

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏名	傅 大任 (Dah-Renn FU)
学位の種類	博士 (獣医学)
学位授与の条件	酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当
学位論文の題目	Study of Prognostic Utilities in Canine Nasal Carcinoma Treated with Radiation Therapy and Radiosensitizing Effects <i>in vitro</i> (犬の鼻腔内癌における放射線治療予後因子と増感効果に関する研究)
審査委員	
主査教授	廉澤 剛 (獣医臨床腫瘍学)
副査教授	谷山 弘行 (獣医病理学)
副査教授	打出 毅 (分子診断治療学)
副査教授	林 正信 (獣医放射線生物学)

**Study of Prognostic Utilities in Canine Nasal Carcinoma Treated with
Radiation Therapy and Radiosensitizing Effects *in vitro***

(犬の鼻腔内癌における放射線治療予後因子と増感効果に関する研究)

酪農学園大学大学院 獣医学研究科 獣医学専攻博士課程 獣医臨床腫瘍学
傳 大任 (Dah-Renn Fu)

Surgery, chemotherapy and radiation therapy are three well-established treatment modalities for animals with cancer disease in veterinary medicine. Radiation therapy is a form of disease treatment by using ionizing radiation. It is becoming increasingly available and high in demand in companion animals with cancers. Recently, there has been an increase in information on its effectiveness in the treatment of a number of different tumor types. Canine nasal tumors are considered one of the most tumor types frequently treated with radiation therapy. Nasal tumors are uncommon but they are nearly all malignant. Canine nasal tumors of carcinomas are more common than those of sarcomas. In this thesis, clinical and immunohistochemical prognostic factors were evaluated in dogs that were diagnosed with nasal carcinoma. Moreover, the mechanisms of radioresistance and radiosensitizing effects were also analyzed for a nasal SCC cell line. This thesis is composed of three chapters.

In Chapter I, we described the outcomes for dogs with nasal carcinoma based on clinical variables. We then compared the survivals for dogs that were treated with such radiation therapy retrospectively in RGU. The median survival time (MST) for all patients with nasal carcinoma treated with radiation therapy in our study was approximately 8 months (241 days), whereas the dogs that did not receive treatment only survived 3.1 months (95 days). Dogs that were diagnosed with SCC had a worse response rate (20%) to radiation than other carcinoma subtypes. The dogs with SCC

also found to have a shorter survival times (178 days) in our study. Additional negative prognostic factors for progression-free survivals (PFS) or overall survival times were observed in this chapter. Regarding clinical signs and CT findings, presence of nasal discharge, facial deformity, exophthalmos at initial presentation, orbital or subcutaneous involvement and cribriform plate destruction were significantly related with PFSs. Dogs with metastasis had a significantly shorter PFS than those without metastatic diseases. Dogs with a partial response were closely correlated with a longer PFS than those with a stable disease. Furthermore, dogs without nasal discharge or with exophthalmos, neurological abnormalities, orbital involvement and cribriform plate destruction were also highly associated with shorter overall survival times. Additionally, dogs with an age less than 11 years had longer survival than dogs with an age greater than 11 years. Presence of metastasis and RT response also had significant correlations with survival times.

In Chapter II, we evaluated the immunohistochemical expression of tumor markers (Ki-67, survivin, EGFR, VEGF, and COX-2) in canine nasal carcinoma. Survivin (89.6%), EGFR (88.1%), VEGF (97%), and COX-2 (82.1%) were expressed in canine nasal carcinoma biopsy samples before treatment. Overexpression of survivin was observed in the dogs with a late clinical stage and worse response to radiation. It also yielded shorter survival times after radiation therapy. Therefore, survivin in our study is strongly suggested a strong prognostic factor for predicting the outcome of canine nasal carcinomas with radiation treatment. On the other hand, although EGFR seemed to show a correlation with the treatment response in the dogs that treated with radiation, it was insignificant. High-EGFR dogs showed significantly shorter overall survival than low-EGFR dogs. High level of VEGF was strongly associated with an advanced-stage in nasal carcinoma but it was not related with survival. COX-2 expression was not associated with clinical features, treatment response and even survivals in our results. Additionally, high Ki-67 expression was closely correlated with an aggressive tumor. Therefore, high-Ki67 dogs were observed

to have shorter survivals after treating with radiation.

