

イヌ頭蓋内腫瘍の細胞分化と腫瘍発生に関する
病理学的・分子生物学的研究

井手 鉄哉

目次

緒論	3
第1章 イヌの神経上皮性腫瘍の分類および組織発生に関する病理学的研究	
序	9
材料と方法	11
結果	13
考察	17
要約	20
図表	21
第2章 イヌの髄膜腫の分類および予後因子に関する病理学的研究	
序	31
材料と方法	33
結果	35
考察	37
要約	40
図表	41
第3章 イヌの頭蓋内原発組織球性肉腫の病理学的および免疫組織化学的特徴に関する研究	
序	50
材料と方法	51
結果	53
考察	55
要約	58
図表	59
第4章 ウェルシュ・コーギー・ペンブローク犬における組織球性肉腫の疾患関連遺伝子の検索	
序	64
材料と方法	66
結果	70
考察	72
要約	75
図表	76
総括	81
謝辞	85
参考文献	86
原著論文	94

緒論

獣医学領域における頭蓋内腫瘍に関する研究は、1990 年代初頭からの Computed tomography (CT) や Magnetic resonance imaging (MRI) などの高度画像診断技術の導入により、とくに小動物獣医臨床分野において大きく進歩した。脳や脊髄は周囲を頭蓋骨や脊椎骨で囲われているため、病変を肉眼であるいはレントゲンや超音波などの従来の画像診断機器を用いて診断することが困難であり、多くの頭蓋内腫瘍の確定診断には病理解剖が必要である。しかし近年、CT や MRI の普及により、生前検査・診断技術が向上し、中枢神経組織内の病変の質や広がりを確認した上で予後判断や治療法選択が行えるようになった。

頭蓋内腫瘍には、脳実質を構成する神経上皮組織に由来する腫瘍の他、脳表層部の髄膜組織に由来する腫瘍や間葉系組織など様々な組織に由来する腫瘍も含まれる[33]。頭蓋内腫瘍のうち、ヒトでは神経上皮組織に由来する膠細胞腫 Glioma の発生が最も多く、その中でも星状膠細胞腫瘍 Astrocytic tumor が多いが、イヌで最も発生頻度が高いのは髄膜（クモ膜）上皮に由来する髄膜腫 Meningioma であり、神経上皮性腫瘍 Neuroepithelial tumor の発生頻度は髄膜腫のそれと比較すると低い[60]。

神経上皮組織に由来する腫瘍は、通常脳実質内に発生し周囲組織への浸潤性増殖を示す場合が多く、神経機能に与える障害も大きい。これらの神経上皮性腫瘍は、髄膜腫などの実質外に発生する腫瘍（髄外腫瘍）に対して、髄内腫瘍と総称されることがある。1999 年に WHO が提唱した動物の神経系腫瘍の分類 (Table 1) [33]では、未分化かつ多方向性分化能を有する原始神経外胚葉性腫瘍 Primitive neuroectodermal tumors (PNETs) あるいは髄芽腫 Medulloblastoma（小脳 PNETs）を最も幼若な腫瘍型として、星状膠細胞への分化を示す腫瘍群（星状膠細胞腫等）、稀突起膠細胞への分化を示す腫瘍群（稀突起膠細胞腫等）、脳室上衣細胞への分化を示す腫瘍群（上衣腫等）、脈絡叢上皮への分化を示す腫瘍群（脈絡叢乳頭腫等）、神経細胞への分化を示す腫瘍群（神経芽細胞腫、神経節細胞腫等）など、腫

瘍細胞が示す分化の特徴にしたがって大まかに神経外胚葉性腫瘍を分類し、さらにその悪性度等に応じて細分類を設けている。神経上皮性腫瘍の疫学調査は、それが実施された地域の特徴によりその結果が異なる傾向があるが、一般的には動物では星状膠細胞性腫瘍と稀突起膠細胞性腫瘍の発生が多く、次いで PNETs の発生が多い[60]。

髄膜腫はイヌの神経系腫瘍の中で最も発生頻度が高い腫瘍である[60]。髄膜組織が存在する脳表層部のいずれの部位からも発生しうるが、イヌでは小脳テントおよび大脳鎌が好発部位とされている[60]。発生部位によっては外科的適応により良好な予後が期待できるため、その生物学的挙動の把握、とりわけ良性と悪性の鑑別は、臨床的には非常に重要と思われる。しかし髄膜腫は非常に多彩な組織形態を示すため、しばしば通常の HE 染色標本のみでは診断に苦慮する場合がある。また、摘出範囲の制限等によりマージンの評価が困難であり、その悪性度を正確に把握できないことが多い。WHO 分類では、髄膜腫をその生物学的挙動の相違から大きく通常型（良性）と退形成型（悪性）に分類し、前者は、組織形態によりさらに髄膜上皮型、線維型（線維芽細胞型）、移行型（混合型）、砂粒体型、血管腫型、乳頭状、顆粒細胞型、粘液型の 8 亜型に分けている[33]。通常型は共通して、緩慢な圧迫性増殖を示すとされている。これに対して退形成型は、異型性・多形性の高い腫瘍細胞が神経組織への浸潤性増殖を示すものとされ、その組織型の細分類は行わない。

一般的に、頭蓋内腫瘍はその種類により抗がん剤や放射線などの治療に対する感受性およびその予後が大きく異なるため、正確に分類することが重要である。しかしながら、動物の神経系腫瘍の WHO 分類が制定されて既に 10 年以上が経過し、さらにこの間、小動物臨床領域における MRI 普及と相まって、動物（特にイヌ）の頭蓋内腫瘍の臨床動向や病理学的特徴に関する情報が飛躍的に増加し、現分類にも問題点がいくつか生じてきている。近年、獣医学領域でも医学領域と同様に、幹細胞に関する知見が飛躍的に増加し、神経組織においては脳室下帯 (SVZ) に存在する神経幹細胞の概念が確立されている (Figs. 1, 2) [3]。この概念は腫瘍発生の解釈にも大きな影響を与え、動物の神経上皮性腫瘍の組織

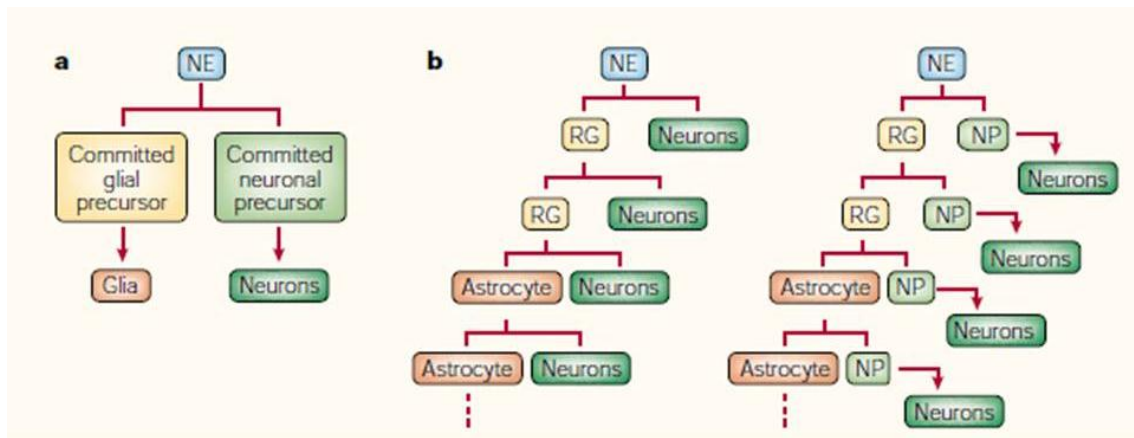
診断分類にも変化をもたらす可能性がある。また、髄膜腫はその組織分類により予後が大きく異なると予想されるため、臨床的特徴や組織発生に配慮した分類が重要である。冒頭で述べたように、獣医学領域においても高度画像診断機器の導入により、生前にある程度の診断や病態把握が可能となり、中枢神経疾患の診断や治療の研究が積極的に行われるようになったが、頭蓋内腫瘍に関する情報量はまだ十分とはいえない。今後の小動物を取り巻く社会的背景や獣医療の進歩を鑑みると、頭蓋内腫瘍を診断し治療する機会はますます増加すると予想される。従って、頭蓋内腫瘍の臨床および病理学的情報を蓄積し、その病理発生機序を解明し、正確な生物学的特徴と腫瘍分類を把握することは、今後の獣医学における重要な課題と考えられる。そのため本研究は、イヌの神経上皮性腫瘍、髄膜腫および頭蓋内の組織球性肉腫の病理発生機序を明らかにすることで、その生物学的特徴を正確に把握することを目的として遂行された。

本論文は4章から構成される。第1章では、イヌの神経上皮性腫瘍についてそれぞれの腫瘍を構成する腫瘍細胞の分化傾向や細胞増殖を調節する様々なマーカーの発現に基づいて階層クラスター解析を行い、神経上皮性腫瘍の組織分類を行った。第2章では、髄膜腫の進展および神経組織内浸潤機序について、細胞接着因子の発現変化に着目し、免疫組織化学的に検討し、通常型と退形成型の髄膜腫の分類を試みた。第3章では、近年イヌで診断機会が急激に増加し、髄膜腫との鑑別が重要となる頭蓋内原発の組織球性肉腫について、その疫学、病理学的特徴、および腫瘍細胞の特性を明らかにした。そして第4章では、第3章で述べた頭蓋内原発の組織球性肉腫が好発することが判明したウェルシュ・コーギー・ペンブローク犬に関して、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム配列を明らかにし、組織球性肉腫罹患リスクの上昇に関わる遺伝子領域の有無を検討した。

Table 1. 動物の神経系腫瘍の WHO 分類（1999 年、Koestner A ら）

- 1) **神経上皮性腫瘍 Tumors of Neuroepithelial Tissue**
 - 1.1 星状膠細胞性腫瘍 Astrocytic tumors
 - 1.2 稀突起膠細胞性腫瘍 Oligodendroglial tumors
 - 1.3 その他の膠細胞性腫瘍 Other gliomas
 - 1.4 上衣細胞性腫瘍 Ependymal tumors
 - 1.5 脈絡叢上皮腫瘍 Choroid plexus tumors
 - 1.6 神経細胞性/神経-膠細胞混合腫瘍 Neuronal/Neuronal-glia tumors
 - 1.7 胚細胞性腫瘍 Embryonal tumors
 - 1.8 松果体実質腫瘍 Pineal parenchymal tumors
- 2) **髄膜腫瘍 Tumors of the Meninges**
 - 2.1 髄膜上皮性腫瘍 Tumors of the meningotheial cells
 - 2.1.1 髄膜腫 Meningiomas
 - 2.1.1.1 髄膜上皮型 Meningothelial
 - 2.1.1.2 線維性（線維芽細胞様） Fibrous (fibroblastic)
 - 2.1.1.3 移行型（混合型） Transitional (mixed)
 - 2.1.1.4 砂粒体型 Psammomatous
 - 2.1.1.5 血管腫状 Angiomatous
 - 2.1.1.6 乳頭状 Papillary
 - 2.1.1.7 顆粒細胞型 Granular cell
 - 2.1.1.8 粘液状 Myxoid
 - 2.1.1.9 退形成性（悪性） Anaplastic (malignant)
 - 2.2 間葉性、非髄膜上皮性腫瘍 Tumors of the meningotheial cells
 - 2.2.1 線維肉腫 Fibrosarcoma
 - 2.2.2 び漫性髄膜肉腫症 Diffuse meningeal sarcomatosis
- 3) **リンパ腫および造血器腫瘍 Lymphomas and hematopoietic Tumors**
 - 3.1 リンパ腫 Tumors of the meningotheial cells
 - 3.2 非 B、非 T 細胞性腫瘍 Non-B, non-T leukocytic neoplasm
 - 3.3 小膠細胞腫瘍 Microgliomatosis
 - 3.4 悪性組織球症 Malignant histiocytosis
- 4) **トルコ鞍部腫瘍 Tumors of the Sellar Resion**
- 5) **その他の原発性腫瘍および嚢胞 Other Primary Tumors and Cysts**
- 6) **転移性腫瘍 Metastatic Tumors**
- 7) **特定部位腫瘍の神経系への局所伸展 Local Extensions of Regional Tumors**
- 8) **末梢神経系腫瘍 Tumors of the Peripheral Nervous System**

Fig. 1. 胎子脳における神経幹細胞の概念（2001 年、Alvarez-Buylla A ら）



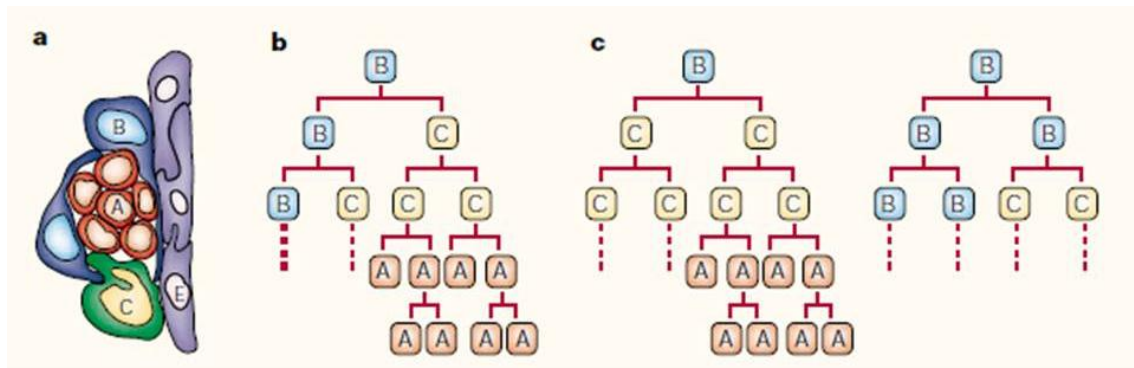
古典的な神経発生の概念 (a)

神経管を構成する神経上皮細胞（NE）がグリア細胞系列ないし神経細胞系列のいずれか一方へ分化すると考えられていた。

新規な神経発生の概念 (b)

神経上皮細胞はまず放射状グリア（RG）へと分化し、この放射状グリアが非対称分裂を繰り返すことでグリア細胞や神経細胞が産生される。神経細胞の産生経路には、放射状グリアが直接分化する経路（左図）、および放射状グリアが神経前駆細胞（NP）へと分化した後、神経細胞へと分化する経路（右図）の 2 つが知られている。放射状グリアは星状膠細胞へと分化すると消失するが、成体脳の脳室下帯ではこれらの星状膠細胞が神経幹細胞として機能し、グリア細胞や神経細胞を産生する。

Fig. 2. 成体脳における神経幹細胞の概念 (2001 年, Alvarez-Buylla A ら)



脳室下帯 SVZ は A 型細胞（神経芽細胞）、B 型細胞（星状膠細胞の特徴を有する神経幹細胞）、C 型細胞（中間前駆体細胞）および E 型細胞（上衣細胞）から構成される。E 型細胞は脳室を裏打ちし、B 型細胞の分化によって時折置き換えられる (a)。神経幹細胞である B 型細胞は B 型細胞と C 型細胞に非対称性に分裂するか (b)、C 型細胞へ対称性に分裂し (c)、A 型細胞へと分化する。A 型細胞は分裂を繰り返した後、神経細胞へと分化する。

