

## 論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成9年度博士課程進学

氏名 中村 倫子

指導教官 辻本 元

### 論文題名 Studies on the Multidrug Resistance in Canine and Feline Lymphoid Tumors

(犬および猫のリンパ系腫瘍における多剤耐性機構に関する研究)

悪性リンパ腫や急性リンパ芽球性白血病 (acute lymphoblastic leukemia、ALL) などのリンパ系腫瘍は犬や猫において最も発生頻度の高い悪性腫瘍の一つである。それらリンパ系腫瘍に対する治療法としては、抗がん剤を用いる化学療法が最も一般的に使用されている。とくにリンパ腫は抗がん剤に対する感受性が高く、寛解導入率が高い。しかし、治療開始前から、または再発時に認められる腫瘍の抗がん剤に対する耐性が治療上の大きな問題となっており、予後の悪化に関与している。そのような腫瘍細胞の抗がん剤に対する耐性にはさまざまな機構があり、化学構造的に関連のない複数の抗がん剤に対して耐性となる多剤耐性が認められることも多い。抗がん剤に対する耐性機構としては薬剤の排出促進、抗がん剤の解毒亢進、抗がん剤の標的の変化、および抗がん剤によるアポトーシス誘導機構の異常などが知られている。ヒトにおいては、これら多剤耐性を克服する試みが行われているが、犬や猫においては多剤耐性に関する報告は少ない。犬および猫においては、P 糖蛋白 (P-gp) による薬剤耐性に関する少数の報告があるに過ぎず、その他の機構や臨床的に有用な薬剤耐性の克服に関しては報告がない。そこで本研究では、培養細胞の系だけではなく、臨床検体も用いることによって、犬および猫のリンパ系腫瘍における多剤耐性機構およびその克服に関する一連の検討を行った。

#### 第一章：犬のリンパ系腫瘍細胞における多剤耐性関連遺伝子の発現

薬剤耐性に関連する遺伝子として、エネルギー依存的に薬剤を排出する膜タンパクである P-gp をコードする *mdr1* および MRP をコードする *mrp*、グル

タチオン抱合に関与する *GSTπ*、アポトーシスの負の制御因子である *bcl-2*、DNA の複製および修復に関わる *Topo IIα* の 5 種類の遺伝子について検討した。

まず、犬のリンパ腫由来細胞株 (CL-1) および白血病由来細胞株 (GL-1) に加えて、これら細胞株を抗がん剤であるアドリアマイシン (ADM) またはビンクリスチン (VCR) 存在下で培養して作成した薬剤耐性株 (CL-1/ADM、GL-1/ADM、GL-1/VCR) について検討した。これらの細胞 RNA から cDNA を作成して鋳型とし、ヒトの各遺伝子の塩基配列を基に作成したプライマーを用いて PCR を行った。内部コントロールとして *GAPDH* 遺伝子を用いた。*mdr1* は、3 つの薬剤耐性株のうち GL-1/VCR 細胞のみにその発現が認められた。*mrp* は薬剤感受性の CL-1 細胞にその発現を認めた。*bcl-2* に関しては、薬剤耐性獲得に伴い、CL-1/ADM 細胞で発現低下が、また GL-1/ADM 細胞および GL-1/VCR 細胞で発現上昇が認められた。*Topo IIα* は、3 つの薬剤耐性株すべてにおいて、親株と比較してその発現が減少していた。*GSTπ* はいずれの細胞株にも発現が見られなかった。

また、4 例の抗がん剤感受性症例および 17 例の抗がん剤耐性例から成る合計 21 例の犬のリンパ系腫瘍症例から腫瘍細胞を採取し、それぞれにおいて 5 種類の薬剤耐性関連遺伝子の発現を検討した。*mdr1* は抗がん剤反応性の 4 例中 1 例、および抗がん剤耐性の 17 例中 10 例でその発現が認められた。*mrp* は抗がん剤耐性症例の 3 例で発現していた。*GSTπ* は抗がん剤耐性の 1 症例にのみ発現が認められた。*bcl-2* および *Topo IIα* は全体の 21 症例のうち、それぞれ 16 例および 15 例に発現しており、その発現は抗がん剤感受性および耐性のいずれの症例においても認められた。また、これら *bcl-2* および *Topo IIα* は *mdr1* とともに発現している傾向がみられた。以上の結果より、犬のリンパ系腫瘍における薬剤耐性においては、*mdr1* の発現が主要なはたらきを示すものと考えられたが、*bcl-2*、*Topo IIα*、*mrp* などの遺伝子の発現が関与する場合や、未知の機構によるものが存在することが示唆された。

## 第二章：犬および猫のリンパ系腫瘍細胞株における各種薬剤による多剤耐性克服効果

本章においては多剤耐性を示す犬および猫のリンパ系腫瘍細胞株を用い、4 種類の多剤耐性克服薬の候補薬について、それらの培養細胞株における効果を検討した。第一章において用いた GL-1 細胞株とその薬剤耐性株 GL-1/VCR

