

博士論文

日本におけるイヌの消化管上皮性腫瘍の発生動向と  
病理発生解明に関する研究

斎藤 翼

## 1. 目次

1.	目次.....	2
2.	緒言.....	7
2.1	図表.....	12
	図 1 腫瘍発生の概念.....	12
	図 2 腸内における WNT 活性勾配.....	13
	図 3 WNT/beta-catenin シグナル経路.....	14
3.	第一章 日本におけるイヌの消化管上皮性腫瘍の発生動向と組織学的特徴.....	15
3.1	序.....	15
3.2	材料と方法.....	17
3.2.1	動物.....	17
3.2.2	病理組織学検査.....	17
3.3	結果.....	18
3.3.1	症例の年齢、性別、犬種.....	18
3.3.2	解剖学的発生部位.....	18
3.3.3	胃腫瘍の組織分類.....	19
3.3.4	腸腫瘍の組織分類.....	20
3.4	考察.....	22
3.5	図表.....	25
	表 1-1. イヌの胃における上皮性腫瘍の組織診断と年齢、性別及び発生部位.....	25
	表 1-2. イヌの腸における上皮性腫瘍の組織診断と年齢、性別及び発生	

部位 .....	26
表 1-3. イヌの胃における上皮性腫瘍の組織診断と犬種 .....	27
表 1-4. イヌの腸における上皮性腫瘍の犬種と組織診断 .....	28
図 1-1. イヌの胃における上皮性腫瘍; HE 染色 .....	29
図 1-2. イヌの腸における上皮性腫瘍; HE 染色 .....	31
4. 第二章 犬種特異的な消化管上皮性腫瘍に関する病理学的研究 .....	33
4.1 序 .....	33
4.2 材料と方法 .....	35
4.2.1 動物 .....	35
4.2.2 病理組織学検査 .....	35
4.2.3 免疫組織化学染色 .....	36
4.2.4 蛍光免疫二重染色 .....	36
4.2.5 計測及び統計解析 .....	37
4.3 結果 .....	38
4.3.1 臨床経過とポリープの病理診断 .....	38
4.3.2 免疫組織化学染色 .....	39
4.4 考察 .....	42
4.5 図表 .....	45
表 2-1. ミニチュア・ダックスフンドの大腸ポリープ 67 病変の病理組 織診断 .....	45
表 2-2. ミニチュア・ダックスフンドの大腸ポリープ 67 病変の病理組 織診断の個別情報 .....	46
表 2-3. Tukey 有意差検定の結果 .....	48
図 2-1. ミニチュア・ダックスフンドの大腸におけるポリープ病変の内	

				視鏡像 .....	49
図 2-2.	腺癌を伴うミニチュア・ダックスフンドの炎症性ポリープ				
	(IPMD) の病理組織学的特徴 .....				50
図 2-3.	ミニチュア・ダックスフンドの炎症性ポリープ (IPMD) 内に				
	発生した腺腫/腺癌 .....				52
図 2-4.	正常部位、ミニチュア・ダックスフンドの炎症性ポリープ				
	(IPMD)、腺腫、腺癌における免疫組織化学染色 (beta-				
	catenin、Ki-67、cytokeratin 5/6) .....				53
図 2-5.	ミニチュア・ダックスフンドの炎症性ポリープ (IPMD) の				
	beta-catenin 及び p53 核陽性率 .....				54
図 2-6.	APC 及び beta-catenin の蛍光二重染色 .....				55
5.	第三章 イヌの消化管上皮性腫瘍の組織形態と病理発生機序に関する研				
	究 .....				56
5.1	序 .....				56
5.2	材料と方法 .....				58
	5.2.1 症例 .....				58
	5.2.2 病理組織検査 .....				58
	5.2.3 免疫組織化学染色 .....				58
5.3	結果 .....				60
	5.3.1 beta-catenin 核陽性率 .....				60
	5.3.2 E-cadherin の膜陽性率 .....				60
	5.3.3 p53 の核陽性率 .....				61
5.4	考察 .....				62
5.5	図表 .....				67

表 3-1.	症例ごとの組織診断と免疫組織化学染色スコア .....	67
表 3-2.	消化管における beta-catenin 免疫組織化学染色による染色動態 の比較 .....	70
表 3-3.	消化管における E-cadherin 免疫組織化学染色による染色動態の 比較 .....	71
表 3-4.	消化管における p53 免疫組織化学染色による染色動態の比較	72
図 3-1 ~ 3-5.	消化管上皮性腫瘍の形態学的・免疫組織化学的特徴 .....	73
図 3-6 ~ 3-7.	polypoid growth (PG) type の胃腺癌と大腸腺癌のルーベ 像及び beta-catenin の染色性 .....	75
6.	総括及び総合考察 .....	76
6.1	図表 .....	81
図 4-1.	犬種特異的消化管上皮性腫瘍の特徴 .....	81
図 4-2.	ミニチュア・ダックスフンドの消化管発生概要 .....	82
図 4-3.	イヌの消化管上皮性腫瘍の発生機序 .....	83
7.	謝辞 .....	84
8.	引用文献 .....	85

略号一覧

APC:	Adenomatous polyposis coli
CAC:	colitis-associated colorectal cancer
DSS:	dextran sulfate sodium
CK:	cytokeratin
FAP:	Familial adenomatous polyposis
HE:	hematoxylin and eosin
IBD:	Inflammatory bowel disease
IPMD:	Inflammatory polyp of Miniature Dachshunds
IHC:	immunohistochemistry
LEF:	lymphoid enhancer factor
NPG:	Non-polypoid growth
PG:	Polypoid growth
TCF4:	T-cell factor-4
WHO:	world health organization

## 2. 緒言

内視鏡検査や造影 CT 検査などの臨床検査技術は日夜進歩しており、獣医学領域においても、消化管における内視鏡検査やポリペクトミーが頻繁に行われるようになった。その結果、小動物の消化管、特に結腸・直腸におけるポリープ状病変や腫瘍が発見、摘出される機会が増え、病理診断に供される機会も増加している。しかしながら、動物の消化管腫瘍に関する情報は今なお少ない。イヌについては、胃[1-7]もしくは腸[5, 7, 8]における腫瘍発生動向に関する報告がいくつかあるが、これらは 20 年以上前に公開されたものが多く、最新の情報を反映しているとはいいがたい。さらに病理組織学的な記載は乏しく、特に日本においては、体系的にまとめた報告は成されていない。

消化管腫瘍は、ヒトにおいても発生頻度が高い腫瘍である[9]。日本では、特に胃がん、大腸がんによる死亡数は多く、2018 年ではそれぞれ 2 位及び 1 位、2019 年では 2 位、3 位と上位を占めている[9]。ヒトの疾患の基礎研究もしくは薬効薬理研究を実施する上で、モデル動物は非常に有用であり、広く開発が進められている。疾患モデル動物として、一般的にげっ歯類が使用されている。しかしながら、実験動物として一般的に用いられるラット（F344、Wistar Han、CrI:CD(SD)）及びマウス（B6C3F1、CrI:CD1(ICR)）の消化管上皮性腫瘍の自然発生率は、いずれも 1%未満であり、非常に稀である[10]。様々な化学物質を用いて実験的に腫瘍を誘発することは可能ではあるものの、主な誘発部位はげっ歯類特有の器官である前胃であり[11]、ヒト疾患モデルに適しているとは言い難い。現在の有用なヒトの消化管腫瘍のモデルとしては、家族性大腸腺腫症（Familial

Adenomatous Polyposis, FAP) 患者より発見された *Adenomatous polyposis coli* (*APC*) 遺伝子に変異を有する *Apc<sup>min</sup>* マウスが良く知られている。本疾患モデルマウスは、責任遺伝子を同じくすることから、ヒトと同様に多数のポリープ病変を形成する。しかしながら、ヒトは大腸を主体としたポリープ形成を示すのに対し、このげっ歯類モデルは小腸を主体としたポリープ形成を示す[12]。この現象は、*APC* の変異という原因はよく反映しているかもしれないが、発生部位や病理学的な特徴を適切に反映しているとは言い難い。一方、イヌにおける自然発生性消化管上皮性腫瘍の発生は、小腸よりも大腸の方が一般的であり[13]、その腫瘍の一部にはヒトと同様に *APC* の変異が認められる[14]。さらに結腸/直腸では有茎性腺腫が遠位部により多くみられるのに対し、近位から中間部では管腔狭窄を引き起こす無茎腫瘍がみられる[13]。これらの特徴はヒトのそれらと類似しており、イヌが疾患モデル動物として有用である可能性がある。

ヒトの散発性腫瘍において、有茎もしくは無茎という増殖パターンは、消化管腫瘍発生機序の相違を反映しているとされている。すなわち、ポリープ状増殖を示す有茎腫瘍は古典的な発がん経路である Adenoma-carcinoma sequence をたどり、平坦・陥凹増殖を示す無茎腫瘍は *de novo* に発生した腫瘍である、という概念である (図 1)。Adenoma-carcinoma sequence は、1970 年代に Morson [15, 16]、Muto [17]らによって体系づけられた概念であり、複数の遺伝子変異が段階的に蓄積することで、腫瘍化するというものである。具体的には、粘膜上皮細胞において腫瘍抑制因子である *APC* や *CTNNB1* (beta-catenin) などに変異が生じると腺腫が形成され、*KRAS* の変異が加わると細胞異型を伴う大型の腫瘍に進展する。しか



しこの段階では浸潤や転移と言った悪性挙動は示さず、*TP53* 変異が加わることによって悪性化する。またこの概念は、癌組織において腺腫や過形成などの前癌病変を伴う症例が多いことから、組織学的にも裏付けられている[18-20]。また腫瘍化した粘膜上皮が、内腔に突出ながら増殖することも Adenoma-carcinoma sequence を経て発生した腫瘍の組織学的な特徴の一つである。一方、癌の中には、非常に小型で、ポリープ状の隆起性病変を示さず、前癌病変を経ないで直接癌が生じる症例も稀ではあるものの存在する[21]。これらの腫瘍は *de novo* 癌と呼ばれており、日本のみならず、1960 年代前後から欧米でも指摘されてきた[22, 23]。しかしながら、イヌをはじめとする伴侶動物における消化管上皮腫瘍の発生や悪性化の機序についての詳細は不明な点が多く、APC や beta-catenin が腫瘍発生に関与しているという報告はわずかである。

ヒトにおける腫瘍発生の鍵となる主な要因は、がん遺伝子の活性化と腫瘍抑制因子の不活化があげられる。がん遺伝子はその転写因子が腫瘍の成長を促進し、腫瘍抑制因子は腫瘍の成長を抑制する。大腸癌関連のがん遺伝子としては *KRAS*、*BRAF*、*PI3KCA*、*EGFR* が、腫瘍抑制因子としては *APC*、*PTEN*、*TP53*、*TGF-beta*、*SMAD* などが知られており、前述の Adenoma-carcinoma sequence にも大きく関与している[20]。特に腫瘍抑制因子である *APC* は大腸がんのゲートキーパーとも呼ばれ、腫瘍発生の重要な役割を果たしている。*APC* は大腸粘膜を埋め尽くすようにポリープ状腺腫が生じる FAP から発見された[24-26]。さらに FAP 患者のみならず、非家族性の散発性腺腫、腺癌の最大 80%程度がこの *APC* 遺伝子を欠損しており[27]、*APC* の機能不全が大腸腫瘍の病因として深く関与していることが窺える。

また APC は、WNT/beta-catenin シグナル伝達経路の主要な構成要素である [28, 29]。WNT/beta-catenin シグナル伝達経路は、細胞分裂、幹細胞性の維持や、極性決定など、細胞の運命を司る経路である [29-31] (図 2)。通常は腸陰窩で活性が高く、分化・成熟した絨毛先端部の細胞は WNT シグナル非存在下にある。beta-catenin は、E-cadherin などと共に細胞接着分子として細胞膜に存在する (図 3)。細胞質内にある beta-catenin も APC/Axin/GSK-3b による破壊複合体 (destruction complex) によりリン酸化、ユビキチン化され、プロテアソームにより分解されるため、細胞内の濃度は低く保たれている。一方で、WNT 存在下では、GSK-3 $\beta$ が複合体から外れることで、beta-catenin はユビキチン化を受けることなく細胞質内に蓄積される。蓄積された beta-catenin は核内に移行し、WNT の標的遺伝子である MYC や CCND1 (Cyclin D1)などを活性化、細胞分裂へと向かう [32-35]。腸上皮性腫瘍は、多くの場合 APC もしくは CTNNB1 (beta-catenin) に変異が生じているために、APC/beta-catenin の複合体が形成されず、恒常的な WNT 経路の活性化が生じている [36]。また、一部の癌では beta-catenin と共局在する細胞接着因子である E-cadherin (CDH1)など、他の因子の変異も報告されていることから、細胞の腫瘍化にとって非常に重要な経路であることが示されている。

本論文の第一章では日本国内におけるイヌの上皮性消化管腫瘍の特徴及び発生動向を明らかにすることを目的とし、消化管腫瘍の病理学的特徴や発症年齢、性別、犬種、発生部位を精査した。第二章では犬種特異性があると考えられたミニチュア・ダックスフンドの大腸ポリープを対象として、消化管腫瘍の発生機序を検討した。第三章では、イヌの消化管上皮

性腫瘍において、主要な腫瘍マーカーである beta-catenin、E-cadherin、p53 の発現と形態学的増殖パターンに着目して病理組織学的に検討し、その腫瘍発生機序を検討した。

## 2.1 図表

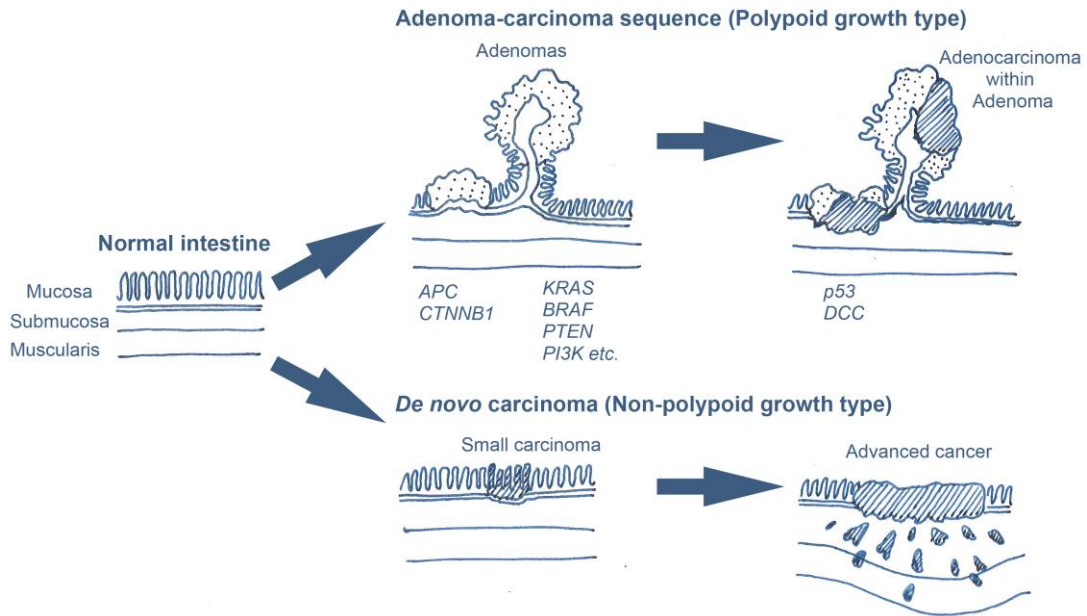


図1 腫瘍発生の概念

**Adenoma-carcinoma sequence:** 遺伝子変異の蓄積が多段階的に生じ、蓄積されることでがんが生じる。腫瘍抑制遺伝子である *APC* や *CTNNB1*(beta-catenin) に変異が生じ、*KRAS* などの変異により腫瘍が増大、*p53* などの変異が加わることで悪性化するとされている。また、変異が蓄積することが発がんには重要であるとされている。

**De novo:** 前腫瘍性病変を伴わず、粘膜に直接癌として発生する。粘膜の隆起を伴わず、小型でありながらも浸潤/転移能を有する。進展も早く、急速に大型の進行がんに進展する。非常に小さな病巣で確定診断が困難であることから、分子生物学的な検証は進んでいない。

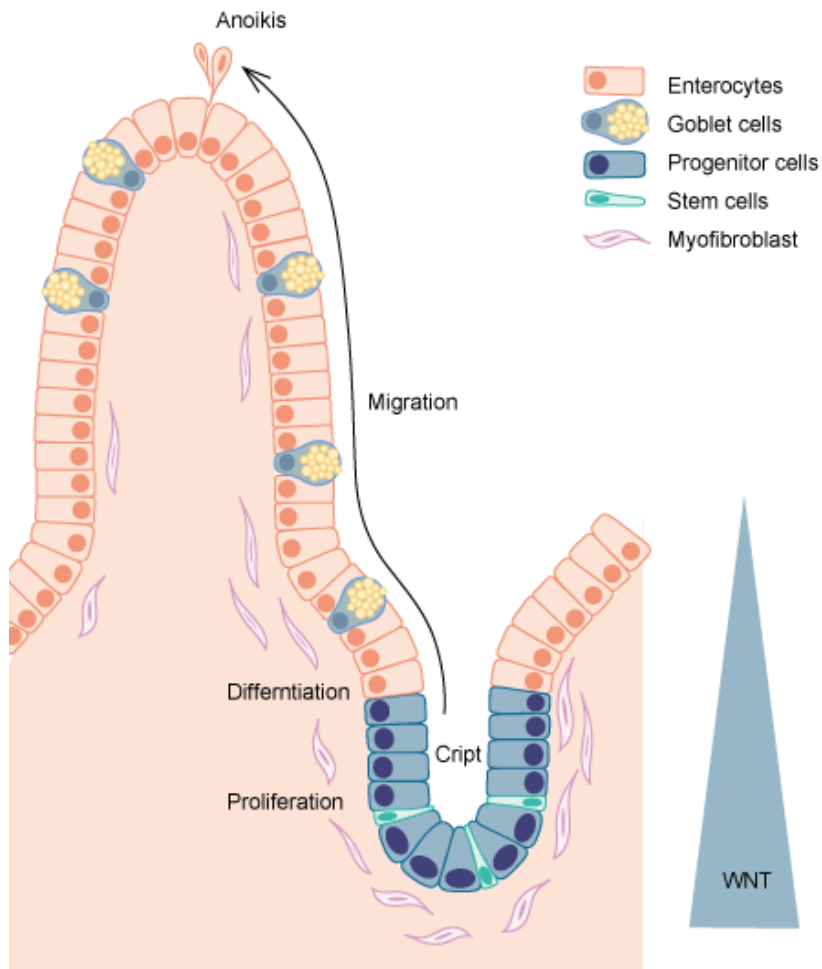


図2 腸内における WNT 活性勾配

腸陰窩では WNT 活性が高く、細胞が分化、先端に移動するにつれて WNT 活性が減弱し、それと共に BMP や  $TGF\beta$  などのシグナルが活性化する。WNT シグナルは腸における幹細胞の維持、制御に重要な役割を果たしており、腸上皮の腫瘍化にも深く関与している。

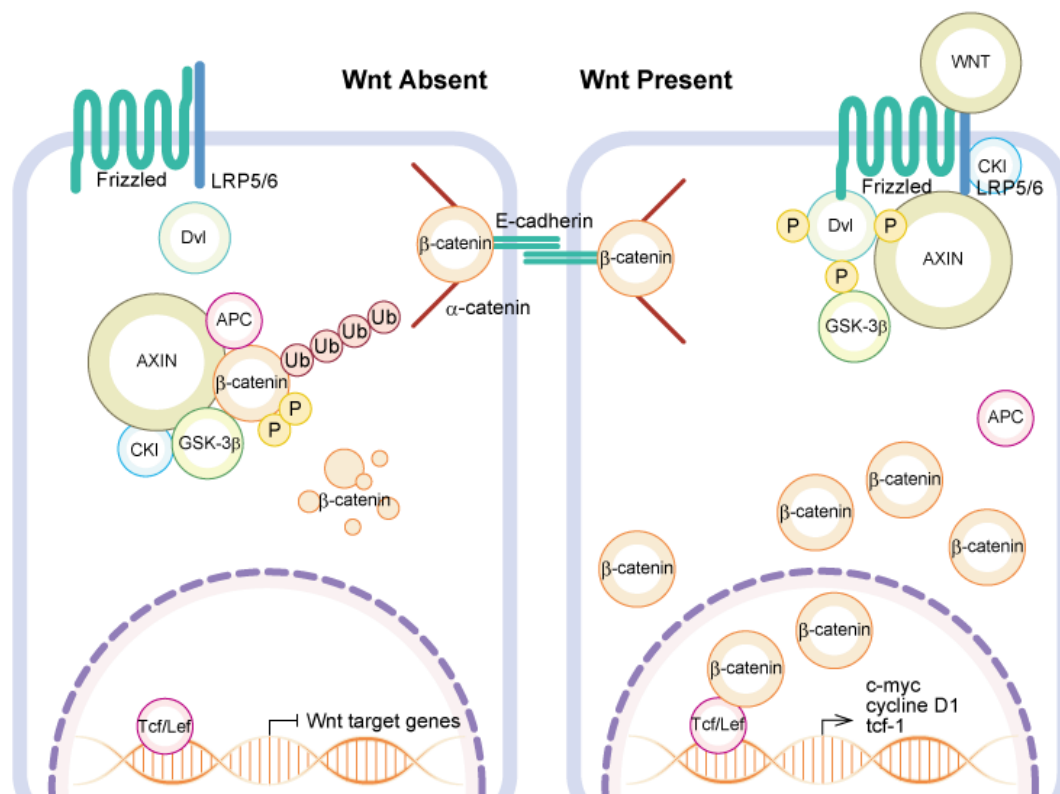


図 3 WNT/beta-catenin シグナル経路

細胞内のシグナル経路の概略を示す。通常 beta-catenin は E-cadherin や  $\alpha$ -catenin などと共に細胞接着に関与している。

**WNT 非存在下（左図）**：beta-catenin は APC や AXIN、GSK-3 $\beta$ と結合し、破壊複合体（destruction complex）を形成する。それによって beta-catenin はユビキチン化され（Ub）、プロテアソームにて分解されることから、細胞内濃度は低く保たれる。従って、細胞質内や核内には検出されず、膜のみに陽性を示す。

**WNT 存在下（右図）**：beta-catenin は破壊複合体が不活化することで安定化し、細胞質内に蓄積する。細胞質内の beta-catenin が核内に移行することで、標的遺伝子が転写され、細胞増殖へと向かう。

APC もしくは beta-catenin に変異が生じた場合、破壊複合体が形成できず、常に WNT 活性刺激を受けている状態となる。それによって恒常的な細胞増殖へと向かい、腫瘍の発生につながる。

