



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	犬組織球性肉腫関連遺伝子の発現動態解析を基盤とした遺伝子診断・治療法の開発に関する基礎的検討
Author(s)	山崎, 裕毅
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第11158号
Issue Date	2013-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11158
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/54706
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroki_Yamazaki.pdf



犬組織球性肉腫関連遺伝子の発現動態解析を基盤とした
遺伝子診断・治療法の開発に関する基礎的検討

山崎 裕毅

略語一覧表

AUC:	Area Under The Curve, ROC 曲線下面積
ABCB1:	ATP-binding cassette transporter B1
ABCC2:	ATP-binding cassette transporter C2
BSA:	Bovine Serum Albumin, ウシ血清アルブミン
CCNU:	ロムスチン
CD:	Cluster of Differentiation
cDNA:	complementary Deoxyribonucleic Acid
CHS:	Canine Histiocytic Sarcoma, 犬組織球性肉腫
CI:	Confidence Intervals, 信頼区間
DAB:	3,3'-Diaminobenzidine,tetrahydrochloride, ジアミノベンチジン
DC:	Dendritic Cell, 樹状細胞
DEPC:	Diethyl Pyrocarbonate, ジエチルピロカーボネート
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's medium , ダルベッコ変法イーグル培地
DMSO:	Dimethyl Sulfoxide, ジメチルスルホキシド
DOX:	Doxorubicin, ドキソルビシン
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic Acid, エチレンジアミン四酢酸
FBS:	Fetal Bovine Serum, 牛胎児血清
FITC:	Fluorescein Isothiocyanate, フルオレセインイソチオシアネート
GAPDH:	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素
HPRT:	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
IAP:	Inhibitor of Apoptosis Protein, アポトーシス抑制因子
IgG:	Immunoglobulin G, 免疫グロブリン G
MGMT:	O6-methylguanine-DNA methyltransferase、
MHC:	Major Histocompatibility Complex, 主要組織適合複合体
M-MLV:	Moloney Murine Leukemia Virus, モロニーマウス白血病ウイルス
MTT:	Methylthiazole Tetrazolium, メチルチアゾールテトラゾリウム
mRNA:	messenger Ribonucleic Acid
PBS:	Phosphate-buffered Saline, リン酸緩衝生理食塩水
ROC:	Receiver Operating Characteristic, 受信者動作特性
RT-PCR:	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SDS:	Sodium Dodecyl Sulfate , ドデシル硫酸ナトリウム
siRNA:	small interfering RNA, 低分子干渉 RNA
TBS:	Tris-Buffered Saline, トリス緩衝生理食塩水

目 次

緒言	1
第 1 章 犬組織球性肉腫（CHS）の表面抗原解析による遺伝子診断法	3
1. 序論	3
2. 材料および方法	5
(1) 供試検体と処理法	5
(2) 表面抗原遺伝子発現量の比較解析法	5
(3) 統計解析	7
3. 結果	9
(1) 症例	9
(2) CHS における表面抗原遺伝子発現量	9
4. 考察	18
5. 小括	21
第 2 章 CHS の分子標的療法に関する基礎的検討	22
1. 序論	22
2. 材料および方法	24
2-1. CHS 症例と Survivin 遺伝子発現量との関連	24
(1) アポトーシス抑制因子（IAP）の遺伝子発現量解析法	24
(2) Survivin 遺伝子発現量と治療経過および予後との比較解析法	24
2-2. CHS 細胞株の Survivin 発現抑制による生物学的機能の変動評価	25
(1) 細胞株と培養法	25
(2) Survivin 発現阻害剤	25
(3) Survivin 発現量の解析法	26
(4) アポトーシスの検出法	27
(5) 細胞生存率の評価法	28
(6) 抗癌剤耐性の評価法	29

(7) 食食機能の評価法	29
2-3. CHS 細胞移植マウスにおける Survivin 発現阻害剤の抗腫瘍効果	30
(1) 抗癌剤耐性 CHS 細胞移植マウスの作製法	30
(2) 腫瘍増殖抑制効果の評価法	31
(3) Survivin 発現量の評価法	31
(4) 抗癌剤耐性関連遺伝子発現量の評価法	32
2-4. 統計解析	33
3. 結果	37
3-1. CHS 症例と Survivin 遺伝子発現量との関連性	37
(1) Survivin 遺伝子とその他の IAP 遺伝子発現量との比較	37
(2) Survivin 遺伝子発現量と治療経過および予後との相関性	37
3-2. CHS 細胞株の Survivin 発現抑制による生物学的機能への影響	38
(1) Survivin 発現量	38
(2) アポトーシスの検出	38
(3) 細胞生存率の影響	39
(4) 抗癌剤耐性の影響	39
(5) 食食機能の影響	40
3-3. CHS 細胞移植マウスの YM155 による抗腫瘍効果	40
(1) Survivin 発現抑制と腫瘍増殖抑制効果	40
(2) 抗癌剤耐性関連遺伝子発現量の影響	43
4. 考察	61
5. 小括	65
6. 総括	66
引用文献	68
謝辞	78
英文抄録	79

緒 言

犬組織球性肉腫（canine histiocytic sarcoma: CHS）は、樹状細胞（dendritic cell: DC）またはマクロファージなどの組織球系細胞を由来とする悪性腫瘍である（Affolter と Moore, 2002）。CHS は未分化な形態を有し、さらに、炎症細胞が混在している場合も多い。そのため、従来の病理組織学的評価のみでは、確実な診断結果が得られない（Moore ら, 1986 ; Fulmer と Mauldin, 2007 ; Ide ら, 2011）。CHS は生物学的・臨床学的挙動が悪く、遠隔転移率や局所浸潤性も高い（Fidel ら, 2006; Klahn ら, 2011）。また、CHS にある程度有効とされているニトロソウレア系抗癌剤であるロムスチン（lomustine: CCNU）や抗腫瘍性を有するアントラサイクリン系の抗生物質であるドキソルビシン（doxorubicin: DOX）を使用しても、比較的早期に抗癌剤耐性を獲得するため、予後は極めて悪い（Commer ら, 2008 ; Rassnick ら, 2010 ; Klahn ら, 2011）。従って、CHS に対する有効な治療法に加え、迅速な診断技術が要求されている。

近年、医学領域における基礎および臨床研究では多くの腫瘍関連遺伝子が発見され、これらの発現レベルや機能の比較解析により、腫瘍特有の病態メカニズムが明らかになってきた（Bernard と Wittwer, 2002 ; Kidd ら, 2007）。さらに、腫瘍疾患に対する新たな試みとして、これらの腫瘍関連遺伝子を標識とした診断法やこれらの遺伝子を標的とした治療法が確立されたことにより、治療成績が大幅に改善された（Bernard と Wittwer, 2002 ; Kidd ら, 2007）。遺伝子解析は客観的な診断指標を早期に検出し、再現性や診断精度も高いため、従来の病理検査の欠点を補う補助的診断評価として有用性が高い（Bernard と Wittwer, 2002 ; Yagihara ら, 2007）。また、特定遺伝子を標的とした分子標的療法は、副作用が少なく、腫瘍細胞特異的に増殖抑制効果を発現するため、従来の抗癌剤治療に代わる新規治療法として大きく期待されている（Bury ら, 2008 ; LaCasse ら, 2008）。

CHS においても、特異的発現因子を遺伝子レベルで検出し、早期に的確な診断をつけることで、抗癌治療の迅速な開始が可能となり、治療反応期間や生存期間の長期化が期待できる。同様に、CHS の生物学的挙動および抗癌剤抵抗性における関連遺伝子を模索し、これらの発現抑制と病態進行の抑制機構との関連性を明らかにすることで治療への応用が可能である。

CHS の治療成績を向上させるために、CHS に特異的とされる腫瘍関連遺伝子を検索し、これらを標識とした診断法ならびに、標的とした治療法を開発することを本研究の目的とした。そこで、第 1 章では CHS の表面抗原解析による迅速的遺伝子診断法の開発を検討し、第 2 章では CHS の悪性挙動に関連した遺伝子である Survivin を標的とした治療法の基礎的研究を行い、有用性の評価ならびに、臨床的意義をそれぞれ検討した。

第 1 章 犬組織球性肉腫（CHS）の表面抗原解析による遺伝子診断法

1. 序 論

一部の単核球や炎症細胞の表面抗原として知られている cluster of differentiation（CD）11b、CD11c、CD11d、CD18 および major histocompatibility complex（MHC）クラスⅡが、CHS にも高発現していることが報告された（Affolter と Moore, 2002 ; Moore ら, 2006）。近年、一部の研究者によってこれらの犬モノクローナル抗体が樹立され、それらを用いた高精度な免疫染色法が行われるようになった（Affolter と Moore, 2002 ; Moore ら, 2006）。しかし、この検査は非常に限られた施設でのみ行なわれているため、その適用適用範囲は非常に限られる。また、免疫組織化学染色法はある程度の技術や凍結切片作製のための特殊設備が求められ、さらに、十分量の検体の必要性や客観性に欠けた診断指標など、いくつかの制約が課せられる。一方、定量的 real-time reverse transcription-polymerase chain reaction（RT-PCR）は微量検体からでも目的とする発現遺伝子の定量解析が可能であるため、さまざまな腫瘍関連遺伝子の検出法として、その診断技術に応用されている（Bernard と Wittwer, 2002 ; Yagihara ら, 2007）。さらに、real-time RT-PCR による解析法は客観性や再現性が高く、比較的簡便な操作で迅速に結果が得られるため、従来の病理組織学的欠点を補う高精度な診断法として大きく期待できる。本研究では CHS 細胞に高発現する表面抗原の中から、MHC クラスⅡ、CD11b、CD11c および CD86 を選出し、遺伝子レベルでこれらの表面抗原発現量の定量解析を試みた。その他の類似疾患と比較し、CHS ではこれらの表面抗原が高発現しているため、定量解析することで、迅速かつ客観的に本腫瘍を検出できると予想された。

本章では、臨床例における CHS 群および非 CHS 群を対象に、real-time

RT-PCR を用いて、前述した 4 種類の表面抗原の（mRNA）発現量を比較解析し、CHS 診断精度を評価ならびに、その有用性について検討した。

2. 材料および方法

(1) 供試検体と処理法

2009 年 10 月から 2012 年 9 月までに北海道大学大学院獣医学研究科附属動物病院に来院し、CHS と確定診断された犬 30 例と CHS 以外の疾患を有する犬 36 例（悪性腫瘍 30 例および非腫瘍性炎症性疾患 6 例）を対象とした。各症例の病変部から切除生検または、針生検のいずれかで検体を採取し、病理組織学的検査ならびに、**real-time RT-PCR** を用いた表面抗原の遺伝子解析にそれぞれ供した。本研究では確定診断のために、特定の病理専門医に検査を依頼した。各検査施設において、パラフィン切片標本による従来の組織学的評価に加え、必要に応じて免疫染色を実施した。初回検査で診断が確定できなかった場合は、改めて後日に検体を採材し、再検査を実施した。生前に診断が確定できなかった症例は、飼い主の同意を得て病理解剖を行った。

(2) 表面抗原遺伝子発現量の比較解析法

表面抗原遺伝子解析における RNA 抽出のために、採材後、すぐに検体を 2~3 mm 角に細切し、1 ml の RNA 抽出用試薬（**Trizol®**, **Invitrogen Life Technologies**, **Carlsbad, CA, USA**）を加えて、抽出処理を行った。採材から mRNA 抽出処理までに時間を要する場合は、RNA 保存液（**RNAlater®**, **Ambion**, **Grand Island, NY, USA**）を用い、 -80°C で一時的に冷凍保存した。RNA 抽出用試薬による処理後、0.3 ml のクロロホルム（和光純薬、大阪）を混合した後、 $13,200\times g$ 、 4°C で 15 分間遠心し、水層を回収した。これに 0.6 ml のイソプロパノール（和光純薬）を混和して 10 分間室温に放置し、 $13,200\times g$ 、 4°C で 10 分間遠心して上清を除去した。0.1%二炭酸ジエチル水溶液（**diethyl pyrocarbonate [DEPC]**水；ナカライテスク、京都）と 99%エタノールを 3：7 で混合した溶液を用いて沈渣を洗浄し、上清を除去した。さらにこの沈渣を風乾した後、少量の 0.1%DEPC 水で溶

解した。RNA 抽出後、DNA 分解酵素（Recombinant DNase I：タカラ、滋賀）を製造元の説明書に従って用い、ゲノミック DNA の処理が実施された。処理後、アガロースゲル電気泳動法により変性ゲル上を泳動した 2 つの RNA バンド（28S rRNA 及び 18S rRNA）が 2:1 の比であることを確認し、RNA サンプルの完全性を評価した。さらに、抽出 RNA サンプルを 10~100 倍に希釈し、波長 260 nm の吸光度を分光光度計（WPA biowave DNA spectrophotometer; Biochro Ltd., Cambridge, UK）を用いて測定した。測定値から近似式 [RNA 濃度 (ng/ml) $\div$ 吸光度 $\times$ 40 $\times$ 希釈率]（Gallagher, 1992）を用いて RNA 濃度が 1.8~2.0 の範囲内であることを確認し、RNA サンプルの純度を評価した。次に、マウスレトロウイルス由来逆転写酵素（Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase [M-MLV RT]; Invitrogen Life Technologies）を用いて、抽出した RNA をオリゴ dT プライマーと M-MLV RT を用いてサーマルサイクラー（Life Pro Thermal Cycler BIOER TECHNOLOGY CO., Hangzhou, China）により 37℃、60 分間で逆転写を行い、cDNA を合成した。この cDNA を用いて、MHC クラス II、CD11c、CD11b、CD86 および内部標準である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA 発現量を測定した。これらに用いた各プライマーは GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) に示された遺伝子配列から、Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) を用いて設計した（表 1-1）。合成した cDNA に、それぞれのセンスおよびアンチセンスプライマーと抽出用 *Taq* ポリメラーゼ（TaKaRa Ex Taq; タカラバイオ、滋賀）を加え、real-time PCR を行った。Real-time RT-PCR は Rotor-Gene Q（Qiagen, Hilden, Germany）を用い、その試薬として KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix（KAPA Biosystems, Boston, MA, USA）を製造元が推奨する濃度で使用した。PCR 反応は、95℃で 20 秒間加温後、95℃で 3 秒間および 60℃で 20 秒間を 40 サイクル繰り返して、反応させた。検量線用サンプル作成の

ために、ひとつの CHS 細胞株 (CHS-4; 第 2 章で記述) から抽出した cDNA を使用し、前述した各標的プライマーを用いて実施した。得られた PCR 産物を 10^{-2} から 10^{-10} 倍に 10 倍階段希釈し、遺伝子濃度のサンプルを作成した。これらのサンプルを用いて、real-time RT-PCR を行い、検量線作成のために最適な希釈倍率を決定し、各表面抗原の発現量をそれぞれ定量解析した。すべての検体の mRNA 発現量は、各 CHS の原発巣と同部位の犬正常組織における各表面抗原遺伝子発現量で補正した (Kidd ら, 2007 ; Bala ら, 2009 ; Fu ら, 2009)。また、PCR 増幅産物の特異性を確認するために、融解曲線分析を行なった。さらに、増幅産物をゲルより切り出して細切し、Quantum Prep Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Column (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて抽出した後、シングルエクステンションによるシーケンス解析を実施した [北海道システムサイエンス (株)]。

(3) 統計解析

統計処理ソフト SPSS, version12.0.1 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA) を用いたマン・ホイットニーの U 検定を実施し、危険率 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。受信者動作特性 (receiver operating characteristic; ROC) 曲線を用いて、95%信頼区間 (confidence intervals; CI) における ROC 曲線下面積 (area under the curve; AUC)、感度および特異度が算出され、CHS を判別するためのカットオフ値を計測した (Ruthanne ら, 2007)。

表 1 -1 各表面抗原の標的プライマー

遺伝子名	増幅産物 (bp)	遺伝子 部位		シーケンス配列
GAPDH	102	258-278	Forward	5'-TGTCCCCACCCCAATGTATC-3'
		362-385	Reverse	3'-CTCCGATGCCTGCTTCACTACCTT-5'
MHC クラス II	98	356-373	Forward	5'-TGGCGGCTGCCTGTGTTT-3'
		582-606	Reverse	3'-ACAGTCACCTCAGGAACCTCATTGG-5'
CD11b	120	268-289	Forward	5'-GAGTCTGACGATTCCACTAATG-3'
		462-480	Reverse	3'-GTTTATGCTGCAGCTGCTA-5'
CD11c	182	342-364	Forward	5'-GTGCTGGATTTGGACACAGCGTG-3'
		550-571	Reverse	3'-AAGGGGACCTGCAGTTGGATGG-5'
CD86	220	7-31	Forward	5'-ATGTATCTCAGATGCACTATGGAAC-3'
		203-227	Reverse	3'-TTCTCTTTGCCTCTGTATAGCTCGT-5'

3. 結 果

(1) 症例

CHS を発症した犬 30 例および CHS 以外の犬 36 例（悪性腫瘍 30 例および炎症性疾患 6 例）における情報（品種、性別、年齢、病変部位および病理診断名）を表 1-2 に示した。CHS の 30 例中 8 例（27%）は未分化であったことや多くの炎症細胞の混在により、初回の病理検査では確定できなかった（図 1-1 B および C）。これらの 8 例中 5 例で病理解剖を実施したところ、5 例はすべて肺原発性 CHS であり、初回の病理診断はいずれも由来不特定の未分化肉腫と判定された。

(2) CHS における表面抗原遺伝子発現量

CHS の 30 症例およびその他の悪性腫瘍 30 症例と非腫瘍性炎症性疾患 6 例を含む非 CHS の 36 症例の各表面抗原 mRNA 発現量の解析結果を図 1-2 に示した。MHC クラス II mRNA 発現量の解析結果において、CHS 症例の発現量はその他の悪性腫瘍および炎症性疾患と比較して、いずれも有意に高値を示した（それぞれ、 $p < 0.01$ ）。また、CHS の 30 症例における採材方法は細針生検が 18 例、コアニードル（太針）生検が 8 例、切除生検が 4 例であったが、採材別による検体の各表面抗原発現量に有意差はみられなかった。CD11b および CD11c における mRNA 発現量の解析結果においても、CHS 症例はその他の悪性腫瘍および炎症性疾患と比較して、有意（CD11b それぞれ、 $p < 0.01$ ；CD11c それぞれ、 $p < 0.01$ ）に高値を示した。CD86 の mRNA 発現量においても、CHS 症例はその他の悪性腫瘍および炎症性疾患と比較して、有意（それぞれ、 $p < 0.01$ ）な差が認められた。なお、real-time PCR における融解曲線分析および増幅産物のシーケンス解析の結果、すべての PCR 増幅産物は目的とする遺伝子であることが確認された。

両群から CHS を識別するために、解析ソフトによる ROC 曲線から AUC

を算出し、MHC クラスⅡ発現量のカットオフ値を 118 と設定したところ、その診断精度は感度 88% (95% CI, 70~92%)、特異度 89% (95% CI, 74~96%)、正診率 89%であった (表 1-3)。CD11b および CD11c におけるカットオフ値をそれぞれ、89 および 110 と設定したところ、その診断精度は CD11b で感度 87%(95% CI, 68~92%)、特異度 86%(95% CI, 66~91%)、正診率 86%であり、CD11c では感度 83% (95% CI, 66~91%)、特異度 89% (95% CI, 72~94%)、正診率 86%を示した (表 1-3)。CD86 において、カットオフ値を 98 と設定したとき、感度 83% (95% CI, 65~90%)、特異度 86% (95% CI, 67~92%)、正診率 85%を示した (表 1-3)。

