



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	犬血管肉腫における治療標的分子の検索と末梢血血管内皮前駆細胞数変動の観察 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	足立, 真実
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第12172号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62063
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Mami_Adachi_review.pdf, 審査の要旨



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：足 立 真 実

審査委員	主査 教授	滝 口 満 喜
	副査 教授	木 村 享 史
	副査 准教授	佐 藤 耕 太
	副査 准教授	高 木 哲

学位論文題名

犬血管肉腫における治療標的分子の検索と末梢血血管内皮前駆細胞数変動の観察

犬の血管肉腫は、全身のどの部位にも発生するが、主に脾臓に好発する血管内皮細胞由来の悪性腫瘍である。脾臓腫瘍は画像検査や細胞診でも判断が難しいことがあり、摘出後の確定診断として病理組織学的検査が用いられているが、それでもまれに良悪の判別が困難な場合がある。本腫瘍は非常に転移率が高く、現在のところ手術と化学療法の併用により約半年程度の生存期間が得られているが、これ以上有効な標準的治療法はない。

近年、腫瘍に対する新規治療として特異性の高い分子標的療法に注目が集まっており、受容体型チロシンキナーゼ（RTK；Receptor tyrosine kinase）である c-kit および血管内皮細胞増殖因子受容体（VEGFR；Vascular endothelial growth factor receptor）-2、RTK の下流の経路である PI3 キナーゼ（PI3K；Phosphatidylinositol 3 kinase）/ Akt / 哺乳類ラパマイシン標的蛋白質（m-TOR；Mammalian target of rapamycin）経路および分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（MAPK；Mitogen activated protein kinase）経路の活性化が本腫瘍においても認められている。また、犬の血管肉腫は分化を停止した血管内皮前駆細胞（EPC；Endothelial progenitor cell）が由来であるとする仮説が提唱されており、血管肉腫罹患犬において良性の血管腫罹患犬と比較して有意な EPC 数の増加が認められ、腫瘍摘出前後で EPC 数が減少したことが報告されている。このことから、EPC を標的とした治療が犬血管肉腫において有用である可能性が示唆され、また脾臓腫瘍は摘出前に良悪の判断が困難であることから EPC 数の検出が本腫瘍における補助的診断指標として期待できる。

以上のような背景から、本論文では犬血管肉腫における RTK 経路および EPC 表面抗原の過剰発現分子を検索し、これに対する阻害薬を用いてその有用性を検討した。また、血管肉腫、良性腫瘍および他の悪性腫瘍罹患犬の腫瘍摘出前後の EPC 数の変動を評価し、犬血管肉腫の補助的診断指標としての EPC 検出の有用性を検討するとともに、がん関連遺伝子を評価してこれらの EPC の腫瘍化を評価した。

まず本研究の第1章では、免疫組織化学染色を用いて犬の脾臓血管肉腫組織における RTK 経路および EPC 表面抗原の過剰発現分子を検索し、RTK (c-kit、VEGFR-2 および血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR ; Platelet derived growth factor receptor) -2)、PI3K / Akt / m-TOR 経路、MAPK 経路および EPC 表面抗原 (フォン・ヴィレブランド因子 (vWF ; von Willebrand factor) および α V β 3 インテグリン) で健常脾臓よりも強い発現が認められた。

次いで第2章では、第1章において犬血管肉腫で発現が認められた RTK 経路阻害薬の有用性を評価するため、犬の脾臓および肝臓血管肉腫細胞株を用いて細胞増殖抑制試験およびアポトーシスの検出を行った。VEGFR-2 および PI3K / Akt / m-TOR 経路阻害薬で腫瘍細胞の増殖抑制が認められたが、MAPK 経路阻害薬では認められなかった。また、VEGFR-2 および PI3K / Akt / m-TOR 経路阻害薬を作用させたところ、アポトーシスが認められた。したがって、複数の RTK 阻害薬がアポトーシスを誘導することによって犬血管肉腫細胞の増殖を抑制することが示され、特に EPC 表面抗原の一つである VEGFR-2 阻害薬が犬血管肉腫に有効であることが示唆された。

第3章では、EPC を標的とした治療が犬血管肉腫において有用な可能性が過去の報告、第1章および第2章から示唆されたことから、EPC 表面抗原を末梢血中で検出して犬血管肉腫治療における標的分子を検索するとともに、その変動を観察して診断の判定指標とすること、および血管肉腫罹患犬の EPC の腫瘍化の検討を行った。腫瘍摘出前の血管肉腫群の末梢血単核球 (PBMC ; Peripheral blood mononuclear cell) において、良性腫瘍群と比較して分化抗原群 (CD ; Cluster of differentiation) 34 および α V β 3 インテグリンの共陽性細胞、すなわち EPC 数が有意に増加し、カットオフ値を 0.87%と設定すると、特異度 90.5%、感度 66.7%であった。さらに、血管肉腫群でのみ腫瘍摘出後に術前より EPC 数が減少し、分離した EPC では p16 および ER- α 遺伝子発現量の増加が認められた。よって、血管肉腫犬から検出された EPC は腫瘍化した EPC すなわち血管肉腫細胞を検出している可能性が示唆された。

以上の結果より、犬血管肉腫において RTK 経路の過剰発現分子が認められ、その分子を治療標的とすることで、より有効な犬の血管肉腫治療が可能となることが示唆された。また、末梢血からの EPC 検出は血中の犬の脾臓血管肉腫細胞を検出しており、この腫瘍の非侵襲的かつ比較的高率な補助的診断指標となり得ることが示唆された。さらに、これらの EPC を標的とすることで、犬血管肉腫における効率的な治療戦略を構築できることが期待された。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者足立真実氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。