

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 宮本 良

犬の SCC は全身のあらゆる上皮から発生し、強い局所浸潤性を特徴とする悪性腫瘍である。犬の SCC の治療は外科的切除と放射線治療を組み合わせた局所療法が主軸である。一方、局所療法により制御が困難な場合は化学療法が治療の選択肢となる。しかしながら、犬の SCC は化学療法に抵抗性でありほとんどの場合効果が得られない。このため、犬の SCC の新たな内科的治療戦略の開発が必要である。そのためには SCC の増殖に必要な分子機構を明らかにし、それを標的とした新たな治療戦略の確立が重要である。これまでの研究から、犬の SCC では survivin や EGFR の過剰発現が報告されており、これらは SCC の増殖に重要な役割を果たしていると考えられる。このため、これらの分子機構は犬の SCC の新たな治療戦略として有望と考えられる。

Survivin は IAP ファミリーに属する分子であり、主に細胞分裂の促進およびアポトーシスの阻害の 2 つの機能を有している。また、survivin は骨髄と生殖器を除き正常組織ではほとんど発現しておらず、多くの癌細胞で高い発現がみられる。近年、survivin 阻害剤である YM155 を用いた人の癌患者の第 I 相および第 II 相試験において、survivin を高発現している様々な悪性腫瘍に対する有効性が示されている。このことから、YM155 を用いた survivin の阻害は犬の SCC において新たな治療戦略となる可能性が考えられる。

一方、EGFR は主に上皮細胞に発現するレセプター型チロシンキナーゼであり、上皮細胞の増殖および分化を促進する。EGFR は多くの人の SCC において過剰発現が認められており、このような SCC では増殖に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。また、まれではあるが EGFR の機能獲得性変異が人の SCC 患者で認められることがある。このような SCC 患者では、EGFR の恒常的なリン酸化により、腫瘍が無秩序に増殖する。現在、人の SCC における EGFR を標的とした治療法は確立していないが、人の肺腺癌では同様の変異が多く症例で認められており、このような患者に対しては EGFR 阻害剤である afatinib および osimertinib が著しい抗腫瘍効果を示す。これらのことから、YM155 を用いた survivin の阻害と同様に afatinib および osimertinib による EGFR の阻害も犬の SCC において新たな治療戦略となる可能性がある。

YM155 や EGFR 阻害剤などの分子標的薬はほとんどが人用の癌治療薬であり、動

物の腫瘍に対する分子標的薬はきわめて少ない。現在、利用が可能な動物の腫瘍に対する分子標的薬は masitinib と toceranib のみである。これらの中でマルチキナーゼ阻害剤である toceranib は、いくつかの犬の腫瘍に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されている。これらのことを考慮すると、犬の SCC 細胞に対して toceranib が増殖抑制効果を有するか否か、また有するならその標的分子を明らかにすることは重要である。

そこで本研究では、犬の SCC に対する分子標的薬を用いた新たな治療戦略を確立するため、第 2 章で、YM155、afatinib、osimertinib および toceranib に対する犬の SCC 株化細胞の感受性を評価した。次いで第 3 章および第 4 章では、それぞれ YM155 と afatinib に注目して作用機序を解析した。さらに第 5 章では afatinib の効果を in vivo で評価した。

1. 犬の SCC 株化細胞における survivin 阻害剤、EGFR 阻害剤およびマルチキナーゼ阻害剤感受性の解析

犬の SCC 細胞において survivin および EGFR が治療標的となるかを検討するため、YM155、afatinib および osimertinib に対する 7 種類の犬の SCC 株化細胞の感受性を評価した。さらに toceranib に対する犬 SCC 株化細胞の感受性についても検討した。YM155 は HAPPY および SQ4 細胞に対して、afatinib は POCO および CSCC-R1 細胞に対して著しい増殖抑制効果を示した。一方、osimertinib および toceranib ではこのような増殖抑制効果はみられなかった。このことから、犬の SCC の増殖機構には survivin あるいは afatinib の標的分子が重要な役割を果たしており、これらは犬 SCC の有望な治療標的となる可能性が考えられた。

2. 犬の SCC 株化細胞における survivin 阻害剤の作用機序の解析

犬の SCC 株化細胞における YM155 の作用機構を明らかにするため、7 種類の犬 SCC 株化細胞における survivin の発現レベルを検討した。次いで、YM155 による HAPPY および SQ4 細胞での survivin 発現レベルの変化と細胞死誘導経路について検討した。Survivin は YM155 感受性の HAPPY および SQ4 細胞において発現レベルが高く、YM155 はこれらの survivin の発現を抑制した。HAPPY および SQ4 細胞では survivin の抑制機構が異なり、YM155 は HAPPY 細胞では survivin の転写抑制により、SQ4 細胞では転写後の過程を抑制することにより抑制した。さらに、これらの細胞では誘導される細胞死の経路にも相違が見られた。いずれの細胞においてもオートファジーとそれに続き PARP 依存性アポトーシスが生じるが、HAPPY 細胞では PARP 依存性アポトーシスが細胞死の主な経路であるのに対して SQ4 細胞ではこれに加えてオートファジー細胞死も誘導されることが示唆された。これらのことから、YM155 は survivin の発現レベルが高い犬の SCC において新たな治療戦略となる可

能性が考えられた。

3. 犬の SCC 株化細胞における afatinib の標的分子の解析

Afatinib 感受性細胞における標的分子を明らかにするため、犬の SCC 株化細胞を用いて ErbB ファミリー蛋白の発現とリン酸化の状態、既知の afatinib 標的分子の塩基配列、細胞内シグナル伝達分子のリン酸化について解析した。また、POCO 細胞を用いたリン酸化蛋白質の網羅的解析も行った。既知の afatinib 標的分子の蛋白および遺伝子解析からは afatinib 感受性細胞における標的分子を特定することができなかった。一方、POCO 細胞を用いたリン酸化蛋白質の網羅的解析から、afatinib は主に MAPK 経路の活性化を抑制することが示された。以上から、特定の犬の SCC では細胞増殖に MAPK 経路が重要な役割を果たしており、そのような SCC では afatinib を用いた MAPK 経路の抑制が新たな治療アプローチとなる可能性が考えられた。

4. 犬 SCC 株化細胞移植マウスモデルにおける afatinib の効果

犬の SCC に対する afatinib の in vivo における効果を解析するため、POCO 細胞移植マウスを用いて afatinib の効果を解析した。また、本解析では EGFR 阻害剤である osimertinib を比較に用いた。Afatinib は in vivo において POCO 細胞に対して著しい抗腫瘍効果を示し、osimertinib では抗腫瘍効果がほとんど見られなかった。これらのことから、afatinib は特定の SCC 細胞に対して in vivo で効果を現すことが示唆された。第 4 章で afatinib が POCO 細胞の MAPK 経路を抑制したことを考慮すると、腫瘍細胞において MAPK 経路が活性化している SCC 症例では afatinib の臨床試験に進む価値があると考えられた。

以上のことから、特定の犬の SCC では survivin の発現あるいは MAPK 経路のリン酸化が増殖に重要な役割を果たしていることが示唆された。YM155 あるいは afatinib はこのような犬の SCC の新たな治療戦略として有望である可能性が考えられた。

以上のように、本論文は犬の扁平上皮癌における増殖機構の一端を解明し、さらにそれに立脚した治療戦略の可能性を示したものであり、学術上、応用上貢献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）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。