

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

日本大学獣医学研究科

堀 切 園 裕

2019

## 略語

ANP; Atrial natriuretic peptide 心房性ナトリウム利尿ペプチド

Alb; Albumin 血清アルブミン濃度

COX-2; Cyclooxygenase-2 シクロオキシゲナーゼ-2

CRI; Constant-rate infusion 静脈内定速注入

CRP; C-reactive protein C反応性蛋白濃度

EUS; Endoscopic ultrasound 内視鏡超音波検査

FBS; Fetal bovine serum ウシ胎児血清

NPR1; Natriuretic peptide receptor 1 ナトリウム利尿ペプチド受容体 1

NSAIDs; Non-steroidal anti-inflammatory drugs 非ステロイド性抗炎症薬

PBS; Phosphate Buffered Saline リン酸緩衝生理食塩水

PCV; Packed cell volume ヘマトクリット値

Plt; Platelet 血小板数

TP; Total protein 血清総蛋白

VEGF; Vascular endothelial growth factor 血管内皮増殖因子

VEGFR; Vascular endothelial growth factor receptor 血管内皮増殖因子受容体

WBC; White blood cell 白血球数

# 目次

頁

序	1
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	6
1. 諸言	7
2. 材料および方法	9
3. 結果	11
4. 考察	20
5. 小括	23
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	25
1. 諸言	26
2. 材料および方法	28
3. 結果	37
4. 考察	45
5. 小括	49
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	51
1. 諸言	52
2. 材料および方法	54
3. 結果	58
4. 考察	61
5. 小括	63
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	65
1. 諸言	66
2. 材料および方法	68

3.	結果	70
4.	考察	81
5.	小括	83
	総括	85
	謝辞	93
	引用文献	94

序

血管新生は既存の血管から新生血管が形成される現象であり、生理的には通常、発生の過程や創傷治癒の際などに認められる。また血管新生は悪性腫瘍の血行転移や浸潤にも関与しており[Argyle and Khanna, 2012]、固形がんの増大には必ず腫瘍周囲に血管新生が必要になると考えられている[Folkman, 1971]。血管内皮増殖因子（Vascular endothelial growth factor; VEGF）は脈管形成および血管新生に関与するサイトカイン群であり、その中でも VEGF-A は腫瘍の増殖や転移の促進に最も重要な因子であると考えられている[Mustonen and Alitalo, 1995]。最近では、医学領域において VEGF-A 活性の抑制による悪性腫瘍に対する抗体療法が臨床応用されている[Hurwitz et al., 2004; Saltz et al., 2008; Sandler et al., 2006; Terada et al., 2017]。犬の VEGF -A はヒトと類似した構造であり、シグナル伝達系も極めて類似している[Scheidegger et al., 1999]。また、乳腺腫瘍や血管肉腫、リンパ腫を有する犬は、血清 VEGF-A 濃度が健常犬と比較し高いことが知られている[Clifford et al., 2001; Gentilini et al., 2005; Kato et al., 2007]。しかし VEGF-A を標的にした治療については、犬腫瘍細胞移植マウスモデルでの報告はあるが[Michishita et al., 2013; Scharf et al., 2013]、実際にどのような腫瘍性疾患が対象となるか十分に検討されておらず不明である

医学領域では結直腸癌患者における血中 VEGF-A 濃度の高値やステージとの相関が明らかとなっており [Bestas et al., 2014; Kumar et al., 1998; Kwon et al., 2010; Werther et al., 2002]、抗 VEGF 抗体による血管新生阻害療法が確立されている[Hurwitz et al., 2004; Saltz et al., 2008]。一方、犬の腸管腫瘍の発生はまれであるものの [Dobson et al., 2002]、本邦においては特にミニチュア・ダックスフンドで結直腸における炎症性ポリープの発生が多く認められる[Ohmi et al., 2012]。ミニチ

ユア・ダックスフンドの結直腸炎症性ポリープは良性の非腫瘍性病変であるが、臨床症状として血便や排便痛、しぶりなどを認めるため、積極的な治療が必要とされる[Ohmi et al., 2012]。医学領域においては、結直腸ポリープから結直腸癌に悪性転化する機序が明らかになっており [Fearon and Vogelstein, 1990; Hussain et al., 2000], アスピリンなどによる結直腸癌の予防効果も示されている[Jänne and Mayer, 2000]。同様にミニチュア・ダックスフンドの結直腸炎症性ポリープは著しい炎症を伴っている場合が多く、悪性転化が示唆されている[Saito et al., 2018]。病変が広範囲に及んでいる場合も多く、粘膜-粘膜下組織プルスルー法[Shida et al., 2008]などによる外科的切除後にも再発の危険性が存在する。そのため、ミニチュア・ダックスフンドの結直腸炎症性ポリープの術後補助療法は不可欠であると考えられるが、臨床的特徴や病態、効果的な術後補助療法についてはほとんど報告されていない。

血管内皮細胞は血管の内面を構成する細胞であり、血管新生を血管の収縮や弛緩、血液凝固など生体内における様々な機能を有している。その中でも特に血管新生においては、その起点となり重要な役割を担っている。血管内皮細胞は、VEGF や線維芽細胞増殖因子を含むサイトカインやメディエーターの影響を受けて、血管新生を亢進することが明らかとなっている[Ferrara and Henzel, 1989; Seghezzi et al., 1998]。そのため、悪性腫瘍における血管新生阻害療法の多くは血管内皮細胞が治療標的となっている。医学領域ではヒトの臍帯静脈から血管内皮細胞を分離、培養する方法が確立されており[Jaffe et al., 1973], 様々な血管新生関連研究に使用されている。しかし、犬の血管内皮細胞を分離、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。そのため獣医学領域において、イヌ

由来血管内皮細胞について詳細な評価が可能なアッセイ系は確立されていない。

悪性腫瘍の発育と転移機構において、血管新生は非常に重要な役割を担っていることから、血管新生の阻害により悪性腫瘍の成長を抑制する血管新生阻害療法は医学領域では広く用いられている。血管新生阻害を目的とした癌休眠療法やメトロノーム化学療法はヒトだけでなく、犬の悪性腫瘍に対しても試行されているが[Elmslie et al., 2008; Lana et al., 2007]、抗 VEGF 抗体であるベバシズマブを用いた治療は臨床応用されていない。また、NSAIDs は一般的に犬の整形疾患に関連する疼痛管理に使用されているが[Vasseur et al., 1995]、近年では犬の膀胱移行上皮癌の治療効果もあることが明らかとなっている[McMillan et al., 2011]。実際に医学領域では NSAIDs が抗炎症効果だけでなく、血管新生阻害効果も有することが報告されている[Tsujii et al., 1998]。さらに抗生物質であるミノサイクリンや[Tamargo et al., 1991]、心房性ナトリウム利尿ペプチド (Atrial Natriuretic Peptide; ANP) 製剤であるカルペリチドが血管内皮細胞の活性を阻害することで悪性腫瘍の発育や転移を抑制する可能性が示唆されている[Nojiri et al., 2015]。しかし獣医学領域におけるこれらの各種薬剤の血管新生阻害効果の作用点や作用機序は十分に検討されていない。犬における効果的な血管新生阻害療法の確立を目指し、犬の血管内皮細胞を用いて血管新生阻害薬についての効果を確認し、獣医領域における血管新生阻害療法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、犬の腫瘍性病変における血管新生阻害療法の確立を目指し、第 1 章では犬の腫瘍性病変における血清 VEGF-A 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病変について検討した。次いで第 2 章では、第 1 章で特に血中 VEGF-A 濃度の高かった犬の結直腸腫瘍性病変の病態や

臨床的特徴について解析し、粘膜-粘膜下組織プレスルー法による手術および術後補助療法を組み合わせた治療成績について検討した。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、各種薬剤におけるイヌ由来血管内皮細胞に対する細胞増殖抑制効果について調査を行い、血管新生阻害療法への応用の可能性を検討した。

## 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

## 1. 諸言

血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor; VEGF) は, 当初, モルモットやハムスター, マウスの腫瘍腹水や, それらの腫瘍細胞培地から検出され, 微小血管透過性を増加させる活性を持つことが明らかとなり, 血管透過性亢進因子として報告された[Senger et al., 1983]。その後, ウシ下垂体濾胞細胞の培養上清中より分離された蛋白質が, 血管透過性亢進因子と同一の物質であり, 血管内皮細胞に分裂促進効果を持つことから, VEGF と名付けられた[Fererra et al., 1989]。

VEGF は脈管形成や血管新生に関与するサイトカイン群であり, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E の 5 種類が知られている。その中でも VEGF-A は血管内皮細胞に発現している VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor; 血管内皮増殖因子受容体) -1 および VEGFR-2 と結合することで血管新生を促進し, 腫瘍の増殖や転移に最も重要な因子であると考えられている [Mustonen and Alitalo, 1995]。そのため医学領域においては, 血清および血漿中の VEGF-A 濃度の高値と予後やステージとの相関が, 結直腸癌をはじめ [Bestas et al., 2014; Kumar et al., 1998; Kwon et al., 2010; Werther et al., 2002], 肝細胞癌 [Jinno et al., 1998; Li et al., 2004; Mukozu et al., 2013; Poon et al., 2003; Zhao et al., 2003] や肺癌 [Ferrari and Scagliotti, 1996], 乳癌 [Adams et al., 2000; Manders et al., 2003], 前立腺癌 [Sharif et al., 2014], 非ホジキンリンパ腫 [Salven et al., 1997] を有する患者で明らかになっている。さらに VEGF-A に特異的に結合し, VEGFR-1 および VEGFR-2 との結合を選択的に阻害することで, 腫瘍組織への血管新生を抑制し, 腫瘍の増殖

を抑える抗 VEGF 抗体による分子標的治療が結直腸癌において用いられている [Cunningham et al., 2013; Hurwitz et al., 2004; Saltz et al., 2008]。

一方、獣医学領域において、犬の VEGF および VEGFR はヒトと類似の構造であり、VEGF シグナル伝達系も極めて類似していることが明らかとなっている [Scheidegger et al., 1999]。また、VEGF-A および VEGFR の過剰発現と微小血管密度との関連が、犬の乳腺腫瘍 [Restucci et al., 2002, 2004] やセミノーマ [Restucci et al., 2003]、扁平上皮癌 [Maiolino et al., 2000] で報告されており、悪性腫瘍を有する犬の腹水および尿中でも VEGF 濃度の高値が認められている [Clifford et al., 2002; Mohammed et al., 2002]。血清 VEGF-A 濃度については、乳腺腫瘍や血管肉腫、リンパ腫を有する犬は、健常犬と比較し高いことが知られており [Clifford et al., 2001; Gentilini et al., 2005; Kato et al., 2007]、特に軟部組織肉腫では外科的切除後に血清 VEGF-A 濃度が減少したことも報告されている [de Queiroz et al., 2013]。しかし VEGF-A を標的にした治療については、犬の骨肉腫細胞および血管周皮腫細胞の移植マウスモデルの報告はあるものの [Michishita et al., 2013; Scharf et al., 2013]、対象となる腫瘍性疾患については十分に検討されておらず不明である。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-A 濃度を測定し、比較検討することを目的とした。

## 2. 材料および方法

### 1) 供試動物

2012年2月から2018年10月に日本大学生物資源科学部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頭を用いた。摘出された腫瘍組織は病理組織学的診断に供された。

また、身体検査、血液および血液化学検査、胸部および腹部 X 線検査によって健康と確認されたビーグル成犬13頭を対象として用い、健常群（Control 群）とした。これらの犬は、日本大学生物資源科学部動物実験指針および手引きに従って管理した。

### 2) 血清の採取方法と処理

腫瘍性疾患犬は術前に静脈血採血を実施し、同様に健常犬においても静脈血採血を実施した。血液は外頸静脈または橈側皮静脈より採血後、ベノジェクト®II 真空採血管（TERUMO Corporation, Tokyo, Japan）に採取した。その後、直ちに3,000rpm で10分間遠心を行い、血清を分注して分析が行われるまで-80℃で凍結保存した。

### 3) 測定方法

血清 VEGF-A 濃度の測定方法は ELISA 法（Canine VEGF Quantikine ELISA kit, R & D Systems Inc., MN, USA）を用いて実施した。吸光度はマイクロプレートリー

ダー (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA) を用い、450 nm の波長で測定し、光学誤差の補正は 540 nm の波長で行った。結果は各サンプルを 2well ずつ測定した平均値を用いた。また、検量線の作成は 4 パラメータ・ロジスティック回帰式を用いた。

#### 4) 統計学的解析

腫瘍性疾患犬の年齢および血清 VEGF-A 濃度は中央値[範囲]で表記した。雌雄差の判定には  $\chi^2$  検定を用いた。また、2 群間の比較には Mann-Whitney U 検定を用い、3 群間以上の比較には Kruskal-Wallis 検定を行い、有意差が認められた場合には post hoc test として Dunn 法を用いて解析した。統計学的有意水準は  $P < 0.05$  とした。全ての解析は GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, Inc., CA, USA) を用いて行った。

### 3. 結果

#### 1) シグナルメント

対象となった腫瘍疾患犬群の年齢は 11.6 歳齢 [3.4-15.7 歳齢]であり、性別は去勢雄 83 頭、未去勢雄 27 頭、避妊雌 81 頭、未避妊雌 11 頭であった。健常群の年齢は 2.4 歳齢 [1.5-2.6 歳齢]であり、性別は未去勢雄 6 頭、未避妊雌 7 頭であった。腫瘍疾患犬群は健常群と比較し有意に高齢であったが、各群間に雌雄差は認められなかった。

#### 2) 病理組織学的診断

腫瘍性疾患の病理組織学的診断結果は肝細胞癌 (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。

#### 3) 血清 VEGF-A 濃度

腫瘍疾患犬の血清 VEGF-A 濃度について健常群と比較解析を行った。健常群の血清 VEGF-A 濃度は 4 pg/ml [0-21 pg/ml]であったのに対し、肝細胞癌は 30 pg/ml [0-158 pg/ml]、肝細胞腺腫は 32 pg/ml [0-49 pg/ml]、肝結節性過形成は 18 pg/ml [0-51 pg/ml] (図 1-1)、褐色細胞腫は 32 pg/ml [0-187 pg/ml]、副腎皮質腺癌は 32 pg/ml [3-161 pg/ml]、副腎皮質腺腫は 27 pg/ml [0-106 pg/ml] (図 1-2)、結直腸炎症性ポ

リープは 37 pg/ml [0–111 pg/ml], 結直腸腺癌は 36 pg/ml [0–75 pg/ml], 結直腸腺腫は 43 pg/ml [0–48 pg/ml], (図 1-3), 肺腺癌は 35 pg/ml [0–131 pg/ml], 肺組織球性肉腫は 35 pg/ml [4–107 pg/ml] (図 1-4), 甲状腺濾胞腺癌は 35 pg/ml [0–106 pg/ml] であった (図 1-5)。

肝臓腫瘍群においては肝細胞癌および肝細胞腺腫の血清 VEGF 濃度は, 健常群と比較し有意に高値であったが, 肝結節性過形成では有意差は認められなかった。また, 結直腸腫瘍においては結直腸腺癌および結直腸炎症性ポリープの血清 VEGF-A 濃度は, 健常群と比較し有意に高値であったが, 結直腸腺腫では有意差は認められなかった。副腎腫瘍, 肺腫瘍および甲状腺濾胞腺癌の血清 VEGF-A 濃度は, それぞれ健常群と比較し有意に高値を認めた。

腫瘍の発生臓器毎に分類し血清 VEGF-A 濃度を比較したところ, 肝臓腫瘍群は 28 pg/ml [0–158 pg/ml], 副腎腫瘍群は 31 pg/ml [0–187 pg/ml], 結直腸腫瘍群は 37 pg/ml [0–111 pg/ml], 肺腫瘍群は 35 pg/ml [0–131 pg/ml] であり (図 1-6), それぞれ健常群と比較して有意に高値を認めたが, 発生臓器間での有意差は認められなかった。

腫瘍性疾患犬を良性疾患群と悪性腫瘍群に分けて血清 VEGF-A 濃度を比較したところ, 良性疾患群は 34 pg/ml [0–111 pg/ml], 悪性腫瘍群は 35 pg/ml [0–187 pg/ml] であり (図 1-7), それぞれ健常群と比較し有意に高値を示したが, 良性腫瘍群と悪性腫瘍群間において有意差は認められなかった。

