

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 チョイスニラチョン ナン

犬の口腔内悪性黒色腫は浸潤性や転移性が高く、これまで様々な治療法が試みられてきたが、その平均生存期間は1年以下と報告されている。一方、近年新しい概念に基づく癌に対する治療法が提唱され注目されている。これはメトロノーム化学療法と呼ばれるもので、シクロフォスファミドなどの抗癌剤を低用量かつ短い間隔で投与することにより、殺細胞効果ではなく制細胞効果によって少ない副作用で“腫瘍休眠状態”を作り出すことを目的としたものである。さらに、最近では抗腫瘍効果を示すことが知られている非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) を組み合わせたメトロノーム化学療法も報告されるようになった。これはメトロノーム化学療法の主な作用機序が、血管新生抑制作用や免疫調整作用によるものと考えられるが、NSAIDs の持つ COX-2 阻害作用が抑制する下流因子の中に血管新生因子である VEGF を含んでおり、両者の組み合わせによって相加相乗的な効果が期待できるためである。犬口腔内悪性黒色腫は、VEGF や COX-2 発現が高いことも知られており、この組み合わせが本腫瘍に対して良好な抗腫瘍効果を示す可能性が考えられる。そこで本研究では、犬口腔内悪性黒色腫に対する低用量のシクロフォスファミドと NSAIDs の1つであるピロキシカムの併用によるメトロノーム療法の有用性を評価するために、犬口腔内悪性黒色腫細胞株を用いた *in vitro* の検討 (第1章)、腫瘍細胞株をヌードマウスに移植した腫瘍モデルを用いた *in vivo* の検討 (第2章)、および口腔内悪性黒色腫の犬の臨床例に対する検討 (第3章) を行った。

第1章では、高い COX-2 発現を示す犬悪性黒色腫由来細胞株 CMM1 を使い、無処置、シクロフォスファミド単独 (CyLD)、ピロキシカム単独 (Px) およびそれらの併用 (CyPx) による CMM1 に対する抗腫瘍効果を、細胞増殖、細胞形態、細胞活性、増殖指数 (PI)、PGE2 産生、関連因子 (VEGF、TSP-1、Bcl-2、ERK/p-ERK) 発現から評価した。処置48時間後の細胞数は、Px、CyPx 群で他の群よりも有意な抑制効果がみられ、これは PI、細胞活性、PGE2 産生、Bcl-2 発現でも同様であった。血管新生抑制因子の TSP-1 は CyLD、CyPx 群で減少がみられたが VEGF には変化がみられなかった。p-ERK 発現はどの治療群でも抑制された。以上の結果から *in vitro* では CyLD、Px およびその組み合わせにより、明らかな血管新生抑制効果は認められなかったが、細胞増殖抑制効果が示された。

第2章では、ヌードマウスへの CMM1 移植モデルを作出し、これを用いて CyLD、Px およびその組み合わせの抗腫瘍効果について検討した。その結果、いずれの薬剤投与群でも重篤な副作用を示すことなく腫瘍増殖抑制効果がみられ、とくに CyPx 群では有意な抑制

効果が認められた。PI は全ての投与群で有意に減少したが、p-ERK の発現強度は Px と CyPx 群のみで低下した。MVD と VEGF 発現は CyPx 群で対照群よりも有意に減少した。免疫染色による血管の性状評価では CyLD 群でのみ正常な血管の比率が低下し、これは同群で特徴的にみられた TSP-1 と VEGF の発現強度の不均衡と一致していた。アポトーシス細胞数は Px、CyPx 群で他の群に比べ有意な増加がみられ、Bcl-2 の発現も両群で低下していた。以上の結果から *in vivo* の条件下では、CyLD と Px の併用によるメトロノーム療法が各薬剤の単独投与よりも優れた抗腫瘍効果を示すことが示された。

第3章では、自然発症の犬口腔内悪性黒色腫の臨床例 37 頭を用いた回顧的研究を行った。全腫瘍例での評価では、PI と臨床病期、色素の有無、生存期間の間に有意な相関が認められたが、MVD との相関はみられなかった。これらの例の治療成績を解析すると、手術、放射線、メトロノーム療法を併用した群のみが無治療群に対して有意に長い生存期間を示した。またそれぞれの症例数は少ないものの、メトロノーム療法を他の療法に組み合わせることで生存期間が延長する傾向がみられた。一方メトロノーム療法による副作用の発現頻度は低く、その程度も軽度であった。

以上の結果から、犬口腔内悪性黒色腫に対する低用量のシクロフォスファミドとピロキシカムの併用は良好な細胞増殖抑制効果や血管新生抑制効果を示し、従来の治療法との併用により少ない副作用で生存期間の延長が期待できると考えられた。

以上本研究は、犬の口腔内悪性黒色腫に対するメトロノーム化学療法の有用性を、培養細胞、細胞移植モデルおよび臨床例において示したものであり、学術上、臨床応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）論文として価値あるものと認めた。