

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鈴木 日吉

チロシンキナーゼ (tyrosine kinase, TK) は細胞の増殖等を制御し、医学領域では TK 遺伝子の変異、タンパク発現量および活性の変化が悪性腫瘍の発生に関与しており、その阻害薬が人のリンパ系腫瘍の一部でも抗腫瘍薬として成果をあげている。獣医学領域では、犬のリンパ系腫瘍の病態における TK の関与や TK 阻害薬の臨床応用は検討されていない。本研究では、犬のリンパ系腫瘍における TK 阻害薬の抗腫瘍効果を検討するため、犬のリンパ系腫瘍細胞株に対する TK 阻害薬の効果を解析し、TK 阻害薬が作用する分子の遺伝子塩基配列、タンパク発現量および TK 活性を検討した。

第 1 章 犬のリンパ系腫瘍細胞株におけるチロシンキナーゼ阻害薬の増殖抑制効果

犬のリンパ系腫瘍における TK 阻害薬の増殖抑制効果の包括的な研究は行われておらず、6 種類の犬のリンパ系腫瘍細胞株 (CL-1、CLBL-1、EMA、GL-1、Nody-1、UL-1) の 10 種類の TK 阻害薬 (axitinib, bosutinib, dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, masitinib, sorafenib, sunitinib, vatalanib) に対する感受性を検討した。CLBL-1 と EMA における dasatinib の 50%増殖阻害濃度は他 4 種の細胞株よりも低く、GL-1 における sorafenib と sunitinib の 50%増殖阻害濃度は他 5 種の細胞株よりも低かった。GL-1 の高感受性は Flt3 に起因すると考えられた。CLBL-1 と EMA は dasatinib に対し高い感受性を示し、作用する TK の生存や増殖への関与が示唆された。

第 2 章 犬の Src のアミノ酸置換がもたらす dasatinib の Src 活性阻害作用に対する影響

異常に活性化した TK の特定は犬のリンパ系腫瘍に対する TK 阻害薬の臨床応用の検討で重要である。増殖抑制作用の原因分子として、dasatinib が作用する SRC ファミリーキナーゼの中でも CLBL-1 と EMA で変異が認められた *src* に着目した。CLBL-1 と EMA の Src には 2 アミノ酸残基の置換があり、その発現量を抗ヒト Src 抗体による Western blotting で比較したが、他の細胞株とほぼ同様であった。この健常犬とアミノ酸置換のある Src を強制発現させた人腎上皮細胞由来細胞株 HEK293T に dasatinib を添加して培養し、TK 活性を測定し

た結果、アミノ酸置換のある Src は正常な Src と比べて低濃度で抑制された。このアミノ酸置換は Src の dasatinib に対する感受性を上げることが示唆された。

第3章 犬のリンパ系腫瘍細胞株における Lyn の dasatinib に対する感受性の評価

医学領域で Lyn の活性化が生存に必須であることが知られているリンパ腫と同タイプの犬のリンパ腫から樹立された CLBL-1 の dasatinib に対する高感受性の原因分子として Lyn に着目した。抗ヒト Lyn 抗体を用いて、第2章と同様の方法で上記6種類のリンパ系腫瘍細胞株における Lyn の発現量、TK 活性を測定した。これら細胞株に dasatinib を添加して培養し、抗ヒト Lyn 抗体を用いた免疫沈降で Lyn を単離して TK 活性を測定した。CLBL-1 では他の細胞株より Lyn の発現量は多かった。TK 活性も有意に強く、他の細胞株に比べて低い濃度の dasatinib により抑制された。CLBL-1 における dasatinib の増殖抑制効果は Lyn の活性化の阻害によるものであることが示唆された。

第4章 犬のリンパ系腫瘍細胞株における dasatinib による Lck の活性化阻害

Lck は T 細胞受容体のシグナル伝達系に関与しており、T 細胞の免疫学的表現型を示す EMA の dasatinib に対する高感受性の原因分子として Lck に着目した。抗ヒト Lck 抗体を用いて、上記6種類のリンパ系腫瘍細胞株における Lck の発現量、TK 活性および dasatinib に対する感受性を第3章と同様の方法で検討した。EMA では他の細胞株より Lck の発現量は多かった。TK 活性も有意に強く、他の細胞株に比べて低い濃度の dasatinib により抑制された。EMA における dasatinib の増殖抑制効果は Lck の活性化の阻害によるものであることが示唆された。

本研究は犬のリンパ系腫瘍に対する分子標的治療を開発するために必要な基礎的知見を提供するものであり、獣医臨床腫瘍学に新たな展開を導くものと評価することができる。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。