

称号及び氏名 博士（獣医学） 田舞 理央

学位授与の日付 平成27年3月31日

論文名 **Blood metabolites profiles of dogs with lymphoma and antitumor effect of fatty acid synthase inhibitor**

(犬リンパ腫における血液代謝物プロファイル解析と脂肪酸合成酵素阻害剤の抗腫瘍効果の検討)

論文審査委員 主査 小森 雅之
副査 久保 喜平
副査 嶋田 照雅
副査 竹中 重雄

論文要旨

諸言

近年、伴侶動物の飼育環境が向上し、獣医療が進歩したことに伴い、伴侶動物の寿命が延長している。それに伴い腫瘍疾患に罹患する動物数は増加傾向にあり、腫瘍の早期発見・早期治療が注目されている。しかし人医療に比べて獣医学領域においては早期発見に結びつく検査法は少なく、侵襲性の低い腫瘍診断法の開発が求められている。

リンパ腫は犬の悪性腫瘍中約 **20%** を占める、一般的な腫瘍である。解剖学的部位により多中心型、縦隔型、消化器型、節外型に分類され、犬では多中心型が最も一般的である。また、腫瘍細胞の表面抗原により **T** 細胞型もしくは **B** 細胞型に分類される。化学療法による寛解率は **60~90%** であり、多剤併用化学療法では約 **20~30%** の犬が診断後 **2** 年間生存する。寛解後の再燃時は再導入療法が必要となる。しかしながら、化学療法の有効性を評価する方法がリンパ節の大きさを評価する以外になく、再燃病変を早期に検出できる方法も存在しないため、新たな検査法の開発が求められている。

ゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクス等を含むオミックス解析は、生命現象を包括的に解明することを目的としている。そのうちメタボロミクスは、低分子代謝物を網羅的に分析する手法であり、その他のオミックス解析に比べて対象となる物質数が少なく、動物種特異性が少

ないため種に関係なく同様の測定方法を使用することができる。人医療においてはメタボロミクス解析による腫瘍マーカーの探索が報告されている。

本研究では、リンパ腫の再発を含めた診断手法として血液代謝物プロファイルの有用性を評価することを目的に、リンパ腫罹患犬および健常犬の血液を用いてメタボロミクス解析を行い、その代謝物プロファイルから判別分析により犬リンパ腫判別モデルの作成を試みた。また、そのリンパ腫特異性を検証するため、肥満細胞腫および悪性黒色腫罹患犬の血液代謝物プロファイルとの比較も行った。さらに、リンパ腫罹患犬の血清代謝物プロファイルから犬リンパ腫における脂肪酸合成の亢進に着目し、新たな犬リンパ腫治療薬の検討を行った。

第一章 犬リンパ腫の血清代謝物プロファイル

ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS)は生体内の糖やアミノ酸、有機酸などを測定できる。人医療においては新生児の尿を用いた先天性代謝異常症の診断支援、また使用する血液量が少なく測定が簡便なことから、健康診断時の様々な病態や腫瘍診断法の開発などに用いられている。

本章では健常犬 13 頭とリンパ腫罹患犬 21 頭の血清を GC-MS で分析し、当研究室で作成した代謝物ライブラリにより代謝物を同定した。すべてのサンプルで検出された 29 種の代謝物のうち、アミノ酸や脂肪酸を含む 16 種の代謝物で血中量に有意差がみられた。それら代謝物を用いて教師ありクラスタ分析法である **Orthogonal projection to latent structure with discriminant analysis (OPLS-DA)**法により判別分析を行った。GC-MS で検出した 29 種および 16 種の代謝物を用いて OPLS-DA 法で良好な腫瘍判別モデルが作成できた。以上の結果から、健常犬とリンパ腫罹患犬の血清代謝物プロファイルが異なっていることを明らかにした。

第二章 犬リンパ腫、肥満細胞腫、悪性黒色腫の血漿中代謝物プロファイルと腫瘍判別モデル作成の試み

第一章において犬リンパ腫の血清代謝物プロファイルが異なり、有意に変動した 16 種の代謝物を見出した。それらのリンパ腫における特異性を検証するため、健常犬 147 頭、リンパ腫罹患犬 41 頭、肥満細胞腫罹患犬 42 頭、悪性黒色腫罹患犬 53 頭の血漿を GC-MS で分析した。すべてのサンプルで検出された代謝物は 34 種あり、その代謝物プロファイルから OPLS-DA により腫瘍判別モデルを作成した。健常犬および各腫瘍罹患犬の代謝物プロファイルを比較した腫瘍判別モデルでは、健常犬を 95%以上、各腫瘍犬を 76~85%の精度で区別できた。また、その血漿代謝物量を比較したところ、各群のいずれかに有意差が認められた代謝物が 23 種あった。このうち健常犬とリンパ腫罹患犬間で、第一章で示した代謝物と 6 種が一致した。また、3 種すべての腫瘍罹患犬の代謝物プロファイルを用いて健常犬と各腫瘍群を区別する判別モデルを作成したが、各腫瘍を区別することはできなかった。