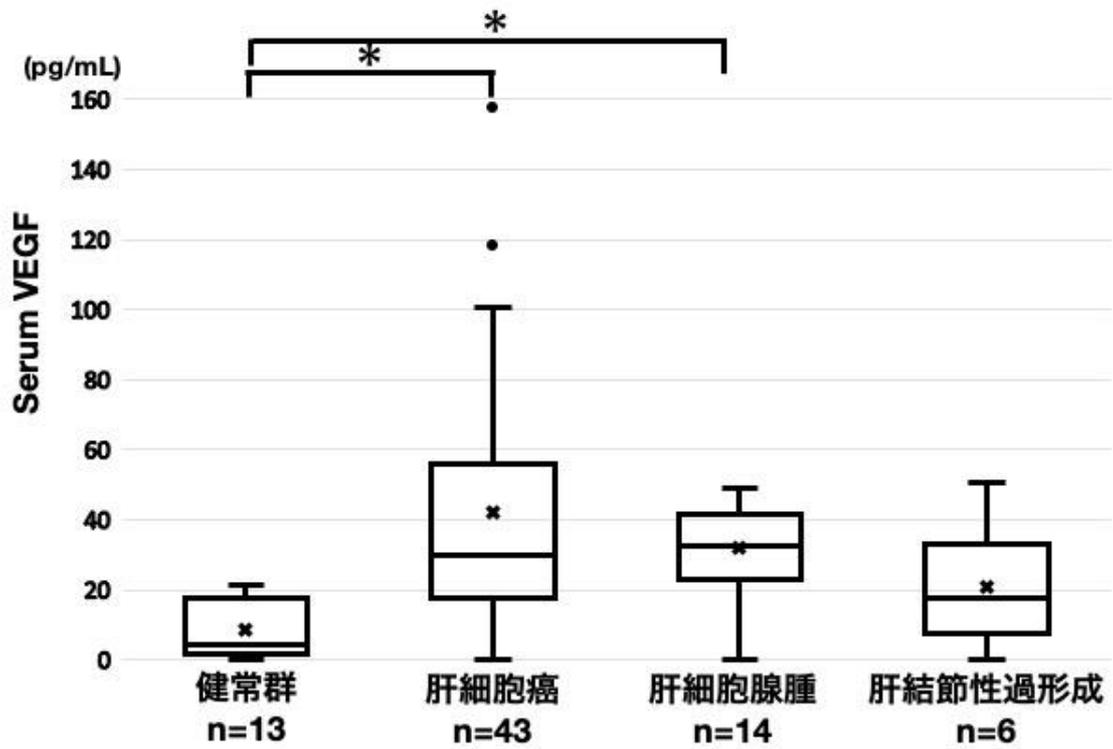


図 1-1. 健常群, 肝細胞癌群, 肝細胞腺腫群, 肝結節性過形成における血清 VEGF-A 濃度の比較

血清 VEGF-A 濃度は, 健常群と比較し, 肝細胞癌群および肝細胞腺腫群で有意に高値を示した。

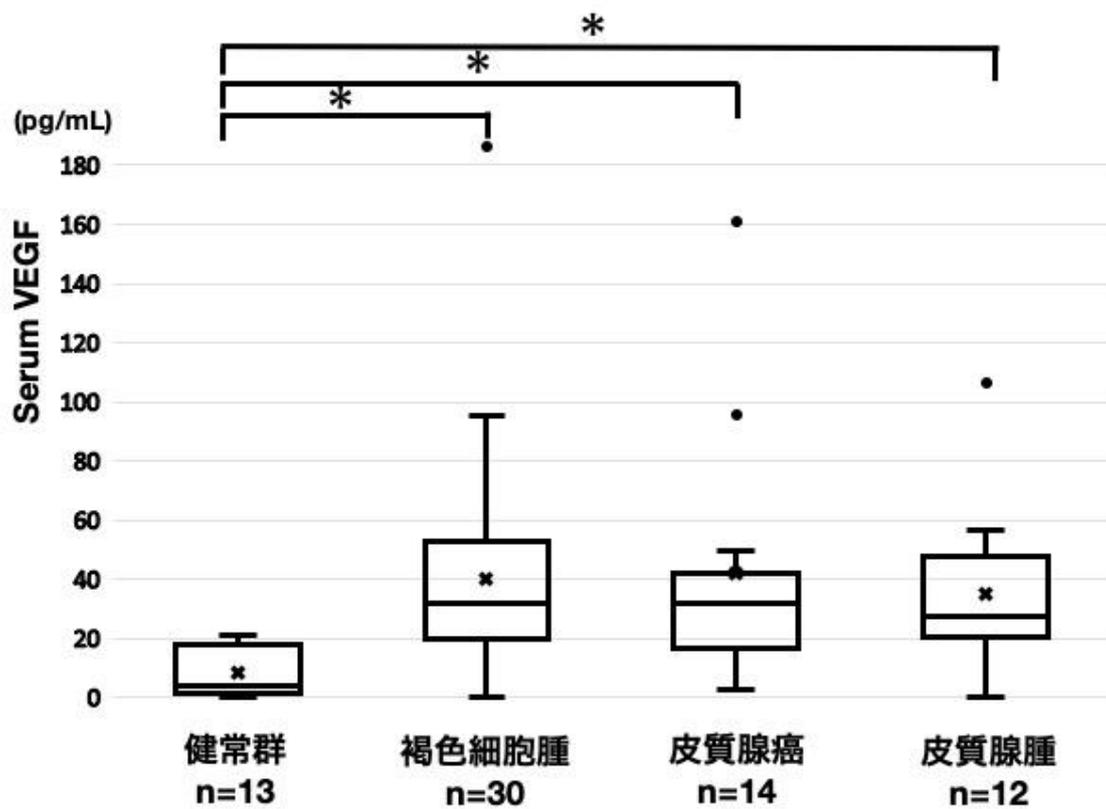


図 1-2. 健常群、褐色細胞腫群、副腎皮質腺癌群、副腎皮質腺腫群における血清 VEGF-A 濃度の比較

血清 VEGF-A 濃度は、健常群と比較し、褐色細胞腫群、副腎皮質腺癌群、副腎皮質腺腫群のいずれも有意に高値を示した。

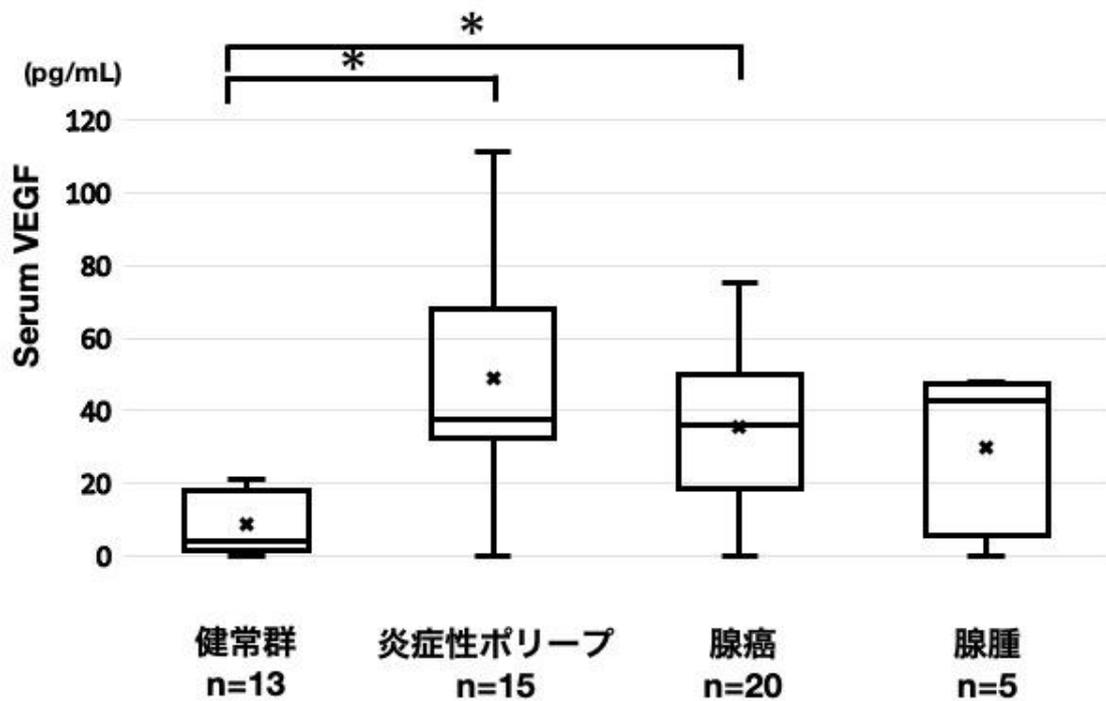


図 1-3. 健常群，結直腸腺癌群，結直腸炎症性ポリープ群，結直腸腺腫群における血清 VEGF-A 濃度の比較

血清 VEGF-A 濃度は，健常群と比較し，結直腸腺癌群および結直腸炎症性ポリープ群で有意に高値を示した。

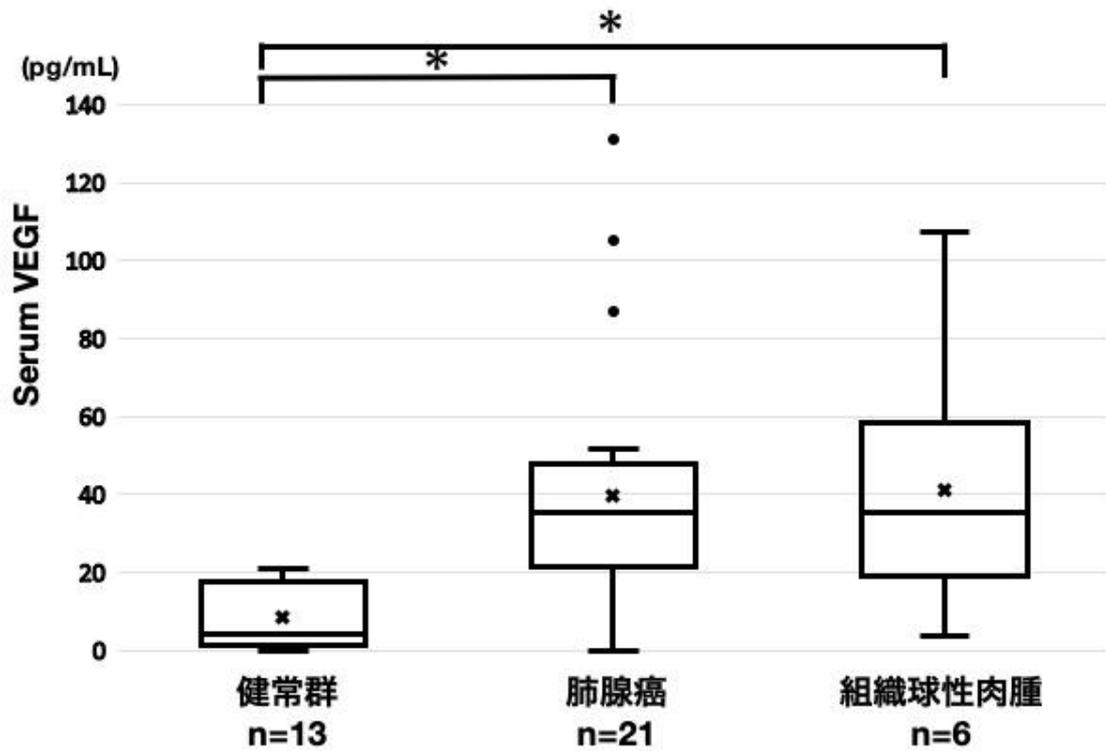


図 1-4. 健常群，肺腺癌群，肺組織球性肉腫群における血清 VEGF-A 濃度の比較  
 血清 VEGF-A 濃度は，健常群と比較し，肺腺癌群，肺組織球性肉腫群のいずれも  
 有意に高値を示した。

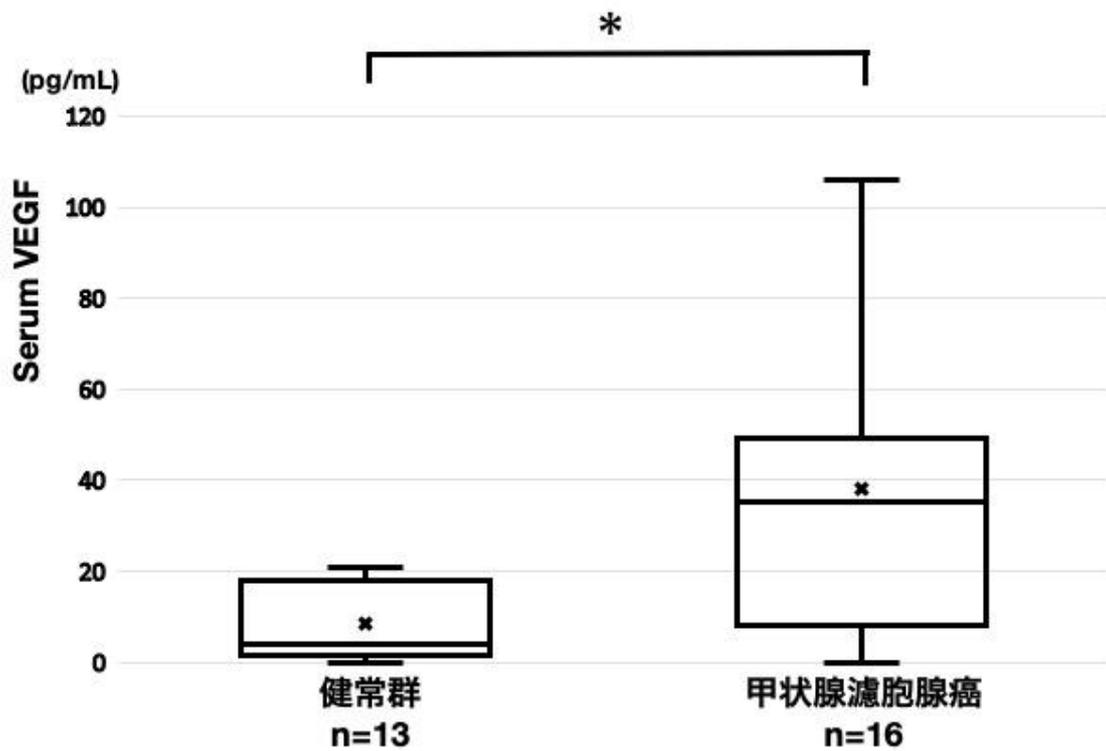


図 1-5. 健常群, 甲状腺濾胞腺癌群における血清 VEGF-A 濃度の比較

血清 VEGF-A 濃度は, 健常群と比較し, 甲状腺濾胞腺癌群は有意に高値を示した。

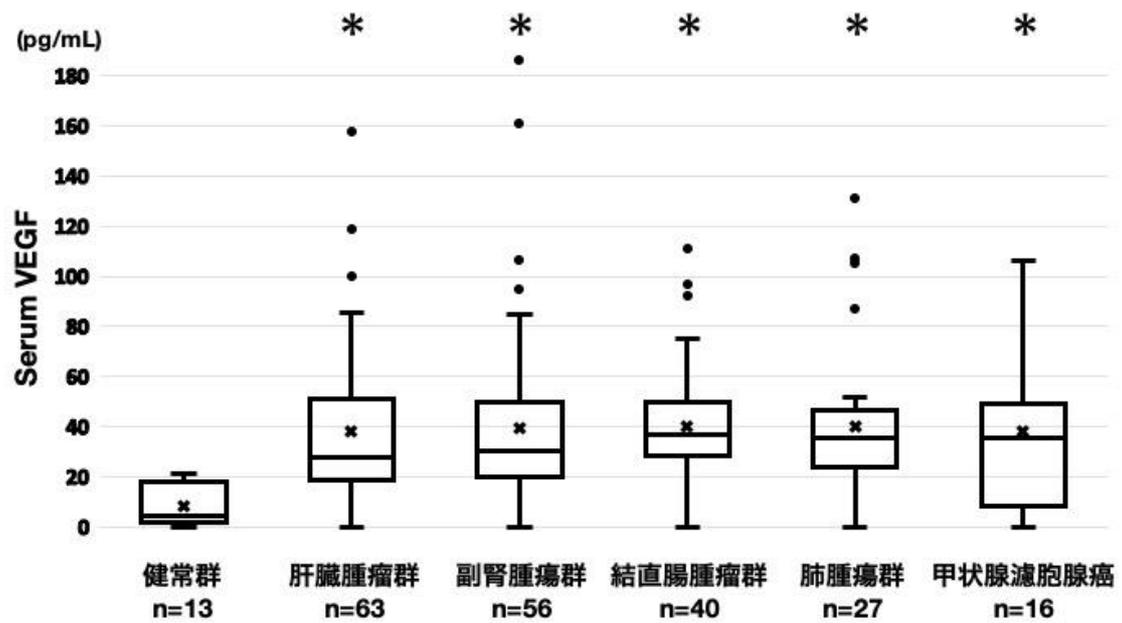


図 1-6. 健常群，肝臓腫瘍群，副腎腫瘍群，結直腸腫瘍群，肺腫瘍群，甲状腺濾胞腺癌における血清 VEGF-A 濃度の比較

血清 VEGF-A 濃度は，健常群と比較しいずれも有意に高値を示したが，発生臓器間での有意差は認められなかった。

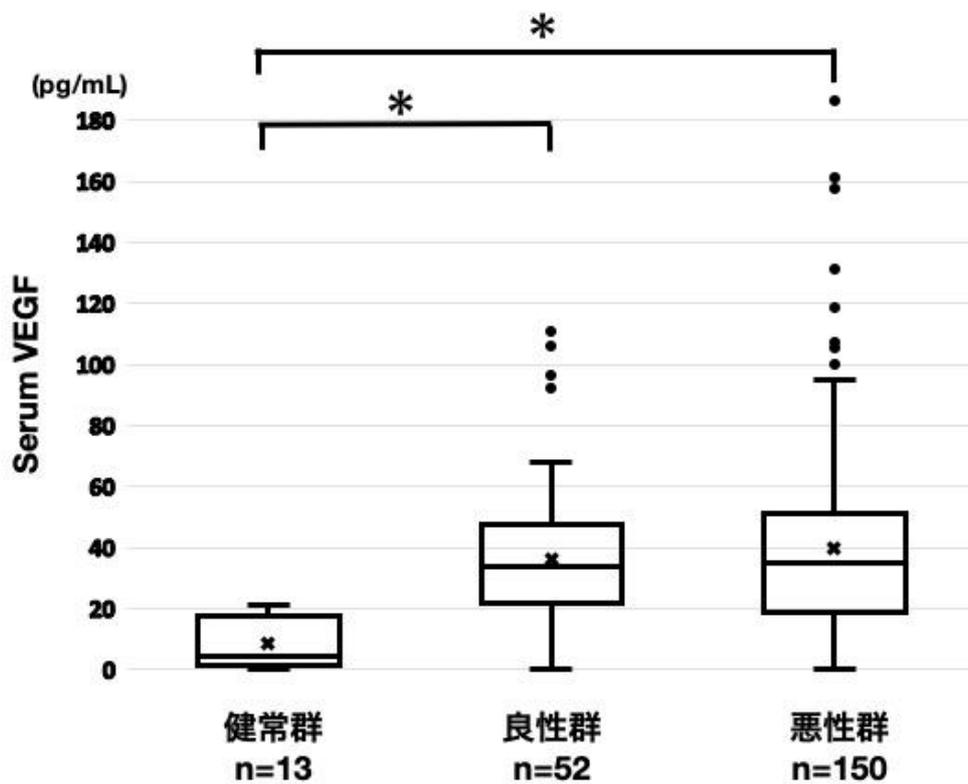


図 1-7. 健常群，良性腫瘍群，悪性腫瘍群における血清 VEGF-A 濃度の比較

血清 VEGF-A 濃度は，健常群と比較し良性腫瘍群，悪性腫瘍群いずれも有意に高値を示したが，良性・悪性間での有意差は認められなかった。

#### 4. 考察

犬の肝臓病変における針生検の感度は34.8%と報告されており[Bahr et al., 2013], 肝臓腫瘍を針生検のみで鑑別することは困難な場合が多い。肝臓腫瘍の質的診断に有用なバイオマーカーはほとんど無く, CT 造影検査による診断法[Kutara et al., 2014]や切除生検による病理組織学的診断が必要とされるが, いずれも麻酔下で実施する必要がある。ヒトの肝細胞癌患者は良性病変患者と比較して血清 VEGF-A 濃度が高く[Zhao et al., 2003], さらに肝細胞癌患者の血中 VEGF-A 濃度は癌の進行度やステージと相関していることから[Li et al., 2004; Poon et al., 2003], VEGF-A の予後指標として応用されている。本研究においても犬の肝細胞癌および肝細胞腺腫は, 健常群と比較し血清 VEGF-A 濃度が有意に高い値を示したが, 肝結節性過形成では有意差を認めなかった。したがって, 犬においてもヒトと同様に血清 VEGF-A 濃度の測定が肝臓腫瘍の質的診断に有用である可能性が示唆された。

副腎腫瘍群は病理診断間での血清 VEGF-A 濃度に明らかな違いは認められないものの, いずれも健常群と比較し血清 VEGF-A 濃度の高値を示した。したがって, 血清 VEGF-A 濃度のみで犬の副腎腫瘍の質的診断に用いることは難しいが, 副腎由来の腫瘍の場合には病理組織学的診断の結果に関わらず, VEGF-A を標的とした分子標的治療が有用である可能性が示唆された。

本研究における結直腸腫瘍群は, 非腫瘍性疾患である炎症性ポリープも多く含まれており, 炎症性ポリープおよび腺癌では健常群と比較して有意に高い血清 VEGF-A 濃度を示した。医学領域では炎症性疾患と VEGF との関連が報告されており[Folkman, 1995], さらに犬の結直腸炎症性ポリープにおける悪性転化の可能

性も指摘されている[Saito et al., 2018]。したがって、非腫瘍性病変である炎症性ポリープにおいても積極的な治療を行う必要があり、本研究の結果から犬の結直腸腫瘍に対して VEGF-A を標的とした分子標的治療が有用である可能性が示唆された。また、結直腸腺腫の血清 VEGF-A 濃度は健常群と有意差を認めなかったため、結直腸腫瘍においては存在診断に有用である可能性が示唆された。

犬の肺腺癌は、医学領域で抗 VEGF 抗体での治療が適応となる非小細胞肺癌 [Sandler et al., 2006] に相当すると考えられる。本研究では肺腺癌においても血清 VEGF-A 濃度が高値であったことから、ヒトと同様に抗 VEGF 抗体による分子標的治療が有用である可能性が考えられた。また、医学領域で抗 VEGF 抗体による分子標的治療の対象疾患は全て上皮性腫瘍であるものの、獣医学領域では血管肉腫 [Clifford et al., 2001; Frenz et al., 2014] やリンパ腫 [Gentilini et al., 2005] などの非上皮性腫瘍での血清 VEGF 濃度が高値であることが報告されている。さらに、本研究により新たに肺組織球性肉腫の血清 VEGF-A 濃度の高値が明らかになったことから、非上皮性腫瘍についても検討を重ねることで治療対象となり得ると考えられた。

犬の甲状腺濾胞腺癌は、固着や浸潤の程度により外科治療や放射線治療が選択される [Lunn and Page, 2013]。また、遠隔転移が認められた場合や、外科治療や放射線治療が選択できない場合には、化学療法が用いられるものの部分寛解率は 30-50% [Lunn and Page, 2013] であり、半数以上の症例では十分な効果が得られない。したがって、犬の甲状腺濾胞腺癌に対する治療効果の高い化学療法が模索されており、本研究結果から他の腫瘍性病変と同様に甲状腺濾胞腺癌の犬においても血清 VEGF-A 濃度の高値を示したことから、VEGF-A を標的とした分子標的治

療が適応となる可能性があると考えられた。

本研究により肝臓腫瘍，副腎腫瘍，結直腸腫瘍，肺腫瘍および甲状腺濾胞腺癌を有する犬では健常犬と比較して有意な血清 VEGF-A 濃度の高値が認められたことから，腫瘍に関連した血管新生が盛んに行われていると推察された。犬におけるこれらの腫瘍性疾患の血清 VEGF-A 濃度を示した報告は見当たらず，本研究において新たに血清 VEGF-A 濃度が高いことが明らかとなった。さらに，肝臓腫瘍および結直腸腫瘍においては血清 VEGF-A 濃度の測定が，質的診断や存在診断に応用できる可能性が示唆された。今後，抗血管新生療法の可能性を追求するため，VEGF-A と腫瘍との関連性を明らかにし，症例数を増やしてさらなる検討を重ねることが必要である。本研究により，獣医学領域における VEGF-A を標的とした分子標的治療による血管新生阻害療法が臨床的に応用できる可能性が示唆された。

## 5. 小括

VEGF-A は血管内皮細胞に作用し，血管新生を促進することで，腫瘍の増殖や転移に密接に関わっている。医学領域においては，血中 VEGF-A レベルが特定の腫瘍患者で高値を示すことや，予後やステージと相関することが明らかとなっている。さらに VEGF-A の働きを阻害することで，腫瘍組織への血管新生を抑制する治療が行われている。犬においてもヒトと同様の VEGF 伝達系を有していることが知られているが，腫瘍性疾患における血中 VEGF-A 濃度については十分に検討されていない。したがって，本研究では様々な腫瘍性疾患の犬における血清 VEGF-A 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月に日本大学生物資源科学部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頭を対象とし，術前に採取された血清の VEGF-A 濃度の測定を行い，腫瘍群間での比較検討を行った。また，比較対象として健常ビーグル犬 13頭より採取した血清を使用した。

肝臓腫瘍群，副腎腫瘍群，結直腸腫瘍群，肺腫瘍群，甲状腺濾胞腺癌において健常群と比較して有意に高値を認めた。腫瘍性疾患犬を良性腫瘍群と悪性腫瘍群に分けて血清 VEGF-A 濃度を比較したところ，それぞれ健常群と比較し有意に高値を示したが，良性腫瘍群と悪性腫瘍群間において有意差は認められなかった。

以上より，肝臓腫瘍群，副腎腫瘍群，結直腸腫瘍群，肺腫瘍群，甲状腺濾胞腺癌では血清 VEGF-A 濃度が高値を示すことが明らかとなり，血管新生が盛んに行われていることが示唆された。本研究の結果は，VEGF を治療標的とした血管新

生阻害療法を臨床応用するための基礎的データとして活用でき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

