

脳腫瘍に罹患したイヌの血漿中アミノ酸濃度の分析およびイヌ・ネコの頭蓋内
腫瘍組織における L-type amino acid transporter-1 (LAT1) の発現に関する研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

宇津木 真一

2023 年 3 月

目次

	(頁)
序文	1
第1章 脳腫瘍に罹患したイヌの血漿中遊離アミノ酸濃度の分析に関する研究	
1-1 緒言	4
1-2 材料および方法	5
1-3 結果	9
1-4 付図・付表	11
1-5 考察	14
1-6 結語	17
第2章 イヌおよびネコの頭蓋内腫瘍組織における L 型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1)の発現に関する研究	
2-1 緒言	19
2-2 材料および方法	21
2-3 結果	22
2-4 付図・付表	24
2-5 考察	29
2-6 結語	33
総括	34
謝辞	37
引用文献	38
Summary (要旨英文)	48

本学位論文に関係した内容は、以下に示す学術雑誌に投稿し、掲載されている。主軸をなす部分は論文 No.1 および 2 である。

論文

1. Utsugi, S., Azuma, K., Osaki, T., Murahata, Y., Tsuka, T., Ito, N., Imagawa, T., Okamoto, Y. 2017. Analysis of plasma free amino acid profiles in canine brain tumors. *Biomed. Rep.* **6**: 195-200.
2. Utsugi, S., Ogihara, K., Naya, Y., Sunden, Y., Nakamoto, Y., Okamoto, Y. 2022. Expression of L-type amino acid transporter 1 in canine and feline intracranial tumors. *J. Vet. Med. Sci.* **84**: 1111-1117.

序文

高度経済成長期にあった 1960 年代以降のペットブームを背景に、イヌやネコを室内で飼育することが一般的となり、今日ではペットは家族として人々の暮らしに密接に関わるようになった。また、近年の新型コロナウイルス感染拡大の影響により、自宅で過ごす機会が多くなったことから、イヌやネコに癒しや安らぎを求めようと、新たに飼い始める人も増加している。

イヌやネコが伴侶動物として人々の生活に密接に関わるようになるにつれて、獣医療もヒト医療のような高度な技術が求められるようになってきている。磁気共鳴画像 (MRI)、コンピュータ断層画像 (CT)、内視鏡やメガボルテージによる放射線治療といった診断や治療技術の向上は、イヌやネコの QOL 向上や寿命の延長に貢献していると考えられる。

しかし、イヌ・ネコの長寿高齢化に伴って悪性腫瘍の発生率が増加し、現在、悪性腫瘍は老衰に続いてイヌの死亡原因として第二位となっている (1)。イヌ・ネコの悪性腫瘍は、髄膜腫、神経膠腫などの脳腫瘍やリンパ腫、乳腺腫瘍、骨肉腫、扁平上皮がんなど多岐に渡りますが、いずれの悪性腫瘍においても早期発見、早期治療が予後の改善につながると考えられている (2)。

ヒト医療では、悪性腫瘍の早期発見のため、様々な腫瘍マーカーが用いられている。例えば、胃がんや大腸がんに対する CEA、CA19-9、肝細胞がんに対する AFP、PIVKA-II、AFP-L3 などが挙げられる (3-5)。一方で、獣医療では有用な腫瘍マーカーは限られており、腫

瘍性疾患の早期発見を困難なものとしている (6)。このような理由から、イヌ・ネコの悪性腫瘍では診断時に既に腫瘍が切除不可能なほど増大してしまっていたり、所属リンパ節や肺などへ転移してしまっていることも少なくない。このことから悪性腫瘍の早期発見および予後改善のため、簡便かつ精度の高いスクリーニング検査の確立が必要とされている。

近年、医学領域では膵臓がんや肺がんなど特定のがん患者の血漿中遊離アミノ酸 (plasma free amino acid, PFAA) プロファイルが特徴的な変化を示すことから、PFAA プロファイルの測定は、がんの早期発見のバイオマーカーとしての利用が期待されている (7, 8)。

また、L-アミノ酸トランスポーター1(L-type amino acid transporter 1, LAT1)は、Na⁺非依存性のアミノ酸トランスポーターで、ヒトでは脳腫瘍、大腸がん、肺がん、前立腺がん、胃がん、乳がん、膵臓がんなど多くの腫瘍において発現が確認されている (9-15)。LAT1 はバリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、メチオニン、ヒスチジンなどのアミノ酸を細胞外から細胞内へ輸送し、腫瘍組織など増殖の盛んな組織で増加するアミノ酸要求量を補う役目を果たしている (16-18)。近年、医学領域ではLAT1 など、腫瘍組織に特異的に発現する分子をターゲットとした分子標的薬が開発されている (19)。分子標的薬は、腫瘍組織に特異的に発現する分子をターゲットとすることから、既存の化学療法薬と比較して副作用が少ないことが特徴である。

以上のように、獣医学領域では悪性腫瘍の発生率増加に伴い、腫瘍の早期発見や副作用の少ない有効な治療方法が求められているが、医学領域で研究が進められているがんの早期

発見のための PFAA プロファイルの研究や、LAT1 に対する分子治療薬の開発は獣医学領域ではほとんど実施されていない。

獣医学領域における脳腫瘍は 5 千頭に 1 頭の割合で発生する (20)。近年の CT、MRI 検査の普及により、過去よりも検出頻度が増してきている。脳腫瘍の主な治療として外科手術、放射線治療、化学療法および対症療法が行われている。例えば神経膠腫などの手術による完全切除が困難な腫瘍や、遠隔転移を伴う進行症例では、放射線治療や化学療法が選択されることがある。イヌの脳腫瘍に対する化学療法薬として、ロムスチン、ハイドロキシウレア、テモゾロミドなどが選択されるが、いずれの薬剤も有効な治療成績を出せているとは言い難い (21-23)。

そこで本研究では、まずは第 1 章において脳腫瘍に罹患したイヌの PFAA プロファイルの分析を行った。次に第 2 章においてイヌとネコにおける原発性および二次性頭蓋内腫瘍組織における LAT1 の発現を調査し、イヌとネコの脳腫瘍における LAT1 の発現特性を明らかにした。

第1章 脳腫瘍に罹患したイヌの血漿中遊離アミノ酸濃度の分析に関する研究

1-1 緒言

イヌの脳腫瘍は中年齢から老齢で多く発生し、その発生率は 2.3~4.5%と報告されている (24, 25)。最も発生頻度が高いイヌの脳腫瘍は髄膜腫で、次いで神経膠腫（星細胞腫、乏突起膠腫を含む）である (24, 26, 27)。脳腫瘍は血液検査や頭蓋骨の X 線検査では発見できないため、MRI で診断することが一般的である (28)。しかし、獣医療では MRI 検査が実施できる動物病院が限られていることや、検査費用が高額であることから、検査を行う機会は限られている。また、脳腫瘍の多くは神経徴候が発現してから疑診されることが殆どであり、MRI 検査で診断された時には腫瘍がかなり進行した状態であることが少なくない。従って、脳腫瘍の早期発見・早期治療のためには、高い感度と特異度を有する簡便かつ非侵襲的なバイオマーカーの確立が必要である。

近年、医学領域では血漿中遊離アミノ酸 (plasma free amino acid, PFAA) プロファイルが、膵臓がん、乳がん、肺がんなどのがんや、循環器疾患など特定の疾患で変化することから、PFAA プロファイルの変化が疾患の発症を予測できると報告されている (7, 8)。このことから、健康診断などの際に PFAA プロファイルを測定することが特定の疾患のバイオマーカーとして利用できる可能性があると期待されている。獣医学領域においても、乳腺がん、口腔内悪性黒色腫やリンパ腫に罹患した犬で PFAA プロファイルが変化することが報告さ

れている (29-31)。また、特発性てんかんのイヌでは、脳脊髄液 (CSF) 中のグルタミン酸濃度が上昇することが報告されている (32)。

ヒトの神経膠腫の患者では、MR スペクトロスコピー (MRS) あるいは手術や剖検で得られた脳腫瘍組織の標本において、アミノ酸やコリンなどの様々な代謝物が分析されているが (33, 34)、脳疾患における PFAA プロファイルに関する報告はほとんどない (35)。また、我々の知る限りでは、イヌの脳腫瘍や特発性てんかんと PFAA プロファイルとの関連は調査されていない。そこで、第 1 章では脳腫瘍に罹患したイヌの PFAA プロファイルを調べ、健常犬および特発性てんかんのイヌの PFAA プロファイルと比較した。

1-2 材料および方法

1) 供試動物

試験動物は、2014 年 10 月から 2015 年 6 月までの間に鳥取大学農学部附属動物医療センターおよび日本動物高度医療センターに来院した脳腫瘍のイヌ 12 頭とした。脳腫瘍の診断は、神経徴候および頭部 MRI 検査と病理組織学的検査に基づいて行った。頻繁に認められた神経徴候は、てんかん発作、性格の変化、意識レベルの低下、歩行時の旋回および四肢不全麻痺であった。MRI 検査には 0.4T 装置 (AIRIS; Hitachi Medico, Tokyo, Japan) あるいは 1.5T 装置 (Echelon Vega; Hitachi Medico, Tokyo, Japan) を用いた。全てのイヌにおいて、T2 強調画像、T1 強調画像および造影 T1 強調画像を撮像した。診断時の年齢は 7 歳から

14 歳齢で、平均年齢は 10.5 歳であった。性別は 6 頭が雄で、6 頭が雌であった。

脳腫瘍の内訳は、神経膠腫疑いのイヌが 6 頭、髄膜腫疑い／確定診断されたイヌが 4 頭、乳腺がんの脳転移と確定診断されたイヌが 2 頭であった。

特発性てんかんと診断されたイヌは 8 頭で、診断時の年齢は 3 歳から 10 歳齢（平均年齢 5.5 歳）であった。また、コントロールとして 1 歳から 14 歳齢（平均年齢 8.1 歳）の健常犬 16 頭を用いた（表 1）。

2) 採血

8 時間以上絶食した後に、頸静脈あるいは伏在静脈からシリンジを用いて全血を採取した。採血後、ヘパリンチューブに静脈血を移し、直ちに $1,700 \times g$ 、 4°C で 15 分間遠心分離を行った。遠心分離後は速やかに血漿を回収し、PFAA を測定するまで -80°C で凍結保存した。PFAA 分析の前には、血漿をメタノール [血漿：メタノール (v/v)、1：9] 中で 20 分間徐たんぱく処理し、攪拌後にサンプルを $15,000 \times g$ 、 4°C で 10 分間遠心分離した後に上清を回収し、機器で分析を行った。

3) PFAA の測定

血漿中の PFAA 濃度の測定は、既報 (36) の方法に従って、液体クロマトグラフィーによるプレカラム法を用いて実施した。標準アミノ酸溶液 (H タイプ) を含むすべての試薬は、

富士フィルム和光純薬株式会社（大阪、日本）から購入したものを使用した。分析には自動プレカラム誘導体化機能の付いた液体クロマトグラフィーシステム（Nexera X2；島津製作所、京都府、日本）を使用した。

測定は以下に挙げる必須アミノ酸および非必須アミノ酸の合計 20 種類の血漿中濃度（ $\mu\text{mol/l}$ ）を測定した。アラニン（Ala）、アルギニン（Arg）、アスパラギン（Asn）、アスパラギン酸（Asp）、システイン-システイン（Cys-Cys）、グルタミン酸（Glu）、グルタミン（Gln）、グリシン（Gly）、ヒスチジン（His）、イソロイシン（Ile）、ロイシン（Leu）、リジン（Lys）、メチオニン（Met）、フェニルアラニン（Phe）、プロリン（Pro）、セリン（Ser）、スレオニン（Thr）、トリプトファン（Trp）、チロシン（Tyr）およびバリン（Val）。

