

# ヒト尿路上皮癌組織を用いた SCID マウス移植モデルの樹立と癌研究への有用性

## 学位論文内容の要旨

### 緒言

癌基礎研究において適切な動物実験モデルの樹立は必須と考えられる。ヌードマウスを代表とする免疫不全マウスへヒト培養癌細胞株を移植することが多いが、長期にわたり培養、継代をくり返された培養癌細胞株は、癌の多様性を失った少数クローンであり、種々の治療反応性が実際に臨床癌で期待されるものと異なる危険性がある。これに対し患者癌組織をdishを介さず直接ヌードマウスに移植しXenograft modelを樹立する方法も多種の癌で試みられ、尿路上皮癌についてその樹立は15-40%と報告されている。本手法で樹立された早期継代モデルは、癌細胞株由来モデルに比べ、本来の癌細胞の性質の保持が期待される。また、T-cell, B-cell系ともに障害されたSevere combined immunodeficient mice (SCIDマウス)を利用する方法も報告され、尿路上皮癌においてはMcCueらにより17例中10例(59%)と高率にSCIDマウス皮下で尿路上皮腫瘍を再現出来たと報告されている。しかし彼らの報告では継代が可能だったのは3系のみで、その維持、継代に伴う性質の変化、早期継代モデルの基礎実験利用への容易性は不明なままである。

本研究では様々な背景をもつ患者尿路上皮癌組織をSCIDマウス皮下に移植し、尿路上皮癌Xenograft modelを作成、樹立の可否に影響を与える背景因子、継代に伴う組織像及び性質の変化を評価し、最終的に癌基礎研究への有用性を検討した。

### 材料及び方法

#### (Xenograft modelの樹立方法)

遺伝子解析研究を含む医学研究への使用に関し同意が得られた尿路上皮癌手術検体を、切除後すぐに4-5mm片の腫瘍塊に調整し6週~10週齢の雌SCIDマウス右背部皮下に移植、移植後6ヶ月間観察した。腫瘍を形成した症例では、腫瘍体積が $1000\text{mm}^3$ - $1500\text{mm}^3$ に達した時点で麻酔下に犠牲死させ、腫瘍の一部を次のマウスへ継代し、一部はホルマリン固定後組織学的に評価した。残りは凍結保存した。以後もXenograftは同様の方法で継代維持した。Ki67ラベリングインデックス(LI)及びp53遺伝子を各継代で再評価した。患者癌検体からの初代移植で樹立されたモデルを $P_1$ と定義し、以後は継代を重ねるごとに $P_n$ ( $n$ =継代数)と表現した。

#### (組織学的検討)

摘出組織はホルマリン固定後、パラフィン包埋し、HE染色を行い組織学的観察を行った。さらにサイトケラチン、Ki67、CD20、ヒトHLA-ABCの発現に関し免疫組織学的に検討した。なお Ki67 LIは対物400倍数視野で少なくとも1000個の細胞をカウントし、陽性細胞数/全細胞数を百分率で示した。またEpstein-Barr virus (EBV) encoded RNAs (EBERs)の発現の有無は、パラフィン切片を使用しIn situ hybridization法(ISH)により検討した。

(RNA抽出及び酵母p53機能アッセイ)

50-100 mg の凍結組織を粉碎後1mlのTriReagent (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA)に溶解し, RNAを抽出した. 続いてp53遺伝子は酵母p53機能アッセイで評価した.

(Xenograftを用いた放射線治療シミュレーション)

4系のXenograft modelを用いて5Gy単回照射治療シミュレーションを行った. 4-5 mm 径の腫瘍塊をマウス右背部皮下に移植し腫瘍体積が250-350mm<sup>3</sup> (8-9mm径)に達した時点で, コントロール群, 照射群に無作為に振り分けた(一群5-8匹). コントロール群と治療群について, 治療開始体積から3倍になる時間の差をもってAbsolute growth delay(AGD)を算出した. また, 今回用いた4系は腫瘍倍加時間が異なるため, 各モデル間での放射線反応性の比較にはAGDを各Xenograftの腫瘍倍加時間で除することでSpecific growth delay(SGD)を算出した.

