

氏名	きむら まゆ 木村真優
本籍（国籍）	日本国
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣博第6号
学位授与年月日	令和4年9月26日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当 課程博士
研究科及び専攻	獣医学研究科 共同獣医学専攻
学位論文題目	イヌ腫瘍におけるトセラニブの治療効果予測因子の解明に関する研究 (Studies on therapeutic predictors of toceranib in canine tumors)
学位審査委員	主査 教授 佐藤 洋 副査 教授 打出 毅 副査 教授 福島 隆 治 副査 教授 片山 泰 章 副査 教授 山崎 真 大

論文の内容の要旨

近年イヌの抗がん治療において、分子標的療法が注目されている。トセラニブは獣医療における代表的な分子標的薬であり、血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2) や血小板由来成長因子受容体 (PDGFR) の阻害による血管新生阻害作用を期待して用いられている。その有効性は様々なイヌの腫瘍において確認されているが、症例によって治療効果が大きく異なることがあり、治療効果予測因子の解明が課題である。治療効果予測因子同定のためには治療効果の判定が必要であるが、現在は生存期間など長期を要する判定法であることが研究の障壁となっている。従来血管に発現するとされていた VEGFR2 や PDGFR は腫瘍細胞にも発現し、ヒトの腫瘍細胞自身の増殖や分化に関与することが報告されている。イヌの腫瘍細胞でも VEGFR2 や PDGFR の発現が認められているがその機能は不明であり、トセラニブが腫瘍細胞にも直接作用している可能性について検討する必要がある。本研究では、トセラニブの治療効果予測因子解明のための基礎的研究として、臨床応用可能な血管新生評価法の構築およびトセラニブの治療効果に影響を及ぼす因子を解明することを目的とした。

第 1 章では、血管新生阻害療法により微小血管密度 (MVD) が減少することに着目し、臨床応用可能な治療効果判定法として血管内皮マーカーの mRNA 定量による血管新生評価について検討した。外科的に摘出されたイヌの腫瘍組織を用い、汎血管内皮マーカーであるフォン・ヴィレブランド因子 (vWF) を用いた既存の免疫組織化学的手法による MVD と、real-time PCR にて定量した vWF の mRNA 発現量を比較したところ正の相関を示し、vWF の mRNA 定量による血管新生評価が可能であることを示した。また、ヒトで新生血管内皮細胞に特異的に発現している endoglin の mRNA 発現量も MVD などの血管新生の指標と相関しており、イヌにおいても血管新

生評価に有用である可能性を示した。さらに、低侵襲な採材法である針生検で得られた mRNA の定量による血管新生の評価も可能であることを証明した。これらの結果から、イヌの腫瘍において血管内皮マーカーの mRNA 定量を用いた客観的で繰り返し可能な血管新生評価が可能であり、臨床現場で迅速に血管新生阻害療法の治療効果判定ができる可能性を示した。

第 2 章では、トセラニブの治療成績が間葉系腫瘍よりも上皮系腫瘍で高い傾向にあることに着目し、この治療成績の差異には血管内皮増殖因子 (VEGF) /VEGFR2 シグナルが影響していると仮定して上皮系および間葉系腫瘍で血管新生の指標とその関連因子の発現を比較解析した。外科的に摘出されたイヌの腫瘍組織を用い、MVD, vWF と endoglin の mRNA 発現量、および血管内皮細胞における VEGFR2 スコアを免疫組織化学の染色強度により求めた。また、腫瘍細胞の VEGF, VEGFR2, リン酸化 VEGFR2 (pVEGFR2) スコアをその染色強度と染色率により求めた。さらに増殖活性の指標である抗 ki-67 抗体を用いた免疫組織化学による増殖指数と pVEGFR2 スコアの関連を解析した。その結果、イヌの上皮系腫瘍と間葉系腫瘍の間に血管新生の指標に関する差はなかったが、上皮系腫瘍では間葉系腫瘍と比較して腫瘍細胞の VEGF, VEGFR2, pVEGFR2 の発現量が多く、さらに pVEGFR2 量が腫瘍細胞増殖に関連している可能性が示された。

第 3 章では、第 2 章をふまえてイヌ乳腺腫瘍細胞株の pVEGFR2 発現量と細胞増殖活性およびトセラニブの効果との関連について検討した。pVEGFR2 の発現量が多い細胞は増殖活性が高く、また、トセラニブは VEGFR2 のリン酸化を阻害し pVEGFR2 発現量の多い細胞の増殖を抑制した。この結果から、イヌの乳腺腫瘍細胞の VEGFR2 が自身の増殖を促進していること、および、トセラニブが乳腺腫瘍細胞の VEGFR2 にも直接作用していることが示され、さらに上皮系腫瘍細胞の pVEGFR2 発現量が治療効果予測因子になりうる可能性が示された。

第 4 章では、第 2・3 章における結果をふまえ、上皮系および間葉系腫瘍における PDGFR のリン酸化 (pPDGFR α および pPDGFR β) スコアと腫瘍細胞増殖の関連について比較検討した。第 2 章と同様の方法で解析したところ、pPDGFR α および pPDGFR β スコアは上皮系腫瘍で高かったものの、増殖指数との相関性はいずれにおいても認められなかった。このことから、PDGFR もトセラニブの治療効果に関与している可能性が示されたが、その作用機序についてはさらなる検討が必要である。

以上より、本研究では客観的で低侵襲な血管新生評価法を構築し、治療中に血管新生を繰り返し評価することが可能であることを示した。さらに、トセラニブが新生血管だけでなく腫瘍細胞も標的としていることを明らかにし、腫瘍細胞への直接作用が治療効果の違いに影響している可能性を示した。今後はトセラニブ投与症例を用いた臨床研究によりこれらの有用性を証明していく必要がある。

論文審査の結果の要旨

本研究は、分子標的薬であるトセラニブのイヌにおける臨床応用可能な治療効果判定法を確立すること、ならびにトセラニブの標的分子である血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2) および血小板由来成長因子受容体 (PDGFR) の腫瘍細胞における存在とその増殖への関与を明らかにすることを目的として実施された。

はじめに、トセラニブによる血管新生阻害療法において腫瘍の微小血管密度 (MVD) が減少することに着目し、汎血管内皮マーカーであるフォン・ヴィレブランド因子 (vWF) ならびに

新生血管内皮細胞に特異的なマーカーである endoglin について real-time PCR により mRNA 量を測定し、MVD と比較することで vWF および endoglin の定量により血管新生評価が可能であることを示した。また、endoglin がイヌにおいても有用であることを示した。さらに、腫瘍から針生検で得られた mRNA の定量でも評価が可能であることを示した。

次に、イヌにおいてトセラニブの治療成績が間葉系腫瘍よりも上皮系腫瘍で高いことから、イヌ腫瘍における血管新生に関連する因子の発現を比較解析したところ、両者の間で血管新生の指標に関する差は認められなかったが、上皮系腫瘍では間葉系腫瘍よりも腫瘍細胞そのものに発現する血管内皮増殖因子 (VEGF) , VEGFR2 量ならびにリン酸化 VEGFR2 (pVEGFR2) 量が多いこと、腫瘍細胞の持つ pVEGFR2 量が腫瘍細胞増殖に関連している可能性を示した。

以上から、pVEGFR2 量と腫瘍細胞増殖の関連を証明するために、イヌ乳腺腫瘍細胞株を用いて pVEGFR2 量と腫瘍細胞増殖の関連を検討したところ、pVEGFR2 量と腫瘍細胞の増殖活性は相関すること、およびトセラニブにより pVEGFR2 量の多い腫瘍細胞株の増殖を抑制できることを示した。

さらに、イヌ腫瘍におけるリン酸化 PDGFR (pPDGFR) 量と腫瘍細胞増殖の関連について検討したところ、上皮系腫瘍では pPDGFR 量が間葉系腫瘍よりも多いが、腫瘍増殖とは相関しないことを示した。

本研究の結果から、イヌにおいて real-time PCR により血管新生を評価し、トセラニブの治療効果判定を行う方法が確立された。また、腫瘍細胞のもつ pVEGFR2 量が増殖に関与すること、ならびにトセラニブは腫瘍細胞の VEGFR2 を阻害することで増殖を直接抑制すると考えられた。さらに、イヌの腫瘍細胞においても PDGFR が発現していることが明らかになった。

以上について、審査委員会全員一致で本論文が岩手大学大学院獣医学研究科の学位論文として充分価値があると認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1. 著者名 : Kimura, M., Miyahara, K., Yamasaki, M. and Uchida, N.

発行年 : 2022

題目 : Comparison of vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor 2 expression and its relationship to tumor cell proliferation in canine epithelial and mesenchymal tumors

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

(巻・号・頁) 84・1・133-141

2. 著者名 : Kimura, M., Yamasaki, M., Satoh, H. and Uchida, N.

発行年 : 2021

題目 : Repeatable and objective method for evaluating angiogenesis using real-time RT-PCR of endoglin expression in canine tumours

学術雑誌名 : Veterinary and Comparative Oncology

(巻・号・頁) 19・1・34-43