

氏名(本籍)	氷海幸子(神奈川県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第164号
学位授与年月日	令和3年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	イヌのリンパ腫における薬剤耐性機序に関する研究
論文審査委員	(主査) 上家潤一 (副査) 坂上元栄 久末正晴

論文内容の要旨

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、薬剤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、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を評価した。その結果、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) 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。

論文審査の結果の要旨

テーマのたて方

本研究では、薬物排泄トランスポーターである P-gp および BCRP に着目し、イヌのリンパ腫組織における発現解析を行った。腫瘍の薬剤耐性研究の多くは腫瘍細胞由来の培養細胞を用いて行っており、抗癌剤刺激によって腫瘍細胞にトランスポーターが発現することが報告されている。本研究では、リンパ腫の組織を解析対象にしており、実症例で生じている現象を明らかにする点が評価できる。本研究では腫瘍内毛細血管にトランスポーターが発現することを明らかにし、血液腫瘍関門の概念を提唱している。また、関門として働くためには毛細血管の細胞間結合が重要であることを認識し、密着結合タンパク質である ZO-1, claudin5 の腫瘍組織内における発現を解析した。毛細血管のトランスポーターの発現は病理組織を解析して初めて明らかになったものであり、そこから血液関門を発想し、血管構造の解析につなげており、テーマのたて方は適切であると判断できる。

研究の背景

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、多剤併用療法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、再発例では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。薬剤耐性を示した犬のリンパ腫において、薬剤排泄トランスポーターの遺伝子発現が報告されているが、局在は明らかではない。本研究ではこれまで不明であったトランスポーターの腫瘍組織内局在が毛細血管であることを明らかにし、さらに密着結合タンパク質の免疫染色により毛細血管の構造を評価した。本研究結果はリンパ腫の薬剤耐性研究に寄与すると考えられる。

研究の方法と結果

第2章では、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、約 40% のリンパ腫に P-gp または BCRP が毛細血管内皮細胞の内腔側に発現していることを明らかにした。さらに、腫瘍から毛細血管を単離し、ウェスタンブロッティング法で BCRP の発現を確認した。rt-PCR を用いて Abcb1、Abcg2 の遺伝子発現を確認している。腫瘍におけるトランスポーターの発現を、免疫染色だけでなく、rt-PCR や単離血管を対象としたウェスタンブロッティングを実施して多角的に確認している点は評価できる。また、PAS 染色と免疫染色の二重染色で血管内皮細胞の内腔側に発現を証明しており、病理組織学的手法を理解して応用できている。同一症例の抗癌剤投与前と後の腫瘍組織を比較し、投与後の腫瘍にトランスポーターが発現することを見出している。症例数が少なく一般化するには至っていないが、血液腫瘍関門という新しい概念を提唱している点は評価できる。しかし、腫瘍組織内のトランスポーターを発現する毛細血管の分布や頻度についての検討がされていない点が

不十分である。

第3章では、第2章で提唱した血液腫瘍関門の証明に必要な項目として、血管の密着結合に着目した。腫瘍組織内の毛細血管の密着結合を免疫染色で評価している。その結果、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）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。間接的ではあるが密着結合の形成を示唆できている。ZO-1 については第2章で対象とした全ての検体について検討しているが、claudin5 については5例のみであり、全検体の検討が望ましい。また、密着結合の証明をするために電子顕微鏡による超微形態観察を行うべきであった。

考察と結論

抗癌剤投与されたイヌのリンパ腫組織において、毛細血管に P-gp および BCRP が発現することを明らかにし、血液腫瘍関門の概念を提唱している。腫瘍細胞の細胞膜に薬剤排泄トランスポーターが発現すると考えられている薬剤耐性機序に新たな知見を提示した点は評価できる。しかし、症例数の少なさから一般化するには至っておらず、また、関門組織としての機能を証明していない。この点について、考察の項目に今後の展望として、単離毛細血管を用いた基質輸送活性の評価の必要性が記載されており、研究結果を客観的に評価できている。

以上、氷海幸子氏は本論文において、イヌのリンパ腫の毛細血管に薬物排泄トランスポーターが発現する例があることを見出し、血液脳関門の概念を提唱した。この概念の完全な立証には至っていないものの、本研究はリンパ腫における薬剤耐性獲得機序の解明に貴重な知見を提供しうるものであり、博士（獣医）の学位を授与するのにふさわしい業績であると判定した。