4) 統計解析

動物を脳腫瘍、特発性てんかん、健常犬（コントロール）の 3 群に分類し、3 群間の PFAA プロファイルと比較した。アミノ酸の血漿中濃度は平均値±標準偏差で表した。数値はすべて Excel 2013（日本マイクロソフト株式会社、東京、日本）で算出した。3 群間の比較は Steel-Dwass 検定（4-Step Excel Statistics version 3; OMS publishing Inc, Tokyo, Japan）を用い、 $P < 0.05$ で統計的に有意差があるとみなした。データはレーダーチャートで表し、コントロールを 100%とした場合の、脳腫瘍および特発性てんかんのイヌにおける PFAA の平均値を%で示した。

5) 免疫組織化学分析

L型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1) の免疫組織化学分析は、外科的に切除された悪性髄膜腫2例(症例1:柴犬、雄、14歳齢、体重11kg、症例2:柴犬、雌、10歳齢、体重10kg) に対して実施した。免疫組織化学分析には、ウサギ抗イヌ LAT1 ポリクローナル抗体を使用した。この抗体は、イヌ LAT1 の C 末端のアミノ酸配列に従って設計された合成ペプチド抗原を用いて調製された(37)。具体的には、6歳の健康な柴犬の脳から Total RNA を抽出し、RT-PCR 増幅により抽出・精製した DNA をクローニングし、イヌの LAT1 の全長 cDNA 塩基配列を決定した。得られたイヌの LAT1 完全長 cDNA に対応する塩基配列は 1828bp の長さで、485 アミノ酸のポリペプチドをコードしていた。イヌの LAT1 のアミノ酸配列は、ヒトおよびラットのものそれぞれ 93.2% および 91.1% の類似性を示した。この合成ペプチド抗原をウサギに免疫し、得られたポリクローナル抗体を一次抗体とした。免疫組織化学分析は、既報(38, 39)の方法に従って実施した。具体的には、脱パラフィン後、切片を 0.01M クエン酸 (pH6.0) 中で、電子レンジで3分間×5回加熱し、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪、日本)で洗浄した。0.3% H₂O₂ 含有メタノールで内因性ペルオキシダーゼを不活性化した後の切片に、ウサギ抗イヌ LAT1 ポリクローナル抗体を塗布し室温で20分間インキュベートした。免疫染色は市販のキット (Histofine Simple Stain MAX PO; Nichirei, Tokyo, Japan) を用いて行った。そ

の後、3,3'-diaminobenzidine (DAB) H₂O₂ 溶液を塗布し、発色反応を誘導した。DAB による反応後、試料を脱イオン水で3~4回洗浄し、その後、ヘマトキシリンで核を染色して観察した。

1-3 結果

脳腫瘍のイヌでは、健常犬と比較して、血漿中の Ala、Pro および Ile の3種類のアミノ酸が有意に増加していた (Ala, P=0.03; Pro, P=0.009; Ile, P=0.009)。脳腫瘍のイヌの血漿中 Ala、Pro および Ile の濃度は、健常犬のそれぞれ1.6倍、1.5倍、1.6倍増加していた (図 1-1)。また、脳腫瘍のイヌでは、健常犬と比較して、Lys が高値を、Asp は低値を示したが、統計学的な有意差は認められなかった。その他のアミノ酸 (Arg、Asn、Cys-Cys、Glu、Gln、Gly、His、Leu、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val) の血漿中濃度は、脳腫瘍のイヌと健常犬の間で統計学的に有意な変化は認められなかった。

脳腫瘍のイヌの中で、髄膜腫と神経膠腫の PFAA プロファイルを比較すると、神経膠腫のイヌでは髄膜腫と比較して血漿中の Asn と Gln が有意に高値を示した (P < 0.05) (図 1-2)。その他のアミノ酸濃度は、髄膜腫と神経膠腫のイヌの間で統計学的に有意な変化は認められなかった。

特発性てんかんのイヌでは、脳腫瘍のイヌおよび健常犬と比較して、いずれのアミノ酸濃度も統計学的に有意な変化は認められなかった (図 1-1)。なお、有意差は認められなかつ

たが、特発性てんかんのイヌの血漿中 Asp 濃度は、健常犬と比較して低値を示す傾向があった。

免疫組織化学分析により 悪性髄膜腫組織の LAT1 発現を調べたところ、症例 1、症例 2 ともに LAT1 陰性であった。

1-4 付図・付表

表1 第1章の供試動物データ

犬種	性別	年齢(歳)	体重(kg)	診断
フレンチ・ブルドッグ	雄	7	9	脳腫瘍(神経膠腫)
フレンチ・ブルドッグ	雄	11	10	脳腫瘍(神経膠腫)
柴犬	雌	10	7	脳腫瘍(神経膠腫)
ゴールデン・レトリバー	雌	10	26	脳腫瘍(神経膠腫)
雑種	雄	11	27	脳腫瘍(神経膠腫)
フレンチ・ブルドッグ	雄	9	13	脳腫瘍(神経膠腫)
柴犬	雄	9	15	脳腫瘍(髄膜腫)
柴犬	雌	10	10	脳腫瘍(髄膜腫)
ミニチュア・シュナウザー	雌	12	6	脳腫瘍(髄膜腫)
柴犬	雄	14	11	脳腫瘍(髄膜腫)
ヨークシャー・テリア	雌	10	2	乳腺がんの脳転移
ミニチュア・ダックスフンド	雌	13	4	乳腺がんの脳転移
ミニチュア・ダックスフンド	雌	3	3	特発性てんかん
ビーグル	雄	3	18	特発性てんかん
ヨークシャー・テリア	雄	6	2	特発性てんかん
チワワ	雌	5	3	特発性てんかん
トイ・プードル	雄	6	3	特発性てんかん
トイ・プードル	雌	6	3	特発性てんかん
雑種	雌	5	3	特発性てんかん
雑種	雌	10	11	特発性てんかん
雑種	雄	14	11	コントロール
ミニチュア・ダックスフンド	雌	6	4	コントロール
トイ・プードル	雌	12	3	コントロール
チワワ	雌	6	3	コントロール
ミニチュア・ダックスフンド	雌	7	6	コントロール
雑種	雄	12	14	コントロール
ミニチュア・ダックスフンド	雌	12	6	コントロール
バグ	雌	9	9	コントロール
マルチーズ	雌	8	4	コントロール
ペキニーズ	雄	2	3	コントロール
ミニチュア・シュナウザー	雌	1	6	コントロール
ミニチュア・ダックスフンド	雌	14	7	コントロール
雑種	雄	1	3	コントロール
ミニチュア・ダックスフンド	雌	10	8	コントロール
チワワ	雄	10	4	コントロール
ペキニーズ	雄	6	6	コントロール

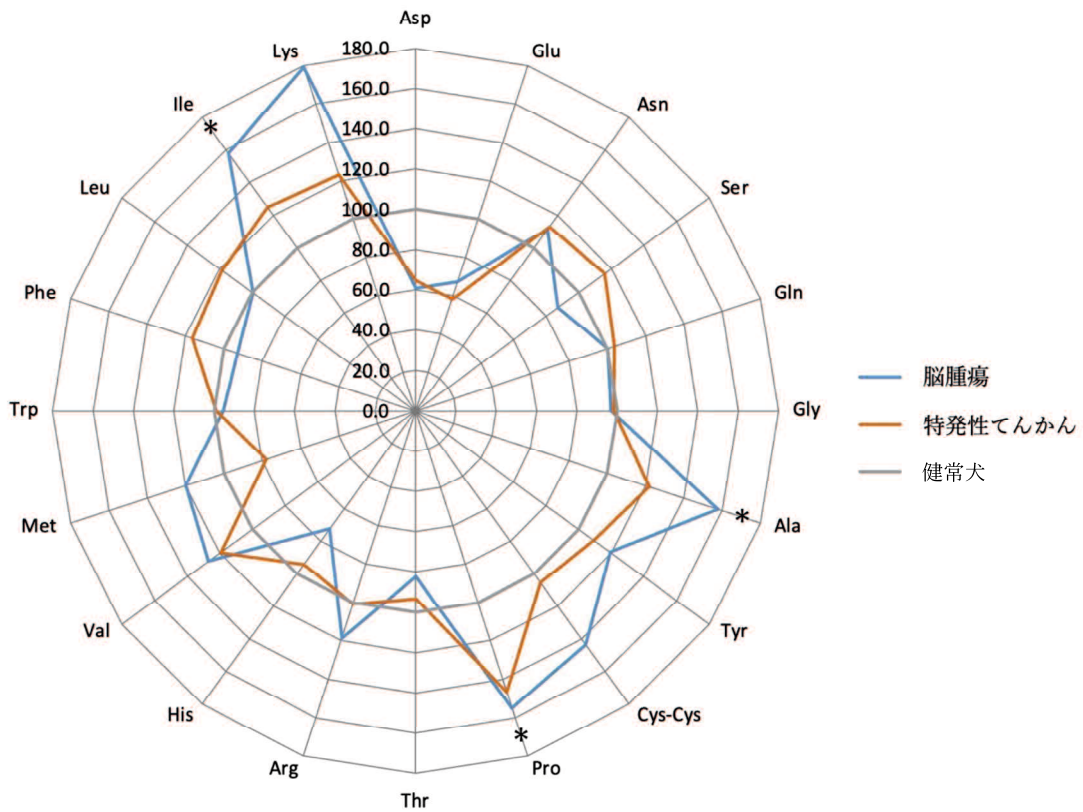


図 1-1 脳腫瘍と特発性てんかんのイヌにおける PFAA プロファイルのレーダーチャート

Note: レーダーチャートは、健常犬の PFAA 濃度を 100%とした時の、脳腫瘍および特発性てんかんのイヌの PFAA 濃度を平均値 (%) で表した。脳腫瘍のイヌでは、健常犬と比較して、血漿中の Ala、Pro および Ile の 3 種類のアミノ酸が有意に増加していた (Steel-Dwass 検定)。

