

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 20 年度博士課程 入学

氏名 井手 鉄哉

指導教官名 中山 裕之

論文題目 イヌ頭蓋内腫瘍の細胞分化と腫瘍発生に関する病理学的・分子生物学的研究

頭蓋内腫瘍には脳実質を構成する神経上皮組織に由来する腫瘍の他、髄膜組織に由来する髄膜腫や間葉系組織に由来する腫瘍も含まれる。脳や脊髄は周囲を頭蓋骨や脊椎骨で囲われているため、病変を肉眼あるいはレントゲンや超音波などの従来の画像診断機器で診断することが困難であり、獣医学における頭蓋内腫瘍に関する研究には病理解剖が不可欠であった。しかし、1990 年代初頭から高度画像診断技術の導入が進んだことにより、生前検査・診断技術が向上し、中枢神経組織内の病変の質や広がりを確認した上で予後判断や治療法選択が行えるようになった。

一般的に、頭蓋内腫瘍はその種類により抗がん剤や放射線などの治療に対する感受性およびその予後が大きく異なるため、正確に分類することが重要である。しかしながら、動物の神経系腫瘍の WHO 分類が制定されて既に 10 年以上が経過し、さらにこの間、小動物臨床領域における MRI の普及と相まって、動物（特にイヌ）の頭蓋内腫瘍の臨床動向や病理学的特徴に関する情報が飛躍的に増加し、現分類に問題点がいくつか生じてきている。本研究は、イヌの神経上皮性腫瘍、髄膜腫および組織球性肉腫の病理発生機序や進展機序を明らかにし、その生物学的特徴を正確に把握することを目的として遂行された。

第 1 章では、イヌの神経上皮性腫瘍の分類および組織発生に関する研究を行った。動物の神経系腫瘍の WHO 分類では、腫瘍細胞が示す分化の特徴に従い大まかに神経上皮性腫瘍を分類している。しかし近年、幹細胞に関する知見が飛躍的に増加し、神経組織においても神経幹

細胞の概念が確立され、従来の動物の神経上皮性腫瘍の組織診断分類や病態解釈が大きく修正される可能性がある。本章では、イヌの神経上皮性腫瘍 30 例について、細胞の分化や増殖に関連するマーカーの発現を免疫染色にて検索し、その結果に基づいて階層クラスター解析を行うことで、イヌの神経上皮性腫瘍の分類を再検討した。その結果、WHO 分類の記載の通り、星状膠細胞性腫瘍、脈絡叢性腫瘍、神経細胞腫および神経芽腫は、比較的均一な分化方向を示す腫瘍細胞より構成され、髄芽腫および原始神経外胚葉性腫瘍は極めて多彩な分化傾向を示す腫瘍細胞より構成されることが明らかになった。しかし、形態学的に稀突起膠細胞性腫瘍と診断されていた腫瘍は、原始神経外胚葉性腫瘍と同様の多彩な分化能を有する非常に未分化な腫瘍であり、由来不明の膠細胞性腫瘍とされていた大脳膠腫症は、様々な膠細胞の反応性増生を伴う未分化な細胞の脳内浸潤亢進を特徴とする疾患であることが判明した。さらに、イヌの神経上皮性腫瘍における細胞増殖関連シグナル伝達系の関与を評価したところ、星状膠細胞性腫瘍と一部の原始神経外胚葉性腫瘍で、チロシンキナーゼ受容体である EGFR と c-erbB2 のシグナル経路の異常が腫瘍発生に関与していることが示唆された。また、多くのイヌの神経上皮性腫瘍で、Bcl-2 と Bcl-xL が相補的に腫瘍細胞のアポトーシスを抑制し、結果として腫瘍細胞の生存・増殖を助長していると考えられた。

第 2 章では、イヌの髄膜腫の分類および予後因子に関する研究を行った。WHO 分類では、髄膜腫をその生物学的挙動の相違から大きく通常型（良性）と退形成型（悪性）に分類している。髄膜腫の診断の際には、通常型と退形成型を区別することが再発や転移予測において非常に重要である。本章では、イヌの髄膜腫 55 症例を用いて、腫瘍細胞の神経組織内浸潤に着目し、髄膜腫の退形成型の診断に有用なマーカーを検討した。正常髄膜上皮の細胞膜に発現している E-cadherin は腫瘍化に伴い発現が減弱し、代償的に N-cadherin が発現するようになった。すると細胞膜で E-cadherin と連結している beta-catenin は核内へと移行する傾向が認められた。さらに、神経芽細胞の脳内移行に関与する Doublecortin が腫瘍の神経組織内浸潤部で腫瘍細胞の細胞質に強く発現するようになった。増殖細胞マーカーである Ki-67 の陽性率は退形成型で高かった。以上のことから、N-cadherin、核内移行 beta-catenin および Doublecortin の発現がイヌの髄膜腫の進展に関連していることが示唆された。また、統計学的に核内移行 beta-catenin、Doublecortin および Ki-67 の発現率が通常型よりも退形成型で有意に高いことが判明し、線型判別解析によりこれら 3 つは単独で使用しても髄膜腫の悪性度の判別にある程度の有用性を示すことが明らかになった。そのため、病理診断に際しては、通常の HE 標本で得られる知見にこれらのマーカーの発現状態を加味して通常型ないし退形成型の判断をすることで、より客観的エビデンスに基づく診断をすることが可能になると思われる。また、顆粒細胞型髄膜腫は大脳髄膜の広範囲に進展病変を形成し、クモ膜上皮が本来発現すべき E-cadherin、beta-catenin 等の細胞接着因子の発現を欠き、生物学的特徴が他の通常型髄膜腫とは異なっていた。このため、顆粒細胞型髄膜腫を従来のように通常型髄膜腫として分類するには問題があると考えられた。