MHC クラスⅡの解析において、非 CHS 群のうちリンパ腫 (3 例) と滑膜炎 (1 例) が比較的、高値を示した。CHS30 例中 18 例に対し、MHC クラスⅡ抗体を用いた免疫染色が実施され、そのうち 15 例 (83%) で陽性を示した。これら陽性を示した 15 例の MHC クラスⅡの mRNA 発現量の中央値は 246 (範囲 106~398) であり、陰性であった 3 例の中央値 112 (範囲 : 88~152) より有意 ($p < 0.05$) に高かった。CD11b の解析では、非 CHS 群のうちリンパ腫 (2 例)、多発性骨髄腫 (1 例) および炎症性肉芽腫 (2 例) の CD11b 発現量が高く、CD11c においてはリンパ腫 (4 例) が比較的、高かった。CD86 では非 CHS 群のうち多発性骨髄腫 (2 例)、形質細胞腫 (1 例) とリンパ腫 (2 例) の発現量が最も高かった。病理解剖を実施した CHS 5 例はいずれも未分化形態が強く、これらの CD86 発現量は (中央値 282、範囲 198~346) は、その他の CHS 25 例の発現量 (中央値 178、範囲 48~288) よりも有意 ($p < 0.05$) に高かった。

CHS の 30 例中 3 例は脾臓原発であり、重度の非免疫介在性再生性貧血 (血中血球容積の中央値 16%、範囲 12~18%、溶血性・出血性貧血は除外、球状赤血球はなく、大多数が多染性網状赤血球、3 例中 2 例でクームステスト陰性)、低アルブミン血症および CHS 細胞の著しい赤血球貪食組織像が確認された (表 1-4)。さらに、3 例中 2 例で血小板減少症がみられ、い

ずれも CCNU を用いた化学療法が奏功せず、初診から 1 か月以内に死亡した（表 1-4）。本法の解析結果では、これらの 3 例の CD11b mRNA 発現量（中央値 302、範囲 248~316）は他の CHS27 例（中央値 172、範囲 76~274）と比較して、有意に高かった（ $p < 0.05$ ）（図 1-2）。

表 1-2 症例の各情報

A) CHS の 30 例

No	品種※ ¹	年齢	性※ ²	病変部位
1	BMD	8	F-S	関節
2	BMD	12	F-S	関節
3	FCR	12	M-C	肺
4	WC	10	M-C	肺
5	GR	9	F-S	関節
6	FCR	14	F-S	関節
7	WC	11	M-I	肺
8	FCR	10	F-I	脾臓
9	WC	13	M-C	肺
10	BMD	10	F-S	脾臓
11	FCR	9	M-I	関節
12	WC	7	F-S	肺
13	BMD	10	M-C	眼球
14	WC	9	F-S	肺
15	WC	13	M-C	肺
16	BMD	14	M-C	皮膚
17	GR	12	F-S	関節
18	WC	10	M-C	肺
19	FCR	9	M-I	肝臓
20	FB	12	F-S	関節
21	BMD	13	M-I	脾臓
22	WC	8	F-S	肺
23	Mix	11	M-C	関節
24	BMD	10	F-S	肝臓
25	BMD	11	F-S	肺
26	FCR	9	M-C	骨盤
27	FCR	11	F-S	関節
28	BMD	12	F-I	関節
29	BMD	11	F-S	関節
30	FCR	10	M-C	関節

B) CHS 以外の悪性腫瘍 30 例

No	品種※ ¹	年齢	性※ ²	病変部位	病理組織学的診断
31	BMD	8	F-S	多中心型	B 細胞性リンパ腫
32	GR	12	F-S	多中心型	B 細胞性リンパ腫
33	WC	12	F-S	消化管型	T 細胞性リンパ腫
34	MD	14	M-C	皮膚型	T 細胞性リンパ腫
35	GR	10	M-C	骨	骨肉腫
36	FCR	8	F-S	皮膚	肥満細胞腫
37	LR	12	F-I	肝臓	肝細胞癌
38	FCR	10	M-I	脾臓	形質細胞腫
39	WC	8	F-S	肺	肺腺癌
40	BMD	9	M-I	骨	多発性骨髄腫
41	FCR	9	F-S	関節	線維肉腫
42	MS	14	F-S	皮膚	形質細胞腫
43	SS	15	M-C	膀胱	移行上皮癌
44	WC	10	F-S	骨	多発性骨髄腫
45	RW	12	M-C	肺	骨肉腫
46	Mix	14	F-S	皮膚	扁平上皮癌
47	GR	10	M-C	脾臓	血管肉腫
48	LR	12	F-S	口腔内	悪性黒色腫
49	MS	9	M-I	消化管	大腸腺癌
50	RW	11	F-I	関節	線維肉腫
51	BMD	12	M-C	肝臓	悪性線維性組織球腫
52	WC	13	M-C	消化管	消化管間質腫瘍
53	Mix	12	F-S	肝臓	肝細胞癌
54	SS	16	F-S	膀胱	移行上皮癌
55	MS	11	M-C	口腔内	悪性黒色腫
56	GR	12	F-S	鼻腔内	鼻腔腺癌
57	FCR	10	F-I	肺	扁平上皮癌
58	LR	11	F-S	消化管	消化管間質腫瘍
59	BMD	12	M-C	脾臓	血管肉腫
60	Mix	5	M-C	肝臓	肥満細胞腫

次頁に続く

(前頁の続き)

C) 非腫瘍性炎症性疾患の犬 6 例

No	品種※ ¹	年齢	性※ ²	病変部位	病理組織学的診断
61	BMD	2	F-S	皮膚	フレグモーネ
62	BMD	12	F-S	関節	炎症性肉芽腫
63	WC	4	M-I	皮膚	炎症性肉芽腫
64	FCR	10	F-S	関節	滑膜炎
65	FCR	8	F-S	肝臓	肝炎
66	WC	6	M-C	関節	滑膜炎

※1. BMD : バーニーズマウンテンドッグ、FB : フレンチブル
 ドッグ、FCR : フラットコーテッドレトリバー、GR : ゴー
 ルデンレトリバー、LR : ラブラドルレトリバー、MD :
 ミニチュアダックスフント、Mix : 雑種、MS : ミニチュアシ
 ュナウザー、RW : ロットワイラー、SS : シェットランドシー
 プドッグ、WC : ウエルシュコーギー・ペンブローク

※2. F : 雌、M : 雄、S : 避妊、C : 去勢、I : 未避妊/未去勢

表 1-3 CHS の診断精度

表面抗原	AUC※	感度(%)	特異度(%)	正診率(%)
MHC クラス II	0.90	86.7	88.9	87.9
CD11b	0.87	86.7	86.1	86.4
CD11c	0.88	83.3	88.9	86.4
CD86	0.85	83.3	86.1	84.8

※ AUC:ROC 曲線下面積

表 1-4 赤血球貪食性 CHS が疑われた 3 例の臨床情報

症例 No	PCV (%) ※ ¹ (赤血球/ μ l)	血液検査※ ²	クームステスト	治療内容	生存期間 (日)※ ³
8	16 (188×10^4)	Alb:2.0 g/dl Plat: 5×10^4 / μ l	データなし	輸血 プレドニゾロン	24
10	12 (152×10^4)	BUN:78 mg/dl Cre:2.8 mg/dl Alb:1.8 g/dl TBil:4.2 mg/dl Plat: 4.5×10^4 / μ l	陰性	無治療	10
21	18 (208×10^4)	Alb:1.8 g/dl ALP:686 U/l T-cho:82 mg/dl	陰性	ロムスチン	18

※1：PCV：血中血球容積

※2：初回のスクリーニング血液検査における異常値

Alb；アルブミン，ALP；アルカリフォスファターゼ，BUN；血中尿素窒素，
Cre；クレアチニン，Plat；血小板，T-cho；総コレステロール

※3：初診日から死亡日までの期間

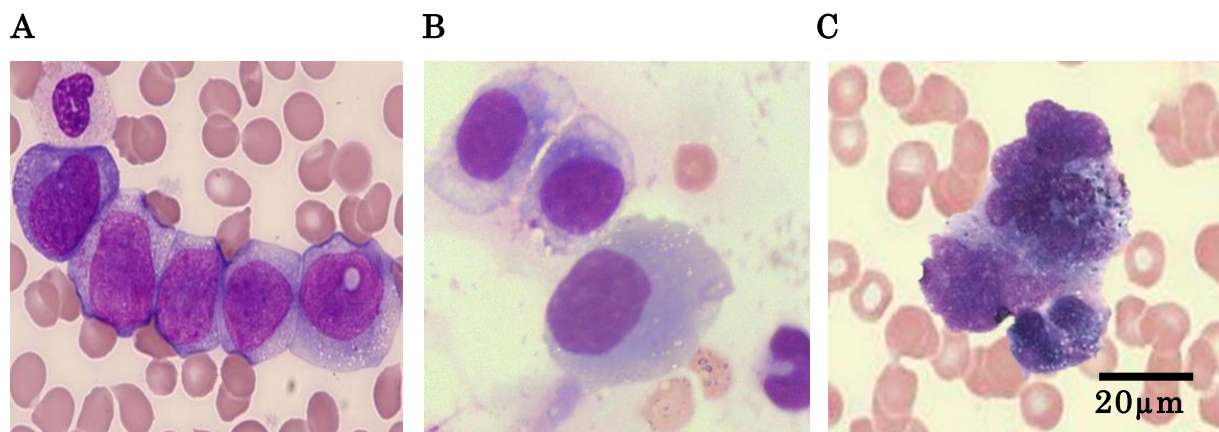


図 1-1 犬組織球性肉腫（CHS）と CHS の類似疾患における細胞学的形態

A. 関節を原発とする従来型の CHS、B. 初回の病理検査で炎症性肉芽腫と判定された CHS、C. 肺を原発とした未分化型の CHS

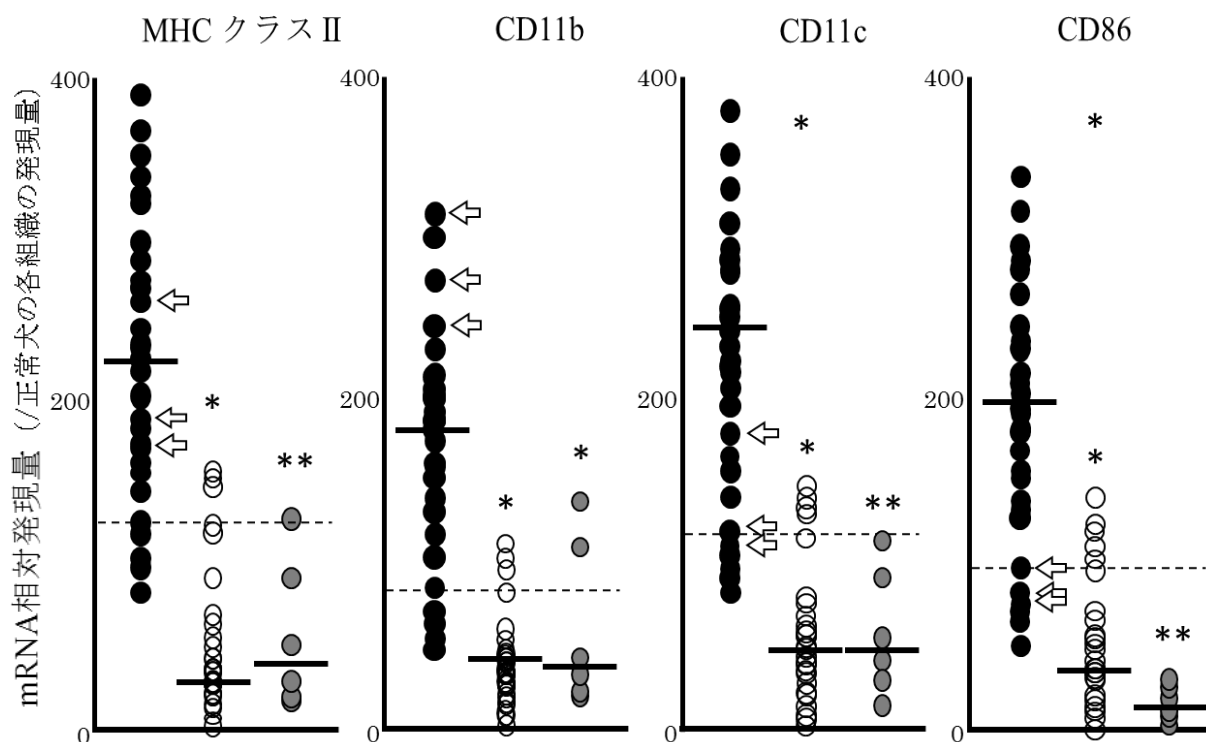


図 1-2 CHS と CHS 以外の疾患における表面抗原遺伝子発現量の比較解析

CHS の 30 例、その他の悪性腫瘍 30 例および炎症性疾患 6 例から採材した検体における MHC クラス II、CD11b、CD11c および CD86 を含む各表面抗原の mRNA 発現量を定量的 real-time RT-PCR で比較解析した。すべての遺伝子発現量は CHS の病変部に対応する各正常犬組織の同じ遺伝子発現量によって補正した。各表面抗原の中央値を — で示した。CHS の 30 例を対象とした他の疾患との有意差をマン・ホイットニーの U 検定で算出した ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$)。受信者動作特性曲線 (ROC) から 95%信頼区間における ROC 曲線下面積、感度および特異度が算出され、CHS を判別するためのカットオフ値を計測した (.....)。また、図中の●は犬組織球性肉腫 30 例を、○はその他の悪性腫瘍 30 例を、●は非腫瘍性炎症性疾患 6 例をそれぞれ示し、さらに、◁は赤血球貪食型 CHS を疑った 3 例を示した。

4. 考 察

本研究では CHS の 30 例中 8 例 (27%) で病変部における炎症細胞および壊死組織の混在や未分化形態のため、初回の病理組織学的検査では確定できなかった。CHS の多くは未分化形態で炎症および壊死組織が混在し、その組織学的形態が不特定であるため、従来の組織学的評価のみでは診断が難しい (Moore ら, 1986 ; Fulmer ら, 2007 ; Ide ら, 2011)。その裏付けのひとつとして、過去に犬滑膜腫瘍と病理診断された検体に対し、CD18 を用いた免疫染色で再評価したところ、その 52% が CHS であったと報告されている (Craig と Julian, 2002)。過去に報告されたフローサイトメトリーによる CHS 表面抗原解析における正診率は 67% であった (Wiley ら, 2010)。好中球、単球およびリンパ球などの炎症細胞はバックグラウンド蛍光が高いため、フローサイトメトリーでは CHS 細胞に加え、他の炎症細胞の抗体反応性も検出してしまう (Craig と Julian, 2002 ; Weiss ら, 2002)。したがって、同じ CHS 疾患でも再現性の高い検出が困難であると考えられた。

本解析では、CHS 群は悪性腫瘍および炎症性疾患を含む非 CHS 群と比較し、いずれも有意な発現差がみられた。また、CHS 診断法としての正診率もそれぞれ、85% 以上を示した。各表面抗原発現量が低く、検出できなかった CHS が数例存在したが、由来細胞の分化過程によっては、表面抗原発現量が一時的に弱まることがあるため (Bonfont-Rebeix ら, 2006 ; Yu-Shan ら, 2007)、検出できなかったかもしれない。さらに、MHC クラス II 抗体を用いた免疫染色からも、本法の解析結果が最終産物であるタンパク質の発現に反映されており、その信頼性が示唆された。本法は従来の免疫染色法と異なり、特異抗体や凍結切片の作製および特殊な検査技術を必要とせず、針生検などによる微量検体で簡便かつ迅速に CHS を判定することができた。本解析に必要な mRNA は従来、不安定な構造であるた

め、長期保存やホルマリン固定検体からの抽出ができない。しかし、病理検査で CHS が疑われた場合、針生検で得た検体を用いて、本法から補助的診断情報を得ることが容易に可能であった。

CD11b の解析結果では重度の再生性貧血を呈した CHS の 3 例で、その mRNA 発現量が最も高値を示した。CHS は樹状細胞 (DC) 由来の局所型・播種型 CHS とマクロファージ由来の赤血球貪食型 CHS に分類され、その判別法として赤血球貪食型 CHS に特異的な CD11d 抗体を組み合わせた免疫染色が確立されている (Moore ら, 2006)。赤血球貪食型 CHS は脾臓を原発とすることが多く、重度の再生性貧血を呈する。さらに、局所型・播種型 CHS よりも病態の進行が早く、治療抵抗性も高いため、予後が極めて悪い (Dobson ら, 2006 ; Soare ら, 2012)。CD11b が高発現したこれらの CHS の 3 例は臨床検査、生物学的挙動や組織学的検査に加え、本解析結果からも赤血球貪食型 CHS を疑うことができた。今後、本法による赤血球貪食型 CHS の検出法を確立するために、CD11d 抗体を用いた免疫染色と本法による解析結果を蓄積し、その有用性を検討する必要がある。

CD86 の解析結果では組織学的に未分化形態で多く占められ、病理検査では確定が困難であった CHS の 5 例において、特に高い発現量を示した。CD80、CD83 および CD86 は DC に特異的な表面抗原であるが (Bonnetfont-Rebeix ら, 2006)、近年、CD80 や CD83 と比較して、CD86 は未成熟型 DC に高発現し、分化が進むにつれ、その発現量が低下することが報告された (Bonnetfont-Rebeix ら, 2006 ; Yu-Shan ら, 2007)。本研究においても、CD80 および CD86 を用いた遺伝子解析では、未分化型の CHS や従来の CHS に有意な発現量の差は認められなかった。CD86 抗体を用いた免疫染色では CHS を検出することはできないが (Affolter ら, 2002 ; Moore ら, 2006)、本法は、組織学的判定が困難である未分化型の CHS を判別できるかもしれない。

正常犬の各組織や臓器における各表面抗原の mRNA 発現量を測定した

ところ、リンパ節における MHC クラス II、CD11b および CD11c の mRNA 発現量がその他の組織や臓器（心臓、肺、腎臓、腸管、皮下組織、膀胱、脾臓、筋肉および骨）よりも高値を示し、さらに、骨髄の CD86 発現量も高値を示した。本研究に用いた表面抗原は DC やマクロファージを含む抹消血液中や犬の各正常組織においても、ある程度、発現している（Doveren ら, 1986 ; Weiss ら, 2004）。したがって、リンパ節や骨髄を原発とする病巣部やリンパ節転移病巣部における診断は本法では適応できない可能性がある。また、抗原提示細胞が豊富に含まれる炎症組織においてもこれらの表面抗原が高発現することがあるため（Kipar ら, 1998 ; Kathrani ら, 2011）、本解析法のみでは対応できないかもしれない。これらの症例は臨床徴候やその他の補助的診断を組み合わせる必要がある。本解析では、リンパ腫で MHC クラス II と CD11c 発現量が高値を示したが、犬リンパ腫は従来の病理検査以外にも、クローナリティ検査やフローサイトメトリーによる補助的診断法が確立されている（Yagihara ら, 2007）。また、多発性骨髄腫でも CD86 の発現量が高値を示したが、骨髄原発性 CHS はまれであるうえに、臨床徴候も CHS とは異なる。さらに、犬の多発性骨髄腫独自の確定診断法も確立されているため（Refs ら, 2009）、判定過誤の要因となる可能性は低いと考えられる。

CHS は従来の病理組織学的検査のみでは判断が難しいため、高精度な補助的診断法が必要である。本法は手技も比較的簡便であり再現性も高く、さらに微量材料でも CHS の診断指標となる可能性が示唆された。本法は病理組織学的検査の欠点を補うことが可能であり、従来の臨床検査と併用する事で、誤診を防ぎ、診断精度をさらに上げる事が期待された。Real-time RT-PCR を用いた CHS における表面抗原の遺伝子解析法はこれまでに前例がないため、その有用性を今後もさらに検討しなければならない。また、その他の類似疾患や炎症併発疾患にも対応可能にするために、詳細な測定条件の検討が必要である。

