

Abstract of Doctoral Thesis

Name: Hardany Primarizky

Title: Evaluation of Exportin 1 expression in canine lymphoma cell lines and the antiproliferative effects of the XPO1 inhibitor KPT-335 as a single agent and in combination with doxorubicin or vincristine
(犬リンパ腫細胞株を用いた Exportin 1 の発現と XPO1 阻害剤 KPT-335 の単独およびドキシ
ルビシン・ビンクリスチンとの併用による細胞増殖抑制効果の検討)

Abstract of thesis:

Lymphoma is the most common neoplasm of the lymphoid tissues in dogs and humans. Canine and human lymphoma share many similarities in clinical presentation, molecular characteristics, treatment strategies and therapeutic response. Lymphoma cells rely heavily on protein and RNA transport between the nucleus and cytoplasm because of their high metabolic activity and rapid proliferation.

In recent years, targeted therapies and immunotherapies have emerged to address the challenges of cancer treatment. Among these, Exportin 1 (XPO1) has gained attention as a promising therapeutic target. XPO1 is a major nuclear export receptor responsible for transporting various proteins and RNA species, thereby maintaining cellular homeostasis and regulating key signaling pathways. Overexpression of XPO1 leads to the cytoplasmic mislocalization and functional inactivation of tumor suppressor proteins (TSPs) such as p21, p53, p73, contributing to oncogenesis and tumor progression.

Recent studies have highlighted the potential of XPO1 inhibitors in targeting these pathways to induce apoptosis and inhibit tumor growth. Selective inhibitors of nuclear export (SINE) compounds have been developed to target XPO1 in many hematopoietic and solid tumor studies. They block nuclear-cytoplasmic translocation by preventing the shuttling of intranuclear TSPs into the cytoplasm. This restores the function of TSPs, inducing cell-cycle arrest and apoptosis as well as inhibiting cell proliferation. The efficacy of KPT-335, a SINE compound, has been investigated in cancer studies and has shown significant decreases in cell proliferation at low IC₅₀ values. However, the factors determining susceptibility to KPT-335 remain unclear.

In canine lymphoma, systemic treatments, particularly multi-drug chemotherapy, are the most effective options and have significantly improved quality of life and patient survival; however, most cases eventually relapse and/or develop resistance. Supporting this, human studies have reported enhanced antitumor effects when XPO1 inhibitors are combined with standard chemotherapies, resulting in increased nuclear TSP retention, reduced cell viability, and apoptosis induction. Furthermore, no reports are available regarding their combination with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone (CHOP), a conventional chemotherapy protocol in canine lymphoma.

(About 800 words in English)

Taken together, the entire study investigated XPO1 in canine lymphoma cell lines *in vitro*. First, I evaluated the XPO1 mRNA and protein expression and examined their relevance to KPT-335. Second, I investigated the effects of KPT-335 alone and in combination with the conventional chemotherapeutics, doxorubicin and vincristine.

In chapter 1 of this study, XPO1 mRNA and protein levels were quantified, and the effect of KPT-335 was assessed using a cell proliferation assay. The results indicated that XPO1 mRNA and protein were highly expressed in 17-71, CLBL-1, CLC, CLGL-90, and UL-1, and were moderately expressed in GL-1, Ema, and Nody-1. All canine lymphoma cell lines showed significant dose-dependent growth inhibition and decreased cell viability when treated with KPT-335, with IC₅₀ concentrations ranging from 89.8 to 418 nM. Although XPO1 mRNA and protein expression levels were related, no clear correlation was found between gene/protein expression levels and KPT-335 efficacy. These findings suggest that XPO1 may represent a promising target for therapeutic intervention in canine lymphoma.

In chapter 2, four canine lymphoma cell lines were used in this study: CLBL-1 and GL-1 (B-cell lymphoma), and Nody-1 and UL-1 (T-cell lymphoma). Western blot analysis revealed that KPT-335 treatment reduced XPO1 protein expression in a dose-dependent manner, with proteasome inhibition reversing this effect, suggesting proteasome-mediated degradation. Cell proliferation assays demonstrated that combination treatments significantly inhibited cell growth compared with single-agent therapies. Synergy was quantified using the Chou–Talalay method and showed that GL-1 and UL-1 cells exhibited consistent synergy across all drug combinations, whereas CLBL-1 and Nody-1 showed variable responses. These findings suggest that KPT-335 enhances the efficacy of doxorubicin and vincristine through proteasome-dependent XPO1 degradation. The observed synergistic interactions support the potential integration of KPT-335 into existing chemotherapy protocols for canine lymphoma. KPT-335 also modulated p53 expression in a cell line-dependent manner, whereas p16 expression remained undetectable post-treatment. The differential modulation of p53 underscores the heterogeneity of canine lymphoma and highlights the importance of cellular context in determining therapeutic efficacy. Future studies assessing nuclear versus cytoplasmic distribution, as well as downstream functional consequences, will be necessary.

