HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Analysis of tumor evasion mechanisms contributing to tumor radio-resistance and the radio-sensitizing effects of Janus kinase inhibitor oclacitinib in canine tumor cell lines [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	大脇, 稜
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第15969号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92537
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Owaki_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：大　脇　　稜

	主査　教　授	滝　口　満　喜
	副査　教　授	今　内　　覚
審査委員	副査　准教授	細　谷　謙　次
	副査　助　教	須　永　隆　文
	副査　教　授	奥　村　正　裕

学位論文題名

Analysis of tumor evasion mechanisms contributing to tumor radio-resistance and the radio-sensitizing effects of Janus kinase inhibitor oclacitinib in canine tumor cell lines

（イヌ腫瘍細胞における放射線治療抵抗性に関わる免疫回避機構の解析および Janus kinase 阻害薬オクラシチニブの放射線増感効果に関する基礎的研究）

放射線治療は、腫瘍細胞に対する DNA 傷害作用のみならず、腫瘍細胞と周囲の間質により構成される腫瘍微小環境において T 細胞を活性化し、抗腫瘍効果を示す。しかし、様々な腫瘍において、Programmed death ligand 1 (PD-L1)が高率に発現し、活性化 T 細胞上の Programmed death 1 (PD-1)と結合することで免疫回避を起こすことが報告されている。それに対し PD-1/PD-L1 経路の阻害と放射線治療の併用療法は、放射線治療の抗腫瘍効果を増強し、治療成績の向上を示した。放射線照射により誘導される腫瘍細胞上の PD-L1 発現には、Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT)シグナル伝達経路が重要な役割を果たす。一方で、イヌ腫瘍における PD-L1 発現機序は不明であり、その解明は新しい治療標的を探索する上で非常に重要である。JAK-STAT シグナル伝達経路の中で、特に STAT3 の活性化は腫瘍進行を促進する因子として認識されており、JAK-STAT シグナル伝達経路の制御は腫瘍の放射線治療抵抗性に対する有効な治療戦略となる可能性がある。

本研究の目的は、イヌ腫瘍の放射線治療抵抗性の原因として、PD-L1 発現と JAK-STAT シグナル伝達経路に着目し、PD-L1 発現増強機序の解明、および放射線照射が JAK-STAT シグナル伝達経路に与える影響を解析した後、それらを治療の標的とすることで、がんの治療成績の向上に寄与することである。

第 1 章では、イヌ腫瘍における炎症性サイトカインおよび DNA 損傷と PD-L1 発現との関連性、ならびにその発現機序を明らかにするため、イヌの骨肉腫細胞株(HMPOS)および悪性黒色腫細胞株（CMeC、LMeC)を用いて、Interferon（IFN)-γ、Tumor necrosis factor（TNF)-αおよび放射線照射が細胞に与える影響を評価した。まず IFN-γまたは TNF-αを添加した全ての細胞で PD-L1 発現の上昇を認めた一方で、放射線照射では発現上昇は認めなかった。続いて IFN-γ添加により、全ての細胞株で PD-L1、STAT1、STAT3、および STAT の下流の遺伝子の発現上昇を認め、その遺伝子発現上昇は、JAK 阻害剤であるオクラシチニブにより抑制された。一方で TNF-α添加においては、全ての細胞株で nuclear factor kappa B（NF-κB) gene RELA（RELA)および RELA により制御される遺伝子の発現が上昇したものの、*PD-L1* 遺伝子の発現上昇は LMeC でのみ認めた。それらの発現上昇は、NF-κB 阻害剤である BAY11-7082 により抑制された。最後に IFN-γおよび TNF-α刺激により増強した PD-L1 発現は、それぞれオクラシチニブおよび BAY11-7082 の添加により抑制された。これらの結果から、イヌ腫瘍において、IFN-γおよび TNF-αは、それぞれ JAK-STAT シグナル伝達経路および NF-κB シグナル伝達経路を介して PD-L1 発現を制御することが示された。

第 2 章では、イヌ腫瘍における JAK-STAT シグナル伝達経路を標的とした治療の確立のため、JAK 阻害薬の放射線増感効果とその作用機序を解析した。JAK 阻害薬であるオクラシチニブは、イヌのアトピー性皮膚炎およびアレルギー性皮膚炎に起因した痒みに対する治療薬であり、すでにイヌにおいて長期投与の安全性が報告されている。イヌ骨肉腫細胞株（HMPOS）および悪性黒色腫細胞株（CMeC）を用いて、以下を検証した。まずオクラシチニブの放射線増感効果の有無について、コロニー形成法を用いた X 線暴露後の細胞生存率、および免疫不全マウス（BALB/cAJcl-nu/nu）を用いたイヌ腫瘍細胞由来の異種移植モデルにおける腫瘍体積の変化を評価したところ、双方においてオクラシチニブによる腫瘍細胞および腫瘍の放射線感受性の増加を認めた。放射線暴露後の細胞では、照射線量および時間依存性に STAT3 の活性化を認め、オクラシチニブの添加によりその活性化は抑制された。また HMPOS においてオクラシチニブは Survivin、B cell lymphoma-extra large および myeloid cell leukemia 1 といった抗アポトーシス遺伝子発現に対する抑制作用、および Poly（ADP-ribose）polymerase（PARP)の活性化を増強する作用を示し、放射線によるアポトーシス誘導を増強した。さらに細胞周期解析において、全ての細胞株で CCND1、cyclin-dependent kinase（CDK)4 および CDK6 の遺伝子発現を抑制し、細胞周期解析において G1 期での細胞周期停止が起こることを示した。これらのことから、オクラシチニブはイヌ腫瘍に対し、STAT3 の活性化を抑制し、アポトーシス誘導および細胞周期停止を引き起こすことで放射線増感効果を示すことが証明された。また放射線治療とオクラシチニブの併用療法によりイヌ腫瘍の治療成績が向上することが示唆された。

本研究より、イヌ腫瘍における PD-L1 発現機序の一部が解明された。また JAK-STAT シグナル伝達経路は IFN-γにより誘導される PD-L1 発現に関わるだけでなく、STAT3 を介して腫瘍の放射線感受性に関わることが示され、STAT3 を標的とし

たオクラシチニブはイヌ腫瘍における放射線増感薬として有効であることを明らかにした。

　よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者大脇稜氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学院規程第 10 条の規定による本学院の行う学位論文の審査等に合格と認めた。