

学位論文題名

犬肥満細胞腫における高ヒスタミン血症発生の
臨床的背景および新規樹立細胞株を用いた
KIT チロシンキナーゼ阻害剤の抗腫瘍効果に関する研究

学位論文内容の要旨

肥満細胞腫 (MCT) は犬で最も発生率の高い悪性腫瘍の一つであるにもかかわらず、本疾患の治療管理における進歩はこれまでにあまり進んでいない。ヒトをはじめ他の動物種において MCT は稀な腫瘍であることから、その病態生理および治療に役立つ情報は非常に少ない。本研究では、MCT に関連する腫瘍随伴症および新規治療法に関して以下の実験を行った。

胃十二指腸潰瘍は MCT に関連する腫瘍随伴症の中でも頻繁に発生し、かつ穿孔した場合には腫瘍罹患犬の直接的死因となる。高ヒスタミン血症はこのような随伴症の発生に関わる主要因と考えられているが、MCT 罹患犬における血中のヒスタミン濃度と随伴症との相関性については依然として明らかにされていない。以上のことから、第 1 章では MCT 罹患犬 11 頭の PHC を 9 か月以上または死亡まで経過を追って測定し、PHC と腫瘍の大きさ、転移状態、臨床徴候および生存期間との関係性を評価した。

その結果、計測可能な腫瘍塊を有する 8 頭の PHC 初回測定値 (中央値 0.73 ng/ml) は健常犬の PHC (中央値 0.19 ng/ml) に対して有意に高値を示した。一方で、肉眼病変をもたない残り 3 頭の PHC 初回測定値と健常犬の PHC の間に有意差はみられなかった。11 頭中 7 頭は治療開始直後の一時期を除いて連続的な PHC の上昇を示し、著しい高ヒスタミン血症を呈した。これら 7 頭は MCT が原因で腫瘍死した。他の 4 頭は調査終了時点において生存中であり、PHC は調査期間を通じて 1 ng/ml を超えなかった。PHC の初回測定時、11 頭中 4 頭に消化管徴候が観察されたが、ヒスタミン 2 (H_2) 受容体拮抗剤の投与によりそれらの徴候は速やかに消退した。消化管徴候を有する犬と無徴候の犬の PHC 間に有意差はみられなかった。その後、7 頭は末期に H_2 受容体拮抗剤で改善されない消化管徴候を発現し、徴候発現時の PHC (中央値 12.2 ng/ml) は著しい高値を示した。

以上の結果から、MCT 罹患犬の PHC は腫瘍の進行に関連した変動を示し、特に進行性 MCT の末期には顕著な高ヒスタミン血症が発生し、H₂ 受容体拮抗剤に抵抗性の消化管徴候を誘発することが示された。

腫瘍の生物学および治療開発において、細胞株を使用した *in vitro* および *in vivo* モデル系は有用な研究手段である。しかしながら、獣医腫瘍学の領域において利用可能な犬の MCT 細胞株は極めて少ない。第 2 章では犬の自然発生腫瘍から *in vitro* 長期継代可能な新規 MCT 細胞株 (CoMS) を樹立し、その性状を解析した。

口唇粘膜原発の MCT を有する犬から腫瘍を採取し、重度複合免疫不全マウスおよびヌードマウスを用いて移植継代した腫瘍から CoMS 細胞を分離した。本細胞株は浮遊状態で増殖し、細胞数の倍加培養時間は 27.0 ± 0.7 時間であった。細胞の形態は直径 10.2 ~ 15.2 μm の円形または卵円形で、その表面には特徴的な絨毛が認められた。細胞質顆粒はトルイジンブルー陽性かつホルマリン高感受性で、ヘパリンとセリンプロテアーゼのキマーゼを優位に含有しており、電子顕微鏡下での電子密度は不均一であった。細胞脱顆粒刺激試験において、CoMS 細胞はカルシウムイオノフォア A23187、サブスタンス P およびコンカナバリン A に反応したが、コンパウンド 48/80 には無反応であった。また、CoMS 細胞は抗 IgE 抗体による刺激に対してほとんど反応しないことから、この所見は本細胞株における機能的な高親和性 IgE 受容体の欠損または低発現を示唆するものと考えられた。

肥満細胞の生物学的特性は各動物種で多様であり、ヒトおよびげっ歯類の肥満細胞株は犬 MCT のモデルとしては必ずしも適当ではない。CoMS 細胞は肥満細胞としての特性に加え、*in vitro* 継代後も原発腫瘍病巣の性質を比較的良好に維持していることが明らかとなった。したがって、CoMS 細胞は犬 MCT の生物学および新たな治療に関する有用な研究手段として利用可能な細胞株であることが示された。

