

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

山口大学大学院共同獣医学研究科

加計 悟

2023年9月

目次

第1章 緒言	1
1-1 腫瘍性疾患とトランスレーショナルリサーチ	1
1-1-1 イヌ腫瘍性疾患を用いた研究の有用性	1
1-1-2 がんにおける内在性 PP2A 阻害因子 SET の役割	2
1-2 マイクロミニピッグを用いた研究の有用性	3
1-3 本研究の目的	6
第2章 イヌ乳腺腫瘍における SET/I2PP2A の役割	7
第1節 背景および目的	7
第2節 実験材料および方法	9
2-2-1 イヌ乳腺腫瘍組織	9
2-2-2 細胞培養	11
2-2-3 使用抗体	11
2-2-4 レンチウイルスを用いた遺伝子導入	13
2-2-5 タンパク質発現量の定量法	14
2-2-6 細胞増殖および細胞生存率の解析	15
2-2-7 倍加時間測定法	15
2-2-8 コロニー形成試験	16
2-2-9 ソフトアガーコロニー形成試験	16
2-2-9 イヌ乳腺腫瘍細胞株の異種移植	16
2-2-10 PP2A 活性測定法	17
2-2-11 放射線照射に対する感受性の解析	17
2-2-12 統計処理	17
第3節 実験結果	19

2-3-1	イヌ乳腺腫瘍における SET タンパク質発現	19
2-3-2	SET タンパク質のイヌ乳腺腫瘍細胞の悪性化に関する検討	25
2-3-3	SET 発現抑制が細胞増殖シグナルに与える影響	35
2-3-4	SET 発現抑制が乳腺腫瘍治療に与える影響	45
第 4 節	考察	49
2-4-1	イヌ乳腺腫瘍の悪性度における SET の関与	49
2-4-2	乳腺腫瘍治療における SET の役割	52
2-4-3	結論（総括）	53
第 3 章	高脂血症誘発性マイクロミニピッグ動脈硬化モデルにおける HMGB1 と血栓形成の関連	54
第 1 節	背景および目的	54
第 2 節	実験材料および方法	57
3-2-1	試供動物	57
3-2-2	血液検査	58
第 3 節	実験結果	61
3-3-1	コレステロール負荷による血清 HMGB1 濃度変化	61
3-3-2	コレステロール負荷による白色血栓形成の変化	63
3-3-3	血清中 HMGB1 濃度と白色血栓形成時間との相関	65
第 4 節	考察	67
3-4-1	マイクロミニピッグにおける血清 HMGB1 濃度と血栓の関係 ...	67
3-4-2	動脈硬化性プラーク形成における HMGB1 の役割	68
3-4-4	結論（総括）	68
第 4 章	総合考察	70
	引用文献	72

謝辭	80
----------	----

第1章 緒言

1-1 腫瘍性疾患とトランスレーショナルリサーチ

1-1-1 イヌ腫瘍性疾患を用いた研究の有用性

近年、家庭内飼育犬におけるワクチンの普及や飼育環境の改善などによってイヌの高齢化現象が進んできている。これに伴って腫瘍性疾患の発生も増加しており、イヌの死亡原因となる疾病としては腫瘍が最も高くなっている[1]。イヌでは良性腫瘍と悪性腫瘍の発生割合はほぼ同程度であるが、悪性腫瘍の発生部位としては、体表の皮膚や乳腺が最も多く、腫瘍の種類としては肥満細胞腫、リンパ腫、悪性黒色腫（メラノーマ）、悪性乳腺腫瘍、扁平上皮癌が上位を占めている[2]。これら腫瘍性疾患に使用される抗腫瘍薬には、以前より使用されてきた古典的なものとして、リンパ腫や肥満細胞腫に用いられるシクロフォスファミドなどのアルキル化薬、メラノーマや扁平上皮癌へ適用されるシスプラチンやカルボプラチンなどのプラチナ系製剤、リンパ腫や乳腺腫瘍へ使用されるドキソルビシンなどの抗腫瘍性抗生物質がある。近年では腫瘍細胞に特異的に作用する分子標的薬として、肥満細胞腫やメラノーマに使用されるイマチニブやトセラニブなどのキナーゼ阻害薬の使用も広がりつつある。

イヌの乳腺腫瘍は小動物臨床において一般的に見られる疾患の一つであり、雌イヌに発生する腫瘍のおよそ半分を占める[4],[5]。イヌ乳腺腫瘍へ使用される治療薬としては、前述のドキソルビシンやカルボプラチン、そして内分泌治療薬のタモキシフェンなどがあるが[6]–[8]、分子標的薬であるチロシンキナーゼ阻害薬もその有効性が期待されている。一方、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を占めている[3]。ヒト乳癌においても各種抗悪性腫瘍薬が用いられているが、発生数や死亡者数の減少には至っておらず、新規の薬物開発が急務である。しか

し、新規薬物の開発においては、ヒト乳癌患者の細胞へのアクセスは限られている上に倫理的な問題があること、大規模スクリーニングが遅くなってしまうことなどの欠点があることから迅速な開発に至っていない。また、トランスレーショナルリサーチとしてのマウス腫瘍を用いたアプローチでは、ヒト乳癌の多様性と構造の再現が難しく、腫瘍の病態や治療に対する感受性を正確に解析するには至っていない[18]。

近年、イヌとヒトの腫瘍の多くが遺伝子型、表現型、臨床像、組織像の点で顕著な類似性を持っており、イヌ腫瘍モデルは腫瘍形成と臨床反応の主要な調節因子において、マウス腫瘍モデルよりも優れていることが明らかとなってきている[19]。また、自然発生した乳腺腫瘍をもつイヌモデルは、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、遺伝子組み換え実験動物よりも利点を持っている。そのため、イヌの自然発症乳腺腫瘍は *in vivo* 研究に必要な実験動物の数を減らしながら、創薬における革新的なスクリーニングツールになると同時に、ヒトの臨床試験前に行われる薬効および毒性試験においてのトランスレーショナルリサーチモデルとなり得ると考えられている[18]。

1-1-2 がんにおける内在性 PP2A 阻害因子 SET の役割

一般に、がんの発生や悪性化は正常細胞のがん関連遺伝子に偶発的な突然変異や過剰発現が起こることからはじまり、傷ついた遺伝子から作られる特定のタンパク質の量や機能が異常に増大・増強されて細胞の無秩序な増殖につながっていくと考えられている。一方、腫瘍細胞の増殖において、細胞内タンパク質に引き起こされる可逆的なリン酸化は、腫瘍促進因子や腫瘍抑制因子などの細胞内シグナリングにおいて不可欠な調節機構であり、これはリン酸化酵素（キ

ナーゼ) と脱リン酸化酵素 (ホスファターゼ) によって制御されている。そのため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きた。分子標的薬は腫瘍細胞の特異的な分子を作用点とするため、がん細胞への選択性が高く毒性も軽度であることが期待されるが、現在承認され使用されている低分子性分子標的薬の多くが、チロシンキナーゼ阻害薬やセリン・スレオニ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。

細胞内タンパク質のセリン・スレオニン残基の脱リン酸化を担うプロテインホスファターゼは約 40 種類存在する。この中で Phosphoprotein phosphatase スーパーファミリーに分類され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る[9]。PP2A の機能異常は様々な疾患の発症に関与しており、PP2A は重要な腫瘍抑制因子としても働いている[10]–[12]。細胞のがん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、プロテインホスファターゼに着目した新たな創薬開発につながる可能性がある。実際、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 活性の低下が観察されている[13]–[15]。イヌの乳腺腫瘍はホルモン受容体発現や増殖マーカー、腫瘍抑制因子の変異などの点でヒト乳癌と類似することが報告されており[16],[17]、ヒト乳癌のモデルとしても有用であると考えられているが、イヌの乳腺腫瘍における SET の役割はまだ報告がない。そこで、第 2 章ではイヌの乳腺腫瘍における SET の役割を解明することを目的に研究を行った。

1-2 マイクロミニピッグを用いた研究の有用性

国内では非げっ歯類の実験動物としてサルやイヌの利用が主流をなしている。しかし、世界的な動物福祉や生命倫理への注目の高まりから、2010年9月の欧州議会において霊長類の実験使用を原則禁止することが可決されるなど、欧米ではサルを使った実験が困難となっている。また、国内でも2006と2021年の動物の愛護及び管理に関する法律の改正によって、伴侶動物であるイヌの実験への使用が社会的にも難しくなっており、サルやイヌに代わる新たな非げっ歯類実験動物の開発が期待されている。

ブタは約1万年前に中国でイノシシを家畜化したことに始まり、長い年月をかけてヒトの生活習慣に順応したと考えられている[20]。一方、ブタは雑食性や睡眠行動、脂質代謝、循環器系の構造機能など様々な点でヒトに類似している[21]。家畜として開発されたブタは、欧米においても実験利用の抵抗性が比較的少なく、サルやイヌの代替動物として有望視されており、各種器官の解剖学的・生理学的特徴の類似性から臓器移植モデルとしても研究されている。近年では、実験用ブタには食用の畜産ブタや改良されたミニブタが使用されている。

人為的に小型化されたミニブタは、これまでにゲッチンゲン（デンマーク）、ユカタン（アメリカ）、クラウン（日本）などが開発されており、イヌに代わる中型実験動物として注視され、実験への使用頻度は高まっている。しかし、一般的なミニブタは体重が40kg以上にもなるため、特殊な飼育施設の必要性とともに取り扱いに難があること、さらに創薬においては薬剤を大量に用いる必要性もある[21]。近年、ブタの長所を残しつつこれらの欠点を克服するために、世界最小ミニブタであるマイクロミニピッグ（富士マイクラ株式会社、静岡県）が作出された。マイクロミニピッグは、ポットベリーと他のミニブタを交配して作出されたクローズドコロニーの超小型国産ミニブタである[22]。そのサイズは最大でも25kg程度であることから、大型の飼育施設が不要であり、温厚・従順な性

格のため実験者が一人でも保定が可能で、採血や無麻酔下での画像検査も取扱いが容易である[20]。さらに解剖学的・生理学的特徴、雑食性、昼行性などの面でも一般のブタと同様にヒトと類似していることから、マイクロミニピッグで得られた薬理学的研究結果や創薬研究結果のヒトへの高い外挿性が期待されている。

世界保健機関（WHO）によると、2019年のヒトの死亡原因は、第1位が虚血性心疾患、第2位が脳卒中であり、これら循環器系の疾患が20年近く世界の主要な死亡原因であり続けている[23]。日本においても食生活の欧米化に伴い、循環器系疾患を引き起こす動脈硬化症のリスクは増加している[24]。実際、令和3年の厚生労働省による人口動態統計（確定数）における日本人の死因順位は、第1位は悪性新生物（腫瘍性疾患）であるが、第2位は心疾患、第4位は脳血管疾患となっており、循環器系疾患による死亡率が上位を占めている[25]。これは、食生活などの環境因子に端を発する動脈硬化症が引き起こす血栓形成や塞栓によって、心筋梗塞や脳梗塞などの虚血症状が誘導された結果の一つであるといえる。

動脈硬化の初期段階では、通常、無症状で進行するため、血圧や心電図、眼底検査でその程度を推定することになる。すべてのタイプの動脈硬化に対する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、また医療倫理的にも多くの治験実施は不可能であることから、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[26]。しかし、近年の生命倫理、動物福祉などの実験動物に対する意識の高まりに加え、従来の動脈硬化モデルとして用いられてきたマウスやウサギは低LDLコレステロール動物であることなど、ヒトとの類似点が乏しいといった反面がある[27]–[29]。そのため大型飼育施設を必要とせず、ハンドリングも行いやすく、さらに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注目されてきている。そこで第 3 章では、新たな動脈硬化モデル動物の作出を目的として、コレステロール誘発性マイクロミニピッグ動脈硬化モデルを用いて研究を行った。

1-3 本研究の目的

本研究では、第 2 章ではヒト乳癌モデルとしてのイヌ乳腺腫瘍を、第 3 章ではヒト動脈硬化モデルとしてのマイクロミニピッグ動脈硬化モデルを用いることにより、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行った。イヌとブタという異種の動物を対象に多角的に生理機能や病気の共通性や差異について研究することは、獣医学研究の成果をヒト医学へ外挿し、また獣医学へフィードバックできるトランスレーショナルリサーチとして獣医療・ヒト医療双方へ貢献することが期待される。

第2章 イヌ乳腺腫瘍における SET/I2PP2A の役割

第1節 背景および目的

小動物医療において、イヌの乳腺腫瘍は最も一般的な疾患の一つであり、雌イヌの腫瘍の約40%を占める。また、イヌの乳腺腫瘍は、ヒト乳癌のトランスレーショナルリサーチモデルとしても高く注目されている[30]。ヒト乳癌と同様に、イヌにおいても乳腺腫瘍の危険因子として、年齢、遺伝的背景、ホルモン、肥満などが報告されている[31], [32]。イヌ乳腺腫瘍では、現在もなお外科的切除が乳腺腫瘍治療の第一選択となっている。ただし、浸潤や転移症例に対しては、ドキシソルビシン、カルボプラチンなどの補助的な化学療法や放射線療法が行われている[6], [7]。エストロゲン受容体モジュレーターであるタモキシフェンを用いた内分泌療法は、ヒト乳癌のサブセットに対して有効であるが、乳腺腫瘍に罹患したイヌに対してタモキシフェンを投与すると、エストロゲン様副作用が発生することが報告されている[8]。また、HER2 陽性のヒト乳癌に対しては、チロシンキナーゼ阻害剤が一定の治療効果を示すことが確認されている。しかし、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体そして HER2 受容体を欠くトリプルネガティブ乳癌の場合、イヌ乳腺腫瘍においても満足いく結果をもたらす有効な化学療法プロトコルは存在しないため、イヌ乳腺腫瘍/ヒト乳癌治療のための新しいターゲットの研究が必要である。

タンパク質のリン酸化は、細胞内シグナル伝達の必須な制御機構であり、プロテインキナーゼとプロテインホスファターゼによって可逆的に制御されている。PP2A は、進化的に保存されたセリン・スレオニンホスファターゼであり、細胞

周期やアポトーシスなど幅広い生命現象を制御している[10]。PP2A は、細胞増殖の乱れや幹細胞性などの腫瘍形成性を抑制する重要な腫瘍抑制因子であり c-Myc, Akt/PKB, ERK1/2, mTORC1/p70 S6 kinase (p70S6K), Wnt/ β -catenin, NF κ B など様々な腫瘍促進シグナルを制御している[33]–[35]。また、多くのヒト腫瘍では、SET、CIP2A、PME-1 などの内因性 PP2A 阻害タンパク質の発現レベル上昇により、PP2A 活性が抑制されている[13]。

ヒトの SET 遺伝子は、急性未分化白血病の体細胞転座によって生じた *set-can* 融合遺伝子の構成要素として発見され[36]、高い相同性を持つ 2 種類のヒト SET アイソフォーム (α および β) が同定されている[37]。我々は以前、イヌ SET の 4 つのアイソフォーム (SET α 、 β 、 γ 、 δ) をクローニングし、イヌの SET α タンパク質がヒトの SET α と 94%の相同性を持つことを報告した[38]。またヒトでは、乳癌や慢性骨髄性白血病、B 細胞性非ホジキンリンパ腫など多くの腫瘍で SET の発現亢進が観察され、さらに SET 発現量の増加は、慢性骨髄性白血病の予後不良と正の相関があることも示されている[14], [15]。さらにヒト乳癌では、SET タンパク質の増加により、がん促進性タンパク質の c-Myc が安定化することが報告されている[15]。

しかし、イヌの乳腺腫瘍における SET の役割は、まだ報告されていない。そこで第 2 章では、イヌの乳腺腫瘍における SET の役割を解明することを目的に研究を行い、イヌ乳腺腫瘍組織で SET タンパク質レベルが上昇していること、転移性イヌ乳腺腫瘍細胞株で SET 発現をノックダウンすると PP2A 活性が上昇し、細胞増殖、コロニー形成、足場非依存性細胞増殖が減少することを明らかにした。さらに、SET ノックダウン (SET-KD) が既存のがん治療薬に対する腫瘍の感受性に及ぼす影響についても解析した。

第2節 実験材料および方法

2-2-1 イヌ乳腺腫瘍組織

乳腺腫瘍組織は、2015年1月から2016年11月までの間に東京大学附属動物医療センターおよび台湾国立中興大学獣医学部獣医学教育病院において、乳腺腫瘍の外科的切除を受けた13匹の家庭犬から採取した。乳腺腫瘍組織を用いた全ての研究手法については、東京大学附属動物医療センターと国立中興大学獣医学部の倫理委員会の承認のもと、関連ガイドラインと規定に則って行い、飼い主へもインフォームドコンセントを行った後、その了承を得ている。研究へ用いた犬種、年齢、性別、そして臨床病期は表1に記した。なお、臨床病期I～VはWHO-TNMシステムの分類に基づいて決定した[39]。最も大きな腫瘍巣から約5 mm四方の腫瘍組織を摘出し、同時に同一個体から正常乳腺組織も採取した。摘出組織は液体窒素を用いて急速凍結し、実験に使用するまで-80°Cで保存した。