### 3. 第一章

日本におけるイヌの消化管上皮性腫瘍の発生動向と組織学的特徴

#### 3.1 序

イヌの自然発生活消化管腫瘍の診断は、内視鏡検査技術の発達により獣医学領域でも一般的になりつつある。しかしながら、その詳細な特徴を述べた論文は少なく、特に日本においては犬種や性別、年齢など、体系的にまとめた報告はない。一方で、これらの腫瘍は動物の WHO 組織学的分類 (WHO histological classification of tumors in domestic animals [37]) を基に日常的に診断されている。しかしながら本書はおよそ 20 年前に発行されており、必ずしも現状に即していない。

ヒトにおける消化管腫瘍、特に大腸の腫瘍発生は adenoma-carcinoma sequence [15-17] と *de novo* 癌 [21, 23, 38-40] という大きく二つの機序が考えられている。Adenoma-carcinoma sequence は、良性の前腫瘍性病変から発生する [16]。この学説は、大腸癌が腺腫性病変内に頻繁に発生することに基づいており、悪性転化は段階的な遺伝子変異によって引き起こされることを示している [18, 19]。もうひとつの発がん機序である *de novo* 癌は平坦もしくは陥凹病変として発生することが特徴とされている。このタイプの癌病変は小型で発見された際にも腺腫性成分を伴ってはいない。このことから、腺腫性病変から進行したものではなく新た (*de novo*) に発生した癌と考えられている [21, 22, 40]。加えて、これら平坦病変は小型の時から高悪性度を示すとされている [41, 42]。以上より、消化管上皮性腫瘍の発生機序は組織表現型として反映され、ポリープ状隆起を示すポリープ状増殖

(PG, Polypoid Growth) 型と、ポリープ状をとらず扁平・陥凹病変を示す非ポリープ状増殖 (NPG, Non-Polypoid Growth) 型にそれぞれ区分される。しかしながら、イヌをはじめとする伴侶動物で本分類を実施した報告はこれまでにない。

そこで、本章ではまず日本国内におけるイヌの消化管上皮性腫瘍の臨床病理学的特徴と病理組織学的特徴を明確にし、その発生動向や関連性を明らかにすることを目的とした。イヌの消化管にて腫瘍性病変と診断された 131 組織 (95 症例) を WHO 組織学的分類及び PG/NPG 分類に従って再分類し、さらに犬種、年齢、性別、発生部位、浸潤/転移の情報を精査した。



## 3.2 材料と方法

### 3.2.1 動物

生検もしくは外科的に 95 例のイヌより得られた消化管上皮性腫瘍、総計 131 組織（胃 38 組織、小腸 13 組織、大腸 80 組織）について検索した。組織は 2013 から 2016 年の間に 3 施設（東京大学附属動物医療センター、日本小動物医療センター、日本動物高度医療センター）にて採取された。

### 3.2.2 病理組織学検査

すべての組織は 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定し、常法に従ってパラフィン包埋した。組織切片は厚さ 4  $\mu\text{m}$  にて作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行った。組織診断は WHO 組織学的分類[37]に基づき実施した。さらに、腺癌（Adenocarcinoma、印環細胞癌及び粘液腺癌を除く）については組織の亜分類としてヒトの腸管腫瘍で用いられている PG 型及び NPG 型に分類した[40]。本分類を端的に述べると、PG 型は正常粘膜の丈を越えて内腔に顕著に突出するのに対し、NPG 型は正常粘膜の丈と同様、もしくは陥凹した増殖形態を示す。これらの組織分類を基に、犬種、年齢、性別、発生部位、浸潤/転移の有無を記録した。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 症例の年齢、性別、犬種

消化管上皮性腫瘍罹患例の平均年齢は、部位別に胃 10 歳、小腸 12 歳、大腸 9 歳であった（表 1-1、表 1-2）。良性である腺腫は（胃平均 8 歳、腸平均 9 歳）、悪性腫瘍（胃平均 10 歳、腸平均 10 歳）に比べやや若齢で発生する傾向があった。

胃及び小腸の発生数に性差は認められなかったが、大腸での発生は雌よりも雄の方が多かった（雄:雌=51:26、表 1-1、表 1-2）。

犬種別の腫瘍発生は胃では、ジャック・ラッセル・テリア、腸ではミニチュア・ダックスフンドに多くみられた（表 1-3、表 1-4）。ジャック・ラッセル・テリアにみられたこれらの腫瘍は、胃から大腸に及ぶ消化管全体の複数領域で多発する傾向があったが、そのほとんどが腺腫、腺癌であり、印環細胞癌、粘液腺癌、未分化癌の発生はなかった。ミニチュア・ダックスフンドの腺腫、腺癌は、いわゆるミニチュア・ダックスフンドの炎症性ポリープ（Inflammatory Polyp of Miniature Dachshunds; IPMD）に併発する例が多かった。

#### 3.3.2 解剖学的発生部位

胃の腫瘍は、胃角から幽門領域における発生が多かった（表 1-1）。小腸に特定の好発部位は認められなかった（表 1-2）。大腸では腺腫、腺癌は下部、特に結直腸境界部から直腸にかけての発生が多かった（表 1-2）。

### 3.3.3 胃腫瘍の組織分類

胃の腫瘍は 38 例に認められ、その内訳は腺腫 (Adenoma) 5 例、腺癌 (Adenocarcinoma) 30 例、未分化癌 (Undifferentiated carcinoma) 3 例であった。WHO 組織学的分類にある粘液腺癌 (Mucinous adenocarcinoma)、腺扁平上皮癌 (Adenosquamous carcinoma) はみられなかった。

腺腫は限局性のポリープ状増殖性病変 (図 1-1A) としてみられた。組織学的には、さらに管状腺腫 (Tubular adenoma、4 例) と管状乳頭状腺腫 (Tubulopapillary adenoma、1 例) に分類されたが、乳頭状腺腫 (Papillary adenoma) はみられなかった (表 1-1)。管状腺腫は、線維血管性の茎を有さないものの腺構造が内腔側に隆起してみられた。管状乳頭状腺腫は上記管状腺腫に加え、組織の一部で線維血管性の茎がみられた。これら腫瘍の細胞形態は、わずかに大型、不整を伴う核を有する一層の円柱上皮細胞によって構成されていた (図 1-1B)。

腺癌は、管状腺癌 (Tubular adenocarcinoma、12 例)、乳頭状腺癌 (Papillary adenocarcinoma、2 例)、管状乳頭状腺癌 (Tubulopapillary adenocarcinoma、4 例)、印環細胞癌 (Signet-ring cell carcinoma、12 例) に分類された (表 1-1)。腺癌は、組織学的に細胞極性の欠如、核の大小不同、著明な核小体を呈し、それら腫瘍細胞が乳頭状もしくは管乳頭状 (図 1-1C、D) および管状 (図 1-1E、F) に増殖していた。乳頭状腺癌は明瞭な線維血管性の茎を有している一方で、管状腺癌は茎を示さず不規則に分岐した管状増殖を示した。

全ての腺腫 (5/5 例)、管乳頭状腺癌 (4/4 例) および半数以下の管状腺癌 (5/12 例) は PG 型の増殖を示した (図 1-1A-D)。これら PG 型腺癌

が遠隔転移もしくは粘膜下への浸潤を示した割合は 27% (3/11 例) であった。一方、NPG 型の増殖 (図 1-1E、F) を示したのは、管状腺癌の 7 例のみであった。この 7 例は全例で転移もしくは浸潤を示した。

印環細胞癌は、腫瘍細胞が粘膜固有層を広範に置換する病変として、もしくは表層粘膜直下での限局性病変としてみられた。腫瘍細胞は豊富な細胞内粘液を有することで核が偏在し (図 1-1G)、多くの場合、粘膜固有層や粘膜下組織への浸潤を示し、付属リンパ節への転移もみられた。

未分化癌は、分化方向が明らかでない細胞集団が、粘膜固有層内にびまん性に認められた。腫瘍細胞は明瞭な核小体を有し、核異型がみられた (図 1-1H)。

#### 3.3.4 腸腫瘍の組織分類

腸の腫瘍は 93 例で、内 13 例が小腸に、80 例が大腸に発生した (表 1-2)。

小腸の腫瘍は 6 例の腺癌 (腺房状腺癌 5 例、乳頭状腺癌 1 例)、5 例の粘液腺癌、1 例の印環細胞癌、1 例の未分化癌に分類された。腺腫、腺扁平上皮癌の発生は小腸では認められなかった。半数の腺癌は PG 型増殖を示した (3/6 例; 腺房状腺癌 2/5 例、乳頭状腺癌 1/1 例)。遠隔転移もしくは粘膜下織への浸潤を示した症例は PG 腺癌では 33% (1/3 例)、NPG 腺癌では 100% (3/3 例) であった。

大腸腫瘍は 35 例の腺腫、41 例の腺癌 (腺房状腺癌 38 例、乳頭状腺癌 3 例)、粘液腺癌 2 例、印環細胞癌 2 例に分類された。腺扁平上皮癌およ

び未分化癌は大腸では認められなかった。腺腫は乳頭状、管状構造から成る限局性の PG 型増殖を示した (図 1-2A)。腫瘍性上皮細胞は単層で、核はわずかに大型で偏在していた (図 1-2B)。腸の腺癌は、腺房状 (管状) 腺癌が最も一般的な型であった (表 1-2、図 1-2C~E)。本病変は、腺房もしくは腺管状増殖を示し、上皮細胞層の多層化を伴っていた。腫瘍細胞の核は不整、不均一、著明な核小体を有しており (図 1-2D)、一部基底膜構造は不明瞭であった (図 1-2F)。過半数の大腸腺癌 (34/41 例; 腺房状腺癌 31 例、乳頭状腺癌 3 例) は PG 型を示し (図 1-2C)、残り 7 例は NPG 型を示した (図 1-2E)。なお NPG 型を示した腺癌は全て腺房状腺癌であった。粘膜下浸潤もしくは遠隔転移は、PG 型では 19% (7/37 例) であったのに対し、NPG 型では 100% (7/7 例) であった。粘液腺癌および印環細胞癌は粘膜下組織を主体として増殖していた。粘液腺癌は粘膜下組織に非常に多くの粘液を貯留しており、その粘液中に単細胞性もしくは腺管形成性の腫瘍細胞が散在していた (図 1-2G、H)。一方、印環細胞癌は、細胞質内に粘液を有する腫瘍細胞を主体とした単細胞性の増殖がみられた。粘液腺癌と印環細胞癌はしばしば同一組織内でみられたが、主たる構成成分に従い診断した。

### 3.4 考察

本章ではイヌにおける 131 例の消化管上皮性腫瘍を WHO 組織学的分類に従って分類し、その年齢、発生部位、増殖パターン、犬種について記録を精査した。その結果、平均年齢、発生部位、性差については既知の報告と類似していた[2, 7, 43]。一方、本研究により日本ではジャック・ラッセル・テリアとミニチュア・ダックスフンドにおける消化管上皮腫瘍の発生が多いことが示された。先行研究では犬種特異性はないとするもの[4, 7]や、ベルジアン・シェパード・ドッグ[44]、コリー[7]、ジャーマン・シェパード[7, 8]、ウエスト・ハイランド・ホワイト・テリア[8]における腺癌の発生が高いとするものなど様々な結果が示されている。これらの結果は発表された地域（国）による差も大きいと考えられるが、いずれの報告にもジャック・ラッセル・テリアとミニチュア・ダックスフンドの記載はなく、本研究の結果は日本における犬種特異性を明確に示すものであった。ジャック・ラッセル・テリアは、若齢（2 歳頃）から多発性のポリープ病変が消化管全域に発生し、特に胃及び直腸に多くみられた。この特徴は、ヒトの FAP に類似している。FAP は若年齢から消化管に非常に多くのポリープ病変が発生する疾患として知られている[24, 25, 45, 46]。ジャック・ラッセル・テリアのポリープは、複数のポリープ状病変が多発するものの、ヒトの FAP に比べると数が少ない。しかし、ヒトでは通常の FAP に比べ少数のポリープを発生する「軽症型」の報告もみられる[47, 48]。近年、吉嵜ら[49]は、ジャック・ラッセル・テリアにおいて、ヒトの軽症型患者で APC 変異がみられる領域におけるヘテロ接合型の生殖細胞変異を同定した。これによって、イヌにおいてもヒトの軽症型 FAP と同様のメカニズムによるポリープ形成、腫瘍発生が示された。ただし、多発傾向や組織形態の類

似性がみられる一方で、発生部位に関しては胃に発生が多いというイヌ特有の特徴があり、ヒトとは異なっていた。この現象は、*Apc<sup>min</sup>* マウスでは小腸にポリープ発生が多いという特徴と同様に、動物種差に起因する相違である可能性が考えられる。この動物種差に関する表現型の違いは非常に興味深く、今後さらなる研究が必要と考える。一方、大腸ではミニチュアダックスフンドにおける腫瘍性病変の発生が多かった。本犬種は大腸に炎症性ポリープ (IPMD) を頻繁に発生することが知られている [50, 51]。しかしながら、IPMD と腫瘍発生の関連は未だ明らかにされていない。従って、IPMD と腫瘍発生の関連について今後検討する必要性があると考えられた。

動物の WHO 組織学的分類によると、悪性大腸上皮性腫瘍は腺房 (腺管) 状腺癌、乳頭状腺癌、粘液腺癌、印環細胞癌、未分化癌、腺扁平上皮癌に分類される [37]。これらの腫瘍の中でも腺扁平上皮癌の発生は非常に稀であり、報告の中には薬剤誘発病変も含まれていることから [52]、自然発生性の病変はさらに限られる [53]。本研究でも腺扁平上皮癌の発生は認められなかった。腺房状腺癌と乳頭状腺癌の分類は、増殖パターンにより分類されているが、同一組織上に混在してみられる例が多く、明確に区別することは困難であった。さらに腫瘍の悪性度の指標として、浸潤及び転移の有無を比較したが、これらの分類間に有意な差は認められなかった。一方ヒトでは、悪性度を示す指標の一つとして、増殖形態の差が着目されている。すなわち、ポリープ状増殖を示さない NPG 型の腫瘍は進行が早く、悪性度が高いとされている [41, 42]。この PG/NPG 分類は、ヒトでは古くから行われている [54]。NPG 腺癌はその組織学的特徴から *de novo* に発

生した癌であると考えられており、Adenoma-carcinoma sequence により発生する PG 型腺癌とは異なる病理発生とされている[40]。De novo 癌は表面型もしくは陥凹病変を呈する NPG 型の小型大腸癌であり[40, 41, 54, 55]、腫瘍内には良性の腺腫成分を欠く[56]。また、NPG 腺癌は高頻度で粘膜下に浸潤し、リンパ節、血管内浸潤を示す[40-42, 55, 57]。さらに、急速に進展し、大型の進行癌となる[56]。上記知見を基に、本研究においても増殖パターンに着目し、PG 型と NPG 型に分類した。PG 型の浸潤や遠隔転移は 21%であったのに対し、NPG 型では 100%であった。これらの組織学的及び生物学的特徴は、ヒトとイヌとで類似していると考えられた。

本章の研究の結果、日本国内で繁殖飼育されているイヌでは、ジャック・ラッセル・テリア及びミニチュア・ダックスフンドの消化管上皮性腫瘍が多いこと、これらの腫瘍は消化管における腫瘍の病理発生メカニズムを研究するためのモデルとして有用であることが示された。また、消化管上皮性腫瘍の肉眼的、組織学的増殖形態は、その悪性度や腫瘍発生機序を理解する上で非常に重要な所見であると考えられた。



### 3.5 図表

表 1-1. イヌの胃における上皮性腫瘍の組織診断と年齢、性別及び発生部位

	Benign			Malignant									
	Adenoma			Adenocarcinoma					MUC	SRC	SCC	UND	Total
	Tub*	Pap*	T-P*	Tub*	Pap*	T-P*							
Age (years)	9±2	-	2	10±3	9±1	11±3	-	10±2	-	11±1	10±3		
Range	(6-12)			(6-15)	(8-9)	(8-14)		(1-13)		(10-12)	(2-15)		
Sex													
Male	3	0	1	7	2	2	0	6	0	1	22		
Female	1	0	0	5	0	2	0	6	0	2	16		
Location													
Cardia	1	0	0	3	0	0	0	0	0	1	5		
Fundus	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	4		
Body	1	0	0	4	0	0	0	4	0	1	10		
Angular	0	0	0	5	0	1	0	5	0	3	14		
Pylorus	3	0	1	5	2	3	0	8	0	1	23		
Growth pattern													
Polypoid	4	0	1	5 [1]	2 [1]	4 [1]	0	-	-	-	16 [3]		
Non polypoid	0	0	0	7 [7]	0	0	0	-	-	-	7 [7]		
Total	4	0	1	12 [8]	2 [1]	4 [1]	0	12 [12]	0	3 [3]	38		

Tub, 管状腺癌 (Tubular adenocarcinoma) ; Pap, 乳頭状腺癌 (Papillary adenocarcinoma) ;

T-P, 管乳頭状腺癌 (Tubulopapillary adenocarcinoma) ;

MUC, 粘液腺癌 (Mucinous adenocarcinoma) ; SRC, 印環細胞癌 (Signet-ring cell carcinoma) ;

SCC, 扁平上皮癌 (Squamous cell carcinoma) ; UND, 未分化癌 (Undifferentiated carcinoma) ;

-, 該当なし ; \*, 管状、乳頭状、管状-乳頭状型の腺腫及び腺癌はその増殖形態によって polypoid growth/non-polypoid growth type に分類した。[ ]内は浸潤/転移があった例数を示す。年齢は平均±標準偏差として記載した。

表 1-2. イヌの腸における上皮性腫瘍の組織診断と年齢、性別及び発生部位

	Benign	Malignant						Total
	Adenoma*	Adenocarcinoma			ASC	UND		
		Aci*	Pap*	MUC	SRC			
<b>Small intestine</b>								
Age (years)	-	11 ± 5	13	11 ± 2	11	-	NR	12 ± 3
Range		(6~18)		(9~13)				(6~18)
<b>Sex</b>								
Male	0	4	0	2	0	0	0	6
Female	0	0	1	3	1	0	0	5
Not recorded	0	1	0	0	0	0	1	2
<b>Location</b>								
Duodenum	0	1	0	1	0	0	0	2
Jejunum	0	1	0	1	1	0	0	3
Ileum	0	2	1	2	0	0	0	5
Not recorded	0	1	0	1	0	0	1	3
<b>Growth pattern</b>								
Polypoid	0	2	1 [1]	-	-	-	-	3 [1]
Non-polypoid	0	3 [3]	0	-	-	-	-	3 [3]
Total	0	5 [3]	1 [1]	5 [5]	1 [1]	0	1 [1]	13
<b>Large intestine</b>								
Age (years)	9 ± 2	11 ± 3	9 ± 2	5	7 ± 2	-	-	9 ± 3
Range	(4~14)	(5~15)	(8~12)	-	(5~8)	-	-	(4~15)
<b>Sex</b>								
Male	26	24	1	0	0	0	0	51
Female	9	12	2	1	2	0	0	26
Not recorded	0	2	0	1	0	0	0	3
<b>Location</b>								
Cecum	0	0	0	0	0	0	0	0
Colon	3	6	2	0	1	0	0	12
Colorectal junction	14	5	1	0	1	0	0	21
Rectum	18	25	0	1	0	0	0	44
Not recorded	0	2	0	1	0	0	0	3
<b>Growth pattern</b>								
Polypoid	35	31 [5]	3	-	-	-	-	69 [5]
Non-polypoid	0	7 [7]	0	-	-	-	-	7 [7]
Total	35	38 [13]	3	2 [2]	2 [2]	0	0	80

Aci, 腺房状腺癌 (Acinar adenocarcinoma) ; Pap, 乳頭状腺癌 (Papillary adenocarcinoma) ;

MUC, 粘液腺癌 (Mucinous adenocarcinoma) ; SRC, 印環細胞癌 (Signet-ring cell carcinoma) ;

ASC, 腺扁平上皮癌 (Adenosquamous carcinoma) ; UND, 未分化癌 (Undifferentiated carcinoma) ;

-, 該当なし ; NR, 記録なし (not record) ; \*, 腺房状及び乳頭状腺癌及び腺腫は、その増殖パターンからさらに polypoid growth/non-polypoid growth type に分類した。[ ]内の数値は浸潤/転移が認められた症例数を示す。年齢は平均±標準偏差値を示す。

表 1-3. イヌの胃における上皮性腫瘍の組織診断と犬種

Breed	Benign			Malignant							Total	(%)	
	Adenoma			Adenocarcinoma				MUC	SRC	SCC			UND
	Tub	Pap	T-P	Tub	Pap	T-P							
Jack Russell Terrier	2	0	1	4	2	3	0	0	0	0	12	31.6	
Miniature Dachshund	0	0	0	1	0	1	0	6	0	1	9	23.7	
French Bulldog	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3	7.9	
Mix	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	3	7.9	
Belgian Shepherd Dog	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2	5.3	
English Cocker Spaniel	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	5.3	
Leonberger	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2	5.3	
Maltese	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5.3	
Miniature Schnauzer	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2.6	
Shih Tzu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2.6	
West Highland White Terrier	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2.6	
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>38</b>	<b>100.0</b>	

Tub, 管状腺癌 (Tubular adenocarcinoma) ; Pap, 乳頭状腺癌 (Papillary adenocarcinoma) ;

T-P, 管状乳頭状腺癌 (Tubulopapillary adenocarcinoma) ; MUC, 粘液腺癌 (Mucinous adenocarcinoma) ;

SRC, 印環細胞癌 (Signet-ring cell carcinoma) ; SCC, 扁平上皮癌 (Squamous cell carcinoma) ;

UND, 未分化癌 (Undifferentiated carcinoma)

表 1-4. イヌの腸における上皮性腫瘍の犬種と組織診断

Organ Breed	Benign		Malignant					Total	(%)
	Adenoma	Adenocarcinoma							
		Aci	Pap	MUC	SRC	ASC	UND		
Small intestines									
Miniature Dachshund	0	1	1	1	0	0	0	3	23.1
Jack Russell Terrier	0	2	0	0	0	0	0	2	15.4
Miniature Schnauzer	0	0	0	2	0	0	0	2	15.4
American Cocker Spaniel	0	0	0	1	0	0	0	1	7.7
Chinese Crested Dog	0	0	0	0	1	0	0	1	7.7
Mix	0	0	0	1	0	0	0	1	7.7
Papillon	0	1	0	0	0	0	0	1	7.7
Not recorded	0	1	0	0	0	0	1	2	15.4
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>13</b>	<b>100.0</b>
Large intestines									
Miniature Dachshund	25	20	1	0	0	0	0	46	57.5
Jack Russell Terrier	0	8	2	0	0	0	0	10	12.5
Boston Terrier	2	1	0	0	0	0	0	3	3.8
French Bulldog	3	0	0	0	0	0	0	3	3.8
Border Collie	1	1	0	0	0	0	0	2	2.5
Lakeland Terrier	0	2	0	0	0	0	0	2	2.5
Mix	0	0	0	1	1	0	0	2	2.5
Papillon	1	1	0	0	0	0	0	2	2.5
Shetland Sheepdog	1	1	0	0	0	0	0	2	2.5
Welsh Corgi	1	0	0	0	1	0	0	2	2.5
Belgian Shepherd Dog (Tervueren)	0	1	0	0	0	0	0	1	1.3
Toy Poodle	0	1	0	0	0	0	0	1	1.3
Yorkshire Terrier	1	0	0	0	0	0	0	1	1.3
Not recorded	0	2	0	1	0	0	0	3	3.8
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>38</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>80</b>	<b>100.0</b>

