

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292158

研究課題名(和文) 犬の悪性腫瘍における抗がん剤・分子標的薬に対する耐性機構の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of molecular mechanisms of drug resistance in canine malignant tumors

研究代表者

辻本 元 (Tsuji moto, Hajime)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：60163804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：犬リンパ腫に対する化学療法において薬剤耐性獲得は治療に限界をもたらす主たる要因となる。本研究では遺伝子発現量の網羅的解析によって、薬剤耐性獲得時には腫瘍組織において免疫応答や炎症反応が抑制されていることが明らかとなり、それらに関連する6遺伝子が新規薬剤耐性遺伝子として抽出された。さらにこの6遺伝子の発現量に基づく遺伝子発現パネルによって高精度に化学療法耐性を予測するモデルが構築された。本研究成果は犬のリンパ腫治療の成績向上に結びつくばかりでなく、人における腫瘍治療の参考になる知見を提供するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Drug resistance is a major cause of the failure in the chemotherapy for malignant tumors in dogs. In this study, comprehensive analysis of gene expression profiles revealed that immune responses and inflammatory reactions were suppressed in lymphoma tissues at the acquisition of drug resistance. In addition, a model to predict chemotherapy resistance was established using expression profiles of 6 genes associated with immune/inflammatory responses. This study revealed novel mechanisms of chemotherapy resistance and suggested that the resistance to chemotherapy could be predicted by the quantification of the 6 genes before chemotherapy. Findings obtained from this study would be beneficial for the chemotherapy in dogs and also provide useful information for the cancer chemotherapy in humans.

研究分野：農学

キーワード：犬 悪性腫瘍 薬剤耐性 網羅的解析

1. 研究開始当初の背景

リンパ腫は犬において最も発生頻度の高い悪性腫瘍の一つであり、抗がん剤を用いた化学療法に対する感受性が高いことから、おもに CHOP 療法 (シクロフォスファミド、ドキシソルピシン、ビンクリスチンを組み合わせた多剤併用療法) が実施される。

しかしながら、ほとんどの報告で初期奏効期間 8~10 ヶ月とされており、再発後にはいずれの抗がん剤も奏効しない「多剤耐性」が大きな問題となることが多い。

抗がん剤に対する耐性機構は、薬物排出ポンプによる抗がん剤の排出、薬物代謝による抗がん剤の不活化、DNA 修復機構の活性化、およびアポトーシス経路の不全に大別され、それぞれに関与する分子が同定されてきた。

犬のリンパ腫に関しては、再発時あるいは薬剤耐性となった際に *ABCB1* 遺伝子がコードする薬剤排出ポンプである P-glycoprotein (P-gp) の発現増強が認められ、P-gp の発現が認められる症例では奏効率が低く生存期間が短いことが知られている。また、我々の研究成果から、犬のリンパ系腫瘍細胞株においては薬剤感受性株と薬剤耐性株の間には *ABCB1* 遺伝子の発現量に差が認められ、それが DNA メチル化およびヒストン脱アセチル化といったエピジェネティック機構によって制御されていることが示された。また、*ABCB1* 遺伝子の発現が増強している細胞株においてその薬剤耐性への関与を明らかにしている。しかしながら、これらの事象はリンパ腫の一部の症例における P-gp と薬剤耐性との関連を示唆するのみであり、多くのリンパ腫症例における薬剤耐性機構の解明には至っていない。

我々は以前の研究において犬リンパ腫症例に関して、薬剤耐性群と感受性群由来のサンプルを用い、抗がん剤耐性への関与が示されている 10 分子について mRNA の発現量を検討した。その結果、耐性群の一部で *ABCB1* 遺伝子の発現が増強していたものの、いずれの分子に関しても 2 群間に有意な差は認められなかった。

上述のようなこれまでの研究経過から、薬剤耐性の発現は一つあるいは少数の分子によって制御されている訳ではなく、多くの分子が関わるネットワークの変化によってもたらされるものと考えられた。さらにこのネットワークの変化にはこれまでに薬剤耐性との関連が示唆されていない新規耐性因子が関与している可能性が高いと考えた。