表 1 乳腺腫瘍組織の外科的切除を受けたイヌの特徴

Dogs	Age	Sex	Breed	WHO Classification			
				T	N	M	Clinical Stage
1	10	Female	Chihuahua	1	0	0	I
2	7	Female	Welsh Corgi	3	0	0	III
3	11	Female	Miniature Dachshund	1	0	0	I
4	11	Female	Chihuahua	2	0	0	II
5	12	Female	Papillon	1	0	0	I
6	12	Female	Maltese	1	0	0	I
7	10	Female	Miniature Dachshund	1	0	0	I
8	5	Female	Japanese Chin	1	0	0	I
9	13	Female	Welsh Corgi	3	1	1	V
10	16	Female	Miniature Dachshund	3	0	1	V
11	8	Female	Mixed	1	0	0	I
12	8	Female	Shiba	3	0	0	III
13	15	Female	Afghan	1	1	0	IV

2-2-2 細胞培養

シーズー乳腺腫瘍細胞株の原発巣由来 (CIP-p) 細胞と転移巣由来 (CIP-m) 細胞は[40]、1% antibiotic-antimycotic (Life Technologies, Carlsbad)、10% fetal bovine serum (FBS) を含有した RPMI1640 を用い、37°C、5% CO₂ に保ったインキュベーター (MCO-5AC、SANYO) 内で培養した。

2-2-3 使用抗体

使用した抗体は表 2 に記載した。

表 2 使用抗体

抗体	メーカー	カタログナンバー
Akt	Cell Signaling	2920
E-cadherin	BD Biosciences	610181
ERK p42/p44	Cell Signaling	9107
GSK3 β	Santa Cruz Biotech	sc-9166
I κ B α	Cell Signaling	4814
N-cadherin	Cell Signaling	13116
Phospho ERK p42/p44	Cell Signaling	9101
Phospho-Ser9 GSK3 β	Cell Signaling	5558
Phospho-Ser473 Akt	Cell Signaling	4060
Phospho-Ser536 p65 NF κ B	Cell Signaling	3033
Phospho-Tyr307 PP2Ac	Abcam	ab32104
Phospho-Thr389 p70S6K	Cell Signaling	9234
PP2Ac	Merck Millipore	07-324
SET	Santa Cruz Biotech	sc-5655
Tubulin- α	Thermo Scientific	RB-9281-P0
c-Myc	Cell Signaling	5605
p97/VCP	GeneTex	GTX113030
p65 NF κ B	Santa Cruz Biotech	sc-372
p70S6K	Santa Cruz Biotech	sc-230
β -catenin	BD Biosciences	610153

2-2-4 レンチウイルスを用いた遺伝子導入

2-2-4-1 プラスミド作製

SET shRNA は、SET の配列に合わせて設計したプライマーをアニーリングした後に mCherry タグが付加された pLVmC ベクターの *ClaI/MluI* サイトにライゲーションすることで作製した[41]。shRNA の標的配列は以下の通りである。

shNonTarget (shNT): 5'- CAACAAGATGAGAGCACCA -3'

shSET (shSET): 5'- GGATGAAGGTGAAGAAGAT -3'

2-2-4-2 プラスミドのトランスフォーメーションおよびミニプレップ

On ice で解凍した E. coli Competent Cells (XL10GOLD, Stratagene) 10 µl にプラスミドを 0.5 µl 加え、on ice で 30 分間静置した。恒温槽 (Dry Bath Incubator, Major Science) を用いて 42°C で 45 秒間ヒートショックを加えた後、on ice で 2 分間静置し、100 µl の LB Broth を加え、37°C で 1 時間振とう培養 (BioShaker BR-22FP, Taitec) した。その後、LB agar (100 µg/ml ampicillin 添加) プレートに播種し、37°C で一晩培養した。出芽したコロニーを単離し、LB Broth (100 µg/ml ampicillin 添加) に加え、37°C、180 rpm で一晩振とう培養した。培養液をチューブに移し、室温にて 3,000 rpm で 10 分間遠心 (Himac CR20, HITACHI) し、上清を除いた後に、Plasmid Mini Kit I (Omega) を使用してプラスミドを抽出した。なお必要な器具は滅菌して用いた。

2-2-4-3 レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入

レンチウイルスは常法に従って作製した。6 穴プレートに HEK293T 細胞を培養し、pLV SIN レンチウイルスベクタープラスミド (3 µg)、packaging plasmid (psPAX2: 2.3 µg)、vesicular stomatitis virus G protein (VSVG) coat protein plasmid

(pMD2.G: 1.3 μ g) を 1 ml の Opti-MEM で希釈し、10 μ l の PEI を混合して 30 分間静置した。その後、4.5 ml の培地 (10% FBS \cdot 1% AA 含有 DMEM) に加え、8 時間培養した後に、3 ml の培地に交換した。48 時間培養後、ウイルスを含む培地を 0.22 μ m のフィルター (Millipore) でろ過し、CIP-p および CIP-m 細胞に 8 時間処置することでウイルスベクターを感染させ、SET shRNA を恒常的に発現する細胞を作製した。

2-2-5 タンパク質発現量の定量法

2-2-5-1 タンパク質抽出法

タンパク質抽出と western blotting は常法に従い実施した [42]。培地を除去した細胞を on ice で冷却した HBS で一回洗浄し、lysate buffer を加えて細胞を可溶化した。得られた細胞懸濁液を on ice で 5 分間静置した後に、4°C、15,000 rpm で 15 分間遠心し、上清を採取してタンパク質サンプルとして使用した。得られたサンプルのタンパク質濃度は BioRad DC protein assay kit (Bio-Rad) を用いて lowry 法により測定した。

使用した lysate buffer の組成は以下の通りである。50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1% Triton X-100、1 mM Na₃VO₄、20 mM sodium pyrophosphate、protease inhibitor cocktail (Roche) 1 tablet/50 ml。

2-2-5-2 Western blotting 法

得られたタンパク質サンプルを SDS ポリアクリルアミドゲルで泳動して分離し、セミドライ式ブロッティング装置 (AE6677, ATTO) を用いてニトロセルロースメンブレン (Wako) に転写した。転写完了後、メンブレンを 0.5% スキムミルク

ク含有 TBS-T を用いて室温で 1 時間振とう (Wave-SI, TAITEC) してブロッキング処置した後、一次抗体を 4°C で振とうしながら一晩反応させた。洗浄後、二次抗体を室温で 1 時間反応させ、ECL Pro (PerkinElmer) で発光させてルミノ・イメージアナライザー (LAS3000mini, FUJIFILM) で観察した。イメージスキャナーで取り込んだバンドは、ImageJ (National Institutes of Health) を用いて解析し数値化した。

使用した TBS-T の組成は以下の通りである。25 mM 2-Amino-2- hydroxymethyl-1, 3- propanediol (Tris) -HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.05% Tween20。

2-2-6 細胞増殖および細胞生存率の解析

細胞増殖は、細胞数測定用キット Cell Counting Kit-8 (CCK8, Dojindo) を用いて検討した。24 穴プレートに 1.0×10^3 個の細胞を播いて 4 日間培養した後、生細胞数を比色法で解析した。細胞生存率の解析は、24 穴プレートに 1.0×10^3 個の細胞を播いて 24 時間後に薬物処置を行い、さらに 48 時間培養した後、CCK8 を用いて行った。

使用した薬物は以下の通りである。4-OH-tamoxifen (1, 3 μ M)、carboplatin (1, 10, 100 μ M)、doxorubicin (10, 100, 1000 ng/ ml)、bortezomib (1, 10, 25 μ M)。

2-2-7 倍加時間測定法

細胞数倍加時間は、HS オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000, KEYENCE) によるタイムラプス撮影法を用いて計測した。4 穴チャンバースライド (4 chamber 35-mm glass bottom dishes) に 1.0×10^4 個の細胞を播き、24 時間培養した後、37°C、5% CO₂ に保った HS オールインワン蛍光顕微鏡内で 15 分ごとに 48 時間タイムラプス撮影を行った。

2-2-8 コロニー形成試験

60 mm ディッシュに 3.0×10^2 個の細胞を播いた。1 週間培養した後、HBS で洗淨した細胞を 99.5%エタノールで固定し、再び洗淨後にギムザ染色を行い、形成されたコロニー数を計測した。

2-2-9 ソフトアガーコロニー形成試験

足場非依存性コロニー形成の検討には、ソフトアガーコロニー形成試験を用いた。2.5 ml の bottom agar (10% FBS、2.8% NaHCO₃、1% AA、0.75% アガロース 含有 RPMI-1640) を 6 穴プレートに敷き、4°C で 8 分間冷却して固めた。その上に 6.0×10^3 個の細胞が含まれた 1.5 ml の top agar (10% FBS、2.8% NaHCO₃、1% AA、0.36% アガロース 含有 RPMI-1640) を添加し、培養した。3 週間後、クリスタルバイオレット染色 (Wako) を行い、形成されたコロニー数を計測した。

2-2-9 イヌ乳腺腫瘍細胞株の異種移植

NOD/SCID マウス (NOD.CB17-Prkdc^{scid} マウス) の左後肢皮下に、コントロールとして shNT を安定発現させた CIP-m 細胞を、右後肢に shSET を安定発現させた CIP-m 細胞をそれぞれ 3×10^6 個移植した。移植後 27 日間、形成される腫瘍の大きさを、ノギスを用いて測定した。腫瘍の大きさは $((\text{width} + \text{length}) / 4)^3 \times 3 \times 4/3$ で計算し比較した。最終日にマウスを安楽殺し、腫瘍を取り出して重量を測定した。なお、本研究における動物の取り扱いは、山口大学で定められた全ての関連指針に沿って行い、動物に与える苦痛を最小限に抑えるための措置を取った。

2-2-10 PP2A 活性測定法

PP2A 活性はマラカイトグリーンアッセイを用いて測定した。Ema 細胞を OP449 (1 μ M) で 2 時間処置し、脱リン酸化活性測定用 lysate buffer を加えて細胞を可溶化した。ネガティブコントロールとして、細胞溶解液を type 2A protein phosphatase 阻害剤である OA (10 nM) で 5 分間処置したサンプルを作製した。その後、リン酸化ペプチドを含む reaction buffer と混合し、室温で 20 分間処置した。反応を 60% HClO₄ を加えることで停止させ、反応液中のリン酸塩量をマラカイトグリーンアッセイにより測定した。ネガティブコントロールとの差をサンプルの PP2A 活性とした。

脱リン酸化活性測定用 lysate buffer の組成は以下の通りである。50 mM MOPS (pH7.4)、0.1% NP-40、0.1 mM EGTa、Roche's complete protease inhibitor cocktail。また、Reaction buffer の組成は以下の通りである。50 mM MOPS (pH7.4)、24 mM MgCl₂、2 mM MnCl₂、0.03% 2-mercaptoethanol、2.9% glycerol、0.2 mM phosphopeptides (K-R-pT-I-R-R)。

2-2-11 放射線照射に対する感受性の解析

放射線照射は、卓上型 X 線照射装置 (MX-80 Labo, mediXtec Japan、管電圧 0 - 80 kV、管電流 0 - 1.25 mA) を用いて行った。24 穴プレートに 1.0×10^4 個の細胞を播き、2 Gy または 4 Gy の電離放射線を照射した。60 mm ディッシュに 3.0×10^2 個の細胞を播き、1 週間培養した。培養後、細胞を 99.5% エタノールで固定してギムザ染色を行い、形成されたコロニー数を計測した。

2-2-12 統計処理

統計処理は Sigma Plot (HULINKS) を用いて行い、結果は、平均 ± 標準誤差で示した。2 群間の比較には、Student's t-test を用いた。3 群以上には、one-way analysis of variance (one-way ANOVA) を用いて比較した後、Fisher's Least Significant Difference (LSD) test を行った。全ての解析において、危険率 (P) が 5%未満の場合を有意差ありとした。

第3節 実験結果

2-3-1 イヌ乳腺腫瘍における SET タンパク質発現

2-3-1-1 イヌ乳腺腫瘍組織における SET タンパク質発現

ヒト乳癌組織では SET タンパク質の高発現が報告されているが、イヌ乳腺腫瘍組織における SET タンパク質の発現レベルはこれまで不明であった。本研究では、東京大学附属動物医療センターおよび国立中興大学獣医学部の獣医学教育病院に来院した 13 頭の飼い犬から乳腺腫瘍組織を採取する際に、同一個体より正常乳腺組織を採取した。そこで、それぞれの組織サンプルから抽出した 10 μg のタンパク質を用いて、western blotting 法で SET タンパク質の発現を解析した (図 1-A)。腫瘍の SET 発現量は、同一個体の正常部組織での SET 発現量を 100% として相対値で示し、乳腺腫瘍ステージ I と II ~ V の発現量を定量化し比較した。図 1-B に示すように、SET タンパク質発現レベルは、乳腺腫瘍ステージ I に比べ、ステージ II ~ V では有意に上昇した。

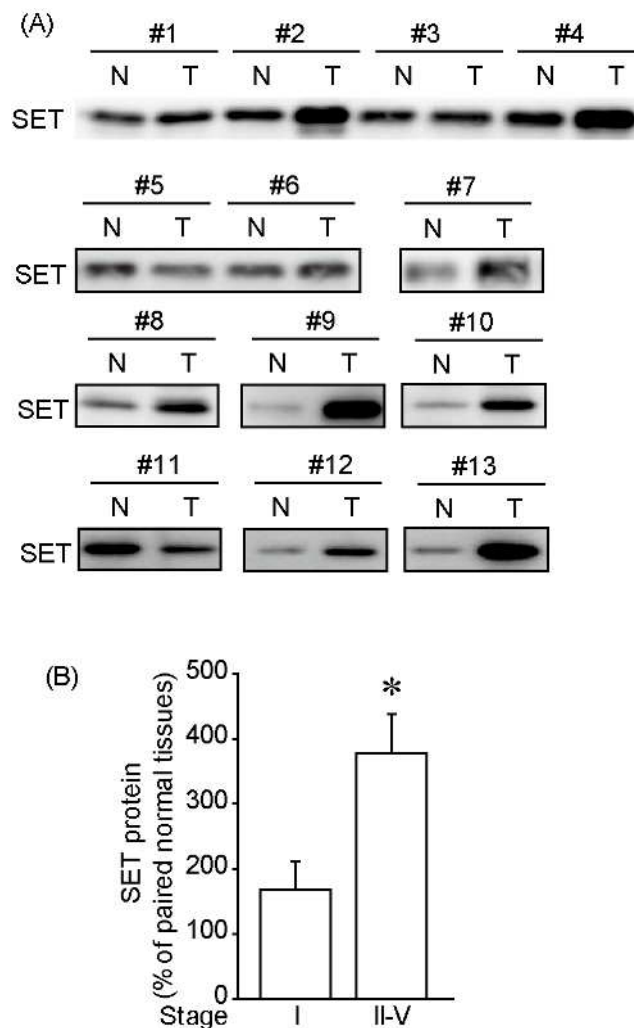


図 1 来院した飼い犬から採取した乳腺腫瘍組織と正常乳腺組織における SET タンパク質発現

13頭の飼い犬の乳腺腫瘍組織と同時に採取した正常な乳腺組織でのSETタンパク質の発現をwestern blotting法を用いて検討した (A)。グラフは、正常部組織でのSET発現量を100%として、乳腺腫瘍組織のSETタンパク質発現量を相対値で示している (B)。Stage I, n=6、Stage II-V, n=7。*: $P < 0.05$ (Stage I との比較)。

2-3-1-2 イヌ乳腺腫瘍細胞株における上皮間葉系マーカータンパク質発現

乳腺腫瘍細胞株の CIP-p 細胞と CIP-m 細胞において SET タンパク質レベルを解析した。CIP-p と CIP-m は、同一個体（シーザー）の原発巣由来と転移巣由来の細胞株である。

がん細胞の悪性度を示す転移性には、上皮間葉転換（Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT）が重要である。上皮細胞がその細胞極性や周囲細胞との細胞接着機能を失い、遊走、浸潤能を得ることで間葉系様の細胞へと変化するプロセスである。上皮細胞が E-カドヘリンを高発現している一方で、間葉系細胞は N-カドヘリンを高発現している[43]。図 2 に示すように、CIP-p 細胞は上皮系マーカーである E-カドヘリンタンパク質を、CIP-m 細胞は間葉系マーカーである N-カドヘリンタンパク質を発現しており、それぞれ EMT の上皮系の細胞特性と間葉系の細胞特性を持つことが確認された。

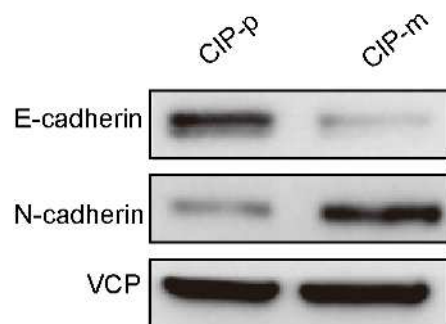


図2 イヌ乳腺腫瘍細胞株における上皮間葉系マーカータンパク質発現

イヌ乳腺腫瘍の原発巣由来の CIP-p 細胞と転移巣由来の CIP-m 細胞において EMT マーカーである E-カドヘリンと N-カドヘリンの発現を western blotting 法を用いて検討した。p97 /VCP をローディングコントロールとして用いた。写真は2つの異なる実験の代表例を示した。