(統計学的処理)

Xenograft model 樹立の可否と背景因子との関連は  $\chi^2$  検定を用いて検討した. またグループ間でのKi67 LI の差は Student's *t*-test を使用し検討した.

結果

(初代移植の結果)

尿路上皮癌 30 検体(膀胱腫瘍 24 検体, 上部尿路腫瘍 6 検体)を移植し, 18 検体(60%)がマウス皮下で腫瘍を形成した. 組織学的に 15 例の形成腫瘍は患者腫瘍の特徴をよく保存し, 免疫組織学的検討の結果これら 15 例はサイトケラチン, HLA-ABC を発現しヒト由来の上皮系癌細胞であることが確認された. 一方, 3 例の形成腫瘍の組織像は移植癌組織と異なり, 小中型の円形の細胞の増殖像を呈した. 免疫組織学的に腫瘍は HLA-ABC, B-cell マーカーである CD20 を強発現したが, サイトケラチンは陰性であった. さらに *ISH* により腫瘍細胞は EBERs を発現していた. また, EBERs 発現リンパ球は由来患者膀胱癌の間質に浸潤していることも確認され, これら 3 例は腫瘍間質に浸潤した EBV 感染 B リンパ球由来のリンパ増殖病態と診断した. マウス皮下での腫瘍の形成の可否に関しては, 浸潤癌, もしくは低分化癌でよりマウス皮下で腫瘍を形成する率が高かったが統計学的有意差は認めなかった. また, p53 変異を有する腫瘍の Ki67 LI (平均値 $\pm$ 標準偏差, 52.2 $\pm$ 12.1%)は野生型のそれ(26.4  $\pm$  20.7%)のおよそ 2 倍で有意に増殖能力が高い結果であったが( $p = 0.0004$ ), 移植された患者腫瘍の p53 変異の有無および Ki67 LI とマウス皮下腫瘍形成の可否には関連を認めなかった.

(継代による Xenograft model の維持)

現在 15 検体中 11 検体が P<sub>2</sub> を超えて継代維持されている. 継代に伴い細胞はやや大型化し, より異型度の高い集団が優位となる傾向をみとめたが, 細胞形態, 組織構築パターンは非常によく保持され, p53 遺伝子は, すべての検体は継代を重ねてもオリジナルの患者腫瘍の p53 遺伝子を保持した. Ki67 LI に関しては Xenograft ではオリジナルの患者腫瘍に比べ若干増加する傾向があったが, 各世代間での変動は非常に小さく各モデルで安定していた.

(放射線単回照射による治療シミュレーション)

樹立した Xenograft のうち, 4 系を用いて腫瘍増殖遅延反応をエンドポイントに 5Gy 単回照射を施行した. 使用した 4 検体はすべて移行上皮癌より樹立されたモデルであるがその反応は大きく異なり, AGD は 20.3 $\pm$ 2.4 日 (平均値 $\pm$ 標準誤差) から 76.4 $\pm$ 7.4 日に分布した. 4 系の SGD は 0.8 $\pm$ 0.3 から 4.5 $\pm$ 1.3 に分布し, この結果は Xenograft の増殖速度及び Ki67 LI とは関連がなかった.

結論

尿路上皮腫瘍 30 検体を dish を介することなく SCID マウス背部に直接移植することで 15 検体(50%)で Xenotransplant が可能であった. これらモデルの大半が継代可能で, また患者腫瘍の性質を十分残した状況で治療実験が可能であった. 本モデルは癌基礎研究に有用で, 近年注目されるオーダーメイド医療研究の基礎となるもので今後のさらなる解析に繋がるものである.

