

平成 30 年 5 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07744

研究課題名(和文) 低酸素誘導因子阻害薬は犬リンパ腫治療の切り札となり得るか？ - 癌幹細胞に着目して -

研究課題名(英文) Inhibition of hypoxia inducible factor as the canine lymphoma treatment

研究代表者

奥田 優 (Okuda, Masaru)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：10325243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素誘導因子(HIF)は腫瘍における低酸素と悪性度の増加に関するキーレギュレーターであると考えられている。今回用いた犬のリンパ腫細胞株およびリンパ腫症例サンプルの全てにおいて、HIF-1 蛋白の発現が確認された。またHIF-1 阻害剤は全ての細胞株に対してin vitroで増殖抑制作用を示した。加えて犬のリンパ腫細胞株を免疫不全マウスに移植してechinomycinを投与した場合、腫瘍の退縮が観察された。以上の結果からHIF-1 はリンパ腫細胞の増殖や生存に必要であることが示唆され、HIF-1 阻害剤はリンパ腫の治療に対する有力な候補薬剤であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Hypoxic conditions in various cancers are believed to relate with their malignancy, and hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) has been shown to be a major regulator of the response to low oxygen. In this study, we examined HIF-1 expression in canine lymphoma using cell lines and clinical samples and found that these cells expressed HIF-1. Moreover, the HIF-1 inhibitors, echinomycin, YC-1 and 2-methoxyestradiol, suppressed the proliferation of canine lymphoma cell lines. In a xenograft model using NOD/scid mice, echinomycin treatment resulted in a dose-dependent regression of the tumor. Our results suggest that HIF-1 contributes to the proliferation and/or survival of canine lymphoma cells. Therefore, HIF-1 inhibitors may be potential agents to treat canine lymphoma.

研究分野：獣医内科学

キーワード：リンパ腫 抗がん剤 犬 低酸素誘導因子

1. 研究開始当初の背景

(1) リンパ腫は犬において発生頻度の高い悪性腫瘍の一つであり、臨床上大きな問題となっている。本疾患は複数の抗癌剤を用いた多剤併用化学療法によって治療されるが、既存の抗癌剤を組み合わせた治療成績は決して満足のいくものではない。

(2) 低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor, HIF) は腫瘍における低酸素と悪性度の増加に關するキーレギュレーターであると考えられており、さらに HIF-1 のトランスジェニックマウスがリンパ増殖性疾患を発症しやすいという報告から、リンパ腫の増殖・維持メカニズムとの関連が示唆されている。また、HIF-1 阻害剤やノックダウンは, epilepsy, progressive myoclonus type 2A (Epm2A) 遺伝子を抑制されたマウスで発生するリンパ腫, および人の白血病症例から分離された腫瘍細胞で細胞死を引き起こすことから、リンパ系腫瘍に対する治療の標的としての可能性が示されている。

2. 研究の目的

本研究では、自らの予備的実験結果から犬リンパ腫幹細胞 (または犬リンパ腫細胞全体) に HIF-1 が発現していると仮説を立て、犬のリンパ腫細胞に対してその阻害薬が *in vitro*, *ex vivo* で有効であることを示すことで将来的な抗癌剤としての有用性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 材料: 正常濃度酸素下で培養された犬リンパ腫細胞株 7 種 (CL-1, CLBL-1, CLC, CLGL90, GL-1, Nody-1, 17-71) と犬リンパ腫 5 症例から得られたリンパ節または末梢血サンプルを用いた。

(2) 方法

- 1) HIF-1 とその下流標的遺伝子 GLUT1 の遺伝子発現解析は real-time PCR で行った。
- 2) HIF-1 蛋白発現は Western blot 法で解析した。
- 3) HIF-1 阻害薬として Echinomycin, YC-1, 2-methoxyestradiol (2-me) をそれぞれ *in vitro* で培養細胞に添加し、細胞増殖阻害効果を MTT 法で解析した。
- 4) 免疫不全マウス NOD/scid mice に CLBL-1 を皮下接種し、Echinomycin 投与による抗腫瘍効果を解析した。