2-3-1-3 イヌ乳腺腫瘍細胞株における SET タンパク質発現と shRNA の効果

次に、イヌ乳腺腫瘍細胞株における SET タンパク質の発現を検討したところ、CIP-p 細胞と CIP-m 細胞ともに正常乳腺組織に比べて高い SET タンパク質の発現が見られた (図 3-A)。

イヌ乳腺腫瘍細胞における SET の機能を検討するために、レンチウイルスベクターを用いて SET に対する shRNA (shSET) を安定的に発現させ、SET 発現を抑制した CIP-p および CIP-m 細胞を作製した。図 3-B に示すように、SET 発現量を western blotting 法により検討したところ、shSET は CIP-p および CIP-m 細胞において SET タンパク質発現を顕著に抑制することが確認された。図には示さないが、SET タンパク質の発現はレンチウイルスの感染によって、少なくとも 30 日間は安定的に抑制された。

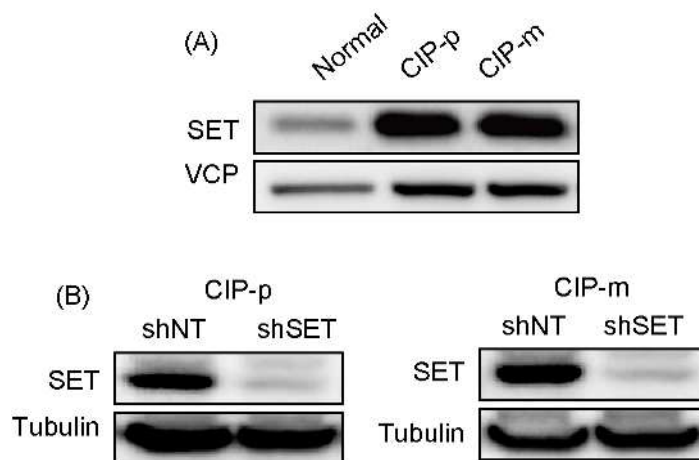


図3 乳腺腫瘍細胞株における SET タンパク質発現と shSET の効果

イヌ正常乳腺組織 (Normal) と CIP-p 細胞、CIP-m 細胞において SET タンパク質の発現を western blotting 法を用いて検討した。p97/VCP (VCP) をローディングコントロールとして用いた (A)。CIP-p 細胞と CIP-m 細胞に nontarget shRNA (shNT) と SET に対する shRNA (shSET) を安定的に発現させた。Western blotting 法を用いて shRNA の効果を確認した典型例。Tubulin はローディングコントロールとして用いた。写真は 2 つの異なる実験の代表例を示した (B)。

2-3-2 SET タンパク質のイヌ乳腺腫瘍細胞の悪性化に関する検討

2-3-2-1 SET 発現抑制がイヌ乳腺腫瘍細胞の増殖に与える影響

一般に、がん細胞の増殖シグナルは常時活性化しており、細胞増殖が異常に亢進している。また、ヒト乳癌細胞株において SET の発現抑制は細胞増殖と足場非依存性の細胞成長を抑制することが報告されている[15]。そこで、イヌ乳腺腫瘍細胞株を用いて SET 発現抑制が細胞増殖活性に与える影響を検討した。原発巣由来株の CIP-p 細胞では増殖活性に変化が認められなかったが、転移巣由来株の CIP-m 細胞における細胞増殖は SET 発現抑制によって有意に抑制された (図 4-A, 4-B)。腫瘍倍加時間は、腫瘍の体積や細胞数が 2 倍になるまでに要する時間と定義されており、倍加時間が短いほど腫瘍の成長速度が速く悪性度が高いと考えられている[44]。そこで、イヌ乳腺腫瘍細胞株における倍加時間が SET 発現抑制によって変化するかを検討したところ、CIP-p 細胞においては倍加時間への影響は認められなかったが、CIP-m 細胞においては倍加時間の延長が認められた (図 4-C, 4-D)。

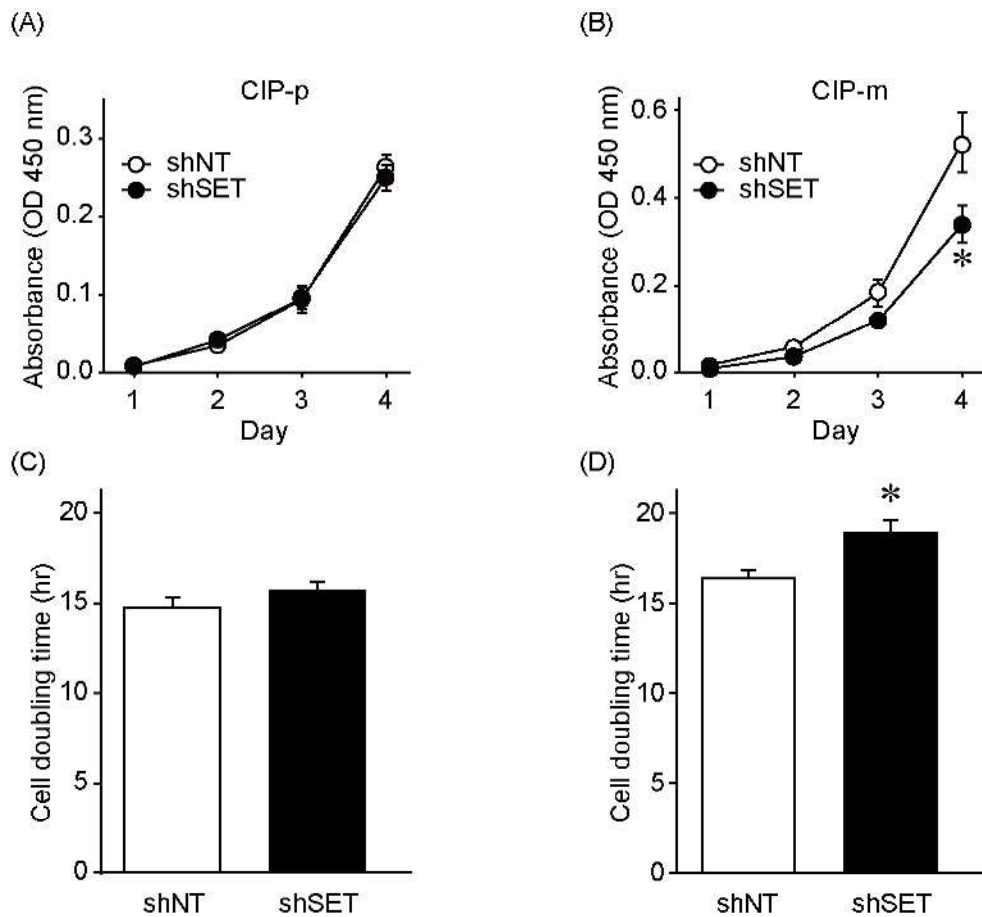


図4 SET発現抑制がイヌ乳腺腫瘍細胞の増殖に与える影響

shNTおよびshSETを発現させたイヌ乳腺腫瘍の原発巣由来のCIP-p細胞と転移巣由来のCIP-m細胞を4日間培養し、細胞増殖をCell Counting Kit-8 (CCK8)を用いて測定した(A, B)。3回の独立した実験における各回2例のデータを解析した。

*: $P < 0.05$ (shNT との比較)

shNTおよびshSETを発現させたイヌ乳腺腫瘍の原発巣由来のCIP-p細胞と転移巣由来のCIP-m細胞を24時間培養し、細胞数倍加時間を測定した(C, D)。2回の異なる実験を行い15-17個の細胞を解析した。*: $P < 0.05$ (shNT との比較)

2-3-2-2 SET 発現抑制がイヌ乳腺腫瘍細胞のコロニー形成に与える影響

単一細胞にしたがん細胞を、低い細胞密度でディッシュ上に播種すると、悪性の高い細胞のみが自己増殖を行い、コロニーを形成する。そこで、SET 発現抑制がコロニー形成能に与える影響について検討することで、乳腺腫瘍の悪性度に与える影響を解析した。

SET 発現抑制がイヌ乳腺腫瘍細胞株の細胞増殖に与える影響と同様に、コロニー形成試験においても、CIP-p 細胞でのコロニー形成には影響を与えなかったが、SET 発現抑制は CIP-m 細胞におけるコロニー形成を有意に抑制した(図 5)。

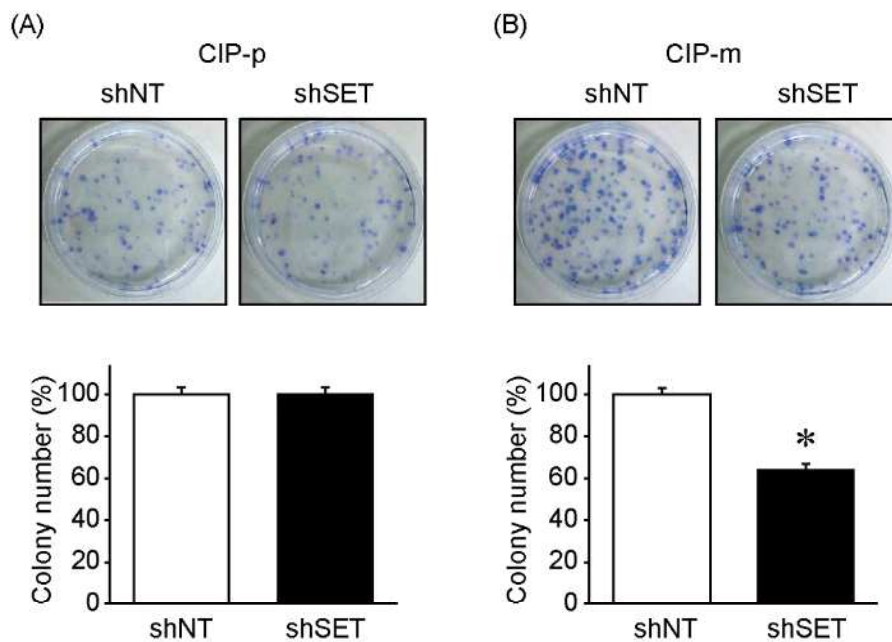


図5 SET 発現抑制がイヌ乳腺腫瘍細胞のコロニー形成に与える影響

shNT および shSET を発現させた CIP-p 細胞 (A) と CIP-m 細胞 (B) を用いてコロニー形成試験を行った。上段はコロニー形成の典型例を、下段は shNT を発現させた細胞のコロニー数を 100% として、shSET 発現細胞の形成数を相対値で表した。3 回の独立した実験における各回 2 例のデータを解析した。*: $P < 0.05$ (shNT との比較)。

2-3-2-3 SET 発現抑制がイヌ乳腺腫瘍細胞の足場非依存性コロニー形成に与える影響

がん細胞は足場となる細胞外基質非依存性に生存し、増殖することができることから、足場非依存性のコロニー形成能は悪性度の指標となる。そこで、SET 発現抑制が足場非依存性のコロニー形成に与える影響について、ソフトアガーコロニー形成試験により検討した。CIP-m 細胞において SET 発現抑制は足場非依存性のコロニー形成を有意に抑制した (図 6)。一方、CIP-p 細胞ではコロニーがほとんど形成されず、shNT においてさえ非常に小さなコロニーを形成しただけであり、解析は不可能であった。以上より、SET は乳腺腫瘍転移巣において腫瘍の悪性度を高めることが示唆された。

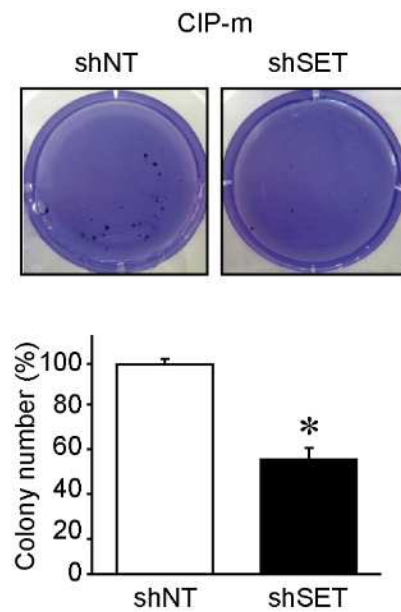


図 6 SET 発現抑制がイヌ乳腺腫瘍細胞の足場非依存性コロニー形成に与える影響

足場非依存的なコロニー形成に対する SET 発現抑制の与える影響を、shNT および shSET を発現させた CIP-m を用いて、ソフトアガーコロニー形成試験により検討した。上段はコロニー形成の典型例を、下段は shNT を発現させた細胞のコロニー数を 100%として、shSET 発現細胞の形成数を相対値で表した。3 回の独立した実験における各回 2 例のデータを解析した。*: $P < 0.05$ (shNT との比較)。

2-3-2-4 SET 発現抑制が xenograft モデルにおけるイヌ乳腺腫瘍細胞の腫瘍化に与える影響

In vitro 試験系においては、SET タンパク質の発現抑制によって転移巣由来のイヌ乳腺腫瘍細胞（CIP-m）の悪性化が抑制されることが示唆されたが、実際に生体内においてイヌ乳腺腫瘍の転移巣由来細胞が悪性化に関与しているかは不明である。そこで、shNT および shSET を発現させた CIP-m 細胞をマウスへ移植した xenograft モデルを用いて、時系列で腫瘍の大きさと重さを比較することで、CIP-m 細胞の悪性度を検討した。図 7 に示すように、xenograft モデルにおける *in vivo* 実験において、SET 発現抑制は CIP-m 細胞の腫瘍化において、その大きさと重量をともに抑制した。

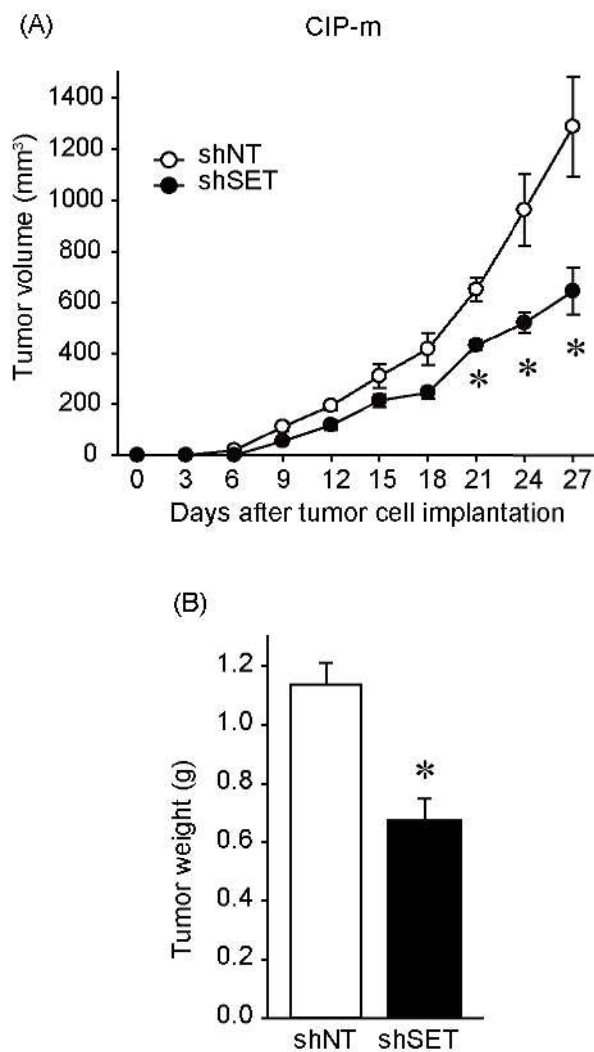


図7 SET発現抑制が xenograft モデルにおけるイヌ乳腺腫瘍細胞の腫瘍化に与える影響

shNT および shSET を発現させた CIP-m 細胞の腫瘍化を xenograft モデルにおいて検討した。腫瘍化は腫瘍の大きさを 27 日間経時的に測定することで解析した (A)。移植して 35 日後に腫瘍組織を摘出し腫瘍重量を測定した (B)。N=7。

*: $P < 0.05$ (shNT との比較)。

2-3-2-5 SET 標的薬がイヌ乳腺腫瘍細胞の生存に与える影響

SET タンパク質の発現抑制によって転移巣由来のイヌ乳腺腫瘍細胞の悪性化が抑制されていることが示唆されたが、SET が直接、乳腺腫瘍の悪性化に関与しているかは不明である。FTY720（フィンゴリモド）はスフィンゴシン類似物質であり、免疫抑制剤としてヒトの多発性硬化症に使用されており、SET に直接作用して PP2A 活性を回復させることが報告されている[45]。そこで、FTY720 のイヌ乳腺腫瘍細胞の生存に与える影響を検討したところ、FTY 投与によって CIP-m 細胞の生存率は用量依存性に減少したが、CIP-p 細胞の生存には影響を与えなかった（図 8）。以上の結果より、イヌ乳腺腫瘍細胞においては、がん細胞における SET の機能が転移によるがん悪性化により変化し、腫瘍促進の役割を担うことが示唆された。