そこで、本研究では、犬のリンパ腫において抗がん剤に対する耐性に関わる新規因子の抽出およびそれらを含む薬剤耐性にかかわる分子ネットワークの解明、さらにはその評価法および制御法を開発するため、犬で利用可能となった cDNA マイクロアレイを用いて薬剤耐性獲得時の遺伝子発現プロファイルにおける変化の網羅的解析を実施するこ

ととした。また、人医学領域において薬剤耐性との関連が示唆されている遺伝子に関しても犬リンパ腫症例から得られた材料を用いてその薬剤耐性との関連を検討した。

2. 研究の目的

本研究では、犬のリンパ腫において化学療法耐性獲得時の遺伝子発現における変化の網羅的な解析から新規薬剤耐性因子の抽出を行い、薬剤耐性に関与する新たな機構を明らかにすることを目的とした。さらに抽出された新規薬剤耐性因子を含む複数の遺伝子を用いた遺伝子発現パネルを作成することで、それらを臨床にフィードバックして薬剤耐性の予測および抗がん剤の選択に利用することをめざした。

3. 研究の方法

(1) **犬リンパ腫症例における薬剤耐性獲得時の遺伝子発現プロファイルにおける変化の網羅的解析**: 犬のリンパ腫における薬剤耐性機構に関するこれまでの研究では P-gp を含む既知の因子と薬剤耐性との関連が検討されてきた。しかしながら、多くの犬リンパ腫症例における薬剤耐性獲得機構はこれら既知の薬剤耐性因子だけでは説明できないことが明らかとなってきた。そこで本研究では、新規薬剤耐性獲得分子機構を明らかとし、さらにその中で重要な役割を果たす耐性因子を同定するため、犬リンパ腫症例が薬剤耐性を獲得した際の遺伝子発現プロファイルの変化を網羅的に解析することとした。この目的を果たすため、多中心型高悪性度 B 細胞リンパ腫に罹患した犬 10 例に関して、化学療法感受性期および耐性期に採取した腫瘍サンプルを用いて遺伝子発現プロファイルを cDNA マイクロアレイによって網羅的に解析し、同一症例における感受性期と耐性期との比較を行った。この 2 期の間の比較において特に大きな発現量の変化が認められた遺伝子に関してはリアルタイム PCR を用いてその発現量の変化を定量的に比較検討した。さらに、得られた遺伝子発現量における変化のデータを用いて Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を実施することで、その遺伝子発現の変化がもたらす生物学的機能における変化を検討した。

(2) **薬剤耐性因子を用いた遺伝子発現パネルによる化学療法耐性予測モデルの構築**: 犬のリンパ腫においては薬剤耐性をもたらす詳細な機構が解明されていないため、治療として化学療法を開始する際には事前に感受性を予測することができない。つまり、実際に化学療法を開始しその効果を検討するまでは選択した薬剤が適切であったのか知ることができないという現状がある。そのため、適切な効果を示す薬剤を決定するために時

間がかかったり、効果を示さない薬剤の投与によって副作用のみが生じるといった多くの問題点が存在する。そこで本研究では、(1)で得られた研究成果を基に薬剤耐性因子を用いた遺伝子発現量パネルを統計学的解析から作成し、その臨床的な有用性を検討することとした。この目的のため、多中心型高悪性度 B 細胞リンパ腫に罹患した犬 40 例を化学療法感受性群および耐性群に分類し、これらの症例から得られた腫瘍サンプルを用いて(1)で明らかとなった薬剤耐性関連遺伝子の発現量を 2 群間で比較した。さらにこれら遺伝子の発現量データを用いて化学療法耐性を予測する遺伝子発現パネルをロジスティック回帰モデルにより作成し、化学療法耐性を予測する感度や特異度を算出した。

(3) 既知の薬剤耐性因子と臨床例における化学療法耐性との関連の検討：犬リンパ腫におけるこれまでの薬剤耐性に関する研究のほとんどは特定の遺伝子やタンパク質の発現量における変化に着目し解析を行っている。しかしながら、特定の遺伝子における塩基配列の異常も薬剤耐性獲得に関与している可能性があると考えられた。そこで本研究では、すでに薬剤耐性との関連が示唆されてきた *p53* 遺伝子に着目し、その塩基配列における異常と臨床的に認められた化学療法の効果との関連を検討することとした。具体的には、高悪性度リンパ腫に罹患した犬 43 例から腫瘍サンプルを採取したのちに PCR-SSCP 法、および DNA 塩基配列解析によって *p53* 遺伝子の塩基配列異常を解析した。次に、*p53* 遺伝子における変異の有無によってこれら症例を 2 群に分類し、化学療法の奏効率および生存期間を群間で比較した。

