

平成 21年 5月 18日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2006～2008

課題番号：18780233

研究課題名（和文） 犬骨肉腫肺転移巣制御における周術期化学療法の検討

研究課題名（英文） A study on perioperative chemotherapy for regulation of pulmonary metastatic legions in canine osteosarcoma.

研究代表者

高木 哲 (TAKAGI SATOSHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：50396305

研究成果の概要：

犬骨肉腫に対する周術期の抗がん剤治療投与方法についてマウス移植モデルを用いて検討したところ、術前化学療法が術後よりも明らかに有効であるという成果は得られなかったが、血管新生阻害剤の投与によって、肺転移を制御可能であることが明らかとなった。

本研究により従来の化学療法に加え、血管新生の抑制を主たる目的とした低用量による持続的化学療法などが実際の症例においても有用である可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	300,000	3,800,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：治療 犬 骨肉腫

1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞のがんである「骨肉腫」は肺転移を非常に高率に生じる腫瘍であり、犬の骨腫瘍全体の85%を占め、比較的高頻度に遭遇する代表的な悪性腫瘍である。犬の骨肉腫はヒトの骨肉腫患者と同様に若齢と老齢で二峰性に多発し、四肢に多く発生が認められる。従って治療は専ら脚の切断手術が選択されるが、切断した数か月後に肺転移が顕著に増大して死亡することがしばしばある。この現象はO'Reilly (1994)らの研究により解明された。すなわち、(骨肉腫に限らないが)原

発巣からは血管新生阻害物質であるアンギオスタチンが放出されており、その切除によって血管新生の抑制が解除され、もともと存在した微小転移巣の腫瘍が増大するという機序である。多くのヒト患者では微小肺転移が生じる以前の原発巣が小さい時点で診断・治療が実施されるため、このような現象はあまり多くは見受けられない。しかしながら動物では臨床症状が発現するまでに病勢が進行している場合が多く、レントゲンには写らないがほとんどが診断時にはすでに微小転移を生じているといわれている。したが

って特に骨肉腫においては生存期間の延長のためにはいかに肺転移巣を制御できるかが予後を大きく左右するが、現在のところ慣例的にドキソルビシンもしくはカルボプラチンが使用されて、手術単独では約半年間の生存期間が約1年間に延長する程度で、その薬剤の選択や適用方法についてはあまり詳しく検討されているわけではない。

また、犬の骨肉腫の肺転移巣治療においてはもっぱら手術による原発巣の切除後に化学療法を実施することに限定され、抗癌剤の種類についてもあまり十分に検討されているとは言い難い状況である。さらに、転移巣に対する血管新生阻害療法についてもほとんど検討されている状況ではなく、抜本的な治療法は未だ確立されていないことが問題となっている。いわば、手術をした後に関しては抗癌剤を投与して、ただ経過を観察するのみという状況になっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は犬の高肺転移株であるHMPOS細胞あるいは臨床材料より分離した培養骨肉腫細胞を用いて *in vitro* では各種抗癌剤の感受性を検討し、*in vivo* ではそれらの抗癌剤の切除前および切除後の化学療法に対する反応性の検討と、血管新生阻害剤であるTNP-470の有効性について検討し、最終的には臨床例の肺転移巣治療についての新たな治療戦略を提示し、実際の症例で過去の手術後抗癌剤治療症例よりも生存期間を延長させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* における抗癌剤感受性の検討

骨肉腫高肺転移株 HMPOS 細胞および臨床例から分離した培養骨肉腫を用いて、MTT assay により各種抗癌剤および TNP-470 の感受性について評価した。その際、各抗癌剤においては血中濃度に該当する濃度を用いて検討した後に、50%以上の感受性を示す薬剤についてさらに段階希釈を行ってその効果について評価した。

また、直接的に細胞数を計測することによってその傾向がほぼ同じであることを確認した。各薬剤への暴露時間はそれぞれ 72 時間とした。

(2) *in vivo* における抗癌剤投与タイミングの検討

HMPOS 細胞をヌードマウスの背部皮下

に移植後、約 14 日間後から顕微鏡レベルの微小肺転移が生じることが明らかにされている。本研究では 2 週間経過後、抗がん剤(前述の感受性試験結果ではビンブラスチンが極端に有効であったが、本実験では現在臨床例で使用されており、副作用が比較的少ないカルボプラチン 200 mg/m² 3 週間おきを選択した。) 投与してから腫瘍摘出を行った群と、腫瘍摘出してから抗がん剤を使用した群で、2 週間後に安楽殺を行い、肺転移巣の増大傾向の比較を行った。

