

論 文 要 旨

学 位 論 文

(要約)

表 題 異種移植マウスモデルを用いたアグレッシブ NK 細胞白血病 (ANKL) の腫瘍微小環境解析

申 請 者 氏 名 亀田 和明

担当指導教員氏名 神田 善伸 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系 専攻
総合医学 分野
内科系総合医学

論文要旨

氏名 亀田 和明

表題

異種移植マウスモデルを用いたアグレッシブ NK 細胞白血病 (ANKL) の腫瘍微小環境解析

1 研究目的

アグレッシブ NK 細胞白血病 (ANKL) は、NK 細胞腫瘍の稀な 1 病型である。欧米と比較すると東アジアでの発症頻度が高く、Epstein-Barr ウイルス (EBV) との強い関連が知られている。腫瘍細胞は主に末梢血・骨髄・肝臓・脾臓に浸潤するが、詳細な病態はほとんどわかっていない。いまだ標準治療が確立されておらず、生存期間中央値は 2 ヶ月未満と極めて予後不良である。一方、白血病や悪性リンパ腫を含めて、腫瘍細胞は周囲の微小環境 (tumor microenvironment: TME) と相互作用して、自身に有利になるように環境 (ニッチ) を変化させる。ANKL のような稀な腫瘍における TME の解析には患者由来異種移植モデル (patient-derived xenograft: PDX) が有用なモデルとなりうる。そこで、ANKL の PDX モデルを作成し、TME を含む詳細な病態の解明を目指すことを本研究の目的とした。

2 研究方法

本研究で用いた手法は、主に(1)PDX マウス作成、(2)PDX マウスの評価、(3)RNA sequencing (RNA-seq) とバイオインフォマティクス解析、(4)CRISPR-Cas9 システムを用いた解析、(5)患者検体の解析、の 5 種類に分類できる。

まず、(1)については、患者から得た末梢血単核球もしくは骨髄細胞を、免疫不全マウスへ経静脈的に移植し、PDX モデルを作成した。(2)については、PDX モデルマウスの肝臓・脾臓・骨髄・末梢血をフローサイトメトリー、光学顕微鏡や共焦点顕微鏡で解析した。巨視的な腫瘍細胞の分布の確認には、ANKL 細胞にレンチウイルスベクターを用いてルシフェラーゼを導入し、IVIS イメージングシステムで解析した。肝臓指向性 ANKL 細胞もしくは脾臓指向性 ANKL 細胞を選択するために、同一臓器から採取した腫瘍細胞を次のマウスへ移植し、また同一臓器から腫瘍細胞を採取する、という行程を 10 回以上繰り返した。

(3)については、腫瘍細胞や、マウス肝臓の遺伝子発現プロファイルを次世代シーケンサーで評価した (RNA-seq 解析)。また PDX マウスについては、CASTIN というソフトウェアで腫瘍 (ヒト) 由来の転写産物とニッチ (マウス) 由来の転写産物を分離解析した (mixed-species RNA-seq)。さらにニッチ由来のリガンドと腫瘍細胞の受容体の相互作用を予測するために、NicheNet というバイオインフォマティクスの解析手法を用いた。

(4)CRISPR-Cas9 システムでの解析については、まずレンチウイルスベクターを用いて Cas9 導入 ANKL 細胞を作成した。さらにレンチウイルスベクターを用いて single-guide RNA (sgRNA) を導入することで、目的遺伝子の改変を行った。

(5)については、倫理委員会からの承認を受けて、患者の生検や剖検標本を染色・顕微鏡観察した。

3 研究成果

合計で4人の患者由来のPDXモデル作成(ANKL1、ANKL3、ANKL5、ANKL9)に成功した。これらのマウスの組織像を観察し、患者では典型的な腫瘍浸潤臓器である肝臓・骨髄・脾臓で、患者と同様に腫瘍像を認めた。またIVISイメージングシステムでも巨視的に腫瘍はやはり肝臓・骨髄・脾臓に主に病変を作っていることを見出した。マウスへ腫瘍細胞を移植後、経時的にフローサイトメトリで評価したところ、腫瘍細胞は最初に肝臓で生着・増殖し、その後に他の臓器へ播種しているという結果を得た。組織像を経時的に観察した結果、肝臓の中でも類洞という毛細血管内で最初に生着・増殖するという結果を得た。

