

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

論文の要約

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻  
博士課程

田村 啓

2022

犬の原発性肺腫瘍には肺腺癌、腺扁平上皮癌、組織球肉腫などがあり、その中でも肺腺癌の発生が最も多く報告されている。犬の肺腺癌での臨床症状として、咳や呼吸困難、喀血などが挙げられるが、無症状で経過する例も約 30%程度存在すると報告されており、肺に腫瘤性病変が確認された時点では、腫瘍が巨大化していることも少なくない。さらに診断時には 71%で局所浸潤およびリンパ節転移が認められ、23%で遠隔転移を起こしているとの報告もあり、リンパ節転移や遠隔転移の発生で予後は非常に悪くなることから早期発見が重要な腫瘍でもある。肺腺癌の診断において医学領域では、胎児抗原である Carcinoembryonic antigen (CEA) や Cytokeratin19-1 (CYFRA21-1) などが腫瘍マーカーとして臨床応用されている。しかし獣医領域では、これらの報告は少なく臨床応用はされていないため、現状では臨床症状から X 線検査や Computed tomography (CT) 検査を行い診断に至るケースや健康診断時に偶発的に発見される事が多く、早期の発見が難しい腫瘍である。さらに犬の肺腺癌に関する疫学調査は、報告数も限られており、臨床学的特徴やそれに関連した腫瘍随伴症候群 (paraneoplastic syndromes : PNSs) の報告も少ないのが現状である。

PNSs は、腫瘍による臓器の構造の変化や機能異常が腫瘍とは離れた場所で発生する症状、病態を指しており、犬の肺腺癌における PNSs として、四肢末端の肥大性骨症や白血球増多症が報告されている。白血球増多症はリンパ腫や腎腺癌、直腸ポリープ、繊維肉腫などでも PNSs として報告されているが、これらの原因について獣医領域では、詳細な研究は行われていない。一方で、医学領域では白血球増多症を呈する肺腺癌において、granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) や Interleukin-6 (IL6) などの過剰産生が発生することが知られており、予後悪化因子であると報告されている。G-CSF は好中球や単球、好酸球などの産生を促進させるサイトカインの 1 つであり、IL6 は C-reaction protein (CRP) の上昇などを引き起こす炎症性サイトカインとして知られており、腫瘍の転移促進や予後マーカーにもなるとされている。獣医領域においては、犬の肺腺癌において白血球増多症の報告が過去に 1 例あるものの、その遺伝子発現については詳しく調べられていない。

犬の肺腺癌のステージ分類として、1つの肺葉に孤立性に腫瘍が存在する場合をステージ 1、リンパ節転移が発生している場合をステージ 2、他の肺葉や胸膜などに遠隔転移している場合はステージ 3 と定義している。犬の肺腺癌におけ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 2、3 の場合は、化学療法を併用しても予後が悪いと報告されている。これらのことからステージの進行した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。

近年、抗がん剤治療や、分子標的薬とは違う観点からの治療法である腫瘍溶解

性ウイルス療法の研究が進んでいる。これは、細胞種特異的に感染して死滅させるというウイルスの性質を利用してがん細胞を特異的に標的とする治療法である。パラミクソウイルス科に属する麻疹ウイルスは、感染後に隣接する細胞と融合性巨細胞を形成して細胞死に至らせる能力があり、腫瘍細胞株も殺傷する性質をもつ。麻疹ウイルスは、伝播力が強く、感染すると呼吸器症状、発疹、免疫抑制を伴う麻疹を起こす。麻疹ウイルスが細胞侵入に利用する受容体は、3種類同定されており、signaling lymphocyte-activation molecule (SLAM)、CD46、Nectin-4である。このSLAMは、リンパ球、マクロファージ、樹状細胞などの免疫担当細胞表面に発現しており、麻疹ウイルスが最初に感染して全身に運ばれ、様々な症状を起こすため、病原発現に関与していると考えられている。CD46は麻疹ウイルスのワクチン株作成の経過で、変異しワクチン株のみが利用する受容体である。Nectin-4は細胞接着に関与する因子であり、正常では胎盤や気管上皮に発現が認められているが、乳がん、卵巣がん、肺がんなどの多くの腫瘍細胞で発現していることも報告されている。麻疹ウイルスは、様々な腫瘍細胞を殺傷することが研究で判明し、利用している受容体は腫瘍細胞が発現しているNectin-4であった。しかし麻疹ウイルスを用いる上で問題となるのは、SLAMを介した強い病原性であったため、甲斐らは、麻疹ウイルスの病原性発現に関与するHタンパク質のSLAM結合領域にリバーシジェネティクス技術を用いて変異を導入したウイルスであるrecombinant MV-SLAMblind(rMV-SLAMblind)を作成した。このウイルスはSLAMを利用することができないため、病原性は消失し、さらにrMV-SLAMblindも、乳がん細胞に感染し、増殖を抑制することが判明した。rMV-SLAMblindは、Nectin-4をターゲットとしているため、Nectin-4が発現している肺がん細胞や膵臓がん細胞にも効果があることが判明している。

獣医領域における腫瘍溶解性ウイルス療法は、メラノーマ細胞や肥満細胞腫で報告はあるものの、少ないのが現状である。さらに犬の肺腺癌細胞における腫瘍溶解性ウイルス療法の報告はない。しかし医学領域では肺がん細胞への腫瘍溶解性ウイルス療法の効果が認められていることから、犬の肺腺癌においても新規治療法の1つとして有望である可能性が考えられた。以上のことから、犬の肺腺癌における臨床学的特徴および新規治療法について検討することを目的として、第1章では、犬の肺腺癌の回顧的解析を行い、臨床学的特徴、予後などについて調査した。次いで、第2章では、犬の肺腺癌の腫瘍随伴症候群である白血球増多症に関して遺伝子発現や予後解析をおこなった。第3章では、新規治療法の1つとして犬の肺腺癌細胞にrMV-SLAMblindを感染させ、腫瘍増殖抑制効果を検討した。最後に第4章ではrMV-SLAMblindのターゲットであるNectin-4の遺伝子発現を犬の肺腺癌症例で調べるとともに、Nectin-4と腫瘍の関連性を解析した。



## 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。これらの症例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る。

## 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2症例における遺伝子発現や予後解析を行った。

対象となる2症例は無症状であり、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/ $\mu$ l、症例2では32,900/ $\mu$ 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。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。一方、両症例においてGM-CSFの発現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予後に影響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ことがわかった。そこで、新規治療法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られ、本章ではその基盤研究として、まず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。その結果、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。

さらに、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  $10^6$ TCID<sub>50</sub> 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ていた。さらに、腫瘍重量もウイルス群で有意に低くなっていたことから、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する新規治療法として有望である可能性が示されたものの、このウイルスのターゲットには Nectin-4 の発現が必要であることから、犬の肺腺癌の自然発生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検査で肺腺癌と診断された 34 症例を対象とした。対象症例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比較対象として、Nectin-4 の発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。さらに、対象症例の腫瘍径、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 のターゲット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。

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。