Aci, 腺房細胞癌 (Acinar adenocarcinoma) ; Pap, 乳頭状腺癌 (Papillary adenocarcinoma) ;

MUC, 粘液腺癌 (Mucinous adenocarcinoma) ; SRC, 印環細胞癌 (Signet-ring cell carcinoma) ;

ASC, 腺扁平上皮癌 (Adenosquamous carcinoma) ; UND, 未分化癌 (Undifferentiated carcinoma)

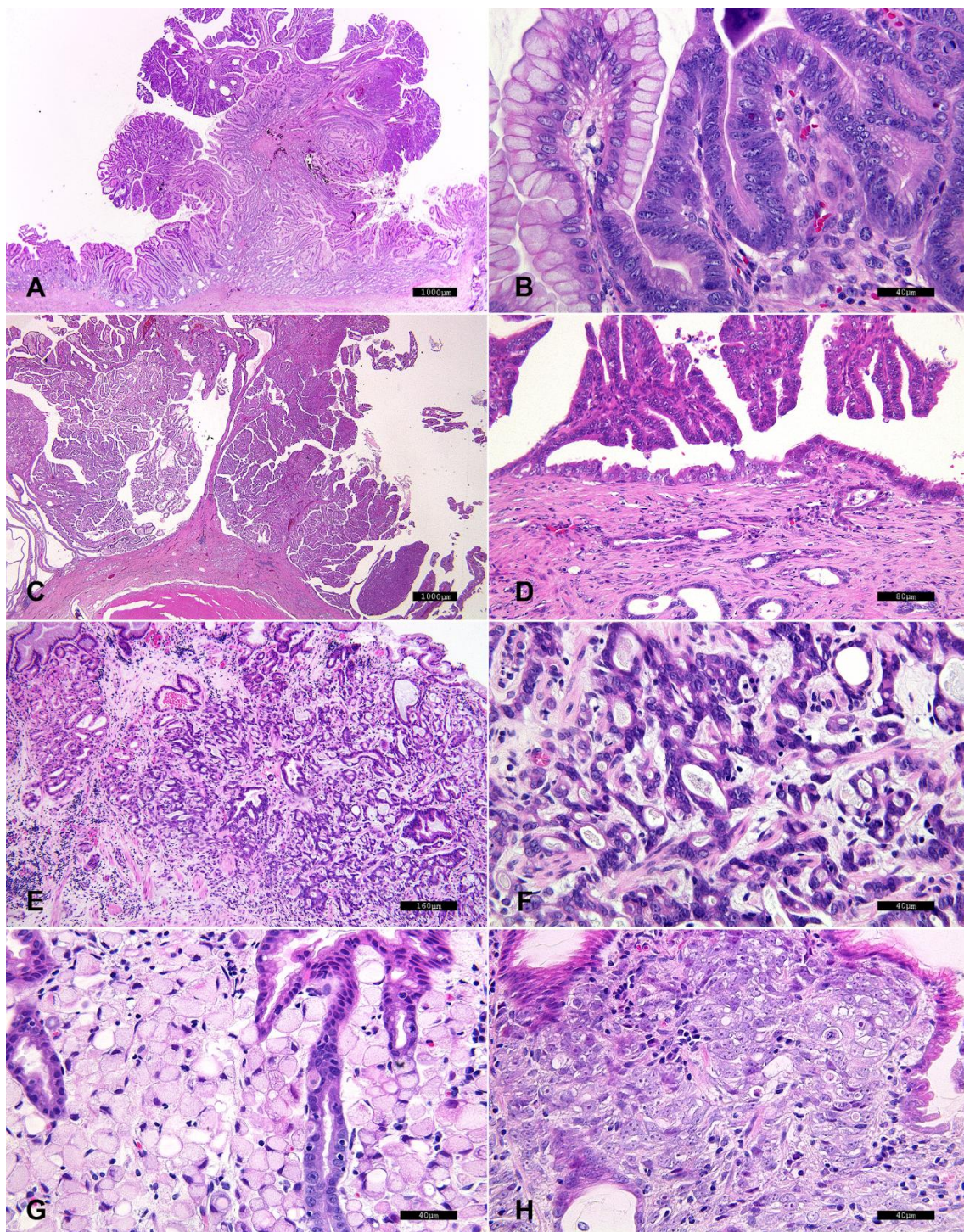


図 1-1. イヌの胃における上皮性腫瘍; HE 染色

- (A) ポリープ状増殖を示す管状乳頭腫 Bar=1,000  $\mu\text{m}$
- (B) 図 1-1A の高倍像; 右側にみられる円柱上皮細胞が腫瘍細胞 Bar=40  $\mu\text{m}$
- (C) 管乳頭状腺癌 (polypoid growth type) Bar=1,000  $\mu\text{m}$
- (D) 図 1-1C の高倍像; 粘膜下層へ局所的な浸潤を示す Bar=80  $\mu\text{m}$
- (E) 粘膜固有層に広がる管状腺癌 (Non-polypoid growth type) Bar=160  $\mu\text{m}$

- (F) 図 1-1E の高倍像；腫瘍細胞は不規則な管状構造を示す Bar=40  $\mu$ m
- (G) 印環細胞癌；細胞質に豊富な粘液を有する印環状の細胞が粘膜固有層にびまん性にみられる Bar=40  $\mu$ m
- (H) 未分化癌；特定の分化方向は認められない Bar=40  $\mu$ m

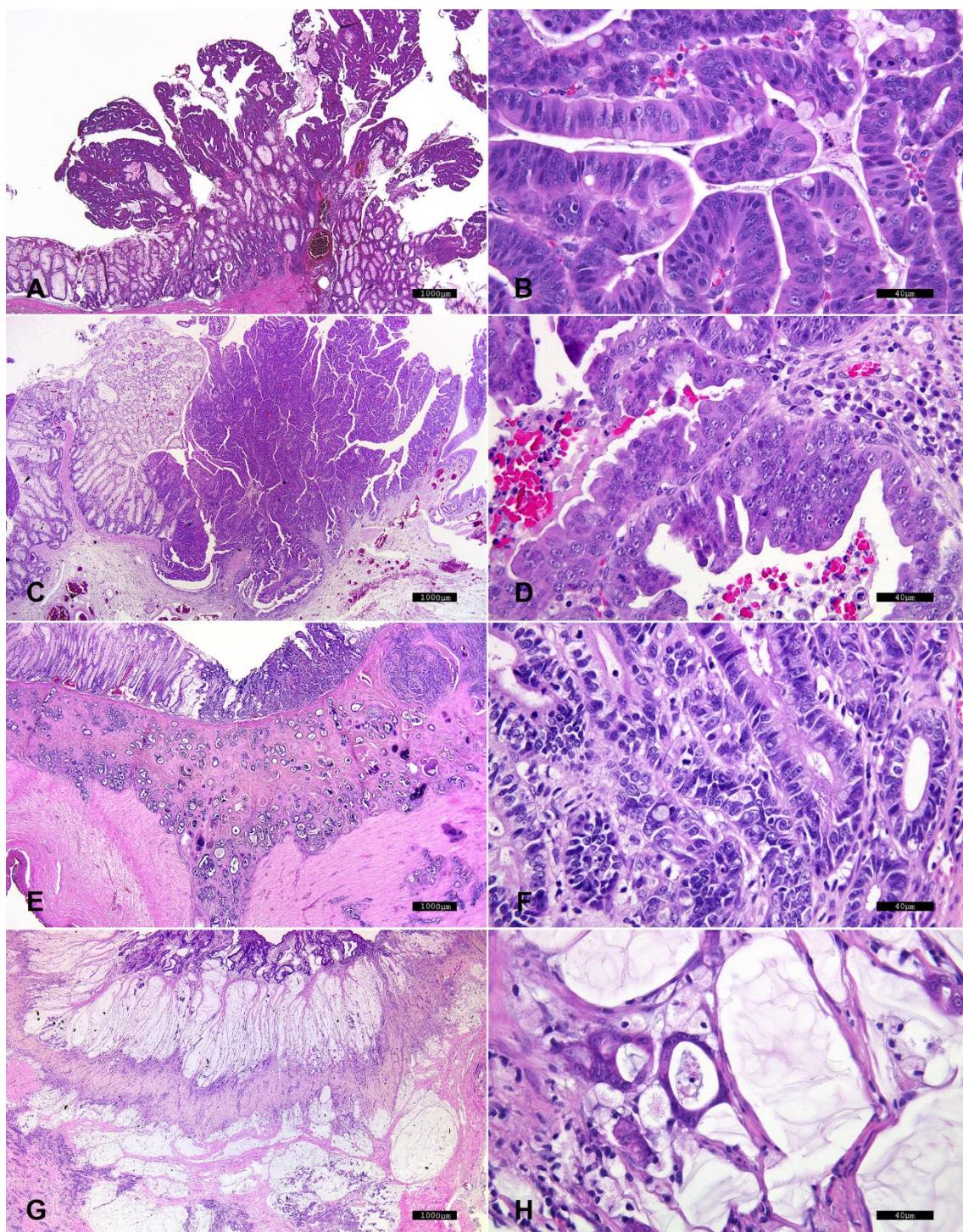


図 1-2. イヌの腸における上皮性腫瘍; HE 染色

- (A) ポリープ状増殖を示す大腸腺腫 Bar=1,000  $\mu$ m
- (B) 図 1-2A の高倍像; 大腸腺腫の腫瘍細胞はわずかに異型を示す Bar=40  $\mu$ m
- (C) 粘膜下組織に限局性の浸潤を示す乳頭状腺癌 (polypoid growth type) Bar=1,000  $\mu$ m
- (D) 図 1-2C の高倍象; 腫瘍細胞の核は淡明で、大小不動や明瞭な核小体を有する Bar=40  $\mu$ m
- (E) 粘膜固有層及び粘膜下組織に広がる腺房腺癌 (Non-polypoid growth type) Bar=1,000 $\mu$ m

- (F) 図 1-2E の高倍象；腫瘍細胞は不規則な管状構造を示す Bar=40  $\mu$ m
- (G) 粘液腺癌；粘膜下組織及び筋層に多量の粘液産生がみられる Bar=1,000  $\mu$ m
- (H) 図 1-2G の高倍象；多量の粘液内に腺管構造もしくは印環細胞がみられる Bar=40  $\mu$ m



## 4. 第二章

### 犬種特異的な消化管上皮性腫瘍に関する病理学的研究

#### 4.1 序

第一章の研究結果から、ミニチュア・ダックスフンドは消化管、特に大腸における上皮性腫瘍の発生が多いことが明らかになった。さらに一部の腫瘍はミニチュア・ダックスフンド特有の病変である炎症性ポリープを併発していた。イヌでは、一般的に炎症性ポリープの発生は稀であるが[8]、日本のミニチュア・ダックスフンドには多発する[50]。本病変は犬種特異的な疾患と考えられることから、ミニチュア・ダックスフンドの炎症性ポリープ（Inflammatory Polyp of Miniature Dachshunds; IPMD）と呼ばれている[51]。組織像は非常に特徴的であり、ヒトにおける潰瘍性大腸炎、クローン病や腸炎などの炎症性腸疾患に伴ういわゆる「炎症性ポリープ」とは異なる。IPMDは大腸のみに発生し、過形成性杯細胞と粘液産生の増加、好中球を主体とした炎症細胞浸潤を含む肉芽様組織によって構成される[51]。その発生には、cyclooxygenase 2 や fibroblast growth factor 2[51], interleukin 8 及び 17[58, 59]、そして pattern recognizing receptor[60, 61]などの炎症性因子が関与しているとされている。IPMDの治療としては外科的な切除や、内視鏡によるポリペクトミー、免疫抑制治療、プラズマアルゴン凝固法がある[50, 62]。ミニチュア・ダックスフンドの大腸におけるIPMDと腫瘍の発生頻度との関係及びIPMD病変から腺腫を発症したという症例報告を鑑みると[63]、IPMDと大腸腫瘍との間に関連性があると考えられる。本章では、ミニチュア・ダックスフンドの腫瘍発生機序の一因を明らかにすることを目的とし、IPMDと消化管上皮性腫瘍との関連性を

検証した。

また IPMD が腫瘍へと進行する可能性を検証するために、IPMD もしくは消化管上皮性腫瘍を発症したミニチュア・ダックスフンドの病歴を調べるとともに、その組織材料を用いて病理組織学的に詳細に観察し、ヒトや動物における消化管上皮性腫瘍の主要な因子である Wnt/beta-catenin 経路[28]の関与を検証することが有用であると考えられる。Beta-catenin は正常の腸では上皮細胞の膜に存在しており、cadherin や alpha-catenin と共に接着結合を形成している[64]。*Adenomatou polyposis coli (APC)* は腫瘍抑制遺伝子であり、その変異はヒトの FAP 患者で同定された[26, 65]。変異による APC の不活性化は、beta-catenin のユビキチンを介した分解を阻害し、結果として beta-catenin の細胞質内蓄積を引き起こす[66]。それに引き続き、beta-catenin は核内に移行し、転写因子である LEF/TCF4 と結合することで、*CCND1*(cycline D)や *MYC*(c-myc)などの増殖関連遺伝子をコードした Wnt ターゲット遺伝子の転写を促進する[32-35]。ヒト及び実験動物において、APC 変異に関連した腸管の腫瘍では、beta-catenin/TCF4 が複合体を形成し、細胞の分化を抑制、前駆細胞の増殖を促進することが知られている[36]。

以上より、本章ではミニチュア・ダックスフンドの大腸ポリープを継続的に調査し、IPMD と腫瘍発生との関連、また組織内での beta-catenin の発現について精査した。

## 4.2 材料と方法

### 4.2.1 動物

2013年から2016年に東京大学附属動物医療センター及び日本小動物医療センターに下血やしぶり、肛門脱等を主訴に来院し、内視鏡検査を受けたミニチュア・ダックスフンドのうち、大腸にポリープ状、腫瘤状病変を有する症例を対象とした。ポリープ性、腫瘤状病変は、67例のミニチュア・ダックスフンドから内視鏡生検材料として得られ、計108標本の大腸ポリープを病理組織検査に用いた。

### 4.2.2 病理組織学検査

すべての組織は10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、常法に従ってパラフィン包埋した。組織切片は厚さ4  $\mu\text{m}$ にて作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。切り出し時に骨形成が疑われた、もしくは薄切が困難であった一部の標本については脱灰液 A (プランク・リュクロ処方、富士フィルム和光純薬株式会社)にて脱灰後に標本作製を実施した。

腫瘍診断は動物の WHO 組織学的分類[37]に従い、IPMD については先行文献[51]に従った。診断基準を端的に以下に記す。

**IPMD:** 好中球及びマクロファージの浸潤、出血、粘液産生の亢進、血管新生、線維芽細胞の増生と骨形成から成るポリープ。ポリープ状の肉芽組織内には円柱上皮細胞がみられる。腺腫: 管状/乳頭状構造を示す上皮細胞の限局性の増殖により構成され、円柱上皮細胞はポリープの大部分を占める。腺癌: 腫瘍細胞は高度異型を示し、細胞極性の消失、核の不整、多数の核分裂像を示す。基底膜への浸潤や間質への浸潤を示す。粘膜下組織

への浸潤を示す。

#### 4.2.3 免疫組織化学染色

組織切片は脱パラフィン後、非特異反応の除去のため 3%過酸化水素化メタノールにて 5 分、8%スキムミルク含有トリス緩衝生理食塩水にて 37°C、40 分処置した。使用した一次抗体を以下に記す：ウサギ抗 APC ポリクローナル抗体（1:100、Thermo Fisher Scientific）、ウサギ抗 p53 ポリクローナル抗体（1:50、Santa Cruz）、マウス抗 beta-catenin モノクローナル抗体（1:1000、clone 14/beta-catenin；BD Transduction Laboratories）、マウス抗 Ki-67 モノクローナル抗体（ready to use、clone MIB-1；Dako）、マウス抗 cytokeratin 5/6 モノクローナル抗体（1:50、clone D5/16 B4；Dako）。抗原の賦活化は、APC、beta-catenin 及び Ki-67 については pH6.0 クエン酸バッファーにて、p53、cytokeratin 5/6 (CK5/6)については Dako high-pH antigen retrieval solution（Dako）にて 121°C、10 分オートクレーブ処理を行った。洗浄の後、組織は Dako Envision Plus Kit（Dako）にて処理した。0.03% 過酸化水素加 DAB（3,3'-Diaminobenzidine、Dojindo）にて発色した後、マイヤーヘマトキシリンにて対比染色を行った。陰性対照は一次抗体を除いて実施した。

#### 4.2.4 蛍光免疫二重染色

蛍光二重免疫染色はウサギ抗 APC 抗体とマウス抗 beta-catenin 抗体を用いて行った。一次抗体反応の後、Alexa Fluor 488 結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（1:200；Thermo Fisher Scientific）、Alexa Fluor 594 結合ヤギ抗マウス

IgG 抗体（1:200；Thermo Fisher Scientific）を用い、37°C にて 40 分反応させた。標本は LSM700 Laser Scanning Microscope（Carl Zeiss）にて観察した。

#### 4.2.5 計測及び統計解析

脱灰を行った試料は、免疫組織化学染色による染色性が著しく低下したことから、適切な評価が不可能であると判断し、解析から除外した。Beta-catenin 陽性細胞及び p53 核陽性細胞数は対物 40 倍にてランダムに 3 視野、上皮における 1000 細胞以上計数した。標本が小さく、1000 細胞に満たなかった場合は、可能な限り計数した。統計解析は IBM SPSS Statistics 22（IBM）を用いた。群間の平均値の比較は one way analysis of variance の後、Tukey の検定を行った。P 値は <0.05 にて有意差ありと判定した。

## 4.3 結果

### 4.3.1 臨床経過とポリープの病理診断

ポリープは結腸から直腸に分布しており、その他の領域には認められなかった。IPMD と診断された病変は、肉眼的に単数もしくは複数のポリープから構成されていた (図 2-1)。治療期間中に発生したポリープには、IPMD だけでなく、腫瘍性病変もみられた (図 2-1)。ただし、これらは内視鏡観察下で区別することは非常に困難であった。

IPMD は病理組織学的に粘膜の表層から内腔に突出するポリープ状の肉芽組織からなり、基底部の構造は概ね保たれていた (図 2-2)。肉芽組織には多数の好中球、マクロファージ及びリンパ球からなる炎症細胞浸潤と間質の水腫、出血及び血管新生が認められた (図 2-2a)。また、破骨細胞様の巨細胞を伴う骨形成もみられた (図 2-2b)。ポリープの底部や周囲では陰窩の拡張と粘液の過剰産生がみられ、杯細胞の過形成 (図 2-2c) から成る粘膜の肥厚がみられた。稀に肉芽組織内に異型上皮細胞巣がみられた (図 2-2d)。異型上皮細胞は肉芽組織内に孤在性にみられ、一部は杯細胞と連続して観察された (図 2-2e)。異型上皮細胞は時に限局性の塊状増殖を示し、核異型や極性の欠如を伴うことから腫瘍性病変と診断する例もあった (図 2-2g)。腫瘍性ポリープはしばしば炎症性ポリープを伴っており (図 2-2)、腫瘍性上皮細胞と IPMD の異型上皮細胞は細胞形態学的に非常に酷似していた (図 2-2d、f)。しかしながら、腫瘍性上皮細胞は塊状、シート状、篩状増殖を示し、核の大小不同や異型を伴う事から IPMD の異型上皮細胞と識別可能であった (図 2-2h)。

67 例の大腸ポリープを病理組織学的に診断した結果、初診で IPMD と

診断されたのは 52 例（78%）、腺腫は 10 例（15%）、腺癌は 5 例（8%）であった（表 2-1）。初診にて IPMD と診断された 52 例のうち 25 例（48%）はポリープ状病変を再発した（表 2-2）。再発時の診断は IPMD が 11 例（21%）、腺腫が 9 例（17%）、腺癌が 5 例（10%）であった（表 2-1）。初診にて腺腫と診断された 10 例は、増殖上皮は主に円柱上皮細胞から構成され、杯細胞への分化を示すものはほとんどなかった。多くの例で、IPMD の組織内に腫瘍がみられた（表 2-2、図 2-3a, b）。このうち、7 例については腫瘍性病変の再発を認めた（表 2-2）。再発した腫瘍の組織診断は、3 例が腺腫、4 例が腺癌であり（表 2-1、表 2-2）、そのほとんどの症例（6/7 例）は同一組織内に典型的な IPMD を伴っていた。調査期間中に腺腫を発症した症例の 90%（18/20 例）は IPMD の発症歴を有する、もしくは同一組織内に IPMD の発生がみられた（表 2-1、表 2-2）。腺癌における異型上皮細胞は核の大小不同を示し、不整な腺管構造を形成していた（図 2-3c, d）。初診時に腺癌と診断された 5 例中 3 例において腺癌の再発がみられた（表 2-1、表 2-2）。腺癌を発症した症例の 57%（8/14 例）は、IPMD の発症歴があるか同一組織内に IPMD の発生があった（表 2-1、表 2-2）。しかし、IPMD の特徴的な組織所見は認められなかった（表 2-1、表 2-2）。

#### 4.3.2 免疫組織化学染色

IPMD 及び腫瘍性病変を含むポリープ病変について、beta-catenin 及び APC の発現状態を調べるため免疫組織化学染色を実施した。beta-catenin は、正常の円柱上皮細胞や過形成性の杯細胞では細胞膜で弱陽性を示した

(図 2-4A)。IPMD 内にみられた異型上皮細胞は、細胞膜が beta-catenin 陽性を示すと共に細胞質内も陽性を示した (図 2-4B)。腺腫、腺癌では、細胞質及び核が陽性を示す一方、細胞膜の染色性は低下していた (図 2-4C, D)。核の染色性は腺腫に比べ腺癌の方が強かった。IPMD、腺腫、腺癌の病巣の一部には、豊富な好酸性の細胞質と大型の核を有し、重層、篩状増殖を示す上皮細胞 (図 2-4E) がみられた。これらの細胞では核が beta-catenin に非常に強く陽性を示した (図 2-4F)。同細胞は扁平上皮マーカーである CK5/6 にも同様に陽性を示したが (図 2-4G)、形態学上、角化や細胞間橋など明らかな扁平上皮細胞の特徴は認められなかった。一方、腺腫や腺癌における円柱上皮細胞は CK5/6 陰性であった (図 2-4H)。IPMD の上皮細胞は正常の陰窩細胞と同様に Ki-67 に陽性を示した (図 2-4I) 一方、腺腫や腺癌は Ki-67 にびまん性に陽性を示した (図 2-4J, K)。CK5/6 に陽性を示した扁平上皮様細胞のほとんどは Ki-67 に陰性であったことから (図 2-4L)、腫瘍性の上皮細胞というより、むしろ squamous morula に相当する病変であると判断し、beta-catenin の定量的解析から除外した。Beta-catenin の核陽性率は IPMD、腺腫、腺癌でそれぞれ 6.4%、46.4%、75.4%であった (図 2-5)。この割合は IPMD と比べ、腺腫、腺癌で有意に高値であった (表 2-3)。