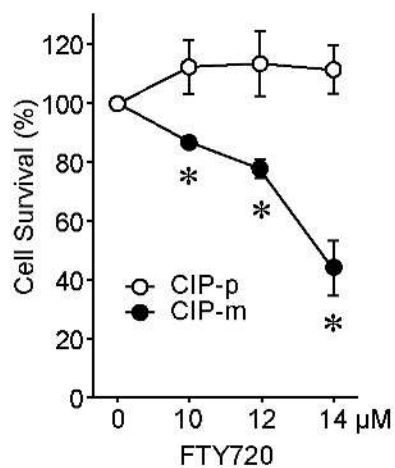


図8 SET 標的薬がイヌ乳腺腫瘍細胞の生存に与える影響

CIP-p および CIP-m 細胞を FTY720 で 48 時間後処置し、CCK8 を用いて細胞生存率を解析した。細胞生存率は各細胞株での無処置での細胞生存率の平均を 100% として相対値で表した。2 回の独立した実験における各回 2 例のデータを解析した。*: $P < 0.05$ (CIP-p との比較)。

2-3-3 SET 発現抑制が細胞増殖シグナルに与える影響

転移巣由来の CIP-m 細胞では SET タンパク質の発現を抑制することで細胞増殖が抑制された。そこで、その分子機構を明らかにするために、SET 発現抑制が細胞増殖シグナルに与える影響を western blotting 法により検討した。

2-3-3-1 SET 発現抑制が c-Myc、Akt および ERK1/2 に与える影響

ヒト乳癌細胞において、SET 発現抑制は c-Myc タンパク質レベルと、Akt リン酸化レベルを減少させることが報告されている[15],[46]。そこで、イヌ乳腺腫瘍細胞における SET 発現抑制がこれら細胞増殖シグナルに与える影響を検討したところ、CIP-m 細胞において SET 発現抑制は c-Myc 発現と Akt のリン酸化およびタンパク質発現には影響を与えなかった (図 9A、B)。また、ERK1/2 リン酸化およびタンパク質発現においても SET 発現抑制による変化は認められず (図 9C)、SET はイヌの乳腺腫瘍転移巣において c-Myc、Akt および ERK1/2 による細胞増殖シグナルを介さず、細胞増殖を制御することが示唆された。

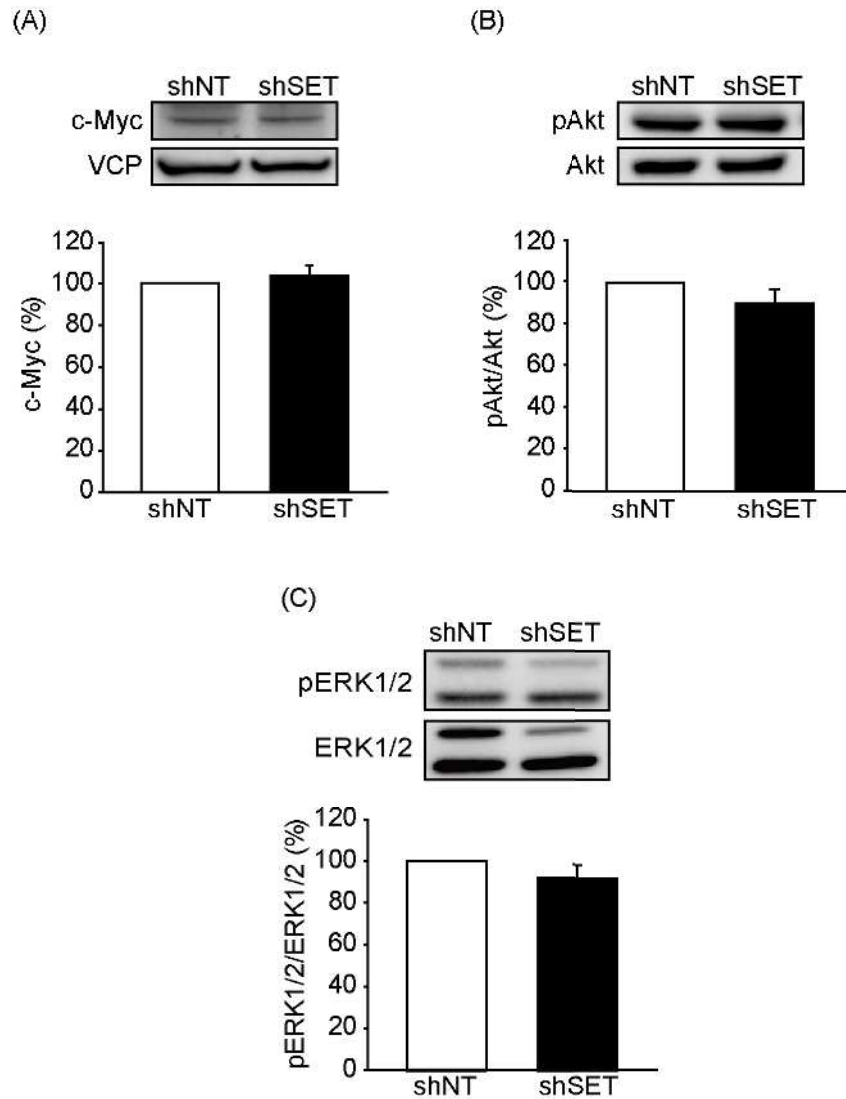


図 9 SET 発現抑制が細胞増殖シグナルに与える影響

SET 発現抑制が c-Myc (A) の発現量, Akt (B) および ERK1/2 (C) のリン酸化およびタンパク質発現量に与える影響について、shNT および shSET を発現させた CIP-m 細胞を用いて western blotting 法により検討した。VCP はローディングコントロールとして用いた (A)。典型的なデータの一部と定量図を示した。定量図は shNT の結果を 100% として、shSET の結果を相対値で表した。2 回の独立した実験における各回 2 例のデータを解析した。

2-3-3-2 SET 発現抑制が mTORC1 / p70S6K に与える影響

セリン/スレオニンキナーゼである mTORC1 (哺乳類ラパマイシン標的タンパク質複合体 1) は哺乳類で高く保存されており、その活性化は糖尿病などの生活習慣病、老化やがんなどと深く関連していることが報告されている[47]。当研究室では、イヌのメラノーマ細胞において SET 発現抑制が、mTORC1 シグナル活性の指標である p70S6K (p70S6 キナーゼ) のリン酸化を抑制することを報告している[41]。この報告と同様に本研究では、転移型イヌ乳腺腫瘍細胞 CIP-m 細胞において、SET 発現抑制は p70S6K のリン酸化レベルを減少させ、さらに p70S6K のタンパク質発現レベルも有意に抑制した (図 10A)。一方、SET 抑制が CIP-p 細胞における細胞シグナル伝達に与える影響について検討したところ、p70S6K リン酸化レベルは有意に減少したが、その抑制は CIP-m 細胞と比べて弱く、また p70S6K のタンパク質発現レベルは変化しなかったことから、SET 抑制は CIP-p 細胞において影響しないことが示唆された (図 10B)。

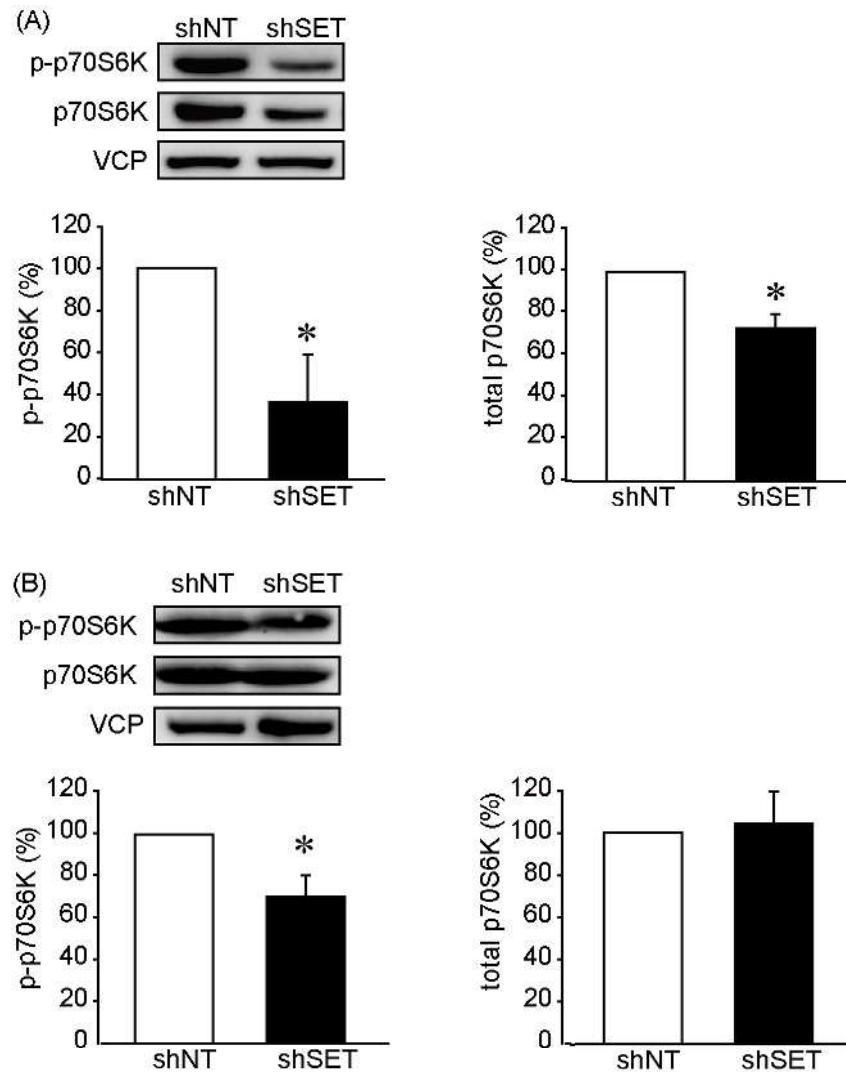


図 10 SET 発現抑制が mTORC1 / p70S6K に与える影響

SET 発現抑制が mTORC1 / p70S6K に与える影響について、shNT および shSET を発現させた CIP-m 細胞 (A) または CIP-p (B) を用いて western blotting 法により検討した。VCP はローディングコントロールとして用いた。典型的なデータの一例と定量図を示した。3~6 回の独立した実験における各回 2 例のデータを解析した。*: $P < 0.05$ (shNT との比較)。

2-3-3-3 SET 発現抑制が Wnt/ β -catenin シグナルに与える影響

ヒト乳癌細胞においては、Wnt/ β -catenin シグナルや NF κ B シグナルが活性化されていることが報告されている[48], [49]。Wnt/ β -catenin シグナルの活性化は、 β -catenin のリン酸化が減少し、その結果細胞質内に β -catenin が蓄積し安定化することに起因する。一方、 β -catenin が GSK3 β によってリン酸化されると β -catenin の分解が促進される。GSK3 β の活性化は PP2A によっても調節されており、GSK3 β は Ser9 残基の PP2A による脱リン酸化により強い活性を示し、 β -catenin のリン酸化と分解につながることを報告されている[50]。そこで、PP2A 阻害因子である SET タンパク質の Wnt/ β -catenin 経路への関与を検討するため、SET タンパク質の発現抑制による β -catenin タンパク質レベルと GSK3 β リン酸化レベルを測定した。SET 発現抑制によって、 β -catenin タンパク質レベルと GSK3 β リン酸化レベルはどちらも有意に減少した (図 11A、B)。また、 β -catenin シグナルの標的の一つである cyclin D1 のタンパク質発現レベルも、SET 発現抑制によって有意に減少した (図 11C)。以上の結果より、SET タンパク質の発現抑制は、PP2A によって活性化された GSK3 β を介して Wnt/ β -catenin シグナルを抑制することが示唆された。

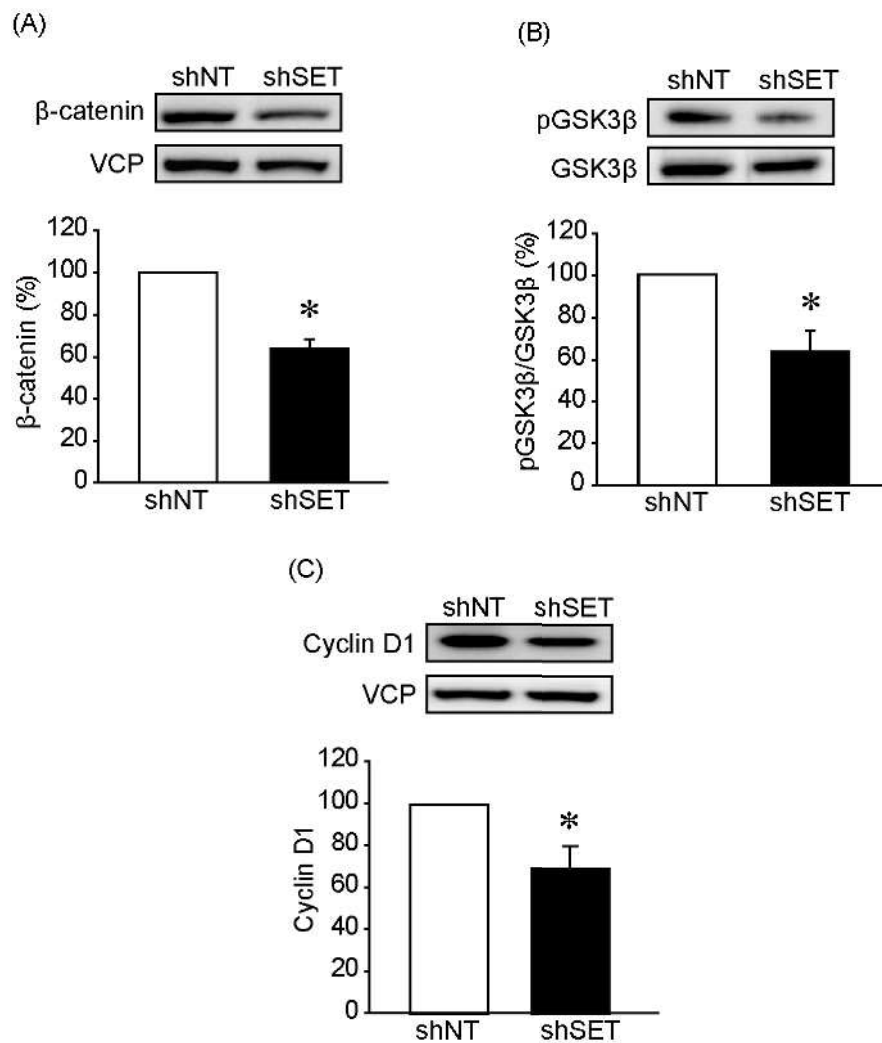


図 11 SET 発現抑制が Wnt/β-catenin シグナルに与える影響

SET 発現抑制が β-catenin の発現量 (A)、GSK3β のリン酸化 (B)、Cyclin D1 発現量 (C) に与える影響について、shNT および shSET を発現させた CIP-m 細胞を用いて western blotting 法により検討した。VCP はローディングコントロールとして用いた。典型的なデータの一部と定量図を示した。3~6 回の独立した実験における各回 2 例のデータを解析した。*: $P < 0.05$ (shNT との比較)。

2-3-3-4 SET 発現抑制が NFκB シグナルに与える影響

NFκB は、p65、RelB、c-Rel、p50、p52 の 5 種類のタンパク質がホモ二量体またはヘテロ二量体を構成する転写調節因子調節ファミリーであり、その活性化は腫瘍の悪性化につながる。PP2A は、NFκB p65 の Ser536 残基を脱リン酸化することによって NFκB 活性を抑制的に調節する[35]。また、NFκB の核内移行はその阻害タンパク質である IκBα によって抑制されることから、IκBα 発現抑制により NFκB の核内移行が活性化される。そこで、PP2A 阻害因子である SET タンパク質の NFκB に関わる経路への関与を検討するため、CIP-m 細胞を用いて、SET タンパク質の発現抑制による NFκB p65 および IκBα タンパク質発現と NFκB p65 のリン酸化レベルを検討したところ、SET 発現抑制は NFκB p65 および IκBα のタンパク質発現レベルに影響を与えることなく、NFκB p65 のリン酸化レベルを減少させた (図 12A、B)。一方、CIP-p 細胞では SET 抑制により NFκB p65 のリン酸化レベルに変化は認められなかったが、IκBα タンパク質レベルは有意に増加した (図 12C、D)。

