

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2022
課題番号：21K15420
研究課題名（和文）中枢神経原発性悪性リンパ腫モデルを用いた腫瘍生着における周囲微小環境の役割解明

研究課題名（英文）Mechanism of peritumor micro-environment for PCNSL using model mice

研究代表者
中山 駿矢（Nakayama, Shunya）

東海大学・医学部・奨励研究員

研究者番号：70884196
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：中枢神経原発性悪性リンパ腫（PCNSL）の90%は抗腫瘍薬の効果が期待されるびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫に分類されるが、腫瘍が頭蓋内に限局するため多くの抗腫瘍薬は血液脳関門を通過できず、使用することができない。そのため一般的なびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫に比べて予後が悪いことが知られている。また、浸潤性の高い腫瘍のため外科的切除も適応とならないことから研究試料も少なく、国内外における基礎研究が滞っている。本研究ではこのPCNSLの周囲の微小環境に着目し、PDXマウスおよびCASTINを用いたin silico解析により相互作用を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PCNSLは非常に稀な疾患である一方、標準治療は患者への負担が大きいものが多い。本研究ではPCNSLの病態を明らかとし、腫瘍と周囲組織とのインタラクションを明らかとすることで治療標的を探索するものである。従来の方法では見つけられない因子をPDXマウスとCASTINを始めとしたin silico解析を用いることで新たな中心的因子を明らかとすることを目指した。得られた結果は今後のPCNSL治療ならびにDLBCL治療の基盤となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Although 90% of primary malignant lymphomas of the central nervous system (PCNSL) are classified as diffuse large B-cell lymphomas that are expected to respond to antitumor drugs, many antitumor drugs cannot cross the blood-brain barrier because the tumor is confined to the cranium. Therefore, it is known to have a worse prognosis than the more common diffuse large B-cell lymphoma. In addition, because surgical resection is not indicated for this highly invasive tumor, research samples are scarce, and basic research in Japan and abroad has been stagnant. In this study, we focused on the microenvironment surrounding PCNSLs and investigated their interaction by in silico analysis using PDX mice and CASTIN.

研究分野：実験動物学

キーワード：中枢神経原発性悪性リンパ腫 PDXマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍増殖においては腫瘍周囲微小環境が重要であることが近年報告されてきた。特に Epstein-bar virus (EBV) 関連びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫においては、腫瘍周囲微小環境が腫瘍形成維持に必須であることを報告している (Higuchi et al. Blood, 2018)。

中枢神経原発性悪性リンパ腫(PCNSL)は現在国内外において増加中の脳腫瘍である(図1)。腫瘍の多くは組織学的にびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫に分類される。びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫においては抗腫瘍薬も開発されており、有効性が示されているものの、PCNSL 腫瘍は頭蓋内に発生することから、多くの抗腫瘍薬は血液脳関門を通過できず、使用することができない。また、浸潤性が高く外科的切除も適応とならないことから組織検体が少なく、上記を改善するための病態解明研究も進展していない極めて予後不良の疾患である (Takahashi et al. J Neuro Oncol, 2016)。

2. 研究の目的

本研究では患者検体での研究の難しい PCNSL をモデルマウスで再現するため、新たにヒト脳由来リンパ腫細胞株 (HKBML) を超免疫不全 (NOG; NOD/Shi-scid, IL-2R KO) マウスの脳に定位移植し、脳内に限局する腫瘍モデルを作成し、これを用いた腫瘍微小環境-腫瘍間相互作用を明らかにすることで脳という特殊環境における腫瘍生着・増殖の責任因子を明らかにすることができるのでは? また、解析を通じて異種細胞移植モデルを利用した疾患病態解明という新規解析手法を確立することができるのでは? と考えた。

3. 研究の方法

本研究では安定した PCNSL モデルマウスの作成および PCNSL マウスにおける腫瘍 腫瘍周囲微小環境のトランスクリプトーム解析を行い、リストアップされた遺伝子の PCNSL における腫瘍生着・増殖への影響を評価する。