第1章

イヌの神経上皮性腫瘍の分類および組織発生に関する病理学的研究

序

神経上皮性腫瘍は、その生物学的特性、悪性度、治療効果、予後などがそれぞれの腫瘍型で異なっている[33,60]。従って、神経上皮性腫瘍を臨床的にあるいは基礎獣医学研究の対象として取り扱うためには、正確な分類体系が必須である。1999年にWHOが提唱した動物の神経系腫瘍の分類は、未分化かつ多方向性分化能を有する原始神経外胚葉性腫瘍 Primitive neuroectodermal tumors (PNETs) あるいは髄芽腫 Medulloblastoma (小脳 PNETs) を最も幼若な腫瘍型として、星状膠細胞への分化を示す腫瘍、稀突起膠細胞への分化を示す腫瘍、脳室上皮細胞への分化を示す腫瘍、脈絡叢上皮への分化を示す腫瘍、神経細胞への分化を示す腫瘍など、腫瘍細胞が示す分化の特徴に従い大まかに神経外胚葉性腫瘍を分類し、さらにその悪性度等に応じて細分類を設けている[33]。現在、獣医学領域ではこのWHO分類が唯一の国際的標準分類である。

しかし近年、幹細胞に関する知見が飛躍的に増加し、神経組織においても神経幹細胞の概念が確立された[3]。これらの神経幹細胞は神経外胚葉性腫瘍にも存在し、その腫瘍発生に重要な役割を担っていることが明らかにされ、腫瘍発生の解釈にも大きな影響を与えている。さらに近年、免疫組織化学に応用可能な神経幹細胞や前駆細胞のマーカー抗体が多数市販されるようになり、従来の動物の神経上皮性腫瘍の組織診断分類や病態解釈が大きく修正される可能性がある。

動物の神経系腫瘍のWHO分類では、免疫組織化学的手法により確認される星状膠細胞の細胞骨格タンパクである Glial fibrillary acidic protein (GFAP)、神経細胞の細胞骨格タ

ンパクである Neurofilament、シナプス関連タンパクである Synaptophysin など、基本的な細胞マーカーの発現に関しては考慮されてあるものの、神経幹細胞や前駆細胞マーカーの発現に関しては一切考慮されておらず、これまでにその発現を検討した報告もない[33]。

そのため本章では、各神経上皮性腫瘍の由来細胞を確定するため、上記の GFAP、Neurofilament に加えて、神経幹細胞およびグリア前駆細胞の細胞骨格タンパクである Nestin、稀突起膠細胞の核内転写因子である Olig2、初期の神経細胞分化に関わる微小管関連タンパクである Class III β -tubulin、胎子期の神経芽細胞の脳内移行に関わる微小管関連タンパクである Doublecortin、マクロファージ・ミクログリア系列の細胞に発現するカルシウム関連タンパクである Ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1)、および上皮系細胞の細胞骨格タンパクである Cytokeratin など、腫瘍細胞の分化傾向を調節するマーカーの発現を免疫組織化学的に検討した[6,17,25,26,28,29,37,38,41,52,54]。

また、各神経上皮性腫瘍の細胞増殖に関連するシグナル伝達系を評価する目的で、チロシンキナーゼ受容体である Epidermal growth factor receptor (EGFR) と c-erbB2 の発現、およびその下流因子である PI3K-Akt シグナルと RAS-ERK (MAPK) シグナルの活性化（リン酸化）状態も免疫組織化学的に検討した[4,14,23,39,45,47,55]。さらに、神経系における主なアポトーシス抑制タンパクである Bcl-2 や Bcl-xL の発現に関しても免疫組織化学的に検討した[12,53]。加えて増殖細胞の検出に関しては一般的に用いられる抗 Ki-67 抗体を用いて検索した[51]。

得られた結果について、階層クラスター解析を用いてデンドログラムを作成することで、腫瘍細胞の分化や増殖に基づくイヌの神経上皮性腫瘍の分類を再検討し、病理発生機序についても考察した。

材料と方法

【症例】

2005 年から 2010 年の 6 年間で、死後剖検により採取されたイヌの神経上皮性腫瘍 21 症例、および生前に生検組織として外科的に採取された同腫瘍 9 症例の計 30 症例を用いた。収集された神経上皮性腫瘍 30 例の内訳は、星状膠細胞性腫瘍 5 例（低グレード星状膠細胞腫 1 例、中グレード星状膠細胞腫 3 例、高グレード星状膠細胞腫 1 例）、稀突起膠細胞性腫瘍 7 例（稀突起膠細胞腫 2 例、退形成性稀突起膠細胞腫 5 例）、大脳膠腫症 4 例、脈絡叢性腫瘍 5 例（脈絡叢乳頭腫 1 例、脈絡叢癌 4 例）、原始神経外胚葉性腫瘍 4 例、髄芽腫 1 例、神経細胞腫 1 例、神経芽腫 3 例であった。case 1~30 の個体情報はまとめて Table 1-1 に示した。上記組織は 10% 中性緩衝ホルマリンで固定後、定法に従い厚さ 4 μ m のパラフィン切片を作製、Haematoxylin and eosin (HE) 染色を施し、動物の神経系腫瘍の WHO 分類に従って診断した[33]。

【免疫染色】

免疫染色は Labeled streptavidin-biotinylated antibody 法を用いて実施した。用いた一次抗体を Table 1-2 に示した。標本は、脱パラフィン後、抗 GFAP 抗体、抗 Nestin 抗体、抗 Neurofilament 抗体との反応に使用する切片以外は、10mM citrate buffer (pH6.0) 内で 120°C 10 分間のオートクレーブにより抗原賦活化を行った。その後、全ての切片を 1% 過酸化水素・メタノール溶液で室温 30 分間処理して内因性ペルオキシダーゼの不活化を行い、8% skim milk / Tris-buffered saline で 37°C 40 分間処理して非特異反応を抑制した後、一次抗体と 4°C 一晩で反応させた。その後、二次抗体として抗ウサギ、抗マウスまたは抗ヤギ Ig G 抗体 (1:400, KPL, Guildford, UK) を使用し、37°C で 40 分間反応させた後、Horse-radish peroxidase-conjugated streptavidin (1:300, Dako Japan, Kyoto, Japan) で室温 30 分間処理した。

発色には 3',3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate (DAB, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) と H_2O_2 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を使用した。後染色にはヘマトキシリンを用いた。

【多変量解析】

腫瘍組織中の強拡大（400 倍）の 5 視野を無作為に選択し、1 視野中の全細胞数および各マーカー陽性細胞数をカウントすることで、陽性細胞数の割合を算出した。

多変量解析には computer-based statistical package (SPSS version 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL) を使用した。算出した全てのマーカー陽性細胞数の割合を利用して Ward 法を用いた階層クラスター解析を行い、神経上皮性腫瘍 30 例の分類を行った。各クラスター間の距離にはユークリッド平方を利用した。

結果

【病理組織学的診断】

case 1~30 における腫瘍発生部位、病理組織学的診断名、腫瘍細胞形態はまとめて Table 1 に示した。

【免疫染色】

case 1~30 における細胞分化マーカーおよび細胞増殖関連マーカーについての免疫染色の結果を、それぞれ Table 1-3、Table 1-4 に示した。

星状膠細胞性腫瘍 (Fig. 1-1) では、GFAP 陽性の腫瘍細胞は高グレードよりも低グレードで多い傾向にあったが、逆に Nestin 陽性の腫瘍細胞は低グレードよりも高グレードで多い傾向があった。Olig2 陽性の腫瘍細胞は中グレードおよび高グレードでは 3 例で、Class III β -tubulin 陽性の腫瘍細胞は中グレードの 1 例で認められ、Cytokeratin AE1/AE3 陽性の腫瘍細胞は中グレードおよび高グレードの 3 例で認められた。また、全症例で腫瘍巣の辺縁部において少数の Doublecortin 陽性の腫瘍細胞を認めた。Neurofilament および Cytokeratin 18 陽性の腫瘍細胞は存在しなかった。EGFR、c-erbB2、pERK1/2 および pAkt に陽性の腫瘍細胞はより高グレードの腫瘍で多くなる傾向があり、pERK1/2 と pAkt に関しては細胞質内だけでなく核内にも陽性反応を認めた。Bcl-xL 陽性の腫瘍細胞は全症例において認められたが、Bcl-2 陽性の腫瘍細胞は中グレードおよび高グレードの 3 例でしか認められず、陽性細胞の数も Bcl-2 よりも Bcl-xL の方が多い傾向があった。また、Ki-67 陽性細胞数はグレードと相関して増加する傾向が認められた (低グレード : 1.4%、中グレード : 8.2 - 18.3%、高グレード : 39.9%)。

稀突起膠細胞性腫瘍 (Fig. 1-2) では、ほとんどの腫瘍細胞が Olig2 および Doublecortin に陽性であった。全症例で GFAP 陽性細胞は少数しか認められなかったが、これ

らの細胞は活性化型星状膠細胞に類似した形態を呈しており、腫瘍細胞ではないと考えられた。Nestin 陽性の腫瘍細胞は良性型では少数であったが、退形成型では多数認められる傾向にあり、Class III β -tubulin 陽性の腫瘍細胞は退形成型のほとんどで認められた。全症例において、Neurofilament、Cytokeratin AE1/AE3、Cytokeratin 18 に陽性の腫瘍細胞は認められなかった。また、全症例で EGFR、c-erbB2 に陽性の腫瘍細胞は認められなかったが、pERK1/2 および pAkt に陽性の腫瘍細胞はそれぞれ退形成型の 2 例および退形成型の 1 例でのみ認められた。星状膠細胞性腫瘍での結果とは異なり、稀突起膠細胞性腫瘍では Bcl-2 陽性の腫瘍細胞の数は Bcl-xL 陽性のそれよりも多い傾向が認められた。また、Ki-67 陽性細胞数は良性型では少なく、退形成型では多かった（良性型 0.8 - 1.8%：、退形成型：3.2 - 61.6%）。

大脳膠腫症（Fig. 1-3）は星状膠細胞に類似の細胞が既存の組織構築をほとんど破壊せず、広範な浸潤性を示す腫瘍とされている。今回の結果から GFAP、Nestin、Olig2、Class III β -tubulin、Doublecortin、Cytokeratin AE1/AE3 陽性の細胞が様々な割合で混在しており、極めて多彩な細胞より構成する腫瘍であることが判明した。全症例において、腫瘍巣内には多数の GFAP 陽性の星状膠細胞、Olig2 陽性の稀突起膠細胞および Iba1 陽性の小膠細胞が認められた。腫瘍の本体と考えられる小型多形細胞は GFAP ないし Iba1 には陰性であるが、Nestin、Olig2、Class III β -tubulin、Doublecortin に陽性であり、多彩な分化能を有していることが明らかになった。病巣内には Neurofilament 陽性の神経突起が散見されたものの、上記の小型多形細胞は Neurofilament には陰性であった。また、Bcl-2 および Bcl-xL に陽性の腫瘍細胞数は症例によって異なるが、他の神経上皮性腫瘍と比較して少ない傾向があった。EGFR、c-erbB2、pERK1/2 および pAkt に陽性の腫瘍細胞は認められなかった。Ki-67 陽性細胞数は少なかった（0.2 - 2.3%）。

脈絡叢性腫瘍では、多数の腫瘍細胞が Cytokeratin AE1/AE3 および Cytokeratin 18 に陽性であり、一部の腫瘍細胞が巣状に GFAP に陽性であったが、いずれの腫瘍細胞も Nestin、Olig2、Class III β -tubulin、Doublecortin には陰性であった。腫瘍内の全ての腫瘍細胞が Bcl-2

および Bcl-xL に陽性であったが、EGFR、c-erbB2、pERK1/2 および pAkt には陰性であった。

Ki-67 陽性細胞数は少なかった (0.7 - 4.2%)。

原始神経外胚葉性腫瘍 (PNET) は極めて多彩な分化を示す腫瘍細胞より構成されており、GFAP、Nestin、Olig2、Class III β -tubulin、Doublecortin および Neurofilament に陽性の腫瘍細胞が様々な割合で認められたが、CytokeratinAE1/AE3 および Cytokeratin18 には陰性であった。全症例で EGFR および c-erbB2 陽性の腫瘍細胞が認められ、4 例中 2 例においては pERK1/2 および pAkt に陽性の腫瘍細胞も認められた。また、腫瘍細胞の大部分は Bcl-2 および Bcl-xL にも陽性であった。Ki-67 陽性細胞数は他の神経上皮性腫瘍と比較すると多かった (12.3 - 25.8%)。

髄芽腫 (小脳 PNET) (Fig. 1-4) は 1 例のみ認められ、PNET と同様に、極めて多彩な分化能を有する腫瘍細胞により構成されていた。腫瘍細胞は主に Class III β -tubulin および Doublecortin に陽性であったが、GFAP、Nestin、Olig2 および Neurofilament に陽性の腫瘍細胞も様々な割合で認められた。Cytokeratin AE1/AE3 および Cytokeratin 18 には陰性であった。腫瘍細胞の大部分は Bcl-2 および Bcl-xL に陽性であったが、EGFR、c-erbB2、pERK1/2 および pAkt には陰性であった。Ki-67 陽性細胞数は 18.2% であった。

神経細胞腫は 1 例のみ認められた。腫瘍細胞は Class III β -tubulin に陽性で、GFAP、Nestin、Olig2、Doublecortin および Neurofilament には陰性であった。また、腫瘍細胞の大部分は Bcl-2 および Bcl-xL に陽性であったが、EGFR、c-erbB2、pERK1/2 および pAkt には陰性であった。Ki-67 陽性細胞数は 1.2% であった。

神経芽腫 (Fig. 1-5) ではほとんどの腫瘍細胞が Class III β -tubulin および Doublecortin に陽性であったが、GFAP、Nestin、Olig2 および Neurofilament には陰性であった。また、大部分の腫瘍細胞が Bcl-2 および Bcl-xL に陽性であった。EGFR、c-erbB2 および pAkt には陰性であったが、全ての症例で pERK1/2 陽性細胞が多数認められた。Ki-67 陽性細胞数は比較的多かった (10.3 - 14.8%)。

【多変量解析】

イヌの神経上皮性腫瘍について各種マーカーの発現に基づく階層クラスター解析を行った際のデンドログラムを Fig. 1-6 に示した。その結果、イヌの神経上皮性腫瘍は A 群（脈絡叢性腫瘍）、B 群（大脳膠腫症）C 群（星状膠細胞性腫瘍）、D 群（神経細胞腫、神経芽腫、髄芽腫）および E 群（稀突起膠細胞性腫瘍、原始神経外胚葉性腫瘍）の 5 つのクラスターに分類された。

考察

本研究では、イヌの神経上皮性腫瘍 30 例について、それぞれの腫瘍を構成する腫瘍細胞の分化傾向や細胞増殖を調節する 15 種のマーカーの発現を検討し、その結果に基づいて階層クラスター解析を行い、デンドログラムを作成した。その結果、イヌの神経上皮性腫瘍は A 群（脈絡叢性腫瘍）、B 群（大脳膠腫症）C 群（星状膠細胞性腫瘍）、D 群（神経細胞腫、神経芽腫、髄芽腫）、E 群（稀突起膠細胞性腫瘍、原始神経外胚葉性腫瘍 (PNETs)）の 5 つのクラスターに分類されることが判明した。