4. 研究成果

1) 犬リンパ腫細胞における HIF-1 遺伝子と蛋白の発現
犬リンパ腫培養細胞株における HIF-1 とその下流標的遺伝子 GLUT1 の mRNA の発現は 7 種全てのリンパ腫細胞株で認められた (図 1)。また、比較対照として用いた犬の正常組織ではその発現の程度は様々であった。

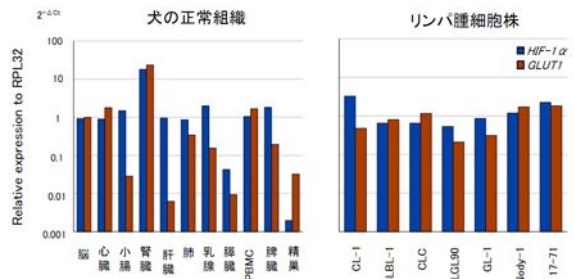


図 1 正常組織とリンパ腫細胞株における HIF-1 mRNA 発現

次に HIF-1 の蛋白発現を解析したところ、正常組織では脳でのみ発現が認められたが、リンパ腫細胞株では 7 種全てで発現が認められた (図 2)。



図 2 正常組織とリンパ腫細胞株における HIF-1 蛋白発現

さらに犬自然発生リンパ腫症例から得られたリンパ腫細胞を解析したところ、細胞株と同様、HIF-1 遺伝子と蛋白の発現が確認された。一方、正常犬から得られた末梢血単核球 (PBMC) では HIF-1 蛋白の発現は認められなかった (図 3)。

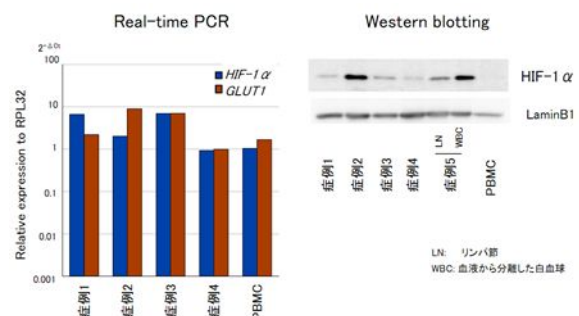


図 3 犬リンパ腫症例における HIF-1 の発現解析

以上の結果から、犬リンパ腫細胞では低酸素下でなくとも恒常的に HIF-1 蛋白が発現している可能性が明らかとなった。

2) *In vitro* における HIF-1 阻害剤による細胞増殖抑制効果
犬リンパ腫細胞株に対して常酸素下で HIF-1 阻害剤 Echinomycin, YC-1, 2-methoxyestradiol をそれぞれ添加し、細胞

