

論文内容の要旨

氏名：田村 啓

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：犬の肺腺癌の臨床学的特徴および新規治療法に関する研究

犬の肺腫瘍はそのほとんどが悪性であり、その中でも腺癌が最も多いとされている。犬の肺腺癌は無症状で経過する例が30%程度存在すると報告されており、診断時には腫瘍が巨大化していることがある。また、腫瘍随伴症候群として犬の肺腫瘍では四肢末端に肥大性骨症が認められることが報告されているものの、その他の腫瘍随伴症候群に関する情報は乏しいのが現状である。

犬の肺腺癌に対する治療法の第一選択は腫瘍が発生している罹患肺葉の外科的切除であるが、ステージが進行した症例や転移が認められる場合は化学療法を併用しても予後が悪いと報告されていることから、犬の肺腺癌に対する決定的な治療法が確立されているとは言い難く、新規治療法の開発が望まれている。

以上のことから、本研究の目的は犬の肺腺癌における回顧的研究を行い、その臨床学的特徴を明らかにし、肺腺癌に関連した腫瘍随伴症候群の発生とその原因について解析するとともに、新規治療法として組み替えウイルスを用いた腫瘍溶解性ウイルス療法について基盤を形成することである。

1. 犬の肺腺癌の回顧的研究

犬の肺腺癌に関する疫学調査は報告数も限られており、その臨床学的特徴やそれに関連した腫瘍随伴症候群の情報も少ない。本章では、犬の肺腺癌における臨床学的特徴や予後について解析した。

2014年から2020年に本学動物病院に来院した犬の肺腫瘍に対して外科的切除を行い、病理組織学的に肺腺癌と診断され、予後追跡が可能であった犬26頭を対象とした。対象犬における臨床症状やステージ分類、予後などの調査を行った。

臨床症状は咳や呼吸困難などが15頭(58%)で認められたが、残りの11頭(42%)は無症状であり、健康診断などで偶発的に発見されていた。血液検査では、白血球数上昇は6頭(23%)、血清肝酵素値上昇は4頭(15%)、CRP上昇は5頭(19%)で認められた。犬の肺腺癌のWHOステージ分類を行ったところ、ステージ1は20頭(77%)、ステージ2は1頭(4%)、ステージ3は5頭(19%)であった。さらに、無症状であった11頭のうち、ステージ1のものは8頭(73%)であったのに対し、ステージ3でも3頭(27%)存在していた。生存期間中央値はステージ1で552日間、ステージ3で114日間と有意差が認められた。

以上の結果から、本章では無症状症例は過去の報告より多く、ステージ3でも無症状であった症例が認められたことから、肺腺癌の検出が遅れて病状が進行している例が存在していることが明らかとなった。そして、外科的切除による治療を施したとしても、ステージ3では術後3-4カ月で約半数は死亡してしまうことから、外科療法には限界があることが再確認された。さらに、腫瘍随伴症候群として肥大性骨症の発生は認められなかったものの、感染症を伴わない白血球増多症が認められたことから、犬の肺腺癌の腫瘍随伴症候群として白血球増多症を考慮する必要があると思われた。

2. 犬の肺腺癌の腫瘍随伴症候群として白血球増多症に関する研究

第1章において、犬の肺腺癌の腫瘍随伴症候群に白血球増多症が含まれることが示されたものの、その発生機序は不明なままである。一方、ヒトの肺腺癌の中には顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)や顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)などのサイトカイン産生性が腫瘍内で認められており、これらのサイトカインの産生・分泌が患者の予後悪化につながると報告されている。以上のことから、本章では白血球増多症を伴う犬の肺腺癌における遺伝子発現や予後解析を行った。

対象となった2症例はいずれも無症状であり、発熱なども認められなかった。血液検査では白血球数は症例1では58,300/ μ l、症例2では32,900/ μ lと顕著に上昇していた。両症例ともCT検査にて孤立性に肺腫瘍が認められ、ステージ1と判断された。治療として罹患肺葉の外科的切除を行い、摘出された腫瘍は病理組織学的にて肺腺癌と診断された。また、罹患肺葉において感染や炎症はほとんど認められなかった。両症例とも術後経過は良好であり、術前に上昇していた白血球数は術後正常範囲内にまで減少した。最終的に、症例1は術後347日目、症例2では術後118日目に死亡した。

両症例から得られた腫瘍組織および比較対照として健常犬5頭から採取した肺組織（コントロール群）を用いて、G-CSF、GM-CSFなどの発現をリアルタイムPCR法にて解析を行ったところ、コントロール群と比較してG-CSFは症例1において6.2倍、症例2では19.7倍発現が増加していたものの、GM-CSFの発現については両症例とも増強は認められなかった。

以上の結果から、犬の肺腺癌の腫瘍随伴症候群の一つである白血球増多症にはGM-CSFではなく、G-CSFが関与していることが示唆された。また、術後における白血球数の顕著な減少は外科的切除によってサイトカイン産生性肺腺癌が摘出されたことに起因すると考えられた。さらに、犬のサイトカイン産生性肺腺癌はヒトと同様に生命予後が悪い傾向がある可能性が示された。

