



Evaluation of the risk of lymphomagenesis in xenografts by the PCR-based detection of EBV BamHI W region in patient cancer specimens

Mukohyama, Junko

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6793号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006793>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Evaluation of the risk of lymphomagenesis in xenografts by the PCR-based detection of EBV BamHI W region in patient cancer specimens

患者癌組織中の EBV BamHI W 領域の PCR 検出によるヒト癌異種移植マウスのリンパ腫化のリスク評価

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
食道胃腸外科学
(指導教員: 掛地 吉弘教授)

向山 順子

はじめに

ヒト癌異種移植マウスマルク (Patient derived-tumor xenograft; PDX) は、手術で摘出した患者の癌組織を免疫不全マウスに直接移植することで樹立される。PDX はヒトの癌の組織像や遺伝子発現の多様性を反映することが可能なため、化学療法に対する抵抗性やバイオマーカーを解析する前臨床モデルとしても有用である。

しかし、肺癌、肝癌、胃癌、大腸癌、膀胱癌、乳癌、前立腺癌など多くの腫瘍の PDX 樹立の過程で、移植した固形腫瘍が生着せずに、ヒト由来の細胞によるリンパ腫を形成することが報告されている。これは、移植組織中に含まれる Epstein-Barr ウィルス (EBV) 感染リンパ球がマウス体内の免疫抑制環境で異常増殖することが原因と考えられているが、移植によるリンパ腫形成を事前に予測する方法は確立されていない。

そこで本研究では、ヒト大腸癌手術検体に潜在する可能性のある EBV の分子生物学的特性と、検体移植後のリンパ腫形成との関連を検討した。移植組織の特性からリンパ腫形成を予測することで、貴重な移植組織やマウスの損失を抑える方法を見出すことを目指す。

方法

同意の得られた 13 例の大腸癌患者の手術検体を、高度免疫不全マウス (NOD/SCID または NSG) に移植した。樹立された大腸癌 PDX (7 例) とリンパ腫形成した PDX (2 例)、および大腸癌手術検体を、HE 染色、免疫組織学的染色 (抗 CD3 抗体、抗 CD20 抗体) および EBER (EBV-encoded small RNA) に対する ISH により組織学的に検討した。次に、リンパ腫 PDX の細胞表面マーカーをフローサイトメトリー解析で、クローニングを免疫グロブリン H 鎮 (IgH) の再構成解析にて解析した。

さらに、EBV の存在および潜在化状態の解析のため、大腸癌手術検体より RNA および genomic DNA を抽出して、EBV 関連遺伝子 (EBNA1, LMP1, EBV 関連マイクロ RNA) および BamHI W 領域の発現をそれぞれ定量的 PCR 法にて解析した。

結果

1. ヒト大腸癌手術検体の移植によるリンパ腫形成

13 例の大腸癌患者の手術検体を、高度免疫不全マウス (NOD/SCID または NSG) に移植したところ、7 例の大腸癌 PDX と 2 例のリンパ腫 PDX が樹立された。大腸癌 PDX は、大

腸がん手術検体と同様に高・中分化型腺癌の組織像を示した。また大腸癌 PDX では、組織中に EBER 陽性のリンパ球は認めなかった。一方、リンパ腫 PDX(KUC4, KUC11)は、びまん性に増殖した CD20 陽性 EBER 陽性の腫大したヒト B リンパ球から構成される EBV 関連びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL) の組織像を示した。

次に、リンパ腫 PDX 組織を酵素処理にて単細胞に分解し、上皮細胞マーカーの EpCAM、ヒトリンパ球マーカーの hCD45 で染色し、フローサイトメトリー解析を行った。リンパ腫 PDX を構成する細胞の大半は EpCAM/hCD45⁺ のヒトリンパ球であり、EpCAM 陽性のヒト大腸癌細胞は、組織中に含まれていなかった。

リンパ腫 PDX は、大腸癌 PDX に比べ腫瘍増殖が速い傾向にあり、肝臓や肺へ EBER 陽性の遠隔転移を認めるもの(KUC11)もあった。一方、大腸癌 PDX では遠隔臓器への転移は認めなかった。リンパ腫 PDX の形成と、元となった大腸癌検体の分化度や進行度、術前化学療法の有無との間に関連は認めなかった。

