

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 25 年度博士課程入学

氏 名 茂木 朋貴

指導教員名 辻本 元

論文題目

Studies on the pathophysiological role of CD44 variant isoforms in canine lymphoma (犬のリンパ腫における CD44 variant isoform の病態生理学的役割に関する研究)

リンパ腫は犬において発生頻度の高い悪性腫瘍であり、全ての腫瘍の 7-24% を占める。WHO 分類において、リンパ腫は解剖学的発生部位、組織学的特徴、および免疫学的表現型に基づいて分類される。そのなかでも多中心型高悪性度 B 細胞性リンパ腫は最も症例数が多く、化学療法反応性の高いサブタイプであるが、薬剤耐性の発現が治療に限界をもたらす主要な要因となっている。犬のリンパ腫はその臨床挙動や組織型に関して人のリンパ腫との類似点が多く、人の非ホジキンリンパ腫の自然発生动物モデル系となっている。犬のリンパ腫ではさまざまな化学療法プロトコールが検討されてきたが、シクロフォスファミド、ドキシソルビシン (DXR)、ビンクリスチン (VCR)、およびプレドニゾロンを組み合わせた CHOP プロトコールは最も良好な成績が得られるプロトコールの一つであり、多くの施設で第一選択として用いられている。しかし、同一の病理組織学的特徴を有しているにも関わらず、症例によって化学療法に対する反応性が著しく異なり、同じ病理組織学的サブタイプにおけるさらなる層別化が必要と考えられた。

これまでに p53 遺伝子の変異や P 糖タンパク質の発現が犬のリンパ腫の予後に影響を与えることが報告されているが、これらの因子だけで化学療法反応性や予後を予測することは困難である。そこで本論文では、人においてリンパ腫をはじめ多くの腫瘍の予後と関連し、がん幹細胞での発現が注目されている CD44 variant isoform (CD44v) に着目して一連の研究を行った。

CD44 はヒアルロン酸などの細胞外マトリックスと結合する接着分子であり、リンパ球のホーミングや活性化、細胞接着や細胞運動、癌細胞増殖・転移などに関与することが知られている。CD44 分子としては、通常型の CD44 の他に、選択的スプライシングによって variant exon が挿入された複数の CD44v が存在することが知られている。CD44v は挿入された exon によってさまざまな機能を示すが、その腫瘍細胞における発現は人における複数の腫瘍の治療抵抗性と関連することが報告されている。なかでも、CD44v 高発現の非ホジキンリンパ腫を有する症例は抗がん剤耐性を示すことが多く、CD44v 低発現の症例よりも予後が悪い。また、CD44 は化学療法や放射線治療の後に残存するがん幹細胞に発現するマーカーの一つとしても注目されており、がん幹細胞の治療抵抗性のがんの根治を妨げているもの

と考えられている。

そこで本論文では、犬のリンパ腫における予後予測の改善と新規治療法の開発を将来的な目標として、CD44v 発現量によるリンパ腫症例の層別化を試みた後、リンパ腫におけるその病態生理学的役割について検討を進めた。はじめに第 1 章では、犬のリンパ腫症例における CD44 variant isoform の発現を解析し、その予後との関連を検討した。第 2 章では、犬のリンパ腫細胞において発現している CD44v mRNA の全塩基配列を決定した後、遺伝子導入によって CD44v3-5,7 および CD44v6 を発現させたリンパ腫細胞株における抗がん剤感受性の変化を調べた。最後に第 3 章では、CD44v の発現量の多いリンパ腫細胞における遺伝子発現変化を網羅的に調べ、CD44v の発現を制御している遺伝子を同定するとともに、その発現の予後に与える影響を検討した。

第 1 章：犬のリンパ腫症例において CD44v の発現が予後に与える影響

はじめに、リンパ腫を発症した犬において CD44v の発現量と予後との関連を調査した。多中心型高悪性度 B 細胞性リンパ腫と診断した犬 47 頭のリンパ節より採取した腫瘍細胞における CD44 variant exon 3, 6, 7 の発現量をリアルタイム PCR によって定量し、健常犬のリンパ節における発現量を対照として高発現群と低発現群の 2 群に分類し、CHOP 療法を行った場合の予後を比較した。その結果、いずれの variant exon に関しても、高発現群は低発現群に比べて予後が悪いことが示された。とくに、CD44 variant exon 6 の高発現群における奏効率 (9%) は低発現群における奏効率 (65%) に比べて有意に低いことが明らかとなった ($P<0.01$)。また、CD44 variant exon 6 の高発現群における無増悪生存期間 (Progression-free survival, PFS) (中央値 76 日) は低発現群における PFS (中央値 271 日) よりも有意に短かった ($P<0.01$)。CD44 variant exon 3 と 7 に関しても同様の結果が示された。これら成績から、CD44v の発現が犬のリンパ腫の予後を悪化させることが示され、その病態生理学的役割についてさらに検討する必要があるものと考えられた。