次に、肝臓指向性ANKL細胞と脾臓指向性ANKL細胞を作成し、その性質を比較した。肝臓指向性ANKL細胞は脾臓指向性ANKL細胞よりもマウス体内で早く増殖し、マウスの生存期間は短かった。RNA-seqを行ったところ、肝臓指向性ANKL細胞と脾臓指向性ANKL細胞は異なる遺伝子発現プロファイルを示した。さらにgene set enrichment analysis (GSEA)を行ったところ、肝臓指向性ANKL細胞では脾臓指向性ANKL細胞と比較してMYC関連遺伝子セットが最上位でエンリッチされていた。NicheNetを用いて、肝臓ニッチ由来のリガンドと腫瘍受容体の相互作用を推測した。

ニッチで機能している可能性があるリガンドと受容体の組み合わせの中から、肝臓や腫瘍での発現量を元に、macrophage migration inhibitory factor (MIF)というサイトカインと、その受容体であるCD74の組み合わせに着目した。各種培養細胞株でCRISPR-Cas9ノックアウトスクリーニングを行ったDepMapプロジェクトのデータベースを解析したところ、in vitroの条件で血液系の細胞株はその生存・増殖をCD74に依存していないという結果を得た。次にCRISPR-Cas9システムを用いて、生体内でのANKL細胞のCD74への依存性を評価した。CD74を標的とするsgRNAを導入したANKL細胞は、non-target sgRNAを導入したANKL細胞よりも、生体内での生着・増殖が抑制された。リガンドであるMIFについても検討を行った。MIFは肝臓では類洞内皮細胞やクッパー細胞といった類洞構成細胞が主に発現していた。MIFはMYCの発現を亢進させ、ANKL細胞の生存・増殖を促進していた。

最後に、PDXマウスで得た知見の患者検体での再現性を検証した。初発ANKL患者の肝生検検体と、2例の剖検検体の肝臓標本を観察したところ、いずれの症例でも肝臓類洞への腫瘍細胞浸潤を認めた。またCD74の発現、肝臓類洞でのMIFの発現も確かめられた。

4 考察

本研究では、ANKL細胞が肝臓類洞でニッチと相互作用しながら生着・増殖することを明らかにした。肝臓類洞自体は、様々な血液腫瘍の浸潤が報告されている。体循環由来の肝動脈血流と、腸管由来の門脈血流が合流するという解剖学的な特性上、肝臓類洞は腸管由来もしくは全身を循環する病原体や抗原の監視・除去に重要な役割を果たしている。その中で、様々な免疫細胞を維持する機能が知られており、このメカニズムをANKLやその他の血液腫瘍細胞はハイジャックしているのかもしれない。また肝臓類洞から産生されるMIFが大腸癌の肝転移に関与するという報告もある。本研究で明らかにされたMIF-CD74経路を含むニッチと腫瘍細胞の相互作用は、今後、免疫学や様々な腫瘍の肝臓との相互作用の研究に新たな示唆を与えられる可能性がある。

5 結論

(甲種)

ANKL 患者は通常は末梢血もしくは骨髓検体で診断されるが、我々は PDX マウスで ANKL 細胞の生着部位は肝臓であり、肝臓類洞が ANKL 細胞に対して重要なニッチを提供していることを見出した。そして MIF-CD74 経路は ANKL の病態に関わっている可能性がある。我々の研究で樹立された PDX モデルによって、この希少な白血病の生物学をより詳細に解明していけることが期待できる。そして、我々の方法論は、これまでの手法では解析が難しかった様々な種類の希少がんやその TME 研究に応用可能である。