

学 位 論 文 要 旨

氏名 加計 悟

題 目：異種動物を用いたトランスレーショナルリサーチの有用性と発展性

論文要旨：

【背景・目的】

近年の飼いイヌの高齢化に伴い腫瘍性疾患の発症が増加しており、中でも乳腺腫瘍は雌イヌに発生する腫瘍のおよそ半分を占めている。ヒトにおいても乳癌は発生率の高い腫瘍であり、日本人女性では腫瘍の中で最も罹患率が高く、死亡原因としても上位となっている。そのためヒト乳癌の新規治療薬開発は緊喫の課題であるが、動物福祉やヒトへの外挿が難しい実験動物利用の問題等から迅速な開発に至っていない。イヌとヒトの腫瘍の多くは、表現型や臨床像の点で高い類似性を持っている。特に、イヌの自然発症乳腺腫瘍は臨床プロファイルや分子的側面においてヒト乳癌に類似していることから、薬効および毒性試験におけるトランスレーショナルリサーチのモデルになり得る。腫瘍治療薬としての分子標的薬の開発は、タンパク質のリン酸化機構にフォーカスされており、その多くがチロシンキナーゼ阻害薬などのキナーゼを標的とした薬剤であり、ホスファターゼをターゲットとした創薬は未だ途上である。プロテインホスファターゼ 2A (PP2A) は、細胞内の脱リン酸化活性の約 90%を担う主要なホスファターゼであり、重要な腫瘍抑制因子として働いている。細胞の腫瘍化や悪性化の要因の一つに PP2A 活性の抑制が考えられることから、SET などの内在性 PP2A 阻害因子をターゲットとする薬剤は新たな治療薬の開発につながる可能性がある。これまで、ヒトの乳癌を含む多くの腫瘍で PP2A の発現低下や SET タンパク質の発現上昇による PP2A 活性の低下が報告されているが、イヌの乳腺腫瘍における SET の役割はまだ明らかとなっていない。

一方、動物福祉の観点等からイヌやサルの実験動物としての利用が厳しくなっている中で、最近注目されているのがミニブタよりも小型で簡易に安定的に維持管理でき、さらに解剖学的・生理学的特徴もヒトと類似しているマイクロミニピッグである。腫瘍性疾患と共にヒトの死亡原因として上位を占めているのが循環器系疾患であり、日本においてもその発症原因となる動脈硬化症のリスクが増加している。動脈硬化の初期段階は無症状で進行するため、薬物の治療効果をヒトで評価・研究することは困難であり、進行初期における治療の有効性を評価するためには動物モデルが不可欠とされる。そこで、脂質代謝においてもヒトと同様の高 LDL コレステロール動物であるマイクロミニピッグが、創薬や安全性評価の研究でフォーカスされている。動脈硬化にともなう炎症は、心血管系疾患や脳血管系疾患を惹起する要因の一つと考えられているが、動脈硬化における炎症と血栓症との関連は十分に解明されていない。また、動脈硬化に関連する炎症誘発因子の一つに、傷害や感染に伴って活性化したマクロファージから分泌されるタンパク質である High Mobility Group Box-1 (HMGB1) があるが、血栓形成との関

係は明らかとなっていない。

このような背景のもと、本研究ではヒト乳癌モデルとしてイヌ乳腺腫瘍を用い、イヌ乳腺腫瘍における腫瘍形成に関する SET の役割と SET 発現抑制による既存療法への効果の検証を行った。また、ヒト動脈硬化モデルとしてマイクロミニピッグ動脈硬化モデルを用い、コレステロール誘発性マイクロミニピッグの血栓傾向と炎症との関連性を評価することで新規動脈硬化モデルの作出を行った。このように、ヒトの三大疾病である腫瘍と心血管疾患の予防と治療につながる基礎研究を実施することで、異種動物におけるトランスレーショナルリサーチの有用性と発展性について検討した。

【結果・考察】

イヌ乳腺腫瘍組織を用いて PP2A 阻害タンパク質である SET 発現を検討したところ、SET の高発現が確認された。またイヌ乳腺腫瘍細胞株では、ヒトと同様に PP2A 活性が抑制され、 β -catenin や NF κ B シグナルなどが増強されて腫瘍形成が促進されることを示した。SET 発現抑制はイヌ乳腺腫瘍細胞の増殖を抑制し、転移巣由来の細胞株ではコロニー形成能が抑制されたこと、加えて SET 標的薬が転移巣由来細胞を死滅させたことから、SET 発現が細胞の腫瘍化と悪性化に関わるとともに、悪性化により SET の腫瘍促進機能が高まっている可能性が示された。また SET 発現抑制が doxorubicin に対して抵抗性を示したことから、イヌ乳腺腫瘍においても doxorubicin の抗がん効果の一部は SET に依存することが示唆された。今後、ヒト乳癌とイヌ乳腺腫瘍において SET を標的とした抗がん戦略が臨床応用されることが期待される。

一方、食餌性コレステロール負荷により動脈硬化を誘発したマイクロミニピッグを用いて、血栓形成と HMGB1 の関連性についてマイクロ流路血栓形成能解析装置 (T-TAS) を用いて検討した結果、ヒトと同様にコレステロール負荷によって血清 HMGB1 濃度が上昇し、さらに HMGB1 値が上昇した血液では血栓形成傾向を示すことが明らかとなった。これらの結果から、初期兆候の現れにくいヒトの動脈硬化の血栓形成を外挿する研究として、T-TAS を用いたマイクロミニピッグ血栓形成評価が有用であることが示唆された。また、早期動脈硬化の検出が可能となるマイクロミニピッグの使用は、動脈硬化症をはじめとする循環器系疾患の病態研究において有用なモデルとなりうることを示された。

現在、ヒト腫瘍の悪性化や予後との関連性が指摘される SET や、動脈硬化につながる炎症や凝固系に対する作用が注目される HMGB1 のように、ヒト疾患の予防や治療のターゲットとなる因子に対して様々な研究が行われている。近年の医療倫理や動物福祉などの社会的な状況を考慮すると、そのアプローチとして活用される動物代替モデルの重要性は高く、本研究で使用したイヌ乳腺腫瘍モデルや動脈硬化マイクロミニピッグモデルは、ヒト医療分野におけるトランスレーショナルリサーチのモデルとして有用であり、その発展において重要な意義があると考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	加計 悟
審 査 委 員	主 査：山口大学 教授 佐藤 晃一
	副 査：鹿児島大学 教授 三浦 直樹
	副 査：山口大学 教授 加納 聖
	副 査：山口大学 教授 谷 健二
	副 査：山口大学 准教授 大瀨 剛
題 目	異種動物を用いたトランスレーショナルリサーチの有用性と発展性
審査結果の要旨： 乳癌は日本人女性で最も罹患率が高く死亡原因としても上位となっている。ヒト乳癌の新規治療薬開発は緊喫の課題であるが、動物福祉やヒトへの外挿が難しい実験動物利用の問題等から迅速な開発に至っていない。一方、イヌの自然発症乳腺腫瘍は臨床プロファイルや分子的側面においてヒト乳癌に類似していることから、トランスレーショナルリサーチのモデルになり得る。新規の腫瘍治療薬としてホスファターゼをターゲットとした創薬は未だ途上であるが、プロテインホスファターゼ 2A (PP2A) は重要な腫瘍抑制因子として働いており、SET などの内在性 PP2A 阻害因子をターゲットとする薬剤は新たな治療薬の開発につながる可能性がある。乳癌を含む多くのヒトの腫瘍で SET タンパク質の発現上昇による PP2A 活性の低下が報告されているが、イヌの乳腺腫瘍における SET の役割はまだ明らかとなっていない。腫瘍性疾患と共にヒトの死亡原因として上位を占めているのが動脈硬化などの循環器系疾患である。しかし動脈硬化の初期段階は無症状で進行するため、薬物の治療効果をヒトで評価・研究することは困難であり、進行初期における治療の有効性を評価するためには動物モデルが不可欠とされる。そこで、脂質代謝においてもヒトと同様の高 LDL コレステロール動物であるマイクロミニピッグが、創薬や安全性評価の研究でフォーカスされている。また動脈硬化に関連する炎症誘発因子の一つに、傷害や感染に伴って活性化したマクロファージから分泌されるタンパク質である High Mobility Group Box-1 (HMGB1) があるが、血栓形成との関係は明らかとなっていない。 このような背景のもと本論文では、ヒト乳癌モデルとしてイヌ乳腺腫瘍を用い、イヌ乳腺腫瘍における腫瘍形成に関する SET の役割と、SET 発現抑制による既存療法への効果の検証を行った。また、ヒト動脈硬化モデルとしてマイクロミニピッグ動脈硬化モデルを用い、コレス	