(3) *in vivo* における血管新生阻害剤投与の有用性の検討

HMPOS 細胞をヌードマウスの背部皮下に移植し、原発巣の腫瘍サイズの変化を観察した。移植してから 10 日目より血管新生阻害剤 TNP-470 を 20 mg/kg で週 3 回投与し、その大きさの変化と肺転移巣の状態を確認した。

大きさの評価には腫瘍の長径および短径を測定し、以下の計算式にしたがって腫瘍体積を計測した。

$$\text{腫瘍体積} = \pi \times \text{長径} \times (\text{短径})^2 \div 6$$

(4) *in vivo* における抗癌剤および血管新生阻害剤投与の効果に関する検討

前述の 2 剤の薬剤を併用投与し、その有用性を評価した。本実験では腫瘍組織の除去は行わず、これらの薬剤を併用することによって、直接的な原発巣の抑制効果と肺転移巣の状況(肺の湿潤重量および病理組織標本)について検討した。

(5) 臨床例における検討

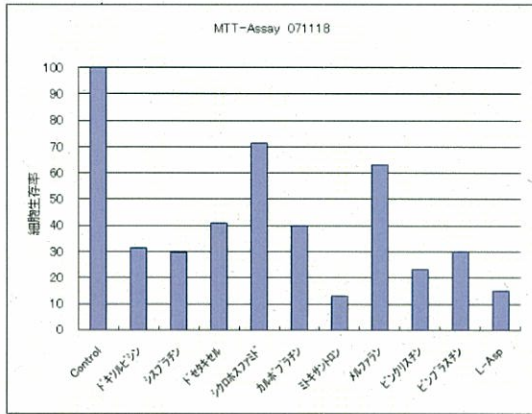
いくつかの臨床例において術前抗癌剤投与法および血管新生阻害剤投与の治療効果判定を試みた。

具体的評価には身体検査、血液検査、X 線検査などを主体に、その症例の投薬に伴う臨床症状および一般状態の変化を観察することで評価を試みた。

4. 研究成果

(1) *in vitro* における抗癌剤感受性

抗癌剤感受性の評価の結果、血中濃度の予測ラインではアルキル化剤を除くほぼ全ての抗癌剤で顕著な細胞障害効果が認められた。その結果を踏まえ、さらに段階希釈列を作成し、検討した結果、特にビンブラスチンで極めて低濃度でも有効であることが明らかとなった。



この後、臨床例5症例より細胞分離し、同様の試験を繰り返して検討した結果、症例によって感受性にばらつきはあったものの、ほぼ全ての症例においてピンブラスチンは著効を示した。

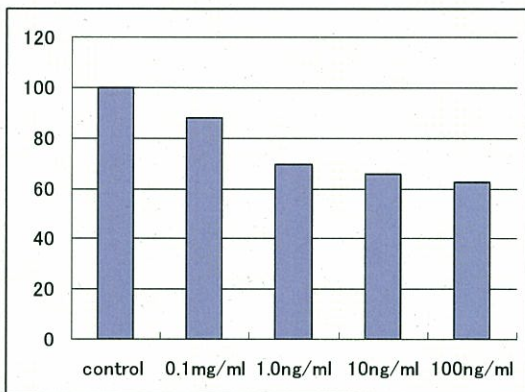
(2) in vivo における抗癌剤投与タイミングの検討

マウスを用いた移植実験の後、肺組織を採材し、その湿潤重量を測定したが、術前化学療法と術後化学療法群で有意差は認められなかった。

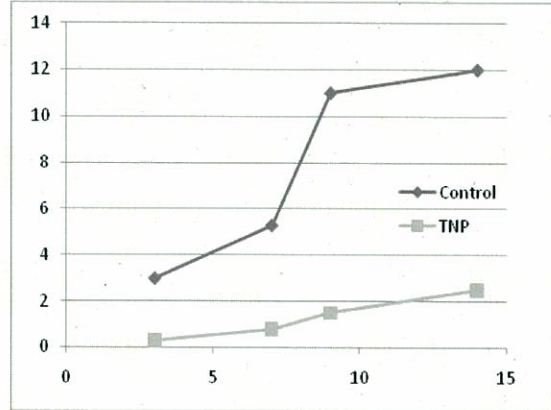
また、肺組織の HE 標本においても明確な違いは認められず、抗癌剤投与のタイミングは肺転移巣の制御には大きく関わらないことが明らかとなった。

