

学 位 論 文 要 旨

氏名 小林 宏祐

題 目 : Generation of tissue factor-bearing procoagulant microparticles in dogs with malignant tumors
(イヌの腫瘍性疾患における組織因子含有凝固促進性マイクロパーティクルの産生)

論文要旨 :

血栓症や播種性血管内凝固 (DIC) などの凝固亢進状態は、イヌの腫瘍性疾患においてしばしば認められ、負の予後因子となることが知られている。しかし、その病態は十分に把握されておらず、確立した診断法および治療法も存在しないことから、小動物臨床における重要な課題となっている。ヒトの悪性腫瘍においては、外因系凝固経路の開始点である組織因子 (tissue factor: TF) の腫瘍細胞や炎症細胞における異所的な発現が明らかとなっている。また TF は細胞上のみならず、細胞外小胞の1つであるマイクロパーティクル (microparticle: MP) 上にも存在し、全身循環へ放出されることが知られている。TF および TF 含有 MP (TF-MP) は、悪性腫瘍における凝固亢進状態に関与していると考えられている。イヌにおいても、いくつかの腫瘍細胞および腫瘍組織において TF の発現および *in vitro* における腫瘍細胞からの TF-MP の産生が報告されているが、TF-MP の産生と全身的な凝固亢進状態との関連性については未だ不明である。そこで私は、イヌの腫瘍性疾患における血液凝固異常の病態解明および診断法・治療法の確立を目指し、TF-MP に着目した以下の研究を行った。

第1章では、基礎的な研究として、乳腺腫瘍、血管肉腫、メラノーマ、およびリンパ腫の細胞株を用いて、*in vitro* における TF の発現と MP の産生をフローサイトメトリー法により解析した。また、細胞表面および培養上清中に放出された MP における TF の凝固促進活性 (TF-procoagulant activity: TF-PCA) を測定した。その結果、乳腺腫瘍 8 株中 8 株、血管肉腫 7 株中 6 株、メラノーマ 4 株中 3 株で TF の発現、MP の産生、および TF-PCA が認められた。一方、リンパ腫細胞株では TF の発現は認められず、TF-PCA も認められなかった。次に山口大学動物医療センター (YUAMEC) に来院した悪性腫瘍症例の末梢血検体より MP を分離し、血漿 TF-PCA を測定した。健常犬 (n = 10) における測定値から基準値は ≤ 5.3 arbitrary unit (AU) と算出した。乳腺腫瘍、血管肉腫、メラノーマ、リンパ腫のいくつかの症例において血漿 TF-PCA の上昇が認められ、特に血管肉腫およびリンパ腫では顕著に上昇した症例が認められた。非 DIC 群および DIC 群の血漿 TF-PCA の中央値は、それぞれ 7.73 AU (n = 12; 範囲: 1.70–16.13 AU) および 43.40 AU (n = 5; 範囲: 3.47–85.19 AU) であり有意差は認められなかったものの、DIC 群の 5 例中 3 例で顕著な血漿 TF-PCA の上昇が認められた。これらの結果から、イヌの腫瘍性疾患においても TF-MP の産生が凝固亢進に関与していることが示唆された。興味深いことに、リンパ腫細胞株には TF の発現が認められなかったが、一部のリンパ腫症例では血漿 TF-PCA の上昇が認められた。このことから、リンパ腫では腫瘍細胞以外の細胞から産生された TF-MP

が凝固亢進に関与している可能性も考えられた。また本研究はイヌの腫瘍性疾患における血漿 TF-PCA の測定を行った初めての報告であるが、症例数が少ないことや測定系の改善の必要性など様々な問題点があり、さらなる研究が必要と考えられた。