5. 小 括

本章では、CHS における迅速的な遺伝子診断法の開発を試みた。CHS では MHC クラス II、CD11b、CD11c および CD86 を含む特定の表面抗原が高発現しているため、これらの遺伝子レベルを定量解析することで、迅速かつ客観的に CHS を検出できることが予想された。定量的 real-time RT-PCR を用いたこれらの表面抗原解析結果では、MHC クラス II、CD11b、CD11c および CD86 はその他の疾患と比較し、CHS に有意に高発現し、有用性のある診断精度が得られた。本法による遺伝子診断法は迅速かつ簡便であり、再現性も高く、微量検体でも CHS の客観的な診断指標となる可能性が示唆された。本法は従来の病理組織学的診断の欠点を補う高精度な診断法として期待された。

第 2 章 CHS の分子標的療法に関する基礎的検討

1. 序 論

アポトーシス抑制因子 (inhibitor of apoptosis protein: IAP) は主に Bcl-2 ファミリーおよび IAP ファミリーに大別されており、いずれもアポトーシスと細胞分裂の制御に関わる機能的タンパク質である (Ambrosini ら, 1997 ; Li ら, 1998)。Bcl-2 および IAP ファミリーの一部では造血幹細胞、生殖細胞、免疫細胞、線維芽細胞などある特定の細胞を除いて正常組織ではほとんど発現しないが (Ambrosini ら, 1997; Shoeneman ら, 2012)、人や犬の多くの癌細胞において、その過剰発現が確認されている (Ambrosini ら, 1997 ; Shoeneman ら, 2012)。IAP の発現機序やその機能が解明されて以来、一部の IAP でタキサン系やアルカロイド系を始めとする多くの抗癌剤の耐性獲得機序に関与していることや、腫瘍の組織学的悪性度、治療反応期間および生存期間にも関連していることが報告されている (Okada ら, 2004 ; Yang ら, 2004 ; Uchide ら, 2005 ; Wang ら, 2006 ; Yamanaka ら, 2011)。多くの IAP のなかでも、Survivin は特に癌治療の標的因子になりうると期待され、これまでに数多くの基礎的研究が実施されている (Bury ら, 2008 ; Shoeneman ら, 2012)。

Survivin 機能解析における信頼性の高い手法として small interfering RNA (siRNA) を応用した RNA 干渉が頻用されているが、*in vivo* に対して、高い再現性を得ることが現実的に難しい (Guo ら, 2013 ; Bakhtiyari ら, 2013)。YM155 は低分子 Survivin 発現阻害剤として新規に開発され、近年、Survivin 標的治療薬として注目されている (Yamanaka ら, 2011 ; Tolcher ら, 2012)。YM155 は *in vitro* および *in vivo* で有効な腫瘍増殖抑制効果が示されているだけでなく、国内での癌患者に対する第Ⅱ相臨床試験の承認を取得している (Giaccone ら, 2009 ; Tolcher ら, 2012)。したが

って、高い安全性と癌患者に対する抗腫瘍効果が期待されている。しかし、小動物臨床における本剤の有効性は、不明であるため、有効濃度、安全性、持続期間および CHS に対する抗腫瘍効果など基礎的検討が必要である。

本章では、CHS に対するより効果的な治療法を開発するため、IAP ファミリー因子のなかでも、特に Survivin を標的とした分子標的療法の可能性を検討した。症例においては CHS と Survivin を含む複数の IAP 遺伝子発現量の比較解析を行い、Survivin が有効な標的治療の候補遺伝子である可能性を探った。次に、CHS の生物学的挙動と Survivin 遺伝子発現量との関連性を調査した。さらに、由来の異なる 4 種類の CHS 細胞株に対して、Survivin 発現阻害剤である Survivin siRNA および YM155 を用い、細胞増殖能、抗癌剤耐性および血球貪食能を含む CHS 細胞の生物学的機能に対する Survivin 抑制の影響を評価した。最後に、抗癌剤耐性 CHS 細胞移植マウスを作製し、これらに対する YM155 による腫瘍増殖抑制効果を評価した。

2. 材料および方法

2-1. CHS 症例と Survivin 遺伝子発現量との関連

(1) アポトーシス抑制因子 (IAP) の遺伝子発現量解析法

第 1 章と同様の手法で、CHS が確定された 30 症例の検体から mRNA 抽出および cDNA 合成を行い、定量的 real-time PCR により Survivin を含む 7 種類の IAP 遺伝子発現量を測定した (Peters ら, 2007 ; Schlotter ら, 2009)。内部標準を hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) とし、IAP に属した Bcl-1、Bcl-xL、Mcl-1、cIAP1、cIAP2、Survivin および XIAP における発現量を網羅的に検索した。これらの標的プライマーは GenBank に示された遺伝子配列から Primer 3 を用いて設計した (表 2-1)。すべての mRNA 発現量は正常犬から樹立した線維芽細胞 (後述) における同じ IAP の mRNA 発現量を基準値として補正し、相対定量値を算出した。

(2) Survivin 遺伝子発現量と治療経過および予後との比較解析法

第 1 章で記述した CHS の 30 症例における無疾病期間および生存期間とその Survivin 遺伝子発現量を比較した。すべての症例の治療内容は統一され、無疾病期間および生存期間も過去の報告を参照に定義した (Osaka ら, 2006; Klahn ら, 2011)。化学療法の第一選択としてロムスチン (CCNU) を投与し (60~90 mg/m²、経口投与、3 週間毎)、重度な副症状や薬剤耐性が見られた場合は、第二選択であるドキソルビシン (DOX) を投与した (30 mg/m²、静脈内投与、3 週間毎)。無疾病期間は、CCNU 投与による完全緩解 (肉眼病変の完全消失) または部分緩解 (腫瘍体積の 50%以上が消失) の持続期間とした。これらは、すべて画像検査 (単純 X 線検査、X 線 CT 検査および超音波検査) で確認した。無疾病期間が 3 週間未満の症例は検討から除外した。また、生存期間は初診日を 1 病日として計測した。Survivin 遺伝子発現量は前述のとおり real-time RT-PCR で定量解析を

実施した。CHS 症例に対する Survivin 遺伝子発現量の中央値を基準として Survivin 発現量が高い CHS 症例群と低い CHS 症例群の 2 群に分類し、両群の予後を比較解析した。

2-2. CHS 細胞株の Survivin 発現抑制による生物学的機能の変動評価

(1) 細胞株と培養法

由来の異なる 4 種類の CHS 細胞株；CHS-4、CTT、DH82 および LHS（岐阜大学大学院連合獣医学研究科 丸尾幸嗣教授ならびに、日本獣医生命科学大学獣医学研究科 盆子原 誠准教授より分与；Sakai ら, 2003；Azakami ら, 2006）と正常犬の皮下組織から樹立した線維芽細胞（Sunaga ら, 2012）を本研究に供した（表 2-2）。細胞培養は、10%ウシ胎児血清（fetal bovine serum; FBS, Biowest, Miami, FL, USA）を添加したダルベッコ改変イーグル培養液（dulbecco's modified eagle's medium; DMEM, GIBCO BRL, Gaithersburg, NY, USA）および 1,000 U/ml ペニシリン G カリウム（ナカライテスク）、0.1 mg/ml 硫酸ストレプトマイシン（ナカライテスク）を用い、37℃、5%CO₂ の条件下で行った。細胞の継代培養は、0.05%トリプシン（和光純薬）および 0.02%エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA-2Na、和光純薬）を添加したリン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline; PBS, pH 7.2）で細胞を浮遊させ、4℃、200×g で遠心分離し、上清を除去後、新たな培養液に細胞を再浮遊させて実施した。

(2) Survivin 発現阻害剤

Survivin 発現阻害剤として Survivin siRNA および YM155（アステラス製薬、茨木、日本）を本研究に使用した。Survivin siRNA（シークエンス：5'-AGAAUUCGAAGAGACCGCAAAGAAA-3'）および陰性対照の Non target siRNA（シークエンス：5'-ATCCGCGCGATAGTACGTA-3'）は、オンラインツールである BLOCK-iT RNAi Designer

(<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>) を用いて設計し、合成した (Invitrogen life Technologies)。供試細胞におけるこれらの siRNA の導入は、導入試薬である LipofectamineTM2000 (Invitrogen life Technologies) を用いて、製造元の指示書に従い実施した。YM155 における投与方法も同様に、製造元 (アステラス製薬) の指示書に従い実施した。

(3) Survivin 発現量の解析法

各 Survivin 発現阻害剤による処理から 12、24、48 および 72 時間後に各 CHS 細胞を採取した。次いで、real-time RT-PCR を用いて、前述と同様の条件で Survivin mRNA 発現量を定量解析した。

さらに、各 Survivin 発現阻害剤による処理から 48 時間後に採取した各 CHS 細胞を用いて、ウエスタンブロットによりタンパク発現量を解析した。タンパク抽出液はタンパク質測定キット (Quick StartTM Bradford Dye Reagent; Bio Rad, Hercules, CA, USA) を用いて製造元の指示書に示された使用法に従い、それぞれの試料のタンパク濃度を Bradford 法 (Bradford, 1976) にて測定した。タンパク量が一定になるように試料の量を調節して 1.5 ml のマイクロチューブ (BMbio、東京) に移した。細胞からのタンパク抽出液は等容量のサンプル緩衝液 [0.125 M トリス塩酸緩衝液 tris-buffered saline: TBS ; pH6.8, 10% 2-メルカプトエタノール (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS、和光純薬)、10%スクロース (和光純薬) および 0.004%ブロモフェノールブルー (ナカライテスク)]を加えて攪拌した。試料を 95℃のアルミブロック恒温槽 (アズワン、大阪) で 3 分間加熱した。試料を 10%アクリルアミドゲルの各穴にそれぞれ流し込み、25 mM トリス (ヒドロキシ) アミノメタン (和光純薬)、192 mM グリシン (和光純薬) および 0.1%SDS を純水に溶解させて作製した泳動溶液を満たしたミニスクラブゲル用電気泳動装置 (AE-6500、アトー、東京) を用いて、1 ゲルあたり 20 mA の送電流で、各試料を泳動した。その後、25 mM ト

リス（ヒドロキシ）アミノメタン、192 mM グリシン、20%メタノール（和光純薬）を純水に溶解して作製した転写溶液およびセミドライブロッキング装置（AE-6677、アトー）を用いてゲル 1 枚あたり 100 mA の送電流で、ゲルからニトロセルロース膜（Bio Rad, Hercules, CA, USA）にタンパクを転写した。ニトロセルロース膜を 10 mM TBS ; pH7.4、0.15 M 塩酸ナトリウム（和光純薬）に 0.1%Tween20（Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden）、1%牛血清アルブミン（bovine serum albumin; BSA, Sigma-Aldrich）および 0.05%アジ化ナトリウム（和光純薬）を溶解して作製したブロッキング溶液中で 1 時間振盪した。ニトロセルロース膜を 0.1%Tween20 および 5%TBS (Tween-TBS; 10mM TBS; pH7.4) に 5%BSA を添加した抗体反応液で 1,000 倍に希釈した一次抗体溶液（ウサギ抗 Survivin 抗体; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA）に浸漬させ、4℃で一晩振盪した。その後、ニトロセルロース膜を Tween20-TBS で 10 分ずつ 3 回振盪・洗浄し、Tween20-TBS で希釈した二次抗体（アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン抗体 ; Shigma-Aldrich）を室温で 2 時間静置した。Tween20-TBS でニトロセルロース膜を 10 分間ずつ 3 回振盪・洗浄し、発色液（1-Step™ NBT/BCIP; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA）を用いて二次抗体で標識されたアルカリフォスファターゼを発色させ、目的のタンパクを検出した。結果の解析には image J（National Institutes of health, Bethesda, MD, USA）を用いて画像化し、タンパク発現量を評価した。

（4）アポトーシスの検出法

Survivin 発現抑制から 24 時間後に、各 CHS 細胞および犬線維芽細胞におけるアポトーシスの検出を行った。Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識アネキシン V 染色によるアポトーシス検出には AnnexinV-Biotin Apoptosis Detection Kit (BioVision Inc., Milpitas, CA, USA) を用いた。各細胞を 2.0×10^5 個/ml となるように 10%FBS を含む抗生物質不含培養液

で希釈し、6 穴平底プレート (Corning Inc., Corning, NY, USA) の各ウェルに 2 ml ずつ分注し、各試薬を添加後、37℃、5%CO₂ の条件下で 24 時間培養した。次に、各細胞を PBS で 2 回洗浄し、アネキシン V およびヨウ化プロピジウム (PI; Sigma) を 5 µl ずつそれぞれ添加し、暗室室温で 5 分間反応させた。2%ホルムアルデヒド(和光純薬)にて細胞を固定し、10%ウサギ正常血清 (ニチレイバイオサイエンス) にてブロッキング処理を行った後、蛍光発色剤 (Fluorescein Conjugate; Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) を 5 µl 添加し 15 分間蛍光染色を行った。細胞膜および核の蛍光の観察には FLoid™ セルイメージングステーション (ライフテクノロジーズジャパン、東京) を用いた。

(5) 細胞生存率の評価法

Survivin 発現抑制から 24、48 および 72 時間後に各 CHS 細胞と犬線維芽細胞の細胞生存率を 3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド [methylthiazole tetrazolium (MTT)、和光純薬] 測定法で評価した (Rubinstein ら、1990)。供試細胞を 2.0×10^4 個/ml となるように 10%FBS を含む抗生物質不含培養液で希釈し、96 穴平底プレート (Corning) の各ウェルに 100 µl ずつ分注した。次いで、2 種類の Survivin 発現阻害剤を各ウェルに添加後、37℃、5%CO₂ の条件下で 24、48 および 72 時間、それぞれ培養した。次に、5 mg/ml の MTT 溶液 20 µl を各ウェルに添加し、37℃、5%CO₂ の条件下で 3 時間培養した。続いて、96 穴平板プレートを 4℃、200×g で 5 分間遠心し、培養液を除去した後に、各ウェルに可溶化溶液 (後述) 100 µl を加え、形成されたテトラゾリウム塩の結晶を溶解した。なお、可溶化溶液は、SDS (和光純薬) を超純水に溶解して 20%SDS 溶液を作製し、その溶液と等量の N,N-ジメチルホルムアミド (和光純薬) を混合した溶液を、塩酸 (和光純薬) で pH4.7 に調整し、作製した。可溶化溶液を添加した各ウェルの波長 570 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Multiskan FC; Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA) で計測し、細胞生存率を算出した。

(6) 抗癌剤耐性の評価法

Survivin 発現抑制後に、CCNU および DOX における抗癌剤感受性を MTT 測定法で評価した。各 CHS 細胞を 2.0×10^5 個/ml となるように 10%FBS を含む培養液で希釈し、96 穴平底プレート (Corning) の各ウェルに 100 μ l ずつ分注した。次いで、無処置、Non target siRNA 複合体、Survivin siRNA 複合体、YM155 のプレートを 2 枚ずつ用意し、37°C、5%CO₂ の条件下で 24 時間培養した。次に、CCNU (和光純薬) と DOX (和光純薬) を 0.01, 0.1, 1, 10, 100 および 1,000 μ M の最終濃度となるように各ウェルにそれぞれ添加し、37°C、5%CO₂ の条件下で、さらに 24 時間培養した。以降、前述した同様の手法により、細胞生存率を測定し、Survivin 発現抑制前後で CCNU および DOX の 50%抑制濃度をそれぞれ比較した。

もうひとつの抗癌剤耐性の評価法として、Survivin 発現抑制後に、CCNU および DOX に関連した抗癌剤耐性因子の mRNA 発現量を測定した。抗癌剤耐性関連因子として O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)、ATP-binding cassette transporter B1 (ABCB1) および ATP-binding cassette transporter C2 (ABCC2) を選択し、内部標準としては HPRT を選択した。前述と同様の手法で、各 CHS 細胞から、mRNA 抽出および cDNA 合成を行い、real-time RT-PCR により、mRNA 発現量を定量解析した。これらの標的プライマーは GenBank に示された遺伝子配列から、Primer 3 を用いて設計した (表 2-1)。すべての遺伝子発現量は無処置の各 CHS 細胞における同じ抗癌剤耐性関連因子の遺伝子発現量を基準値として補正した。

(7) 貪食機能の評価法

Survivin 発現抑制後、ラテックスビーズ [Fluoresbrite Carboxylate Microspheres (2.5% Solids-Latex) 2 μ m YG, Polysciences Inc., Warrington, PA, USA] を用いて、貪食機能の評価した (Azakami ら, 2006)。

供試細胞を 2.0×10^5 個/ml となるように 10%FBS を含む抗生物質不含培養液で希釈し、6 穴平底プレート (Corning) の各ウェルに 100 μ l ずつ分注した。次いで、siRNA と YM155 の Survivin 発現阻害剤を各ウェルに添加後、37°C、5%CO₂ の条件下で 48 時間、それぞれ培養した。次に、ラテックスビーズ溶液 100 μ M を各ウェルに添加し、再び 37°C、5%CO₂ の条件下で 2 時間培養した。培養後に、各 CHS 細胞を PBS で 3 回洗浄し、貪食されなかったビーズを除去した。その後、メタノールで 10 分間固定し、ライト・ギムザ溶液 (和光純薬) で染色した。デジタル顕微鏡 (HS オールインワン蛍光顕微鏡; KEYENCE、大阪) で写真を撮影し、画像処理ソフト (Adobe photoshop CS; Adobe, San Jose, CA, USA) を用いて、ランダムに細胞 1,000 個を選択し、細胞内に取り込まれたビーズの総数を定量測定した。これらのビーズの総数を処理前と処理後で比較した。

2-3. CHS 細胞移植マウスにおける Survivin 発現阻害剤の抗腫瘍効果

(1) 抗癌剤耐性 CHS 細胞移植マウスの作製法

前述した 4 種類の CHS 細胞のうち YM155 の腫瘍増殖抑制効果が最も高かった CHS-4 と腫瘍増殖抑制効果が低かった CTT および LHS を選択した。雌、4 週齢、ヌードマウス (BALB/C nu/nu; 日本 SLC、浜松、日本) の背部皮下に、各細胞 (2.0×10^6 個) を含んだ生理食塩水 1 ml を接種した。接種翌日から、それぞれに CCNU を投与し (2.5 mg/kg、経口投与、3 週間毎)、腫瘍体積が 1,000 mm³ に増殖した時点で安楽死を実施した (Fichtner ら, 1986; Amarasingh ら, 2009)。その後、腫瘍組織を採材し、数 mm 単位に細切した後、新しいヌードマウスの背部に皮下接種し、同様に CCNU を投与した。この過程を 8 回繰り返し、8 回目の CHS 細胞移植マウスを CCNU 耐性 CHS 細胞移植マウスとした (Okugawa ら, 2004)。これらに対し、CCNU の代わりに生理食塩水を投与した対照 CHS マウスも同時に作製した。各抗癌剤耐性 CHS マウスと対照 CHS マウスの腫瘍組

組織を一部採取し、腫瘍組織片から細胞株に再び戻すために、前述した培養液中で 37℃、5%CO₂ の条件下で 48 時間培養した。次に、抗癌剤耐性を評価するために、これらの細胞株を用いて、MTT アッセイによる CCNU 感受性（前述）および real-time RT-PCR による抗癌剤耐性関連遺伝子の発現量（前述）を比較解析した（表 2-3）。なお、動物実験は「北海道大学大学院獣医学研究科・獣医学部において行う動物実験に関するガイドライン」に従って実施した（実験許可番号 1120 および 1156）。

（2）腫瘍増殖抑制効果の評価法

3 種類の細胞株（CHS-4、CTT および LHS）から作製した従来の CHS 細胞移植マウスとこれらを親株として作製した CCNU 耐性 CHS 細胞移植マウスを本研究に供した。これらのマウスの腫瘍体積がそれぞれ、約 100 mm³（肉眼可視最少体積）に増殖した後、3 匹ずつ、生理食塩水投与（対照）群、CCNU 投与（2.5 mg/kg、単回経口投与）群、YM155 投与群（5 mg/kg、3 日間連続皮下投与、1 週間毎；製造元の推奨用量）および YM155 と CCNU の併用群に分類し、3 日間毎に、それぞれの腫瘍体積および体重を測定した。いずれかの群において腫瘍体積が 1,000 mm³ に達した時点、異常行動、摂食障害や体重減少がみられた時点、または投与開始から 3 週間経過した時点のいずれかをエンドポイントと設定し（Nakahara ら, 2007; Shen ら, 2012）、安楽殺を実施した。