(3) in vivo における血管新生阻害剤投与の有用性の検討

前述の抗癌剤投与試験と同じ手技を用いて TNP-470 の細胞増殖抑制効果を調べたところ、対照群と比較して有意に有効であったのは 100 ng/ml の濃度のみであり、ほとんど感受性に大きな違いは認められなかった。



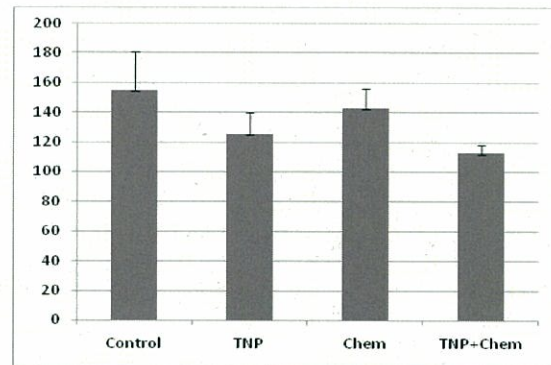
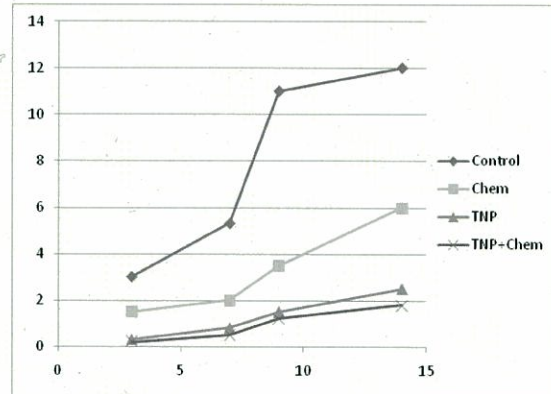
一方、in vivo の検討においては顕著な細胞増殖抑制効果を示し、肺転移巣の制御も良好であった。したがって血管新生阻害剤は直接的には顕著な抗腫瘍効果を示さないが、生体では新生血管を抑制することで明確な抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。



しかしながら、全体で体重が 30% 前後少なめで推移した。これはある程度の副作用があるという可能性と、ヌードマウスは幼若マウスであるため、血管新生阻害剤が各器官の発達に影響を及ぼしている可能性も考えられた。

(4) in vivo における抗癌剤および血管新生阻害剤投与の効果に関する検討

前述の 2 剤の薬剤を併用投与し、他の実験と同様に評価を行った。その結果、薬剤を併



用することによって原発巣および転移巣の制御が可能であった。顕微鏡レベルでも肺転移巣の制御が確認された。

(5) 臨床例における検討

四肢の骨肉腫の臨床例数例において、抗癌剤 (シスプラチン 60 mg/m²) の術前投与を実

施してみたが、原発巣の縮小効果は得られなかった。また、断脚手術後の生存期間は術後化学療法を実施した症例よりも短くなっていた。

また、血管新生阻害剤の投与に関しては100 mg/m²を点滴静注したが顕著な副作用は認められなかった。明確な腫瘍縮小効果は認められなかったが、肺転移巣が縮小した症例が1例認められた。

血管新生阻害剤は研究用試薬であるため、即時臨床応用することは難しいが、抗癌剤の定用量投与などによって同様の効果が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. Hoshino, Y., Tajima, M., Takagi, S., Osaki, T., Okumura, M. and Fujinaga, T. Relative quantification of canine CD56mRNA expression by real-time polymerase chain reaction in normal tissues and activated lymphocytes. 2008. J. Vet. Med. Sci. 70: 309-312. 査読有
2. Hoshino, Y., Takagi, S., Osaki, T., Okumura, M. and Fujinaga, T. 2008. Phenotypic analysis and effects of sequential administration of activated canine lymphocytes on healthy beagles. J. Vet. Med. Sci. 70: 581-588. 査読有
3. Osaki, T., Takagi, S., Hoshino, Y., Okumura, M. and Fujinaga, T. 2007. Antitumor effects and blood flow dynamics after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative monoacid ring A in KLN205 and LM8 mouse tumor models. Cancer Lett. 248: 47-57. 査読有
4. Takagi, S., Hoshino, Y., Osaki, T., Okumura, M. and Fujinaga, T. 2007. Expression of membrane-anchored matrix metalloproteinase inhibitor reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motifs in murine cell lines. Exp. Oncol. 29: 30-34. 査読有

[学会発表] (計1件)

1. 高木 哲 犬における腫瘍マーカーとしてのミッドカインの有用性日本獣医学会 2008. 3. 28 東京・麻布大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 哲 (TAKAGI SATOSHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号: 50396305

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし