

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中川 貴之

腫瘍の遠隔転移には、原発巣からの遊離、脈管内への侵入、二次臓器の血管内皮への接着と血管外への離脱、二次臓器での増殖といった様々な段階があり、各段階において様々な因子の関与が示唆されている。人医学領域では乳癌をはじめ様々な腫瘍でこれら因子の解析あるいは細胞動態や病態との関連について研究が進められているが、獣医学領域においてはまだ不明な点も多い。

異常を背景に、本論文は犬乳腺腫瘍における転移機構の解明に向けた基礎的研究として、犬乳腺腫瘍における転移関連因子の検索ならびに *in vitro*、*in vivo*、実験動物モデルにおけるそれらの役割や意義を検討したものである。

第一章では様々な腫瘍関連因子の犬乳腺腫瘍細胞における発現を、同一犬乳癌症例の原発巣と転移巣より樹立された3ペア計6株(CHMp/m、CIPp/m、CNMp/m)を用い検索した。これら細胞株よりタンパク質を抽出し、人乳癌との関連が示唆されている細胞接着因子、細胞周期関連因子、シグナル伝達因子、レセプター等、計24因子についてウェスタンブロット法により発現解析を行った。その結果、原発や転移巣といった細胞株の由来により一定の発現傾向を示した因子はみられなかったものの、いくつかの因子においてその発現の差異がみられた。中でも sialyl Lewis X[sLe(x)]は遠隔転移巣から分離された CHMm 株でのみ強発現を示し、検索した細胞株数は少ないものの、犬乳腺腫瘍における血行性転移との関連が示唆された。

第二章では犬乳腺腫瘍細胞における sLe(x)発現とその機能について検討した。sLe(x)は E-selectin と特異的に結合する糖鎖抗原であり、炎症部位における血管内皮への炎症細胞の接着に関与し、また腫瘍細胞の遠隔転移との関連も示唆されている。免疫染色による細胞での発現検索では、CHMm 株でのみ細胞膜を中心に強い発現がみられた。また細胞接着実験では、sLe(x)陽性細胞である CHMm 株では E-selectin を誘導された人臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に対し有意にその接着性を増し、一方 sLe(x)陰性株である CHMp 株では接着性に有意な変化はなかった。フロースルーチャンバーを用いた検索では CHMm 株が HUVEC の上に転がるように接着していく過程が観察され、これは炎症細胞と血管内皮の接着で報告されている sLe(x)-E-selectin 結合によるローリング現象と同様であると考えられた。これらの結果より sLe(x)と犬乳腺腫瘍の血行性遠隔転移との関連が示唆された。

第三章では犬乳腺腫瘍自然発症例を対象とし、組織および血清中の sLe(x)発現と転移や予後などとの関連を検討することとした。本学附属家畜病院にて外科手術を受けた犬の原発乳腺腫瘍組織における sLe(x)発現を検索したところその約半数で発現がみられたが、健常犬や腫瘍症例の非癌部では発現はみられず、癌化に伴い sLe(x)が発現していることが示唆された。しかし、酵素免疫測定法を用いた血清中 sLe(x)濃度測定では、乳腺腫瘍と健常犬における濃度値に有意

な差異はみられず、またこれらの発現と臨床データとの有意な関連もみられなかった。

第四章では肺高転移モデルの作製とそこでの sLe(x)発現の可能性を検索した。免疫不全マウスへ CHMp 株を皮下移植した後、肺に形成された転移巣から腫瘍細胞を分離し、それを新たなマウスへと移植を重ねることでより転移能の高い細胞株を得ることができた。移植を重ねる中で、マウスの生存期間の短縮、肺転移結節数の増加などより高い転移能や悪性化を示す所見が得られた。しかし本モデルの 3 世代目まででは sLe(x)発現はみられなかった。

以上要するに、本研究では犬乳腺腫瘍細胞株にみられた sLe(x)の特異的な発現に着目し、*in vitro* においてその接着性を、また自然発症例において約半数の原発腫瘍組織において癌化に伴う sLe(x)の発現を確認したものの、その発現と転移や予後との関連は明らかではなかった。しかし、本研究は sLe(x)の犬乳癌発生における何らかの役割を示したものであり、また今後の乳癌研究上貴重な細胞およびマウスモデルを開発したことから、その臨床上、学術上貢献するところは少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。