

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

2022年

岩手大学大学院 獣医学研究科

木村 真優

# 目次

総緒 .....	5
第1章 イヌの腫瘍における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法の構築.....	10
1. 小緒 .....	11
2. 材料と方法 .....	13
3. 結果 .....	20
4. 考察 .....	22
図表 .....	27
第2章 イヌの上皮系腫瘍と間葉系腫瘍における VEGF/VEGFR2 シグナル発現とその腫瘍細胞増殖との関連の比較 .....	37
1. 小緒 .....	38
2. 材料と方法 .....	40
3. 結果 .....	44
4. 考察 .....	46
図表 .....	49
第3章 イヌ乳腺腫瘍細胞株における VEGFR2 のリン酸化が 細胞増殖およびトセラニブの効果に与える影響の評価.....	60
1. 小緒 .....	61
2. 材料と方法 .....	63
3. 結果 .....	67
4. 考察 .....	68
図表 .....	71

第4章 イヌの上皮系腫瘍と間葉系腫瘍における PDGFR のリン酸化と その腫瘍細胞増殖との関連の比較.....	76
1. 小緒 .....	77
2. 材料と方法 .....	79
3. 結果 .....	81
4. 考察 .....	82
図表 .....	86
総括 .....	91
謝辞 .....	95
引用文献.....	96

## 略語一覧

CBR : clinical benefit rate, 臨床的有用率

DAB : diaminobenzidine, ジアミノベンジジン

DEPC : diethylpyrocarbonate, ジエチルピロカーボネート

DMSO : dimethyl sulfoxide, ジメチルスルホキシド

FBS : fetal bovine serum, ウシ胎児血清

FNA : fine needle aspiration biopsy 針穿刺吸引生検

GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, グリセルアルデヒド-3-リン酸  
デヒドロゲナーゼ

H.E. : hematoxylin eosin, ヘマトキシリン・エオジン

LOA : limit of agreement, 許容範囲

MVD : micro vessel density, 微小血管密度

PBS : phosphate buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水

PCNA : proliferating cell nuclear antigen, 増殖細胞核抗原

PDGF : platelet-derived growth factor, 血小板由来成長因子

PDGFR : platelet-derived growth factor receptor, 血小板由来成長因子受容体

PD-L1 : programmed cell death 1 – ligand 1, プログラム細胞死リガンド 1

PI : proliferation index, 増殖指数

pPDGFR : phospho-PDGFR, リン酸化 PDGFR

pVEGFR2 : phospho-VEGFR2, リン酸化 VEGFR2

RPL19 : ribosomal protein L19, リボソームタンパク質 L19

TBST : tris-buffered saline with tween-20, tween-20 含有トリス緩衝生理食塩水

TKI : tyrosin kinase inhibitor, チロシンキナーゼ阻害剤



VEGFR2 : vascular endothelial growth factor receptor, 血管内皮増殖因子受容体 2

VEGF : vascular endothelial growth factor, 血管内皮増殖因子

vWF : von Willebrand factor, フォン・ヴィレブランド因子

## 総緒

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（パ  
ラディア<sup>®</sup>、Zoetis）はイヌの再発した皮膚肥満細胞腫の治療薬としてわが国で 2013  
年に承認されたチロシンキナーゼ受容体阻害薬（TKI）であり、KIT、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）を阻害する。  
これらの分子のうち、VEGFR2 と PDGFR は血管新生の促進に関与する。血管新生  
は腫瘍の成長と転移に重要な固形がん共通のメカニズムであることから、トセラニ  
ブは VEGFR2 や PDGFR を標的とした血管新生阻害作用を期待されて肥満細胞腫以  
外の様々なイヌの腫瘍に対しても広く使用されている。実際にトセラニブの有効性は  
様々なイヌの腫瘍において報告されている [Gustafson and Biller, 2019, Heaton et al.,  
2020, Kim et al., 2017, London et al., 2012, Sheppard-Olivares et al., 2020]。しかしな  
がら、臨床現場では同じ診断名の腫瘍でも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となっている。

トセラニブの標的分子の発現解析などにより治療効果に関わる分子を同定しよう  
とする試みが複数の研究で行われているものの [Gattino et al., 2018, Heishima et al.,  
2018, Hocker et al., 2017, Sanchez-Cespedes et al., 2020]、未だ治療効果予測因子の解  
明には至っていない。その原因の一つとして、治療効果予測因子同定のためには治療  
効果と比較解析していくことが必要であるが、現在治療効果判定は生存期間など長期  
を要する方法で行われていることが研究の障壁の一つとなっていることが考えられ  
る。そのため、臨床現場で迅速に血管新生阻害療法の治療効果を判定する方法の確立  
が必要である。ヒトの膠芽腫において、血管新生阻害療法により一般的な血管新生の  
指標である微小血管密度（MVD）が減少することが報告されていることから  
[Yamamoto et al., 2017]、血管新生阻害療法の治療効果判定に MVD の評価が有用で  
ある可能性が示唆されている。しかしながら、著者が知る限り MVD の評価が血管新  
生阻害療法の効果判定として有用であるとの報告は今のところ存在しない。その原因

として、MVD は病理組織学的な評価法であることから生体に対して侵襲性の高い採材法を必要とし臨床現場で容易に評価できないことや、手技の観点から主観的評価であること、さらに使用する血管内皮マーカーの違いにより結果に差が生じることが挙げられる。したがって、MVD に代わる低侵襲で客観的な血管新生評価法を確立することで、臨床現場で血管新生の評価が容易に実施できるようになると考えられる。

VEGFR2 と PDGFR はそれぞれ腫瘍細胞が分泌する血管内皮増殖因子 (VEGF) および血小板由来増殖因子 (PDGF) が結合することで自己リン酸化し、シグナル伝達を活性化させる。ヒト医療においては抗 VEGF モノクローナル抗体であるベバシズマブは大腸がん、非小細胞肺癌、子宮頸がん、卵巣がんの治療薬として承認されており、VEGFR2 と PDGFR を主な標的とするスニチニブとソラフェニブは腎細胞癌や肝細胞癌の治療薬として承認されていることから、VEGFR2 および PDGFR シグナルを標的とした阻害剤は特に上皮系腫瘍で効果が認められていることが分かる。また、獣医療においても、トセラニブはイヌの間葉系腫瘍よりも上皮系腫瘍において効果が高い傾向にある [Choi et al., 2021, London et al., 2012, London et al., 2003]。これらのことから、上皮系腫瘍と間葉系腫瘍の間に VEGFR2 および PDGFR シグナルに関してトセラニブの治療効果に影響を及ぼしうる何らかの差異があると考えられるが、上皮系腫瘍と間葉系腫瘍における VEGFR2 および PDGFR シグナルに関する比較検討についてはこれまでに報告されていない。上皮系腫瘍と間葉系腫瘍における VEGFR2 および PDGFR シグナルについての差異を突き止めることができれば、トセラニブの治療効果に影響を及ぼす因子の解明の一助となると考えられる。

VEGFR2 は従来血管内皮細胞に発現するとされていたが、腫瘍細胞にも発現することが報告されている [Devery et al., 2015, Hocker et al., 2017, Koltai et al., 2018, Liang et al., 2006, Masood et al., 2001, Walters et al., 2018]。ヒトの様々な腫瘍では腫瘍細胞が分泌する VEGF が腫瘍細胞自身の VEGFR2 に作用しオートクリンループを

形成することで腫瘍細胞の増殖や分化に関与することが報告されており [Adamcic et al., 2012, Aesoy et al., 2008, Alvarez et al., 2006, Devery et al., 2015, Heldin and Westermark, 1999, Knizetova et al., 2008, Östman and Heldin, 2007]、さらに VEGFR2 阻害剤が腫瘍細胞の VEGFR2 を阻害することで増殖抑制やアポトーシスを誘導することが示されている [Devery et al., 2015, Liang et al., 2006, Masood et al., 2001]。PDGFR も従来、血管周皮細胞などの間質細胞に広く発現すると考えられていたが、腫瘍細胞にも発現しその増殖および生存に重要であると報告されている [Alvarez et al., 2006, Heldin and Westermark, 1999, Östman and Heldin, 2007]。イヌの腫瘍細胞においても VEGFR2 [Brown et al., 2012, Hocker et al., 2017, Koltai et al., 2018, Maniscalco et al., 2013, Milovancev et al., 2016, Urie et al., 2012, Walters et al., 2018] や PDGFR [Brown et al., 2012, Hocker et al., 2017, Maniscalco et al., 2013, Milovancev et al., 2016, Urie et al., 2012] の発現が認められているものの、イヌの腫瘍細胞における VEGFR2 や PDGFR の腫瘍細胞の増殖や生存などに関する機能は不明である。これらのことから、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も検討する必要があると考えられる。

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 章ではイヌの腫瘍組織を用い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。第 2 章ではイヌの上皮系および間葉系腫瘍で VEGF/VEGFR2 シグナルの比較解析を行った。第 3 章では、第 2 章において腫瘍細胞におけるリン酸化 VEGFR2 (pVEGFR2) が腫瘍細胞増殖の促進およびトセラニブの効果に影響していることが示唆されたことをふまえ、イヌ乳腺腫瘍細胞株を用いて pVEGFR2 量と細胞増殖率およびトセラニブの効果との関連について検討した。第 4 章では第 2・3 章における結果をふまえ、イヌの上皮系および間葉

系腫瘍におけるリン酸化 PDGFR (pPDGFR) と腫瘍細胞増殖の関連について比較検討した。

## 第 1 章

イヌの腫瘍における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法の構築

## 1. 小 緒

血管新生は腫瘍の成長と転移に重要であり、一般的に腫瘍の悪性度や予後と関連していると言われている [Weidner, 1995]。代表的な血管新生の評価法として、血管内皮マーカーを用いた免疫組織化学により腫瘍内の MVD を算出する方法がある。MVD は実際に様々な腫瘍の悪性度や予後の指標として有用であると報告されていることから [He et al., 2015, Muhammadnejad et al., 2013, Weidner et al., 1991]、信頼性の高い評価法であると考えられる。また、血管新生阻害療法により MVD が減少することがヒトの膠芽腫において報告されていることから [Yamamoto et al., 2017]、血管新生阻害療法の治療効果判定にも有用である可能性が示唆されている。しかしながら、著者が知る限り MVD の評価が血管新生阻害療法の効果判定として有用であるとの報告は今のところ存在しない。その原因として、MVD の評価は生体に対して侵襲性の高い採材法を必要とすることや主観的評価であること、および使用する血管内皮マーカーの違いにより結果に差が生じることが挙げられる。

MVD は病理組織学的な評価法であることから、腫瘍組織の切除が必要となる。そのため、生体に対して侵襲性が高く臨床現場で容易に評価することができないことから、治療中に MVD を繰り返し評価することは困難である。また、MVD は評価者の主観に影響されやすい。MVD の評価法には Weidner らが考案した hotspot 法 [Weidner et al., 1991] が主に用いられる。hotspot 法とは、光学顕微鏡下にて低倍率で組織切片全体を観察し、最も血管密度が多い部分 (hotspot) において高倍率視野での血管数を数える方法であり、多くの研究で用いられている [Cao et al., 2013, Diessler et al., 2017, Joo et al., 2004, Lavallo et al., 2009, Shen et al., 2000]。しかし、Sprindzuk ら [Sprindzuk et al., 2009] はこの hotspot を探す過程が最も主観的であると指摘しており、実際にヒトの卵巣がんにおいて MVD と生存期間の相関性について矛盾した結



果が報告されている [Chan et al., 2005, Shen et al., 2000]。さらに、用いる血管内皮マーカーの種類の違いも MVD の結果に影響するといわれている [He et al., 2015]。血管内皮マーカーには von Willebrand factor (vWF)、CD31 および CD34 などが広く用いられているが、これらは汎血管内皮マーカーであり、増殖活性のない既存の血管にも発現している。一方、ヒト医療においては活性化内皮マーカーとして endoglin (CD105) の有用性が報告されている。endoglin は増殖活性を示す血管内皮に発現しており、腫瘍組織において腫瘍血管に選択的に発現しているため [Afshar Moghaddam et al., 2015, Burrows et al., 1995, Li et al., 2003]、汎血管内皮マーカーを用いた MVD よりも endoglin を用いた MVD の方がより正確に予後や腫瘍の進行を反映すると報告されている [Akagi et al., 2002, Brewer et al., 2000]。イヌの乳腺腫瘍において、抗 endoglin 抗体が腫瘍内の活性化した血管内皮細胞を検出し固形がんの生体イメージングに有用であるとの報告が存在するが [Fonsatti et al., 2000]、血管新生評価法としての有用性は獣医療においては報告されていない。

そこで本研究では、vWF および endoglin 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法を確立するとともに、イヌの腫瘍における endoglin の血管新生評価としての有用性を検討することを目的とした。まず、様々な種類のイヌの腫瘍組織を用いて real-time RT-PCR により vWF と endoglin の mRNA 発現量を測定し、それらと MVD との相関性を調べた。次に、vWF および endoglin の mRNA 発現量と血管新生関連因子である VEGF および VEGFR2 の mRNA 発現量との相関性を比較し、さらに増殖活性の指標である抗増殖細胞核抗原 (PCNA) 抗体を用いた免疫組織化学により PCNA に陽性を示す核を持つ血管の割合と endoglin の mRNA 発現量との相関性を解析した。最後に、繰り返し可能な採材法である FNA により得られたサンプルにおける mRNA 発現量と腫瘍組織における mRNA 発現量の一致度を評価した。

## 2. 材料と方法

### 1. 症例および検体

2017 年から 2019 年までに岩手大学動物病院にて外科的切除により腫瘍を摘出された様々な種類の腫瘍罹患犬 51 頭を対象とした。犬種、年齢、性別などの一般的な情報はカルテから収集した。摘出された腫瘍組織から得られた 48 検体をそれぞれ組織学的検索用と遺伝子学的検索用に分割した。また、腫瘍組織 20 検体から 23G の針を使用して FNA による採材を実施し、それぞれの組織検体からの FNA サンプルを得た。組織学的検索用のサンプルは 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、遺伝子学的検索用のサンプルは TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) を加えて -80°C で保存し、それぞれの検索に使用した。

### 2. 組織学的検索

採材した組織を 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定後、常法に従いパラフィン包埋を行い、3 μm の厚さで薄切し、剥離防止用スライドガラスに貼付し、伸展盤上にて 24 時間以上乾燥させた標本を作製した。作製した標本はヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色および免疫組織化学を行い、組織学的検索に供した。

#### (1) H.E.染色法による病理組織学的診断

病理組織学的診断を目的に、H.E.染色を行った。まず、切片をキシレンに 5 分×2 回静置し脱パラフィンを行った。次に 99%、85%、75%エタノール溶液の順に 2 分ずつ静置し水和した。流水にて 5 分洗浄し、Reverse Osmosis (RO) 水に 1 分静置した後、ヘマトキシリン液に 3 分間浸した。流水にて 10 分洗浄し、RO 水に 5 分静置した後、75%、85%エタノール溶液の順に 2 分ずつ静置し、エオジン液に 1 分間浸し

た。100%エタノール液に2分×2回静置した後、キシレンに5分×2回浸し、封入した。作製したH.E.染色切片を用い、各腫瘍組織についてWHOの診断基準に従って病理組織学的に診断した。各腫瘍の発生組織と診断名は表1-1に示した。

## (2) 免疫組織化学

血管内皮細胞の同定として、抗vWF抗体による免疫組織化学を行った。一次抗体は、ウサギ抗ヒトvWFポリクローナル抗体(abcam, Cambridge, UK)を使用し、EnVision+System-HRP(Dako, Glostrup, Denmark)を用いた酵素標識ポリマー法により行った。まず、切片をキシレンに5分×2回静置し脱パラフィンを行った。次に99%エタノール溶液に2回、85%、75%エタノール溶液の順に2分ずつ静置し親水化を行った後、流水にて10分洗浄し、RO水に5分静置した。湿潤箱にて内因性ペルオキシダーゼのブロッキング試薬を室温で10分間反応させた後、Phosphate Buffered Saline(-)(PBS、pH 7.4)で5分×3回洗浄した。抗体希釈液(Dako)を用いて4,000倍に希釈した抗ヒトvWF抗体を一次抗体として用いて、4°Cで一晩反応させた。ネガティブコントロールには抗vWF抗体の代わりに正常ウサギIgG抗体(Cell Signaling Technology, Denver, MA, US)を用いた。PBSで5分×3回洗浄した後、EnVisionポリマー試薬を室温で30分間反応させた。PBSで5分×3回洗浄した後、顕微鏡下で確認しながら3,3'-Diaminobenzidine(DAB)により発色させた。流水で10分洗浄し、RO水に1分静置した後、ヘマトキシリン液に30秒静置することで対比染色し、流水で10分洗浄し、RO水に5分静置した。75%、85%、99%(2回)エタノール溶液の順に2分ずつ静置して脱水した後、キシレンに5分×3回静置し、封入した。光学顕微鏡下で褐色を呈したものを陽性とした。

### (3) MVD の評価

染色強度に関わらず、抗 vWF 抗体に陽性を示した細胞で管腔構造をつくるものを血管とした。微小血管密度の評価は Weidner らの方法[Weidner et al., 1991]に準じて以下の方法で行った。光学顕微鏡下で低倍率（×40）にて微小血管の多い領域（hot spot）を探し、hot spot における高倍率（×400）10 視野での血管数を数え、その平均値を MVD とした。MVD の評価は日本獣医病理学専門家協会会員である佐藤洋博士（岩手大学）の指導のもと実施した。

### (4) 免疫二重蛍光抗体法

血管内皮細胞の増殖活性を評価するため、vWF と PCNA の二重染色を行った。抗体は、ウサギ抗ヒト vWF ポリクローナル抗体およびマウス抗ヒト PCNA モノクローナル抗体（Dako）を用いた。蛍光標識二次抗体には VectaFluor™ Duet Double Labeling Kit（Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, US）を用いて添付プロトコールに従って行った。前述のように脱パラフィン、親水化を行った後、2.5%正常ウマ血清にて湿潤箱内で 20 分間ブロッキングを行った。その後、一次抗体として 400 倍希釈した抗 vWF 抗体と 200 倍希釈した抗 PCNA 抗体のカクテルを湿潤箱内において 4°Cで一晩反応させた。PBS で 5 分×2 回洗浄した後、VectaFluor Duet 試薬 [DyLight® 488 Anti-Rabbit IgG (Green)、DyLight® 594 Anti-Mouse IgG (Red)] を遮光下にて室温で 30 分間反応させた。PBS で 5 分×2 回洗浄し、VECTASHIELD® HardSet™ Antifade Mounting Medium with DAPI（Vector Laboratories, Inc.）で核染色および封入を行った。

### (5) PCNA 陽性血管率の算出

(4) で作製した切片を共焦点レーザー顕微鏡[ECLIPSE Ti, (Nikon, Tokyo, Japan)]

を用いて観察した。管腔があり血管内皮細胞の核が1つ以上見られるものを血管とし、そのうち1つでも PCNA 陽性核があれば PCNA 陽性血管とした (図 1-1)。切片の全体を低倍率 (×100) で観察し、ランダムに選んだ視野において、高倍率 (×400) で血管 100 個中の PCNA 陽性血管の割合を求めた。

### 3. 遺伝子学的検索

#### (1) total RNA の抽出

遺伝子学的検索用に採材したサンプルから、TRIzol® Reagent を用いて、添付のプロトコールを一部改変し、以下の手順で total RNA を抽出した。まず、500 µL の TRIzol® 試薬を用いてサンプルをホモジナイズし、上清を回収して TRIzol® Reagent を 500 µL 加えた。その後、室温で 5 分間静置し、クロロホルム 0.2 mL を加え、ボルテックスミキサーで十分に攪拌した。さらに 5 分間室温静置した後、4°C で 15 分間、12,000×g で遠心し、水相を回収してイソプロピルアルコールを 0.5 mL 加えて転倒混和した。室温で 10 分間静置した後、4°C で 10 分間、12,000×g で遠心した。RNA の沈殿物がチューブの側面および底面にゲル状ペレットとして確認できるので、上清を除去し、ペレットを洗浄する目的で 75%エタノールを 1 mL 加えて 4°C、12,000×g で 5 分間遠心した後、再び上清を除去した。ここで RNA ペレットを保存する場合は、75%エタノールを 1 mL 加えて -80°C で保存した。すぐに DNase 処理を行う場合は、RNA ペレットを溶解させるために、ペレットが半透明になるまで乾燥させ、ペレットの大きさに応じて Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水を加えて溶解させた。

#### (2) total RNA の精製

抽出した total RNA は RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, WI, US) を用いて、添付プロトコールに従って DNase 処理した。まず、total RNA の濃度を

NanoDrop 2000c 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) を用いて 260 nm の吸光度にて計測した。次に、total RNA が 7 µg 以上となるようにサンプルを量り取り、RNA RQ1 RNase-Free DNase 1 U/µg、RQ1 RNase-Free DNase 10× Reaction Buffer 2 µL を加え、全量が 20 µL となるように DEPC 処理水を加えて反応液を調整した。反応には T100™ サーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, US) を用い、37°C で 30 分間インキュベートした。反応後は TRIzol® Reagent を 100 µL 加え、3) - 1. と同様の手順で total RNA の再抽出を行い、精製 total RNA を得た。ただし、液量はすべて 10 分の 1 とした。逆転写反応に供するまで -40°C で保存した。

### (3) cDNA の作製

精製した total RNA を High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, US) を用いて、添付プロトコールに従って以下の手順で逆転写反応させ、cDNA を作製した。まず、サンプルの上清を除去した後、RNA ペレットを半透明になるまで風乾させ、10 µL の DEPC 処理水に溶解した。次に、total RNA の濃度を NanoDrop 2000c 分光光度計を用いて 260 nm の吸光度にて計測した。total RNA 2 µg に対し 2×RT Buffer 10 µL、20×Enzyme Mix 1 µL を加え、全量 20 µL となるように DEPC 処理水を加えて反応液を調整し、T100™ サーマルサイクラーを用い、37°C で 60 分間、95°C で 5 分間反応させた。反応後のサンプルは real-time PCR 法に供するまで -40°C で保存した。

### (4) プライマー設計

本実験で使用したプライマーの塩基配列とその増幅産物長は表 1-2 に示した。vWF、VEGF、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) および ribosomal

protein L19 (RPL19) の塩基配列はそれぞれ先行研究を参考に設計した [Chi et al., 2011, Jais et al., 2011, Pessina et al., 2012]。endoglin および VEGFR2 プライマー設計ソフトウェアである Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) を用いて設計した。

#### (5) real-time PCR

Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いたインターカレーター法にて、以下の手順で real-time PCR を行った。各サンプルは Duplicate で測定した。添付プロトコールに従って、real-time PCR 用 96 穴プレート (Sorenson BioScience, Salt Lake City, Utah, USA) に、DEPC 滅菌処理水で 150 倍に希釈した逆転写反応産物 5  $\mu$ L、Power SYBR Green PCR Master Mix (2 $\times$ ) 25  $\mu$ L、0.4  $\mu$ M Forward/Reverse プライマー 2 $\mu$ L、Nuclease-free water 16 $\mu$ L を加え、1well あたり全量が 25  $\mu$ L になるように Duplicate した。real-time PCR には Step One Plus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を使用し、95°C10 分間反応後、95°C15 秒、60°C60 秒を 40 サイクル反応させた。さらに、目的の PCR が特異的に行われていることを melting curve 解析にて確認した。解析は検量線を用いた相対定量法によって行い、ハウスキーピング遺伝子は Bestkeeper ソフトウェアを用いてピアソン相関係数 (r) を算出することで GAPDH と RPL19 のうち発現量が最も安定しているものに決定した。

#### 4. 統計解析

MVD、血管内皮マーカーと血管新生関連因子の mRNA 発現量および PCNA 陽性血管率の相関性はいずれもスピアマンの順位相関係数を用いて分析し、 $P < 0.05$  を有意差ありとし、相関係数の基準は  $< 0.2$  : poor、 $0.2 \sim 0.4$  : fair、 $0.4 \sim 0.6$  :

moderate、0.6～0.8 : strong、0.8～1.0 : very strong とした。組織サンプルと FNA サンプルの mRNA 発現量の一致性については、Bland-Altman 分析およびスピアマンの順位相関係数を用いた。すべての統計解析は GraphPad Prism® program (version 8.0 ; GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA) を用いて実施した。



