

イヌのリンパ腫における薬剤耐性機序に関する研究
(Study on drug resistance mechanism
in canine lymphoma)

2021年2月

麻布大学大学院 獣医学研究科

獣医学専攻 博士課程

DV1701 氷海 幸子

目次

| | |
|--|----|
| 1. 緒言 | 4 |
| 1.1. イヌのリンパ腫..... | 4 |
| 1.1.1. イヌのリンパ腫の組織学的分類..... | 5 |
| 1.1.2. イヌのリンパ腫の治療..... | 5 |
| 1.1.3. 薬剤耐性..... | 6 |
| 1.2. 本論文の目的..... | 8 |
| 2. リンパ腫における薬剤排泄トランスポーターの発現評価 | 9 |
| 2.1. 序論 | 9 |
| 2.2. 材料および方法..... | 9 |
| 2.2.1. 免疫染色による薬剤排泄トランスポーターの発現解析..... | 9 |
| 2.2.2. PCR による薬剤排泄トランスポーターの発現解析 | 10 |
| 2.2.3. 薬物排泄トランスポーターの血管における発現解析 | 10 |
| 2.2.4. 抗がん治療前後における薬剤排泄トランスポーター発現の評価..... | 11 |
| 2.3. 結果 | 11 |
| 2.3.1. 免疫染色による薬剤排泄トランスポーターの発現解析..... | 12 |
| 2.3.2. PCR による薬剤排泄トランスポーターの発現解析 | 12 |
| 2.3.3. 薬物排泄トランスポーターの血管における発現解析 | 12 |
| 2.3.4. 抗がん治療前後における薬物排泄トランスポーターの発現評価..... | 13 |
| 2.4. 考察 | 13 |
| 2.4.1. 免疫染色による薬剤排泄トランスポーターの発現解析..... | 13 |
| 2.4.2. PCR による薬剤排泄トランスポーターの発現解析 | 14 |
| 2.4.3. 薬物排泄トランスポーターの血管における発現解析 | 14 |
| 2.4.4. 抗がん治療前後における薬剤排泄トランスポーター発現評価..... | 15 |
| 2.5. 小括 | 15 |
| 3. 腫瘍血管における血液腫瘍関門形成について..... | 17 |
| 3.1. 序論 | 17 |
| 3.2. 材料および方法..... | 17 |
| 3.2.1. 腫瘍内毛細血管の形態的検索..... | 17 |
| 3.3. 結果 | 17 |
| 3.3.1. 腫瘍内毛細血管の形態的検索..... | 17 |
| 3.4. 考察 | 18 |
| 3.4.1. 腫瘍内毛細血管の形態的検索..... | 18 |
| 3.5. 小括 | 19 |
| 4. 総括 | 20 |

| | |
|-----------------|----|
| 5. 図表 | 22 |
| 6. 参考文献 | 35 |
| 7. 要旨 | 44 |
| 7.1. 和文要旨 | 44 |
| 7.2. 英文要旨 | 46 |
| 8. 謝辞 | 48 |

1. 緒言

本論文の対象はイヌのリンパ腫である。イヌのリンパ腫は標準治療が存在するものの、多くの症例が再発し、高率に薬剤耐性を示すことが知られている。イヌのリンパ腫の再発例における薬剤耐性獲得は、小動物臨床において大きな課題であるが、その機序は明らかにされていない。本研究は、抗がん剤の薬剤耐性機構に関与していることが示唆されている薬物排泄トランスポーターに焦点をあて、イヌのリンパ腫におけるその発現と薬剤耐性への関わりを検討することとした。

1.1. イヌのリンパ腫

リンパ腫とはリンパ球が腫瘍化した造血器腫瘍であり、イヌにおいて最もよくみられる腫瘍の一つである。イヌのリンパ腫は単一の疾患とみなされているが、その挙動は多様であり、形態学的にも多彩な組織像を示す [Zandvliet M]。イヌのリンパ腫は、ヒトの non-Hodgkin's lymphoma (NHL) と多くの類似性を示すことから、しばしばその動物モデルとしても使用される [Tomiyasu H et al.]。

イヌのリンパ腫の年間推定最小発症率は 10 万頭あたり 13~114 であり [Dorn CR et al.; Teske E; Dobson JM et al.]、過去数十年にわたって増加している [Zandvliet M]。

リンパ腫はすべての犬種で認められるが、ボクサーやゴールデンレトリバー、ロットワイラーなど、中型犬から大型犬でよくみられる [Edwards DS et al.; Teske E, de Vos JP et al.; Villamil JA et al.]。リンパ腫はどの年齢でも発症するが、主に中年から高齢のイヌで認められ、1 歳未満のイヌでは 10 万例あたり 1.5 例なのに対し、10 歳以上のイヌでは 84 例に増加する [Dorn CR et al.]。

多くのリンパ腫は節性に発症する多中心型であるが、節外性に発症する皮膚型や消化器型、前縦隔型などもみられ、その臨床症状は腫瘍随伴症状によって複雑である。血液検査や画像検査では、広範な非特異的異常を示すことが多いため、リンパ腫の診断においては、針生検による細胞診が迅速および高感度、低侵襲な手法であるとされている [Teske, E and van Heerde P; Sozmen M et al.]。しかし、細胞診では低悪性度のリンパ腫の診断や非定型のリンパ球を特徴づけるには不十分な場合があり、その場合は、低悪性度のリンパ腫の診断およびリンパ腫の細分類を可能とする組織学的生検検査の実施が勧められる。

2010 年に形態学的、免疫組織化学的特徴に基づいたリンパ腫の分類について、リンパ腫のイヌ 608 検体を用いた研究が行われた。この研究によると、リンパ節で主に腫瘍化が高度に認められる節性のリンパ腫は 82.4%、リンパ節以外の部位で腫瘍化が高度に認められる節外性リンパ腫は 17.6%、更に節外性リンパ腫のうち、12.34%は皮膚の真皮あるいは上皮向性である場合は表皮への浸潤も認められる皮膚型であった。また、イヌでは B 細胞型は 63.8%、T 細胞型は 35.4%、免疫組織学的に B・T 細胞の表現型を示さない未分化型である null 細胞型が 0.8%であり、B 細胞型が有意に多かった。イヌのリンパ腫の中で最も多数例であったのは全体の 38.49%を占める慢性大細胞型 B 細胞性の胚中心芽球性リンパ腫であった [Ponce

F. et al.]。

1.1.1. イヌのリンパ腫の組織学的分類

イヌのリンパ腫は、組織学的には一般的に新WHO分類に従って分類される [Valli VE]。新WHO分類に従った分類では、まず免疫組織化学的にT細胞型/B細胞型の分類がなされ、細胞の成長パターン、核のサイズ、核の形態（クロマチンパターン、核小体の数と位置）、有糸分裂指数、免疫表現型など、いくつかの形態学的基準に基づいて特徴付けられ、その特性に基づいて診断される。リンパ腫の大部分はB細胞由来（±70%）であり、T細胞（±30%）や非B/非T細胞リンパ腫（null型、<5%）の割合は少ないと報告されている [Appelbaum FR et al.; Teske E, Wisman P. et al. ; Caniatti M et.al.; Fournel-Fleury C et al.; Ruslander DA et al.]。本邦における悪性リンパ腫のイヌ57例を用いて新WHO分類に従い診断した報告では、B細胞が38例、T/NK細胞性が17例であり、その内訳は、B細胞性では、1.2.8 Large B-cell lymphomaが21例（全リンパ腫中の36.8%）、1.2.2 B-cell lymphocytic lymphoma intermediate type (lymphocytic) 7例（12.3%）、1.2.5 Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type (MALT) 4例（7.0%）、1.1.1B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma (lymphoblastic) 3例（5.3%）、1.2.4 Follicular lymphoma 2例（3.5%）、1.2.9 Burkitt-type lymphoma 1例（1.8%）、T/NK細胞性では、2.2.1Large Granular lymphoproliferative disorders (LGL) が10例（17.5%）、2.2.2Cutaneous T-cell neoplasms 4例（7.0%）、2.2.3Extranodal/Peripheral T-cell lymphoma (PTCL) 1例（1.8%）、2.2.4Adult T-cell likelymphoma/leukemia 1例（1.8%）、2.2.8 Anaplastic large cell lymphoma 1例（1.8%）であった [Sakai Y. et al.]

1.1.2. イヌのリンパ腫の治療

イヌのリンパ腫ではリンパ節が高度に腫瘍化する節性リンパ腫が多く、特に特定のリンパ節だけではなく、複数のリンパ節が同時に腫瘍化し、腫大する多中心型リンパ腫が多く報告されている。腫瘍が複数の場所に認められる上に、リンパ行性に腫瘍細胞が移動するため、外科的切除による完治は難しく、イヌのリンパ腫では第一選択の治療法として抗がん剤を用いた化学療法があげられる [Zandvliet M]。以下にイヌのリンパ腫において標準的に使用される薬物療法を示す。

1.1.2.1. 糖質コルチコイド

糖質コルチコイドはリンパ球とリンパ芽球のアポトーシスを誘発すると考えられており、イヌのリンパ腫の治療に日常的に使用される薬剤である [Smith LK et al.]。糖質コルチコイドは緩和治療としてみなされており、通常 60～90 日間の継続投与により良好な部分的または完全な反応を示す [Squire RA et al.; Bell R et al.]。一方、いくつかの研究では化学療法を開始する前に糖質コルチコイドを使用することで、奏効率が低下し、寛解維持期間が短く

なることが報告されている [Price GS et al.; Teske E, van Heerde P et al.; Gavazza A et al.; Marconato L et al.]。

1.1.2.2. First line therapy

イヌのリンパ腫では、複数の薬剤を使用する多剤併用療法（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾロンを組み合わせたCHOP療法またはCHOP療法にL-アスパラギナーゼを併用したL-CHOP療法など）が標準的に行われる。First line therapyは、完全寛解を目的に集中的に治療を行う導入期とその後の寛解を維持することを目的とした維持期で構成されている。以前は長期間の維持期を設定することが標準とされていたが、いくつかの報告で維持期を長期間継続しても治療効果が改善しないことが示されたことから、現在では6か月間の導入および短い維持期で治療を行うことが標準とされている [Piek CJ et al.; Chun R et al.; Garrett LE et al.]。多剤併用療法は治療初期には高い奏効率を示すものの、多くの症例が再発し、再発した場合、高率に薬剤耐性を示すことが知られており、イヌのリンパ腫の治療を妨げる最大の要因と考えられている。

1.1.2.3. レスキュープロトコル

レスキュープロトコルは、First line therapy による治療で寛解しない、または再発後に使用される治療を指す。レスキュープロトコルの選択は、First line therapy による治療効果や治療期間、その副作用など様々な状況を考慮し、決定される。レスキュープロトコルは通常、寛解率が低く、寛解したとしてもその期間も短い（2～3 か月）。また、使用する薬剤にもよるが First line therapy よりも毒性が強くと表れる傾向がある [Zandvliet M]。

1.1.2.4. 低悪性度のリンパ腫に対する治療

イヌのリンパ腫には、数はそれほど多くはないが、T 領域リンパ腫（T-zone lymphoma, TZL）や脾臓の辺縁帯リンパ腫（Marginal zone lymphoma, MZL）などの比較的進行が緩やかなリンパ腫（Indolent lymphoma）が存在する。いくつかの症例報告では、これらのリンパ腫は長期予後が良好であることから、CHOP療法を実施する意義がないことが示されている [Valli VE et al.; Stefanello D et al.; Flood-Knapik KE et al.; O'Brien D et al.; Seelig DM et al.]。したがって、これらのリンパ腫に対しては、モニタリングを実施し積極的な治療を行わない、またはクロラムブシルやプレドニゾロンなどの低強度プロトコルで治療することが勧められる。

1.1.3. 薬剤耐性

イヌのリンパ腫は、多剤化学療法の治療による寛解率が高いものの、ほとんどの症例が再発し、薬剤耐性を示す。イヌのリンパ腫の治療に使用できる薬剤が限られていることから、薬剤耐性の発現はその予後に重大な影響を及ぼす。薬剤耐性には多くの原因が考えら

れるが [Lage H]、ATP依存的に薬物を排出するATP-binding cassette (ABC)トランスポーターファミリーに分類されるP糖タンパク質 (P-glycoprotein : P-gp) およびbreast cancer resistance protein (BCRP)などが重要な役割を果たしていると考えられている [Bergman PJ et al.; Lee JJ et al. ; Page RL et al.; Tashbaeva RE et al.; Mealey KL et al.; Honscha KU et al.; Hifumi T et al.]。ABCB1遺伝子にコードされているP-gpは、Vinca alkaloid系やAnthracycline系、Taxan系など複数の抗がん剤を基質として細胞外へ排出するトランスポーターで、 [Tomiyasu H et al.]、ヒト [O'Connor, R] およびイヌ [Bergman PJ et al.] において最も集中的に研究されている薬剤耐性分子の1つである。P-gpの過剰発現は、リンパ腫患者の治療に一般的に使用されるビンクリスチンやドキソルビシンなどの基質剤の細胞内濃度を低下させることが知られており [Kathawala RJ et al.]、ヒトのリンパ腫では、23例中8例にP-gpが発現していたという報告がある [Moscow JA et al.]。また、P-gp阻害剤は薬剤耐性を示すリンパ腫患者に有効であることが報告されている [Miller TP et al.; Wilson WH et al.; Yahanda AM et al.]。P-gp発現と薬剤耐性との関連は、イヌのリンパ腫でも示されている。イヌのABCB1遺伝子の形質導入は、イヌの細胞株においていくつかの化学療法剤に対する耐性を誘導することが報告されている [Matsuura S et al.]。イヌのリンパ腫においてもP-gp発現と薬剤耐性表現型との関連が報告されている。再発または薬剤耐性を示すイヌリンパ腫症例ではP-gpを発現する割合が高く [Lee JJ et al.; Moore AS et al.]、化学療法前にP-gpを発現したイヌのリンパ腫症例は、奏効率が低く、生存期間が短かった [Bergman PJ et al.]。また、多剤耐性を発症したイヌのリンパ腫の10症例中4症例でABCB1遺伝子の高い発現レベルが示されており [Tomiyasu H et al.]、P-gpの高発現がイヌのリンパ腫において薬剤耐性と関連していることが示唆されている。

