

| | | |
|---------|--|-------|
| 称号及び氏名 | 博士（獣医学） | 田中 利幸 |
| 学位授与の日付 | 平成26年3月31日 | |
| 論文名 | 犬乳腺腫瘍における MHC クラス I 発現とエピジェネティクスに関する研究 (Relationship between MHC class I expression and epigenetics in canine mammary gland tumor) | |
| 論文審査委員 | 主査 | 大橋 文人 |
| | 副査 | 笹井 和美 |
| | 副査 | 久保 喜平 |

論文要旨

緒言

MHC クラス I は、生体のほぼ全ての細胞表面上に発現している分子であり、腫瘍化などの変化に伴い細胞内で合成された抗原を CD8⁺リンパ球などの細胞傷害性細胞へ提示する。MHC クラス I を介して細胞の異常を認識した CD8⁺リンパ球などの細胞傷害性細胞は、異常細胞を排除して腫瘍の発生を抑制する。したがって、細胞表面における MHC クラス I 発現率が、腫瘍の発生と密接に関係しているものと考えられる。実際ヒトにおいて発生率の高い乳癌では全体の 37-88%において MHC クラス I 発現低下や消失が認められ、腫瘍細胞における MHC クラス I の発現率が癌患者の予後と密接に関係していることが報告されている。

MHC クラス I 抗原は約 45kDa の α 鎖と約 12kDa の β 2 ミクログロブリン (B2M) から構成されており、腫瘍細胞における MHC クラス I 発現低下や消失には B2M の発現や機能が密接に関係していることが知られている。腫瘍細胞における B2M 遺伝子の発現異常には、遺伝子の一次構造に変化を起こすことなく可逆的に遺伝子発現を抑制する変化である DNA メチル化やヒストン脱アセチル化などのエピジェネティクスが関与しているとされている。上述したヒトの乳癌の MHC クラス I 発現低下や消失は B2M 遺

伝子のヒストン脱アセチル化が原因とされており、B2M および MHC クラス I 発現率は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬により改善することが報告されている。

一方、犬においても乳腺腫瘍は、ヒトと同様発生率の高い腫瘍であるものの、腫瘍組織へのリンパ球浸潤の程度と予後との関係についての報告はあるが、MHC クラス I の発現状況ならびに、その発現状況と症例の予後との関係を検討した報告は無い。

そこで本研究では、まず犬乳腺腫瘍組織における MHC クラス I の発現状況を B2M の発現状況と共に検討し、症例の予後との関係について検討した。また、乳腺腫瘍細胞における MHC クラス I 発現とエピジェネティクスの関係についてさらに検討した。

1 章 犬乳腺腫瘍における MHC クラス I 発現と予後との関係

犬乳腺腫瘍はヒト乳癌と比較して病理組織学的特徴や生物学的挙動など似た特徴を持っているものの、犬乳腺腫瘍における MHC クラス I 発現状況と予後との関係について研究された報告は認められない。そのため第 1 章では犬乳腺癌および乳腺混合腫瘍において、MHC クラス I 発現と B2M 発現、腫瘍の大きさ、病理組織学的悪性度および予後との関係について検討した。

転移の認められない犬乳腺腫瘍組織 22 例（単純癌 9 例、混合腫瘍 13 例）において MHC クラス I 発現状況、と B2M 発現状況、腫瘍の大きさ、病理組織学的悪性度、予後との関係について検討した。MHC クラス I 発現状況および B2M 発現状況は発現あり、または発現無しに分類し、腫瘍の大きさは 3cm 以上および 3cm 以下、病理組織学的悪性度はグレード 1-3、予後は 24 ヶ月以上および 24 ヶ月以下に分類した。その結果、単純癌において、MHC クラス I 発現喪失が B2M 発現喪失、病理組織学的悪性度、そして腫瘍の再発と関連していることが明らかとなった。また、混合腫瘍において、大半の症例が MHC クラス I 発現を呈しているため、腫瘍の再発は認められなかった。以上の結果から、犬乳腺癌において MHC クラス I 発現状況は B2M 発現状況および予後に関係していることが明らかになった。

2 章 犬乳腺癌における B2M 遺伝子異常

第 1 章では、犬の乳腺癌において MHC クラス I と B2M 発現が喪失しており、MHC クラス I と B2M 発現状況が症例の予後に密接に関係していることが判明した。腫瘍細胞に MHC クラス I 発現喪失が認められた 75% 以上の症例では、B2M 遺伝子エクソン 1 の変異によるアミノ酸配列の変化がおこり、遺伝子発現が抑制されていることが報告されている。そこで、第 2 章では、犬乳腺癌組織を用いて MHC クラス I 発現喪失と B2M 遺伝子変異との関係について検討した。

手術で摘出した犬乳腺癌組織 5 例および正常犬の正常乳腺 5 例から、DNA Purification Kit を用いてゲノム DNA を抽出し、B2M エクソン 1 およびイントロン 1 領域をターゲットとするプライマーを用いて PCR 法による増幅を行ない、ダイレクトシーケンス

法で塩基配列を解析した。

その結果、乳腺癌において、エクソン 1 におけるサイレントミューテーション(12C→T, Arg4Arg)が 80%の症例で確認された。また、イントロン 1 におけるミューテーション(88+94C→T)が 80%の症例で確認された。

以上の結果から、犬乳腺癌の 80%において B2M エクソン 1 における遺伝子変異が認められたものの、その変化はアミノ酸配列に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

3 章 犬乳腺癌における MHC クラス I 発現とエピジェネティクスの関係

第 2 章では、犬乳腺癌において B2M 遺伝子で高頻度に認められた遺伝子変異はアミノ酸配列に異常をもたらすものではないことが明らかとなった。遺伝子発現抑制には、遺伝子変異以外に DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティクスが高頻度で関与していることが報告されている。そこで第 3 章では、犬乳腺癌の B2M および MHC クラス I 発現抑制とエピジェネティクスとの関係を明らかにするため、犬乳腺癌における MHC クラス I 発現状況とヒストン脱アセチル化および DNA メチル化の関与について検討した。

まず、飼い主の同意の得られた MHC クラス I の発現低下または消失が認められた犬乳腺癌組織 3 例から腫瘍細胞株を樹立した。その乳腺癌株を用いて、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬である TSA、DNA メチル化酵素阻害薬である 5AZA-AC を添加し、細胞表面における MHC クラス I と B2M の発現量の変化を FACS にて調べた。TSA を添加した犬乳腺癌株では、2 株で MHC クラス I および B2M 陽性細胞数が有意に増加した。また、1 株において MHC クラス I 陽性細胞数は有意に増加したものの、B2M 陽性細胞数は変化しなかった。一方、5AZA-AC を添加した犬乳腺癌株では、発現低下が認められた 1 株において MHC クラス I および B2M 陽性細胞数が有意に増加した。

以上の結果から、犬乳腺癌において、MHC クラス I 発現抑制の原因の一つとしてヒストン脱アセチル化および DNA メチル化が関与していることが示唆された。

まとめ

1. 犬乳腺癌における MHC クラス I 発現喪失が B2M 発現喪失および予後の悪化と関係していることが明らかとなった。
2. 犬乳腺癌において、B2M エクソン 1 およびイントロン 1 の遺伝子変異が高頻度で認められたものの、アミノ酸配列に影響を及ぼすものではなかった。
3. 犬乳腺癌における MHC クラス I 発現抑制にはヒストン脱アセチル化や DNA メチル化が関与していることが明らかとなった。

4.犬乳腺癌におけるMHCクラスI発現抑制は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬やDNAメチル化酵素阻害薬によって、発現が回復することが明らかになった。

以上の結果から、犬乳腺癌においてMHCクラスI発現抑制は予後に関係しており、今回用いた犬乳腺癌細胞株においてMHCクラスI発現低下にはヒストン脱アセチル化やDNAメチル化が関与していることが明らかとなった。そして、犬乳腺癌におけるMHCクラスI発現抑制は各阻害薬によって回復させることが可能であることが示された。

本研究結果から、MHCクラスI発現低下および喪失の認められた乳腺癌疾患犬において、各阻害薬を投与することでその予後を改善することが可能であると思われる。また、免疫療法との併用によって、抗腫瘍効果の増強が期待できる。これらの知見は獣医療におけるエピジェネティクス研究の基盤となり、今後研究を進めることで、犬の腫瘍に対する新たな治療法として期待される。

審査結果の要旨

MHCクラスI抗原は約45kDaの α 鎖と約12kDaの β 2ミクログロブリン(B2M)から構成され、腫瘍化などの変化に伴い細胞内で合成された抗原をCD8⁺リンパ球などの細胞傷害性細胞へ提示する。したがって、細胞表面におけるMHCクラスI発現率が、腫瘍の発生と密接に関係しているものと考えら、腫瘍細胞におけるMHCクラスI発現低下や消失にはB2Mの発現や機能が密接に関係していることが知られている。ヒトにおいて腫瘍細胞におけるB2M遺伝子の発現異常には、遺伝子の一次構造に変化を起こすことなく可逆的に遺伝子発現を抑制する変化であるDNAメチル化やヒストン脱アセチル化などのエピジェネティクスが関与しているとされている。ヒトの乳癌のMHCクラスI発現低下や消失はB2M遺伝子のヒストン脱アセチル化が原因とされており、B2MおよびMHCクラスI発現率は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬により改善することが報告されている。

一方、犬においても乳腺腫瘍は、ヒトと同様発生率の高い腫瘍であり、腫瘍組織へのリンパ球浸潤の程度と予後との関係についての報告はあるが、MHCクラスIの発現状況並びにその発現状況と症例の予後との関係を検討した報告は無い。本研究では、まず犬乳腺腫瘍組織におけるMHCクラスIの発現状況をB2Mの発現状況と共に検討し、症例の予後との関係について検討した。また、乳腺腫瘍細胞におけるMHCクラスI発現とエピジェネテ

イクスの関係についてさらに検討し、下記の結果を得た。

第1章では、犬乳腺腫瘍における MHC クラス I 発現状況と予後との関係について明らかにするために、転移の認められない犬乳腺腫瘍組織 22 例（乳腺癌 9 例、混合腫瘍 13 例）を用いて、MHC クラス I 発現状況と B2M 発現状況、腫瘍の大きさ、病理組織学的悪性度、予後との関係について検討した。その結果、乳腺癌において、MHC クラス I 発現喪失が B2M 発現喪失、病理組織学的悪性度、そして腫瘍の再発と関連していることを明らかにした。

第2章では、犬乳腺癌における B2M 遺伝子の遺伝子変異の状況を調べるため、DNA Purification Kit を用いてゲノム DNA を抽出し、B2M エクソン 1 およびイントロン 1 領域をターゲットとするプライマーを用いて PCR 法による増幅を行ない、ダイレクトシーケンシング法で塩基配列を解析した。その結果、乳腺癌において、エクソン 1 におけるサイレントミューテーション(12C→T, Arg4Arg)が 80%の症例で確認された。また、イントロン 1 におけるミューテーション(88+94C→T)が 80%の症例で確認された。このことから、乳腺癌において B2M エクソン 1 およびイントロン 1 の遺伝子変異は高頻度で認められるものの、アミノ酸配列に影響を及ぼすものではないことを明らかにした。

第3章では、犬乳腺癌細胞株 3 株を用いて、犬乳腺癌におけるヒストン脱アセチル化および DNA メチル化の関与について検討した。その結果、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬である TSA を添加した犬乳腺癌株では、2 株で MHC クラス I 陽性細胞数が有意に増加した。一方、DNA メチル化酵素阻害薬である 5AZA-AC を添加した犬乳腺癌株では、発現低下が認められた 1 株において MHC クラス I 陽性細胞数が有意に増加した。このことから、犬乳腺癌における MHC クラス I 発現抑制にはヒストン脱アセチル化や DNA メチル化が関与していることが明らかとなり、各阻害薬によって MHC クラス I 発現が回復することを明らかにした。

本研究は、犬乳腺癌における MHC クラス I 発現と予後との関係、MHC クラス I 発現抑制に対するエピジェネティクスの関与を明らかにした。これらの成績は、臨床獣医学並びに腫瘍学に大きく貢献するものと評価する。

本論文の審査および最終試験の結果と併せて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。