

北里大学大学院獣医学系研究科

博士課程学位論文審査の結果と最終試験の成績

平成28年2月19日

学位論文題目

加齢および抗腫瘍薬が犬末梢血単核球細胞の細胞傷害性にもたらす影響に関する基礎的研究

氏名 小山田 友大 所属 獣医学専攻 獣医外科学

審査委員 主査 北里大学 教授 伊藤 直之



副査 北里大学 教授 胡 東良



副査 帝京科学大学 教授 多川 政弘



審査の結果

合格

最終試験の成績

優

論文審査の要旨および担当者

学位申請者	小山田 友大 (DV12001 獣医外科学)
学位論文題目	加齢および抗腫瘍薬が犬末梢血単核球細胞の細胞傷害性にもたらす影響に関する基礎的研究
担当者	主査 北里大学教授 伊藤 直之 副査 北里大学教授 胡 東良 副査 帝京科学大学教授 多川 政弘

論文審査の要旨 (3,000 字以内)

腫瘍性疾患は加齢関連性疾患の大部分を占め、小動物の高齢化に伴い年々症例数が増加している。腫瘍性疾患の罹患性には、腫瘍細胞の排除に関わる免疫細胞の機能における加齢性変化が関与していることが指摘されているが、獣医学領域においてはこの点に関しては明らかにされてはいない。そこで、本研究では加齢と末梢血単核球細胞(PBMC)のもつ細胞傷害性の関連性について検討を行った(第1章)。また、抗腫瘍治療として化学療法剤を使用することにより、PBMCの機能が抑制されることが人で報告されてはいるが、犬における挙動に関しては十分に検討されていない。そのため、臨床的に使用頻度の高いプレドニゾロンを用いてPBMCの細胞傷害性に与える影響を検証した(第2章)。また、近年、小動物医療において、外科、放射線そして化学療法の3大抗腫瘍療法に加え、低侵襲性かつ副作用が少ない免疫細胞療法が新たな治療法として着目さ

れている。主な免疫細胞療法として活性化リンパ球療法が知られており、実際に多くの動物病院にて実施されている。しかしながら、担癌状態により Natural Killer(NK)細胞を含む様々な免疫細胞の機能が抑制されることが報告されている。そのため、免疫細胞療法による効率的な腫瘍細胞殺傷効果の発揮のためには、免疫細胞療法に対する補助療法が必要である。したがって、本研究では医学領域にて腫瘍細胞退縮効果だけでなく PBMC の細胞傷害性を増加することが報告されているモノクローナル抗体医薬(第3章)およびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(第4章)を用いた基礎的検討を行うことで、これら薬剤が犬における免疫細胞療法の補助手段として有用であるかを検証した。

第1章 加齢による PBMC の細胞傷害性の変化

加齢が PBMC の細胞傷害性へ影響を及ぼすかを評価するため、健康な 9-12 歳齢(高齢犬群)および 1-4 歳齢(若齢犬群)のそれぞれのビーグル犬から PBMC を採取し細胞傷害性を測定した。その結果、PBMC が示した腫瘍細胞に対する細胞傷害性および PBMC 中に占める CD3⁺CD21⁺細胞の割合は両年齢群間で有意差は認められなかった。一方で、細胞傷害性の発動に重要である NK 関連分子(NKG2D, NKp46, NKp44, NKp30, Perforin, Granzyme B)の PBMC における mRNA 発現量に関して、ほとんどの分子において高齢犬群の方が高い発現量を示した。以上のことから、高齢犬と若齢犬それぞれの PBMC における NK 関連分子の mRNA 発現量に差は認められたが、PBMC の細胞傷害性に関しては加齢にかかわらず維持されることが明らかとなった。

