

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吉田 貢太

---

犬乳腺腫瘍は雌犬の中で最も発生頻度が高い腫瘍であり、悪性例の一部は強い局所浸潤や再発及び遠隔転移を示し、予後は極めて不良である。近年、悪性腫瘍がこのような性質を示す原因の一つとして、上皮間葉移行 (EMT) が示唆されている。EMT は上皮細胞が間葉細胞様に性質を変化させる現象で、細胞の形態変化、運動能の亢進、上皮・間葉マーカーの変化といった形質変化として捉えられるが、犬乳腺腫瘍における EMT の意義は未だ不明な点が多い。そこで本研究では犬乳腺腫瘍の悪性化における EMT の意義を明らかにすることを目的とし、犬乳腺腫瘍自然発症例における悪性度・予後との関連の評価、および犬乳腺腫瘍培養細胞株を用いた EMT モデルの作成とその制御メカニズムについて検討を行った。

まず、犬乳腺腫瘍自然発症例 110 例の手術検体を用い、上皮マーカーである ZO-1、E-cadherin、間葉マーカーである vimentin、N-cadherin、fibronectin の発現を調べるとともに、予後や臨床病理学的データとの関連性を統計学的に評価した。その結果、119 組織サンプル (良性 71、悪性 48) において、ZO-1、E-cadherin、vimentin、N-cadherin は悪性腫瘍において有意な発現の変化を示した。また、単変量解析では E-cadherin と vimentin が 1 年生存の有意な予後因子であり、交絡因子の影響を補正した多変量解析では E-cadherin が独立した予後因子となることが明らかとなった (adjusted odds ratio: 2.3、 $p=0.02$ )。以上の結果から EMT の指標の一つである上皮・間葉マーカーの発現の変化と犬乳腺腫瘍の悪性度や予後との間に関連が見られ、EMT の犬乳腺腫瘍の悪性化への関与が示唆された。

そこで次に犬乳腺腫瘍と EMT の関連をより詳細に検討するため、犬乳腺癌由来細胞株を用いた EMT 誘導モデルの作製を試みた。EMT 誘導には Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) と hepatocyte growth factor (HGF) もしくはそれらの共刺激が有効との報告があり、これらを用いて誘導実験を行った。その結果、HGF 刺激により乳腺癌由来細胞株の一つである CHMm 株において形態学的変化、運動能の亢進、上皮・間葉マーカーの変動が認められ、HGF が犬乳腺腫瘍に対する EMT 誘導因子となり得ると考えられた。

次にこのモデルにおいて、これら刺激による EMT 誘導の制御機序に関し詳細な検討を行った。EMT 誘導を制御する転写因子として報告のある Snail、Slug、ZEB1、ZEB2、Twist に注目し、リアルタイム PCR によって TGF- $\beta$  及び HGF 刺激後の発現動態を解析したところ、最も典型的に EMT が誘導された CHMm 株において Twist の発現が誘導されていることが明らかとなった。この誘導された Twist の機能を検証するために、RNA 干渉法を用いて Twist のノックダウンを行った上で HGF 刺激を行ったところ、対照群では運動能の亢進とマーカーの変化が観察されたが、Twist siRNA 群ではこれらの変化が認められなかった。

これらのことから CHMm 株における HGF 誘導性 EMT は、Twist 依存性に誘導されることが明らかとなった。さらに Twist の機能を検討するために、通常培養条件下で Twist 発現の高い CHMp 株と CNMm 株に対しても Twist のノックダウンを行い EMT 関連因子の変化について検討した。その結果、運動能は有意に低下したが、マーカーの変化は認められず、Twist は運動能の調節に関して重要な役割を持つことが示唆された一方で、上皮・間葉マーカーの発現調節に関してはその他の調節因子による制御を検討する必要があることが示唆された。

以上の結果から、犬乳腺腫瘍臨床症例における EMT の悪性度や予後との関連が示唆され、その制御機序の一部に Twist が関与していることが明らかとなった。一方犬乳腺腫瘍における EMT 制御の全体像の理解には、他の転写因子の機能の解明を含めさらなる研究が必要であると考えられた。

以上、本研究は犬乳腺腫瘍の悪性化に上皮間葉移行が関与していることを明らかにし、さらにその制御機構の一端を示したものであり、学術上、臨床応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）論文として価値あるものと認めた。