

論文審査の結果の要旨

氏名：堀切園 裕

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：犬の腫瘍性病変における血管新生阻害療法確立のための基礎的研究

審査委員：（主査） 教授 浅野 和之
（副査） 教授 亘 敏広
教授 渋谷 久

悪性腫瘍の増殖と転移のメカニズムにおいて、血管新生は非常に重要な役割を担っており、血管新生阻害療法による悪性腫瘍の増殖や転移を抑制する試みが実施されている。特に、血管内皮増殖因子(Vascular endothelial growth factor ; VEGF)は血管新生に深く関与しており、医学領域において抗 VEGF 抗体による特定の悪性腫瘍の治療が臨床応用されているが、獣医学領域では実施されておらず、対象となる腫瘍も不明である。血管内皮細胞は血管新生の役割を担っており、血管新生阻害療法の標的となると考えられているが、犬の血管内皮細胞を分離および培養した報告は少なく、その性状も十分に解析されていない。また、獣医学領域における血管新生阻害療法は臨床的に試行されているものの、犬の血管内皮細胞に対する作用は十分に明らかにされておらず、その有効性を検討することは非常に重要である。

以上のことから、犬の腫瘍性病変に対する血管新生阻害療法の確立を目指し、第 1 章では犬の腫瘍性疾患における血清 VEGF 濃度の測定を行い、血管新生が大きく関与して治療対象となり得る腫瘍性疾患を検討した。次いで第 2 章では、第 1 章で特に VEGF 発現が多かったミニチュア・ダックスフンドの結直腸腫瘍性病変の病態や治療成績について調査した。第 3 章では、イヌ由来血管内皮細胞の分離、培養および性状解析を行い、最後に第 4 章では、各種薬剤における血管内皮細胞に対する細胞増殖抑制効果の検討を行い、血管新生阻害療法について検討した。

第 1 章 犬の腫瘍性疾患における血管内皮増殖因子の血中レベル

医学領域では結直腸癌をはじめ、肺癌や乳癌患者の血中 VEGF 濃度が高いことが知られており、補助療法として抗 VEGF 抗体による治療が実施されているが、犬の腫瘍性疾患では臨床的に使用されておらず、対象となり得る疾患についても十分に検討されていない。したがって、本研究では様々な腫瘍性疾患の犬における血清 VEGF 濃度を測定し、比較検討することを目的とした。

2012 年 2 月から 2018 年 10 月に本学附属動物病院に来院し、肝臓、副腎、結直腸、肺、甲状腺の腫瘍性疾患に対する外科治療を行った犬 202 頭および健常犬 13 頭の血清検体を用いた。血清 VEGF 濃度の測定方法は ELISA 法を用いた。

対象となった疾患は肝細胞癌(n=43)、肝細胞腺腫(n=14)、肝結節性過形成(n=6)、副腎褐色細胞腫(n=30)、副腎皮質腺癌(n=14)、副腎皮質腺腫(n=12)、結直腸腺癌(n=20)、結直腸腺腫(n=5)、結直腸炎症性ポリープ(n=15)、肺腺癌(n=21)、肺組織球性肉腫(n=6)、甲状腺濾胞腺癌(n=16)であった。肝結節性過形成および結直

腸腺腫を除き、その他すべての腫瘍性疾患の血清 VEGF 濃度は健常群と比較して有意に高値を認めた。腫瘍の発生臓器間および良性・悪性間での有意差は認められなかった。

以上の結果から犬の肝臓腫瘍、副腎腫瘍、結直腸腫瘍、肺腫瘍および甲状腺濾胞腺癌における血清 VEGF 濃度は健常犬と比較して高値を示すことが明らかとなり、VEGF を標的とした治療が有用である可能性が示唆された。

第2章 犬の結直腸腫瘍性病変における臨床的特徴と病態の解析および治療法の検討

第1章の結果から、犬において血清 VEGF 濃度の高値を示すことが明らかとなった腫瘍性疾患のうち、結直腸癌は医学領域で抗 VEGF 抗体による治療が実施されている。本邦においてミニチュア・ダックスフンドの結直腸腫瘍性疾患の発生が多く、非腫瘍性病変であっても進行すると悪性転化する可能性が報告されている。しかし、病態や治療成績についてはほとんど報告されていない。したがって、本研究は2002年10月から2015年11月に本学附属動物病院に来院し、結直腸腫瘍性病変を診断され、粘膜-粘膜下組織プルスルー法を実施したミニチュア・ダックスフンド40頭を対象とし、医療記録について詳細に調査した。

臨床症状は、血便が全頭(100%)、しぶりが30頭(75%)で認められた。血液検査は、C反応性蛋白濃度の増加が17頭(42.5%)、白血球数の増加が10頭(25%)で認められた。下部消化管内視鏡超音波検査による腫瘍の深部方向への局在評価は38頭(95%)で実施され、粘膜限局が35頭(92.1%)、粘膜下まで浸潤が3頭(7.9%)であった。全頭で粘膜-粘膜下組織プルスルー法が実施可能であり、肉眼上の主要な腫瘍性病変が切除された。病理組織学的検査では炎症性ポリープが全頭(100%)で認められ、その他に腺癌が10頭(25%)、腺腫が1頭(2.5%)で部分的に認められた。水平マージン部の評価は12頭(30%)で病変を認めず、11頭(27.5%)で初期病変が、17頭(42.5%)で病変が認められた。術後補助療法は非ステロイド性抗炎症薬(Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs ; NSAIDs)が36頭(90%)、メサラジンが36頭(90%)で投与された。死亡率は0%であり、5頭(12.5%)で再発が認められた。再発を認めた5頭のうち3頭(60%)は内科治療を継続しており、1頭(20%)は初回手術時に完全切除されていた。