## 1. 諸言

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。犬の腸管における腫瘍の発生は比較的まれで腫瘍全体の約 1%の発生率と報告されており[Dobson et al., 2002], 結直腸では腺腫性ポリープや腺癌が比較的多く認められる[Church et al., 1987; Valerius et al., 1997]。特に、本邦のミニチュア・ダックスフンドには結直腸における多発性の炎症性ポリープの発生が多く認められるが[Ohmi et al., 2012], 海外ではほとんど報告がない。

ミニチュア・ダックスフンドの結直腸炎症性ポリープは良性の非腫瘍性病変であり、犬の結直腸の腺腫や腺癌と比較して、上皮細胞のシクロオキシゲナーゼ-2 (Cyclooxygenase-2; COX-2) 陽性率が有意に高いことが報告されている[Uchida et al., 2016]。またインターロイキン-8 や Toll 様受容体の高発現や、Nucleotide-binding oligomerization domain 2 遺伝子の変異などが報告されており、炎症との関連が示唆されているものの、明確な原因は不明である[Igarashi et al., 2014, 2015; Tamura et al., 2013]。臨床症状として血便や排便痛、しづりなどを認めるため、積極的な治療が必要とされる[Ohmi et al., 2012]。

犬の結直腸腫瘍性病変は、良性病変の場合であっても再発や悪性転化する可能性が示唆されている[Valerius et al., 1997]。結直腸粘膜病変の摘出法には内視鏡的粘膜切除術[Coleman et al., 2014; Igarashi et al., 2013]や経肛門的粘膜剥離術[Danova et al., 2006]が用いられるが、これらの手技は切除可能範囲が限られており、取り残しにより局所再発する危険性がある。結直腸領域の病変が広範に存在する場合

には、完全切除を目的とした恥骨結合離開や骨盤骨切りを併用した結直腸切除術が実施される[Allen and Crowell, 1991; Davies and Read 1990]。これらの外科的手技は侵襲が大きく、重度の術後疼痛を伴い、排便障害や吻合部の裂開、狭窄などの合併症を引き起こすことがある。経肛門的全層プルスルー法は、これらの手術より切除範囲の延長が可能であるが、合併症の発生率が高く適応は限られる[Nucci et al., 2014; Ohmi et al., 2012]。

一般的に結直腸炎症性ポリープの病変は粘膜内に限局しており、粘膜-粘膜下組織プルスルー法[Shida et al., 2008]が適応できる。粘膜-粘膜下組織プルスルー法は、結直腸の病変をより広範囲に切除可能であり、合併症の発生率を低下できる可能性がある。しかし結直腸炎症性ポリープの病因には大腸炎が示唆されていることから、外科的切除後にも再発の危険性が存在する。そのため、術後補助療法は不可欠であると考えられるが、効果的な術後補助療法についてはほとんど報告されていない。したがって、本研究ではミニチュア・ダックスフンドにおける結直腸腫瘍性病変の臨床的特徴や病態を解析し、粘膜-粘膜下組織プルスルー法と術後補助療法の治療成績などについて検討した。

## 2. 材料および方法

### 1) 供試動物

2002年10月から2015年11月に日本大学生物資源科学部附属動物病院に来院し、下部消化管内視鏡検査によって結直腸腫瘤性病変を診断され、粘膜-粘膜下組織プルスルー法にて外科的切除を実施したミニチュア・ダックスフンド40頭を対象とした。

### 2) 方法

供試犬の医療記録から、性別、年齢（初診時）、体重（初診時）、臨床症状を調べた。全頭で血液検査、血液化学検査、胸部および腹部X線検査、腹部超音波検査、下部消化管内視鏡検査を実施した。また、結直腸の組織病理学的検査は下部消化管内視鏡検査および外科手術時に採材したものを供試材料とした。さらに手術成績、周術期管理、予後などについて詳細に調査した。

### 3) 麻酔および疼痛管理

全頭で橈側皮静脈または外側伏在静脈に留置針（22-24 G）を設置し、麻酔前処置としてファモチジン（1 mg/kg）またはラニチジン塩酸塩（2 mg/kg）の皮下投与を行った。硫酸アトロピン（0.04 mg/kg）を皮下投与した後、麻酔マスクからの酸素吸入下で、ミダゾラム（0.1 mg/kg）およびフェンタニルクエン酸塩とドロペリドールの合剤であるタラモナル（0.1 ml/kg）の静脈内投与を行った。次いで、プロポフォールによる麻酔導入を行った後、気管内チューブを挿管し、イソ

フルラン（1.5–2.5%）と酸素（2 L/min）による吸入麻酔で維持した。

術中の血行動態管理としてリドカイン塩酸塩（25–75  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ），ドパミン塩酸塩（2.5–10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ），ドブタミン塩酸塩（2.5–10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ）の静脈内定速注入（Constant-rate infusion; CRI）を行った。

疼痛管理として術前術後にモルヒネ（0.3 mg/kg）の筋肉内投与を行い，術中術後はレミフェタニル塩酸塩（5–40  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ ）の静脈内 CRI を行った。術後疼痛管理および大腸炎に対する抗炎症治療として非ステロイド性抗炎症薬（Non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs）を使用した。

#### 4) 粘膜-粘膜下組織プルスルー法（図 2-1～2-6）

全頭で術前 24 時間の絶食と乳酸加リンゲル液（3 ml/kg/hr）による点滴管理と，術直前に麻酔下での浣腸を実施した。術式は過去の報告[Shida et al., 2008]を一部改変し，症例はジャックナイフ位に保定した。直腸の粘膜-粘膜下組織の上下左右 4 カ所に支持糸をかけて牽引し，次に吻側の粘膜-粘膜下組織に上下左右 4 カ所に支持糸をかけた。上下左右の尾側支持糸と吻側支持糸間をメイヨー剪刀またはメツェンバウム剪刀で全周性に切開し，ガーゼおよびバイポーラ型電気メスを使用し，粘膜-粘膜下組織を筋層から剥離した。病変部を含む粘膜-粘膜下組織を分離した後，背側部を矢状方向に切開し粘膜面を露出し，主要病変が含まれていることを確認した。切開部の断端を 4-0 ポリグリカプロンまたはポリジオキサノン縫合糸にて背側・左右の順に生体側と縫着した後，粘膜-粘膜下組織の腹側面を切開し病変を摘出した。最後に腹側断端も同様に生体側と縫着し，上下左右の縫合糸間を単純結節縫合で吻合した。

#### 5) 術後管理と予後

摘出された組織は10%中性緩衝ホルマリンに48時間浸漬固定後、パラフィンによる包埋処理を行い、病理組織学的検索に供した。術後は食事管理および抗炎症治療を目的とした内科治療を実施した。予後は術後入院中および再診時の問診および臨床検査により調査した。再発は再手術が必要とされる臨床症状および下部消化管内視鏡検査所見と定義した。

#### 6) 統計学的解析

年齢、体重、血液検査、血液化学検査、下部消化管内視鏡検査日、摘出された腸管粘膜-粘膜下組織の長径、投薬期間、追跡調査期間は中央値[範囲]で表記した。



図 2-1. 術中体位

全ての患者は浣腸を実施した後にジャックナイフ位に保定した。

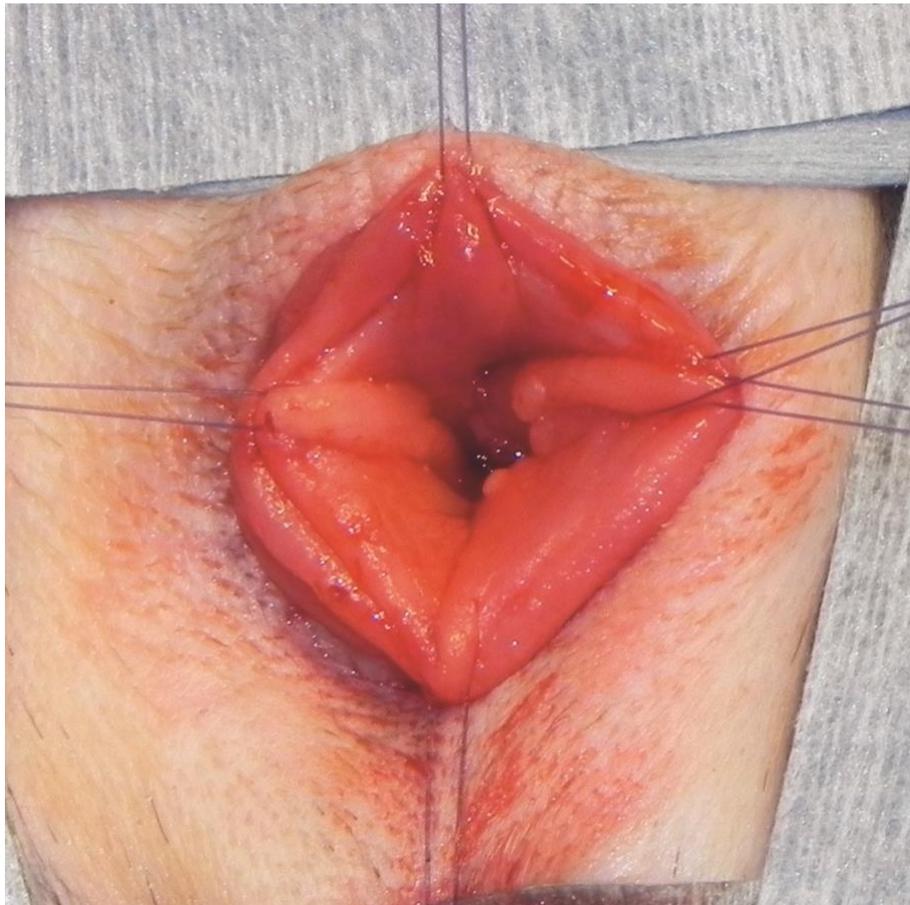


図 2-2. 支持糸の設置

ドゥベーカー鑷子および支持糸により、直腸の粘膜-粘膜下組織を引き出した。腫瘤を確認後、最初の支持糸の吻側上下左右4カ所にさらに支持糸をかけた。

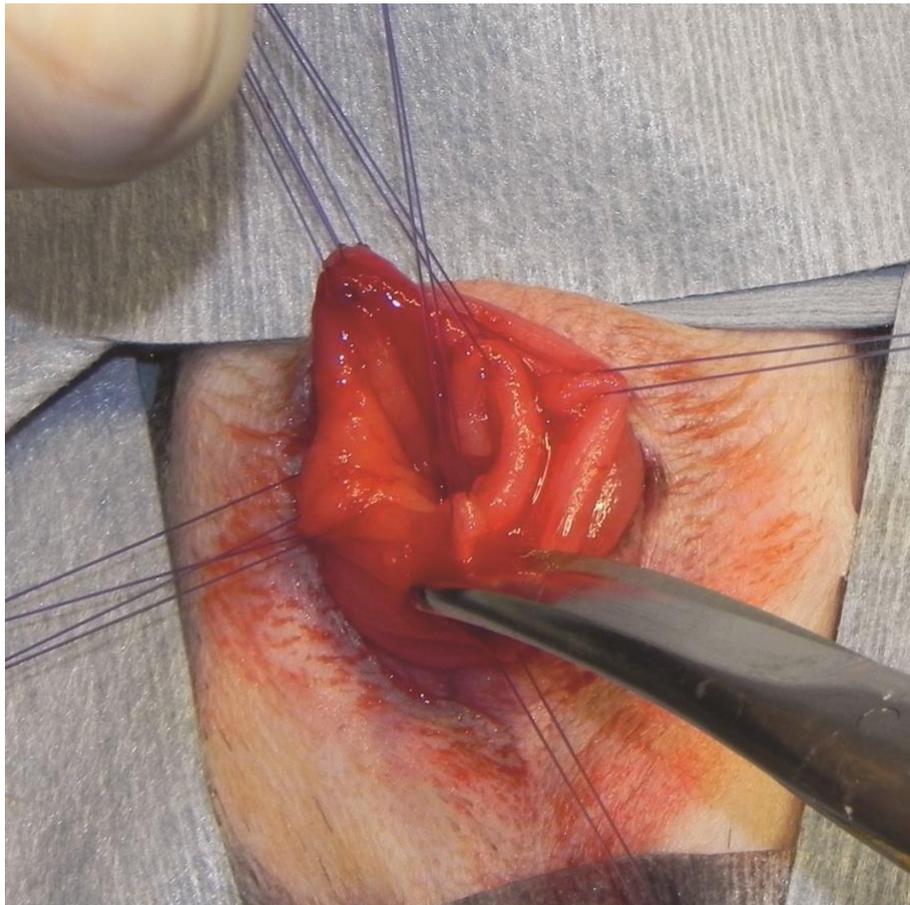


図 2-3. 粘膜-粘膜下組織の分離

支持糸間をメイヨー剪刀またはメツツェンバウム剪刀で切開し、粘膜-粘膜下組織を分離した。

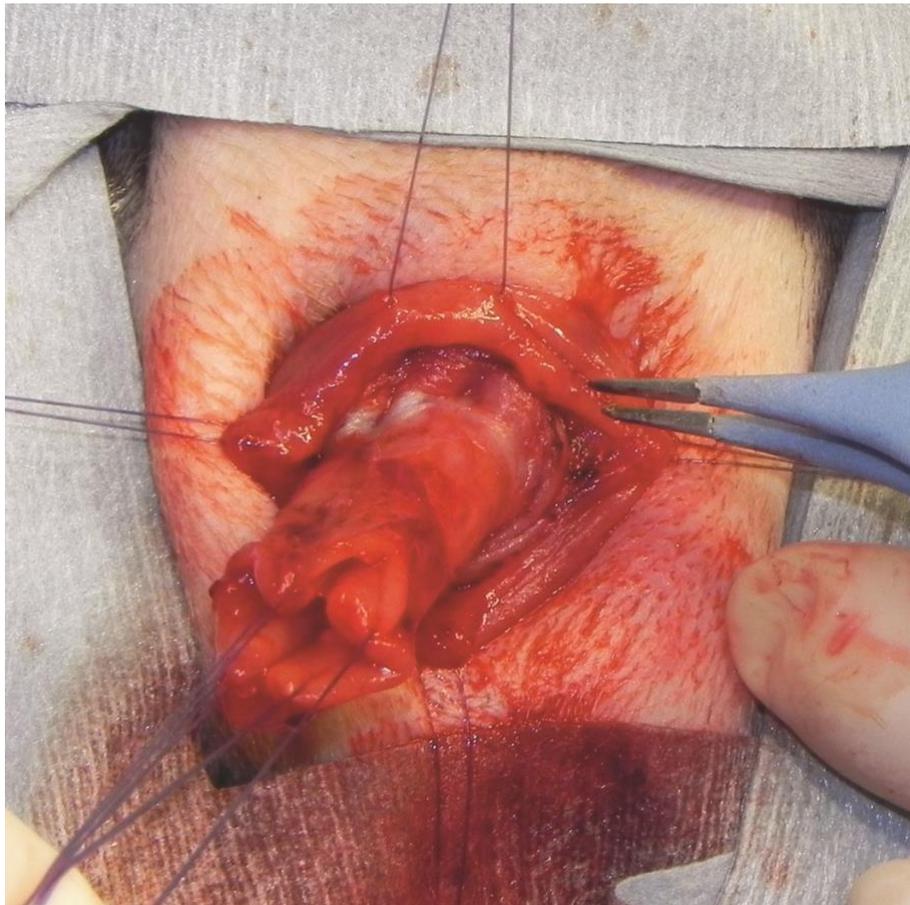


図 2-4. 粘膜-粘膜下組織の牽引

バイポーラ型電気メスを用い、筋層から丁寧に粘膜-粘膜下組織を剥離しながら、病変部を牽引した。

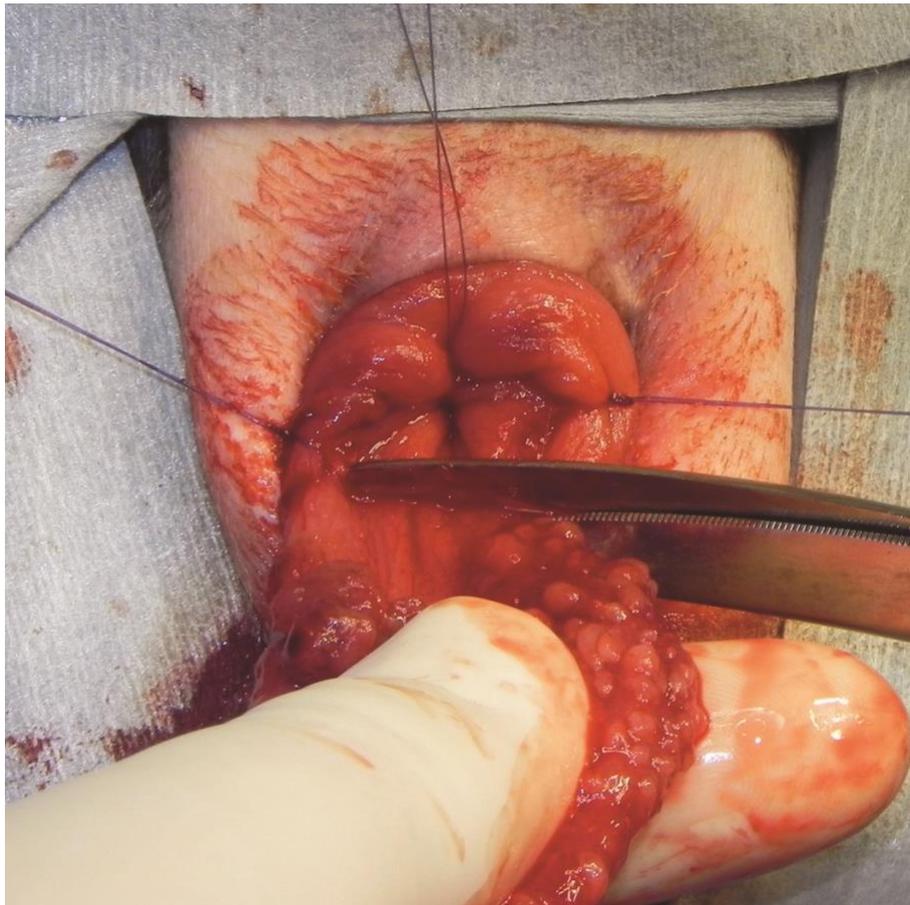


図 2-5. 病変部を含む粘膜-粘膜下組織の切離

牽引した粘膜-粘膜下組織の背側部を矢状方向に切開した。粘膜面を確認しながら主要病変よりも吻側の位置で切離して、病変を摘出した。

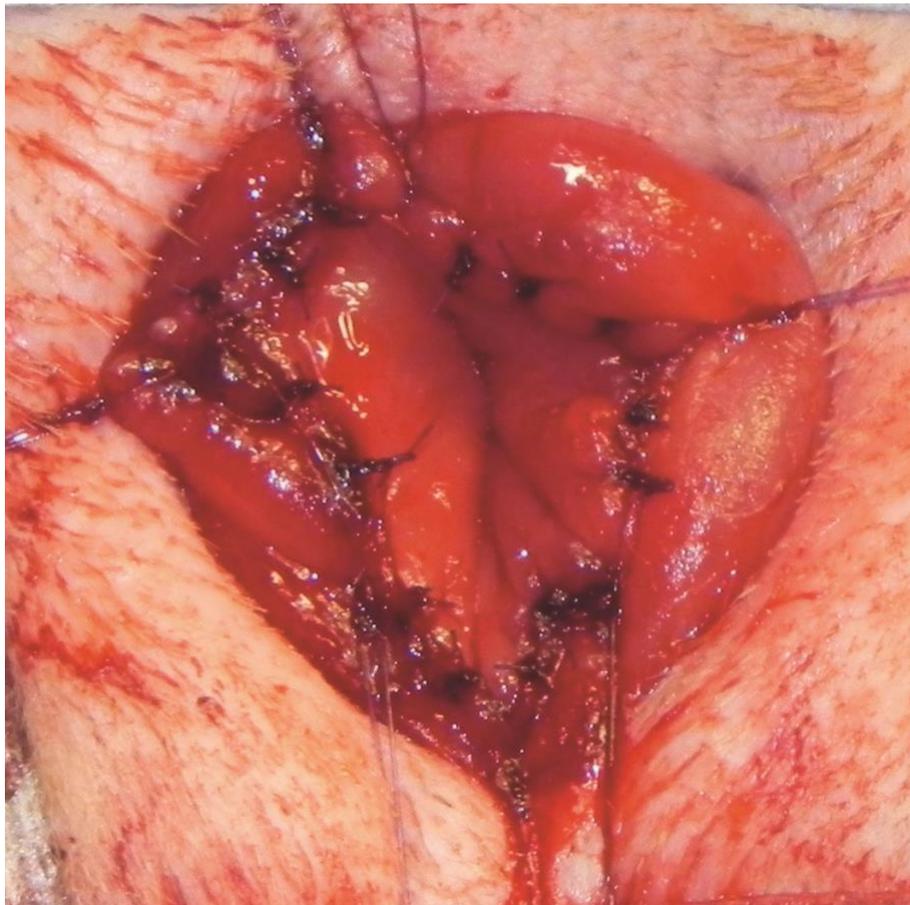


図 2-6. 吻側および尾側の粘膜-粘膜下組織層の吻合

切開部断端の上下左右を生体側と縫着した後に，さらに縫合糸間を等間隔で単純結節縫合して手術を終了した。

### 3. 結果

対象症例の年齢は9.55歳[2.7–15.3歳], 体重は5.47 kg[2.25–8.70 kg]であり, 性別は雄22頭(そのうち去勢雄が14頭), 雌18頭(そのうち避妊雌が10頭)であり, 雌雄差は認められなかった。