APC の発現を免疫組織化学に確認すると、正常の腸上皮細胞や IPMD における過形成性の上皮細胞では、いずれも細胞質が均一な染色性を示した (図 2-6A~C)。これに対して、腺腫や腺癌の染色性は不均一であり、強陽性部分と弱陽性部分が混在していた (図 2-6D~I)。興味深いことに、beta-catenin に強陽性を示す部分では APC の染色性は減弱しており、逆に



beta-catenin の染色性が減弱している部分では APC が強陽性を示した（[図 2-6D~I](#)）。

悪性度の指標として用いられるがん抑制因子である p53 の陽性細胞率は、IPMD、腺腫、腺癌でそれぞれ 1.2%、8.1%、21.2%であり、IPMD と比べ、腺腫、腺癌で統計学的に有意に高値であった（[図 2-5](#)、[表 2-3](#)）。

#### 4.4 考察

イヌにおける非腫瘍性の消化管ポリープの発生に関する報告は非常に少ない。しかしミニチュア・ダックスフンドでは、大腸に非腫瘍性のポリープが多発する傾向があり、ミニチュア・ダックスフンドの炎症性ポリープ (IPMD) と呼ばれる [50]。本研究では、ミニチュア・ダックスフンドのポリープ状病変について継続した観察と組織採取、病理診断を行った。その結果 IPMD を発症した症例のうち、48% (25/52 例) はポリープ状病変を再発した。これら再発症例の 56% (14/25 例) は腫瘍性病変 (腺腫もしくは腺癌) であった。さらに、腺腫もしくは腺癌と診断された初発症例のうち、76% (22/29 例) は同一組織内に IPMD の特徴を有していたか、IPMD の発症履歴を有していた。これらの結果は、IPMD が腺腫や腺癌に進行する前腫瘍病変としての性質を有している可能性を示唆している。一方、初診で腺癌と診断された例では、その組織内に IPMD の組織学的特徴を見出すことはできなかった。これらの例では、腺癌が IPMD とは無関係に発症した可能性や、IPMD から発症したものの完全に腫瘍組織に置換された可能性が考えられた。イヌの消化管腫瘍の発生は稀であるにも関わらず [8, 43, 67, 68]、IPMD を発症した 52 例のうち 14 例 (27%) も治療中に腫瘍を発生した事、さらに IPMD 組織内に異型上皮細胞、腫瘍性上皮細胞が散見されることは、IPMD が腫瘍の発生源母地となりうることを示唆している。

Beta-catenin と APC の異常は、ヒトの大腸ポリープの原因と考えられている。本章では、イヌの大腸腫瘍における beta-catenin の関与を示す目的で、beta-catenin の核陽性率の定量的解析を実施した。好酸性の細胞質と大型の核、篩状増殖や重層化など、一見すると悪性の特徴を有す特定の細

胞が Beta-catenin に強陽性を示した。これらの異型細胞の増殖活性を調べるため、Ki-67 による免疫組織化学染色を実施した。Ki-67 は増殖活性マーカーであり、IPMD 病変や正常陰窩の細胞核が陽性を示し、腺腫、腺癌細胞の核も陽性を示した。しかし上述の異型細胞巣では Ki-67 陽性所見は確認できなかった。一方、これらの細胞は扁平上皮細胞マーカーである CK5/6 に陽性を示した。

ヒトにおいて、扁平上皮化生は大腸腺腫腺癌を含む多くの上皮性腫瘍で報告されている[69-73]。典型的な扁平上皮化生病変の他に、子宮内膜[74, 75]、胃[76]、大腸[77, 78]の腫瘍では、扁平上皮に似た細胞の病巣がみられることがあり、これらの病巣は squamous morules と呼ばれている。Squamous morules は、明らかなケラチン産生や細胞間橋を欠くものの CK5/6 陽性を示すとされており[74]、未熟もしくは不完全な扁平上皮への分化を示すものと考えられている[79]。ヒトの結腸直腸癌および胃癌の squamous morules において、beta-catenin は広範な分布を示すにも関わらず、Ki-67 陽性細胞および p53 陽性細胞はほとんど観察されない[76, 77]。従って、squamous morules が悪性要素をとしての性格を有するかどうかは、依然として議論が続いている。以上のことから、IPMD、腺腫、腺癌にみられた CK5/6 陽性の細胞は、形態学的及び免疫組織化学的特徴から、ヒトの腫瘍で報告がある squamous morules と類似の病変であると考えられた。これら CK5/6 陽性細胞という特異な細胞を評価するのは、腸の上皮性腫瘍形成機序を解明するという本研究の目的からは逸すると考え、beta-catenin の定量解析から除外した。

beta-catenin 及び p53 の核陽性細胞数は、IPMD に比べ腺腫と腺癌で有

意に多かった。また、beta-catenin が核強陽性を示す部位では、APC の陽性強度は減弱していた。これらの APC と beta-catenin の分布についての結果は、イヌの消化管腫瘍についての先行研究と一致する [80, 81]。APC はヒトの腫瘍発生、悪性化に重要な役割を担っており、FAP 患者では APC が変異・不活化することによって、良性ポリープが悪性転化することが知られている [24]。APC はヒト [19, 82, 83] だけではなく、イヌの大腸腫瘍においても [14]、最も一般的な腫瘍抑制因子とされている。本研究でみられた APC の発現強度の低下は、組織内の beta-catenin の核内移行を引き起こした可能性があり、これによって腸上皮細胞の脱分化や細胞増殖が引き起こされたと考えられた。一方で p53 は、IPMD、腺腫及び腺癌にて統計学的に有意な増加を示した。このことから IPMD 病変の悪性化に、p53 の異常が関与している可能性が考えられた。しかしながら、イヌの消化管腫瘍については、がん抑制因子である p53 の腫瘍発生、悪性化への関連は低いとする報告もある [80]。今回の結果はミニチュア・ダックスフンドという特定の犬種で発生した病変のみの精査であることから、犬種を問わずイヌにおける関与を知るためには、さらなる検討が必要であると考えられた。

本章では、日本における IPMD は腺腫や腺癌を発症する可能性のある進行性疾患である可能性を明らかにした。さらにこれらの症例では、APC や beta-catenin の異常な発現が腫瘍の進行に関与している可能性も明らかになった。

## 4.5 図表

表 2-1. ミニチュア・ダックスフンドの大腸ポリープ 67 病変の病理組織診断

Initial: Subsequent	Cases		Tumor with IPMD
	n	%	
IPMD	52		
None	27	51.9	— <sup>a</sup>
IPMD	11	21.2	—
Adenoma	9	17.3	9
Adenocarcinoma	5	9.6	4
Adenoma	10		
None	3	30.0	2
Adenoma	3	30.0	3
Adenocarcinoma	4	40.0	3
Adenocarcinoma	5		
None	2	40.0	0
Adenocarcinoma	3	60.0	0

IPMD, Inflammatory polyp of Miniature Dachshunds.

<sup>a</sup> 該当なし

表 2-2. ミニチュア・ダックスフンドの大腸ポリープ 67 病変の病理組織診断の個別情報

Case No.	Sex*	Age		Histopathological diagnosis**				
		Year	Month	1st	2nd	3rd	4th	with IPMD
01	SF	7		IPMD	-	-	-	-
02	F	7		IPMD	-	-	-	-
03	SF	7	0	IPMD	-	-	-	-
04	SF	7	0	IPMD	-	-	-	-
05	F	7	6	IPMD	-	-	-	-
06	SF	7	10	IPMD	-	-	-	-
07	SF	8		IPMD	-	-	-	-
08	SF	9		IPMD	-	-	-	-
09	F	9	11	IPMD	-	-	-	-
10	SF	10		IPMD	-	-	-	-
11	SF	11		IPMD	-	-	-	-
12	SF	11	4	IPMD	-	-	-	-
13	SF	12		IPMD	-	-	-	-
14	SF	12	7	IPMD	-	-	-	-
15	F	13	10	IPMD	-	-	-	-
16	SF	13	6	IPMD	-	-	-	-
17	SF	15		IPMD	-	-	-	-
18	M	6		IPMD	-	-	-	-
19	CM	6	2	IPMD	-	-	-	-
20	CM	6		IPMD	-	-	-	-
21	M	7	5	IPMD	-	-	-	-
22	CM	8		IPMD	-	-	-	-
23	CM	8	0	IPMD	-	-	-	-
24	CM	9	10	IPMD	-	-	-	-
25	CM	10	11	IPMD	-	-	-	-
26	CM	10	3	IPMD	-	-	-	-
27	M	11	6	IPMD	-	-	-	-
28	F	5	9	IPMD	IPMD	-	-	-
29	SF	8		IPMD	IPMD	-	-	-
30	SF	8	0	IPMD	IPMD	-	-	-
31	SF	9		IPMD	IPMD	-	-	-
32	SF	11	8	IPMD	IPMD	-	-	-
33	F	12		IPMD	IPMD	-	-	-
34	F	12	9	IPMD	IPMD	-	-	-
35	M	4	0	IPMD	IPMD	-	-	-
36	CM	8		IPMD	IPMD	-	-	-
37	CM	11		IPMD	IPMD	IPMD	IPMD	-
38	M	12		IPMD	IPMD	-	-	-
39	SF	6	6	IPMD	Adenoma	Adenoma	-	with IPMD
40	SF	7	4	IPMD	Adenoma	Adenoma	-	with IPMD
41	SF	7	7	IPMD	Adenoma	Adenoma	-	with IPMD
42	SF	8		IPMD	Adenoma	-	-	with IPMD
43	CM	8	2	IPMD	Adenoma	IPMD	-	with IPMD
44	M	9	2	IPMD	Adenoma	Adenoma	-	with IPMD
45	M	10		IPMD	Adenoma	IPMD	-	with IPMD
46	M	10		IPMD	Adenoma	Adenoma	-	with IPMD
47	CM	12	7	IPMD	Adenoma	-	-	with IPMD
48	CM	10	7	IPMD	ACA	-	-	-
49	M	11		IPMD	ACA	Adenoma	ACA	with IPMD
50	M	12		IPMD	ACA	-	-	with IPMD
51	CM	13	3	IPMD	IPMD	ACA	-	with IPMD
52	CM	14	8	IPMD	IPMD	ACA	ACA	with IPMD
53	M	5		Adenoma	-	-	-	with IPMD
54	M	7		Adenoma	-	-	-	with IPMD
55	CM	8	6	Adenoma	-	-	-	-
56	SF	10	1	Adenoma	Adenoma	-	-	with IPMD
57	M	9		Adenoma	Adenoma	Adenoma	-	with IPMD
58	M	11		Adenoma	Adenoma	-	-	with IPMD
59	SF	11	3	Adenoma	ACA	-	-	with IPMD
60	M	7	10	Adenoma	Adenoma	ACA	-	with IPMD
61	CM	12	1	Adenoma	ACA	ACA	ACA	with IPMD
62	CM	14	0	Adenoma	ACA	-	-	-
63	F	7	8	ACA	-	-	-	-
64	CM	13		ACA	-	-	-	-

Continued on next page

*Continued from previous page*

65	SF	12	6	ACA	ACA	-	-	-
66	CM	12		ACA	ACA	-	-	-
67	CM	12	6	ACA	ACA	-	-	-

\* F, 雌 (Female) ; SF, 避妊雌 (Spayed female) ; M, 雄 (Male) ; CM, 去勢雄 (Castrated male)

\*\* ACA, 腺癌 (Adenocarcinoma) ; -, 該当なし

表 2-3. Tukey 有意差検定の結果

Study groups	Tukey honestly significant difference		
	Q statistic	<i>p</i> -value	inference
Beta-catenin			
IPMD vs Adenoma	12.0616	0.0010053	** <i>p</i> <0.01
IPMD vs Adenocarcinoma	14.3376	0.0010053	** <i>p</i> <0.01
Adenoma vs Adenocarcinoma	5.6047	0.0010053	** <i>p</i> <0.01
p53			
IPMD vs Adenoma	4.2097	0.0107771	* <i>p</i> <0.05
IPMD vs Adenocarcinoma	9.3711	0.0010053	** <i>p</i> <0.01
Adenoma vs Adenocarcinoma	5.9476	0.0010053	** <i>p</i> <0.01

図 2-5 参照



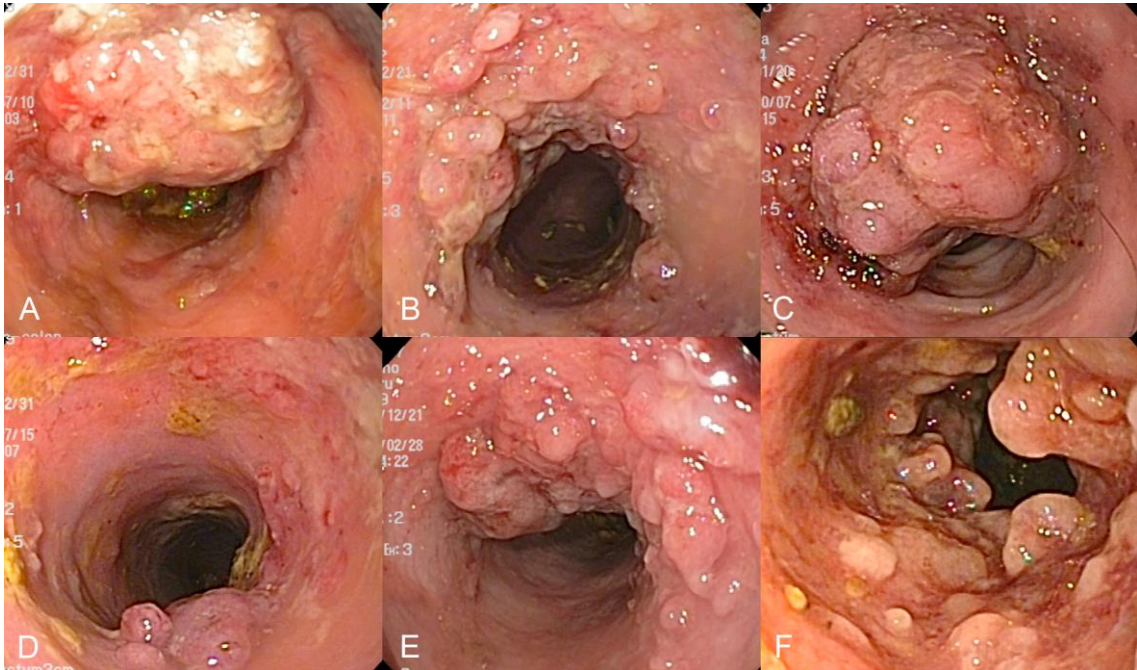


図 2-1. ミニチュア・ダックスフンドの大腸におけるポリープ病変の内視鏡像

(A~C) ミニチュア・ダックスフンドの炎症性ポリープ (IPMD)

(A) 粘膜面にみられた孤在性の大型ポリープ

(B) 複数の小型ポリープ

(C) 小葉状の大型ポリープ

(D~F) IPMD に続発した腫瘍性ポリープ (A~C と同一症例)

(D) 腺腫：粘膜表面にみられた数個の小型ポリープ

(E) 腺腫：肉眼的特徴は原発性ポリープと酷似

(F) 腺癌：不規則な形状の複数のポリープ

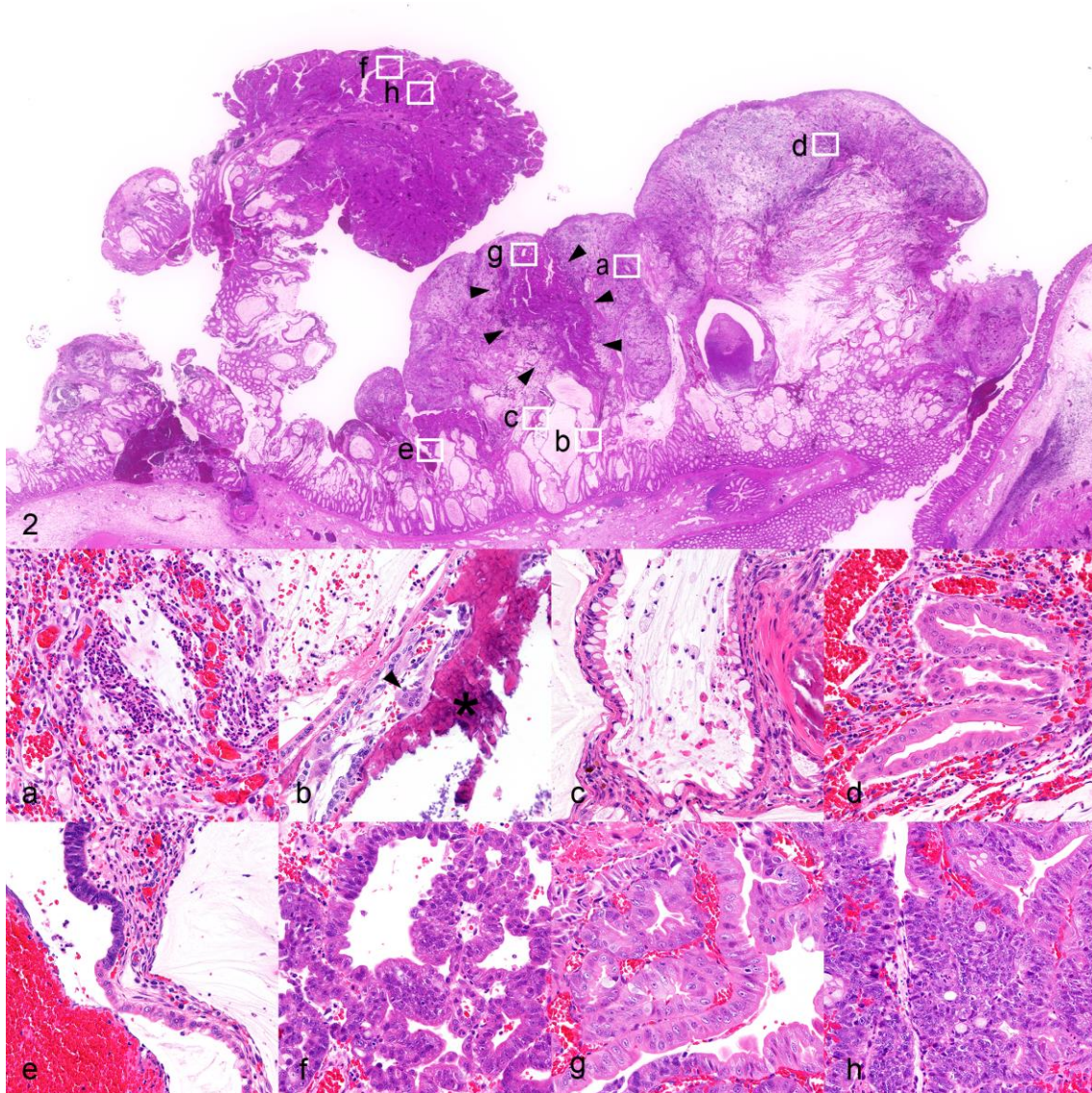


図 2-2. 腺癌を伴うミニチュア・ダックスフンドの炎症性ポリープ（IPMD）の病理組

#### 織学的特徴

有茎性の腫瘍（左）と肉芽様ポリープ（右）が連続してみられ、双方とも粘膜から内腔へ突出してみられる。IPMD 内にも一部腫瘍性増殖が認められる（矢頭）。四角で囲った領域の拡大像の特徴を以下に記す。

- (a) 好中球を主体とした炎症細胞浸潤及び血管新生
- (b) 多核巨細胞（矢頭）と共に骨形成（\*）がみられる
- (c) 過形成性の杯細胞が拡張した陰窩を内貼りし、多量の粘液産生を伴う
- (d) 肉芽組織内には異型を示す上皮細胞が限局性にみられる
- (e) 異型上皮細胞は過形成性の杯細胞と連続する部位がある
- (f) 腫瘍性上皮細胞の一部；不規則な管状構造を形成する
- (g) IPMD 内の異型上皮細胞塊；形態的に腫瘍性上皮細胞と酷似する

(h) 腫瘍性上皮細胞の一部；腫瘍細胞の核は高密度で、異型、極性消失を示す

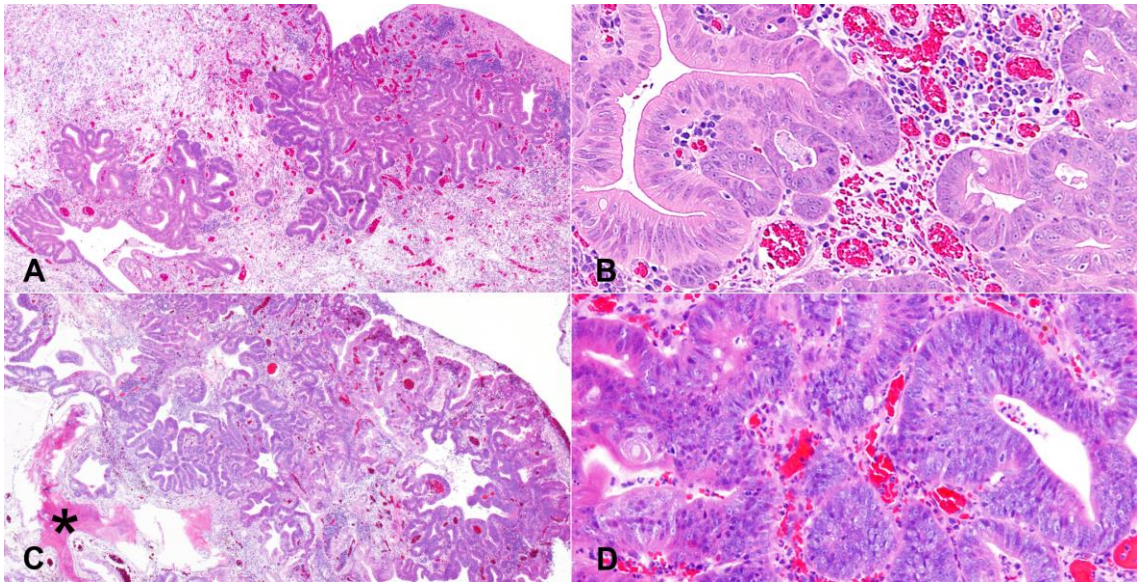


図 2-3. ミニチュア・ダックスフンドの炎症性ポリープ（IPMD）内に発生した腺腫/腺癌

- (A、B) IPMD より発生した大腸腺腫
- (A) IPMD の肉芽組織内を一部腫瘍性上皮細胞が占める
- (B) 図 2-8 の拡大像：1 層の円柱上皮が管状構造を示し、わずかな核異型、細胞異型を伴う
- (C、D) IPMD より発生した大腸腺癌
- (C) 肉芽組織内にみられる腫瘍性上皮は極性を失いつつ増殖する。一部では骨形成を伴う（\*）
- (D) 図 2-10 の拡大像：腫瘍細胞は乳頭状から管状の増殖、異型を示す。一部で極性を失い、明確な基底膜構造を欠く