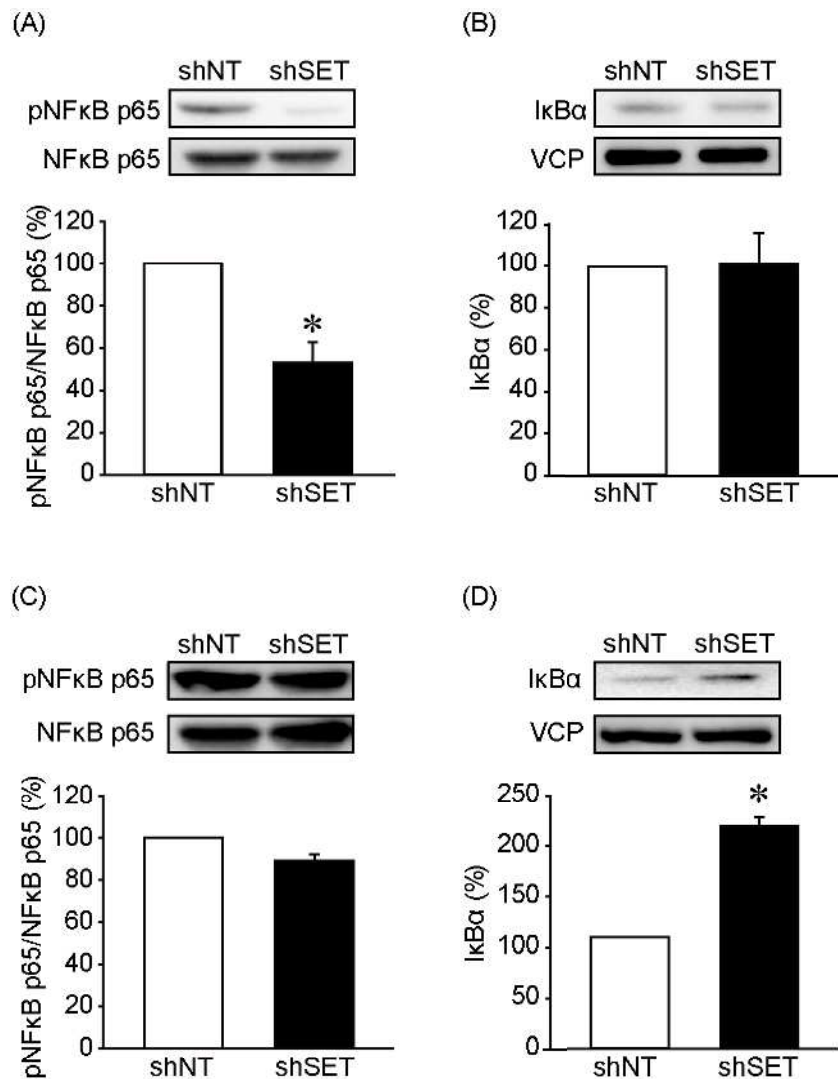


図 12 SET 発現抑制が NFκB シグナルに与える影響

SET 発現抑制が NFκB p65 および IκBα タンパク質発現と NFκBp65 のリン酸化レベルに与える影響について、shNT および shSET を発現させた CIP-m 細胞 (A、B) または CIP-p 細胞 (C、D) を用いて western blotting 法により検討した。VCP はローディングコントロールとして用いた。典型的なデータの一部と定量図を示した。3~6 回の独立した実験における各回 2 例のデータを解析した。*: $P < 0.05$ (shNT との比較)。

2-3-3-5 SET 発現抑制が PP2A 活性に与える影響

ここまでの実験結果より、SET はイヌ乳腺腫瘍の悪性化に重要な役割を果たしており、そのメカニズムが mTORC1/p70S6K、 β -catenin、NF κ B 経路に関連していることが示唆された。SET は PP2A の阻害タンパク質であることから、SET 発現抑制による作用が PP2A 活性化を介しているかを、Active PP2A DuoSet IC kit を用いて検討した。CIP-m 細胞において、shSET により SET 発現を抑制すると PP2A 活性の有意な増強が観察された (図 13A)。一方、PP2A の Tyr307 残基のリン酸化により PP2A 活性が抑制されることが報告されている[51]。そこで、SET 発現抑制が PP2A の Tyr307 残基リン酸化に与える影響を western blotting 法により検討したところ、SET の発現抑制により PP2A の Tyr307 残基のリン酸化レベルが有意に減少した (図 13B)。

以上の結果より、SET は PP2A 活性を抑制することで、mTORC1/p70S6K、 β -catenin、NF κ B 経路を増強していることが示唆される。

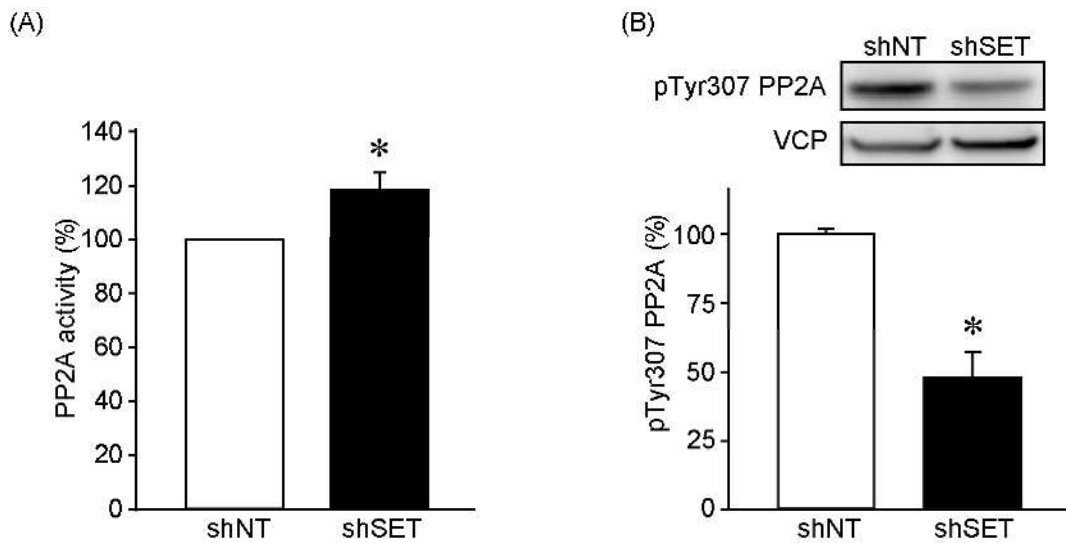


図 13 SET 発現抑制が PP2A 活性に与える影響

(A) shNTおよびshSETを発現させたCIP-m細胞を用いて、SET発現抑制がPP2A活性に与える影響について検討した。3回の独立した実験における各回2例のデータを解析した。*: $P < 0.05$ (shNT との比較)。(B) PP2AのTyr307残基のリン酸化レベルを、shNTおよびshSETを発現させたCIP-m細胞を用いてwestern blotting法により検討した。shNTを発現させたCIP-m細胞のPP2A Tyr307リン酸化レベルを100%として相対値で示している。典型的なデータの一例と定量図を示した。VCPはローディングコントロールとして用いた。4回の独立した実験における各回2例のデータを解析した。*: $P < 0.05$ (shNT との比較)。

2-3-4 SET 発現抑制が乳腺腫瘍治療に与える影響

イヌの乳腺腫瘍の治療においては外科的切除が第一選択の治療法となっているが、浸潤性や転移性の腫瘍の場合には内分泌療法や放射線療法などの補助的治療が行われる。そこで、既存の乳腺腫瘍治療に対する SET の役割を検討した。

2-3-4-1 SET 発現抑制がイヌ乳腺腫瘍の内分泌療法および化学療法に与える影響

ヒト乳腺腫瘍の約7割を占めるエストロゲン受容体(ER)陽性乳腺腫瘍では、エストロゲンの刺激によって増殖シグナルが異常亢進することが知られており、選択的エストロゲン受容体モジュレーターである **tamoxifen** が内分泌療法薬として用いられる[52]。一方、SET 発現抑制は、ヒト肺癌細胞株 A549 の **cisplatin** に対する感受性を増強することが報告されており[53]、化学療法の抗がん効果における SET の役割を示唆している。さらに、26S プロテアソーム阻害剤で抗腫瘍効果をもつ **bortezomib** は、もう一つの PP2A 阻害タンパク質である CIP2A 発現を抑制することで、ヒトのトリプルネガティブ乳癌細胞に抗がん効果をもたらすことが報告されている[54]。そこで本研究では、イヌの乳腺腫瘍における、ヒトの腫瘍の既存療法の効果および SET の役割を検討するため、SET 発現を抑制した細胞を 4-OH-tamoxifen (1, 3 μ M)、carboplatin (1, 10, 100 μ M)、doxorubicin (10, 100, 1000 ng/ml)、bortezomib (1, 10, 25 μ M) で 48 時間処置し、CCK8 を用いて細胞増殖に与える影響を検討した (図 14)。SET 発現抑制は、CIP-m 細胞の 4-OH-tamoxifen、carboplatin、bortezomib に対する感受性を変化させなかったが、doxorubicin に対して細胞抵抗性が観察され、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。

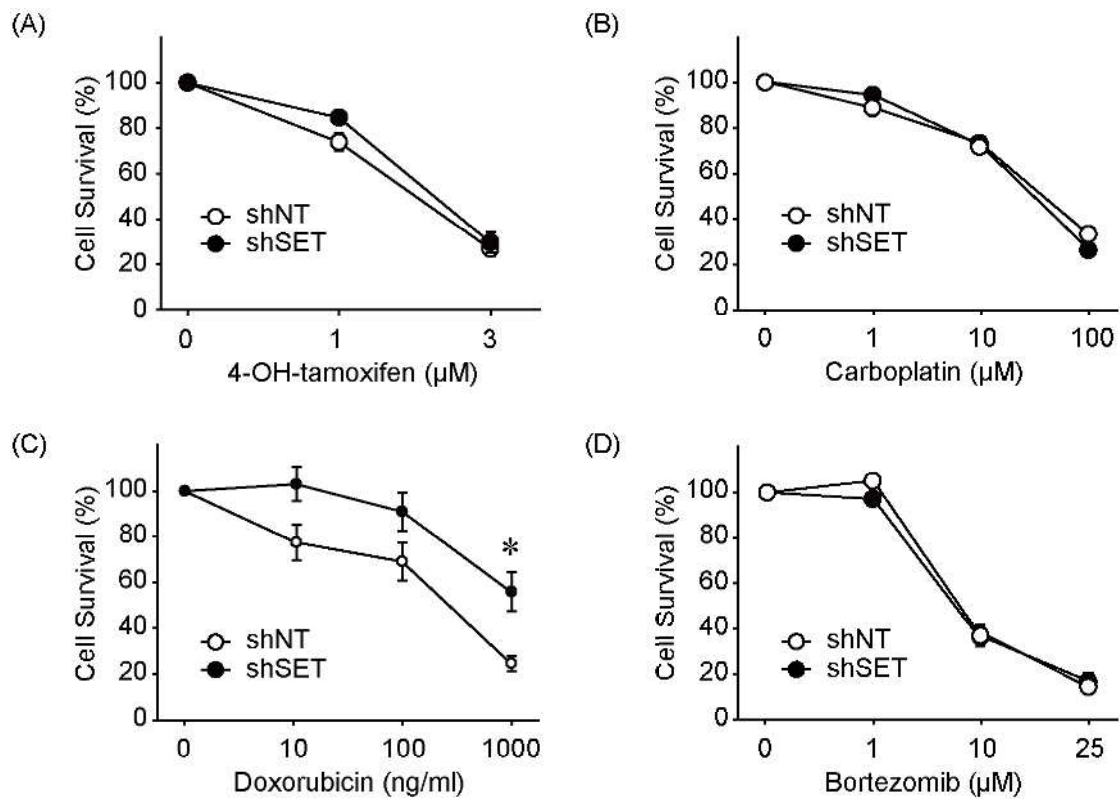


図 14 SET 発現抑制がイヌ乳腺腫瘍の内分泌療法および化学療法に与える影響

shNT および shSET を発現させた CIP-m 細胞を 4-OH-tamoxifen (A)、carboplatin (B)、doxorubicin (C)、bortezomib (D) で 48 時間処置し、CCK8 を用いて細胞生存率を解析した。無処置の細胞生存率を 100% として相対値で表した。3 回の独立した実験における各回 2 例のデータを解析した。*: $P < 0.05$ (shNT との比較)。

2-3-4-2 SET 発現抑制が放射線療法に与える影響

乳腺腫瘍の転移や再発のリスク軽減を目的として、しばしば放射線療法が用いられる。SET 発現抑制が放射線療法に与える影響について検討するため、CIP-m 細胞に電離放射線 (2 Gy および 4 Gy) を照射し、1 週間後のコロニー形成数を解析した。電離放射線は強度依存的にコロニー形成数を減少させたが、SET 発現抑制は照射後のコロニー形成には影響を与えなかった (図 15)。これらの結果より、イヌの乳腺腫瘍において SET は放射線療法に対する細胞の抵抗性には関与しないことが示唆された。

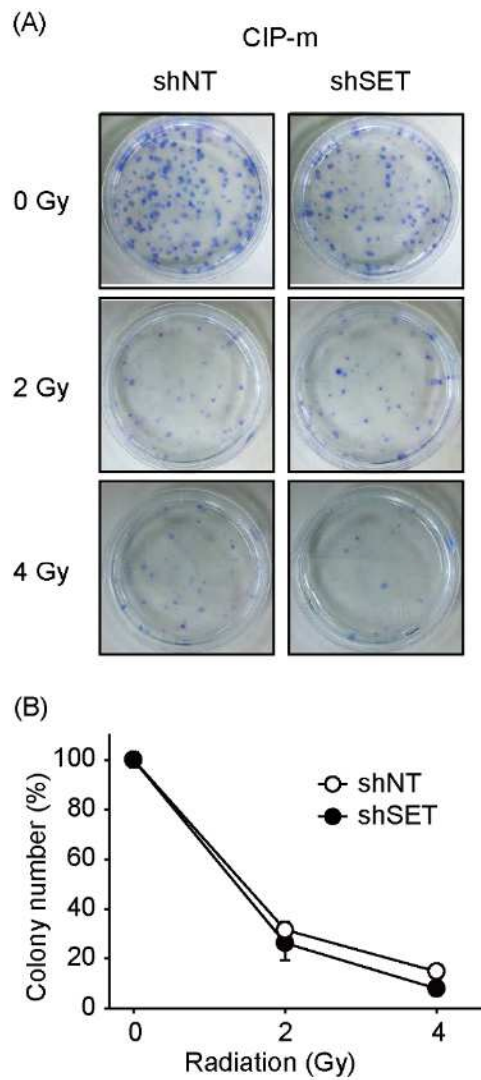


図 15 SET 発現抑制が放射線療法に与える影響

shNT および shSET を発現させた CIP-m 細胞に電離放射線(2 Gy および 4 Gy)を照射し、1 週間後のコロニー形成数を解析した。無照射のコロニー形成数を 100%として相対値で示した。3 回の独立した実験における各回 2 例のデータを解析した。

第4節 考察

乳腺腫瘍は雌イヌに最も多い腫瘍であるが、悪性度が高い転移巣の腫瘍に対しては有効な治療法が確立されていない。一方、イヌ乳腺腫瘍はヒト乳癌の有用な代替モデルとなりうると考えられることから、イヌ乳腺腫瘍に関する研究の意義は獣医療分野のみならず医療分野においても大きい。本研究では、イヌの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を検証することを目的としている。

2-4-1 イヌ乳腺腫瘍の悪性度における SET の関与

今回、イヌ乳腺腫瘍組織の進行したステージ（ステージⅡ～Ⅴ）では、SET タンパク質発現レベルがステージⅠと比較して上昇していることが明らかとなった。転移巣由来の CIP-m イヌ乳腺腫瘍細胞では、SET 発現抑制は腫瘍化の指標である細胞増殖を抑制しており、SET 発現抑制はヒト乳腺腫瘍細胞の増殖を抑制するというこれまでの報告と一致している[15]。一方、原発巣由来の CIP-p 細胞においては SET 発現抑制が影響を与えなかったことから、悪性度の低い細胞では SET の関与は小さいと考えられる。

ヒト乳腺腫瘍細胞では、SET 発現抑制は c-Myc Ser62 の脱リン酸化を増強して c-Myc タンパク質レベルを減少させる [15]。また、ヒト乳腺腫瘍細胞 MCF-7 において siRNA による c-Myc 発現抑制が、細胞増殖を低下させることが報告されている[55]。しかし、本研究ではイヌ乳腺腫瘍細胞において SET 発現抑制が c-Myc タンパク質レベルを変化させることはなかった。同様に SET 発現抑制は、ヒト非小細胞性肺癌細胞において ERK1/2 と Akt 活性を抑制することや[56]、ヒト乳腺腫瘍細胞 MDA-MB-231 において ERK1/2 および Akt のリン酸化レベルが細胞増殖の制御に重要であること[57]などが報告されているが、イヌ乳腺腫瘍

細胞においては、SET 発現抑制による ERK1/2 や Akt のリン酸化に対する影響は確認されず、SET はこれらのリン酸化や c-Myc 発現制御を介さず、細胞増殖を促進していることが示唆された。これらの結果より、イヌ乳腺腫瘍細胞における SET 発現抑制が細胞増殖の抑制をもたらす分子メカニズムは、ヒト乳腺腫瘍の報告と異なっていると考えられる。これらの違いはまだ不明のままだが、イヌ乳腺細胞では C 末端が切断された SET アイソフォームが発現するなど[38]、SET の構造における種の違いが寄与している可能性が考えられるが、今後の更なる研究が必要である。