（3）Survivin 発現量の評価法

安楽殺後に採材した腫瘍検体の Survivin 遺伝子発現量を real-time RT-PCR で評価し、Survivin タンパク発現量を免疫組織化学染色法で評価した。安楽殺後、各マウスから腫瘍を採材し、一部の検体を 2~3 mm 角に細切し、前述と同様の手法で RNA 抽出および cDNA 合成を行い、標的プライマーを用いて Survivin mRNA 発現量を定量解析した。すべての mRNA 発現量は、対照マウスの腫瘍検体における同じ Survivin 遺伝子発現量を基準値“1”として補正した。

各マウスから採取した腫瘍組織を 4 %パラホルムアルデヒド-PBS (pH7.3) により 4℃で 24 から 48 時間固定し、常法に従いパラフィンに包埋した。パラフィン包埋した組織は 3 μ m の厚さに薄切後、スライドガラス (松浪硝子、大阪) に貼り付けて乾燥し、切片とした。切片を脱パラフィン後、10 mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) に浸漬し 120℃、10 分間オートクレーブ処理することで抗原を賦活化した。次に、0.3%過酸化水素水加メタノール (ナカライテスク) で 30 分間処置し、内因性ペルオキシダーゼ活性の不活化処理を行った。10%正常ヤギ血清 (ヒストファイン SAB-PO (R) キット、ニチレイ、東京) を室温 1 時間反応させ、非特異的抗体反応を抑制した。一次抗体として、0.01 M PBS で 100 倍希釈したウサギ抗 Survivin ポリクローナル抗体 (Novus Biologicals) を 4℃で一晩反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体としてキットに付属の抗ウサギ Immunoglobulin G (IgG) ヤギ血清に室温で 1 時間、ビオチン・ストレプトアビジン溶液に室温で 30 分間反応させた後、0.3%過酸化水素水加 3,3' ジアミノベンチジン (3,3'-Diaminobenzidine,tetrahydrochloride; DAB) 反応液を用いて 3 分間発色させた。脱水、キシレン透徹し、観察に用いた。なお、陰性対照として一次抗体の代わりに正常ウサギ IgG (normal rabbit IgG ; Abcam, Cambridge, UK) を用いた。

(4) 抗癌剤耐性関連遺伝子発現量の評価法

Survivin 発現抑制後に、各 CHS 細胞移植マウスの腫瘍検体における MGMT、ABCB1 および ABCC2 の mRNA 発現量を測定した。安楽殺後、各マウスから腫瘍の一部を採材し、すぐに検体を 2~3 mm 角に細切し、前述と同様の手法で mRNA 抽出および cDNA 合成を行い、それぞれの標的プライマーを用いて mRNA 発現量を定量解析した。すべての mRNA 発現量は、対照マウスの腫瘍検体における同じ抗癌剤耐性関連遺伝子発現量を基準値として補正した。

2-4. 統計解析

CHS における Survivin 遺伝子発現量と生存期間および無疾病期間との関連性は統計処理ソフト SPSS を用いたウィルコクソンの符号順位検定または、マン・ホイットニーの U 検定を実施した。また、Survivin 発現量が高い CHS 症例群と低い CHS 症例群の両群における無疾病期間および生存期間の比較は、カプラン・マイヤー曲線により表示した。Survivin 発現抑制における細胞株の変動評価においてはダネット検定法を実施し、Survivin 発現抑制における CHS 細胞移植マウス腫瘍体積の評価はマン・ホイットニーの U 検定を実施した。すべてのデータは平均値±標準誤差で表示し、危険率 $p < 0.05$ を持って有意差ありと判定した。

表 2-1 標的プライマーの一覧

標的遺伝子		シーケンス配列	増幅サイズ (bp)
HPRT	Forward	5'-AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC-3'	100
	Reverse	5'-TTATAGTCAAGGGCATATCC-3'	
Bcl-2	Forward	5'-TGGAGAGGGTCAACCGGGAGATG-3'	103
	Reverse	5'-AGGTGTGCAGATGCCGGTTCAGG-3'	
Bcl-xL	Forward	5'-GCCTTTTTCTCCTTGGGTGG-3'	185
	Reverse	5'-CTCTCGGCTGCTGCATTGTT-3'	
Mcl-1	Forward	5'-TGTGGCCAAACACTTGAAGA-3'	120
	Reverse	5'-GTCAAACAAAGAGGCTGGGA-3'	
cIAP1	Forward	5'-AGGCGTCCCCGTGTGCGAGAG-3'	96
	Reverse	5'-TAGCATCAGGCCGCAGCAGAAGC-3'	
cIAP2	Forward	5'-AGGCCAATGTAATTAATAAACAGGA-3'	94
	Reverse	5'-AACTAAGACAGTATCAATCAGTTCTCTC-3'	
Survivin	Forward	5'-ACCACCGCATCTCTACATTC-3'	98
	Reverse	5'-ACAGAAAGGAAAGCACAAACC-3'	
XIAP	Forward	5'-ACTATGTATCACTTGAGGCTCTG-3'	80
	Reverse	5'-AGTCTGGCTTGATTCATCTTGTG-3'	
MGMT	Forward	5'-GATGAGGAGCAATCCTGTGC-3'	88
	Reverse	5'-GAGTCCTCCGGTGTAGTTGC-3'	
ABCB1	Forward	5'-ACTCGGGAGCAGAAGTTTGA-3'	95
	Reverse	5'-AATGAGACCCCGAAGATGTG-3'	
ABCC2	Forward	5'-GAGCTGGCTCACCTCAAAAC-3'	82
	Reverse	5'-GTAGCTGCCTCTGCCCTATG-3'	

表 2-2 本研究に用いた細胞株の基本情報

細胞株	由来	遺伝子（mRNA）発現量※			
		Survivin	MGMT	ABCB1	ABCC2
CHS-4	関節	124	36	28	24
CTT	皮膚	360	86	76	69
DH82	不明	324	124	96	88
LHS	肺	282	76	42	82

※定量的 real-time RT-PCR による測定（すべての遺伝子発現量は犬の線維芽細胞における同じ遺伝子発現量を基準値として補正）

MGMT: O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase

ABCB1: ATP-binding cassette transporter B1

ABCC2: ATP-binding cassette transporter C2

表 2-3 CCNU 耐性 CHS 細胞株の基本情報

細胞株	CCNU の 50%抑制濃度	抗癌剤耐性関連遺伝子の発現量※		
		MGMT	ABCB1	ABCC2
CHS-4	18.2 $\mu\text{mol/L}$	1	1	1
CCNU 耐性 CHS-4	276 $\mu\text{mol/L}$	18.2	8.2	6.4
CTT	96.6 $\mu\text{mol/L}$	6.0	4.2	2.8
CCNU 耐性 CTT	513.8 $\mu\text{mol/L}$	48.4	18.6	12.6
LHS	42.6 $\mu\text{mol/L}$	2.9	5.7	4.9
CCNU 耐性 LHS	187.4 $\mu\text{mol/L}$	58.6	12.4	22.3

※ 定量的 real-time RT-PCR で測定（すべての遺伝子発現量は CHS-4 における同じ遺伝子発現量を基準値として補正）

3. 結 果

3-1. CHS 症例と Survivin 遺伝子発現量との関連性

(1) Survivin 遺伝子とその他の IAP 遺伝子発現量との比較

CHS の 30 例の検体における Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1、cIAP-1、cIAP-2、Survivin および XIAP を含む IAP の mRNA 発現量を比較した (図 2-1)。Survivin 発現量 (中央値 248、範囲 80~360) はその他の IAP と比較して、有意 ($p < 0.05$) に高かった。なお、CHS 症例のなかで Bcl-xL 発現量 (中央値 24、範囲 1.2~68) が最も低く、その中央値は Survivin 発現量の中央値の約 10 分の 1 であった。

(2) Survivin 遺伝子発現量と治療経過およびその予後との相関性

CHS の 30 症例 (第 1 章参照) の情報 (品種、原発部位、肺転移、無疾病期間、生存期間および Survivin 発現量; 一部の情報は表 1-2 と重複) を表 2-4 に示した。Survivin 発現量が高い CHS 症例群 (9 例) の無疾病期間 (中央値 42 日、範囲 21~147 日) は Survivin 発現量が高い CHS 症例群 (9 例) のそれ (中央値 126 日、範囲 63~315 日) と比較して、有意 ($p < 0.05$) に短かった (図 2-2 A)。また、Survivin 発現量が高い CHS 症例群 (12 例) の生存期間 (中央値 44 日、範囲 3~180 日) は Survivin 発現量が高い CHS 症例群 (12 例) のそれ (中央値 104 日、範囲 42~364 日) と比較して、有意 ($p < 0.01$) に短かった (図 2-2 B)。さらに関節を原発とした CHS の 8 例を対象として、CCNU 投与開始前と投与後に CCNU 抵抗性を示した時点での腫瘍病変を針生検で採材し、それぞれの Survivin mRNA 発現量を比較解析した。CHS の 8 症例における CCNU 投与開始前の Survivin の mRNA 発現量 (中央値 158、範囲 82~388) は CCNU 抵抗性獲得後の発現量 (中央値 412、範囲 298~880) と比較して、有意 ($p < 0.01$) に低かった (図 2-3)。

3-2. CHS 細胞株の Survivin 発現抑制による生物学的機能への影響

(1) Survivin 発現量

Survivin siRNA および Non target siRNA 投与から 12、24、48 および 72 時間後に各 CHS 細胞を採取し、Survivin mRNA 発現量を測定した（図 2-4 A）。Survivin siRNA 投与から 24 時間以降、投与前と比較して、すべての CHS 細胞で 90%以上の発現抑制がみられた。また、投与から 48 時間後に、各 CHS 細胞における Survivin タンパク質もほとんど発現がみられなかった（図 2-4 A）。これに対し、Non target siRNA を投与した CHS 細胞において、Survivin 発現抑制はいずれもみられなかった。

同様に、YM155 投与から 12、24、48 および 72 時間後に各 CHS 細胞を採取し、Survivin mRNA 発現量を測定した（図 2-4 B）。CHS-4 および DH82 の 2 つの細胞において、投与から 24 時間以降、投与前と比較して 90%以上の発現抑制がみられた。また、CHS-4 および DH82 の 2 つの細胞においては、投与から 48 時間後に、Survivin タンパク質の発現もみられなかった（図 2-4 B）。これに対し、CTT および LHS では mRNA、タンパク質ともに、明らかな Survivin 発現抑制がみられなかった。

(2) アポトーシスの検出

Survivin siRNA および Non target siRNA 投与から 24 時間後に各 CHS 細胞および犬線維芽細胞を採取し、アポトーシスを評価した（図 2-5）。Survivin siRNA 投与から 24 時間後、投与前と比較して、すべての CHS 細胞でアポトーシスが検出されたが、線維芽細胞においては、アポトーシスは検出されなかった。これに対し、Non target siRNA 投与によるアポトーシスはいずれも検出されなかった。

同様に、YM155 投与から 24 時間後に各 CHS 細胞および線維芽細胞を採取し、アポトーシスを評価した（図 2-5）。投与から 24 時間後、投与前と比較して、CHS-4 および DH82 の 2 つの細胞でアポトーシスが検出された。これに対し、CTT および LHS のアポトーシスはわずかであり、線維

芽細胞においては、アポトーシスは検出されなかった。

(3) 細胞生存率の影響

Survivin siRNA および Non target siRNA 投与から 24 および 48 時間後に各 CHS 細胞および線維芽細胞を採取し、細胞生存率を評価した（図 2-6）。Survivin siRNA 投与から 48 時間後、Non target siRNA 投与および対照と比較して、すべての CHS 細胞で有意に（ $p < 0.05$ ）増殖が抑制された。これに対し、線維芽細胞においては増殖抑制がみられなかった。

同様に、YM155 投与から 24 および 48 時間後に各 CHS 細胞および線維芽細胞を採取し、細胞生存率を評価した（図 2-6）。Survivin siRNA 投与から 48 時間後、Non target siRNA 投与および対照と比較して、CHS-4 および DH82 の 2 つの細胞で有意な（ $p < 0.05$ ）増殖抑制がみられた。これに対し、CTT、LHS および線維芽細胞においては有意な細胞増殖はみられなかった。

(4) 抗癌剤耐性の影響

Survivin siRNA および Non target siRNA 投与における CCNU と DOX の感受性の影響を評価した（表 2-4）。Survivin siRNA 投与後、Non target siRNA 投与および投与前と比較して、すべての CHS 細胞で有意に（ $p < 0.05$ ）、CCNU および DOX の感受性が増加した。同様に、YM155 投与における CCNU および DOX の感受性の影響を評価した（表 2-4）。YM155 投与後、投与前と比較して、CHS-4 および DH82 の 2 つの細胞で有意に（ $p < 0.05$ ）、CCNU および DOX の感受性が増加した。これに対し、CTT、LHS において、有意な感受性の変化はみられなかった。

Survivin siRNA および Non target siRNA 投与における MGMT、ABCB1 および ABCC2 を含む抗癌剤耐性関連遺伝子発現量の影響を評価した（図 2-7）。Survivin siRNA 投与後は、投与前と比較して、すべての CHS 細胞で有意に（ $p < 0.05$ ）、MGMT、ABCB1 および ABCC2 の mRNA 発現量が減少した。これに対して、Non target siRNA 投与後、mRNA 発現量の有

意な変化はみられなかった。同様に、YM155 投与における抗癌剤耐性関連遺伝子発現量の影響を評価した (図 2-7)。YM155 投与後、対照と比較して、CHS-4 および DH82 の 2 つの細胞で有意に ($p < 0.05$) MGMT、ABCB1 および ABCC2 すべての mRNA 発現量が減少した。これに対して、CTT および LHS においては、mRNA 発現量の有意な変化はみられなかった。

(5) 食食機能への影響

Survivin siRNA および Non target siRNA 投与後、ラテックスビーズを用いて、各 CHS 細胞における食食機能の影響を評価した (図 2-8)。Survivin siRNA 投与後は、投与前と比較し、すべての CHS 細胞において、貪食されたラテックスビーズの総数が有意に ($p < 0.05$) 減少した。これに対し、Non target siRNA 投与前後では、いずれの細胞においてもラテックスビーズの総数に有意な変化はみられなかった。

YM155 投与後、同様に、各 CHS 細胞における食食機能の影響を評価した (図 2-8)。YM155 投与後は、投与前と比較して、CHS-4 および DH82 の 2 つの細胞で貪食されたラテックスビーズの総数が有意に ($p < 0.05$) 減少した。これに対し、CTT および LHS においては、ラテックスビーズの総数に有意な変化はみられなかった。

3-3. CHS 細胞移植マウスの YM155 による抗腫瘍効果

(1) Survivin 発現抑制と腫瘍増殖抑制効果

CHS-4 移植マウスは、腫瘍組織片移植から約 21 日後に腫瘍体積が 100 mm³に増殖したため、マウスを前述した 4 群に分類し、各処置を実施した (第 1 病日)。これらのマウスにおいて異常行動、摂食障害または体重減少はみられなく、第 21 病日にエンドポイントに達した。その時点での腫瘍体積(マウス 3 匹の中央値)は対照群; 828 mm³、CCNU 投与群; 424 mm³、YM155 投与群; 388 mm³、YM155 と CCNU の併用投与群; 212 mm³であった (図 2-9 A および B)。各群の腫瘍体積を比較したところ、YM155

投与群は対照群より有意に小さく ($p < 0.05$)、YM155 と CCNU の併用投与群は CCNU 投与群より有意に小さかった ($p < 0.05$)。安楽殺後に剖検を実施したところ、全群で転移病巣は確認されなかった。さらに、病理組織学的検査により、すべての腫瘍病変は CHS と確定した。免疫組織化学染色および定量的 real-time PCR では YM155 投与群および YM155 と CCNU の併用群の腫瘍組織において、Survivin 発現はみられなかった (図 2-10 A および B)。

CCNU 耐性 CHS-4 移植マウスは、腫瘍組織片移植から約 18 日後に腫瘍体積が 100 mm^3 に増殖したため、マウスを前述した 4 群に分類し、各処置を実施した (第 1 病日)。これらのマウスにおいて異常行動、摂食障害または体重減少はみられなく、第 21 病日にエンドポイントに達した。その時点での腫瘍体積 (マウス 3 匹の中央値) は対照群 ; 808 mm^3 、CCNU 投与群 ; 784 mm^3 、YM155 投与群 ; 386 mm^3 、YM155 と CCNU の併用投与群 ; 236 mm^3 であった (図 2-9 A)。各群の腫瘍体積を比較したところ、YM155 投与群は対照群より有意に小さく ($p < 0.05$)、YM155 と CCNU の併用投与群は CCNU 投与群より有意に小さかった ($p < 0.05$)。安楽殺後に剖検を実施したところ、全群で転移病巣は確認されなかった。さらに、病理組織学的検査により、すべての腫瘍病組織は CHS と確定した。免疫組織化学染色および定量的 real-time PCR では YM155 投与群および YM155 と CCNU の併用群の腫瘍病変において、Survivin 発現はみられなかった。

CTT 移植マウスは、腫瘍組織片移植から約 8 日後に腫瘍体積が 100 mm^3 に増殖したため、マウスを前述した 4 群に分類し、各処置を実施した (第 1 病日)。これらのマウスにおいて異常行動、摂食障害または体重減少はみられなく、第 15 病日にエンドポイントに達した。その時点での腫瘍体積 (マウス 3 匹の中央値) は対照群 ; $1,028 \text{ mm}^3$ 、CCNU 投与群 ; 748 mm^3 、YM155 投与群 ; 452 mm^3 、YM155 と CCNU の併用投与群 ; 206 mm^3 で

あった（図 2-9 A）。各群の腫瘍体積を比較したところ、YM155 投与群は対照群より有意に小さく（ $p < 0.05$ ）、YM155 と CCNU の併用投与群は CCNU 投与群より有意に小さかった（ $p < 0.05$ ）。安楽殺後に剖検を実施したところ、対照群の 3 匹中 1 匹で肺転移病巣が確認された。さらに、病理組織学的検査により、すべての腫瘍病変および転移病巣は CHS と確定した。免疫組織化学染色および定量的 real-time PCR では YM155 投与群および YM155 と CCNU の併用群の腫瘍組織において、Survivin 発現はみられなかった。

CCNU 耐性 CTT 移植マウスは、腫瘍組織片移植から約 6 日後に腫瘍体積が 100 mm³に増殖したため、マウスを前述した 4 群に分類し、各処置を実施した（第 1 病日）。これらのマウスにおいて異常行動、摂食障害または体重減少はみられなく、第 12 病日にエンドポイントに達した。その時点での腫瘍体積（マウス 3 匹の中央値）は対照群；1,080 mm³、CCNU 投与群；978 mm³、YM155 投与群；768 mm³、YM155 と CCNU の併用投与群；312 mm³であった（図 2-9 A）。各群の腫瘍体積を比較したところ、YM155 投与群は対照群より有意に小さく（ $p < 0.05$ ）、YM155 と CCNU の併用投与群は CCNU 投与群より有意に小さかった（ $p < 0.05$ ）。安楽殺後に剖検を実施したところ、対照群の 3 匹中 2 匹、CCNU 投与群の 3 匹中 2 匹で肺転移病巣が確認された。さらに、病理組織学的検査により、すべての腫瘍病変および転移病巣は CHS と確定した。免疫組織化学染色および定量的 real-time PCR では YM155 投与群および YM155 と CCNU の併用群の腫瘍組織において、Survivin 発現はみられなかった。