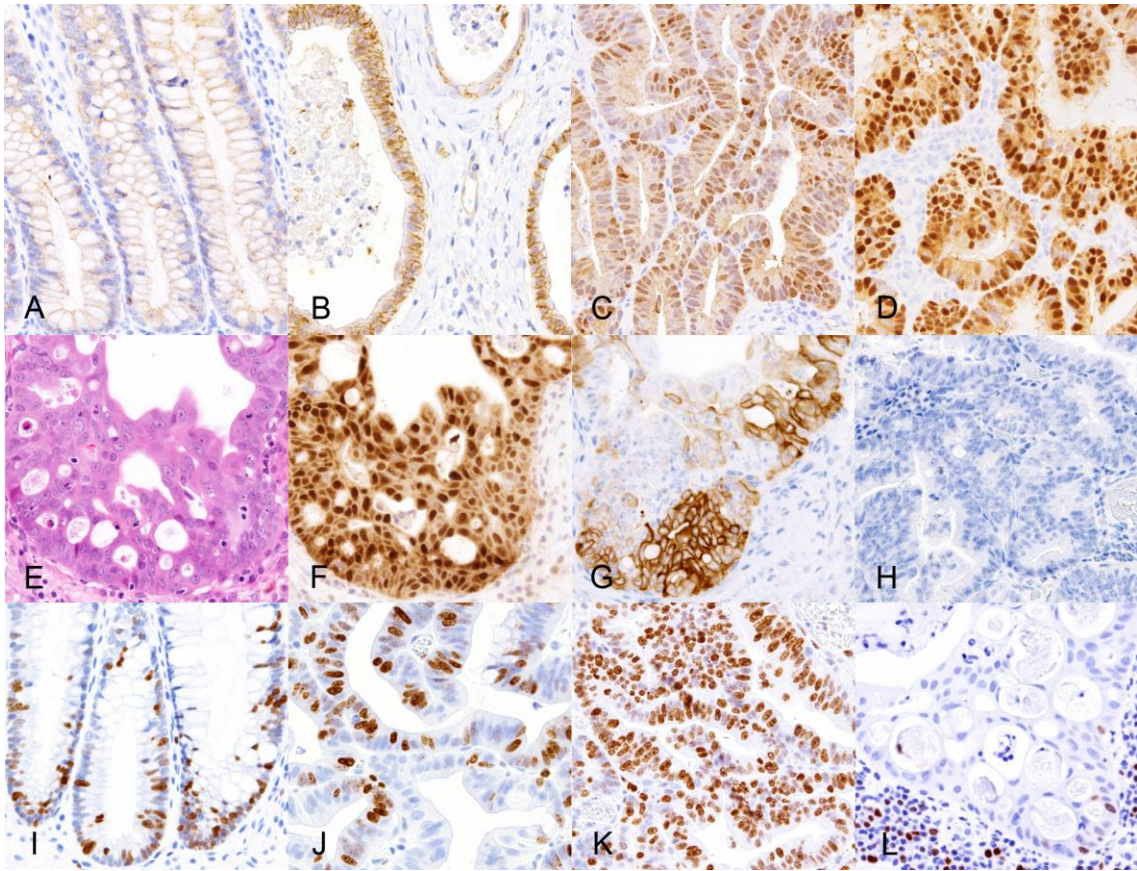


図 2-4. 正常部位、ミニチュア・ダックスフンドの炎症性ポリープ（IPMD）、腺腫、腺癌における免疫組織化学染色（beta-catenin、Ki-67、cytokeratin 5/6）

（A～D） beta-catenin を用いた免疫組織化学染色（IHC）

（A） 結腸正常部位。杯細胞の細胞膜に弱陽性

（B） IPMD 内の異型上皮細胞。肉芽組織内にみられる異型上皮細胞は細胞膜及び細胞質に陽性

（C） 腺腫：細胞質に加え約半数で核内陽性

（D） 腺癌：細胞質に加えほとんどの核内に強陽性

（E～G） IPMD 内の異型上皮細胞（連続切片）

（E） 上皮細胞は豊富な細胞質と大型の核を有し、重層化、篩状構造を呈する（HE）

（F） 多くの細胞は beta-catenin に核陽性

（G） 異形細胞は cytokeratin 5/6 に陽性（IHC）

（H） 腺癌：腫瘍細胞は cytokeratin 5/6 は陰性

（I～L） Ki-67 による IHC

（I） 結腸正常部位の上皮細胞は増殖帯である基底部に陽性

（J） 腺腫：半数程度の腫瘍細胞が核陽性

（K） 腺癌：腫瘍細胞の多くが核陽性

（L） IPMD 内の cytokeratin 5/6 陽性領域は Ki-67 に概ね陰性（図 2-16 の連続切片）

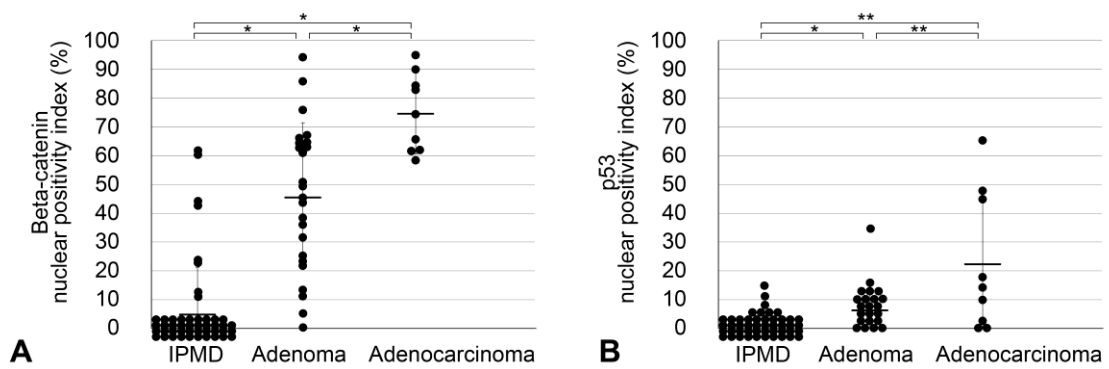


図 2-5. ミニチュア・ダックスフンドの炎症性ポリープ（IPMD）の beta-catenin 及び p53 核陽性率

ミニチュア・ダックスフンドの炎症性ポリープ（IPMD, n=47）、腺腫（n=24）、腺癌（n=9）における beta-catenin（A）及び p53（B）核陽性細胞の割合。IPMD と比較して、腺腫と腺癌の割合が有意に高かった。 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ 。横線は各群の中央値、エラーバーは標準偏差を示す。

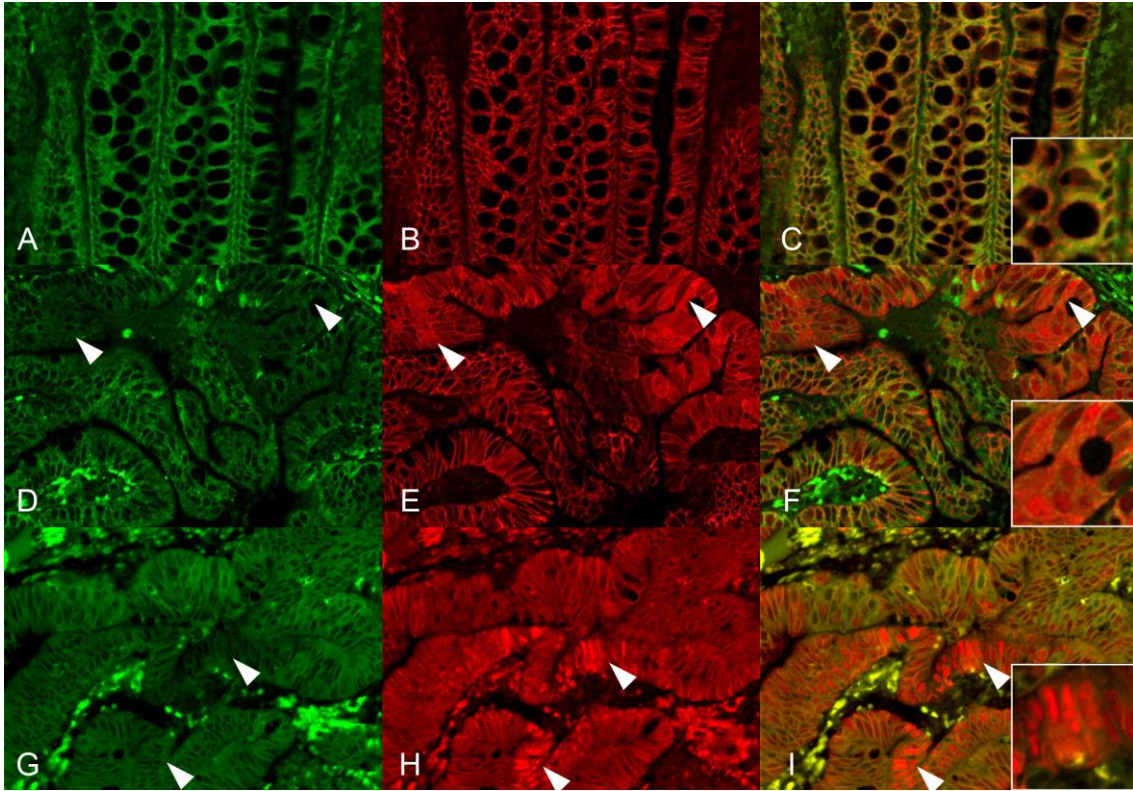


図 2-6. APC 及び beta-catenin の蛍光二重染色

(A, D, G) adenomatous polyposis coli (APC ; 緑)、(B, E, H) beta-catenin (赤)、(C, F, I) 結合 (挿入図はそれぞれ拡大図を示す)

(A~C) 正常結腸上皮 ; Beta-catenin 及び APC の均一な染色性がみられる

(D~F) 腺腫 ; APC の染色強度が弱い部位では beta-catenin の染色強度が強くみられる (矢頭)

(G~I) 腺癌 ; APC の染色強度が弱い部位で beta-catenin の核陽性像がみられる (矢頭)

## 5. 第三章

イヌの消化管上皮性腫瘍の組織形態と病理発生機序に関する研究

### 5.1 序

本研究の第一章では、ジャック・ラッセル・テリアやミニチュア・ダックスフンドは消化管腫瘍を発生しやすいことを示した。ジャック・ラッセル・テリアについては、消化管腫瘍の発生が多い原因として APC 遺伝子の生殖細胞系列変異が近年明らかにされている[49]。一方、ミニチュア・ダックスフンドについては本研究の第二章において、犬種特異的に好発する非腫瘍性病変である IPMD が前腫瘍性病変としての性格を有する事、その腫瘍化には beta-catenin や APC、p53 が関与していることが推察された。ただし、これらは特定犬種のみで示された事象であり、イヌの消化管腫瘍の特徴として述べるにはさらなる検証が必要である。さらに第二章での研究対象は、IPMD というポリープ状の病変を基とする性質から、検索した腫瘍性病変も PG 型であった。一方、第一章で実施した多犬種を対象とした調査では、ポリープ状隆起を示す PG 型だけではなく、陥凹もしくは平坦型の腫瘍である NPG 型腺癌の発生がしばしばみられた。これらの増殖形態を示す病変はヒトでも報告されており[84]、小型の病巣でも既に癌(悪性)であること、さらにその組織内に腺腫や前がん病変を含まないことから、新規に生じる *de novo* 癌であると考えられている[21, 85]。つまり形態学的な PG 型もしくは NPG 型は、大腸の発生機序である Adenoma-carcinoma sequence もしくは *de novo* 発がん経路を反映している[40, 54]。NPG 型腺癌は急速に進行し、ただちに大型の進行癌へと進展する[56, 86]。De novo 発がんにおける、関連する遺伝子変異についてはほとんど知られ



ていないものの[87-89]、APC や KRAS の関与は稀であるとされている[90-92]。

そこで第三章では、これら NPG 型を含むすべての消化管腫瘍性病変に関して、beta-catenin の関与を探るべく、免疫組織化学的に検討した。さらに、ヒトにおいて腫瘍抑制[93]、浸潤性増殖、転移や予後[94]に重要な役割をはたしているとされている E-cadherin、遺伝子変異と蛋白質蓄積が腺腫から早期癌への進行に関わっているとされている p53[95, 96]について併せて検討し、イヌの消化管腫瘍における組織学的特徴と主要な発がんマーカーとの関連を探ることを目的とした。

## 5.2 材料と方法

### 5.2.1 症例

2013 から 2016 年の間に 3 施設（東京大学附属動物医療センター、日本小動物医療センター、日本動物高度医療センター）で内視鏡もしくは外科手術にて腫瘍を摘出され、組織学的に腫瘍性病変と診断された 95 症例 131 検体を用いた。

### 5.2.2 病理組織検査

すべての標本は 10% 中性ホルマリンにて固定した。常法に従い、4 $\mu$ m のパラフィン切片について HE 染色もしくは免疫組織化学染色を行った。いずれの病変も、動物の WHO 組織学的分類[37]に従って分類し、加えて PG 型（[図 3-1](#)）もしくは NPG 型（[図 3-2](#)）に分類した。PG/NPG 分類はヒトの大腸腫瘍で用いられている分類を基にした[40]。すなわち、PG 型の腺癌は、内腔へ突出した隆起性の腫瘍（有茎型、固着型を含む）、NPG 型の腺癌は正常粘膜の丈を越えない平坦もしくは陥凹した病変である。上記に従い、腺腫（n=40）、PG 腺癌（n=48）、NPG 腺癌（n=17）、印環細胞癌（n=15）、粘液腺癌（n=7）、未分化癌（n=4）に分類した。これら組織的特徴的形態を [図 3-1](#)～[図 3-5](#) に示す。また、これらの標本は beta-catenin、E-cadherin、p53 を用いた免疫組織化学染色にも供した。

### 5.2.3 免疫組織化学染色

組織切片は脱パラフィン後、非特異反応を防止するため、3% 過酸化水素化メタノールで室温 5 分、8% スキムミルク含有 Tris-buffered saline で

37°C、40 分間インキュベートした。一次抗体は以下を用いた：マウス抗 beta-catenin モノクローナル抗体（1:1000、clone 14/Beta-Catenin；BD Transduction Laboratories）、マウス抗 E-cadherin モノクローナル抗体（1:1000、36/E-Cadherin；BD transduction Laboratories）及びウサギ抗 p53 ポリクローナル抗体（1:50；Santa Cruz）。beta-catenin 及び E-cadherin の抗原の賦活化には pH 6.0 クエン酸バッファーを用い、p53 の抗原賦活化には Dako high pH antigen retrieval solution（Dako）を用いてオートクレーブで 121°C、10 分間加温処理を実施した。その後、湿潤箱内で一次抗体と 4°C、一晩反応させた。切片は洗浄後 Dako Envision Plus Kit（Dako）にて処理し、0.03% 過酸化水素含有 3-3'-diaminobenzidine（Dojindo、Kumamoto、Japan）を用いて発色した。その後マイヤーヘマトキシリンにて対比染色を行った。陰性対象は一次抗体を除いたものを用いた。beta-catenin や p53 の免疫染色スコアは、核陽性細胞の割合が、<1%をスコア 0、1-25%をスコア 1、26-50%をスコア 2、50%<をスコア 4 として評価した。E-cadherin では膜陽性の低下した領域の割合について、上記スコアを用いて評価した。

## 5.3 結果

### 5.3.1 beta-catenin 核陽性率

beta-catenin は正常上皮細胞では膜が陽性であった。核の反応性を表 3-1 及び表 3-2 にまとめて示した。胃腺腫では 20% (1/5 例)、大腸腺腫は 94% (33/35 例) の症例が beta-catenin 核陽性を示した。消化管全体では 55% (22/40 例) の症例がスコア 1 であり、特に胃ではスコア 2、3 を示す例はみられなかった。腺癌は胃と腸管、PG 型と NPG 型でそれぞれ染色性が異なっていた。PG 型胃腺癌では 45% (5/11 例)、小腸では 100% (3/3 例)、大腸では 100% (34/34 例、図 3-1) で beta-catenin 核陽性であった。形態学的には胃 PG 型腺癌 (図 3-6) と腸 PG 型腺癌 (図 3-7) は酷似しているものの、胃での beta-catenin 陽性率、陽性スコアは腸と比べ低かった (表 3-2)。大腸における PG 型腺癌では、47% (16/34 例) がスコア 3 であったが、NPG 腺癌 (1/17 例、図 3-2b)、印環細胞癌 (0/15 例、図 3-3b)、粘液腺癌 (0/7 例、図 3-4b)、未分化癌 (0/4 例、図 3-5b) では、一例を除く全ての例で陰性であった (表 3-2)。

### 5.3.2 E-cadherin の膜陽性率

E-cadherin は正常上皮細胞では細胞膜が陽性であった。膜陽性率の結果を表 3-1 及び表 3-3 にまとめて記載した。腫瘍細胞は組織型に関わらず、様々な程度で E-cadherin への反応性を失っていた。特に PG 型腺癌は腫瘤の表層で強陽性を示したのに対し、深部での反応性は低下していた (図 3-1c)。腺管形成性の腫瘍は、NPG/PG 型などの増殖形態に関わらず様々な染色性を示したが、一部ではその反応性が保たれていた (図 3-1c、図 3-2c)。

一方、びまん性増殖を示す粘液腺癌（図 3-3c）、印環細胞癌（図 3-4c）、未分化癌（図 3-5c）では、ほぼすべての領域で染色性の低下がみられ、特にスコア 3 を記録した例では完全に陰性の場合もあった（図 3-4c）。粘液腺癌の E-cadherin に対する反応性は、印環細胞様の単細胞性腫瘍細胞で著しく低下していたが、腺管構造を形成している腫瘍細胞では細胞膜が陽性を示した（図 3-3c）。

### 5.3.3 p53 の核陽性率

正常の上皮細胞は p53 が陰性であった。p53 への反応性は表 3-1 及び表 3-4 にまとめて示した。全体として 39%（51/131 例）の胃消化管腫瘍で陽性所見がみられた。良性腫瘍である腺腫は、43%（17/40 例）で核陽性を示したが、すべてスコア 1 と低く、スコア 2 以上の例はみられなかった。一方、悪性腫瘍では、8%（7/91 例）がスコア 3 であったが、その内訳は PG 腺癌が 1/48 例（図 3-1d）、NPG 腺癌が 1/17 例（図 3-2d）、印環細胞癌が 3/15 例（図 3-4d）、未分化癌が 2/4 例（図 3-5c）であった。粘液腺癌は、一部の腫瘍性細胞は陽性を示したが、その領域は限局的であった（図 3-3d）。これらの結果に統計学的な有意差は認められず、組織型や発生部位と免疫組織化学的スコアとの相関は得られなかった。しかし、スコア 3 を示した症例では、いずれも間質/粘膜下浸潤もしくは遠隔転移が認められた。

## 5.4 考察

ヒトの大腸腫瘍発生機序としては adenoma-carcinoma sequence が主流であり、本経路は遺伝子変異の蓄積によって生じるとされる[18]。APC 腫瘍抑制遺伝子の変異、不活性化は、adenoma-carcinoma sequence において早期に生じ、結果として腺腫を形成する[97]。APC 変異は、ヒトの家族性腺腫症 (familial adenomatous polyposis, FAP) 患者から発見され[24-26]、散发性の大腸腺腫および大腸癌においても 80%以上の症例で認められている[27]。APC は細胞内における beta-catenin の制御に関与している[98]。変異 APC は axin と結合できないことから beta-catenin の分解が抑制され、細胞内および核内に beta-catenin 蛋白質が蓄積する[99]。さらに一部の腫瘍では、beta-catenin の変異や beta-catenin-Tcf 経路の活性化も報告されている[100]。消化管腫瘍における APC 及び beta-catenin の研究は実験動物や伴侶動物においても実施されており、その関与が報告されている[80, 101]が、特に FAP 患者や APC に変異を有する代表的なモデル動物である *Apc<sup>min</sup>* マウスに生じる腫瘍はポリープ状を呈し、Adenoma-carcinoma sequence を介して発生すると考えられている[12]。本章では、beta-catenin がイヌの消化管腫瘍発生に及ぼす影響を精査するため、免疫組織化学染色 (IHC) を実施した。IHC を用いた beta-catenin の検出結果は、胃と腸で異なる結果を示していた。小腸及び大腸の PG 腺癌は全例 (100%、37/37 例) で腫瘍細胞の核が陽性を示したのに対し、胃の PG 腺癌では、核に陽性所見を認められた例は 45% (5/11 例) であった。この結果は、beta-catenin の機能不全がイヌの腸において特に PG 型腺癌の発生に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。また、胃と腸の PG 腺癌における beta-catenin の発現の相違は、腫瘍形成における本分子の役割の違いを示している可能性があ

る。ヒトの胃がんはその発生機序の違いから、主としてびまん型と腸型の2種に分けられる[102, 103]。腸型は、慢性胃炎から萎縮性胃炎、腸上皮化生、異形成を経て、段階的に癌に進展する。この胃炎の発生過程は、主に *Helicobacter pylori* 感染に関連する[102, 103]。一方、びまん型は、胃炎を経ずに新規に癌が発生すると考えられている[103]。ヒトの胃がんにおける Wnt/beta-catenin 経路の関与については様々な解釈があるものの、およそ30%以上の胃がんで関与しているとされ[102]、腸における腫瘍発生である[27]adenoma-carcinoma sequence とは異なると解釈されている。この様に、ヒトの消化管腫瘍発生では、胃よりも腸の方が APC や beta-catenin に依存しており、本研究におけるイヌの胃と腸の腫瘍における APC と beta-catenin の発現の差とも合致している。イヌの大腸腫瘍における APC の変異や beta-catenin の核内蓄積については既に報告があり[14, 80]、本研究で腫瘍発生が多くみられたジャック・ラッセル・テリアでもまた同様であった[49]。従って、PG 型腫瘍でみられた核内 beta-catenin の高スコアは、APC の遺伝子変異に起因する可能性を示すものと考えられる。

一方で、NPG 型の癌の 94% (16/17 例) では beta-catenin に対する核の陽性反応は認められなかった。同様に、びまん性に増殖する印環細胞癌、粘液腺癌、未分化癌でも、beta-catenin の核内発現は認められなかった。これらの結果は、イヌの NPG 型の腫瘍については PG 型と別の発生経路、すなわち beta-catenin を必要としない経路により発生していることが示唆された。イヌにおいて PG/NPG 分類にて検討した文献はみられないが、ヒトでは古くから研究されている。しかし、遺伝的・分子的要因については未だ議論の余地があり、beta-catenin を制御・分解する APC については NPG

型の癌腫に必ずしも関与しているわけではない[92]とされており、beta-catenin の関係についても十分検証されてはいない。本研究の結果は、消化管上皮系腫瘍の発生機序における beta-catenin の必要性について、新たな知見を提供するものである。