A 群に分類された脈絡叢性腫瘍は、脈絡叢の構造によく似た組織構築を示す脳室内腫瘍である。腫瘍細胞は立方上皮の形態を示し、上皮系細胞マーカーの CytokeratinAE1/AE3 および Cytokeratin18 に陽性であることから、腺上皮への単一な分化を示す腫瘍であると考えられる。また、一部の腫瘍細胞で GFAP の発現が認められたが、これは腫瘍細胞が脳室上蓋細胞への分化を示すためと考えられている[9,49]。脈絡叢性腫瘍はその特徴的な発生部位や組織形態から、他の神経上皮性腫瘍との鑑別は容易であると考えられる。

B 群に分類された大脳膠腫症は、動物の神経系腫瘍の WHO 分類では、大脳の広範囲にび漫性の浸潤性増殖を示す由来不明の膠細胞性腫瘍と分類されていた[33]。しかし本研究により、星状膠細胞、稀突起膠細胞および小膠細胞の反応性増生に加えて、グリア前駆細胞マーカーの Nestin、稀突起膠細胞マーカーの Olig2、神経細胞系マーカーの Class III β -tubulin および Doublecortin を発現し多彩な分化能を有する小型多形細胞が、病巣内でび漫性に増殖していることが明らかになった。そのため、大脳膠腫症は、神経幹細胞の性質を有する細胞の脳内浸潤と様々な膠細胞の反応性増生を特徴とする極めて特殊な神経上皮性腫瘍であると推察された。

C 群に分類された星状膠細胞性腫瘍は、星状膠細胞マーカーの GFAP とグリア前駆細胞マーカーの Nestin を発現する星状膠細胞様形態の腫瘍細胞から構成されていた。一部

の腫瘍細胞が Olig2 や Class III β -tubulin を発現していたが、星状膠細胞への比較的均一な分化方向を示す神経上皮性腫瘍であると推察された。また、神経組織への浸潤を示す病巣辺縁部の腫瘍細胞には、神経芽細胞の脳内移行に関与する Doublecortin が強く発現していた。ヒトの星状膠細胞性腫瘍においても辺縁部の腫瘍細胞でのみ Doublecortin の発現が認められている[13,41]。これらの腫瘍細胞は高い運動能による浸潤性を有していると報告されているため、Doublecortin の発現は星状膠細胞性腫瘍において脳実質内浸潤の指標となる可能性が高い。

D 群に分類された神経細胞腫、神経芽腫、髄芽腫は、いずれも神経細胞への分化傾向が強い神経上皮性腫瘍であることが明らかになった。分化・成熟が十分な大型神経細胞様の腫瘍細胞から構成される神経細胞腫、および類円形核と淡明な細胞質を有する小型細胞から構成される神経芽腫では、ともに成熟神経細胞マーカーである Neurofilament の発現は認められないものの、分化初期の神経細胞マーカーである Class III β -tubulin の発現が認められた。しかし、神経細胞腫では胎子期の神経芽細胞に発現する Doublecortin に陽性の腫瘍細胞がみられない一方で、神経芽腫では多くの腫瘍細胞が陽性であったことから、どちらの腫瘍も神経細胞への分化を示すものの、神経芽腫の方がより未熟であると考えられる。髄芽腫は小脳に発生する多方向性の分化能を有する神経上皮性腫瘍で、ヒトでは神経細胞への分化傾向があると報告されている[32,52,60]。本研究では、多くの髄芽腫細胞が神経細胞系マーカーの Class III β -tubulin および Doublecortin に陽性であったが、神経幹細胞ないしグリア前駆細胞マーカーである Nestin や稀突起膠細胞マーカーである Olig2 にも陽性を示す細胞が認められた。これらの所見は神経細胞への分化のみではなく、グリア細胞への分化も示唆するものであると考えられる。

E 群に分類された稀突起膠細胞性腫瘍は WHO 分類では膠細胞性腫瘍に分類されているが、本研究により稀突起膠細胞マーカーである Olig2 のみならず、神経細胞系マーカーである Class III β -tubulin や Doublecortin、神経幹細胞ないしグリア前駆細胞マーカーである

Nestin も発現していることが明らかになった。実際にヒトの稀突起膠細胞性腫瘍では神経細胞への分化を示すエビデンスが遺伝子レベルで得られており[15]、本研究における免疫染色の所見はこれらの報告を支持するものと考えられる。また、GFAP 陽性の細胞も混在して認められたが、これらは形態的に反応性の星状膠細胞であると考えられた。以上のことから、PNETs を含めた E 群の腫瘍は細胞形態や発生部位などの相違はあるものの、いずれも神経幹細胞の性質を有する神経上皮性腫瘍であることが示された。

次いで、イヌの神経上皮性腫瘍での細胞増殖に関連するシグナル伝達系の関与を評価する目的で、ヒトの星状膠細胞性腫瘍で異常が報告されているチロシンキナーゼ受容体の Epidermal growth factor receptor (EGFR) と c-erbB2 の発現[4,23,45]、およびその下流因子である PI3K-Akt シグナルと RAS-ERK (MAPK) シグナルの活性化状態を検索した。その結果、星状膠細胞性腫瘍と一部の PNETs に関しては、これらのシグナル経路の異常が腫瘍発生に関与している可能性が考えられた。また、神経系におけるアポトーシス抑制分子である Bcl-2 と Bcl-xL についても検索したところ、ほとんどの腫瘍において発現が確認されたことから、多くのイヌの神経上皮性腫瘍で、Bcl-2 と Bcl-xL が相補的に腫瘍細胞のアポトーシスを抑制し、結果として腫瘍細胞の生存・増殖を助長していると考えられた。

本章の研究により、イヌの神経上皮性腫瘍の分類と組織発生に関して、新しい知見を得ることができた。とくに、由来不明の膠細胞性腫瘍とされていた大脳膠腫症は様々な膠細胞の反応性増生を伴う神経幹細胞の脳内浸潤亢進を特徴とする疾患であること、これまで形態学的に稀突起膠細胞性腫瘍と診断されていた腫瘍は多彩な分化能を有する神経幹細胞の腫瘍であることが明らかになったことは着目すべき点である。今後、神経幹細胞や前駆細胞に関する新たな知見の集積や新規マーカーの開発により、神経上皮性腫瘍に関する更なる情報が得られれば、従来の神経上皮性腫瘍の分類や病態解釈が大きく修正される可能性があると考えられた。

要約

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

症例				腫瘍発生部位		病理組織学的診断	腫瘍細胞形態
case	犬種	性別	年齢				
1	シーズー	♂	9歳	右側頭葉	星状膠細胞腫 (低グレード)	細胞突起のよく発達した線維性細胞	
2	フレンチブルドッグ	♂	9歳2ヶ月齢	左側頭葉	星状膠細胞腫 (中グレード)	短い細胞突起を有する原形質性細胞	
3	チワワ	♂	2歳	右頭頂葉	星状膠細胞腫 (中グレード)	豊富な好酸性細胞質を有する肥胖性細胞	
4	雑種	♂	9歳	右小脳	星状膠細胞腫 (中グレード)	血管周囲ロゼットを形成し、多極性の細胞突起を有する星芒状細胞	
5	フレンチブルドッグ	♂	7歳4ヶ月齢	右頭頂葉	星状膠細胞腫 (高グレード)	壊死巣周囲で核の柵状配列を伴う高度な多形性を呈する小型細胞	
6	ボクサー	♂	7歳	右前頭葉	稀突起膠細胞腫	蜂巣状構造を呈する核周囲に明量を有する細胞	
7	雑種	♂	12歳	側脳室	稀突起膠細胞腫	蜂巣状構造を呈する核周囲に明量を有する細胞	
8	ボクサー	♀	8歳	左線条体	退形成性稀突起膠細胞腫	蜂巣状構造を呈する核周囲に明量を有する細胞	
9	ラブラドル・レトリバー	♀	13歳	側脳室	退形成性稀突起膠細胞腫	蜂巣状構造を呈し、異型性が強い核の周囲に明量を有する細胞	
10	ラブラドル・レトリバー	♂	10歳	側脳室	退形成性稀突起膠細胞腫	細胞突起に乏しい肥胖性細胞に類似した小型細胞	
11	フレンチブルドッグ	♂	8歳8ヶ月齢	右前頭葉	退形成性稀突起膠細胞腫	蜂巣状構造を呈し、異型性が強い核の周囲に明量を有する細胞	
12	ゴールデン・レトリバー	♀	11歳	側脳室	退形成性稀突起膠細胞腫	case 9 と case 10 の細胞が混在	
13	ヨークシャー・テリア	♂	6歳	左大脳～脊髄	大脳膠腫症	未分化な小型多形細胞の増殖に様々な膠細胞の増生が混在	
14	ラブラドル・レトリバー	♂	8歳	左大脳～脳幹	大脳膠腫症	未分化な小型多形細胞の増殖に様々な膠細胞の増生が混在	
15	ボクサー	♀	11歳	左大脳	大脳膠腫症	未分化な小型多形細胞の増殖に様々な膠細胞の増生が混在	
16	ブルドッグ	♂	13歳	視床～延髄	大脳膠腫症	未分化な小型多形細胞の増殖に様々な膠細胞の増生が混在	
17	ゴールデン・レトリバー	♂	7歳9ヶ月齢	左前頭葉	神経細胞腫	大型神経細胞に類似した細胞	
18	ブルドッグ	♂	7歳7ヶ月齢	左側脳室	神経芽腫	Homer-Wright型ロゼット形成を伴う核周囲に明量を有する細胞	
19	ブルドッグ	♂	7歳	左前頭葉	神経芽腫	Homer-Wright型ロゼット形成を伴う核周囲に明量を有する細胞	
20	柴犬	♂	7歳7ヶ月齢	右前頭葉	神経芽腫	Homer-Wright型ロゼット形成を伴う核周囲に明量を有する細胞	
21	ボストン・テリア	♂	13歳	左頭頂葉	原始神経外胚葉性腫瘍	Homer-Wright型ロゼットや血管周囲ロゼット形成を伴う小型多形細胞	
22	雑種	♀	8歳	脊髄	原始神経外胚葉性腫瘍	Homer-Wright型ロゼットや血管周囲ロゼット形成を伴う小型多形細胞	
23	ゴールデン・レトリバー	♀	6歳11ヶ月齢	左前頭葉	原始神経外胚葉性腫瘍	Homer-Wright型ロゼットや血管周囲ロゼット形成を伴う小型多形細胞	
24	雑種	♂	13歳	右大脳	原始神経外胚葉性腫瘍	Homer-Wright型ロゼットや血管周囲ロゼット形成を伴う小型多形細胞	
25	雑種	♀	5歳	小脳	髄芽腫	Homer-Wright型ロゼットや血管周囲ロゼット形成を伴う小型多形細胞	
26	ゴールデン・レトリバー	♀	5歳6ヶ月齢	第三脳室	脈絡叢乳頭腫	脈絡叢に類似した組織形態を呈する単層の立方上皮細胞	
27	トイプードル	♀	7歳	第四脳室	脈絡叢癌	脳実質への浸潤性を示す重層の立方上皮細胞	
28	柴犬	♀	12歳10ヶ月齢	第四脳室	脈絡叢癌	脳実質への浸潤性を示す重層の立方上皮細胞	
29	ゴールデン・レトリバー	♂	5歳	側脳室	脈絡叢癌	脳実質への浸潤性を示す重層の立方上皮細胞	
30	グレート・ピレネーズ	♂	6歳	脊髄 (転移病巣)	脈絡叢癌	脊髄実質への浸潤性を示す重層の立方上皮細胞	

Table 1-1. 検索に用いた症例の腫瘍形成部位、病理組織学的診断、腫瘍細胞形態。

抗体	希釈倍率	販売元	神経系における認識細胞
細胞分化マーカー			
GFAP	1:400	Dako Japan ¹⁾	休止型および活性化型星状膠細胞
Nestin	1:20	Immuno-Biological Laboratories ²⁾	神経幹細胞～グリア前駆細胞
Neurofilament	Ready-to-use	Dako Japan	神経細胞
Class III β -tubulin	1:1000	Promega Corporation ³⁾	神経前駆細胞～神経細胞
Doublecortin	1:200	Santa Cruz Biotechnology ⁴⁾	神経前駆細胞
Cytokeratin AE1/AE3	1:50	Dako Japan	上皮細胞
Cytokeratin 18	Ready-to-use	PROGEN Biotechnik ⁵⁾	腺上皮細胞
Iba1	1:250	Wako Pure Chemical Industries ⁶⁾	休止型および活性化型小膠細胞
細胞増殖関連マーカー			
EGFR	1:200	Abcam ⁷⁾	なし
c-erbB-2	1:200	Dako Japan	なし
p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	1:100	Cell Signaling Technology ⁸⁾	活性化型星状膠細胞
p-Akt (Ser473)	1:50	Cell Signaling Technology	なし
Bcl-2	1:50	Santa Cruz Biotechnology	神経細胞、脈絡叢、脳室上衣、反応性星状膠細胞
Bcl-xL	Ready-to-use	Genetex ⁹⁾	神経細胞、脈絡叢、脳室上衣、反応性星状膠細胞
Ki-67	Ready-to-use	Dako Japan	増殖細胞

¹⁾Dako Japan, Kyoto, Japan, ²⁾Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japan, ³⁾Promega Corporation, Madison, WI,

⁴⁾Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ⁵⁾PROGEN Biotechnik, Frankfurt, Germany,

⁶⁾Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan, Abcam, Tokyo, Japan, ⁸⁾Cell Signaling Technology Japan, Tokyo, Japan,

⁹⁾Genetex Inc., Irvine, TX, Covance, Dallas, CA

Table 1-2. 免疫染色に使用した一次抗体。

case	病理組織学的診断	GFAP	Nestin	Olig2	Neurofilament	Class III β-tubulin	Doublecortin	Cytokeratin AE1/AE3	Cytokeratin 18	Iba1
1	星状膠細胞腫 (低グレード)	68.3*	4.2	0	0	0	1.2	0	0	検索せず
2	星状膠細胞腫 (中グレード)	28.7	69.2	2.7	0	4.1	2.6	3.1	0	検索せず
3	星状膠細胞腫 (中グレード)	31.7	41.2	0	0	0	4.2	0	0	検索せず
4	星状膠細胞腫 (中グレード)	96.5	52.0	6.5	0	0	1.9	0.9	0	検索せず
5	星状膠細胞腫 (高グレード)	14.6	73.1	7.4	0	0	3.5	2.2	0	検索せず
6	稀突起膠細胞腫	6.4	8.2	92.5	0	0	71.2	0	0	検索せず
7	稀突起膠細胞腫	5.1	6.3	93.2	0	0	93.3	0	0	検索せず
8	退形成性稀突起膠細胞腫	8.6	13.3	85.7	0	0	94.7	0	0	検索せず
9	退形成性稀突起膠細胞腫	6.0	60.1	90.9	0	4.8	91.2	0	0	検索せず
10	退形成性稀突起膠細胞腫	3.2	71.2	93.6	0	44.7	88.6	0	0	検索せず
11	退形成性稀突起膠細胞腫	5.8	22.3	72.4	0	13.2	78.6	0	0	検索せず
12	退形成性稀突起膠細胞腫	1.3	11.9	79.1	0	4.1	83.0	0	0	検索せず
13	大脳膠腫症	20.1	6.2	31.4	0	6.3	5.2	10.2	0	62.1
14	大脳膠腫症	31.2	8.4	8.8	0	9.4	6.9	0.4	0	51.9
15	大脳膠腫症	11.6	5.9	52.1	0	1.8	34.2	0.9	0	46.6
16	大脳膠腫症	15.9	12.6	42.1	0	11.0	14.2	4.4	0	18.1
17	神経細胞腫	0	0	0	0	76.5	0	0	0	検索せず
18	神経芽腫	0	0	0	0	97.2	61.2	0	0	検索せず
19	神経芽腫	0	0	0	0	94.0	54.4	0	0	検索せず
20	神経芽腫	0	0	0	0	91.2	39.3	0	0	検索せず
21	原始神経外胚葉性腫瘍	8.2	1.3	54.2	0.6	48.3	97.7	0	0	検索せず
22	原始神経外胚葉性腫瘍	26.2	31.2	70.6	0	42.5	86.5	0	0	検索せず
23	原始神経外胚葉性腫瘍	41.3	56.5	61.2	0	38.1	69.2	0	0	検索せず
24	原始神経外胚葉性腫瘍	36.7	14.9	79.0	0	64.3	41.1	0	0	検索せず
25	髄芽腫	3.1	34.5	76.5	1.1	96.2	16.8	0	0	検索せず
26	脈絡叢乳頭腫	0.3	0	0	0	0	0	54.2	76.3	検索せず
27	脈絡叢癌	1.3	0	0	0	0	0	12	44.6	検索せず
28	脈絡叢癌	6.6	0	0	0	0	0	51.2	70.9	検索せず
29	脈絡叢癌	4.1	0	0	0	0	0	34.1	68.2	検索せず
30	脈絡叢癌	2.0	0	0	0	0	0	59.9	89.4	検索せず