4. 研究成果

(1) 犬リンパ腫症例における薬剤耐性獲得時の遺伝子発現プロファイルにおける変化の網羅的解析：リンパ腫に罹患した犬 10 例の化学療法感受性期と耐性期の間で遺伝子発現量の変化を網羅的に解析した結果、2 期間で有意に発現量が異なる遺伝子として 57 遺伝子が抽出された。このうち 2 遺伝子は耐性期に発現量が上昇しており、55 遺伝子は発現量が低下していた。これら 57 遺伝子のうち特に 2 期間の発現量に明確な差が認められた遺伝子として 16 遺伝子が抽出され、リアルタイム PCR による詳細な発現量解析の結果、*CCR3*, *ASNS*, *CXCL8*, *CALCA*, *SASH1*, *IL1R2*, *FCER1A*, *SELE*, *LOC448801*, *EDNRB*, *PKD4*, *SERPINA1* および *PLAUR* の 13 遺伝子が新規薬剤耐性関連遺伝子候補として抽出された。このうち *CCR3* と *ASNS* は化学療法耐性期に発現量が上昇しており、その他 11 遺伝子は耐性期に発現量が低下していた。また、上述のように抽出された 57 遺伝子の発現量変化に関して IPA を用いてその生物学的機能におけ

る変化を検討した結果、感受性期と比較して耐性期において不活化されていた生物学的機能として 64 の機能タームが抽出された。そのうち 32 ターム(50%)は白血球の活性化、動員、脱顆粒などに関連するものであった。

本研究の成果として、犬リンパ腫における新規の薬剤耐性関連因子の候補として 13 遺伝子が抽出された。これら遺伝子群には炎症反応や免疫応答に関わる遺伝子や腫瘍の浸潤・進行に関与する遺伝子が含まれていた。これら遺伝子の発現量における変化と臨床的に認められる薬剤耐性との関連に関しては不明な点が多いため、今後詳細な解析を行っていく予定である。さらに、IPA による生物学的機能における変化の検討によって化学療法耐性期には腫瘍組織中における免疫応答や炎症反応の抑制が起きている可能性が示唆された。これまでの人医学領域における報告では、腫瘍の微小環境における免疫応答活性化が化学療法に対する良好な反応性と関連することが示されている。そのため、本研究の成果を踏まえると、人と犬の両種において免疫応答や炎症反応の抑制が化学療法耐性をもたらす新たなメカニズムである可能性が示唆された。

(2) 薬剤耐性因子を用いた化学療法耐性予測モデルの構築：(1)の研究から新規薬剤耐性因子の候補として見出された 13 遺伝子に関して、新たにリンパ腫に罹患した犬 40 例から得た腫瘍サンプルを用いてその発現量を検討した。具体的には 23 例の化学療法感受性群と 17 例の化学療法耐性群の 2 群間で上記遺伝子の発現量を比較した。その結果、*ASNS*, *CCR3*, *CALCA*, *EDNRB*, *FCER1A* および *SASH1* の計 6 遺伝子において 2 群間に有意な差が認められ、このうち *ASNS* と *CCR3* は化学療法耐性群で発現量が上昇しており、*CALCA*, *EDNRB*, *FCER1A* と *SASH1* は発現量が低下していることが明らかとなった。次に、これら遺伝子発現量データを用いてロジスティック回帰モデルによって化学療法耐性予測モデルを構築した。まず、遺伝子発現パネルに用いる遺伝子の抽出を行ったところ上述した解析結果と同じ 6 遺伝子が遺伝子パネルに組み込むべき因子として抽出されたため、これら遺伝子の発現量を元に化学療法耐性予測の計算式を作成した。その結果、 $-24.1 + 8.2 \times \log(ASNS) + 14.0 \times \log(CCR3) - 5.0 \times \log(CALCA) - 1.7 \times \log(EDNRB) - 9.3 \times \log(FCER1A) + 0.9 \times \log(SASH1)$ という計算式に各遺伝子の発現量を代入することによってスコアを計算し、スコアが負であれば化学療法感受性、正であれば耐性と予測するモデルが構築され、その感度と特異度はそれぞれ 0.717、0.801 とその精度は優れていることが明らかとなった。