(1) ヒト PCNSL モデルマウスの作成

腫瘍生着性の高い免疫不全 (NOG; NOD/Shi-scid, IL-2R KO) マウスの右大脳にヒト脳由来リンパ腫細胞株 (HKBML) を定位移植することで PCNSL モデルを作成する。この手法では移植後 1 ヶ月で脳内にリンパ腫が形成されることが確認されている。またこの腫瘍はヒト PCNSL の病態と同様に脳内に限局し、全身への転移も認められなかったことから、ヒト PCNSL を忠実に反映したモデルであると考えられる。現時点においては脳内への移植細胞数はおおよそ 1×10^4 個であり、後述の遺伝子導入とこれを用いた重要因子のスクリーニング等においてはより多くの細胞を移植することが必要と考えられる。本研究課題中においてはより多くの (1×10^6 個) 細胞を安定して移植・生着させるための移植位置や頭蓋内圧管理手法等の検討を行う。また本研究においてはさらに腫瘍細胞を蛍光色素であるルシフェラーゼなどで標識することでモデルマウス中における浸潤の進展を詳細に追跡、評価し、PCNSL における腫瘍の進展パターン解析などに応用する。

(2) CASTIN による異種細胞間相互作用 (インタラクトーム) 解析

マウス脳内に形成された腫瘍とその周囲組織からトータル RNA を抽出し、細胞間相互作用分析プログラムである CASTIN (Komura et al., BMC Genomics, 2016) を用いて解析することにより、遺伝的種差を利用してヒト (腫瘍) とマウス (腫瘍周囲細胞) を分別する。腫瘍側リガンド (ヒト) と周囲細胞側受容体 (マウス) でそれぞれ発現した遺伝子をもとにタンパク質間相互作用を解析することで、腫瘍とその周囲細胞間で相互作用を示す重要な候補分子を探索する。すでに本手法にて 36 の候補タンパク質を同定しているが、本研究中には腫瘍を経時的に解析することにより、更に候補タンパク質を探索する。

(3) マウス生体内スクリーニングによる PCNSL の維持因子の探索

レンチウイルスベクターによる CRISPR/Cas9 システムを用いて、Cas9 と候補分子 (腫瘍側) に対する遺伝子導入を行う。通常の CRISPR/Cas9 法では数個の遺伝子を個別に改変することでその役割を解析していくが、本手法では<2. インタラクトーム解析>において明らかとなった候補遺伝子をすべて HKBML 細胞へ導入し、マウスへ移植する。

腫瘍が生着した後、腫瘍組織を取り出し挿入したガイド RNA を次世代シーケンサーを用いて網羅的に検出、欠損・減弱した遺伝子を確認する。変化の認められた遺伝子は腫瘍増殖に重要と考えられる。本手法では一度にそれぞれの因子の役割を解析することが可能であり、よりバイアスのかからない解析が期待される。

また、HKBML 細胞において CRISPR/Cas9 の発現が十分に得られない場合や、CRISPR 導入 HKBML 細胞が脳内に生着しない場合は、レンチウイルスライブラリーを用いて候補遺伝子を過剰発現させた HKBML 細胞を移植することにより、腫瘍形成を促進する分子を解析する。

4. 研究成果

(1) ヒト PCNSL モデルマウスの作成

HKBML 細胞の脳内定位移植により脳に腫瘍生着を確認した。また、脳以外での定着は認められなかった。In vivo CRSPER-screening に用いるための最小数である 1×10^6 投与での生存については、 1×10^6 個投与でも 2 週間前後の生存は確認された。一方で長期生存については経過が急となることから難しいと考えられた。

(2) CASTIN による異種細胞間相互作用 (インタラク トーム) 解析

CASTIN 解析により PCNSL 腫瘍とその周囲細胞において正常細胞や全身性の DLBCL と比較して発現の異なる 36 の因子を同定した。この 36 因子に対してスクリーニング的に検討を行ったところ、NOTCH1-KO HKBML は体重減少の遅延や行動変化など、腫瘍の定着が遅れる結果を示した (図 2)。

また脳組織 HE 染色では腫瘍細胞の集簇は HKBML 細胞移植部位に局限しており、びまん性の浸潤を認めなかった。

この結果から、CASTIN によって同定されたいくつかの因子については実際に腫瘍の増殖および播種に関係し、PCNSL 腫瘍の治療標的探索の足がかりとなる可能性が示唆された。

