

## 論文内容の要旨

論文題目 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

氏名 齋藤 翼

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、小動物の消化管におけるポリープや腫瘍が発見、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。しかし動物の消化管腫瘍に関する発生動向や病理組織学的な情報は今なお少ない。

ヒトにおいて消化管腫瘍は、発生頻度の高い腫瘍である。特に胃がん、大腸がんは、がん死亡率の上位を占めている。ヒトにおける腫瘍発生の鍵となる主な要因は、腫瘍の成長を促進するがん遺伝子の活性化と腫瘍抑制因子の不活化が挙げられる。特に腫瘍抑制因子である *APC* (*Adenomatous polyposis coli*) は大腸の腫瘍発生に重要な役割を果たしている。*APC* は家族性大腸腺腫症 (FAP) から発見された。さらに FAP 患者のみならず、非家族性の散発性腺腫、腺癌でも *APC* の機能不全が病因として深く関与している。*APC* は細胞分裂、幹細胞性の維持など、細胞の運命を司る WNT/beta-catenin シグナル伝達経路の主要な構成要素である。Beta-catenin は細胞接着分子として細胞膜に存在する一方、細胞質内では *APC/Axin/GSK-3b* によりユビキチン化、分解され、低濃度に保たれている。WNT 存在下では、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、核内に移行、WNT の標的遺伝子を活性化することで細胞分裂へと向かう。腸の上皮性腫瘍は、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。

ヒトの疾患を研究する上で、モデル動物は有用である。ヒトの消化管腫瘍のモデルとして、主に *Apc<sup>min</sup>* マウスが用いられている。本マウスは *APC* 変異により消化管に多数のポリープを形成するモデルとして知られている。しかしこのげっ歯類モデルは、主に小腸にポリープを形成するため、ヒトの消化管腫瘍の発生部位や病理学的特徴などの表現型を完全には反映していない。一方、イヌにおける自然発生性消化管上皮性腫瘍は、小腸よりも大腸における発生が一般的であり、一部の腫瘍ではヒトと同様に *APC* の変異が認められる。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傾向がある。これらの特徴はヒトとの類似点が多く、疾患モデルとして有用である可能性がある。しかしながら、発生動向や悪性度、組織学的特徴、関連因子、発生機序を体系的にまとめた研究はこれまで成されておらず、ヒトの疾患モデルとしての妥当性には不明な点が多い。従って、本研究ではイヌの上皮性消化管腫瘍について、多角的にその特徴を検討した。

第一章では、131例の消化管にみられた上皮性の腫瘍を、世界保健機構(WHO)の組織学的分類に従い診断・分類した。さらに、ヒトで古くから研究されている粘膜内での腫瘍増殖形態の相違に着目し、PG/NPG (polypoid growth/non-polypoid growth) 型に分類した。これらの診断を基に、犬種、年齢、性別、発生部位、浸潤/転移の有無など、その発生動向を精査した。その結果、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、扁平上皮癌の発生はなかった。PG/NPG 分類では過半数が隆起性の病変を示す PG 型腫瘍であった。平坦・陥凹型である NPG 型の腫瘍では、全例で浸潤/転移が認められた。ヒトの消化管における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されている。Adenoma-carcinoma sequence は、1970年代に体系づけられた概念であり、APC や CTNNB1 (beta-catenin) など、複数の遺伝子変異が段階的に蓄積することで、腫瘍化するものである。癌組織では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、組織学的にも有力な説とされている。一方、発見される癌の中には、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存在する。これらの腫瘍は *de novo* 癌と呼ばれ、1960年代前後から日本のみならず欧米でも指摘されてきた。さらに *de novo* 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。さらに急速に進展し、大型の進行癌となるという特徴を有している。これらの知見はイヌでみられた消化管上皮性腫瘍についても類似点が多く、腫瘍の増殖形態の指標である PG/NPG 分類は、悪性度や腫瘍発生機序を理解する上で重要な所見であることが示唆された。一方、犬種毎における腫瘍発生について精査したところ、消化管全体ではジャックラッセルテリアが、大腸ではミニチュアダックスフンドが多かった。特にこれら2犬種は、胃消化管上皮性腫瘍の腫瘍形成のモデルとして、有用な情報を提供する可能

性がある。特にジャックラッセルテリアについては、本研究にて消化管腫瘍の発生率の高さと、胃及び大腸に多数のポリープを形成するという表現型が明らかとなると共に、罹患例に APC 変異があることが報告されている。このためジャックラッセルテリアでは、ヒトの消化管上皮性腫瘍と同様、APC 変異が腫瘍発生に関与するものと考えられた。