本研究から構築された化学療法耐性予測モデルは、犬リンパ腫症例から採取した腫瘍サンプルを用い遺伝子発現量を測定しスコ

アを計算することで化学療法開始前にその感受性を予測できる可能性を示した画期的なものであり、その高い感度および特異度から臨床的な有用性が高いと考えられた。

(3) **既知の薬剤耐性因子と臨床例における化学療法耐性との関連の検討**: 高悪性度リンパ腫に罹患した犬 43 例において *p53* 遺伝子の塩基配列を解析した結果、7 例 (16%) において異常が検出された。このうち 3 例においては 1 塩基挿入が認められ、4 例においては 1 塩基変異が認められた。また、これら 7 例のうち 6 例においてはアミノ酸配列に変化をもたらす塩基配列異常を有することが明らかとなった。次にこれら塩基配列異常を有する症例と異常を認めなかった症例との間で化学療法の奏効率および生存期間を比較したところ、*p53* 遺伝子の塩基配列異常を有する症例では異常を認めなかった症例に比べて有意に化学療法の奏効率が低く、生存期間が短いことが示された。

本研究から、犬のリンパ腫における薬剤耐性には薬剤耐性関連因子の遺伝子発現量における変化のみならず、特定の遺伝子の塩基配列異常も関与していることが示された。とくに *p53* 遺伝子における塩基配列異常は犬リンパ腫に対する治療の奏効率や生存期間との関連が示されたことから、症例の予後マーカーとして有用である可能性が示唆された。

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 11 件)

Roode, S.C., Rotroff, D., Richards, K.L., Moore, P., Motsinger-Reif, A., Okamura, Y., Mizuno, T., Tsujimoto, H., Suter, S.E. and Breen, M. Comprehensive genomic characterization of five canine lymphoid tumor cell lines. *BMC Vet. Res.* 査読有、12:207 (2016). doi:10.1186/s12917-016-0836-z

Hiyoshi-Kanemoto, S., Goto-Koshino, Y., Fukushima, K., Takahashi, M., Kanemoto, H., Uchida, K., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Detection of circulating tumor cells using GeneScan analysis for antigen receptor gene rearrangements in canine lymphoma patients. *J. Vet. Med. Sci.* 査読有、78:877-881 (2016). doi:10.1292/jvms.15-0433

Mizutani, N., Goto-Koshino, Y., Uchida, K., Takahashi, M. and Tsujimoto, H. Clinical and histopathological evaluation of 16 dogs with T-zone lymphoma. *J. Vet. Med. Sci.* 査読有、78:1237-1244

(2016).

doi:10.1292/jvms.15-0688.

Mizutani, N., Goto-Koshino, Y., Tsuboi, M., Kagawa, Y., Ohno, K., Uchida, K. and Tsujimoto, H. Evaluation of CD25-positive cells in relation to the subtypes and prognoses in various lymphoid tumours in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 査読有、173:39-43 (2016). doi:10.1016/j.vetimm.2016.03.018.

Sato, M., Yamazaki, J., Goto-Koshino, Y., Setoguchi, A., Takahashi, M., Baba, K., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Minimal residual disease in canine lymphoma: An objective marker to assess tumor cell burden in remission. *Vet. J.* 査読有、215:38-42 (2016).

doi:10.1016/j.tvjl.2016.05.012

Koshino, A., Goto-Koshino, Y., Setoguchi, A., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Mutation of p53 gene and its correlation with the clinical outcome in dogs with lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* 査読有、30:223-229 (2016).

doi:10.1111/jvim.13807

Fujiwara-Igarashi, A., Igarashi, H., Mizutani, N., Goto-Koshino, Y., Takahashi, M., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Expression profile of circulating serum microRNAs in dogs with lymphoma. *Vet. J.* 査読有、205:317-321 (2015).

doi: 10.1016/j.tvjl.2015.04.029

Tomiyasu, H. and Tsujimoto, H. Comparative aspects of molecular mechanisms of drug resistance through ABC transporters and other related molecules in canine lymphoma. *Vet. Sci.* 査読有、2:185-205 (2015).