(3) マウス生体内スクリーニングによる PCNSL の維持因子の探索

生体内スクリーニングの基盤となる PCNSL 発症マウスにおけるトランスクリプトーム解析を行い、CASTIN 解析から上位発現の 36 遺伝子を同定した。

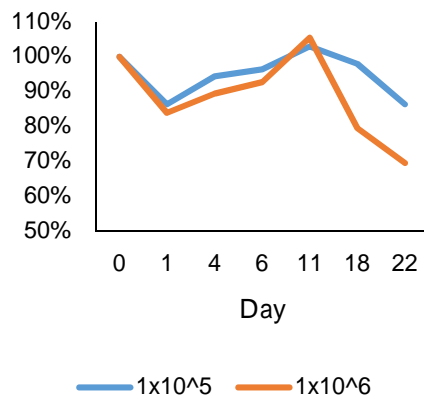


図 1 1×10^5 の HKBML 投与により PCNSL は発症した

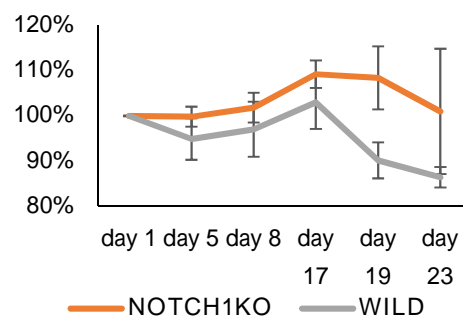


図 2 行動や外貌についても NOTCH1 KO-HKBML 移植マウスは PCNSL 症状を呈さなかった

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kakizaki Masatoshi, Yamamoto Yuichiro, Nakayama Shunya, Kameda Kazuaki, Nagashima Etsuko, Ito Masatoshi, Suyama Takashi, Matsuzaki Yumi, Chiba Tetsuhiro, Sumiyoshi Hideaki, Inagaki Yutaka, Kotani Ai	4. 巻 12
2. 論文標題 Human hepatocyte-derived extracellular vesicles attenuate the carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 1010
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-021-04204-7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kudo Kai, Miki Yoshimi, Carreras Joaquim, Nakayama Shunya, Nakamoto Yasushi, Ito Masatoshi, Nagashima Etsuko, Yamamoto Kei, Higuchi Hiroshi, Morita Shin-ya, Inoue Asuka, Aoki Junken, Ando Kiyoshi, Nakamura Naoya, Murakami Makoto, Kotani Ai	4. 巻 34
2. 論文標題 Secreted phospholipase A2 modifies extracellular vesicles and accelerates B cell lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Metabolism	6. 最初と最後の頁 615 ~ 633.e8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cmet.2022.02.011	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中山駿矢, 中本泰, 紙屋光佑, 工藤海, 三木寿美, 白石良樹, 伊藤洋子, 浅野浩一郎, 村上誠, 幸谷愛
2. 発表標題 肝臓由来エクソソームの脂質を介したARDSの制御
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山駿矢, 工藤海, 幸谷愛
2. 発表標題 SPREDSは脂質を介して炎症を制御する
3. 学会等名 第9回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山駿矢, 中本泰, 紙屋光佑, 工藤海, 三木寿美, 白石良樹, 伊藤洋子, 浅野浩一郎, 村上誠, 幸谷愛
2. 発表標題 肝細胞由来細胞外小胞はリゾリン脂質を介して炎症収束を誘導する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山駿矢, 中本泰, 紙屋光佑, 工藤海, 三木寿美, 白石良樹, 伊藤洋子, 浅野浩一郎, 村上誠, 幸谷愛
2. 発表標題 sPLA2により活性化された細胞外小胞は脂質を介して組織修復を誘導する？
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 多価不飽和脂肪酸及び/又はリゾリン脂質を表面に有する細胞外小胞	発明者 吉田愛、工藤海、中山駿矢、村上誠、武富芳隆、三木寿美	権利者 学校法人東海大学、国立大学法人東京大学
産業財産権の種類、番号 特許、2022-118364	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------