臨床症状は, 全頭(100%)で血便が認められたほか, しぶりが30頭(75%), 軟便が28頭(70%), 粘液便が28頭(70%), 頻回便が18頭(45%), 便形状変化が12頭(30%), 直腸脱が7頭(17.5%)で認められた。術前の内科治療では14頭(35%)でプレドニゾロンが使用されたが, 明らかな臨床症状の改善は認められなかった。

初診時に血液検査および血液化学検査を実施した(表1-1)。血液検査では, 血小板数(platelet; Plt)の増加が15頭(37.5%), 白血球数(White blood cell; WBC)の増加が10頭(25%), ヘマトクリット値(Packed cell volume; PCV)の減少が3頭(7.5%)で認められた。WBCの増加が認められた10頭は好中球の割合が89%[76–93%]と好中球優位であった。血液化学検査では, C反応性蛋白濃度(C-reactive protein; CRP)の増加が17頭(42.5%), 血清アルブミン濃度(Albumin; Alb)の低下が9頭(22.5%), 血清総蛋白(Total protein; TP)の低下が1頭(2.5%)で認められた。

全頭で胸部および腹部X線検査, 腹部超音波検査を実施し, 肺野やリンパ節への転移が疑われる所見は示さなかった。また直腸検査では全頭で腫瘤状病変が触知可能であった。

下部消化管内視鏡検査は術前28日目[11–178日目]に実施され, 発生部位は直腸

周囲のみが 18 頭 (45%) で、下行結腸まで浸潤が 21 頭 (52.5%)、横行結腸付近まで浸潤が 1 頭 (2.5%) であり、30 頭 (75%) で全周性、7 頭 (17.5%) で半周性、3 頭 (7.5%) で部分的に腫瘍が認められた。内視鏡超音波検査 (Endoscopic ultrasound; EUS) 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 (図 2-7)。

内視鏡下生検による病理組織学的検査では炎症が 3 頭 (7.5%)、炎症性ポリープが 28 頭 (70%)、腺腫が 2 頭 (5%)、腺癌が 7 頭 (17.5%) で認められた。

全頭で粘膜-粘膜下組織プルスルー法を実施することが可能であり、肉眼上の腫瘍性病変が切除された。切除された腸管粘膜-粘膜下組織の長径は 7.5 cm[3.1–12.2 cm]であった。術直後の軽度合併症として血便、しぶりが全頭で認められたが、内科治療のみで全て 2 カ月以内に改善した。

外科的切除による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、その他に潰瘍が 1 頭 (2.5%)、腺腫が 1 頭 (2.5%)、腺癌が 10 頭 (25%) で部分的に認められた (図 2-8)。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%) で陰窩の拡張などの初期病変が、17 頭 (42.5%) で病変が認められた。病変の局在は粘膜内限局が 37 頭 (92.5%)、粘膜下組織まで浸潤が 3 頭 (7.5%) で認められ、EUS と病理組織学的検査の診断一致率は 94.7%であった。術中および術後在院死は認められなかった。7 頭 (17.5%) で内視鏡下生検と外科的切除による病理組織学的検査での診断が異なった (表 1-2)。

術後補助療法はラクツロース (1–5 ml/頭) が全頭 (100%)、NSAIDs[フィロコキシブ (5 mg/kg) またはカルプロフェン (4.4 mg/kg)] が 36 頭 (90%)、メサラジン (10–20 mg/kg) が 36 頭 (90%)、メトロニダゾール (10–15 mg/kg) が 29 頭

(72.5%) で投与された。大腸炎の治療を目的とした長期内科治療として NSAIDs が 33 頭 (82.5%) に 123 日間 (32–1,838 日間), メサラジンが 33 頭 (82.5%) に 148 日間 (34–2,352 日間) 投与された。NSAIDs での治療反応が乏しい 2 頭 (5%) で内科治療が NSAIDs からプレドニゾロン (1 mg/kg) に変更された。

追跡調査期間は術後 118 日間 (13–2,638 日間) であった。死亡率は 0% で、5 頭 (40%) で再発が認められた (表 1-3)。再発を認めた 5 頭のうち 3 頭 (60%) は内科治療を継続 (うち 1 頭は投薬量を半減) しており、2 頭 (40%) は再発時に内科治療を継続していなかった。再発を認めた 5 頭のうち、初回手術時に腺癌を伴っていた 3 頭 (60%) は、粘膜下への浸潤は認めていなかったが、2 頭 (40%) はマージン部に病変が認められていた。再手術は粘膜-粘膜下組織プルスルー法が 2 頭、開腹下結腸切除術が 1 頭で実施され、臨床症状の改善を認めた。粘膜-粘膜下組織プルスルー法を実施した 1 頭で術後に敗血症性腹膜炎を認めたが、ホスホマイシン (30 mg/kg) およびイミペネム/シラスタチン合剤 (5 mg/kg) の投与により 4 週間で改善した。2 頭 (40%) は再手術を提示したが、その後の追跡調査が不可能であった。

表 1-1. ミニチュア・ダックスフンドの結直腸腫瘍性病変の  
血液検査および血液化学検査結果

項目	中央値	範囲	正常範囲	低値症例 (%)	高値症例 (%)
TP (g/dl)	6.5	5.1-7.3	5.2-8.2	1 (2.5)	0 (0)
Alb (g/dl)	2.95	2.0-3.9	2.7-3.8	9 (22.5)	1 (2.5)
CRP (mg/dl)	0.58	0.0-12.0	0.0-0.99	-	17 (42.5)
WBC (/ $\mu$ l)	10,150	4,300-220,000	6,000-17,000	3 (7.5)	10 (25)
PCV (%)	49	23.5-57.0	37.0-55.0	3 (7.5)	3 (7.5)

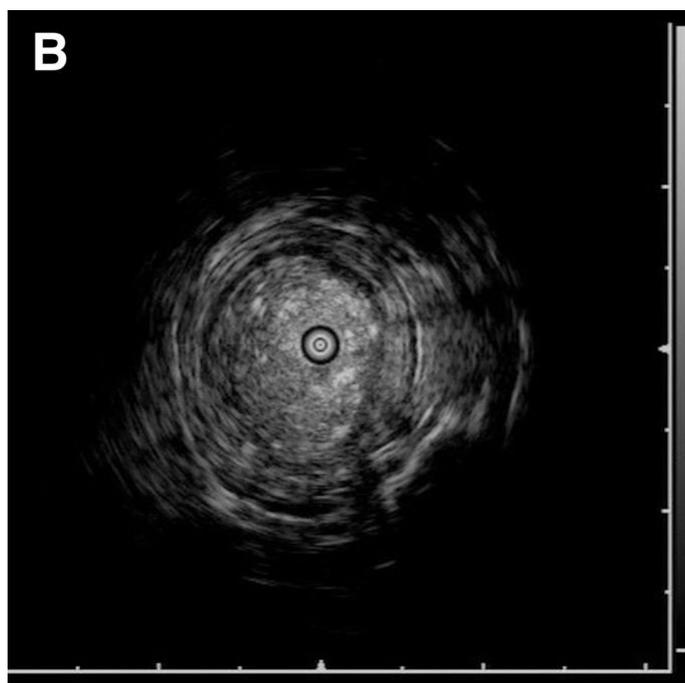
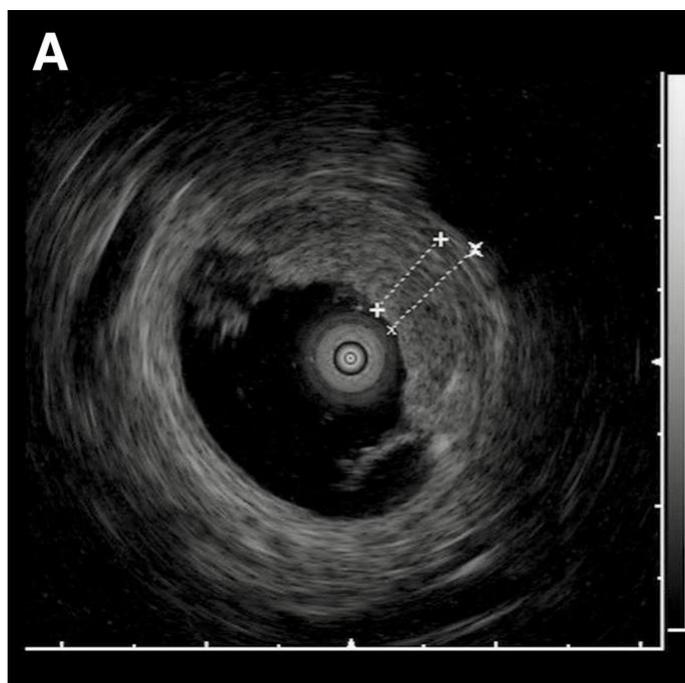


図 2-7. EUS 検査所見

A: 粘膜面限局の症例

B: 粘膜下組織浸潤の症例

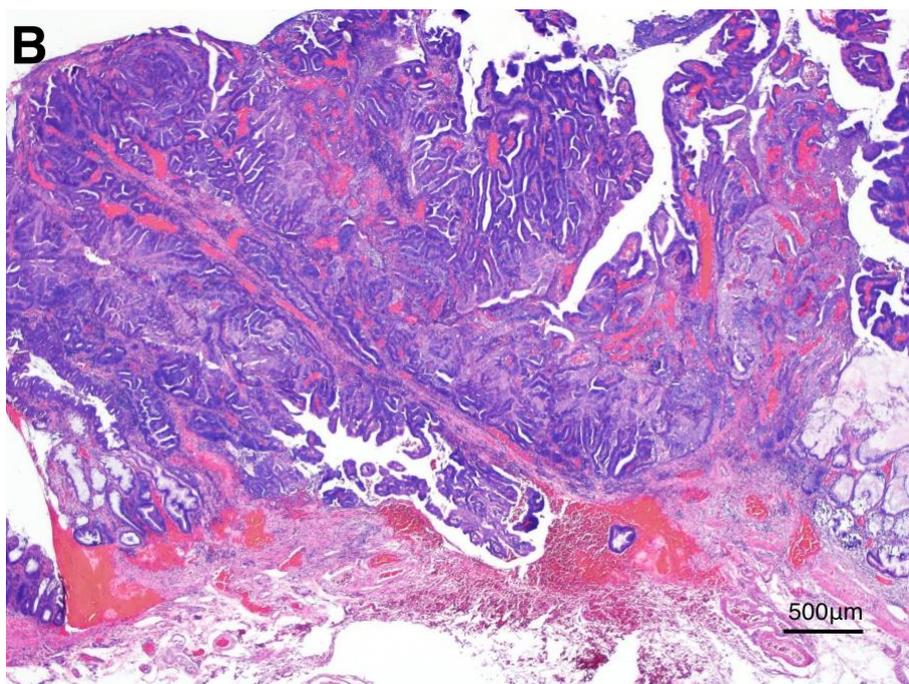
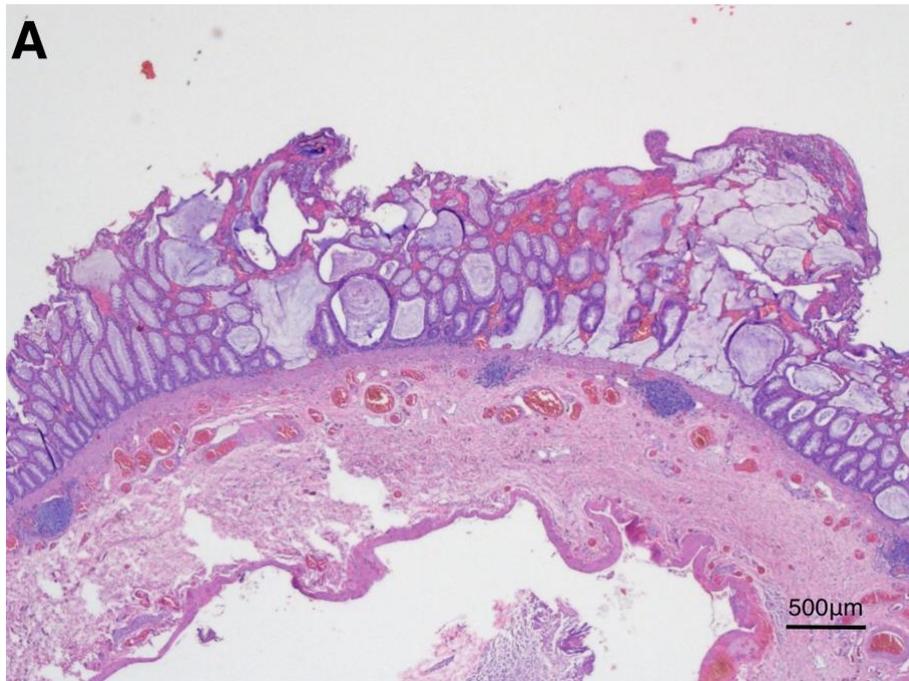


図 2-8 病理組織学的検査所見

A: 炎症性ポリープ（粘膜面限局）

B: 腺癌（粘膜下組織浸潤）

表 1-2. 内視鏡下生検および外科的切除の病理組織学的診断が異なった症例

症例	内視鏡下生検	外科的切除
1	炎症	炎症性ポリープ
2	炎症	炎症性ポリープ
3	炎症	炎症性ポリープ+潰瘍
4	炎症性ポリープ	炎症性ポリープ+腺腫
5	炎症性ポリープ	炎症性ポリープ+腺癌
6	腺腫	炎症性ポリープ+腺癌
7	腺腫	炎症性ポリープ+腺癌

表 1-3. 再発症例の詳細

症例	シグナルメント	病理診断	外科マージン (水平/垂直)	浸潤度	無病期間 (月)	術後補助療法 (再発時)	経過	観察期間 (日)
1	12歳齢, 去勢雄	炎症性ポリープ	ダーティ/クリーン	粘膜限局	77	中止	再手術後の経過良好 (結直腸切除術)	220
2	8歳齢, 未避妊雌	炎症性ポリープ	ダーティ/クリーン	粘膜限局	47	継続	再手術後の経過良好 (粘膜-粘膜下組織プルスルー法)	311
3	4歳齢, 未去勢雄	腺癌	クリーン/クリーン	粘膜限局	19	中止	再手術後の経過良好 (粘膜-粘膜下組織プルスルー法)	727
4	9歳齢, 未去勢雄	腺癌	ダーティ/クリーン	粘膜限局	2	継続	追跡不能	-
5	12歳齢, 未避妊雌	腺癌	ダーティ/クリーン	粘膜限局	2	継続	追跡不能	-

#### 4. 考察

本研究では、ミニチュア・ダックスフンドの結直腸腫瘍性病変における症状は血便（100%）やしぶり（75%）、粘液便（70%）を主体としており、これまでの報告[Ohmi et al., 2012]と同様であった。しかし、ミニチュア・ダックスフンドの結直腸炎症性ポリープは雄での発生が有意に多いと報告されているが、本研究では雄での発生が多いものの性差は認められなかった。年齢の中央値は 9.55 歳齢 [2.7–15.3 歳齢]と中齢で多く、以前に報告された 9.0 歳齢[6.6–12.7 歳齢][Ohmi et al., 2012]と同様の傾向であったが、本研究ではより若齢から高齢まで幅広い年齢での発生が明らかとなった。また、腺癌を伴っていた 10 頭（25%）においても、腫瘍の明らかな筋層への浸潤や、リンパ節、他臓器への転移は認められなかった。

血液検査および血液化学検査では半数以上の症例で WBC または CRP の増加が認められており、特に WBC の増加を認めた 10 頭は好中球優位であり、炎症に起因している可能性が考えられた。中でも 1 頭は WBC が 220,000/ $\mu\text{l}$ 、好中球数が 199,100/ $\mu\text{l}$  と顕著に高値であり、好中球増多症を呈した直腸腫瘍のコッカー・スパニエルの報告[Knottenbelt et al., 2000]に類似していた。本症例は術前に骨髄検査を含む、各種検査により他の疾患は否定されており、術後 2 カ月目に WBC が 26,100/ $\mu\text{l}$  まで低下したことから、結直腸腫瘍から好中球増加に関わる因子が放出されていた可能性が示唆された。また一部では血便や軟便に起因すると考えられる Alb の低下（22.5%）や PCV の減少（7.5%）を認めており、術前の血液検査および血液化学検査が重要であると考えられた。

本研究では全頭で術前の内視鏡下生検による病理組織学的診断が実施され、う

ち7頭(17.5%)では外科的切除による病理組織学的検査と診断が異なっていた。特に3頭(7.5%)では外科的切除による病理組織学的検査において、新たに腺癌が検出されており、これは検体量に起因すると考えられた。そのため、内視鏡下生検による診断が良性の結果であっても、悪性の部位が存在する可能性は否定できないと考えられた。

下部消化管内視鏡検査は治療方法を選択する上で重要な検査法であり、病変の分布を詳細に観察可能であった。EUSは結直腸の腫瘍性病変の浸潤程度の評価が可能であり[Hayashi et al., 2012], 38頭(95%)は術前にEUSを実施し、粘膜および粘膜下組織に病変が限局していることを確認し、粘膜-粘膜下組織プルスルー法が選択された。本研究では明らかな筋層への浸潤が認められた症例はなかったが、EUSまたは外科的切除による病理組織学的診断により筋層への浸潤を認めた場合は全層プルスルー法を実施する必要があると考えられた。以前の報告でのEUSと病理組織学的検査の診断一致率は92%であり、一部症例が重複しているものの、本研究での診断一致率は94.7%と同等であり、EUSによる術前診断の有用性が再確認された。したがって、犬の結直腸腫瘍性病変における手術方法の選択にEUSを含む下部消化管内視鏡検査は重要であると考えられた。

ミニチュア・ダックスフンドの結直腸炎症性ポリープにおいて内科治療での臨床症状の改善率は80%であったものの、腫瘍が消失または顕著に縮小した割合は40%であったと報告されている[Ohmi et al., 2012]。しかし、本研究では全頭(100%)で臨床症状が改善し、主要な腫瘍性病変は切除されたことから、ミニチュア・ダックスフンドの結直腸腫瘍性病変に対する粘膜-粘膜下組織プルスルー法は高い治療効果が得られると考えられた。犬の結直腸腺癌に全層プルスルー法により治

療した報告では、術後死亡率が 18%、長期的な排便障害が 9%であった[Morello et al., 2008]。さらに、直腸腫瘍に直腸プルスルー法を実施した報告では、術後合併症として排便障害や下痢、しぶり、狭窄を 78.4%で認め、31%の症例では永続的な排便障害が認められた[Nucci et al., 2014]。また、ミニチュア・ダックスフンドの炎症性ポリープ 3 頭に対して全層プルスルー法を実施したところ 1 頭で不可逆的な排便障害が認められた[Ohmi et al., 2012]。一方、本研究においては全頭で短期的な軽度合併症は認めたものの早期に改善し、長期間継続する合併症は認められなかった。全層プルスルー法と比較し、粘膜-粘膜下組織プルスルー法は重度合併症の発生率がほとんど無いことが示された。したがって、内科治療が奏効しなかった粘膜-粘膜下組織限局の結直腫瘍性病変に対して、粘膜-粘膜下組織プルスルー法が有効な治療選択肢になることが示唆された。

医学領域では、慢性炎症が主要な発がん因子であることが指摘されており、いくつかの種類のがんでは炎症環境下での悪性転化が認められている[Mantovani et al., 2008]。さらに、大腸炎患者の組織では腫瘍抑制遺伝子である p53 の変異が頻繁に観察されており、p53 を含む種々の遺伝子変異によるポリープから腺癌への悪性転化「adenoma-carcinoma sequence theory」は広く認められている[Fearon and Vogelstein, 1990; Hussain et al., 2000]。また、潰瘍性大腸炎およびクローン病を有する患者は、結直腸癌のリスクが高いことが報告されている[Eaden et al., 2001; Gillen et al., 1994]。しかし、結腸におけるがん化予防法として非選択的 COX 阻害薬であるアスピリンや選択的 COX-2 阻害薬である NSAIDs の効果が認められている[Jänne and Mayer, 2000]。獣医学領域ではミニチュア・ダックスフンドの結直腸炎症性ポリープの詳細な病態は不明であるが、上皮細胞での COX-2 発現率が高い

ことが認められており[Uchida et al., 2016], さらに大腸炎が存在していることで悪性転化を促進していることが指摘されている[Saito et al., 2018]。また, NSAIDsにより縮小した犬の直腸腫瘍の症例も報告されている[Knottenbelt et al., 2000]。以上の理由から, 結直腸におけるポリープや腫瘍が完全に切除された場合であっても, 炎症が存在すると再発が起こり得ると推察された。本研究において, マージン部に病変を認めなかった例は30%であったが, 大腸炎の抑制を目的にNSAIDsおよびメサラジンが処方されており, 再発率は12.5%であった。したがって, 結直腸腫瘍性病変を有する犬において, 術後補助療法は予後の改善のために重要であると考えられた。また, 3頭(7.5%)は術後補助療法を継続していたにもかかわらず再発を認めたことから, 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。

## 5. 小括

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病変は炎症性ポリープが多く認められ、その病因には大腸炎が示唆されていることから、外科的切除後にも再発の危険性が存在する。そのため、術後補助療法は不可欠であると考えられるが、犬の結直腸炎症性ポリープの効果的な術後療法はほとんど報告されていない。したがって、本研究ではミニチュア・ダックスフンドにおける結直腸腫瘍性病変の臨床的特徴や病態を解析し、粘膜-粘膜下組織プルスルー法と術後補助療法の治療成績などについて検討した。

