後のリン酸化Aktをウェスタンブロット法により確認した。このデータは同一の実験を3度行い、そのうちの1例を示している。

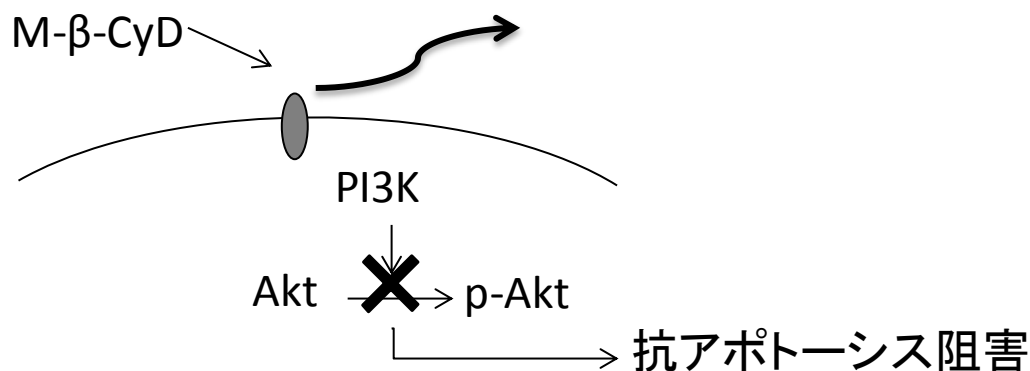


図 1 4. M-β-CyDによるアポトーシス誘導メカニズム

2-3-6 BCBL-1を移植した高度免疫不全マウスにおけるM-β-CyDの効果

これまでの結果より、M-β-CyDのPEL細胞株に対する抗腫瘍効果が認められたため、異種移植したマウスで効果を検証した。NOD/rag-2/Jak3 欠損 (NRJ)マウスにBCBL-1 (7×10⁶個) を腹腔移植し、PEL発症マウスモデルを作製後、前臨床試験を行った¹⁹。BCBL-1を移植して3日後より治療を行った。治療群では、腹腔内にM-β-CyDを500 mg/kgの濃度で投与した。21日間24時間おきの100μl投与を続けた。同様に無治療群では、21日間24時間おきにPBS100μlを投与した。その結果、M-β-CyDの治療群では健康状態が維持され、無治療群では腹水貯留による腹部の膨らみが認められた (図 1 4 a、図 1 4 b)。

また、無治療群のマウスは治療群のマウスに比べ、明らかな体重増加が認められた (n=7, p<0.01)。図 1 4 c)と表 5 に示すように、治療群の腹水量 (0.13 ± 0.19 ml) は無治療群の腹水量 (2.34 ± 0.49 ml) に比べ、極めて少量であった (P<0.01)。さらに、PEL細胞の肺への転移は、HHV-8由来の蛋白であるLANAを染色することで評価した。

M-β-CyDを投与した治療群では、LANA陽性細胞の数は40倍の視野で0~1個であるのに対し、無治療群ではLANA陽性細胞の数は40倍の視野で10~20個であった (図 1 4 d)。これらの結果からM-β-CyDはin vivoでもPELの増殖を抑制していることは明らかである。

M-β-CyDの副作用として、マウスにおいて高濃度条件下での静脈投与が溶血を誘発することが知られている。そこで我々は治療群の赤血球数、Hb、LDHを確認した。その結果、図 1 5 に示すように、腫瘍に直接投与を行った場合この濃度であれば、溶血を起こす等の重大な副作用は認められなかった。

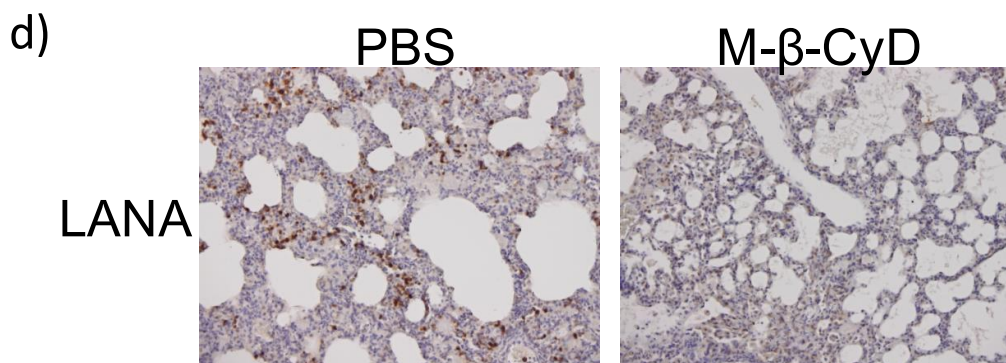
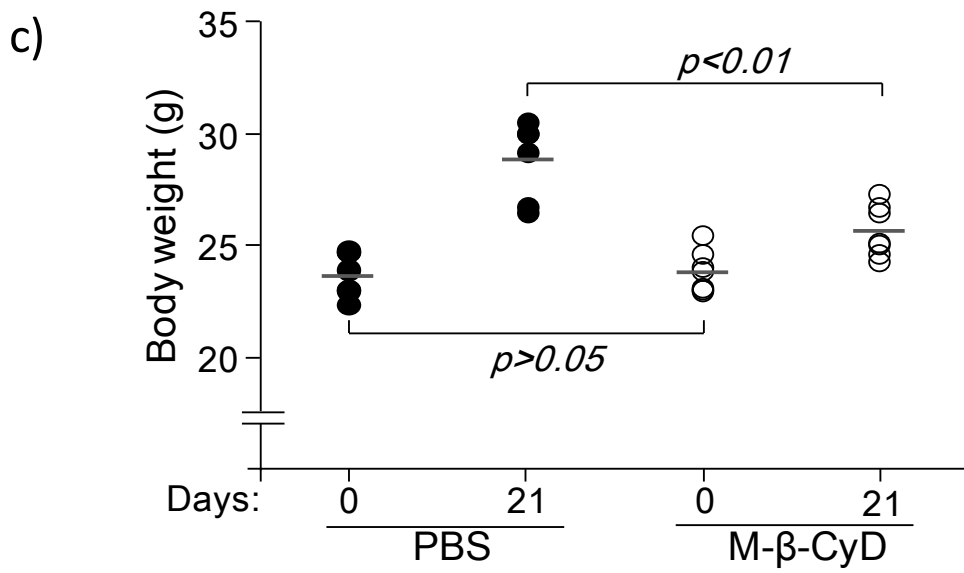
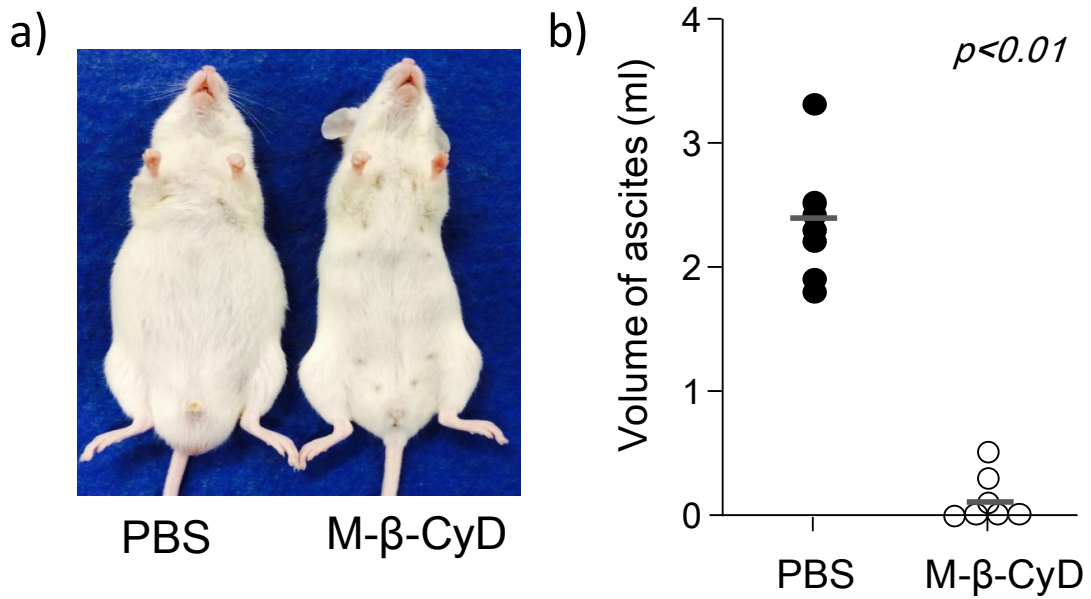