LHS 移植マウスは、腫瘍組織片移植から約 10 日後に腫瘍体積が 100 mm³に増殖したため、マウスを前述した 4 群に分類し、各処置を実施した（第 1 病日）。これらのマウスにおいて異常行動、摂食障害または体重減少はみられなく、第 18 病日にエンドポイントに達した。その時点での腫瘍体積（マウス 3 匹の中央値）は対照群；1,012 mm³、CCNU 投与群；662

mm³、YM155 投与群；380 mm³、YM155 と CCNU の併用投与群；146 mm³であった（図 2-9 A）。各群の腫瘍体積を比較したところ、YM155 投与群は対照群より有意に小さく（ $p < 0.05$ ）、YM155 と CCNU の併用投与群は CCNU 投与群より有意に小さかった（ $p < 0.05$ ）。安楽殺後に剖検を実施したところ、対照群の 3 匹中 2 匹、CCNU 投与群の 3 匹中 1 匹で肺転移病巣が確認された。さらに、病理組織学的検査により、すべての腫瘍病変および転移病巣は CHS と確定した。免疫組織化学染色および定量的 real-time RT-PCR では YM155 投与群および YM155 と CCNU の併用群の腫瘍組織において、Survivin 発現はみられなかった。

CCNU 耐性 LHS 移植マウスは、腫瘍組織片移植から約 8 日後に腫瘍体積が 100 mm³に増殖したため、マウスを前述した 4 群に分類し、各処置を実施した（第 1 病日）。これらのマウスにおいて異常行動、摂食障害または体重減少はみられなく、第 15 病日にエンドポイントに達した。その時点での腫瘍体積（マウス 3 匹の中央値）は対照群；998 mm³、CCNU 投与群；986 mm³、YM155 投与群；582 mm³、YM155 と CCNU の併用投与群；158 mm³であった（図 2-9 A）。各群の腫瘍体積を比較したところ、YM155 投与群は対照群より有意に小さく（ $p < 0.05$ ）、YM155 と CCNU の併用投与群は CCNU 投与群より有意に小さかった（ $p < 0.05$ ）。安楽殺後に剖検を実施したところ、対照群の 3 匹中 2 匹、CCNU 投与群の 3 匹中 1 匹で肺転移病巣が確認された。さらに、病理組織学的検査により、すべての腫瘍病変および転移病巣は CHS と確定した。免疫組織化学染色および定量的 real-time PCR では YM155 投与群および YM155 と CCNU の併用群の腫瘍組織において、Survivin 発現はみられなかった。

（2）抗癌剤耐性関連遺伝子発現量の影響

安楽殺後、採取した腫瘍検体における抗癌剤耐性関連遺伝子（MGMT、ABCB1 および ABCC2）の発現量を real-time RT-PCR により解析した（図 2-11）。それぞれの対応する群において mRNA 発現量を比較したところ、

YM155 投与群のすべての抗癌剤耐性関連遺伝子発現量は対照群より有意に低く ($p < 0.05$)、同様に、YM155 と CCNU の併用投与群のすべての発現量は CCNU 投与群より有意に低かった ($p < 0.05$)。

表 2-4 CHS を発症した 30 症例の情報（一部の情報は、表 1-2 と重複）

No	品種※ ¹	病変部	FFP (日)※ ²	ST (日)※ ³	転移※ ⁴	Survivin 発現量※ ⁵
1	BMD	関節	189	224	－	98
2	BMD	関節	／	142	－	164
3	FCR	肺	63	82	不明	296
4	WC	肺	105	／	不明	368
5	GR	関節	／	42	＋	336
6	FCR	関節	315	364	－	136
7	WC	肺	42	71	不明	386
8	FCR	脾臓	21	38	－	398
9	WC	肺	126	198	不明	128
10	BMD	脾臓	／	3	－	812
11	FCR	関節	252	／	－	82
12	WC	肺	／	96	不明	264
13	BMD	眼球	147	180	＋	417
14	WC	肺	84	112	不明	214
15	WC	肺	84	／	不明	452
16	BMD	皮膚	21	50	＋	696
17	GR	関節	63	92	－	282
18	WC	肺	／	9	不明	418
19	FCR	肝臓	／	82	＋	636
20	FB	関節	42	／	＋	388
21	BMD	脾臓	／	8	－	1024
22	WC	肺	／	22	不明	560
23	Mix	関節	／	86	＋	324
24	BMD	肝臓	／	28	－	462
25	BMD	肺	／	97	不明	342
26	FCR	骨盤	42	65	＋	486
27	FCR	関節	105	／	－	180
28	BMD	関節	126	164	－	124
29	BMD	関節	／	105	＋	376
30	FCR	関節	63	／	－	308

次頁に続く

(前頁の続き)

- ※1 : BMD : バーニーズマウンテンドッグ、FB : フレンチブルドッグ、
FCR : フラットコーテッドレトリバー、GR : ゴールデンレトリバー、WC : ウェルシュコーギー
- ※2 : FFP : 無疾病期間 (CCNU 投与から完全緩解または部分緩解が持続した日数 [21 日未満は対象から除外])
- ※3 : ST : 生存期間 (初診日から CHS の原因による死亡日まで)
- ※4 : 初診時に確認された肺転移病巣の有無 (肺原発性 CHS は不明と表記)
- ※5 : 定量的 real-time RT-PCR による測定 (犬の線維芽細胞における Survivin)

表 2-5 siRNA および YM155 による抗癌剤感受性の影響

細胞株	CCNU (μ M)			DOX (μ M)		
	処 理 前	処 理 後 [※]		処 理 前	処 理 後 [※]	
		siRNA	YM155		siRNA	YM155
CHS-4	18.2	3.2	6.8	1.2	0.8	0.4
CTT	96.6	24.6	106.4	12.6	6.6	10.8
DH82	86.4	7.2	8.6	8.6	1.8	1.6
LHS	42.6	18.6	36.9	18.4	2.4	20.4

※ 処理後：Survivin siRNA および YM155 投与から 48 時間後
CCNU；ロムスチン、DOX；ドキソルビシン

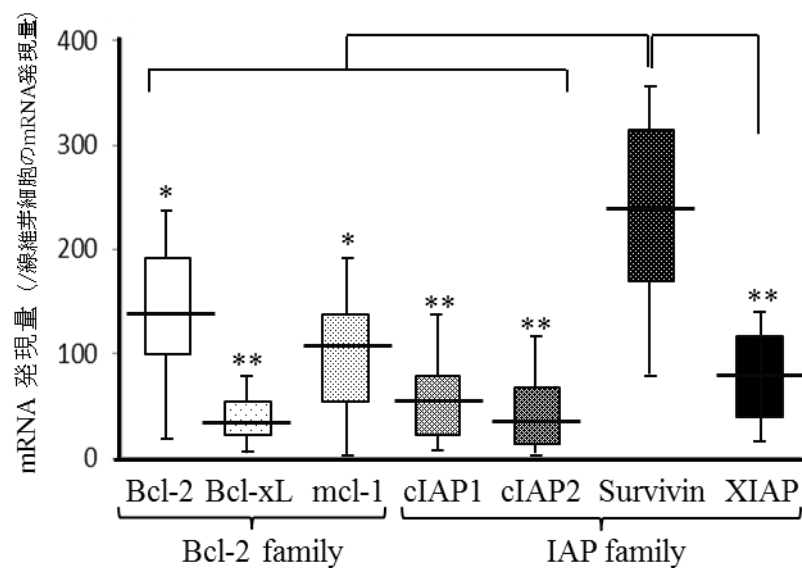


図 2-1 CHS の 30 症例におけるアポトーシス抑制遺伝子
発現量の比較解析

CHSを発症した犬 30 例から採材した腫瘍検体における Bcl-2、Bcl-xL、mcl-1、cIAP1、cIAP2、Survivin および XIAP を含むアポトーシス抑制遺伝子の mRNA 発現量を定量的 real-time RT-PCR で比較解析した。すべての遺伝子発現量は犬の線維芽細胞における同じ遺伝子の発現量によって補正した。各アポトーシス抑制遺伝子発現量の中央値を — で示した。Survivin 発現量と、他のアポトーシス抑制遺伝子発現量との有意差をマン・ホイットニーの U 検定で算出した (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。

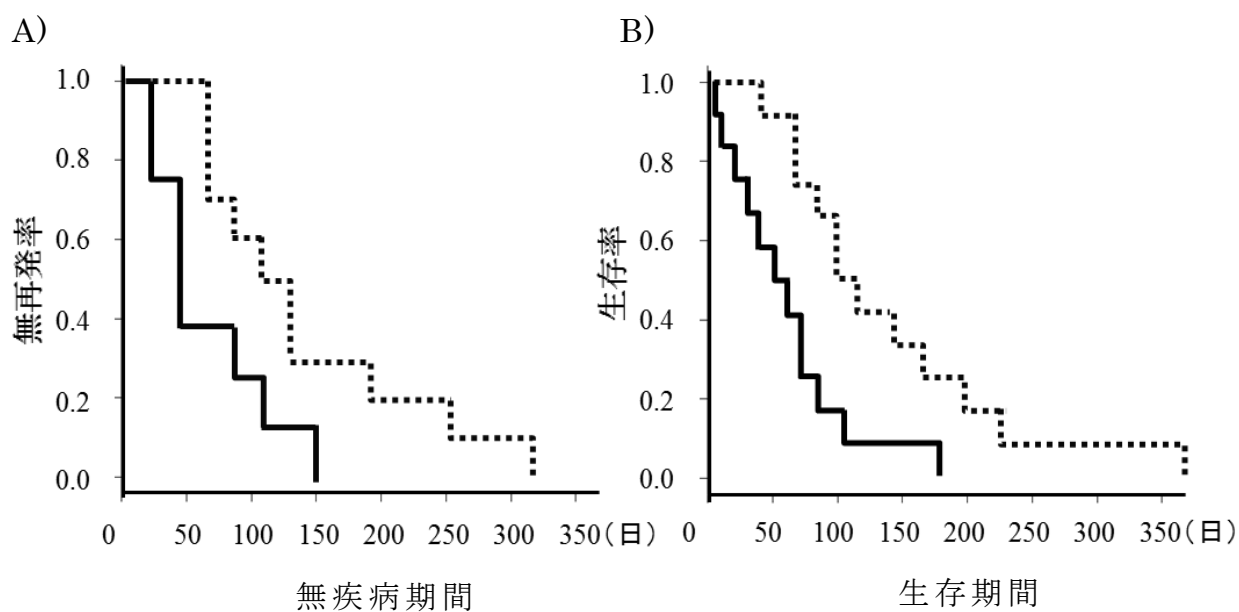


図 2-2 CHS 症例における Survivin 遺伝子発現量と予後との関連性

A) CHS の 18 症例における Survivin 遺伝子発現量と無疾病期間の関連性を評価した ($p = 0.026$)。B) CHS の 24 症例の Survivin 遺伝子発現量と生存期間の関連性を評価した ($p = 0.009$)。Survivin 遺伝子発現量は定量的 real-time RT-PCR で測定した。いずれも、CHS 症例はその中央値を基準に Survivin 発現量の高い群 (—) と低い群 (.....) に分類し、両群を Kaplan-Meier 曲線で比較した。両群の有意差はウィルコクソンの符号順位検定で示した。

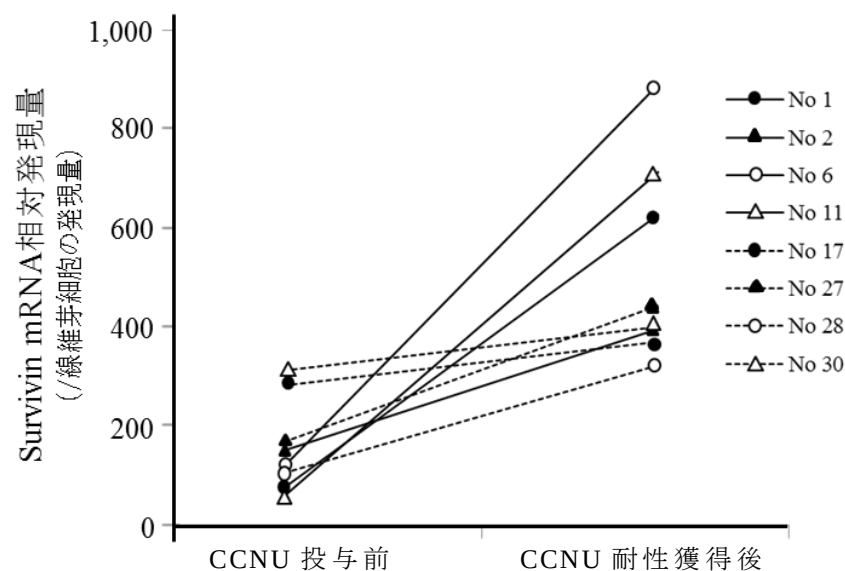


図 2-3 CHS 症例における Survivin 遺伝子発現量
と抗癌剤耐性との関連性

関節を原発とした CHS のうち、CCNU 投与から 1 クール（21 日）以内に完全緩解または部分緩解がみられた犬 8 症例を対象とした。各症例の CCNU 投与前と CCNU 耐性獲得後からそれぞれ腫瘍検体を採材し、Survivin 遺伝子発現量を定量的 real-time RT-PCR で比較した。すべての遺伝子発現量は犬の線維芽細胞における Survivin 遺伝子の発現量によって補正した。CCNU 投与前と CCNU 耐性獲得後における Survivin 遺伝子発現量の有意差は、マン・ホイットニーの U 検定を実施した ($p < 0.01$)。

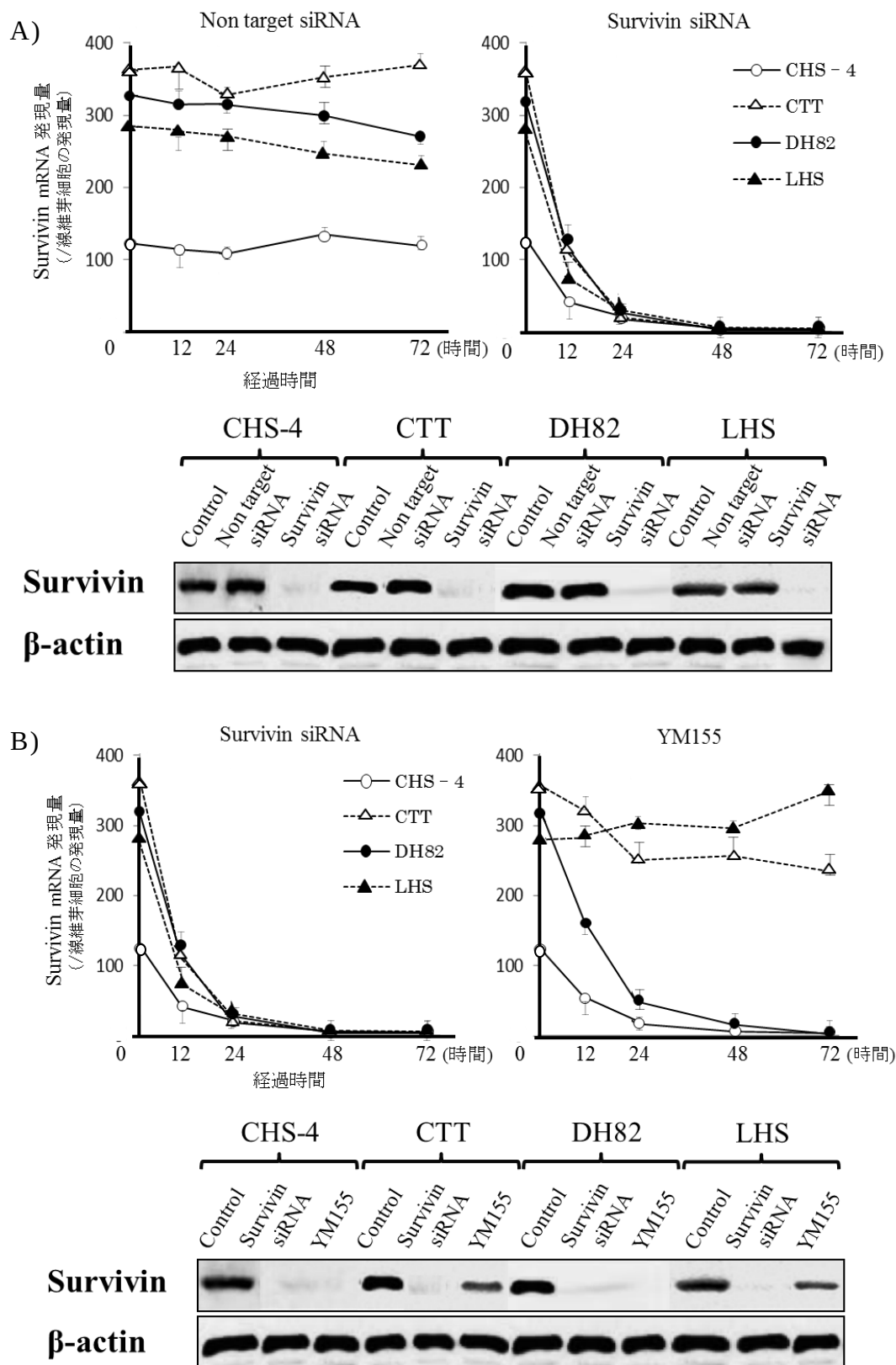


図 2-4 siRNA および YM155 による Survivin 発現量

次頁に続く

(前頁の続き)

A) Non target siRNA および Survivin siRNA を各 CHS 細胞にそれぞれ投与し、12、24、48 および 72 時間後に Survivin 遺伝子発現を定量的 real-time RT-PCR で評価した (上)。すべての遺伝子発現量は犬の線維芽細胞における Survivin 遺伝子発現量で補正した。グラフは平均値±標準偏差値で示した。Non target siRNA および Survivin siRNA を各 CHS 細胞にそれぞれ投与し、48 時間後に Survivin タンパク発現をウエスタンブロットで評価した (下)。B) YM155 を各 CHS 細胞にそれぞれ投与し、12、24、48 および 72 時間後に Survivin 遺伝子発現を定量的 real-time RT-PCR で評価した (上)。すべての遺伝子発現量は犬の線維芽細胞における Survivin 遺伝子発現量で補正した。グラフは平均値±標準偏差値で示した。YM155 を各 CHS 細胞に投与し、48 時間後に Survivin のタンパク発現をウエスタンブロットで評価した (下)。

