

## 論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 29 年度博士課程 入学

氏名 平林 美幸

指導教員 内田 和幸

論文題目：犬と猫の組織球増殖性疾患の分類および病理発生機序に関する研究

組織球が反応性または腫瘍性に増殖する疾患群は組織球増殖性疾患と総称され、発生は特に犬で多く、猫やヒトでは稀とされる。犬と猫の組織球増殖性疾患は、病変の分布と増殖する組織球の種類および異型性の程度に基づいて分類される。各疾患の病態は多様で、自然治癒するものや、診断後数日から数ヶ月で貧血や臓器不全により死に至るものまで様々である。猫の組織球増殖性疾患は、肺においてランゲルハンス細胞（LC）が増殖する肺ランゲルハンス細胞組織球症（LCH）、全身緒臓器で間質樹状細胞（iDC）が増殖する組織球性肉腫（HS）および猫の進行性組織球症（FPH）、血球を貪食するマクロファージが増殖する血球貪食性 HS に分類される。いずれの疾患においても組織球が腫瘍性に増殖し、病態の進行に伴い死に至る。猫の組織球増殖性疾患のなかでは HS と FPH の発生が比較的多いが、その病態や生存期間について多症例を用いて詳細に検証した報告がなく、有効な治療法も確立していない。また、病理診断に有用な猫の組織球マーカーに関する情報は非常に少ない為、病変の発生部位と増殖組織球の異型性の程度に基づいて診断されることが多い。一方、犬の組織球増殖性疾患は反応性増殖疾患と腫瘍性疾患に大別される。反応性増殖疾患には、活性化した iDC が増殖する皮膚組織球症と全身性組織球症（SyH）が含まれる。また、腫瘍性疾患には、LC が増殖する皮膚組織球腫と皮膚 LCH、iDC が増殖する HS と樹状細胞白血病、および血球を貪食するマクロファージが増殖する血球貪食性 HS が含まれる。これらのうち HS は発生様式に基づいて、単一臓器およびその領域リンパ節に病変を形成する限局性 HS と多臓器に病変を形成する播種性 HS に細分類される。これらの疾患の病態はオーバーラップすることが多く、病理診断において疾患を明確に分類することは難しい。病理診断では、Iba-1、CD204 および E-cadherin などのマーカーを用い、増殖細胞の免疫表現型に基づいて疾患分類を行うが、犬の正常組織または炎症病変における組織球マーカーの発現解析は十分行われていない。動物の組織球増殖性疾患の治療法は、犬の HS に関して最も多くの研究がな

されている。犬の HS に対しては化学療法が適用されるが、有効性が確認されているものはニトロソウレア系アルキル化剤の Lomustine のみで、その延命効果は小さい。近年、犬の HS において分子標的薬の有効性が検証されているが、HS の腫瘍細胞の増殖および生存は単一の分子機構に依存しないことが示唆されている。本疾患の病態は多様であり、疾患ごとに細胞増殖メカニズムが異なる可能性があることから、治療法の開発には各疾患の病理発生メカニズムを分子レベルで明らかにすることが不可欠である。本研究では、犬と猫の組織球増殖性疾患について各疾患の病理学的特徴と細胞増殖メカニズムを解明すると共に、これらの疾患に汎用性のある治療薬候補を探索することを目的とした。

