

学 位 論 文 要 旨

氏名 上林 聡之

題 目 : Analyses of resistance to alkylating agents by
*O*⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) and expression of
hypoxia inducible factor-1 α as a novel target for treatment of canine lymphoma.
(犬リンパ腫におけるアルキル化薬耐性機構
および新規治療ターゲットとしての低酸素誘導因子 1 α の解析)

論文要旨 :

リンパ腫は犬で発生頻度の高い造血器系悪性腫瘍である。抗癌剤を用いた治療が一般的であり、特にB細胞型リンパ腫は治療への反応が良いとされるが、その多くは後に薬剤抵抗性を獲得する。一方で、T細胞型リンパ腫はより低い治療反応性を示す。

一般的な抗癌剤投与プロトコルに反応が悪い症例や、抵抗性を呈するようになった症例ではレスキュー治療として作用機序の異なる抗癌剤が用いられる。しかしながら、その治療効果は、初期治療への反応と比較して長期間持続しない。

よって、リンパ腫の治療成績を高めるためには、リンパ腫の薬剤耐性機構の克服と腫瘍の発生・増殖・生存等に関わるキーレギュレーターの阻害の両方が重要であると考えられる。

<第一章>

一般的な抗癌剤耐性は、P糖蛋白や multidrug resistance associated protein (MRP) に代表される ATP-binding cassette transporter が薬物排泄装置として働くことに依るところが大きい。ロムスチンはP糖蛋白やMRPの基質とならないため、リンパ腫のレスキュー治療でよく選択される薬剤であるが、次第に耐性を生じて無効となる。この耐性のメカニズムに関しては不明であったが、人ではDNA修復蛋白MGMTが、ロムスチンによって修飾を受けた腫瘍細胞DNAの*O*⁶-メチルグアニンをグアニンに戻すことで細胞死を免れていることが報告されている。

第一章では、犬リンパ腫におけるロムスチン耐性機構としてのMGMTの関与を、腫瘍細胞株を用いて *in vitro* で解析した。MGMTの阻害剤を加えた際、2つの細胞株でロムスチンに対する感受性が増加した。また、これらの細胞株はMGMT活性を有していた。一方、残りの3つの細胞株は、ロムスチンに感受性を示しMGMT阻害剤による感受性の変化は認められなかった。これらの結果から、犬のリンパ腫細胞株ではMGMT活性を有しロムスチン耐性のものと、MGMT活性を有さずロムスチン感受性である2種類の細胞株があることが分かった。

人ではMGMTの発現コントロールには、プロモーター領域のCpGアイランドのメチル化が関与する。バイサルファイト法を用い、犬のリンパ腫細胞株におけるこの領域のメチル化を解析したが、人の報告とは異なり、メチル化の程度とMGMTの発現抑制レベルとは関連性が認められなかった。MGMT発現の制御機構は不明であったものの、犬のリンパ腫細胞におけるMGMT発現抑制は、ニトロソウレア系抗癌剤への耐性克服に有用であることが示唆された。

(別紙様式第3号)

<第二章>

リンパ腫の治療に関しては、人では抗 CD20 抗体製剤に代表される分子標的薬の開発が目覚ましい。これらの治療薬は癌に特徴的な発がん機構や、増殖・生存に必要な蛋白を阻害することで抗癌作用を得る。獣医療では犬の肥満細胞腫に対してチロシンキナーゼ阻害剤が治療効果を上げている。しかし、リンパ腫については有効な分子標的薬の研究は進んでおらず、治療ターゲットを探索する必要性がある。

低酸素誘導因子 (HIF) は腫瘍における低酸素と悪性度の増加に関与するキーレギュレーターであると考えられており、さらに HIF-1 α のトランスジェニックマウスがリンパ増殖性疾患を発症しやすいという報告から、リンパ腫の増殖・維持メカニズムとの関連が示唆されている。また、HIF-1 α 阻害剤やノックダウンは、epilepsy, progressive myoclonus type 2A 遺伝子を抑制されたマウスで発生するリンパ腫、および人の白血病症例から分離された腫瘍細胞で細胞死を引き起こすことから、リンパ系腫瘍に対する治療の標的としての可能性が示されている。

第二章では、*in vitro* および *in vivo* 異種移植系を用いて、犬リンパ腫細胞における HIF-1 α 発現とその阻害による効果を検討した。今回用いた犬のリンパ腫細胞株およびリンパ腫症例サンプルの全てにおいて、HIF-1 α 蛋白の発現が確認された。一方、リンパ系組織を含む正常組織では脳でのみ発現が認められた。さらに、3 種の HIF-1 α 阻害剤 (echinomycin, YC-1, 2-methoxyestradiol) を添加したところ、全ての細胞株で増殖抑制作用があることを確認した。加えて、犬のリンパ腫細胞株を免疫不全マウスに移植して echinomycin を投与した場合、腫瘍の退縮が観察された。これらが特異的な HIF-1 α 阻害による結果であることを証明することはできなかったが、以上の結果から HIF-1 α はリンパ腫細胞の増殖や生存に必要であることが示唆された。さらに HIF-1 α 阻害剤はリンパ腫の治療に対する有力な候補薬剤であると考えられた。