2. EBV 感染リンパ球のモノクローナルな増殖によるリンパ腫 PDX 形成

リンパ腫 PDX と元となった大腸癌臨床検体より RNA を抽出し、定量的 PCR 法にて、EBV 関連遺伝子(EBNA1, EBNA2, EBNA3C, LMP1)の発現を評価した。EBV の潜伏感染は、これらの遺伝子の発現パターンによって I 型、II 型、III 型の 3 つに分類される。リンパ腫 PDX では、EBNA1, EBNA2, EBNA3C, LMP1 の発現が高く、潜伏感染 III 型の状態であった。潜伏感染 III 型は臓器移植後リンパ球増殖疾患などで見られ、PDX のリンパ腫形成もマウス体内の免疫抑制環境で同様の現象が起こった結果であることが推測された。一方、リンパ腫 PDX の元となった大腸癌臨床検体のうち、KUC4 では同様に EBNA1, EBNA2, EBNA3C, LMP1 が検出されたが、KUC11 では検出されなかった。

大腸癌 PDX とリンパ腫 PDX から genomic DNA を抽出し、PCR 法にて IgH の再構成解析を行った。大腸癌 PDX では増幅産物が検出できなかった。一方、リンパ腫 PDX ではそれぞれ単一の大きさの遺伝子増幅産物を認めたことから、これらの組織がヒト B 細胞のクローナルな増殖により形成されたと考えられた。

3. 大腸癌検体からの EBV BamHI W 領域の検出とリンパ腫 PDX 形成との相関

[†]BamHI W 領域は EBV ゲノム中の主要な反復配列である。そのため、PCR 法による

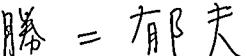
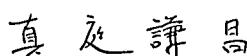
BamHI W 領域の検出は、EBV 遺伝子の存在を示す最も確立された方法の一つである。そこで、PDX の元となった大腸癌 8 検体より 60 ng のゲノム DNA を採取し、PCR 法にて BamHI W 領域の検出を行ったところ、KUC4 の大腸癌検体で BamHI W 領域が検出された。さらに、15 サイクルの増幅をかけた後に PCR を行ったところ、2 検体(KUC1, KUC11)で同領域の検出を認めた。この方法で BamHI W 領域が検出された大腸癌 3 検体(KUC1, KUC4, KUC11)のうち、2 検体(KUC4, KUC11)で移植後にリンパ腫 PDX が形成された。一方、BamHI W 領域の検出がみられなかった 5 検体では、全て大腸癌 PDX が樹立され、リンパ腫形成は認めなかった。

次に、EBV 関連マイクロ RNA(BART1-5p, BART7)の発現とリンパ腫 PDX 形成との関連を検討した。EBV 関連マイクロ RNA は EBV の潜伏感染細胞であれば、潜伏感染の状態によらず発現するとされている。リンパ腫 PDX では BART1-5p, BART 7 ともに高い発現を認めた。一方、大腸癌検体のうち、KUC4 では BART1-5p, BART 7 ともに発現していたのに対し、KUC11 では BART1-5p が僅かに検出できるのみであった。したがって、大腸癌検体中の EBV 関連マイクロ RNA の発現と、リンパ腫 PDX 形成との関連は否定的であった。

以上の結果より、PCR 法による大腸癌検体の BamHI W 領域の検出が、リンパ腫 PDX 形成の予測に有用である可能性が明らかになった。

まとめ

本研究では、EBV の主要な反復配列である BamHI W 領域を PCR 法にて検出することで、リンパ腫形成した PDX の元となった移植組織内に EBV 感染リンパ球が存在することを初めて証明した。また、移植前に同方法で移植組織の検索を行うことで、PDX のリンパ腫形成を事前に予測できる可能性があることを示した。固形腫瘍の移植にともなう PDX のリンパ腫形成を予測する方法はこれまでになく、本研究の成果は移植組織や免疫不全マウスなどの研究資材の有効利用のためにも有用な知見となる可能性をもつ。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2654 号	氏名	向山 順子
論文題目 Title of Dissertation	患者癌組織中の EBV BamHI W 領域の PCR 検出によるヒト癌異種移植マウスのリンパ腫化のリスク評価 Evaluation of the risk of lymphomagenesis in xenografts by the PCR-based detection of EBV BamHI W region in patient cancer specimens		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner  副査 Vice-examiner  副査 Vice-examiner 		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