特発性てんかんのイヌでは、脳腫瘍のイヌおよび健常犬と比較して、いずれのアミノ酸濃度も有意差は認められなかった。

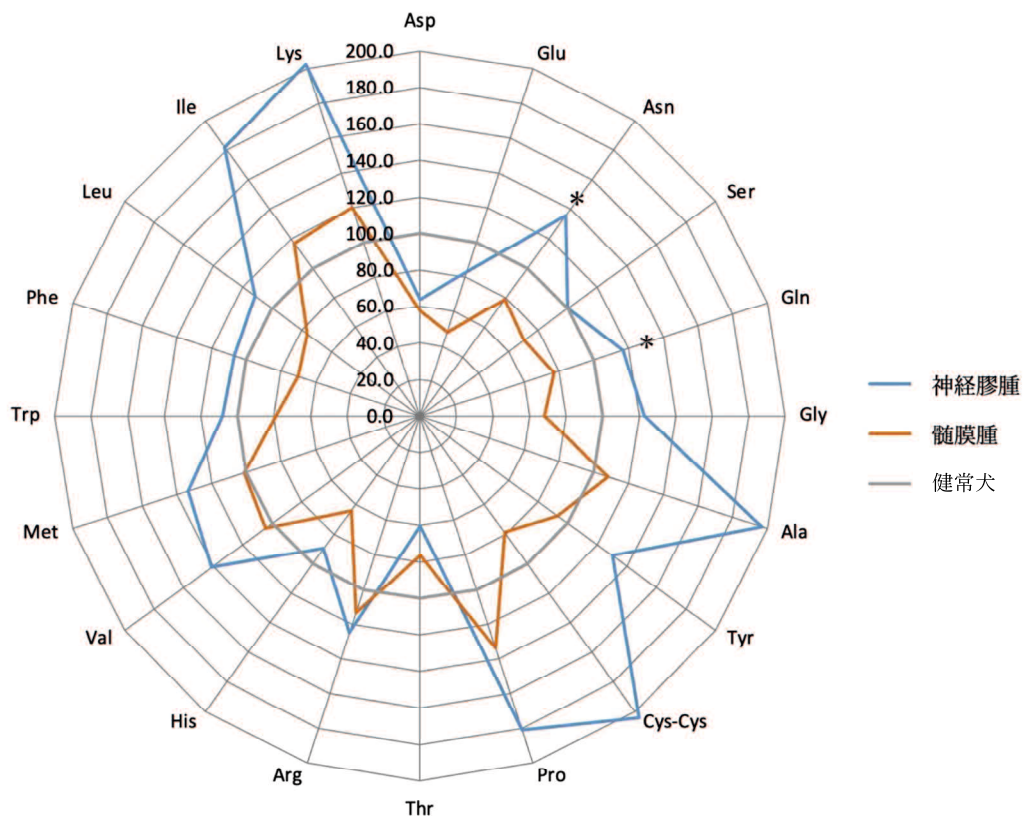


図 1-2 神経膠腫と髄膜腫のイヌにおける PFAA プロファイルのレーダーチャート

Note: レーダーチャートは、健常犬の PFAA 濃度を 100%とした時の、神経膠腫および髄膜腫のイヌの PFAA 濃度を平均値 (%) で表した。神経膠腫のイヌでは、髄膜腫のイヌと比較して、血漿中の Asn および Gln が有意に増加していた (Steel-Dwass 検定)。

1-5 考察

本研究において、脳腫瘍のイヌにおける血漿中アミノ酸濃度は、健常犬と比較して Ala、Pro および Ile がそれぞれ 1.6 倍、1.5 倍、1.6 倍増加していた (図 1-1)。また、脳腫瘍のイヌでは、測定値にばらつきがあり統計学的な有意差は認められなかったが、健常犬と比較して Lys が高値を、Asp が低値を示した。これらの結果から、末梢血中の PFAA プロファイルは、脳腫瘍の代謝を反映していると考えられる。

医学領域では、脳腫瘍の代謝に特定のアミノ酸が関与していることが示唆されている (40)。例えばヒトの悪性神経膠腫の患者の CSF では、健常人と比較して Pro、Met、タウリン、Lys、Ser、Phe、Gln の濃度が有意に高値を示したと報告されている (40)。また、外科的に摘出された神経膠腫組織と腫瘍周囲の組織のアミノ酸濃度を測定した研究では、正常脳組織と比較して腫瘍周囲の組織で Ile と Val の濃度が有意に高値を示したと報告されている (34)。さらに、ヒトの髄膜腫における MRS では、91.3%の症例でアラニンレベルの増加が認められている (41)。脳腫瘍の患者において、アミノ酸濃度が変化する正確なメカニズムは明らかにされていないが、腫瘍組織における L 型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1) などのアミノ酸トランスポーターの発現の変化が原因である可能性が考えられる。

本研究では、悪性髄膜腫の 2 検体に対して LAT1 の免疫組織化学分析を行ったところ、LAT1 抗体による染色が非常に弱かった。このことから、イヌの悪性髄膜腫では LAT1 がダウンレギュレートされている可能性が考えられた。なお、本研究で使用した抗体は、以前に

落合らが様々な組織における LAT1 の発現を調査するため、イヌの LAT1 の C 末端アミノ酸配列に基づいて設計した合成ペプチド抗原を調製したものを使用した (37)。このことから、本研究で使用した抗体は、イヌの LAT1 に特異的であると考えられる。

本研究および過去の報告において、Ala、Pro、Ile など特定のアミノ酸がヒトとイヌの脳腫瘍患者の両者で増加していた (34, 40, 41)。一方で、Met、タウリン、Lys、Ser、Phe、Gln などは、ヒトの患者でのみ増加している (34, 40)。ヒトとイヌで増加するアミノ酸が異なる理由として、サンプルの採取部位が異なることが考えられる。ヒトではサンプルとして CSF が用いられているが (40)、本研究では静脈血から得た血漿を使用した。脳腫瘍をはじめとした脳疾患に罹患したイヌのアミノ酸プロファイルは、血漿だけでなく CSF でも変化すると考えられる。イヌの脳腫瘍とアミノ酸濃度との相関を理解するためには、血漿に加えて CSF 中のアミノ酸プロファイルも調査する必要があると考えられる。なお、本研究では、脳腫瘍のイヌと特発性てんかんのイヌの両者で Asp 濃度が低値を示す傾向があったことから、Asp 濃度の低下がてんかん発作と関連している可能性が疑われた。

獣医学領域において、健常犬と比較して悪性黒色腫のイヌで Thr、Pro、Ser の血漿中濃度が低下、リンパ腫のイヌで Phe、Glu の血清中濃度が上昇、非転移性乳腺腫瘍のイヌで Met、Ser、Asn、Gln、Ala、タウリン、シトルリンの血漿中濃度が低下したと報告されている (29-31)。これらの PFAA プロファイルの変化は、本研究で観察された変化と異なっていることから、本研究で認められた PFAA プロファイルの変化はイヌの脳腫瘍に特異的な変化であ

ることが示唆された。

過去の報告では、特発性てんかんのイヌでは CSF 中の Glu 濃度が上昇すると報告されている (32)。本研究では、脳腫瘍のイヌに加えて、特発性てんかんのイヌおよび健常犬の PFAA プロファイルも調査した。しかし、特発性てんかんのイヌでは、健常犬と比較していずれのアミノ酸濃度においても有意な変化は認められなかった。この理由として、血液脳関門 (BBB) の存在が考えられる。特発性てんかんのイヌでは、BBB が損傷していないことから、CSF 中のアミノ酸濃度は変化するが、末梢血中のアミノ酸濃度は変化しない可能性が考えられる。一般的に、全身性の痙攣発作は一時的に BBB の透過性を高めるが、BBB の透過性亢進は 24 時間以内に回復すると考えられている (42)。また、本研究では、全例で脳の MRI 検査を行ったが、脳腫瘍のイヌでは全例で造影剤 (ガドテリドール) により脳腫瘍組織の増強が認められたことから、BBB 機能の低下が示唆された。このことから、脳腫瘍のイヌでは末梢血の PFAA プロファイルが変化したと考えられる (34)。したがって、てんかん発作を起こしたイヌに対する PFAA プロファイルのスクリーニング検査は、特発性てんかんと構造的てんかんの早期鑑別、特にてんかん発作の原因が脳腫瘍であるか否かを鑑別するのに有用であると考えられる。

ヒトの MRS の研究では、悪性神経膠腫において乳酸やコリンなどいくつかの代謝物のレベルが上昇すると報告されている (33)。また、別の MRS の研究では、グリシンのレベルは神経膠腫のグレードによって変化するが、神経膠芽腫と髄膜腫の患者間で差がないこと

が示されている (43)。一方、サンプルに CSF を用いた研究では、脳腫瘍のグレードで CSF 中のアミノ酸濃度に差がないことが示されている (35)。本研究では、髄膜腫と神経膠腫のイヌで血漿中の Asn と Gln 濃度に有意差が認められた。また、統計学的な有意差は認められなかったが、神経膠腫のイヌでは健常犬と比較して Ala、Cys-Cys、Pro、Ile、Lys の濃度が高値を示す傾向であった。この結果から、PFAA プロファイルが腫瘍の種類やグレードと関連している可能性が考えられる。さらに、治療前と治療後で PFAA プロファイルが変化する可能性が考えられるが、この点に関してはさらなる研究が必要である。

本研究の結果から、脳腫瘍のイヌの PFAA プロファイルは、健常犬と比較して特定のアミノ酸が変化することが示唆された。PFAA プロファイルの測定は、全身麻酔などの特別な処置を必要とせず、採血で簡便に測定することが可能である。また、脳腫瘍以外の複数の種類のがんについても 1 つの検体で同時に検査できることから、がんの早期発見のためのスクリーニング検査として有用であると考えられる。今後はより多くのサンプルを集積し、各腫瘍ごとの PFAA プロファイルの変化や予後を調査し、診断に有用なバイオマーカーとしての確立が期待される。

1-6 結語

本研究では、脳腫瘍および特発性てんかんに罹患したイヌの PFAA プロファイルを測定し、健常犬と比較した。本研究で得られた知見から、脳腫瘍のイヌの PFAA プロファイルは健

常犬とは異なり、その変化は脳腫瘍に特異的と考えられることから、神経徴候などから脳腫瘍を疑うイヌの PFAA プロファイルの測定は、脳腫瘍の早期発見のためのバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

第2章 イヌおよびネコの頭蓋内腫瘍組織におけるL型アミノ酸トランスポーター1

(LAT1)の発現に関する研究

2-1 緒言

アミノ酸トランスポーターは、タンパク質合成や生化学反応の基質となるアミノ酸を細胞に供給することで、細胞の生存を維持する重要な役割を担っている (44, 45)。腫瘍細胞は細胞増殖や細胞内代謝を維持するために正常細胞よりも多くの栄養分を必要とすることから、アミノ酸トランスポーターの発現が亢進している (22, 46)。腫瘍組織におけるアミノ酸量は、隣接する正常組織の約2倍であると報告されている (47)。腫瘍組織で発現が亢進するアミノ酸トランスポーターとして、LAT1、LAT3 および ASCT2 が知られているが、その中でも LAT1 は複数の必須アミノ酸の取り込みに関与しており、多くの悪性腫瘍で発現が亢進することから特に重要である (48)。

LAT1 は Na⁺非依存性アミノ酸トランスポーターで、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、メチオニンおよびヒスチジンなどのアミノ酸を細胞外から細胞内へ輸送することで、細胞増殖や細胞内代謝が活発な組織へのアミノ酸供給に関与している (20-22)。LAT1 は胎児期で発現が亢進しているが、正常な成人では脳、精巣および胎盤に発現が限られており、その発現量は腫瘍組織と比較して低いと考えられている (14, 16, 22, 46, 49, 50)。

ヒトでは、脳腫瘍、大腸がん、肺がん、前立腺がん、胃がん、乳がん、膵臓がんなど多くの悪性腫瘍で LAT1 の発現が亢進し、その発現量はがんの悪性度と相関し、予後予測因子となる (13-19)。例えば、ヒトの腎細胞がん患者の研究では、がん組織の 92% で LAT1 が発現し、LAT1 の発現量が多い患者は全生存期間と無増悪生存期間が短く、腫瘍組織中の LAT1 発現量が多いほど転移や再発が多いと報告されている (51)。

LAT1 を薬理的に阻害することでがん細胞の増殖が抑制されることから、医学領域では近年、JPH203 のような LAT1 を標的とした新規抗がん剤が注目されている (17, 23)。JPH203 は選択的 LAT1 阻害剤で、細胞内に入るアミノ酸量を減少させることで腫瘍細胞の増殖を抑制する (23)。