増殖率を解析したところ，全ての阻害剤で用量依存的に細胞増殖抑制効果が認められた（図 4A-C）。

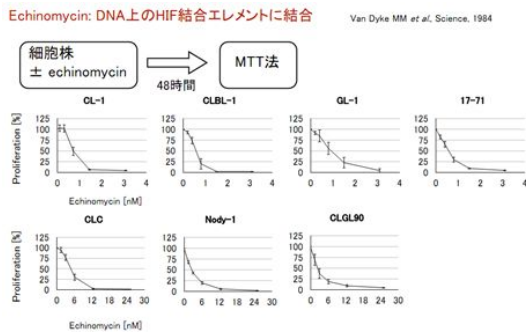


図 4A Echinomycin による細胞増殖抑制効果

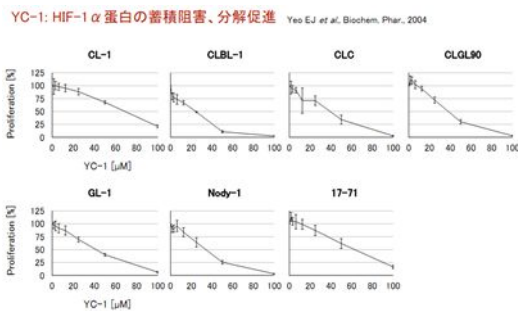


図 4B YC-1 による細胞増殖抑制効果

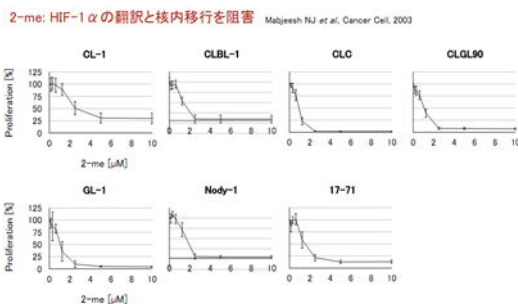


図 4C 2-me による細胞増殖抑制効果

図 5 に犬リンパ腫細胞株に対する 3 種類の HIF-1 阻害剤の IC₅₀ を示す。細胞株毎に薬剤感受性は異なるものの，いずれの HIF-1 阻害剤も犬リンパ腫細胞株に対する増殖抑制効果が認められた。

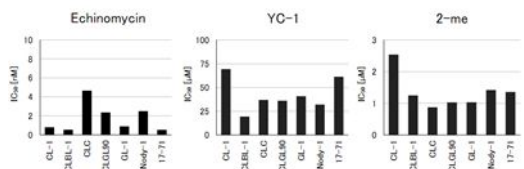


図 5 各 HIF 阻害剤の IC₅₀

3) *In vivo* における echinomycin の腫瘍増殖抑制効果

最後に CLBL-1 を免疫不全マウスに皮下接種し，各種濃度の echinomycin を投与することで，その腫瘍増殖抑制効果を検討した。

その結果，echinomycin 非投与群では一貫し

た腫瘍の増大が認められたが，echinomycin 投与群では用量依存的に腫瘍の増大が抑制されることが明らかとなった（図 6）。

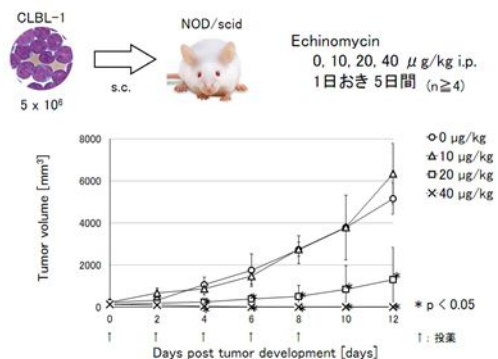


図 6 異種移植モデルにおける echinomycin の抗腫瘍効果

以上の結果から HIF-1 阻害剤は *in vivo* においても犬リンパ腫細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。

4) 総括

本研究により，犬リンパ腫細胞では常酸素下でも恒常的に HIF-1 を発現しており，HIF-1 阻害剤は *in vitro* でも *in vivo* でもリンパ腫細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。以上の結果は HIF-1 がリンパ腫細胞の増殖や生存に必要である可能性を強く示唆しており，HIF-1 阻害剤はリンパ腫治療の有力な候補薬剤であると考えられた。本研究は，犬リンパ腫の腫瘍増殖・生存機構について新たな知見を提供するものであり，将来的な犬リンパ腫治療成績の改善に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kobayashi K, Shimokawa Miyama T, Itamoto K, Noguchi S, Baba K, Mizuno T, Okuda M. Development of hepatocellular carcinoma after long-term immunosuppressive therapy including danazol in a dog. J Vet Med Sci., 査読有, 78 巻, 2016, 1611-1614
DOI:10.1292/jvms.16-0019

Kambayashi S, Igase M, Kobayashi K, Kimura A, Shimokawa Miyama T, Baba K, Noguchi S, Mizuno T, Okuda M. Hypoxia inducible factor 1 expression and effects of its inhibitors in canine lymphoma. J Vet Med Sci., 査読有, 77 巻, 2015, 1405-1412
DOI:10.1292/jvms.15-0258

〔学会発表〕(計 1 件)

小林宏祐，馬場健司，下川孝子，奥田優

イヌ血管肉腫細胞に対する Simvastatin の細胞傷害性ならびに凝固促進性マイクロパーティクルの産生に与える影響，日本獣医学会，2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 優 (Masaru, Okuda)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：10325243

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし