

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14992

研究課題名(和文) イヌ悪性腫瘍に起因するDICの新規治療法の確立を目指した基盤研究

研究課題名(英文) Fundamental research to establish a new treatment for DIC caused by canine malignancy

研究代表者

小林 宏祐 (Kobayashi, Kosuke)

岡山理科大学・獣医学部・助教

研究者番号：40876893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍組織を含む様々なイヌ組織における組織因子(TF)とトロンボモジュリン(TM)のmRNA発現量を調査した。良性腫瘍と上皮系および間葉系悪性腫瘍でTFやTM発現の差はなかった。脾臓悪性腫瘍では非腫瘍病変よりも腫瘍病変の方がTM発現が低い傾向があり、TM発現の減少により凝固亢進が形成されていると示唆された。

TFとTMの発現を調節する薬剤としてスタチンに着目し、イヌ血管肉腫細胞に対する作用をin vitroで検証した。その結果スタチンは細胞増殖を抑制するとともにTF発現を減少させ、TM発現を上昇させる作用を有することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々なイヌ腫瘍組織における組織因子(TF)やトロンボモジュリン(TM)の発現を調査した報告はこれまでないため、イヌ腫瘍におけるTFやTMに関する研究の基礎的知見を提示することができた。

スタチンのTFやTMに関連した抗凝固作用をイヌで調べた報告はこれまでにない。イヌ血管肉腫において抗腫瘍、抗凝固作用を期待した治療薬としてスタチンが応用できる可能性を示せた。

研究成果の概要(英文)：I investigated the mRNA expression levels of tissue factor (TF) and thrombomodulin (TM) in various canine tissues, including tumor tissues. There were no significant differences in TF or TM expression between benign tumors and epithelial or mesenchymal malignancies. In splenic malignancies, TM expression tended to be lower in tumorous lesions compared to non-tumorous lesions, suggesting that reduced TM expression may contribute to the formation of a hypercoagulable state.

Focusing on statins as agents that can regulate TF and TM expression, I examined their effects on canine hemangiosarcoma cells in vitro. The results demonstrated that statins inhibited cell proliferation, decreased TF expression, and increased TM expression.

研究分野：Veterinary oncology

キーワード：canine tumor coagulation tissue factors thrombomodulin statin

1. 研究開始当初の背景

イヌにおいて悪性腫瘍に起因する播種性血管内凝固 (DIC) は多臓器不全や出血傾向を引き起こす致死的な病態である。しかし、その病態には不明な点が多く、確立された治療法は存在しない。報告者は、これまでの研究でイヌ腫瘍細胞における組織因子 (TF) の発現と凝固亢進活性に加え、DIC が生じたイヌにおける血漿中 TF 活性の上昇を明らかにしており、TF が DIC 発生の重要なトリガー因子となっていると考えた。またヒトにおける報告を参考に、イヌではほとんど調べられていない凝固抑制性因子であるトロンボモジュリン (TM) の発現低下も DIC の発生に関与していると考えた。そこでイヌ悪性腫瘍では TF の発現が亢進し、TM の発現が減弱することで凝固促進的な環境を形成していると仮説を立てた。

さらに報告者はこれまで高脂血症治療薬であるスタチンが腫瘍細胞の増殖を抑制することを示している。ヒトにおける報告ではスタチンは抗腫瘍作用に加え、TF や TM の発現を調節して凝固抑制的に作用すると示唆されている。これまでの自身の研究成果とヒトにおける知見を組み合わせ、スタチンはイヌ腫瘍細胞に対し抗腫瘍効果を発揮するとともに、TF や TM の発現を調節することで抗凝固作用を有すると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、イヌ腫瘍に起因する DIC の病態解明とスタチンの治療的応用性を示すために、以下の 2 点に関して研究した。

- 1) 様々なイヌ腫瘍組織における TF および TM の発現解析
- 2) スタチンの *in vitro* における抗腫瘍効果と TF, TM 発現に与える影響の解析

3. 研究の方法

1) 様々なイヌ腫瘍組織における TF および TM の発現解析

上皮系悪性腫瘍 (42 症例, 47 検体)、間葉系悪性腫瘍 (32 症例, 42 検体) に加え、対照群として良性病変 (11 症例, 14 検体) および健康犬由来組織 (3 例, 21 検体) を用いた。組織より total RNA を抽出し、特異的プライマーを用いて RT-qPCR 法により TF および TM の mRNA レベルでの発現を解析した。さらに脾臓に腫瘍性悪性病変を有する症例 (5 例) では非腫瘍部の解析も同様に行い、腫瘍部と比較した。