本研究の結果より、犬のリンパ腫に対するニトロソウレア系抗癌剤使用に際しては MGMT 発現の有無による治療抵抗性の予測が可能である可能性が示唆された。また、新たな治療ターゲットとして HIF は有用な候補の 1 つであると考えられた。本研究は、犬のリンパ腫における薬剤抵抗性および腫瘍増殖・生存機構について新たな知見を提供するものであり、将来的な犬リンパ腫治療成績の改善に寄与することを期待している。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	上林 聡之
審査委員	主査： 山口大学 教授・奥田 優
	副査： 鹿児島大学 教授・桃井 康行
	副査： 山口大学 教授・森本 将弘
	副査： 山口大学 教授・水野 拓也
	副査： 山口大学 准教授・馬場 健司
題目	Analyses of resistance to alkylating agents by O ⁶ -methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) and expression of hypoxia inducible factor-1 α as a novel target for treatment of canine lymphoma. (犬リンパ腫におけるアルキル化薬耐性機構 および新規治療ターゲットとしての低酸素誘導因子 1 α の解析)
審査結果の要旨： リンパ腫は犬に発生頻度の高い造血系悪性腫瘍であり、実際の臨床現場では抗癌剤を用いた治療が行われている。一般的な抗癌剤投与プロトコールに反応が悪い症例や、抵抗性を呈するようになった症例ではレスキュー治療として作用機序の異なる抗癌剤が用いられる。しかしながら、その治療効果は初期治療への反応と比較して長期間持続しない。 本研究はリンパ腫の治療成績を高めるために、リンパ腫の薬剤耐性機構の克服と、腫瘍の発生や増殖に関わるキーレギュレーターの同定を目的として行われている。 第一章では、犬のリンパ腫における DNA 修復酵素 MGMT の発現と抗癌剤耐性の関連について研究が行われている。一般的な抗癌剤耐性は、P 糖蛋白や multidrug resistance associated protein (MRP) に代表される ATP-binding cassette transporter が薬物排泄装置として働くことに依るところが大きい。ロムスチンは、P 糖蛋白や MRP の基質とならないため、リンパ腫のレスキュー治療でよく選択される薬剤であるが、次第に耐性を生じて無効となる。この耐性のメカニズムに関しては不明であったが、人では MGMT が、ロムスチンによって修飾を受けた腫瘍細胞 DNA の O ⁶ -メチルグアニンをグアニンに戻すことで細胞死を免れていることが報告されている。 このような背景から本章では、犬リンパ腫におけるロムスチン耐性機構としての MGMT の関与が、腫瘍細胞株を用い <i>in vitro</i> で解析されている。MGMT の阻害剤を加えた際、2 つの細胞株でロムスチンに対する感受性が増加した。また、これらの細胞株は MGMT 活性を有していた。一方、残りの 3 つの細胞株は、ロムスチンに感受性を示し、MGMT 阻害剤による感受	

(別紙様式第 10 号)

性の変化は認められなかった。これらの結果から、犬のリンパ腫細胞株では MGMT 活性を有しロムスチン耐性のものと、MGMT 活性を有さずロムスチン感受性である 2 種類の細胞株があることを明らかにしている。

続けて、バイサルファイト法を用いて、犬のリンパ腫細胞株における MGMT プロモーター領域のメチル化を解析している。人の報告とは異なり、メチル化の程度と MGMT の発現抑制レベルとは関連性が認められなかった。MGMT 発現の制御機構は不明であったものの、犬のリンパ腫細胞における MGMT 発現抑制は、ニトロソウレア系抗癌剤への耐性克服に有用であることが示唆されている。

第二章では、犬リンパ腫の増殖に関わる分子として、低酸素誘導因子 (HIF) に関する研究が行われている。HIF は腫瘍における低酸素と悪性度の増加に関与するキーレギュレーターであると考えられており、さらに HIF-1 α のトランスジェニックマウスがリンパ増殖性疾患を発症しやすいという報告から、リンパ腫の増殖・維持メカニズムとの関連が示唆されている。また、HIF-1 α 阻害剤や遺伝子ノックダウンは、epilepsy, progressive myoclonus type 2A 遺伝子を抑制されたマウスで発生するリンパ腫、および人の白血病症例から分離された腫瘍細胞で細胞死を引き起こすことから、リンパ系腫瘍に対する治療の標的としての可能性が示されている。

本章では、*in vitro* および *in vivo* 異種移植系を用いて、犬リンパ腫細胞における HIF-1 α 発現とその阻害による効果を検討している。今回用いた犬のリンパ腫細胞株およびリンパ腫症例サンプルの全てにおいて、HIF-1 α 蛋白の発現が確認された。一方、健常犬のリンパ系組織では、その発現は認められなかった。さらに、3 種の HIF-1 α 阻害剤 (echinomycin, YC-1, 2-methoxyestradiol) を添加したところ、全ての細胞株で増殖抑制作用があることが確認された。加えて、犬のリンパ腫細胞株を免疫不全マウスに移植して echinomycin を投与した場合の腫瘍の退縮も確認された。以上の結果は、HIF-1 α がリンパ腫細胞の増殖や生存に必要である可能性を示唆しており、さらに、HIF-1 α 阻害剤はリンパ腫の治療に対する有力な候補薬剤である可能性を示している。

これら二章の結果を総括すると、1) 犬のリンパ腫に対するニトロソウレア系抗癌剤使用に際しては、MGMT 発現の有無による治療抵抗性の予測が可能である可能性、2) 新たな治療ターゲットとして HIF が有用な候補の 1 つである可能性を示している。本論文は、犬のリンパ腫における薬剤抵抗性および腫瘍増殖・生存機構について新たな知見を提供するものであり、臨床獣医学の発展に貢献するものと考えられる。以上により、審査員一同は、本論文が博士 (獣医学) の学位を与えるに十分な内容を有するものと判断した。