ABCG2遺伝子にコードされているBCRPもAnthracycline系などの複数の抗がん剤を基質とすることが報告されている [Tomiyasu H et al.]。ヒトのNHL患者では、ABCG2遺伝子またはBCRPの発現の増加が予後不良と関連していることが示されている [Galimberti S et al.; Kim JE et al.]。獣医学では、BCRPの発現とドキソルビシン、シクロホスファミド、およびシスプラチンに対する耐性との関連が、イヌの乳腺腫瘍細胞株で報告されている [Pawlowski KM et al.; Honscha KU et al.]。イヌのリンパ腫に関しては、以前の研究で、薬剤耐性のあるリンパ腫のイヌとないイヌでABCG2遺伝子発現レベルに有意差は見られなかったが [Tomiyasu H et al.]、ABCG2遺伝子のアップレギュレーションがイヌT細胞リンパ腫の薬剤耐性表現型と関連していることが報告されている [Zandvliet M et al.]。

上記の通り、P-gp および BCRP の発現解析はなされているものの、イヌのリンパ腫において、その腫瘍組織内で両分子の発現局在を解析した報告は未だなされていない。局在情報を理解することは薬剤排泄トランスポーターの薬剤耐性機序についてより深い知見を得ることにつながると考えられる。そこで、腫瘍組織内での薬物排泄トランスポーターの発現局在を解析することにより、薬物耐性獲得機構における薬剤排泄トランスポーターの関与の新たな知見が得られると考えた。

1.2. 本論文の目的

本研究では、薬剤排泄トランスポーターである P-gp および BCRP の発現に着目し、イヌのリンパ腫における両トランスポーターの発現および薬剤耐性への関与を検討することを目的とした。薬剤耐性機構における薬剤耐性トランスポーターの関与を明らかにするには、薬物排泄トランスポーターが①腫瘍組織のどこで、②どのような機能を果たしているのか明らかにする必要がある。さらに、③薬剤耐性機構の獲得機序を明らかにするため、抗がん治療と薬剤排泄トランスポーター発現の経時的解析を行うこととした。

2. リンパ腫における薬剤排泄トランスポーターの発現評価

2.1. 序論

上記に示した通り、薬剤排泄トランスポーターがリンパ腫の治療抵抗性に関与している可能性があることから、イヌのリンパ腫を用いて、薬剤排泄トランスポーターの発現を評価することとした。まず、薬剤排泄トランスポーターの発現の評価方法として、免疫組織化学的検索を実施した。次に、免疫組織化学的検索にて確認された P-gp および BCRP が非特異でなくこれらのトランスポーターであることを確認するため、PCR 解析により薬剤トランスポーターの評価を行った。さらに、免疫組織化学的検索において毛細血管に発現した P-gp および BCRP の局在を評価するため、腫瘍組織から毛細血管を単離し、Western Blotting 行った。また、免疫染色と PAS の重染色を行うことで、各トランスポーターの発現部位を評価した。次に抗がん治療前後でサンプリングしている検体を用い、免疫組織化学的に薬剤排泄トランスポーターを評価した。

2.2. 材料および方法

2.2.1. 免疫染色による薬剤排泄トランスポーターの発現解析

リンパ腫と診断されたイヌ 43 症例から生検もしくは斃死により剖検にて採材した検体に免疫組織化学的検索を実施し、P-gp および BCRP の発現を評価した。また、T/B 分類のため、CD20 および CD3 の免疫組織化学的検索を実施した。その判定基準は、CD20 陽性を B 細胞型、CD3 陽性を T 細胞型、CD20 および CD3 陰性を Null 型とした。健常部位での発現評価には、健常なイヌのリンパ節を使用した。また、P-gp および BCRP の陽性コントロールとして健常なイヌの脳を使用した。

イヌのリンパ腫 43 検体中、抗がん剤投与歴を有するリンパ腫は 8 検体、抗がん剤未投与リンパ腫は 23 検体、抗がん剤投与歴が不明なリンパ腫は 12 検体であった (Table 1)。

P-gp、BCRPの免疫組織化学的検索の一次抗体はmonoclonal Rabbit P-gp antibody (Anti-P Glycoprotein antibody, abcam,1:100)、monoclonal mouse BCRP antibody (Anti-BCRP/ABCG2 antibody, abcam, 1:100)、二次抗体はpolyclonal goat anti-immunoglobulins (Histofine Simple Stain MAX-PO (MULTI): Nichirei Biosciences)を使用した。抗体の希釈はすべて1%bovine serum albumin-added phosphate buffered saline (PBS、pH7.4) で行った。

組織は10%neutral-buffered formalinで固定(7日以上)し、定法に従いパラフィンに包埋し、薄切して3 μ mの切片を作製した。切片はキシレンと段階希釈したエタノールで脱パラフィンし、PBSで5min洗浄した。前処理はイムノセーバー (Nisshin EM)を用い、98 $^{\circ}$ C 45min加温した。前処理後、PBSで5min洗浄し、5% H₂O₂加メタノールで室温20minインキュベーションすることで、内因性ペルオキシダーゼを阻止した。ブロックエースで非特異反応を阻止後、一次抗体を4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。PBSで5minを3回洗浄後に二次抗体を室温60minインキュベートした。PBSで5minを3回洗浄後に3-3'-diaminobenzidine

tetrahydrochloride (DAB)で可視化、ヘマトキシリンで核染色を行った。最後にエタノールで脱水し、キシレンで透徹、封入剤 (NEW MX, Matsunami Glass Ind.,Ltd.) で封入した。

T/B 分類の免疫組織化学的検索では、一次抗体として polyclonal Rabbit CD20 antibody (CD20 Polyclonal Antibody, Thermo Fisher Scientific, 1:400)および monoclonal Mouse CD3 antibody (Monoclonal Mouse Anti-Human CD3, DAKO, 1:50)を用いた。CD3 の免疫組織化学的検索でのみ、賦活化処理として抗体を反応させる前に切片を 20min オートクレーブ処理した。それ以外は P-gp および BCRP の免疫組織化学的検索の手技と同じ方法で実施した。

2.2.2. PCRによる薬剤排泄トランスポーターの発現解析

免疫組織化学的検索でP-gp、BCRPの発現を確認したNo.10の凍結材料および陽性コントロールとして健常なビーグル (雌、成体) の大脳皮質から抽出したTotal RNAを用いてRT-PCRを行った。また、PCRコントロールとしてGlyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いた。P-gp、BCRP、GAPDHのPCRで使用したプライマー配列をTable 2に示した。Total RNAはTRIzol®(Invitrogen)を用いて定法に従って抽出した。RNAの濃度と純度は260 nmおよび280nmの波長における吸光度の測定値をもとに算出した。cDNAはSuper script III(Invitrogen)を用いてtotal RNAを逆転写して作成した。cDNA sample 1μlに対して24 μl PCR reaction (Taq polymerase(5U/μl)(TaKaRa), 2.5 mM dNTP Mixture(TaKaRa), 0.2 μMの specific primer(Life technology))を説明書に従って混合してRT-PCR増幅を行った。P-gp、BCRP、GAPDHのRT-PCR条件はdenaturation:94°C30sec, annealing:55°C 30sec, extension:72°C 1minを 40 cycle行った。PCR産物のうち、GAPDHは4 μlをethidium bromide で前染色した2%agarose gelsで、P-gp、BCRPは8 μlをethidium bromideで後染色した12.5% acrylamide gelsを用いて電気泳動し、UVで可視化した。

2.2.3. 薬物排泄トランスポーターの血管における発現解析

2.2.3.1. Western Blotting による解析

毛細血管の単離：

Western Blottingの材料として、免疫組織化学的検索でP-gp、BCRPの発現を確認したNo.10リンパ腫および健常なイヌの大脳皮質の凍結材料から毛細血管を単離し、毛細血管豊富材料 (Brain Capillary rich sample: BCAP, Lymphoma Capillary rich sample: LCAP)を作成した。

凍結材料はSolution B (101mM NaCl, 4.6mM KCl, 2.5mM CaCl₂-2H₂O, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄-7H₂O, 15mM HEPES, MQ) で解凍した。材料の5倍量のSolution A(25mM NaHCO₃, 10mM Glucose, 1mM Pyruvate, 0.5%BSA, Soln. B)を加え、ポッター型ホモジナイザー

(Potter-Elehm Tissue Grinder, Wheaton) ホモジナイズした。ホモジナイズした材料と等量の26%dextran-solution Aを加え、5800g for 10min 4°Cで遠心分離して上清を取り除いた。ペレットはmedium 199に懸濁し、ペレット懸濁液とした。Percoll gradient (45%Percoll, 10% medium199, 30mM HEPES, MQ, pH7.4)を1000g 4°Cで10分(SW40Ti rotor, 2900rpm)遠心分離し

て作成した。Percoll gradientの上部にペレット懸濁液をのせ、1000g 4°C10分 (SW40Ti rotor, 2900rpm)で遠心分離し、中層をとりだした。Percoll gradientを取り除くため、材料は Solution Bで洗浄後、Tris-HCL buffer (pH8.0)で洗浄し、確認のため、Toluidine blue染色後、光学顕微鏡下で観察した (Figure 3)。

BCRPのWestern Blotting :

腫瘍におけるBCRPの発現を調べるため、免疫組織化学的検索でP-gp, BCRPの発現を確認したNo.10のリンパ腫材料(Lymphoma-whole)および同リンパ腫から作成したLCAP、陽性コントロールとして健常なイヌの脳皮質材料(Brain-whole)および同材料から作成したBCAPを用いてWestern Blottingを行った。一次抗体は免疫組織化学的検索に利用したmouse anti-human BCRP antibody(×5000)、二次抗体はPeroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulin G(CST Japan, ×2000)を使用した。一次抗体はイムノエンハンサーA液(イムノエンハンサー®LD, 和光)で希釈、二次抗体はイムノエンハンサーB液(イムノエンハンサー®LD, 和光)で希釈して、ネガティブコントロールは一次抗体の代わりにイムノエンハンサーA液のみを使用した。

各材料に、材料と同質量の 0.1%SDS を加えて室温 30min インキュベートし、15000g 4°C 15min 遠心分離した。上清のタンパク量を測定し、同じタンパク量となるよう 0.1%SDS で調整したのち 2X gel-loading sample buffer を等量混合し、100°C5min 熱した後、10%SDS-polyacrylamide gel で SDS-PAGE 電気泳動した。polyvinylidene difluoridemembrane に転写後、blocking buffer (5%skim milk, 0.1%Tween 20, PBS) で室温 30min インキュベートした。0.1% Tween 20/PBS(T-PBS)で 15min, 5min, 5min 洗浄後、一次抗体で 4°C over night 反応させた。T-PBS で 5min を 3 回、15min を 3 回洗浄後、二次抗体で 4°C 1hour 反応させた。T-PBS で 5min を 3 回、15min を 3 回洗浄後、メンブレンを Pierce Western Blotting Substrate(Millipore)内で、室温にて 5min で発色後、暗視野下で化学発光を観察した。

2.2.3.2. PAS との重染色による解析

健常なイヌの脳および P-gp の発現が認められた No. 45 および BCRP の発現が認められた No. 47 の検体を用いて (症例の詳細は 2.2.4 項を参照)、P-gp および BCRP の免疫組織化学的検索と PAS の重染色を行った。P-gp および BCRP の免疫組織化学的検索は 2.2.1 項と同じ方法を用い、ヘマトキシリンで核染色を行う際に PAS 反応で染色を行った。

2.2.4. 抗がん治療前後における薬剤排泄トランスポーター発現の評価

抗がん治療前後で複数回検体を採材したリンパ腫の症例 5 例を用い、2.2.1 項に記載した方法で P-gp、BCRP の発現を評価した (Table 4)。

2.3. 結果

2.3.1. 免疫染色による薬剤排泄トランスポーターの発現解析

P-gpおよびBCRPの免疫組織化学的検索の結果、健常なイヌのリンパ節では両トランスポーターの発現が認められなかったが (Figure 1a, 1b)、陽性コントロールとして用いた健常なイヌの大脳皮質では毛細血管内皮細胞にP-gpおよびBCRPの発現が認められた (Figure 1c, 1d)。イヌのリンパ腫43症例中、P-gpで18症例、BCRPで17症例にイヌの大脳皮質と同様毛細血管内皮細胞に発現が認められた (Figure 1e, 1f)。その発現割合は、P-gpで41.9%、BCRPで39.5%であった。一部細胞質内の染色が認められたものがあったが、トランスポーターとして機能するためには細胞膜へ発現している必要があることから、細胞質内の染色は陰性として取り扱った。