doi:10.3390/vetsci2030185

Asada, H., Tomiyasu, H., Goto-Koshino, Y., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Evaluation of the drug sensitivity and expression of 16 drug resistance-related genes in canine histiocytic sarcoma cell lines. *J. Vet. Med. Sci.* 査読有、77:677-684 (2015).

doi:10.1292/jvms.14-0415

Goto-Koshino, Y., Mochizuki, H., Sato, M., Nakashima, K., Hiyoshi, S., Fujiwara-Igarashi, A., Maeda, S., Nakamura, K., Uchida, K., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Construction of a multicolor GeneScan analytical system to detect clonal rearrangements of immunoglobulin and

T cell receptor genes in canine lymphoid tumors. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 査読有、165:81-87. (2015).
doi: 10.1016/j.vetimm.2015.03.005
Sato, M., Mochizuki, H., Goto-Koshino, Y., Fujiwara-Igarashi, A., Takahashi, M., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Hypermethylation of the death-associated protein kinase CpG island in canine B-cell lymphoid tumors. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 査読有、161:222-231 (2014).
doi: 10.1016/j.vetimm.2014.08.011

〔学会発表〕(計 9 件)

茂木朋貴、富安博隆、後藤(越野)裕子、金本英之、大野耕一、渡邊学、菅野純夫、辻本元：全エクソームシーケンシングを用いた犬の多中心型高悪性度 B 細胞性リンパ腫における生殖細胞系列変異の検出、第 13 回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2017 年 2 月 18 日、神奈川

浅田創、坪井誠也、内田和幸、富安博隆、大参亜紀、金本英之、後藤(越野)裕子、大野耕一、辻本元：犬の組織球性肉腫において高頻度に認められた TP53 遺伝子における 2 塩基挿入、第 13 回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2017 年 2 月 18 日、神奈川

小川琴子、富安博隆、末永珠祐、渡邊学、菅野純夫、茂木朋貴、大参亜紀、後藤(越野)裕子、大野耕一、Skorupski K. A.、辻本元：犬の多中心型高悪性度 B 細胞リンパ腫における新規化学療法耐性化因子の発現量解析、第 13 回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2017 年 2 月 18 日、神奈川

Motegi, T., Tomiyasu, H., Goto-Koshino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Prognostic significance of the expression of CD44 variant isoform in canine multicentric high-grade B-cell lymphoma. Veterinary Cancer Society Annual Conference 2016, 2016 年 10 月 21 日、オランダ、アメリカ
Tomiyasu, H., Suenaga, M., Watanabe, M., Ogawa, K., Motegi, T., Goto-Koshino, Y., Ohno, K., Sugano, S., Sukorupski, K. A. and Tsujimoto, H. Comprehensive gene expression analysis to elucidate common molecular mechanism of drug resistance in canine lymphoma. Veterinary Cancer Society Annual Conference 2016, 2016 年 10 月 21 日、オランダ、アメリカ

末永珠祐、富安博隆、渡邊学、後藤(越野)裕子、大野耕一、菅野純夫、辻本元：犬のリンパ腫における化学療法耐性化関連遺伝子群の網羅的解析、第 12 回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2016 年 2 月 20 日、神奈川
茂木朋貴、高橋雅、富安博隆、後藤(越野)裕子、大野耕一、辻本元：犬のリンパ腫において CD44 バリエーションフォームの発現が予後に与える影響、第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月 8 日、青森
末永珠祐、富安博隆、渡邊学、後藤(越野)裕子、大野耕一、菅野純夫、辻本元：犬の B 細胞性高悪性度リンパ腫における網羅的遺伝子発現量解析による化学療法感受性関連遺伝子群の探索、第 11 回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2015 年 2 月 21 日、神奈川
渡邊学、木村絵里、坪井誠也、萱橋賭朋子、今村昌平、佐伯亘平、中川貴之、内田和幸、望月学、西村亮平、辻本元、菅野純夫：伴侶動物の乳腺腫瘍へのラパチニブ投与における分子生物学的解析およびトランスレーショナルリサーチの試み、第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 10 日、北海道

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

辻本元 (TSUJIMOTO, Hajime)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：60163804

(2) 研究分担者

渡邊学 (WATANABE, Manabu)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授
研究者番号：70376606