本研究では、SET 発現抑制は PP2A 活性を増強し、mTORC1 / p70S6K、 β -catenin、NF κ B シグナルを抑制する結果となった。PP2A は mTORC1 シグナル活性マーカーである p70S6K と直接関連し、PP2A の調節サブユニットの抑制は p70S6K Thr389 のリン酸化を増強することが報告されている[34], [58]。 β -catenin タンパク質の発現は、GSK3 β による β -catenin のリン酸化によって調節されており、さらに GSK3 β の活性化は PP2A の脱リン酸化によってもたらされることが知られている[50]。PP2A は、NF κ B p65 の Ser536 残基を脱リン酸化することで、NF κ B 活性を抑制的に調節している[35]。本研究では、NF κ B の阻害因子である I κ B α タンパク質の発現レベルは SET 発現抑制によっては影響されず、NF κ B p65 が直接的に脱リン酸化を受けた可能性が示唆される。これらの機構を確認するためにはさらなる解析が必要ではあるが、今回の研究から、イヌ乳腺腫瘍細胞においては、SET 発現抑制によって活性化した PP2A が、mTORC1 / p70S6K、 β -catenin、NF κ B を抑制したことが示唆される。本研究では、発現レベルが上昇した SET が、がん細胞において β -catenin と NF κ B シグナルを増強することを初めて明らかにした。これらのシグナル伝達経路は、SET の過剰発現に伴って、乳腺

腫瘍細胞を含むヒトがん細胞においても増強している可能性があり、SET は新たながん治療薬開発の戦略ターゲットになると考えられる。

イヌ乳腺腫瘍の原発巣由来の CIP-p 細胞と転移巣由来の CIP-m 細胞は、同一個体のシーザーから樹立したものである[40]。一般に、がん幹細胞は単一細胞状態でも増殖することができ、細胞を単一状態で播種した後に形成されるコロニー数は腫瘍の悪性度の指標となる[59]。本研究において、SET 発現抑制は、イヌ乳腺腫瘍の細胞増殖に与える影響と同様に、CIP-m 細胞においてはコロニー形成を有意に抑制したが、CIP-p 細胞のコロニー形成には影響を与えなかった。一般に、細胞は細胞外基質などの接着できる足場がない浮遊状態ではアノイキスと呼ばれる細胞死が誘導されるが、上皮幹細胞はアノイキス抵抗性であるために足場非依存性に増殖することが可能である。がん幹細胞も同様にアノイキス抵抗性であり、足場非依存性の細胞増殖は腫瘍の悪性度の指標となる[38]。本研究で行ったソフトアガーコロニー形成試験では、CIP-m 細胞において SET 発現抑制が足場非依存性の増殖を抑制する一方、CIP-p 細胞ではコロニーが形成されなかった。コロニー形成試験の結果を考慮すると、CIP-p 細胞は CIP-m 細胞よりもがん悪性度の低い段階にあり、乳腺腫瘍が転移性に移行したことにより悪性度が高まっている可能性が考えられる。CIP-p 細胞と CIP-m 細胞の間で SET のタンパク質発現レベルは著しい違いは認められていないが、SET 発現抑制の影響はそれらの細胞株において異なっている。SET 発現抑制の効果の違いを決定する分子機構はまだ明らかではないが、CIP-m 細胞の遺伝子突然変異や、SET タンパク質の翻訳後修飾の差が要因としてあるのかもしれない。

2-4-2 乳腺腫瘍治療における SET の役割

ヒト乳腺腫瘍細胞では、SET 標的薬の OP449 や FTY720 が抗腫瘍効果を発揮することが報告されている[15],[60]。本研究では、FTY720 が CIP-m 細胞を選択的に死滅させることが明らかとなった。また、当研究室では、OP449 と FTY720 が、イヌのリンパ腫細胞とメラノーマ（黒色腫）細胞において PP2A 活性を回復させ、アポトーシスを引き起こすことを報告している[41],[61]。一方、SET 発現抑制は、転写因子である NDRG1 の PP2A 依存性の活性化を介して、A549 ヒト非小細胞性肺癌細胞の白金製剤 cisplatin に対する感受性を増強することが報告されている[53]。また FTY720 は、ヒト大腸がん細胞において、oxaliplatin の抗がん効果を増強することが報告されている[62]。Carboplatin も白金製剤の一つであり、アデニンとグアニンの N-7 位に結合し、DNA 鎖に架橋を形成することで DNA 合成を阻害する[63]。しかし、本研究では SET 発現抑制が carboplatin による CIP-m 細胞の細胞増殖抑制作用に対して感受性を増強することはなかった。

また、FTY720 はヒト大腸がん細胞とヒト乳癌細胞において doxorubicin の抗がん効果を増強することが報告されている[60],[62]。一方、本研究では SET 発現抑制細胞において doxorubicin に対する抵抗性が認められ、FTY720 とは異なり抗がん効果の減弱が示唆された。Doxorubicin は、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害物質であり、細胞の DNA の塩基対間に結合し、DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼおよびトポイソメラーゼ II を阻害し、DNA および RNA の生合成を阻害することで相乗的に抗がん効果を発揮することから、doxorubicin の抑制効果においてはクロマチンリモデリングの重要性が示されている[64],[65]。一方、SET は PP2A 非依存性機構を介して、クロマチンリモデリングとヒストンアセチル化の調節に関わっていることが報告されている[66],[67]。

FTY720 の抗がん効果は PP2A 活性に依存していることから、SET の PP2A 非依存性機構が、この矛盾する結果の要因となっている可能性が考えられる。

2-4-3 結論（総括）

本研究では、イヌ乳腺腫瘍組織において PP2A 阻害タンパク質の SET が高発現していることが明らかとなった。さらに、SET 発現抑制はイヌ乳腺腫瘍細胞株において PP2A 活性を増強し、mTORC1 / p70S6K、 β -catenin、NF κ B を阻害することで腫瘍形成を抑制することが示された。一方、SET 発現抑制は、既存のがん治療を想定した、腫瘍細胞の 4-OH-tamoxifen、carboplatin、bortezomib、X 線放射線に対する感受性には影響を与えなかったが、doxorubicin に対する抵抗性を示した。これらは、イヌ乳腺腫瘍とヒト乳癌において、抗腫瘍薬の標的としての SET を利用した治療の可能性のさらなる解析の一助となるだろう。

第3章 高脂血症誘発性マイクロミニピッグ動脈硬化モデルにおける HMGB1 と血栓形成の関連

第1節 背景および目的

動脈硬化は、血液中の中性脂肪やコレステロールなどの脂質が増加することによって、動脈壁が肥厚することを特徴とする進行性の疾患である。動脈硬化が冠動脈や脳血管に発生すると、狭心症、心筋梗塞、脳出血や脳梗塞などの重篤な循環器系疾患を誘発することから、その予防薬や治療薬の開発は循環器系疾患における重要なターゲットとなっている。

冠動脈においては、粥状動脈硬化（アテローム性動脈硬化）が一般的に見られ、マクロファージによる血管壁でのプラーク形成により血管内腔の狭窄がおこる。マクロファージとその下流のシグナル伝達経路は、プラーク形成に重要な役割を果たしている。動脈硬化は、多くの環境因子と関連した多因子遺伝性疾患であり、一般的な危険因子としては、高コレステロール血症などの脂質異常症があげられる[68]。また、細菌やウイルス感染などによる局所的な長期間にわたる血管炎症が動脈硬化を促進することも指摘されており[69]、慢性炎症性疾患としての動脈硬化症に焦点を当てた研究も多数行われている。

動脈硬化に関連する炎症誘発因子のひとつに、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。HMGB1 は損傷関連分子パターン (DAMP) として作用し、インフラマソームを活性化して IL-1 β や TNF α などの炎症性サイトカインを産

生、放出し、炎症を促進させる[70]。また HMGB1 は、組織因子の誘導や止血反応により動脈硬化を促進する凝固作用に関与することも注目されている[71]。

動脈硬化の進行は、動脈血流を制限あるいは遮断し、心血管系疾患や脳血管系疾患を引き起こす可能性があるが、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。そのため、動脈硬化の根本的な原因を明らかにすることは、動脈硬化の予防策や治療法を確立するために重要である。

一方、初期の動脈硬化は無症状であることから、病気が進行する前の患者において治療効果を評価することは困難である。そのため、早期段階での治療効果を評価するには、マウスやウサギなどの動物モデルが不可欠となる[26]。しかし、従来の動脈硬化モデルは、動物実験に関する倫理的・福祉的問題が生じるほか、低比重リポ蛋白 (LDL) コレステロールの分布などがヒトとは異なる特徴を有している[27]–[29]などヒトへの外挿に注意を必要とする。そのため、よりヒトに近い動脈硬化を発症するモデル動物を作製する目的で、マイクロミニピッグが注目されている[20], [22]。

マイクロミニピッグでは、マイクロ流路血栓形成能解析装置 Total Thrombus Formation Analysis System: T-TAS®で測定した白色血栓形成時間がヒトより短いことが報告され、マイクロミニピッグが強い血栓形成傾向を持つことが報告されている[72]。また脂質代謝に関しても、コレステロール分画を調べることにより、マイクロミニピッグがヒトや家畜豚で観察されるように、高い LDL コレステロール値を持つことが示されている[73]。そのため、高脂肪・高コレステロール食（脂肪 12%、コレステロール 5%、コール酸ナトリウム 0.7%）を 12 週間与えたマイクロミニピッグでは、高コレステロール血症と動脈硬化性病変が誘発される[74], [75]。

そこで第 3 章では、新たな動脈硬化モデル動物の血栓傾向を評価することを目的として、投与する食餌性コレステロールの量を変えて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 の関連性について検討した。

第2節 実験材料および方法

3-2-1 試供動物

本研究には、マイクロミニピッグ（富士マイクラ株式会社）4カ月齢、雄25頭を使用した。鹿児島大学動物実験施設において、飼育環境の温度を $24\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度を $50\pm 20\%$ 、人工照明により12時間の明暗サイクルで動物を飼養し、給水は自由にできるようにした。約2週間の馴化期間を経た後、25頭を無作為に5頭ずつ5群に分けた。コントロール群には、普通食（ND：通常飼料、Kodakara 73、日清丸紅飼料株式会社、東京）を給餌した。普通食は、9.0%以下の炭水化物、15.0%以上のタンパク質、2.0%以上の脂肪、9.0%以下の繊維で構成されている。実験群は、高脂肪食（12% 純正ラード、ミヨシ油脂株式会社、大阪）に加え、コレステロール（和光純薬工業株式会社、大阪）の投与量を、低濃度（Low, 0.2%）、中濃度（Mid, 0.5%）、高濃度（High, 1.5%）に設定して給餌する3群と、高濃度群に0.7%コール酸ナトリウム（sodium cholate）（和光純薬工業株式会社、大阪）を給餌する群（High+SC）に分けた。5群それぞれに体重の1.6~3%量を朝1回、8週間給餌した。

本研究における動物の取り扱い、鹿児島大学で定められた全ての関連指針に沿って行い、動物に与える苦痛を最小限に抑えるための措置を取った。

3-2-2 血液検査

食餌負荷 8 週間後にマイクロミニピッグ全頭から前大静脈洞より採血し、HMGB1 ELISA Kit II (Shino-test) を用いて、キットの常法に従い血清 HMGB1 を測定した。白色血栓形成の解析は、マイクロ流路血栓形成能解析装置 Total thrombus-formation analysis system: T-TAS® (藤森工業株式会社、東京) を用いて行った。血液は 3.2%クエン酸ナトリウム (sodium citrate) を含むチューブに採取し、T-TAS のマイクロチップに適用する直前に、1.25 mg/ml のコーントリプシン阻害剤を含む 20 μ l の 0.3 M CaCl₂ と混合した。血液とコーントリプシン阻害剤の混合物は、マイクロ流路内部をコラーゲンと組織トロンボプラスチンで固相化したマイクロチップに 10 μ l/min の速度で灌流した。白色血栓の形成がコーティング表面に広がるに伴い、マイクロチップ流路が徐々に閉塞し流圧上昇が観察された。白色血栓によって流路が完全に閉塞していることを表す流圧 80 kPa (T80) に達するまでの時間を測定した (図 16)。

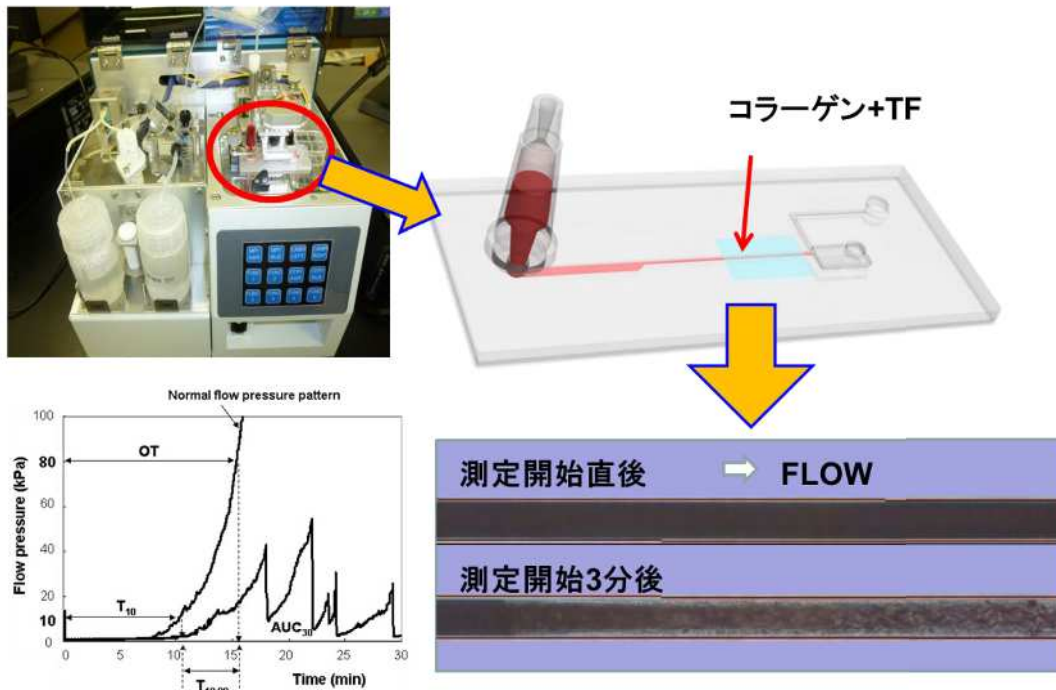


図 16 T-TAS による血栓形成能評価

T-TAS 本体チップ（左上赤丸部分）のリザーバーに血液を入れ、圧力をかけマイクロチップに血液を流す（右上）。マイクロ流路内にはコラーゲンと組織因子（TF）が固相化された部分があり、そこで血流依存性に白色血栓が形成される。血栓形成過程は、マイクロスコープによる、白色血栓画像を視覚的に評価することができる。右下は、実際に血栓ができる過程の典型的な写真。同時にリザーバーにかかる圧を計測し、血栓形成に伴い圧が上昇し、圧上昇曲線が見られる（左下）。

3-2-3 統計処理

統計処理は Prism 7.0 と JMP13.0 を用いて行い、結果は平均 ± 標準誤差で示した。3 群以上には、one-way analysis of variance (one-way ANOVA)を用いて比較した後、相関分析にはスピアマンの順位相関係数を使用した。全ての解析において、危険率 (P) が 5%未満の場合を有意差ありとした。

第3節 実験結果

3-3-1 コレステロール負荷による血清 HMGB1 濃度変化

コントロール群と比較して、コレステロール負荷群では、投与コレステロール濃度に依存して血清 HMGB1 濃度が増加した。コントロール群の血清 HMGB1 濃度はすべて同程度の値を示したが、コレステロール負荷群では、血清 HMGB1 濃度に大きなばらつきが見られ、特に High+SC 群では2頭のマイクロミニピッグにおいて明らかな高値を示した（図 17）。

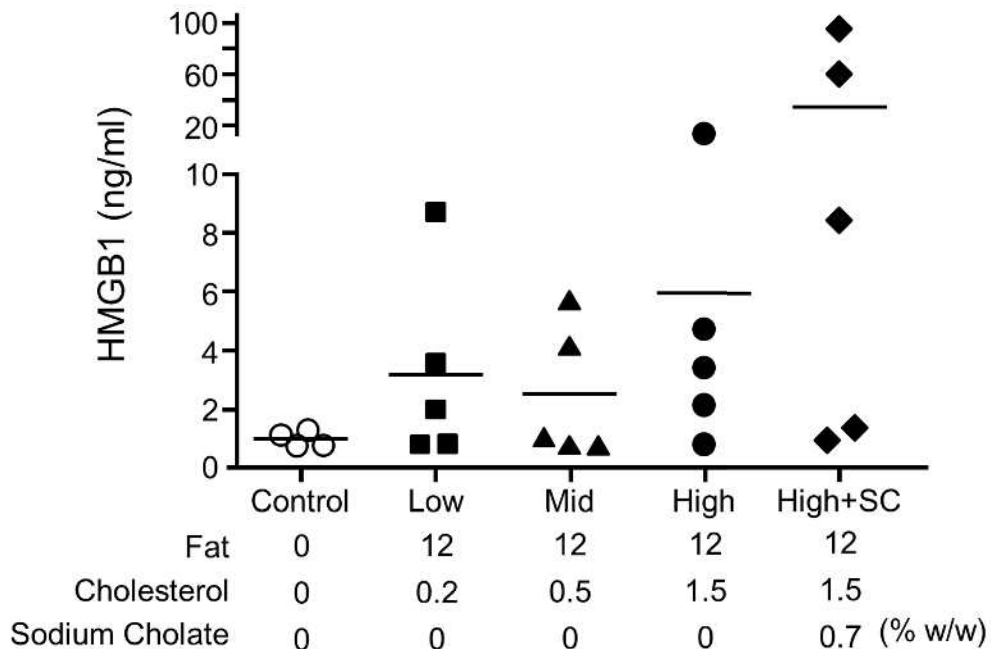


図 17 コレステロール負荷による血清 HMGB1 濃度変化

マイクロミニピッグのコントロール群には普通食を、試験群には高脂肪食 (Fat 12%) に加え、コレステロールを低濃度 (Low、0.2%)、中濃度 (Mid、0.5%)、高濃度 (High、1.5%) 給餌し、さらに一部のマイクロミニピッグには高濃度コレステロールに加えて 0.7% コール酸ナトリウム (High+SC) を給餌した。給餌 8 週間後に血清 HMGB1 濃度を測定した。図中の横棒は各群の平均値を表す。N = 4 - 5。