### 3. 結 果

#### 1. 抗 vWF 抗体による免疫組織化学

すべての組織において血管内皮細胞は抗 vWF 抗体に陽性を示した (図 1-2)。また、リンパ管内皮細胞、毛細血管細胞、肝臓の類洞様内皮細胞は抗 vWF 抗体に弱陽性を示した。起源の特定できない肉腫の腫瘍細胞は抗 vWF 抗体に対して陰性であったことから、血管内皮細胞由来の腫瘍ではないことが示された。

#### 2. MVD、血管内皮マーカーと血管新生関連因子の mRNA 発現量および PCNA 陽性血管率の相関性

Bestkeeper 解析の結果、GAPDH ( $r = 0.956$ ,  $P = 0.001$ ) は RPL19 ( $r = 0.954$ ,  $P = 0.001$ ) に比べて安定した遺伝子であることが示された。そのため、各サンプルの mRNA 発現量は GAPDH の mRNA 発現量で標準化した。MVD は vWF ( $P < 0.05$ ,  $R_s = 0.364$ ; 図 1-3a) および VEGFR2 ( $P < 0.01$ ,  $R_s = 0.288$ ; 図 1-3c) の mRNA 発現量と弱い正の相関を示し、endoglin の mRNA 発現量と中等度の正の相関を示した ( $P < 0.01$ ,  $R_s = 0.472$ ; 図 1-3b)。MVD と VEGF の mRNA 発現量の間には相関性は認められなかった ( $P = 0.467$ ; 図 1-3d)。vWF と endoglin の mRNA 発現量は中等度の正の相関を示した ( $P < 0.01$ ,  $R_s = 0.467$ ; 図 1-4)。VEGFR2 の mRNA 発現量は vWF の mRNA 発現量と中等度の正の相関を示し ( $P < 0.01$ ,  $R_s = 0.512$ ; 図 1-5a)、endoglin の mRNA 発現量と強い正の相関を示した ( $P < 0.01$ ,  $R_s = 0.649$ ; 図 1-5b)。VEGF の mRNA 発現量は vWF ( $P = 0.419$ ; 図 1-5c) および endoglin ( $P = 0.065$ ; 図 1-5d) の mRNA 発現量のいずれとも相関しなかった。PCNA 陽性血管率は vWF ( $P = 0.066$ ; 図 1-6a) および endoglin ( $P = 0.124$ ; 図 1-6b) の mRNA 発現量のいずれとも相関しなかった。

### 3. 組織サンプルと FNA サンプルの mRNA 発現量の相関性および一致度

組織サンプルと FNA サンプル間における endoglin および VEGFR2 の mRNA 発現量の相関性と一致性を解析した。2 種類のサンプル間で endoglin の mRNA 発現量は強い正の相関を示し ( $P < 0.01$ ,  $R_s = 0.690$ ; 図 1-7a)、VEGFR2 の mRNA 発現量はとても強い正の相関を示した ( $P < 0.01$ ,  $R_s = 0.881$ ; 図 1-7b)。endoglin の mRNA 発現量について、比例誤差が認められたが有意ではなかった ( $P = 0.879$ )。endoglin の mRNA 発現量の bias は 0.453 であり、許容範囲 (limit of agreement; LOA) 上限は 2.26 (mean + 1.96 SD)、LOA 下限は -1.35 (mean - 1.96 SD) であった (図 1-8a)。VEGFR2 の mRNA 発現量について、系統誤差は認められなかった。VEGFR2 の mRNA 発現量の bias は 5.28 であり、LOA 上限は 31.2 (mean + 1.96 SD)、LOA 下限は -20.6 (mean - 1.96 SD) であった (図 1-8b)。endoglin で 10% (2/20)、VEGFR2 で 5% (1/20) のサンプルが LOA 上限を超えた。

## 4. 考 察

イヌの腫瘍において vWF および endoglin の mRNA の定量により低侵襲で繰り返し可能な血管新生評価が可能であることを明らかにした。さらに、endoglin の mRNA 発現量は vWF の mRNA 発現量よりも血管新生評価に有用である可能性を示した。

血管新生評価のツールとしての vWF の mRNA の定量の客観性や正確性については、ヒトにおける報告からも裏付けられる [Zanetta et al., 2000]。同研究では、VEGF や線維芽細胞成長因子-2 が血管内皮マーカーの蛋白質だけでなく mRNA 発現量の増加も誘導することが示されており、さらにヒトの直腸がんの組織において血管内皮マーカーの mRNA 発現量が MVD よりも正確に血管新生を評価している可能性が示唆されている。このように、ヒトにおいては血管内皮マーカーの mRNA の定量による血管新生評価法の可能性について報告されている。獣医療においては血管内皮マーカーの mRNA 発現量と MVD の相関性について言及した報告は著者の知る限り本研究が初めてであり、イヌの腫瘍においても血管内皮マーカーの mRNA の定量により血管新生評価が可能であることが示された。

イヌの腫瘍における endoglin に関する研究では、endoglin のタンパク質発現についての報告は少数あるものの [Fonsatti et al., 2000, Fosmire et al., 2004]、mRNA 発現量についての報告は著者の知る限り本研究が初めてである。本研究において、vWF に比べて endoglin の mRNA 発現量の方が MVD や VEGFR2 の mRNA 発現量と強く相関していたことから、イヌ腫瘍において endoglin が転写レベルで調節されている可能性が示され、さらに活性化内皮マーカーとして有用である可能性が考えられた。

しかしながら、本研究では PCNA 陽性血管率と endoglin の間に相関性は認められなかった。ヒトの気管支がんにおいても、endoglin のタンパク質発現と PCNA 陽性血管率を比較して同様の結果が報告されている [Miller et al., 1999]。この原因の一つ

として、PCNA の生物学的半減期が考えられる。組織内での PCNA 蛋白質の半減期が少なくとも 20 時間以上であるため、細胞周期が終わった細胞内の核内にも PCNA 蛋白質が発現していることが分かっている [Scott et al., 1991]。また、増殖因子や DNA の損傷に対する反応として細胞周期にない状態でも PCNA 発現が誘導されるといわれている [Bologna-Molina et al., 2013, Maga and Hubscher, 2003]。よって、本研究では増殖活性がないにも関わらず PCNA の発現が認められる核をもつ血管を PCNA 陽性血管としてカウントしていた可能性が考えられた。PCNA 以外の細胞増殖マーカーとしては ki-67 が知られており、ki-67 は様々な腫瘍の増殖活性において PCNA よりも感度と特異度が高いと報告されている [Bologna-Molina et al., 2013, Oka et al., 2011]。そのため、endoglin の血管新生評価としての有用性をさらに追求するためには、ki-67 を用いた検討が必要であると考えられる。

本研究では VEGF の mRNA 発現量と血管内皮マーカーの mRNA 発現量の間に関係性が認められなかったのに対し、VEGFR2 の mRNA 発現量と血管内皮マーカーの mRNA 発現量は正の相関を示した。ヒトの重度肺高血圧症の叢状病変における血管内皮細胞では VEGF および VEGFR2 が蛋白質レベルと mRNA レベルの両方で高発現しているとの報告 [Tuder et al., 2001] があり、これらの血管新生関連因子は転写レベルで調節されていることが示されている。したがって、本研究においても VEGF や VEGFR2 の mRNA 発現量はこれらのタンパク質量を反映していると考えられ、イヌの腫瘍において VEGF よりも VEGFR2 の発現が血管新生の調節に重要であることが示唆された。

本研究では VEGF および VEGFR2 の mRNA 発現量と MVD との間には相関性が認められなかった。ヒトの食道がん、直腸がん、胃がんおよび乳がんでは、MVD と VEGF や VEGFR2 が蛋白質レベルで正の相関を示しており [Du et al., 2003, Maeda et al., 1996, Takahashi et al., 1995, Toi et al., 1994]、非小細胞性肺癌では VEGF の

mRNA 発現量が MVD と正の相関を示すとの報告がある [Yuan et al., 2000]。イヌの肥満細胞腫においても VEGF の蛋白質発現量が MVD を反映するとの報告があり [Patruno et al., 2009]、VEGF や VEGFR2 が蛋白質および mRNA レベルで MVD と相関していることが多くの研究で報告されている。一方で、本研究のようにヒトの卵巣がんにおいて VEGF の蛋白質発現量と mRNA 発現量のいずれも MVD と相関が認められなかった報告 [Patruno et al., 2009] や、イヌの扁平上皮癌と毛包上皮腫において VEGF および VEGFR2 のタンパク発現量が MVD と相関していなかったという報告 [Al-Dissi et al., 2007] も存在している。このように VEGF や VEGFR2 の発現量と MVD との相関性についての結果が異なる原因の 1 つとして、MVD の評価法の主観的な側面が考えられる。本研究において MVD ではなく血管内皮マーカーの mRNA 発現量が VEGFR2 の mRNA 発現量と正の相関を示したことからも、MVD よりも血管内皮マーカー の mRNA の定量の方が血管新生評価に正確である可能性が考えられた。

ヒトの直腸がんにおいて endoglin は線維芽細胞に発現していたことが報告されており [Paauwe et al., 2018]、様々なイヌの腫瘍では VEGFR2 が腫瘍細胞にも発現していることがわかっている [Al-Dissi et al., 2007, Rawlings et al., 2003, Restucci et al., 2004]。したがって、本研究では血管内皮細胞に発現している endoglin や VEGFR2 のみを捉えることができていない可能性が考えられた。しかし、本研究における endoglin や VEGFR2 の mRNA 発現量は MVD や vWF の mRNA 発現量などの他の血管新生の指標と正の相関性を示していたことから、血管内皮細胞以外に発現しているこれらの影響は小さいと考えられた。

本研究において、臨床現場で生体に対して低侵襲で繰り返し可能な mRNA の採材法として FNA を検討した。ヒトの甲状腺がんでは、FNA サンプル中のがん遺伝子の mRNA 発現量の測定が良性と悪性に分類するのに有用であると報告されており [Jin et

al., 2011]、イヌの乳腺腫瘍においても針生検サンプル中の腫瘍マーカーの mRNA 発現量が悪性度の判定に有用であることが示されている [Komatsu et al., 2012]。また、ヒトの非小細胞肺癌において FNA により得られた programmed cell death 1 - ligand 1 (PD-L1) の mRNA 発現量と免疫組織化学による PD-L1 の発現量が高い一致度を示したとの報告がある [Erber et al., 2017]。さらに、ヒトの腎臓においては FNA とコア針生検サンプル中に含まれる遺伝子情報が一致していたことから、FNA による遺伝子発現のモニターの可能性が報告されている [Eikrem et al., 2018]。このように、FNA による採材サンプル中の遺伝子学的解析結果を臨床応用しようとする試みは複数の研究でなされている。しかし、外科的に切除された腫瘍組織と FNA サンプルの mRNA 発現量の一致度を評価した報告は著者の知る限り本研究が初めてであり、本研究により FNA により繰り返し血管新生評価ができる可能性が示された。

しかし、FNA による血管新生評価を臨床応用するには注意すべき点が 2 つある。まず 1 つに、本研究の結果からも示されているように、組織と FNA サンプルの mRNA 発現量は完全に一致するわけではない。したがって、繰り返し評価する際には用いるサンプルを組織か FNA サンプルかのどちらかに統一する必要があると考えられる。次に、腫瘍組織は均一な構造をとっているわけではないことに留意すべきである。例えば、血管新生は腫瘍組織の辺縁部で盛んであることが知られており [Miller et al., 1999]、組織中には壊死組織や炎症組織が含まれている可能性も考えられる。したがって、様々な方向から角度を変えて複数回採材することで、サンプル中の構成細胞を採材ごとに平均化させる必要がある。また、超音波ガイド下で明らかな壊死巣を回避したり、採材したサンプルの細胞診を実施し構成細胞を確認したりすることで、安定した採材が可能になると考えられる。

本研究の制限として、サンプル数の少なさから腫瘍の種類ごとの統計解析を実施することができなかった。腫瘍が発生した組織や悪性度によって血管内皮マーカーや血

管新生関連因子の相関性が異なる可能性も考えられるため、今後はサンプル数を増やしてさらなる検討が必要であると考えられる。

以上のことから、本研究ではイヌの腫瘍において血管内皮マーカーの mRNA の定量による低侵襲で繰り返し可能な血管新生評価が可能であり、特に endoglin が血管新生評価により有用である可能性が示された。今後は実際にトセラニブの治療効果と比較していくことで治療効果判定法としての有用性を検討していく必要がある。

表 1 - 1. 腫瘍の種類

発生組織	診断名	n	発生組織	診断名	n
肺	腺癌	2	膀胱	移行上皮癌	1
	組織球性肉腫	1		起源の特定できない肉腫	2
口腔	扁平上皮癌	3	精巣	セルトリ細胞腫	1
	棘細胞性エナメル上皮腫	1	陰	線維腫	1
	悪性黒色腫	2		平滑筋腫	1
	末梢性歯原性線維腫	2	副腎	副腎皮質腺癌	1
	線維肉腫	1	四肢	骨肉腫	2
	骨肉腫	1		未分化肉腫	1
腸	神経内分泌腫瘍	1	皮下	肛門周囲腺腫	6
	腺癌	3		毛包上皮腫	1
	消化管間質腫瘍	2		メラノサイトーマ	1
肝臓	肝細胞癌	6		肥満細胞腫	1
	肝細胞腺腫	1		軟部組織肉腫	1
	組織球性肉腫	2	乳腺	単純腺腫	1
腎臓	腎細胞癌	2		複合腺腫	8
脾臓	血管肉腫	3		混合腺腫	1
				扁平上皮癌	1



表 1 - 2. プライマー配列

遺伝子	アクセッション番号	方向	塩基配列 (5'-3')	増幅産物 (bp)
vWF	NM_001002932	Forward	CCC AGT GCT CCC AGA AGC CCT	130
		Reverse	TCG CCC CGT GGT GAA CCG AT	
endoglin	XM_005625330	Forward	TCC AAG CAA AAT GGC ACT CG	122
		Reverse	ATC AGT TTG GGG TTG AAG GC	
VEGF	XM_025418882.1	Forward	CAC TGA GGA GTT CAA CAT CAC	92
		Reverse	TGC TAT GCT GCA GGA AAC TC	
VEGFR2	XM_025435574.1	Forward	TCT TTT GGT GTC TTG CTC TGG	104
		Reverse	CTG GTG CCT TCT TTC AAT CG	
GAPDH	NM_001003142.2	Forward	AGT ATG ATT CTA CCC ACG GCA AA	146
		Reverse	CAC AAC ATA CTC AGC ACC AGC AT	
RPL19	AY158223	Forward	CCA ATG AGA CCA ATG AAA TC	60
		Reverse	GCC CAT CTT TGA TCA GCT T	

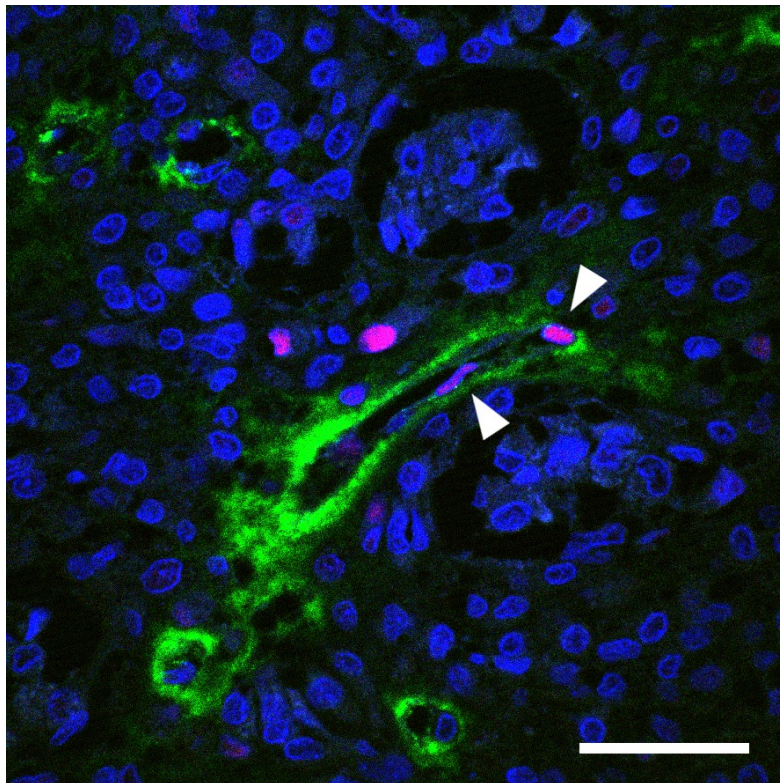


図1 - 1. 抗vWF抗体および抗PCNA抗体による免疫二重  
蛍光染色を施したイヌの悪性黒色腫 (bar; 40  $\mu$ m)  
核は青色、vWF陽性血管内皮細胞は緑色、PCNA陽性核は  
赤色を呈した。矢頭は血管内皮細胞のPCNA陽性核を示す。

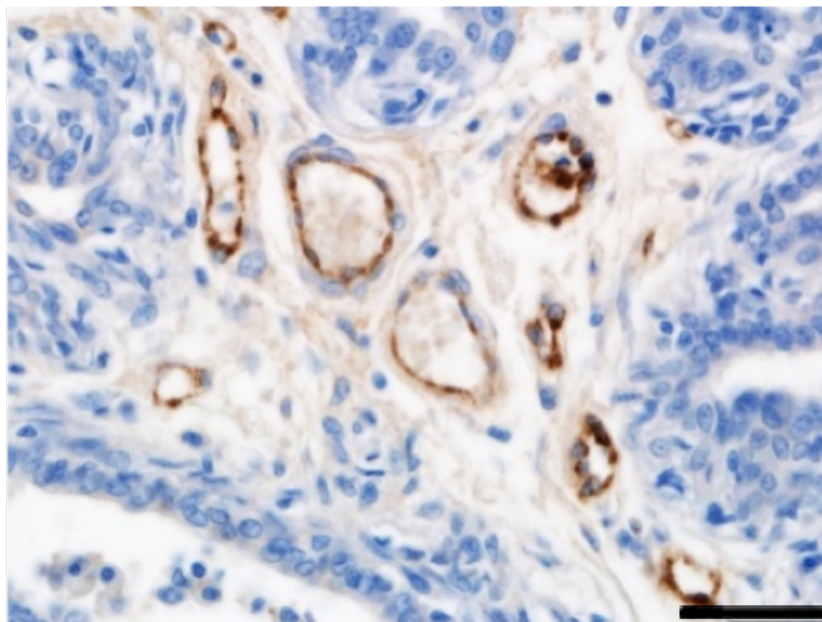


図1-2. 抗vWF抗体による免疫組織化学を施したイヌの乳腺腫瘍 (bar; 40  $\mu\text{m}$ )  
対比染色はヘマトキシリン (青色) にて実施した。

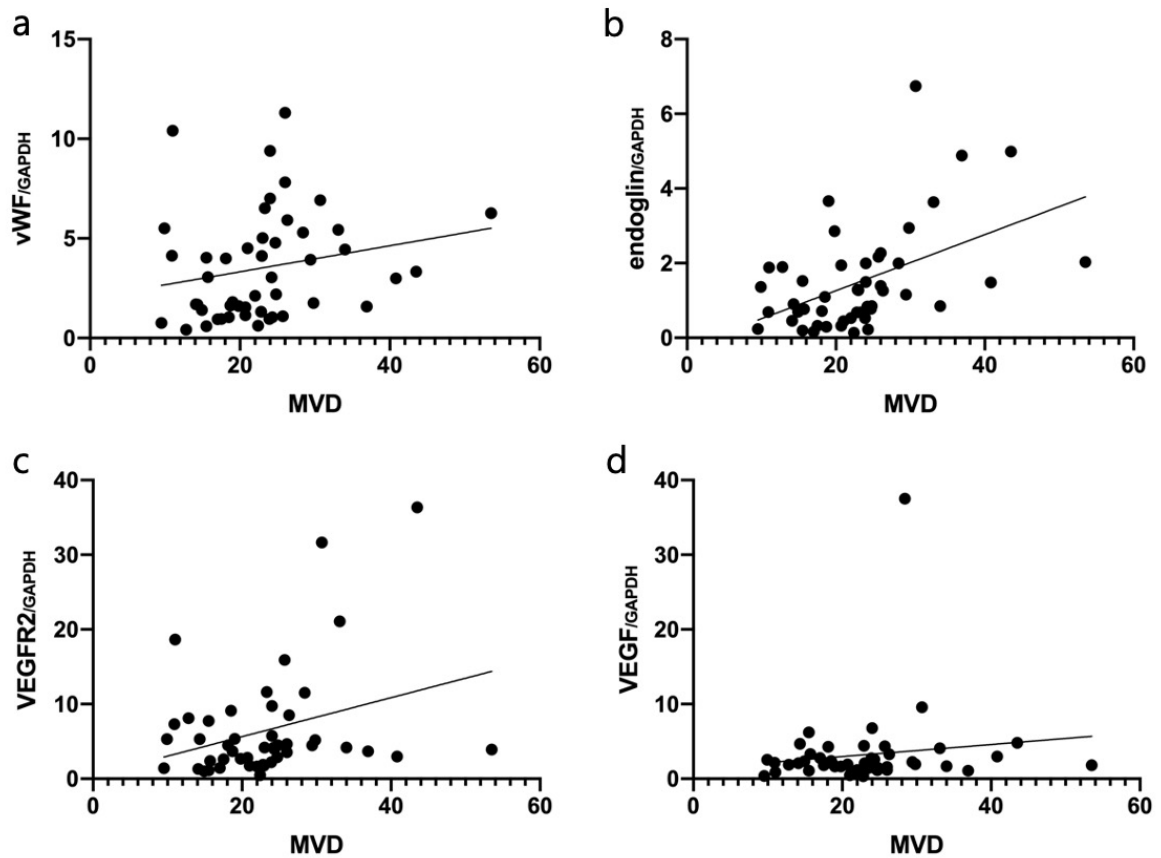


図1-3. MVDと(a)vWF ( $P < 0.05$ ,  $R_s = 0.364$ )、(b)endoglin ( $P < 0.01$ ,  $R_s = 0.472$ )、(c)VEGFR2 ( $P < 0.05$ ,  $R_s = 0.288$ ) および(d)VEGF ( $P = 0.467$ ) の mRNA発現量の相関性

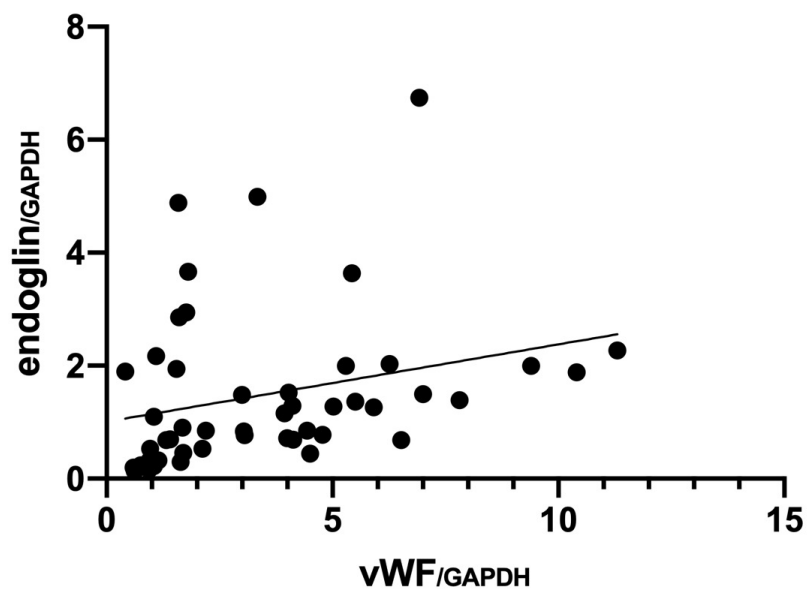


図1 - 4. vWFおよびendoglinのmRNA発現量の相関性 ( $P < 0.01$ ,  $R_s = 0.467$ )

