

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 22 年度博士課程入学

氏名 水谷 格之

指導教員名 辻本 元

論文題目

**Studies on the expression of interleukin-2 receptor alpha chain (IL-2r α)
and measurement of its soluble form in canine lymphoid tumours
(犬のリンパ系腫瘍におけるインターロイキン 2 受容体 α 鎖(IL-2r α)の発現
および血清中可溶性 IL-2r α の測定に関する研究)**

犬においてリンパ腫は最も発生頻度の高い造血器腫瘍性疾患であり、動物腫瘍の WHO 組織学的分類(2002)によってサブタイプの細分化が進められているが、その治療に関しては新たな展開が乏しいのが現状である。そこで本研究では、犬のリンパ腫において IL-2 受容体 α 鎖(interleukin-2 receptor alpha chain, IL-2r α)(CD25)の発現およびその可溶性タンパクを解析することにより、将来的なリンパ腫の治療成績向上をめざすこととした。

CD25 は静止期リンパ球には発現していないが、抗原やマイトジェン等の刺激による活性化過程で発現が誘導される分子量 55KDa の膜貫通型糖タンパクである。医学領域では、複数のサブタイプに属する悪性リンパ腫/白血病の腫瘍細胞が恒常的に CD25 を発現し、その発現率と予後との関連が示されている。また、CD25 はリンパ球の細胞表面のみならず活性化プロセスで血清中に切断遊離することが分かっており、可溶性 IL-2 受容体(soluble IL-2 receptor, sIL-2r)と呼ばれている。sIL-2r は CD25 の細胞外ドメインのみに切断された分子量 45KDa のタンパクであり、悪性リンパ腫患者における腫瘍の増大・退縮の状況を反映することから、医学領域において腫瘍マーカーとして臨床応用されている。

本研究では、はじめに第 1 章において、WHO 分類(2002)の公表以降に明確となった新しいサブタイプである T 領域リンパ腫(T-zone lymphoma, TZL)に関して、その腫瘍細胞における CD25 の発現を検討するとともに本疾患に罹患した症例の臨床的・臨床病理学的特徴を明らかにした。次に第 2 章では、犬のリンパ腫の各サブタイプに関して腫瘍細胞における CD25 の発現を解析し、CD25 陽性率と予後との関連を検討した。最後に第 3 章では、犬における sIL-2r 測定システムを開発し、その臨床的有用性を検討した。

第 1 章 犬の T 領域リンパ腫(TZL)16 例における臨床的・臨床病理学的特徴に関する検討

犬の TZL は進行が緩慢なリンパ腫の一病型として報告されており、一般的な悪性度の高いサブタイプとは異なる臨床的対応が必要と考えられる。本章においてその臨床的・臨床病理学的特徴を明らかにするとともに、腫瘍細胞における CD25 の発現に関して検討した。リンパ節の摘出生検により病理組

織学的に TZL と診断された多中心型リンパ腫の犬 16 症例を対象とし、シグナルメント、臨床ステージ・サブステージ、併発疾患、血液検査所見、治療、および予後を解析するとともに、免疫組織化学染色を実施した。TZL では、ゴールデンレトリバーで好発であり、WHO 臨床ステージ V に分類されるものの、サブステージ a の症例が多く、ほとんどの症例でリンパ腫に伴う全身症状は認められなかった。併発疾患として毛包虫症を代表とする感染・炎症性疾患や各種腫瘍性疾患が高頻度に認められた。予後解析において全生存期間の中央値は 938 日であり、追跡期間中にリンパ腫による死亡例は 3 例のみであった。6 例に対してリンパ腫に対する治療を実施せず経過観察 (Watchful waiting) したところ、リンパ節サイズは観察期間中に増減したものの進行性のリンパ節腫脹は観察されず、5 例は観察終了時まで生存していた。リンパ節の免疫組織化学染色において、TZL における腫瘍細胞は CD3 陽性、CD20 陰性であり、CD25 強陽性であることが特徴的であった。

本章の結果から、犬の TZL は穏やかな臨床挙動をたどり、長期生存が期待できるリンパ腫サブタイプではあるものの、免疫抑制と関連すると考えられる併発疾患が高頻度に認められた。また、本サブタイプの腫瘍細胞における CD25 高発現はこれら症例における免疫抑制状態と関連している可能性が考慮された。