3-3-2 コレステロール負荷による白色血栓形成の変化

コントロール群と比較して、コレステロール負荷群では、白色血栓形成時間に有意な変化は認められなかったが、中濃度負荷群 (Mid) と高濃度+コール酸ナトリウム負荷群 (High+SC) において白色血栓形成時間の短縮を示す個体が存在することが確認された (図 18)。

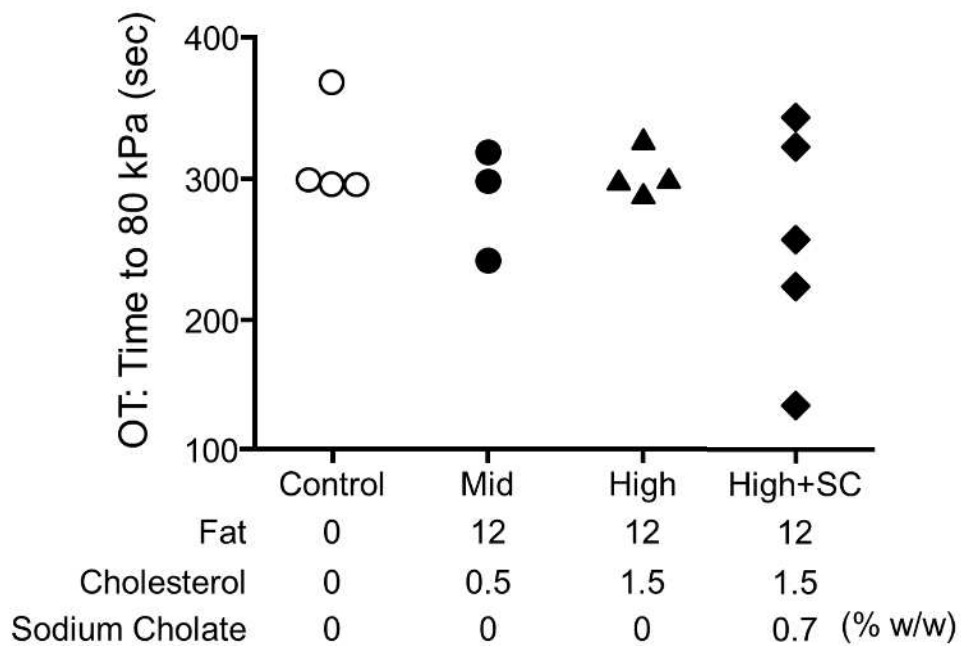


図 18 コレステロール負荷による白色血栓形成時間の変化

マイクロミニピッグのコントロール群には普通食を、試験群には高脂肪食 (Fat 12%) に加え、コレステロールを中濃度 (Mid、0.5%) または高濃度 (High、1.5%) 給餌し、さらに一部のマイクロミニピッグには高濃度コレステロールに加えて 0.7% コール酸ナトリウム (High+SC) を給餌した。給餌 8 週間後に白色血栓解析装置を用いて、血栓により流路が閉鎖し流圧が 80 kPa に達するまでの閉塞時間 (OT) を測定した。N = 3 - 5。

3-3-3 血清中 HMGB1 濃度と白色血栓形成時間との相関

マイクロミニピッグへのコレステロール負荷による血清中 HMGB1 濃度と白色血栓形成時間の相関関係について解析したところ、血清中 HMGB1 濃度と白色血栓形成時間には有意な負の相関が見られた（図 19、 $r = 0.835$ 、 $p < 0.0001$ ）。

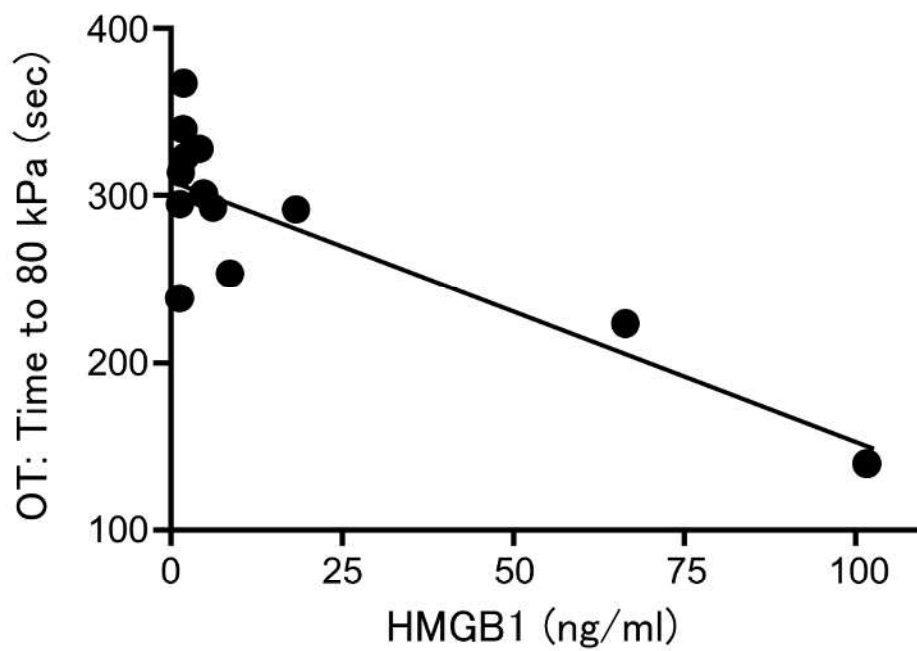


図 19 コレステロール負荷による血清 HMGB1 濃度と白色血栓形成時間の関係

血清 HMGB1 濃度と白色血栓形成時間 (OT) には負の相関が認められた。

第4節 考察

本研究は、マイクロミニピッグの動脈硬化動物モデルを用いて HMGB1 と血栓形成の関連を示した初めての報告である。マイクロミニピッグによる動脈硬化病変は、病理学的および病態学的にヒトと類似しており、マイクロミニピッグでは短期間で病変を誘導できるため、今後、動脈硬化の病態を研究する上で有用なモデルの一つになると考えられる。

3-4-1 マイクロミニピッグにおける血清 HMGB1 濃度と血栓の関係

HMGB1 は核内非ヒストン DNA 結合タンパク質であり、ヌクレオソーム形成を安定化させる。また HMGB1 は、p53 や NF- κ B などの転写因子の発現に必須の役割を果たすことが報告されている[76], [77]。HMGB1 は、活性化した単核食細胞や壊死した細胞から放出された場合には炎症性サイトカインとして機能し、炎症反応や免疫反応を誘発する[70], [78]–[80]。また、細胞から放出された HMGB1 は、IL-1 β や TNF α などの炎症性サイトカインの放出を誘導することで炎症を促進させることも報告されている[70]。

HMGB1 は血栓形成を介して動脈硬化を誘発すると考えられており、組織因子を誘導し、凝固に関わる止血反応を促進することが報告されている[71]。そのため、HMGB1 が局所的かつ慢性的に増加すると動脈硬化を引き起こす可能性が高くなる。ヒトの動脈硬化病巣における HMGB1 の過剰発現を確認した報告[81]を考えると、高脂血症誘発性マイクロミニピッグにおける血清 HMGB1 濃度と血栓形成時間には負の相関があるという今回の結果は、ヒトの動脈硬化患者にも展開できる可能性がある。

3-4-2 動脈硬化性プラーク形成における HMGB1 の役割

動脈硬化は、高血圧、高血糖、高脂血症などにより促進されることが知られているが、血清 LDL コレステロール値や HMGB1 値の上昇などの初期症状を把握することは、無症状の患者の動脈硬化進行予防に有用である。これまでの研究で、LDL コレステロールを取り込んだ血管内膜の単球である泡沫細胞と遊離コレステロールが粥腫性プラークを形成し、このプラークに凝集した単球が HMGB1 を過剰発現していることが明らかとされている[82]。この報告と同様に、マイクロミニピッグを用いた本研究においても、コレステロール負荷により血清 HMGB1 値が上昇することが確認され、コレステロールと HMGB1 の関連性が示唆された。この結果は、血清 HMGB1 値を測定することで早期動脈硬化の検出が可能であることを示唆している。さらに、マイクロ流路血栓形成能解析装置 (T-TAS) を用いた測定結果から、コレステロール負荷により HMGB1 レベルが上昇した血液では、混合白色血栓形成により毛細管が閉塞するまでの時間が短縮された。このことは、血清 HMGB1 が動脈硬化性プラーク形成における血栓誘導因子のひとつとして機能していることを示唆している。

一方、本研究においては、HMGB1 の増加は、高コレステロールを摂取したマイクロミニピッグの一部でしか観察されなかった。これは、本実験における観察期間が短かったことが一因と考えられる。また、本研究では生きた動物モデルを観察したため、マイクロミニピッグの血中に存在する血栓を評価することができなかった。これらの問題点を軽減し、本実験で得られた知見を確認するためには、さらなる研究が必要である。

3-4-4 結論 (総括)

本研究では、新たな動脈硬化モデル動物の作出を目的として、投与する食餌性コレステロールの量を変えて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、T-TAS を用いて検討した。その結果、T-TAS を用いた血栓形成解析システムがマイクロミニピッグの血栓形成の評価に有用であり、血清 HMGB1 濃度の上昇が血栓形成に関与することが明らかとなった。

第4章 総合考察

ヒトと動物の健康と環境の健全性は、相互に密接につながり、強く影響し合っている一つのものであるというワンヘルスという概念がある。最近ではこのワンヘルスの考えから生まれた、医学と獣医学の垣根を取り払った研究分野として「汎動物学 (Zoobiquity)」という言葉が生まれている。一方、医学と獣医学分野における橋渡し研究「トランスレーショナルリサーチ」は、ヒトと動物の両観点から重要性が認識されており、たとえば倫理的な問題で容易に入手できないヒトサンプルを動物代替モデルに求めるなど、医療の発展に貢献できる研究手法として注目を集めている。そこで本研究では、イヌとブタという異種の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の確認を目的として、ヒト乳癌に関してイヌ乳腺腫瘍モデルを使用した研究を行い、動脈硬化症に関してマイクロミニピッグ動脈硬化モデルを使用した研究を行った。

第2章では、ヒト乳癌のトランスレーショナルモデルとしても注目されるイヌ乳腺腫瘍組織において、ヒト乳癌を含む多くの腫瘍で発現上昇が観察される PP2A 阻害タンパク質である SET が高発現していることが明らかとなった。さらにはがん化により SET の発現が上昇し、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、イヌ乳腺腫瘍の細胞増殖を抑制し、さらに転移巣由来の細胞株では原発巣とは異なり、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 の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。ヒト乳癌治療にも使用される doxorubicin

に対して SET 発現抑制は抵抗性を示し、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、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 3 章では、新たな動脈硬化モデル動物の作出を目的として、投与する食餌性コレステロールの量を変えて動脈硬化を誘発したマイクロミニピッグの有用性を検討した。ヒトの動脈硬化の一般的なリスク因子として、高脂血症の他に注目されている長期的かつ局所的な炎症誘発因子である HMGB1 と血栓形成との関連性について検討した結果、ヒトと同じよう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。初期兆候の現れにくいヒトの動脈硬化の血栓形成評価への外挿に、血清 HMGB1 濃度を測定することで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を研究する上で有用なモデルとなりうることを示された。

現在、多くのヒトの腫瘍において観察され、その予後とも関連性が指摘される PP2A 阻害因子の 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、獣医療だけでなくヒト医療の分野でもトランスレーショナルリサーチとしての発展においての意義が大きい。

引用文献

- [1] M. Inoue and K. Sugiura, “Analysis of Life Expectancy and Causes of Death of Dogs and Cats in Japan Based on Veterinary Medical Record Data.,” *J Jpn Vet Med Assoc*, vol. 75, no. 6, pp. e128–e133, 2022, doi: 10.12935/jvma.75.e128.
- [2] A. Irie, C. Kita, and T. Ishida, “An Epidemiological Survey of Neoplastic Diseases in Dogs and Cats at 26 Primary Care Veterinary Hospitals in Japan.,” *J Jpn Vet Med Assoc*, vol. 69, no. 8, pp. 468–473, 2016, doi: 10.12935/jvma.69.468.
- [3] information cancer, “最新がん統計,” がん情報サービス. https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html
- [4] M. Vascellari, K. Capello, A. Carminato, C. Zanardello, E. Baioni, and F. Mutinelli, “Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer,” *Prev. Vet. Med.*, vol. 126, pp. 183–189, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.02.008.
- [5] J. Rodríguez, Á. Santana, P. Herráez, D. R. Killick, and A. E. de Los Monteros, “Epidemiology of canine mammary tumours on the Canary Archipelago in Spain,” *BMC Vet. Res.*, vol. 18, no. 1, p. 268, Jul. 2022, doi: 10.1186/s12917-022-03363-9.
- [6] S. Fukumoto *et al.*, “L-type amino acid transporter 1 (LAT1): A new therapeutic target for canine mammary gland tumour,” *Vet. J.*, vol. 198, no. 1, pp. 164–169, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.tvjl.2013.06.016.
- [7] A. Toss and M. Cristofanilli, “Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer,” *Breast Cancer Res. BCR*, vol. 17, p. 60, Apr. 2015, doi: 10.1186/s13058-015-0560-9.
- [8] N. Sleenckx, H. de Rooster, E. J. B. Veldhuis Kroeze, C. Van Ginneken, and L. Van Brantegem, “Canine mammary tumours, an overview,” *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.*, vol. 46, no. 6, pp. 1112–1131, Dec. 2011, doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01816.x.
- [9] Q. Zhang and F. X. Claret, “Phosphatases: the new brakes for cancer development?,” *Enzyme Res.*, vol. 2012, p. 659649, 2012, doi: 10.1155/2012/659649.
- [10] V. Janssens and J. Goris, “Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling,”

Biochem. J., vol. 353, no. Pt 3, pp. 417–439, Feb. 2001, doi: 10.1042/0264-6021:3530417.

[11] F. Liu, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, and C.-X. Gong, “Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 22, no. 8, pp. 1942–1950, Oct. 2005, doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04391.x.

[12] W. Chen, Z. Wang, C. Jiang, and Y. Ding, “PP2A-Mediated Anticancer Therapy,” *Gastroenterol. Res. Pract.*, vol. 2013, p. 675429, 2013, doi: 10.1155/2013/675429.

[13] M. Ciccone, G. A. Calin, and D. Perrotti, “From the Biology of PP2A to the PADs for Therapy of Hematologic Malignancies,” *Front. Oncol.*, vol. 5, p. 21, 2015, doi: 10.3389/fonc.2015.00021.

[14] D. J. Christensen *et al.*, “SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target,” *Blood*, vol. 118, no. 15, pp. 4150–4158, Oct. 2011, doi: 10.1182/blood-2011-04-351072.

[15] M. Janghorban *et al.*, “Targeting c-MYC by antagonizing PP2A inhibitors in breast cancer,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 25, pp. 9157–9162, Jun. 2014, doi: 10.1073/pnas.1317630111.

[16] G. B. Gelaleti, B. V. Jardim, C. Leonel, M. G. Moschetta, and D. A. P. de C. Zuccari, “Interleukin-8 as a prognostic serum marker in canine mammary gland neoplasias,” *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 146, no. 2, pp. 106–112, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.vetimm.2012.02.005.

[17] F. L. Queiroga, T. Raposo, M. I. Carvalho, J. Prada, and I. Pires, “Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings,” *Vivo Athens Greece*, vol. 25, no. 3, pp. 455–465, 2011.

[18] A. Raffo-Romero *et al.*, “Establishment and characterization of canine mammary tumoroids for translational research,” *BMC Biol.*, vol. 21, no. 1, p. 23, Feb. 2023, doi: 10.1186/s12915-023-01516-2.

[19] R. L. Nance, A. M. Sajib, and B. F. Smith, “Canine models of human cancer: Bridging the gap to improve precision medicine,” *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 189, no. 1, pp. 67–99, 2022, doi: 10.1016/bs.pmbts.2021.12.003.

