［別紙２］

論文審査の結果の要旨

申請者氏名　　大橋　絵美

イヌには様々な悪性腫瘍が発生するが、中でも発生率の高い悪性黒色腫や乳癌、肥満細胞腫といった腫瘍は、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。これらのうち、肥満細胞腫はイヌの皮膚、皮下織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。通常多くの腫瘍の臨床予後判定は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。

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、中でも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。また皮膚癌や頭頚部癌、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極めて少ない。

そこで本研究では、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、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。その結果、悪性黒色腫細胞ではほとんど増殖抑制効果は認められず、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は必ずしも高くなく、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種類のイヌ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、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、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。

また ATRA 投与３日後のトルイジンブルー染色の結果から、肥満細胞腫細胞内の異染性顆粒が増加しており、レチノイドの分化誘導作用が確認された。さらに肥満細胞腫細胞におけるレチノイドの作用機序

を検討するため、レチノイドによるアポトーシス誘導およびその経路についても検討を行った。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。またアポトーシス経路における各カスパーゼ活性測定の結果、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 処置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。

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 とプレドニゾロン（PRD）の併用処理を行い、併用時の効果の検討を行った。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。

さらに、レチノイドの作用は主に核内レセプターである RAR と RXR により発現するが、グルココルチコイドも、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、３種類の細胞株のいずれにおいても RAR と RXR の各サブタイプが発現しており、レセプターとレチノイド・ PRD 併用時の増殖抑制効果との関連性は認められなかった。

以上まとめると、本研究は３種のイヌ肥満細胞腫細胞株を用いて、レチノイドが分化およびアポトーシスを誘導することでこれらの細胞の増殖を抑制し、かつ本腫瘍にしばしば用いられる PRD と相乗効果を示す可能性を示したものであり、臨床応用上貢献することは少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として括ある物と認めた。