Taken together, this study clarified that high XPO1 mRNA expression and protein expression, and their correlation suggest that XPO1 may be a promising target for the treatment of canine lymphoma. KPT-335 demonstrated efficacy in canine lymphoma cell lines at nanomolar concentrations, indicating that the range used in this study is clinically achievable. Because drug resistance to conventional chemotherapy has been reported in canine lymphoma, KPT-335 may exert antitumor activity, potentially through proteasome-dependent degradation of XPO1, and enhance the cytotoxic effects of doxorubicin and vincristine.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Hardany Primarizky
審 査 委 員	主 査：山口大学 教 授 谷 健 二
	副 査：鹿児島大学 教 授 遠 藤 泰 之
	副 査：山口大学 教 授 西 垣 一 男
	副 査：山口大学 教 授 水 野 拓 也
	副 査：山口大学 准教授 馬 場 健 司
題 目	Evaluation of Exportin 1 expression in canine lymphoma cell lines and the antiproliferative effects of the XPO1 inhibitor KPT-335 as a single agent and in combination with doxorubicin or vincristine (犬リンパ腫細胞株を用いた Exportin 1 の発現と XPO1 阻害剤 KPT-335 の単独およびドキシソルビシン・ビンクリスチンとの併用による細胞増殖抑制効果の検討)
審査結果の要旨： 犬のリンパ腫は、小動物臨床において発生頻度の高い造血器系腫瘍であり、臨床現場では重要な疾患の一つである。現在、治療の中心は多剤併用化学療法であり、一定の寛解率は得られるものの、再発や薬剤耐性の出現が避けられず、長期的な予後の改善には至っていない。一方、ヒト医療分野では、腫瘍の分子機構に基づいた分子標的治療薬の開発が進み、新たな治療選択肢が臨床応用されているが、犬リンパ腫においてはその分子基盤の解明および治療応用に関する研究は依然として限定的である。 本論文は、犬リンパ腫における新規治療標的の探索を目的として、核外輸送因子 Exportin 1 (XPO1) に着目し、その発現特性ならびに XPO1 阻害剤 KPT-335 (verdinexor) の抗腫瘍効果を <i>in vitro</i> で検討した研究である。XPO1 は多くのがん抑制蛋白を核外へ輸送することでその機能を低下させ、腫瘍細胞の増殖、生存、ならびに治療抵抗性に関与することが知られており、ヒトの血液腫瘍を含む多くのがん種において有望な分子標的として注目されている。 第 1 章では、複数の犬リンパ腫細胞株を用いて、XPO1 の mRNA および蛋白発現を正常細胞と比較し、その発現特性が詳細に解析されている。その結果、多くの犬リンパ腫細胞株において XPO1 が高発現していることが示され、犬リンパ腫においても XPO1 が腫瘍の分子病態に関与している可能性が明らかとなった。さらに、XPO1 阻害剤 KPT-335 の単独投与により、	

すべての犬リンパ腫細胞株において用量依存的な細胞増殖抑制および細胞生存率の低下が認められ、その IC_{50} は nM 濃度域であった。一方、XPO1 の発現量と KPT-335 に対する薬剤感受性との間には明確な相関は認められず、薬剤応答性には細胞周期制御やアポトーシス関連分子など、他の細胞内因子が関与する可能性が示唆された。

第 2 章では、KPT-335 と従来の化学療法薬であるドキソルビシンおよびビンクリスチンとの併用効果について検討が行われている。ウエスタンブロット解析により、KPT-335 投与による XPO1 蛋白量の低下がプロテアソーム依存的に生じることが示され、XPO1 阻害の分子機構の一端が明らかにされた。さらに、細胞増殖試験および Chou-Talalay 法を用いた解析により、特定の犬リンパ腫細胞株において、KPT-335 とドキソルビシンまたはビンクリスチンとの併用が、相加的あるいは相乗的な増殖抑制効果を示すことが確認された。これらの結果は、XPO1 阻害剤が既存の化学療法の抗腫瘍効果を増強し得る可能性を示すものであり、薬剤耐性克服の観点からも重要な知見である。

以上のように、本論文は、犬リンパ腫における XPO1 の分子生物学的役割を明らかにするとともに、XPO1 阻害剤を用いた新規治療戦略の基盤を提示した点で高く評価される。本研究で得られた成果は、犬リンパ腫の分子病態の理解を深化させるのみならず、将来的な分子標的治療の臨床応用や比較腫瘍学の発展にも寄与するものと考えられる。

以上により、本論文は、博士（獣医学）の学位を授与するに値するものと認める。