*: 陽性細胞率(%)

Table 1-3. イヌの神経上皮性腫瘍における細胞分化マーカー陽性細胞の割合。

case	病理組織学的診断	EGFR	c-erbB2	pERK1/2	pAkt	Bcl-2	Bcl-xL	Ki-67
1	星状膠細胞腫（低グレード）	0*	0	2.6	1.9	0	67.2	1.4
2	星状膠細胞腫（中グレード）	45.0	21.1	48.9	29.1	48.2	85.7	8.2
3	星状膠細胞腫（中グレード）	26.5	6.7	25.6	6.5	36.9	95.5	13.5
4	星状膠細胞腫（中グレード）	78.2	34.5	86.5	14.2	0	99.2	18.3
5	星状膠細胞腫（高グレード）	56.7	14.8	89.7	10.5	67.3	92.1	39.9
6	稀突起膠細胞腫	0	0	0	0	87.2	34.2	1.8
7	稀突起膠細胞腫	0	0	0	0	79.0	10.3	0.8
8	退形成性稀突起膠細胞腫	0	0	0	0	45.7	7.8	3.2
9	退形成性稀突起膠細胞腫	0	0	0	0	92.1	76.3	20.4
10	退形成性稀突起膠細胞腫	0	0	0	0	97.9	56.2	61.6
11	退形成性稀突起膠細胞腫	0	0	83.2	0	87.6	81.3	34.1
12	退形成性稀突起膠細胞腫	0	0	69.7	13.2	91.2	67.1	25.1
13	大脳膠腫症	0	0	0	0	8.4	2.4	0.2
14	大脳膠腫症	0	0	0	0	11.0	8.9	0.9
15	大脳膠腫症	0	0	0	0	19.9	14.4	1.6
16	大脳膠腫症	0	0	0	0	24.1	11.9	2.3
17	神経細胞腫	0	0	0	0	93.1	97.3	1.2
18	神経芽腫	0	0	45.6	0	89.6	78.4	10.3
19	神経芽腫	0	0	32.3	0	98.2	72.5	14.8
20	神経芽腫	0	0	38.0	0	91.1	88.4	13.1
21	原始神経外胚葉性腫瘍	80.6	1.1	77.2	16.2	96.6	98.8	12.3
22	原始神経外胚葉性腫瘍	24.2	31.4	58.6	41.9	89.8	96.0	20.1
23	原始神経外胚葉性腫瘍	11.4	23.4	0	0	93.4	94.1	17.7
24	原始神経外胚葉性腫瘍	2.3	1.9	0	0	97.8	92.5	25.8
25	髄芽腫	0	0	0	0	78.5	87.8	18.2
26	脈絡叢乳頭腫	2.3	0	0	0	100	100	0.7
27	脈絡叢癌	7.4	0	0	0	100	100	3.6
28	脈絡叢癌	31.2	0	0	0	100	100	1.5
29	脈絡叢癌	21.0	0	0	0	100	100	4.2
30	脈絡叢癌	12.3	0	0	0	100	100	2.9

*: 陽性細胞率(%)

Table 1-4. イヌの神経上皮性腫瘍における細胞増殖関連マーカー陽性細胞の割合。

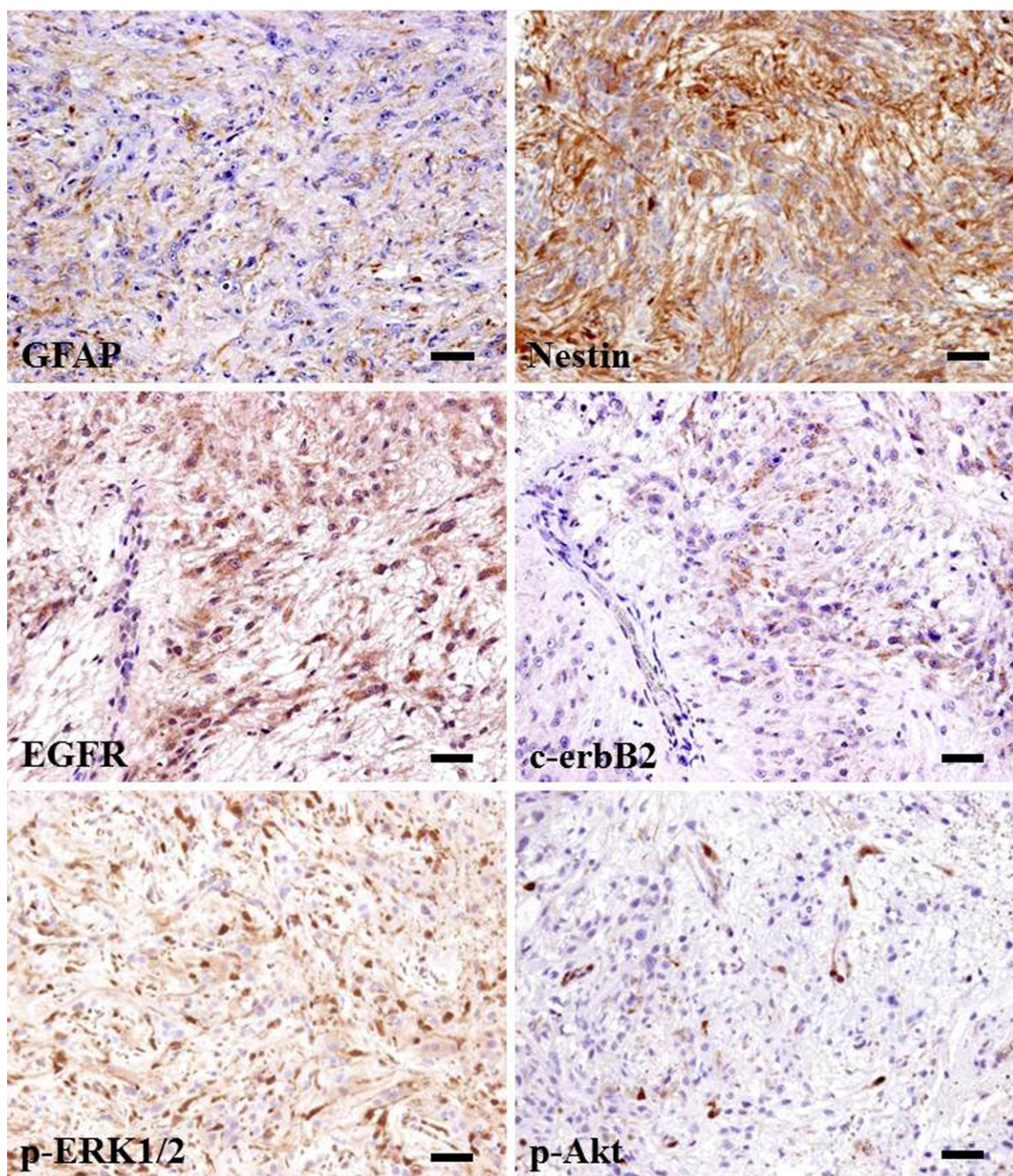


Fig.1-1. 中グレード星状膠細胞腫の免疫染色 (case 2)。Scale bar = 30mm。

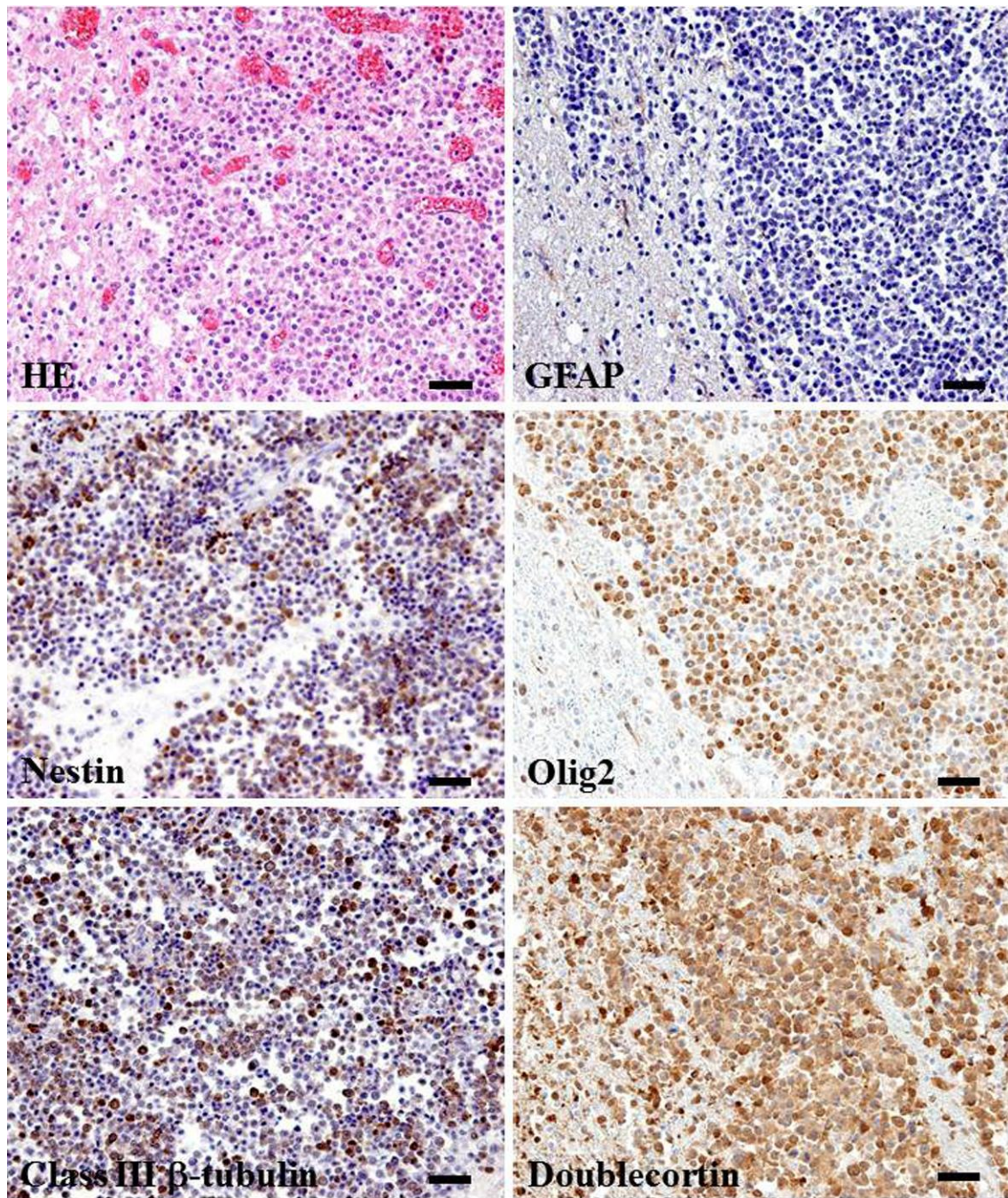


Fig.1-2. 退形成性稀突起膠細胞腫の病理組織および免疫染色 (case 10)。

Scale bar = 30mm。

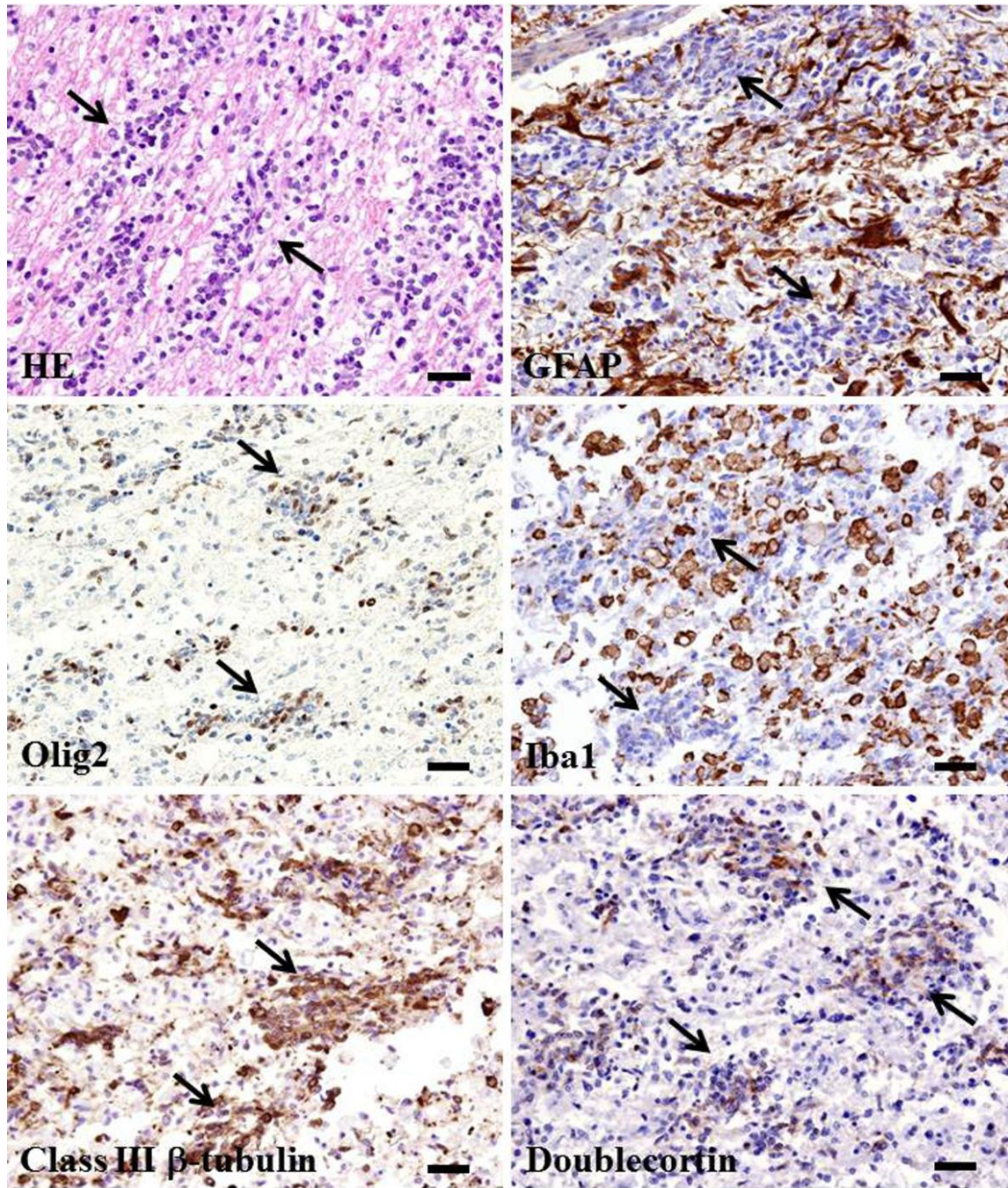


Fig.1-3. 大脳膠腫症の病理組織および免疫染色 (case 13)。矢印は小型多形細胞の小集簇を示す。これらの細胞は Olig2、Class III β -tubulin、Doublecortin に陽性であるが、GFAP、Iba1 には陰性である。Scale bar = 30mm。

