

審査の結果の要旨

氏名 齋藤 友睦

犬における炎症性乳癌(cIMC)は、炎症徴候を伴い、進行が早く、早期に遠隔転移を起こすため予後が極めて不良であることが知られている。一方、上皮間葉転換(EMT)は癌の浸潤、転移に関与する重要な現象と考えられており、上皮系マーカー発現の減少や喪失、間葉系マーカー発現の亢進がみられる。この EMT 誘導因子の一つとして、TGF- β や炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-6 などの関与が示唆されている。cIMC と類似する人炎症性乳癌では、炎症性サイトカインと EMT との関連が示唆されており、cIMC でも同様の機序が働いている可能性が考えられるがその関連についてはほとんど知られていない。

そこで本研究では、cIMC と EMT との関連を非炎症性乳癌(non-cIMC)と比較することにより評価すること、炎症性刺激による cMGT の悪性化と EMT の関係性の評価を行うことを目的とし検討を行った。

第 1 章では、cIMC 及び non-cIMC の組織標本に対し免疫組織化学染色(IHC)及び免疫蛍光染色(IF)を行い、EMT の有無、進行状態及び臨床データとの比較検討を行った。EMT の評価には、IHC では上皮系マーカー(E-cadherin、ZO-1、cytokeratin18)及び間葉系マーカー(vimentin、fibronectin)を用い、IF では E-cadherin と vimentin の二重染色を行った。その結果、cIMC 群の方が E-cadherin、vimentin、fibronectin の発現が変化している症例が多く、発現変化しているマーカー数も cIMC 群で多かった。IF では、E-cadherin 陰性/vimentin 陽性細胞が cIMC 群において有意に多かった。以上より、cIMC では non-cIMC に比べ EMT が進行している可能性が示唆された。

第 2 章では、以降の実験に使用する犬組換えタンパク質、犬 TGF- β (cTGF- β)、犬 TNF- α (cTNF- α)、犬 IL-6 (cIL-6)を作製した。その有用性を評価するために犬腎臓尿細管上皮細胞由来細胞株である MDCK 細胞に作用させたところ、E-cadherin 発現の減少及び形態変化が認められた。このことから、これらのサイトカインは犬由来細胞株に対し EMT を誘導することが明らかになった。

第 3 章では、まず cMGT 細胞株 6 種に対する、各サイトカインによる EMT 誘導を、上皮系マーカー (E-cadherin、ZO-1) と間葉系マーカー (vimentin、N-cadherin、fibronectin) の発現変化により評価した。その結果、細胞株毎に各サイトカイン刺激への反応性は様々であった。この反応性の差異は、これらの細胞株が不均一な細胞集団であることが一因と考えられたため、次に刺激に対して反応性の高かった CIPp 株をクローン化し、その中で最も上皮様の性質が高い CIPp-4b 株を用いて検討を行った。その結果、cTNF- α 刺激、cTGF- β /cTNF- α 刺激により E-cadherin の発現減少及び N-cadherin、fibronectin の発現増加が、cTGF- β /cIL-6 刺激により

vimentin の発現上昇が認められた。このことから、炎症性刺激により cMGT 細胞に EMT が誘導されることが示唆された。

第 4 章では、生体内での炎症性刺激が cMGT 細胞に与える影響について検討した。Balb/c ノードマウスの左腋窩に CIPp-4b 細胞を皮下移植した後、腫瘍内及び周囲に各サイトカイン刺激を行った。その結果、刺激後 2 週間で腫瘍サイズは cTGF- β 刺激、cTGF- β /cTNF- α 刺激群で対照群より増大した。また、cTNF- α 刺激マウスではリンパ節へ、cTGF- β /cIL-6 刺激マウスでは肺への転移が確認された。一方、E-cadherin と vimentin の IF では、原発巣中央部及び転移巣では双方の発現はあるものの、共局在はほぼ認められなかったのに対し、腫瘍辺縁で E-cadherin 発現の低下及び vimentin 発現の亢進が観察された。以上より、炎症性刺激により腫瘍の増大及び悪性化が起きたことが示唆された。

これらの結果から、cIMC では non-cIMC と比較して EMT が進行していること、炎症性サイトカインは *in vitro* において cMGT 由来細胞において EMT 様の現象を誘導すること、*in vivo* において乳腺腫瘍の悪性度を増強することが示唆された。

以上の研究成果は、犬乳腺腫瘍において炎症性刺激が上皮間葉転換と腫瘍の悪性化に及ぼす影響の一部を新たに明らかにしたものであり、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。