図 1 5. NRJ マウスにおける M-β-CyD の PEL に対する増殖抑制

- a) BCBL-1 細胞腹腔内移植後 3 週間のマウス (左側：無治療群、右側：M-β-CyD 投与群)
- b) BCBL-1 細胞を腹腔内に移植したマウスの腹水の量 (ml)
(左側：無治療群、右側：M-β-CyD 投与群)
- c) BCBL-1 細胞を腹腔内に移植したマウスの体重 (g)
(左側：無治療群、右側：M-β-CyD 投与群)
- d) BCBL-1 細胞を移植した NRJ マウスの肺の LANA 染色
(左側：無治療群・転移あり、右側：M-β-CyD 投与群・転移なし)

表 5. PELを移植したマウスの腹水の量(ml)

腹水	PBS	M-B-CyD
1	2.5	0.3
2	1.8	0.5
3	2.2	0
4	3.3	0
5	2.3	0
6	1.9	0
7	2.4	0.1
平均	2.342857	0.128571
標準偏差	0.492805	0.197605

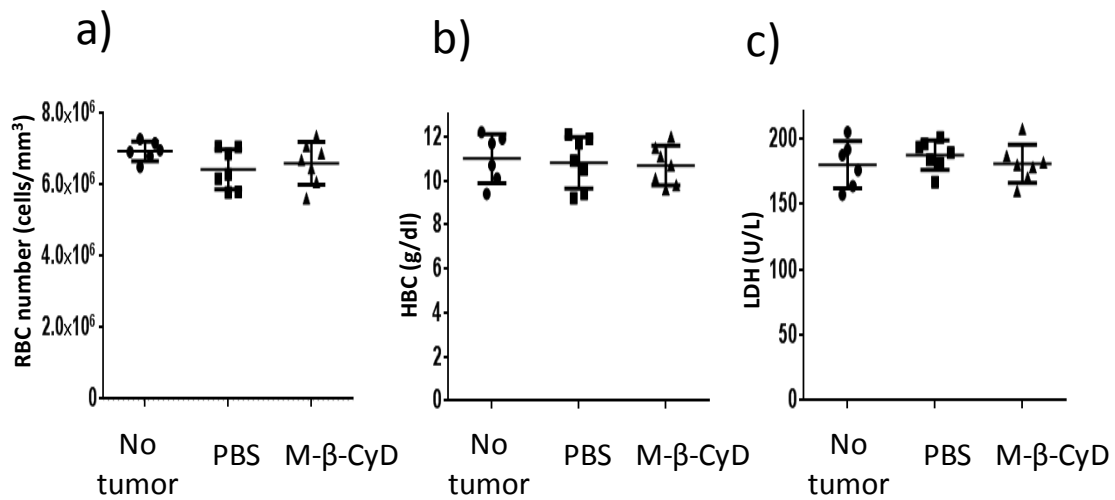


図 16. M-β-CyDの溶血作用

M-β-CyDを高濃度条件下で静脈に投与した場合、副作用として溶血が起こり、RBC・Hb・LDHの減少がみられることが報告されている。このため、腹腔内投与した場合に副作用が現れるか検討した。

a) RBC (Red Blood Cell : 赤血球数)

b) Hb (Hemoglobin Concentration : ヘモグロビン濃度)

c) LDH (Lactate Dehydrogenase : 乳酸脱水素酵素)

2-4 章総括

我々はM- β -CyDが細胞膜の脂質ラフトからコレステロールを引き抜くことで、PELにアポトーシスを誘導することを確認した。また、PELを発症したモデルマウスの実験でもM- β -CyDが劇的にPELの増殖を抑制した。しかし、PEL発症マウスに対してM- β -CyDを投与する際、副作用がなく抗腫瘍効果が得られるかどうかについては注意する必要がある。今回は、直接腫瘍内にM- β -CyDを投与することにより、強い抗腫瘍効果を持つことが示された⁴。一方、M- β -CyDの静脈内投与は、溶血作用を誘発することが知られている。このため、血中に投与する場合には腫瘍のみに集積するような指向性が必要である。この指向性に関する研究では葉酸を添加することで副作用をおこさずに、葉酸受容体を多く持つ腫瘍細胞に集積させることに成功したという報告がある^{20,21}。一方でPELは体腔内（肋膜、腹膜、心膜）でリンパ浸出液とともに増殖するという特徴を持つため、PELを発症したマウスの体腔内に直接M- β -CyDを投与することで抗腫瘍効果が得られた。この結果からM- β -CyDは化学療法耐性のPELの治療法として有用であることが示唆された。

第3章 蛍光イメージング用ヌードマウスの開発

3-1 実験の背景と目的

光イメージングを行うためには、無毛マウスを使用する必要がある。なぜなら有毛マウスでは、内部から放出される発光や蛍光シグナルが体毛により吸収され、十分なシグナル検出ができないためである。このため、無毛マウスを使用する必要があるが、無毛マウスには強いNK活性があり、腫瘍細胞の生着が25-35%に制限される^{5,22}。

近年ではNK細胞が完全欠損するように遺伝子を組み替えた高度免疫不全マウスが開発された²³⁻²⁶。このようなマウスの登場により、移植効率が大きく改善した。私たちが以前、Nude-RJマウスの遺伝的バックグラウンドであるBalb/cを用いて高度免疫不全マウス（Rag - 2 / Jak3二重欠損マウス）を作製した²⁷。このマウスは成熟T細胞とB細胞、NK細胞が欠損していて、ヒトCD34+血液幹細胞（HSC）とヒト末梢血単核球（PBMC）の両方が高効率で生着し、ヒト腫瘍の異種移植にも適していた²⁸。しかしながら、これらのマウスは有毛である。そこで、NK細胞の働きを抑えた、蛍光イメージングに適した高度免疫不全、且つ無毛マウスを開発する必要がある。

この研究では高度免疫不全ヌードマウスであるNude-RJマウス及びEGFPを発現したNude-R/J-EGFPを確立し、光イメージングに使用するマウスとしての有用性の評価を行った。

3-2 実験材料と方法

3-2-1 マウス

Balb/c Rag-2 欠損(Rag-2^{-/-})マウス と Balb/c Jak3 欠損 (Jak3^{-/-})マウスはBalb/c 系統マウスに10世代継代し、Rag-2^{-/-} マウス²⁹又は、Jak3^{-/-} マウス³⁰ (熊本大学動物資源開発センターより入手) をそれぞれ交配させることにより樹立している。さらにBalb/c Rag-2/Jak3 二重欠損(Rag-2^{-/-}Jak3^{-/-}) マウスを樹立するため、Balb/c Rag-2 欠損 (Rag-2^{-/-})マウス と Balb/c Jak3 欠損 (Jak3^{-/-})マウスを交配して樹立している。

このようにして樹立したBalb/c Rag-2/Jak3 二重欠損(Rag-2^{-/-}Jak3^{-/-}) マウスに Balb/c Nude mice (クレアから購入) を掛け合わせることにより、Balb/c Nude Rag-2^{-/-}Jak3^{-/-} (Nude-RJ)マウスを樹立した。

C57/BL6-EGFPトランスジェニックマウスは大阪大学の岡部勝先生よりご供与いただいた。このマウスはチキンβアクチンプロモーターとサイトメガロウイルスの強化因子によってEGFPを発現する³¹。Balb/c - EGFPマウスはC57/BL6-EGFPマウスにBalb/cを10代に渡って交配させて作製した。Balb/c-EGFP

Rag-2^{-/-}Jak3^{-/-} マウスはBalb/c Rag-2^{-/-}Jak3^{-/-} マウス²⁷とBalb/c-EGFP マウスを交配させることで樹立した。Balb/c-EGFP nude Rag-2^{-/-}Jak3^{-/-} マウス

(Nude-R/J-EGFP mice) はBalb/c-EGFP Rag-2^{-/-}Jak3^{-/-}マウス とBalb/c nude マウスの交配によって作製した。ヌードマウスでは、nu/nu 雌が子供を育てられないため³³、nu/nu 雄とnu/+ 雌の交配により系統を維持した。