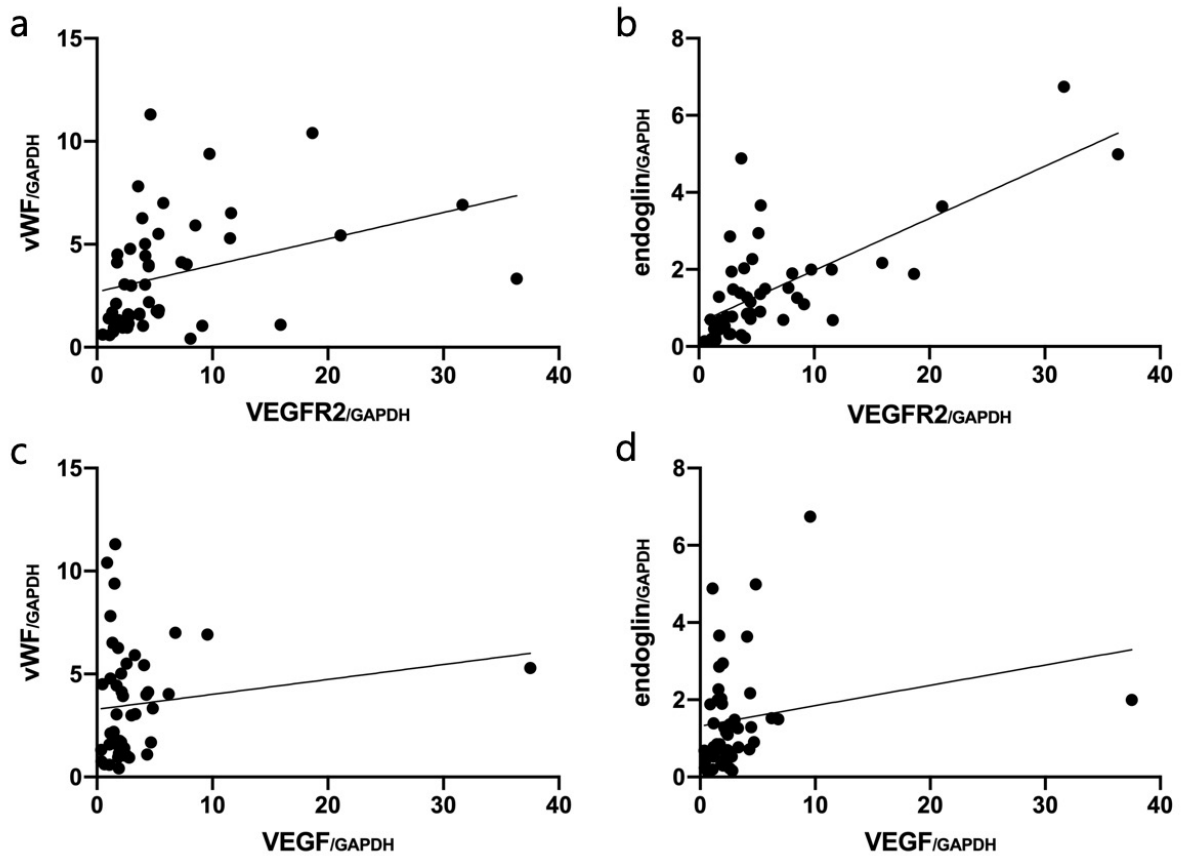


図1-5. 血管新生関連因子と血管内皮マーカーのmRNA発現量の相関性  
 (a)VEGFR2とvWF ( $P < 0.01$ ,  $R_s = 0.512$ ) (b)VEGFR2とendoglin ( $P < 0.01$ ,  $R_s = 0.649$ )、(c)VEGFとvWF ( $P = 0.419$ ) (d)VEGFとendoglin ( $P = 0.065$ )

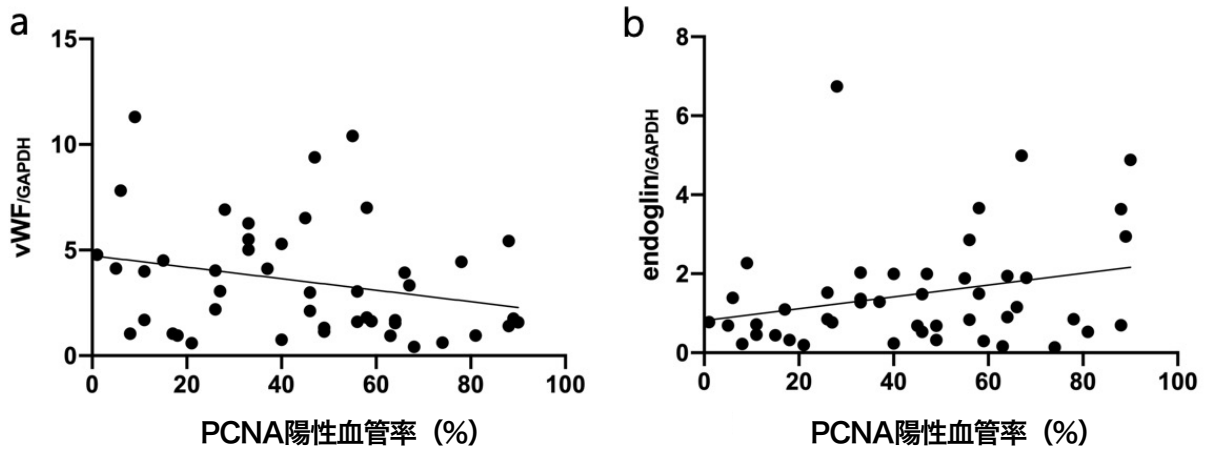


図1-6. PCNA陽性血管率と(a)vWF ( $P = 0.066$ ) および(b)endoglin ( $P = 0.124$ ) のmRNA発現量の相関性

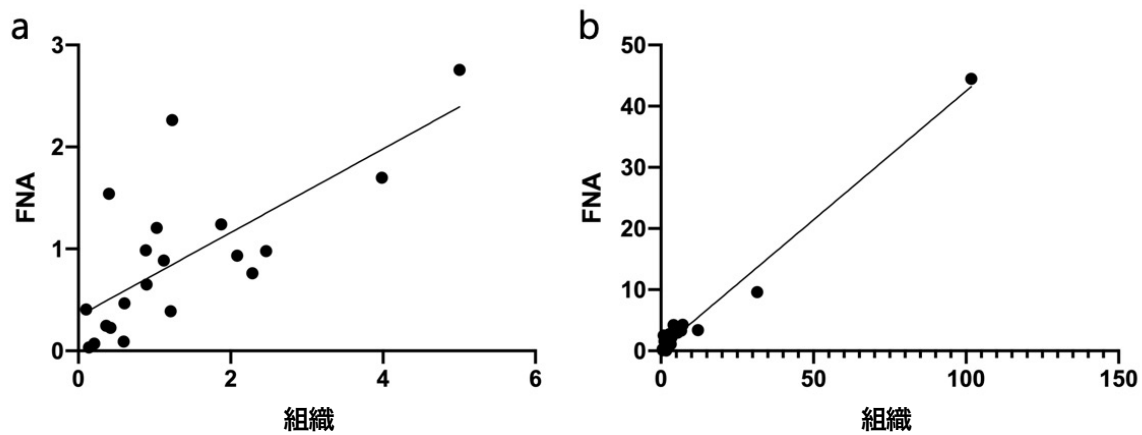


図1-7. 組織サンプルとFNAサンプル間における(a)endoglin ( $P < 0.01$ ,  $R_s = 0.690$ ) および(b)VEGFR2 ( $P < 0.01$ ,  $R_s = 0.881$ ) のmRNA発現量の相関性



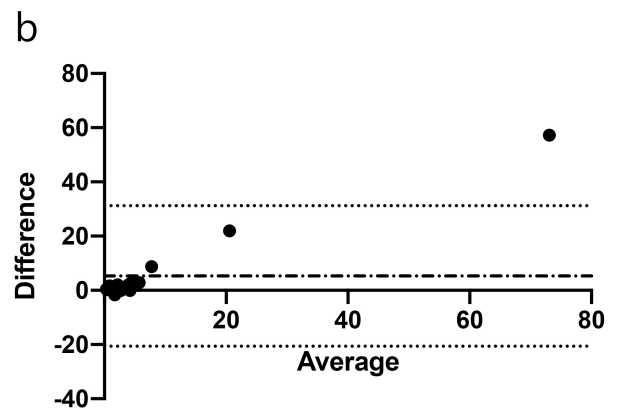
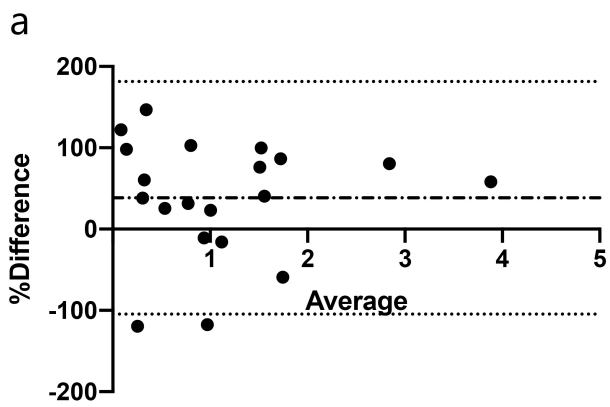


図1-8. 組織サンプルとFNAサンプル間における(a)endoglin および (b)VEGFR2のmRNA発現量の一致性

## 第2章

イヌの上皮系腫瘍と間葉系腫瘍における  
VEGF/VEGFR2 シグナル発現とその腫瘍細胞増殖との関連の比較

## 1. 小 緒

VEGF は血管新生に重要な役割を果たしている [Jakobsson et al., 2010, Santos et al., 2007]。VEGF は血管内皮細胞に発現する VEGFR2 に結合し、VEGFR2 をリン酸化させることで VEGF/VEGFR2 シグナルを活性化させる [Jakobsson et al., 2010, Santos et al., 2007]。このシグナルを介した血管新生は腫瘍が酸素と栄養を獲得することを可能にすることから、腫瘍の成長と進行に重要である [Folkman, 1971]。そのため、VEGF/VEGFR2 シグナルは抗がん剤治療戦略である分子標的薬のターゲットとして注目されている。

VEGFR2 は血管内皮細胞だけでなく腫瘍細胞にも発現していることが報告されている [Devery et al., 2015, Hocker et al., 2017, Koltai et al., 2018, Liang et al., 2006, Masood et al., 2001, Walters et al., 2018]。ヒトでは腫瘍細胞が分泌する VEGF が自身の VEGFR2 に作用しオートクリンループを形成することで腫瘍細胞の増殖に直接関与していることが様々な腫瘍で報告されている [Adamcic et al., 2012, Aesoy et al., 2008, Devery et al., 2015, Knizetova et al., 2008]。イヌにおいても鼻腔癌、乳腺腫瘍、移行上皮癌などの様々なイヌ腫瘍において腫瘍細胞に VEGFR2 の発現が認められているが [Hocker et al., 2017, Koltai et al., 2018, Walters et al., 2018]、イヌの腫瘍細胞における VEGFR2 の腫瘍細胞増殖への直接的な関与は未だ明らかとなっていない。

VEGF/VEGFR2 シグナルを標的とした阻害剤は特に上皮系腫瘍で効果が認められている。ヒト医療においては VEGF/VEGFR2 シグナルを標的とした阻害剤が主に上皮系腫瘍の治療薬として FDA から承認されている。抗 VEGF モノクローナル抗体であるベバシズマブは大腸がん、非小細胞肺癌、子宮頸がん、卵巣がんの治療薬として承認されており、VEGFR2 を標的の一つとするスニチニブとソラフェニブは腎細胞癌や肝細胞癌の治療薬として承認されている。また、獣医療においてもイヌの間葉

系腫瘍よりも上皮系腫瘍において VEGFR2 阻害剤であるトセラニブの効果が高い傾向にある [Choi et al., 2021, London et al., 2012, London et al., 2003]。これらのことから、上皮系腫瘍と間葉系腫瘍の間に VEGF/VEGFR2 シグナルに関してトセラニブの治療効果に影響を及ぼしうる何らかの差異があると考えられるが、上皮系腫瘍と間葉系腫瘍における VEGF/VEGFR2 シグナルに関する比較検討についてはこれまでに報告されていない。

そこで本章では、イヌの上皮系腫瘍と間葉系腫瘍における VEGF/VEGFR2 シグナルの違いおよび腫瘍細胞の VEGFR2 と細胞増殖の関連を明らかにするために、まず血管内皮細胞における VEGFR2 の発現量、MVD、vWF および endoglin の mRNA レベルを免疫組織化学と RT-qPCR を用いて比較検討した。次に、腫瘍細胞における VEGF、VEGFR2 発現量および pVEGFR2 量を免疫組織化学により評価した。さらに、VEGF、VEGFR2 発現量および pVEGFR2 量と ki-67 免疫染色による増殖指数 (PI) の相関、さらに血管新生と PI の関連も評価した。

## 2. 材料と方法

### 1. 症例および検体

2017年から2021年までに岩手大学動物病院にて外科的切除により腫瘍を摘出された様々な種類の腫瘍罹患犬50頭を対象とした。犬種、年齢、性別などの一般的な情報はカルテから収集した。50頭のイヌから上皮系腫瘍29検体、間葉系腫瘍21検体を得て、第1章と同様の方法で保存した。組織学的検索用の検体については第1章と同様の方法で標本を作成し、H.E染色を行い病理学的に診断した。各腫瘍の発生組織と診断名は表2-1に示した。

### 2. 免疫組織化学

第1章と同様の方法でvWF、Ki-67、VEGF、VEGFR2およびpVEGFR2について免疫組織化学を行った。脱パラフィンおよび親水化の後、VEGFR2、pVEGFR2およびki-67においては次に示した手順で抗原賦活化処理を行った。VEGFR2とpVEGFR2においてはProteinase K ×50 (Dako)を室温、6分間反応させた後、PBSで5分間×3回洗浄した。ki-67においてはTarget Retrieval Solution (Dako)中でオートクレーブ処理を120°C、20分間行った。湿潤箱にて内因性ペルオキシダーゼのブロッキング試薬を室温、10分間反応させた後、PBSで5分間×3回洗浄した。一次抗体はウサギ抗ヒトvWFポリクローナル抗体(1:4000; ab6994, abcam)、マウス抗VEGFモノクローナル抗体(1:100; Invitrogen, California, USA)、ウサギ抗VEGFR2ポリクローナル抗体(1:100; ab2349, abcam)、ウサギ抗Phospho-VEGFR2抗体(1:250; MyBiosource [フィルジェン株式会社、愛知、日本])、マウス抗ヒトki-67モノクローナル抗体(1:150; Dako)を用いた。抗vWF、Ki-67、VEGFおよびVEGFR2抗体のイヌに対する交差性は以前に報告されている[Angrimani et al., 2020,

Choi et al., 2016, Fratini et al., 2016, Furukawa et al., 2017, Rodrigues da Rosa Filho et al., 2021]。抗 pVEGFR2 抗体 of イヌに対する交差性は本研究においてウェスタンブロット法を用いて証明した (図 2-1)。ネガティブコントロールには抗 VEGF 抗体および抗 ki-67 抗体の代わりに正常マウス IgG 抗体 (Dako)、抗 vWF 抗体、抗 VEGFR2 抗体および抗 pVEGFR2 抗体の代わりに正常ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いた。

### 3. 免疫組織化学による評価

#### (1) MVD の評価

第 1 章と同様の方法で MVD を算出した。

#### (2) VEGF、VEGFR2 および pVEGFR2 発現量の評価

VEGF、VEGFR2 および pVEGFR2 発現量の評価は先行研究[Guan et al., 2019, Nishida et al., 2004, Yamamoto et al., 1997]の方法に準じて免疫反応スコア (Immunoreactivity score; IRS)を用いて行なった。血管内皮細胞における VEGFR2 発現量は染色強度を 0~3 (0: 染色反応なし、1: 弱い、2: 中程度、3: 強い) にスコアリングし IRS とした。腫瘍細胞における VEGF、VEGFR2、pVEGFR2 発現量は陽性細胞率を 1~4 (1:  $\leq 10\%$ 、2: 11~50%、3: 51~80%、4: 81~100%)、染色強度を 0~3 (0: 染色反応なし、1: 弱い、2: 中程度、3: 強い) にスコアリングし、その積 0~12 を IRS とした。

#### (3) 増殖指数 (PI) の評価

PI の評価は先行研究の方法[Swiderska et al., 2015]に準じて以下の方法で行った。光学顕微鏡下で低倍率 ( $\times 40$ ) にて ki-67 陽性細胞の多い領域 (hot spot) を探

し、hot spot における高倍率 (×400) 5 視野でそれぞれ 200 個の腫瘍細胞数を数え、腫瘍細胞 1000 個に対する ki-67 陽性細胞数の割合を算出した。

#### 4. real-time PCR

第 1 章と同様の方法で total RNA 抽出および DNase 処理を実施し、得られた cDNA を real-time PCR により増幅させた。酵素は QuantiNova™ SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いた。1 × SYBR Green PCR Master Mix、0.4 μM Forward/Reverse プライマー、逆転写反応産物 (2.5 μL)、1 × QN ROX Reference Dye、および Nuclease-free water (up to 25 μL) を混合して反応液を調製し、Step One Plus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を使用して 95°C10 分間反応後、95°C15 秒間、60°C60 秒間を 40 サイクル反応させた。本実験で使用したプライマーの塩基配列とその増幅産物長は表 2-2 に示した。vWF、endoglin、GAPDH、ribosomal protein S18 (RPS18) および ribosomal protein L32 (RPL32) の塩基配列はそれぞれ先行研究を参考に設計した [Chi et al., 2011, Jais et al., 2011, Kimura et al., 2021, Okabayashi et al., 2019, Peters et al., 2007]。Bestkeeper ソフトウェアを用いて GAPDH、RPS18、RPL32 のピアソン相関係数 (r) を算出し、発現量の安定したハウスキーピング遺伝子を決定した。

#### 5. 統計解析

上皮系および間葉系腫瘍の間のイヌの一般的な特徴の差において、量的変数については Mann-Whitney の U 検定、カテゴリ変数については Fisher の正確検定を用いて比較した。タンパク質発現量、MVD および血管内皮マーカーの mRNA 発現量の有意差の有無については Mann-Whitney の U 検定を用いて分析した。また、タンパク質発現量と PI との相関性についてはスピアマンの順位相関係数を用いて分析

し、相関係数の基準は $<0.2$  : poor、 $0.2\sim0.4$  : fair、 $0.4\sim0.6$  : moderate、 $0.6\sim0.8$  : strong、 $0.8\sim1.0$  : very strong とした。すべての統計解析は GraphPad Prism<sup>®</sup> program (version 8.0 ; GraphPad Software, Inc.) を用いて実施し、いずれも  $P < 0.05$  を有意差ありとした。



### 3. 結 果

#### 1. 症例情報

上皮系グループは、雄 12 頭（未去勢 6 頭、去勢 6 頭）、雌 17 頭（未避妊 1 頭、避妊 16 例）、年齢中央値 11 歳（5-14 歳）であった。間葉系グループは、雄 10 頭（未去勢 4 頭、去勢 6 頭）、雌 11 頭（未避妊 5 頭、避妊 6 頭）であり、年齢の中央値は 10 歳（範囲 6-14 歳）であった。両群グループ間においてこれらの特徴に統計学的な差はなかった。症例の一般的な特徴や各腫瘍の IRS を表 2-3 に示した。

#### 2. 血管内皮細胞の VEGFR2 スコア、MVD、vWF および endoglin の mRNA 発現量

血管内皮細胞は、抗 VEGFR2 抗体（図 2-2a）と抗 vWF 抗体（図 2-2c）に対して陽性を示した。起源の特定できない肉腫の腫瘍細胞は抗 vWF 抗体に対して陰性であり、血管内皮細胞由来ではないことが示された。Bestkeeper 解析の結果、RPS18 ( $r = 0.985$ ,  $P = 0.001$ ) は GAPDH ( $r = 0.922$ ,  $P = 0.001$ ) および RPL32 ( $r = 0.970$ ,  $P = 0.001$ ) に比べて安定した遺伝子であることが示された。そのため、各サンプルの mRNA 発現量は RPS18 の mRNA 発現量で標準化した。血管内皮細胞の VEGFR2 スコア ( $P = 0.721$ ; 図 2-3a)、MVD ( $P = 0.536$ ; 図 2-3b)、vWF の mRNA 発現量 ( $P = 0.905$ ; 図 2-3c) および endoglin の mRNA 発現量 ( $P = 0.164$ ; 図 2-3d) は上皮系腫瘍と間葉系腫瘍の間で有意差はなかった。

#### 3. 腫瘍細胞における VEGF、VEGFR2 および pVEGFR2 スコア

VEGF は腫瘍細胞、線維芽細胞および内皮細胞の細胞質に顆粒状に観察され、ほとんどの腫瘍において間質細胞よりも腫瘍細胞で強い染色強度を示した (Fig.2-4a)。VEGFR2 の染色強度は腫瘍細胞の核で強く、細胞質と細胞膜で中等度、そして間質細

胞で弱かった (図 2-4c, d)。pVEGFR2 の染色強度は腫瘍細胞の膜および細胞質で強く、間質細胞で弱く、染色部位は細胞膜に集中していた (図 2-4f, g)。間葉系腫瘍細胞と比較して、上皮系腫瘍細胞は有意に VEGF ( $P < 0.01$ ; 図 2-5a)、VEGFR2 ( $P < 0.01$ ; 図 2-5b)、pVEGFR2 ( $P < 0.01$ ; 図 2-5c) のスコアが高かった。

#### 4. 腫瘍細胞の VEGF、VEGFR2 および pVEGFR2 スコアと PI の相関関係

VEGF スコアは、上皮系腫瘍 ( $P = 0.485$ ; 図 2-6a)、間葉系腫瘍 ( $P = 0.166$ ; 図 2-6b) とともに PI と相関が認められなかった。VEGFR2 スコアも上皮系腫瘍 ( $P = 0.895$ ; 図 2-6c)、間葉系腫瘍 ( $P = 0.485$ ; 図 2-6d) のいずれにおいても PI と相関がなかった。pVEGFR2 スコアは、上皮系腫瘍では PI と中程度の正の相関があったが ( $P < 0.01$ ,  $R_s = 0.543$ ; 図 2-7a)、間葉系腫瘍では相関が認められなかった ( $P = 0.278$ ; 図 2-7b)。

#### 5. 血管新生の指標と PI の相関関係

上皮系腫瘍において MVD と PI の間に相関性は認められなかった ( $P = 0.125$ ; 図 2-8a) のに対し、間葉系腫瘍ではそれらの間に中等度の正の相関性が認められた ( $P < 0.05$ ,  $R_s = 0.540$ ; 図 2-8b)。vWF mRNA 発現量は上皮系腫瘍 ( $P = 0.171$ ; 図 2-8c) および間葉系腫瘍 ( $P = 0.670$ ; 図 2-8d) いずれにおいても PI と相関しなかった。同様に、endoglin mRNA 発現量も上皮系腫瘍 ( $P = 0.178$ ; 図 2-8e) および間葉系腫瘍 ( $P = 0.515$ ; 図 2-8f) いずれにおいても PI と相関しなかった。

## 4. 考 察

血管新生の程度や血管内皮細胞における VEGFR2 の発現量は上皮系腫瘍と間葉系腫瘍で差は認められなかった。一方で、腫瘍細胞における VEGF、VEGFR2 発現量および pVEGFR2 量は間葉系腫瘍よりも上皮系腫瘍で高いことが示された。また、上皮系腫瘍では pVEGFR2 量、間葉系腫瘍では MVD が腫瘍細胞増殖と関連していた。

VEGFR2 は VEGF と結合してリン酸化されると、細胞質および核に移動して自身の転写を制御することが報告されている [Domingues et al., 2011]。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞や様々な正常および腫瘍組織においても、VEGFR2 および pVEGFR2 が細胞膜、細胞質および核に免疫組織化学的に検出されたことが報告されており [Domingues et al., 2011, Stewart et al., 2003]、本研究における VEGFR2 および pVEGFR2 の局在は、これらの過去の報告と一致していた。

本研究において、腫瘍細胞における VEGF の発現は腫瘍の種類に関わらず認められ、かつ、多くのイヌ腫瘍細胞において VEGFR2 がリン酸化していた。さらに、上皮系腫瘍では pVEGFR2 量と PI が相関していた。これらのことから、腫瘍細胞に発現している VEGFR2 は自身が分泌した VEGF により刺激され、機能的に活性化していることが考えられた。腫瘍細胞における VEGF/VEGFR2 のオートクリンループはヒトの膠芽腫 [Knizetova et al., 2008]、乳腺腫瘍 [Aesoy et al., 2008]、非小細胞肺癌 [Devery et al., 2015] およびメラノーマ [Adamcic et al., 2012] など様々な腫瘍で報告されている。イヌ腫瘍においても乳腺癌 [Millanta et al., 2006] や扁平上皮癌および毛包上皮腫 [Al-Dissi et al., 2007] において VEGF/VEGFR2 シグナルのオートクリンループが示唆されているものの、これらの報告では VEGFR2 のリン酸化は評価しておらず、その機能的活性については不明であった。本研究ではイヌ腫瘍細胞における VEGFR2 のリン酸化を評価している点で、機能的な VEGF/VEGFR2 のオートクリン

ループの存在を支持する新たな知見を得ることができた。

VEGF および VEGFR2 の発現と腫瘍細胞増殖の関連については、複数のイヌの腫瘍において過去に報告されている。扁平上皮癌では VEGF および VEGFR2 のスコアが PI と正の相関を示し、毛包上皮腫や乳腺癌では VEGF スコアが PI と正の相関を示している [Al-Dissi et al., 2007, Al-Dissi et al., 2010]。著者の知る限り、本研究はイヌの腫瘍における VEGFR2 のリン酸化と腫瘍細胞増殖の関連を示した初めての研究である。本研究では、上皮系腫瘍において pVEGFR2 量のみが腫瘍細胞増殖と関連していたことから、イヌでは VEGF や VEGFR2 よりも pVEGFR2 量が腫瘍細胞増殖の指標となりうること、また、上皮系腫瘍において VEGF/VEGFR2 シグナルが腫瘍細胞増殖に関与する可能性が示唆された。一方、間葉系腫瘍では PI は MVD と正の相関を示し、腫瘍細胞の pVEGFR2 量とは相関が認められなかった。これらの結果は、間葉系腫瘍細胞の増殖が新生血管からの酸素と栄養の供給に依存していることを示唆している。しかし、血管内皮マーカーの mRNA 発現量と PI との間には相関が認められなかったことから、解釈には注意が必要である。また、VEGF は細胞増殖以外にも遊走や生存など多くの細胞機能に重要であることから [Ferrara et al., 2003]、間葉系腫瘍細胞における VEGF/VEGFR2 シグナルはこのような他の機能にも関与している可能性があると考えられる。

本研究における制限として、サンプルの臨床的特徴がさまざまであった。特に良性腫瘍と悪性腫瘍がランダムに含まれており、上皮系腫瘍では悪性腫瘍のサンプル数が明らかに多かった。悪性腫瘍では VEGF や VEGFR2 の発現が高いことが報告されており [Chen et al., 2000, Kopparapu et al., 2013]、実際、本研究でも悪性腫瘍は良性腫瘍に比べて VEGF スコアが有意に高かった（データ未提示）。しかし、悪性腫瘍では pVEGFR2 スコアと PI に相関がなかったことから、上皮と間葉系の違いが本研究の結果に影響を与えたと考えられる。今後の研究では各腫瘍の数を増やし、臨床的特徴

を統一していく必要がある。また、pVEGFR2 スコアの評価にホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルを用いた。VEGFR2 のリン酸化状態は短時間で変化するため、ホルマリン固定の際に染色強度やパターンが本来の腫瘍組織での発現から人為的に変化している可能性がある。ヒトのリンパ腫における FFPE サンプルを用いた pVEGFR2 の評価が過去に報告されていること [28] や、本研究の結果で VEGFR2 スコアが別の生物学的指標と相関していたことを考慮すると、今回の結果は実際の値を反映していたと考えられる。しかし、凍結切片や凍結サンプルを用いたウエスタンブロッティングなどの別の解析方法がより適切であったと考えられる。

以上のことから、本研究においてイヌの上皮系腫瘍では間葉系腫瘍と比較して VEGF、VEGFR2 発現量および pVEGFR2 量が多く、さらに pVEGFR2 量が腫瘍細胞増殖に関連していることが明らかとなった。これらの差異がトセラニブの治療効果に影響を及ぼすかどうか、さらなる検討が必要である。

表 2 - 1 . 腫瘍の種類

上皮系腫瘍

発生組織	診断名	n
肺	腺癌	3
	扁平上皮癌	1
副鼻腔	腺癌	1
口腔	扁平上皮癌	2
唾液腺	扁平上皮癌	1
腸	腺癌	4
肝臓	肝細胞癌	7
腎臓	腎細胞癌	3
前立腺	腺癌	1
皮下	肛門周囲腺腫	4
	毛包上皮腫	1
	皮脂腺癌	1

間葉系腫瘍

発生組織	診断名	n
口腔	線維肉腫	1
腸	消化管間質腫瘍	2
脾臓	間質腫瘍	2
腎臓	起源の特定できない肉腫	1
膀胱	起源の特定できない肉腫	1
膣	線維腫	1
	平滑筋腫	1
子宮	平滑筋腫	2
腹腔	線維肉腫	1
四肢	骨肉腫	4
	未分化肉腫	1
皮下	軟部組織肉腫	3
	血管周皮腫	1

表 2 - 2. プライマー配列

遺伝子	アクセッション番号	方向	塩基配列 (5'-3')	増幅産物 (bp)
vWF	NM_001002932	Forward	CCC AGT GCT CCC AGA AGC CCT	130
		Reverse	TCG CCC CGT GGT GAA CCG AT	
endoglin	XM_005625330	Forward	TCC AAG CAA AAT GGC ACT CG	122
		Reverse	ATC AGT TTG GGG TTG AAG GC	
GAPDH	NM_001003142.2	Forward	AGT ATG ATT CTA CCC ACG GCA AA	146
		Reverse	CAC AAC ATA CTC AGC ACC AGC AT	
RPS18	NM_001048082.1	Forward	ATA GCC TTT GCC ATC ACA GCA ATT A	86
		Reverse	TTG GTG AGA TCG ATG TCT GCT TTC	
RPL32	XM848016	Forward	TGG TTA CAG GAG CAA CAA GAA A	100
		Reverse	GCA CAT CAG CAG CAC TTC A	

表2-3. 症例情報および腫瘍組織の免疫反応スコア (IRS)

## 上皮系腫瘍

No	発生組織	診断名	犬種	年齢	性別	血管内皮細胞		腫瘍細胞	
						VEGFR2	VEGF	VEGFR2	pVEGFR2
1	肺	腺癌	ミニチュア・シュナウザー	12	去勢雄	2	12	8	12
2			バーニーズ・マウンテン・ドッグ	8	去勢雄	2	12	8	12
3			雑種	11	避妊雌	1	9	9	8
4		扁平上皮癌	バセット・ハウンド	9	避妊雌	2	12	8	8
5	副鼻腔	腺癌	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	12	避妊雌	1	8	8	12
6	口腔	扁平上皮癌	ボーダー・コリー	10	避妊雌	3	12	8	12
7			マルチーズ	11	避妊雌	2	12	12	12
8	唾液腺	扁平上皮癌	トイ・プードル	10	避妊雌	1	12	9	12
9	腸	腺癌	雑種	13	去勢雄	3	4	8	12
10			ジャック・ラッセル・テリア	10	避妊雌	2	8	4	12
11			シー・ズー	9	未去勢雄	1	12	12	12
12			トイ・プードル	5	去勢雄	1	12	6	4
13	肝臓	肝細胞癌	バグ	11	避妊雌	1	12	12	8
14			ミニチュア・シュナウザー	12	未去勢雄	1	12	3	4
15			柴犬	11	未避妊雌	1	12	12	4
16			雑種	13	避妊雌	1	12	8	4
17			トイ・プードル	6	避妊雌	0	12	8	3
18			ベキニーズ	10	避妊雌	1	12	8	6
19			ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	12	避妊雌	1	12	1	4
20	腎臓	腎細胞癌	ラブラドル・レトリバー	8	未去勢雄	3	12	8	8
21			雑種	9	去勢雄	1	12	12	8
22			ボメラニアン	10	去勢雄	1	12	8	8
23	前立腺	腺癌	ミニチュア・ダックスフンド	11	避妊雌	3	12	8	12
24	皮下	肛門周囲腺腫	ミニチュア・シュナウザー	11	未去勢雄	3	12	12	8
25			トイ・プードル	10	未去勢雄	2	12	12	2
26			ミニチュア・ダックスフンド	12	避妊雌	2	12	12	8
27			雑種	11	未去勢雄	2	12	12	8
28		毛包上皮腫	雑種	14	避妊雌	2	12	12	12
29		皮脂腺癌	ヨークシャー・テリア	14	避妊雌	0	12	2	4

## 間葉系腫瘍

No	発生組織	診断名	犬種	年齢	性別	血管内皮細胞		腫瘍細胞	
						VEGFR2	VEGF	VEGFR2	pVEGFR2
30	口腔	線維肉腫	トイ・プードル	10	避妊雌	1	4	8	3
31	腸	消化管間質腫瘍	ゴールデン・レトリバー	8	避妊雌	1	8	8	1
32			シベリアン・ハスキー	14	去勢雄	1	4	0	1
33	脾臓	間質腫瘍	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	9	避妊雌	1	3	2	4
34			チワワ	11	未避妊雌	3	1	2	2
35	腎臓	起源の特定できない肉腫	トイ・プードル	11	未去勢雄	3	6	4	1
36	膀胱	起源の特定できない肉腫	アメリカン・コッカー・スパニエル	10	去勢雄	2	9	8	3
37	膈	線維腫	トイ・プードル	13	避妊雌	2	12	4	0
38		平滑筋腫	キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル	11	未避妊雌	2	4	8	3
39	子宮	平滑筋腫	柴犬	11	未避妊雌	2	4	1	8
40			雑種	10	避妊雌	1	4	1	12
41	腹腔	線維肉腫	バーニーズ・マウンテン・ドッグ	6	未去勢雄	1	4	4	6
42	四肢	骨肉腫	秋田犬	13	未避妊雌	0	12	4	1
43			秋田犬	12	避妊雌	2	12	8	1
44			ボルゾイ	6	未去勢雄	0	8	8	8
45			ゴールデン・レトリバー	9	去勢雄	1	8	2	1
46		未分化肉腫	雑種	10	去勢雄	3	6	8	8
47	皮下	軟部組織肉腫	ラブラドル・レトリバー	7	去勢雄	0	8	0	0
48			雑種	8	避妊雌	3	6	6	6
49			ジャック・ラッセル・テリア	11	去勢雄	2	4	8	8
50		血管周皮腫	シェットランド・シープドッグ	11	未去勢雄	0	4	1	4



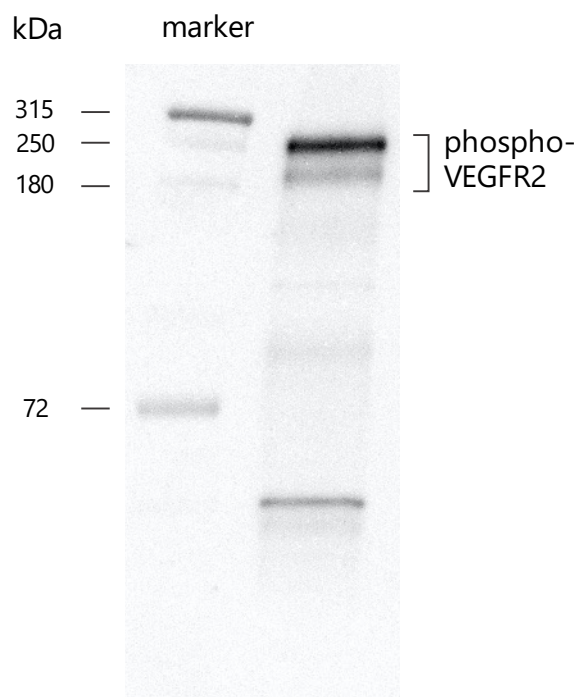


図2-1. ウェスタンブロットによる抗pVEGFR2  
 抗体のイヌへの交差性の検証  
 検体にはイヌの肺腺癌を用いた。予想された分子  
 量（～240 kDa）の位置に特異的なバンドが検出さ  
 れた。

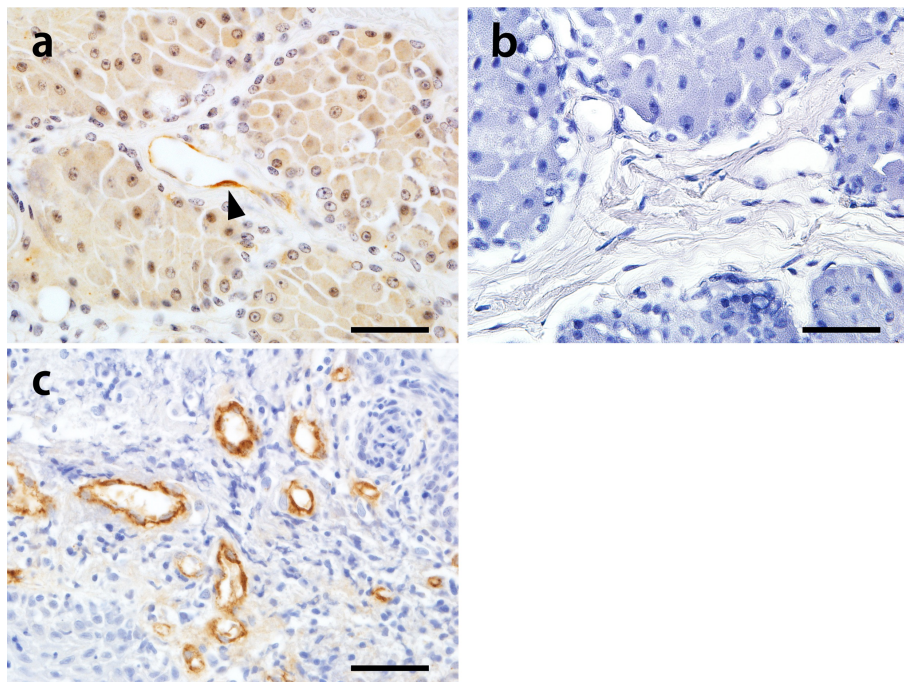


図2 - 2 . 抗VEGFR2抗体および抗vWF抗体による免疫組織化学を施した腫瘍組織 (a) 肛門周囲腺腫におけるVEGFR2発現 (茶色、IRS; 3) 血管内皮細胞と腫瘍細胞に陽性反応を呈した。矢頭はVEGFR2陽性血管内皮細胞を示す。(b) (a)と同様の切片におけるVEGFR2に対するネガティブコントロール (c) 皮脂腺癌におけるvWF発現 (茶色) 血管内皮細胞に陽性反応を呈した。対比染色はヘマトキシリン (青色) にて実施した。Bar = 40  $\mu$  m

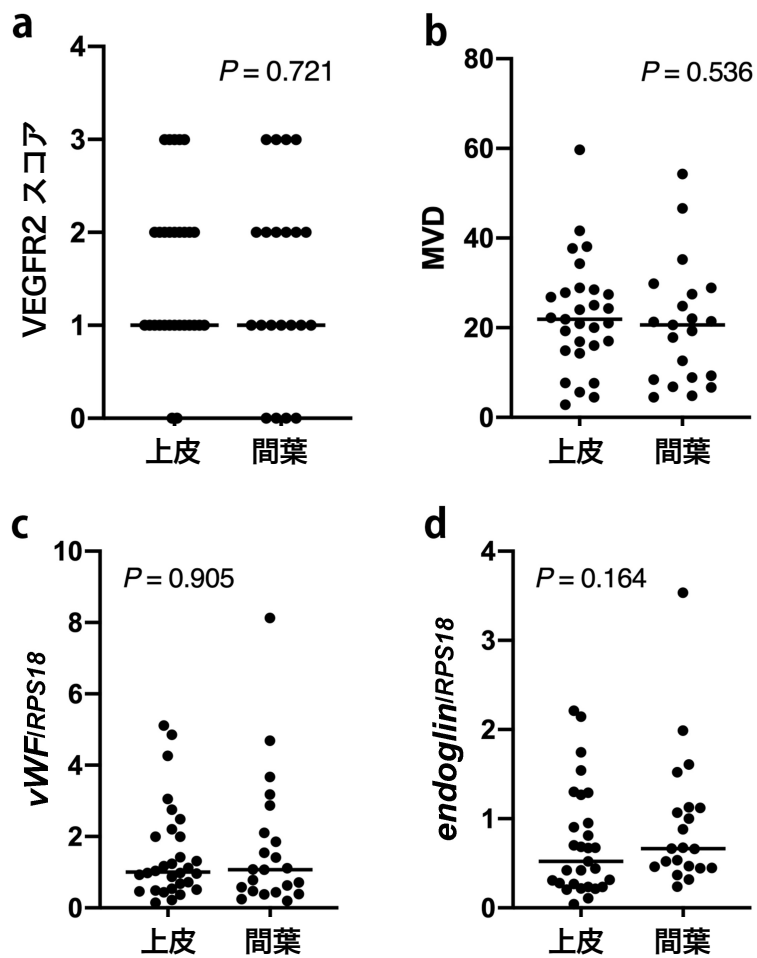


図 2 - 3 . 上皮系および間葉系腫瘍における(a) 血管内皮細胞における VEGFR2 スコア ( $P = 0.721$ )、(b) MVD ( $P = 0.536$ )、(c) vWF mRNA 発現量 ( $P = 0.905$ ) および(d) endoglin mRNA 発現量 ( $P = 0.164$ ) の比較

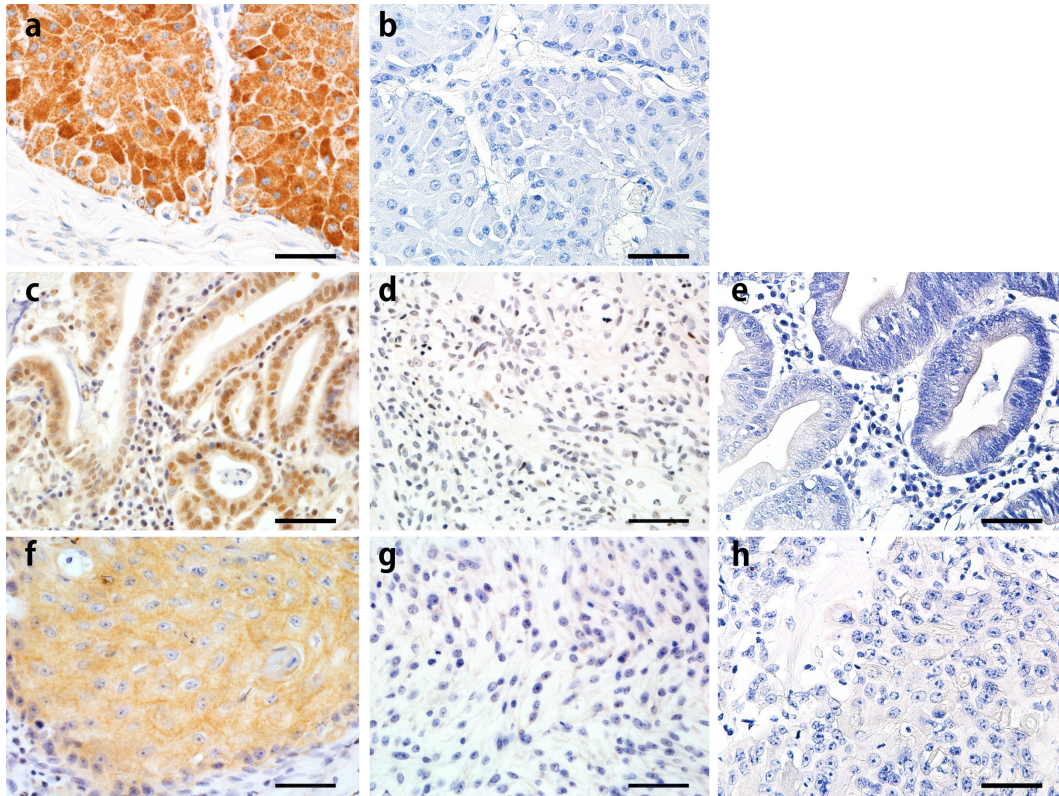


図2-4. 抗VEGF抗体、抗VEGFR2抗体および抗pVEGFR2抗体による免疫組織化学を施した腫瘍組織 (a) 肛門周囲腺腫におけるVEGF発現 (茶色、IRS; 12) (b) (a)と同様の切片におけるVEGFに対するネガティブコントロール (c) 腸腺癌におけるVEGFR2発現 (茶色、IRS; 12) (d) 腎臓の起源の特定できない肉腫におけるVEGFR2発現 (茶色、IRS; 4) (e) (c)と同様の切片におけるVEGFR2に対するネガティブコントロール (f) 毛包上皮腫におけるpVEGFR2発現 (茶色、IRS; 12) (g) 膀胱の起源の特定できない肉腫におけるpVEGFR2 (茶色、IRS; 3) (h) (f)と同様の切片におけるpVEGFR2に対するネガティブコントロール Bar = 40  $\mu$ m

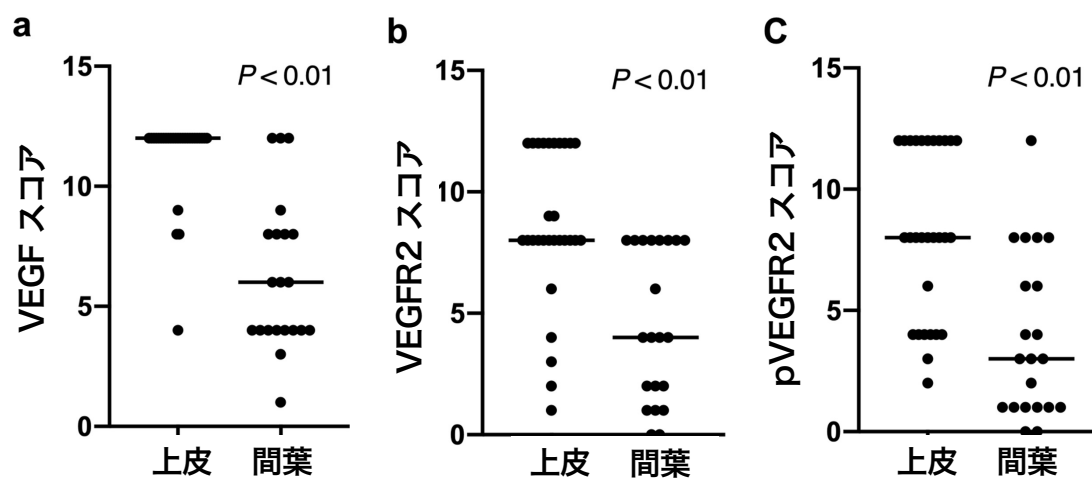


図2-5. 上皮系および間葉系腫瘍における腫瘍細胞の(a) VEGFスコア ( $P < 0.01$ )、(b) VEGFR2スコア ( $P < 0.01$ ) および(c) pVEGFR2スコア ( $P < 0.01$ ) の比較