第2章では、YUAMEC に来院した腫瘍性疾患に加え炎症性疾患や感染症に罹患した症例犬の血漿より MP を分離し、改善を加えた測定法で血漿 TF-PCA を測定し、血漿 TF-PCA と DIC の発生の関連性を後ろ向きに解析した。さらに治療前後で検体が得られた3症例(脾臓血管肉腫、免疫介在性溶血性貧血、急性膵炎の各1例)において、血漿 TF-PCA の推移と転機との関連性を検討した。その結果、健常犬 (n = 10) における測定値から算出した血漿 TF-PCA の基準値は ≤ 11.3 AU であったのに対し、非 DIC 群と DIC 群の中央値はそれぞれ 5.0 AU (n = 14; 範囲: 1.9-37.2 AU) と 26.6 AU (n = 12; 範囲: 1.6-88.6 AU) であり、2群間において有意差が認められた ($p = 0.021$)。追跡調査では、3例すべてにおいて治療による全身状態および凝固線溶系パラメーターの改善に伴い、上昇していた血漿 TF-PCA の低下が認められた。これらの結果から血漿 TF-PCA はイヌの様々な疾患において凝固亢進状態を反映している可能性があり、その測定は DIC の診断や治療効果の判定に有用である可能性が示された。本研究の結果は、今後のより大規模な前向き研究によって、DIC の診断および治療効果判定における血漿 TF-PCA の有用性を検証するための礎となるものと考えられた。

次に私は、TF を標的とした腫瘍随伴性凝固亢進に対する治療法の確立を目的とし、高脂血症治療薬として広く用いられているスタチン系薬剤に注目した。スタチンは Ras や Rho といった低分子量 GTPase のプレニル化を抑制することで、コレステロール合成抑制作用とは独立した多面的な作用(抗腫瘍、抗炎症、抗凝固作用など)を有することが知られている。実際に脂溶性スタチン的一种である Simvastatin (Sim) は、過去の報告において血管内皮細胞やヒト腫瘍細胞における TF の発現を抑制すると同時に細胞傷害性を有することが示されており、さらにはヒトにおける疫学調査や臨床試験からもスタチンによる抗凝固作用および抗腫瘍作用が示唆されている。しかし私の行った予備的実験では、*in vitro* における Sim による TF-PCA の抑制効果は認められなかった。そこで第3章では、Sim のイヌ腫瘍細胞株における細胞傷害性を検討した。血管肉腫3株、メラノーマ4株、リンパ腫5株を用いて解析したところ、多くの細胞株において Sim による細胞増殖抑制効果が認められた。また Sim はアポトーシスならびに細胞周期停止を誘導していることが示された。次に細胞傷害性の機序を解明するため、Sim が Ras シグナルの活性化に与える影響を解析した。その結果、血管肉腫およびメラノーマの高感受性株において、Sim が Ras の活性化ならびにプレニル化を抑制することが示された。一方リンパ腫においては、その抑制効果は認められなかった。これらの結果から、Sim は様々な由来の腫瘍細胞に対して細胞増殖抑制効果を有することが示され、血管肉腫およびメラノーマにおいては Ras の抑制がその機序に関与していることが示唆された。

以上の研究結果から、イヌの腫瘍性疾患において TF および血漿中の TF-MP が凝固亢進状態に寄与している可能性、および血漿 TF-PCA の測定が DIC の診断や治療効果判定に有用である可能性が示された。また本研究ではスタチン系薬剤の抗凝固作用は示されなかったが、Sim はイヌの様々な腫瘍細胞に対して増殖抑制効果を有することが明らかとなった。これらの研究結果は、イヌの抗腫瘍療法および腫瘍随伴性凝固亢進の診断法・治療法の確立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	小林 宏祐
審 査 委 員	主 査：山口大学 教 授・奥田 優
	副 査：鹿児島大学 教 授・遠藤 泰之
	副 査：山口大学 教 授・水野 拓也
	副 査：山口大学 教 授・谷 健二
	副 査：山口大学 准教授・馬場 健司
題 目	Generation of tissue factor-bearing procoagulant microparticles in dogs with malignant tumors (イヌの腫瘍性疾患における組織因子含有凝固促進性マイクロパーティクルの産生)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>血栓症や播種性血管内凝固（DIC）などの凝固亢進状態は、イヌの腫瘍性疾患時にしばしば認められ、負の予後因子となることが知られている。しかし、その病態は十分に把握されておらず、確立した診断法および治療法も存在しないことから、小動物臨床における重要な課題となっている。</p> <p>本研究は、イヌの腫瘍性疾患に随伴する凝固亢進状態の病態解明、新規診断法および治療法の検討を目的に行われている。</p> <p>第 1 章では、外因系凝固経路の開始点である組織因子（TF）に着目し、イヌの腫瘍性疾患における TF の発現および活性を評価した研究が行われている。背景としてヒトの悪性腫瘍においては、外因系凝固経路の開始点である TF の腫瘍細胞や炎症細胞における異所性発現が明らかとなっており、また TF は細胞膜上のみならず、細胞外小胞の 1 つであるマイクロパーティクル（MP）上にも存在し、全身循環へ放出されることが知られている。そのため TF および TF 含有 MP（TF-MP）は、悪性腫瘍における凝固亢進状態に関与していると考えられている。しかしながら獣医学領域における知見は非常に限られている。本章では、イヌの腫瘍細胞株における TF-MP の産生が <i>in vitro</i> で解析されている。その結果、イヌ乳腺腫瘍、血管肉腫、およびメラノーマでは TF-MP の産生が認められたが、リンパ腫においては認められなかった。さらに本章では、自然発生腫瘍症例における血漿中 MP による TF 凝固促進活性（血漿 TF-PCA）の測定を行っており、DIC の存在との関連性を検討している。その結果、健常犬と比較して乳腺腫瘍、血管肉腫、メラノーマ、リンパ腫のいくつかの症例において血漿 TF-PCA の上昇を認め、特に血管肉腫およびリンパ腫では顕著に上昇した症例を認めている。非 DIC 群および DIC 群間では統計学的な有意差は認められなかったものの、DIC 群の 5 例中 3 例で</p>	