マウスは学内のガイドラインに沿って動物施設で飼育されている。

Nude³⁴、Rag-2²⁹ とJak3³⁰の遺伝子欠損は尾組織からDNAを抽出し、PCR法により同定した。EGFPマウスは、紫外線ランプで蛍光を確認した。すべての実験手順とプロトコールは動物委員会の承認を得ている。

3-2-2 細胞株

ヒト胆管がん細胞株 (KKU-M213) は、培地にダルベッコ変法イーグル培地

(DMEM; 和光純薬、大阪、日本) を用いて培養した。56°Cで30分加熱し不活化した10%ウシ胎児血清 (JRH Bioscience、Lenexa、KS、USA) および、100u/mLのペニシリンと100のμg/mLストレプトマイシンを添加した³²。ヒト赤白血病細胞株 (K562) は理研の細胞バンク(筑波、日本)から購入した。培地には (RPMI1640; 和光純薬、大阪、日本) を使用し、56°Cで30分加熱し不活化した10%ウシ胎児血清 (JRH Bioscience、Lenexa、KS、USA) および、100u/mLのペニシリンと100のμg/mLストレプトマイシンを添加した。

mCherryを遺伝子導入したKKU-M213 (M213-mCherry) の作製方法は、メーカー

の指示通り、pmCherry-N1 Vector (Clontech、Mountain View、CA、USA) とトランスフェクション用の試薬Lipofectamine 2000 (Invitrogen、Carlsbad、CA、USA) を用いた。遺伝子導入した細胞は、ネオマイシン (G418; Carbiochem、Darmstadt、Germany) 含有培地により選択した。

3-2-3 フローサイトメトリー

マウス脾臓細胞はDX5-APC (panNK marker)、mCD122 (IL-2R β)-PE、mCD19-APC とmCD3-PE/Cy7 (eBiosciences、San Diego、CA、USA) により染色し、LSR II (BD Biosciences、San Diego、CA、USA) を使い分析した²⁷。データは、FlowJo (Tree Star, San Carlos, CA, USA) により解析した。

3-2-4 組織学的な分析

脾臓は10%ホルマリンで固定した後、ホルマリンを除去しパラフィン包埋を行った。切片は4 μ m厚で切り出し、ヘマトキシリンエオジン染色を行った。

3-2-5 異種移植片マウスモデル

8-10週齢のNude -RJマウス及びNude-R/J-EGFPマウスの左右側腹部皮下にM213-mCherry細胞株(6×10^6 個/100 μ l PBS)を移植した。移植16日後にマウスを蛍光イメージングシステムで撮像した。

3-2-6 イメージ取得

Nude -RJマウスは生体蛍光イメージングシステムであるMaestro (Cambridge Research & Instrumentation, MA, USA)を使用して撮影した。

Nude-R/J-EGFPマウスはMaestro及びマルチスペクトラル・イメージングシステムであるNuance multispectral imaging system (Cambridge Research & Instrumentation)を用いて撮影した。

3-2-7 統計解析

実験群の統計的有意差はスチューデント t 検定を用いて、p 値が0.05未満の時、有意差があると判断した。

3-3 実験結果

3-3-1 Nude-RJマウスにおける免疫表現型

Nude-RJマウスの免疫表現型を確かめるため、脾臓細胞を単細胞化し、mouse DX-5 (pan NK marker), CD122 (IL-2R β), CD3 (T cell marker)とCD19 (B cell marker) に対して蛍光抗体で標識した。ヌードマウスではBリンパ球およびNK細胞が検出された。一方、Nude -RJマウスの脾臓細胞からはTリンパ球、Bリンパ球およびNK細胞は検出されなかった (図 1 7 a)。またNude-RJマウス脾臓のヘマトキシリンエオジン染色を行った。Balb/cでは胚中心が認められるのに対し、Nude-RJマウスでは、胚中心が失われていた。(図 1 7 b))

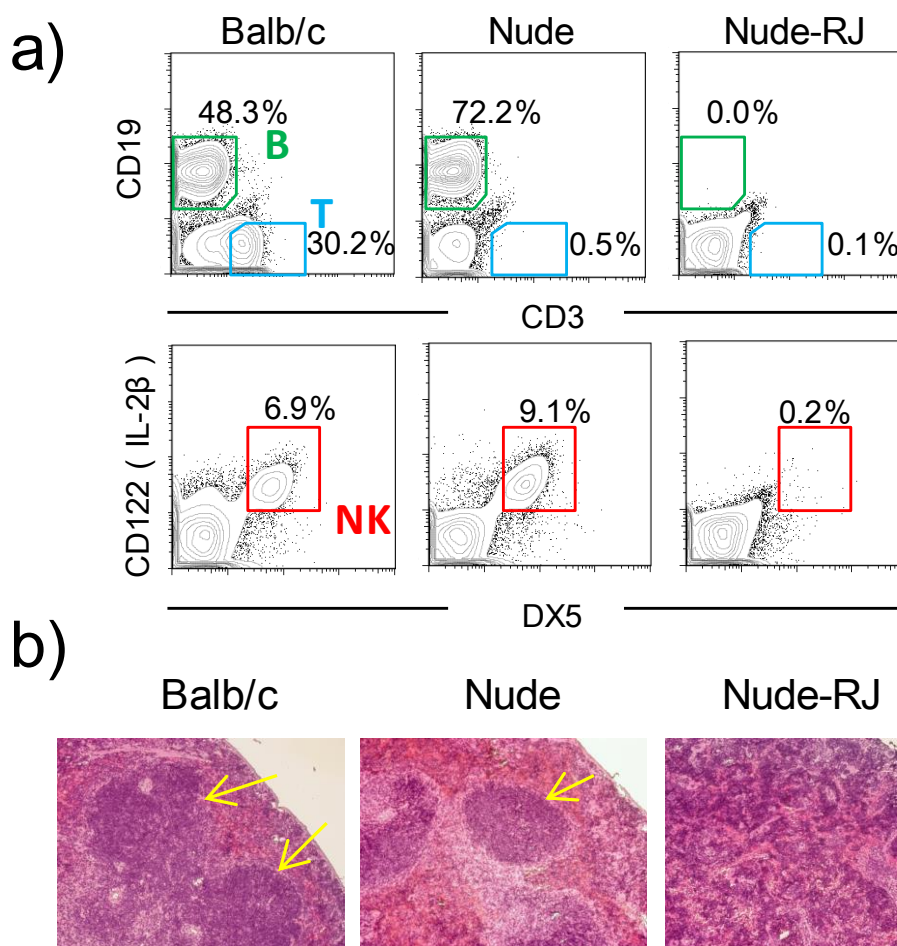


図 1 7. Nude-RJ マウスにおける成熟リンパ球と NK 細胞の欠損

a) Balb/c, Nude, Nude-RJマウスに対し、フローサイトメトリーにて免疫表現型解析を行った。

b) 脾臓のヘマトキシリンエオジン染色

3-3-2 Nude-R/J-EGFPマウスにおける免疫表現型

Nude-R/J-EGFPマウスの免疫表現型を確かめるため、脾臓細胞を単細胞化し、mouse DX-5 (pan NK marker), CD122 (IL-2R β), CD3 (T cell marker)とCD19 (B cell marker)に対して蛍光抗体で標識した。Balb/cマウスではBリンパ球、Tリンパ球およびNK細胞が検出された。一方、Nude-R/J-EGFPマウスの脾臓細胞からはTリンパ球、Bリンパ球およびNK細胞は検出されなかった。(図18a)
 またNude-R/J-EGFPマウスにおける脾臓細胞でのEGFPの発現を確認した。(図18b))

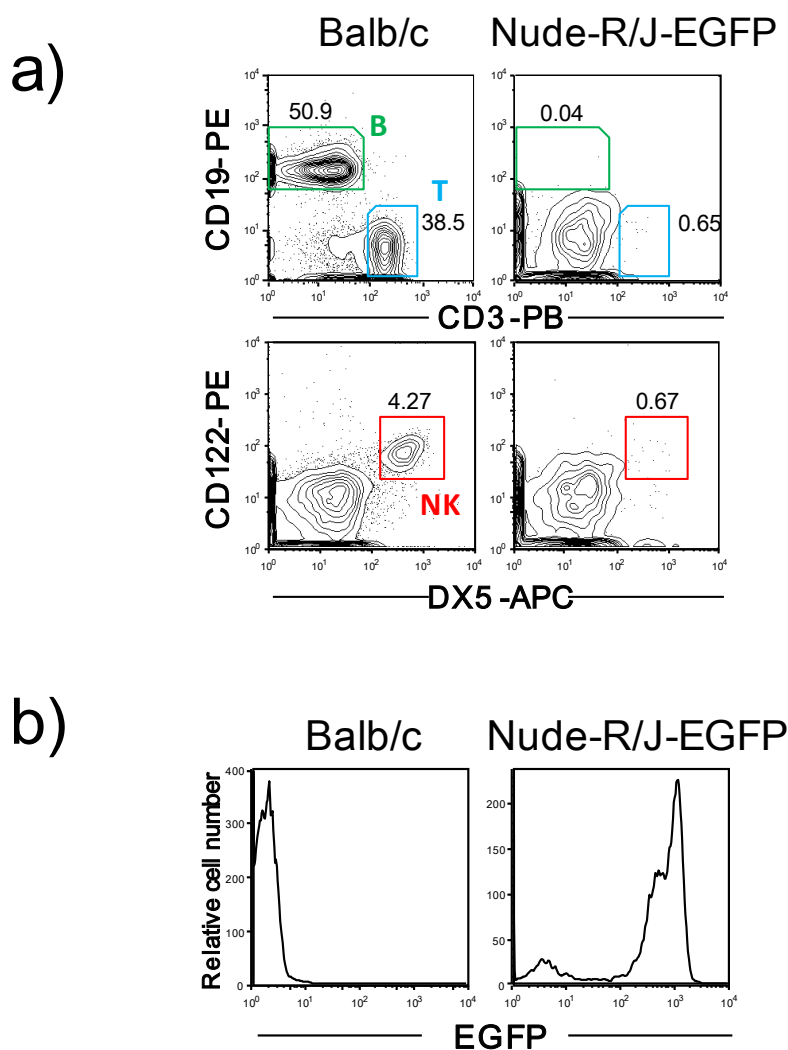


図18. Nude-R/J-EGFP マウスにおける成熟リンパ球と NK 細胞の欠損およびEGFP 発現

- a) Balb/c, Nude -R/J-EGFPマウスに対し、フローサイトメトリーにて免疫表現型解析を行った。
 b)脾臓細胞でのEGFPの発現

3-3-3 Nude-RJマウスにおける腫瘍細胞移植

Nude-RJマウスとヌードマウスにヒト血液系悪性腫瘍を移植して腫瘍形成性を比較した。それぞれのマウスの左右側腹部皮下にK562（ヒト赤白血病細胞）を移植した。皮下に形成された固形腫瘍は、ヌードマウスに比べ、Nude-RJマウスの方が大きな腫瘍を形成した（図19a）。皮下腫瘍移植16日後に、マウスを安楽死させ皮下腫瘍を摘出し、腫瘍重量を測定した。その結果、Nude-RJマウスの腫瘍重量は、ヌードマウスの腫瘍重量より重く、顕著に大きな腫瘍を形成していた。

(Nude-RJ: $1.54 \pm 0.64\text{g}$, Nude: $0.39 \pm 0.27\text{g}$, $n=6$ each, $P < 0.01$) (図19b,c)

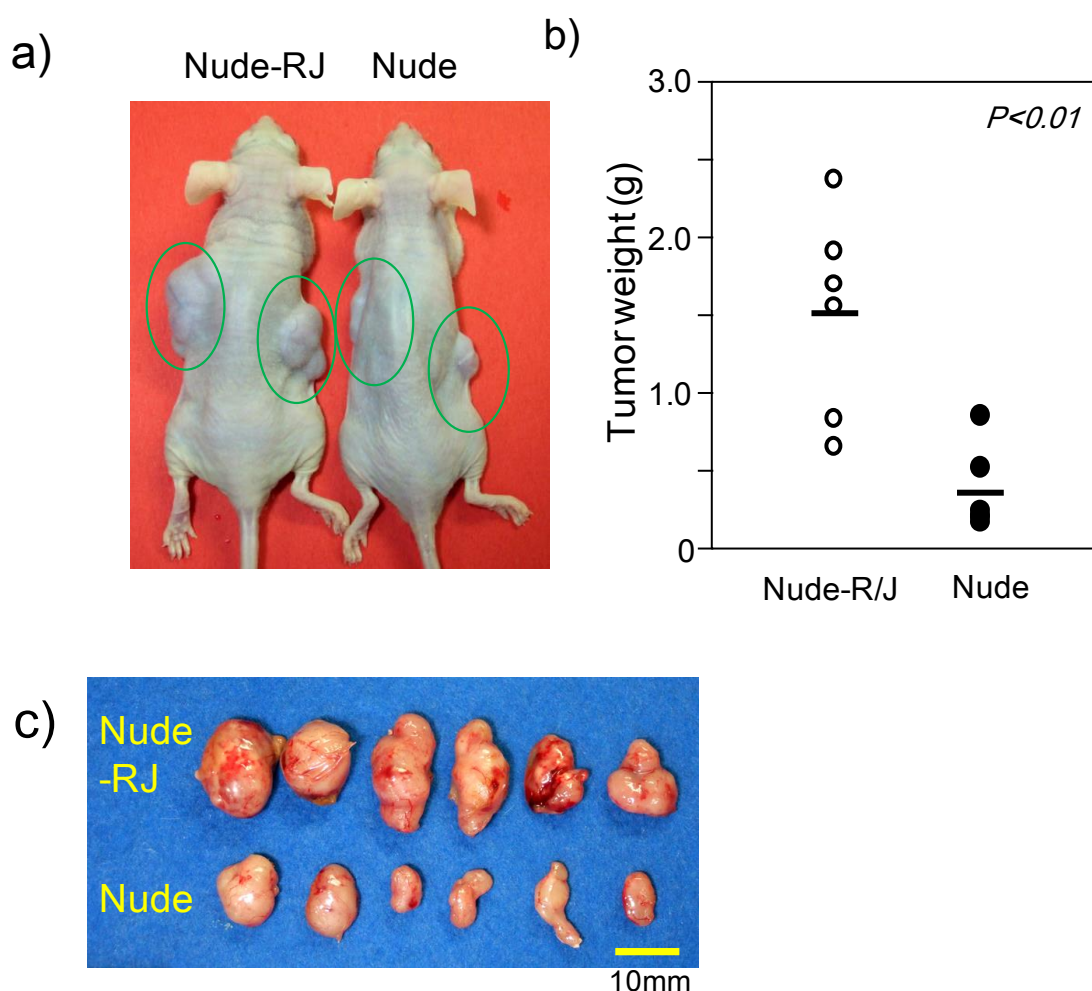


図19. Nude-RJマウスとヌードマウスの腫瘍形成性

K562（赤白血病細胞）をNude-RJマウスとヌードマウスの皮下にそれぞれ移植し、腫瘍の成長を比較した。

- a) 移植後16日目Nude-RJマウスとヌードマウスの写真
- b) Nude-RJマウスとヌードマウスから取り出した腫瘍重量の比較
- c) 腫瘍組織の写真

3-3-4 Nude-RJマウスにおける皮下腫瘍の蛍光検出

mCherryは赤色蛍光（図20a）を発現する。

リポソームトランスフェクション法により胆管がん細胞株（M213）にmCherryを遺伝子導入し、M213-mCherryを樹立した。

皮下に移植されたM213-mCherryの蛍光はMaestro（生体蛍光イメージングシステム）によって検出した。また、検出されたM213-mCherryの蛍光強度と蛍光領域と腫瘍重量をそれぞれ比較した。

蛍光強度と蛍光領域と腫瘍重量は、それぞれ相関していることが分かった（図20b）。

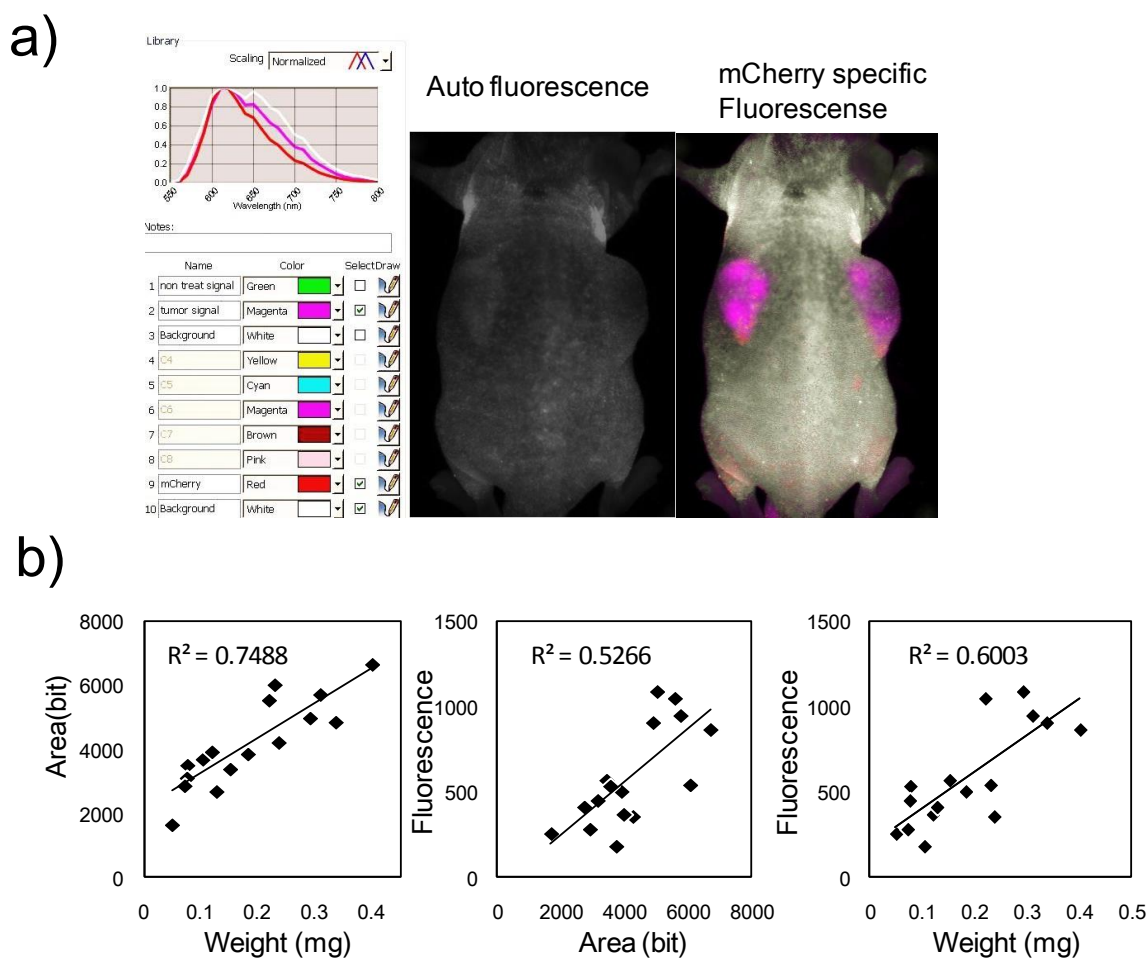


図20. 蛍光強度、蛍光領域と腫瘍重量の相関性

mCherryを発現するM213胆管がん細胞株をNude-RJマウスの皮下に移植した。移植12日後、Maestro（生体蛍光イメージングシステム）で蛍光強度と蛍光領域を測定した。

3-3-5 Nude-R/J-EGFPマウスにおけるEGFP検出

緑色蛍光の発現は、Nude-R/J-EGFPマウスに励起光を照射すると肉眼で簡単に検出できる。持ち運び可能なUVランプでも鮮明に検出された（図20a）。イメージング装置によりほとんどの臓器で緑色の蛍光を検出できた（図20b）。

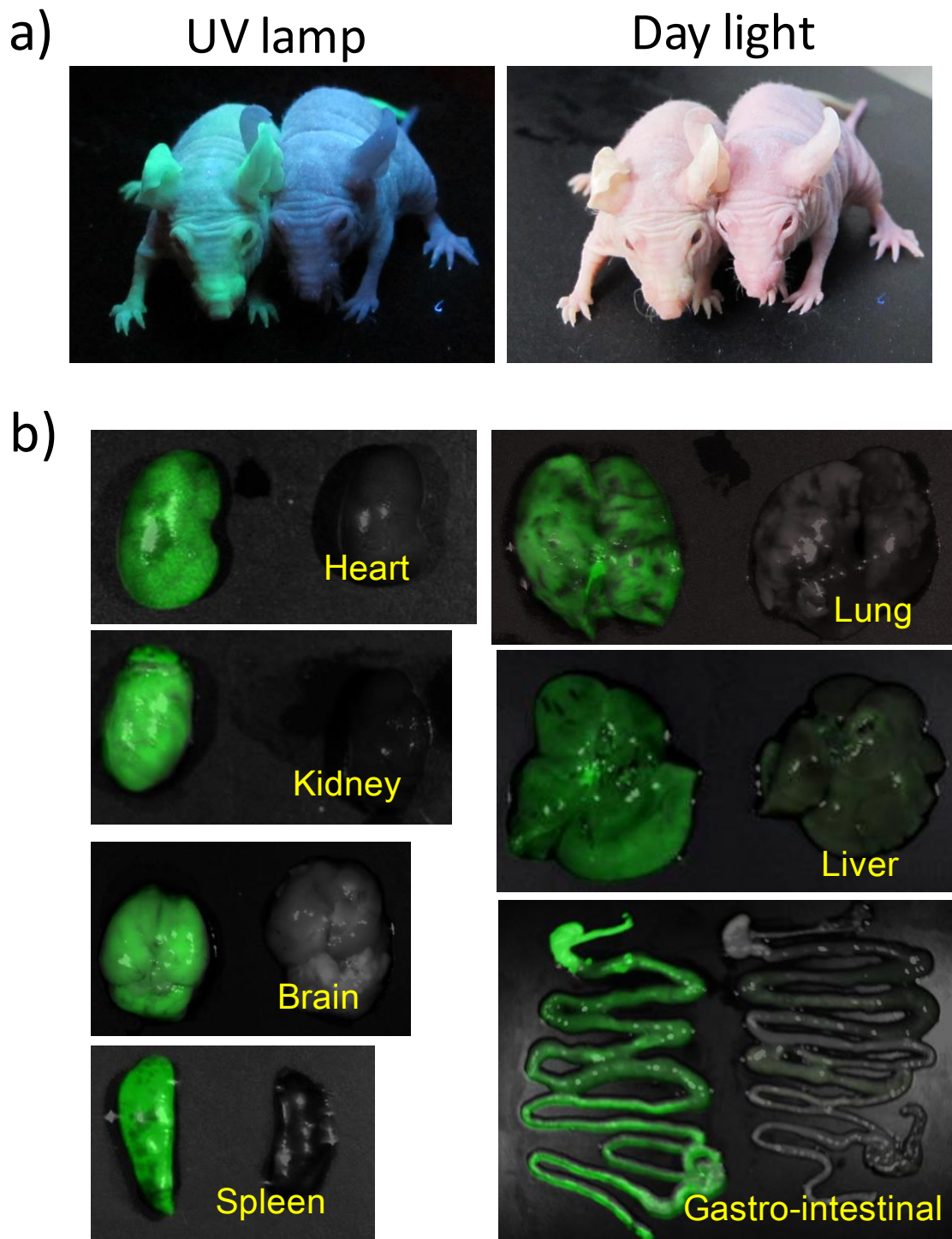


図 2 1 . Nude-R/J-EGFP マウス

a) 昼光色と手持ち用 UV ランプによる Nude-R/J-EGFP マウス照射

b) 蛍光イメージングシステムを用いた心臓、肺、腎臓、肝臓、脳、脾臓、消化管の画像

(左側 : Nude-R/J-EGFP マウス、右側 : ノードマウス)