2-1) スタチンの抗腫瘍効果の検証

イヌ血管肉腫 (HSA) 3 株、イヌ乳腺腫瘍 (MGT) 4 株、イヌ肥満細胞種 (MCT) 3 株における 3 種のスタチン (アトルバスタチン, フルバスタチン, シンバスタチン) の細胞増殖抑制効果を WST-8 法により解析した。その機序の解析のために、スタチンで処理した細胞における開裂型 Caspase-3 の発現, Akt, Erk1/2, JNK のリン酸化状態をウエスタンブロッティング法で調べた。

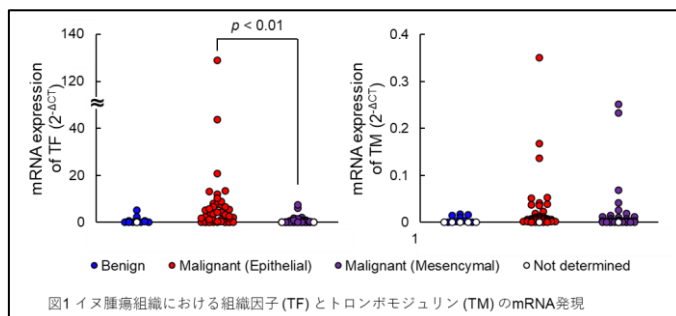
2-1) イヌ HSA 細胞におけるスタチンの TF および TM 発現に与える影響の解析

3 種の HSA 細胞に上記 3 種のスタチンを添加した際の TF および TM 発現の変化を、特異的プライマーを用いた RT-qPCR 法および特異的抗体を用いたフローサイトメトリー法により解析した。またヒトでは Akt のリン酸化状態の変化がスタチンによる TF 発現調節に関与していることが示されているため、Akt 阻害薬 (MK-2206) を用いて同様の解析を行った。

4. 研究成果

1) 様々なイヌ腫瘍組織における TF および TM の発現解析

上皮系悪性腫瘍では間葉系悪性腫瘍と比較して有意に TF 発現が高かった (図 1)。これは「間葉系よりも上皮系悪性腫瘍の多くで凝固亢進状態の形成が生じている」というトロンボエラストグラフィーを用いた過去のヒトにおける報告結果と合致している。しかしながら、上皮系悪性腫瘍である移行上皮癌や扁平上皮癌では顕著に TF 発現が高い症例が認められたが、健康犬由来の膀胱および皮膚組織と比較した際に有意差はなかった。TM 発現に関しては良性腫瘍、上皮系、間葉系悪性腫瘍間で発現量に有意な差はなかったが、腫瘍性悪性腫瘍病変を有する症例に着目した解析では、非腫瘍部と比較して腫瘍部では TM 発現が低い傾向にあった ($p = 0.07$)。 (図 2)。



これらの結果から、悪性腫瘍で普遍的に TF が高発現し TM 発現が減少しているという結果は得られなかったが、脾臓病変においては TM 発現の減少により凝固亢進状態が形成されている可能性が示された。また TF はヒトで腫瘍抗原としても着目されているが、本研究で高い発現が認められた腫瘍では同様に腫瘍抗原として応用できる可能性が示された。ただし、本研究では腫瘍組織における mRNA レベルでの解析しか実施できなかったため、今後はタンパクレベルでの発現解析や末梢血中での発現および活性の解析が必要だと考えられた。

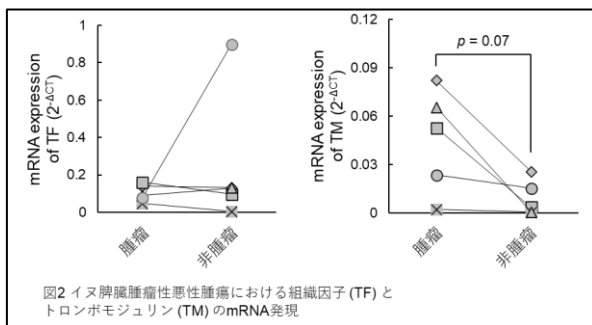


図2 イヌ脾臓腫瘍性悪性腫瘍における組織因子(TF)とトロンボモジュリン(TM)のmRNA発現

2-1) スタチンの抗腫瘍効果の検証

用いたすべての細胞株において各種スタチンは濃度依存的に細胞増殖を抑制した (図3)。ただし細胞株間における感受性の差が認められた。高感受性株では開裂型 Caspase-3 の発現量が増加していた。また HSA, MGT, MCT において感受性株ではスタチン添加により Akt のリン酸化の減少と JNK のリン酸化の上昇が認められた。HSA を除く他の腫瘍では高感受性株において Erk1/2 のリン酸化の減少も同時に認められた。これらの結果からスタチンは細胞種毎の感受性の差はあるものの、アポトーシスの誘導を介して細胞増殖を抑制し、その機序として Akt や Erk1/2, JNK のリン酸化状態の変化が関与しているものと考えられた。