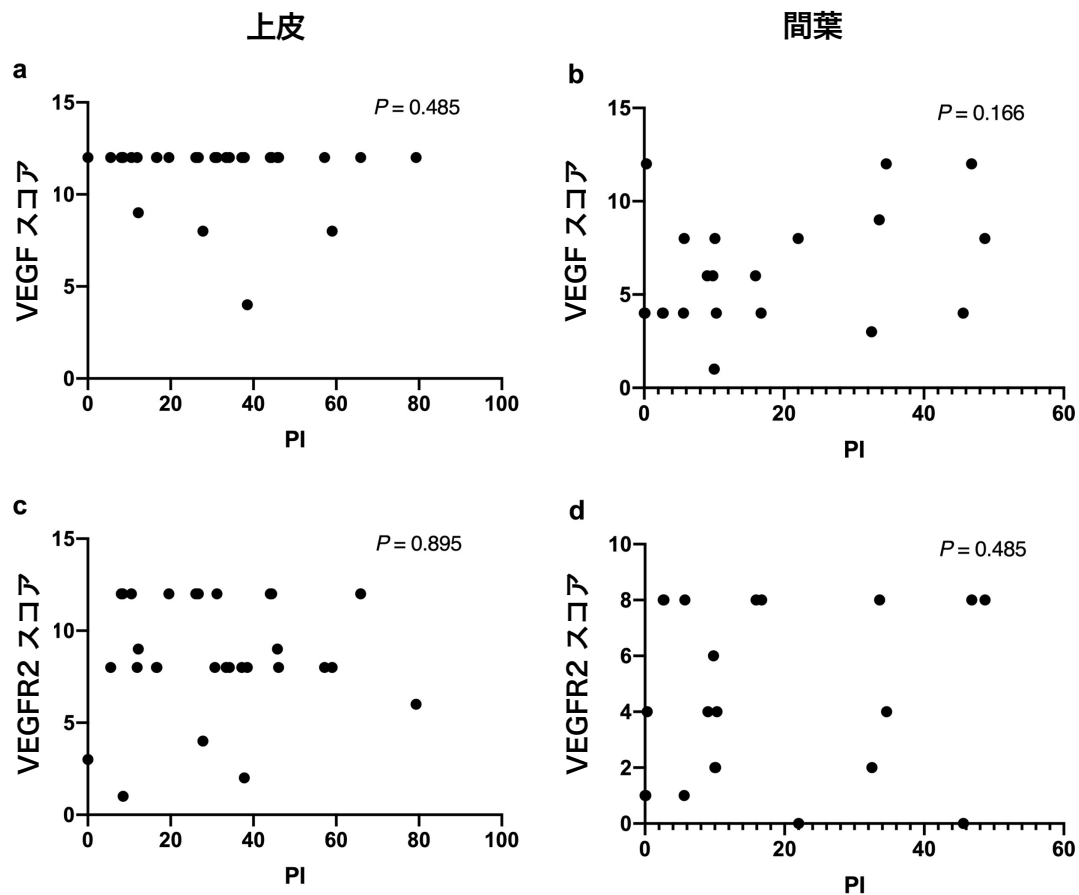


図2-6. VEGFおよびVEGFR2スコアとPIの相関性 (a)上皮系 ( $P = 0.485$ ) および(b)間葉系 ( $P = 0.166$ ) 腫瘍におけるVEGFスコアとPIの相関性。(c)上皮系 ( $P = 0.895$ ) および(d)間葉系 ( $P = 0.485$ ) 腫瘍におけるVEGFR2スコアとPIとの相関性。

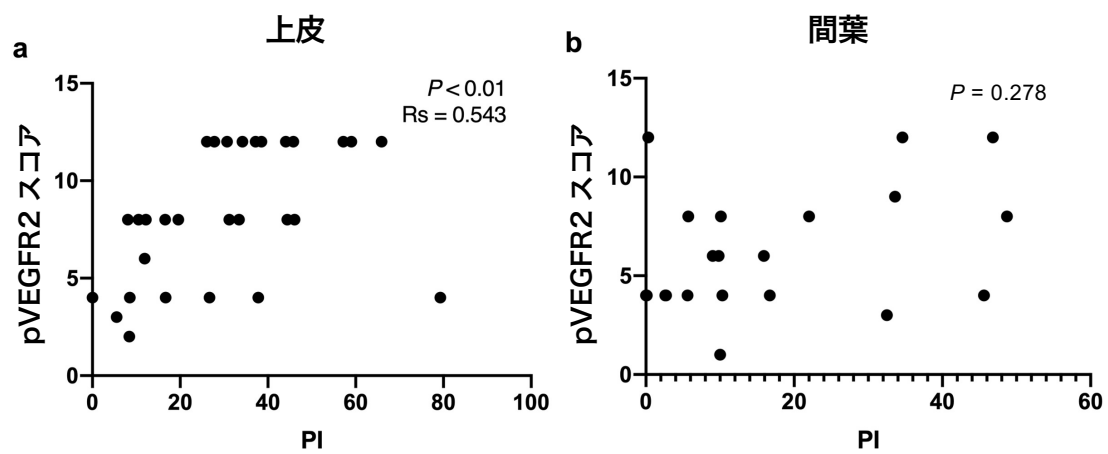


図 2 - 7. pVEGFR2スコアとPIの相関性 (a)上皮系腫瘍 ( $P < 0.01$ ,  $R_s = 0.543$ )  
(b)間葉系腫瘍 ( $P = 0.278$ )

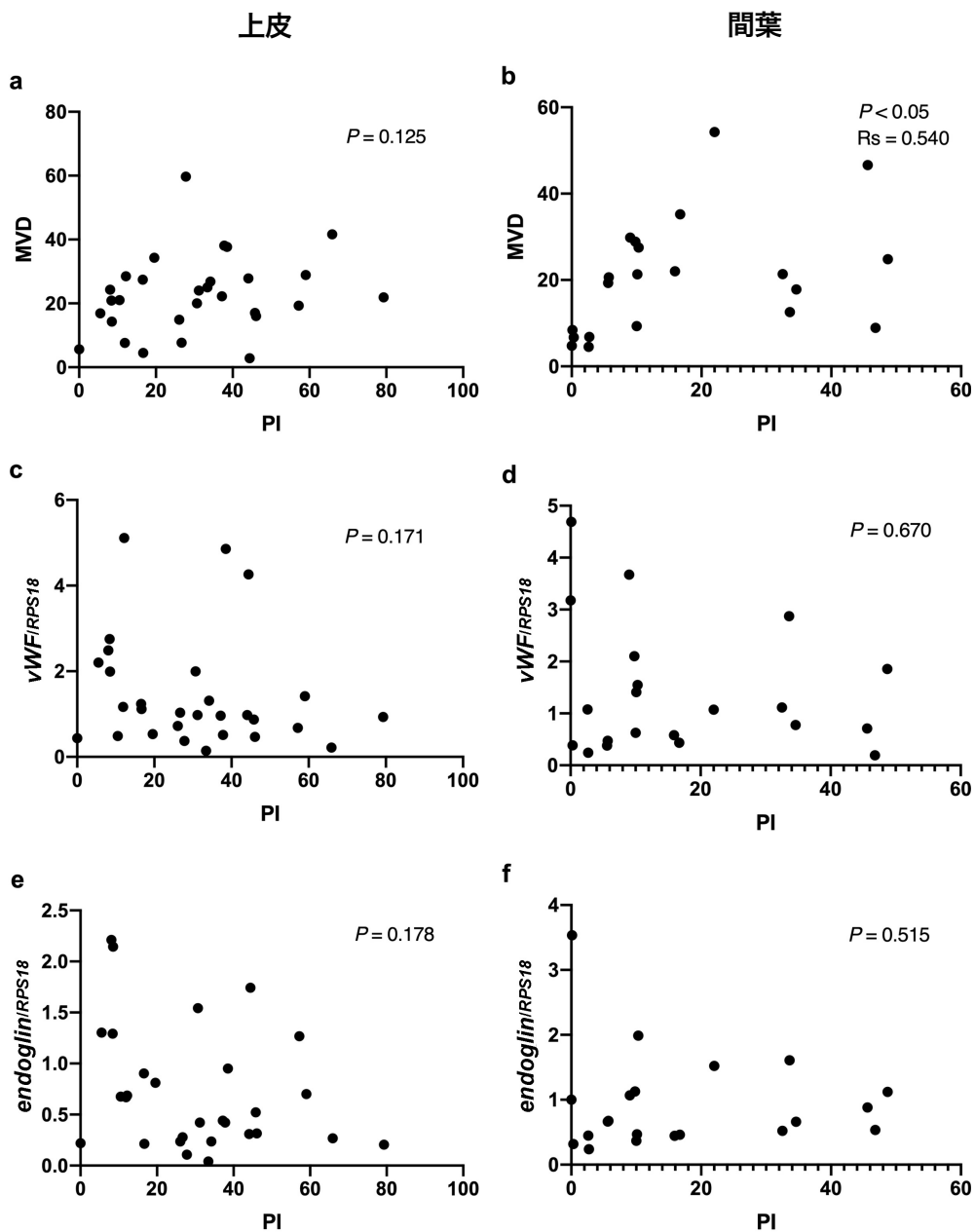


図2-8. 血管新生の指標とPIの相関性。(a,b) (a)上皮系 ( $P=0.125$ ) および (b)間葉系 ( $P<0.05$ ,  $R_s=0.540$ ) 腫瘍におけるMVDとPIの相関性。(c,d) 上皮系 ( $P=0.171$ ) および(d)間葉系 ( $P=0.670$ ) 腫瘍におけるvWF mRNA発現量とPIの相関性。(e,f) 上皮系 ( $P=0.178$ ) および(d)間葉系 ( $P=0.515$ ) 腫瘍におけるendoglin mRNA発現量とPIの相関性。



### 第 3 章

イヌ乳腺腫瘍細胞株における VEGFR2 のリン酸化が  
細胞増殖およびトセラニブの効果に与える影響の評価

## 1. 小 緒

トセラニブ（パラディア®、Zoetis）はイヌの肥満細胞腫の治療薬として 2013 年に FDA によって承認された分子標的薬である。トセラニブは TKI であり、KIT、PDGFR および VEGFR2 のリン酸化を阻害する。そのうち、VEGFR2 は血管内皮細胞に発現し、血管新生に重要な役割を果たす [Jakobsson et al., 2010, Santos et al., 2007]。血管新生は腫瘍が酸素と栄養を獲得することを可能にすることから、腫瘍の成長と進行に重要である [Folkman, 1971]。そのため、トセラニブはその血管新生阻害効果を期待されイヌの様々な腫瘍に対して適応外使用されている。近年、トセラニブの治療効果として腫瘍の種類ごとの臨床的有用率（CBR）が報告されてきており、London らの報告によると、上皮系腫瘍である肛門嚢腺癌、甲状腺癌、頭頸部癌および鼻腔癌の CBR はそれぞれ 87.5%、80%、75% および 71.4% であったのに対し、間葉系腫瘍である転移性骨肉腫、軟部組織肉腫および血管肉腫の CBR は 47.8%、50% および 0% と比較的低い値であった [London et al., 2012, London et al., 2003]。さらに、Choi らはトセラニブが間葉系腫瘍に比べて上皮系腫瘍で良好な治療成績を示したことを報告している [Choi et al., 2021]。これらの報告はトセラニブが上皮系腫瘍により効果的である可能性を示しているが、トセラニブの治療効果に影響を及ぼす因子は未だ不明である。

VEGFR2 は血管内皮細胞だけでなく腫瘍細胞にも発現していることが報告されており [Devery et al., 2015, Hocker et al., 2017, Koltai et al., 2018, Liang et al., 2006, Masood et al., 2001, Walters et al., 2018]、ヒトにおいては非小細胞肺癌、乳癌、メラノーマ、卵巣癌、膵臓癌などの腫瘍において VEGFR2 阻害剤が腫瘍細胞の VEGFR2 を阻害することで増殖抑制やアポトーシスを誘導することが示されている [Devery et al., 2015, Liang et al., 2006, Masood et al., 2001]。イヌにおいては鼻腔癌、乳腺腫瘍、移行上皮癌などの様々な腫瘍において腫瘍細胞に VEGFR2 が発現していることがす

で報告されており[Hocker et al., 2017, Koltai et al., 2018, Walters et al., 2018]、著者は本研究の第2章においてイヌの上皮系腫瘍では間葉系腫瘍に比べて VEGF、VEGFR2 発現量および pVEGFR2 量が有意に高いこと、さらに VEGFR2 のリン酸化と腫瘍細胞増殖が関連していることを明らかにしている。しかしながら、トセラニブが腫瘍細胞の VEGFR2 を直接標的としているかどうかは未だ不明である。また、*in vitro* においてイヌの骨肉腫[Sanchez-Cespedes et al., 2020]や乳腺腫瘍[Gattino et al., 2018]の細胞株に対するトセラニブの効果を確認した報告があるが、それらの報告におけるトセラニブの濃度は治療中における血中濃度と比較して極めて高濃度であり、臨床的にトセラニブを生体内に投与した際の腫瘍細胞への影響は議論の余地がある。

そこで本研究では、「腫瘍細胞における VEGFR2 のリン酸化が腫瘍細胞増殖を促進させ、この機序を阻害することがトセラニブの治療効果に影響している」と仮説を立て、pVEGFR2 量の異なるイヌ乳腺腫瘍細胞株において増殖率やトセラニブによる生細胞率への影響を比較解析することで仮説を検証した。

## 2. 材料と方法

### 1. 細胞株

7つのイヌ乳腺腫瘍細胞株（CHM-p, CHM-m, CIP-p, CIP-m, CNM-p, CNM-m, CTB-p）を使用した。これらの細胞株は先行研究[Uyama et al., 2006]にて樹立されており、中川貴之博士（東京大学）より供与された。すべての細胞株は10%ウシ胎児血清（FBS, Biowest, Nuaille, France）および1%ペニシリン-ストレプトマイシン（ナカライテスク株式会社、京都、日本）を含む Dulbecco' modified Eagle Media（ナカライテスク）中で37°C、5 % CO<sub>2</sub>の条件下で培養維持した。

### 2. ウェスタンブロット

細胞株を30,000 cells/wellとなるように6穴プレートに播種し、0.2%FBSを含む培地中で37°C、5 % CO<sub>2</sub>の条件下で一晩培養した。FBSの濃度について、実験中にFBS中におけるVEGFなどの増殖因子の存在がVEGFR2のリン酸化や細胞増殖に影響することを最小限にするため、以降の実験はすべて低濃度（0.2%）で実施した。一晩培養した後、Mammalian Lysis Buffer（Promega, Madison, WI, USA）およびProtease Inhibitor Cocktail, 50×（Promega）を用いて添付のプロトコールに従いタンパク質を抽出し、Quick Start Bradford 1× Dye Reagent（Bio-Rad, California, USA）を用いて添付のプロトコールに従い、得られたタンパク質抽出液の濃度を測定した。タンパク質抽出液と4×Loading Buffer（組成：1 M Tris-HCl, pH 6.5; 1.5 mL, 1M dithiothreitol; 3mL, sodium dodecyl sulfate; 0.6 g, bromophenol blue; 30mg, glycerol; 2.4 mL, water; up to 7.5mL）を混合し、各サンプルの総タンパク質量が等量になるように調製した泳動サンプルを95°C、5分間加熱した。20 μgのタンパク質を10% Mini-PROTEAN TGX Gels（Bio-Rad）にロードし150Vで約60分間電

気泳動した。次に、50V、8時間もしくは60V、4時間の条件でPVDFメンブレン (Merck Millipore, Massachusetts, USA)に転写し、PVDFメンブレンをPVDF Blocking Reagent for Can Get signal (東洋紡、大阪、日本)に浸して室温で1時間振とうさせたのち、Tris-Buffered Saline with Tween-20 (TBST; 150 mM NaCl, 20 mM Tris, 0.05% Tween-20)で洗浄した。その後、PVDFメンブレンをCan Get Signal Solution 1 (東洋紡)にて希釈した一次抗体液に浸して4°Cで一晩振とうさせ、TBSTで洗浄したのち、Can Get Signal Solution 2 (東洋紡)にて希釈した二次抗体液に浸して室温で1時間振とうした。一次抗体はウサギ抗 Phospho-VEGFR2 抗体(1:500; MyBiosource)およびマウス抗  $\beta$ -actin モノクローナル抗体(1:100,000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)、二次抗体はヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (HRP 標識) (Enzo Lifesciences, Farmingdale, NY, USA) およびヤギ抗マウス IgG 抗体 (HRP 標識) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を使用した。TBSTで洗浄後、Ez-Capture MG (Atto、東京、日本)を使用してバンドを検出した。Image J[Rasband, 1997-2018]を用いてバンドを定量し、 $\beta$ -actin の値で補正することで pVEGFR2 量を数値化した。測定は3回以上行い、それらの平均値を解析に用いた。

### 3. トセラニブ添加による pVEGFR2 量の評価

2において pVEGFR2 の量が多かった CIP-m を 30,000 cells/well となるように6穴プレートに播種し、0.2%FBS ± 250 nM トセラニブまたは 0.01%ジメチルスルホキシド (DMSO) を含む培地中で 37°C、5 % CO<sub>2</sub> の条件下で一晩培養した。その後、2の手順でタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットにより pVEGFR2 量を測定した。本実験は3回実施し、解析には各測定値の平均を用いた。

#### 4. 細胞増殖試験

##### (1) 120 時間培養試験

細胞株を 4,000 cells/well となるように 96 穴プレートに播種した。0.2%FBS を含む培地中で 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で 24 または 120 時間培養したのち、Cell Counting Kit-8 (CCK-8; DOJINDO、熊本、日本) を使用し、添付のプロトコールに従い 450 nm の吸光度を Infinite® 200 PRO F Plex (テカンジャパン株式会社、神奈川、日本) により測定した。増殖率を次のように算出した。「増殖率 = 培養 120 時間後の吸光度 ÷ 培養 24 時間後の吸光度 × 100」本実験は triplicate で 3 回ずつ実施し、解析には各測定値の平均を用いた。

##### (2) トセラニブ添加試験

細胞株を 4,000 cells/well となるように 96 穴プレートに播種し、0.2%FBS を含む培地中で 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で一晩培養しプレートに接着させた。培養液を 0.2%FBS および 250 nM トセラニブまたはコントロールとして 0.01% DMSO を含む新しい培養液に交換し、37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下でさらに 48 時間培養した。CCK-8 (DOJINDO) を用いて 450 nm の吸光度を Infinite® 200 PRO F Plex (テカンジャパン株式会社) により測定した。本実験は triplicate で 3 回ずつ実施し、解析には各測定値の平均を用いた。

#### 5. 統計解析

pVEGFR2 量と増殖率の相関性についてはスピアマンの順位相関係数を用いて分析し、相関係数の基準は <0.2 : poor、0.2~0.4 : fair、0.4~0.6 : moderate、0.6~0.8 : strong、0.8~1.0 : very strong とした。また、トセラニブ添加による pVEGFR2 量の評価および細胞増殖試験の結果は Student の t 検定により分析した。

すべての統計解析は GraphPad Prism® program (version 8.0 ; ) を用いて実施し、  
いずれも  $P < 0.05$  を有意差ありとした。

### 3. 結 果

#### 1. 腫瘍細胞の pVEGFR2 量と細胞増殖率の相関関係

すべての細胞株において、予想される分子量約 240kDa の pVEGFR2 のバンドが認められた (図 3-1)。pVEGFR2 量は細胞株によってさまざまであり、CIP-m および CTB-p では顕著に多く、CNM-p および CNM-m では比較的少なかった (図 3-2)。120 時間培養後の細胞増殖率は CHM-p、CHM-m、CIP-p、CIP-m、CNM-p、CNM-m および CTB-p でそれぞれ 38.3、115.3、127.0、218.7、17.1、9.47 および 454.6% であり、pVEGFR2 量の多かった CIP-m および CTB-p で顕著に高かった。pVEGFR2 量と細胞増殖率の間には強い正の相関が認められた ( $P < 0.05$ ,  $R_s = 0.893$ ; 図 3-3)。

#### 2-2. トセラニブ添加による pVEGFR2 量の変化

トセラニブ添加により、CIP-m の pVEGFR2 量はコントロールと比較して有意に減少した ( $P < 0.01$ ; 図 3-4)

#### 2-3. トセラニブ添加による生細胞率の変化

トセラニブ添加後の CHM-p、CHM-m、CIP-p、CIP-m、CNM-p、CNM-m および CTB-p の生細胞率はそれぞれ 113.6、107.9、113.9、86.4、150.0、147.9、80.7% であった (図 3-5)。pVEGFR2 量の多い CIP-m ( $P < 0.05$ ) および CTB-p ( $P < 0.01$ ) は有意に生細胞率が減少したのに対し、pVEGFR2 量の少ない CNM-p ( $P < 0.05$ ) および CNM-m ( $P < 0.05$ ) は有意に生細胞率が増加した。



## 4. 考 察

イヌ乳腺腫瘍細胞において、pVEGFR2 量の多い腫瘍細胞は増殖能が高く、さらにトセラニブが血中濃度と同程度の濃度で pVEGFR2 量の多い腫瘍細胞の生細胞率を減少させることが明らかとなった。

ヒトでは腫瘍細胞における VEGF/VEGFR2 シグナルが腫瘍細胞の増殖や生存に関与していることが知られている。ヒトのメラノーマや非小細胞肺がんでは VEGFR2 をノックダウンした腫瘍細胞は増殖率が減少することが報告されており [Devery et al., 2015, Molhoek et al., 2008]、グリオーマ幹細胞様細胞では VEGFR2 高発現の細胞は VEGFR2 低発現の細胞よりも生存率が高いことが報告されている [Hamerlik et al., 2012]。本研究では pVEGFR2 量と細胞増殖率が相関していたことから、これらの先行研究と同様の結果が得られたと考えられた。また、添加等による外因性 VEGF の非存在下においても腫瘍細胞の VEGFR2 のリン酸化が認められたことから、イヌ乳腺腫瘍細胞が分泌した内因性 VEGF が自身の VEGFR2 を刺激するオートクリンループを形成し、腫瘍細胞増殖を促進している可能性が考えられた。さらに、第 2 章の *in vivo* で得られた pVEGFR2 量と PI の相関性を支持する結果であったことから、イヌ腫瘍細胞における VEGF/VEGFR2 シグナルはイヌの生体内腫瘍環境下において腫瘍細胞増殖に重要であると考えられた。

本研究では、*in vitro* において治療時における血中濃度と同程度の濃度のトセラニブが腫瘍細胞の VEGFR2 のリン酸化と生細胞率を減少させることが明らかとなった。このことから、臨床的にもトセラニブは血管内皮細胞だけでなく腫瘍細胞にも作用しており、腫瘍細胞の増殖を直接抑制している可能性が示唆された。先行研究では VEGFR2 阻害剤がヒト非小細胞肺がん細胞やイヌ乳腺腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することが報告されていることから [Devery et al., 2015, Lee et al., 2019, Pal et al.,

2013]、本研究では増殖抑制だけでなくアポトーシスも誘導された可能性も考えられる。一方、異種移植マウスモデルにおいて、トセラニブはイヌ骨肉腫の増殖を抑制するものの、腫瘍細胞のアポトーシスは誘導されないことが報告されている [Sanchez-Cespedes et al., 2020]。これらの知見は、VEGFR2 を標的とした腫瘍増殖抑制のメカニズムが腫瘍の種類により異なる可能性を示唆している。本研究の *in vivo* での結果において、PI と正の相関を示したのは上皮系腫瘍では腫瘍細胞の pVEGFR2 スコアであったのに対し、間葉性腫瘍では MVD であったこともこの可能性を支持しうる。トセラニブによる腫瘍増殖抑制のメカニズムを解明するためには、さらなる研究が必要である。

本研究では、pVEGFR2 量が多い細胞株でのみトセラニブによる生細胞率の減少が認められたことから、増殖機能が VEGF/VEGFR2 シグナルに強く依存する細胞ではトセラニブがより有効である可能性が示唆された。著者の知る限り、本研究はイヌの腫瘍細胞における pVEGFR2 量とトセラニブの効果の関連を示した初めての研究である。Gattino らは、VEGFR2 の mRNA の発現量が他の株よりも高いイヌ骨肉腫細胞株では本研究と同程度の濃度のトセラニブで増殖抑制効果が認められたと報告している [Gattino et al., 2018, Sanchez-Cespedes et al., 2020]。また、ヒトの非小細胞肺癌では VEGFR2 阻害剤が VEGFR2 を過剰発現している腫瘍細胞の増殖を抑制する一方で正常ヒト気管支細胞の増殖は抑制しないことや [Pal et al., 2013]、ヒトのメラノーマにおいて VEGF 中和抗体の細胞増殖抑制効果が VEGFR2 陽性腫瘍細胞で認められるが、VEGFR2 陰性細胞では認められないことが報告されている [Molhoek et al., 2008]。さらに、VEGFR2 の発現量が多いヒト肝細胞癌細胞は *in vitro* において VEGFR2 阻害剤がより効果的であることが示されている [Yang and Qin, 2018]。これらは腫瘍細胞の VEGFR2 の発現量が VEGF/VEGFR2 シグナル阻害による細胞増殖抑制効果に強く影響していることを示しており、本研究の結果から、イヌの腫瘍細胞

