

論文内容の要旨

獣医学専攻

平成 18 年度博士課程 入学

氏 名 ムカワ ロブナ

指導教員名 佐々木 伸雄

論文題目 Study on NF- κ B activity and its relation to malignancy of canine mammary gland tumors.

(犬の乳腺腫瘍における NF- κ B の活性化あるいは抑制と悪性度との関連に関する研究)

乳腺腫瘍は雌の犬で最も多くみられる腫瘍であり、雌犬に発生する全腫瘍の約半数を占めると言われている。犬の乳腺腫瘍は組織学的に良性腫瘍である乳腺腫と良性混合腫瘍および悪性腫瘍である乳腺癌と悪性混合腫瘍に大別され、全体の約 50%が悪性腫瘍であると報告されている。良性腫瘍においてはその予後は良好とされているが、悪性腫瘍においては局所リンパ節への転移だけでなく肺、肝臓、腎臓などへの遠隔転移もみられ、これらは予後不良となる。

Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) は炎症反応や細胞の生存や増殖などの様々な生理現象に関与する転写因子であり、ほとんど全ての細胞においてその発現がみられる。NF- κ B は Inhibitor κ B (I κ B) の結合により活性が抑制されている状態では細胞質に存在する。TNF- α など種々の細胞刺激で活性化した I κ B Kinase (IKK) によって I κ B- α はリン酸化されプロテアソームによる分解を受ける。I κ B との結合が解除された NF- κ B は核内へと移行し、核内にて様々な標的遺伝子の転写活性化を起こす。NF- κ B 活性の制御異常は様々な慢性の炎症性疾患などにおいて報告されている。また腫瘍性疾患においても NF- κ B は重要な働きを示すと考えられている。様々な悪性腫瘍において NF- κ B の恒常的な活性化が報告されており、癌化や腫瘍の悪性化への関与が示唆されている。

そこで本研究は犬乳腺腫瘍における NF- κ B 活性化の意義を明らかにすることを目的とし、犬乳腺腫瘍細胞株を用いたマウス移植モデルと犬乳腺腫瘍自然発症例における NF- κ B 活性化および腫瘍動態や臨床データとの関連を評価した。またその関連性を確認するために NF- κ B 阻害剤を用いた実験も行った。

犬乳腺腫瘍における NF- κ B 活性化とその腫瘍動態との関連を評価するために、ま

ず免疫不全マウス移植モデルを用い実験を行った。本研究室において犬乳腺腫瘍自然発症例より樹立された CHMp 株から分離された 2 つのクローン株、すなわち悪性度の高い CHMp-5b 株と悪性度の低い CHMp-13a 株をそれぞれヌードマウスに移植し、移植後 2, 4, 6 週に安楽殺を行い原発巣および諸臓器を採材した。Ki-67、NF- κ B、cyclin D1 に対する免疫染色を行いその結果を両細胞株移植群で比較してみたところ、全ての週において CHMp-5b 株移植群での核内における Ki-67 と NF- κ B のより強い発現がみられ、CHMp-5b 移植群の原発巣では NF- κ B の活性化が亢進していることが示唆された。また cyclin D1 は移植後初期においては CHMp-13a 株移植群でより強い発現がみられたが経時的に徐々に発現は低下し、最終週では CHMp-5b 株移植群のほうがより強い発現を示した。リンパ節転移は CHMp-5b 株移植群においては第 4 週には全てのマウスで、また肺転移は第 6 週に 3 頭中 2 頭でみられたが、CHMp-13a 株移植群ではリンパ節転移が第 6 週の 6 頭中 2 頭でみられるのみで肺転移はいずれのマウスでもみられなかった。CHMp-5b 株移植群と CHMp-13a 株移植群ではマウス内での腫瘍動態に差異がみられ、CHMp-5b 株移植群においてみられる腫瘍の悪性挙動は NF- κ B の活性化が関連している可能性が示唆された。

また実際の犬乳腺腫瘍自然発症例における検討では自然発症の犬乳腺腫瘍症例から外科的に切除された 48 組織を用い評価を行った。これら組織において免疫染色により評価した NF- κ B および cyclin D1 の核内における発現率と分裂指数 (MI) を、それぞれの病理組織型により比較検討した。NF- κ B 活性は乳腺癌 (17.9 \pm 14.2%) において乳腺腫 (1.7 \pm 1.5%)、良性混合腫瘍 (1.8 \pm 2.9%)、乳腺過形成 (3.8 \pm 3.0%) と比較して有意に高い結果が得られた。また NF- κ B 活性と MI は有意な相関 ($r=0.459$, $p=0.001$) がみられ、乳腺癌組織と他の組織型との間に有意な差がみられた ($p<0.05$)。しかしながら cyclin D1 の発現は 4 群間で有意な差異はみられなかった。NF- κ B 活性は腫瘍サイズ ($r=0.483$, $p=0.001$)、リンパ節転移 ($r=0.308$, $p=0.033$) と有意な相関がみられた一方で、遠隔転移との有意な相関はみられなかった ($r=0.217$, $p=0.181$)。また生存期間と NF- κ B 活性との関連を解析したところ、NF- κ B 活性の高い症例では有意に生存期間が短いことがわかった ($p<0.01$)。

これらマウス移植モデルと臨床例の解析から示唆された犬乳腺腫瘍における NF- κ B 活性化と腫瘍の悪性度や転移予後との関連を確認するために NF- κ B 阻害剤を用い NF- κ B の抑制による腫瘍動態の変化を評価した。阻害剤は NF- κ B 特異的阻害剤である BAY 11-7082 (BAY) (E)3-[(4-methylphenyl)-sulfonyl]-2-propenenitrile と、化学予防効果を持ち NF- κ B に対しても阻害効果を持つクルクミンの 2 種類の阻害剤を用い、犬乳腺腫瘍細胞株は CHMp-5b 株を用いた。In vitro の阻害実験では CHMp-5b 細胞を 0, 1, 2, 4 microG/ml の BAY を添加した培養液にて 1, 6, 24 時間培養し、Western blot 法にてこれらの細胞におけるタンパク発現の変化を解析した。BAY 2 および 4 microG/ml 添加下で 6 時間培養した細胞において、p-I κ B, Bcl-2, cyclin D1 の顕著な発現減少がみられ、I κ B に対するリン酸化減少による NF- κ B 活性の抑制効果が確認された。生体内での NF- κ B 活性の抑制効果とそれに伴う腫瘍動態の変化の評価にはマウス移植モデルを用いた。CHMp-5b 株をヌードマウ

スの乳腺部皮下脂肪へ移植し一日おきに BAY (6mg/kg) の腹腔内投与を行ったが、NF-kB の活性は BAY 投与群の原発巣 (4.4%) では対照群 (17.1%) と比較して有意に低く NF-kB 活性の抑制が確認された。また BAY 投与群では対照群と比較して原発巣の腫瘍増殖は遅く、肺転移も少ない結果となった。同様にマウス移植モデルにおける NF-kB 阻害実験をクルクミンを用いて行った。クルクミンは *Curcuma longa* から抽出されるポリフェノールの一種であり、NF-kB とそれにより転写調節を受ける因子を抑制することで、細胞の形質変化や腫瘍発生、血管新生、浸潤転移を抑えることが知られている物質である。CHMp-5b 細胞を移植したヌードマウスに 2%クルクミン含有食を自由給餌した場合の NF-kB 活性の阻害とその抗腫瘍効果を評価した。クルクミンを経口摂取したマウスでは対照群 (11.4%) と比較して有意に低い NF-kB 活性 (3.1%) を示した。クルクミン給餌群では腫瘍の増殖が遅く、NF-kB 活性の阻害との関連が示唆された。また肺転移についてもクルクミン給餌群では対照群よりも少ない結果となった。これらの阻害実験から NF-kB の活性化が CHMp-5b 株における増殖や転移予後の悪性化に関与しており阻害剤によりその悪性度を低下させることが可能であることが示された。これは犬乳腺腫瘍の悪性化に NF-kB の活性化が関与しており NF-kB 阻害剤が本腫瘍に対して抗腫瘍効果を持つ新たな治療法につながる可能性を示唆するものと考えられた。

以上のように本研究では犬乳腺腫瘍における NF-kB 活性化の意義を検討することを目的とし、犬乳腺腫瘍における NF-kB 活性化と腫瘍動態との関連を検討した。その結果、犬乳腺腫瘍細胞株を用いた免疫不全マウス移植モデルでは NF-kB 活性と腫瘍の増殖、リンパ節転移、遠隔転移との関連が示唆され、自然発症の腫瘍症例における解析では NF-kB 活性化がその組織型や転移予後と相関することが明らかとなった。これら犬乳腺腫瘍の悪性化と NF-kB 活性化の関連を 2 種類の NF-kB 阻害剤を用いた実験により確認するとともにマウス移植モデルにおけるこれら阻害剤の抗腫瘍効果を確認することができた。犬乳腺腫瘍は発生頻度の高い腫瘍であるが進行した症例における全身的治療は未だ確立されていない。本研究で明らかになった NF-kB の活性化と腫瘍の悪性度や予後との関連は新たな診断や予後指標の確立に繋がると考えられ、またその抗腫瘍効果は新たな治療法の開発に繋がるものと考えられる。また今後の研究においてはこうした臨床応用に向けた研究だけでなく NF-kB 活性化により転写調節を受ける標的遺伝子の解析や NF-kB 活性化を誘導する細胞刺激やそのメカニズムを解析していくことで犬乳腺腫瘍の悪性化と NF-kB 活性の関連がより明らかになっていくものと考えられ、今後もさらなる研究を進めていく予定である。