3-3-6 Nude-R/J-EGFPマウスにおけるイメージング

Nude-R/J-EGFPマウスの緑色蛍光と左右脇腹に移植したM213-mCherryの赤色蛍光をMaestro（生体蛍光イメージングシステム）で区別することに成功した（図2 2）。また、M213-mCherryの腫瘍細胞内にできた宿主由来の新生血管をNuance（マルチスペクトラル・イメージング・システム）によって詳細に検出できた。Nude-R/J-EGFPマウスに違う蛍光を発する細胞を移植することにより、移植細胞が血管内を輸送される状況が鮮明に映し出され、二重蛍光イメージングにより宿主細胞と移植細胞を区別できた。

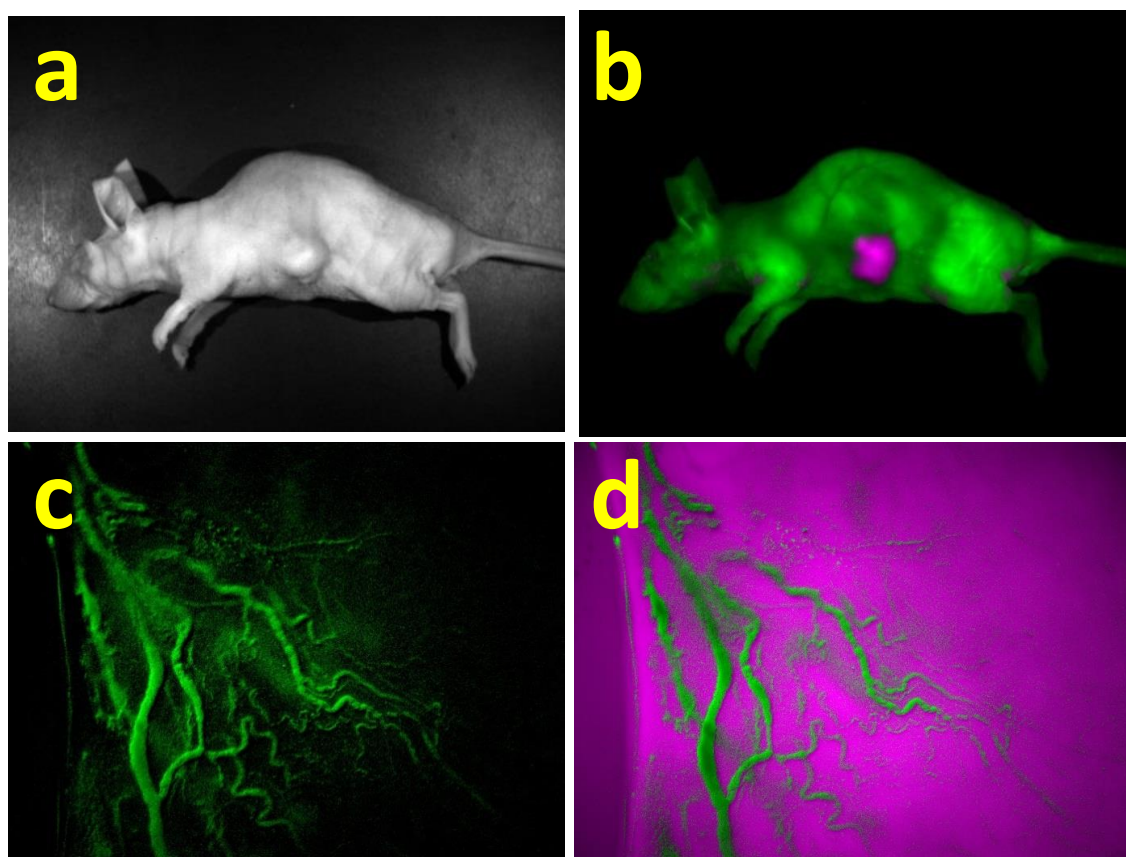


図 2 2 . Nude-R/J-EGFP マウスに移植した mCherry 発現腫瘍

- a. 皮下で成長した M213-mCherry 細胞株と Nude-R/J-EGFP マウス
- b. 皮下で成長した M213-mCherry 細胞株と Nude-R/J-EGFP マウスの蛍光画像
- c. Nude -R/J-EGFP マウスの新生血管
- d. M213 腫瘍内に新生した血管の可視化

3-4 章総括

免疫不全マウスを使ったヒト腫瘍移植モデルは前臨床薬剤の評価、転移、バイオマーカーの発見といった研究を含め、様々ながん研究に広く用いられている³⁵。免疫不全マウスの開発はNudeマウスに始まり、以来、様々な免疫不全マウスが生み出されてきた。ヌードマウスには、T細胞は欠損しているがB細胞とNK細胞を有するため、患者由来ヒト腫瘍の25-35%しか生着しないという欠点があった^{5,22}。この欠点を克服するため、*beige-nude*, *CBA/N nude* や *nude-scid mice* など、免疫不全マウスの開発が続けられてきた^{36,37}。他に、脾臓や胸腺の欠損マウスやNIHタイプ2ヌードマウス、または部分的にB細胞が欠損した *CBA/N nude mice*, *nude-beige* マウスや *NOD/Scid* ヌードマウスが確立されてきた。しかしながら、これらのマウスにもNK細胞が保持されており、移植の生着率の明らかな改善には至らなかった³⁸。近年では、マウスの開発技術の進歩により、*NOD/Scid common γ -欠損マウス* や *Jak3 欠損マウス*^{23-26,39}、*Balb/c Rag-2 common γ -40*、*Jak3 二重欠損マウス*^{24,28}の様なNK細胞が完全に欠損しているマウスが開発され、効率よく異種移植ができるよう改良された高度免疫不全マウスが作製された²⁸。

しかしながら、今日でもヌードマウスは非常によく使用されている。無毛という特徴から、腫瘍移植や評価が容易であるためである^{22,40}。また、近年の光イメージング技術の飛躍的な進歩により、ヌードマウスを使えば生体内の蛍光物質を体外から検出できるようになった。それに加えて、蛍光たんぱく質を発現する*in vivo*イメージングに適したいくつかの免疫不全マウスが開発されている⁴¹⁻⁴⁴。しかし、ヌードマウスをバックグラウンドに持つこれらのマウスでは免疫不全のレベルが十分ではないため、ヒト細胞の移植には適していない⁴²。

そこで*Balb/c*をバックグラウンドに持つ*Balb/c Rag-2/Jak3 二重欠損マウス*を使用し、*Nude-RJ*マウスを確立した。このマウスは、無毛でありNK細胞が欠損しているため、ヒト腫瘍移植モデルマウスにも非侵襲性の蛍光イメージング装置を用いた評価にも適したマウスである。さらに、EGFPを発現した *Nude-R/J-EGFP*マウスを樹立した。このマウスでは、移植細胞と宿主細胞が蛍光イメージングにより区別でき、マウスの体内に占める移植細胞区別が明確にできるように改良されている。

これらのマウスは、ヒト腫瘍研究や遺伝子研究において価値のある資源となり得る。また、バイオルミネッセンスや蛍光プローブを用いて行うイメージングの研究需要はこれから増加するため、重要な研究ツールと言える⁴⁵。これからの研究を推し進めるための強力なツールとして期待される。

第4章 総括および今後の展開

4-1 総括

先進国におけるエイズ治療の現状は、1995年にcARTが導入され、ウイルスをある程度制御できるようになったことで、大きな予後の改善がみられた。しかし、患者の生存期間が延びたことで、合併症が問題視されるようになった。cART以前では患者の合併症は日和見感染によるものが一番多く15年生存率は2割であった。cART以後の合併症は、日和見感染による死亡が激減したため、飛躍的に生存期間が長くなったものと考えられ、15年生存率は7割まで改善している。cART以後の合併症の割合として増加したものが、肝炎や悪性腫瘍であり、中でもHIV患者の予後を左右するものとして悪性腫瘍が挙げられる。悪性腫瘍の中で高頻度併発するのがエイズ関連悪性リンパ腫である。エイズ関連悪性リンパ腫の一種であるPELは、HHV-8を感染原因とする進行性のB細胞性非ホジキンリンパ腫であり、特徴として体腔内に胸水や腹水をともなう増殖する浸潤性の腫瘍である。また、PELは一般的な化学療法に耐性を示すことから、未だ標準治療が確立されていない。患者の平均余命は診断から平均3～6か月であり、早急な対策が求められている。

本研究で用いたM- β -CyDは、従来の化学療法とは全く違った作用機序を有し、高い抗腫瘍効果が報告されているため、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。次にPELを移植したマウスを生きたまま、腫瘍の進展を解析する方法として分子イメージングが有用であると考え、光イメージングによる生体情報を取得するために、高度免疫不全ヌードマウスの作製をおこなった。