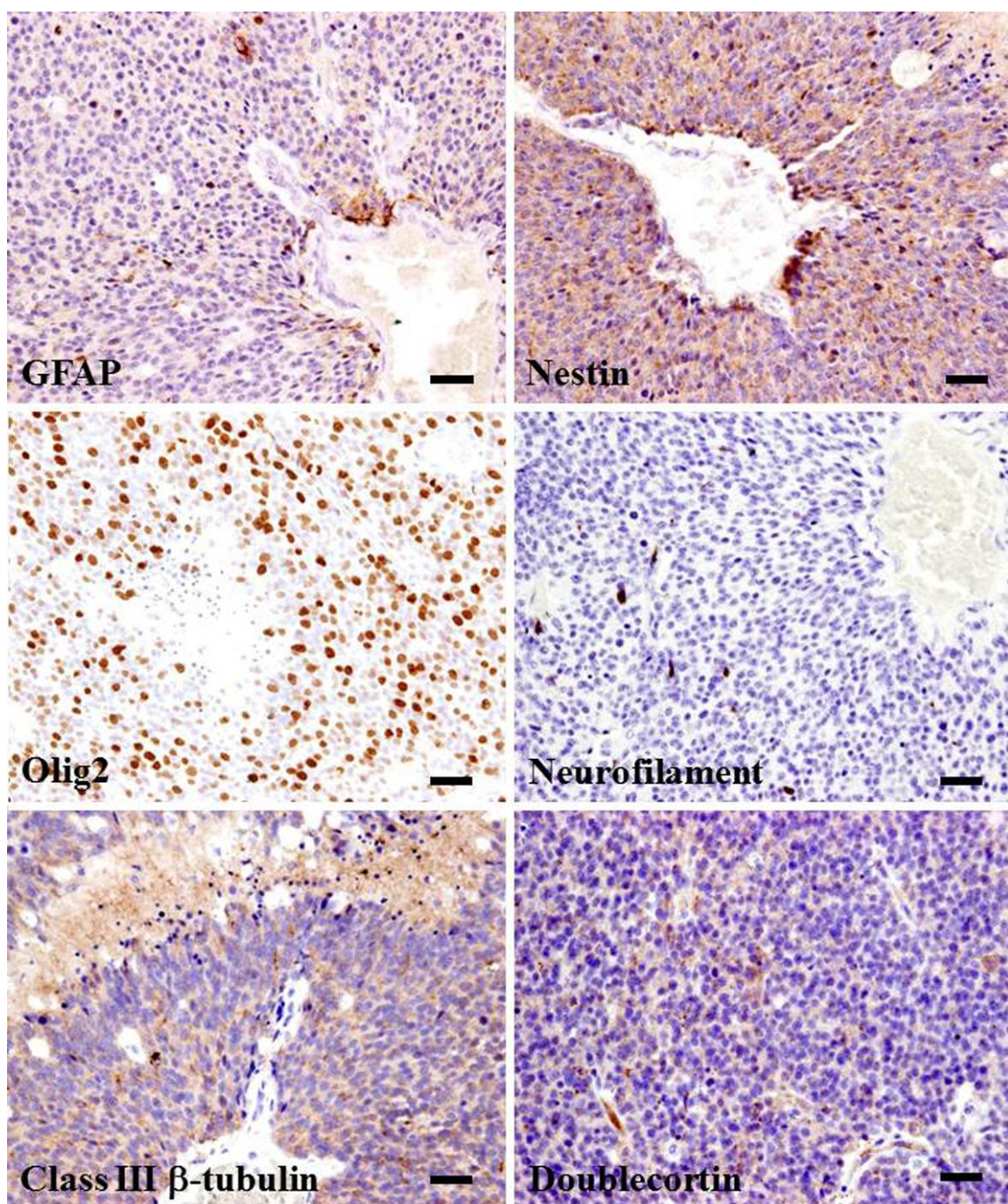


Fig.1-4. 髄芽腫の免疫染色 (case 25)。Scale bar = 30mm。

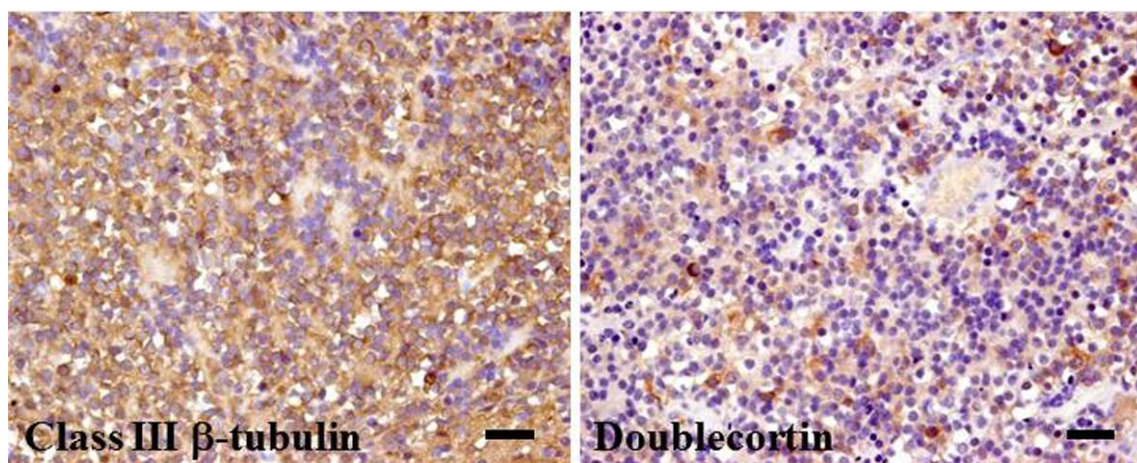


Fig.1-5. 神経芽腫の免疫染色 (case 19)。Scale bar = 30mm。

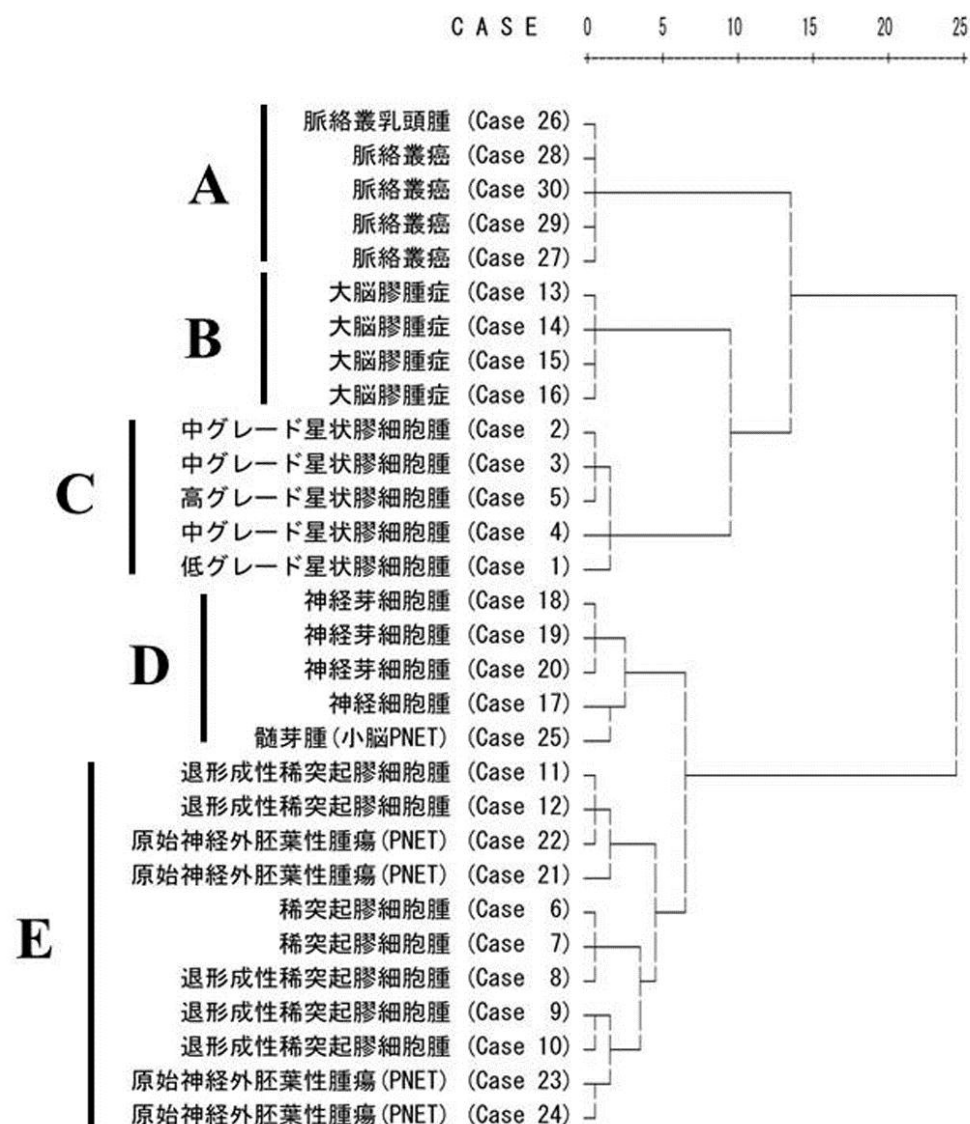


Fig.1-6. イヌの神経上皮性腫瘍における各種マーカーの発現について階層クラスタ解析を行った結果。

第2章

イヌの髄膜腫の分類および予後因子に関する病理学的研究

序

髄膜腫は髄膜組織、特にクモ膜上皮細胞から発生する腫瘍であり、イヌの原発性頭蓋内腫瘍の約40%を占める[32,60]。髄膜組織が存在する脳表層部のいずれの部位からも発生しうるが、イヌでは小脳テントおよび大脳鎌が好発部位とされている。動物の神経系腫瘍のWHO分類では、髄膜腫をその生物学的挙動の相違から大きく通常型（良性型）と退形成型（悪性型）に分類している[33]。通常型は細胞の形態、配列、細胞の産物、間質の状態などの組織形態に基づいて髄膜上皮型、線維型（線維芽細胞様）、移行型（混合型）、砂粒体型、血管腫型、乳頭型、顆粒細胞型、粘液型など8つに細分類されているが、いずれも緩慢な圧迫性増殖を示すとされ、神経組織内への浸潤性も乏しい。これに対して退形成型は、異型性・多形性の高い腫瘍細胞が神経組織に浸潤性増殖するものである[33,60]。

髄膜腫の診断に際し、通常型と退形成型の髄膜腫を鑑別することは、再発や転移など予後の予測において非常に重要である。しかし手術材料の組織検索では、摘出範囲の制限等により、その鑑別のために最も重要な腫瘍細胞の神経組織内浸潤を確認できない場合もある。このため免疫組織化学的手法などにより、退形成型の髄膜腫に特異的に発現するマーカーの研究が必要である。

ヒトのクモ膜上皮細胞は、一般的な上皮系細胞が有する細胞接着分子のEpithelial cadherin (E-cadherin) を発現しており、細胞膜において β -catenin と共に複合体を形成している[2,56]。様々な原因によりE-cadherinの発現が減弱すると、E-cadherin と β -cateninの複合体が解除され、 β -cateninが細胞質や核内へ移行することが知られているが、ヒトの髄膜

腫細胞においても同様の現象が報告されている[2,18,19,40,67]。さらに胃癌、大腸癌、肝臓癌や食道癌においては、細胞膜ではなく細胞質に高レベルの β -catenin が発現しており、これらが核内へと移行して Tcf/Lef 転写因子群と会合する結果、細胞増殖を亢進し、分化を阻害する[40,67]。また、E-cadherin の発現が減弱した際、代償性に Neural-cadherin (N-cadherin) 分子が発現するようになる cadherin-switch 現象も同時に起こることが知られている[20,69]。これにより上皮系組織への親和性を失い、間葉系組織への親和性を増すことも、癌細胞の浸潤や転移の一因になると考えられている[21,69]。

第 1 章で述べたように、Doublecortin は胎子期の神経芽細胞の脳内移行に関わる微小管関連タンパクである[13,41]。2005 年にヒトの星状膠細胞性腫瘍および退形成型髄膜腫の神経組織内浸潤部の腫瘍細胞で強く発現していることが報告されている[13,41]。第 1 章でもイヌの星状膠細胞性腫瘍の辺縁部において神経組織内へ浸潤している腫瘍細胞が陽性であることが明らかになった。これらの事実を鑑みると、Doublecortin は神経芽細胞のマーカーのみならず、神経組織内への浸潤性を示す細胞の特異的なマーカーとなる可能性が高いと考えられ、イヌの髄膜腫においても通常型と退形成型を判別できるマーカーになると予想される。

本章では、通常型と退形成型の髄膜腫を区別できる特異的なマーカーを探索するため、収集したイヌの髄膜腫 55 例について、細胞接着分子マーカー (E-cadherin、N-cadherin、 β -catenin)、浸潤細胞マーカー (Doublecortin) および増殖細胞マーカー (Ki-67) [51]を用いて通常型と退形成型における各マーカーの発現率を免疫組織化学的に比較した。加えて cadherin 分子の発現変化および β -catenin の核内移行に着目し、退形成型髄膜腫の神経組織内浸潤メカニズムについて考察した。

材料と方法

【症例】

2005 年から 2009 年の 5 年間に、死後剖検により採取されたイヌの髄膜腫 13 症例、および生前に生検組織として外科的に採取された同腫瘍 42 症例の計 55 症例を用いた。55 例の組織型は、髄膜上皮型 21 例、線維型（線維芽細胞様）4 例、移行型（混合型）10 例、砂粒体型 3 例、血管腫型 1 例、顆粒細胞型 2 例および退形成型 14 例であった。case 1~55 の個体情報はまとめて Table 2-1 に示す。上記髄膜腫組織は 10% 中性緩衝ホルマリンで固定後、定法に従い 4 μ m の厚さでパラフィン切片を作製し、Haematoxylin and eosin (HE) 染色を施し、動物の神経系腫瘍の WHO 分類に従って上述のように診断した[33]。

