

論文内容の要旨

獣医学専攻

平成12年度博士課程 進学

氏名 大橋 絵美

指導教官 佐々木 伸雄

論文題目 In vitro antitumor activity of retinoids on canine cancer cells

(イヌ悪性腫瘍細胞に対するレチノイドの抗腫瘍効果に関する研究)

近年イヌの高齢化に伴い悪性腫瘍の発生頻度は増加しており、また家族の一員としての立場から、副作用が少なくかつ効果的な治療を望む飼い主が増加している。イヌの腫瘍の中でも悪性黒色腫、乳癌、および肥満細胞腫といった腫瘍は、その発生率、および浸潤能や転移能が高いことから獣医学領域で問題となっている。近年イヌに対する化学療法の研究も進んできているものの、現在のところこれらの腫瘍が一旦進行した段階での、症状の劇的な改善をもたらす抗癌剤のプロトコールはほとんどない。これらのうち、肥満細胞腫はイヌの皮膚、皮下織に頻繁に発生する腫瘍であり、特異な生物学的性状をもつことが知られている。通常多くの腫瘍での臨床予後判定がその大きさや転移の有無による病期分類によって行われているが、肥満細胞腫では、これらの指標よりも形態学的な分化程度を指標とした組織学的分類が予後と相関するため、臨床の現場ではしばしばこの分類用いられている。すなわち、分化程度の低い症例の予後が悪い傾向にある。

レチノイドは、ビタミンAおよびレチノイン酸とその天然・合成誘導体の総称であり、分化や増殖、アポトーシス、脊椎動物の形態形成など多くの生物機能を制御する生理活性物質である。レチノイドは悪性腫瘍細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが知られており、さまざまな腫瘍で *in vitro* および *in vivo* における研究報告がなされている。これらの中で最も有効性が確認されているのは、*all-trans* レチノイン酸 (ATRA) を用いた、ヒト急性前骨髄球性白血病 (APL) に対する分化誘導療法である。また皮膚癌や頭頸部癌、肺癌などに対する有効性も報告され、臨床応用が進められている。しかしながらイヌの悪性腫瘍に対するレチノイドの有効性に関する研究は少なく、培養細胞を用いてその有効性を検討した報告が

数例あるのみである。

そこで本研究では、これらの背景をもとにイヌ悪性腫瘍に対するレチノイドの有効性を明らかにし、さらにその効果発現機序を明らかにすることを目的として、すでに我々の研究室で樹立されたイヌ悪性腫瘍の培養細胞株を用い、以下の実験を行った。

第1章の序論に続き、第2章ではイヌ悪性黒色腫および乳癌細胞株を用いて、天然 (ATRA と 9cRA) および合成レチノイド (Am80 と HX630) の腫瘍抑制効果についての検討を行った。各細胞間でレチノイドによる増殖抑制効果に差があったものの、悪性黒色腫細胞ではほとんど増殖抑制効果は認められなかった。また乳癌細胞では感受性を示した細胞株が存在したものの、レチノイドに対する感受性が必ずしも高くなく、これら2種の腫瘍に対してレチノイドの有効性を示すことはできなかった。

第3章では、口腔内 (CoMS)、皮膚 (CM-MC)、および腸管 (VI-MC) といった異なった部位より樹立された3種類の肥満細胞腫細胞株に対する、天然および合成レチノイドの効果の検討を行った。その結果、悪性黒色腫細胞や乳癌細胞とは異なり、全ての細胞株において濃度依存的に増殖が抑制された。3株の中ではCM-MC細胞が最も高い感受性を示し、IC50はATRAと9cRAでそれぞれ $9.7 \times 10^{-8} \text{M}$ と $2.1 \times 10^{-9} \text{M}$ であった。このことから、レチノイドは皮膚肥満細胞腫に対する有効な抗腫瘍薬となる可能性が示唆された。