第二章では、大腸において腫瘍発生頻度が高かったミニチュアダックスフンドを対象として、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には犬種特異的疾患として炎症性ポリープ (Inflammatory Polyps of Miniature Dachshunds, IPMD) が好発することが知られているが、本疾患と腫瘍発生との関連は不明である。そこで、内視鏡検査にて結直腸に隆起性病変を認めた 67 例 (計 108 標本) を用いて病理組織学検査を行うと共に、症例の臨床歴を精査し、IPMD と腫瘍発生との関連性を検討した。組織検索の結果、IPMD では炎症性肉芽組織内に、異型上皮細胞や上皮細胞の塊状増殖がみられ、微小な腫瘍巣形成が観察された。さらに IPMD を発症した症例の約半数 (48%) は、大腸病変 (IPMD/腺腫/腺癌) の再発を示すとともに、27% の症例に腫瘍性病変が認められた。さらに、それらの腫瘍組織内には IPMD の典型的組織象を伴っていたことから、腫瘍は IPMD と同一組織から発生したことが示唆された。次に IPMD から腫瘍に進展する機序を明らかにする目的で、ヒトの消化管腫瘍発生や悪性化に関与しているとされている APC、beta-catenin 及び p53 の関与について免疫組織化学的に検索した。Beta-catenin 及び p53 の核陽性率は、IPMD、腺腫、腺癌の順で病態進行に伴い有意な増加を示した。さらに beta-catenin 核陽性を示す領域では APC の染色性の低下が認められたことから、APC/beta-catenin の発現異常が腫瘍発生及び病態の進行へ関与している可能性が示された。以上より、ミニチュアダックスフンドにおける大腸腫瘍において、犬種特異的疾患である IPMD が発生母地となり得ることが示唆された。また、その腫瘍化および悪性化の機序に APC/beta-catenin 及び p53 が関与している可能性があると考えられた。

第三章では、イヌの消化管腫瘍の発生機序として APC/beta-catenin 及び p53 の関与が疑われことから、ミニチュアダックスフンドのみではなく、第一章にて用いた症例をもとに、すべての犬種、腫瘍組織について beta-catenin、p53 の関与を免疫組織学的に検索した。さらに、ヒトでは腫瘍の悪性度の指標として用いられる E-cadherin についても検討した。その結果、E-cadherin 及び p53 については明らかなる組織相関性が得られなかったものの、beta-catenin に対する反応性は、胃と大

腸の腫瘍で異なることが明らかとなった。すなわち、beta-catenin は胃に比べて大腸の腫瘍における陽性率が高く、特に大腸において腫瘍発生に寄与している可能性が示唆された。胃と大腸での beta-catenin の反応性の違いは、ヒトでも報告されており、胃よりも腸の方が APC や beta-catenin に依存する腫瘍が多くみられる。これは胃と腸の発生機序の違いを反映しており、イヌにおいても同様の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 の反応性が異なることが明らかとなった。大腸において内腔側に突出する増殖形態を示す PG 型腺癌では、全例について beta-catenin の核陽性所見が認められた。それに対して、平坦もしくは陥凹状の増殖形態を示す NPG 型の腺癌や印環細胞癌、粘液腺癌、未分化癌などのびまん性に増殖する癌では、1 例を除くすべての症例が beta-catenin 核陰性であった。さらに NPG 型腺癌では、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。この結果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すものである。すなわち、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の核内に beta-catenin が蓄積することによって発がんする、いわゆる adenoma-carcinoma sequence を介すると考えられた。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癌として発生する腫瘍であり、機序としては *de novo* 癌等の APC/beta-catenin 以外の遺伝子変異を介する発生機序が考えられた。以上の結果より、イヌの消化管上皮腫瘍の増殖形態の相違は、ヒトと同様に腫瘍発生機序及び悪性度の相違を反映していると考えられた。

以上の一連の研究により、イヌの消化管腫瘍の発生動向や犬種特異性が明示された。さらに腫瘍組織の免疫組織化学的検索結果は、腫瘍の増殖形態と発がん機序の関連性を示唆するものであった。これらの成果は、イヌの消化管上皮性腫瘍の臨床および病理的特徴を理解し、その診断治療を行うための基礎情報として活用されるものと期待される。また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、特に PG/NPG 型の増殖形態およびその腫瘍細胞の免疫組織学的特徴は、ヒトとイヌの消化管腫瘍発生機序の関連性の理解する上で、有用な比較病理学的情報を供与するものであると考える。