【免疫染色】

免疫染色は Labeled streptavidin-biotinylated antibody 法を用いて実施した。一次抗体として用いた抗体を Table 2-2 に示した。脱パラフィン後、抗 E-cadherin 抗体、抗 N-cadherin 抗体、抗 β -catenin 抗体との反応に使用する切片は Target retrieval solution, pH9.0 (Dako Japan)、抗 Doublecortin 抗体、抗 Ki-67抗体との反応に使用する切片は 10mM citrate buffer (pH6.0) をそれぞれ使用して 120 $^{\circ}$ C、10 分間のオートクレーブにより抗原賦活化を行った。その後、全ての切片を 1%過酸化水素・メタノール溶液を用いて室温で 30 分間処理して内因性ペルオキシダーゼの不活化を行い、8% skim milk / Tris-buffered saline で 37 $^{\circ}$ C40 分間処理して非特異反応を抑制した後、一次抗体と 4 $^{\circ}$ C一晩で反応させた。二次抗体は Ig G (1:400, KPL) を使用し、37 $^{\circ}$ Cで 40 分間反応させた後、Horse-radish peroxidase-conjugated streptavidin (1:300, Dako Japan) を室温で 30 分間処理することで標識させた。発色には DAB (Dojindo Laboratories) と H₂O₂ (Wako Pure Chemical Industries) を使用した。後染色にはヘマトキシリンを用いた。

免疫染色後、腫瘍組織標本の強拡大（400 倍）5 視野を無作為に選び、1 視野中の

全細胞数および陽性細胞数をカウントし、陽性細胞の割合を算出した。Doublecortin 陽性細胞については、切片中に神経組織が含まれる場合は神経組織に接する腫瘍辺縁部を、含まれてない場合は他のマーカーの場合と同様に無作為に選択した視野についてカウントした。

【統計解析】

統計解析には SPSS version 15.0 を使用し、通常型と退形成型の間の陽性細胞数の有意差をカイ二乗検定により検討した。次に線型判別解析を行い、通常型と退形成型を区別する際の各種マーカーの有用性を評価した。さらに、ピアソンの相関係数を算出することで E-cadherin ないし N-cadherin の発現率と他マーカーの発現率との相関を検討した。使用したパラメーターは E-cadherin、N-cadherin、核内移行 β -catenin、Doublecortin、Ki-67 の発現率の 5 つである。

結果

【病理組織学的診断】

case 1~55 における腫瘍発生部位、組織型、画像による浸潤性評価、組織による浸潤性評価をまとめて Table 2-1 に示す。組織学的に浸潤性を確認した症例は 55 例中 14 例 (25%) であった。その 14 例のうち、腫瘍細胞の神経組織内浸潤を認めた症例は 11 例、軟膜浸潤を認めた症例は 3 例で、Virchow-Robin 腔内播種を認めた症例はみられなかった。

【免疫染色】

まず、神経疾患のない 5 歳齢雄のビーグル犬からクモ膜組織を採取し、正常なクモ膜組織における E-cadherin、N-cadherin、 β -catenin の発現を確認した。その結果、E-cadherin はクモ膜上皮細胞の細胞膜に発現しているが、N-cadherin は発現しておらず、 β -catenin は細胞膜と細胞質に発現していることを確認した (Fig. 2-1)。また、Doublecortin および Ki-67 の発現は認められなかった。case 1~55 における各種マーカーについての免疫染色の結果を Table 2-3 に示す。

イヌの髄膜腫ではその組織型に関わらず、cadherin 分子のうち、E-cadherin のみを発現している症例は 55 例中 14 例 (22%) で、N-cadherin のみを発現している症例は 55 例中 24 例 (44%) であった (Fig. 2-1) が、E-cadherin と N-cadherin をともに発現している症例は 55 例中 17 例 (31%) であった。 β -catenin の細胞膜での発現は 55 例中 10 例 (18%) しか認められず、ほとんどの症例で細胞質に高レベルの発現が認められた。また、55 例中 26 例 (47%) で β -catenin の発現部位が核内へ移行していた。Doublecortin は神経組織への浸潤性を示す腫瘍細胞に特異的に発現しており (Fig. 2-2)、特に軟膜下の神経組織実質へ浸潤している腫瘍細胞では強く発現する傾向があった。Ki-67 陽性細胞の数は症例により様々で 0 – 18.1% であった。Fig. 2-3 は通常型と退形成型における各種マーカーの陽性細胞率の

範囲を、箱ひげ図で表したものである。また、顆粒細胞型髄膜腫は他の組織型の髄膜腫とは異なり、E-cadherin、N-cadherin ないし β -catenin のいずれの細胞接着分子の発現も認めなかった。

【統計解析】

核内移行 β -catenin、Doublecortin および Ki-67 の発現率は通常型よりも退形成型で有意に高かった。E-cadherin と N-cadherin の発現率については両型で有意差は認められなかった (Table 2-4)。

次いで、各種マーカーの発現状況が髄膜腫の組織学的悪性度の判定にどの程度有用なパラメーターとなるのか、線型判別解析を用いて評価した (Table 2-5)。その結果、イヌの髄膜腫において、核内移行 β -catenin、Doublecortin ないし Ki-67 の発現状況が単独で通常型と退形成型を区別できる確率はそれぞれ 73.6%、71.7%、77.4%であり、これらのマーカーは髄膜腫の組織学的悪性度の判定にある程度有用であると考えられた。一方で、E-cadherin および N-cadherin の発現は単独ではそれぞれ 42.4%、52.8%の確率でしか通常型と退形成型とを区別できなかった。E-cadherin、N-cadherin および核内移行 β -catenin の3つのパラメーターを組み合わせると線型判別解析を行ったところ、その確率は 73.6%で、核内移行 β -catenin 単独のそれとほぼ同等の確率であったが、E-cadherin、N-cadherin、核内移行 β -cateninに加えて Doublecortin、Ki-67 の全てのパラメーターを組み合わせると、確率は 84.9%にまで上昇し、さらに、単独でも高い確率を示した核内移行 β -catenin、Doublecortin および Ki-67 の3つのパラメーターを組み合わせた場合はその確率は 89.4%にまで上昇した。

Table 2-6 は、cadherin 分子の発現と他のマーカーの発現における相関を、ピアソンの相関係数により検討した結果である。E-cadherin と N-cadherin の間、E-cadherin と核内移行 β -catenin の間に有意な負の相関が認められた一方で、N-cadherin と核内移行 β -catenin の間、N-cadherin と Doublecortin の間、N-cadherin と Ki-67 の間には有意な正の相関が認められた。

考察

本研究により、イヌの髄膜腫において通常型（良性）および退形成型（悪性）を区別する際に有用と考えられる新たな知見を得ることができた。カイ二乗検定の結果、核内移行 β -catenin、Doublecortin および Ki-67 の発現率が退形成型では通常型よりも有意に高いことが判明し、線型判別解析によっても、これら 3 つのパラメーターは単独で使用しても髄膜腫の悪性度の判別にある程度の有用性を示すことが明らかになった。また、上記 3 つのパラメーターを組み合わせた際の線型判別解析では、さらに高い確率で両型を判別できることを明らかにした。一方で、E-cadherin および N-cadherin の発現率には通常型と退形成型の間で有意な差はなく、線型判別解析においても、両型を区別する際の有用なパラメーターにはなり得ないことが示唆された。

一般的に、クモ膜上皮細胞は E-cadherin や β -catenin 等の細胞接着分子を発現している[2,56]。E-cadherin は隣接細胞どうしでオリゴマーを形成し、細胞間結合を成立させる膜貫通タンパク質であり、介在タンパク群を介して actin 細胞骨格に連結されている[69]。

β -catenin は、 α -catenin や p120 とともに cadherin と actin 細胞骨格の間に機械的に連結する介在タンパク質として存在している[69]。上皮細胞において細胞膜から E-cadherin が消失すると、 β -catenin が放出され、核へと遊走して Tcf/Lef 転写因子群と会合し、それによって *Cyclin D1* や *Myc* といった細胞の成長や増殖に関与する重要な諸遺伝子の発現を誘導することが知られている[69]。さらに、E-cadherin をコードする *CDH1* 遺伝子がヒトの多くの髄膜腫でプロモーター領域のメチル化により、その発現が抑制されていることも報告されている[36,42,50]。本研究では、メチル化に関する検索は行っていないものの、多数の症例で

E-cadherin の発現が減弱していた。さらに、E-cadherin の発現と β -catenin の核内移行には有意な負の相関が認められたことから、イヌでもヒトの髄膜腫と同様 *CDH1* 遺伝子のメチル化により E-cadherin の発現が抑制され、 β -catenin の連結が解除されて核内へと移行した結果、

細胞の成長や増殖に関連するシグナルが増強されたのではないかと考えられる。

また、本研究では E-cadherin と N-cadherin の発現率には有意な負の相関が認められた。すなわち、E-cadherin の発現が減弱し、代償性に N-cadherin が発現する cadherin-switch 現象に類似した現象がイヌの髄膜腫においても確認された。一般的に表面に N-cadherin を発現した癌細胞は、同じく N-cadherin を提示している間質の線維芽細胞や血管内皮細胞と同一分子を用いた相互作用を行っている[69]。さらに、N-cadherin の分子対で形成される分子間結合は E-cadherin のそれよりも弱いため、こうした癌細胞は運動性や浸潤性を増すと報告されている[69]。そのため、髄膜腫細胞が N-cadherin を発現するようになると、線維芽細胞や血管内皮細胞と同様に N-cadherin を発現している神経組織への親和性を増すと考えられる。その結果、髄膜腫は、 β -catenin の核内移行による転写因子活性化との相乗作用により、神経組織への浸潤性を増している可能性が示唆された。

髄膜腫において、神経組織への浸潤性は通常型と退形成型を区別する際の重要な診断基準となっており[46,66]、イヌの退形成型髄膜腫のほとんどの症例で神経組織内浸潤が確認される[60]。さらに本研究において、Doublecortin が神経組織に隣接する腫瘍辺縁部において特異的に発現しており、神経組織内浸潤部の腫瘍細胞では特に強く発現する傾向が認められた。そのため、HE 標本により腫瘍細胞の神経組織内浸潤を確認できない場合でも、Doublecortin の免疫染色により、悪性度の判定が可能なのではないかと考えられる。また、Doublecortin の発現と N-cadherin の発現には有意な正の相関が認められたので、N-cadherin を発現している腫瘍細胞が多い髄膜腫ほど、Doublecortin を発現する細胞、すなわち神経組織内への浸潤性を示す細胞も多いと考えられた。そのため、N-cadherin および Doublecortin の発現が髄膜腫の神経組織内浸潤に重要な役割を果たしているのではないかと推察された。

また、顆粒細胞型髄膜腫に関しては、その細胞形態に特徴があるため診断に苦慮することはないが[33]、クモ膜上皮が本来発現すべき E-cadherin、 β -catenin 等の細胞接着因

子の発現を欠くこと、大脳髄膜の広範囲に進展病変を形成すること、生物学的特徴が退形成型や組織球性肉腫に近いことから従来のように通常型髄膜腫の一つとして分類するには問題があると考えられた。

本研究により、イヌの髄膜腫に関する新しい知見を得ることができた。通常、細胞膜に発現している E-cadherin は腫瘍化に伴い発現が減弱し、代償性に N-cadherin が発現するようになり、E-cadherin と連結している β -catenin は核内へと移行する。さらに、神経芽細胞の脳内移行に関与する Doublecortin が神経組織内浸潤部で強く発現するようになり、退形成型では増殖細胞マーカーである Ki-67 の陽性率も高くなることが明らかになった。以上のことから、E-cadherin の発現率が高い髄膜腫では腫瘍細胞は神経組織内浸潤を示さず、一方で、E-cadherin の発現率が低い髄膜腫では腫瘍細胞は神経組織内浸潤を示す可能性が強く示唆された。そのため、病理診断に際しては、通常の HE 標本で得られる知見に細胞接着分子の発現状況を加味して診断を行うことで、より客観的エビデンスに基づいて通常型ないし退形成型の判断を行うことが可能になると考えられる。

要約

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

症例				腫瘍発生部位	組織型	画像による 浸潤性評価 ¹⁾	組織標本による 浸潤性評価 ²⁾
case	犬種	性別	年齢				
1	雑種	♀	13歳	右側頭葉	髄膜上皮型	記載なし	A
2	雑種	♂	15歳	右側頭葉	髄膜上皮型	A	A
3	ゴールデン・レトリバー	♀	9歳	頭蓋内	髄膜上皮型	記載なし	A
4	トイ・プードル	♀	12歳	脊髄	髄膜上皮型	A	A
5	ボメラニアン	♂	6歳	右前頭葉	髄膜上皮型	記載なし	A
6	シー・ズー	♂	9歳	右前頭葉	髄膜上皮型	記載なし	A
7	雑種	♂	9歳	左側頭葉	髄膜上皮型	記載なし	A
8	シー・ズー	♀	11歳	前脳	髄膜上皮型	A	A
9	ヨークシャー・テリア	♂	9歳	脊髄	髄膜上皮型	記載なし	A
10	雑種	♂	16歳	左前頭葉	髄膜上皮型	記載なし	A
11	バーニーズ・マウンテン・ドッグ	♂	記載なし	左嗅球	髄膜上皮型	A	A
12	ゴールデン・レトリバー	♂	11歳	大脳鎌	髄膜上皮型	記載なし	A
13	ゴールデン・レトリバー	♀	9歳	右前頭葉	髄膜上皮型	A	A
14	ビーグル	♂	7歳	前頭葉	髄膜上皮型	記載なし	A
15	オーストラリアン・ケルピー	♂	記載なし	大脳底	髄膜上皮型	記載なし	A
16	トイ・プードル	♂	9歳	頭蓋内	髄膜上皮型	記載なし	A
17	ゴールデン・レトリバー	♀	7歳	前頭葉	髄膜上皮型	P	P (1b)
18	ゴールデン・レトリバー	♂	11歳	頭頂葉	髄膜上皮型	記載なし	A
19	ゴールデン・レトリバー	記載なし	12歳	右前頭葉	髄膜上皮型	記載なし	A
20	シー・ズー	♂	記載なし	左大脳半球	髄膜上皮型	記載なし	A
21	ゴールデン・レトリバー	♀	7歳	右側頭葉	髄膜上皮型	A	A
22	シベリアン・ハスキー	記載なし	10歳	右側頭葉	線維型	記載なし	A
23	雑種	♂	14歳	右前頭葉	線維型	A	A
24	ラブラドル・レトリバー	♀	8歳	左側頭葉	線維型	記載なし	P (1b)
25	雑種	♀	記載なし	前頭葉	線維型	記載なし	A
26	ゴールデン・レトリバー	♂	11歳	右大脳半球	移行型	P	P (1b)
27	シー・ズー	記載なし	記載なし	左側頭葉	移行型	A	A
28	ミニチュア・ダックスフンド	♂	8歳	左嗅球	移行型	A	A
29	ラブラドル・レトリバー	♂	10歳	頭蓋内	移行型	記載なし	A
30	シベリアン・ハスキー	♀	12歳	嗅球	移行型	記載なし	A
31	ゴールデン・レトリバー	♀	10歳	右側頭葉	移行型	記載なし	A
32	雑種	♂	13歳	右前頭葉	移行型	記載なし	A
33	マルチーズ	♀	13歳	前頭葉	移行型	記載なし	A
34	ボクサー	♀	7歳	右前頭葉	移行型	記載なし	A
35	雑種	♀	記載なし	右側頭葉	移行型	A	A
36	ミニチュア・ダックスフンド	♂	14歳	右前頭葉	砂粒体型	A	A
37	雑種	♀	12歳	頭蓋内	砂粒体型	記載なし	A
38	シェットランド・シープドッグ	♀	記載なし	右側頭葉	砂粒体型	P	A
39	雑種	♀	13歳	左側頭葉	血管腫型	記載なし	A
40	シー・ズー	♀	11歳	右前頭葉	顆粒細胞型	P	P (2)
41	ミニチュア・シュナウザー	♂	11歳	右大脳半球	顆粒細胞型	P	P (2)
42	ゴールデン・レトリバー	♀	12歳	脊髄	退形成型	記載なし	P (2)
43	チワワ	♂	10歳	右前頭葉	退形成型	P	A
44	ブルドッグ	♂	7歳	左前頭葉	退形成型	P	P (2)
45	ボストン・テリア	♂	13歳	左側頭葉	退形成型	記載なし	A
46	マルチーズ	♀	13歳	大脳鎌	退形成型	記載なし	P (2)
47	柴犬	♀	11歳	左嗅球	退形成型	P	P (2)
48	雑種	♂	11歳	頭蓋内	退形成型	A	P (2)
49	トイ・プードル	♂	14歳	右前頭葉	退形成型	記載なし	A
50	ゴールデン・レトリバー	♀	11歳	左前頭葉	退形成型	記載なし	A
51	雑種	♂	21歳	右前頭葉	退形成型	P	A
52	柴犬	♀	記載なし	左嗅球	退形成型	P	P (2)
53	ゴールデン・レトリバー	♀	11歳	右前頭葉	退形成型	P	P (2)
54	雑種	♂	12歳	前頭葉	退形成型	記載なし	P (2)
55	ペンブローク・ウェルシュ・コーギー	♀	7歳	左前頭葉	退形成型	P	P (2)