In Chapter III, we established a cell line of canine nasal squamous cell carcinoma (CNSC1) and a radioresistant subclone cell line (CNSC1-IR). In our *in vitro* study, CNSC1-IR cells showed a higher level of survivin protein and lower rates of spontaneous and radiation-induced apoptosis than the control CNSC1 cells. Therefore, survivin expression is considered play a role for cellular radiosensitivity. YM155 suppressed the level of survivin protein and then increased radiation induced-apoptosis to enhance the radiosensitivity of the canine nasal SCC cells. It showed that YM155 sensitized CNSC1 and CNSC1-IR cells to radiation *in vitro*. Our results provided a rationale for future preclinical and clinical investigation of therapeutic efficacy of survivin inhibition in combination with radiation therapy. On the other hand, COX-2 inhibitor, celecoxib, also found a synergy effect of combination with radiation. However, neither multi-targeted TKI (toceranib) nor EGFR inhibitor (gefitinib) was shown to alter the radiosensitivity of CNSC1-IR cells in our *in vitro* study.

Based from the results described above, survivin expression is considered a valuable prognostic significance in canine nasal carcinoma. However, additional study of the efficacy of radiation therapy combined with survivin inhibition for improving patient prognosis is necessary, especially in advanced-stage tumors and those that often have a poor response to radiation therapy. This thesis also provides a rationale for future preclinical and clinical investigation of therapeutic efficacy of molecular targeted therapeutic agents in a combination with radiation therapy.

論文審査の要旨および結果

1 論文審査の要旨および結果

審査は、1)体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2)科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

論文の概要について

研究の背景と目的

悪性腫瘍は伴侶動物の主要な死亡原因であり、局所療法である外科療法と放射線療法および全身療法である化学療法が3大柱として行われている。犬の鼻腔内腫瘍は浸潤性が強いものの転移が少ない生物学的挙動を持つため、その治療には局所療法が重要である。鼻腔内という解剖学的理由から局所療法として放射線療法が第一選択となるが、根治する症例はまれである。これまで、犬の鼻腔内腫瘍に放射線治療を行った際の子後因子はいくつか報告されているが、それらの因子に注目し予後を改善しようとする研究は不十分である。そこで本研究では、犬の鼻腔内癌を対象として予後因子を調べ、鼻腔内癌の予後を悪化させる放射線抵抗性を予測する指標分子について解析し、さらに放射線抵抗性を克服するための放射線増感効果について鼻腔内癌培養細胞を用いて検討した。

研究の成果

第一章では、犬の鼻腔内癌の予後因子の探索を目的として回顧的研究を行った。2004年から2013年まで酪農学園大学附属動物病院において鼻腔内癌腫と病理学的に診断された犬84例を対象とし、臨床徴候、臨床ステージと治療法を無増悪期間や生存期間と比較して予後因子について調べた。臨床徴候については、顔面変形、眼球突出、神経徴候、鼻汁の有無が関連し、臨床ステージについては、眼窩、皮下への浸潤、篩板破壊の有無、および転移の有無が予後と関連していた。治療法については、59症例で放射線治療を実施しており、その生存期間の中央値が241日であったのに対して、無治療の16症例は95日と大きく異なった。また、同じ腫瘍であっても放射線感受性に違いが見られ、部分奏効した35症例の生存期間の中央値が254日であったのに対して、変化が認められなかった20症例では173日と有意に短かった。これらの予後因子の多くは腫瘍の進行に伴って生じたものであり、積極的に改善できる余地がある因子は放射線感受性であった。しかし、放射線感受性に差が生じる原因は酸素状態以外には十分に解明さ

