

博士（獣医学） BARROGA, EDWARD F.

学位論文題名

A Study on the Differentiation Therapy
of Canine Osteosarcoma with Vitamin D and Retinoids

(イヌの骨肉腫に対するビタミンDおよび
レチノイドによる分化誘導療法に関する研究)

学位論文内容の要旨

イヌの骨肉腫は、攻撃的で致死的な骨格系の悪性腫瘍であり、未分化な骨細胞由来で、未分化な骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨芽細胞などから構成されている。骨肉腫細胞から骨細胞へ正常な分化を誘導することによって、不規則な細胞分化過程が回復し、腫瘍の増殖が抑制され、悪性度の高い細胞活動性は低下する可能性がある。

腫瘍に残存する分化能を確認するため、*in vitro* の実験として、まず第一にPOS骨肉腫細胞とそのクローン細胞であるPOS 53D(骨芽細胞型), POS 53B(軟骨芽細胞型), POS 53C(未分化型)およびPOS 14A(線維芽細胞型)を用いてビタミンD₃とその誘導体(ビタミンD)およびレチノイドによる分化誘導能および増殖抑制効果を調べた。

1,25(OH)₂D₃(カルシトリオール), 22-oxa-1,25(OH)₂D₃(22-oxa-calcitriol=OCT) 25(OH)D₃(コレカルシフェロール), オール-*trans*-レチノイン酸(ATRA)および9-*cis*-レチノイン酸(9-*cis* RA)を10⁻¹⁰から10⁻⁸モル(M)の濃度に調整し、これらの細胞を48から120時間培養した。その結果、POS, POS 53B, POS 53C およびPOS 53Dの細胞形態は伸長した紡錘形に変化した。特に10⁻⁸から10⁻⁷Mの濃度で120時間培養後細胞内小器官数の増加と核の活動性の亢進が認められた。すべての薬剤を10⁻¹⁰から10⁻⁸Mの濃度で用いて72時間培養することによって、POS細胞の増殖は濃度依存性に有意に抑制された(P<0.05)。OCTを10⁻⁹から10⁻⁸Mの濃度で72時間培養した場合にはすべての細胞株の細胞数が有意に減少し、8日間の培養においてOCTは有意な増殖抑制効果を示した(P<0.05)。以上のことから、骨肉腫における細胞分化の制御異常は可逆的であることが明らかとなった。

第二に、POS細胞とそのクローン細胞に対するビタミンDとレチノイドの形態学的分化誘導と増殖抑制が機能的分化と一致しているか否かを検討した。機能的分化は骨分I型コラーゲン(PIP)産生を指標にした*in vitro*の実験で確認した。10⁻⁸Mの濃度のOCT, カルシトリオールおよびATRAで72時間培養した結果、POS細胞のALP, GLA-OC およびPIPの産生は有意に増加した(P<0.05)。骨芽細胞型、軟骨芽細胞型および未分化型のPOSクローン細胞において、OCTとカルシトリオールはすべての機能的分化を誘導したのに対し、ATRAはALP活性のみを誘導した。また、9-*cis* RAとコレカルシフ

エロールは骨芽細胞型と軟骨芽細胞型のPOSクローニング細胞のALP活性を、ATRA, 9-cis RA およびコレカルシフェロールは軟骨細胞型と未分化型のPOSクローニング細胞のPIP産生を各々誘導した。すべての薬剤は線維芽細胞型のPOSクローニング細胞に対して、有意な機能的分化は誘導できなかった。このように骨肉腫細胞が機能的に成熟した骨芽細胞様骨細胞に分化したことから、ビタミンDとレチノイドによる機能的分化誘導は形態的分化誘導と増殖抑制に一致して起こることが示唆された。

さらに、ビタミンDとレチノイドを 10^{-6} Mの濃度で48時間、 10^{-7} Mの濃度で96時間、 10^{-8} および 10^{-9} Mで120時間POS細胞を培養した結果、アポトーシスが誘導された。

イヌの骨肉腫の最も致死的な特徴として肺への転移が挙げられることから、骨肉腫細胞の増殖と肺への転移に対するビタミンDとレチノイドの分化誘導および抑制効果を評価するために*in vivo*の実験を行った。

まず第一に、ヌードマウスの皮下にPOS細胞を移植し、肺転移した腫瘍細胞をさらに別のヌードマウスの皮下に移植する作業を5回繰り返すことによって、イヌの骨肉腫の高頻度肺転移モデルを確立した。POS細胞の親株から転移しやすい性質を持つ細胞を選択することによって、中型で多角形の高頻度転移POS(HMPOS)細胞が得られた。培養中のHMPOS細胞とPOS細胞の平均倍化時間は各々 30 ± 1.2 および 32 ± 1.3 時間であった。HMPOS細胞は皮下移植後12週間で肺組織の置換を伴う様々な大きさ(>直徑1 mm)の腫瘍塊の増殖が多数認められた(>20結節)。それに対し、POS細胞はより小さい(直徑1 mm)肺転移腫瘍塊が少数認められた(<10結節)。肺転移塊の大きさと数は規則的な関連性を示していた。HMPOS細胞は皮下と肺において低分化の骨芽細胞様の腫瘍細胞型に変化した。HMPOSの微小転移は肺の肺胞壁と血管に沿って認められ、多角形の骨芽細胞型に変化した。5, 10, 13 および20個の微小転移結節が認められた平均期間は各々6, 8, 10 および12週間であった。