第 2 章：犬のリンパ腫における CD44v の特徴とその抗がん剤耐性との関連

第 1 章においては、各 variant exon の発現量と予後との関係が明らかとなったが、その variant exon を含む完全長 CD44v mRNA の同定はできていない。本章では、CD44 variant exon 3, 6, 7 の発現量が多いリンパ腫症例 4 頭のリンパ節から合計 8 種類の CD44v mRNA を同定し、それらの塩基配列を決定した。これら 8 種類の CD44v のうち、CD44v3-5、CD44v3-5,7、および CD44v6 は 4 症例すべてで検出された。次いで、CD44v3-5,7 および CD44v6 の cDNA を犬のリンパ腫細胞株に導入して発現させ、その機能変化を解析した。その結果、CD44v6 発現細胞株では DXR および VCR に対する感受性が低下したが、CD44v3-5,7 発現細胞株ではこれら抗がん剤に対する感受性の変化は認められなかった。さらに、CD44v6 発現細胞株では HGF 刺激によって p-PDK1 および p-Akt の発現量が増加し、Akt 阻害薬である LY249002 を添加することによって DXR および VCR に対する感受性が回復した。本章での研究を通して、犬のリンパ腫細胞において 8 種類の CD44v mRNA の発現が同定され、そのうち CD44v6 に関しては、その発現によって Akt シグナルの活性化を介した抗がん剤耐性が誘導されることが明らかとなった。

第 3 章：犬のリンパ腫症例の予後と関連する CD44v の発現を制御する因子としての ESRP1 の同定

本章では網羅的な遺伝子発現解析を用い、犬のリンパ腫における CD44v の発現制御機構について検

討を行った。多中心型高悪性度 B 細胞性リンパ腫と診断した症例から CD44v 高発現症例 4 例および低発現症例 5 例を選抜し、cDNA マイクロアレイ解析に供した。マイクロアレイ解析によって CD44v 高発現群と CD44 低発現群を比較し、群間で 2 倍以上かつ有意な ($P < 0.05$) 発現量の差があった遺伝子として 1,249 遺伝子が抽出された。そのうち、612 遺伝子については CD44v 高発現群において発現量が増加しており、637 遺伝子については CD44v 高発現群において発現量が減少していた。発現量に変化していた上位 5 遺伝子について症例ごとに比較したところ、SCML と ESRP1 の 2 遺伝子では CD44v 高発現群 4 頭における最低値が CD44v 低発現群 5 頭における最高値を大きく上回っていた。そこで、ESRP1 の cDNA を犬のリンパ腫細胞株に導入して発現させ、その機能解析を行った。その結果、ESRP1 の発現誘導に伴って CD44v の発現亢進が認められ、VCR および DXR に対する感受性の低下が認められた。さらに、多中心型高悪性度 B 細胞リンパ腫 47 頭に関して、ESRP1 発現量解析および予後調査を行ったところ、ESRP1 高発現群における PFS (中央値 98 日) は ESRP1 低発現群における PFS (中央値 256 日) よりも有意に短かった ($P < 0.01$)。本章での研究により、CD44v 高発現リンパ腫細胞における遺伝子発現変化が明らかとなった。また、ESRP1 は、培養細胞系において CD44v の発現および抗がん剤耐性を誘導し、症例においても予後予測に有用な分子マーカーであることが示された。

本研究により、犬のリンパ腫における CD44v の病態生理学的役割が明らかになった。今後、CD44v6 や ESRP1 の発現量が多い犬のリンパ腫において、Akt 阻害薬を併用した新規治療法の応用が期待され、これにより治療反応性の悪いリンパ腫症例の予後を改善できる可能性が示唆された。また、本研究によって明らかとなった犬のリンパ腫における CD44v 発現量と予後との関連により、同じ病理組織学的サブタイプの症例を分子マーカーによって層別化することが可能となった。

今後、本研究において実施した分子生物学的マーカーに関する解析をさらに進めることによって新たな治療法に関するアイデアが生まれ、臨床現場におけるリンパ腫の予後改善につながることを期待される。本論文における一連の成果は、獣医学分野において遺伝子発現量や遺伝子型の変化に基づいた新たな治療法開発戦略を提供するものであり、臨床獣医学における Precision medicine の発展に貢献するものと考えている。