抗がん剤投与した症例の75.0% (8例中6例) でP-gpおよびBCRPの発現が認められ、非投与例では34.8% (23例中8例) であり、抗がん剤を投与した群が非投与群と比較して有意にP-gpまたはBCRPを発現していた (カイ二乗検定、 $P=0.048969$)。

イヌのリンパ腫41検体中、免疫組織化学的検索にてT細胞型は17検体、B細胞型は12検体、Null型は12検体であった。T細胞型では35.2%にP-gpおよびBCRPの発現が認められ、B細胞型では66.7%にP-gpの発現が、58.3%にBCRPの発現が認められた (Table 3)。T細胞型とB細胞型を比較して、P-gpの発現率またはBCRPの発現率に有意差は認められなかった (カイ二乗検定、P-gp: $p=0.095882$ 、BCRP: $p=0.21918$)。

2.3.2. PCRによる薬剤排泄トランスポーターの発現解析

RT-PCRではNo.10のリンパ腫および健常なイヌの大脳皮質を使用した。P-gpでは、約100kbpに、BCRPでは約150kbpに両サンプルともバンドが認められ、GAPDHのRT-PCRでも約100kbpにバンドが認められた (Figure 2)。

2.3.3. 薬物排泄トランスポーターの血管における発現解析

2.3.3.1. Western Blottingによる解析

毛細血管の単離：

リンパ腫および大脳凍結サンプルから作成したサンプルでは、形態的にどちらも扁平な核をもつ細胞を有し、多数分岐した構造を有する太さ約5-10 μ mの毛細血管が豊富に認められた (Figure 3a, b)。サンプル中では毛細血管より太い細動脈様の血管や脳実質の構成細胞と考えられる細胞も含まれていたが、単離前の組織と比較して明確に毛細血管の純度が高められたことから、それぞれをLCAP及びBCAPとした。

BCRPのWestern Blotting：

Lymphoma-whole, LCAP, Brain-wholeおよびBCAPにおけるBCRPのWestern Blottingでは、約90kDaにバンドが認められ、リンパ腫、大脳ともにWhole材料と比較してCap rich sampleでよりバンドが濃く認められたことから、毛細血管に発現が局在していることが示された

(Figure 4)。

2.3.3.2. PAS との重染色による解析

P-gp および BCRP の免疫組織化学的検索と PAS 染色の重染色を行うことによって、PAS 染色で毛細血管の基底膜を明瞭にし、P-gp および BCRP の発現部位を評価しやすくした。その結果、健常なイヌの脳では、毛細血管の内皮細胞の管腔側に P-gp および BCRP の染色が認められた (Figure 5a、5b)。No. 45 および No. 47 の検体では、陽性コントロールの脳皮質ほど明瞭ではないが、管腔側に P-gp および BCRP の発現が認められた (Figure 5c、5d)。

2.3.4. 抗がん治療前後における薬物排泄トランスポーターの発現評価

リンパ腫の 5 症例について、抗がん治療前後で薬物排泄トランスポーターの発現を評価した。No. 44、45 は、ともに最初の検査でリンパ腫と診断され、その後抗がん剤を投与し Complete Response になるも、再発し、再検査を実施した。No. 44 では抗がん治療前の 1 回目の検査、抗がん治療後の 2 回目の検査ともに P-gp および BCRP が陰性だった (Table 4)。No. 45 では抗がん治療前の 1 回目の検査で P-gp および BCRP は陰性だったが、抗がん治療後の 2 回目の検査で P-gp の毛細血管内皮細胞の染色が認められた (Table 4、Figure 6a、6b)。No. 46 は最初の検査でリンパ腫と診断され、その後治療内容は不明だったが、Stable Disease を維持しており、再度検査を実施された。本症例は 2 回の検査ともに P-gp および BCRP が陰性であった (Table 4)。No. 44、45、46 は T/B 分類の結果、B 細胞型リンパ腫であった。No. 47 は 1 回目の検査でリンパ腫と診断されて以降化学療法による治療が行われたが、リンパ節の腫大が認められたため、その後 2 回検査をおこなった。本症例は、抗がん治療前の 1 回目および抗がん治療後の 2 回目の検査で P-gp が陰性であったが、抗がん治療後の 3 回目の検査で細胞膜に認められた。BCRP については、抗がん治療後の 2 回目の検査のみ毛細血管の内皮細胞の染色が認められた (Table 4、Figure 6c、6d)。

No. 48 の症例は、下顎リンパ節の腫脹を認めたため、ステロイドおよび抗生物質の服用を 2 か月間行った後、生検を実施。その後 L-アスパラギナーゼ、ステロイド、クロラムブシルを投与。Stable Disease を維持していたが、リンパ節の腫大が認められたためビンクリスチンを投与。リンパ節の大きさに変化はなかったが、診断のため左下顎リンパ節を切除した。本症例では、抗がん治療前の 1 回目および抗がん治療後の 2 回目の検査で P-gp が陰性であった。BCRP は 1 回目の検査で陰性であったが、2 回目の検査で毛細血管の内皮細胞に陽性が認められた (Table 4、Figure 6e、6f)。No. 47 および 48 は T/B 分類の結果、T 細胞型リンパ腫であった。

2.4. 考察

2.4.1. 免疫染色による薬物排泄トランスポーターの発現解析

P-gp および BCRP は健常なイヌのリンパ節では認められなかったが、リンパ腫症例では、

それぞれ 41.9%、39.5%で発現が認められ、その局在は脳での発現同様、腫瘍内の毛細血管内皮細胞であることが明らかになった。

また、抗がん剤投与例の薬剤排泄トランスポーターの発現率は 75.0%であり、非投与例の発現率 (34.8%) と比較して有意に高く ($p=0.048969$)、抗がん剤の投与によりトランスポーターの発現が誘導され、このトランスポーターが薬剤耐性に関与していることが示唆された。薬剤排泄トランスポーターを発現した多くの症例で、P-gp や BCRP の基質であるビンクリスチンやドキシソルピシンが使われており、これらの基質がトランスポーターの発現に関与している可能性が考えられる。一方で、抗がん剤非投与例においても薬剤トランスポーターが発現している症例が認められた。リンパ腫では、抗がん剤投与前にステロイドによる治療が行われることがあり、抗がん剤投与前のステロイドの使用がリンパ腫の予後を悪くさせるという報告がある [Price GS et al.; Teske E, van Heerde P et al.; Marconato L et al.]。今回ステロイドの使用歴は明らかとなっていないが、ステロイドは両トランスポーターの基質であり、この使用が P-gp および BCRP の発現に関与した可能性も考えられる。

T/B 分類においては、T 細胞型と比べ、B 細胞型に薬剤排泄トランスポーターの発現が多くみられたが、両型の P-gp または BCRP の発現率に有意差は認められなかった。

2.4.2. PCR による薬剤排泄トランスポーターの発現解析

免疫組織化学的検索にて P-gp および BCRP の発現が認められている健常なイヌの脳皮質および No. 10 の症例において RT-PCR を実施したところ、両トランスポーターの発現が認められた。このことから、免疫組織化学的検索において認められた P-gp および BCRP の発現が RT-PCR においても裏付けられた。

2.4.3. 薬物排泄トランスポーターの血管における発現解析

2.4.3.1. Western Blotting による解析

BCRP の Western Blotting において、whole 材料よりも Cap rich sample でよりバンドが太く認められた。これは腫瘍内毛細血管に BCRP の発現が局在していることを裏付けている。イヌの BCRP 分子量が約 72.718kDa に対して、本研究の Western Blotting では約 90kDa にバンドが認められたが、通常膜タンパク質は翻訳後、ゴルジ体で糖鎖修飾されてから細胞膜へ移行するため、この糖鎖修飾された BCRP が検出されたことが原因と考えられる。

2.4.3.2. PAS との重染色による解析

リンパ腫症例 No. 45 および No. 47 において、免疫染色および PAS の重染色で毛細血管の基底膜を明瞭にし、P-gp および BCRP の局在を評価したところ、脳の P-gp および BCRP の発現と同様に毛細血管の内腔側に両トランスポーターを発現していたことが明らかとなった。このことから、リンパ腫の血管内皮細胞に発現した P-gp および BCRP は脳の毛細血管での働き同様に基質を血管腔に排泄する役割を持つ可能性が考えられる。

2.4.4. 抗がん治療前後における薬剤排泄トランスポーター発現評価

抗がん治療前後における薬剤排泄トランスポーターの発現評価では、抗がん治療前に発現していなかった薬剤排泄トランスポーターが抗がん治療後に発現した。また、投与している薬剤が明らかとなっている No. 48 では、P-gp および BCRP の基質であるステロイドが投与されており、これが BCRP の発現に関与している可能性が考えられた。

抗がん治療前後で発現評価を行った症例数は限られているが、診断時（抗がん治療前）には薬剤トランスポーターの発現が認められておらず、その後の検査で B 細胞型の症例は P-gp を、T 細胞型の症例は BCRP を毛細血管に発現していた。一方、2.2.1 項で免疫組織化学的検索を行った 43 症例では、多くの症例が両トランスポーターを発現していた。これらの症例は多くが剖検例であることを考慮すると、B 細胞型のリンパ腫は最初に P-gp を、T 細胞型のリンパ腫は最初に BCRP を発現し、リンパ腫が進行し、死亡した症例では両トランスポーターを発現していた可能性が示唆された。

2.5. 小括

リンパ腫症例の約 40%に薬物排泄トランスポーターが発現しており、その局在は腫瘍内毛細血管内皮細胞であることが明らかになった。これまで、イヌのリンパ腫の P-gp および BCRP の発現を評価する報告はあったが、組織学的に評価した報告は少なく、また、P-gp および BCRP は腫瘍細胞の細胞膜に発現し、細胞外へ基質を排泄することで薬剤耐性に関与すると考えられていたが [Vajdovich P et al.]、今回組織学的に P-gp および BCRP の発現を評価したところ、ほとんどが毛細血管内皮細胞に発現しており、1 例で細胞膜への染色が見られた。また、リンパ腫症例で認められた毛細血管内皮細胞の染色は、健康なイヌの脳での毛細血管の染色とよく類似していた。

薬物排泄トランスポーターの血管における発現解析では、Western Blotting 解析によって薬物排泄トランスポーターが毛細血管に局在していることが示され、さらに PAS との重染色によって血管内腔側に存在していることが明らかとなった。

リンパ腫症例における抗がん剤投与例および非投与例の比較では、抗がん剤投与例において、非投与例と比較して有意に P-gp および BCRP の発現が認められており、両トランスポーターの発現は抗がん剤投与に関連する可能性が示唆された。さらに、同一症例で抗がん治療の前と後で薬剤排泄トランスポーターの発現評価を行ったところ、抗がん治療前には発現が認められていなかった薬剤排泄トランスポーターが、抗がん治療後に発現しており、このことから抗がん治療が薬物排泄トランスポーターの発現に関与していると考えられた。また、治療歴が明らかとなっている症例の情報から、抗がん治療の中でも、それぞれのトランスポーターの基質投与が薬剤排泄に関与している可能性が示唆された。

以上より、抗がん治療によって腫瘍組織内に薬物排泄トランスポーターが発現し、その基質を腫瘍組織外に排出する、脳で認められるような関門形成をしている可能性が考えられ

た。

通常、リンパ節の毛細血管内皮細胞は、大脳毛細血管と異なり、密着結合は未発達である。さらに、腫瘍では急激な増大に対して栄養と酸素を供給するパイプとして毛細血管の新生が亢進し、通常腫瘍血管内皮細胞同士の関係（接着、嵌合）が正常に比べて疎であり、血管の壁細胞は存在するが血管内皮細胞との接着が疎であるため血管の透過性が更新しているといわれている [Hida K et al.]。一方、血液脳関門である大脳毛細血管内皮細胞は無窓構造であり、細胞間に密着結合が認められる。毛細血管内皮細胞に発現した (CAP type) P-gp、BCRP が薬剤排泄トランスポーターとしての機能を有するためには、第2章で示されたように血管の管腔側に発現するだけでなく、血管自体に大脳毛細血管と同様の密着構造を示す必要がある。大脳の毛細血管、つまり血液脳関門は毛細血管内皮細胞によって形成され、ペリサイトとアストロサイトに囲まれており、細胞間に存在する密着結合は拡散バリアを形成し、極性の薬剤を含む水溶性化合物の脳への浸透を厳しく制限している。また、脂溶性の薬剤が内皮細胞内に入ってきた場合も、P-gp や BCRP をはじめとする薬物排泄トランスポーターによって、管腔側に薬剤を排出することで、脳への浸透を制限している [Deeken JF et al.]。血液脳関門において密着構造を構成する重要な役割を果たすのが ZO-1 と Claudin 5 である。ZO-1 は、細胞質側に位置する周辺膜リンタンパク質であり、上皮細胞間および内皮細胞間にある密着結合で局在する [Stevenson BR et al.]。ZO-1 は、膜貫通タンパク質である occludin および claudin に結合し、細胞骨格アクチンに連結させる重要なタンパク質である [Poritz LS et al.]。また、Claudin 5 は血液脳関門における密着結合の構造と機能を担う分子基盤の中心をなしており、細胞間接着部位に集積して細胞膜を密着させると同時に、細胞膜内でひも状の密着構造ストランドを形成する [Iwamoto N et al.]。