次に、ヌードマウスの皮下に増殖したHMPOS細胞を用い、OCTとATRAが腫瘍の増殖および肺転移の抑制効果を有するか否かについて検討した。*In vitro*での実験では、HMPOS細胞は形態的に伸長し、そのALP活性および染色性は増強した。*In vivo*の実験においては、OCTとATRAの週3回の併用投与(OCT+ATRA)を皮下に5週間行い、各々 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ の投与量で相乗的で有意な腫瘍の増殖抑制効果が認められた。対照群のマウスのHMPOS細胞は低分化の骨芽細胞様細胞と軟骨芽細胞様細胞から構成されていたが、投与群のマウスのHMPOS細胞は類骨の形成が多くかつコラーゲン組織量の増加が認められた。肉眼的な少量の肺転移結節が対照群のすべてのマウスにのみ認められた。肺微小転移結節はATRAを投与された6頭のマウスのうち2頭にのみ認められたが、結節の大きさと数および肺の湿重量はすべて有意に減少した。OCTあるいはOCTとATRAの併用投与で処置されたマウスにおいて、肺転移は認められなかった。以上のことから、ビタミンDおよびレチノイドの皮下投与は腫瘍増殖と肺転移を抑制することが明らかとなった。

以上の結果をまとめると、本研究によりビタミンD₃およびその誘導体、特にOCTおよびレチノイドはPOSイヌ骨肉腫細胞とそのクローニング細胞の増殖を*in vitro*および*in vivo*で抑制し、肺転移を*in vivo*で抑制することが示され、これらの薬剤が有する分化およびアポトーシスの誘導活性によって抗腫瘍効果が得られるものと示唆された。OCT

およびレチノイドは、獣医臨床において従来の化学療法の補助的治療として有用であり、イヌの骨肉腫の治療において化学療法、外科療法あるいは放射線療法実施後の長時間にわたり使用できるものと期待される。

学位論文審査の要旨

主査 教授 藤永 徹
副査 教授 橋本 晃
副査 教授 桑原 幹典
副査 教授 梅村 孝司

学位論文題名

A Study on the Differentiation Therapy of Canine Osteosarcoma with Vitamin D and Retinoids

(イヌの骨肉腫に対するビタミンDおよび
レチノイドによる分化誘導療法に関する研究)

悪性腫瘍に対する分化誘導療法は、未分化な悪性度の高い細胞活性を低下させ得る治療法である。本研究では、攻撃的で致死的なイヌの骨肉腫に対する分化誘導療法について基礎的に検討した。

まず、ヌードマウスに継代可能なイヌのPOS骨肉腫細胞とそのクローン細胞であるPOS 53D, POS 53B, POS 53CおよびPOS 14Aの5株を用い、ビタミンD₃とその誘導体: calcitriol, 22-oxa-calcitriol (OCT), cholecalciferol, およびレチノイド: all-trans retinoic acid(ATRA), 9-cis RAの*in vitro*細胞増殖抑制効果および分化誘導能について検討した。その結果、POS細胞の増殖は濃度依存性に有意に抑制され、類円形細胞が紡錘形に変化し、細胞内小器官数の増加と核の活動亢進が認められた。また、骨分化指標であるアルカリホスファターゼ活性、オステオカルシン産生およびI型コラーゲン産生が増加し、機能的分化が確認され、さらに、アポトーシスの誘導が活性化された。

イヌの骨肉腫の特徴として、肺への好発転移が挙げられることから、ヌードマウスの皮下にPOS細胞を移植し、肺転移した腫瘍細胞を5回選択継代することによって、イヌの骨肉腫の高頻度肺転移 (HMPOS)細胞株を確立した。これをヌードマウスの皮下移植後、*in vitro*で分化誘導効果の最も高かったOCT, ATRAまたは両者を皮下投与した。その結果、移植部の有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。さらに、対照群では全てのマウスに肺転移が認められたが、OCTあるいはOCTとATRAを併用投与したマウスでは、肺転移は全く認められなかった。

以上のように申請者は、イヌの骨肉腫の治療法として分化誘導療法の有用性を示唆した。本研究の成果は、イヌの骨肉腫の治療に大きく貢献するものと判断される。

断された。よって、審査員一同は上記博士論文提出者 Barroga, Edward Fontanilla 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。