以上より、摘出された腫瘍性病変の一部は腺癌を伴っており、結直腸炎症性ポリープは前癌状態である可能性が示唆された。また、病変が完全に切除された場合であっても、再発が起こり得ると推察された。しかし、マージン部に病変を認めた場合でも、NSAIDs およびメサラジンが処方され、再発率は低かった。したがって、結直腸腫瘍性病変を有する犬において、NSAIDs を含む術後補助療法は再発率を低下させる可能性が示唆された。しかし、術後補助療法を継続していたにもかかわらず再発した例も認めたことから、術後補助療法のさらなる検討が必要であると考えられた。

第3章 イヌ由来血管内皮細胞の分離、培養方法の確立および性状解析

第1章によって、犬の腫瘍性疾患における VEGF を標的とした血管新生阻害療法が有用である可能性が示唆されたことから、治療標的とされる血管内皮細胞の性状について、検討が必要であると考えた。しかし犬の血管内皮細胞の分離法については少数の報告があるのみであり、イヌ由来血管内皮細胞の分離および培養の方法や、分子生物学的性状については十分に検討されていない。したがって、本研究では健常犬から各種血管を摘出し、イヌ由来血管内皮細胞の分離および培養を実施し、血管新生関連因子に関する性状について解析した。

本研究は各種検査より臨床的に健常であると認められたビーグル犬3頭を用いた。健常ビーグル犬3頭を安楽殺後に総頸動脈、外頸静脈、胸部大動脈および後大静脈を摘出し、検体として用いた。各血管の内腔にトリプシン液を満し、回収した細胞を MCDB131 培地により培養した。細胞の同定を目的に抗マウス CD31 ウサギポリクローナル抗体による蛍光免疫染色を実施し、細胞性状の定性解析を目的に RT-PCR 法により CD31、VEGF、血管内皮増殖因子受容体(VEGFR)-1、VEGFR-2、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)およびナトリウム利尿ペプチド受容体 1(Natriuretic Peptide Receptor 1 ; NPR1)遺伝子の発現について検討を行った。

得られた内皮細胞様の形態を呈した細胞を、3週間で4回継代を実施した。4継代目の細胞を用いた蛍光抗体法

により 99%以上の細胞で CD31 が陽性であった。RT-PCR 法では CD31、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2、COX-2 および NPR1 遺伝子の mRNA の発現が検出された。

以上より、犬の各種血管からトリプシン液を用いた血管内皮細胞の分離法および培養方法が確立され、イヌ由来血管内皮細胞における血管新生関連遺伝子の発現が明らかとなった。したがって、本研究で得られたイヌ由来血管内皮細胞は血管新生についての検討に有用である可能性が示唆された。

第 4 章 イヌ由来血管内皮細胞に対する血管新生阻害薬の細胞増殖抑制効果

第 3 章の結果から、イヌ由来血管内皮細胞が血管新生についての検討に有用である可能性が示唆された。抗 VEGF 抗体であるベバシズマブは、腫瘍の増大や転移を抑制するため、医学領域では悪性腫瘍に対して臨床応用されている。また、第 2 章の結果から NSAIDs は一部の腫瘍に有用である可能性が示唆され、実際に医学領域では NSAIDs が血管新生阻害効果を有することが報告されている。しかし、獣医学領域における NSAIDs の血管新生阻害のメカニズムについては明らかになっていない。また、抗生物質であるミノサイクリンは血管新生阻害作用を有していることが知られている。近年、ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチドであるカルペリチドは、NPR1 を介して血管内皮細胞の活性を阻害することが示されている。一方、獣医学領域ではそのような血管新生阻害療法が確立しておらず、基礎的検討もなされていない。したがって本研究では、イヌ由来血管内皮細胞に対するベバシズマブ、メロキシカム、カルプロフェン、ロベナコキシブ、ミノサイクリンおよびカルペリチドの細胞増殖抑制効果について検討した。

第 3 章の方法で得られたイヌ由来血管内皮細胞を MCDB131 培地に撒き、ベバシズマブ、メロキシカム、カルプロフェン、ロベナコキシブ、ミノサイクリンおよびカルペリチドを添加した。各種薬剤を添加後に比色定量法を用い、対象群の細胞増殖活性を 100%として、各種薬剤添加後の細胞増殖活性を比率で評価した。

ベバシズマブおよび NSAIDs では血管内皮細胞の増殖が抑制されたのに対し、ミノサイクリンおよびカルペリチドでは増殖抑制効果は認められなかった。

以上の結果から、ベバシズマブおよび NSAIDs はイヌ由来血管内皮細胞の増殖を抑制することが明らかとなり、今後、検討を進めることで獣医学領域における血管新生阻害療法へ応用できる可能性が示唆された。

総括

本研究によって、犬の特定の腫瘍性疾患では血清 VEGF 濃度が健常犬と比較して高値であることが明らかとなり、VEGF が治療標的になり得る可能性が示唆された。さらに、ミニチュア・ダックスフンドの結直腸腫瘍性病変の臨床的特徴と病態が明らかとなり、NSAIDs を含む術後補助療法の有効性が示唆された。また、各種血管からイヌ由来血管内皮細胞の分離および培養方法を確立し、血管新生関連遺伝子の発現を明らかにした。最後に、ベバシズマブおよび NSAIDs が血管内皮細胞の増殖抑制効果を有しており、小動物臨床における血管新生阻害薬として応用できる可能性を示した。

以上のことから、本研究により犬の腫瘍性病変に対する血管新生阻害療法に関して、新たな知見が得られ、小動物臨床の発展に大きく寄与するものであると思われた。

よって本論文は、博士（獣医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和元年 10 月 10 日