ヒト癌異種移植マウスマodel (Patient-derived tumor xenograft; PDX)は、手術で摘出した患者の癌組織を免疫不全マウスに直接移植することで樹立される。PDX はヒトの癌の組織像や遺伝子発現の多様性を反映することが可能なため、化学療法に対する抵抗性やバイオマーカーを解析する前臨床モデルとしても有用である。しかし、肺癌、肝癌、胃癌、大腸癌、膀胱癌、乳癌、前立腺癌など多くの腫瘍のPDX 樹立の過程で、移植した固形腫瘍が生着せずに、ヒト由来の細胞によるリンパ腫を形成することが報告されている。これは、移植組織中に含まれる Epstein-Barr ウィルス (EBV) 感染リンパ球がマウス体内の免疫抑制環境で異常増殖することが原因とされてきたが、移植によるリンパ腫形成を事前に予測する方法は確立されていない。本研究では、大腸癌手術検体に潜在すると考えられる EBV の分子生物学的特性と検体移植後のリンパ腫形成との関連を明らかにするため、がん患者検体およびそれらを移植した PDX 腫瘍を、免疫組織学的染色、フローサイトメトリー解析、PCR 法などを用いて解析した。

大腸癌患者の手術検体 13 例を、高度免疫不全マウスに移植し、7 例の大腸癌 PDX と 2 例のリンパ腫 PDX (KUC4, KUC11) を樹立した。リンパ腫 PDX の形成と、元となった大腸癌検体の分化度や進行度、術前化学療法の有無との間に関連は認めなかった。大腸癌 PDX は、大腸癌手術検体と同様に高・中分化型腺癌の組織像を示した。また、その組織中には EBV 核酸である EBER 陽性のリンパ球は認めなかった。一方、2 例のリンパ腫 PDX は共に CD20 陽性 EBER 陽性の EBV 関連びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL) の組織像を示した。さらに、フローサイトメトリー解析にて、これらのリンパ腫 PDX 組織を構成する細胞の大部分は、上皮細胞マーカーEpCAM 陰性 ヒトリンパ球マーカーhCD45 陽性のヒトリンパ球であり、ヒト大腸がん細胞は存在しないことを示した。また、リンパ腫 PDX は、大腸癌 PDX に比べ腫瘍増殖が速い傾向にあり、肝臓や肺へ遠隔転移を認めるものもあった。一方、大腸癌 PDX では遠隔臓器への転移は認めなかった。

さらに、リンパ腫 PDX と元となった大腸癌臨床検体より RNA を抽出し、定量的 PCR 法にて、EBV 関連遺伝子(EBNA1, EBNA2, EBNA3C, LMP1)の発現を解析した。リンパ腫 PDX は、EBNA1, EBNA2, EBNA3C, LMP1 の発現が共に高く、EBV の潜伏感染Ⅲ型の状態であった。潜伏感染Ⅲ型は臓器移植後のリンパ球増殖疾患などで見られることから、PDX のリンパ腫形成もマウス体内の免疫抑制環境で同様の現象が起こった結果であることが推測された。一方、リンパ腫 PDX の元となった大腸癌臨床検体のうち、KUC4 では EBNA1, EBNA2, EBNA3C, LMP1 が検出されたが、KUC11 では検出されなかった。したがって移植組織中に含まれる EBV の再活性化の有無に関わらずリンパ腫 PDX の形成が起りうると推察された。

BamHI W 領域は EBV ゲノム中の主要な反復配列である。そのため、PCR 法による BamHI W 領域の検出は、EBV 遺伝子の存在を示す最も確立された方法の一つである。大腸癌手術検体 8 例よりそれぞれ 60 ng のゲノム DNA を採取し、PCR 法にて BamHI W 領域の検出を行ったところ、KUC4 の大腸癌検体で陽性となった。さらに、15 サイクルの増幅をかけた後に同様に PCR を行ったところ、さらに 2 検体(KUC1, KUC11)で陽性となった。この方法で BamHI W 領域が検出された大腸癌 3 検体(KUC1, KUC4, KUC11)のうち 2 検体でリンパ腫 PDX が形成された。一方、BamHI W 領域の検出がみられなかった 5 検体は、全て大腸癌 PDX が形成された。したがって、PCR 法による大腸癌検体内の BamHI W 領域の検出の有無が、リンパ腫 PDX 形成と相関する可能性が明らかになった。

本研究では、EBV の主要な反復配列である BamHI W 領域を PCR 法にて検出することで、リンパ腫形成 PDX の元となった移植組織内に EBV 陽性リンパ球が存在することを初めて証明した。また、移植前に同方法で移植組織の解析を行うことで、PDX のリンパ腫形成を事前に予測できる可能性があることを示した。固形腫瘍の移植にともなうリンパ腫 PDX の形成のリスクを事前に予測する方法を初めて提案した本研究は、前臨床モデルとして活用が広がる PDX 作製をより効率的にすすめるために有用な知見となる点でも意義がある。よって、本研究者は、博士の学位を得る資格があると認める。