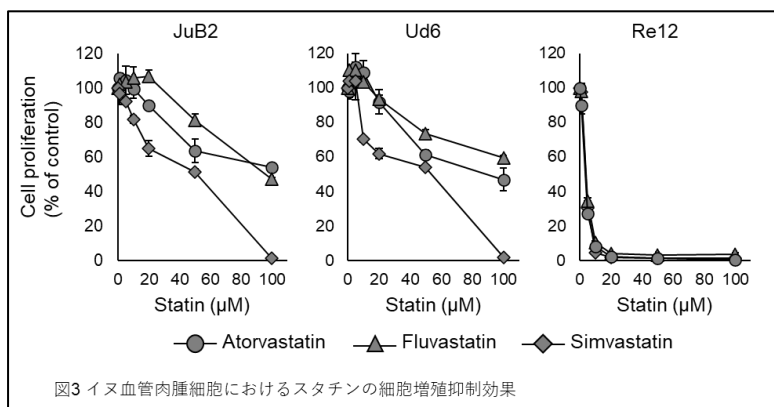


図3 イヌ血管肉腫細胞におけるスタチンの細胞増殖抑制効果

2-1) イヌ HSA 細胞におけるスタチンの TF および TM 発現に与える影響の解析

スタチン添加によりイヌ HSA 細胞における TF 発現の減少が認められた。この変化は mRNA およびタンパクレベル (図4) でともに認められた。一方で TM 発現に関しては3種の細胞株の内1種のみで発現量の増加が認められた。Akt 阻害薬である MK-2206 を添加した際には、2種の細胞株では TF の発現の上昇が、1種ではスタチン添加と同様に TF の発現が減少した。TM 発現に関しては1種で発現量が上昇し、1種で低下し、1種では変化は認められなかった。

これらの結果からスタチンは細胞種毎で作用に作用に差はあるものの、腫瘍細胞における TF の発現を減少させ TM の発現を上昇させることで抗凝固的に作用する可能性が示された。スタチンによる Akt のリン酸化の抑制は一部の細胞種では TF や TM 発現調節作用に関与している可能性はあるものの、すべての細胞に共通しているものではなかった。さらなる機序の検討に加え、TF や TM の発現のみではなく活性に与える影響についても解析する必要があると考えられた。

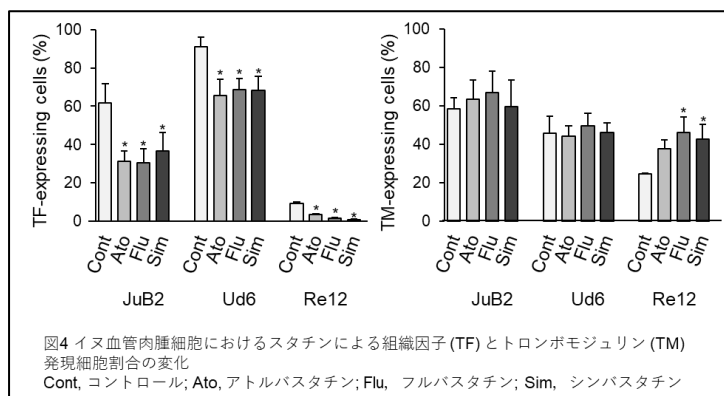


図4 イヌ血管肉腫細胞におけるスタチンによる組織因子(TF)とトロンボモジュリン(TM)発現細胞割合の変化
Cont, コントロール; Ato, アトルバスタチン; Flu, フルバスタチン; Sim, シンバスタチン

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Kosuke, Baba Kenji, Kambayashi Satoshi, Okuda Masaru	4. 巻 169
2. 論文標題 Blockade of isoprenoids biosynthesis by simvastatin induces autophagy-mediated cell death via downstream c-Jun N-terminal kinase activation and cell cycle dysregulation in canine T-cell lymphoma cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Research in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 105174 ~ 105174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rvsc.2024.105174	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Kosuke, Takemura Reika Deja, Miyamae Jiro, Mitsui Ikki, Murakami Kohei, Kutara Kenji, Saeki Kohei, Kanda Teppei, Okamura Yasuhiko, Sugiyama Akihiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Phenotypic and molecular characterization of novel pulmonary adenocarcinoma cell lines established from a dog	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-44062-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林宏祐, 村上康平, 佐伯亘平, 杉山晶彦
2. 発表標題 イヌ肺腺癌より樹立した上皮系および間葉系様細胞株の性状解析
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井治, 小林宏祐, 日高大地, 村上康平, 三河翔馬, 望月庸平, 三井一鬼, 久楽賢治, 岡村泰彦
2. 発表標題 臨床的に中皮腫が疑われた犬2症例より樹立した中皮細胞株の性状解析
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林宏祐 , 村上康平 , 馬場健司
2. 発表標題 スタチンがイヌ血管肉腫細胞における細胞増殖と組織因子 , トロンボモジュリンの発現に与える影響
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------