これらの理由から、医学領域では LAT1 はがんの予後を予測するバイオマーカーとして、また、がんの治療標的として注目されている。しかし、獣医学領域では LAT1 の発現プロファイルに関する研究はほとんどない。

第 1 章の脳腫瘍に罹患したイヌの血漿中遊離アミノ酸 (PFAA) プロファイルの分析に関する研究において、悪性 (退形成性) 髄膜腫の組織 2 例に LAT1 の免疫組織化学分析を行ったところ、2 例とも LAT1 の発現が低下 (down-regulation) していたことを述べた (52)。本章では、イヌおよびネコの頭蓋内腫瘍組織における LAT1 の発現および悪性度との関連について、より多くの症例で調査した。

2-2 材料および方法

1) 供試動物および組織サンプルの採取

試験動物は、2014年10月から2017年12月までの間に、鳥取大学農学部附属動物医療センターおよび京都市内の動物病院に来院し、MRI または CT 検査により頭蓋内腫瘍と診断され、外科手術で切除・摘出した腫瘍組織の病理組織学的検査を行った。

2) LAT1 の免疫組織化学染色

LAT1 の免疫組織化学染色 (IHC) には、ウサギ抗イヌ LAT ポリクローナル抗体を使用した。この抗体は、イヌの LAT1 の C 末端アミノ酸配列に基づいて設計された合成ペプチド抗原を使用して調製された (37)。用いた抗体の作製に関しては第 1 章で記載した通りである。

IHC は、以下に示す方法で行った。脱パラフィン後、切片を 0.01M クエン酸 (pH6.0) 中で 3 分間電子レンジで加熱し、加熱を 5 回繰り返した後、0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4) で洗浄した。内因性ペルオキシダーゼを 0.3% H₂O₂ 含有メタノールで不活性化し、切片をウサギ抗犬 LAT1 ポリクローナル抗体を用いて一晩 4°C でインキュベートした。免疫染色は、市販のキット [EnVision + kit/ HRP (DAB), Dako, Glostrup, Denmark] を用いて行った。その後、3,3'-diaminobenzidine (DAB) H₂O₂ 溶液を塗布し、陽性呈色反応を誘導した。DAB 反応後、検体を脱イオン水で 3~4 回洗浄し、ヘマトキシリンで核を染色して観察し

た。

3) 組織学的検査

腫瘍組織は 10%緩衝ホルマリンで固定した後にパラフィンに包埋し、6-8 μ m の厚さで切片化し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色で染色し、組織学的検査を行った。髄膜腫はヒトの髄膜腫の WHO 分類に基づいてグレード I~III に分類した。LAT1 染色において、イヌでは陽性対照として精巣上体を用いた。また、ネコとの相同性は確認できなかったが、ネコの正常な脳の毛細血管内皮細胞の染色は、ネコで特異的であると判断した。さらに、ネコの陰性対照は染色されないことを確認した (38)。

LAT1 発現の分類と評価は、標本上の腫瘍組織に限定し、手作業によるカウントを行った。全腫瘍細胞中の LAT1 陽性細胞の割合は、5 視野の平均値で算出した。腫瘍細胞数が 200 個以下の場合、全腫瘍細胞をカウントして算出した。LAT1 の染色強度は、LAT1 陽性細胞の割合が腫瘍面積の 0%で-、腫瘍面積の 25%未満で+、腫瘍面積の 25-50%で++、腫瘍面積の 50-75%では+++、腫瘍面積の 75-100%で++++と 5 段階に分類した。

2-3 結果

腫瘍組織のサンプルは、14 頭のイヌと 3 頭のネコから採取され、平均年齢は 11.4 \pm 3.4 歳 (中央値: 11 歳、範囲: 4-19 歳) であった。全サンプルのうち、10 頭が雄、7 頭が雌であ

った（表 2）。イヌでは髄膜腫が 5 例（グレード I が 3 例、グレード II が 2 例）、組織球性肉腫が 3 例、リンパ腫、膠芽腫、下垂体腺腫、鼻腔内腺がん、鼻腔内移行上皮がん、骨髄性白血病が各 1 例ずつであった。このうち 10 例が原発性頭蓋内腫瘍で、4 例が二次性頭蓋内腫瘍であった。イヌでは大脳に発生した原発性頭蓋内腫瘍が 9 例、下垂体に発生した原発性頭蓋内腫瘍が 1 例であった。二次性頭蓋内腫瘍は、大脳に 2 例、大脳と脳幹に 1 例、下垂体に 1 例であった（表 2）。ネコでは髄膜腫（グレード I）、リンパ腫、扁平上皮がんが各 1 例ずつであった。このうち 2 例が原発性頭蓋内腫瘍で、1 例が二次性頭蓋内腫瘍であった。ネコでは原発性および二次性頭蓋内腫瘍ともに大脳発生であった（表 2）。

IHC により、LAT1 はイヌ 14 例中 12 例で検出された。LAT1 が陰性であった 2 例は悪性髄膜腫とリンパ腫であった（図 2-1）。イヌの髄膜腫 5 例のうち、組織学的に悪性が 2 例、良性が 3 例であった。組織球性肉腫、膠芽腫、リンパ腫は悪性であり、下垂体腺腫は良性であった。したがって、イヌの頭蓋内原発腫瘍 10 例のうち、6 例が悪性、4 例が良性であり、悪性 6 例のうち 5 例が LAT1 陽性、良性 4 例は全て LAT1 陽性であった（図 2-2, 図 2-3）。二次性頭蓋内腫瘍では、鼻腔内腺がん 1 例、鼻腔内移行上皮がん 1 例、骨髄性白血病 1 例が LAT1 陽性で、リンパ腫 1 例は陰性であった（図 2-4）。

ネコ 3 例（良性髄膜腫、頭蓋内原発リンパ腫、扁平上皮がんの転移）ではいずれも LAT1 が陽性であった（図 2-5）。

2-4 付図・付表

表2 第2章の供試動物データ

動物種	性別	年齢(歳)	病変の発生部位	病理診断名	原発/二次性	LAT1
イヌ	雄	11	左嗅球~大脳(前頭葉)	移行型髄膜腫(グレード1)	原発性	++++
イヌ	雄	10	大脳(頭頂葉)	髄膜腫(グレード1)	原発性	++++
イヌ	雌	11	大脳(前頭葉~側頭葉)	髄膜腫(グレード1)	原発性	++++
イヌ	雄	12	大脳(前頭葉)	非定型髄膜腫(グレード2)	原発性	++++
イヌ	雄	19	大脳(前頭葉)	髄膜腫(グレード2)	原発性	-
イヌ	雌	8	大脳	組織球性肉腫	原発性	++++
イヌ	雄	10	大脳(側頭葉)	組織球性肉腫	原発性	++++
イヌ	雄	10	大脳(前頭葉)	組織球性肉腫	原発性	+
イヌ	雄	11	下垂体	下垂体腺腫瘍	原発性	+
イヌ	雄	10	大脳	膠芽腫	原発性	++++
ネコ	雌	14	大脳	砂粒体型髄膜腫(グレード1)	原発性	+++
ネコ	雌	10	大脳	リンパ腫	原発性	++++
イヌ	雄	13	嗅球~大脳(前頭葉), 脳幹	鼻腔内腺癌	二次性	+++
イヌ	雄	17	大脳(くも膜下腔)	鼻腔内移行上皮がん	二次性	+++
イヌ	雌	8	大脳(脈絡叢)	骨髄性白血病	二次性	++++
イヌ	雌	4	下垂体	リンパ腫	二次性	-
ネコ	雌	15	大脳(側頭葉)	扁平上皮がん	二次性	++

Note: LAT1, L型アミノ酸トランスポーター1

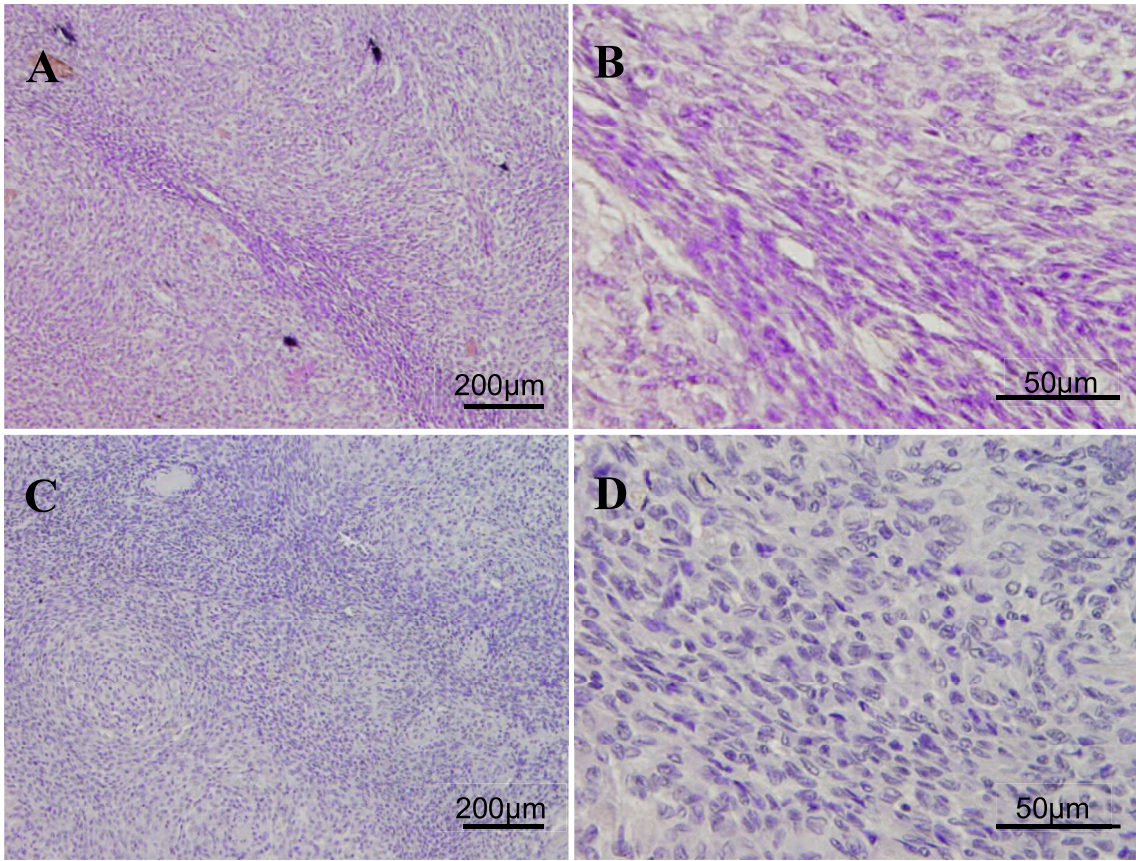


図 2-1 L 型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1) 陰性 (-) のグレード 2 の髄膜腫のイヌの組織切片。HE 染色 (A, B)、LAT1 免疫染色 (C, D)

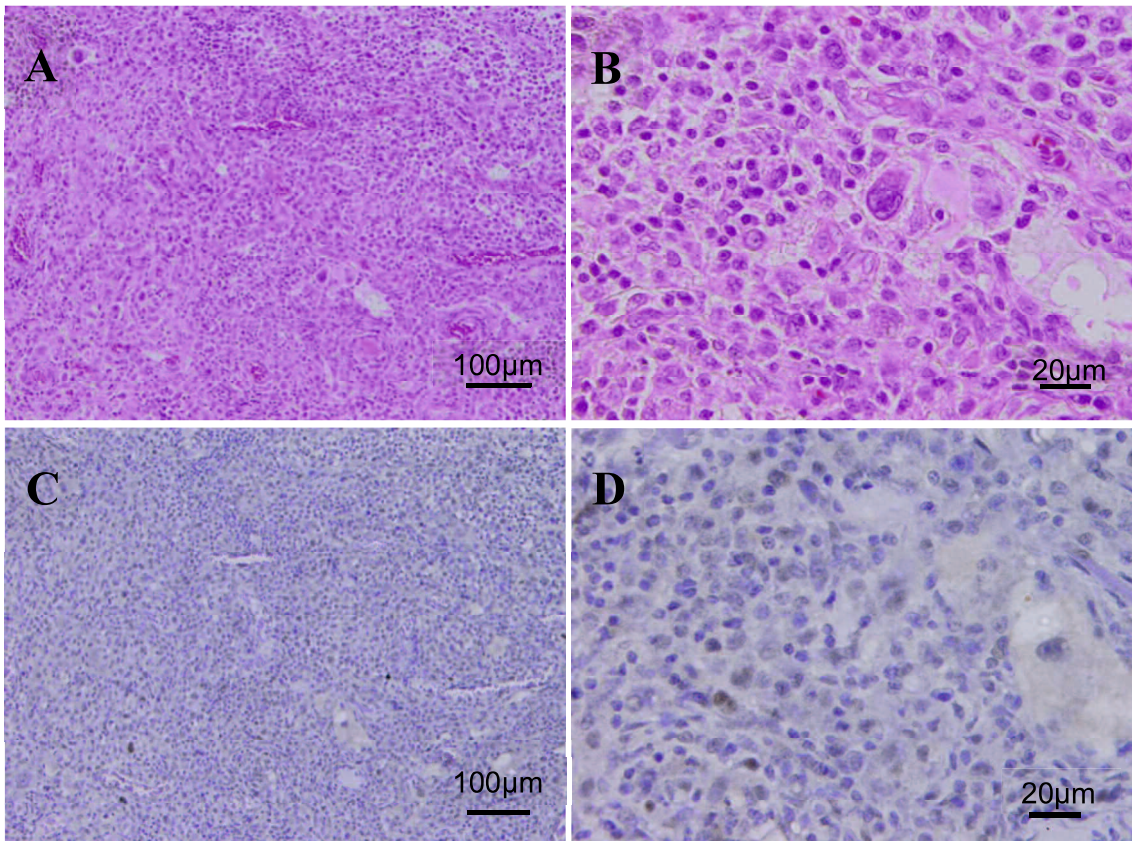


図 2-2 L 型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1) 陽性 (+) の組織球性肉腫のイヌの組織切片。HE 染色 (A, B)、LAT1 免疫染色 (C, D)

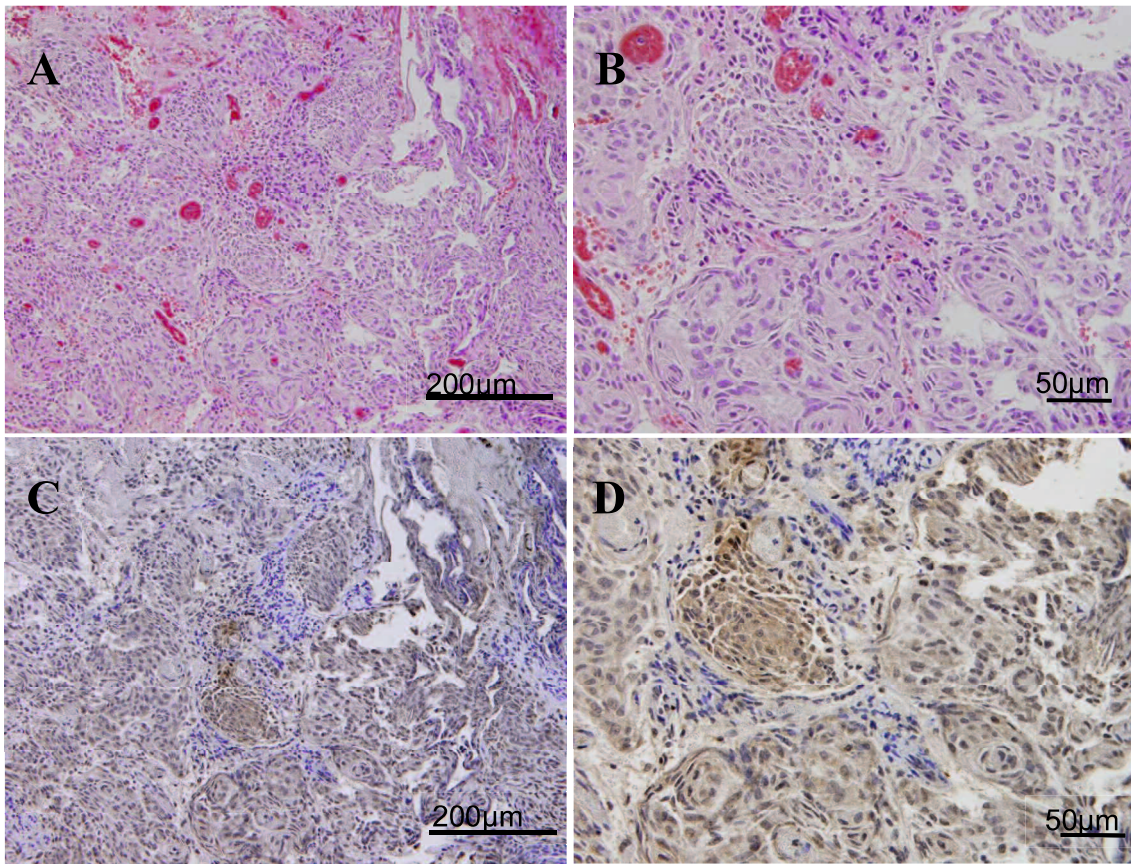


図 2-3 L 型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1) 陽性 (++++) のグレード 2 の髄膜腫のイヌの組織切片。HE 染色 (A, B)、LAT1 免疫染色 (C, D)

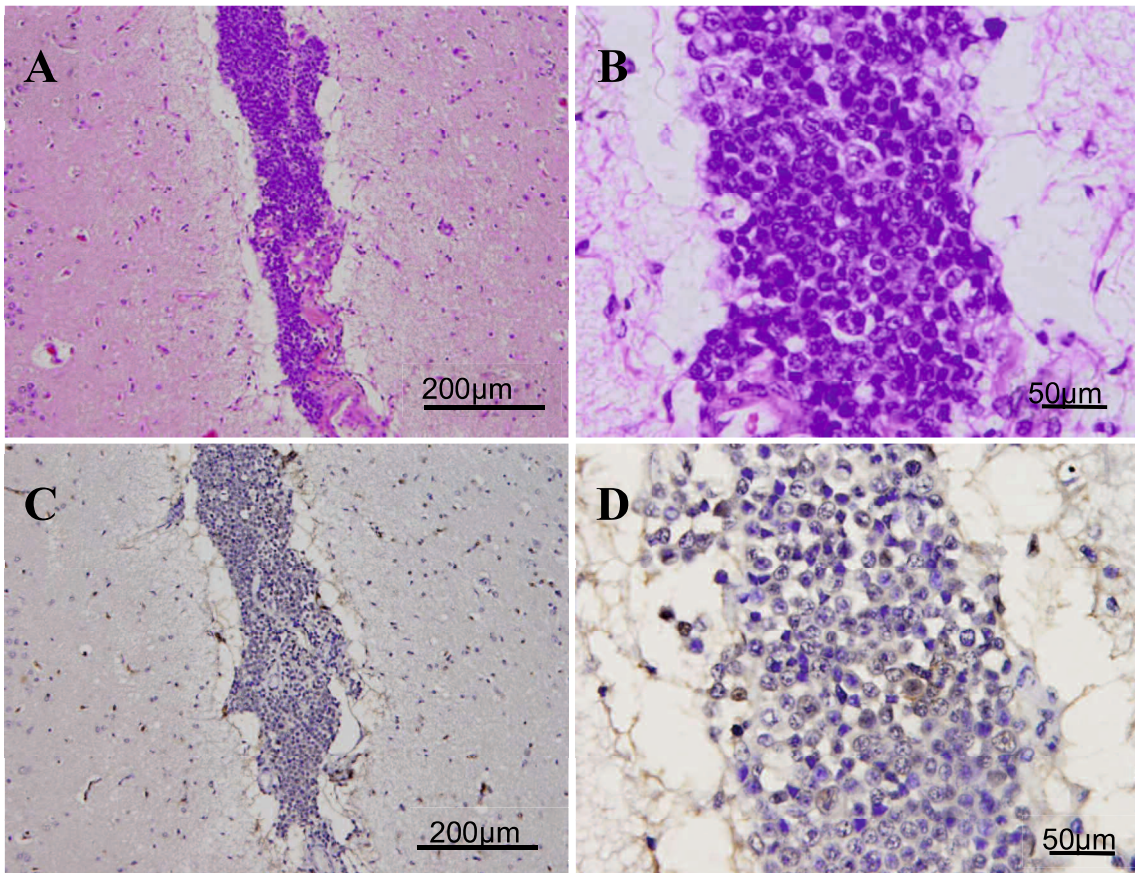


図 2-4 L 型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1) 陽性 (+++) で、鼻腔内腺がんが、
大脳への局所浸潤と脳幹へ転移したイヌの組織切片。HE 染色 (A, B)、LAT1 免疫染色 (C,
D)

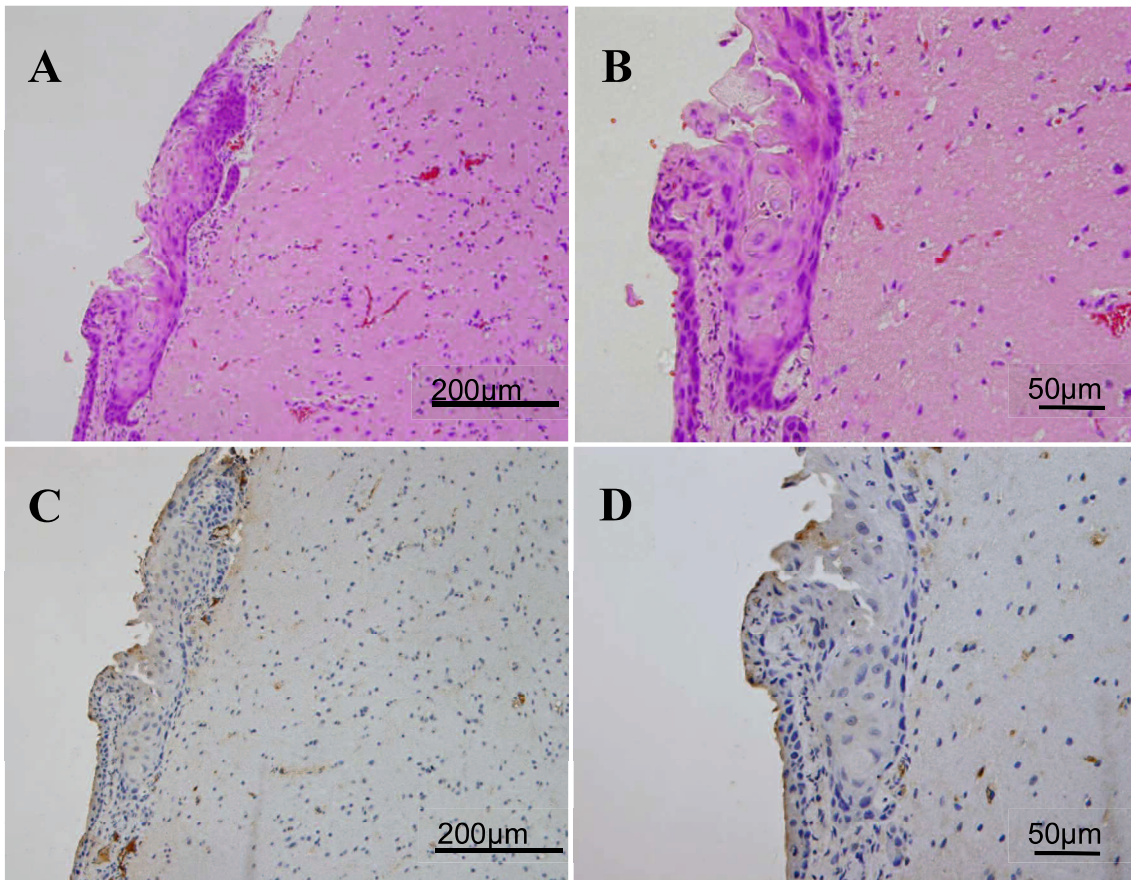


図 2-5 L 型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1) 陽性 (++) の右側頭葉に転移した扁平上皮癌のネコの組織切片。HE 染色 (A, B)、LAT1 免疫染色 (C, D)

2-5 考察

本研究は、イヌおよびネコの原発性および二次性頭蓋内腫瘍における LAT1 の発現を調査した初めての報告である。本研究において、原発性および二次性頭蓋内腫瘍の両方で LAT1 の発現が高い頻度で亢進していたことから、LAT1 の発現亢進が腫瘍の進行や転移に関連している可能性が考えられた。特にイヌの髄膜腫と組織球性肉腫では LAT1 が高発現してい

たことから、特にこれらの腫瘍の進行に LAT1 が重要な役割を担っていると考えられた。

ヒトの転移性脳腫瘍に関する研究では、ほぼ全ての脳転移組織（98.5%）で LAT1 の発現が亢進しており、これは原発巣における発現頻度よりもかなり高いと報告されている（53）。

また、悪性腫瘍における原発巣とその肺転移巣を比較したヒトの研究では、原発巣では大腸がん、乳がん、頭頸部がん、生殖器がん、軟部組織肉腫の LAT1 発現陽性率は、それぞれ 40%、24%、56%、41%、45%であった。一方、転移巣ではそれぞれ 65%、45%、84%、67%、73%であり、転移巣でより高頻度に LAT1 の発現が亢進することが示されている（54）。

本研究では、これらヒトの悪性腫瘍に関する報告と同様に、原発巣の LAT1 陽性率は不明ではあるが、二次性頭蓋内腫瘍の 80.0%という高い頻度で LAT1 の発現亢進が認められた。

Kaira らは、原発巣と比較して転移巣で LAT1 や CD98 の発現量が顕著に増加することを報告している（54）。また、ラットモデルを用いた肝臓への転移性腫瘍の研究では、LAT1 陽性および CD98 陽性群の腫瘍サイズは、LAT1 陰性および CD98 陰性群に比べて有意に大きかったと報告されている（46）。このことから、LAT1 が CD98 と共に腫瘍の成長を促進することが示唆される。従って、LAT1 の機能を阻害することは、多くの種類のがんの治療ターゲットとなりうると考えられる。

イヌでは乳腺腫瘍、肝細胞がん、悪性黒色腫において LAT1 の発現が亢進することが報告されているが、我々の知る限り、ネコの腫瘍性疾患における LAT1 の発現に関する報告はなく、本研究がネコの腫瘍性疾患における LAT1 の発現に関する最初の研究である（49, 55,

56)。イヌの肝細胞がんの腫瘍細胞は、正常な肝細胞の 28 倍もの LAT1 を発現していた (56)。

イヌの乳腺腫瘍 (良性および悪性の両方) では、正常な乳腺組織と比較して LAT1 の発現が 20 倍増加していた (49)。さらに、血管浸潤を有する乳腺腫瘍では、浸潤のない腫瘍と比較して LAT1 の発現が上昇していた (49)。また、悪性黒色腫における LAT1 の発現量は、正常組織と比較して有意に高かった (55)。さらに、遠隔転移のある悪性黒色腫は、遠隔転移のないものに比べて LAT1 の発現量が高いことが報告されている (55)。ヒトの神経膠腫では、悪性度が高いほど LAT1 の発現量が増加する (57)。これらの知見から、LAT1 は良性腫瘍と悪性腫瘍の両方で発現が亢進するが、悪性腫瘍で局所浸潤や遠隔転移があるものはより発現が亢進すると考えられる。

本研究において、イヌの髄膜腫は 3 例が良性、2 例が悪性であり、良性の全例と悪性 1 例で LAT1 が陽性であった。第 1 章で示した脳腫瘍に罹患したイヌの血漿中遊離アミノ酸プロファイルを分析した研究では、悪性髄膜腫の 2 例は LAT1 が陰性であった (52)。本研究の結果と合わせると、悪性髄膜腫の 4 例中 1 例のみが LAT1 陽性で、良性では 3 例全てが LAT1 陽性であった。これらの結果から、イヌの髄膜腫では良性の方が LAT1 の発現が亢進しており、過去の知見とは異なる結果となった。この理由として、イヌの正常脳組織では LAT1 の発現が亢進しており、髄膜腫では down-regulation する可能性や LAT1 が腫瘍の悪性度だけでなく増殖能を反映している可能性が考えられる。また、症例数が少ないことも理由の一つとして考えられる。今後は更に症例を集積し、統計解析を行うことで、LAT1 の発

現亢進と悪性度との関連が明らかになると考えられる。

LAT1 はがん細胞の増殖や、がんの進行に重要な役割を果たすことから、医学領域ではがんの診断マーカーや治療標的としての利用が期待されており、近年では LAT1 を標的とした抗腫瘍薬がいくつか開発されている (58)。LAT1 を薬理的に阻害することや、遺伝子を切断することで、がん細胞へのロイシンの輸送が阻害され、がん細胞の増殖が抑制されることが報告されている (17)。LAT1 阻害剤は従来の抗がん剤とは作用機序が異なるため、従来の抗がん剤との併用が可能である。また、従来の治療法に反応しないがん患者に対しては、LAT1 阻害剤単独での効果も期待できる。さらに、LAT1 阻害剤と従来の抗がん剤を併用することで、従来の抗がん剤の使用量を減らすことができ、副作用を軽減できる可能性がある。イヌの悪性黒色腫に関する研究では、2-アミノ-2-ノルボルナンカルボン酸 (BCH) やメルファラン (LPM) などの選択的 LAT1 阻害剤はがん細胞の増殖とアミノ酸取り込みを阻害し、BCH と LPM の腫瘍増殖抑制効果はカルボプラチン、シクロホスファミド、ダカルバジンなどの従来の抗がん剤と併用すると増強することが報告されている (55)。医学領域においても、LAT1 阻害剤とシスプラチン、ゲムシタビン、5-FU、ゲフィチニブ、ビカルタミドなどの従来の抗がん剤との相乗効果が報告されている (19, 59-61)。

本研究において、イヌおよびネコの原因性および二次性頭蓋内腫瘍の両方で LAT1 の発現が亢進していたことから、LAT1 は腫瘍の増殖に重要な役割を果たしていることが示唆された。このことから、LAT1 はイヌおよびネコの原因性および二次性頭蓋内腫瘍の治療におけ

る分子標的となりうる可能性があり、LAT1 阻害剤はイヌおよびネコの頭蓋内腫瘍の治療選択肢となりうることが期待される。

2-6 結語

本研究では、イヌおよびネコの原発性および二次性頭蓋内腫瘍組織における LAT1 の発現について調査した。イヌおよびネコの原発性および二次性頭蓋内腫瘍組織の大部分で LAT1 の発現が亢進していたことから、LAT1 の免疫組織化学染色は予後指標や治療ターゲットとなりうる可能性が示唆された。

今後の研究では、より多くの症例を集積し、腫瘍の種類別や悪性・良性での LAT1 発現率の違いを調査することが望まれる。

総括

獣医療において脳腫瘍は MRI で診断するのが一般的であるが、保有施設が限られていることや全身麻酔が必要であることから簡便に検査を行うことができない。また、MRI で脳腫瘍と診断された段階で腫瘍がかなり進行した状態であることも少なくない。そのため、脳腫瘍の早期発見のために簡便かつ非侵襲的なバイオマーカーの確立が求められている。

我々は本研究において、脳腫瘍に罹患したイヌの PFAA プロファイルの分析を行った。また、PFAA プロファイルが変化する原因として L 型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1) に着目し、イヌおよびネコの頭蓋内腫瘍組織における LAT1 の発現特性を調査した。

第 1 章では、医学領域において血漿中遊離アミノ酸 (PFAA) プロファイルが、各種がんや循環器疾患など特定の疾患で変化するとされていることから、脳腫瘍のイヌ、特発性てんかんのイヌおよび健常犬の PFAA プロファイルを測定し、3 群間で比較した。研究には、脳腫瘍のイヌ 12 頭 (神経膠腫 6 頭、髄膜腫 4 頭、乳腺がんの脳転移 2 頭)、特発性てんかんのイヌ 8 頭および健常犬 16 頭の血漿を用い、必須アミノ酸および非必須アミノ酸の合計 20 種類の血漿中濃度を測定した。

その結果、脳腫瘍のイヌでは、健常犬と比較して、Ala、Pro、Ile が有意に増加していた。また、髄膜腫と神経膠腫との比較では、髄膜腫と比較して神経膠腫のイヌにおいて Asn と Gln が有意に増加していた。特発性てんかんのイヌでは、脳腫瘍および健常犬と比較して、

いずれのアミノ酸濃度も有意差は認められなかった。

この結果より、末梢血中の PFAA プロファイルは、脳腫瘍の代謝を反映していると考えられた。これは、ヒトにおいて脳腫瘍の代謝には、特定のアミノ酸が関与しているという知見と一致する結果であった。また、脳腫瘍を疑診するイヌの PFAA プロファイルの測定が、脳腫瘍の早期発見のための有用なバイオマーカーとなりうると考えられた。また、髄膜腫と神経膠腫のイヌで、PFAA プロファイルが異なったことから、PFAA プロファイルが腫瘍の種類やグレードとも関連していると考えられた。

第2章では、多くの悪性腫瘍で発現が亢進し、発現量が腫瘍の悪性度や予後と相関すると言われている LAT1 に着目し、原発性および二次性（転移性）頭蓋内腫瘍に罹患したイヌとネコの腫瘍組織における LAT1 の発現特性を調査した。研究にはイヌ 14 頭とネコ 3 頭から採取された腫瘍組織を用い、LAT1 の免疫組織化学染色を行なった。イヌでは髄膜腫 5 例、組織球性肉腫 3 例およびリンパ腫、膠芽腫、下垂体腺腫、鼻腔内腺がん、鼻腔内移行上皮がん、骨髄性白血病が各 1 例ずつで、このうち 10 例が原発性頭蓋内腫瘍で、4 例が二次性頭蓋内腫瘍であった。ネコでは髄膜腫、リンパ腫、扁平上皮がんが各 1 例ずつで、このうち 2 例が原発性頭蓋内腫瘍で、1 例が二次性頭蓋内腫瘍であった。

その結果、LAT1 はイヌ 14 例中 12 例で陽性、ネコでは 3 例全例で LAT1 が陽性であった。LAT1 が陰性だった 2 例は悪性髄膜腫とリンパ腫であった。