¹⁾ A; 浸潤所見なし, P; 浸潤所見あり

²⁾ A; 浸潤所見なし, P; 浸潤所見あり

1a; 腫瘍細胞のウィルヒョウ・ロビン腔内播種, 1b; 腫瘍細胞の軟膜浸潤, 2; 腫瘍細胞の神経組織内浸潤

Table 2-1. 検索に用いた症例の腫瘍発生部位、組織型、画像および組織標本における浸潤性評価。

抗体	クローン	希釈倍率	販売元	認識細胞	抗原賦活化
Epithelial cadherin (E-cadherin)	Mouse anti-human, monoclonal, 4A2C7	1:100	Invitrogen ¹⁾	クモ膜上皮細胞	Target retrieval solution (pH9.0) (Dako)
Neural cadherin (N-cadherin)	Mouse anti-human, monoclonal, 6G11	1:25	Dako Japan ²⁾	神経細胞、神経網	Target retrieval solution (pH9.0) (Dako)
β-catenin	Rabbit anti-human, polyclonal	1:400	Millipore ³⁾	クモ膜上皮細胞	Target retrieval solution (pH9.0) (Dako)
Doublecortin	Goat anti-human, polyclonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology ⁴⁾	神経前駆細胞	クエン酸バッファー (pH6.0)
Ki-67	Mouse anti-human, monoclonal, MIB-1	Ready-to-use	Dako Japan	増殖細胞	クエン酸バッファー (pH6.0)

¹⁾Invitrogen corporation, Camarillo, C.A. ²⁾Dako Japan, Kyoto, Japan.

³⁾Millipore Corporation, Billerica, MA. ⁴⁾Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.

Table 2-2. 免疫染色に使用した一次抗体。

case	組織型	E-cadherin	N-cadherin	β -catenin (膜発現)	β -catenin (核内発現)	Doublecortin	Ki-67
1	髄膜上皮型	++*	-	-	-	-	+
2	髄膜上皮型	-	+++	-	++	+	+
3	髄膜上皮型	+	-	-	-	-	+
4	髄膜上皮型	-	+++	-	-	++	+
5	髄膜上皮型	++	-	+++	-	-	-
6	髄膜上皮型	-	+++	++	+	-	-
7	髄膜上皮型	-	+++	-	-	-	+
8	髄膜上皮型	+	++	-	-	-	+
9	髄膜上皮型	+++	-	+++	-	-	-
10	髄膜上皮型	+++	-	++	-	-	-
11	髄膜上皮型	-	+++	-	+	-	+
12	髄膜上皮型	+	+++	-	-	-	+
13	髄膜上皮型	+	++	-	+	-	+
14	髄膜上皮型	-	+++	-	++	++	++
15	髄膜上皮型	+	+++	-	-	-	+
16	髄膜上皮型	+	-	+++	-	+	+
17	髄膜上皮型	+	++	-	++	++	-
18	髄膜上皮型	-	+++	-	+	-	+
19	髄膜上皮型	-	+++	-	+++	++	+
20	髄膜上皮型	+	++	-	++	-	+
21	髄膜上皮型	++	++	-	+	-	+
22	線維型	-	+++	-	+	-	++
23	線維型	-	+++	-	++	-	+
24	線維型	-	+++	-	++	++	+
25	線維型	-	+++	-	-	-	+
26	移行型	-	+++	-	++	++	+
27	移行型	++	-	-	-	-	+
28	移行型	-	+++	-	-	-	+
29	移行型	+	+++	-	-	++	-
30	移行型	++	-	+++	+	-	-
31	移行型	-	+++	-	++	+	+
32	移行型	-	+++	-	++	++	+
33	移行型	+	+++	-	++	+	+
34	移行型	++	-	++	-	-	-
35	移行型	+++	+	++	-	-	-
36	砂粒体型	++	-	-	+	-	+
37	砂粒体型	++	-	++	-	-	+
38	砂粒体型	+	++	-	++	+	+
39	血管腫型	-	+++	-	+	++	-
40	顆粒細胞型	-	-	-	-	-	-
41	顆粒細胞型	-	-	-	-	-	+
42	退形成型	-	+++	-	-	+	+
43	退形成型	+	++	-	+	-	+
44	退形成型	-	+++	-	+++	+++	++
45	退形成型	-	+++	-	++	+	+
46	退形成型	-	+++	-	++	++	+
47	退形成型	-	+++	-	++	++	+
48	退形成型	+	+++	-	++	++	+
49	退形成型	+	+++	-	+	+++	++
50	退形成型	-	+++	-	++	+	+
51	退形成型	+++	-	+++	-	-	+
52	退形成型	-	+++	-	++	++	+
53	退形成型	++	+++	-	+	++	+
54	退形成型	+	+++	-	+++	++	+
55	退形成型	++	+	-	++	+++	++

* - : 陰性

+: 1-10%の腫瘍細胞が陽性

++: 11-50%の腫瘍細胞が陽性

+++ : 51-100%の腫瘍細胞が陽性

Table 2-3. イヌの髄膜腫における免疫染色の結果。

マーカー	組織型	各スコアごとの症例数*				P 値
		—	+	++	+++	
E-cadherin	通常型	17	11	8	3	0.958
	退形成型	7	4	2	1	
N-cadherin	通常型	10	0	7	22	0.278
	退形成型	1	0	2	11	
核内移行β-catenin	通常型	19	8	12	0	0.021
	退形成型	2	3	7	2	
Doublecortin	通常型	23	6	10	0	0.003
	退形成型	2	4	5	3	
Ki-67	通常型	16	22	1	0	0.003
	退形成型	0	11	3	0	

*— : 陰性

+ : 1-10%の腫瘍細胞が陽性

++ : 11-50%の腫瘍細胞が陽性

+++ : 51-100%の腫瘍細胞が陽性

Table 2-4. 通常型と退形成型における各マーカーの発現率とカイ二乗検定による差の評価。

パラメーター	組織学的悪性度の判定確率 (%)
E-cadherin	43.4
N-cadherin	52.8
核内移行 β -catenin	73.6
Doublecortin	71.7
Ki-67	77.4
E-cadherin + N-cadherin + 核内移行 β -catenin	73.6
核内移行 β -catenin + Doublecortin + Ki-67	89.4
E-cadherin + N-cadherin + 核内移行 β -catenin + Doublecortin + Ki-67	84.9

Table 2-5. 髄膜腫の組織学的悪性度を判定する際の各パラメーターの有用性。

		N-cadherin	核内移行 β -catenin	Doublecortin	Ki-67
E-cadherin	ピアソンの相関係数	-0.665	-0.269	-0.229	-0.244
	<i>P</i> 値（両側）	0.000	0.047	0.092	0.076
N-cadherin	ピアソンの相関係数	—	0.395	0.370	0.292
	<i>P</i> 値（両側）	—	0.003	0.005	0.032

Table 2-6. E-cadherin または N-cadherin の発現と他マーカーの発現との相関。

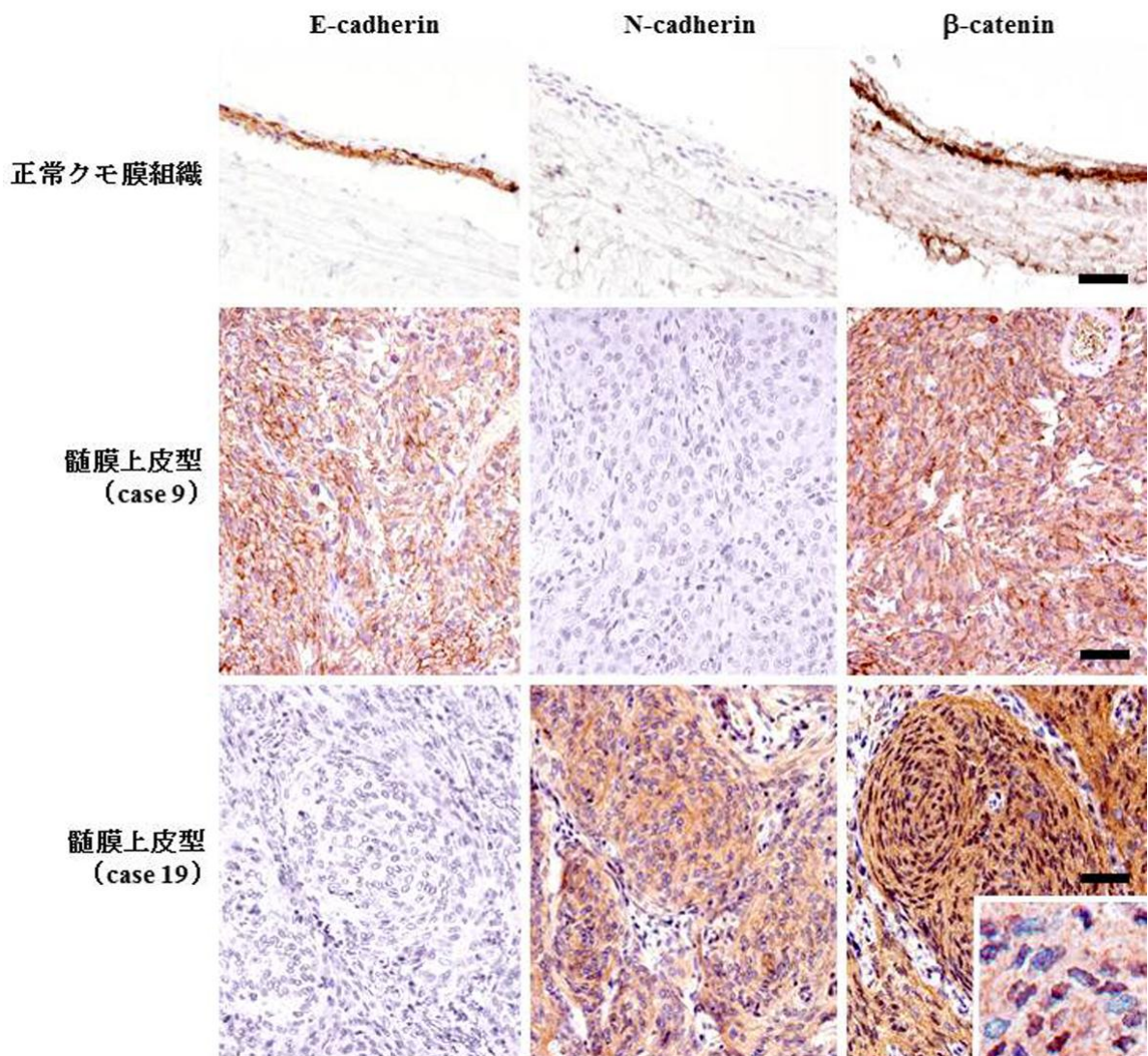


Fig.2-1. 通常のクモ膜上皮は E-cadherin およびβ-catenin を発現しているが、N-cadherin は発現していない。E-cadherin 陽性細胞が多い症例 (case 9) では N-cadherin 陽性細胞は少ない。これに対し、E-cadherin 陽性細胞が少ない症例 (case 19) では N-cadherin 陽性細胞は多く、β-catenin が核内へ移行するようになる (挿入図)。免疫染色。Scale bar = 30mm。

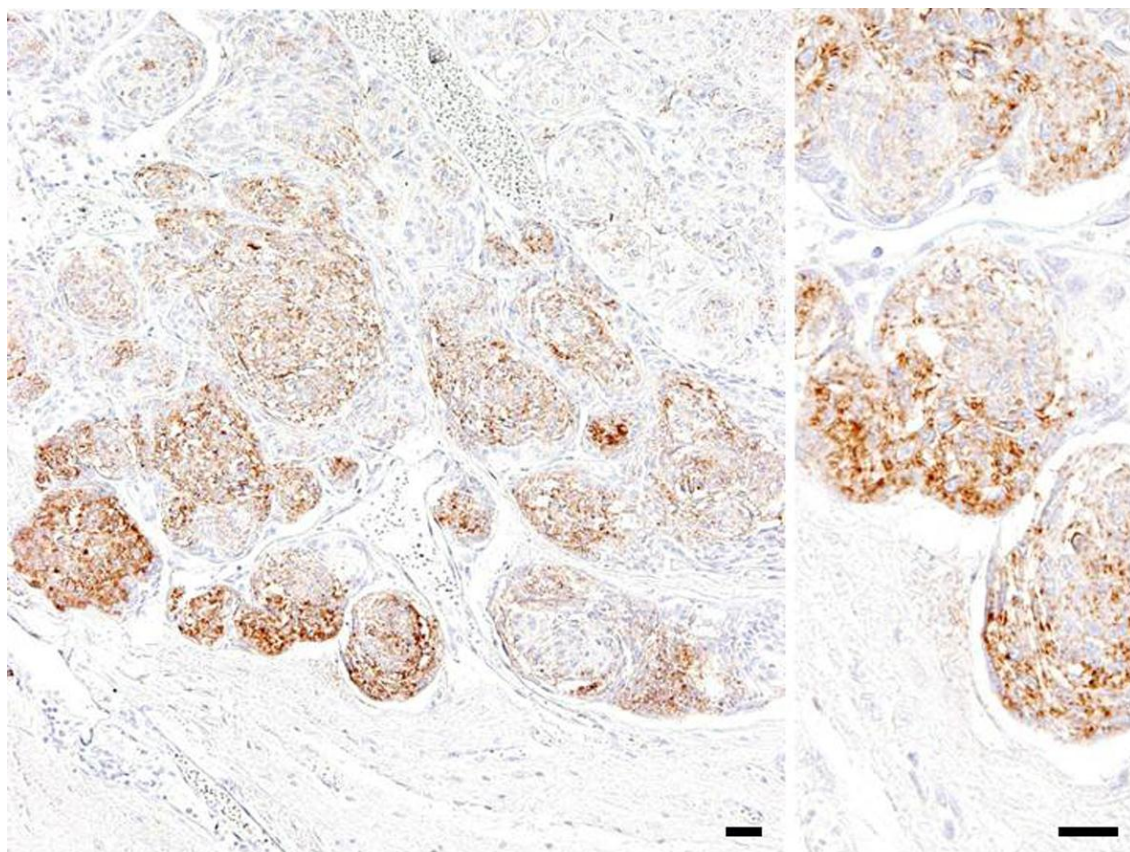


Fig.2-2. 退形成型髄膜腫症例の Doublecortin 陽性細胞 (case 46)。腫瘍辺縁部の腫瘍細胞に Doublecortin が発現し、特に神経組織内への浸潤部で強く発現する。免疫染色。
Scale bar = 30mm。