これらの結果より、腫瘍を発症することで血中代謝物プロファイルが変化することから、腫瘍疾患を血液代謝物プロファイルから検出できる可能性が示された。しかし、各腫瘍間での代謝物

プロファイルの変化はそれぞれの腫瘍間で明確ではないため、血中代謝物プロファイルのみで腫瘍の種類を診断することは難しいことが示唆された。

第三章 脂肪酸合成酵素阻害による犬 T リンパ腫細胞株の細胞致死効果

第一章及び第二章の結果から、リンパ腫罹患犬の血液中で 4 種の脂肪酸(**Linoleic acid**、**Palmitic acid**、**Palmitoleic acid**、**Oleic acid**)が健常犬に比べ有意に増加していたことが示された。脂肪酸は食事により摂取するか、マロニル **CoA** とアセチル **CoA** から脂肪酸合成酵素(**FASN**)が合成するパルミチン酸に由来する。哺乳類の **FASN** は 2 つの多機能ポリペプチドからなり、それぞれが 7 つのドメインで構成されている。脂質合成が必要な肝臓・乳腺・子宮内膜などの組織以外では発現や活性は低い。腫瘍細胞においては脂肪酸の新規合成が盛んであり、人においてはいくつかの腫瘍で **FASN** の発現や活性が高いことが知られており、その予後と相関するとされている。本章では、犬のリンパ腫において脂肪酸が重要な役割を果たしていると考え、犬 T リンパ腫細胞株における脂肪酸の働きについての検討を行った。**FASN** 阻害剤として、**FASN** から最終産物であるパルミチン酸を放出するチオエステラーゼ部位を阻害する **Orlistat** を用いた。

犬 T リンパ腫細胞株(**CLC**、**CLK**、**Em**)における **FASN** 遺伝子の発現を **RT-PCR** により確認したところ、3 種ともに **FASN** の発現が認められた。対して、健常犬から分離した末梢血単核球(**PBMC**)ではその発現が認められなかった。また、**Orlistat** を培地中に添加し、48 時間後の細胞生存率を検討した結果、**CLK**、**Em** では高い細胞致死効果が認められたが、**CLC** は抵抗性を示した。またアポトーシスのマーカーとして **Caspase-3** をウェスタンブロットにより検出した結果、**CLC**、**CLK**、**Em** では **Orlistat** 処理により **Caspase-3** の発現が認められたが、**PBMC** では認められなかった

以上の結果から、犬 T リンパ腫細胞株の生存に **FASN** は重要な役割を果たしており、それを阻害することによって T リンパ腫細胞のアポトーシスを導くことができた。従って、犬リンパ腫において **FASN** は抗腫瘍剤開発のターゲットになる可能性が示唆された。また、**Orlistat** の臨床応用が期待される。

総括

1. 健常犬とリンパ腫罹患犬の血清代謝物プロファイルが異なることが見出された。
2. 健常犬と肥満細胞腫、悪性黒色腫、リンパ腫罹患犬の血漿中代謝物プロファイルは異なるが、各腫瘍罹患犬を統計学的手法で分離できなかった。
3. **FASN** は T リンパ腫細胞株の生存に重要な役割を果たしており、**Orlistat** を含む **FASN** 抑制剤が T リンパ腫の治療に有用であることが示唆された。

審査結果の要旨

リンパ腫は犬の悪性腫瘍中約 20%を占める、一般的な腫瘍である。解剖学的部位により多中心型、縦隔型、消化器型、節外型に分類され、犬では多中心型が最も一般的である。また、腫瘍細胞の表面抗原により T 細胞型もしくは B 細胞型に分類される。化学療法による寛解率は 60~90%であり、多剤併用化学療法では約 20~30%の犬が診断後 2 年間生存する。寛解後の再燃時は再導入療法が必要となる。しかしながら、化学療法の有効性を評価する方法がリンパ節の大きさを評価する以外になく、再燃病変を早期に検出できる方法も存在しないため、新たな検査法の開発が求められている。

ゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクス等を含むオミックス解析は、生命現象を包括的に解明することを目的としている。そのうちメタボロミクスは、低分子代謝物を網羅的に分析する手法であり、その他のオミックス解析に比べて対象となる物質数が少なく、動物種特異性が少ないため種に関係なく同様の測定方法を使用することができる。人医療においてはメタボロミクス解析による腫瘍マーカーの探索が報告されている。

そこで、本研究では、リンパ腫の再発を含めた診断手法として血液代謝物プロファイルの有用性を評価することを目的に、リンパ腫罹患犬および健常犬の血液を用いてメタボロミクス解析を行い、その代謝物プロファイルから判別分析により犬リンパ腫判別モデルの作成を試みた。また、そのリンパ腫特異性を検証するため、肥満細胞腫および悪性黒色腫罹患犬の血液代謝物プロファイルとの比較も行った。さらに、リンパ腫罹患犬の血清代謝物プロファイルから犬リンパ腫における脂肪酸合成の亢進に着目し、新たな犬リンパ腫治療薬の検討を行った。

第 1 章では、健常犬 13 頭とリンパ腫罹患犬 21 頭の血清をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS)で分析し、当研究室で作成した代謝物ライブラリにより代謝物を同定した。すべてのサンプルで検出された 29 種の代謝物のうち、アミノ酸や脂肪酸を含む 16 種の代謝物で血中量に有意差がみられた。それら代謝物を用いて教師ありクラスタ分析法である **Orthogonal projection to latent structure with discriminant analysis (OPLS-DA)**法により判別分析を行った。GC-MS で検出した 29 種および 16 種の代謝物を用いて OPLS-DA 法で良好な腫瘍判別モデルが作成できた。以上の結果から、健常犬とリンパ腫罹患犬の血清代謝物プロファイルが異なっていることを明らかにした。

第 2 章では、犬リンパ腫の血清代謝物プロファイルの特異性を検証するため、健常犬 147 頭、リンパ腫罹患犬 41 頭、肥満細胞腫罹患犬 42 頭、悪性黒色腫罹患犬 53 頭の血漿を GC-MS で分析した。すべてのサンプルで検出された代謝物は 34 種あり、その代謝物プロファイルから OPLS-DA により腫瘍判別モデルを作成した。健常犬および各腫瘍罹患犬の代謝物プロファイルと比較した腫瘍判別モデルでは、健常犬を 95%以上、各腫瘍犬を 76~85%の精度で区別できた。また、その血漿代謝物量を比較したところ、各群のいずれかに有意差が認められた代謝物が 23 種あった。これらの結果

より、腫瘍を発症することで血中代謝物プロファイルが変化することから、腫瘍疾患を血液代謝物プロファイルから検出できる可能性が示された。しかし、各腫瘍間、もしくはリンパ腫の細胞型間での代謝物プロファイルの変化は明確ではないため、血中代謝物プロファイルのみで腫瘍の種類を診断することは難しいことが示唆された。

第3章では、犬のリンパ腫において脂肪酸が重要な役割を果たしていると考え、犬 T リンパ腫細胞株における脂肪酸の働きについての検討を行った。脂肪酸合成酵素 (FASN) 阻害剤として、FASN から最終産物であるパルミチン酸を放出するチオエステラーゼ部位を阻害する Orlistat を用いた。また、犬 T リンパ腫細胞株の細胞内・細胞外代謝物の分析を行い、リンパ腫細胞が血液代謝物に与える影響について検討した。その結果、犬 T リンパ腫細胞株の生存に FASN は重要な役割を果たしており、それを阻害することによって T リンパ腫細胞のアポトーシスを導くことができた。従って、犬リンパ腫において FASN は抗腫瘍剤開発のターゲットになる可能性が示唆された。

以上のように本研究は、健常犬とリンパ腫罹患犬の血清代謝物プロファイルが異なることを見出した。また、健常犬と肥満細胞腫、悪性黒色腫、リンパ腫罹患犬の血漿中代謝物プロファイルは異なるが、各腫瘍罹患犬を統計学的手法で分離できなかった。さらに、FASN は T リンパ腫細胞株の生存に重要な役割を果たしており、Orlistat を含む FASN 抑制剤が T リンパ腫の治療に有用であることが示唆された。これらの成果は、獣医学の発展に貢献するものであり、本論文の審査ならびに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。