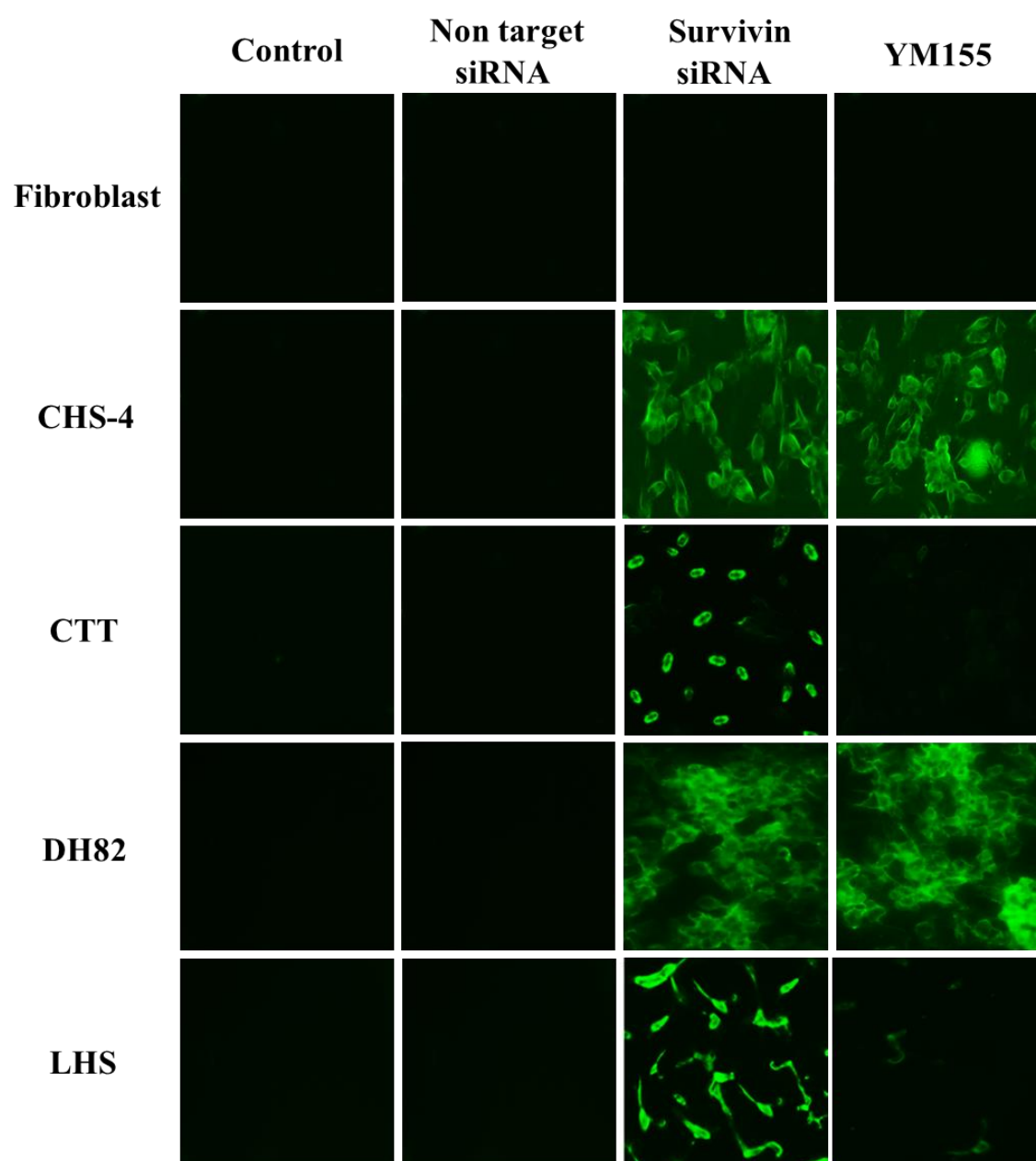


図 2-5 siRNA および YM155 によるアポトーシスの誘導

各細胞に Non target siRNA、Survivin siRNA および YM155 をそれぞれ投与し、48 時間後にアネキシン V 染色でアポトーシスを検出した。

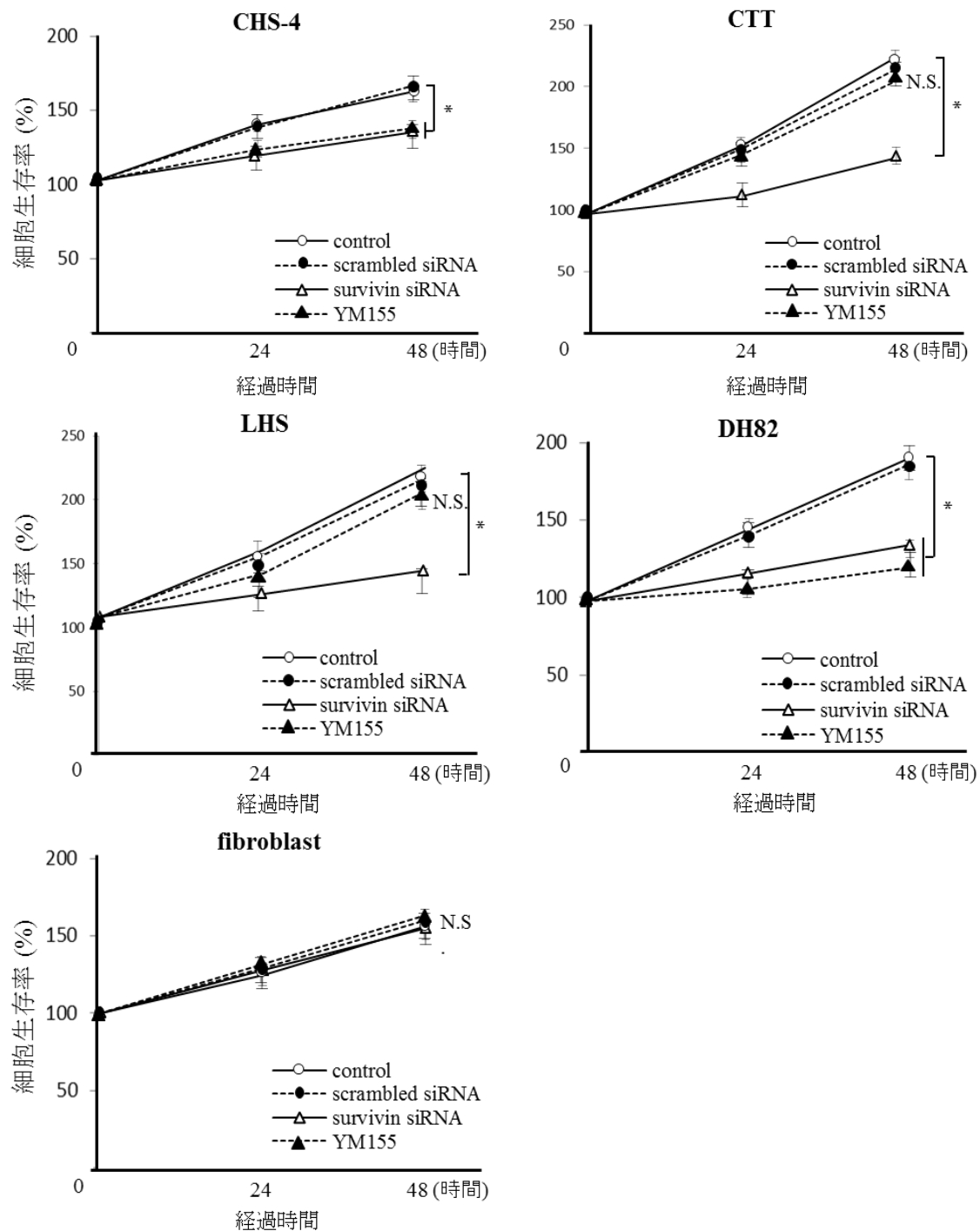


図 2-6 siRNA および YM155 による細胞生存率

各細胞に Non target siRNA、Survivin siRNA および YM155 をそれぞれ投与し、24 および 48 時間後に MTT アッセイで細胞生存率を評価した。グラフは平均値±標準偏差値で示し、対照と比較した有意差はダネット検定で算出した (N.S: 有意差なし、* $p < 0.05$)。

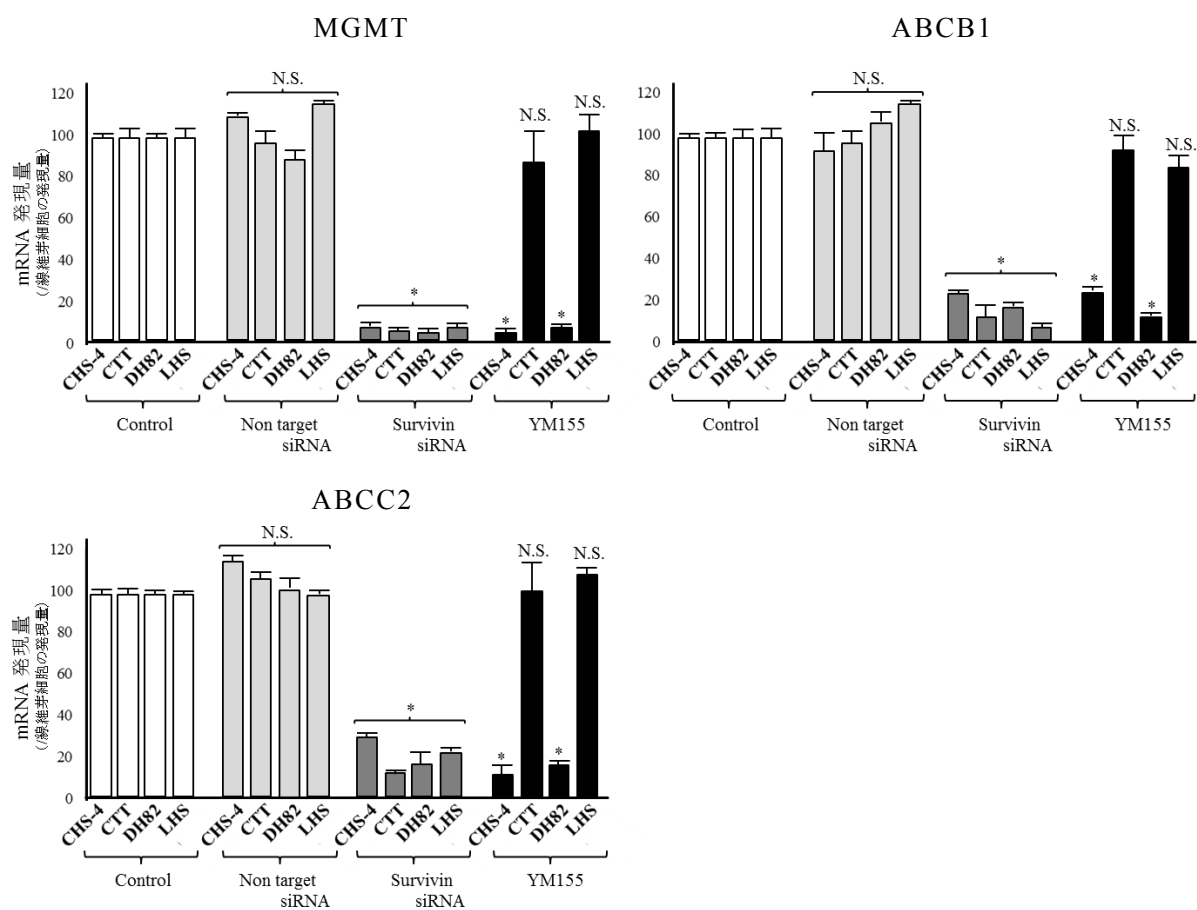


図 2-7 siRNA および YM155 による MGMT、ABCB1 および ABCC2 遺伝子発現量の変化

Non target siRNA、Survivin siRNA および YM155 を各 CHS 細胞に、それぞれ投与し、48 時間後に抗癌剤耐性関連遺伝子である MGMT、ABCB1 および ABCC2 の発現量を定量的 real-time RT-PCR で相対評価した。すべての遺伝子は対照における同じ遺伝子発現量で補正した。グラフは平均値±標準偏差値で示し、対照と比較した有意差はダネット検定で算出した (N.S: 有意差なし、* $p < 0.05$)。

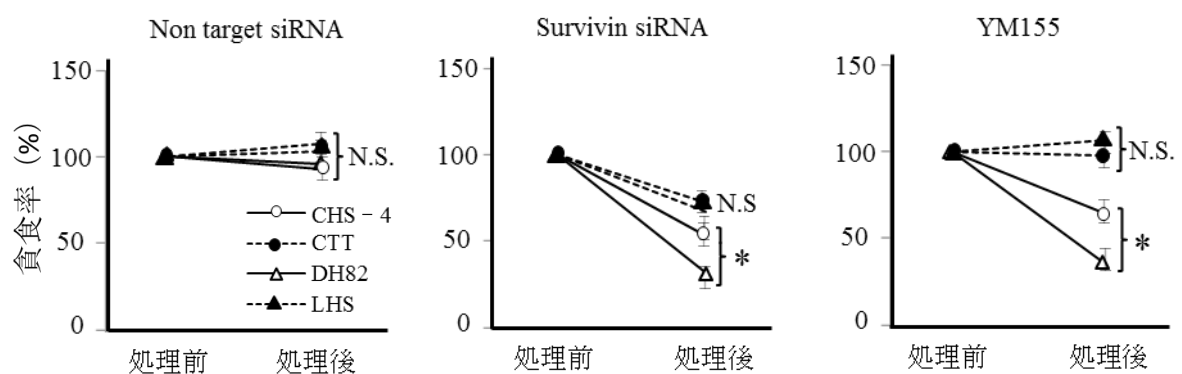
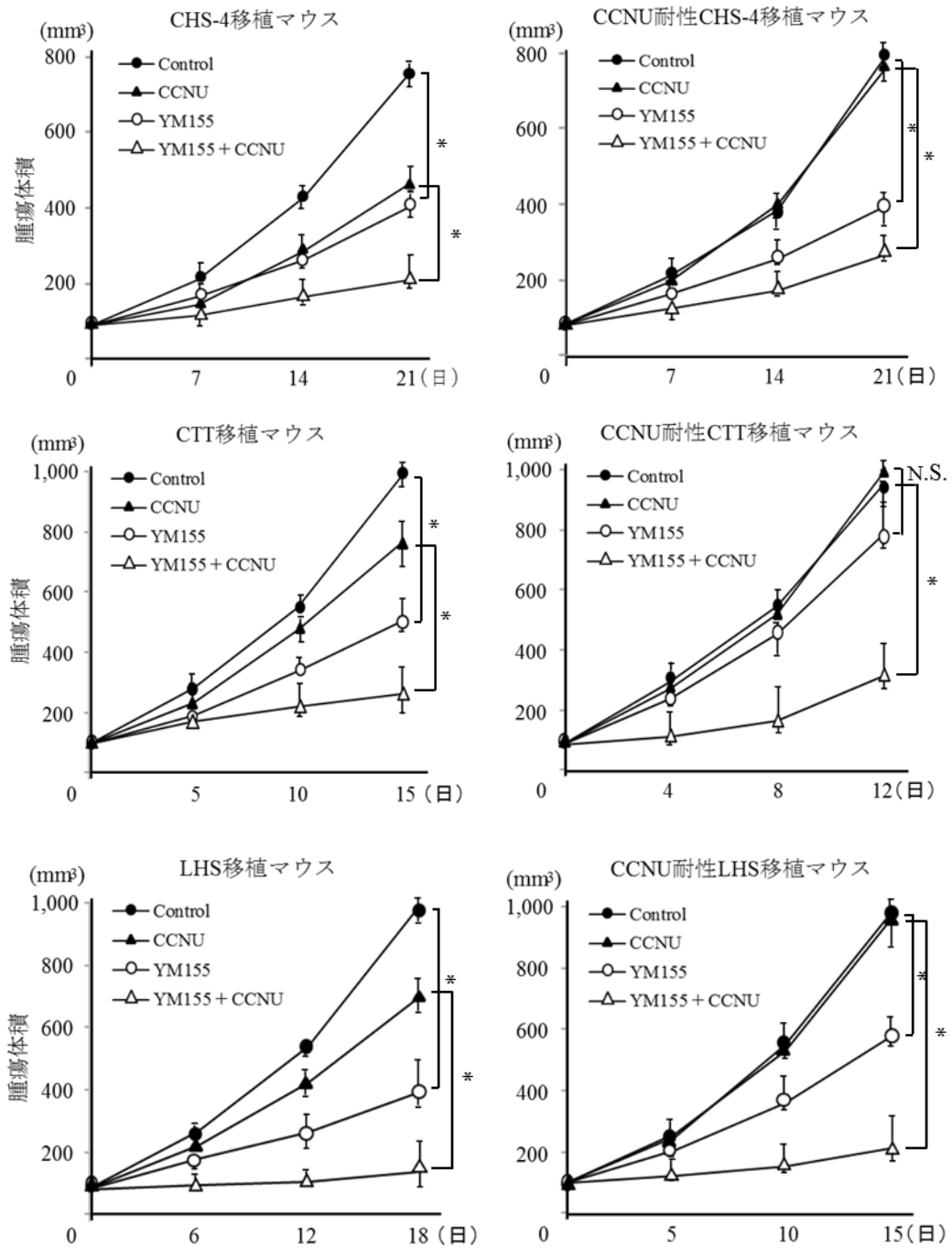


図 2-8 siRNA および YM155 による食食機能の変化

Non target siRNA、Survivin siRNA および YM155 を各 CHS 細胞に、それぞれ投与し、48 時間後に食食率（細胞内に取り込まれたラテックスビーズの総数）を画像解析装置で相対評価した。グラフは平均値±標準偏差値で示し、対照と比較した有意差はマン・ホイットニーの U 検定で算出した（N.S：有意差なし、* $p < 0.05$ ）。

A)



次頁に続く

(前頁の続き)

B)

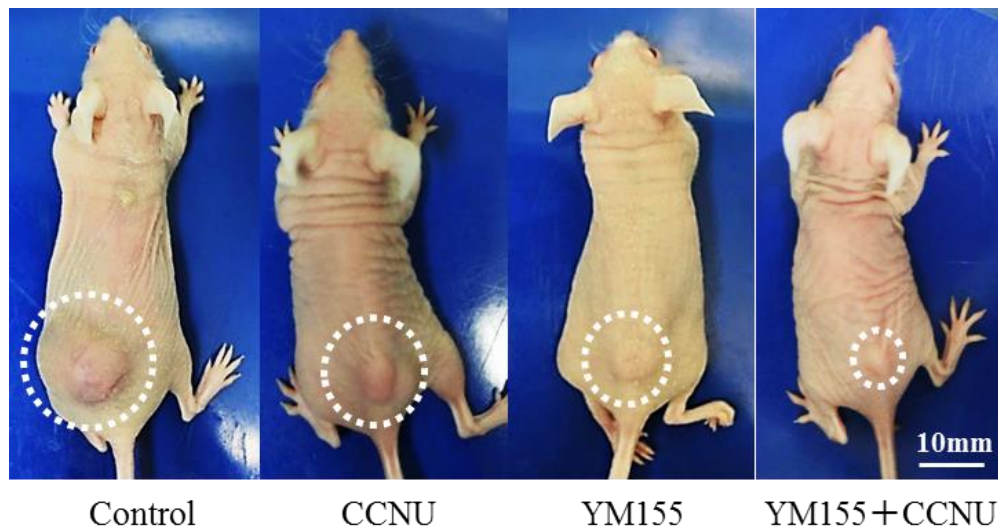


図 2-9 CHS 細胞移植マウスにおける YM155 投与後の腫瘍
増殖抑制効果

A) 各 CHS 細胞移植マウスに YM155 を投与し、定期的に腫瘍体積(長軸×短軸×高さ×0.5)を測定した。グラフは平均値±標準偏差値で示し、対照と CCNU 投与群で比較した有意差はマン・ホイットニーの U 検定で算出した (N.S: 有意差なし、* $p < 0.05$)。B) YM155 投与から 21 日後の CHS-4 細胞移植マウスの腫瘍肉眼所見 (図中のバーは 10mm) を示した。