E-cadherin はカルシウム依存性細胞間接着分子である。細胞間接着は、細胞外部分を構成するタンパク質である E-cadherin と、細胞内の alpha-、beta-および p120 catenin との接着で構成されている[104]。E-cadherin やそれらの catenin 分子は上皮の構造を保持するとともに、腫瘍の抑制にも重要な役割を果たしている[104-107]。特に E-cadherin は腫瘍抑制[93]、浸潤性増殖、転移や予後[94]に重要であることが知られている。進行癌では、がん細胞は隣接する細胞から離れ、基底膜を破壊して周囲組織に移動する。E-cadherin の変異は様々な腫瘍で認められており[108]、癌の浸潤と転移に関与する[109, 110]。胃癌[111, 112]や大腸癌[113, 114]を含む様々な腫瘍[115]では、E-cadherin の発現が減少することも知られている。イヌの消化管腫瘍における E-cadherin の役割についてもいくつか報告があるが[80, 81, 116]、その詳細については不明な点が多い。このため、本研究ではイヌの消化管上皮腫瘍における腫瘍発生や悪性転化に関わる因子として、E-cadherin の発現を検討した。その結果、イヌの胃腸管上皮性腫瘍における E-cadherin の発現は、腫瘍内の位置に依存している傾向があった。すなわち、PG 型腫瘍では、内腔に面した表層部の腫瘍細胞の膜が強い発現を示し、深層部では著しく低下または消失していた。また、印環細胞癌や粘液腺癌、未分化癌などのびまん性増殖を示す悪性腫瘍の一部では、E-cadherin の発現が完全に消失していた。しかしながら、良性腫瘍を含む他の腫瘍で



も E-cadherin の発現低下がみられたことから、組織型と E-cadherin の発現の間に相関はみられなかった。ヒト [117] やイヌ [80] の大腸腺腫における E-cadherin の発現は腺癌と同様減少することが報告されている。E-cadherin は上皮の構造維持や形成に重要であり [108]、E-cadherin の発現が減弱した腫瘍では、異常な細胞構築や組織完全性の欠如が生じる。したがって、本章の結果は、イヌの消化管腫瘍における E-cadherin の減弱は悪性転化や浸潤能の獲得というより、腫瘍形成や異常な組織構築に関与している可能性を示唆している。

*p53* 腫瘍抑制遺伝子の変異と異常蛋白の蓄積が大腸腫瘍において腺腫から早期癌への進行に関わる [95, 96]。野生型の *p53* は半減期の短い安定した蛋白であり、IHC では検出できない。しかし、変異した *p53* は腫瘍細胞に蓄積し、IHC の標的となり得る [118-121]。実際、IHC はヒトにおける変異 *p53* を検出する方法として広く用いられており [122-125]、イヌにおいても IHC を用いた *p53* 蛋白質発現の検出は、様々な腫瘍で報告されている [126-129]。しかしながら、イヌの消化管腫瘍では、ヒトとは異なり、*p53* 異常に依存しない悪性腫瘍も報告されている [80, 130]。本研究において、核が *p53* に対して強陽性を示した腫瘍は悪性腫瘍の 9% (7/91 例) 程度であった。これらの 7 例はすべてスコア 3 であり浸潤もしくは転移が認められたものの、特定の組織型との相関は認められなかった。また、悪性所見が全く認められない良性腫瘍の一部でもスコアは低かったものの、*p53* の陽性所見が観察された。イヌの消化管悪性腫瘍は、ヒトの大腸腫瘍とは異なり、*p53* 変異を伴わないと報告されている [80, 130]。本研究においても、全ての悪性腫瘍に *p53* の異常があるわけではないことが示唆されたが、ほ

とんどの腫瘍細胞が p53 陽性の場合（スコア 3）、その腫瘍は高い悪性度を有すると考えられた。

本章では、犬の腸管腫瘍における組織学的増殖形態と beta-catenin の発現との関係について、新たな知見が得られた。すなわち、beta-catenin の核内蓄積は胃と腸の腫瘍、PG 型と NPG 型で異なっていた。beta-catenin の発現は、PG 型腫瘍の発生に関与しているが、NPG 型腺癌や、印環細胞癌、粘液腺癌、未分化癌などのびまん性増殖を示す癌には関与しない。この結果は、PG 型腺癌は adenoma-carcinoma sequence により、核内に beta-catenin 蓄積を伴うポリープ状腺腫から発生するが、NPG 腺癌は *de novo* や表層陥凹型腺腫から発生し、beta-catenin の核蓄積を伴わないことを示唆するものである。これに対し、イヌの消化管上皮性腫瘍における E-cadherin 及び p53 の役割についてはより詳細な分子生物学的研究が必要であると考えられた。

## 5.5 図表

表 3-1. 症例ごとの組織診断と免疫組織化学染色スコア

Case No.	Location	Histopathological diagnosis	Score			Age (Year)	Sex	Breed
			B-cat	E-cad	p53			
1	Stomach	Adenoma, PG	0	0	0	12	MC	Maltese
2	Stomach	Adenoma, PG	0	1	0	9	FS	Maltese
3	Stomach	Adenoma, PG	0	2	0	2	MC	Jack Russell terrier
4	Stomach	Adenoma, PG	0	3	0	6	MC	Jack Russell terrier
5	Stomach	Adenoma, PG	1	2	0	9	M	Jack Russell terrier
6	Stomach	ACA, PG	0	1	0	14	FS	Miniature Dachshund
7	Stomach	ACA, PG	0	1	0	7	FS	Jack Russell terrier
8	Stomach	ACA, PG	0	1	0	9	M	Jack Russell terrier
9	Stomach	ACA, PG	0	1	0	6	MC	Jack Russell terrier
10	Stomach	ACA, PG	0	2	0	10	M	Jack Russell terrier
11	Stomach	ACA, PG	0	3	0	8	FS	Jack Russell terrier
12	Stomach	ACA, PG	1	1	0	9	M	Jack Russell terrier
13	Stomach	ACA, PG	1	1	0	10	M	Jack Russell terrier
14	Stomach	ACA, PG	1	2	0	9	M	Jack Russell terrier
15	Stomach	ACA, PG	1	3	1	10	FS	French Bulldog
16	Stomach	ACA, PG	1	3	1	8	M	Jack Russell terrier
17	Stomach	ACA, NPG	0	1	0	11	F	West Highland White terrier
18	Stomach	ACA, NPG	0	2	0	15	MC	Mix
19	Stomach	ACA, NPG	0	2	0	11	FS	French Bulldog
20	Stomach	ACA, NPG	0	2	1	13	MC	Miniature Dachshund
21	Stomach	ACA, NPG	0	2	1	9	FS	Miniature Dachshund
22	Stomach	ACA, NPG	0	3	0	8	M	Leonberger
23	Stomach	ACA, NPG	0	3	3	7	M	French Bulldog
24	Stomach	SRC	0	2	0	13	MC	Mix
25	Stomach	SRC	0	2	0	8	FS	Leonberger
26	Stomach	SRC	0	2	0	12	MC	English Cocker Spaniel
27	Stomach	SRC	0	2	1	7	FS	Belgian Shepheed Dog
28	Stomach	SRC	0	2	3	10	F	Miniature Dachshund
29	Stomach	SRC	0	3	0	12	FS	Miniature Dachshund
30	Stomach	SRC	0	3	0	12	MC	Miniature Dachshund
31	Stomach	SRC	0	3	0	10	FS	Miniature Dachshund
32	Stomach	SRC	0	3	0	11	MC	Miniature Dachshund
33	Stomach	SRC	0	3	0	7	MC	Mix
34	Stomach	SRC	0	3	0	11	MC	Miniature Schnauzer
35	Stomach	SRC	0	3	3	12	F	Miniature Dachshund
36	Stomach	UND	0	2	0	11	MC	Shih Tzu
37	Stomach	UND	0	2	3	12	F	Miniature Dachshund
38	Stomach	UND	0	3	0	10	FS	English Cocker Spaniel
39	Small I	ACA, PG	1	2	0	8	M	Jack Russell terrier
40	Small I	ACA, PG	2	3	0	6	MC	Jack Russell terrier
41	Small I	ACA, PG	3	2	1	13	FS	Miniature Dachshund
42	Small I	ACA, NPG	0	0	1	12	MC	Papillon
43	Small I	ACA, NPG	0	2	0	NR	NR	NR
44	Small I	ACA, NPG	0	3	1	18	M	Miniature Dachshund
45	Small I	MUC	0	1	1	10	MC	Miniature Schnauzer
46	Small I	MUC	0	2	1	11	F	Miniature Dachshund
47	Small I	MUC	0	3	1	11	MC	Miniature Schnauzer
48	Small I	MUC	0	3	0	13	FS	MIX
49	Small I	MUC	0	3	0	9	FS	American Cocker Spaniel
50	Small I	SRC	0	3	3	11	F	Chinese Crested Dog
51	Small I	UND	0	3	3	NR	NR	NR
52	Large I	Adenoma, PG	0	1	0	10	M	Miniature Dachshund
53	Large I	Adenoma, PG	0	3	0	4	M	FRENCH BULLDOG
54	Large I	Adenoma, PG	1	2	0	10	M	Welsh Corgi

Continued on next page

*Continued from previous page*

55	Large I	Adenoma, PG	1	2	0	7	MC	French Bulldog
56	Large I	Adenoma, PG	1	2	0	8	MC	Boston terrier
57	Large I	Adenoma, PG	1	2	0	7	MC	PAPILLON
58	Large I	Adenoma, PG	1	2	1	9	M	Miniature Dachshund
59	Large I	Adenoma, PG	1	2	1	9	M	Miniature Dachshund
60	Large I	Adenoma, PG	1	2	1	8	MC	Miniature Dachshund
61	Large I	Adenoma, PG	1	2	1	12	MC	Miniature Dachshund
62	Large I	Adenoma, PG	1	3	0	11	M	Miniature Dachshund
63	Large I	Adenoma, PG	1	3	0	10	FS	Miniature Dachshund
64	Large I	Adenoma, PG	1	3	0	8	FS	Miniature Dachshund
65	Large I	Adenoma, PG	1	3	0	4	M	FRENCH BULLDOG
66	Large I	Adenoma, PG	1	3	0	8	MC	Boston terrier
67	Large I	Adenoma, PG	1	3	1	14	MC	Miniature Dachshund
68	Large I	Adenoma, PG	1	3	1	7	FS	Miniature Dachshund
69	Large I	Adenoma, PG	1	3	1	10	FS	Miniature Dachshund
70	Large I	Adenoma, PG	1	3	1	11	FS	Miniature Dachshund
71	Large I	Adenoma, PG	1	3	1	8	FS	Miniature Dachshund
72	Large I	Adenoma, PG	1	3	1	7	M	Miniature Dachshund
73	Large I	Adenoma, PG	1	3	1	7	FS	Miniature Dachshund
74	Large I	Adenoma, PG	1	3	1	12	M	Border Collie
75	Large I	Adenoma, PG	3	2	0	10	MC	Yorkshire terrier
76	Large I	Adenoma, PG	3	2	0	6	MC	Shetland sheepdog
77	Large I	Adenoma, PG	2	3	0	7	FS	Miniature Dachshund
78	Large I	Adenoma, PG	2	3	0	8	MC	Miniature Dachshund
79	Large I	Adenoma, PG	2	3	1	7	FS	Miniature Dachshund
80	Large I	Adenoma, PG	2	3	1	9	M	Miniature Dachshund
81	Large I	Adenoma, PG	3	3	0	10	M	Miniature Dachshund
82	Large I	Adenoma, PG	3	3	0	8	M	Miniature Dachshund
83	Large I	Adenoma, PG	3	3	0	5	M	Miniature Dachshund
84	Large I	Adenoma, PG	3	3	1	11	M	Miniature Dachshund
85	Large I	Adenoma, PG	3	3	1	9	M	Miniature Dachshund
86	Large I	Adenoma, PG	3	3	1	7	M	Miniature Dachshund
87	Large I	ACA, PG	1	2	0	15	MC	Miniature Dachshund
88	Large I	ACA, PG	1	2	0	15	MC	Miniature Dachshund
89	Large I	ACA, PG	1	3	0	12	MC	Papillon
90	Large I	ACA, PG	1	3	0	14	MC	Lakeland terrier
91	Large I	ACA, PG	1	3	0	7	FS	Jack Russell terrier
92	Large I	ACA, PG	1	3	1	10	MC	Miniature Dachshund
93	Large I	ACA, PG	1	3	1	13	MC	Miniature Dachshund
94	Large I	ACA, PG	1	3	2	10	M	Miniature Dachshund
95	Large I	ACA, PG	1	3	2	11	FS	Miniature Dachshund
96	Large I	ACA, PG	2	1	0	5	M	Toy Poodle
97	Large I	ACA, PG	2	2	1	12	MC	Miniature Dachshund
98	Large I	ACA, PG	2	3	0	12	MC	Miniature Dachshund
99	Large I	ACA, PG	2	3	0	8	M	Miniature Dachshund
100	Large I	ACA, PG	2	3	0	14	MC	Lakeland terrier
101	Large I	ACA, PG	2	3	0	8	FS	Jack Russell terrier
102	Large I	ACA, PG	2	3	0	6	MC	Jack Russell terrier
103	Large I	ACA, PG	2	3	1	7	F	Miniature Dachshund
104	Large I	ACA, PG	2	3	2	11	FS	Shetland sheepdog
105	Large I	ACA, PG	3	1	2	11	MC	Miniature Dachshund
106	Large I	ACA, PG	3	3	0	13	MC	Miniature Dachshund
107	Large I	ACA, PG	3	3	1	14	MC	Miniature Dachshund
108	Large I	ACA, PG	3	3	1	12	FS	Miniature Dachshund
109	Large I	ACA, PG	3	2	0	12	M	Miniature Dachshund
110	Large I	ACA, PG	3	2	3	NR	NR	NR
111	Large I	ACA, PG	3	3	0	12	MC	Miniature Dachshund
112	Large I	ACA, PG	3	3	0	6	F	Boston terrier
113	Large I	ACA, PG	3	3	0	8	FS	Jack Russell terrier
114	Large I	ACA, PG	3	3	0	8	FS	Jack Russell terrier
115	Large I	ACA, PG	3	3	0	6	FS	Jack Russell terrier

*Continued on next page*

*Continued from previous page*

116	Large I	ACA, PG	3	3	0	9	FS	Jack Russell terrier
117	Large I	ACA, PG	3	3	1	11	M	Miniature Dachshund
118	Large I	ACA, PG	3	3	1	11	M	Border Collie
119	Large I	ACA, PG	3	3	1	11	F	Belgian Shephrd Dog Tervueren
120	Large I	ACA, PG	3	3	2	12	MC	Miniature Dachshund
121	Large I	ACA, NPG	0	1	0	10	M	Jack Russell terrier
122	Large I	ACA, NPG	0	1	2	NR	NR	NR
123	Large I	ACA, NPG	0	2	0	12	FS	Miniature Dachshund
124	Large I	ACA, NPG	0	2	1	14	FS	Miniature Dachshund
125	Large I	ACA, NPG	0	3	0	7	FS	Miniature Dachshund
126	Large I	ACA, NPG	3	2	0	6	MC	Jack Russell terrier
127	Large I	ACA, NPG	3	2	0	7	MC	Jack Russell terrier
128	Large I	MUC	0	1	0	NR	NR	NR
129	Large I	MUC	0	2	0	5	FS	MIX
130	Large I	SRC	0	3	0	8	FS	Welsh Corgi
131	Large I	SRC	0	2	0	5	FS	MIX

Small I, 小腸 (Small intestines) ; Large I, 大腸 (Large intestines) ;

PG, polypoid growth type ; NPG, non-polypoid growth type ; ACA, 腺癌 (Adenocarcinoma) ;

SRC, 印環細胞癌 (Signet ring cell carcinoma) ; UND, 未分化癌 (Undifferentiated carcinoma) ;

MUC, 粘液腺癌 (Mucinous adenocarcinoma) ;

M, 雄 (Male) ; MC, 去勢雄 (Male, castrated) ; F, 雌 (Female) ; FS, 避妊雌 (Female, spayed)

NR, 記録なし (not recorded)

表 3-2. 消化管における beta-catenin 免疫組織化学染色による染色動態の比較

Diagnosis: Growth pattern:	Adenoma		Adenocarcinoma			SRC		MUC		UND			
	PG		PG		NPG								
Beta-catenin													
Stomach (n=38):	5		11	[3]	7	[7]	12	[12]	†	0		3	[3]
Score 0	4	80%	6	[1] 55%	7	[7] 100%	12	[12] 100%	0	0		3	[3] 100%
Score 1	1	20%	5	[2] 45%	0		0		0	0		0	
Score 2	0		0		0		0		0	0		0	
Score 3	0		0		0		0		0	0		0	
Small intestines (n=13):	0		3	[1]	3	[3]	1	[1]		5	[5]	1	[1]
Score 0	0		0		3	[3] 100%	1	[1] 100%	5	[5] 100%	1	[1] 100%	
Score 1	0		1	33%	0		0		0		0		
Score 2	0		1	33%	0		0		0		0		
Score 3	0		1	[1] 33%	0		0		0		0		
Large intestines (n=80):	35		34	[6] *	7	[7] **, ††	2	[2] ††	2	[2] ††	0		
Score 0	2	6%	0		6	[6] 86%	2	[2] 100%	2	[2] 100%	0		
Score 1	21	60%	9	26%	0		0		0		0		
Score 2	4	11%	9	[1] 26%	0		0		0		0		
Score 3	8	23%	16	[5] 47%	1	[1] 14%	0		0		0		
All sites (n=131):	40		48	[10]	17	[7] **, ††	15	[15] **, ††	7	[7] **, ††	4	[4] ††	
Score 0	6	15%	6	[1] 13%	16	[16] 94%	15	[15] 100%	7	[7] 100%	4	[4] 100%	
Score 1	22	55%	15	[2] 31%	0		0		0		0		
Score 2	4	10%	10	[1] 21%	0		0		0		0		
Score 3	8	20%	17	[6] 35%	1	[1] 6%	0		0		0		

PG, polypoid growth type ; NPG, non-polypoid growth type ; SRC, 印環細胞癌 (Signet-ring cell carcinoma) ;

MUC, 粘液腺癌 (Mucinous adenocarcinoma) ; UND, 未分化癌 (Undifferentiated carcinoma) .

[ ] 内の数字は浸潤/転移を示した症例数。

\*\*,  $p < 0.01$ , vs PG adenoma ; †,  $p < 0.05$ , vs PG adenocarcinoma ; ††,  $p < 0.01$ , vs PG adenocarcinoma.

表 3-3. 消化管における E-cadherin 免疫組織化学染色による染色動態の比較

Diagnosis:	Adenoma		Adenocarcinoma			SRC		MUC		UND		
Growth pattern:	PG		PG		NPG							
E-cadherin												
Stomach (n=38):	5		11	[3]	7	[7]	12	[12]	0		3	[3]
Score 0	1	20%	0		0		0		0		0	
Score 1	1	20%	6	[2] 55%	1	[1] 14%	0		0		0	
Score 2	2	40%	2	18%	4	[4] 57%	5	[5] 42%	0		2	[2] 67%
Score 3	1	20%	3	[2] 27%	2	[2] 29%	7	[7] 58%	0		1	[1] 33%
Small intestines (n=13):	0		3	[1]	3	[3]	1	[1]	5	[5]	1	[1]
Score 0	0		0		1	[1] 100%	0		0		0	
Score 1	0		0		0		0		1	[1] 20%	0	
Score 2	0		2	[1] 67%	1	[1]	0		1	[1] 20%	0	
Score 3	0		1	33%	1	[1]	1	[1] 100%	3	[3] 60%	1	[1] 100%
Large intestines (n=80):	35		34	[6] *	7	[7] **, ††	2	[2]	2	[2] †	0	
Score 0	0		0		0		0		0		0	
Score 1	1	3%	2	6%	2	[2] 29%	0		1	[1] 50%	0	
Score 2	10	29%	5	[1] 15%	4	[4] 57%	1	[1] 50%	1	[1] 50%	0	
Score 3	24	69%	27	[5] 79%	1	[1] 14%	1	[1] 50%	0		0	
All sites (n=131):	40		48	[10]	17	[7]	15	[15]	7	[7]	4	[4]
Score 0	1	3%	0		1	[1] 6%	0		0		0	
Score 1	2	5%	8	[2] 17%	3	[3] 18%	0		2	[2] 29%	0	
Score 2	12	30%	9	[2] 19%	9	[9] 53%	6	[6] 40%	2	[2] 29%	2	[2] 50%
Score 3	25	63%	31	[5] 65%	4	[4] 24%	9	[9] 60%	3	[3] 43%	2	[2] 50%

PG, polypoid growth type ; NPG, non-polypoid growth type ; SRC, 印環細胞癌 (Signet-ring cell carcinoma) ;

MUC, 粘液腺癌 (Mucinous adenocarcinoma) ; UND, 未分化癌 (Undifferentiated carcinoma) .

[ ] 内の数字は浸潤/転移を示した症例数。

\*\*,  $p < 0.01$ , vs PG adenoma; †,  $p < 0.05$ , vs PG adenocarcinoma; ††,  $p < 0.01$ , vs PG adenocarcinoma.