第3章では P-gp、BCRP の CAP type 発現が認められた血管における密着結合分子 (ZO-1 および Claudin 5) を評価することで密着構造を評価することとした。

3. 腫瘍血管における血液腫瘍関門形成について

3.1. 序論

イヌのリンパ腫の腫瘍内毛細血管における密着構造を評価するため、密着結合の基礎となるタンパク質である Claudin5 および Claudin5 を裏打ちするタンパク質である ZO-1 について、免疫組織化学的検索を実施した。

3.2. 材料および方法

3.2.1. 腫瘍内毛細血管の形態的検索

3.2.1.1. 腫瘍内毛細血管の接着タンパクの評価

密着結合タンパク質ZO-1およびClaudin5の発現を調べるため、第2章で用いたリンパ腫の48検体中、40 検体 (No. 45およびNo. 47は2回目の検査の検体) でZO-1の免疫染色を行った。また、No. 10、14、38、45、47 (No. 45および47は2回目の検査の検体) について、Claudin5の免疫染色を行った。

一次抗体として polyclonal rabbit anti-human ZO-1 antibody (invitrogen, 61-7300, 1:100)および Claudin5 monoclonal antibody (ThermoFisher, 4C3C2, 1:200), 二次抗体で polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulin G (Nichirei bioscience, MAX-PO(R)) を使用した。抗体の希釈はすべて 1% bovine serum albumin-added phosphate buffered saline (PBS、pH7.4)で行った。

組織は10%neutral-buffered formalinで固定(7日以内)し、パラフィンに包埋した。切片は3 μ mで薄切した。切片はキシレンと段階希釈したエタノールで脱パラフィンし、PBSで5min洗浄した。前処理はZO-1では、0.4% pepsin, 37°C, 30minインキュベートし、Claudin5ではクエン酸緩衝液で20min煮沸した。前処理後、PBSで5min洗浄し、5%H₂O₂加メタノールで室温20min、ペルオキシダーゼ阻止をした。ブロックエースで非特異反応を阻止後、一次抗体を4°C overnightインキュベートした。PBSで5minを3回、洗浄後に二次抗体を室温60minインキュベートした。PBSで5minを3回洗浄後に3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)で可視化、ヘマトキシリンで核染色を行った。最後にエタノールで脱水し、キシレンで透徹、封入剤 (NEW MX, Matsunami Glass Ind.,Ltd.) で封入した。

3.3. 結果

3.3.1. 腫瘍内毛細血管の形態的検索

3.3.1.1. 腫瘍内毛細血管の tight junction タンパク質の局在評価

健常なイヌのリンパ節では、毛細血管内皮細胞を含めいずれの構造にも ZO-1 の染色が認められなかったが (Figure 7a)、健常なイヌの脳では毛細血管内皮細胞に発現が認められた (Figure 7c)。リンパ腫 40 症例で ZO-1 の免疫組織化学的検索を行ったところ、P-gp あるいは BCRP の CAP type の発現が認められた 20 検体中 17 検体で ZO-1 の発現が認められ (Figure 7e)、ZO-1 未発現の CAP type は 3 検体であった (Table 5)。P-gp または BCRP の CAP type の発現が認められなかったリンパ腫 20 検体中、10 検体で ZO-1 の発現が認められた。残りの 10 検体は ZO-1 未発現であった。ZO-1 の発現は腫瘍組織全体に認められ、その発現頻度は

断片的に発現しているものから線状に発現しているものまで様々であったが、連続または不連続ながらも線状に発現しているものが多かった。抗がん剤投与群および非投与群を比較したところ、抗がん剤投与群では 80.0%に ZO-1 が発現しており、非投与群では 63.2%に ZO-1 が発現し、抗がん剤投与群で有意に ZO-1 を発現していた(カイ二乗検定、 $P=0.006575$)。T 細胞型、B 細胞型の ZO-1 の発現率を比較したところ、両型で ZO-1 の発現率に有意差は認められなかった(カイ二乗検定、 $p=0.176183$) (Table 6)。P-gp あるいは BCRP の発現と ZO-1 の発現の関連性を評価するため、カッパ係数による検定を行った。その結果、P-gp および ZO-1 の発現の関連性については $\kappa=0.35$ であり、両分子の発現にはある程度の一致が認められた ($p=0.0181$)。また、BCRP と ZO-1 の関連性については $\kappa=0.372$ であり、BCRP と ZO-1 の発現についてもある程度の一致が認められた ($p=0.00899$)。

Claudin 5 においては、健常なイヌのリンパ節で発現が認められなかったが (Figure 7b)、健常なイヌの脳では毛細血管内皮細胞に発現が認められた(Figure 7d)。Claudin5 の免疫組織化学的検索を行った No. 10、14、38、45、47 では、No. 38 を除いてすべての症例で毛細血管内皮細胞の染色が認められた (Figure 7f、Table 7)。その発現は腫瘍組織内全体に認められ、多くの毛細血管で発現しており不連続な線状を呈するものから断片的にその発現が認められるものまで様々であったが、いずれも P-gp または BCRP の発現と同じか高頻度に発現が認められた。

3.4. 考察

3.4.1. 腫瘍内毛細血管の形態的検索

3.4.1.1. 腫瘍内毛細血管の接着タンパクの評価

イヌのリンパ腫において、P-gp、BCRP が陰性の症例でも ZO-1 の発現は認められたが、P-gp または BCRP の発現が認められた症例では、よりその発現率が高かった (P-gp または BCRP 陽性：20 例中 17 例 [85.0%]、陰性：20 例中 10 例 [50.0%])。P-gp または BCRP の発現と ZO-1 の発現の関連をカッパ係数により検定を行ったところ、両分子の発現に有意な一致が示された (それぞれ $p<0.05$)。また、Claudin 5 の免疫組織化学的検索を行った 5 症例のうち 4 症例で Claudin 5 の発現が認められた。Claudin 5 の発現が認められなかった No. 38 は、P-gp および BCRP が陰性であり、一方陽性だった 4 例は P-gp または BCRP が陽性だったことから (Table 7)、Claudin 5 も ZO-1 同様、P-gp または BCRP の発現と関連性があることが示唆された。

また、リンパ腫症例における ZO-1 および Claudin 5 の発現はすべて腫瘍内毛細血管に認められ、形態的に血液脳関門に類似していた。ZO-1 および Claudin 5 の発現頻度は、P-gp または BCRP の発現と同じまたは高頻度に認められており、本来、リンパ節の毛細血管では認められない密着結合タンパクが認められたこと、P-gp および BCRP の発現を経時的に評価した症例 (抗がん治療の前と後) では、発現が認められていなかったトランスポーターが抗がん治療後に発現したことを考慮すると、イヌのリンパ腫の毛細血管では薬物排泄トラン

スポンターの CAP type 発現と同時またはそれより前に ZO-1 および Claudin 5 が発現し、密着結合形成が促進する可能性が示唆された。また、薬物排泄トランスポーターの CAP type 発現および密着結合は脳毛細血管の特徴であり、イヌのリンパ腫における腫瘍内毛細血管は生体における脳毛細血管と類似した毛細血管を作る傾向にあることが考えられる。

3.5. 小括

イヌのリンパ腫において、本来リンパ節の毛細血管では認められない密着結合タンパク（ZO-1 および Claudin 5）が発現認められ、特に ZO-1 では P-gp および BCRP の発現との関連が示された。このことから、腫瘍内毛細血管において薬物排泄トランスポーターが発現すると同時に密着結合の形成が促進される傾向が認められ、形態学的にはあるがリンパ腫の腫瘍組織内に血液腫瘍関門を形成している可能性が示唆された。

4. 総括

リンパ腫では抗がん剤の感受性低下が寛解を目指す上で問題となることから、感受性低下を引き起こす薬剤耐性機構を明らかにすることが重要である。本研究ではイヌで頻繁に用いられる抗がん剤VCR, DXR, CPAの感受性低下に関与する可能性が高いトランスポーターについて、イヌのリンパ腫症例を用いて発現解析を行った。その結果、イヌのリンパ腫ではP-gp, BCRPのCAP type発現が認められた。これらの発現は健常なリンパ節では認められていないことから、腫瘍特異的な発現であることが示された。また、イヌのリンパ腫ではほとんどがCAP typeの発現であり、腫瘍細胞を含めた腫瘍環境の中でP-gp, BCRPの発現は毛細血管に局在が集中している可能性が示唆された。これまで、P-gpおよびBCRPは腫瘍細胞の細胞膜に発現し、細胞外へ基質を排泄することで薬剤耐性に関与していると考えられていたが、本研究においてイヌのリンパ腫でCap typeの発現が認められ、通常の細胞膜での発現と異なる薬物動態、つまり血管に発現して組織への流入を阻止することで薬剤耐性に関わっている可能性が示唆された。

このように腫瘍細胞だけでなく腫瘍内毛細血管に形態的变化が生じる背景として、全身性に投与される抗がん治療による影響のほかに、がん微小環境の存在への影響が考えられる。腫瘍組織では急激な腫瘍増大のため、低酸素、低栄養状態になっており、さらにがん細胞やがん間質細胞から分泌されるサイトカインに暴露されている。このようながん微小環境下では、がん細胞だけでなく、腫瘍血管内皮細胞にも遺伝的变化がもたしている可能性が高い [Hida K et al.]。実際これまでの報告で、腫瘍血管内皮細胞では、遺伝子発現レベルで正常血管内皮細胞と異なり、上皮細胞増殖因子 (EGFR) や血管内非増殖因子 (VEGF) などの発現が多く認められており [Amin DN et al.; Kurosu T et al.]、ヒトのリンパ腫ではがん細胞と同様の染色体異常が腫瘍血管内皮細胞にも認められている [Streubel B et al.]。さらに、腫瘍血管内皮細胞では、正常血管内皮細胞に比べてP-gpのmRNAの発現が上昇することによってpaclitaxelに対して耐性が認められたことが報告されている

[Akiyama K et al.]。これらのことから、がん微小環境下では、がん細胞だけでなく、腫瘍環境を構成する血管および血管に関わる因子に対して腫瘍は構造を変化させ、生存に有利な状況を構成する力を有すると考えられ、CAP typeでは、通常のトランスポーターの働きである細胞から基質を排除するのではなく、血管に発現することでトランスポーターの基質が組織への流入を阻止するよう形態が変化した可能性が高い。

毛細血管におけるP-gpおよびBCRPの局在を評価では、毛細血管の内腔側にその発現が認められ、両トランスポーターが毛細血管から腫瘍組織内に移行する抗がん剤等の基質を血管腔に排泄している可能性が示唆された。

さらにCAP type発現を示した腫瘍内毛細血管内皮細胞には密着結合タンパク質の発現が認められ、ZO-1ではP-gpおよびBCRPの発現との関連性が示された。また、Claudin 5においても、P-gpまたはBCRPを発現している症例において、発現が認められている。これらの結果から、P-gpおよびBCRPを毛細血管に発現した症例において、通常のリンパ節ではみとめ

られない密着構造を作り出している可能性が考えられた。

大脳の毛細血管は血管内を流れる物質から実質を守る血液関門としてはたらいっている。通常、VCRやDXRのような脂溶性物質は細胞膜透過が容易な物質であるが、イヌのリンパ腫では、CAP type発現することによって基質となる抗がん剤の薬物動態を変化させ、大脳毛細血管のように、血中を流れる基質となる抗がん剤から血管外の実質、腫瘍細胞の保護としてはたらく可能性が考えられ、リンパ腫の腫瘍組織内で血液腫瘍関門を形成している可能性が示唆された。

抗がん治療前後でP-gpおよびBCRPの発現を評価した症例では、抗がん治療前に両トランスポーターの発現は認められておらず、治療後に発現していた。また、抗がん剤を投与した症例と非投与の症例を比較した統計解析では、投与した症例においてこれらのトランスポーターが有意に発現していることが示された。このことから、イヌのリンパ腫において抗がん治療、特にP-gpおよびBCRPの基質の使用が、これらのトランスポーターの発現に関与している可能性が示唆された。

本研究では、健常なイヌのリンパ節で発現していない密着結合タンパクが、腫瘍内毛細血管に発現していることが明らかとなったが、腫瘍内毛細血管が血液脳関門と同様に連続性の毛細血管であるかどうかについては明らかにできていない。そのため、電子顕微鏡により腫瘍内毛細血管の接着構造を超微形態的に確認する必要があると考える。また、今回、形態学的にP-gp,およびBCRPがイヌのリンパ腫において、血液脳関門と同様の機序により薬剤耐性に関わっている可能性が示唆されたが、イヌのリンパ腫における関門形成を証明するには、今後、腫瘍内毛細血管を単離し、P-gp および BCRP による基質の輸送活性を評価するなどの機能的実験を行う必要があると考える。

本論文の一部は、以下に公表した。

Hyokai, S., Tanaka, H., Aihara, N., Kamiie, J.: Expression of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein in three cases of canine lymphoma showing drug resistance. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 83(3): 473-477: 2021