(別紙様式第 10 号)

テロール誘発性マイクロミニピッグの血栓傾向と炎症との関連性を評価することで新規動脈硬化モデルの作出を行った。

第二章においては、イヌ乳腺腫瘍組織を用いて PP2A 阻害タンパク質である SET 発現を検討したところ、SET の高発現が確認された。またイヌ乳腺腫瘍細胞株では、ヒトと同様に PP2A 活性が抑制され、 β -catenin や NF κ B シグナルなどが増強されて腫瘍形成が促進されることを示した。SET 発現抑制はイヌ乳腺腫瘍細胞の増殖を抑制し、転移巣由来の細胞株ではコロニー形成能が抑制されたこと、加えて SET 標的薬が転移巣由来細胞を死滅させたことから、SET 発現が細胞の腫瘍化と悪性化に関わるとともに、悪性化により SET の腫瘍促進機能が高まっている可能性が示された。また、SET 発現抑制が doxorubicin に対して抵抗性を示したことから、イヌ乳腺腫瘍において doxorubicin の抗がん効果の一部は SET に依存することが示唆された。今後、ヒト乳癌とイヌ乳腺腫瘍において SET を標的とした抗がん戦略が臨床応用されることが期待される。第三章では、食餌性コレステロール負荷により動脈硬化を誘発したマイクロミニピッグを用いて、血栓形成と HMGB1 の関連性についてマイクロ流路血栓形成能解析装置 (T-TAS) を用いて検討した結果、ヒトと同様にコレステロール負荷によって血清 HMGB1 濃度が上昇し、さらに HMGB1 値が上昇した血液では血栓形成傾向を示すことが明らかとなった。これらの結果から、初期兆候の現れにくいヒトの動脈硬化の血栓形成を外挿する研究として、T-TAS を用いたマイクロミニピッグ血栓形成評価が有用であることが示唆された。また、早期動脈硬化の検出が可能となるマイクロミニピッグの使用は、動脈硬化症をはじめとする循環器系疾患の病態研究において有用なモデルとなりうることを示された。

近年、ヒト腫瘍の悪性化や予後との関連性が指摘される SET や、動脈硬化につながる炎症や凝固系に対する作用が注目される HMGB1 のように、ヒト疾患の予防や治療のターゲットとなる因子に対して様々な研究が行われている。医療倫理や動物福祉などの社会的な状況を考慮すると、そのアプローチとして活用される動物代替モデルの重要性は高く、本研究で使用したイヌ乳腺腫瘍モデルや動脈硬化マイクロミニピッグモデルは、ヒト医療分野における異種動物を用いたトランスレーショナルリサーチのモデルとして有用であり、その発展において重要な意義があると考えられる。

以上により本論文は、博士 (獣医学) の学位論文にふさわしい価値があると認める。