の他、猫のリンパ腫細胞株 (FT-1) および ADM 存在下で培養して作成した薬剤耐性株 FT-1/ADM を用いた。これら GL-1/VCR 細胞および FT-1/ADM 細胞においては *mdr1* 遺伝子および P-gp の発現が認められ、また ADM と VCR に対する交差耐性も確認された。これらの細胞株に、耐性克服候補薬剤としてシクロスポリン A (CsA)、タクロリムス (Tac)、ベラパミル (Ver) および新規キノリン化合物である MS-209 を添加し、ADM および VCR に対する感受性を IC<sub>50</sub> (50% growth inhibitory concentration) 値によって評価した。

GL-1/VCR 細胞に CsA、Tac、Ver および MS-209 を添加したところ、ADM に対する感受性は 1.4~10 倍に増強され、また VCR に対する感受性は 31~375 倍に増強された。その耐性克服効果は MS-209 および Ver において高く、CsA および Tac において低い傾向が認められた。同様に、FT-1/ADM 細胞に CsA、Tac、Ver および MS-209 を添加して培養したところ、ADM に対する感受性は 1.5~7.3 倍に増強された。また、FT-1/ADM 細胞に CsA、Tac、Ver および MS-209 を添加したところ、VCR に対する感受性は 1.2~35 倍に増強された。FT-1/ADM 細胞における耐性克服効果は CsA、MS-209 および Ver において比較的高く、Tac において低いことが認められた。

以上の結果から、P-gp を発現し、多剤耐性を獲得した犬および猫のリンパ系腫瘍細胞株において、CsA、Tac、Ver および MS-209 の 4 薬剤はいずれも抗がん剤に対する感受性を回復させる効果があることが明らかとなった。なかでも、MS-209 はいずれの細胞株と抗がん剤の組み合わせにおいても良好な耐性克服効果を示すことが注目された。

### 第三章：犬および猫の薬剤耐性リンパ系腫瘍症例における多剤耐性克服薬剤 (MS-209) の臨床試験

第二章では、犬および猫のリンパ系腫瘍細胞株において、MS-209 が良好な薬剤耐性克服効果を示すことが明らかとなった。また MS-209 は CsA や Ver とは異なり、単剤での生理活性および副作用がないことが知られている。そこで本章では、抗がん剤耐性となった犬および猫のリンパ系腫瘍症例における MS-209 の薬剤耐性克服効果を検討した。VCR に耐性になった時点で、VCR 投与による腫瘍縮小率を算定し、一定期間後に同一症例に対して VCR および MS-209 を同時に投与することによってその腫瘍縮小率を算定し、両者の違いを検討することによって、薬剤耐性症例における MS-209 の有効性を判定する

こととした。また末梢血中に腫瘍細胞が検出される場合にはその減少率についても同時に評価した。また、本臨床試験を行った症例の腫瘍細胞について、RT-PCRにより *mdr1* および *mrp* 遺伝子の検出も併せて行った。

その結果、本臨床試験を行ったリンパ系腫瘍の犬の 7 例中 4 例および猫の 2 例中 2 例において、VCR 単独投与では腫瘍の縮小や末梢血中腫瘍細胞の減少は認められなかったにもかかわらず、VCR と MS-209 の同時投与によって、明らかな腫瘍の縮小および末梢血中腫瘍細胞の減少が認められた。また、犬のリンパ系腫瘍症例のうち、*mdr1* 遺伝子の発現は、MS-209 が有効であった 4 例中 3 例、および無効であった 3 例中 1 例に認められた。*mrp* 遺伝子の発現は MS-209 が無効であった 1 例において認められた。猫のリンパ系腫瘍の 2 例では *mdr1* および *mrp* 遺伝子のいずれの発現も認められなかった。しかし、MS-209 の有効性が認められた症例においても、再発が一週間以内に認められる症例が多く、有効性の持続に関する問題が残った。

以上、本論文では犬および猫のリンパ系腫瘍における多剤耐性機構の解析とその克服に関する研究を行った。薬剤の排出に関わる P-gp は犬および猫のリンパ系腫瘍において薬剤耐性に関与する主要な分子の一つであることが示されたが、P-gp の発現が認められない薬剤耐性の症例も多く、いわゆる非定型的多剤耐性についてもさらなる検討が必要であることが示された。また、多剤耐性克服のための候補薬剤のうち、とくに新規キノリン化合物である MS-209 が犬および猫のリンパ系腫瘍細胞株において薬剤耐性克服効果を示すことが明らかとなり、さらに実際の犬および猫のリンパ系腫瘍症例においても薬剤耐性克服効果が証明された。犬および猫のリンパ系腫瘍における多剤耐性機構に関する本研究は、抗がん剤治療において最も大きな問題となっている薬剤耐性に対して分子生物学的解析から臨床試験まで幅広いアプローチを行ったものであり、今後の抗腫瘍化学療法に関して新しい展開を導くものと期待される。