

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 宮島 望

---

レチノイドはビタミン A 誘導体で、細胞の増殖、成熟、分化において重要な役割を果たしており、またその作用は核内レセプターを介すると言われている。レチノイドレセプターにはレチノイン酸レセプター ( $RAR\alpha, \beta, \gamma$ ) とレチノイド X レセプター ( $RXR\alpha, \beta, \gamma$ ) があり、それぞれ別の遺伝子によってコードされている。一方レチノイドは、医学領域において  $RAR\alpha$  遺伝子の染色体転座が原因である急性前骨髄球性白血病 (APL) の第一選択薬として用いられ、さらに近年、他の固形癌においてもレチノイドの抗腫瘍効果が報告されている。そこで本研究では、代表的な天然レチノイドである ATRA を用い、イヌの腫瘍細胞株、特に細胞増殖抑制効果が示唆されている肥満細胞腫における ATRA の抗腫瘍効果について多面的に検討した。

第 1 章では、自然発症症例から樹立したイヌの 4 つの腫瘍の計 17 種の腫瘍細胞株 (乳腺腫瘍 6 株、骨肉腫 3 株、悪性黒色腫 5 株、肥満細胞腫 3 株) を用い、 $RAR\alpha, \beta, \gamma$  遺伝子の発現をリアルタイム PCR で検討した。その結果、ATRA の腫瘍増殖抑制効果には  $RAR\alpha$  が最も大きく関与すると考えられた。また、 $RAR\alpha$  は肥満細胞腫の 3 細胞株で他の細胞株より高い発現が見られ、ATRA 投与による増殖抑制効果もより強い効果を示し、さらに ATRA による増殖抑制効果と  $RAR\alpha$  発現との間には強い関連が示された。これらの結果から、ATRA はイヌ肥満細胞腫の治療薬となりうること、および  $RAR\alpha$  の発現が ATRA 治療に対する反応性の指標となる可能性が示唆された。

レチノイドは腫瘍細胞に分化やアポトーシスを誘導し、抗腫瘍効果を示している可能性がある。そこで第 2 章では、 $RAR\alpha$  高発現株であった肥満細胞腫の 3 株 (CoMS, VI-MC, CM-MC) と、 $RAR\alpha$  低発現株であった他の腫瘍の 3 株を用い、分化との関連が報告されている細胞周期からの脱出について検討した。フローサイトメトリーにて ATRA 処置後の細胞周期を調べたところ、CoMS, VI-MC では  $G_1$  期細胞の割合が増加し、細胞周期の停止が示されたが、 $RAR\alpha$  低発現株では大きな変化はなかった。次にウェスタンブロット法により、細胞周期の停止または遅延と関係する  $p27^{Kip1}$  と Mad1 の発現と、アポトーシスに関連する断片化 caspase-3 (caspase-3 の活性型) の発現を調べた。その結果、ATRA 処置後に  $RAR\alpha$  高発現株で  $p27^{Kip1}$  発現の増加、また CoMS, VI-MC で Mad1 発現の増加が見られ、細胞周期の停止が示唆された。したがって、ATRA は  $RAR\alpha$  を介して細胞周期を停止させ、増殖抑制効果を示すものと思われた。

一方、アポトーシスに関しては、Mad1 発現の増加が見られなかった CM-MC と VI-MC

で断片化 caspase-3 の発現が増加しており、ATRA の RAR $\alpha$  を介した効果には細胞周期の停止だけではなく、アポトーシス誘導効果も関与すると考えられた。

第 3 章では、VI-MC をヌードマウスの皮下に移植して腫瘍を形成させ、ATRA を経口投与し、ATRA の増殖抑制効果を調べた。その結果、ATRA 投薬群では 1mg/kg の用量で腫瘍の増殖が抑制された。

第 4 章では、肥満細胞腫に対する臨床応用を視野に入れ、ATRA とプレドニゾロン (PRD) ならびにビンブラスチン (VBL) を併用した時の効果をそれぞれ *in vitro*, *in vivo* で検討した。それぞれの薬剤を段階希釈し、ATRA と PRD、ATRA と VBL、ならびに 3 剤を併用して 3 株の細胞に処置し、培養後の生細胞数を測定した。その結果、ATRA と PRD ではやや高濃度で併用した場合、ATRA と VBL では低～中濃度で併用した場合に、強い相乗的な増殖抑制効果が得られた。3 剤を併用した場合では、CoMS と CM-MC で強い相乗効果が見られた。一方、ヌードマウス移植モデルにおいて、3 剤の併用効果を調べたところ、どの併用の場合においても、相加あるいは相乗的な腫瘍増殖抑制効果が見られなかった。この理由として、VBL が微小管阻害剤であるため、ATRA の作用と拮抗した可能性も考えられるが、正確な原因は不明であった。

以上より、ATRA は RAR $\alpha$  を介して肥満細胞腫に細胞周期 G<sub>1</sub> 期停止、アポトーシスを起こすことで増殖抑制効果を示すことが明らかとなったが、他の薬剤と併用した場合、*in vivo* では相乗効果が見られなかった。したがって今後 ATRA を肥満細胞腫の補助的な治療薬として使用するにはさらなる効果・作用機序の検討が必要であると考えられるが、本研究によりその作用機序の一端を示すことができたことは、今後の ATRA の臨床応用の可能性を示し、さらにその際の治療計画の決定にも重要な情報となるものと考えられた。

以上要するに、本研究は治癒の困難なイヌ肥満細胞腫に対し、レチノイドの臨床的有用性を明らかにしたものであり、学術上、応用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。