5. 図表

Table 1. リンパ腫 43 症例の各症例情報および P-gp および BCRP の免疫組織化学的検索結果

| No. | P-gp | BCRP | T/B | breed | sex | anticancer treatment | section |
|-----|------|------|-----|----------------------------|-----|-------------------------------------|---------|
| 1 | Cap | Cap | B | Mix | ♀ | VCR, L-ASP | Lym |
| 2 | Cap | Cap | B | Border Collie | ♀ | VCR, DXR, L-ASP, Ara-C, MIT, HYD | Lym |
| 3 | Cap± | Cap± | B | Pembroke Welsh Corgi | ♂ | L-ASP | Lym |
| 4 | Cap | Cap | B | Shiba | ♀ | — | Lym |
| 5 | Cap | Cap | B | Pug | ♀ | — | Lym |
| 6 | Cap | Cap | B | Shih Tzu | ♀ | ND | Lym |
| 7 | Cap | Cap | B | Golden Retriever | ♀ | ND | Lym |
| 8 | Cap | — | B | Boxer | ♂ | ND | Skin |
| 9 | Cap | Cap | T | Beagle | ♂ | VCR | Lym |
| 10 | Cap | Cap | T | Labrador Retriever | ♀ | VCR, CPA, Ara-C, L-ASP | Lym |
| 11 | Cap | Cap | T | Shiba | ♀ | — | Lym |
| 12 | Cap | Cap | T | Golden Retriever | ♀ | — | Skin |
| 13 | Cap± | Cap± | T | Shih Tzu | ♀ | — | Skin |
| 14 | Cap | Cap | T | Golden Retriever | ♂ | — | Spleen |
| 15 | Cap | Cap | N | German Shepherd | ♀ | L-ASP | Lym |
| 16 | Cap | Cap | N | Golden Retriever | ♀ | — | Spleen |
| 17 | Cap | Cap± | N | Mix | ♂ | — | Lym |
| 18 | Cap | Cap | N | ND | ND | ND | Skin |
| 19 | — | — | T | Shih Tzu | ♀ | — | Skin |
| 20 | — | — | T | Bernese Mountain | ND | ND | Lym |
| 21 | — | — | N | ND | ND | — | Lym |
| 22 | — | — | N | Pembroke Welsh Corgi | ♂ | — | Lym |
| 23 | — | — | B | Shih Tzu | ND | — | Lym |
| 24 | — | — | B | American Cocker Spaniel | ND | — | Lym |
| 25 | — | — | B | Pembroke Welsh Corgi | ♂ | — | Lym |
| 26 | — | — | B | Golden Retriever | ♀ | — | Lym |

| | | | | | | | |
|----|---|---|----|--------------------|----|-------------------------|------|
| 27 | — | — | T | Mix | ♂ | VCR, DXR, L-ASP, MIT | Lym |
| 28 | — | — | T | Mix | ♂ | — | Lym |
| 29 | — | — | T | Beagle | ♀ | — | Skin |
| 30 | — | — | T | Beagle | ♂ | — | Skin |
| 31 | — | — | T | Labrador Retriever | ♂ | — | Skin |
| 32 | — | — | T | Maltese | ♀ | — | Skin |
| 33 | — | — | T | Mix | ♀ | ND | Skin |
| 34 | — | — | T | ND | ND | ND | Lym |
| 35 | — | — | T | ND | ND | ND | Lym |
| 36 | — | — | N | ND | ND | VCR,DXR,Ara-C,CPA | Lym |
| 37 | — | — | N | Golden Retriever | ND | — | Lym |
| 38 | — | — | N | Shetland Sheepdog | ♂ | — | Skin |
| 39 | — | — | N | Golden Retriever | ♂ | ND | Lym |
| 40 | — | — | N | Golden Retriever | ♂ | ND | Lym |
| 41 | — | — | N | ND | ND | ND | Lym |
| 42 | — | — | ND | ToyPoodle | ♀ | ND | Lym |
| 43 | — | — | ND | Golden Retriever | ♂ | — | Lym |

腫瘍内毛細血管内皮細胞に発現したものを Cap、陰性は—で示した。T/B の B は B 細胞型、T は T 細胞型、N は Null 型である。Anticancer treatment における—は抗がん剤の治療歴なし。ND (No data)は不明。

Table 2. RT-PCR に用いた P-gp, BCRP の primer pairs の配列

| | Sense primer | Reverse primer | Amplicon size(bp) | GenBank accession number |
|------|---|---|-------------------|--------------------------|
| P-gp | 5'-ACTCGGGAGCAGAAGTTGA-3' (2734-2753) | 5'-AATGAGACCCGAAGATGTG-3' (2809-2828) | 95 | NM001003215 |
| BCRP | 5'-AACTTCTGCCCAGGAGTCAA-3' (1768-1787) | 5'-ATCATGCATCCCAAGGCTAC-3' (1891-1910) | 143 | DQ222459 |

Table 3. リンパ腫 43 症例における P-gp および BCRP 発現解析

| Transporter | Total case N=43 n (%) | 抗がん剤投与 N=8 n (%) | 抗がん剤非投与 N=23 n (%) | T 細胞性 N=17 n (%) | B 細胞性 N=12 n (%) |
|---------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| P-gp positive | 18 (41.9%) | 6 (75.0%) p=0.048969 | 8 (34.8%) | 6 (35.2%) p=0.095882 | 8 (66.7%) |
| BCRP positive | 17 (39.5%) | 6 (75.0%) p=0.048969 | 8 (34.8%) | 6 (35.2%) p=0.21918 | 7 (58.3%) |

抗がん剤投与 vs 非投与および T 細胞性 vs B 細胞性の検定にはカイ二乗検定を用いた。

Table 4. 抗がん治療前後でサンプリングした症例の症例情報および P-gp および BCRP の免疫組織化学的検索の結果

| Case | Sample | P-gp | BCRP | T/B | breed | sex | treatment | section |
|------|---------------------------|------|------|-----|--------------------|-----|---|---------|
| 44 | 44 (1 st test) | — | — | B | French bulldog | ♂ | Continued | Lym |
| | 44 (2 nd test) | — | — | | | | anticancer drugs after diagnosis | Lym |
| 45 | 45 (1 st test) | — | — | B | Miniature pinscher | ♂ | Anticancer drug started after diagnosis. Achieved CR but soon relapsed | Lym |
| | 45 (2 nd test) | Cap | — | | | | Lym | |
| 46 | 46 (1 st test) | — | — | B | French bulldog | ♀ | Unknown | Lym |
| | 46 (2 nd test) | — | — | | | | Lym | |
| 47 | 47 (1 st test) | — | — | T | Welsh corgi | ♀ | Chemotherapy after diagnosed | Lym |
| | 47 (2 nd test) | — | Cap | | | | Lym | |
| | 47 (3 rd test) | Mem | — | | | | Lym | |
| 48 | 48 (1 st test) | — | — | T | Beagle | ♂ | Not achieved CR after L-asparaginase, steroids, chlorambucil then vincristine | Lym |
| | 48 (2 nd test) | — | Cap | | | | Lym | |

腫瘍内毛細血管内皮細胞に発現したものを Cap、腫瘍細胞の細胞膜に発現したものを Mem、陰性は—で示した。T/B の B は B 細胞型、T は T 細胞型である。

Table 5. ZO-1 の免疫組織化学的検索の結果

| No. | ZO-1 | P-gp | BCRP | T/B |
|------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| 1 | + | Cap | Cap | B |
| 2 | + | Cap | Cap | B |
| 3 | + | Cap± | Cap± | B |
| 4 | + | Cap | Cap | B |
| 5 | + | Cap | Cap | B |
| 6 | + | Cap | Cap | B |
| 7 | + | Cap | Cap | B |
| 8 | + | Cap | — | B |
| 9 | + | Cap | Cap | T |
| 10 | + | Cap | Cap | T |
| 11 | + | Cap | Cap | T |
| 12 | + | Cap | Cap | T |
| 13 | — | Cap± | Cap± | T |
| 14 | + | Cap | Cap | T |
| 15 | + | Cap | Cap | N |
| 16 | + | Cap | Cap | N |
| 17 | + | Cap | Cap± | N |
| 18 | + | Cap | Cap | N |
| 19 | ND | — | — | T |
| 20 | — | — | — | T |
| 21 | ND | — | — | N |
| 22 | ND | — | — | N |
| 23 | — | — | — | B |
| 24 | + | — | — | B |
| 25 | — | — | — | B |
| 26 | + | — | — | B |
| 27 | + | — | — | T |
| 28 | — | — | — | T |
| 29 | + | — | — | T |
| 30 | — | — | — | T |
| 31 | — | — | — | T |
| 32 | + | — | — | T |
| 33 | — | — | — | T |
| 34 | + | — | — | T |

| | | | | |
|---------------|----|-----|-----|----|
| 35 | — | — | — | T |
| 36 | + | — | — | N |
| 37 | + | — | — | N |
| 38 | — | — | — | N |
| 39 | + | — | — | N |
| 40 | + | — | — | N |
| 41 | — | — | — | N |
| 42 | ND | — | — | ND |
| 43 | ND | — | — | ND |
| 44 | ND | — | — | B |
| 45 (2nd test) | — | Cap | — | B |
| 46 | ND | — | — | B |
| 47 (2nd test) | — | Mem | Cap | T |
| 48 | ND | — | Cap | T |

ZO-1+：毛細血管内皮細胞における発現が認められた。ZO-1 -：毛細血管において発現は認められなかった。ND(no data)：免疫組織化学的検索未実施リンパ腫。

P-gp または BCRP：腫瘍内毛細血管内皮細胞に発現したものを Cap、腫瘍細胞の細胞膜に発現したものを Mem、陰性は—で示した。T/B の B は B 細胞型、T は T 細胞型である。

Table 6 リンパ腫 40 症例における ZO-1 発現解析

| Transporter | Total N=40 n (%) | case N=10 n (%) | 抗がん剤投与 N=19 n (%) | 抗がん剤非投与 N=17 n (%) | T 細胞性 N=17 n (%) | B 細胞性 N=13 n (%) |
|------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| ZO-1 positive | 27 (67.5%) | 8 (80.0%) | 12 (63.2%) | 9 (52.9%) | 9 (52.9%) | 10 (76.9%) |
| | | p=0.006575 | | | p=0.176783 | |

抗がん剤投与 vs 非投与および T 細胞性 vs B 細胞性の検定にはカイ二乗検定を用いた。

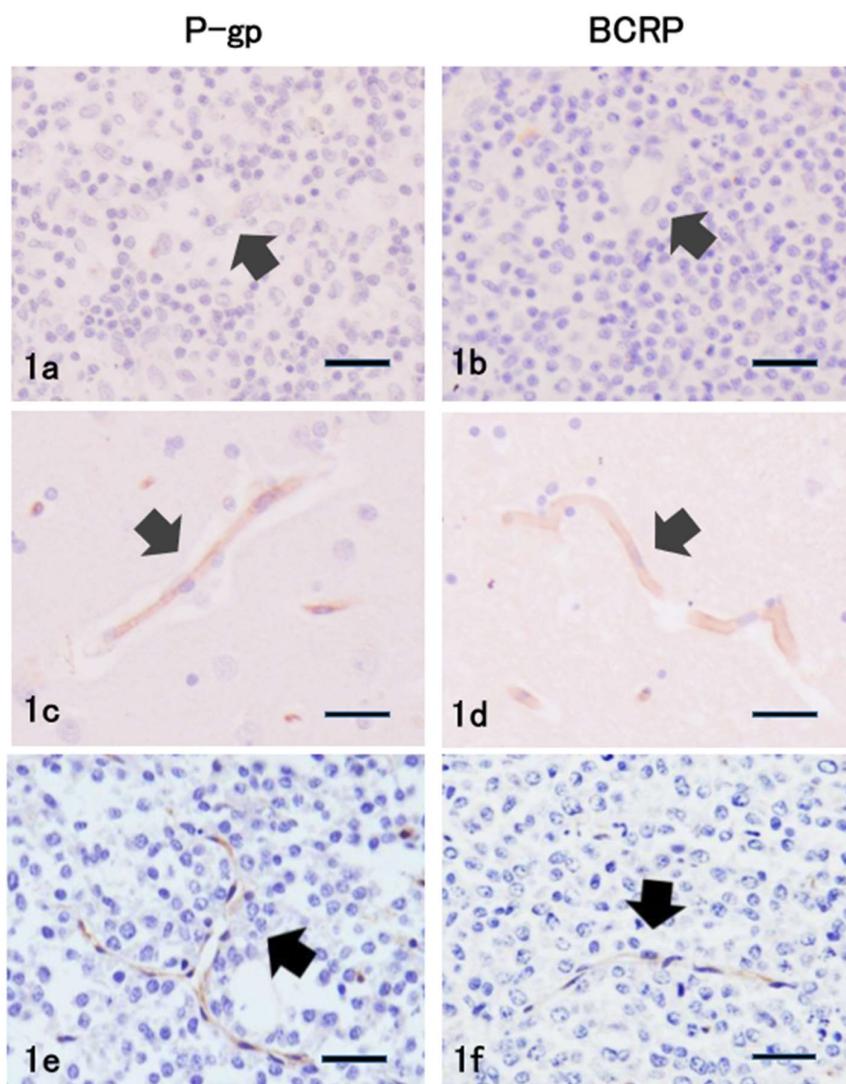
Table 7. Claudin 5 の免疫組織化学的検索の結果

| No. | Claudin 5 | P-gp | BCRP | T/B |
|---------------|-----------|------|------|-----|
| 10 | + | Cap | Cap | T |
| 14 | + | Cap | Cap | T |
| 38 | — | — | — | N |
| 45 (2nd test) | + | Cap | — | B |
| 47 (2nd test) | + | Mem | Cap | T |