第2章 プレドニゾロンによる PBMC の細胞傷害性の変化

プレドニゾロンは抗腫瘍治療においても使用される免疫抑制剤であるが、PBMC の細胞傷害性に与える影響は犬においては検討がなされていない。本検討では始めに *in vitro* における検討として、犬 PBMC に対するプレドニゾロン添加培養を行ったところ、PBMC の細胞傷害性の抑制および NK 関連分子の mRNA 発現量の減少が認められた。続いて、*in vivo* における検討として、ビーグル犬にプレドニゾロンを2週間連日投与(2mg/kg)し、1週間ごとに PBMC の細胞傷害性を測定した。その結果、プレドニゾロン投与期間中において、PBMC の細胞傷害性は投与前に比較して抑制される傾向にあったが、CD3⁺CD21⁺細胞が PBMC 中に占める割合は観察期間を通して変化はなかった。一方で、プレドニゾロン投与期間中の PBMC における NK 関連分子の mRNA 発現量は投与前に比較し顕著に減少した。プレドニゾロン投与による PBMC の細胞傷害性および NK 関連分子の mRNA 発現量の動態には類似性が見られ、プレドニゾロン投与終了に伴いこれらは回復する傾向にあった。以上のことから、プレドニゾロン投与により PBMC の細胞傷害性は抑制されるが、それは CD3⁺CD21⁺細胞が占める割合の減少ではなく NK 関連分子の発現量減少に起因することが推察された。

第3章 トラスツズマブによる PBMC の細胞傷害性の変化

トラスツズマブ(ハーセプチン[®])は HER2 陽性乳癌患者に対する抗 HER2 モノクローナル抗体医薬である。本検討では、犬乳腺腫瘍細胞株である CHMm および CIPm、そして犬甲状腺癌細胞株の CTAC を用いてトラスツズマブの効果を評価した。その結果、各細胞株においてイヌ HER2 mRNA 発現およびトラスツズマブとの結合能が認められ、特に CHMm は他の細胞株に比較し高値を示した。さらに、トラスツズマブによる PBMC

の細胞傷害性の増強、つまり抗体依存性細胞傷害性(ADCC)の誘導を評価したところ、CHMm に対する ADCC の誘導性が認められた。しかしながら、CTAC に対してはトラスツズマブとの結合能が認められたにもかかわらず ADCC の誘導性は認められなかった。以上のことから、トラスツズマブは HER2 を発現する犬乳腺腫瘍細胞に対して ADCC を誘導することが明らかとなり、その効果は細胞とトラスツズマブの結合能に依存する可能性が考えられた。

第 4 章 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による PBMC の細胞傷害性の変化

本検討では、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi)として Valproic acid (VPA)または Suberoylanilide hydroxamic acid(SAHA)を使用し、これら薬剤が犬腫瘍細胞株(CTAC, CIPm, MCM-N1)に対する PBMC の細胞傷害性に与える影響を評価した。その結果、これら細胞株は PBMC との混合培養前に VPA もしくは SAHA を用いた前培養によって、より効率的に PBMC に殺傷されただけでなく、NKG2D リガンドの一つである *ULBP1* の mRNA 発現量が増加した。よって、この結果は細胞傷害性の発動に重要である NKG2D-NKG2D リガンド間の相互作用が HDACi により増加したことに起因するものと考えられる。しかしながら、SAHA を用いて前培養された MCM-N1 は細胞傷害性に対してむしろ抵抗性を示した。さらに、腫瘍細胞株だけでなく PBMC に対してもそれぞれ VPA または SAHA を用いた前培養を行い、その後にこれら細胞を混合培養したところ、PBMC の細胞傷害性は顕著に抑制された。以上のことから、HDACi は腫瘍細胞に対して PBMC の細胞傷害性に対する感受性を増加させる作用をもつが、PBMC に対しては直接的に細胞傷害性を抑制することも明らか

となった。

以上の研究より、腫瘍性疾患の罹患率が比較的高いとされる高齢犬においても PBMC の細胞傷害性は維持されることが示された。また、プレドニゾロン投与は NK 関連分子の発現抑制を介して PBMC の細胞傷害性を抑制することが明らかとなった。さらに、PBMC の細胞傷害性を増加する薬剤として、トラスツズマブは HER2 陽性犬乳腺腫瘍株に対してその効果が認められた。しかし、HDACi は PBMC の細胞傷害性を抑制する作用をもつため、その臨床応用に先立ち更なる検討が求められる。

最終試験の結果の 要旨および担当者

学位申請者	小山田 友大 (DV12001 獣医外科学)
学位論文題目	加齢および抗腫瘍薬が犬末梢血単核球細胞の細胞傷害性にもたらす影響に関する基礎的研究
担当者	主査 北里大学教授 伊藤 直之 副査 北里大学教授 胡 東良 副査 帝京科学大学教授 多川 政弘

成績：優

最終試験の結果の要旨

審査員一同は、論文提出者に対し、平成28年2月19日、その論文内容および関連事項について詳細な質疑を行った。その結果、論文提出者は博士（獣医学）の学位を受けるに相応しい学識と能力を有するものと認め、優と判定した。