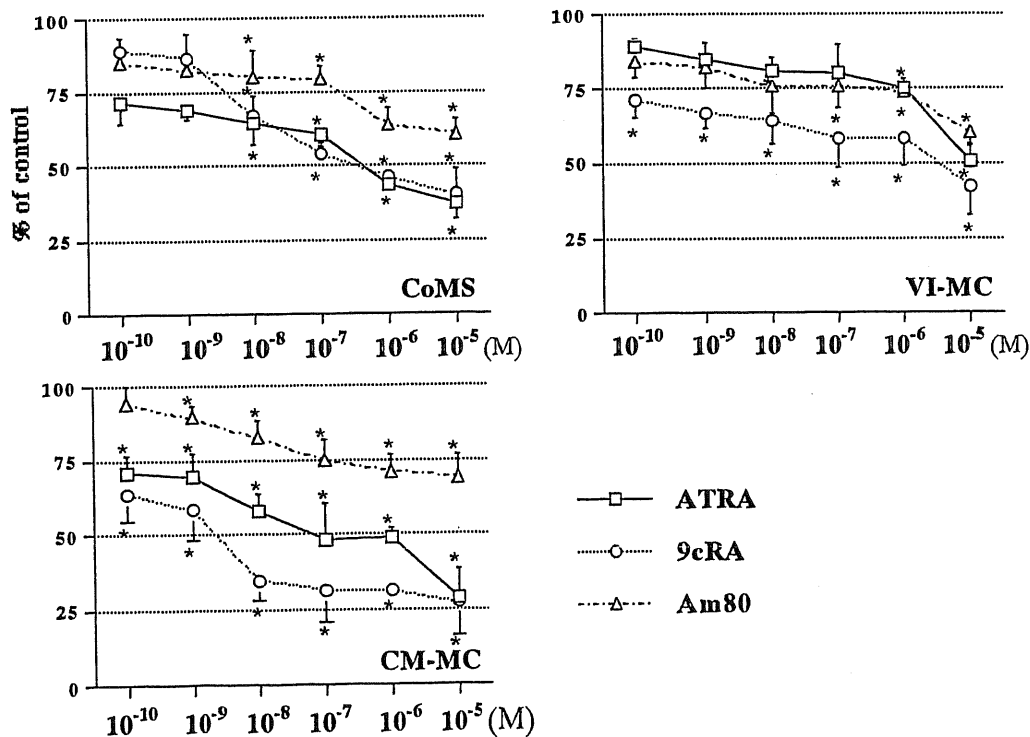


図1. レチノイドの肥満細胞腫細胞に対する増殖抑制効果。

コントロールに対する増殖抑制の割合 (%) を示す。

*:コントロールに対して有意(p<0.05)、値を mean±S.D で示す。

また CM-MC 細胞において ATRA 投与3日後にトルイジンブルー染色を行った結果、肥満細胞腫細胞内の異染色性顆粒がコントロールと比べ増加したことから、レチノイドが肥満細胞腫細胞の分化を誘導することが示された。

さらに肥満細胞腫細胞におけるレチノイドのアポトーシス誘導およびその経路について検討を行った。フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析の結果、いずれの細胞においても ATRA 投与後にアポトーシス細胞の割合が上昇した。また CM-MC 細胞を用いてウェスタンブロッティング法と蛍光比色法にて各カスパーゼの活性測定を行ったところ、ATRA 投与後にカスパーゼ 3 および 8 の活性上昇が認められた。ATRA を投与した細胞にカスパーゼ阻害剤である ZVAD-FMK を加えたところ、アポトーシスが阻害されたことから、レチノイドにより誘導されるアポトーシスにはカスパーゼが大きく関与していることが確認された。

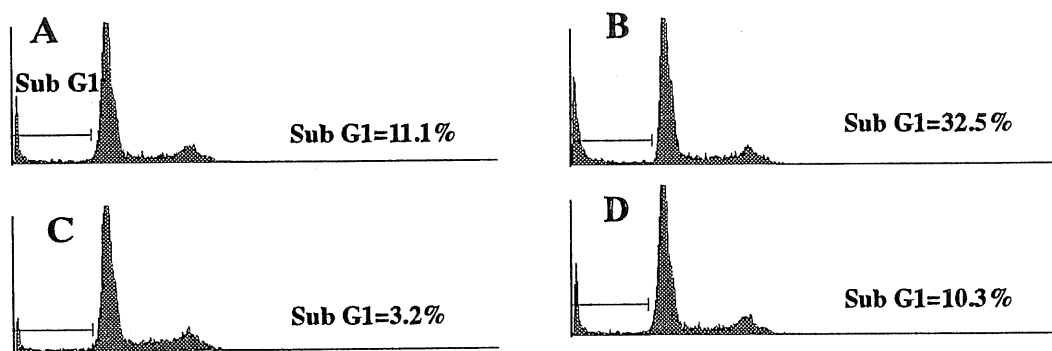


図2. レチノイドによるアポトーシス誘導および ZVAD-FMK によるその阻害。

Sub G1:アポトーシス細胞を示す。

A : コントロール、 B : ATRA 添加、 C : ZVAD-FMK 添加、 D : ATRA+ZVAD-FMK 添加

第3章において肥満細胞腫がレチノイドに対して比較的高い感受性を持つことが示されたものの、臨床における ATRA 投与後の血中濃度が約 10^{-9} M であることを考えると、単独での使用では腫瘍抑制効果が不十分ではないかと考えられた。一方、肥満細胞腫症例に対しては従来からグルココルチコイドがしばしば抗腫瘍薬として用いられ、ある程度の腫瘍抑制効果を示すことが知られている。

そこで第4章では上記3種類の肥満細胞腫細胞株に対し、ATRA とグルココルチコイドであるプレドニゾン (PRD) の併用処理を行い、レチノイドがこれらの細胞株の PRD 感受性を高めるか否かについて検討を行った。その結果、両薬剤併用時の感受性は各細胞によって異なったものの、CM-MC と CoMS 細胞においてそれぞれ相乗および相加的な増殖抑制効果が認められた。しかし、腸管由来である VI-MC 細胞に対しては、ほとんど効果が認められなかった。

一方、レチノイドの作用は主に核内レセプターである RAR と RXR により発現すると考えられてい

る。またグルココルチコイドの作用も、同じ核内レセプタースーパーファミリーに属するグルココルチコイドレセプターを介して発現することが知られている。両者を併用したときの相乗効果とレチノイドレセプター発現の関連性を調べる目的で、RAR と RXR の検出を行った。その結果、各細胞間でレチノイド単独や PRD 併用時の増殖抑制効果に差があったものの、3種類の細胞株において RAR と RXR の各サブタイプいずれの発現も検出され、レセプターとレチノイドおよび PRD 併用時における増殖抑制効果との関連性は認められなかった。

以上、本研究ではレチノイドによる3種のイヌ悪性腫瘍細胞株に対する増殖抑制効果について検討を行った。その中で感受性が高かった肥満細胞腫においては、レチノイドが分化およびアポトーシスを誘導することによって腫瘍細胞の増殖を抑制し、また ATRA と PRD の併用を行ったところ、その作用に相乗効果を示す細胞もあることが示された。肥満細胞腫は分化程度によって予後が大きく左右されることから、分化を亢進させる働きのあるレチノイドが増殖抑制効果を示したことは、臨床的にもきわめて興味深いことである、今後 *in vivo* での検討が必要ではあるが、レチノイドがイヌ肥満細胞腫に対して有効な治療法である可能性が示唆された。