近年、細胞の増殖、分化およびアポトーシスに関与する受容体型または非受容体型チロシンキナーゼを標的分子とした薬剤が開発され、既存の抗腫瘍化学療法剤に抵抗を示す一部の腫瘍に対して臨床的成果をあげている。一方、犬の MCT における KIT 受容体の機能獲得性変異は、リガンド非依存性に受容体チロシンキナーゼ (RTK) を活性化し、KIT の自己リン酸化を誘導することによって本腫瘍の癌化に寄与する。そこで第 3 章では、RTK 阻害剤 AG1296 を用いて犬 MCT に対する抗増殖活性および KIT RTK 阻害効果を *in vitro* で評価し、同時に MCT に対する化学療法剤として一般的に用いられるプレドニゾロンおよびビンブラスチンとの効果の違いについて比較検討した。次いで、AG1296 に近い RTK 阻害ス

ベクトルを有し、かつ動物実験においてマウスへの反復経口投与の可能なことが既に明らかにされている STI571 を用い、マウス移植腫瘍に対する抗腫瘍効果を *in vivo* で検討した。

その結果、AG1296 はプレドニゾロンおよびビンブラスチンに比較して、実験に供した 3 種類の犬 MCT 細胞株 (CoMS、VI-MC および CM-MC) 全てに対して濃度依存性に高い抗増殖活性を示した。AG1296 とプレドニゾロンとを併用した場合の抗増殖活性は、それらの薬剤を単独で用いた場合と比較して全ての MCT 細胞株に対し有意に増強した。AG1296 を 3 μ M で添加培養した場合、細胞数はこれら 3 細胞株のうち 2 細胞株でアポトーシス陽性細胞の増加を伴い経日的に著しく減少した。また、これら 3 細胞株の KIT RTK 活性は AG1296 によって濃度依存性に減少した。STI571 はヌードマウスに移植可能な 2 種類の MCT 細胞株のうち 1 細胞株の移植腫瘍に対して薬剤投与期間中にその増殖を完全に阻害し、他の 1 細胞株対しても腫瘍の増殖を阻害する傾向がみられた。

以上のことから、犬 MCT に対する治療薬として KIT RTK 阻害剤の有用性が示唆された。

本研究により得られた成績をまとめると次のとおりである。MCT 罹患犬において、PHC の変動は本疾患の進行に関連し、高ヒスタミン血症は重篤な消化管障害の発症に関与した。次に、*in vitro* 研究に有用な犬 MCT の新規細胞株 (CoMS) を樹立し、その性状を解析した。この細胞株を含む 3 種類の MCT 細胞株を用いた *in vitro* および *in vivo* 腫瘍モデルに対し、KIT RTK 阻害剤の AG1296 および STI571 は抗腫瘍活性を示した。既存の抗腫瘍化学療法剤に抵抗性で、かつ重篤な消化管障害を誘発するような犬の MCT に対し、KIT RTK 阻害剤は有用な治療薬になる可能性があるものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 永 徹
副 査 教 授 伊 藤 茂 男
副 査 教 授 梅 村 孝 司
副 査 講 師 廉 澤 剛

学 位 論 文 題 名

犬肥満細胞腫における高ヒスタミン血症発生の 臨床的背景および新規樹立細胞株を用いた KIT チロシンキナーゼ阻害剤の抗腫瘍効果に関する研究

肥満細胞腫 (MCT) は犬の腫瘍の中では最も発生率の高い悪性腫瘍の一つである。肥満細胞がアレルギー等の炎症反応において中核を成す細胞であるため、腫瘍が産生する生理活性物質も大きな問題となる特殊な疾患である。しかしながら、その病態については不明な点が多く、また、本腫瘍に対する有効な治療法も十分には確立されていない。

以上のことから、申請者は犬 MCT における病態生理の解明および治療管理法の向上を目指して、以下の研究を行った。

まず、MCT 罹患犬における血漿ヒスタミン濃度の変動とその臨床的背景との相互関係を検討し、血漿ヒスタミン濃度の上昇が本疾患の病態を悪化させ、特に進行性 MCT の末期において高ヒスタミン血症が重篤な消化管障害の発生に重要な役割を演じていることを明らかにした。

次に、これまでに分離が難しいとされている犬の肥満細胞株を樹立し、その生物学的性状を解析した。その結果、樹立細胞株が粘膜組織型、かつキマーゼ型の肥満細胞に由来することが示され、犬の MCT やアレルギー疾患等の基礎研究に細胞株という重要な研究手段を提供した。

最後に、KIT 受容体チロシンキナーゼ (RTK) を標的分子とする新規酵素阻害剤を用いて犬 MCT に対する抗腫瘍活性を検討し、RTK 阻害剤 AG1296 が *in vitro* 培養肥満細胞に対して、さらに AG1296 に近い RTK 阻害剤スペクトルをもつ STI571 が *in vivo* マウス移植腫瘍に対して高い抗腫瘍活性を有することを明らかにした。

以上のように申請者は、犬 MCT における病態生理の解明および治療管理の向上

に有用な知見を提供し、犬の MCT の研究の発展に貢献した。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者石黒武人氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。