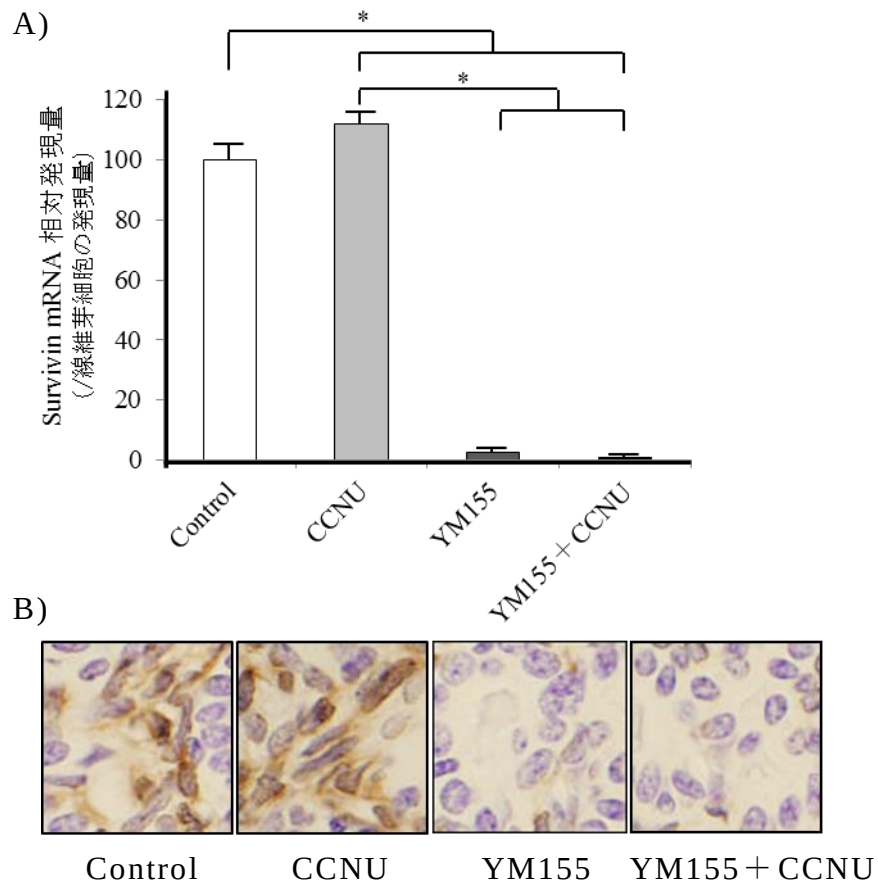


図 2-10 CHS 細胞移植マウスにおける YM155 投与後の Survivin 発現量

A) 安楽殺後に、YM155 を投与した各 CHS 細胞移植マウスから採材した腫瘍検体における Survivin 遺伝子発現量を定量的 real-time PCR で評価した。すべての遺伝子発現量は対照マウスの腫瘍における Survivin 遺伝子発現量で補正した (本グラフは CHS-4 移植マウスの Survivin 遺伝子発現量)。グラフは平均値±標準偏差値で示し、対照と CCNU 投与群で比較した有意差はマン・ホイットニーの U 検定で算出した ($*p < 0.05$)。B) 安楽殺後に、YM155 を投与した各 CHS 細胞移植マウスから採材した腫瘍検体における Survivin タンパク発現量を免疫組織化学染色で評価した (図は CHS-4 移植マウスの組織像)。

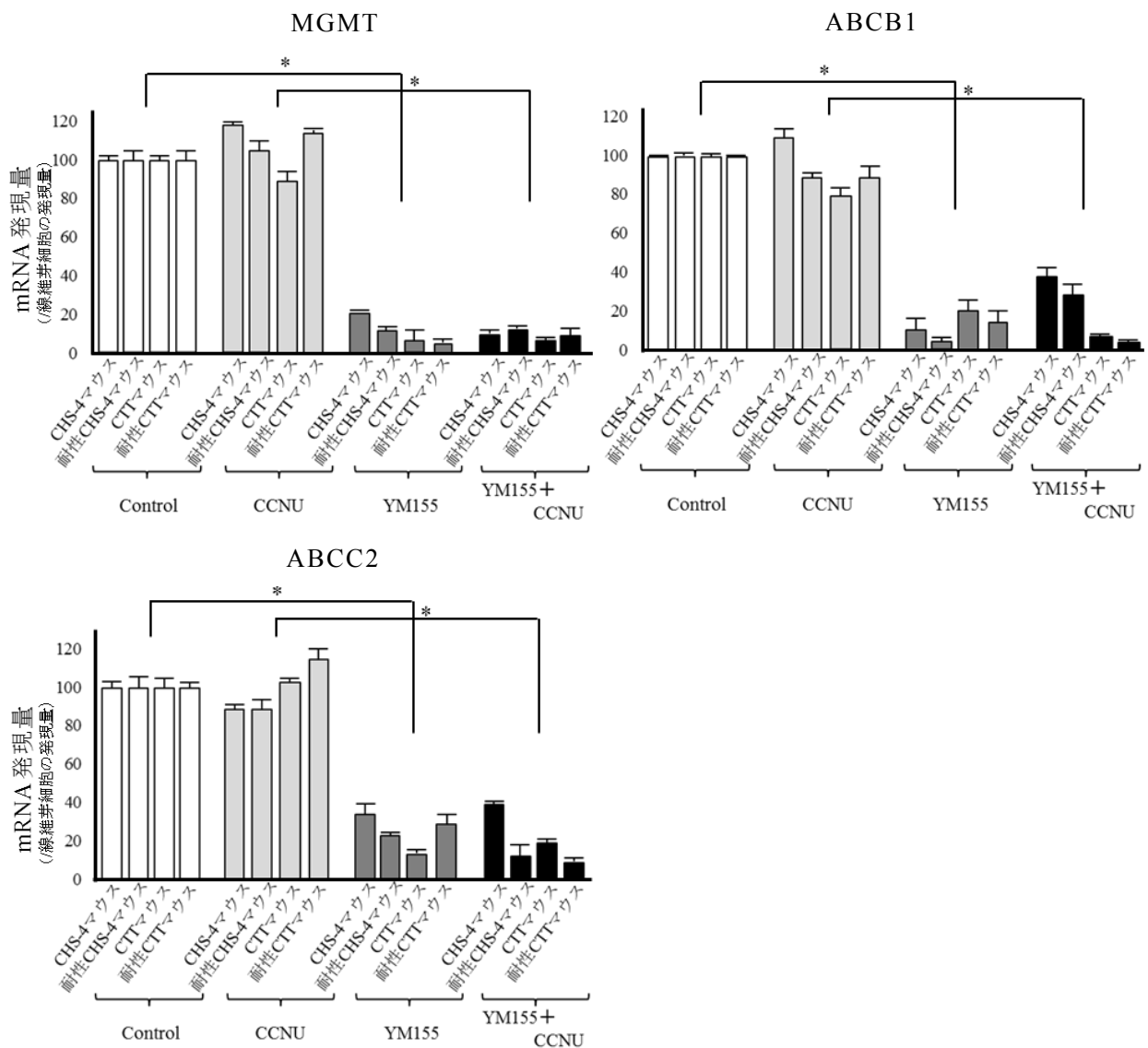


図 2-11 CHS 細胞移植マウスにおける YM155 投与後の MGMT、ABCB1 および ABCC2 遺伝子発現量の変化

安楽殺後に、YM155 を投与した各 CHS 細胞移植マウスから採材した腫瘍検体における MGMT、ABCB1 および ABCC2 を含む抗癌剤耐性関連因子遺伝子発現量を定量的 real-time RT-PCR で相対評価した。すべての遺伝子発現量は対照マウスの腫瘍における同じ抗癌剤耐性関連遺伝子の発現量で補正した。グラフは平均値±標準偏差値で示し、対照と CCNU 投与群で比較した有意差はマン・ホイットニーの U 検定で算出した (* $p < 0.05$)。

4. 考 察

本研究の結果では、多くの IAP のなかでも、特に Survivin が CHS に高発現していることが判明した。臨床例においても Survivin 発現量の高い CHS 症例は低い症例と比較し、CCNU 耐性や転移リスクの向上などにより、その無疾病期間および生存期間が有意に短かった。悪性黒色腫、前立腺癌および乳腺癌を含む複数の癌患者を対象に行った人医療の臨床研究においても、Survivin 高発現量は予後不良のリスクファクターである可能性を示唆している (Takeuchi ら, 2005 ; Lv ら, 2010 ; Tolcher ら, 2012)。したがって、臨床研究からも Survivin は CHS の病態進行過程および生物学的挙動に反映した予後因子のひとつである可能性が示唆された。Survivin は細胞質および核内の広い領域でその発現が確認されているが、現在、細胞分裂過程 G₂/M 期における核内 Survivin が、細胞分裂やアポトーシスの制御において、より重要であると考えられている (Preuss ら, 2008 ; Xie ら, 2012 ; Mulay ら, 2013)。予後因子として Survivin を確定するためには、今後、核内 Survivin 発現量と症例の予後との関連性をさらに詳細に解明する必要がある。

CHS 細胞株を用いた本研究の結果では、Survivin 発現抑制により、細胞増殖能、アポトーシス、抗癌剤耐性および貪食機能を含む生物学的挙動の変化が確認された。Survivin siRNA 導入から 24 時間以降に、すべての CHS 細胞株において細胞生存率の低下およびアポトーシスの誘導がほぼ同時に確認されたが、正常細胞である線維芽細胞では変化がみられなかった。Survivin は悪性腫瘍の細胞分裂過程 G₂/M 期において、最も強く発現し、その増殖機能および特定の細胞増殖因子の活性化を優先的に、援助している (Ambrosini ら, 1997 ; Shoeneman ら, 2012)。今回得られた結果からも、Survivin 発現抑制後、他の生物活性と比較して、細胞増殖抑制やアポトーシスが最も早くから観察することができた。したがって、増殖サ

イクルの早い腫瘍細胞ほど、Survivin 発現抑制による増殖抑制効果が高いことが考えられる。

Survivin siRNA 導入から 48 時間後、すべての CHS 細胞株において、CCNU と DOX 感受性の増加ならびに、MGMT、ABCB1 および ABCC2 を含む抗癌剤耐性関連遺伝子の発現抑制が確認された。これらの遺伝子は犬リンパ腫など特定の悪性腫瘍において後天的に獲得する多剤耐性因子として知られている (Tomiyasu ら, 2010)。ある研究では、Survivin 発現抑制はアポトーシスを遅延させる細胞内テロメラーゼ活性を抑制し、癌細胞の薬剤抵抗性を非特異的に弱めると指摘している (Endoh ら, 2005)。本研究においては、Survivin 発現が抑制されたことにより、抗癌剤耐性関連遺伝子発現量が低下した。MGMT は DNA 修復能を援助し、ABCB1 および ABCC2 は薬剤排泄能を調節している (Tomiyasu ら, 2010; Silber ら, 2012)。したがって、抗癌剤感受性の増加は、これらの機能低下により生じたと考えられた。細胞の由来に関わらず、後天的に獲得した高い抗癌剤抵抗性を示す CHS 細胞に対しても、Survivin 発現を抑制することで、再び、既存の抗癌剤による抗腫瘍効果が臨床的にも示されるかもしれない。

Survivin siRNA 導入から 48 時間後、すべての CHS 細胞株における貪食機能の低下が確認された。Survivin 発現量と貪食機能の関連性は不明である。ある報告では癌細胞における他組織や血管内における移動や浸潤などの器械的運動能力は Survivin の高い発現量に依存し、結果として転移率の向上に関与していることが示唆されている (Salz ら, 2005; Yang ら, 2000; McKenzie ら, 2010)。また、ヒト悪性黒色腫細胞株の Survivin 発現量を増加させた研究では、その移動能の上昇が確認されている (Chu ら, 2012)。これらの現象は Survivin 発現抑制により、細胞運動能に関連した Akt および $\alpha 5$ -integrin などの修飾因子の失活または、その発現量が低下したためと推測される (McKenzie ら, 2010)。しかし、本研究では Survivin siRNA 導入後、CHS 細胞の種類により、貪食機能低下の程度に

差が生じた。したがって、本現象は **Survivin** 以外にも、その他の関連因子の存在が影響していると考えられた。

もう一つの **Survivin** 発現阻害剤である **YM155** を用いて、同様に、4 つの **CHS** 細胞株に対する基礎的検討を行ったところ、**CTT** および **LHS** の 2 つの細胞で有意な **Survivin** 発現抑制はみられなかった。他の **CHS-4** および **DH82** で確認されたアポトーシス、細胞増殖率の低下、抗癌剤抵抗性および食欲機能の低下を含む抑制的な生物学的活性は、これらの 2 つの細胞においては著明に認められなかった。腫瘍細胞の薬剤耐性獲得機序は、急速な細胞分裂による投与薬物の希釈および排泄機能の活性化などが報告されている (**Hanahan** と **Weinberg**, 2010)。ある研究において、複数のヒト前立腺癌の細胞株に **YM155** を投与したところ、増殖速度が速い細胞ほど **YM155** の 50%抑制濃度が高く、いずれの細胞増殖抑制率も濃度依存的に上昇した (**Nakahara** ら、2007 ; **Nakahara** ら、2011)。さらに、同じ細胞の移植マウスを用いた報告では、同期間において **YM155** 低濃度皮下投与は高濃度静脈内投与よりも有意に腫瘍増殖抑制効果を示した (**Nakahara** ら、2007 ; **Nakahara** ら、2011)。したがって、各 **CHS** 細胞による **YM155** の有効濃度の違いもまた、薬物排泄能および代謝速度に依存していることが考えられた。**Survivin** 発現抑制のための有効濃度を維持するためには、単回投与ではなく、**YM155** を低濃度で長期間、持続投与する必要があるかもしれない。

CHS-4、**CTT** および **LHS** 細胞移植マウスに対し、**YM155** 単独投与や **CCNU** と **YM155** の併用は、いずれも有意な抗腫瘍効果を示した。さらに、**CCNU** 単独使用による抗腫瘍効果がみられなかった **CCNU** 耐性 **CHS-4**、**CCNU** 耐性 **CTT** および **CCNU** 耐性 **LHS** 移植マウスにおいても、**YM155** 単独投与や **CCNU** と **YM155** の併用は著明な抗腫瘍効果を示した。さらに、摂食障害、体重減少などの異常行動も認められなかった。マウス生体内に投与された **YM155** の半減期は正常組織や血液中では平均 72 時間であるが、

腫瘍内ではその 50 倍近い濃度で 96 時間以上も特異的に蓄積するため、低濃度でも十分な持続効果を示し、重篤な全身性の副作用も認められない (Nakahara ら、2007 ; Giaccone ら、2009 ; Tolcher ら、2012)。したがって、細胞分裂速度が比較的速い CTT および LHS を用いた移植マウスにおいても、局所的な持続効果により抗腫瘍効果を示したと考えられた。CCNU 耐性マウスにおける YM155 の抗腫瘍効果は腫瘍組織における MGMT、ABCB1 および ABCC2 の遺伝子発現量が低下したことによる薬剤排泄能の低下および DNA 修復能の低下に続発した結果であると考えられた。

YM155 が投与されたマウスはいずれも転移病巣は検出されなかった。ある研究では、Survivin 遺伝子を悪性黒色腫細胞に導入し、その発現量を増加させると、がん転移の進行機序を担う Akt の活性および $\alpha 5$ インテグリンの発現増強が誘導され、転移率および浸潤能が上昇すると結論づけている (McKenzie ら、2010)。また、他の研究では、Survivin は血管内皮成長因子のひとつである VEGF-C の発現を調節しているため、その発現変動により、腫瘍血管増生に起因した転移リスクが高まると報告している (Cai ら、2012 ; Li ら、2012)。本研究では Survivin と転移率との関連性は不明であるが、Survivin 発現抑制により、前述した関連因子の発現量および活性レベルが変化し、CHS の細胞移動能に抑制的影響が生じたかもしれない。

本研究の結果から、Survivin 発現量は CHS の生物学的挙動および病態の進行過程に関与し、その予後に反映していると考えられた。また、CHS 細胞株における Survivin 発現抑制は、細胞の生物学的活性を有意に低下させ、さらに、腫瘍増殖抑制効果ならびに、抗癌剤感受性の増加や転移率の減少を示した。以上より、Survivin は CHS における遺伝子治療の有効な標的になると期待された。今後、正常犬に対する安全性の評価、プロトコルの改善ならびに、放射線療法やその他の抗癌剤との併用による増強効果など、前臨床試験として実施すべき基礎的検討の課題が残されている。

5. 小 括

本章では、CHS の生物学的挙動と Survivin 発現量の関連性を調査し、Survivin 標的治療における基礎的検討を行った。複数の IAP 遺伝子の中から、Survivin は CHS に特異的に高発現したため、分子標的療法の候補遺伝子として選出した。さらに、Survivin 発現量の高い CHS 症例は、低い症例と比較し、無疾病期間および生存期間が短く、抗癌剤に対する高い抵抗性を示した。また、CHS 細胞株における Survivin 発現抑制は細胞増殖率の低下、抗癌剤感受性の増加、抗癌剤耐性関連遺伝子発現量の低下および貪食率の低下を含む生物学的活性を有意に低下させた。CHS 細胞移植マウスに対する Survivin 発現抑制においても、腫瘍増殖抑制効果に加え、抗癌剤感受性の増加や転移率の減少が確認された。以上より、Survivin は CHS における遺伝子治療の有効な標的になると期待された。

総 括

犬の組織球性肉腫 (CHS) は樹状細胞または、マクロファージに由来し、不特定の組織形態を示すことが多い。そのため、従来の病理組織学的評価のみでは、確実な診断結果が得られない。また、CHS は遠隔転移率や局所浸潤性が高く、抗癌剤耐性を容易に獲得するなど、生物学的・臨床学的挙動も極めて悪い。したがって、CHS に対する迅速かつ確実な診断・治療法の確立がより高く要求される。本研究の目的は、CHS 細胞の表面抗原解析による迅速かつ正確な診断法の確立とともに本腫瘍の効果的な遺伝子治療法の確立に必要な基礎的情報を得ることである。

第 1 章では CHS の表面抗原解析による遺伝子診断法の開発を試みた。CHS 細胞では MHC クラス II、CD11b、CD11c および CD86 を含む特定の表面抗原が高発現しているため、これらの 4 つの標的因子を遺伝子レベルで定量解析することで、迅速かつ客観的に CHS を検出できることが予想された。定量的 real-time PCR を用いた表面抗原の遺伝子解析結果では、MHC クラス II、CD11b、CD11c および CD86 の遺伝子発現量はその他の腫瘍疾患および CHS の類似疾患と比較し、CHS に有意に高発現し、有用性の高い診断精度を示した。本法は迅速かつ簡便であり、客観的で再現性も高かった。さらに、微量検体でも CHS の診断材料となるため、病理組織学的診断の欠点を補う高精度な診断法として期待できた。

第 2 章では CHS の分子標的療法の開発に関する基礎的研究を行った。悪性腫瘍の病態メカニズムに関連している複数のアポトーシス抑制因子の中から、Survivin を選択した。さらに、CHS の生物学的挙動と Survivin 発現量の関連性を調査し、Survivin 標的治療における基礎的検討を行った。その結果、Survivin は CHS に特異的に高発現し、さらに、Survivin 発現量の高い CHS 症例は、低い症例と比較し、無疾病期間および生存期間が短く、抗癌剤に対する高い抵抗性を示した。また、Survivin 発現抑制は

CHS 細胞株における細胞増殖率の低下、抗癌剤感受性の増加、抗癌剤耐性関連遺伝子発現量の低下および貪食機能の低下を含む生物学的活性を有意に低下させた。CHS 細胞移植マウスに対する Survivin 発現抑制においても、腫瘍増殖抑制効果に加え、抗癌剤感受性の増加や転移率の減少が確認された。以上の結果より、Survivin は CHS における遺伝子治療の有効な標的になると期待された。

本研究では CHS の表面抗原である MHC クラス II、CD11b、CD11c および CD86 遺伝子の発現様式から本腫瘍を高精度に診断できる可能性を明らかにした。また、CHS における分子標的療法の標的遺伝子として、Survivin の特性を検討し、Survivin が本腫瘍の効果的な治療標的となることが示唆された。本法を臨床的に実用化するためには、CHS 臨床例に対する実証的な検討が必要である。

引用文献

1. Affolter, V.K. and Moore, P.F. 2002. Localized and disseminated histiocytic sarcoma of dendritic cell origin in dogs. *Vet Pathol.* 39: 74-83.
2. Amarasingh, S., Macleod, M.R. and Whittle, I.R. 2009. What is the translational efficacy of chemotherapeutic drug research in neuro-oncology? A systematic review and meta-analysis of the efficacy of BCNU and CCNU in animal models of glioma. *J Neurooncol.* 91: 117-125.
3. Ambrosini, G., Adida, C. and Altieri, D.C.A. 1997. novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.* 3: 917-921.
4. Azakami, D., Bonkobara, M., Washizu, T., Iid, A. and Kondo, M. 2006. Establishment and biological characterization of canine histiocytic sarcoma cell lines. *J Vet Med Sci.* 68: 1343-1346.
5. Bakhtiyari, S., Haghani, K., Basati, G. and Karimfar, M.H. 2013. siRNA therapeutics in the treatment of diseases. *Ther Deliv.* 4: 45-57.
6. Bala, G.D., Ozlen, K. and Betul, B. 2009. Identification of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis in normal matched breast tumor tissues. *Oncol Res.* 17: 353-365.
7. Bernard, P.S. and Wittwer, C.T. 2002. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem.* 48: 1178-1185.
8. Bonnefont-Rebeix, C., de, Carvalho, CM., Bernaud, J., Chabanne, L., Marchal, T. and Rigal, D. 2006. CD86 molecule is a specific marker for canine monocyte-derived dendritic cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 109: 167-176.
9. Bury, J.M., Skrzypek, A. and Mach-Lichota, E. 2008. Survivin in cancer diagnosis and therapy - a review. *Annales UMCS, Medicina.* LXIII(N1, 12): 78-84.