2002年10月から2015年11月に日本大学生物資源科学部附属動物病院に来院し、下部消化管内視鏡検査によって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にて外科的切除を実施したミニチュア・ダックスフンド40頭を対象とし、供試犬の医療記録から、性別、年齢、体重、臨床症状、血液検査、血液化学検査、胸部および腹部X線検査、腹部超音波検査、下部消化管内視鏡検査、組織病理学的検査、手術成績、周術期管理、予後などについて詳細に調査した。

ミニチュア・ダックスフンドの結直腸腫瘍性病変は血便やしぶりを主症状とし、幅広い年齢に発症することが明らかになった。病理組織学的検査では炎症性ポリープが主体であり、25%の症例では腺癌を伴っていたが、粘膜-粘膜下組織プルスルー法による治療成績は良好であった。また、治療選択にはEUSを含む下部消化管内視鏡検査が有用であることが再確認された。NSAIDsおよびメサラジンの長期投与による術後補助療法が併用されており、87.5%の症例では経過は良好であったが、12.5%で再発を認めたことから、術後の新規治療法や治療プロトコルの

模索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

## 1. 諸言

腫瘍の増大には血管から運ばれる酸素と栄養が不可欠であり、血管新生は腫瘍の成長に重要な役割を担っている[Folkman, 1971]。さらに、血管新生は悪性腫瘍の転移にも関与していることが知られている[Argyle and Khanna, 2012]。そのため血管新生を阻害することにより、癌の制御を行う血管新生阻害療法が提唱された[Folkman, 1971]。その後、血管新生は VEGF や線維芽細胞増殖因子を含む、様々なサイトカインやメディエーターが血管内皮細胞に直接作用することで促進されることが報告されている[Ferrara and Henzel, 1989; Seghezzi et al., 1998]。VEGF の中でも VEGF-A は受容体である VEGFR-1 および VEGFR-2 と結合し血管内皮細胞を増殖させ、血管新生を促進させる。また近年、医学領域において COX-2 阻害薬である NSAIDs により血管新生が抑制されることや[Leahy et al., 2002]、ナトリウム利尿ペプチド受容体 1 (NPR1) 受容体と結合する ANP 製剤が肺癌患者の転移を予防することが示唆された[Nojiri et al., 2015]。しかし COX-2 や NPR1 遺伝子が犬の血管内皮細胞に発現しているかは明らかになっていない。

医学領域では血管内皮細胞を用いた研究が盛んに行われているが、各種増殖因子への反応性を維持している不死化細胞は存在せず、基本的には臍帯などから初代培養により分離されたヒト由来血管内皮細胞が血管新生関連研究に用いられている[Jaffe et al., 1973]。血管新生に最も寄与していると考えられている VEGF 伝達系は、ヒトと犬とで極めて類似していることが報告されている[Scheidegger et al., 1999]。しかし、動物種が異なる細胞を使用した結果を臨床に外挿することは適切ではない可能性がある。特に、犬の血管内皮細胞の分離法[Hu et al., 2013];

Oosterhoff et al., 2016]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血管新生に関する分子生物学的性状は十分に検討されていない。

また、血管内皮細胞は動脈や静脈で分子生物学的性状が異なることも知られており[Adams et al., 1999; Wang et al., 1998]、臍帯由来の血管内皮細胞では血管新生について十分に検討ができない可能性がある。そのため臍帯以外の体腔内の血管から内皮細胞を分取、培養する方法が必要となる。

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、血管新生関連遺伝子の mRNA 発現について検討した。

## 2. 材料および方法

### 1) 供試動物

身体検査，血液および血液化学検査，胸部および腹部X線検査によって，健常と確認されたビーグル成犬3頭を血管の採材に用いた。これらの犬は，日本大学生物資源科学部動物実験指針および手引きに従って管理した。

### 2) 血管採取

血管の採材に用いた健常ビーグル犬4頭は，麻酔前処置として橈側皮静脈に22G留置針を設置した。最初に塩酸ミダゾラム（0.2 mg/kg）と酒石酸ブトルファノール（0.2 mg/kg）を静脈内投与した。麻酔導入にはプロポフォール（6 mg/kg）による麻酔導入を行った後，気管内チューブを挿管し，イソフルラン（1.5–2.5%）と酸素（2 L/min）による吸入麻酔で維持した。その後，イソフルラン（5%）による深麻酔下に維持し，塩化カリウム（40 mEq/head）の静脈内投与にて安楽殺を行った。

その後，速やかに仰臥位に保定し，頸部正中切開により外頸静脈および総頸動脈を分離し，胸部肋間開胸により胸部後大静脈および胸部大動脈を分離した。分離した血管は片側を結紮糸で結紮し，分枝が存在した場合はそれぞれも同様に結紮を行った。血管の頭側端以外を結紮後，切断して摘出を行い，血管内を用手で抜いて脱血した。摘出した各血管はリン酸緩衝生理食塩水（Phosphate Buffered Saline; PBS）の入った試験管に入れて分離処理を行うまで冷蔵にて保存した。

### 3) 血管内皮細胞の分離

片側の断端が結紮されている血管の反対側から 0.25%トリプシン液をシリンジにて内腔が満たされるまで注入した。その後 10 分間静置し、シリンジにて内腔のトリプシン液を回収し、等量の MCDB131 培養液 (Gibco; Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama, Japan) と混合し反応を止めた。次いで、400G 3 分間の条件で遠心分離を行い、上清を排液し、沈渣をタッピング後に 10%ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS)加 MCDB131 培養液を加えて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。

### 4) 蛍光免疫染色

得られた細胞をガラススライドフラスコに培養し、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液により固定を行った。次に、0.1%サポニン加 PBS で膜透過処理を行い、1%FBS 加 PBS でブロッキングを実施した。一次抗体には抗マウス CD31 ウサギポリクローナル抗体 (1:20, Bioss Antibodies Inc., MA, USA) を使用して 4°C で 1 晩反応させた。二次抗体には Alexa488 を使用し、対比染色として DAPI により核を染色した。蛍光顕微鏡により観察し、免疫活性が陽性の細胞の比率を計測した。

### 5) 全 RNA 抽出および一本鎖 cDNA 合成

得られた細胞を 0.25%トリプシン液およびセルスクレーパーで剥離後、NucleoSpin® RNA kit (MACHERY-NAGEL GmbH & Co., Duren, Germany) を使用し、全 RNA の抽出および精製処理を行った。その後、吸光光度計 (NanoDrop 1000; LMS Co., Ltd., Tokyo, Japan) にて全 RNA の濃度を算出した。抽出された全

RNA は相補的な一本鎖 DNA を合成するために、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific K.K.) を用いて、逆転写反応を行った。氷上にて、全 RNA 1  $\mu\text{g}$  に反応液を加え、サーマルサイクラー (MyGenie32™ Thermal Block; Bioneer Corporation, Daejeon, Korea) を用いて 25°C 10 分間、37°C 120 分間、85°C 5 分間の条件にて cDNA 合成を行った。

#### 6) RT-PCR 法

得られた細胞の遺伝子発現を定性解析するために、RT-PCR 法を用いた。対象とする遺伝子は、血管内皮細胞の同定を目的に CD31 を用い、血管新生関連遺伝子として VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, COX-2 および NPR1 を選択した。RT-PCR 法に用いたセンスおよびアンチセンスプライマーは犬の RefSeq 登録遺伝子に対して Primer3 Plus software (<https://primer3plus.com>) を使用して設計し、作成した (表 2)。RT-PCR には GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, WI, USA) を用いて実施した。サーマルサイクラーを用いて 95°C 2 分間の熱変性を行った後に、95°C 30 秒間、55°C 30 秒間、73°C 15 秒間を 30 サイクル行い、73°C 3 分間の伸長反応の条件で実施した。その後、PCR 反応液の一部をローディングバッファーと混合し、2%アガロースゲルにアプライし Mupid®-exU (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて、電気泳動を 100V 30 分間の条件で行った。電気泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマイドで染色を行い、UV トランスイルミネーター上で、増幅産物を確認した。

表 2. RT-PCR に用いたプライマー

遺伝子	方向性	塩基配列 (5' - 3')	増幅産物 (bp)
CD31	Forward	AATCCCAAATTCCACGTCAG	346
	Reverse	GAATGGAGCACCACAGGTTT	
VEGF-A	Forward	TCAGGACACTGCTGTACTTTGAGG	133
	Reverse	GGCTTGTCAGGAGCAAGTGAA	
VEGFR-1	Forward	CACCTGGGCTGAGAGCAAAC	117
	Reverse	CCACACCTGGAATGGCAGAA	
VEGFR-2	Forward	GACAACCAGACGGACAGTGGTATG	157
	Reverse	ACTGGTAGCCACTCGTTTGGTTAG	
COX2	Forward	GTTTCATTCCTGATCCCCAAG	186
	Reverse	TTGAAAAGGCGCAGTTTATG	
NPR1	Forward	CGCATTGAGCTGACGCGAAA	249
	Reverse	TGAGGTTGCCATGGGAGCAA	

Forward: センスプライマー, Reverse: アンチセンスプライマー

### 3. 結果

各血管の内壁からトリプシン液により処理した培養液から紡錘形に増殖する線維芽細胞様および敷石状に増殖する内皮細胞様の細胞が得られた。そのうち内皮細胞様の形態を呈したものを選択して培養し、3週間で4回継代を実施した。

MCDB131 培養液による培養で内皮細胞は増殖を認め、各継代間で増殖速度や細胞形態に変化は認められなかった。

4 継代目の細胞を用いて蛍光抗体法を実施し、蛍光顕微鏡による観察により 99%以上の細胞で CD31 が陽性であった (図 3-1)。

RT-PCR 法では CD31, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, COX-2 および NPR1 遺伝子の増幅産物が、アガロースゲル上の適切な位置に明瞭なバンドとして確認され、mRNA の発現が検出された (図 3-2)。

以上の結果から、イヌ由来血管内皮細胞が分離され、4 継代目の細胞において VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, COX-2 および NPR1 の血管新生関連遺伝子の mRNA が発現していることが確認された。

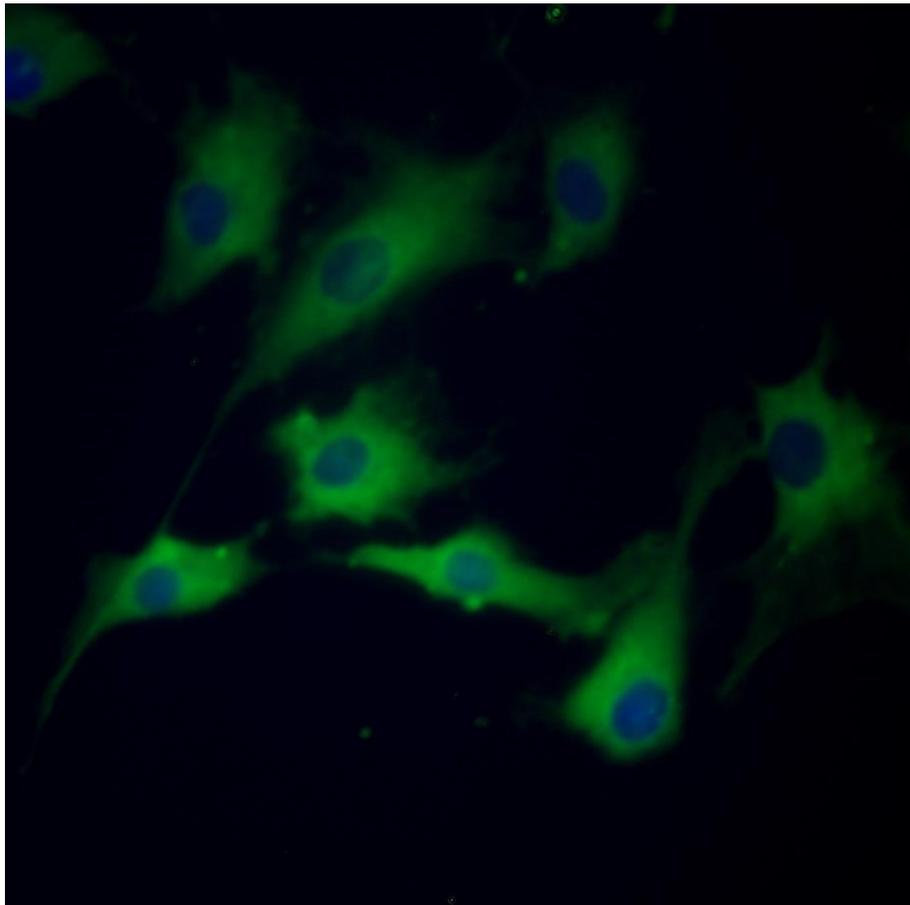


図 3-1. イヌ由来血管内皮細胞の蛍光免疫染色

CD31: Alexa488 (緑), 核: DAPI (青)

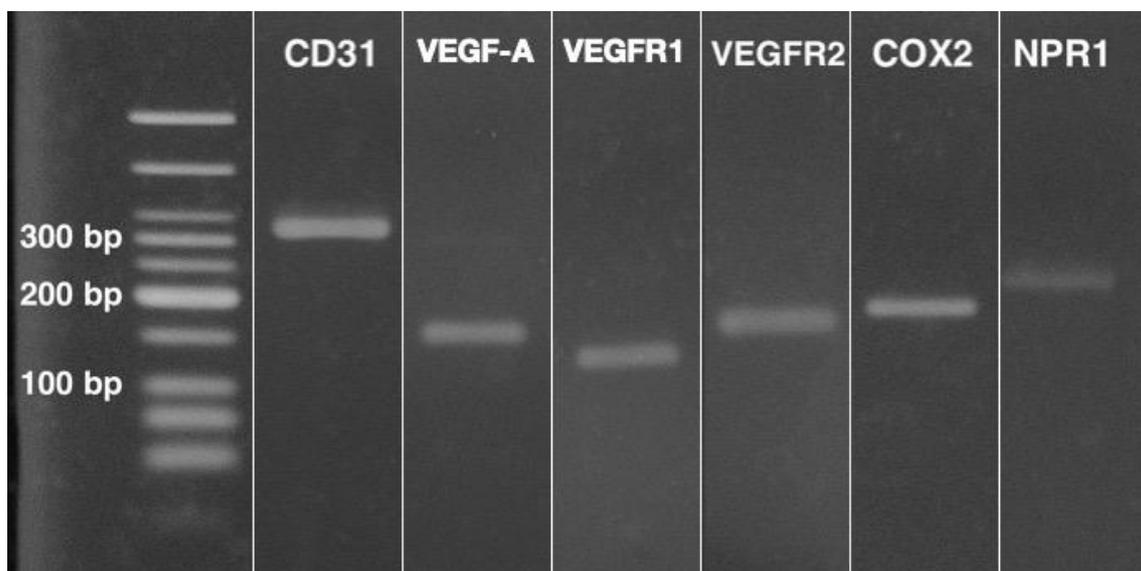


図 3-2 RT-PCR 法による血管新生関連遺伝子の検出

#### 4. 考察

本研究は安楽殺後の犬を用いており，対象とした外頸静脈，総頸動脈，胸部後大静脈および胸部大動脈をそれぞれ容易に摘出することが可能であった。さらに，本研究で用いられた血管中で最も径が細い総頸動脈においても片側からトリプシン液の注入ができ，血管内皮細胞の分離は十分に可能であった。医学領域では動脈および静脈の血管内皮細胞間で発現する遺伝子や，腫瘍に流入する血管と正常血管とでは性状が異なることが報告されている[[Hu et al., 2013](#); [Oosterhoff et al., 2016](#)]。一方，獣医学領域では犬の血管内皮細胞の種類については十分に検討されておらず，本手法を用いることで今後，血管の解剖学的部位による特徴や，正常血管および腫瘍血管での相違について解析するために有用である可能性が示唆された。

本手法で得られる可能性がある接着細胞は主に血管内皮細胞，血管平滑筋細胞および線維芽細胞であると考えられる。血管内皮細胞は一般的に，平滑筋細胞および線維芽細胞と比較して増殖速度が遅いが，敷石状の形態を取るため他の細胞との識別ができ，培養初期に選択することが可能であった。また，MCDB131 培養液を用いた培養方法で血管内皮細胞の順調な増殖が認められたことから，MCDB131 培養液はイヌ由来血管内皮細胞に対して適切な培地であると考えられた。本研究では内皮細胞様の形態を示した細胞群を選択することで，4回の継代を行っても蛍光免疫染色により細胞の99%以上がCD31陽性であったことから，純度の高いイヌ由来血管内皮細胞を得ることができた。

また，得られたイヌ由来血管内皮細胞は4回継代後も，血管新生関連遺伝子である VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, COX-2 および NPR1 遺伝子の mRNA が発現していた。以上のことから，本研究で得られたイヌ由来血管内皮細胞は主要な血管新生の経路である VEGF 伝達系や，COX-2 や NPR1 に関連する細胞の応答についての検討に有用である可能性が示唆された。

## 5. 小括

血管内皮細胞は、血管新生をはじめ、血管の収縮や弛緩、血液凝固などに関わっており様々な機能を有している。その中でも特に、血管新生においては、その起点となることから大きな役割を担っている。しかし、イヌ由来血管内皮細胞の分離や培養方法についての報告はほとんどなく、血管新生に関連する遺伝的性状もほとんど解析されていない。そこで、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、血管新生関連遺伝子の mRNA 発現について検討した。

身体検査、血液および血液化学検査、胸部および腹部 X 線検査により健常と判断したビーグル成犬 3 頭に、適切な方法で安楽殺を実施後、外頸静脈、総頸動脈、胸部後大静脈および胸部大動脈を摘出した。摘出した血管内腔からトリプシン液を用いて細胞を分離し、4 継代後に蛍光抗体法および RT-PCR 法を用いた性状解析を行った。

各血管の内腔からトリプシン液を用いて血管内皮細胞を分離することが可能であり、MCDB131 培養液により良好な増殖が得られた。

4 継代目の細胞において蛍光抗体法により 99%以上の細胞で CD31 が陽性であり、RT-PCR 法では CD31, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, COX-2 および NPR1 遺伝子の発現が検出された。この結果から、イヌ由来血管内皮細胞が分離され、4 継代目の細胞において VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, COX-2 および NPR1 の血管新生関連遺伝子の mRNA が発現していることが確認された。

以上より、イヌ由来血管内皮細胞においてトリプシン液を用いた分離および MCDB131 培養液による培養が可能であった。また、VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, COX-2 および NPR1 の血管新生関連遺伝子の発現が確認されたことから、本手法で得られたイヌ由来血管内皮細胞は血管新生関連研究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

## 1. 諸言

抗 VEGF 抗体であるベバシズマブは、VEGF-A がリガンドとして VEGFR-1 および VEGFR-2 に結合することを阻害し、腫瘍の増大や転移を抑制する分子標的薬である。医学領域では悪性腫瘍に対する血管新生阻害療法が確立しており、ベバシズマブをはじめとする血管新生阻害薬は結直腸癌[Hurwitz et al., 2004; Saltz et al., 2008], 肺癌[Sandler et al., 2006]や乳癌[Terada et al., 2017]などに広く利用されており、その治療の有効性が報告されている。そのため犬においても、ヒトと同様に、血管内皮細胞の増殖抑制が悪性腫瘍の増大や転移を抑制する補助療法として血管新生阻害薬が使用できる可能性がある。

NSAIDs は一般的に犬の整形疾患に関連する急性および慢性疼痛に使用されており[Vasseur et al., 1995], 近年では、悪性腫瘍に伴うがん性疼痛の緩和や[Gaynor, 2008], 術中のマルチモーダル鎮痛にも役立っている。さらに、NSAIDs は犬の膀胱移行上皮癌の治療効果を有することも知られている[McMillan et al., 2011]。医学領域においても NSAIDs が抗炎症効果だけでなく、血管新生阻害効果を有することが報告されている[Tsuji et al., 1998]。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。さらに、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[Tamargo et al., 1991]。近年、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) 製剤であるカルペリチドは、ナトリウム利尿ペプチド受容体 1 (Natriuretic peptide receptor 1; NPR1) を介して血管内皮細胞の活性を阻害することも示されている[Nojiri et al., 2015]。

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ため、犬の血管内皮細胞に対する、これらの薬剤の直接的な影響については明らかにされていない。

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。

## 2. 材料および方法

### 1) 薬剤の添加

第3章の方法で健常ビーグル成犬3頭から得られたイヌ由来血管内皮細胞を用いた。得られた6細胞群をそれぞれ96wellプレートに1,000個/wellで10%FBS加MCDB131培養液100 $\mu$ l中に播種した。その後、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>環境下で24間培養し、MCDB131培養液を吸引してPBSで洗浄した。

抗VEGF抗体であるベバシズマブ投与細胞群をVEGF-A非添加, 50 ng/ml 添加, 400 ng/ml 添加の3グループに分け、ベバシズマブ濃度0.1, 1.0, 2.0 mg/mlを各wellにMCDB131培養液（FBS無添加）100 $\mu$ lと共に添加した。

NSAIDsであるメロキシカム、カルプロフェン、ロベナコキシブおよび抗生物質であるミノサイクリン、ANP製剤であるカルペリチドの添加薬剤濃度は臨床的に使用し得られる最大血中濃度の1/4倍、1/2倍、1倍、2倍を設定した。メロキシカムは20, 40, 80, 160  $\mu$ g/ml、カルプロフェンは2, 4, 8, 16  $\mu$ g/ml、ロベナコキシブは165, 330, 660, 1,320 ng/mlをそれぞれMCDB131培養液（FBS無添加）中に添加し、ミノサイクリンは0.3, 0.6, 1.2, 2.4  $\mu$ g/ml、カルペリチドは0.625, 1.25, 2.5, 5 ng/mlを各wellにMCDB131培養液（FBS無添加）100 $\mu$ lと共に添加した。

### 2) 細胞増殖評価

各々の薬剤を添加した日を0日目とし、2日目に比色定量法を用いて血管増殖抑制効果を評価した。比色定量法は alamarBlue<sup>®</sup> Cell Viability Reagent（Thermo

Fisher Scientific, Inc.) を測定対象の well に 10 $\mu$ l 添加し, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 環境下で 2 時間培養した。その後, 蛍光強度測定を SpectraMax Gemini EM Microplate Reader (Molecular Devices, LLC., San Jose, CA, USA) を用い, 励起波長 570 nm および測定波長 590 nm の条件で行った。得られた値から薬剤非添加細胞群の細胞増殖活性を 100%として, それぞれの薬剤添加群の細胞増殖活性を 6 細胞群の平均値で表した。

### 3. 結果

#### 1-1) VEGF-A 添加群

VEGF-A 非添加群の細胞増殖活性を 100% として、VEGF-A 50 ng/ml 添加群では 123%、VEGF-A 400 ng/ml 添加群では 113%であり、それぞれ VEGF-A 非添加群よりも高い細胞増殖活性を示した (図 4-1)。

#### 1-2) VEGF-A+ベバシズマブ添加群

VEGF-A 非添加群における細胞増殖活性は、ベバシズマブ濃度 0.1 mg/ml 添加では 99%、1.0 mg/ml では 91%、2.0 mg/ml では 55%であった。VEGF-A 50 ng/ml 添加群における細胞増殖活性は、同様にベバシズマブを調整した上でそれぞれ 90%、71%、43%であり、VEGF-A 400 ng/ml 添加群における細胞増殖活性はそれぞれ 89%、68%、45%であった (図 4-2~4-4)。

#### 2) NSAIDs 添加群

メロキシカム添加群における細胞増殖活性は、低濃度添加群から順にそれぞれ 60%、52%、43%、30%であった。同様にカルプロフェン添加群における細胞増殖活性はそれぞれ 100%、97%、67%、34%であり、同様にロベナコキシブ添加群では 87%、81%、79%、71%であった (図 4-5~4-7)。

### 3) ミノサイクリンおよびカルペリチド添加群

ミノサイクリン添加群における細胞増殖活性は、低濃度添加群から順にそれぞれ 86%, 85%, 87%, 86%であり、同様にカルペリチド添加群における細胞増殖活性はそれぞれ 90%, 86%, 86%, 86%であった (図 4-8, 4-9)。

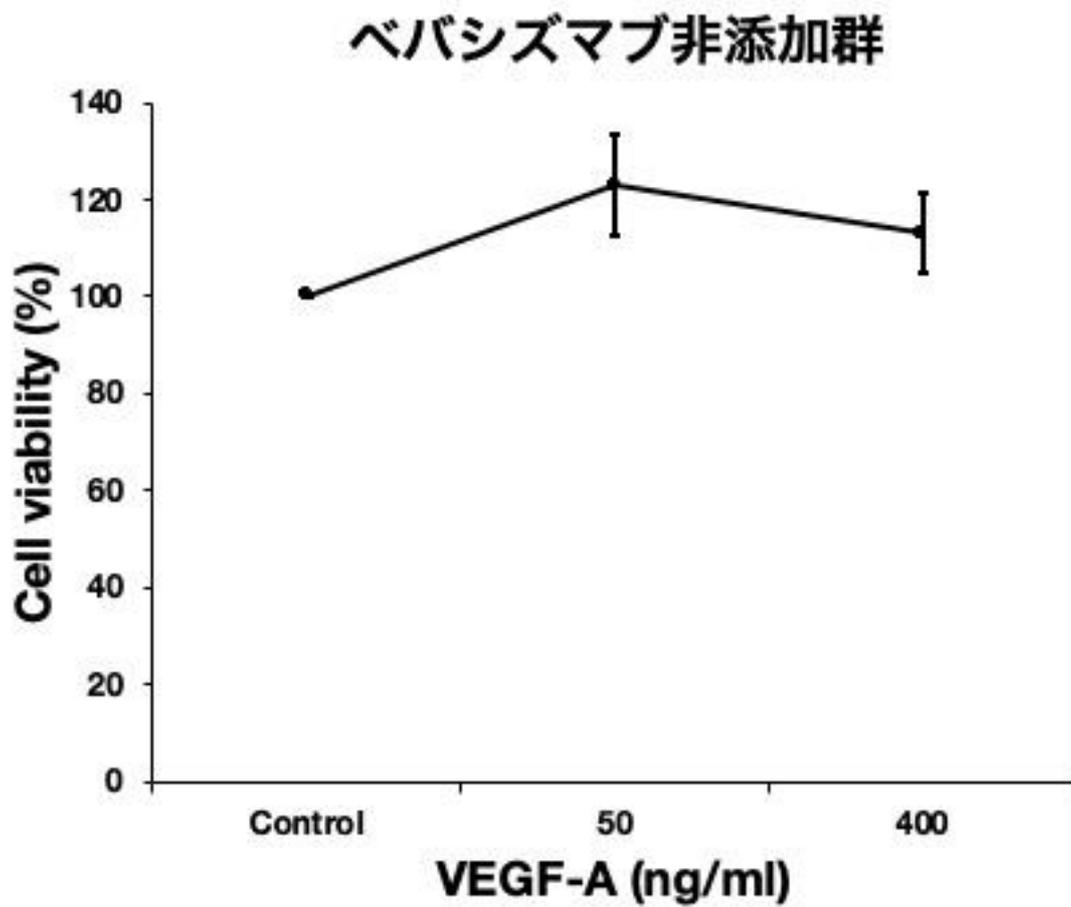


図 4-1. VEGF-A 添加時におけるイヌ由来血管内皮細胞の細胞増殖活性

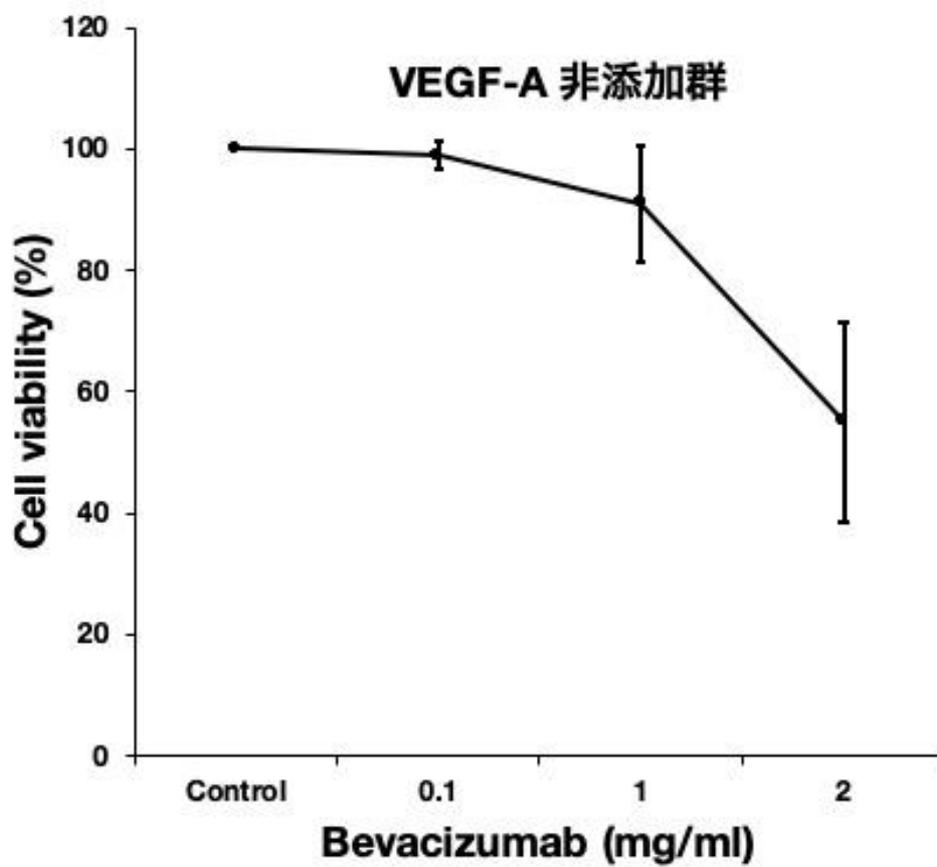


図 4-2. VEGF-A 非添加細胞群におけるベバシズマブ添加時の細胞増殖活性

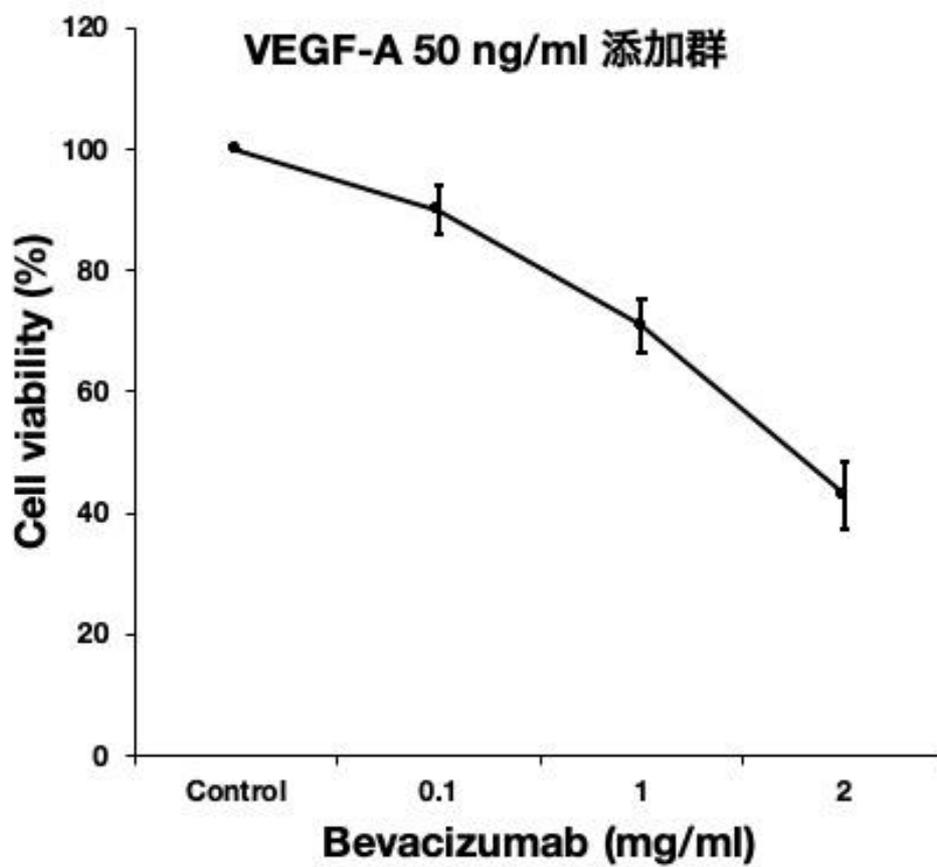


図 4-3. VEGF-A 50 ng/ml 添加細胞群におけるベバシズマブ添加時の細胞増殖活性

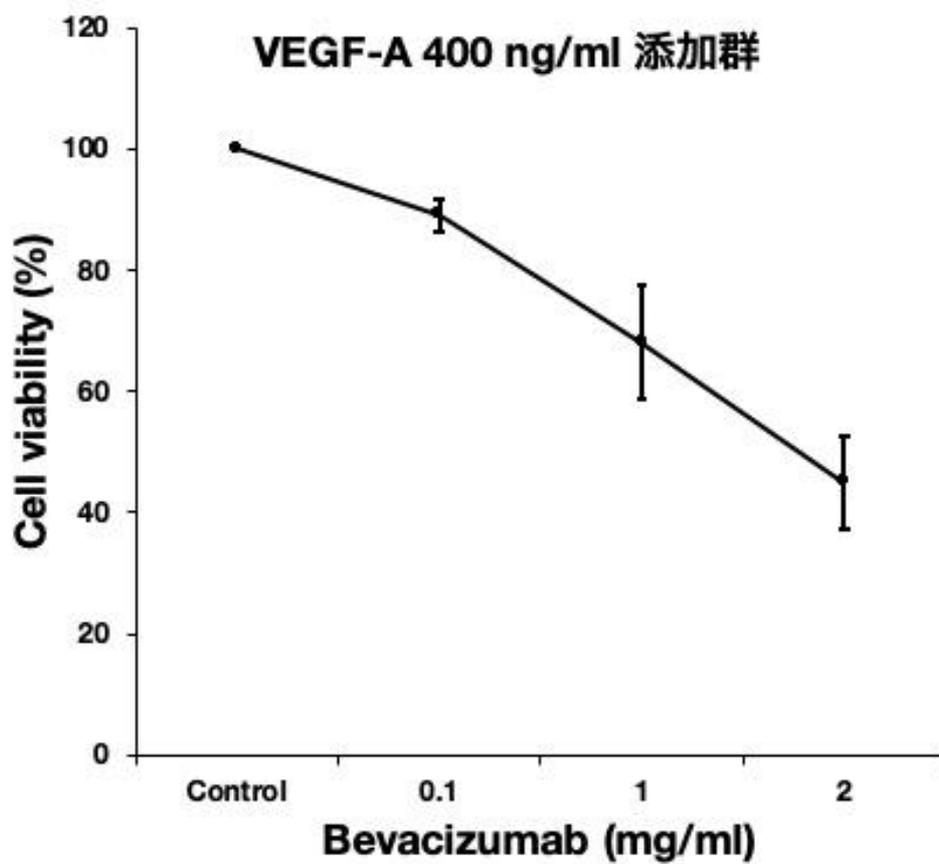


図4-4. VEGF-A 400 ng/ml 添加細胞群におけるべバシズマブ添加時の細胞増殖活性

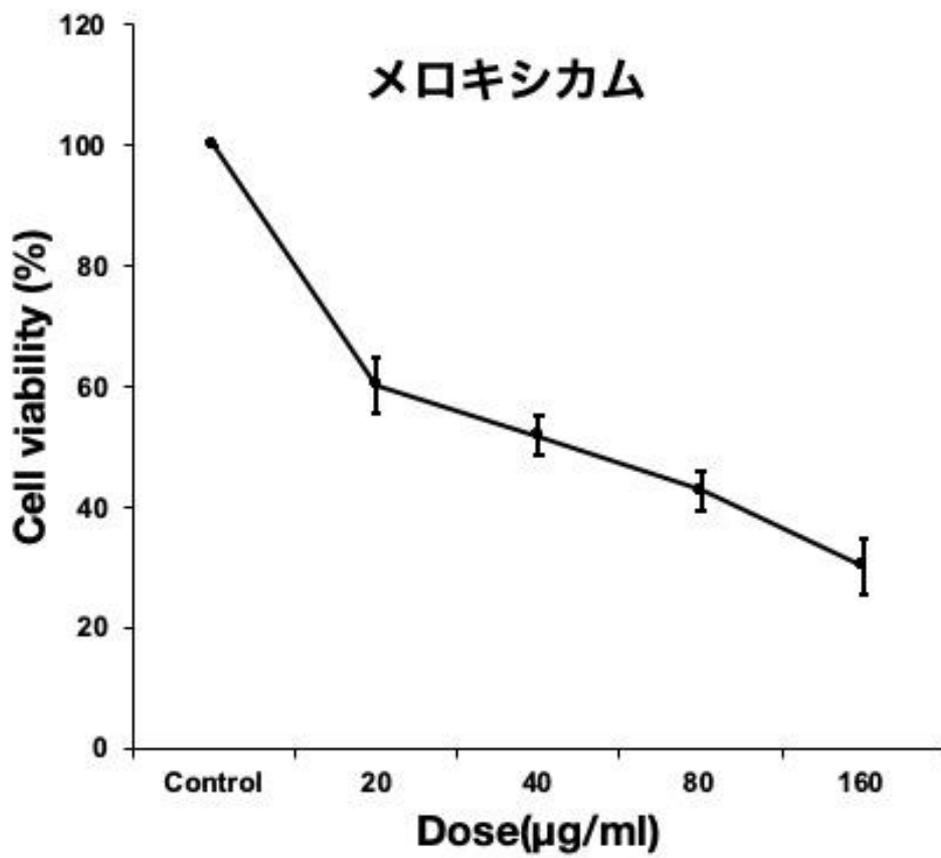


図 4-5.メロキシカム添加細胞群の細胞増殖活性

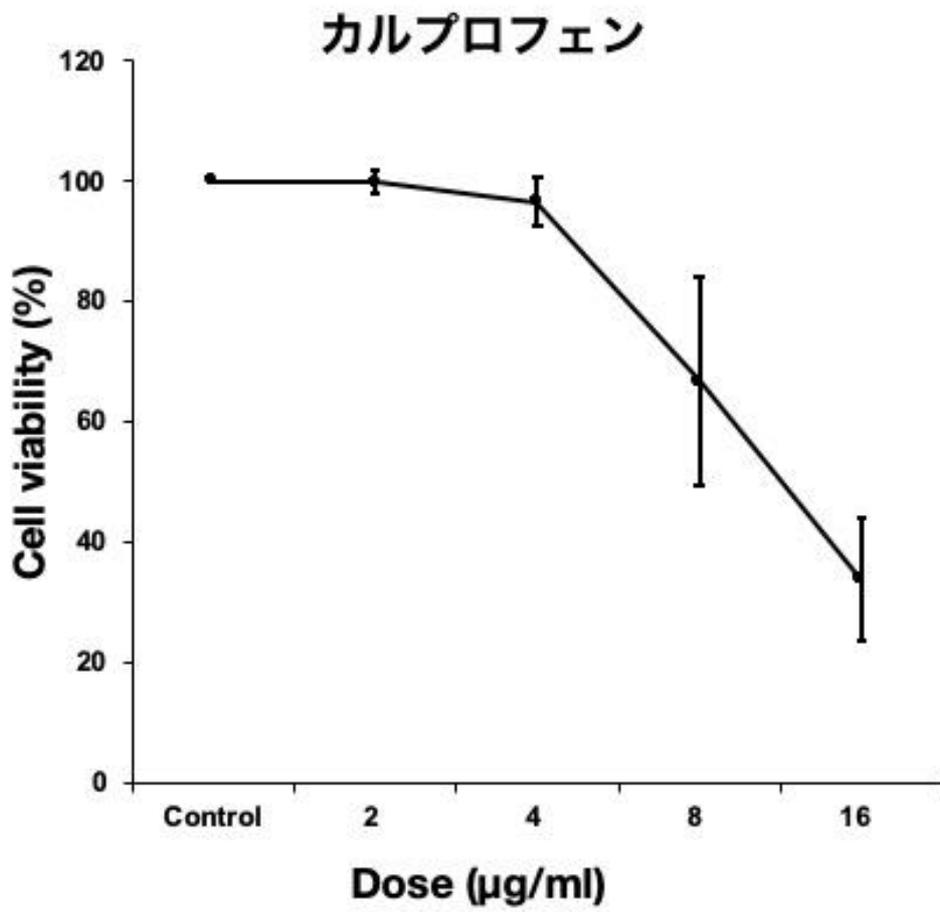


図 4-6. カルプロフェン添加細胞群の細胞増殖活性

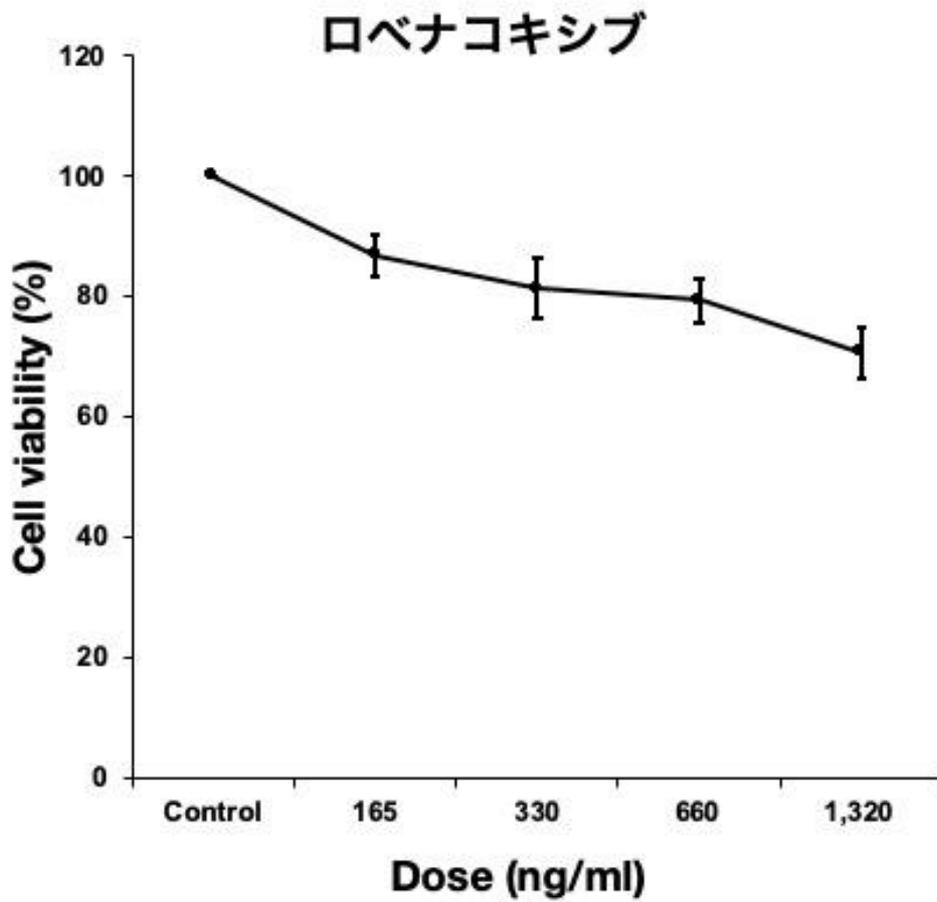


図 4-7. ロベナコキシブ添加細胞群の細胞増殖活性

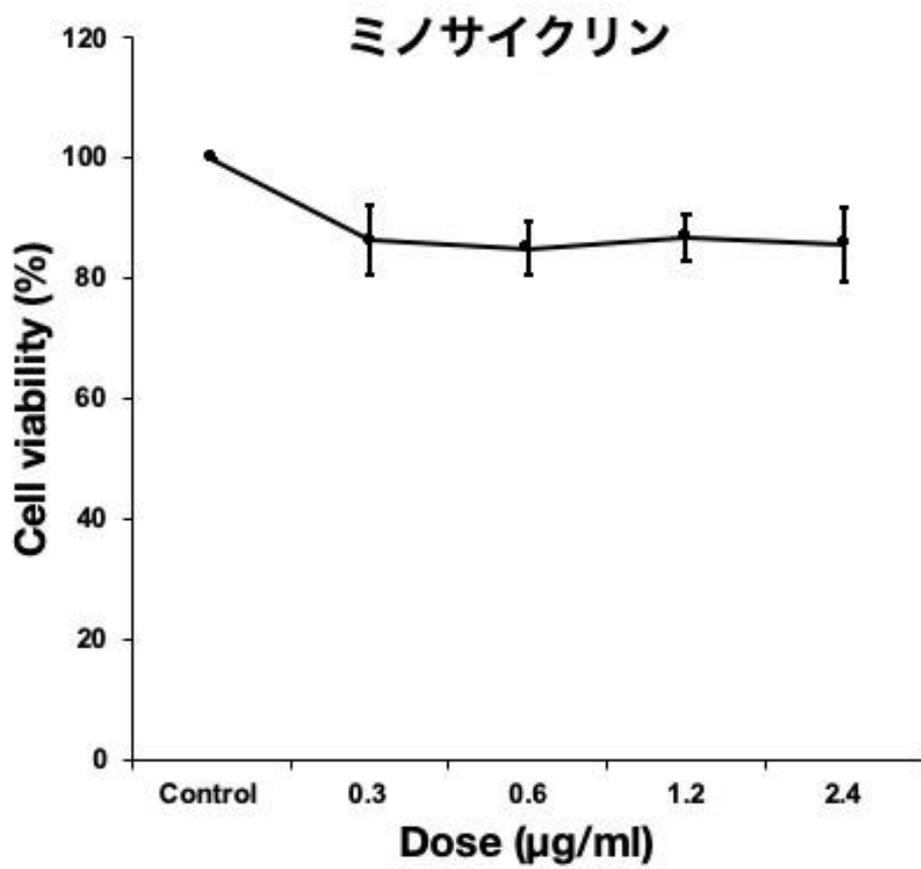


図 4-8 ミノサイクリン添加細胞群の細胞増殖活性

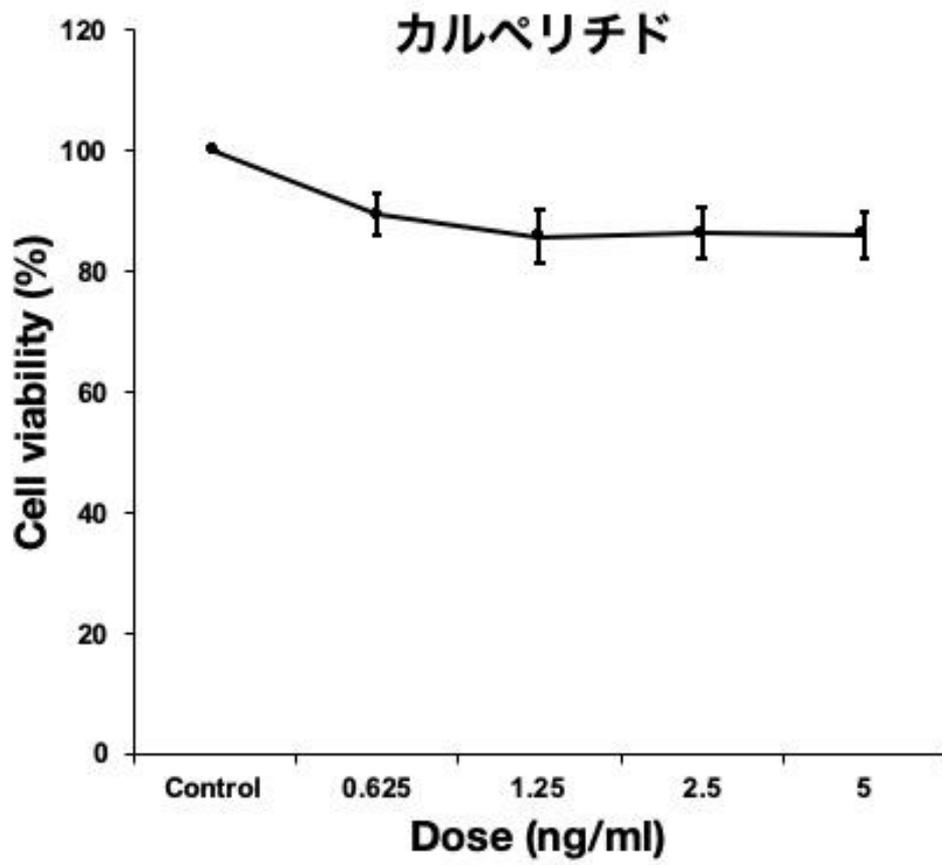


図 4-9. カルペリチド添加細胞群の細胞増殖活性

#### 4. 考察

本研究で用いたイヌ由来血管内皮細胞は、第3章の結果より VEGFR-1 および VEGFR-2 の発現が明らかとなっている。各細胞群に VEGF-A を添加した場合に、濃度依存的ではないもののそれぞれ細胞増殖活性の増加が認められたことから、VEGF シグナル伝達系に依ると考えられる細胞増殖の亢進が示唆された。

抗 VEGF 抗体であるベバシズマブをそれぞれ 0.1 mg/ml および 1.0 mg/ml の濃度で添加した細胞群では、VEGF-A の濃度依存的に細胞増殖抑制効果が認められた。しかし、ベバシズマブ濃度 2.0 mg/ml を添加した細胞では VEGF-A の濃度に依らず細胞増殖活性が低下していた。ベバシズマブ濃度 0.1 mg/ml および 1.0 mg/ml を添加した細胞群では VEGF-A に依る細胞増殖の亢進を、ベバシズマブが抑制したことで細胞増殖抑制効果が得られたと考えられるが、ベバシズマブ濃度 2.0 mg/ml を添加した細胞群ではベバシズマブの細胞毒性などの影響により細胞増殖活性が落ちた可能性が示唆された。

一部の NSAIDs は犬の腫瘍細胞株に対して濃度依存的に増殖抑制効果を持つことが報告されているが[Knottenbelt et al., 2006]、犬の血管内皮細胞への影響については検討されていない。また、マウスやラットでは、NSAIDs による血管新生阻害作用が明らかになっている[Leahy et al., 2002; Yoshida et al., 2003]。これは VEGF の産生に関連しているプロスタグランジン E<sub>2</sub> が、NSAIDs の COX-2 阻害作用で抑制されるためであると考えられている[Yoshida et al., 2003]。本研究では、メロキシカムおよびロベナコキシブでは各濃度を添加した細胞群で濃度依存的に細胞増殖抑制効果が認められた。また、カルプロフェンは 4 µg/ml 添加群までは、ほ

とんど細胞増殖抑制効果が得られなかったが、8 µg/ml 添加群以上の濃度では濃度依存的に細胞増殖抑制効果が認められた。本研究で用いた NSAIDs はいずれもイヌ由来血管内皮細胞に対する直接的な細胞増殖抑制効果を示しており、臨床的に使用し得られる血中濃度においても、細胞増殖活性を 79–43%に低下させたことから、血管新生阻害薬として使用できる可能性が示唆された。

一方、血管新生阻害作用が報告されているミノサイクリン[Tamargo et al., 1991]や、悪性腫瘍の再発抑制効果が示唆されているカルペリチド[Nojiri et al., 2015]は、血管内皮細胞に対する直接的な増殖抑制効果を有していないことが示唆された。

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でき、今後、濃度を検討す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。

## 5. 小括

医学領域では血管新生阻害療法が確立しており，抗 VEGF 抗体であるベバシズマブが血管新生阻害薬として様々な悪性腫瘍に利用されており，その治療の有効性が報告されている。また，獣医学領域では NSAIDs は一般的に整形疾患に関連する疼痛管理や，術中のマルチモーダル鎮痛に使用されている。さらに，NSAIDs は犬の膀胱移行上皮癌の治療効果もあることが知られている。医学領域では NSAIDs が抗炎症効果だけでなく，血管新生阻害効果も有することが報告されている。そのため犬においても，ヒトと同様に，血管内皮細胞の増殖抑制が悪性腫瘍の増大や転移を抑制する補助療法として血管新生阻害薬が使用できる可能性がある。しかし獣医学領域ではベバシズマブや NSAIDs，その他の薬剤における血管新生阻害のメカニズムについては十分に検討されていない。したがって，第3章の研究で得られたイヌ由来血管内皮細胞を用いて，各種血管新生阻害薬の細胞増殖抑制効果について検討した。

第3章の方法で健常ビーグル成犬3頭から得られたイヌ由来血管内皮細胞の6細胞群を用いた。得られたイヌ由来血管内皮細胞は，ベバシズマブ投与細胞群を VEGF-A 非添加，50 ng/ml 添加，400 ng/ml 添加の3グループに分け，ベバシズマブ濃度 0.1，1.0，2.0 mg/ml を各 well に MCDB131 培養液（FBS 無添加）と共に添加した。また，その他の薬剤は添加薬剤濃度を臨床的に使用し得られる最大血中濃度の 1/4 倍，1/2 倍，1 倍，2 倍として，メロキシカムは 20，40，80，160 µg/ml，カルプロフェンは 2，4，8，16 µg/ml，ロベナコキシブは 165，330，660，1,320 ng/ml，ミノサイクリンは 0.3，0.6，1.2，2.4 µg/ml，カルペリチドは 0.625，1.25，2.5，5 ng/ml

で各 well に MCDB131 培養液 (FBS 無添加) と共に添加した。

ベバシズマブでは最大量の 2.0 mg/ml を除き, VEGF-A 濃度依存的に血管内皮細胞の増殖を抑制した。メロキシカム, カルプロフェンおよびロベナコキシブは, 血管内皮細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。ミノサイクリンおよびカルペリチドは直接的な増殖抑制効果を示さなかった。

以上より, ベバシズマブおよび NSAIDs ではイヌ由来血管内皮細胞の増殖抑制効果が認められたことから, 血管新生阻害効果を有する可能性が示唆された。今後, 濃度を検討す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考えられた。

## 総括

血管新生は生理的に通常、発生の過程や創傷治癒の際などに認められるが、悪性腫瘍の血行転移や浸潤にも関与している。固形がんの増大には必ず、腫瘍組織に栄養や酸素を供給するために、血管新生が必要になると考えられている。VEGFは脈管形成および血管新生に関与するサイトカイン群であり、その中でもVEGF-Aは腫瘍の増殖や転移の促進に最も重要な因子である。近年では、医学領域においてVEGF-A活性の抑制による抗VEGF抗体薬による血管新生療法が臨床応用されている。犬のVEGFシグナル伝達系はヒトと極めて類似しており、実際に担癌犬は健常犬と比較して血中VEGF-A濃度が高いことが知られている。しかし、実際にどのような腫瘍性疾患が血管新生阻害療法の治療対象となるか十分に検討されておらず不明である。また、血管内皮細胞は血管の内面を構成する細胞であり様々な機能を有しているが、特に血管新生においては、その起点となり重要な役割を担っている。血管内皮細胞は、主にVEGFなどの影響を受けて、血管新生の亢進に寄与している。したがって、悪性腫瘍における血管新生阻害療法の多くは血管内皮細胞が治療標的となっているが、犬の血管内皮細胞を分離、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。そのため各種血管新生阻害薬の作用点や作用機序は十分に検討されていない。

以上のことから、犬の腫瘍性病変におけ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-A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について検討した。次いで第2章では、第1章で特に血中VEGF-A濃度の高かった犬の結直腸腫瘍性病変の病態や臨床的特徴について解析し、粘膜-粘膜下組織プルスルー法による手術および術後補助療法を組み合わせた治療成績について検討した。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，各種薬剤におけるイヌ由来血管内皮細胞に対する細胞増殖抑制効果について調査を行い，血管新生阻害療法への応用の可能性を検討した。

#### 1. 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

VEGF-A は血管内皮細胞に作用し，血管新生を促進することで，腫瘍の増殖や転移に密接に関わっている。医学領域においては，血中 VEGF-A レベルが特定の腫瘍患者で高値を示すことや，予後やステージと相関することが明らかとなっている。さらに VEGF-A の働きを阻害することで，腫瘍組織への血管新生を抑制する治療が行われている。犬においてもヒトと同様の VEGF 伝達系を有していることが知られているが，腫瘍性疾患における血中 VEGF-A 濃度については十分に検討されていない。したがって，本研究では様々な腫瘍性疾患の犬における血清 VEGF-A 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月に日本大学生物資源科学部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頭を対象とし，術前に採取された血清の VEGF-A 濃度の測定を行い，腫瘍群間での比較検討を行った。また，比較対象として健常ビーグル犬 13頭より採取した血清を使用した。

肝臓腫瘍群，副腎腫瘍群，結直腸腫瘍群，肺腫瘍群，甲状腺濾胞腺癌において健常群と比較して有意に高値を認めた。腫瘍性疾患犬を良性腫瘍群と悪性腫瘍群に分けて血清 VEGF-A 濃度を比較したところ，それぞれ健常群と比較し有意に高

値を示したが、良性腫瘍群と悪性腫瘍群間において有意差は認められなかった。

以上より、肝臓腫瘍群、副腎腫瘍群、結直腸腫瘍群、肺腫瘍群、甲状腺濾胞腺癌では血清 VEGF-A 濃度が高値を示すことが明らかとなり、血管新生が盛んに行われていることが示唆された。本研究の結果は、VEGF を治療標的とした血管新生阻害療法を臨床応用するための基礎的データとして活用できる可能性が示唆された。

## 2. 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

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病変は炎症性ポリープが多く認められ、その病因には大腸炎が示唆されていることから、外科的切除後にも再発の危険性が存在する。そのため、術後補助療法は不可欠であると考えられるが、犬の結直腸炎症性ポリープの効果的な術後療法はほとんど報告されていない。したがって、本研究ではミニチュア・ダックスフンドにおける結直腸腫瘍性病変の臨床的特徴や病態を解析し、粘膜-粘膜下組織プルスルー法と術後補助療法の治療成績などについて検討した。

2002 年 10 月から 2015 年 11 月に日本大学生物資源科学部附属動物病院に来院し、下部消化管内視鏡検査によって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にて外科的切除を実施したミニチュア・ダックスフンド 40 頭を対象とし、供試犬の医療記録から、性別、年齢、体重、臨床症状、血液検査、血液化学検査、胸部および腹部 X 線検査、腹部超音波検査、下部消化管内視鏡検査、組織病理学的検査、手術成績、周術期管理、予後などについて詳細に調査した。

ミニチュア・ダックスフンドの結直腸腫瘍性病変は血便やしぶりを主症状とし、幅広い年齢に発症することが明らかになった。また病理組織学的診断は炎症性ポリープが主体であり、25%の症例では腺癌を伴っていたが、粘膜-粘膜下組織プルスルー法による治療成績は良好であった。また、治療選択の際にはEUSを含む下部消化管内視鏡検査が有用であることが再確認された。NSAIDs およびメサラジンの長期投与による術後補助療法が併用されており、87.5%の症例では経過は良好であったが、12.5%で再発を認めたことから、術後の新規治療法や治療プロトコルの模索が必要であると考えられた。

### 3. 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

血管内皮細胞は、血管新生をはじめ、血管の収縮や弛緩、血液凝固などに関わっており様々な機能を有している。その中でも特に、血管新生においては、その起点となることから大きな役割を担っている。しかし、イヌ由来血管内皮細胞の分離や培養方法についての報告はほとんどなく、血管新生に関連する遺伝的性状もほとんど解析されていない。そこで、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、血管新生関連遺伝子の mRNA 発現について検討した。

身体検査、血液および血液化学検査、胸部および腹部X線検査により健常と判断したビーグル成犬3頭に、適切な方法で安楽殺を実施後、外頸静脈、総頸動脈、胸部後大静脈および胸部大動脈を摘出した。摘出した血管内腔からトリプシン液を用いて細胞を分離し、4継代後に蛍光抗体法およびRT-PCR法を用いた性状解

析を行った。

各血管の内腔からトリプシン液を用いて血管内皮細胞を分離することが可能であり、MCDB131 培養液により適切な良好な増殖が得られた。

4 継代目の細胞において蛍光抗体法により 99%以上の細胞で CD31 が陽性であり、RT-PCR 法では CD31, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, COX-2 および NPR1 遺伝子の発現が検出された。この結果から、イヌ由来血管内皮細胞が分離され、4 継代目の細胞において VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, COX-2 および NPR1 の血管新生関連遺伝子の mRNA が発現していることが確認された。

以上より、イヌ由来血管内皮細胞においてトリプシン液を用いた分離および MCDB131 培養液による培養が可能であった。また、VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, COX-2 および NPR1 の血管新生関連遺伝子の発現が確認されたことから、本手法で得られたイヌ由来血管内皮細胞は血管新生関連研究に有用である可能性が示唆された。

#### 4. 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

医学領域では血管新生阻害療法が確立しており、抗 VEGF 抗体であるベバシズマブが血管新生阻害薬として様々な悪性腫瘍に利用されており、その治療の有効性が報告されている。また、獣医学領域では NSAIDs は整形疾患に関連する疼痛管理や、がん性疼痛の緩和、術中のマルチモーダル鎮痛に使用されている。さらに、NSAIDs は犬の膀胱移行上皮癌の治療効果もあることが知られている。医学領域では NSAIDs が抗炎症効果だけでなく、血管新生阻害効果も有することが報

告されている。そのため犬においても、ヒトと同様に、血管内皮細胞の増殖抑制が悪性腫瘍の増大や転移を抑制する補助療法として血管新生阻害薬が使用できる可能性がある。しかし獣医学領域ではベバシズマブや NSAIDs, その他の薬剤における血管新生阻害のメカニズムについては十分に検討されていない。したがって、第 3 章の研究で得られたイヌ由来血管内皮細胞を用いて、各種血管新生阻害薬の細胞増殖抑制効果について検討した。

第 3 章の方法で健常ビーグル成犬 3 頭から得られたイヌ由来血管内皮細胞の 6 細胞群を用いた。得られたイヌ由来血管内皮細胞は、ベバシズマブ投与細胞群を VEGF-A 非添加, 50 ng/ml 添加, 400 ng/ml 添加の 3 グループに分け、ベバシズマブ濃度 0.1, 1.0, 2.0mg/ml を各 well に MCDB131 培養液 (FBS 無添加) と共に添加した。また、その他の薬剤は添加薬剤濃度を臨床的に使用し得られる最大血中濃度の 1/4 倍, 1/2 倍, 1 倍, 2 倍として、メロキシカムは 20, 40, 80, 160  $\mu\text{g/ml}$ , カルプロフェンは 2, 4, 8, 16  $\mu\text{g/ml}$ , ロベナコキシブは 165, 330, 660, 1,320 ng/ml, ミノサイクリンは 0.3, 0.6, 1.2, 2.4  $\mu\text{g/ml}$ , カルペリチドは 0.625, 1.25, 2.5, 5 ng/ml で各 well に MCDB131 培養液 (FBS 無添加) と共に添加した。

ベバシズマブでは最大量の 2.0 mg/ml を除き、VEGF-A 濃度依存的に血管内皮細胞の増殖を抑制した。メロキシカム, カルプロフェンおよびロベナコキシブは、血管内皮細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。ミノサイクリンおよびカルペリチドは直接的な増殖抑制効果を示さなかった。

以上より、ベバシズマブおよび NSAIDs ではイヌ由来血管内皮細胞の増殖抑制効果が認められたことから、血管新生阻害効果を有する可能性が示唆された。今後、濃度を検討す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

能性が考えられた。

本研究によって肝臓腫瘍，副腎腫瘍，結直腸腫瘍，肺腫瘍，甲状腺濾胞腺癌の犬において，血清 VEGF-A 濃度が高値を示すことが明らかとなり，血管新生が盛んに行われていることが示唆された。さらに，血清 VEGF-A 濃度の高値を示すミニチュア・ダックスフンドの結直腸腫瘍性病変は，血便やしぶりを主症状とし，幅広い年齢に発症しており，粘膜-粘膜下組織プルスルー法による手術および NSAIDs を含む術後補助療法が有用である可能性が示唆された。また，イヌ由来血管内皮細胞においてトリプシン液を用いた分離および MCDB131 培養液による培養が可能であり，VEGF-A，VEGFR-1，VEGFR-2，COX-2 および NPR1 の血管新生関連遺伝子の発現が確認された。最後に，ベバシズマブおよび NSAIDs ではイヌ由来血管内皮細胞の増殖抑制効果が認められたことから，血管新生阻害効果を有する可能性が示唆された。今後，濃度を検討す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考えられた。

以上のことから，本研究は犬の腫瘍性病変における，血管新生阻害療法の確立のための新たな知見が得られ，小動物がん治療の応用に向けて新たな展開が期待される。

## 謝辞

終わりに、本研究を行うにあたり終始懇篤なるご指導およびご校閲を賜りました日本大学生物資源科学部獣医学科獣医外科学研究室 浅野和之教授に深甚なる謝意を表します。また、貴重な御助言および御校閲を賜りました、同学部獣医内科学研究室 亘敏広教授、同学部獣医病理学研究室 渋谷久教授に深謝致します。

また、本研究を進めるにあたり御協力ならびに御助言を頂いた同学部獣医外科学研究室 枝村一弥准教授、関真美子専任講師、同学部獣医麻酔・呼吸器学研究室 手島健次専任講師、同大学附属動物病院の支援獣医師である石垣久美子先生ならびに臨床指導獣医師である吉田織江先生、同学部獣医外科学研究室研究員である飯田玄德先生、ノースラボ 賀川由美子先生ならびに西村麻紀先生に深謝致します。

日々の多忙な診療と研究の中で、終始甚大なる御協力を惜しまれなかった同大学附属動物病院研修医一同、同学部獣医外科学研究室室員に深謝致します。

最後に、本研究に供しました犬たちに心から感謝致します。

## 引用文献

1. Adams, J., Carder, P. J., Downey, S., Forbes, M. A., MacLennan, K., Allgar, V., Kaufman, S., Hallam, S., Bicknell, R., Walker, J. J., Cairnduff, F., Selby, P. J., Perren, T. J., Lansdown, M. and Banks, R. E. 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res.* 60: 2898–2905.
2. Adams, R. H., Wilkinson, G. A., Weiss, C., Diella, F., Gale, N. W., Deutsch, U., Risau, W. and Klein, R. 1999. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev.* 13: 295–306.
3. Allen, S. W. and Crowell, W. A. 1991. Ventral approach to the pelvic canal in the female dog. *Vet Surg.* 20: 118–121.
4. Argyle, D. J. and Khanna, C. 2012. Tumor Biology and Metastasis. pp. 30–50. *In: Withrow and McEwen's small animal clinical oncology, 5th ed.* (Withrow, S. J., Vail, D. M. and Page, R. L. eds.), Elsevier, Saunders.
5. Bahr, K. L., Sharkey, L. C., Murakami, T. and Feeney, D. A. 2013. Accuracy of US-guided FNA of focal liver lesions in dogs: 140 cases (2005-2008). *J Am Anim Hosp Assoc.* 49: 190–196.
6. Beştaş, R., Kaplan, M. A. and Işıkdoğan, A. 2014. The correlation between serum VEGF levels and known prognostic risk factors in colorectal carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 61: 267–271.

7. Church, E. M., Mehlhaff, C. J. and Patnaik, A. K. 1987. Colorectal adenocarcinoma in dogs: 78 cases (1973-1984). *J Am Vet Med Assoc.* 191: 727–730.
8. Clifford, C. A., Hughes, D., Beal, M. W., Henry, C. J., Drobatz, K. J. and Sorenmo, K. U. 2002. Vascular endothelial growth factor concentrations in body cavity effusions in dogs. *J Vet Intern Med.* 16: 164–168.
9. Clifford, C. A., Hughes, D., Beal, M. W., Mackin, A. J., Henry, C. J., Shofer, F. S. and Sorenmo, K. U. 2001. Plasma vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs and dogs with hemangiosarcoma. *J Vet Intern Med.* 15: 131–135.
10. Coleman, K. A., Berent, A. C. and Weisse, C. W. 2014. Endoscopic mucosal resection and snare polypectomy for treatment of a colorectal polypoid adenoma in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 244: 1435–1440
11. Cunningham, D., Lang, I., Marcuello, E., Lorusso, V., Ocvirk, J., Shin, D. B., Jonker, D., Osborne, S., Andre, N., Waterkamp, D. and Saunders, M. P. 2013. Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 14: 1077–1085.
12. Danova, N. A., Robles-Emanuelli, J. C. and Bjorling, D. E. 2006. Surgical excision of primary canine rectal tumors by an anal approach in twenty-three dogs. *Vet Surg.* 35: 337–340.
13. Davies, J. V. and Read, H. M. 1990. Sagittal pubic osteotomy in the investigation and treatment of intrapelvic neoplasia in the dog. *J Small Anim Pract.* 31: 123–130.

14. de Queiroz, G. F., Dagli, M. L., Meira, S. A. and Matera, J. M. 2013. Serum vascular endothelial growth factor in dogs with soft tissue sarcomas. *Vet Comp Oncol.* 11: 230–235.
15. Dobson, J. M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K. and Wood, J. L. 2002. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract.* 43: 240–246.
16. Eaden, J. A., Abram, K. R. and Mayberry, J. F. 2001. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut.* 48: 526–535.
17. Elmslie, R. E., Glawe, P. and Dow, S. W. 2008. Metronomic therapy with cyclophosphamide and piroxicam effectively delays tumor recurrence in dogs with incompletely resected soft tissue sarcomas. *J Vet Intern Med.* 22: 1373–1379.
18. Fearon, E. R. and Vogelstein, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61: 759–767.
19. Ferrara, N. and Henzel, W. J. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 161: 851–858.
20. Ferrari, G. and Scagliotti, G. V. 1996. Serum and urinary vascular endothelial growth factor levels in non-small cell lung cancer patients. *Eur J Cancer.* 32: 2368–2369.
21. Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 285: 1182–1186.
22. Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1: 27–31.

23. Frenz, M., Kaup, F. J. and Neumann, S. 2014. Serum vascular endothelial growth factor in dogs with haemangiosarcoma and haematoma. *Res Vet Sci.* 97: 257–262.
24. Gaynor, J. S. Control of cancer pain in veterinary patients. 2008. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 38: 1429–1448.
25. Gentilini, F., Calzolari, C., Turba, M. E., Agnoli, C., Fava, D., Forni, M. 2005. Bergamini, P. F. 2005. Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and plasma activity of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 in lymphoma-affected dogs. *Leuk Res.* 29: 1263–1269.
26. Gillen, C. D., Walmsley, R. S., Prior, P., Andrews, H. A. and Allan, R. N. 1994. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut.* 35: 1590–1592.
27. Hayashi, K., Okanishi, H., Kagawa, Y., Asano, K. and Watari, T. 2012. The role of endoscopic ultrasound in the evaluation of rectal polypoid lesions in 25 dogs. *Jpn J Vet Res.* 60: 185–189.
28. Hu, Q., Chai, J., Liu, L., Hou, Y., Wang, Y., Li, B. and Yang, H., 2013. Isolation, culture, and identification of canine umbilical vein vascular endothelial cells. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 27: 460–463.
29. Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R. and Kabbinavar, F. 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 350: 2335–2342.

30. Hussain, S. P., Amstad, P., Raja, K., Ambs, S., Nagashima, M., Bennett, W. P., Shields, P. G., Ham, A. J., Swenberg, J. A., Marrogi, A. J. and Harris, C. C. 2000. Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res.* 60: 3333–3337.
31. Igarashi, H., Ohno, K., Maeda, S., Kanemoto, H., Fukushima, K., Uchida, K. and Tsujimoto, H. 2014. Expression profiling of pattern recognition receptors and selected cytokines in miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps. *Vet Immunol Immunopathol.* 159: 1–10.
32. Igarashi, H., Ohno, K., Ohmi, A., Tsukamoto, A., Nakashima, K., Fujino, Y., Uchida, K. and Tsujimoto, H. 2013. Polypoid adenomas secondary to inflammatory colorectal polyps in 2 miniature dachshunds. *J Vet Med Sci.* 75: 535–538.
33. Igarashi, H., Ohno, K., Uchida, E., Fujiwara-Igarashi, A., Kanemoto, H., Fukushima, K., Uchida, K. and Tsujimoto, H. 2015. Polymorphisms of nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) gene in miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps. *Vet Immunol Immunopathol.* 164: 160–169.
34. Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. and Minick, C. R. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 52: 2745–2756.
35. Jänne, P. A. and Mayer, R. J. 2000. Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 29: 1960–1968.
36. Jinno, K., Tanimizu, M., Hyodo, I., Nishikawa, Y., Hosokawa, Y., Doi, T., Endo, H., Yamashita, T. and Okada, Y. 1998. Circulating vascular endothelial growth factor

- (VEGF) is a possible tumor marker for metastasis in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 33: 376–382.
37. Kato, Y., Asano, K., Mogi, T., Kutara, K., Teshima, K., Edamura, K., Tsumagari, S., Hasegawa, A. and Tanaka, S. 2007. Clinical significance of circulating vascular endothelial growth factor in dogs with mammary gland tumors. *J Vet Med Sci.* 69: 77–80.
38. Knottenbelt, C. M., Simpson, J. W. and Chandler, M. L. 2000. Neutrophilic leucocytosis in a dog with a rectal tumour. *J Small Anim Pract.* 41: 457–460.
39. Knottenbelt, C., Chambers, G., Gault, E. and Argyle, D. J. 2006. *J Small Anim Pract.* 47: 14–20. The in vitro effects of piroxicam and meloxicam on canine cell lines.
40. Kumar, H., Heer, K., Lee, P. W., Duthie, G. S., MacDonald, A. W., Greenman, J., Kerin, M. J. and Monson, J. R. 1998. Preoperative serum vascular endothelial growth factor can predict stage in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 4:1279–1285.
41. Kutara, K., Seki, M., Ishikawa, C., Sakai, M., Kagawa, Y., Iida, G., Ishigaki, K., Teshima, K., Edamura, K., Nakayama, T. and Asano, K. 2014. Triple-phase helical computed tomography in dogs with hepatic masses. *Vet Radiol Ultrasound.* 55: 7–15.
42. Kwon, K. A., Kim, S. H., Oh, S. Y., Lee, S., Han, J. Y., Kim, K. H., Goh, R. Y., Choi, H. J., Park, K. J., Roh, M. S., Kim, H. J., Kwon, H. C. and Lee, J. H. 2010. Clinical significance of preoperative serum vascular endothelial growth factor, interleukin-6, and C-reactive protein level in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 10:203.

43. Lana, S., U'ren, L., Plaza, S., Elmslie, R., Gustafson, D., Morley, P. and Dow, S. 2007. Continuous low-dose oral chemotherapy for adjuvant therapy of splenic hemangiosarcoma in dogs. *J Vet Intern Med.* 21: 764–769.
44. Leahy, K. M., Ornberg, R. L., Wang, Y., Zweifel, B. S., Koki, A. T. and Masferrer, J. L. 2002. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res.* 62: 625–631.
45. Li, X., Feng, G. S., Zheng, C. S., Zhuo, C. K. and Liu, X. 2004. Expression of plasma vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma and effect of transcatheter arterial chemoembolization therapy on plasma vascular endothelial growth factor level. *World J Gastroenterol.* 10: 2878–2882.
46. Lunn, K. F. and Page, R. L. 2013. Tumor of the Endocrine System. In: *Withrow and McEwen's Small Animal Clinical Oncology, 5th ed.*, (Withrow, S. J., Vail, D. M. and Page, R. L., ed.), pp. 504–531. Elsevier Saunders. St. Louis.
47. Maiolino, P., De Vico, G. and Restucci, B. 2000. Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell tumours and in squamous cell carcinomas of canine skin. *J Comp Pathol.* 123: 141–145.
48. Manders, P., Sweep, F. C., Tjan-Heijnen, V. C., Geurts-Moespot, A., van Tienoven, D. T., Foekens, J. A., Span, P. N., Bussink, J. and Beex, L. V. 2003. Vascular endothelial growth factor independently predicts the efficacy of postoperative radiotherapy in node-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 9: 6363–6370.
49. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. and Balkwill, F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature.* 454: 436–444.

50. McMillan, S. K., Boria, P., Moore, G. E., Widmer, W. R., Bonney, P. L. and Knapp, D. W. 2011. Antitumor effects of deracoxib treatment in 26 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Am Vet Med Assoc.* 239: 1084–1089.
51. Michishita, M., Uto, T., Nakazawa, R., Yoshimura, H., Ogihara, K., Naya, Y., Tajima, T., Azakami, D., Kishikawa, S., Arai, T. and Takahashi, K. 2013. Antitumor effect of bevacizumab in a xenograft model of canine hemangiopericytoma. *J Pharmacol Sci.* 121: 339–342.
52. Mohammed, S. I., Bennett, P. F., Craig, B. A., Glickman, N. W., Mutsaers, A. J., Snyder, P. W., Widmer, W. R., DeGortari, A. E., Bonney, P. L. and Knapp, D. W. 2002. Effects of the cyclooxygenase inhibitor, piroxicam, on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer Res.* 62: 356–358.
53. Morello, E., Martano, M., Squassino, C., Iussich, S., Caccamo, R., Sammartano, F., Zabarino, S., Bellino, C., Pisani, G. and Buracco, P. 2008. Transanal pull-through rectal amputation for treatment of colorectal carcinoma in 11 dogs. *Vet Surg.* 37: 420–426.
54. Mukozu, T., Nagai, H., Matsui, D., Kanekawa, T. and Sumino, Y. 2013. Serum VEGF as a tumor marker in patients with HCV-related liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 33: 1013–1021.
55. Mustonen, T. and Alitalo, K. 1995. Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol.* 129: 895–898.

56. Nojiri, T., Hosoda, H., Tokudome, T., Miura, K., Ishikane, S., Otani, K., Kishimoto, I., Shintani, Y., Inoue, M., Kimura, T., Sawabata, N., Minami, M., Nakagiri, T., Funaki, S., Takeuchi, Y., Maeda, H., Kidoya, H., Kiyonari, H., Shioi, G., Arai, Y., Hasegawa, T., Takakura, N., Hori, M., Ohno, Y., Miyazato, M., Mochizuki, N., Okumura, M. and Kangawa, K. 2015. Atrial natriuretic peptide prevents cancer metastasis through vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112: 4086–4091.
57. Nucci, D. J., Liptak, J. M., Selmic, L. E., Culp, W. T., Durant, A. M., Worley, D., Maritato, K. C., Thomson, M., Annoni, M., Singh, A., Matz, B., Benson, J. and Buracco, P. 2014. Complications and outcomes following rectal pull-through surgery in dogs with rectal masses: 74 cases (2000-2013). *J Am Vet Med Assoc.* 245: 684–695.
58. Ohmi, A., Tsukamoto, A., Ohno, K., Uchida, K., Nishimura, R., Fukushima, K., Takahashi, M., Nakashima, K., Fujino, Y. and Tsujimoto, H. 2012. A retrospective study of inflammatory colorectal polyps in miniature dachshunds. *J Vet Med Sci.* 74: 59–64.
59. Oosterhoff, L. A., Kruitwagen, H. S., Spee, B. and van Steenbeek, F.G. 2016. Isolation and Culture of Primary Endothelial Cells from Canine Arteries and Veins. *J Vis Exp.* 117.
60. Poon, R. T., Lau, C. P., Cheung, S. T., Yu, W. C. and Fan, S. T. 2003. Quantitative correlation of serum levels and tumor expression of vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 63: 3121–3126.

61. Restucci, B., Borzacchiello, G., Maiolino, P., Martano, M., Paciello, O. and Papparella, S. 2004. Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours. *J Comp Pathol.* 130: 99–104.
62. Restucci, B., Maiolino, P., Paciello, O., Martano, M., De Vico, G. and Papparella, S. 2003. Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry. *J Comp Pathol.* 128: 252–259.
63. Restucci, B., Papparella, S., Maiolino, P. and De Vico, G. 2002. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Mammary Tumors. *Vet Pathol.* 39: 488–493.
64. Saito, T., Chambers, J. K., Nakashima, K., Uchida, E., Ohno, K., Tsujimoto, H., Uchida, K. and Nakayama, H. 2018. Histopathologic Features of Colorectal Adenoma and Adenocarcinoma Developing Within Inflammatory Polyps in Miniature Dachshunds. *Vet Pathol.* 55: 654–662.
65. Saltz, L. B., Clarke, S., Díaz-Rubio, E., Scheithauer, W., Figer, A., Wong, R., Koski, S., Lichinitser, M., Yang, T. S., Rivera, F., Couture, F., Sirzén, F. and Cassidy, J. 2008. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol.* 26: 2013–2019.
66. Salven, P., Teerenhovi, L. and Joensuu, H. 1997. A high pretreatment serum vascular endothelial growth factor concentration is associated with poor outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 90: 3167–3172.

67. Sandler, A., Gray, R., Perry, M. C., Brahmer, J., Schiller, J. H., Dowlati, A., Lilenbaum, R. and Johnson, D. H. 2006. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 355: 2542–2550.
68. Scharf, V. F., Farese, J. P., Coomer, A. R., Milner, R. J., Taylor, D. P., Salute, M. E., Chang, M. N., Neal, D. and Siemann, D. W. 2013. Effect of bevacizumab on angiogenesis and growth of canine osteosarcoma cells xenografted in athymic mice. *Am J Vet Res.* 74: 771–778.
69. Scheidegger, P., Weiglhofer, W., Suarez, S., Kaser-Hotz, B., Steiner, R., Ballmer-Hofer, K. and Jaussi, R. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in tumor-bearing dogs. *Biol Chem.* 380: 1449–1454.
70. Seghezzi, G., Patel, S., Ren, C. J., Gualandris, A., Pintucci, G., Robbins, E. S., Shapiro, R. L., Galloway, A. C., Rifkin, D. B. and Mignatti, P. 1998. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J. cell Biol.* 141: 1659–1673.
71. Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S. and Dvorak, H. F. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 219: 983–985.
72. Sharif, M. R., Shaabani, A., Mahmoudi, H., Nikoueinejad, H., Akbari, H. and Einollahi, B. 2014. Association of the serum vascular endothelial growth factor levels with benign prostate hyperplasia and prostate malignancies. *Nephrourol Mon.* 6: e14778.

73. Shida, T., Maruo, T., Suga, K., Kawamura, H., Takeda, H., Sugiyama, H., Ishikawa, T., Inoue, A., Yamada, T., Ito, T., Madarame, H., Kayanuma, H. and Suganuma, T. 2008. Rectal mucosal pull-through surgical technique for canine rectal multiple tumor. *Jpn J Vet Anesth Surg.* 39: 11–16.
74. Tamargo, R. J., Bok, R. A. and Brem, H. 1991. Angiogenesis inhibition by minocycline. *Cancer Res.* 51: 672–675.
75. Tamura, Y., Ohta, H., Torisu, S., Yuki, M., Yokoyama, N., Murakami, M., Lim, S. Y., Osuga, T., Morishita, K., Nakamura, K., Yamasaki, M. and Takiguchi, M. 2013. Markedly increased expression of interleukin-8 in the colorectal mucosa of inflammatory colorectal polyps in miniature dachshunds. *Vet Immunol Immunopathol.* 156: 32–42.
76. Terada, M., Sugiura, H., Yoshimoto, N., Nishikawa, S., Ito, Y., Kawaguchi, Y., Ando, Y. and Hato, Y. 2017. Three Poor Performance Status(PS)Cases of Metastatic Breast Cancer Controlled with Adjustment of Dosing Interval and Dosage of Bevacizumab and Paclitaxel. *Gan To Kagaku Ryoho.* 44: 591–593.
77. Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M. and DuBois, R. N. 1998. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 93: 705–716.
78. Uchida, E., Chambers, J. K., Nakashima, K., Saito, T., Ohno, K., Tsujimoto, H., Nakayama, H. and Uchida, K. 2016. Pathologic features of colorectal inflammatory polyps in miniature dachshunds. *Vet Pathol.* 53: 833–839.

79. Valerius, K. D., Powers, B. E., McPherron, M. A., Hutchison, J. M., Mann, F. A. and Withrow, S. J. 1997. Adenomatous polyps and carcinoma in situ of the canine colon and rectum: 34 cases (1982-1994). *J Am Anim Hosp Assoc.* 33: 156–160.
80. Vasseur, P. B., Johnson, A. L., Budsberg, S. C., Lincoln, J. D., Toombs, J. P., Whitehair, J. G. and Lentz, E. L. 1995. Randomized, controlled trial of the efficacy of carprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in the treatment of osteoarthritis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 206: 807–811.
81. Wang, H. U., Chen, Z. F. and Anderson, D. J. 1998. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell.* 93: 741–753.
82. Werther, K., Christensen, I. J. and Nielsen, H. J. Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group. 2002. Prognostic impact of matched preoperative plasma and serum VEGF in patients with primary colorectal carcinoma. *Br J Cancer.* 86: 417–423.
83. Yoshida, S., Amano, H., Hayashi, I., Kitasato, H., Kamata, M., Inukai, M., Yoshimura, H. and Majima, M. 2003. COX-2/VEGF-dependent facilitation of tumor-associated angiogenesis and tumor-growth in vivo. *Lab Invest.* 83: 1385–1394.
84. Zhao, J., Hu, J., Cai, J., Yang, X. and Yang, Z. 2003. Vascular endothelial growth factor expression in serum of patients with hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl).* 116: 772–776.