顕著な血漿 TF·PCA の上昇を認めた。また *in vitro* では TF の発現が認められなかったリンパ腫において、血漿 TF·PCA が上昇した症例が認められたことは非常に興味深い結果であり、腫瘍細胞以外の細胞から産生された TF·MP が凝固亢進に関与していることが示唆された。これらの結果は、イヌの腫瘍性疾患に随伴する凝固亢進状態の病態に TF·MP の産生が関与している可能性を明らかにしている。

第 2 章では、腫瘍性疾患に加え炎症性疾患や感染症に罹患した症例犬において、血漿 TF·PCA が測定され、血漿 TF·PCA と DIC の発生の関連性が後ろ向きに解析されている。その結果、DIC 群では非 DIC 群と比較し有意な血漿 TF·PCA の上昇が認められた。さらに脾臓血管肉腫、免疫介在性溶血性貧血、急性膵炎の各 1 例において治療前後の解析が行われ、3 例すべてにおいて治療による全身状態および凝固線溶系パラメーターの改善に伴い、上昇していた血漿 TF·PCA の低下を認めた。これらの結果は、血漿 TF·PCA はイヌの様々な疾患において凝固亢進状態を反映している可能性と、その測定は DIC の診断や治療効果の判定に有用である可能性を示している。

第 3 章では、高脂血症治療薬として広く用いられているメバロン酸経路阻害薬であるスタチンの多面的作用に着目した研究が行われている。スタチンはコレステロール合成抑制作用に加え、低分子量 GTPase のプレニル化を抑制することで抗腫瘍作用、抗炎症作用、ならびに抗凝固作用を有することが数々の研究により示されている。本章では、スタチンの一種である Simvastatin によるイヌ腫瘍細胞株に対する細胞傷害性とその機序を解析している。その結果、Simvastatin はイヌ血管肉腫、メラノーマ、リンパ腫由来の多くの細胞株に対し細胞増殖抑制効果を有し、その機序としてアポトーシスおよび細胞周期停止の誘導が関与していることが明らかとなった。またその機序の更なる解明のため、Simvastatin 添加による Ras のプレニル化および活性化の変化が解析され、血管肉腫およびメラノーマにおいては高感受性株において Ras のプレニル化および活性化の減少が認められており、Simvastatin の細胞傷害性に関与している可能性が示唆された。これらの結果は、メバロン酸経路はこれらの腫瘍細胞の増殖や生存に重要であり、Simvastatin はイヌの腫瘍の新規治療薬剤となる可能性を示している。

これら三章の結果を総括すると、1) TF·MP の産生がイヌの腫瘍随伴性凝固亢進状態の発生に寄与している可能性、2) 血漿 TF·PCA の測定は腫瘍性疾患を含んだイヌの様々な疾患において DIC の診断や治療効果の判定に有用である可能性、3) 高脂血症治療薬である Simvastatin はイヌの腫瘍細胞に対し細胞傷害性を有し、抗腫瘍薬として応用できる可能性を示している。本論文は、イヌの抗腫瘍療法および腫瘍随伴性凝固亢進の診断法・治療法の確立のための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。