3. 犬の肺腺癌に対する腫瘍溶解性ウイルス療法の抗腫瘍効果に関する研究

第1章および第2章において、犬の肺腺癌の転移症例や腫瘍随伴症候群が併発した症例においては予後が悪くなることが示され、新規治療法を模索する必要があるため、その候補として腫瘍溶解性ウイルス療法に着目した。医学領域では、悪性腫瘍に対する腫瘍溶解性ウイルス療法の報告は比較的多く認められ、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、麻疹ウイルスなどを用いた研究が進められている。麻疹ウイルスが増殖および病原性の発現のために使用するレセプターはsignaling lymphocyte activation molecule (SLAM)、細胞接着分子のNectin-4が存在しており、rMV-SLAMblindはSLAMへの接着性を消失させた病原性のない麻疹ウイルスであり、Nectin-4のみを受容体としている。ヒト肺腺癌細胞ではNectin-4の発現が認められており、rMV-SLAMblindがヒト肺腺癌細胞に対して細胞溶解効果を持つことが証明されている。以上のことから、犬の肺腺癌における新規治療法の1つとしてrMV-SLAMblindによる腫瘍溶解性ウイルス療法が有望であると考え、本章ではその基盤研究として犬の肺腺癌細胞におけるNectin-4の発現およびrMV-SLAMblindの細胞傷害効果を検討した。

3種類の犬肺腺癌細胞株（AZACL1、AZACL2、CLAC）を用いて解析を行ったところ、そのすべての細胞株においてNectin-4の発現が認められ、さらにrMV-SLAMblindの感染も確認された。さらに細胞株にrMV-SLAMblindを感染させ、WST-1による細胞傷害性試験を行ったところ、CLACの細胞生存率は感染後7日目で66%と有意に減少した。しかし、AZACL1およびAZACL2においては細胞生存率に大きな変化は認められなかった。そこで、rMV-SLAMblindの腫瘍増殖抑制効果を調べるため、CLAC細胞をヌードマウスに移植してxenograft modelを作成した。移植から14日目にヌードマウス（N=16）を 10^6 TCID₅₀のrMV-SLAMblind投与群と生理食塩水投与群の2群に分け、ウイルス投与を1週間ごとに3回行った（N=8/group）。2-3日ごとに腫瘍サイズを測定して投与から35日後に安楽殺を行った。その結果、ウイルス群では投与後3日目から35日目まで生理食塩水群と比較して有意に腫瘍サイズは抑制された。さらに、腫瘍重量もウイルス群で有意に減少したことから、犬の肺腺癌細胞株であるCLACのxenograft modelにおいてrMV-SLAMblindは腫瘍増殖抑制効果を持つことが判明した。

以上の結果から、rMV-SLAMblindを用いた腫瘍溶解性ウイルス療法は犬の肺腺癌に対して抗腫瘍効果を有し、新規治療法として有望である可能性が示された。しかし、rMV-SLAMblindの標的となる細胞にはNectin-4の発現が必要であることから、犬の肺腺癌の自然発症例においてその発現を解析する必要があると考えられた。

4. 犬の肺腺癌症例におけるNectin-4の発現に関する研究

Nectinは細胞接着分子として機能しており、ヒトの肺腺癌ではNectin-4の過剰発現が報告されている。一方、犬においてもNectin-4の発現が前立腺癌で報告されているものの、肺腺癌での報告は見当たらない。したがって、本章では犬の肺腺癌症例におけるNectin-4の発現を解析した。

2014年から2019年に本学動物病院に来院した肺腫瘍の犬のうち、外科的切除を行って病理組織学的に肺腺癌と診断された34頭を対象とした。対象犬から得られた肺腫瘍組織および健常犬から採取した肺組織をコントロール群として、Nectin-4の発現をリアルタイムPCR法にて解析した。さらに、対象犬の腫瘍径、腫瘍重量、ステージ分類を調査し、Nectin-4発現との関連性を解析した。

肺腺癌犬34頭のうち、Nectin-4の発現は25頭(73%)で認められた。Nectin-4の発現量はステージ間では有意差が認められなかったものの、腫瘍径および腫瘍重量には有意な正の相関が認められた。

以上の結果から、犬の肺腺癌の自然発生例においても高率でNectin-4の発現が認められ、第3章で検討したrMV-SLAMblindの標的になり得る可能性が示された。したがって、犬の肺腺癌においてrMV-SLAMblindを用いた腫瘍溶解性ウイルス療法は新規治療法として臨床応用する価値は十分にあると考えられた。

総括

本研究では、犬の肺腺癌の臨床学的特徴を明らかにし、臨床ステージが進行した場合は外科療法を行ったとしても予後が悪いことを再確認した。また、腫瘍随伴症候群として白血球増多症が発生するメカニズムの一つとしてG-CSFの関与を示すことができ、白血球増多症を併発している症例では予後が悪い可能性が示された。犬の肺腺癌細胞株を用いてrMV-SLAMblindにおける腫瘍溶解性ウイルス療法の抗腫瘍効果を検討したところ、CLACでは腫瘍増殖抑制効果が認められた。さらに、rMV-SLAMblindの標的となるNectin-4の発現は、犬の肺腺癌の自然発生例において高い発現性が確認された。

以上のことから、犬の肺腺癌においては腫瘍の転移例や腫瘍随伴症候群を示すような症例においては外科療法だけでは限界があり、新規治療法の確立が望まれており、その一つとしてrMV-SLAMblindを用いた腫瘍溶解性ウイルス療法は有望である可能性を示すことができた。本研究の成果は、臨床獣医学の発展に大きく寄与するものであると考えられた。