

学位論文要旨

氏名 荻原 喜久美

題 目 : *In vivo* および *in vitro* の解析方法を用いた動物腫瘍の性状に関する
病理学的研究

論文要旨 :

本研究は、腫瘍の基本的性状を明らかにすることにより、新たな治療法の開発に役立つ情報を得ることを目的とし、イヌの肝細胞癌およびメラノーマについて、*in vivo* および *in vitro* の様々な技術を用いて病理学的並びに分子生物学的に解析を試みたものである。本研究では、1. イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株における中性アミノ酸輸送に係わる L 型アミノ酸トランスポーター1 の発現とロイシン輸送能、2. マウスおよびイヌのメラノーマ由来樹立細胞株におけるルパン型トリテルペン化合物ルペオールの抗増殖および分化誘導効果について解析した。

近年、病理組織診断結果に基づいた特定の組織型の動物腫瘍に対し、遺伝子治療をはじめとする新たな治療法が開発されつつある。新たな治療の標的となりうる腫瘍細胞の代謝・増殖についての基本的性状に関する知見を基にした、副作用の少ない新規治療薬の開発が望まれている。

第1章 イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株における中性アミノ酸輸送に係わるL型アミノ酸トランスポーター1 の発現とロイシン輸送能

腫瘍細胞は、急速に増殖するためアミノ酸の要求量が高く、中性アミノ酸輸送に係わる役割を担う L 型アミノ酸トランスポーター1 の発現量が高い。L 型アミノ酸トランスポーター1 は、腫瘍細胞に特異性が高く、腫瘍診断マーカーおよび治療の標的分子の候補として研究が行われている。膵臓癌をはじめとする多くの癌で、L 型アミノ酸トランスポーター1 の高発現群は予後不良であることが報告されている。

イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株における L 型アミノ酸トランスポーター1 遺伝子の発現量について、リアルタイム RT-PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて解析した。イヌの正常肝細胞と比較して、イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株の L 型アミノ酸トランスポーター1 遺伝子の発現量は 28 倍高値を示した。L 型アミノ酸トランスポーター1 の抑制剤であるヘプタン-2-カルボン酸を添加した細胞では、ロイシン輸送能が 90%減少した。これらの結果から、ヘプタン-2-カルボン酸がイヌの肝細胞癌の新たな治療薬となり得ることが示唆された。

第2章 マウスおよびイヌのメラノーマ由来樹立細胞株におけるルパン型トリテルペン化合物ルペオールの抗増殖および分化誘導効果

口腔内に発生するイヌのメラノーマは、進行が早く再発率も高いため、外科手術単独で完治することが困難な腫瘍である。抗癌剤としてタキソールなどが用いられるが、毒性が強く副作用が多い。そこで、メラノーマ細胞の増殖メカニズムに基づき、分化誘導効果のあるキク科植物より抽出したルパン型トリテルペン化合物ルペオールが抗腫瘍効果を示すかどうかを、マウスおよびイヌのメラノーマ由来樹立細胞株を用いて解析した。

第1節では、マウスメラノーマ由来細胞株 B16 2F2 細胞にルペオール 10 μ M を添加したところ、添加後 8 時間でストレスファイバーの脱重合を引き起こし、樹状突起の伸長が誘導された。また、ルペオール添加 48 時間後に電子顕微鏡観察を行ったところ、ルペオールを添加したマウスメラノーマ由来細胞株 B16 2F2 細胞の細胞質には成熟したIV型メラノソームが多数観察されるとともに、チロシナーゼやメラノソーム輸送関連タンパクの発現亢進が認められた。ルペオール添加によるメラノーマ細胞の分化は、2つのステージに分かれて出現することが確認された。

第2節では、イヌのメラノーマ由来樹立細胞株 4 株 (cMEL-1~4) にルペオールを添加し、腫瘍細胞に対するルペオールの分化誘導能について *in vivo* および *in vitro* の手法を用いて解析した。ルペオール添加後、いずれの細胞株でも小眼球症関連転写因子、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連蛋白 2 の発現の増加がみられた。次に、ルペオール添加によりチロシナーゼの発現が高かった細胞株 cMEL-2 を SCID マウスに移植し、10 日後にルペオール接種群とルペオール未接種群で腫瘍の重量を比較したところ、ルペオール接種群で有意な腫瘍増殖抑制が確認された。以上のことから、ルペオールは *in vivo* および *in vitro* でメラノーマ細胞の分化誘導能並びに増殖抑制能を有し、ルペオールがイヌのメラノーマの新たな治療薬になり得ることが示唆された。

以上のごとく、L型アミノ酸トランスポーター1 遺伝子の発現が高いイヌ肝細胞癌由来樹立細胞株にヘプタン-2-カルボン酸を添加することで、ロイシンの輸送能力が低下すること、およびキク科植物より抽出したルパン型トリテルペン化合物であるルペオールがメラノーマ細胞の分化誘導能並びに増殖抑制能を有することを示した。これらの情報はイヌの肝細胞癌・メラノーマに留まらず、獣医学領域における完治が困難な腫瘍に対する新たな治療薬の応用・開発に役立つことが期待される。さらに、L型アミノ酸トランスポーター1 遺伝子の高発現がみられる腫瘍は予後が悪いことから、腫瘍の悪性度を決定する因子としても有用であると考えられる。

今回、*in vivo* および *in vitro* の様々な病理学的並びに分子生物学的解析によって明らかにされたイヌの肝細胞癌・メラノーマの腫瘍細胞の代謝・増殖についての基礎的性状に関する研究成果は、動物腫瘍の新たな治療標的に基づく今後の新規治療薬の開発に貢献するものと考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

氏名	荻原喜久美
審査委員	主査：鳥取大学 教授 森田剛仁
	副査：鹿児島大学 教授 三好宣彰
	副査：鳥取大学 教授 岡本芳晴
	副査：鳥取大学 教授 今川智敬
	副査：鳥取大学 教授 竹内崇
題目	<i>In vivo</i> および <i>in vitro</i> の解析方法を用いた動物腫瘍の性状に関する病理学的研究
審査結果の要旨： 近年、病理組織診断結果に基づいた特定の組織型の動物腫瘍に対し、遺伝子治療法をはじめとする新たな治療法が開発されつつある。新たな治療の標的となりうる腫瘍細胞の代謝・増殖についての基本的性状に関する知見を基にした、副作用の少ない新規治療薬の開発が望まれている。そこで本研究では、腫瘍の基本的性状を明らかにすることにより、新たな治療法の開発に役立つ情報を得ることを目的とし、イヌの肝細胞癌およびメラノーマについて、 <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> の様々な技術を用いて病理学的並びに分子生物学的に解析を試みた。 第1章：イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株における中性アミノ酸輸送に係わるL型アミノ酸トランスポーター1の発現とロイシン輸送能 腫瘍細胞は、急速に増殖するためアミノ酸の要求量が高く、中性アミノ酸輸送に係わる役割を担うL型アミノ酸トランスポーター1の発現量が高い。L型アミノ酸トランスポーター1は、腫瘍細胞に特異性が高く、腫瘍診断マーカーおよび治療の標的分子の候補として研究が行われている。膵臓癌をはじめとする多くの癌で、L型アミノ酸トランスポーター1の高発現群は予後不良であることが報告されている。 イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株におけるL型アミノ酸トランスポーター1遺伝子の発現量について、リアルタイムRT-PCR法およびウエスタンブロット法を用いて解析した。イヌの正常肝細胞と比較して、イヌ肝細胞癌由来樹立細胞株のL型アミノ酸トランスポーター1遺伝子の発現量は28	

倍高値を示した。L 型アミノ酸トランスポーター1 の抑制剤であるヘプタン-2-カルボン酸を添加した細胞では、ロイシン輸送能が 90%減少した。これらの結果から、ヘプタン-2-カルボン酸がイヌの肝細胞癌の新たな治療薬となり得ることが示唆された。

第 2 章：マウスおよびイヌのメラノーマ由来樹立細胞株におけるルパン型トリテルペン化合物ルペオールの抗増殖および分化誘導効果

口腔内に発生するイヌのメラノーマは、進行が早く再発率も高いため、外科手術単独で完治することが困難な腫瘍である。抗癌剤としてタキソールなどが用いられるが、毒性が強く副作用が多い。そこで、メラノーマ細胞の増殖メカニズムに基づき、分化誘導効果のあるキク科植物より抽出したルパン型トリテルペン化合物ルペオールが抗腫瘍効果を示すかどうかを、マウスおよびイヌのメラノーマ由来樹立細胞株を用いて解析した。

第 1 節では、マウスメラノーマ由来細胞株 B16 2F2 細胞にルペオール 10 μ M を添加したところ、添加後 8 時間でストレスファイバーの脱重合を引き起こし、樹状突起の伸長が誘導された。また、ルペオール添加 48 時間後に電子顕微鏡観察を行ったところ、ルペオールを添加したマウスメラノーマ由来細胞株 B16 2F2 細胞の細胞質には成熟した IV 型メラノソームが多数観察されるとともに、チロシナーゼやメラノソーム輸送関連タンパクの発現亢進が認められた。ルペオール添加によるメラノーマ細胞の分化は、2 つのステージに分かれて出現することが確認された。

第 2 節では、イヌのメラノーマ由来樹立細胞株 4 株 (cMEL-1~4) にルペオールを添加し、腫瘍細胞に対するルペオールの分化誘導能について *in vitro* および *in vivo* の手法を用いて解析した。ルペオール添加後、いずれの細胞株でも小眼球症関連転写因子、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連蛋白 2 の発現の増加がみられた。次に、ルペオール添加によりチロシナーゼの発現が高かった細胞株 cMEL-2 を SCID マウスに移植し、10 日後にルペオール接種群とルペオール未接種群で腫瘍の重量を比較したところ、ルペオール接種群で有意な腫瘍増殖抑制が確認された。以上のことから、ルペオールは *in vitro* および *in vivo* でメラノーマ細胞の分化誘導能並びに増殖抑制能を有し、ルペオールがイヌのメラノーマの新たな治療薬になり得ることが示唆された。

以上のように、L 型アミノ酸トランスポーター1 遺伝子の発現が高いイヌ肝細胞癌由来樹立細胞株にヘプタン-2-カルボン酸を添加することで、ロイシンの輸送能力が低下すること、およびキク科植物より抽出したルパン型トリテルペン化合物であるルペオールがメラノーマ細胞の分化誘導能並びに増殖抑制能を有することを示した。さらに、L 型アミノ酸トランスポーター1 遺伝子の高発現がみられる腫瘍は予後が悪いことから、腫瘍の悪性度を決定する因子としても有用であると考えられる。

今回、*in vitro* および *in vivo* の解析によって明らかにされた研究成果は、動物腫瘍の新たな治療標的に基づく今後の新規治療薬の開発に貢献するものと考えられる。以上より、本論文は博士 (獣医学) の学位論文にふさわしい価値があるものと考えられた。