

## 審査の結果の要旨

氏名 佐伯 亘平

悪性腫瘍の多くで転移の進行が腫瘍死と密接に関連している。そのため腫瘍患者の予後改善のためには転移の制御を目的とした治療法の確立が不可欠である。雌犬に発生する乳腺腫瘍 (Canine mammary gland tumor; CMGT)は獣医学領域において重要な腫瘍性疾患であるが、転移の進行が症例の予後と大きく関わると報告されている腫瘍である。

近年の研究により腫瘍細胞間には遺伝的・形質的な不均一性が存在し、転移巣の形成に腫瘍内に存在する一部の高悪性細胞が関与していることが判明してきた。最近1つのCMGT細胞株からクローニングされた異なるクローン株間に大きな転移能の差が存在することが報告され、CMGTには腫瘍細胞のクローン進化が存在していることが示唆されている。そこで本博士論文では、一部の転移能を持つクローンを選択的に傷害するような薬剤を探索し、その作用機序を検討することでCMGTの新たな治療法を提案することを目的とした。

第2章において、CMGTクローン株間の表現型の比較を行ったところ、高悪性度を示すCHMp-5b株(-5b)と低悪性度であるCHMp-13a株(-13a)間には大きな遺伝子発現の違いがあり、-5b株は高い浸潤能と腫瘍幹細胞性を示した。この結果から-5bはCMGTのクローン進化の結果生じた転移能の高い悪性クローン、-13aは比較的悪性度が低いクローンのモデル細胞株と考えられた。続いて-5bの増殖を選択的に抑制する分子標的薬を-13a細胞を対照として無作為薬剤スクリーニングにより探索した。その結果ミトコンドリア呼吸鎖複合体阻害薬(Mitochondrial respiratory complex inhibitors; MRCIs)が悪性株の増殖を強く抑制することを見出した。

続いてMRCIsの作用機序に関して評価を行った。活性酸素種産生量の増加とミトコンドリアATP産生量の減少は2細胞間で同様であったが、AMPK分子の活性化は-13aで強く生じることが明らかになった。この結果はAMPK活性化阻害薬であるCompound C存在下でMRCIsによる-13aの細胞障害性が減弱することからも支持された。以上より、MRCIsが高悪性細胞選択的な薬剤となる可能性が示唆され、これは酸化的リン酸化抑制に対する細胞反応の違いによって生じると考えられた。

第3章では臨床応用を目指し、糖尿病治療薬として使用され生体での十分な安全性が証明されたMRCIであるメトホルミン(MET)に着目し研究を行った。METは*in vitro*で高悪性クローン-5bの細胞増殖を-13aと比較して有意に強く抑制し、また-5bを用いた異種移植モデルにおいても、原発巣の成長を有意に低下させた。またMETは両細胞株のミトコンドリアATP産生量

を低下させたが、AMPK経路の活性化、また Compound Cによる細胞増殖抑制効果の消失は-13aのみで顕著に認められた。-5bにおける作用機序を網羅的な遺伝子発現解析により検討したところ、MET暴露による細胞周期進行の抑制が示唆された。-5b株ではMET暴露による cyclinD1の減少と Rb分子のリン酸化減少が認められ、細胞周期解析の結果からも G1/Sチェックポイントにおける細胞周期進行の停止が確認された。-5bにおけるMETへの感受性の高さにはAMPK非依存的な細胞周期進行の抑制が関与していると結論付けられた。

第4章では第2,3章の結果と過去の報告に基づき、METによる細胞周期停止は細胞内NAD量の減少によって生じると仮説を立て検証を行った。その結果、MET暴露は-5b細胞に細胞増殖の抑制、細胞周期の停止、細胞内NAD濃度の低下を引き起こすが、これらの作用は細胞外よりNADを添加することでほぼ完全に消失することが観察された。またこのいずれの操作においても細胞内ATP濃度は全く変化しておらず、CHMp-5b細胞におけるAMPK非依存的な細胞周期停止には細胞内NAD量の減少が関与していることが強く示唆された。

以上より本博士論文において、①CMGTにおける高悪性クローン選択的増殖抑制薬としてのMRCIsの可能性、②高悪性クローンと低悪性クローン間で異なる酸化的リン酸化抑制に対する細胞反応、③臨床応用可能なMRCIとしてのMETの有用性、④細胞内NAD量の減少を介するMETの新たな抗腫瘍作用機序、を明らかにした。

これらの研究成果は、犬乳腺腫瘍に対するミトコンドリア呼吸鎖阻害薬の臨床応用可能性を示し、またその作用機序の一部を新たに明らかにしたものであり、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。