これらの結果より、イヌおよびネコにおける原発性・二次性頭蓋内腫瘍の大部分で LAT1 の発現が亢進していたことから、LAT1 の発現亢進が腫瘍の進行や転移に関連している可能性が示唆された。

第 1 章と第 2 章の研究結果を併せると、イヌの髄膜腫では悪性より良性の方が LAT1 の発現が亢進しており、過去の知見とは異なる結果となった。この理由として、イヌの正常脳組織では LAT1 の発現が亢進しており、髄膜腫では down-regulation する可能性や LAT1 が腫瘍の悪性度だけでなく増殖能を反映している可能性などが考えられた。

この結果より、LAT1 は腫瘍の増殖に重要な役割を果たしていると考えられることから、イヌとネコの原発性および二次性頭蓋内腫瘍の治療標的となりうると考えられる。今後、LAT1 阻害剤が、イヌとネコの頭蓋内腫瘍に対する治療選択肢のひとつとなることが期待される。

本研究では、脳腫瘍に罹患したイヌの末梢血中の PFAA プロファイルの変化およびイヌとネコの頭蓋内腫瘍組織中の LAT1 発現に関して新たな知見を得られたと考えられる。今後、症例を蓄積することで、頭蓋内腫瘍とアミノ酸との関連が更に調査されることが望まれる。

謝辞

本論文を作成するにあたり、熱心かつ丁寧にご指導を賜りました担当教官の鳥取大学農学部共同獣医学科、獣医外科学研究室の岡本芳晴教授に深く感謝いたします。また、サンプル採集にご協力いただきました、京都市 Neuro Vets 動物神経科クリニック院長 中本裕也先生、病理検査を実施いただきました鳥取大学農学部共同獣医学科、獣医病理学研究室の寸田祐嗣准教授および麻布大学生命・環境科学部、臨床検査技術学科、病理学研究室の荻原喜久美教授に深く感謝いたします。

引用文献

1. Inoue, M. and Sugiura, K. 2021. Identifying causes of death of companion dogs in Japan using data from pet cemeteries. *J. Vet. Med. Sci.* **83**: 1039-1043.
2. Webb, J.L., Burns, R.E., Brown, H.M., LeRoy, B.E. and Kosarek, C.E. 2009. Squamous cell carcinoma. *Compend. Contin. Educ. Vet.* **31**: E9.
3. Feng, F., Tian, Y., Xu, G., Liu, Z., Liu, S., Zheng, G., Guo, M., Lian, X., Fan, D. and Zhang, H. 2017. Diagnostic and prognostic value of CEA, CA19-9, AFP and CA125 for early gastric cancer. *BMC Cancer.* **17**: 737.
4. Gao, Y., Wang, J., Zhou, Y., Sheng, S., Qian, S.Y. and Huo, X. 2018. Evaluation of serum CEA, CA19-9, CA72-4, CA125 and ferritin as diagnostic markers and factors of clinical parameters for colorectal cancer. *Sci. Rep.* **8**: 2732.
5. Park, S.J., Jang, J.Y., Jeong, S.W., Cho, Y.K., Lee, S.H., Kim, S.G., Cha, S.W., Kim, Y.S., Cho, Y.D., Kim, H.S., Kim, B.S., Park, S. and Bang, H.I. 2017. Usefulness of AFP, AFP-L3, and PIVKA-II, and their combinations in diagnosing hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore).* **96**: e5811.
6. von Euler, H., Einarsson, R., Olsson, U., Lagerstedt, A.S. and Eriksson, S. 2004. Serum thymidine kinase activity in dogs with malignant lymphoma: a potent marker for prognosis and monitoring the disease. *J. Vet. Intern. Med.* **18**: 696-702.

7. Proenza, A.M., Oliver, J., Palou, A. and Roca, P. 2003. Breast and lung cancer are associated with a decrease in blood cell amino acid content. *J. Nutr. Biochem.* **14**: 133-138.
8. Fukutake, N., Ueno, M., Hiraoka, N., Shimada, K., Shiraishi, K., Saruki, N., Ito, T., Yamakado, M., Ono, N., Imaizumi, A., Kikuchi, S., Yamamoto, H. and Katayama, K. 2015. A novel multivariate index for pancreatic cancer detection based on the plasma free amino acid profile. *PLoS One.* **10**: e0132223.
9. Ichinoe, M., Mikami, T., Yoshida, T., Igawa, I., Tsuruta, T., Nakada, N., Anzai, N., Suzuki, Y., Endou, H. and Okayasu, I. 2011. High expression of L-type amino-acid transporter 1 (LAT1) in gastric carcinomas: comparison with non-cancerous lesions. *Pathol. Int.* **61**: 281–289.
10. Kaira, K., Oriuchi, N., Imai, H., Shimizu, K., Yanagitani, N., Sunaga, N., Hisada, T., Tanaka, S., Ishizuka, T., Kanai, Y., Endou, H., Nakajima, T. and Mori, M. 2008. Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 expression in resectable stage I-III nonsmall cell lung cancer. *Bri. J. Cancer.* **98**: 742–748.
11. Kaira, K., Sunose, Y., Arakawa, K., Ogawa, T., Sunaga, N., Shimizu, K., Tominaga, H., Oriuchi, N., Itoh, H., Nagamori, S., Kanai, Y., Segawa, A., Furuya, M., Mori, M., Oyama, T. and Takeyoshi, I. 2012. Prognostic significance of L-type amino-acid transporter 1 expression in surgically resected pancreatic cancer. *Br. J. Cancer.* **107**: 632–638.
12. Nakanishi, K., Matsuo, H., Kanai, Y., Endou, H., Hiroi, S., Tominaga, S., Mukai, M., Ikeda, E.,

- Ozeki, Y., Aida, S. and Kawai, T. 2006. LAT1 expression in normal lung and in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Virchows Arch.* **448**: 142–150.
13. Satou, M., Wang, J., Nakano-Tateno, T., Teramachi, M., Suzuki, T., Hayashi, K., Lamothe, S., Hao, Y., Kurata, H., Sugimoto, H., Chik, C. and Tateno, T. L-type amino acid transporter 1, LAT1, in growth hormone-producing pituitary tumor cells. 2020. *Mol. Cell Endocrinol.* **515**: 110868.
14. Shennan, D.B., Thomson, J., Barber, M.C. and Travers, M.T. 2003. Functional and molecular characteristics of system L in human breast cancer cells. *Biochimica. et biophysica. Acta.* **1611**: 81–90.
15. Xu, M., Sakamoto, S., Matsushima, J., Kimura, T., Ueda, T., Mizokami, A., Kanai, Y. and Ichikawa, T. 2016. Up-regulation of LAT1 during antiandrogen therapy contributes to progression in prostate cancer cells. *J. Urol.* **195**: 1588–1597.
16. Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, Ki., Uchino, H., Takeda, E. and Endou, H. 1998. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.* **273**: 23629–23632.
17. Prasad, P.D., Wang, H., Huang, W., Kekuda, R., Rajan, D.P., Leibach, F.H. and Ganapathy, V. 1999. Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**: 283–288.
18. Yanagida, O., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Segawa, H., Nii, T., Cha, S.H., Matsuo,

- H., Fukushima, J., Fukasawa, Y., Tani, Y., Taketani, Y., Uchino, H., Kim, J.Y., Inatomi, J., Okayasu, I., Miyamoto, K., Takeda, E., Goya, T. and Endou, H. 2001. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochimica. et biophysica. acta.* **1514**: 291–302.
19. Okunushi, K., Furihata, T., Morio, H., Muto, Y., Higuchi, K., Kaneko, M., Otsuka, Y., Ohno, Y., Watanabe, Y., Reien, Y., Nakagawa, K., Sakamoto, S., Wakashin, H., Shimojo, N. and Anzai, N. 2020. JPH203, a newly developed anti-cancer drug, shows a preincubation inhibitory effect on L-type amino acid transporter 1 function. *J. Pharmacol. Sci.* **144**: 16–22.
20. Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K. and Wood, J.L.N. 2002. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J. Small. Anim. Pract.* **43**: 240–246.
21. Van Meervenne, S., Verhoeven, P.S., De Vos, J., Gielen, I.M.V.L., Polis, I. and Van Ham, L.M.L. 2014. Comparison between symptomatic treatment and lomustine supplementation in 71 dogs with intracranial, space-occupying lesions. *Vet. Comp. Oncol.* **12**: 67–77.
22. Tamura, S., Tamura, Y., Ohoka, A., Hasegawa, T. and Uchida, K. 2007. A canine case of skull base meningioma treated with hydroxyurea. *J. Vet. Med. Sci.* **69**: 1313-1315.
23. Hidalgo Crespo, E., Farré Mariné, A., Pumarola I Battle, M., Borrego Massó, J.F. and Luján Feliu-Pascual, A. 2022. Survival time after surgical debulking and temozolomide adjuvant

- chemotherapy in canine intracranial gliomas. *Vet. Sci.* **9**: 427.
24. Song, R.B., Vite, C.H., Bradley, C.W. and Cross, J.R. 2013. Postmortem evaluation of 435 cases of intracranial neoplasia in dogs and relationship of neoplasm with breed, age, and body weight. *J. Vet. Intern. Med.* **27**: 1143–1152.
25. Vandeveld, M. 1984. Brain tumors in domestic animals; Proceedings of a conference on brain tumors in man and animals; Research Triangle Park, NC.
26. Heidner, G.L., Kornegay, J.N., Page, R.L., Dodge, R.K. and Thrall, D.E. 1991. Analysis of survival in a retrospective study of 86 dogs with brain tumors. *J. Vet. Intern. Med.* **5**: 219–226.
27. Snyder, J.M., Shofer, F.S., Van Winkle, T.J. and Massicotte, C. 2006. Canine intracranial primary neoplasia: 173 cases (1986–2003). *J. Vet. Intern. Med.* **20**: 669–675.
28. LeCouteur, R.A. 1999. Current concepts in the diagnosis and treatment of brain tumours in dogs and cats. *J. Small Anim. Pract.* **40**: 411–416.
29. Azuma, K., Osaki, T., Tsuka, T., Imagawa, T., Minami, S. and Okamoto, Y. 2012. Plasma free amino acid profiles of canine mammary gland tumors. *J. Vet. Sci.* **13**: 433–436.
30. Tamai, R., Furuya, M., Hatoya, S., Akiyoshi, H., Yamamoto, R., Komori, Y., Yokoi, S., Tani, K., Hirano, Y., Komori, M. and Takenaka, S. 2014. Profiling of serum metabolites in canine lymphoma using gas chromatography mass spectrometry. *J. Vet. Med. Sci.* **76**: 1513–1518.
31. Kawabe, M., Baba, Y., Tamai, R., Yamamoto, R., Komori, M., Mori, T. and Takenaka, S. 2015.

- Profiling of plasma metabolites in canine oral melanoma using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Vet. Med. Sci.* **77**: 1025–1028.
32. Hasegawa, T., Sumita, M., Horitani, Y., Tamai, R., Tanaka, K., Komori, M. and Takenaka, S. 2014. Gas chromatography-mass spectrometry-based metabolic profiling of cerebrospinal fluid from epileptic dogs. *J. Vet. Med. Sci.* **76**: 517–522.
33. Yamasaki, F., Kurisu, K., Kajiwara, Y., Watanabe, Y., Takayasu, T., Akiyama, Y., Saito, T., Hanaya, R. and Sugiyama, K. 2011. Magnetic resonance spectroscopic detection of lactate is predictive of a poor prognosis in patients with diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro-oncol.* **13**: 791–801.
34. Bianchi, L., de Micheli, E., Bricolo, A., Ballini, C., Fattori, M., Venturi, C., Pedata, F., Tipton, K.F. and della Corte, L. 2004. Extracellular levels of amino acids and choline in human high grade gliomas: An intraoperative microdialysis study. *Neurochem. Res.* **29**: 325–334.
35. Piek, J., Adelt, T., Huse, K. and Bock, W.J. 1987. Cerebrospinal fluid and plasma aminograms in patients with primary and secondary tumors of the CNS. *Infusionsther. Klin. Ernahr.* **14**: 73–77.
36. Azuma, K., Hirao, Y., Hayakawa, Y., Murahata, Y., Osaki, T., Tsuka, T., Imagawa, T., Okamoto, Y. and Ito, N. 2016. Application of pre-column labeling liquid chromatography for canine plasma-free amino acid analysis. *Metabolites.* **6**: 3.
37. Ochiai, H., Morishita, T., Onda, K., Sugiyama, H. and Maruo, T. 2012. Canine Lat1: Molecular structure, distribution and its expression in cancer samples. *J. Vet. Med. Sci.* **74**: 917–922.

38. Oghihara, K., Onda, K., Sato, R., Naya, Y. and Ochiai, H. 2015. Evidence of LAT1 expression in canine caput epididymis. *J. Vet. Med. Sci.* **77**: 85–88.
39. Shi, S.R., Key, M.E. and Kalra, K.L. 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* **39**: 741–748.
40. Locasale, J.W., Melman, T., Song, S., Yang, X., Swanson, K.D., Cantley, L.C., Wong, E.T. and Asara, J.M. 2012. Metabolomics of human cerebrospinal fluid identifies signatures of malignant glioma. *Mol Cell Proteomics.* **11**: 014688.
41. Demir, M.K., Iplikcioglu, A.C., Dincer, A., Arslan, M. and Sav, A. 2006. Single voxel proton MR spectroscopy findings of typical and atypical intracranial meningiomas. *Eur. J. Radiol.* **60**: 48–55.
42. Danjo, S., Ishihara, Y., Watanabe, M., Nakamura, Y. and Itoh, K. 2013. Pentylentetrazole-induced loss of blood-brain barrier integrity involves excess nitric oxide generation by neuronal nitric oxide synthase. *Brain Res.* **1530**: 44–53.
43. Righi, V., Andronesi, O.C., Mintzopoulos, D., Black, P.M. and Tzika, A.A. 2010. High-resolution magic angle spinning magnetic resonance spectroscopy detects glycine as a biomarker in brain tumors. *Int. J. Oncol.* **36**: 301–306.
44. Christensen, H. N. 1990. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.* **70**: 43–77.

45. Kanai, Y. and Endou, H. 2001. Heterodimeric amino acid transporters: molecular biology and pathological and pharmacological relevance. *Curr. Drug Metab.* **2**: 339–354.
46. Ohkame, H., Masuda, H., Ishii, Y. and Kanai, Y. 2001. Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (4F2hc) in liver tumor lesions of rat models. *J. Surg. Oncol.* **78**: 265–272.
47. Hirayama, A., Kami, K., Sugimoto, M., Sugawara, M., Toki, N., Onozuka, H., Kinoshita, T., Saito, N., Ochiai, A., Tomita, M., Esumi, H. and Soga, T. 2009. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res.* **69**: 4918–4925.
48. Bioparadigms SLC TABLES. Available online: <http://slc.bioparadigms.org/>
49. Fukumoto, S., Hanazono, K., Komatsu, T., Iwano, H., Kadosawa, T. and Uchide, T. 2013. L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in canine mammary gland tumors. *J. Vet. Med. Sci.* **75**: 431–437.
50. McGivan, J.D. and Pastor-Anglada, M. 1994. Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. *Biochem. J.* **299**: 321–334.
51. Higuchi, K., Sakamoto, S., Ando, K., Maimaiti, M., Takeshita, N., Okunushi, K., Reien, Y., Imamura, Y., Sazuka, T., Nakamura, K., Matsushima, J., Furihata, T., Ikehara, Y., Ichikawa, T. and Anzai, N. 2019. Characterization of the expression of LAT1 as a prognostic indicator and a

- therapeutic target in renal cell carcinoma. *Sci Rep.* **9**:16776.
52. Utsugi, S., Azuma, K., Osaki, T., Murahata, Y., Tsuka, T., Ito, N., Imagawa, T. and Okamoto, Y. 2017. Analysis of plasma free amino acid profiles in canine brain tumors. *Biomed. Rep.* **6**: 195–200.
53. Papin-Michault, C., Bonnetaud, C., Dufour, M., Almairac, F., Coutts, M., Patouraux, S., Virolle, T., Darcourt, J. and Burel-Vandenbos, F. 2016. Study of LAT1 expression in brain metastases: towards a better understanding of the results of positron emission tomography using amino acid tracers. *PLoS One.* **11**: e0157139.
54. Kaira, K., Oriuchi, N., Imai, H., Shimizu, K., Yanagitani, N., Sunaga, N., Hisada, T., Tanaka, S., Ishizuka, T., Kanai, Y., Endou, H., Nakajima, T. and Mori, M. 2008. L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms. *Cancer Sci.* **99**: 2380–2386.
55. Fukumoto, S., Hanazono, K., Fu, D.R., Endo, Y., Kadosawa, T., Iwano, H. and Uchide, T. 2013. A new treatment for human malignant melanoma targeting L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a pilot study in a canine model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **439**: 103–108.
56. Ogihara, K., Naya, Y., Sato, R., Onda, K. and Ochiai, H. 2015. Analysis of L-type amino acid transporter in canine hepatocellular carcinoma. *J. Vet. Med. Sci.* **77**: 527–534.
57. Kobayashi, K., Ohnishi, A., Promsuk, J., Shimizu, S., Kanai, Y., Shiokawa, Y. and Nagane, M.

2008. Enhanced tumor growth elicited by L-type amino acid transporter 1 in human malignant glioma cells. *Neurosurg.* **62**: 493–503.
58. Kanai, Y. 2021. Amino acid transporter LAT1 (SLC7A5) as a molecular target for cancer diagnosis and therapeutics. *Pharmacol. Ther.* 107964.
59. Imai, H., Kaira, K., Oriuchi, N., Shimizu, K., Tominaga, H., Yanagitani, N., Sunaga, N., Ishizuka, T., Nagamori, S., Promchan, K., Nakajima, T., Yamamoto, N., Mori, M. and Kanai, Y. 2010. Inhibition of L-type amino acid transporter 1 has antitumor activity in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* **30**: 4819–4828.
60. Kaira, K., Sunose, Y., Ohshima, Y., Ishioka, N.S., Arakawa, K., Ogawa, T., Sunaga, N., Shimizu, K., Tominaga, H., Oriuchi, N., Itoh, H., Nagamori, S., Kanai, Y., Yamaguchi, A., Segawa, A., Ide, M., Mori, M., Oyama, T. and Takeyoshi, I. 2013. Clinical significance of L-type amino acid transporter 1 expression as a prognostic marker and potential of new targeting therapy in biliary tract cancer. *BMC Cancer.* **13**: 482.
61. Yamauchi, K., Sakurai, H., Kimura, T., Wiriyasermkul, P., Nagamori, S., Kanai, Y. and Kohno, N. 2009. System L amino acid transporter inhibitor enhances anti-tumor activity of cisplatin in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Cancer Lett.* **276**: 95–101.

(Summary)

**A study on plasma free amino acid profile in dogs with brain tumors and expression of
L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in canine and feline intracranial tumors**

By

Shinichi UTSUGI

As dogs and cats have become more closely involved in people's lives as companion animals, veterinary medicine has also improved diagnosis and treatment techniques, resulting in improved quality of life and longer life spans for dogs and cats. However, the incidence of malignant tumors has increased as dogs and cats live longer, and malignant tumors are now the second leading cause of death in canines after senility.

In human medicine, various tumor markers are used for early detection of malignant tumors, but in veterinary medicine, useful tumor markers are limited, making early detection of malignant tumors difficult. Therefore, it is necessary to establish a simple and accurate screening test for early detection of malignant tumors and improvement of prognosis.

Recently, in human medicine, measurement of plasma free amino acid (PFAA) profile is expected to be used as a biomarker for early detection of cancer, since PFAA profile shows characteristic changes in certain cancer patients. In veterinary medicine, altered PFAA profiles have been reported in dogs affected by mammary carcinoma, oral melanoma and lymphoma, but there are no reports investigating the association between canine brain tumors and PFAA profiles. Therefore, in this study, we first analyzed the PFAA profiles of dogs affected by brain tumors.

In Chapter 1, the PFAA profiles of dogs with brain tumors, dogs with idiopathic epilepsy, and normal dogs were measured and compared among the three groups. In this study, plasma concentrations of a total of 20 essential and nonessential amino acids were measured in 12 dogs with brain tumors (6 gliomas, 4 meningiomas, and 2 brain metastases of mammary carcinoma), 8 dogs with idiopathic epilepsy and 16 healthy dogs. The results showed that Ala, Pro, and Ile were significantly increased in dogs with brain tumors compared to healthy dogs. In a comparison between meningiomas and gliomas, Asn and Gln were significantly increased in dogs with gliomas compared to meningiomas. There were no significant differences in any of the amino acid concentrations in dogs with idiopathic epilepsy compared to those with brain tumors and healthy dogs. The results suggest that PFAA profiles in peripheral blood may reflect the metabolism of brain tumors, and that measurement of PFAA profiles in dogs

with suspected brain tumors may be a useful biomarker for the early detection of brain tumors.

In addition, the PFAA profiles differed between meningiomas and gliomas, suggesting that PFAA profiles are also associated with tumor type and grade.

We then focused on L-type amino acid transporter 1 (LAT1) as the cause of the altered PFAA profile in dogs with brain tumors and investigated the expression characteristics of LAT1 in canine and feline intracranial tumor tissue.

In Chapter 2, we performed immunohistochemical staining for LAT1 in tumor tissue from dogs and cats affected with primary and secondary (metastatic) intracranial tumors. Tumor tissue from 14 dogs and 3 cats was used in this study. In the dogs, there were 5 meningiomas, 3 histiocytic sarcomas and 1 each of lymphoma, glioblastoma, pituitary adenoma, intranasal adenocarcinoma, intranasal transitional epithelial carcinoma, and myeloid leukemia, of which 10 were primary intracranial tumors and 4 were secondary intracranial tumors. In cats, there was one case each of meningioma, lymphoma, and squamous cell carcinoma, of which two were primary intracranial tumors and one was a secondary intracranial tumor. The results showed that LAT1 was positive in 12 of 14 canine cases and in all three feline cases; the two cases that were negative for LAT1 were malignant meningiomas and lymphomas in dogs.

These results indicate that LAT1 expression was upregulated in the majority of primary and secondary intracranial tumors in dogs and cats, suggesting that increased LAT1 expression

may be associated with tumor progression and metastasis. LAT1 is also a potential therapeutic target for primary and secondary intracranial tumors in dogs and cats, and it is expected that LAT1 inhibitors will become a therapeutic option for intracranial tumors in dogs and cats in the future.

This study provides new insights into changes in PFAA profiles in the peripheral blood of dogs with brain tumors and LAT1 expression in canine and feline intracranial tumor tissue. It is expected that the association between intracranial tumors and amino acid changes will be further investigated with the accumulation of more cases in the future.