［ 別 紙 ２ ］

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名　富安　博隆

リンパ腫は犬において最も発生頻度の高い悪性腫瘍の一つであり、一般的な治療法として多剤併用化学療法が選択される。薬剤耐性は、犬のリンパ腫に対する化学療法に限界をもたらす最も重要な要因の一つであり、獣医臨床において大きな問題となっている。そこで本研究では、犬のリンパ腫における薬剤耐性獲得機構の解明を目指して一連の研究を実施した。

第 1 章：犬の多剤耐性リンパ腫における薬剤耐性因子 mRNA の定量解析

本章では薬剤耐性機構に関与する 10 種類の分子に関してそれらをコードする遺伝子の mRNA 量および *p53* 遺伝子の変異に関して、薬剤感受性症例群と薬剤耐性症例群とを比較した。その結果、二群間において、いずれの遺伝子に関しても有意な発現量の差は認められなかった。また、*p53* 遺伝子の変異の頻度に関しても二群間に有意な差は認められなかった。しかし、耐性群のうちの 3 頭においては薬剤排出ポンプである P-glycoprotein (P-gp) をコードする *ABCB1* 遺伝子の過剰発現が認められた。本章における研究から、一部の症例における P-gp の薬剤耐性機構への関与が示唆された。

第 2 章：犬のリンパ系腫瘍細胞における *ABCB1* 遺伝子のエピジェネティック発現制御機構の解析

本章では *ABCB1* 遺伝子発現制御機構として DNA メチル化とヒストン H3 アセチル化の解析を行った。その結果、リンパ系腫瘍細胞株のうち、ビンクリスチン感受性株では耐性株に比べ *ABCB1* 遺伝子の発現量が低く、*ABCB1* 遺伝子 CpG motif の DNA 高メチル化状態およびヒストン H3 の低アセチル化状態が認められた。次に、高悪性度多中心型リンパ腫に罹患した犬 27 頭から採取した腫瘍細胞サンプルに関して、同様の方法で *ABCB1* 遺伝子の DNA メチル化解析を行った。しかしながら、化学療法感受性および耐性のほとんどの症例で *ABCB1* 遺伝子 CpG motif は DNA 低メチル化状態であった。本章の結果から、犬のリンパ系腫瘍細胞株では、DNA メチル化およびヒストン H3 アセチル化といったエピジェネティック発現制御が犬の *ABCB1* 遺伝子の発現量制御に関わっていることが示された。しかし、犬のリンパ腫細胞では、DNA メチル化に関連した機構が耐性期における *ABCB1* 遺伝子の過剰発現に関与している可能性は低いものと考えられた。

第 3 章：犬のリンパ腫細胞株における MAPK/ERK 経路を介した *ABCB1* および *LRP* 遺伝子の発現制御機構の解析

本章では P-gp をはじめとする薬剤排出ポンプの発現が高い分画と報告されている Side population (SP)分画に着目し、その他の分画(Major population; MP)との表現型の違いをもたらす分子機構を明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、犬のリンパ腫細胞株２株においてはクローナルな細胞集団中に SP と MP という表現型が異なる細胞集団が存在し、*ABCB1* 遺伝子と *LRP* 遺伝子の発現量が MP に比べ SP において高いことが明らかとなった。さらに SP においては MP と比べて、MAPK/ERK 経路が活性化しており、この MAPK/ERK 経路の活性化は *ABCB1* 遺伝子と *LRP* 遺伝子の発現上昇に関与していることも示された。

第 4 章：犬のリンパ腫細胞株における MAPK/ERK 経路を介した *ABCB1* および *LRP* 遺伝子の発現制御機構の解析

本章では細胞内シグナル伝達を調節する薬剤である perifosine による *ABCB1* 遺伝子発現抑制効果について検討を加えた。犬のリンパ腫細胞株である UL-1 では *ABCB1* 遺伝子発現量の減少が認められ、さらにその減少には JNK 経路の活性化が関与していることが明らかとなった。また、perifosine の添加によって、UL-1 においては薬剤排出能が低下し、ビンクリスチンに対する感受性が上昇することが示された。これらの結果から、perifosine はある種の薬剤耐性犬リンパ腫においては *ABCB1* 遺伝子の発現量減少を介して薬剤感受性を回復させる可能性が示唆された。

第 5 章：犬のリンパ腫症例に関する薬剤感受性期と薬剤耐性期との間における遺伝子発現量変化の網羅的探索

本章では新規薬剤耐性因子の探索を目的として、高悪性度多中心型リンパ腫に罹患した症例サンプルのうち、同一個体から薬剤感受性期と薬剤耐性期に採取することができた 4 症例の腫瘍細胞サンプルを用い、マイクロアレイ解析によって 4 症例に共通する薬剤耐性期における遺伝子発現の変化の検出を行った。その結果、Gene Ontology Analysis および Gene Set Enrichment Assay によって、薬剤耐性期の腫瘍細胞においてはケモタキシスおよび炎症などの免疫学的反応に関わる遺伝子群の発現量が有意に減少していることが示された。

以上の一連の研究成果により、犬のリンパ腫に関して、薬剤耐性獲得に関与する *ABCB1* 遺伝子の過剰発現をもたらす分子機構、およびその克服を目指した治療法の可能性が見いだされ、さらには新規薬剤耐性因子として免疫学的反応に関わる遺伝子群の発現量減少が同定された。本研究の成果は、獣医学領域および人医学領域における腫瘍性疾患に対する化学療法の治療成績を向上させるための基礎研究として貢献するとともに、人と動物の双方において重要な臨床的な問題となっている薬剤耐性に関して比較医学的知見を提供するものと考えられる。

本申請論文を審査した結果、博士（獣医学）の学位を授与するに値すると判断した。