では pVEGFR2 量がトセラニブの VEGFR2 阻害による細胞増殖抑制効果に直接影響していると考えられた。

一方で、本研究において pVEGFR2 発現量と増殖能が顕著に低かった細胞株では、トセラニブ添加により生細胞率の上昇が認められた。本研究では生細胞数の測定において WST 法を適用した。WST 法は還元発色試薬と生細胞数中のミトコンドリア内脱水素酵素活性を利用して吸光度測定により細胞数を計測する方法で、MTT 法や MTS 法と同様に細胞増殖評価に幅広く用いられている手法である [Gattino et al., 2018, Kannan et al., 2010, Lin et al., 2017, Yu et al., 2012]。しかし、過去の研究において、細胞に対する薬剤の抗増殖活性や薬剤感受性の評価において同様の手法を使用すると、薬剤誘導による細胞周期の停止に伴う細胞サイズ増大とそれに続くミトコンドリア量の増加により、ミトコンドリアによる還元活性が顕著に増加し、実際の細胞数と乖離した結果が生じることが報告されている [Chan et al., 2013]。実際にイヌの前立腺癌細胞においても、低濃度の薬剤添加で細胞数の減少と MTS 法による細胞生存率の増加がともに観察されている [Klose et al., 2022]。したがって、本研究においても生細胞率の増加が見られた細胞株ではトセラニブの効果が小さく、測定法による影響が大きく出た可能性が考えられた。

以上のことから、本研究においてトセラニブは血管新生だけでなくイヌの腫瘍細胞にも直接作用しており、腫瘍細胞の VEGFR2 リン酸化阻害による腫瘍細胞増殖抑制効果がトセラニブの治療効果に影響を与えている可能性を示した。さらなる研究により、腫瘍細胞の pVEGFR2 量がトセラニブの治療効果予測因子となりうるかもしれない。

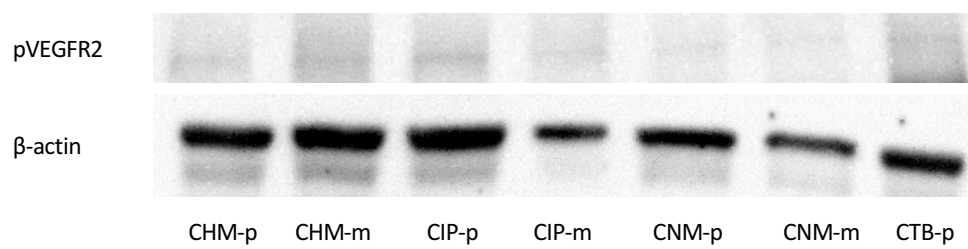


図3-1. 各細胞株におけるpVEGFR2と $\beta$ -actinのタンパク質発現

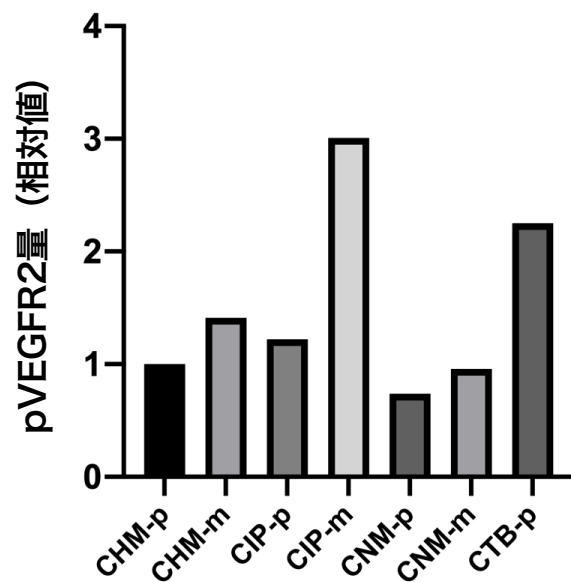


図3-2. CHM-p、CHM-m、CIP-p、CIP-m、CNM-p、CNM-mおよびCTB-pにおけるpVEGFR2量（相対値）

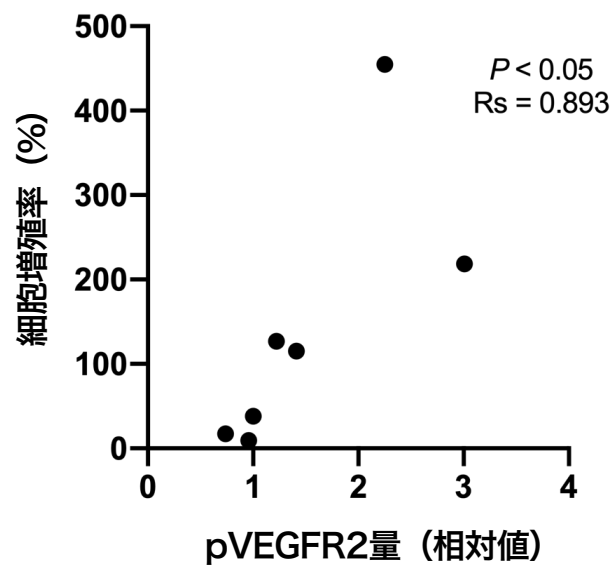


図 3 - 3 . pVEGFR2量と細胞増殖率の相関性  
 $P < 0.05$ ,  $R_s = 0.893$

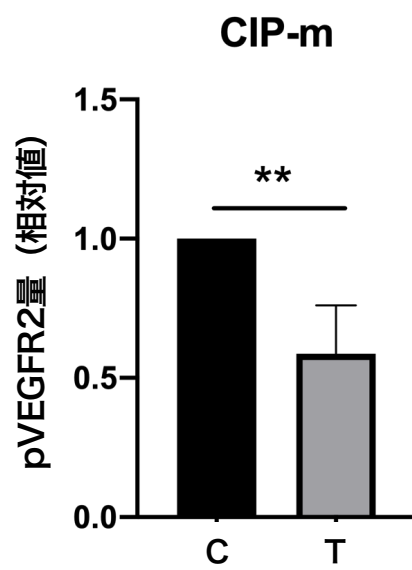


図3-4. CIP-mにおけるコントロールおよびトセラニブ添加後のpVEGFR2量  
C; コントロール, T; トセラニブ  
\*\* $P < 0.01$

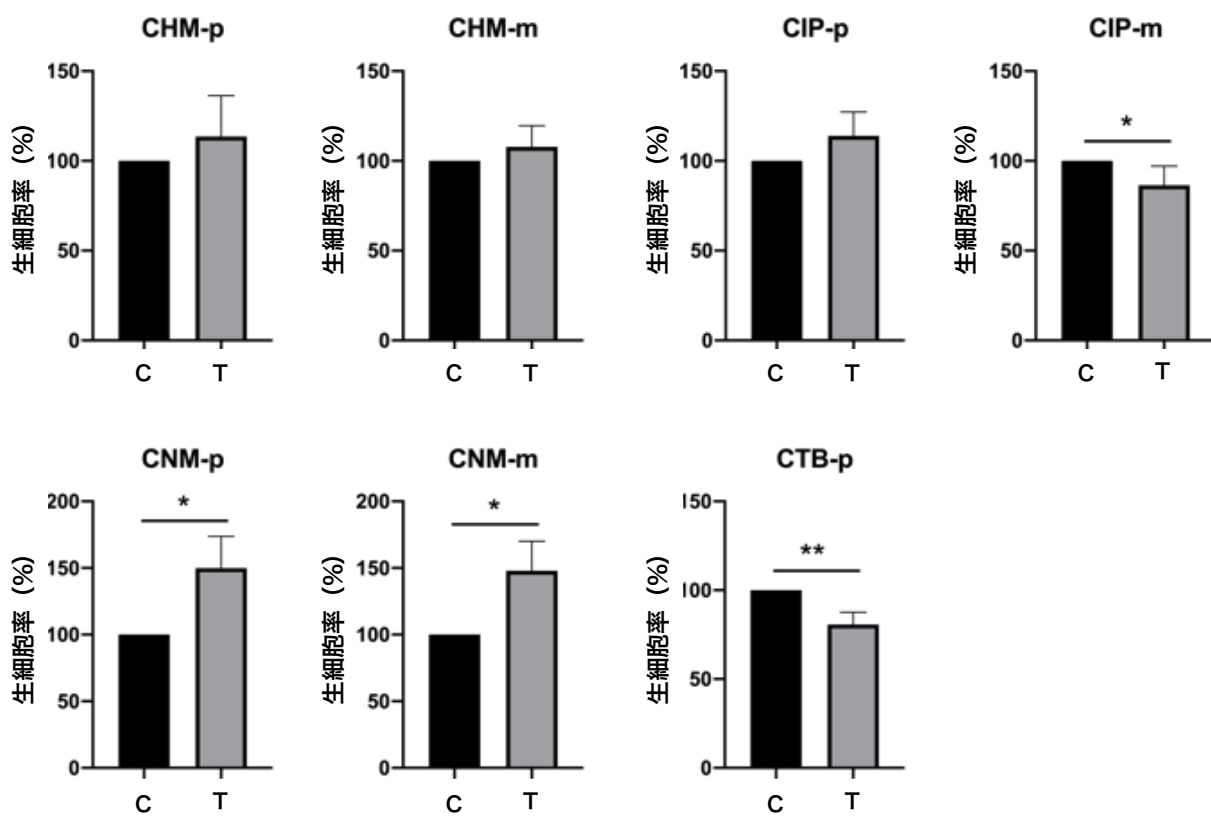


図3-5. 各細胞株におけるコントロールおよびトセラニブ添加後の生細胞率  
 C; コントロール, T; トセラニブ, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$



## 第4章

イヌの上皮系腫瘍と間葉系腫瘍における  
PDGFR のリン酸化とその腫瘍細胞増殖との関連の比較

## 1. 小 緒

PDGFRs (PDGFR $\alpha$  および PDGFR $\beta$ ) は PDGF が結合することで自己リン酸化し、様々なシグナルの活性化を促進する受容体型チロシンキナーゼである。腫瘍における PDGFR $\alpha$  と PDGFR $\beta$  の機能的な違いは明確ではないものの、いずれのシグナル伝達も血管新生や腫瘍細胞の増殖および生存に重要であると報告されている [Alvarez et al., 2006, Heldin and Westermark, 1999, Östman and Heldin, 2007]。いくつかのヒトの腫瘍においては PDGFR $\alpha$  および PDGFR $\beta$  の発現が予後と負の相関を示すことが報告されており [Henriksen et al., 1993, Kilvaer et al., 2014, Kubo et al., 2008, Paulsson et al., 2009]、さらに PDGFR $\alpha$  および PDGFR $\beta$  の発現は PDGFR を標的とした治療における良好な反応の予測に有用である可能性が示唆されている [Dornbusch et al., 2013, Kusuda et al., 2013]。一方、イヌの腫瘍においては様々な種類の腫瘍において腫瘍細胞および間質細胞における PDGFRs の発現が認められているものの [Brown et al., 2012, Hocker et al., 2017, Maniscalco et al., 2013, Milovancev et al., 2016, Urie et al., 2012]、PDGFRs 発現と腫瘍の臨床的な関連についてはメラノーマにおいて PDGFRs の発現が予後不良因子となる可能性が示唆されているのみであり [Iussich et al., 2017]、イヌの腫瘍細胞における PDGFRs の腫瘍の成長への直接的な関与は不明である。

獣医療における PDGFRs を標的とする抗がん剤としては、KIT および PDGFR や VEGFR2 などの血管新生関連因子を標的とする TKI であるトセラニブが挙げられる。トセラニブはイヌの様々な腫瘍に有効であることが示されており、間葉系腫瘍よりも上皮系腫瘍でその治療成績が高い傾向がある [Choi et al., 2021, London et al., 2012, London et al., 2003]。しかし、上皮系腫瘍でより効果的であるメカニズムは不明である。

著者は本研究の第2章および第3章において VEGF/VEGFR2 シグナルに着目し、トセラニブの標的分子のリン酸化量の違いが治療効果に影響を与える可能性を示したことから、VEGFR2 以外の標的分子についても同様に検討する必要があると考えられた。そこで本章では、イヌの上皮系腫瘍と間葉系腫瘍における PDGFR のリン酸化量の差異および PDGFR のリン酸化と腫瘍細胞増殖の関連を明らかにすることを目的とし、イヌの様々な腫瘍において pPDGFR $\alpha$  および pPDGFR $\beta$  の量を上皮系腫瘍と間葉系腫瘍の間で比較し、さらに pPDGFRs の量と腫瘍細胞の PI との相関性を解析した。

## 2. 材料と方法

### 1. 症例および検体

第2章と同様の症例および検体を用いた。各腫瘍の発生組織と診断名は表2-1の通りである。

### 2. 免疫組織化学

第2章・2と同様の手順で、酵素標識ポリマー法により pPDGFR $\alpha$  および pPDGFR $\beta$  について免疫組織化学を行った。抗原賦活化処理は Proteinase K  $\times$  50 (Dako) を室温、6分間反応させることで行い、一次抗体はウサギ抗 Phospho-PDGFR $\alpha$  ポリクローナル抗体 (1:50; AF8196, Affinity Biosciences, Ohio, USA) およびウサギ抗 Phospho-PDGFR $\beta$  ポリクローナル抗体 (1:50; AF4398, Affinity Biosciences) を用いた。抗 pPDGFR $\alpha$  抗体および抗 pPDGFR $\beta$  抗体のイヌに対する交差性は本研究においてウェスタンブロット法を用いて証明した (図4-1)。二次抗体はヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (HRP 標識) (ab214880, abcam) を用い、室温で30分間反応させた。

### 3. 免疫組織化学による評価

#### (1) pPDGFR $\alpha$ および pPDGFR $\beta$ 量の評価

腫瘍細胞における pPDGFR $\alpha$  および pPDGFR $\beta$  量は第2章・3 (2) と同様の方法で IRS を求め評価した。IRS の算出は日本獣医病理学専門家協会会員である佐藤洋博士 (岩手大学) の指導のもと実施した。

### (3) 増殖指数 (PI) の評価

PI は第 2 章・3 (3) と同様の方法で ki-67 陽性細胞数の割合を評価した。

## 4. 統計解析

第 2 章・5 と同様の解析法を用いた。すべての統計解析は GraphPad Prism® program (version 8.0) を用いて実施し、いずれも  $P < 0.05$  を有意差ありとした。

### 3. 結 果

#### 1. 症例情報

第2章の結果と同様である。症例の一般的な特徴や各腫瘍の IRS を表 4-1 に示した。

#### 2. 抗 pPDGFR $\alpha$ 抗体および抗 pPDGFR $\beta$ 抗体による免疫組織化学

pPDGFR $\alpha$  および pPDGFR $\beta$  に陽性を示したすべての腫瘍組織において、pPDGFR $\alpha$  および pPDGFR $\beta$  は基本的に腫瘍細胞の細胞質に観察され、間質細胞にも比較的弱い染色強度を示した。この所見に加え、pPDGFR $\alpha$  スコアが 8 以上であった腫瘍においては、pPDGFR $\alpha$  は腫瘍細胞の細胞膜に集中して局在している所見が観察された。また、複数の腫瘍において pPDGFR $\beta$  は腫瘍細胞の核内にも局在している所見が観察された (図 4-2)。

#### 3. 腫瘍細胞の pPDGFR $\alpha$ および pPDGFR $\beta$ スコアと PI の相関関係

間葉系腫瘍細胞と比較して、上皮系腫瘍細胞は有意に pPDGFR $\alpha$  ( $P < 0.01$ ; 図 4-3a) および pPDGFR $\beta$  ( $P < 0.05$ ; 図 4-3b) のスコアが高かった。pPDGFR $\alpha$  スコアは、上皮系腫瘍 ( $P = 0.272$ ; 図 4-4a)、間葉系腫瘍 ( $P = 0.580$ ; 図 4-4b) とともに PI と相関が認められなかった。pPDGFR $\beta$  スコアも上皮系腫瘍 ( $P = 0.897$ ; 図 4-4c)、間葉系腫瘍 ( $P = 0.381$ ; 図 4-4d) のいずれにおいても PI と相関が認められなかった。

## 4. 考 察

pPDGFR $\alpha$  および pPDGFR $\beta$  の量が間葉系腫瘍に比べて上皮系腫瘍で多いことが明らかとなった。また、pPDGFR $\alpha$  および pPDGFR $\beta$  量はいずれも腫瘍細胞増殖とは関連していなかった。

本研究ではイヌ腫瘍細胞における pPDGFRs 量を評価した。本研究の第 2 章において腫瘍細胞増殖などの機能的な指標との関連の解析には標的分子のリン酸化量を評価することが妥当であることが示されているだけでなく [Kimura et al., 2022]、イヌの口腔線維肉腫における他の先行研究においても、PDGFR 発現と腫瘍増殖の関連を検討するうえでリン酸化の評価が未実施であったことが制限として述べられている [Milovancev et al., 2016]。また、本研究は腫瘍細胞における PDGFR のトセラニブの治療効果への関与を検討することを目的としていたことから、実際の腫瘍組織内における PDGFR の機能性やトセラニブが直接阻害するリン酸化を評価することが重要であると考え、pPDGFRs 量の評価に着目した。

イヌの腫瘍（扁平上皮癌、口腔線維肉腫、肛門嚢腺癌、甲状腺癌および骨肉腫）における先行研究では PDGFR $\alpha$  と PDGFR $\beta$  はともに、主に腫瘍細胞の細胞質に発現していることが報告されており [Maniscalco et al., 2013, Milovancev et al., 2016, Sozmen et al., 2021, Urie et al., 2012]、本研究における pPDGFRs の染色部位も主に腫瘍細胞の細胞質であった。また、イヌの肛門嚢腺癌や鼻腔癌においては PDGFR $\beta$  が特に間質で強発現しているとの報告もあり [Brown et al., 2012, Gramer et al., 2017]、本研究でも複数の腫瘍組織において PDGFR $\beta$  が腫瘍細胞だけでなく間質でも高発現する傾向が認められた。これらのことから、本研究では過去の報告と矛盾のない結果が得られたと考えられた。

また、本研究では複数の腫瘍において pPDGFR $\alpha$  の腫瘍細胞の細胞膜における集

中した局在や、pPDGFR $\beta$ の腫瘍細胞の核内での局在も認められた。PDGFRsなどの受容体型チロシンキナーゼは本来膜タンパク質であるが、細胞内や核にも移行して様々なシグナル伝達機能を発揮することが知られている[Schlessinger and Lemmon, 2006]。イヌの扁平上皮癌と肛門嚢腺癌においては PDGFR $\alpha$ が核内にも発現することが報告されているものの[Sozmen et al., 2021, Urie et al., 2012]、本研究において pPDGFR $\alpha$ は核内に認められなかった。また、核内における PDGFR $\alpha$ の機能についての報告は、ヒトとイヌのいずれにおいても著者の知る限り存在しない。これらのことから、イヌの腫瘍細胞における核内の PDGFR $\alpha$ は腫瘍形成に必須ではない可能性が推察された。一方で、核内における PDGFR $\beta$ は細胞増殖を調節していることがヒトの皮膚線維芽細胞において報告されており[Papadopoulos et al., 2018]、本研究の結果から、イヌの腫瘍においても PDGFR $\beta$ が腫瘍細胞の核内で何らかのシグナル伝達を介している可能性が考えられた。よって、本研究では核内 pPDGFR $\beta$ と PI との関連は認められなかったものの、今後はサンプル数を増やして核内 pPDGFR $\beta$ と腫瘍細胞増殖の関連についても検討していく必要がある。また、本研究における腎細胞癌ではすべてのサンプルで核内における pPDGFR $\beta$ の高発現が観察されたことから、イヌの腎細胞癌では PDGFR $\beta$ の核内移行メカニズムが腫瘍形成に関与している可能性が推察された。

本研究において、イヌの上皮系腫瘍では間葉系腫瘍に比べて腫瘍細胞における pPDGFR $\alpha$  および pPDGFR $\beta$  量が多かった。また、用いたサンプルのうち、先行研究でトセラニブの CBR が報告されている腫瘍において、その CBR と pPDGFR $\alpha$  および pPDGFR $\beta$  スコアを比較したところ、口腔扁平上皮癌 (n=2, CBR; 75%[London et al., 2012]) で pPDGFR $\alpha$ ; 8 および pPDGFR $\beta$ ; 11 $\pm$ 2.1、鼻腔癌 (n=1, CBR; 71%[London et al., 2012]) で pPDGFR $\alpha$ ; 4 および pPDGFR $\beta$ ; 6、骨肉腫 (n=4, CBR; 10[Kim et al., 2017]-47.8%[London et al., 2012]) で pPDGFR $\alpha$ ; 2 $\pm$ 1.9 およ



び pPDGFR $\beta$ ;  $2 \pm 1.5$  と、トセラニブの CBR が高い腫瘍では pPDGFRs のスコアが高い傾向にあった。これらのことから、腫瘍細胞における pPDGFRs 量がトセラニブの治療効果に影響している可能性が示唆された。

腫瘍における PDGFR $\alpha$  と PDGFR $\beta$  の機能について、それらの明確な違いは未だ明らかとなっていないものの [Ehnman et al., 2013, Matei et al., 2006, Oseini and Roberts, 2009, Song et al., 2005, Tsutsumi et al., 2004]、ヒトでは血管新生や腫瘍細胞の増殖および生存など様々報告されている [Alvarez et al., 2006, Heldin and Westermarck, 1999, Östman and Heldin, 2007]。PDGFR $\alpha$  はヒトの横紋筋肉腫の腫瘍細胞の生存と分化に関与していることや [Ehnman et al., 2013]、PDGFR $\beta$  はヒトの膵臓癌や前立腺癌において間質で強く発現し、血管の形態形成や腫瘍細胞の転移に関与していることが報告されている [Hagglof et al., 2010, Yuzawa et al., 2012]。著者の知る限り、本研究はイヌの腫瘍細胞における pPDGFRs 量と腫瘍細胞増殖の関連について調査した初めての研究である。腫瘍細胞の pPDGFR および pPDGFR $\beta$  量は PI と相関していなかったことから、イヌの腫瘍細胞における PDGFRs は腫瘍細胞増殖促進機能を有していない可能性が示され、トセラニブの治療効果には腫瘍細胞における PDGFRs の細胞増殖以外の腫瘍成長に関わる機能が影響していると推察された。細胞増殖以外の機能でそれを阻害することにより腫瘍の退縮が期待できるものとして、腫瘍細胞の生存維持が挙げられる。前述のとおり、実際にヒトの横紋筋肉腫では腫瘍細胞の PDGFR $\alpha$  が腫瘍細胞の生存に関与していることが報告されている。したがって、今後はイヌの腫瘍細胞の PDGFRs が腫瘍細胞の生存維持に関する機能を有している可能性、およびその機序の阻害がトセラニブの治療効果に影響する可能性について検討を行っていく必要があると考えられる。

本研究の制限として、サンプルの臨床的特徴がさまざまであったことが挙げられる。ヒトの腫瘍における PDGFRs の高発現は悪性腫瘍で多く報告されており [Henriksen

et al., 1993, Kilvaer et al., 2014, Kubo et al., 2008, Paulsson et al., 2009]、ヒトの卵巣腫瘍や膵臓腫瘍では良性腫瘍に比べて悪性腫瘍の方が PDGFRs の発現量が多いことが報告されていることから[Fjallskog et al., 2007, Henriksen et al., 1993]、本研究では悪性腫瘍のサンプル数が結果に影響する可能性が懸念された。しかし、本研究において上皮系腫瘍と間葉系腫瘍の間で悪性と良性のサンプル数に統計学的な差はなかった ( $P = 0.4539$ , カイ二乗検定) ことから、今回の結果は上皮系腫瘍と間葉系腫瘍の pPDGFRs 量の差が純粋に反映されていると考えられた。

結論として、イヌの腫瘍細胞の pPDGFRs 量は間葉系腫瘍よりも上皮系腫瘍で高いことが明らかとなった。腫瘍細胞の PDGFR のリン酸化と腫瘍細胞増殖の関連は認められなかったものの、pPDGFRs 量がトセラニブの治療効果に影響している可能性が示唆されたため、今後は腫瘍細胞の PDGFR の機能およびそれに対するトセラニブの作用について研究していく必要がある。

表4-1. 症例情報および腫瘍組織の免疫反応スコア (IRS)

上皮系腫瘍								
No	発生組織	診断名	犬種	年齢	性別	pPDGFR $\alpha$	pPDGFR $\beta$	
1	肺	腺癌	ミニチュア・シュナウザー	12	去勢雄	2	0	
2			バーニーズ・マウンテン・ドッグ	8	去勢雄	4	9	
3			雑種	11	避妊雌	1	2	
4		扁平上皮癌	バセット・ハウンド	9	避妊雌	0	9	
5	副鼻腔	腺癌	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	12	避妊雌	4	6	
6	口腔	扁平上皮癌	ボーダー・コリー	10	避妊雌	8	12	
7			マルチーズ	11	避妊雌	8	9	
8	唾液腺	扁平上皮癌	トイ・プードル	10	避妊雌	3	2	
9	腸	腺癌	雑種	13	去勢雄	6	9	
10			ジャック・ラッセル・テリア	10	避妊雌	1	0	
11			シー・ズー	9	未去勢雄	1	2	
12			トイ・プードル	5	去勢雄	0	9	
13	肝臓	肝細胞癌	バグ	11	避妊雌	6	4	
14			ミニチュア・シュナウザー	12	未去勢雄	1	6	
15			柴犬	11	未避妊雌	0	0	
16			雑種	13	避妊雌	0	12	
17			トイ・プードル	6	避妊雌	2	4	
18			ベキニーズ	10	避妊雌	0	2	
19			ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	12	避妊雌	0	1	
20	腎臓	腎細胞癌	ラブラドル・レトリバー	8	未去勢雄	0	9	
21			雑種	9	去勢雄	0	9	
22			ボメラニアン	10	去勢雄	2	9	
23	前立腺	腺癌	ミニチュア・ダックスフンド	11	避妊雌	2	0	
24	皮下	肛門周囲腺腫	ミニチュア・シュナウザー	11	未去勢雄	2	0	
25			トイ・プードル	10	未去勢雄	4	0	
26			ミニチュア・ダックスフンド	12	避妊雌	0	12	
27			雑種	11	未去勢雄	2	0	
28		毛包上皮腫	雑種	14	避妊雌	1	0	
29		皮脂腺癌	ヨークシャー・テリア	14	避妊雌	1	12	

## 間葉系腫瘍

No	発生組織	診断名	犬種	年齢	性別	pPDGFR $\alpha$	pPDGFR $\beta$	
30	口腔	線維肉腫	トイ・プードル	10	避妊雌	0	1	
31	腸	消化管間質腫瘍	ゴールデン・レトリバー	8	避妊雌	0	0	
32			シベリアン・ハスキー	14	去勢雄	0	0	
33	脾臓	間質腫瘍	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	9	避妊雌	0	0	
34			チワワ	11	未避妊雌	0	0	
35	腎臓	起源の特定できない肉腫	トイ・プードル	11	未去勢雄	0	1	
36	膀胱	起源の特定できない肉腫	アメリカン・コッカー・スパニエル	10	去勢雄	0	2	
37	膣	線維腫	トイ・プードル	13	避妊雌	1	0	
38		平滑筋腫	キャバリア・キング・チャールズ・スパ	11	未避妊雌	2	0	
39	子宮	平滑筋腫	柴犬	11	未避妊雌	0	1	
40			雑種	10	避妊雌	0	1	
41	腹腔	線維肉腫	バーニーズ・マウンテン・ドッグ	6	未去勢雄	0	0	
42	四肢	骨肉腫	秋田犬	13	未避妊雌	0	1	
43			秋田犬	12	避妊雌	2	1	
44			ボルゾイ	6	未去勢雄	0	4	
45			ゴールデン・レトリバー	9	去勢雄	0	1	
46		未分化肉腫	雑種	10	去勢雄	1	8	
47	皮下	軟部組織肉腫	ラブラドル・レトリバー	7	去勢雄	0	6	
48			雑種	8	避妊雌	0	0	
49			ジャック・ラッセル・テリア	11	去勢雄	0	4	
50		血管周皮腫	シェットランド・シープドッグ	11	未去勢雄	1	12	

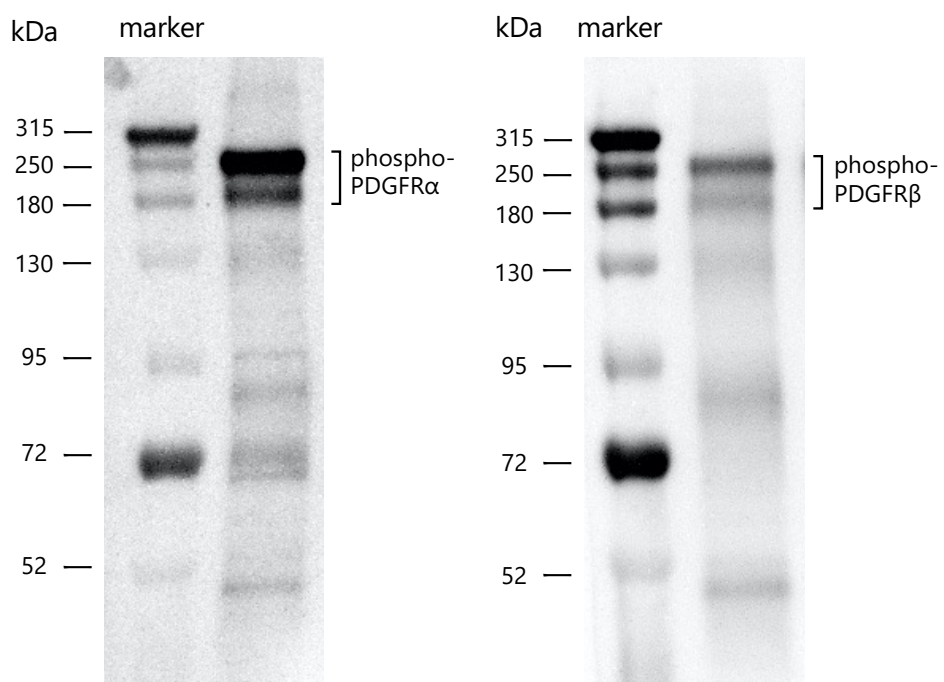


図4-1. ウェスタンブロットによる抗pPDGFR $\alpha$ 抗体および抗pPDGFR $\beta$ 抗体のイヌへの交差性の検証  
 検体にはイヌの肺腺癌を用いた。180-250 kDa付近に特異的なバンドが検出された。

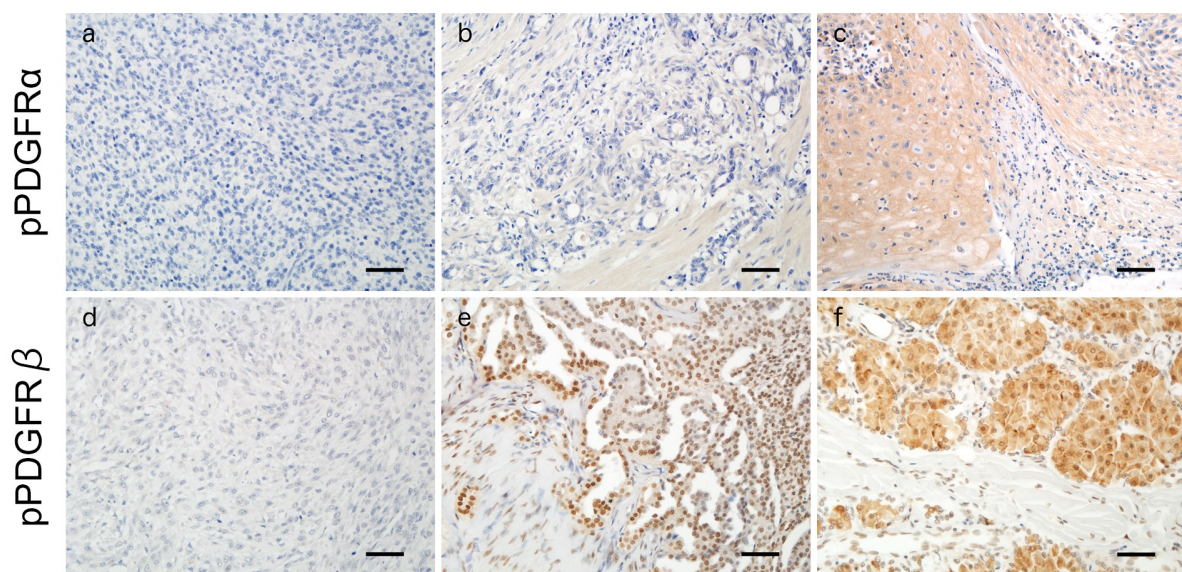


図4-2. 抗pPDGFR $\alpha$ 抗体 (a-c) および抗pPDGFR $\beta$ 抗体 (d-f) による免疫組織化学を施した腫瘍組織 (a) 膀胱の起源の特定できない肉腫におけるpPDGFR $\alpha$ 発現 (IRS; 0) (b) 腸腺癌におけるpPDGFR $\alpha$ 発現 (IRS; 6) (c) 扁平上皮癌におけるpPDGFR $\alpha$ 発現 (IRS; 8) (d) 骨肉腫におけるpPDGFR $\beta$ 発現 (IRS; 1) (e) 腎細胞癌におけるpPDGFR $\beta$ 発現 (IRS; 9) (f) 肛門周囲腺腫におけるpPDGFR $\beta$ 発現 (IRS; 12) 対比染色はヘマトキシリン (青色) にて実施した。Bar = 40  $\mu$  m

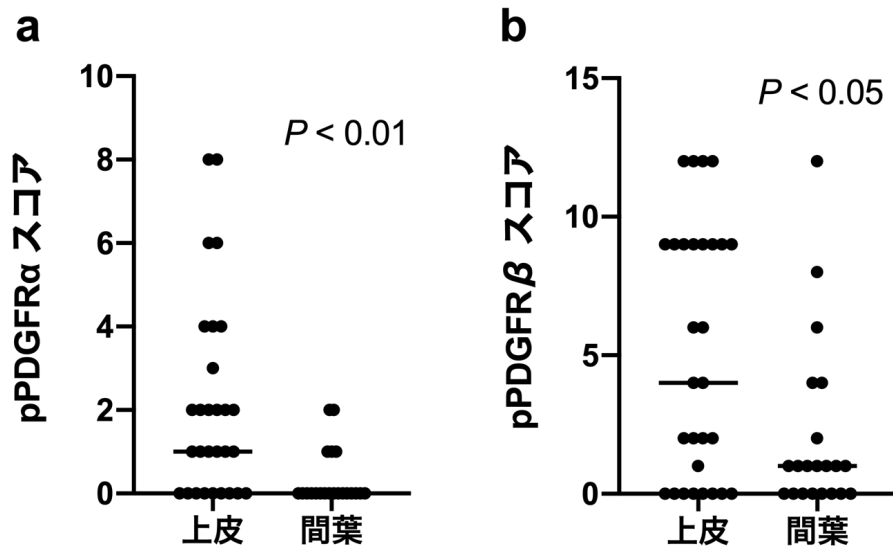


図4-3. 上皮系および間葉系腫瘍における(a) pPDGFR $\alpha$  スコア ( $P < 0.01$ ) および(b) pPDGFR $\beta$  ( $P < 0.05$ ) の比較

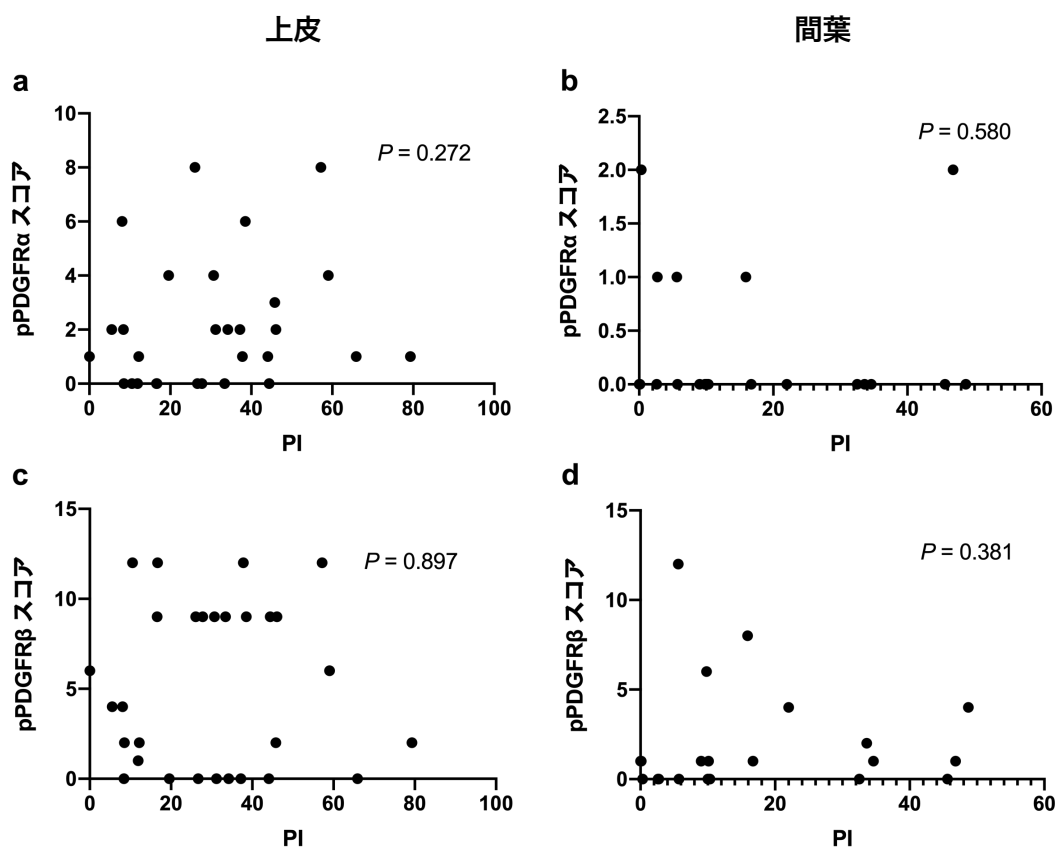


図4-4. pPDGFR $\alpha$ およびpPDGFR $\beta$ スコアとPIの相関性 (a)上皮系 ( $P=0.272$ ) および(b)間葉系 ( $P=0.580$ ) 腫瘍におけるpPDGFR $\alpha$ スコアとPIの相関性(c)上皮系 ( $P=0.897$ ) および(d)間葉系 ( $P=0.381$ ) 腫瘍におけるpPDGFR $\beta$ スコアとPIとの相関性

## 総括



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、VEGFR2 や 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となっている。治療効果予測因子同定のためには治療効果と比較解析していくことが必要であるが、現在治療効果判定は生存期間など長期を要する方法で行われていることが研究の障壁となっている。ヒトの膠芽腫において血管新生阻害療法により MVD が減少することから、血管新生阻害療法の治療効果判定に MVD の評価が有用である可能性が示唆されているが、MVD の評価は生体に対して侵襲性の高い採材法を必要とすることや、手技の観点で主観的評価であることから臨床現場で応用することが難しい。そのため、MVD に代わる低侵襲で客観的な血管新生評価法の確立が必要である。また、トセラニブはイヌの間葉系腫瘍よりも上皮系腫瘍において効果が高い傾向にあり、上皮系腫瘍と間葉系腫瘍の間に VEGFR2 および PDGFR シグナルに関してトセラニブの治療効果に影響を及ぼしうる何らかの差異があると考えられる。しかし、イヌの上皮系腫瘍と間葉系腫瘍における VEGFR2 および PDGFR シグナルに関する比較検討を行った報告は今ところ存在しない。さらに、VEGFR2 や PDGFR は従来それぞれ血管内皮細胞や血管周皮細胞に発現するとされていたが、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それらの分子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、イヌの腫瘍において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。免疫組織学的に算出した MVD と汎血管内皮マーカーである vWF の mRNA 発現量の相関性を解析したところ正の相関を示したことから、vWF の mRNA の定量により血管新生評価が可能であることが明らかとなった。また、ヒトで新生血管内皮細胞に特異的に発現されている endoglin の mRNA 発現量は vWF の mRNA 発現量よりも MVD や VEGFR2 の mRNA 発現量と強く相関していたことから、イヌの腫瘍においても endoglin がより正確な血管新生評価に有用である可能性が示された。さらに、低侵襲な採材法である FNA により得られたサンプルの mRNA 発現量は外科的に切除された腫瘍組織の mRNA 発現量と統計学的に一致していたことから、FNA により得られたサンプルを用いた血管新生評価が可能であることが示された。これらのことから、本研究において血管内皮マーカーの mRNA の定量による低侵襲で繰り返し可能な血管新生評価が可能であることが示された。

第 2 章では、イヌの上皮系腫瘍と間葉系腫瘍における VEGF/VEGFR2 シグナルの比較および腫瘍細胞の VEGFR2 と細胞増殖の関連について検討した。血管新生の指標として第 1 章と同様に MVD や vWF および endoglin の mRNA 発現量、さらに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が、いずれも上皮系と間葉系腫瘍との間に差は認められなかった。次に腫瘍細胞の VEGF、VEGFR2、pVEGFR2 スコアをその染色強度と染色率により求めたところ、いずれも上皮系腫瘍で高い結果となった。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は上皮系腫瘍の pVEGFR2 スコアと正の相関を示した。これらのことから、イヌの上皮系腫瘍と間葉系腫瘍の間に血管新生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 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ことが明らかとなった。

第3章では、第2章をふまえて「腫瘍細胞における VEGFR2 のリン酸化が腫瘍細胞増殖を促進させ、この機序を阻害することがトセラニブの治療効果に影響している」と仮説を立てた。pVEGFR2 量の異なるイヌ乳腺腫瘍細胞株において増殖率やトセラニブによる増殖抑制効果を比較解析したところ、pVEGFR2 量の多い腫瘍細胞は増殖能が高く、さらにトセラニブが血中濃度と同程度の濃度で pVEGFR2 量の多い腫瘍細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。このことから、トセラニブは血管新生だけでなくイヌの腫瘍細胞にも直接作用しており、腫瘍細胞の VEGFR2 リン酸化阻害による腫瘍細胞増殖抑制効果がトセラニブの治療効果に影響を与えている可能性が示された。

第4章では、第2・3章をふまえてイヌの上皮系腫瘍と間葉系腫瘍における PDGFR のリン酸化量の差異および PDGFR のリン酸化と腫瘍細胞増殖の関連について検討した。第2章と同様に pPDGFRs 量を免疫組織化学により解析したところ、pPDGFR  $\alpha$  および pPDGFR  $\beta$  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唆されたが、その作用機序についてはさらなる検討が必要であると考えられた。

本研究ではイヌの腫瘍において臨床現場で応用可能な新たな血管新生評価法を構築し、さらにトセラニブが血管新生だけでなく腫瘍細胞にも作用しており、腫瘍細胞への作用が治療効果に影響するという新たな知見を得ることができた。今後は本研究で得られた知見を、トセラニブ投与症例を用いた臨床試験により検証していくことで、トセラニブの治療効果予測因子の解明に大きく貢献できると考えられる。

## 謝 辞

本論文を終えるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻いただきました本学 山崎真大教授、内田直宏助教、佐藤洋教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本学位論文の完成のために大変有意義なご指導とご助言を賜りました本学 片山泰章教授、山本欣郎教授、大沼俊名准教授、星野有希准教授、小林沙織助教、森田智也助教ならびに東京農工大学 福島隆治教授、打出毅教授、そして、細胞株の供与ならびに貴重なご助言を賜りました東京大学 中川貴之准教授に厚く御礼申し上げます。また、貴重なサンプルの提供にご協力いただきました犬たちとそのご家族に心より感謝申し上げます。さらに、日頃よりご支援とご協力を頂きました本学小動物病態診断学研究室ならびに小動物病態内科学研究室内の学生の皆様、そして、学部時代から同輩として切磋琢磨し合ってきた西浦颯君に深く感謝いたします。最後に、今まで研究に専念できるよう暖かく支え続けてくださった家族に心より感謝いたします。

## 引用文献

1. Adamcic U, Skowronski K, Peters C, Morrison J and Coomber BL (2012) The effect of bevacizumab on human malignant melanoma cells with functional VEGF/VEGFR2 autocrine and intracrine signaling loops. *Neoplasia* 14, 612-623
2. Aesoy R, Sanchez BC, Norum JH, Lewensohn R, Viktorsson K and Linderholm B (2008) An autocrine VEGF/VEGFR2 and p38 signaling loop confers resistance to 4-hydroxytamoxifen in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular Cancer Research* 6, 1630-1638
3. Afshar Moghaddam N, Mahsuni P and Taheri D (2015) Evaluation of endoglin as an angiogenesis marker in glioblastoma. *Iran J Pathol* 10, 89-96
4. Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, Kimura Y, Kinoshita J, Miyazaki M and Abe T (2002) Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery* 131, S109-113
5. Al-Dissi AN, Haines DM, Singh B and Kidney BA (2007) Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor associated with tumor cell proliferation in canine cutaneous squamous cell carcinomas and trichoepitheliomas. *Veterinary Pathology* 44, 823-830
6. Al-Dissi AN, Haines DM, Singh B and Kidney BA (2010) Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. *Canadian Veterinary Journal* 51, 1109-1114
7. Alvarez RH, Kantarjian H and Cortes JE (2006) Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clinic Proceedings* 81, 1241-1257

8. Angrimani DSR, Francischini MCP, Brito MM and Vannucchi CI (2020) Prostatic hyperplasia: Vascularization, hemodynamic and hormonal analysis of dogs treated with finasteride or orchiectomy. *PloS One* 15, e0234714
9. Arao T, Matsumoto K, Furuta K, Kudo K, Kaneda H, Nagai T, Sakai K, Fujita Y, Tamura D, Aomatsu K, *et al.* (2011) Acquired drug resistance to vascular endothelial growth factor receptor 2 tyrosine kinase inhibitor in human vascular endothelial cells. *Anticancer Research* 31, 2787-2796
10. Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Molina-Frechero N, Mori-Estevez AD and Sanchez-Acuna G (2013) Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* 18, e174-179
11. Brewer C, Setterdahl J, Li M, Johnston J, Mann J and McAsey M (2000) Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer. *Obstetrics and Gynecology* 96, 224-228
12. Brown RJ, Newman SJ, Durtschi DC and Leblanc AK (2012) Expression of PDGFR-beta and Kit in canine anal sac apocrine gland adenocarcinoma using tissue immunohistochemistry. *Veterinary and Comparative Oncology* 10, 74-79
13. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES and Thorpe PE (1995) Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clinical Cancer Research* 1, 1623-1634
14. Cao F, Hu YW, Li P, Liu Y, Wang K, Ma L, Li PF, Ni CR and Ding HZ (2013) Lymphangiogenic and angiogenic microvessel density in chinese patients with gastric carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and prognosis.