[20] H. Kawaguchi *et al.*, “Reference values of hematological and biochemical parameters for the world smallest microminipigs,” *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 74, no. 7, pp. 933–936, Jul. 2012, doi: 10.1292/jvms.11-0571.

- [21] O. Svendsen, "The minipig in toxicology," *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Ges. Toxikol. Pathol.*, vol. 57, no. 5–6, pp. 335–339, Jul. 2006, doi: 10.1016/j.etp.2006.03.003.
- [22] N. Kaneko, K. Itoh, A. Sugiyama, and Y. Izumi, "Microminipig, a non-rodent experimental animal optimized for life science research: preface," *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 115, no. 2, pp. 112–114, 2011, doi: 10.1254/jphs.10r16fm.
- [23] O. World Health, "The top 10 causes of death," *World Health Organization*. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death#>
- [24] G. Egusa *et al.*, "Influence of the extent of westernization of lifestyle on the progression of preclinical atherosclerosis in Japanese subjects," *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 9, no. 6, pp. 299–304, 2002, doi: 10.5551/jat.9.299.
- [25] H. Ministry, "性別に見た死亡順位," 厚生労働省. https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei17/dl/10_h6.pdf
- [26] J. R. Turk, K. K. Henderson, G. D. Vanvickle, J. Watkins, and M. H. Laughlin, "Arterial endothelial function in a porcine model of early stage atherosclerotic vascular disease," *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 86, no. 5, pp. 335–345, Oct. 2005, doi: 10.1111/j.0959-9673.2005.00446.x.
- [27] R. L. Reddick, S. H. Zhang, and N. Maeda, "Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression," *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.*, vol. 14, no. 1, pp. 141–147, Jan. 1994, doi: 10.1161/01.atv.14.1.141.
- [28] M. Shiomi, T. Ito, T. Tsukada, T. Yata, and M. Ueda, "Cell compositions of coronary and aortic atherosclerotic lesions in WHHL rabbits differ. An immunohistochemical study," *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.*, vol. 14, no. 6, pp. 931–937, Jun. 1994, doi: 10.1161/01.atv.14.6.931.
- [29] S. M. Schwartz, Z. S. Galis, M. E. Rosenfeld, and E. Falk, "Plaque rupture in humans and mice," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 27, no. 4, pp. 705–713, Apr. 2007, doi: 10.1161/01.ATV.0000261709.34878.20.
- [30] S. S. Pinho, S. Carvalho, J. Cabral, C. A. Reis, and F. Gärtner, "Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis," *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.*, vol. 159, no. 3, pp. 165–172, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.trsl.2011.11.005.
- [31] H.-Y. Lim *et al.*, "Effects of Obesity and Obesity-Related Molecules on Canine Mammary Gland Tumors," *Vet. Pathol.*, vol. 52, no. 6, pp. 1045–1051, Nov. 2015, doi: 10.1177/0300985815579994.

- [32] F. L. Queiroga, M. D. Pérez-Alenza, G. Silvan, L. Peña, C. Lopes, and J. C. Illera, "Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 94, no. 1–3, pp. 181–187, Feb. 2005, doi: 10.1016/j.jsbmb.2004.12.014.
- [33] D. Perrotti and P. Neviani, "Protein phosphatase 2A: a target for anticancer therapy," *Lancet Oncol.*, vol. 14, no. 6, pp. e229-238, May 2013, doi: 10.1016/S1470-2045(12)70558-2.
- [34] K. Hahn, M. Miranda, V. A. Francis, J. Vendrell, A. Zorzano, and A. A. Teleman, "PP2A regulatory subunit PP2A-B' counteracts S6K phosphorylation," *Cell Metab.*, vol. 11, no. 5, pp. 438–444, May 2010, doi: 10.1016/j.cmet.2010.03.015.
- [35] T. Zhang *et al.*, "PHF20 regulates NF- κ B signalling by disrupting recruitment of PP2A to p65," *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 2062, 2013, doi: 10.1038/ncomms3062.
- [36] M. von Lindern, S. van Baal, J. Wiegant, A. Raap, A. Hagemeijer, and G. Grosveld, "Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 12, no. 8, pp. 3346–3355, Aug. 1992, doi: 10.1128/mcb.12.8.3346-3355.1992.
- [37] S. Saito, M. Miyaji-Yamaguchi, T. Shimoyama, and K. Nagata, "Functional domains of template-activating factor-I as a protein phosphatase 2A inhibitor," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 259, no. 2, pp. 471–475, Jun. 1999, doi: 10.1006/bbrc.1999.0790.
- [38] R. Yabe, N. Fujiwara, T. Mizuno, T. Usui, T. Ohama, and K. Sato, "Characterization of SET/I2PP2A isoforms in dogs," *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 76, no. 9, pp. 1235–1240, Sep. 2014, doi: 10.1292/jvms.14-0209.
- [39] K. U. Sorenmo, R. Rasotto, V. Zappulli, and M. H. Goldschmidt, "Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms," *Vet. Pathol.*, vol. 48, no. 1, pp. 85–97, Jan. 2011, doi: 10.1177/0300985810389480.
- [40] R. Uyama, T. Nakagawa, S.-H. Hong, M. Mochizuki, R. Nishimura, and N. Sasaki, "Establishment of four pairs of canine mammary tumour cell lines derived from primary and metastatic origin and their E-cadherin expression," *Vet. Comp. Oncol.*, vol. 4, no. 2, pp. 104–113, Jun. 2006, doi: 10.1111/j.1476-5810.2006.00098.x.

- [41] S. Enjoji *et al.*, “The therapeutic effects of SET/I2PP2A inhibitors on canine melanoma,” *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 77, no. 11, pp. 1451–1456, Nov. 2015, doi: 10.1292/jvms.15-0193.
- [42] T. Ohama and D. L. Brautigan, “Endotoxin conditioning induces VCP/p97-mediated and inducible nitric-oxide synthase-dependent Tyr284 nitration in protein phosphatase 2A,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 12, pp. 8711–8718, Mar. 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.099788.
- [43] O. J. Scully, B.-H. Bay, G. Yip, and Y. Yu, “Breast cancer metastasis,” *Cancer Genomics Proteomics*, vol. 9, no. 5, pp. 311–320, Oct. 2012.
- [44] W. Weiss, “Tumor doubling time,” *Chest*, vol. 79, no. 5, pp. 612–613, May 1981, doi: 10.1378/chest.79.5.612b.
- [45] P. Neviani *et al.*, “PP2A-activating drugs selectively eradicate TKI-resistant chronic myeloid leukemic stem cells,” *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 10, pp. 4144–4157, Oct. 2013, doi: 10.1172/JCI68951.
- [46] W. Zhang *et al.*, “Paclitaxel resistance in MCF-7/PTX cells is reversed by paeonol through suppression of the SET/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 12, no. 1, pp. 1506–1514, Jul. 2015, doi: 10.3892/mmr.2015.3468.
- [47] R. Zoncu, A. Efeyan, and D. M. Sabatini, “mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 12, no. 1, pp. 21–35, Jan. 2011, doi: 10.1038/nrm3025.
- [48] Z. Zhao *et al.*, “Nestin positively regulates the Wnt/ β -catenin pathway and the proliferation, survival and invasiveness of breast cancer stem cells,” *Breast Cancer Res. BCR*, vol. 16, no. 4, p. 408, Jul. 2014, doi: 10.1186/s13058-014-0408-8.
- [49] S. M. Smith, Y. L. Lyu, and L. Cai, “NF- κ B affects proliferation and invasiveness of breast cancer cells by regulating CD44 expression,” *PloS One*, vol. 9, no. 9, p. e106966, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0106966.
- [50] A. Mitra *et al.*, “DNAJB6 chaperones PP2A mediated dephosphorylation of GSK3 β to downregulate β -catenin transcription target, osteopontin,” *Oncogene*, vol. 31, no. 41, pp. 4472–4483, Oct. 2012, doi: 10.1038/onc.2011.623.
- [51] J. Chen, B. L. Martin, and D. L. Brautigan, “Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation,” *Science*, vol. 257, no. 5074, pp. 1261–1264, Aug. 1992, doi: 10.1126/science.1325671.

- [52] M. Chang, “Tamoxifen resistance in breast cancer,” *Biomol. Ther.*, vol. 20, no. 3, pp. 256–267, May 2012, doi: 10.4062/biomolther.2012.20.3.256.
- [53] H. Liu *et al.*, “SET-mediated NDRG1 inhibition is involved in acquisition of epithelial-to-mesenchymal transition phenotype and cisplatin resistance in human lung cancer cell,” *Cell. Signal.*, vol. 26, no. 12, pp. 2710–2720, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.cellsig.2014.08.010.
- [54] L.-M. Tseng, C.-Y. Liu, K.-C. Chang, P.-Y. Chu, C.-W. Shiau, and K.-F. Chen, “CIP2A is a target of bortezomib in human triple negative breast cancer cells,” *Breast Cancer Res. BCR*, vol. 14, no. 2, p. R68, Apr. 2012, doi: 10.1186/bcr3175.
- [55] C.-H. Zhou *et al.*, “[Inhibition of proliferation in MCF-7 breast cancer cells by plasmid-based siRNA targeting to oncogene c-myc],” *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, vol. 39, no. 3, pp. 373–377, May 2008.
- [56] H. Liu *et al.*, “Overexpression of PP2A inhibitor SET oncoprotein is associated with tumor progression and poor prognosis in human non-small cell lung cancer,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 17, pp. 14913–14925, Jun. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.3818.
- [57] J. He *et al.*, “siRNA-Mediated Suppression of Synuclein γ Inhibits MDA-MB-231 Cell Migration and Proliferation by Downregulating the Phosphorylation of AKT and ERK,” *J. Breast Cancer*, vol. 17, no. 3, pp. 200–206, Sep. 2014, doi: 10.4048/jbc.2014.17.3.200.
- [58] R. T. Peterson, B. N. Desai, J. S. Hardwick, and S. L. Schreiber, “Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 8, pp. 4438–4442, Apr. 1999, doi: 10.1073/pnas.96.8.4438.
- [59] D. E. Costea, L. Gammon, K. Kitajima, L. Harper, and I. C. Mackenzie, “Epithelial stem cells and malignancy,” *J. Anat.*, vol. 213, no. 1, pp. 45–51, Jul. 2008, doi: 10.1111/j.1469-7580.2008.00895.x.
- [60] R. Rincón *et al.*, “PP2A inhibition determines poor outcome and doxorubicin resistance in early breast cancer and its activation shows promising therapeutic effects,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 6, pp. 4299–4314, Feb. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.3012.
- [61] N. Fujiwara *et al.*, “A potential therapeutic application of SET/I2PP2A inhibitor OP449 for canine T-cell lymphoma,” *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 75, no. 3, pp. 349–354, 2013, doi: 10.1292/jvms.12-0366.
- [62] I. Cristóbal *et al.*, “Deregulation of the PP2A inhibitor SET shows promising therapeutic implications and determines poor clinical outcome in patients

with metastatic colorectal cancer,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 21, no. 2, pp. 347–356, Jan. 2015, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0724.

[63] R. S. Go and A. A. Adjei, “Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 17, no. 1, pp. 409–422, Jan. 1999, doi: 10.1200/JCO.1999.17.1.409.

[64] F. Yang, S. S. Teves, C. J. Kemp, and S. Henikoff, “Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1845, no. 1, pp. 84–89, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.bbcan.2013.12.002.

[65] P. Maiso *et al.*, “The synergy of panobinostat plus doxorubicin in acute myeloid leukemia suggests a role for HDAC inhibitors in the control of DNA repair,” *Leukemia*, vol. 23, no. 12, pp. 2265–2274, Dec. 2009, doi: 10.1038/leu.2009.182.

[66] N. Shikama *et al.*, “Functional interaction between nucleosome assembly proteins and p300/CREB-binding protein family coactivators,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 23, pp. 8933–8943, Dec. 2000, doi: 10.1128/MCB.20.23.8933-8943.2000.

[67] S. B. Seo, P. McNamara, S. Heo, A. Turner, W. S. Lane, and D. Chakravarti, “Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein,” *Cell*, vol. 104, no. 1, pp. 119–130, Jan. 2001, doi: 10.1016/s0092-8674(01)00196-9.

[68] K. Wouters, R. Shiri-Sverdlov, P. J. van Gorp, M. van Bilsen, and M. H. Hofker, “Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoe and ldlr mice,” *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 43, no. 5, pp. 470–479, 2005, doi: 10.1515/CCLM.2005.085.

[69] L. A. Campbell and M. E. Rosenfeld, “Infection and Atherosclerosis Development,” *Arch. Med. Res.*, vol. 46, no. 5, pp. 339–350, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.arcmed.2015.05.006.

[70] B. Lu *et al.*, “Molecular mechanism and therapeutic modulation of high mobility group box 1 release and action: an updated review,” *Expert Rev. Clin. Immunol.*, vol. 10, no. 6, pp. 713–727, Jun. 2014, doi: 10.1586/1744666X.2014.909730.

[71] T. Ito and I. Maruyama, “Thrombomodulin: protectorate God of the vasculature in thrombosis and inflammation,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 9, no. s1, pp. 168–173, 2011, doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04319.x.

[72] N. Miura *et al.*, “Coagulation activity and white thrombus formation in the microminipig,” *Vivo Athens Greece*, vol. 27, no. 3, pp. 357–361, Jun. 2013.

- [73] H. Kawaguchi *et al.*, “Sex differences of serum lipid profile in novel microminipigs,” *Vivo Athens Greece*, vol. 27, no. 5, pp. 617–621, Oct. 2013.
- [74] N. Miyoshi *et al.*, “Novel microminipig model of atherosclerosis by high fat and high cholesterol diet, established in Japan,” *Vivo Athens Greece*, vol. 24, no. 5, pp. 671–680, Oct. 2010.
- [75] H. Kawaguchi *et al.*, “Rapid development of atherosclerosis in the world’s smallest Microminipig fed a high-fat/high-cholesterol diet,” *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 21, no. 3, pp. 186–203, 2014, doi: 10.5551/jat.21246.
- [76] U. Andersson, H. Erlandsson-Harris, H. Yang, and K. J. Tracey, “HMGB1 as a DNA-binding cytokine,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 72, no. 6, pp. 1084–1091, Dec. 2002.
- [77] S. Müller, L. Ronfani, and M. E. Bianchi, “Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function,” *J. Intern. Med.*, vol. 255, no. 3, pp. 332–343, Mar. 2004, doi: 10.1111/j.1365-2796.2003.01296.x.
- [78] H. E. Harris and A. Raucchi, “Alarmin(g) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1,” *EMBO Rep.*, vol. 7, no. 8, pp. 774–778, Aug. 2006, doi: 10.1038/sj.embor.7400759.
- [79] P. Scaffidi, T. Misteli, and M. E. Bianchi, “Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation,” *Nature*, vol. 418, no. 6894, pp. 191–195, Jul. 2002, doi: 10.1038/nature00858.
- [80] R. Palumbo *et al.*, “Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation,” *J. Cell Biol.*, vol. 164, no. 3, pp. 441–449, Feb. 2004, doi: 10.1083/jcb.200304135.
- [81] N. Kalinina *et al.*, “Increased expression of the DNA-binding cytokine HMGB1 in human atherosclerotic lesions: role of activated macrophages and cytokines,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, no. 12, pp. 2320–2325, Dec. 2004, doi: 10.1161/01.ATV.0000145573.36113.8a.
- [82] P. Kanellakis *et al.*, “High-mobility group box protein 1 neutralization reduces development of diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, no. 2, pp. 313–319, Feb. 2011, doi: 10.1161/ATVBAHA.110.218669.

謝辞

本論文の作成を進めるにあたり、ご指導並びにご助言を賜った山口大学 大学院 共同獣医学研究科 生体機能学講座の佐藤晃一 教授、大浜剛 准教授、鹿児島大学 共同獣医学部 基礎獣医学講座の宮本篤 教授、白石光也 教授、鹿児島大学 共同獣医学部 動物病院の三浦直樹 教授に心より厚く感謝の意を表します。またサンプルの提供や実験のご協力を賜りました東京大学大学院 農学生命科学研究科の中川貴之准 教授、National Chung Hsing University (国立中興大學) Department of Veterinary Medicine の Professor Chang, Shih-Chieh (張 仕杰)、Associate Professor Liu, Hao-Ping (劉 浩屏)、東京農工大学 農学部 共同獣医学科の臼井達哉 特任講師、たきた動物病院の田中由依子 院長、鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科の谷本昭英 教授、北里大学 獣医学部 獣医学科の川口博明 教授、鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科の永里朋香 特任研究員、株式会社新日本科学の山田知信 様、熊本大学 大学院生命科学研究部 (保) 伊藤隆史 教授、鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科の丸山征郎 特任教授、そして山口大学 共同獣医学部 獣医学科 獣医薬理学分野卒業生の皆様に厚く感謝申し上げます。また、公私ともに山口大学大学院在学中に支えてくださった加計学園の皆様、妻の加計聖をはじめ家族に対して心より感謝いたします。

最後に、本研究で犠牲になった多くの動物たちに深く感謝するとともに、その霊が鎮められるよう心よりお祈り致します。