第 1 章では、組織球増殖性疾患が除外された猫の組織と、25 例の HS と 6 例の FPH を用いて、正常組織球および各疾患の増殖細胞の免疫表現型を、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を用いてそれぞれ検討し、さらに FPH と HS の生存期間を比較検討した。また、FPH の細胞株 (AS-FPH01) を新規に樹立し、その細胞定性と細胞移植による *in vivo* モデルの確立を行った。検討の結果、HS の生存期間 (中央値 150 日) は FPH の生存期間 (中央値 470 日) よりも有意に短かった。免疫組織化学的に、各種組織球は Iba-1、HLA-DR、E-cadherin、CD204、CD163、CD208 および MAC387 に様々に陽性で、iDC とマクロファージは CD204+/E-cadherin<sup>-</sup>、LC は CD204-/E-cadherin<sup>+</sup>であった。また、リンパ節に CD204+/E-cadherin<sup>+</sup>を示す LC 様細胞が認められた。FPH と HS の増殖細胞は CD204+/E-cadherin<sup>-</sup> (iDC/マクロファージ免疫表現型) または CD204-/E-cadherin<sup>+</sup> (LC 免疫表現型) で、一部の HS は CD204+/E-cadherin<sup>+</sup> (LC 様細胞免疫表現型) であった。さらに、E-cadherin 陰性 FPH に由来する AS-FPH01 細胞の免疫染色およびウエスタンブロット (WB) 解析により、培養細胞が *in vitro* および *in vivo* で CD204+/E-cadherin<sup>+</sup>を示すことが明らかになった。これらの結果により、猫の HS および FPH の増殖細胞の免疫表現型は微小環境により変化し、多様な iDC/マクロファージおよび LC マーカーの発現パターンを示すことが確認された。

第 2 章では、組織球増殖性疾患が除外された犬の組織と、38 例の犬の組織球増殖性疾患の症例を用いて、正常組織球および各疾患の増殖細胞の免疫表現型を FFPE 標本を用いて検討した。また、播種性 HS と SyH から新規に樹立した細胞株を用いて、各疾患の増殖細胞を定性した。免疫組織化学的に、iDC とマクロファージは CD204+/E-cadherin<sup>-</sup>、LC は CD204-/E-cadherin<sup>+</sup>であった。また、リンパ節に CD204+/E-cadherin<sup>+</sup>を示す LC 様細胞が認められた。犬の組織球増殖性疾患では、限局性 HS と播種性 HS の増殖細胞は CD204+/E-cadherin<sup>-</sup> (iDC/マクロファージ免疫表現型) または

CD204+/E-cadherin+ (LC 様細胞免疫表現型) で、1 例の播種性 HS で CD204+/E-cadherin+ (LC 免疫表現型) を示す細胞の増殖を認めた。皮膚組織球症と SyH の増殖細胞では核近傍に E-cadherin の陽性反応を認めた。これらの結果から、犬の組織球増殖性疾患の増殖細胞は、多様な iDC/マクロファージおよび LC マーカーの発現型を示すことが明らかになった。また、播種性 HS 由来の FCR-DHS03 細胞および FCR-DHS04 細胞と、SyH 由来の BMD-SyH01 細胞の免疫染色および WB 解析により、増殖細胞の E-cadherin 発現パターンが微小環境によって変化することが明らかになり、播種性 HS 細胞はリンパ節のベール細胞および LC 様細胞と類似の免疫表現型を示していた。また、SyH の増殖細胞は悪性転化により播種性 HS の増殖細胞と類似の免疫表現型と増殖能を持つ細胞へ変化することが示唆された。

第 3 章では、2 章で用いた犬の播種性 HS、限局性 HS、SyH および LCH の細胞株の mRNA 発現を網羅的に解析し、細胞増殖に関わる遺伝子の発現量を比較した。さらに解析結果を基に分子標的薬の対照となりうる候補分子を探索し、犬と猫の組織球増殖性疾患の細胞株に対する細胞増殖抑制効果を *in vitro* および *in vivo* で検証した。RNA シークエンス解析では、細胞株のクラスタリングにより、SyH 由来の BMD-SyH01、播種性 HS 由来の FCR-DHS03 および FCR-DHS04 が同じグループに、限局性 HS 由来の PWC-HS01 と FCR-HS02 が同じグループに、LCH 由来の FB-LCH01 は単独で分類された。この解析結果は、発生部位および免疫表現型による疾患分類と一致し、疾患により異なる遺伝子発現プロファイルは各疾患の病態および病理発生と密接に相関していると考えられた。さらに、SyH の細胞は悪性転化により播種性 HS の細胞と類似の遺伝子プロファイルを示すことが明らかになった。機能解析の結果、播種性 HS では遊走に関連する遺伝子発現が上昇し、この特徴が播種性病変と限局性病変の病変分布の相違に関与すると考えられた。LCH では E-cadherin を含む細胞間接着に関連する遺伝子が上昇し、細胞間接着には完全長 E-cadherin (120kDa) の発現が重要と考えられた。また、犬の播種性 HS ではホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) シグナル伝達経路が、限局性 HS では分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) シグナル伝達経路と PI3K シグナル伝達経路が、犬の LCH では MAPK シグナル伝達経路が活性化し、それぞれ腫瘍抑制因子の *TP53*、*CDKN2A*、*CDKN1A* および *PTEN* (HS) の抑制と協調して細胞周期が促進していると考えられた。HS および LCH はそれぞれ、ヒトと犬で活性化されるシグナル伝達経路と抑制される腫瘍抑制遺伝子が共通しており、細胞増殖メカニズムが類似すると考えられた。分子標的薬の対照分子とし

ては、腫瘍抑制因子の RB1 がいずれの細胞株においても発現が高いことに着目し、CDK4/6 阻害薬である Palbociclib について、犬の播種性 HS、限局性 HS、LCH および猫の FPH の細胞株に対する細胞増殖抑制効果を検討した。その結果 Palbociclib は、*in vitro* で全ての細胞株において細胞増殖を抑制し、播種性 HS 細胞株 (FCR-DHS04) 移植マウスを用いた *in vivo* においても有意な細胞増殖抑制効果を示した。

以上の一連の研究成果より猫の組織球増殖性疾患については、組織学的に FPH と診断される病態のなかに LC の免疫表現型を持つ組織球の増殖を認め、犬の皮膚組織球腫や皮膚 LCH に相当する病態と考えられた。病変がリンパ節や内臓に多発し、増殖細胞の異型性が軽度から中度で、LC 免疫表現型を示す場合は LCH に、増殖細胞が悪性転化し、細胞異型が明確となり、かつ LC 免疫表現型を示す病態は、ヒトの LC 肉腫 (LCS) に相当する病態と考えられる。また、iDC/マクロファージの免疫表現型を示す増殖細胞は、微小環境の変化により LC 様細胞免疫表現型を示すことから、LC 様細胞免疫表現型の増殖病変は、病変部位および増殖細胞の異型性に基づいて FPH または HS に相当する病態と考えられた。犬においても、病変がリンパ節や内臓に多発し、増殖細胞の異型性が軽度から中度で、LC 免疫表現型を示す場合は LCH に、増殖細胞の異型性が重度で、LC 免疫表現型を示す場合は LC 肉腫 (LCS) へと病態が変動するものと考えられる。また、LC 様細胞の免疫表現型を示す組織球の増殖病変については、病変部位、発生様式 (単発/多発) および増殖細胞の異型性に基づいて SyH、皮膚組織球症、限局性/播種性 HS にそれぞれ相当する病態と考えられる。従って組織球の反応性増殖病変は、その増殖細胞の悪性転化に伴い、より悪性の腫瘍病態に変化し、これに合わせてその疾患分類も変動する可能性があるものと考えられる。

本研究では、犬と猫の組織球増殖性疾患の増殖細胞の免疫表現型の特徴に基づき、その疾患分類を再考し、その病態変化について新しい概念を提唱した。同時に犬の SyH、播種性 HS、限局性 HS および LCH に由来する細胞株の網羅的な mRNA 発現解析に基づき、各疾患の増殖細胞の分子メカニズムの一部を明らかにすると共に、Rb を高発現する犬と猫の組織球増殖性疾患に対する CDK4/6 阻害薬である Palbociclib の治療薬としての可能性を提示することができた。これらの研究成果は、これまで不明な点が多かった犬や猫の組織球増殖性疾患の病理発生機序の解明や、より有効で副作用の少ない治療薬の開発に直接寄与すると共に、ヒトでは稀とされるこれらの疾患の病態解明にも比較病理学的見地より有用な情報をもたらすものと考えられる。