10. Cai, X., Ma, S., Gu, M., Zu, C., Qu, W. and Zheng, X. 2012. Survivin regulates the expression of VEGF-C in lymphatic metastasis of breast cancer. *Diagn Pathol.* 7:52.
11. Chu, X.Y., Chen, L.B., Wang, J.H. and Su, Q.S. 2012. Overexpression of survivin is correlated with increased invasion and metastasis of colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 105: 520-528.
12. Commer, A.R. 2008. Canine Histiocytic Diseases. *Compendium* 30: 202-208.
13. Craig, L.E. and Julian, M.E. 2002. Ferrcone JD. The diagnosis and prognosis of synovial tumours in dogs 35 cases. *Vet Pathol.* 39: 66-67.
14. Dobson, J., Villiers, E. and Roulois, A. 2006. Histiocytic sarcoma of the spleen in fla-tcoated retrievers with regenerative anaemia and hypoproteinaemia. *Vet Rec.* 158: 825-829.
15. Doveren. R.F., van, der, Linden, C.J. and Spronken, E.E. 1986. Canine MHC class II antigens on B and T lymphocytes. *Tissue Antigens* 27: 87-98.
16. Endoh, T., Tsuji, N. and Asanuma, K. 2005. Survivin enhances telomerase activity via up-regulation of specificity protein 1- and c-Myc-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription. *Exp Cell Res.* 305: 300-311.
17. Fichtner, I., Arndt, D. and Reszk, R. 1986. Antineoplastic activity and toxicity of some alkylating cytostatics (cyclophosphamide, CCNU, cytotasan) encapsulated in liposomes in different murine tumour models. *J Microencapsul.* 3: 77-87.
18. Fidel, J., Schiller, I. and Hauser, B. 2006. Histiocytic sarcomas in flat-coated retrievers: a summary of 37 cases (November 1998-March 2005). *Vet Comp Oncol.* 4: 63-74.
19. Fulmer, AK. and Mauldin, G.E. 2007. Canine histiocytic neoplasia: An

- overview. *Can Vet J.* 48: 1041-1050.
20. Fu, L.Y., Jia, H.L. and Dong, Q.Z. 2009. Suitable reference genes for real-time PCR in human HBV-related hepatocellular carcinoma with different clinical prognoses. *BMC Cancer* 9: 49.
21. Gallagher, SR. and Cole, S. 1992. DNA quantitation with a benchtop fluorometer. *Am Biotechnol Lab.* 10: 42.
22. Giaccone, G., Zatloukal, P. and Roubec, J. 2009. Multicenter phase II trial of YM155, a small-molecule suppressor of survivin, in patients with advanced, refractory, non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 27: 4481-4486.
23. Guo, W., Chen, W., Yu, W., Huang, W. and Deng, W. 2013. Small interfering RNA-based molecular therapy of cancers. *Chin J Cancer.* 10.5732/cjc.012.10280.
24. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
25. Ide, T., Uchida, K. and Kagawa, Y. 2011. Pathological and immunohistochemical features of subdural histiocytic sarcomas in 15 dogs. *J Vet Diagn Invest.* 23: 127-132.
26. Kathrani, A., Schmitz, S., Priestnall, S.L. and Smith, K.C. 2011. CD11c+ cells are significantly decreased in the duodenum, ileum and colon of dogs with inflammatory bowel disease. *J Comp Path.* 145: 359-366.
27. Kidd, M., Nadler, B. and Mane, S. 2007. GeneChip, geNorm, and gastrointestinal tumors: novel reference genes for real-time PCR. *Physiol Genomics* 30: 363-370.
28. Kipar, A., Baumgärtner, W. and Vogl, C. 1998. Immunohistochemical characterization of inflammatory cells in brains of dogs with granulomatous meningoencephalitis. *Vet Pathol.* 35: 43-52.

29. Klahn, S.L., Kitchell, B.E. and Dervisis, N.G. 2011. Evaluation and comparison of outcomes in dogs with periarticular and nonperiarticular histiocytic sarcoma. *J Am Vet Med Assoc.* 239: 90-96.
30. LaCasse, E.C., Mahoney, D.J. and Cheung, H.H. 2008. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 27: 6252-6275.
31. Li, F., Ambrosini, G. and Chu, E.Y. 1998. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nat Med.* 396: 580-584.
32. Li, X., Dang, X. and Sun, X. 2012. Expression of survivin and VEGF-C in breast cancer tissue and its relation to lymphatic metastasis. *Eur J Gynaecol Oncol.* 33: 178-182.
33. Lv, Y.G., Yu, F., Yao, Q., Chen, J.H. and Wang, L. 2010. The role of survivin in diagnosis, prognosis and treatment of breast cancer. *J thorac Dis.* 2: 100-110.
34. McKenzie, J.A., Liu, T., Goodson, A.G. and Grossman, D. 2010. Survivin enhances motility of melanoma cells by supporting Akt activation and $\alpha 5$ integrin upregulation. *Cancer Res.* 70: 7927-7937.
35. Moore, P.F. 1986. Utilization of cytoplasmic lysozyme immunoreactivity as a histiocytic marker in canine histiocytic disorders. *Vet Pathol.* 23: 757-762.
36. Moore, P.F., Affolter, V.K. and Vernau, W. 2006. Canine hemophagocytic histiocytic sarcoma: a proliferative disorder of CD11d⁺ macrophages. *Vet Pathol.* 43: 632-645.
37. Moore, P.F. and Rosin, A. 1986. Malignant histiocytosis of Bernese mountain dogs. *Vet Pathol.* 23: 1-10.
38. Mulay, K., Puthyapurayil, F.M. and Mohammad, J.A. 2013. Adenoid cystic carcinoma of the lacrimal gland: role of nuclear survivin (BIRC5) as a prognostic marker. *Histopathology.* 62: 840-846.

39. Nakahara, T., Kita, A. and Yamanaka, K. 2007. YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer Res.* 67: 8014-8021.
40. Nakahara, T., Kita, A., Yamanaka, K., Mori, M., Amino, N., Takeuchi, M., Tominaga, F., Kinoyama, I., Matsuhisa, A., Kudou, M. and Sasamata M. 2011. Broad spectrum and potent antitumor activities of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in a wide variety of human cancer cell lines and xenograft models. *Cancer Sci.* 102: 614-621.
41. Okada, H., Bakal, C., Shahinian, A., Elia, A. and Wakeham, A. 2004. Survivin loss in thymocytes triggers p53-mediated growth arrest and p53-independent cell death. *J Exp Med.* 199: 399-410.
42. Okugawa, K., Kobayashi, H. and Hirakawa, T. 2004. In vivo establishment and characterization of a paclitaxel-resistant human ovarian cancer cell line showing enhanced growth properties and drug-resistance only in vivo. *J Cancer Res Clin Oncol.* 130: 178-186.
43. Osaka, E., Suzuki, T. and Osaka, S. 2006. Survivin as a prognostic factor for osteosarcoma patients. *Acta Histochem Cytochem.* 39: 95-100.
44. Peters, I. R., Peeters, D., Helps, C. R. and Day, M. J. 2007. Development and application of multiple internal reference (housekeeper) gene assays for accurate normalisation of canine gene expression studies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117: 55-66.
45. Preuss, S.F., Weinell, A. and Molitor, M. 2008. Nuclear survivin expression is associated with HPV-independent carcinogenesis and is an indicator of poor prognosis in oropharyngeal cancer. *Br J Cancer* 98: 627-632.
46. Rassnick, K.M., Moore, A.S. and Russell, D.S. 2010. Phase II, open-label trial of single-agent CCNU in dogs with previously untreated histiocytic

- sarcoma. *J Vet Intern Med.* 24: 1528-1531.
47. Refs, R.S., Jackie, W. and Anne, M.B. 2009. An overview of multiple myeloma in dogs and cats. *Vet Med.* 104: 468-476.
48. Ruthanne, C., Heidi, B.K. and Rosemary, A.H. 2007. Comparison of plasma cardiac troponin I concentrations among dogs with cardiac hemangiosarcoma, noncardiac hemangiosarcoma, other neoplasmas, and pericardial effusion of nonhemangiosarcoma origin. *J Am Vet Med Assoc.* 237: 806-811.
49. Sakai, H., Nakano, H. and Yamaguchi, R. 2003. Establishment of a new canine cell line (CCT) originated from a cutaneous malignant histiocytosis. *J Vet Med Sci.* 65: 731-735.
50. Salz, W., Eisenberg, D. and Plescia, J. 2005. A survivin gene signature predicts aggressive tumor behavior. *Cancer Res.* 65: 3531-3534.
51. Schlotter, Y. M., Veenhof, E. Z., Brinkhof, B., Rutten, V. P., Spee, B., Willemse, T. and Penning, L. C. 2009. A GeNorm algorithm-based selection of reference genes for quantitative real-time PCR in skin biopsies of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 129: 115-118.
52. Shen, X., Zheng, J.Y. and Shi, H. 2012. Survivin knockdown enhances gastric cancer cell sensitivity to radiation and chemotherapy in vitro and in nude mice. *Am J Med Sci.* 344: 52-58.
53. Shoeneman, J.K., Ehrhart, E.J. 3rd. and Eickhoff, J.C. 2012. Expression and function of survivin in canine osteosarcoma. *Cancer Res.* 72: 249-259.
54. Silber, J.R., Bobola, M.S., Blank, A. and Chamberlain, M.C. 2012. O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: promise and problems. *Biochim Biophys Acta* 1826: 71-82.
55. Soare, T., Noble, P.J. and Hetzel, U. 2012. Paraneoplastic syndrome in

- haemophagocytic histiocytic sarcoma in a dog. *J Comp Pathol.* 146: 168-174.
56. Sunaga, T., Oh, N., Hosoya, K., Takagi, S. and Okumura, M. 2012. Pro-apoptotic effects of tepoxalin, a cyclooxygenase /lipxygenase dual inhibitor, on canine synovial fibroblasts. *J Vet Med Sci.* 74: 745-750.
57. Takeuchi, H., Morton, D.L., Elashoff, D. and Hoon, D.S. 2005. Survivin expression by metastatic melanoma predicts poor disease outcome in patients receiving adjuvant polyvalent vaccine. *Int J Cancer* 117: 1032-1038.
58. Tolcher, A.W., Quinn, D.I. and Ferrari, A. 2012. A phase II study of YM155, a novel small-molecule suppressor of survivin, in castration-resistant taxane-pretreated prostate cancer. *Ann Oncol.* 23: 968-973.
59. Tomiyasu, H., Goto-Koshino, Y., Takahashi, M., Fujino, Y. and Ohno, K. 2010. Quantitative analysis of mRNA for 10 different drug resistance factors in dogs with lymphoma. *J Vet Med Sci.* 72: 1165-1172.
60. Uchide, T., Takatsu, N., Fujimori, Y., Fukushima, U. and Itoh, H. 2005. Expression of survivin mRNA in dog tumors. *DNA Seq.* 16: 329-334.
61. Wang, W., Luo, H. and Wang, A. 2006. Expression of survivin and correlation with PCNA in osteosarcoma. *J Surg Oncol.* 93: 578-584.
62. Weiss, D.J. 2002. Flow Cytometric evaluation of hemophagocytic disorders in canine bone marrow. *Vet Clin Pathol.* 31: 36-41.
63. Weiss, D.J., Welle, M., Mortiz, A. and Walcheck, B. 2004. Evaluation of leukocyte cell surface markers in dogs with septic and nonseptic inflammatory diseases. *Am J Vet Res.* 65: 59-63.
64. Wiley, J., Walton, R. and Kennedy, D. 2010. Comparison of cytology, flow cytometry using CD18, and histopathology with immunohistochemistry (CD18) for the diagnosis of canine histiocytic sarcoma. *Vet Compl Oncol.*

8: 153-233.

65. Xie, Y.L., An, L., Jiang, H. and Wang, J. 2012. Nuclear survivin expression is associated with a poor prognosis in Caucasian non-small cell lung cancer patients. *Clin Chim Acta* 414: 41-43.
66. Yagihara, H., Tamura, K. and Isotani, M. 2007. Genomic organization of the T-cell receptor gamma gene and PCR detection of its clonal rearrangement in canine T-cell lymphoma/leukemia. *Vet Immunol Immunopathol.* 115: 375-382.
67. Yamanaka, K., Nakahara, T. and Yamauchi, T. 2011. Antitumor activity of YM155, a selective small-molecule survivin suppressant, alone and in combination with docetaxel in human malignant melanoma models. *Clin Cancer Res.* 17: 5423-5431.
68. Yang, D., Welm, A. and Bishop, J.M. 2004. Cell division and cell survival in the absence of survivin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 15100-15105.
69. Yang, Y.L. and Li, X.M. 2000. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res.* 10: 169-177.
70. Yu-Shan, W., Kwan-Hwa, C. and Kuang-Wen, L. 2007. Characterization of canine monocyte-derived dendritic cells with phenotypic and functional differentiation. *Can J Vet Res.* 71: 165-174.

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始懇切なるご指導を賜りました北海道大学大学院獣医学研究科外科学教室の奥村正裕教授、北海道大学大学院獣医学研究科先端獣医療学教室の高木 哲准教授に深く感謝致します。また、本論文をご校閲いただき、多大なご指導をいただきました同大学感染症学教室大橋 和彦教授、放射線学教室稲波 修教授、外科学教室の細谷謙次准教授、先端獣医療学教室の星野有希助教に深謝致します。

また、日々の多大な診療と研究のなか、終始甚大なる協力を惜しまれなかった北海道大学大学院獣医学研究科獣医外科学教室呉南侑学士、足立真美学士、金 尚昊学士をはじめとする教室員各位に深く感謝致します。

最後に、本研究で使用した細胞を授与してくださった岐阜大学大学院連合獣医学研究科丸尾幸嗣教授、日本獣医生命科学大学獣医学研究科盆子原誠准教授ならびに、生体材料の使用を快諾してくださった症例犬の飼い主の方々に心から感謝します。

英文抄録

The studies on establishment of molecular targeted diagnosis and therapy based on expression kinetic analysis of canine histiocytic sarcoma-related factor

Hiroki YAMAZAKI

Laboratory of Veterinary Surgery Department of Veterinary Clinical Sciences

Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University

Sapporo 060-0818, Japan

Canine histiocytic sarcoma or CHS is an aggressive malignant neoplasm originating from dendritic cells and macrophages. Definitive diagnosis of CHS is relatively difficult by conventional histopathological examination because objective features of CHS are not well-defined. In addition, CHS is characterized by progressive local infiltration and a very high metastatic potential. Thus, to improve clinical outcome of CHS, it was tried to establish an objective adjunct diagnostic technique and a novel therapeutic approach in this study.

In the first part, MHC class II α , CD11b, CD11c, and CD86 as specific cellular surface antigens of CHS were selected, and mRNA expression levels of these surface antigens were comparatively analysed between CHS cases and non-CHS cases for the establishment of a novel genetic diagnostic technique.

Specimens were collected from dogs with CHS (hereafter referred to as HS dogs) (n = 30) and non-HS dogs (n = 36), including lymphoma (n = 4), other malignant tumors (n = 26) and inflammatory diseases (n = 6), by excisional biopsy and needle biopsy. To determine the efficacy of the CHS detection, mRNA expression levels of the selected 4 surface antigens were quantitatively analyzed using real-time

quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

The mRNA expression levels of each surface antigen in HS dogs were significantly higher than those in non-HS dogs ($p < 0.01$). Cutoff values for discriminating CHS from all diseases were calculated on the basis of receiver operating characteristic analysis. The diagnostic accuracy of these cutoff values was $> 84\%$. The accuracy for lymphoma was the lowest in all non-HS dogs. These results suggest that quantitative analysis of mRNA expression of the selected surface antigen could be a highly reliable adjunctive diagnostic technique for CHS. However, substantial investigation is required for the exclusion of diseases with similar cell types of origin to lymphoma.

Survivin is as an inhibitory factor of apoptosis that has major functions in cell proliferation, including inhibition of apoptosis and regulation of cell division. Survivin is expressed in most types of human and canine malignant neoplasms. In the second part of the study, to investigate the hypothesis that survivin may be potential target of effective treatment for CHS, the relation between survivin expression and aggressive biological behavior of CHS was researched.

Firstly, expression levels of selected 7 apoptosis-inhibitory genes, including survivin, in specimens of 30 HS dogs were comparatively analyzed, and the correlation between survivin expression and these clinical outcomes, including survival time, freedom from progression and lomustine (CCNU)-resistance were determined. Next, the effect on biological activities, including apoptosis, cell growth, chemoresistance, and phagocytic activities, through inhibition of the expression of survivin, including survivin siRNA and YM155 as a small molecule of survivin inhibitor, in 4 CHS cell lines and normal canine fibroblasts were evaluated. Annexin V staining for apoptosis, methylthiazole tetrazolium assays for cell viability, CCNU- and doxorubicin (DOX)-sensitivity, real-time qPCR for expression analysis of chemoresistance genes, including MGMT, ABCB1 and ABCC2, and latex beads assay for measurement of phagocytic activities were performed, respectively. Lastly, the

effect of anti-tumor and CCNU-sensitivity by YM155 against 3 different types of murine xenograft models, which established from CHS cell lines with CCNU-resistance, were evaluated.

The expression levels of the surviving gene in 30 HS dogs were significantly higher than those of the other 6 apoptosis-inhibitory genes. Enhanced expression of the survivin gene expression decreased CCNU-sensitivity of HS dogs, resulting in shorter freedom from tumor progression and survival time. After the transfection with survivin siRNA, apoptosis, cell growth inhibition, enhanced CCNU- and DOX-sensitivity, decrease of 3 chemoresistance genes expression levels, and weakened phagocytic activities were observed in all CHS cell lines. In contrast, fibroblasts were not significantly affected by survivin knockdown. After the treatment with YM155, these changes were observed in 2 out of the 4 HS cell lines. In contrast, fibroblasts and other 2 HS cell lines were not significantly affected by survivin knockdown. However, YM155 significantly suppresses tumor growth without abnormal behavior against murine all models of CHS. In addition, the combination of YM155 with CCNU increased CCNU-efficacy against murine models with CCNU-resistance by the induction of chemoresistance genes knockdown. These results suggested that survivin might control aggressive biological activities of CHS, and enhanced survivin expression might induce poor prognosis and therapeutic resistance.

In contrast, survivin suppression induced inhibitory biological activities, including anti-tumor effects and enhanced chemosensitivities, in CHS. In conclusion, survivin may be a potential target of effective treatment for CHS regardless of chemoresistance.

It were tried to establish technique of genetic diagnosis and molecular targeted therapy on the basis of expression kinetic analysis of multiple CHS-related factors. This study has demonstrated that genetic analysis of selected surface antigens could detect CHS with high diagnostic accuracy. Furthermore, it has showed that survivin

inhibition using YM155 induced tumor growth inhibition and weakened chemoresistance against murine xenograft models of CHS, followed by a potential target of effective treatment. These findings might indicate the useful preclinical evaluation of CHS. There remains substantial investigation for improvement of diagnostic accuracy, or practical advancement of survivin-targeted therapeutics, including safety evaluation for clinical cases and synergistic effect by combination of other chemotherapy or radiotherapy.