第 2 章 犬のリンパ系腫瘍細胞におけるインターロイキン 2 受容体 α 鎖 (IL-2r α) の発現およびその予後に対する影響

本章では、犬の各種リンパ系腫瘍に関して腫瘍細胞における CD25 の発現を解析するとともに、最も主要なサブタイプである多中心型高悪性度 B 細胞性リンパ腫において CD25 発現率と予後との関連を検討した。CD25 の発現解析には、高悪性度 B 細胞性リンパ腫 (17 例)、TZL (5 例)、および濾胞性リンパ腫 (Follicular lymphoma, FL) (2 例) の体表リンパ節、皮膚型リンパ腫 (2 例) の皮膚、および急性リンパ芽球性白血病 (Acute lymphoblastic lymphoma, ALL) (3 例) の末梢血液から採取した腫瘍細胞を含むサンプルを用いた。予後に関しては、シクロフォスファミド、ヒドロキシダウノルビシン (ドキシソルビシン)、ビンクリスチン (オンコビン)、プレドニゾロンを用いた CHOP-based 多剤併用化学療法プロトコール (UW-25) によって治療を行った高悪性度 B 細胞性リンパ腫症例 (15 例) について、無増悪生存期間を Kaplan-Meier 法により評価した。イヌ CD25 に対するモノクローナル抗体 (P4A10) を用いたフローサイトメトリーの結果、高悪性度 B 細胞性リンパ腫および TZL においては健常犬および反応性過形成のリンパ節よりも有意に CD25 発現率が高かった。また、症例数は少なかったが、FL および皮膚型リンパ腫のいずれにおいても高い CD25 発現率が認められた。しかし、ALL の 3 症例では、いずれにおいても腫瘍細胞における CD25 発現率は低かった。高悪性度 B 細胞性リンパ腫症例を発現率 60% 以上の CD25 高発現群 (7 例) と発現率 60% 未満の低発現群 (8 例) の 2 群に分け予後解析したところ、高発現群における無増悪生存期間は低発現群におけるものに比べて有意に短かった。免疫組織化学染色においては、FL では腫瘍細胞領域が CD25 強陽性であり、残存する非腫瘍部分では CD25 陽性率が低かった。高悪性度 B 細胞性リンパ腫では、リンパ節全体にびまん性に増生している腫瘍細胞の CD25 陽性率は 0.6% から 78% とさまざまであった。

本研究により、犬のリンパ腫の主要なサブタイプにおける腫瘍細胞の CD25 発現状況が明らかになるとともに、高悪性度 B 細胞性リンパ腫では CD25 の発現率が予後因子になりうることが示された。

第3章 犬のリンパ腫における血清中可溶性インターロイキン2受容体の測定に関する検討

第1章および第2章において、複数のサブタイプの犬のリンパ系腫瘍腫細胞においてCD25の発現を検出した。本章では、犬の血清中においてsIL-2rを検出し、その定量・測定系を確立して臨床的有用性を検討した。sIL-2rの検出には犬のリンパ腫細胞株(UL-1, CL-1, Nody-1)の膜タンパクおよび健常犬血清を用い、免疫沈降ポリアクリルアミド電気泳動(IP-PAGE)を実施した。イヌCD25の細胞外領域のペプチドをウサギに免疫することによって得られた抗イヌIL-2r α ポリクローナル抗体と、既に報告のあるイヌの抗IL-2r α モノクローナル抗体(P4A10)を用いて、イヌsIL-2rを測定するSandwich ELISA系を構築し、sIL-2r濃度の異なる3種類の犬血清を用いて本測定系の妥当性を検証した。本ELISA系を用い、リンパ腫罹患犬(51例)における治療前血清中sIL-2r濃度を求めた。またCHOP-based多剤併用化学療法プロトコル(UW-25)により治療を行った高悪性度B細胞性リンパ腫症例(4例)において治療経過における血清中sIL-2r値および体表リンパ節/腫瘍サイズの変化をモニターした。免疫沈降ポリアクリルアミド電気泳動の結果、犬のリンパ腫由来細胞株(CL-1, Nody-1)のCD25膜タンパク(約55kDa)より分子量の小さいsIL-2r(約45kDa)に相当するタンパクを犬の血清中に検出することができた。今回作製したELISA系に関して、直線性試験、添加回収試験、精度・再現性試験を実施したところ、犬の血清中sIL-2rを特異的に測定可能であることが確認された。治療前の多中心型高悪性度B細胞性リンパ腫症例の血清中sIL-2r濃度は健常犬および炎症性疾患罹患犬より有意に高値であった。治療経過中、高悪性度B細胞性リンパ腫症例の4例中3例において血清中sIL-2r濃度が体表リンパ節/腫瘍サイズと並行して変動することが示された。さらに2例においては寛解導入後再発の9~13週前からsIL-2r濃度の上昇が確認された。

本章における研究により、犬の血清中にsIL-2rの存在が証明され、今回作製したELISA系によって特異的に測定可能であることが確認された。治療前、多中心型高悪性度B細胞性リンパ腫症例の血清中sIL-2r値は健常犬よりも有意に高値を示し、血清中sIL-2r濃度が腫瘍の消長と相関する症例が存在したことから、sIL-2rは犬リンパ腫症例の治療効果のモニタリングに有用である可能性が示された。

本論文における一連の研究により、犬のリンパ腫細胞にさまざまなレベルのCD25の発現が検出され、本タンパクの高発現が免疫抑制および予後悪化に関与している可能性が示唆された。また、リンパ腫罹患犬の血中にsIL-2rの存在が確認され、高悪性度B細胞性リンパ腫に関しては、血清中sIL-2r濃度が治療効果のモニタリングや再発の早期検出に有用であることが示唆された。本研究によって得られた成果は、犬のリンパ腫における病態生理の解明および病状のモニタリングに寄与するとともに、CD25をターゲットとする分子標的薬の臨床応用の可能性を示唆するものであり、リンパ腫治療における新たな方向性を示すものと考えられる。