Claudin 5+ : 毛細血管内皮細胞における発現が認められた。Claudin 5 - : 毛細血管において発現は認められなかった。

P-gp または BCRP : 腫瘍内毛細血管内皮細胞に発現したものを Cap、細胞膜に発現したものを Mem、陰性は—で示した。T/B の B は B 細胞型、T は T 細胞型である。

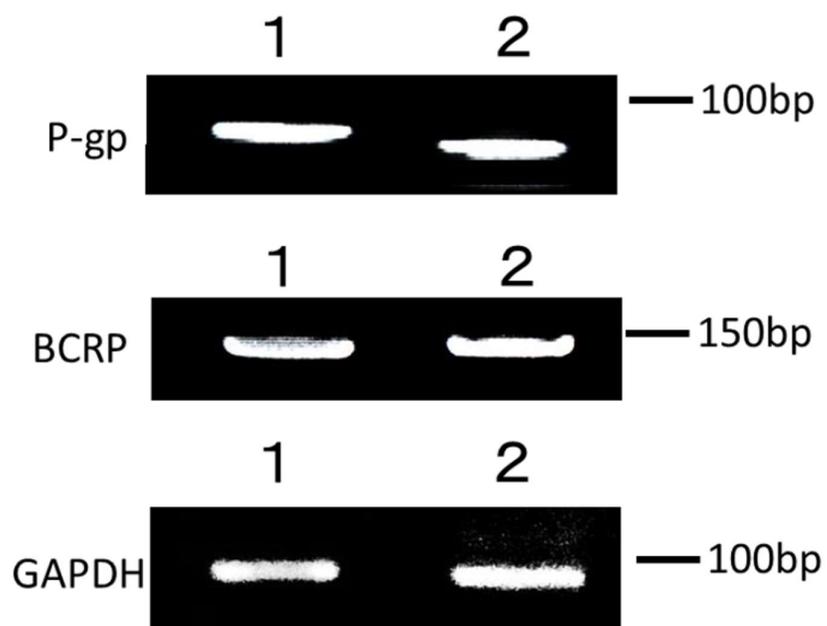
Figure 1. P-gp および BCRP の免疫染色



1aは健常なイヌのリンパ節の P-gp、1bは健常なイヌのリンパ節の BCRP の染色。健常なイヌのリンパ節では P-gp および BCRP の発現は認められなかった (矢印は毛細血管)。1cは健常なイヌの脳の P-gp、1dは健常なイヌの脳の BCRP の染色。健常なイヌの脳では毛細血管内皮細胞に P-gp および BCRP が発現していた (矢印)。1eは No.10 の P-gp、1fは No. 10 の BCRP の染色。No. 10 では腫瘍内毛細血管内皮細胞に発現が認められた(矢印)。

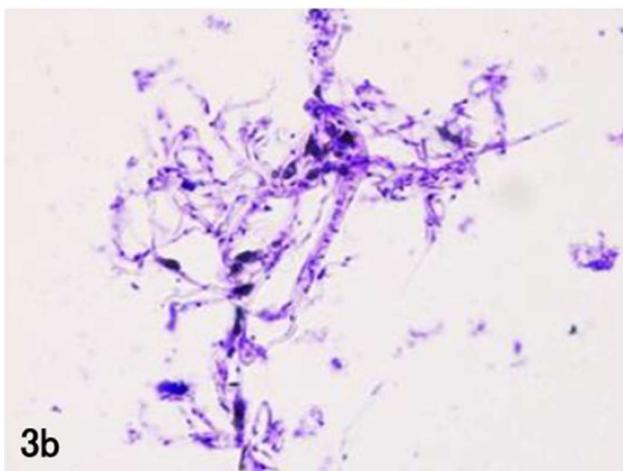
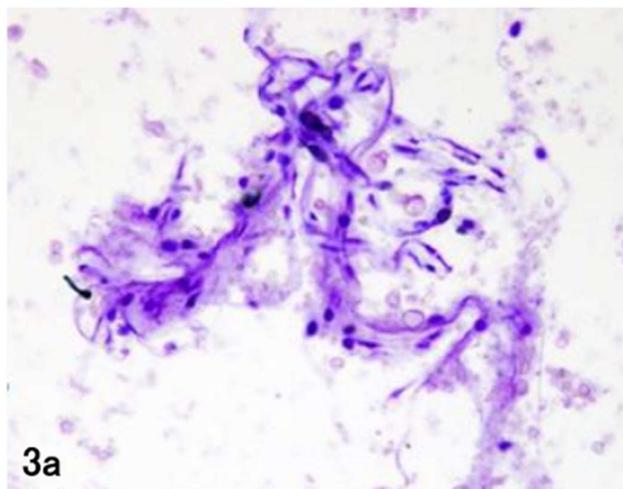
Bar:25 μ m

Figure 2. P-gp および BCRP の RT-PCR



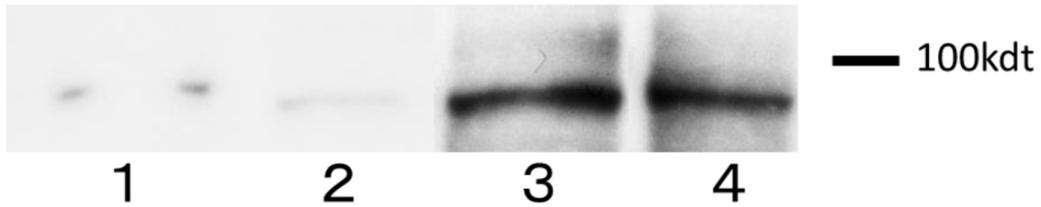
健常なイヌの脳皮質(Rane 1)とリンパ腫(No.10, Rane 2)における RT-PCR。両サンプルとも 95bp の P-gp, 143bp の BCRP および 101bp の GAPDH で増幅が認められた。

Figure 3. 単離した毛細血管（トルイジンブルー染色）



健常なイヌの脳皮質から作成した毛細血管豊富なサンプル BCAP (3a)。No.10 のイヌのリンパ腫から作成した毛細血管豊富なサンプル LCAP (3b)。両サンプルとも多数分岐している毛細血管が豊富に認められた。

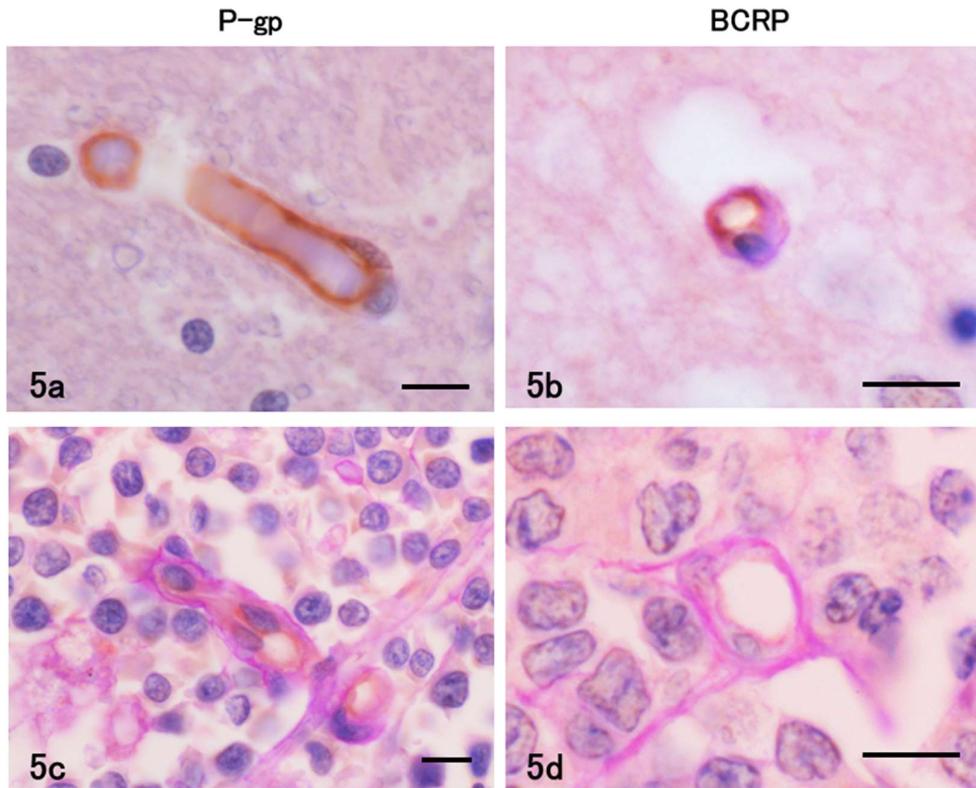
Figure 4. BCRP の Western Blotting



Rane 1 : Lymphoma Whole、Rane 2 : Brain Whole、Rane 3 : LCAP、Rane 4 : BCAP

全サンプルで約 90kdt に BCRP の発現が認められた。Whole 材料に対して、毛細血管豊富な材料ではより多く BCRP の発現が認められた。

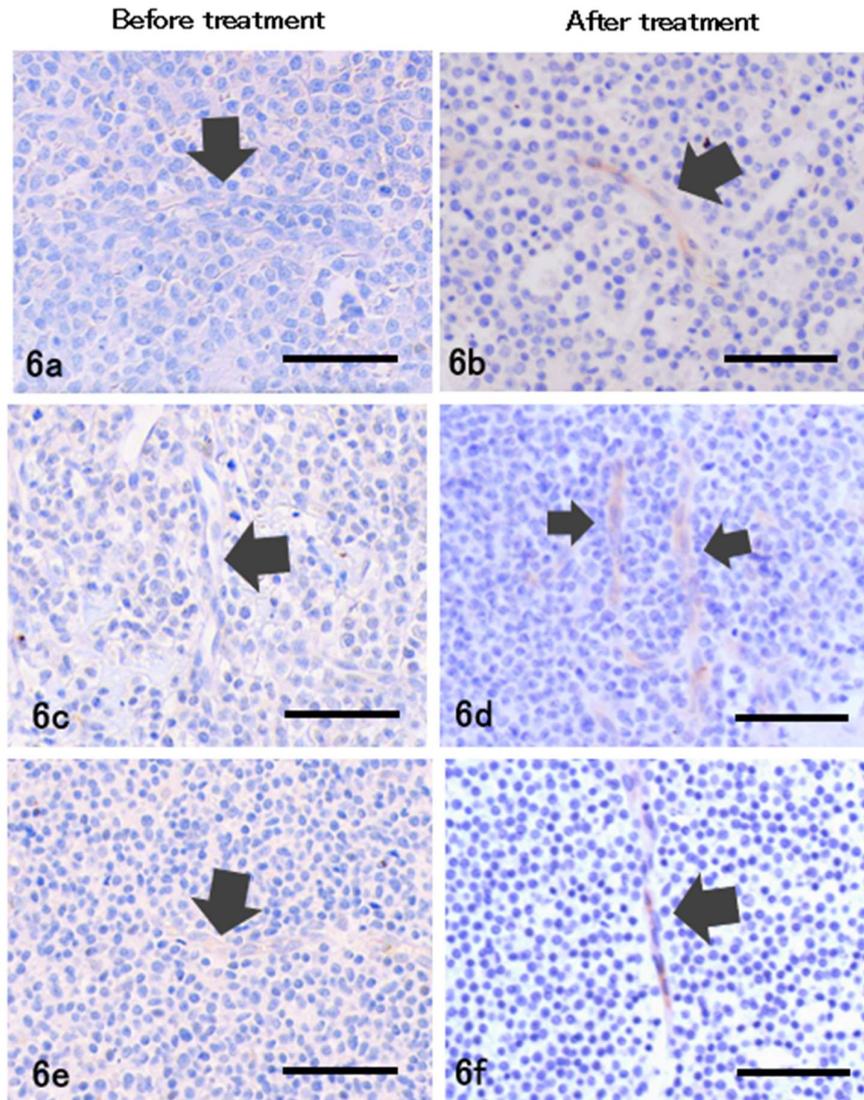
Figure 5. P-gp および BCRP と PAS の重染色



5a は健常なイヌの脳皮質の P-gp、5b は健常なイヌの脳皮質の BCRP の染色。健常なイヌの脳皮質では毛細血管の管腔側に P-gp および BCRP の発現が認められた。5c は No. 45 の 2 回目の検査検体の P-gp の染色。5d は No. 47 の 2 回目の検査検体の BCRP の染色。5c、5d とともに脳皮質ほど明瞭ではないが、管腔側に P-gp および BCRP の発現が認められた。