M- β -CyDのPELに対する抗腫瘍効果については、in vitroでは濃度依存的に細胞障害性を及ぼし、アポトーシス亢進作用が認められた。また、M- β -CyDがPEL細胞膜から脂質を引き抜くことにより、PI3-Akt経路においてリン酸化が抑制され、抗アポトーシス阻害が起こると考えられた。in vivoでは高度免疫不全マウスに、PEL細胞株(BCBL-1)を移植し、移植3日後から21日間、24時間おきにM- β -CyD(500mg/kg)を腹腔内投与し、PBS投与マウスと比較した。

移植24日後の腹水の量を比較した結果、PBS投与群では平均2.5ml程度の貯留が認められたのに対し、M- β -CyD投与群では腹水の貯留はほとんど認められなかった。また、M- β -CyD投与群では立毛等の臨床症状も確認されなかった。よって、M- β -CyDは、PELの治療法として有用であることが示唆された。

光イメージングによる担ヒト癌マウスを解析するため、無毛の高度免疫不全マウスの作成を試みた。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。Nude-RJマウスとヌードマウスの皮下に**K562**細胞株を移植して比較し、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した。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。さらに、Nude-RJマウスからEGFPを発現するマウス (**Nude-R/J-EGFP**マウス) も開発した。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**) を左右脇腹の皮下に移植し、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) を使い撮像を試みた。形成された固形腫瘍と腫瘍内の新生血管の可視化に成功した。Nude-RJ-EGFPマウスは、宿主細胞と移植細胞を区別することが可能であり、腫瘍関連マクロファージや腫瘍関連線維芽細胞等、腫瘍微小環境の評価に使えると考えられる。今回樹立したマウスを用い、光イメージング法を発展させることで、PELのさらなる治療法確立が期待される。

4-2 今後の展開

PELの治療法として今後抗体療法や化学療法を試していきたい。PELは化学療法には耐性であるが、他の悪性リンパ腫と比較しても放射線への感受性が高いことを確認している。そこで、シクロデキストリンとの併用療法についても検討してみたいと考えている。また、その効果を光イメージング法により評価し、より良い評価ができる実験手法へと確立したい。

現在は、小動物用のSPECT/CTを使用したイメージング研究を行っている。SPECT/CTは放射性同位元素から放出される放射線を検出し、機能的な情報をイメージングするSPECTと形態的な情報をイメージングするCTで構成されている。このSPECTとCTから得られたイメージング画像を重ね合わせることで診断、評価の精度が上がる。SPECTとCTの利点は画像の美しさと正確性にある。また、3D動画での表示が可能であるため、多方からの状況が分かりやすく容易に評価が可能である。その反面、放射性同位元素を使用するため、放射性同位元素が持つ物理的半減期と代謝などによる生物学的半減期の影響を大きく受けるため、同じ条件で何度も撮像することが出来ないことと、撮像には時間が掛かるといったデメリットがある。この点では蛍光イメージングが優れており、遺伝子操作で細胞が蛍光を発するため、同じ条件のもとに撮像を行えるという強みがある。

また、CTと光イメージング画像の組み合わせもソフト上で可能であり、様々な種類の分子イメージング装置を上手く組み合わせることで、目的にあった画像を構成することができる。

また、分子イメージング装置の進歩には目を見張るものがあり、それに合わせた小動物モデルも必要となるため、動物の開発についても引き続き研究していきたい。

図23は、I-131投与マウスの甲状腺集積を撮像した画像であり、小動物用SPECT/CTによるPELに対するM- β -CyDの評価についても検証したいと考えている。

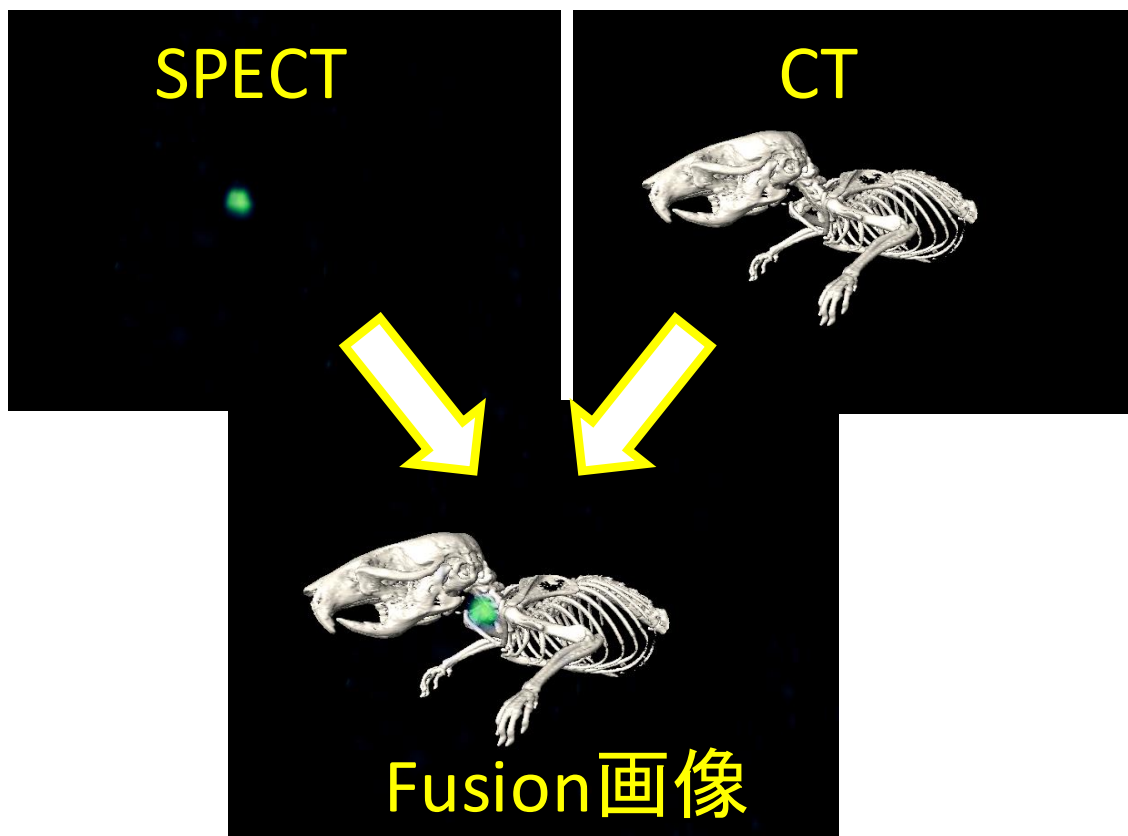


図 2 3 . SPECT/CTによるマウス画像

I-131投与後マウスの甲状腺集積をSPECT/CTで画像化したものである。SPECT/CTでは、SPECTによる機能学的生体情報、X線CTによる形態学的情報が得られ、画像を合成することにより診断・評価の精度が上がる。3D動画として出力させることにより、多方向から容易に評価が可能であり、多くの情報を得ることができる。