表 3-4. 消化管における p53 免疫組織化学染色による染色動態の比較

Diagnosis: Growth pattern:	Adenoma	Adenocarcinoma			SRC	MUC	UND
	PG	PG	NPG				
p53							
Stomach (n=38):	5	11 [3]	7 [7]	12 [12]	0	3 [3]	
Score 0	5 100%	9 [2] 82%	4 [4] 57%	9 [9] 75%	0	2 [2] 47%	
Score 1	0	2 [1] 18%	2 [2] 29%	1 [1] 8%	0	0	
Score 2	0	0	0	0	0	0	
Score 3	0	0	1 [1] 14%	2 [2] 17%	0	1 [1] 33%	
Small intestines (n=13):	0	3 [1]	3 [3]	1 [1]	5 [5]	1 [1]	
Score 0	0	2 67%	1 [1] 33%	0	0	0	
Score 1	0	1 [1] 33%	2 [2] 67%	0	2 [2] 40%	0	
Score 2	0	0	0	0	3 [3] 60%	0	
Score 3	0	0	0	1 [1] 100%	0	1 [1] 100%	
Large intestines (n=80):	35	34 [6]	7 [7]	2 [2]	2 [2]	0	
Score 0	18 51%	19 [2] 56%	5 [5] 71%	2 [2] 100%	2 [2] 100%	0	
Score 1	17 49%	9 [2] 26%	1 [1] 14%	0	0	0	
Score 2	0	5 [1] 15%	1 [1] 14%	0	0	0	
Score 3	0	1 [1] 3%	0	0	0	0	
All sites (n=131):	40	48 [10]	17 [7]	15 [15]	7 [7]	4 [4]	
Score 0	23 58%	30 [4] 63%	10 [10] 59%	11 [11] 73%	4 [4] 57%	2 [2] 50%	
Score 1	17 43%	12 [4] 25%	5 [5] 29%	1 [1] 7%	3 [3] 43%	0	
Score 2	0	5 [1] 10%	1 [1] 6%	0	0	0	
Score 3	0	1 [1] 2%	1 [1] 6%	3 [3] 20%	0	2 [2] 50%	

PG, polypoid growth type ; NPG, non-polypoid growth type ; SRC, 印環細胞癌 (Signet-ring cell carcinoma) ;  
MUC, 粘液腺癌 (Mucinous adenocarcinoma) ; UND, 未分化癌 (Undifferentiated carcinoma) .  
[ ] 内の数字は浸潤/転移を示した症例数を記した。統計学的有意差はいずれの群間にもみられなかった。



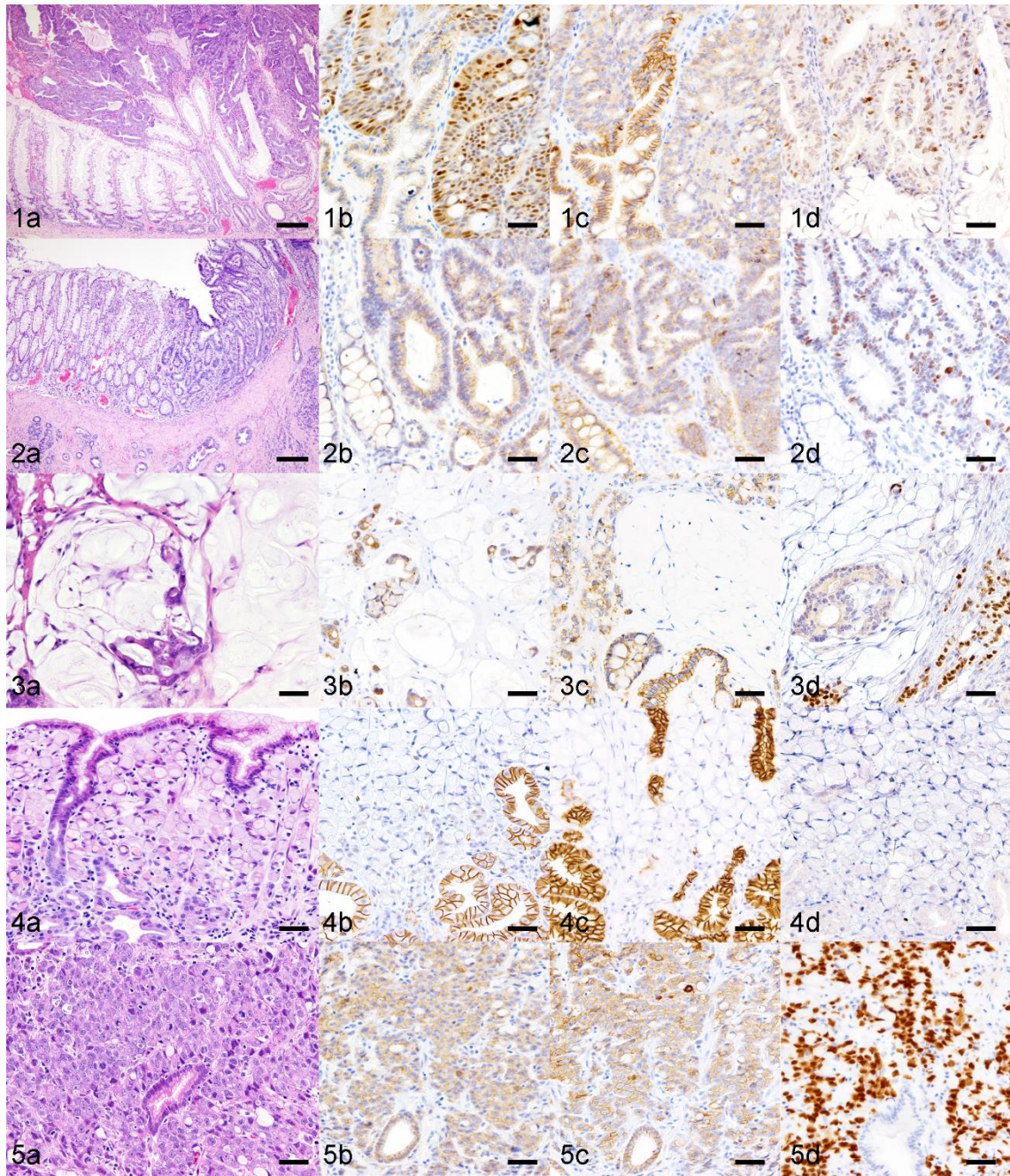


図 3-1 ~ 3-5. 消化管上皮性腫瘍の形態学的・免疫組織化学的特徴

**図 3-1. Polypoid growth type の大腸腺癌 (症例番号 119)**

- (a) 腫瘍性病変は内腔に突出。HE 染色。Bar = 200 $\mu$ m
- (b) 腫瘍細胞の核は beta-catenin 陽性 (Score 3)、免疫組織化学染色 (IHC)。Bar = 200 $\mu$ m
- (c) 腫瘍細胞の細胞膜は E-cadherin 弱陽性 (Score 3)。IHC。Bar = 40 $\mu$ m
- (d) 腫瘍細胞の核は散在性に p53 に陽性 (Score 1)。IHC。Bar = 40 $\mu$ m

**図 3-2. Non-polypoid growth type の大腸腺癌 (症例番号 122)**

- (a) 粘膜表面は平坦、腫瘍細胞は粘膜化組織に浸潤 (HE 染色)。Bar = 200  $\mu$ m

- (b) 腫瘍細胞の核は beta-catenin 陰性 (Score 0) 。IHC。Bar = 40  $\mu$ m
- (c) 腫瘍細胞の細胞膜は不均質に陽性を示す (Score 1) 。IHC。Bar = 40  $\mu$ m
- (d) 腫瘍細胞の核は散発的に p53 陽性を示す (Score 2) 。IHC。Bar = 40  $\mu$ m

**図 3-3. 小腸粘液腺癌 (症例番号 46) (a-d) Bar, 40  $\mu$ m。**

- (a) 腫瘍細胞は、粘膜下層の細胞外粘膜内に増殖し、単細胞性もしくは腺管形成を示す。(HE)
- (b) 腫瘍細胞の核は beta-catenin 陰性 (Score 0) 。IHC。
- (c) 単細胞性の腫瘍細胞は E-cadherin の染色性が著しく染色性が低下する一方、腺管形成性の腫瘍細胞では膜強陽性を示す (Score 2) 。IHC。
- (d) 単細胞性の腫瘍細胞は p53 核陽性を示す一方、腺管形成性の腫瘍細胞では陰性 (Score 1) 。IHC。

**図 3-4. 胃印環細胞癌 (症例番号 32) (a-d) Bar = 40  $\mu$ m**

- (a) 「印環」様の構造を有する腫瘍細胞が粘膜固有層にびまん性にみられる (HE)
- (b) 腫瘍細胞の核は beta-catenin 陰性を示す (Score 0) 。IHC。
- (c) 腫瘍細胞の細胞膜は完全に E-cadherin 陰性 (Score 3) 。IHC。
- (d) 腫瘍細胞の核は p53 陰性 (Score 0) 。IHC。

**図 3-5. 胃未分化癌 (症例番号 37) (a-d) Bar = 40  $\mu$ m**

- (a) 特定の細胞への分化を示さない細胞が粘膜固有層にびまん性に浸潤する (HE)
- (b) 腫瘍細胞の核は beta-catenin に陰性 (Score 0) 。IHC。
- (c) 細胞膜はほとんどが E-cadherin に陰性であるが、時折陽性を示す (Score 2) 。IHC。
- (d) 腫瘍細胞の核は p53 強陽性を示す (Score 3) 。IHC。

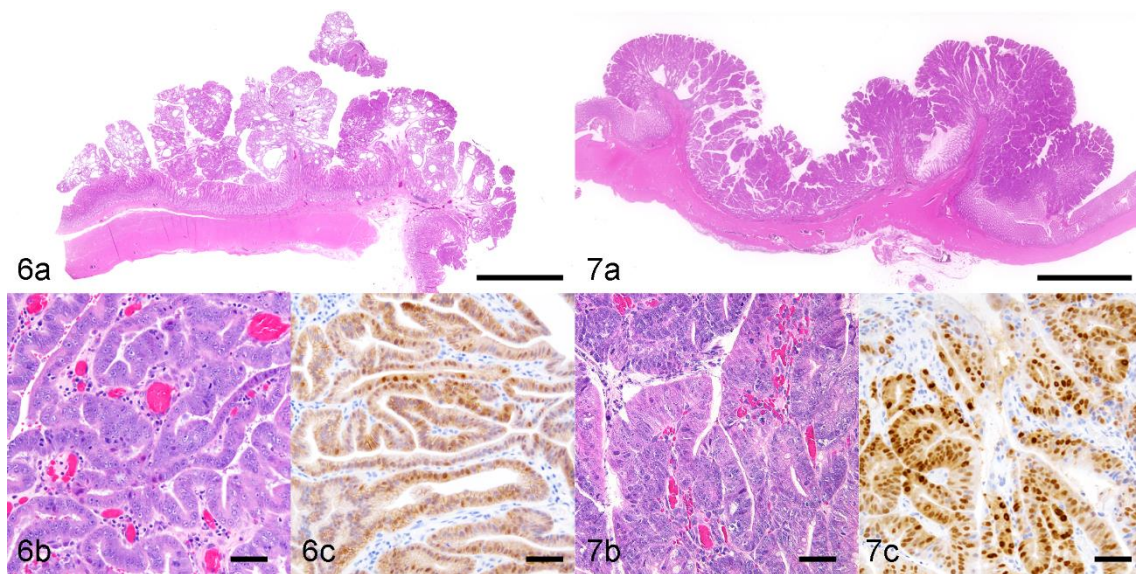


図 3-6 ~ 3-7. polypoid growth (PG) type の胃腺癌と大腸腺癌のルーペ像及び beta-catenin の染色性

**図 3-6. Polypoid growth type の胃腺癌 (症例番号 13)**

- (a) 腫瘍性上皮細胞は内腔に突出 (HE 染色) Bar = 500  $\mu\text{m}$
- (b) 図 6a の高倍率写真、Bar=60  $\mu\text{m}$
- (c) beta-catenin 核陽性が散見される (IHC)。Bar = 60  $\mu\text{m}$

**図 3-7. Polypoid growth type の大腸腺癌 (症例番号 91)**

- (a) 腫瘍性上皮細胞は内腔に突出 (HE 染色) Bar = 500  $\mu\text{m}$
- (b) 図 7a の高倍率写真、Bar = 60  $\mu\text{m}$
- (c) 多くの腫瘍性上皮細胞が beta-catenin に核強陽性を示す (IHC) Bar = 60  $\mu\text{m}$ .

## 6. 総括及び総合考察

イヌにおける消化管上皮腫瘍はヒトのモデルとして期待されつつも、その発生傾向、腫瘍発生機序は明らかにされていない。本研究では、131例のイヌの消化管ポリープ及び上皮性腫瘍における病理学的検索を実施し、以下の様な成果を得た。

第一章では、131の病理標本をWHO組織学的分類およびPG/NPG型分類に従って再分類し、その組織分類ごとに犬種、年齢、性別、発生部位、浸潤/転移の有無などの発生動向について精査した。組織学的分類については、腺腫、腺癌がそのほとんどを占め、未分化癌や粘液腺癌の発生は稀であった。PG/NPG型分類ではNPG型を示す全ての病巣で浸潤/転移が認められたことから、腫瘍の増殖形態の指標であるPG/NPG型分類は、悪性度や腫瘍発生機序を理解する上で重要である可能性が示唆された。犬種については、消化管全体でジャック・ラッセル・テリアの発生数が多く、大腸ではミニチュア・ダックスフンドの発生が多かった。特にこれら2犬種は、胃腸腫瘍の腫瘍形成モデルとして有用な情報を提供する可能性が示された。特にミニチュア・ダックスフンドは日本における飼育頭数割合が高い犬種であり、腫瘍の発生数が多かった原因は飼育絶対数が多いことが可能性が考えられる。しかしながら、一般社団法人ジャパンケネルクラブの犬種別犬籍登録数 (<https://www.jkc.or.jp/archives/enrollment>, accessed 21 June 2021) では、ダックスフンドの飼育頭数は29,368頭(実験期間中間値である2014年度を参照)で、プードル(80,888頭)やチワワ(53,630頭)に次いで3位であることから、飼育絶対数のみで説明することは困難である。また、ジャック・ラッセル・テリアの飼育頭数は、4,334頭とプ

ードルの約 1/20 であり、飼育頭数による母集団の偏りとは無関係な事象であると考えられる。これまでイヌにおいては、FAP の発生は確認されていない[131]。しかしながら、本研究で明らかになったジャック・ラッセル・テリアにおける消化管腫瘍の発生数の多さと、胃及び大腸に多数のポリープ状腫瘤を形成するという特徴、さらに遺伝子変異の同定[49]により、イヌでも、少なくともジャック・ラッセル・テリアにおいては、ヒトの FAP と同様に APC の変異による腫瘍形成の可能性が考えられた (図 4-1)。

第二章では、大腸腫瘍の発生数が多かったミニチュア・ダックスフンドについて、その腫瘍発生機序を検討した。ミニチュア・ダックスフンドは犬種特異的な疾患として炎症性ポリープ (IPMD) を好発することが知られている。内視鏡検査で隆起性病変を認めた 67 例 (計 108 標本) を用い病理組織学的検査を実施するとともに、その病歴を精査し、IPMD と腫瘍との関連を検討した。その結果、IPMD を発症した症例の 48.1% は、大腸病変を再発し、26.9% が腫瘍性病変を発生した。さらに、それらの腫瘍性腫瘍には病変と共に典型的な IPMD の組織像も含んでいたことから、腫瘍は IPMD と同一組織から発生した可能性が示唆された (IPMD 関連腫瘍)。さらに、免疫組織学的検索で、IPMD 内の異型上皮細胞及び腫瘍細胞の核内に beta-catenin の陽性像が認められた。beta-catenin の核陽性率は、IPMD、腺腫、腺癌と病態が進行するにつれ統計学的に有意な増加を示したことから、beta-catenin 核陽性領域では APC 発現の低下が認められたことから、APC と beta-catenin の発現異常が腫瘍の進行に関与している可能性が明らかになった。以上より、ミニチュア・ダックスフンドにおける大腸腫瘍発生の原因は、犬種特異的な疾患である IPMD が発生母地となり得ることを示し、

その腫瘍化には beta-catenin が関与している事を明らかにした (図 4-2)。

ヒトの大腸癌は、慢性潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患 (IBD, Inflammatory Bowel Disease) が発生源地となることが知られており、腸炎関連大腸癌 (CAC, colitis-associated colorectal cancer) と称されている [132, 133]。CAC の発がん機序の詳細は、未だ明らかにされていない。しかし分子学的メカニズムとしては、散発性腫瘍と異なり TP53 の変異が比較的早期にみられ、APC の変異は後期にみられるとされる [133]。一方で、CAC においても beta-catenin の核内蓄積が頻繁に確認されている [134]。これは、APC に依存せずに、NF- $\kappa$ B や PI-3K、Akt などの炎症関連因子が beta-catenin の活性を促すためとされている [135]。本研究では、IPMD 関連腫瘍において beta-catenin 及び APC の関与を示したが、APC については腫瘍化上皮細胞における異常発現を免疫組織化学的に確認したのみである。APC が腫瘍形成のどの段階に関与しているか、また APC 遺伝子変異が存在するかなどの点についてはなお不明である。さらに炎症関連因子についての検討は不十分である。これらの点について今後はより詳細な検証が必要であり、IPMD 関連腫瘍は散発性腫瘍というより CAC の性質を有するモデルとして有用である可能性もある。ただし、ヒト CAC で主要な関連因子とされる p53 の変異による異常 p53 蛋白の発現は、IPMD 関連腺癌で陽性例がみられたものの、比較的大型腫瘍における陽性率が高く、IPMD 内の異型上皮細胞は概ね陰性であったこと、および IPMD 中に発生した腺腫では陽性細胞が少数しか確認できなかったことなどから、この病変で早期に TP53 変異が生じている可能性は低く、本研究ではミニチュア・ダックスフンドに生じる腫瘍発生は散発性腫瘍に類似するものと結論付けた (図 4-1)。

ミニチュア・ダックスフンドの消化管腫瘍発生機序として APC/beta-catenin 異常の関与が疑われことから、第三章では、第一章で使用した標本を基に、すべての犬種、腫瘍組織について beta-catenin の関与を免疫組織学的に検索した。その結果、胃と大腸では beta-catenin に対する反応性が異なることが明らかとなった。すなわち、beta-catenin は胃の腫瘍に比べて大腸腫瘍での陽性率が高く、大腸において腫瘍発生に関与している可能性が示唆された。一方で、大腸に発生する腫瘍の中でも増殖形態によって、beta-catenin の発現が異なることも明らかとなった。大腸において内腔に突出する増殖形態を示す PG 型腺癌では、全例で beta-catenin 核陽性であったのに対し、平坦もしくは陥凹する増殖形態の NPG 型腺癌や印環細胞癌、粘液腺癌、未分化癌などのびまん性に増殖する癌では、beta-catenin 核陽性を示す例は 1 例のみであり、ほとんどの症例で beta-catenin は陰性であった。さらに NPG 型腺癌については、すべての症例で浸潤/転移を伴っており、増殖パターンの差異は腫瘍発生機序のみならず、その悪性度にも関連があることが示された。この事はイヌの腸管腫瘍における特定の組織学的増殖形態と beta-catenin との関係について、新たな知見をもたらした。以上のことから、イヌの PG 型腺癌は、前がん病変、腺腫を伴い、それら病変を含む粘膜上皮に beta-catenin が蓄積する、いわゆる adenoma-carcinoma sequence を介して発がんする。一方で NPG 型もしくはびまん型を呈する腺癌では、beta-catenin の核蓄積は生じず、前がん病変や腺腫を経ずに直接 *de novo* 癌として発生する腫瘍であり、APC/beta-catenin 以外の遺伝子変異を介した発生機序が考えられた。この様に、イヌの消化管上皮腫瘍でも、ヒトと同様に増殖形態の差は、腫瘍発生機序の差を反映していると考えられた (図 4-3)。

本研究の成果は、イヌの消化管上皮性腫瘍の特性を理解し、病理組織学的診断や治療方針の決定に寄与するものである。さらにヒトとイヌの消化管上皮性腫瘍の形態学的、免疫組織化学的な類似点及び相違点を明らかとし、イヌの消化管上皮性腫瘍のヒト疾患モデルとしての可能性を示唆するものである。特に PG/NPG 型分類という粘膜の増殖形態による腫瘍細胞の beta-catenin、APC、p53 の発現については、ヒトと動物の消化管腫瘍発生機序の関連性の理解を深めるうえで、重要な知見を供与したと考える。



## 6.1 図表



Jack Russell terrier

Gross pathology:	Multiple polyps
Histopathology:	Polypoid growth
Frequent sites:	Stomach, colorectum
Responsible gene:	<i>APC</i>
Model:	Familial adenomatous polyposis
Pathogenesis:	Adenoma-carcinoma sequence



Miniature Dachshund

Gross pathology:	Multiple polyps
Histopathology:	Polypoid growth with/within inflammatory polyposis in miniature dachshund
Frequent sites:	Colorectum
Responsible gene:	<i>CTNNB1</i> (encoding beta-catenin)
Model:	Sporadic
Pathogenesis:	Adenoma-carcinoma sequence

図 4-1. 犬種特異的消化管上皮性腫瘍の特徴

ジャック・ラッセル・テリア：胃及び大腸が好発部位。多数のポリープ状病変を呈する。責任遺伝子は *APC* であることが示されており、ヒトの家族性大腸腺腫症のモデルとして期待されている。

ミニチュア・ダックスフンド：大腸に多数のポリープ性病変を呈するが、そのほとんどは犬種特異的疾患である「炎症性ポリープ」である。炎症性ポリープ病変に腫瘍性病変が発生する場合がある。稀に腫瘍性病変がみられるが、その一部に炎症性ポリープが観察されることがある。病態の進行に伴い beta-catenin 及び p53 の核陽性像がみられる。

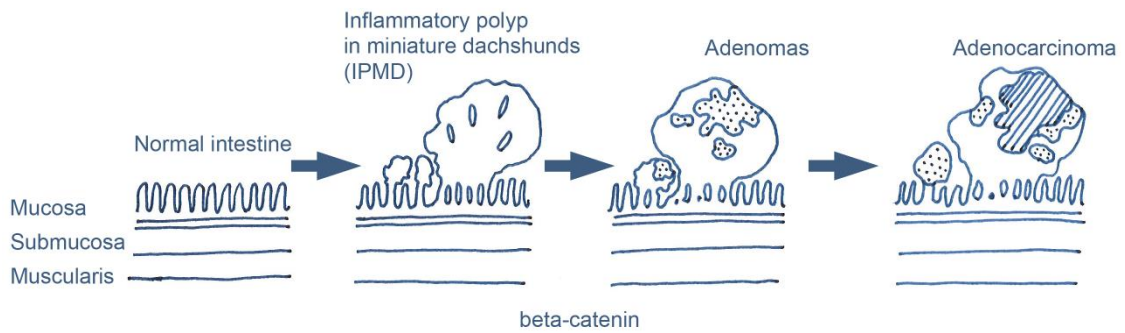


図 4-2. ミニチュア・ダックスフンドの消化管発生概要

正常粘膜からミニチュア・ダックスフンドの炎症性ポリープ（IPMD）が発生し、IPMD の組織内に腺腫、腺腫内腺癌が認められる（Adenoma-carcinoma sequence）。既に大型に進行している場合は IPMD が観察できない場合もある。

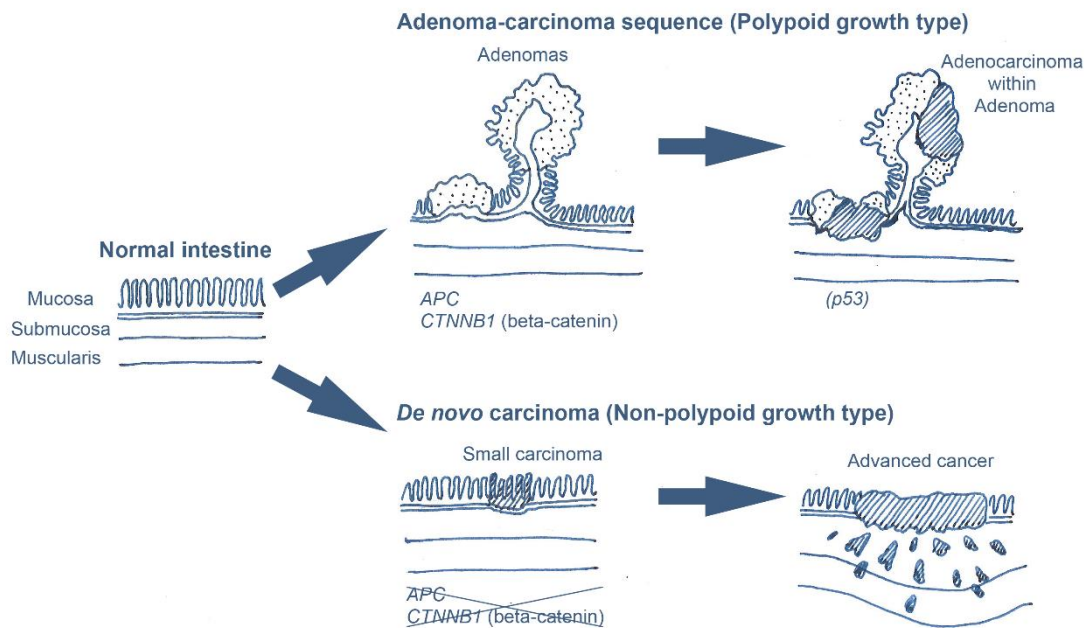


図 4-3. イヌの消化管上皮性腫瘍の発生機序

ポリープ状増殖を示す腫瘍（PG型）には beta-catenin の核陽性が高頻度にみられる。その機序として APC の関与が考えられる。粘膜下の局所浸潤を示すものの転移は少なく、摘出すれば比較的予後は良い。

ポリープ状増殖を示さない平坦型/陥凹型腺癌、粘液腺癌、印環細胞癌、未分化癌を含むびまん型癌（NPG癌）では beta-catenin の核陽性像はみられない。粘膜内、粘膜下層、筋層、リンパ節に浸潤/転移していることが多い。進行が早く予後は不良であることが多い。

## 7. 謝辞

本研究の遂行と論文作成にあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学・中山裕之名誉教授ならびに内田和幸准教授、チェンバーズ ジェームズ助教に深甚なる感謝の意を表します。研究、論文はもちろんの事、学術的な面だけではなく心身共に鍛えていただきました。また、貴重な標本を提出してくださった東京大学附属動物医療センターの先生方、公益財団法人日本小動物医療センターの中島亘先生、株式会社日本動物高度医療センター（当時）二瓶和美先生に心から感謝いたします。東京大学獣医病理研究室の皆様とは、多くの時間を共有し、ご支援やご助言、激励、刺激を与えていただきました。また実験動物学研究室の皆様には、セミナーを通じて新しい知見と洞察を与えていただきました。深く感謝申し上げます。

本研究を遂行する機会とご支援を賜りました東京大学・土井邦雄名誉教授、株式会社ボゾリサーチセンター 山内久実 代表取締役社長、田村一利 博士、星谷達 博士、山口裕子 氏をはじめとする研究員の皆様に、深く感謝いたします。

最後に研究期間中、住処の提供に加え多大な迷惑をかけた両親、家庭を顧みずに研究に邁進する日々を許容し常に支えてくれた妻、不在時間が多いながらも変わらず父として接してくれた長女、知らぬ間に人語を解し歩きはじめた次女に、心から感謝いたします。

## 8. 引用文献

1. Lingeman, C.H., F.M. Garner, and D.O. Taylor, Spontaneous gastric adenocarcinomas of dogs: a review. *J Natl Cancer Inst*, 1971. **47**: p. 137-53.
2. Sullivan, M., et al., A study of 31 cases of gastric carcinoma in dogs. *Vet Rec*, 1987. **120**: p. 79-83.
3. Seim-Wikse, T., et al., Breed predisposition to canine gastric carcinoma-- a study based on the Norwegian canine cancer register. *Acta Vet Scand*, 2013. **55**: p. 25.
4. Sautter, J.H. and G.F. Hanlon, Gastric neoplasms in the dog: a report of 20 cases. *J Am Vet Med Assoc*, 1975. **166**: p. 691-6.
5. Frgelecová, L., et al., Canine gastrointestinal tract tumours: a retrospective study of 74 cases. *Acta Vet. Brno*, 2013. **82**: p. 387-392.
6. Patnaik, A.K., A.I. Hurvitz, and G.F. Johnson, Canine gastric adenocarcinoma. *Vet Pathol*, 1978. **15**: p. 600-7.
7. Patnaik, A.K., A.I. Hurvitz, and G.F. Johnson, Canine gastrointestinal neoplasms. *Vet Pathol*, 1977. **14**: p. 547-55.
8. Holt, P.E. and V.M. Lucke, Rectal neoplasia in the dog: a clinicopathological review of 31 cases. *Vet Rec*, 1985. **116**: p. 400-5.
9. 国立がん研究センターがん情報サービス.  
Available from: [https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/dl/index.html](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/dl/index.html).
10. ラットの背景病変. マウスの背景病変. 新毒性病理組織学. 西村書店. p705-735.
11. Chandra, S.A., M.W. Nolan, and D.E. Malarkey, Chemical carcinogenesis

- of the gastrointestinal tract in rodents: an overview with emphasis on NTP carcinogenesis bioassays. *Toxicol Pathol*, 2010. **38**: p. 188-97.
12. Nalbantoglu, I., V. Blanc, and N.O. Davidson, Characterization of Colorectal Cancer Development in *Apc* (*min/+*) Mice. *Methods Mol Biol*, 2016. **1422**: p. 309-27.
  13. Johnson, R.L. and J.C. Fleet, Animal models of colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2013. **32**: p. 39-61.
  14. Youmans, L., et al., Frequent alteration of the tumor suppressor gene APC in sporadic canine colorectal tumors. *PLoS One*, 2012. **7**: p. e50813.
  15. Morson, B.C., Precancerous and early malignant lesions of the large intestine. *Br J Surg*, 1968. **55**: p. 725-31.
  16. Morson, B., President's address. The polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proc R Soc Med*, 1974. **67**: p. 451-7.
  17. Muto, T., H.J. Bussey, and B.C. Morson, The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*, 1975. **36**: p. 2251-70.
  18. Vogelstein, B., et al., Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 1988. **319**: p. 525-32.
  19. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990. **61**: p. 759-67.
  20. Turner, J.R., *The Gastrointestinal Tract in Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 2014, Saunders. p. 749-819.
  21. Kuramoto, S. and T. Oohara, Minute cancers arising de novo in the human large intestine. *Cancer*, 1988. **61**: p. 829-34.
  22. SPRATT, J.S., L.V. ACKERMAN, and C.A. MOYER, Relationship of

- polyps of the colon to colonic cancer. *Ann Surg*, 1958. **148**: p. 682-96; discussion 696-8.
23. CASTLEMAN, B. and H.I. KRICKSTEIN, Do adenomatous polyps of the colon become malignant? *N Engl J Med*, 1962. **267**: p. 469-75.
  24. Groden, J., et al., Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 1991. **66**: p. 589-600.
  25. Nakamura, Y., et al., Mutations of the adenomatous polyposis coli gene in familial polyposis coli patients and sporadic colorectal tumors. *Princess Takamatsu Symp*, 1991. **22**: p. 285-92.
  26. Kinzler, K.W., et al., Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*, 1991. **253**: p. 661-5.
  27. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 1996. **87**: p. 159-70.
  28. Kolligs, F.T., G. Bommer, and B. Göke, Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion*, 2002. **66**: p. 131-44.
  29. Kumar, V., *Neoplasia in Robbins and Cortan Pathologic Basis of Disease*. 2014. p. 265-340.
  30. de Lau, W., et al., The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev*, 2014. **28**: p. 305-16.
  31. Steinhart, Z. and S. Angers, Wnt signaling in development and tissue homeostasis. *Development*, 2018. **145**.
  32. Behrens, J., et al., Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 1996. **382**: p. 638-42.

33. Clevers, H., Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 2006. **127**: p. 469-80.
34. Molenaar, M., et al., XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*, 1996. **86**: p. 391-9.
35. van de Wetering, M., et al., Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell*, 1997. **88**: p. 789-99.
36. van de Wetering, M., et al., The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, 2002. **111**: p. 241-50.
37. Head, K.W., et al., Histological classification of tumors of the alimentary system of domestic animals. World Health Organization international histological classification of tumors of domestic animals ; 2nd ser., v. 10. 2003: Washington, DC : Published by the Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, 2003.
38. ACKERMAN, L.V. and J.S. SPRATT, Do adenomatous polyps become cancer? *Gastroenterology*, 1963. **44**: p. 905-8.
39. ACKERMAN, L.V., MALIGNANT POTENTIAL OF POLYPOID LESIONS OF THE LARGE INTESTINE. *Trans Stud Coll Physicians Phila*, 1964. **32**: p. 5-14.
40. Shimoda, T., et al., Early colorectal carcinoma with special reference to its development de novo. *Cancer*, 1989. **64**: p. 1138-46.



41. Kudo, S., H. Kashida, and T. Tamura, Early colorectal cancer: flat or depressed type. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000. **15 Suppl**: p. D66-70.
42. Iishi, H., et al., Early depressed adenocarcinomas of the large intestine. *Cancer*, 1992. **69**: p. 2406-10.
43. Frgelecová, L., et al., Canine gastrointestinal tract tumours: a retrospective study of 74 cases. *Acta Veterinaria Brno*, 2013. **82**: p. 387-392.
44. Fonda, D., M. Gualtieri, and E. Scanziani, Gastric carcinoma in the dog: A clinicopathological study of 11 cases. *J Small Anim Pract*, 1989. **30**: p. 353-360.
45. Al-Sukhni, W., M. Aronson, and S. Gallinger, Hereditary colorectal cancer syndromes: familial adenomatous polyposis and lynch syndrome. *Surg Clin North Am*, 2008. **88**: p. 819-44, vii.
46. Half, E., D. Bercovich, and P. Rozen, Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis*, 2009. **4**: p. 22.
47. Hernegger, G.S., H.G. Moore, and J.G. Guillem, Attenuated familial adenomatous polyposis: an evolving and poorly understood entity. *Dis Colon Rectum*, 2002. **45**: p. 127-34; discussion 134-6.
48. Soravia, C., et al., Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet*, 1998. **62**: p. 1290-301.
49. Yoshizaki, K., et al., Familial Adenomatous Polyposis in Dogs: Hereditary Gastrointestinal Polyposis in Jack Russell Terriers with Germline APC Mutations. *Carcinogenesis*, 2020.
50. Ohmi, A., et al., A retrospective study of inflammatory colorectal polyps

- in miniature dachshunds. *J Vet Med Sci*, 2012. **74**: p. 59-64.
51. Uchida, E., et al., Pathologic Features of Colorectal Inflammatory Polyps in Miniature Dachshunds. *Vet Pathol*, 2016. **53**: p. 833-9.
  52. Kamano, T., et al., Experimental colonic cancer in a dog. *Jpn J Surg*, 1981. **11**: p. 214-8.
  53. Patnaik, A.K. and P.H. Lieberman, Gastric squamous cell carcinoma in a dog. *Vet Pathol*, 1980. **17**: p. 250-3.
  54. Ikegami, M., A pathological study on colorectal cancer. From de novo carcinoma to advanced carcinoma. *Acta Pathol Jpn*, 1987. **37**: p. 21-37.
  55. Kuramoto, S. and T. Oohara, Flat early cancers of the large intestine. *Cancer*, 1989. **64**(4): p. 950-5.
  56. Matsui, T., et al., Natural history of superficial depressed colorectal cancer: retrospective radiographic and histologic analysis. *Radiology*, 1996. **201**: p. 226-32.
  57. Kurisu, Y., et al., Histologic and immunohistochemical analysis of early submucosal invasive carcinoma of the colon and rectum. *Pathol Int*, 1999. **49**: p. 608-16.
  58. Ohta, H., et al., Expression of CD4+ T cell cytokine genes in the colorectal mucosa of inflammatory colorectal polyps in miniature dachshunds. *Vet Immunol Immunopathol*, 2013. **155**: p. 259-63.
  59. Tamura, Y., et al., Markedly increased expression of interleukin-8 in the colorectal mucosa of inflammatory colorectal polyps in miniature dachshunds. *Vet Immunol Immunopathol*, 2013. **156**: p. 32-42.
  60. Igarashi, H., et al., Functional analysis of pattern recognition receptors in

- miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps. *J Vet Med Sci*, 2015. **77**: p. 439-47.
61. Igarashi, H., et al., Expression profiling of pattern recognition receptors and selected cytokines in miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps. *Vet Immunol Immunopathol*, 2014. **159**: p. 1-10.
  62. Tsukamoto, A., et al., A case of canine multiple inflammatory colorectal polyps treated by endoscopic polypectomy and argon plasma coagulation. *J Vet Med Sci*, 2012. **74**: p. 503-6.
  63. Igarashi, H., et al., Polypoid adenomas secondary to inflammatory colorectal polyps in 2 miniature dachshunds. *J Vet Med Sci*, 2013. **75**: p. 535-8.
  64. Peifer, M., et al., The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the *Drosophila* segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol*, 1992. **118**: p. 681-91.
  65. Nishisho, I., et al., Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, 1991. **253**: p. 665-9.
  66. Rubinfeld, B., et al., Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science*, 1996. **272**: p. 1023-6.
  67. Head KW, E.R., Dubielzig RR, Tumors of the Alimentary Tract. 4 ed. Tumors in Domestic Animals. 2002: Iowa State Press.
  68. Uzal, F.A., B.L. Plattner, and J.M. Hostetter, Neoplastic and proliferative lesions of the stomach and intestine. 6 ed. Jubb, Kennedy & Palmer's

- Pathology of Domestic Animals, ed. **M. Grant**. Vol. 2. 2015: Saunders Ltd.
69. Almagro, U.A., K. Pintar, and R.B. Zellmer, Squamous metaplasia in colorectal polyps. *Cancer*, 1984. **53**: p. 2679-82.
  70. Bansal, M., et al., Are metaplasias in colorectal adenomas truly metaplasias? *Am J Pathol*, 1984. **115**: p. 253-65.
  71. Chen, K.T., Colonic adenomatous polyp with focal squamous metaplasia. *Hum Pathol*, 1981. **12**: p. 848-9.
  72. Hayashi, I., et al., Tubular adenoma with focal squamous metaplasia of the ascending colon. *Acta Pathol Jpn*, 1985. **35**(2): p. 507-15.
  73. Kontozoglou, T., Squamous metaplasia in colonic adenomata: report of two cases. *J Surg Oncol*, 1985. **29**: p. 31-4.
  74. Houghton, O., L.E. Connolly, and W.G. McCluggage, Morules in endometrioid proliferations of the uterus and ovary consistently express the intestinal transcription factor CDX2. *Histopathology*, 2008. **53**: p. 156-65.
  75. Wani, Y., et al., Aberrant Cdx2 expression in endometrial lesions with squamous differentiation: important role of Cdx2 in squamous morula formation. *Hum Pathol*, 2008. **39**: p. 1072-9.
  76. Petris, G.D. and L. Chen, Morules in fundic gland polyposis: a case report. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. **7**: p. 1241-5.
  77. Mochizuki, K., et al., Squamous morula formation in colorectal adenoma: Immunohistochemical and molecular analyses. *Pathol Res Pract*, 2015. **211**: p. 797-800.

78. Pantanowitz, L., Colonic adenoma with squamous metaplasia. *Int J Surg Pathol*, 2009. **17**: p. 340-2.
79. Buchley, C.H., Normal endometrium and non-proliferative conditions of the endometrium. 5th ed, ed. H. Fox. 2003, Haines & Taylor Obstetrical and Gynaecological Pathology: Churchill Livingstone.
80. McEntee, M.F. and K.A. Brenneman, Dysregulation of beta-catenin is common in canine sporadic colorectal tumors. *Vet Pathol*, 1999. **36**: p. 228-36.
81. Restucci, B., et al., Expression of E-cadherin, beta-catenin and APC protein in canine colorectal tumours. *Anticancer Res*, 2009. **29**: p. 2919-25.
82. Powell, S.M., et al., APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 1992. **359**: p. 235-7.
83. Tsao, J. and D. Shibata, Further evidence that one of the earliest alterations in colorectal carcinogenesis involves APC. *Am J Pathol*, 1994. **145**: p. 531-4.
84. Soetikno, R.M., et al., Prevalence of nonpolypoid (flat and depressed) colorectal neoplasms in asymptomatic and symptomatic adults. *JAMA*, 2008. **299**: p. 1027-35.
85. Crawford, B.E. and F.W. Stromeyer, Small nonpolypoid carcinomas of the large intestine. *Cancer*, 1983. **51**: p. 1760-3.
86. Minamoto, T., et al., Superficial-type adenomas and adenocarcinomas of the colon and rectum: a comparative morphological study. *Gastroenterology*, 1994. **106**: p. 1436-43.

87. Hasegawa, H., et al., p53 gene mutations in early colorectal carcinoma. De novo vs. adenoma-carcinoma sequence. *Int J Cancer*, 1995. **64**: p. 47-51.
88. Mueller, J.D., B. Bethke, and M. Stolte, Colorectal de novo carcinoma: a review of its diagnosis, histopathology, molecular biology, and clinical relevance. *Virchows Arch*, 2002. **440**: p. 453-60.
89. Yamagishi, H., et al., Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chin J Cancer*, 2016. **35**: p. 4.
90. Minamoto, T., et al., Infrequent K-ras activation in superficial-type (flat) colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Cancer Res*, 1994. **54**: p. 2841-4.
91. Umetani, N., et al., Involvement of APC and K-ras mutation in non-polypoid colorectal tumorigenesis. *Br J Cancer*, 2000. **82**: p. 9-15.
92. Yagi, O.K., et al., Analyses of the APC and TGF-beta type II receptor genes, and microsatellite instability in mucosal colorectal carcinomas. *Jpn J Cancer Res*, 1997. **88**: p. 718-24.
93. Muta, H., et al., E-cadherin gene mutations in signet ring cell carcinoma of the stomach. *Jpn J Cancer Res*, 1996. **87**: p. 843-8.
94. Berx, G. and F. van Roy, Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009. **1**: p. a003129.
95. Kikuchi-Yanoshita, R., et al., Genetic changes of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res*, 1992. **52**: p. 3965-71.

96. Ohue, M., et al., A frequent alteration of p53 gene in carcinoma in adenoma of colon. *Cancer Res*, 1994. **54**: p. 4798-804.
97. Ichii, S., et al., Inactivation of both APC alleles in an early stage of colon adenomas in a patient with familial adenomatous polyposis (FAP). *Hum Mol Genet*, 1992. **1**: p. 387-90.
98. Munemitsu, S., et al., Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**: p. 3046-50.
99. Hinoi, T., et al., Complex formation of adenomatous polyposis coli gene product and axin facilitates glycogen synthase kinase-3 beta-dependent phosphorylation of beta-catenin and down-regulates beta-catenin. *J Biol Chem*, 2000. **275**(44): p. 34399-406.
100. Morin, P.J., et al., Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*, 1997. **275**: p. 1787-90.
101. Tomita, H., et al., Development of gastric tumors in Apc(Min/+) mice by the activation of the beta-catenin/Tcf signaling pathway. *Cancer Res*, 2007. **67**: p. 4079-87.
102. Chiurillo, M.A., Role of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in gastric cancer: An in-depth literature review. *World J Exp Med*, 2015. **5**: p. 84-102.
103. Hugen, S., et al., Gastric carcinoma in canines and humans, a review. *Vet Comp Oncol*, 2016.
104. Tian, X., et al., E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotechnol*, 2011. **2011**: p. 567305.
105. Kadowaki, T., et al., E-cadherin and alpha-catenin expression in human

- esophageal cancer. *Cancer Res*, 1994. **54**: p. 291-6.
106. Ochiai, A., et al., Frequent loss of alpha catenin expression in scirrhous carcinomas with scattered cell growth. *Jpn J Cancer Res*, 1994. **85**: p. 266-73.
107. Xiangming, C., et al., The expression of cadherin-catenin complex in association with the clinicopathologic features of early gastric cancer. *Surg Today*, 1998. **28**: p. 587-94.
108. Pećina-Slaus, N., Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int*, 2003. **3**: p. 17.
109. Frixen, U.H., et al., E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*, 1991. **113**: p. 173-85.
110. Vleminckx, K., et al., Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*, 1991. **66**: p. 107-19.
111. Mayer, B., et al., E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Res*, 1993. **53**: p. 1690-5.
112. Shimoyama, Y. and S. Hirohashi, Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Res*, 1991. **51**: p. 2185-92.
113. Kim, H.C., H.J. Kim, and J.C. Kim, Reduced E-cadherin expression as a cause of distinctive signet-ring cell variant in colorectal carcinoma. *J Korean Med Sci*, 2002. **17**: p. 23-8.
114. Nigam, A.K., et al., Loss of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 1993. **68**: p. 507-14.



115. Shiozaki, H., et al., Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol*, 1991. **139**: p. 17-23.
116. Aresu, L., et al., E-cadherin and  $\beta$ -catenin expression in canine colorectal adenocarcinoma. *Res Vet Sci*, 2010. **89**: p. 409-14.
117. Kroepil, F., et al., Down-regulation of CDH1 is associated with expression of SNAI1 in colorectal adenomas. *PLoS One*, 2012. **7**: p. e46665.
118. Ando, K., et al., Discrimination of p53 immunohistochemistry-positive tumors by its staining pattern in gastric cancer. *Cancer Med*, 2015. **4**: p. 75-83.
119. Finlay, C.A., et al., Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol*, 1988. **8**: p. 531-9.
120. Gronostajski, R.M., A.L. Goldberg, and A.B. Pardee, Energy requirement for degradation of tumor-associated protein p53. *Mol Cell Biol*, 1984. **4**: p. 442-8.
121. Kaklamanis, L., et al., p53 expression in colorectal adenomas. *Am J Pathol*, 1993. **142**: p. 87-93.
122. Fenoglio-Preiser, C.M., et al., TP53 and gastric carcinoma: a review. *Hum Mutat*, 2003. **21**: p. 258-70.
123. Fernandez-Pol, S., et al., Immunohistochemistry for p53 is a useful tool to identify cases of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes that are TP53 mutated, have complex karyotype, and have poor prognosis. *Mod Pathol*, 2017. **30**: p. 382-392.
124. Kmet, L.M., L.S. Cook, and A.M. Magliocco, A review of p53 expression

- and mutation in human benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors. *Cancer*, 2003. **97**: p. 389-404.
125. Rodrigues, N.R., et al., p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**: p. 7555-9.
  126. Carrasco, V., et al., Canine gastric carcinoma: immunohistochemical expression of cell cycle proteins (p53, p21, and p16) and heat shock proteins (Hsp27 and Hsp70). *Vet Pathol*, 2011. **48**: p. 322-9.
  127. Chambers, J.K., et al., Adenocarcinoma of Barrett's esophagus in a dog. *J Toxicol Pathol*, 2017. **30**: p. 239-243.
  128. Gamblin, R.M., J.E. Sagartz, and C.G. Couto, Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. *Am J Vet Res*, 1997. **58**: p. 857-63.
  129. Haga, S., et al., Overexpression of the p53 gene product in canine mammary tumors. *Oncol Rep*, 2001. **8**: p. 1215-9.
  130. Wolf, J.C., et al., Immunohistochemical detection of p53 tumor suppressor gene protein in canine epithelial colorectal tumors. *Vet Pathol*, 1997. **34**: p. 394-404.
  131. Munday, J.S., C.V. Löhr, and M. Kiupel, Tumors of the Alimentary Tract in "Tumors in Domestic Animals". Fifth Edition ed. 2017: Wiley-Blackwell.
  132. Triantafyllidis, J.K., G. Nasioulas, and P.A. Kosmidis, Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res*, 2009. **29**: p. 2727-37.

133. Kameyama, H., et al., Genomic characterization of colitis-associated colorectal cancer. *World J Surg Oncol*, 2018. **16**: p. 121.
134. Weber, C.R., et al., Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab Invest*, 2008. **88**: p. 1110-20.
135. Grivennikov, S.I., Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol*, 2013. **35**: p. 229-44.