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野々村 克 也

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 高 田 賢 藏

学 位 論 文 題 名

## ヒト尿路上皮癌組織を用いた

## SCID マウス移植モデルの樹立と癌研究への有用性

現在、ヒト癌基礎研究において頻用される動物モデルは、ヒト培養癌細胞株をヌードマウスを代表とする免疫不全マウスに移植する Xenograft である。このモデルは樹立が容易である利点を有するが、培養癌細胞株は長期にわたる継代培養に伴い由来癌腫の性質を大幅に失っている危険性があり、この Xenograft での反応が臨床癌での反応を反映していない可能性が危惧される。本研究では、SCID マウスへ直接ヒト尿路上皮癌検体を移植する方法で Xenograft を樹立し、由来腫瘍の性質を十分残した状態で治療実験を行い得るか評価した。結果、初代移植時 30 例中 15 例 (50%) で Xenograft を樹立出来たこと、肉眼的に固形腫瘍のみからなる系と、嚢胞を形成し内腔に腫瘍細胞が裏打ちする系の 2 種類の増殖様式を呈したこと、また 30 例中 3 例では膀胱癌間質に浸潤した EB ウイルス感染リンパ球が腫瘍化する現象が生じ Xenograft の樹立を妨げる現象があったこと、樹立モデルの大半が安定して継代維持出来たこと、継代によっても p53 変異、Ki67 ラベリングインデックスは由来腫瘍を反映し組織構築パターンの保持も良好であったこと、4 系の早期継代モデルを用いた 5Gy 単回照射放射線感受性試験では放射線感受性と腫瘍の増殖速度には関連がなく p53 変異をもつ系が最も放射線耐性を示したこと、最終的に本モデルの治療実験への利便性を報告している。

質疑応答では副査の高田賢藏教授から、放射線感受性試験が行われた Xenograft での反応と由来患者の治療成績との相関は認められるか、またオーダーメイド医療を考えた場合 Xenograft を用いた治療試験に要する時間が問題とならないか質問があった。これらの質問に対し申請者は、放射線感受性試験を施行した 4 系のうち由来患者が放射線治療を受けている 1 系では観察期間も短く相関は現時点では不明であること、また Xenograft を利用した治療試験は時間を要するが、尿路上皮癌が表在性癌から浸潤癌へと進行するの

に要する時間、また浸潤癌が遠隔転移を生じるのに要する時間も数年であることが多く、時間は大きな問題ではないと考えられると回答した。

次いで副査の守内哲也教授から膀胱癌における p53 変異の意味について今回の Xenograft での知見も併せて質問があった。申請者は、p53 変異は膀胱癌の予後不良因子とする報告と関連無しとする報告があり結論が出ていないこと、また Xenograft の増殖速度からは p53 変異が膀胱癌の growth advantage になるとは言い切れないと回答した。さらに今回の樹立 Xenograft を用いた放射線感受性試験がすべてのモデルで行われていない点に関し質問があり、申請者はその理由として嚢胞形成を伴う系では外表からの腫瘍計測が難しく、超音波による腫瘍体積のみの測定など別の測定方法で嚢胞形成性モデルの実験利用を考慮していると回答した。また、出席者からは p53 変異癌細胞を伴う Xenograft では継代に伴い p53 変異癌細胞が優位となっていくか質問があり、質問者の指摘どうりの現象が p53 酵母機能アッセイの結果みられたと回答した。

次いで主査の野々村克也教授より EB ウイルスと膀胱癌の発生の関連に関し質問があった。申請者は、発表内容では触れなかったが追加実験にて約 6 割の症例で膀胱癌間質に EB ウイルス陽性リンパ球の浸潤を認め、かつ一部の症例で EB ウイルスの溶解感染を膀胱癌間質で生じていること、またこの EB ウイルス陽性リンパ球の浸潤は表在性癌に比較し浸潤癌で高率に認めることから癌の進行に関与する可能性を考えていると回答した。最後に野々村克也教授より、実際の臨床応用への距離を埋めるべく、さらに多くの症例で Xenograft での反応と実際の患者の治療反応性を比較することが必要とのコメントで終了となった。

この論文は、将来の新たな医療の可能性を示しているものとして高く評価され、今後の発展によるオーダーメイド治療への寄与が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。