参考文献

1. Sausville EA, Burger AM. Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. *Cancer Res.* 2006; 66:3351-3354, discussion 3354.
2. Taghian A, Budach W, Zietman A, Freeman J, Gioioso D, Ruka W, Suit HD. Quantitative comparison between the transplantability of human and murine tumors into the subcutaneous tissue of NCr/Sed-nu/nu nude and severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* 1993; 53:5012-5017.
3. Grosse P.Y., Bressole F, Pinguet F, Antiproliferative effect of methyl- β -cyclodextrin in vivo and in human tumor xenografted athymic nude mice. *Br. J. Cancer.*, 78, (1998) 1165-1169.
4. Yunomae K, Arima H, Hirayama F, Uekama K, Involvement of cholesterol in the inhibitory effect of dimethyl-beta-cyclodextrin on P-glycoprotein and MRP2 function in Caco-2 cell. *FEBS Lett.*, 536, 225-231 (2003).
5. Shimosato Y, Kameya T, Nagai K, Hirohashi S, Koide T, Hayashi H and Nomura T: Transplantation of human tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 56: 1251-1260, 1976.
6. 厚生労働科学研究エイズ対策研究事業「国内外のHIV感染症の流行動向及びリスク関連情報の戦略的収集と統合的分析に関する研究班」
7. がんサポート情報センター <http://www.gsic.jp/>
8. 片野晴隆：HHV-8とリンパ増殖性疾患. 炎症と免疫 vol.8 no.1:68-75,2000
9. 片野晴隆, 森茂郎：HHV-8と悪性腫瘍ーカポジ肉腫, PELを中心として
10. Motoyama K, Kaneyama K, Onodera R, Araki N, Hirayama F, Uekama K, Arima H, Involvement of PI3K-AKT-Bad pathway in apoptosis induced by 2,6-di-*O*-methyl- β -cyclodextrin, not 2,6-di-*o*-methyl- α -cyclodextrin, through cholesterol depletion from lipid rafts on plasma membranes in cell. *Eur. J. Pharm.Sci.*, 38, 249-261 (2009).
11. 岡田誠治：新規高度免疫不全マウスの樹立と医学・生命科学研究への応用
12. Carreno BM, Garbow JR, Kolar GR, Jackson EN, Engelbach JA, Becker-Hapak M, Carayannopoulos LN, Piwnica-Worms D, Linette GP. Immunodeficient mouse strains display marked variability in growth of human melanoma lung metastases. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:3277-3286.
13. R. Renne, W. Zhong, B. Herndier, M. McGrath, N. Abbey, D. Kedes, D. Ganem, Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture, *Nature medicine* 2 (1996) 342-346.
14. E. Cesarman, P.S. Moore, P.H. Rao, G. Inghirami, D.M. Knowles, Y. Chang, In vitro establishment and characterization of two acquired immunodeficiency

- syndrome-related lymphoma cell lines (BC-1 and BC-2) containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences, *Blood* 86 (1995) 2708-2714.
15. L. Arvanitakis, E.A. Mesri, R.G. Nador, J.W. Said, A.S. Asch, D.M. Knowles, E. Cesarman, Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity-based) lymphoma cell line (BC-3) harboring kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in the absence of Epstein-Barr virus, *Blood* 88 (1996) 2648-2654.
 16. H. Katano, Y. Hoshino, Y. Morishita, T. Nakamura, H. Satoh, A. Iwamoto, B. Herndier, S. Mori, Establishing and characterizing a CD30-positive cell line harboring HHV-8 from a primary effusion lymphoma, *Journal of medical virology* 58 (1999) 394-401.
 17. H. Goto, Y. Kojima, H. Nagai, S. Okada, Establishment of a CD4-positive cell line from an AIDS-related primary effusion lymphoma, *Int J Hematol* 97 (2013) 624-633.
 18. A.R. Gottschalk, L.H. Boise, C.B. Thompson, J. Quintans, Identification of immunosuppressant-induced apoptosis in a murine B-cell line and its prevention by bcl-x but not bcl-2, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 7350-7354.
 19. N. Takahashi-Makise, S. Suzu, M. Hiyoshi, T. Ohsugi, H. Katano, K. Umezawa, S. Okada, Biscoclaurine alkaloid cepharanthine inhibits the growth of primary effusion lymphoma in vitro and in vivo and induces apoptosis via suppression of the NF-kappaB pathway, *International journal of cancer. Journal international du cancer* 125 (2009) 1464-1472.
 20. R. Onodera, K. Motoyama, A. Okamatsu, T. Higashi, H. Arima, Potential use of folate-appended methyl-beta-cyclodextrin as an anticancer agent, *Sci Rep* 3 (2013) 1104.
 21. R. Onodera, K. Motoyama, N. Tanaka, A. Ohyama, A. Okamatsu, T. Higashi, R. Kariya, S. Okada, H. Arima, Involvement of autophagy in antitumor activity of folate-appended methyl-beta-cyclodextrin, *Sci Rep* 4 (2014) 4417.
 22. Bellet RE, Danna V, Mastrangelo MJ, Berd D. Evaluation of a "nude" mouse-human tumor panel as a predictive secondary screen for cancer chemotherapeutic agents. *J Natl Cancer Inst.* 1979; 63:1185-1188.
 23. Yahata T, Ando K, Nakamura Y, Ueyama Y, Shimamura K, Tamaoki N, Kato S and Hotta T: Functional human T lymphocyte development from cord blood CD34+ cells in nonobese diabetic/Shi-scid, IL-2 receptor gamma null mice. *J Immunol* 169: 204-209, 2002.

24. Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, Bronz L, Piffaretti JC, Lanzavecchia A and Manz MG: Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 304: 104-107, 2004.
25. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, Watanabe T, Akashi K, Shultz LD and Harada M: Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor $\{\gamma\}$ chain(null) mice. *Blood* 106: 1565-1573, 2005.
26. Okada S, Harada H, Ito T, Saito T and Suzu S: Early development of human hematopoietic and acquired immune systems in new born NOD/Scid/Jak3(null) mice intrahepatic engrafted with cord blood-derived CD34 (+) cells. *Int J Hematol* 88: 476-482, 2008.
27. Ono A, Hattori S, Kariya R, Iwanaga S, Taura M, Harada H, Suzu S and Okada S: Comparative study of human hematopoietic cell engraftment into BALB/c and C57BL/6 strain of rag-2/jak3 double-deficient mice. *J Biomed Biotechnol* 2011: 539748, 2011.
28. Phimsen S, Kuwahara K, Nakaya T, Ohta K, Suda T, Rezano A, Kitabatake M, Vaeteewoottacharn K, Okada S, Tone S and Sakaguchi N: Selective cell death of p53-insufficient cancer cells is induced by knockdown of the mRNA export molecule GANP. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* 17: 679-690, 2012.
29. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM *et al*: RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68: 855-867, 1992.
30. Park SY, Saijo K, Takahashi T, Osawa M, Arase H, Hirayama N, Miyake K, Nakauchi H, Shirasawa T and Saito T: Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity* 3: 771-782, 1995.
31. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 1997; 407:313-319.
32. Seubwai W, Wongkham C, Puapairoj A, Okada S and Wongkham S: 22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D3 efficiently inhibits tumor growth in inoculated mice and primary histoculture of cholangiocarcinoma. *Cancer* 116: 5535-5543, 2010.
33. Flanagan SP. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res.* 1966; 8:295-309.
34. Hirasawa T, Yamashita H, Makino S. Genetic typing of the mouse and rat nude mutations by PCR and restriction enzyme analysis. *Exp Anim.* 1998; 47:63-67.

35. Sausville EA, Burger AM. Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. *Cancer Res.* 2006; 66:3351-3354, discussion 3354.
36. Maruo K, Shimamura K, Hioki K, Itoh M, Ueyama Y, Tamaoki N. Role of x-linked immunodeficiency (xid) and NK activity in rejection of human tumor xenotransplants in nude mice. *APMIS.* 1993; 101:345- 352.
37. Clarke R. Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 1996; 39:69-86.
38. Kelland LR: Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer* 40: 827-836, 2004.
39. Shultz LD, Ishikawa F and Greiner DL: Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* 7: 118-130, 2007.
40. Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, Bronz L, Piffaretti JC, Lanzavecchia A, Manz MG. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science.* 2004; 304:104-107.
41. Yang M, Reynoso J, Bouvet M, Hoffman RM. A transgenic red fluorescent protein-expressing nude mouse for color-coded imaging of the tumor microenvironment. *J Cell Biochem.* 2009; 106:279-284.
42. Yang M, Reynoso J, Jiang P, Li L, Moossa AR, Hoffman RM. Transgenic nude mouse with ubiquitous green fluorescent protein expression as a host for human tumors. *Cancer Res.* 2004; 64:8651-8656.
43. Shima K, Mizuma M, Hayashi H, et al. Potential utility of eGFP-expressing NOG mice (NOG-EGFP) as a high purity cancer sampling system. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012; 31:55.
44. Niclou SP, Danzeisen C, Eikesdal HP, Wiig H, Brons NH, Poli AM, Svendsen A, Torsvik A, Enger PO, Terzis JA, Bjerkvig R. A novel eGFP-expressing immunodeficient mouse model to study tumor-host interactions. *FASEB J.* 2008; 22:3120-3128.
45. Troy T, Jekic-McMullen D, Sambucetti L and Rice B: Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models. *Mol Imaging* 3: 9-23, 2004.