15. Chan JK, Magistris A, Loizzi V, Lin F, Rutgers J, Osann K, DiSaia PJ and Samoszuk M (2005) Mast cell density, angiogenesis, blood clotting, and prognosis in women with advanced ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 99, 20-25
16. Chen HJ, Treweek AT, Ke YQ, West DC and Toh CH (2000) Angiogenically active vascular endothelial growth factor is over-expressed in malignant human and rat prostate carcinoma cells. *British Journal of Cancer* 82, 1694-1701
17. Chi JT, Thrall DE, Jiang C, Snyder S, Fels D, Landon C, McCall L, Lan L, Hauck M, MacFall JR, *et al.* (2011) Comparison of genomics and functional imaging from canine sarcomas treated with thermoradiotherapy predicts therapeutic response and identifies combination therapeutics. *Clinical Cancer Research* 17, 2549-2560
18. Choi E-S, Song J-H, Shin J-I, Sur J-H, Kang B-T, An S-J, Cho K-W and Jung D-I (2016) Tyrosine kinase inhibitor as clinical application feasibility in canine intractable tumor diseases. *Journal of Veterinary Clinics* 33
19. Choi S-I, Nam Y-L, Kim J-K, Park H-J, Song K-H and Seo KW (2021) Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia) for treatment of different tumor types in 31 dogs. *Korean Journal of Veterinary Research* 61
20. Devery AM, Wadekar R, Bokobza SM, Weber AM, Jiang Y and Ryan AJ (2015) Vascular endothelial growth factor directly stimulates tumour cell proliferation in non-small cell lung cancer. *International Journal of Oncology* 47, 849-856
21. Diessler ME, Castellano MC, Portiansky EL, Burns Sand Idiart JR (2017) Canine mammary carcinomas: influence of histological grade, vascular invasion, proliferation, microvessel density and VEGFR2 expression on lymph node status and survival time. *Veterinary and Comparative Oncology* 15, 450-461



22. Domingues I, Rino J, Demmers JA, de Lanerolle Pand Santos SC (2011) VEGFR2 translocates to the nucleus to regulate its own transcription. *PLoS One* 6, e25668
23. Dornbusch J, Zacharis A, Meinhardt M, Erdmann K, Wolff I, Froehner M, Wirth MP, Zastrow Sand Fuessel S (2013) Analyses of potential predictive markers and survival data for a response to sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *PLoS One* 8, e76386
24. Du JR, Jiang Y, Zhang Y and Fu H (2003) Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas. *World Journal of Gastroenterology* 9, 1604-1606
25. Ehnman M, Missiaglia E, Folestad E, Selfe J, Strell C, Thway K, Brodin B, Pietras K, Shipley J, Ostman A and Eriksson U (2013) Distinct effects of ligand-induced PDGFRalpha and PDGFRbeta signaling in the human rhabdomyosarcoma tumor cell and stroma cell compartments. *Cancer Research* 73, 2139-2149
26. Eikrem O, Walther TC, Flatberg A, Beisvag V, Strauss P, Farstad M, Beisland C, Koch E, Mueller T and Marti HP (2018) Fine needle aspirates of kidneys: a promising tool for RNA sequencing in native and transplanted kidneys. *BMC Nephrology* 19, 221
27. Erber R, Stohr R, Herlein S, Giedl C, Rieker RJ, Fuchs F, Ficker JH, Hartmann A, Veltrup E, Wirtz R and Brueckl WM (2017) Comparison of PD-L1 mRNA expression measured with the checkpoint typer(R) assay with PD-L1 protein expression assessed with immunohistochemistry in non-small cell lung cancer. *Anticancer Research* 37, 6771-6778
28. Ferrara N, Gerber HP and LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 9, 669-676

29. Fjallskog ML, Hessman O, Eriksson Band Janson ET (2007) Upregulated expression of PDGF receptor beta in endocrine pancreatic tumors and metastases compared to normal endocrine pancreas. *Acta Oncologica* 46, 741-746
30. Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine* 285, 1182-1186
31. Fonsatti E, Jekunen AP, Kairemo KJ, Coral S, Snellman M, Nicotra MR, Natali PG, Altomonte Mand Maio M (2000) Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clinical Cancer Research* 6, 2037-2043
32. Fosmire SP, Dickerson EB, Scott AM, Bianco SR, Pettengill MJ, Meylemans H, Padilla M, Frazer-Abel AA, Akhtar N, Getzy DM, *et al.* (2004) Canine malignant hemangiosarcoma as a model of primitive angiogenic endothelium. *Laboratory Investigation* 84, 562-572
33. Fratini P, Carreira AC, Alcantara D, de Oliveira e Silva FM, Rodrigues MNand Miglino MA (2016) Endothelial differentiation of canine yolk sac cells transduced with VEGF. *Research in Veterinary Science* 104, 71-76
34. Furukawa S, Nagaike Mand Ozaki K (2017) Databases for technical aspects of immunohistochemistry. *Journal of Toxicologic Pathology* 30, 79-107
35. Gattino F, Maniscalco L, Iussich S, Biasato I, Martano M, Morello E, Gola C, Millan Ruiz Y, Saeki N, Buracco P, *et al.* (2018) PDGFR-alpha, PDGFR-beta, VEGFR-2 and CD117 expression in canine mammary tumours and evaluation of the in vitro effects of toceranib phosphate in neoplastic mammary cell lines. *Veterinary Record* 183, 221
36. Gramer I, Killick D, Scase T, Chandry D, Marrington Mand Blackwood L (2017)

- Expression of VEGFR and PDGFR-alpha/-beta in 187 canine nasal carcinomas. *Veterinary and Comparative Oncology* 15, 1041-1050
37. Guan J, Darb-Esfahani S, Richter R, Taube ET, Ruscito I, Mahner S, Woelber L, Prieske K, Concin N, Vergote I, *et al.* (2019) Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) correlates with long-term survival in patients with advanced high-grade serous ovarian cancer (HGSOC): a study from the Tumor Bank Ovarian Cancer (TOC) Consortium. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 145, 1063-1073
  38. Gustafson T and Biller B (2019) Use of Toceranib Phosphate in the Treatment of Canine Bladder Tumors: 37 Cases. *Journal of the American Animal Hospital Association* 55, 243-248
  39. Hagglof C, Hammarsten P, Josefsson A, Stattin P, Paulsson J, Bergh A and Ostman A (2010) Stromal PDGFRbeta expression in prostate tumors and non-malignant prostate tissue predicts prostate cancer survival. *PloS One* 5, e10747
  40. Hamerlik P, Lathia JD, Rasmussen R, Wu Q, Bartkova J, Lee M, Moudry P, Bartek J, Jr., Fischer W, Lukas J, *et al.* (2012) Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. *Journal of Experimental Medicine* 209, 507-520
  41. He L, Wang Q and Zhao X (2015) Microvessel density as a prognostic factor in ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16, 869-874
  42. Heaton CM, Fernandes AFA, Jark PC and Pan X (2020) Evaluation of toceranib for treatment of apocrine gland anal sac adenocarcinoma in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 34, 873-881

43. Heishima K, Iwasaki R, Kawabe M, Murakami M, Sakai H, Maruo K and Mori T (2018) Short-Term Administration of Single-Agent Toceranib in Six Cases of Inoperable Massive Canine Hepatocellular Carcinoma. *Journal of the American Animal Hospital Association*
44. Heldin CH and Westermark B (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews* 79, 1283-1316
45. Henriksen R, Funa K, Wilander E, Backstrom T, Ridderheim M and Oberg K (1993) Expression and prognostic significance of platelet-derived growth factor and its receptors in epithelial ovarian neoplasms. *Cancer Research* 53, 4550-4554
46. Hocker SE, Higginbotham ML, Schermerhorn T and Henningson J (2017) Receptor tyrosine kinase expression and phosphorylation in canine nasal carcinoma. *Research in Veterinary Science* 115, 484-489
47. Iussich S, Maniscalco L, Di Sciua A, Iotti B, Morello E, Martano M, Gattino F, Buracco P and De Maria R (2017) PDGFRs expression in dogs affected by malignant oral melanomas: correlation with prognosis. *Veterinary and Comparative Oncology* 15, 462-469
48. Jais A, Klein D, Wolfesberger B and Walter I (2011) Gene expression profile of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in various cell types of the canine lymph node using laser capture microdissection (LCM). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 140, 207-214
49. Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, Rosewell I, Busse M, Thurston G, Medvinsky A, *et al.* (2010) Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nature Cell Biology* 12, 943-953

50. Jin L, Lloyd RV, Nassar A, Lappinga PJ, Sebo TJ, Swartz K, Seys AR, Erickson-Johnson MR, Roth CW, Evers BR, *et al.* (2011) HMGA2 expression analysis in cytological and paraffin-embedded tissue specimens of thyroid tumors by relative quantitative RT-PCR. *Diagnostic Molecular Pathology* 20, 71-80
51. Joo HJ, Oh DK, Kim YS, Lee KB and Kim SJ (2004) Increased expression of caveolin-1 and microvessel density correlates with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *BJU International* 93, 291-296
52. Kilvaer TK, Smeland E, Valkov A, Sorbye SW, Bremnes RM, Busund LT and Donnem T (2014) The VEGF- and PDGF-family of angiogenic markers have prognostic impact in soft tissue sarcomas arising in the extremities and trunk. *BMC Clinical Pathology* 14, 5
53. Kim C, Matsuyama A, Mutsaers AJ and Woods JP (2017) Retrospective evaluation of toceranib (Palladia) treatment for canine metastatic appendicular osteosarcoma. *Canadian Veterinary Journal* 58, 1059-1064
54. Kimura M, Miyahara K, Yamasaki M and Uchida N (2022) 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. *Journal of Veterinary Medical Science* 84, 133-141
55. Kimura M, Yamasaki M, Satoh H and Uchida N (2021) Repeatable and objective method for evaluating angiogenesis using real-time RT-PCR of endoglin expression in canine tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 19, 34-43
56. Knizetova P, Ehrmann J, Hlobilkova A, Vancova I, Kalita O, Kolar Z and Bartek J (2008) Autocrine regulation of glioblastoma cell cycle progression, viability and radioresistance through the VEGF-VEGFR2 (KDR) interplay. *Cell Cycle* 7, 2553-

57. Koltai Z, Szabo B, Jakus J and Vajdovich P (2018) Tyrosine kinase expression analyses in canine mammary gland tumours - A pilot study. *Acta Veterinaria Hungarica* 66, 294-308
58. Komatsu T, Iwano H, Ebisawa M, Watabe A, Endo Y, Hirayama K, Taniyama Hand Kadosawa T (2012) Pathological classification of canine mammary tumor based on quantifying mRNA levels of hormonal receptors, SATB1, and Snail in tissue and fine needle biopsy samples. *Journal of Veterinary Medical Science* 74, 719-726
59. Kopparapu PK, Boorjian SA, Robinson BD, Downes M, Gudas LJ, Mongan NP and Persson JL (2013) Expression of VEGF and its receptors VEGFR1/VEGFR2 is associated with invasiveness of bladder cancer. *Anticancer Research* 33, 2381-2390
60. Kubo T, Piperdi S, Rosenblum J, Antonescu CR, Chen W, Kim HS, Huvos AG, Sowers R, Meyers PA, Healey J and Gorlick R (2008) Platelet-derived growth factor receptor as a prognostic marker and a therapeutic target for imatinib mesylate therapy in osteosarcoma. *Cancer* 112, 2119-2129
61. Kusuda Y, Miyake H, Behnsawy HM, Fukuhara T, Inoue T and Fujisawa M (2013) Prognostic prediction in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sorafenib based on expression levels of potential molecular markers in radical nephrectomy specimens. *Urologic Oncology* 31, 42-50
62. Lanahan AA, Hermans K, Claes F, Kerley-Hamilton JS, Zhuang ZW, Giordano FJ, Carmeliet P and Simons M (2010) VEGF receptor 2 endocytic trafficking regulates arterial morphogenesis. *Developmental Cell* 18, 713-724

63. Lavalle GE, Bertagnolli AC, Tavares W and Cassali GD (2009) Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary Pathology* 46, 1275-1280
64. Lee JH, Li Q, An JH, Chae HK, Choi JW, Kim BJ, Song WJ and Youn HY (2019) Antitumor activity of rivocecanib against canine mammary gland tumor cell lines. *Anticancer Research* 39, 5483-5494
65. Li C, Gardy R, Seon BK, Duff SE, Abdalla S, Renehan A, O'Dwyer ST, Haboubi N and Kumar S (2003) Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis. *British Journal of Cancer* 88, 1424-1431
66. Liang Y, Brekken RA and Hyder SM (2006) Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones. *Endocrine-Related Cancer* 13, 905-919
67. London C, Mathie T, Stingle N, Clifford C, Haney S, Klein MK, Beaver L, Vickery K, Vail DM, Hershey B, *et al.* (2012) Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia((R))) in solid tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 10, 194-205
68. London CA, Hannah AL, Zadovskaya R, Chien MB, Kollias-Baker C, Rosenberg M, Downing S, Post G, Boucher J, Shenoy N, *et al.* (2003) Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clinical Cancer Research* 9, 2755-2768
69. Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T and Sowa M (1996) Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 77, 858-863

70. Maga Gand Hubscher U (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of Cell Science* 116, 3051-3060
71. Maniscalco L, Iussich S, Morello E, Martano M, Biolatti B, Riondato F, Della Salda L, Romanucci M, Malatesta D, Bongiovanni L, *et al.* (2013) PDGFs and PDGFRs in canine osteosarcoma: new targets for innovative therapeutic strategies in comparative oncology. *Veterinary Journal* 195, 41-47
72. Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR and Gill PS (2001) Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood* 98, 1904-1913
73. Matei D, Emerson RE, Lai YC, Baldrige LA, Rao J, Yiannoutsos Cand Donner DD (2006) Autocrine activation of PDGFR $\alpha$  promotes the progression of ovarian cancer. *Oncogene* 25, 2060-2069
74. Millanta F, Silvestri G, Vaselli C, Citi S, Pisani G, Lorenzi D and Poli A (2006) The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Research in Veterinary Science* 81, 350-357
75. Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A, Sedlacek HH, Muller R and Adamkiewicz J (1999) Elevated expression of endoglin, a component of the TGF- $\beta$ -receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *International Journal of Cancer* 81, 568-572
76. Milovancev M, Helfand SC, Marley K, Goodall CP, Lohr CV and Bracha S (2016) Antiproliferative effects of masitinib and imatinib against canine oral fibrosarcoma in vitro. *BMC Veterinary Research* 12, 85



77. Molhoek KR, Griesemann H, Shu J, Gershenwald JE, Brautigian D and Slingluff CL, Jr. (2008) Human melanoma cytotoxicity by combined inhibition of mammalian target of rapamycin and vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor-2. *Cancer Research* 68, 4392-4397
78. Muhammadnejad S, Muhammadnejad A, Haddadi M, Oghabian MA, Mohagheghi MA, Tirgari F, Sadeghi-Fazel F and Amanpour S (2013) Correlation of microvessel density with nuclear pleomorphism, mitotic count and vascular invasion in breast and prostate cancers at preclinical and clinical levels. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 14, 63-68
79. Nishida N, Yano H, Komai K, Nishida T, Kamura T and Kojiro M (2004) Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 101, 1364-1374
80. Oka S, Uramoto H, Shimokawa H, Iwanami T and Tanaka F (2011) The expression of Ki-67, but not proliferating cell nuclear antigen, predicts poor disease free survival in patients with adenocarcinoma of the lung. *Anticancer Research* 31, 4277-4282
81. Okabayashi K, Narita T, Takashiro S, Nadaoka S, Kanai S, Ito D and Kitagawa M (2019) mRNA expression of tumor-associated genes in canine grade I meningiomas. *Journal of Veterinary Medical Science* 81, 369-372
82. Oseini A and Roberts LR (2009) PDGFRalpha: a new therapeutic target in the treatment of hepatocellular carcinoma? *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 13, 443-454
83. Östman A and Heldin CH (2007) PDGF Receptors as Targets in Tumor

Treatment. pp 247-274

84. Paauwe M, Schoonderwoerd MJA, Helderma R, Harryvan TJ, Groenewoud A, van Pelt GW, Bor R, Hemmer DM, Versteeg HH, Snaar-Jagalska BE, *et al.* (2018) Endoglin expression on cancer-associated fibroblasts regulates invasion and stimulates colorectal cancer metastasis. *Clinical Cancer Research* 24, 6331-6344
85. Pal HC, Sharma S, Strickland LR, Agarwal J, Athar M, Elmets CA and Afaq F (2013) Delphinidin reduces cell proliferation and induces apoptosis of non-small-cell lung cancer cells by targeting EGFR/VEGFR2 signaling pathways. *PloS One* 8, e77270
86. Papadopoulos N, Lennartsson J and Heldin CH (2018) PDGFRbeta translocates to the nucleus and regulates chromatin remodeling via TATA element-modifying factor 1. *Journal of Cell Biology* 217, 1701-1717
87. Patruno R, Arpaia N, Gadaleta CD, Passantino L, Zizzo N, Misino A, Lucarelli NM, Catino A, Valerio P, Ribatti D and Ranieri G (2009) VEGF concentration from plasma-activated platelets rich correlates with microvascular density and grading in canine mast cell tumour spontaneous model. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13, 555-561
88. Paulsson J, Sjoblom T, Micke P, Ponten F, Landberg G, Heldin CH, Bergh J, Brennan DJ, Jirstrom K and Ostman A (2009) Prognostic significance of stromal platelet-derived growth factor beta-receptor expression in human breast cancer. *American Journal of Pathology* 175, 334-341
89. Pessina P, Castillo V, Araujo M, Carriquiry M and Meikle A (2012) Expression of thyroid-specific transcription factors in thyroid carcinoma, contralateral thyroid lobe and healthy thyroid gland in dogs. *Research in Veterinary Science* 93, 108-

90. Peters IR, Peeters D, Helps CR and Day MJ (2007) Development and application of multiple internal reference (housekeeper) gene assays for accurate normalisation of canine gene expression studies. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 117, 55-66
91. Rasband WS (1997-2018) ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, Bethesda, Maryland, USA
92. Rawlings NG, Simko E, Bebchuk T, Caldwell SJ and Singh B (2003) Localization of integrin alpha(v)beta3 and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Flk-1) in cutaneous and oral melanomas of dog. *Histology and Histopathology* 18, 819-826
93. Restucci B, Borzacchiello G, Maiolino P, Martano M, Paciello O and Papparella S (2004) Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* 130, 99-104
94. Rodrigues da Rosa Filho R, Morales Brito M, Gomes Faustino T, Lima de Almeida L, Correia Manoel V, Cogliati Band Vannucchi CI (2021) Prostaglandin and antigestagen in pyometra bitches: vascular and stereological effect. *Reproduction and Fertility* 2, 95-105
95. Sanchez-Cespedes R, Accornero P, Miretti S, Martignani E, Gattino F, Maniscalco L, Gola C, Iussich S, Martano M, Morello E, *et al.* (2020) In vitro and in vivo effects of toceranib phosphate on canine osteosarcoma cell lines and xenograft orthotopic models. *Veterinary and Comparative Oncology* 18, 117-127
96. Santos SC, Miguel C, Domingues I, Calado A, Zhu Z, Wu Y and Dias S (2007) VEGF and VEGFR-2 (KDR) internalization is required for endothelial recovery

- during wound healing. *Experimental Cell Research* 313, 1561-1574
97. Schlessinger J and Lemmon MA (2006) Nuclear signaling by receptor tyrosine kinases: the first robin of spring. *Cell* 127, 45-48
  98. Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, van Noorden S, Price Y, Lane DP and Wright NA (1991) A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *Journal of Pathology* 165, 173-178
  99. Shen GH, Ghazizadeh M, Kawanami O, Shimizu H, Jin E, Araki T and Sugisaki Y (2000) Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian carcinoma. *British Journal of Cancer* 83, 196-203
  100. Sheppard-Olivares S, Bello NM, Wood E, Szivek A, Biller B, Hocker S and Wouda RM (2020) Toceranib phosphate in the treatment of canine thyroid carcinoma: 42 cases (2009-2018). *Veterinary and Comparative Oncology* 18, 519-527
  101. Song S, Ewald AJ, Stallcup W, Werb Z and Bergers G (2005) PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nature Cell Biology* 7, 870-879
  102. Sozmen M, Devrim AK, Sudagidan M, Kabak YB and Yildirim F (2021) Expression of angiogenic growth factors in canine squamous cell cancers. *Biotechnic and Histochemistry* 96, 450-459
  103. Sprindzuk M, Dmitruk A, Kovalev V, Bogush A, Tuzikov A, Liakhovski V and Fridman M (2009) Computer-aided image processing of angiogenic histological samples in ovarian cancer. *Journal of Clinical Medicine Research* 1, 249-261
  104. Stewart M, Turley H, Cook N, Pezzella F, Pillai G, Ogilvie D, Cartlidge S, Paterson D, Copley C, Kendrew J, *et al.* (2003) The angiogenic receptor KDR is widely distributed in human tissues and tumours and relocates intracellularly on

- phosphorylation. An immunohistochemical study. *Histopathology* 43, 33-39
105. Swiderska Z, Korzynska A, Markiewicz T, Lorent M, Zak J, Wesolowska A, Roszkowiak L, Slodkowska J and Grala B (2015) Comparison of the manual, semiautomatic, and automatic selection and leveling of hot spots in whole slide images for Ki-67 quantification in meningiomas. *Analytical Cellular Pathology (Amsterdam)* 2015, 498746
106. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR and Ellis LM (1995) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Research* 55, 3964-3968
107. Toi M, Hoshina S, Takayanagi T and Tominaga T (1994) Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Japanese Journal of Cancer Research* 85, 1045-1049
108. Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada Y, Onimaru M, Tanii M, Okano S, Kaneko K, Hasegawa M, Hashizume M, Maehara Y and Sueishi K (2004) Essential role of PDGFRalpha-p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor angiogenesis in vivo: role of PDGFRalpha during angiogenesis. *Circulation Research* 94, 1186-1194
109. Tuder RM, Chacon M, Alger L, Wang J, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Cool CD, Bishop AE, Geraci M, Semenza GL, *et al.* (2001) Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *Journal of Pathology* 195, 367-374

110. Urie BK, Russell DS, Kisseberth WC and London CA (2012) Evaluation of expression and function of vascular endothelial growth factor receptor 2, platelet derived growth factor receptors-alpha and -beta, KIT, and RET in canine apocrine gland anal sac adenocarcinoma and thyroid carcinoma. *BMC Veterinary Research* 8, 67
111. Uyama R, Nakagawa T, Hong SH, Mochizuki M, Nishimura R and Sasaki N (2006) Establishment of four pairs of canine mammary tumour cell lines derived from primary and metastatic origin and their E-cadherin expression. *Veterinary and Comparative Oncology* 4, 104-113
112. Walters L, Martin O, Price J and Sula MM (2018) Expression of receptor tyrosine kinase targets PDGFR-beta, VEGFR2 and KIT in canine transitional cell carcinoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 16, E117-E122
113. Weidner N (1995) Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *American Journal of Pathology* 147, 9-19
114. Weidner N, Semple JP, Welch WR and Folkman J (1991) Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *New England Journal of Medicine* 324, 1-8
115. Yamamoto S, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Komatsu T, Nanbu K, Sakahara H and Mori T (1997) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian neoplasms: correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF levels. *British Journal of Cancer* 76, 1221-1227
116. Yamamoto Y, Tamura R, Tanaka T, Ohara K, Tokuda Y, Miyake K, Takei J, Akasaki Y, Yoshida K, Murayama Y and Sasaki H (2017) "Paradoxical" findings of tumor

- vascularity and oxygenation in recurrent glioblastomas refractory to bevacizumab. *Oncotarget* 8, 103890-103899
117. Yang Cand Qin S (2018) Apatinib targets both tumor and endothelial cells in hepatocellular carcinoma. *Cancer Med* 7, 4570-4583
118. Yuan A, Yu CJ, Chen WJ, Lin FY, Kuo SH, Luh KTand Yang PC (2000) Correlation of total VEGF mRNA and protein expression with histologic type, tumor angiogenesis, patient survival and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *International Journal of Cancer* 89, 475-483
119. Yuzawa S, Kano MR, Einama Tand Nishihara H (2012) PDGFRbeta expression in tumor stroma of pancreatic adenocarcinoma as a reliable prognostic marker. *Medical Oncology* 29, 2824-2830
120. Zanetta L, Marcus SG, Vasile J, Dobryansky M, Cohen H, Eng K, Shamamian Pand Mignatti P (2000) Expression of Von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. *International Journal of Cancer* 85, 281-288