れておらず、犬鼻腔内癌の放射線感受性に関連する分子的指標を探索する必要があると考えられた。

第二章では、犬鼻腔内癌の予後に関連する因子を腫瘍組織から探索し、特に放射線感受性に関連する指標分子について検討した。放射線治療前に鼻腔内癌の確定診断のために採材し再検索可能であった組織 67 検体を対象として、ヒトの悪性腫瘍で予後に関連する因子として報告の多い Ki-67, Survivin, EGFR, VEGF および COX-2 蛋白発現を免疫組織化学染色にて評価し、またアポトーシスを TUNEL 法にて評価した。Ki-67 蛋白発現は、T ステージ、篩板破壊の有無と有意な関連性が認められた。Survivin 蛋白発現は、T ステージとの関連性が認められた。また、EGFR の高発現は生存期間の短縮と有意な関連性が認められ、さらに VEGF の高発現については進行性の腫瘍と有意に相関していた。しかし、COX-2 とアポトーシスの発現はいずれとも関連性が認められなかった。一方、放射線感受性に関連する指標分子については、Survivin 発現のみが有意な関連性を認めた。このため、Survivin 発現のコントロールによって放射線抵抗性が変化する可能性が示唆された。

第三章では、犬の鼻腔内癌から細胞株および放射線抵抗細胞株を樹立し、放射線感受性株と抵抗性株との比較を行い、*in vitro* で分子標的治療薬の増感効果について検討した。鼻腔内扁平上皮癌と診断されたミニチュア・シュナウザーから生検により得た組織を初代培養し、CNSC1 と命名した。また、CNSC1 株を放射線 (12 Gy) で 4 回照射し、放射線抵抗性株 (CNSC1-IR) を作成した。放射線抵抗性の CNSC1-IR は、CNSC1 と比較し、Survivin 発現のレベルが高く、自発的アポトーシス率と放射線誘発アポトーシス率が低下した。この結果から、Survivin はアポトーシス阻害と関連があり、細胞の放射線抵抗性を増加させる因子であると考えられた。さらに、Survivin 抑制剤である YM155 を細胞に作用させたところ、Survivin 発現が減少し放射線誘発アポトーシス率を増加させたことから、Survivin 発現のコントロールによって放射線抵抗性を改善できる可能性が高いことが *in vitro* レベルで明らかとなった。

研究の評価

本論文は、根治が難しい犬の鼻腔内癌の放射線治療成績を改善することを目的に、実際に鼻腔内癌を罹患した症例の材料を用いて、放射線抵抗性の克服に道を開く標的分子を明らかにしている。論文構成は、犬の鼻腔内癌の予後因子の探索を目的とした回顧的研究、犬鼻腔内癌の放射線感受性に関連する指標分子の探索、および犬鼻腔内癌の放射線抵抗性細胞株の樹立と放射線感受性および増感効果の検討から成り、各章の目的は明確である。これらの目的のために、過去 10 年間に来院した鼻腔内癌の犬 84 症例を回顧

的に調査し、67検体の組織材料を用いて放射線抵抗性に関連する指標分子を探索した。さらに放射線感受性の異なる犬の鼻腔内癌の細胞株を自ら樹立し、放射線抵抗性に関連する有力な指標分子である Survivin の発現をコントロールすることによって放射線抵抗性を克服する可能性について *in vitro* レベルで検証している。実際の鼻腔内癌症例で放射線抵抗性を変化させ得るかについて *in vivo* レベルでの例証はなされていないが、本論文は、獣医学領域のみならず医学領域の放射線腫瘍学に十分にインパクトを与える内容を有していると考えられる。

以上のことから、本論文は科学的にも獣医学的にも意義が大きいと判断でき、博士(獣医学)の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

2 最終試験の結果

審査委員4名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2015年 2月17日

審査員

主査	教授	廉澤	剛
副査	教授	谷山	弘行
副査	教授	打出	毅
副査	教授	林	正信