

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 ムカワ ロブナ

乳腺腫瘍は雌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。犬乳腺腫瘍の約 50%が悪性であり、局所リンパ節だけでなく肺、肝臓、腎臓などへの転移もみられる症例では一般に予後不良である。

Nuclear factor- κ 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その発現がみられる。NF- κ B は Inhibitor κ B (I κ B) との結合により活性が抑制された状態で細胞質に存在する。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り分解される。I κ B との結合が解除された NF- κ B は核内へと移行し様々な標的遺伝子の転写活性化を起こす。また、NF- κ B は様々な悪性腫瘍においてそ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。

第一章では、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 株からクローン化された悪性度の高い 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、その結果を両移植群で比較したところ、全ての週において CHMp-5b 株移植群でその核内における 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。リンパ節転移および肺転移はいずれも CHMp-5b 株移植群で多く、これらの悪性挙動は NF- κ B の活性化が関連している可能性が示唆された。

第二章では、犬乳腺腫瘍自然発症例から得られた 48 腫瘍組織におけるこれらの発現を検討した。その結果、腫瘍の組織型における差異をみると、乳腺癌における NF- κ B 活性が、乳腺腫、良性混合腫瘍、乳腺過形成と比較して有意に高い結果が得られた。また NF- κ B 活性と分裂指数は有意な相関がみられた。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 活性は各症例の腫瘍サイズ、リンパ節転移と有意に相関しており、また生存期間は NF- κ B 活性の高い症例で有意に短いことがわかった。

第三章では、NF- κ B の特異的阻害剤 BAY 11-7082 (BAY) を用い、NF- κ B の抑制による影響を CHMp-5b 細胞、ならびにその移植ヌードマウスモデルを用いて検討した。In vitro の実験では、CHMp-5b 細胞を 0, 1, 2, 4 μ g/ml の BAY を添加した培養液にて培養し、

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。その結果、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。ヌードマウスモデルでは、NF- κ B の活性は BAY 投与群の原発巣で対照群より有意に低く、NF- κ B 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、肺転移も少なかった。

第四章では、同様のヌードマウス移植モデルにおいて NF- κ B 阻害作用を持つクルクミンの効果を検討した。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- κ B 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。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、対照群と比較して有意に低い NF- κ B 活性を示した。クルクミン給餌群では腫瘍の増殖が遅く、また肺転移を起こしたマウスの数もクルクミン給餌群では対照群よりも少なかった。これらの実験から、NF- κ B の活性化が CHMp-5b 株における増殖や転移、予後等の悪性化に関与しており、犬乳腺腫瘍の悪性化と NF- κ B の活性化の関連が示された。

本研究は犬乳腺腫瘍と NF- κ B 活性化の関連を検討した初めての研究である。しかも NF- κ B 活性化は犬乳癌悪性度の有力な指標となること、およびその抑制は有力な治療法の開発に繋がることを証明したものであり。学術上、応用上、貢献するところが少なくない。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。