第 3 章では頭蓋内原発の組織球性肉腫の病理組織学的特徴および腫瘍細胞の免疫組織化学的特徴を詳細に検討した。イヌでは近年、頭蓋内の組織球性肉腫が多く診断されるようにな

り、髄膜腫との鑑別が必要になっている。通常の組織球性肉腫はリンパ性組織や軟部組織に病巣を形成し、バーニーズ・マウンテン・ドッグなどの大型犬種に好発することが知られているが、頭蓋内組織球性肉腫ではリンパ性組織や軟部組織に特に病変がなく、頭蓋内に限局する症例が多い。検索した 20 症例の頭蓋内原発組織球性肉腫はその発生に性差はなく、平均発症年齢は 8.4 歳であり、中型犬種であるウェルシュ・コーギー・ペンブローク (WCP) 犬に高率 (60%) に発生することが明らかになった。本研究では頭蓋内原発組織球性肉腫の増殖パターンを大きく 2 つに分類した。すなわち、髄膜腫のように孤在性腫瘤を形成するもの (孤在型) が 18 症例、髄膜の広範囲にび漫性に浸潤するもの (び漫型) が 2 症例である。両型の細胞形態に相違は認められなかった。マクロファージ・組織球系列のマーカーである HLA-DR alpha-chain (MHC class II) と Iba1 およびマクロファージのマーカーである CD163 と CD204 に対する免疫染色を行ったところ、CD163 と CD204 が孤在型とび漫型を区別するマーカーとして有用であることが明らかになった。加えて、頭蓋内原発の組織球性肉腫と通常の組織球性肉腫では腫瘍形成部位および好発犬種が明らかに異なることから、それぞれには異なる病因因子が関与していると考えられた。

第 4 章では、WCP 犬で組織球性肉腫が多発する原因を調べるため、国内の WCP 犬における過去 3 年間の組織球性肉腫の発生状況を調査したところ、特に頭蓋内と肺に好発することが明らかになった。そのため、WCP 犬は組織球性肉腫罹患リスクに関連するゲノム・遺伝子群に特有の SNP (一塩基多型) を有していると予想し、組織球性肉腫罹患症例 3 例および健常症例 1 例について、次世代シーケンサーにより全ゲノム配列を決定して、罹患症例に特有の SNP の有無を明らかにした。すなわち、罹患症例の全エクソン領域で共通してみられる SNP を検出し、さらに腫瘍組織の網羅的遺伝子発現解析により、実際の腫瘍細胞で発現している遺伝子群に関連する SNP を抽出した。これらの SNP から特に遺伝子機能への影響が大きい SNP のみを選択した。その結果、罹患症例では *Bone marrow kinase gene on X chromosome (BMX)* 遺伝子のエクソン 8 の SNP により、第 237 番アミノ酸が Ala から Thr へと変異し、同タンパク質の SH3 様ドメインの構造が変化していることが明らかになった。BMX は JAK-STAT シグナル経路を活性化し、ヒトでは様々な腫瘍の病理発生に関与している。BMX 遺伝子は組織球性肉腫の腫瘍細胞でも有意に発現していることが確認されたことから、本腫瘍の病理発生に関与している可能性は高いと考えた。以上の結果から、WCP 犬において BMX 遺伝子のエクソン 8 に存在する SNP を検出することは、組織球性肉腫罹患リスクを予測するうえで有用と考えた。

以上の一連の結果より、イヌの神経上皮性腫瘍では多方向性分化能を有する神経幹細胞様の細胞の増殖が関与すること、髄膜腫では細胞接着分子の発現変化や Doublecortin の発現がその進展機序に重要であることが明らかになった。これらの研究成果は、イヌの頭蓋内腫瘍の分類、組織発生および腫瘍化のメカニズムを解明していく上で、貴重な情報となると考えられた。また、日本国内の WCP 犬に頭蓋内組織球性肉腫が多発していることが明らかになり、本腫瘍の感受性遺伝子 1 つとして BMX 遺伝子が同定された。本研究で得られた一連の知見は、イヌの頭蓋内腫瘍の病理発生機序を解明していく上で極めて重要と思われた。