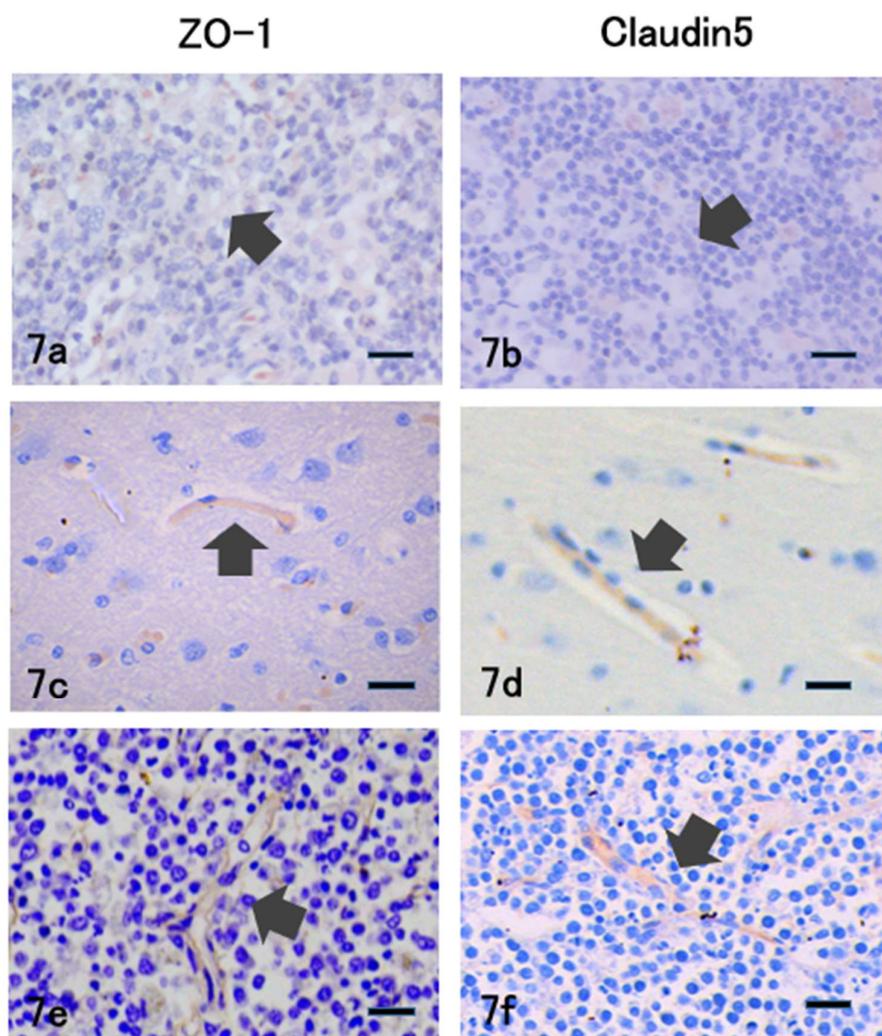
Bar: 8 μm

Figure 6. P-gp および BCRP の免疫染色



6a は No. 45 の抗がん治療前、6b は抗がん治療後の P-gp 免疫染色結果。6c は No. 47 の抗がん治療前、6d は抗がん治療後の BCRP 免疫染色結果。6e は No. 48 の抗がん治療前、6f は抗がん治療後の BCRP 免疫染色結果。矢印はすべて毛細血管を示している。No. 45、No. 47、No. 48 とともに抗がん治療前には P-gp または BCRP の発現が認められなかったが、抗がん治療後に毛細血管内皮細胞にその発現が認められている。Bar:50 μ m

Figure 7. ZO-1 および Claudin 5 の免疫染色



7a は健康なイヌのリンパ節の ZO-1、7b は健康なイヌのリンパ節の Claudin 5 の染色。健康なイヌでは ZO-1 および Claudin5 の発現が認められなかった (矢印は毛細血管)。7c は健康なイヌの脳皮質の ZO-1、7d は健康なイヌの脳皮質の Claudin5 の染色。健康なイヌの脳では ZO-1 および Claudin5 が毛細血管内皮細胞に発現していた。7e は No.2 の ZO-1 の染色。No. 2 では毛細血管に ZO-1 の発現が認められた (6e)。7f は No. 45 の Claudin5 の染色。No. 45 では毛細血管に Claudin 5 の発現が認められた。Bar.:20 μ m

6. 参考文献

Akiyama K, Ohga N, Hida Y, Kawamoto T, Sadamoto Y, Ishikawa S, Maishi N, Akino T, Kondoh M, Matsuda A, Inoue N, Shindoh M, Hida K. 2012. Tumor endothelial cells acquire drug resistance by MDR1 up-regulation via VEGF signaling in tumor microenvironment. *Am J Pathol.* 180: 1283-93

Amin DN, Hida K, Bielenberg DR, Klagsbrun M. 2006. Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Res.* 66:2173-80.

Appelbaum FR, Sale GE, Storb R, Charrier K, Deeg HJ, Graham T, Wulff JC. 1984. Phenotyping of canine lymphoma with monoclonal antibodies directed at cell surface antigens: classification, morphology, clinical presentation and response to chemotherapy. *Hematol Oncol.* 2:151–168.

Bergman, P.J. Mechanisms of anticancer drug resistance. 2003. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* 33:651-667.

Bergman PJ, Ogilvie GK, Powers BE. 1996. Monoclonal antibody C219 immunohistochemistry against P-glycoprotein: sequential analysis and predictive ability in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med.* 10:354–359.

Bell R, Cotter S, Lillquist A, Sallan S, McCaffrey R. 1984. Characterization of glucocorticoid receptors in animal lymphoblastic disease: correlation with response to single-agent glucocorticoid treatment. *Blood.* 63:380–383.

Caniatti M, Roccabianca P, Scanziani E, Paltrinieri S, Moore PF. 1996. Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Vet Pathol.* 33:204–212.

- Chun R, Garrett LD, Vail DM. 2000. Evaluation of a high-dose chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med.* 14:120–124.
- Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JL. 2002. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract.* 43:240–246.
- Dorn CR, Taylor DO, Hibbard HH. 1967. Epizootiologic characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma. *Am J Vet Res.* 28:993–1001.
- Edwards DS, Henley WE, Harding EF, Dobson JM, Wood JL. 2003. Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. *Vet Comp Oncol.* 1:200–206.
- Flood-Knapik KE, Durham AC, Gregor TP, Sanchez MD, Durney ME, Sorenmo KU. 2013. Clinical, histopathological and immunohistochemical characterization of canine indolent lymphoma. *Vet Comp Oncol* 11:272–286.
- Fournel-Fleury C, Magnol JP, Bricaire P, Marchal T, Chabanne L, Delverdier A, Bryon PA, Felman P. 1997. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *J Comp Pathol.* 117:35–59.
- Galimberti S, Nagy B, Benedetti E, Pacini S, Brizzi S, Caracciolo F, Papineschi F, Ciabatti E, Guerrini F, Fazzi R, Canestraro M, Petrini M.. 2007. Evaluation of the MDR1, ABCG2, topoisomerases IIalpha and GSTpi gene expression in patients affected by aggressive mantle cell lymphoma treated by the R-Hyper-CVAD regimen. *Leuk Lymphoma.* 48:1502–1509.
- Garrett LD, Thamm DH, Chun R, Dudley R, Vail DM. 2002. Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med.* 16:704–709.

Gavazza A, Lubas G, Valori E, Gugliucci B. 2008. Retrospective survey of malignant lymphoma cases in the dog: clinical, therapeutical and prognostic features. *Vet Res Commun.* 32:S291–S293.

Hida K. 2012. Tumor microenvironment and Tumor Endothelial Cells. *Drug Delivery Systems.* 27:34-39

Hida K, Akiyama K, Ohga N, Maishi N, Hida Y. 2013. Tumour endothelial cells acquire drug resistance in a tumour microenvironment. *J Biochem.* 153:243-9

Hifumi T, Miyoshi N, Kawaguchi H, Nomura K, Yasuda N. 2010. Immunohistochemical detection of proteins associated with multidrug resistance to anti-cancer drugs in canine and feline primary pulmonary carcinoma. *J Vet Med Sci.* 72:665–668.

Honscha KU, Schirmer A, Reischauer A, Schoon HA, Einspanier A, Gabel G. 2009. Expression of ABC-transport proteins in canine mammary cancer: consequences for chemotherapy. *Reprod Domest Anim.* 44:218–223.

Iwamoto N, Furuse M. 2013. The blood- brain barrier and barrier function in vivo: the role of tight junctions. 28:279-86

Kathawala, R.J.; Gupta, P.; Ashby, C.R., Jr.; Chen, Z.S. 2015. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug Resist Updates.* 18C:1-17.

Kim JE, Singh RR, Cho-Vega JH, Drakos E, Davuluri Y, Khokhar FA, Fayad L, Medeiros LJ, Vega F. 2009. Sonic hedgehog signaling proteins and ATP-binding cassette G2 are aberrantly expressed in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol.* 22:1312-1320.

Kurosu T, Ohga N, Hida Y, Maishi N, Akiyama K, Kakuguchi W, Kuroshima T, Kondo M, Akino T, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F, Hida K. HuR keeps an angiogenic switch on by stabilizing mRNA of VEGF and COX-2 in tumor endothelium. *Br J Cancer*. 104: 819-29.

Lage H. 2008. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cell Mol Life Sci*. 65:3145–3167.

Lee JJ, Hughes CS, Fine RL, Page RL. 1996. P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance. *Cancer*. 77:1892–1898.

Marconato L, Stefanello D, Valenti P, Bonfanti U, Comazzi S, Roccabianca P, Caniatti M, Romanelli G, Massari F, Zini E. 2011. Predictors of long-term survival in dogs with high-grade multicentric lymphoma. *J Am Vet Med Assoc*. 238:480–485.

Matsuura, S.; Koto, H.; Ide, K.; Fujino, Y.; Setoguchi-Mukai, A.; Ohno, K.; Tsujimoto, H. 2007. Induction of chemoresistance in a cultured canine cell line by retroviral transduction of the canine multidrug resistance 1 gene. *Am J Vet Res* 68:95-100.

Mealey KL, Fidel J, Gay JM, Impellizeri JA, Clifford CA, Bergman PJ. 2008. ABCB1-1Delta polymorphism can predict hematologic toxicity in dogs treated with vincristine. *J Vet Intern Med*. 22:996–1000.

Miller TP, Grogan TM, Dalton WS, Spier CM, Scheper RJ, Salmon SE, 1991. P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. *J Clin Oncol* 9:17-24.

- Moore, A.S.; Leveille, C.R.; Reimann, K.A.; Shu, H.; Arias, I.M. 1995. The expression of P-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance. *Cancer Investig.* 13:475-479.
- Moscow JA, Fairchild CR, Madden MJ, Ransom DT, Wieand HS, O'Brien EE, Poplack DG, Cossman J, Myers CE, Cowan. KH. 1989. Expression of anionic glutathione-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumors. *Cancer Res.* 49:1422-1428.
- O'Brien D, Moore PF, Vernau W, Peuroi JR, Rebhun RB, Rodriguez CO,Jr, Skorupski KA. 2013. Clinical characteristics and outcome in dogs with splenic marginal zone lymphoma. *J Vet Intern Med.* 27:949-954.
- O'Connor, R. 2007. The pharmacology of cancer resistance. *Anticancer Res.*27:1267-1272.
- Page RL, Hughes CS, Huyen S, Sagris J, Trogdon M. 2000. Modulation of P-glycoprotein-mediated doxorubicin resistance in canine cell lines. *Anticancer Res.* 20:3533-3538.
- Piek CJ, Rutteman GR, Teske E. 1999. Evaluation of the results of a L-asparaginase-based continuous chemotherapy protocol versus a short doxorubicin-based induction chemotherapy protocol in dogs with malignant lymphoma. *Vet Q.* 21:44-49.
- Ponce F, Marchal T, Magnol JP, Turinelli V, Ledieu D, Bonnefont C, Pastor M, Delignette ML, Fournel-Fleury C. 2010. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet Pathol.* 47:414-433.

- Price GS, Page RL, Fischer BM, Levine JF, Gerig TM. 1991. Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. *J Vet Intern Med.* 5:259–262.
- Pawlowski KM, Mucha J, Majchrzak K, Motyl T, Krol M. 2013. Expression and role of PGP, BCRP, MRP1 and MRP3 in multidrug resistance of canine mammary cancer cells. *BMC Vet Res.* 9, doi:10.1186/1746-6148-9-119.
- Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Klotun WA. 2007. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res.*140:12-9
- Ruslander DA, Gebhard DH, Tompkins MB, Grindem CB, Page RL. 1997. Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. *In Vivo.* 11:169–172.
- Sakai Y, Uetsuka K, and Nakayama H. 2008. Diagnoses of Canine and Feline Malignant Lymphomas Using the New WHO Classification. *J Jpn Vet Med Assoc.* 61:543-548.
- Seelig DM, Avery P, Webb T, Yoshimoto J, Bromberek J, Ehrhart EJ, Avery AC. 2014. Canine T-zone lymphoma: unique immunophenotypic features, outcome, and population characteristics. *J Vet Intern Med.* 28:878–886.
- Smith LK and Cidlowski JA. 2010. Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. *Prog Brain Res.* 182:1–30.
- Sozmen M, Tasca S, Carli E, De Lorenzi D, Furlanello T, Caldin M. 2005. Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. *J Vet Diagn Invest.* 17:323–330.

Squire RA, Bush M, Melby EC, Neeley LM, Yarbrough B. 1973. Clinical and pathologic study of canine lymphoma: clinical staging, cell classification, and therapy. *J Natl Cancer Inst.* 51:565–574.

Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol.* 103:755-66

Streubel B, Chott A, Huber D et al. 2004. Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med.*351:250-9.

Stefanello D, Valenti P, Zini E, Comazzi S, Gelain ME, Roccabianca P, Avallone G, Caniatti M, Marconato L. 2011. Splenic marginal zone lymphoma in 5 dogs (2001-2008). *J Vet Intern Med.* 25:90–93.

Tashbaeva RE, Hwang DN, Song GS, Choi NH, Lee JH, Lyoo YS, Lee SJ, Jung DI, Kim HY, Sur JH. 2007. Cellular characterization of multidrug resistance P-glycoprotein, alpha fetoprotein, and neovascular endothelium- associated antigens in canine hepatocellular carcinoma and cirrhotic liver. *Vet Pathol.* 44:600–606.

Teske E. 1994. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-hodgkin's lymphoma. *Vet Q.* 16:209–219.

Teske E, de Vos JP, Egberink HF, Vos JH. 1994. Clustering in canine malignant lymphoma. *Vet Q.* 16:134–136.

Teske E and van Heerde P. 1996. Diagnostic value and reproducibility of fine-needle aspiration cytology in canine malignant lymphoma. *Vet Q.* 18:112–115.

- Teske E, van Heerde P, Rutteman GR, Kurzman ID, Moore PF, MacEwen EG. 1994. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 205:1722–1728.
- Teske E, Wisman P, Moore PF, van Heerde P. 1994. Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology. *Exp Hematol.* 22:1179–1187.
- Tomiyasu, H.; Goto-Koshino, Y.; Takahashi, M.; Fujino, Y.; Ohno, K.; Tsujimoto, H. 2010. Quantitative analysis of mrna for 10 different drug resistance factors in dogs with lymphoma. *J. Vet. Med. Sci.*72:1165-1172.
- Tomiyasu H, Tsujimoto H. 2015. Comparative Aspects of Molecular Mechanisms of Drug Resistance through ABC Transporters and Other Related Molecules in Canine Lymphoma. *Vet. Sci.* 2:185-205.
- Vajdovich P, Koltai Z, Valeria D, Kungl K, Harnos A. 2018. Evaluation of Pgp (MDR1) immunohistochemistry in canine lymphoma - prognostic and clinical aspects. *Acta Vet Hung.* 66: 309-328.
- Valli VE. 2002. Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals. WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals.
- Valli VE, Vernau W, de Lorimier LP, Graham PS, Moore PF. 2006. Canine indolent nodular lymphoma. *Vet Pathol.* 43:241–256.
- Villamil JA, Henry CJ, Hahn AW, Bryan JN, Tyler JW, Caldwell CW. 2009. Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *J Cancer Epidemiol.* doi:10.1155/2009/591753.

Wilson WH, Bates SE, Fojo A, Bryant G, Zhan Z, Regis J, Wittes RE, Jaffe ES, Steinberg SM, Herdt J. 1995. Controlled trial of dexverapamil, a modulator of multidrug resistance, in lymphomas refractory to EPOCH chemotherapy. *J Clin Oncol.* 13:1995-2004.

Yahanda AM, Alder KM, Fisher GA, Brophy NA, Halsey J, Hardy RI, Gosland MP, Lum BL, Sikic BI. 1992. Phase I trial of etoposide with cyclosporine as a modulator of multidrug resistance. *J Clin Oncol.*10:1624-1634.

Zandvliet,M. 2016. Canine lymphoma: a review. *Vet Q.* 36:76-104.

Zandvliet M, Teske E, Schrickx JA, Mol JA. 2015. A longitudinal study of ABC transporter expression in canine multicentric lymphoma. *Vet J* 205:263-271.

7. 要旨

7.1. 和文要旨

第1章 緒言

リンパ腫はイヌにおいて最もよくみられる造血器腫瘍の一つであり、その治療として、複数の薬剤を使用する多剤併用療法（シクロホスファミド、ドキシソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾロンを組み合わせた CHOP 療法など）が標準的に行われる。多剤併用療法は治療初期には高い奏効率を示すものの、多くの症例で再発がみられ高率に薬剤耐性を示すことが知られている。イヌのリンパ腫の再発例における薬剤耐性獲得は、小動物臨床において大きな課題であるが、その機序は明らかにされていない。

イヌのリンパ腫の薬剤耐性には多くの原因が考えられるが、その中でも ATP 依存的に薬物を排出する ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターファミリーに分類される P 糖タンパク質 (P-glycoprotein : P-gp) および breast cancer resistance protein (BCRP) などが重要な役割を果たしていると考えられている。これらのトランスポーターは細胞膜における薬物排泄を担う細胞膜タンパク質で、vinca alkaloid 類、anthracyclin 類、taxane 類などの抗がん剤を基質とする。ヒトでは腫瘍細胞や患者で薬剤排泄トランスポーターの発現解析の研究がなされているが、イヌでは遺伝子解析による研究が主体で、腫瘍組織内での発現局在の解析は未だなされていない。そのため、本研究では腫瘍組織内での薬物排泄トランスポーターの発現局在を解析することにより、薬物耐性獲得機構における薬剤排泄トランスポーターの関与の検討することとした。

第2章 リンパ腫における薬剤排泄トランスポーターの発現評価

リンパ腫43症例を対象にP-gpおよびBCRPの免疫組織化学的検索を実施したところ、約40%のリンパ腫にP-gpまたはBCRPが発現しており、その局在は、健康なイヌの脳と同様、毛細血管内皮細胞であることが明らかになった。また、抗がん剤を投与した症例では非投与の症例に比べてこれらのトランスポーターが有意に発現していることが示され、抗がん剤の投与がこれらのトランスポーターの発現に関与していることが示唆された。

薬物排泄トランスポーターの血管における発現解析として、P-gp および BCRP の発現が確認された症例から毛細血管を単離し、BCRP の Western Blotting 解析を行った。その結果、Whole 材料よりも Cap rich sample でよりバンドが太く認められ、薬物排泄トランスポーターが血管に局在していることが明らかとなった。

CAP type の症例の P-gp および BCRP の発現部位を評価したところ、毛細血管の内腔側に存在していることが明らかとなった。

抗がん治療前後における薬剤排泄トランスポーター発現の評価を行った症例では、抗がん治療前には認められていなかった薬物排泄トランスポーターが抗がん治療後に発現していた。また、治療歴が明らかとなっている症例の情報から、抗がん剤や治療の中でも、それぞれのトランスポーターの基質投与が薬剤排泄に関与している可能性が示唆された。

以上より、トランスポーターの基質投与によって腫瘍血管に薬物排泄トランスポーターの発現が誘発され、大脳で認められるような関門形成つまり、血液腫瘍関門をしている可能性が考えられた。

第3章 腫瘍血管における血液腫瘍関門形成について

第2章で、イヌのリンパ腫で血液腫瘍関門を形成している可能性が示唆されたが、血液脳関門である大脳毛細血管内皮細胞は無窓構造であり、細胞間に密着結合が認められる。さらに、血管外を星状膠細胞が取り囲むことで、細胞膜に発現した **transporter** だけでなく、物理的にも血管外の脳実質への物質の移行を抑制する。それに対して、リンパ節の毛細血管内皮細胞では密着結合が未発達である。密着結合が未発達であると、リンパ腫に薬剤排泄トランスポーターが認められたとしても、細胞間隙を通り抜けてしまい、トランスポーターとしての機能を有さない可能性がある。そのため、リンパ腫の毛細血管に密着構造が認められるかを第3章で評価することとした。腫瘍内毛細血管の形態的検索として、腫瘍内毛細血管の接着タンパク（ZO-1 および Claudin 5）の発現が認められ、ZO-1 においては、その発現が **P-gp** および **BCRP** との関連していることが示された。以上より、腫瘍内毛細血管において薬物排泄トランスポーターが発現すると同時に密着結合の形成を促進する傾向が認められた。

これらの結果より、形態学的にリンパ腫の腫瘍組織内に血液腫瘍関門を形成している可能性が示唆され、この関門組織がリンパ腫の多剤耐性発現に影響している可能性が考えられた。本研究では、機能性については明らかできていないが、形態学的に **P-gp**, **BCRP** がイヌのリンパ腫において、ユニークな機序により薬物動態に関与する可能性を示した。

7.2. 英文要旨

Chapter 1 Introduction

Lymphoma is the most common hematopoietic neoplasia in dogs. It is routinely treated with a multi-agent chemotherapy protocol, such as the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone (CHOP-protocol), which is currently the standard of care. Although the initial response rate for the multi-agent chemotherapy is high, in most cases the tumor recurs. Acquisition of drug resistance in canine lymphoma is a major issue in small animal clinical practice, but the mechanism has not been clarified.

There are many possible causes for drug resistance in canine lymphoma, among which P-glycoprotein (P-glycoprotein) and breast cancer resistance protein (BCRP) (ATP-binding cassette (ABC) transporter family) are thought to play important roles. These transporters are cell membrane proteins responsible for drug excretion, which substrates are many anticancer agents such as vinca alkaloids, anthracyclins, and taxanes. In humans, research on the expression analysis of these transporters in tumor cells and patients has been reported, but in dogs, research by gene analysis has been mainly conducted, and analysis of expression localization in tumor tissues has not yet been reported. Therefore, in this study, we investigated the expression localization of the drug excretion transporter in the dog tumor tissues to reveal the involvement of the drug excretion transporters in the drug resistance acquisition mechanism.

Chapter 2 Evaluation of drug excretion transporter expression in canine lymphoma

Immunohistochemical examination of P-gp and BCRP in 43 cases of canine lymphoma revealed that P-gp or BCRP were expressed in about 40% of canine lymphomas, and its localization was found in the capillary endothelial cells, which is similar with cerebrum in the healthy dogs. In addition, it was shown that these transporters were significantly expressed in the cases in which the anticancer drug was administered as compared with the cases in which the anticancer drug was not administered, and the administration of the anticancer drug was involved in the expression of these transporters. To evaluate the expression of the drug excretion transporter in the capillary endothelial cells, capillaries were isolated from cases in which expression of P-gp and BCRP was confirmed, and Western Blotting analysis of BCRP was performed. As a result, a thicker band was observed in the capillary rich sample than in the whole sample, and it was clarified that the drug excretion transporter was localized in the capillary endothelial cells.

Evaluation of the localization of P-gp and BCRP in CAP type cases revealed that they were present on the apical of capillaries.

In the cases in which the expression of the drug excretion transporters before and after the anticancer treatment was evaluated, the drug excretion transporters were not observed before the anticancer treatment but expressed after the anticancer treatment. In addition, from the information on cases for

which the medical history has been clarified, it was suggested that substrate administration may be involved in expression of drug excretion transporters. Based on the results, it is considered that the expression of the drug excretion transporters is induced in the tumor capillary endothelial cells by the substrate administration and the blood tumor barrier is formed.

Chapter 3 Blood tumor barrier formation in tumor capillary endothelial cells

In Chapter 2, it was suggested that canine lymphoma may induce capillary endothelial cells to form a blood-tumor barrier which is similar with blood brain barrier in cerebrum capillary endothelial cells. However, the blood-brain barrier in the cerebral capillary endothelial cells has tight junctions in gap between the cells. Furthermore, not only the transporter expressed on the cell membrane but also the physical transfer of substances to the brain parenchyma outside the blood vessel are suppressed by surrounding the outside of the blood vessel with astrocytes. In contrast, in the capillary endothelial cells of the lymph nodes the tight junctions are not developed well. If the tight junctions are not developed well, even if a drug excretion transporter is found in the lymphoma, it may pass through the intercellular spaces and not function as a transporter.

Therefore, in Chapter 3, it was decided to evaluate whether or not a tight structure is observed in the capillaries of lymphoma. Adhesive proteins of intratumoral capillaries were evaluated for morphological search of intratumoral capillaries. As a result, expression of tight junction proteins (ZO-1 and Claudin 5), which are not originally found in lymph node capillaries, was observed. The expression of ZO-1 is associated with P-gp and BCRP. Therefore, it was suggested that the drug excretion transporter was expressed in the apical membrane of the intratumoral capillaries and at the same time, the formation of tight junctions was promoted. These results suggest that morphologically, a blood tumor barrier may be formed in the tumor tissue of lymphoma, and it is considered that this barrier tissue may influence the development of multidrug resistance of lymphoma. In this study, although the functionality has not been clarified, it is revealed P-gp and BCRP may be involved in pharmacokinetics by a unique mechanism in canine lymphoma morphologically.

8. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご指導を賜りました麻布大学獣医学部病理学研究室教授 上家潤一先生、ならびに助教 相原尚之先生に深く御礼申し上げます。

本学位論文の審査にあたり、貴重なお助言を賜りました麻布大学獣医学部解剖学第二研究室教授 坂上元栄先生、ならびに小動物内科学研究室准教授 久末正晴先生に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究遂行にあたりご協力いただきました麻布大学獣医学部病理学研究室の卒業生ならびに在籍生各位に御礼申し上げます。