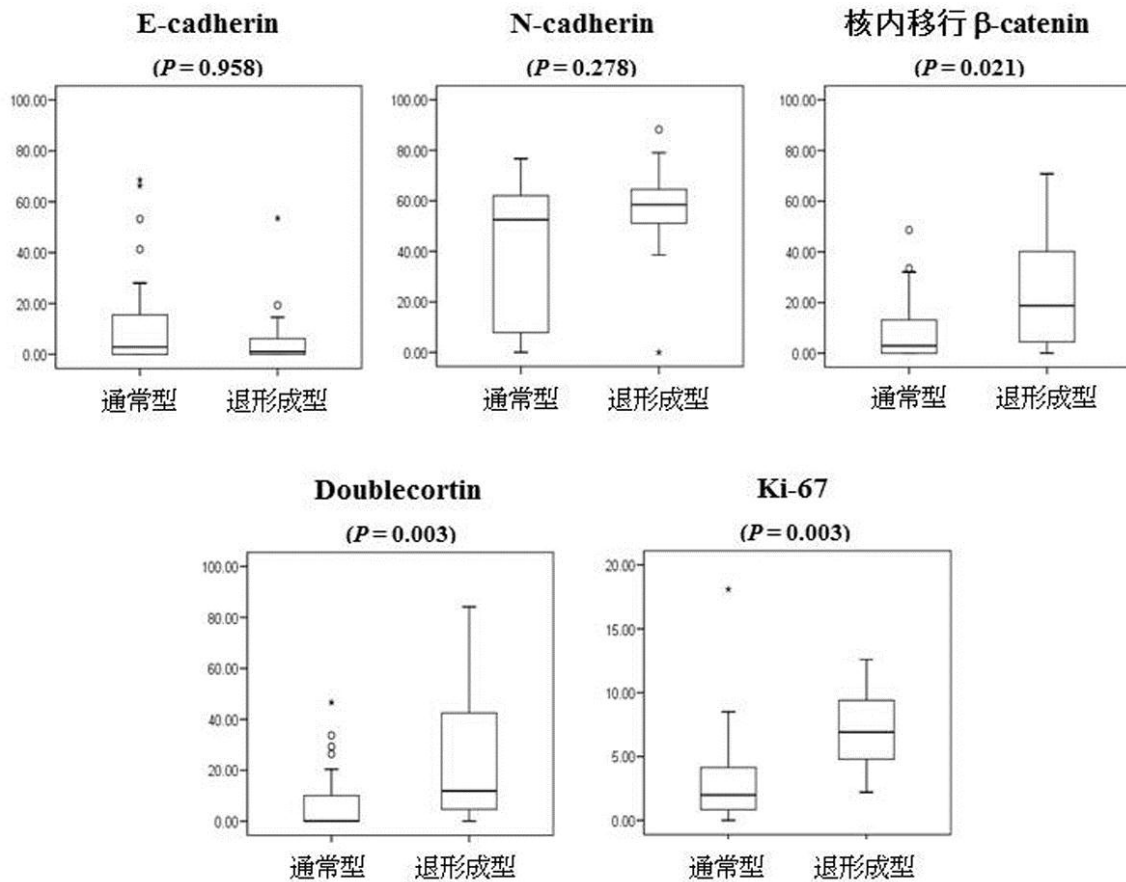


Fig.2-3. 髄膜腫における各種マーカー発現率の範囲を示した箱ひげ図。通常型と退形成型では E-cadherin と N-cadherin の発現率に有意な差は認められなかったが、核内移行 β -catenin、Doublecortin、Ki-67 の発現率には有意な差が認められた。箱ひげ図の上から最大値、第 3 四分位点、中央値、第 1 四分位点、最小値を表す。○は中程度の外れ値を、★は極度の外れ値を示す。

第3章

イヌの頭蓋内原発組織球性肉腫の病理学的および免疫組織化学的 特徴に関する研究

序

第2章で述べた髄膜腫との鑑別が必要な腫瘍として、イヌでは近年、頭蓋内の組織球性肉腫が多く診断されるようになった。動物の神経系腫瘍のWHO分類では、頭蓋内の組織球性肉腫は悪性組織球症 *Malignant histiocytosis* の一分症として記載されているが[33]、実際は内臓諸臓器に特に病変がなく、頭蓋内のみに限局する症例が圧倒的に多い。

近年、イヌでも応用可能な組織球特異マーカーが数種市販されるようになり、頭蓋内に限局した組織球性肉腫が多数報告されるようになってきた[10,62,63,65,70]。これまでの報告を総合すると、イヌの頭蓋内原発の組織球性肉腫の増殖パターンは大きく2つに分類される。髄外に孤在性腫瘤を形成するもの（孤在型）と、髄膜の広範囲にび漫性に浸潤するもの（び漫型）である。前者はバーニーズ・マウンテン・ドッグ、ウェルシュ・コーギー・ペンブロークおよびシェットランド・シープドッグで報告されており[10,63,70]、後者はチワワおよびミニチュア・シュナウザーで報告されている[62,65]。

このように、イヌの頭蓋内に原発する組織球性肉腫には2種類の増殖パターンが存在するが、同じ組織球性肉腫であるにも関わらず、なぜこのように明らかな増殖形態の相違が存在するのかは明らかにされていない。したがって、それぞれの型の疫学的、病理学的特徴および腫瘍細胞の特性を明確にすることによって、各型の病理発生機序解明の際の重要な手がかりが得られると考えられる。本章では、日本国内で収集されたイヌの頭蓋内原発の組織球性肉腫20例（孤在型18例、び漫型2例）の病理組織学的特徴および腫瘍細胞の免疫組織化学的特徴について詳細に検討した。

材料と方法

【症例】

2005 年から 2010 年の 6 年間で、死後剖検により採取された 5 症例、および生前に生検組織として外科的に採取された 15 症例、計 20 症例のイヌの頭蓋内限局性組織球性肉腫を用いた。上記組織を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定後、定法に従い 4 μ m の厚さでパラフィン切片を作製し、Haematoxylin and eosin (HE) 染色を行って観察し、過去の報告に従って孤在型とび漫型の組織球性肉腫に分類した[62]。case 1~20 の個体情報をまとめて Table 3-1 に示す。

【免疫染色】

免疫染色は Envision polymer 法を用いて実施し、一次抗体として用いた各マーカー抗体を Table 3-2 に示した。脱パラフィンした切片（抗 CD20 抗体との反応に使用する切片以外）について、オートクレーブにより 120°C 5 分間の抗原賦活化を行った。全ての切片を 1% 過酸化水素・メタノール溶液で室温 30 分間処理して内因性ペルオキシダーゼの不活化を行い、8% skim milk / Tris-buffered saline で 37°C 40 分間処理して非特異反応を抑制した後、一次抗体と 4°C 一晩で反応させた。二次抗体は Envision polymer (Dako Japan) を使用し、37°C で 40 分間反応させた。発色には DAB (Dojindo Laboratories) と H₂O₂ (Wako Pure Chemical Industries) を使用した。後染色にはヘマトキシリンを用いた。

陽性細胞の定量化に関しては、腫瘍組織中の強拡大（400 倍）の 5 視野を無作為に選び、1 視野中の全細胞数および陽性細胞数をカウントすることで、陽性細胞の割合を算出した。

【統計解析】

統計解析には SPSS version 15.0 を使用し、各マーカーに対する陽性細胞数の割合をマーカーの発現率として、孤在型とび漫型とでカイ二乗検定により比較した。

結果

【発生状況】

本研究で検索した頭蓋内原発組織球性肉腫 20 例の犬種の内訳は、ウェルシュ・コーギー・ペンブロークが 12 例（60%）、バーニーズ・マウンテン・ドッグが 2 例（10%）、ワイアー・フォックス・テリアが 1 例（5%）、ロットワイラーが 1 例（5%）、ニューファンランドが 1 例（5%）、ノーフォーク・テリアが 1 例（5%）、チワワが 1 例（5%）、ミニチュア・シュナウザーが 1 例（5%）であった。組織球性肉腫の発症に性差はなく、平均発症年齢は 8.4 歳（5 歳 10 ヶ月齢～12 歳齢）であった。ほとんどの症例で、てんかん発作、姿勢反応の低下や四肢の不全麻痺などの神経症状を呈していた。孤在型は 18 例で認められ、その発生部位は脳（16 例）および脊髄（2 例）であった。一方で、び漫型は 2 例で認められ、ともに脳から脊髄の広範囲に病変がみられた。case 1~20 の犬種、性別、年齢、主な神経症状、腫瘍発生部位および腫瘍細胞の増殖パターンを Table 3-1 にまとめて示した。

【病理組織学的特徴】

孤在型の組織球性肉腫は 20 例中 18 例で認められた。髄膜腫のように孤在性の髄外腫瘍を形成しており、異型性・多形性を示す組織球の増殖に混在して小型リンパ球の浸潤も認められた。全ての孤在型において、腫瘍性組織球は軟膜下の神経組織実質へと浸潤性増殖を示していた。ほとんどの腫瘍性組織球は細胞境界明瞭で、豊富な好酸性細胞質と大小不同を示す類円形核を有しており、多数の有糸分裂像が認められた。多核巨細胞も散見され、その細胞質内には貪食像や貪食空胞もしばしば認められた。一部の腫瘍性組織球は泡沫状マクロファージ様の形態を呈し、それらの細胞質内には変性したミエリン鞘や脂肪顆粒が充満していた（Fig. 3-1）。

び漫型の組織球性肉腫は 20 例中 2 例で認められ、異型性・多形性を示す組織球が

髄膜の広範囲にび漫性に浸潤しており、小型リンパ球の浸潤も混在していた。多数の腫瘍性組織球が硬膜からクモ膜腔、軟膜を置換するように増殖し、脳実質へ浸潤性増殖を示していた (Fig. 3-1)。孤在型とび漫型で細胞形態に相違は認められなかった。

【免疫染色】

Human leukocyte antigen (HLA)-DR alpha-chain、ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1)、cluster of differentiation (CD) 163、CD204、epithelial cadherin (E-cadherin) および Ki-67 に対する抗体を用いて行った免疫染色の結果を Table 3-3 に示す。神経疾患のない 5 歳齢雄のビーグル犬からクモ膜組織を採取し、正常なクモ膜組織における上記抗体の染色性を確認したところ、E-cadherin 陽性の髄膜上皮細胞に混在して、HLA-DR、Iba1、CD163、CD204 に陽性を示す組織固着のマクロファージ・組織球系細胞が存在することが明らかになった (Fig. 3-2)。

頭蓋内原発組織球性肉腫では、HLA-DR 陽性の腫瘍細胞は症例により様々であったが、概して HLA-DR 陽性の腫瘍細胞よりも Iba1 陽性の腫瘍細胞の方が多い傾向があった。孤在型 18 例のうち 16 例では、非常に多数の CD163 および CD204 陽性の腫瘍細胞が認められたが (Fig. 3-2)、残りの 2 例ではこれらの細胞は稀であった。一方、び漫型では 2 例ともに CD163 および CD204 陽性の腫瘍細胞はほとんど認められなかった (Fig. 3-2)。孤在型、び漫型ともに腫瘍細胞は E-cadherin に陰性であった。Ki-67 陽性の腫瘍細胞の数は、孤在型では 7.7 – 43.5% と症例により様々であったが、び漫型では 8.9 – 10.5% であった。また、腫瘍巣内には多数の CD3 陽性の T リンパ球ないし CD20 陽性の B リンパ球が浸潤していたが、いずれの細胞にも異型は認められなかった。

カイ二乗検定の結果、び漫型より孤在型で CD163 ($P = 0.010$) および CD204 ($P = 0.008$) の発現率が有意に高いことが明らかになったが、両型間で他マーカーの発現率に有意な差は認められなかった。

考察

イヌの組織球増殖性疾患は、あらゆる犬種の若齢犬に発症する犬皮膚組織球腫、皮膚に多発病巣を形成する皮膚組織球症、バーニーズ・マウンテン・ドッグの家族性疾患で皮膚やリンパ系組織など全身に病巣を形成する全身性組織球症、悪性組織球性疾患である組織球性肉腫／悪性組織球症（播種性組織球性肉腫）の4つのカテゴリーに分類されている（Moore PF: 2004, The histiocytic disease complex. *In*: Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine annual meeting, pp. 437–438. June 9–12, 2004, Minneapolis, MN）。組織球性肉腫／悪性組織球症（播種性組織球性肉腫）は一般的に内臓諸臓器に病巣を形成し、バーニーズ・マウンテン・ドッグ、ロットワイラー、フラット・コーテッド・レトリバーやゴールデン・レトリバーなどの大型犬種に好発し、その起源は骨髄由来の樹状細胞と考えられている[1,33,60]。本研究により、組織球性肉腫でも頭蓋内原発のものは中型犬種であるウェルシュ・コーギー・ペンブローク犬に高率（60%）に発症していることが明らかになり、その起源は髄膜組織常在のマクロファージであることが示唆された。このように、頭蓋内原発の組織球性肉腫と通常の組織球性肉腫では好発犬種が異なることから、両者には異なる病因因子が関与していると考えられた。

イヌのマクロファージ・組織球系列の細胞は CD1、CD11b、CD11c、CD14、CD68 および major histocompatibility complex (MHC) class II を発現しており、これらのマーカーがマクロファージ・組織球系列の細胞であることを確定させるのに有用であると報告されている[1]。本研究ではパラフィン標本のみが利用可能であったため、MHC class II (HLA-DR) に対する抗体以外に、ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1)、cluster of differentiation (CD) 163、CD204 に対する抗体も使い、都合4つの抗体をマクロファージ・組織球系細胞の同定のために使用した。Iba1 はマクロファージ・組織球系細胞のカルシウムシグナルを媒介するアダプター分子であり、第1章の結果より、イヌのマクロファージ・組織球系細胞

の同定にも有用なマーカーであると考えられる[25,26]。CD163 は分子量が 120kDa および 70kDa であることが確認されているマクロファージの表面抗原であり[8,35,59]、CD204 は細菌の菌体成分である LPS などの陰性荷電巨大分子をリガンドとして認識するマクロファージのス캐ベンジャー受容体である[35,48]。両者ともにマクロファージ特異的に発現し、樹状細胞、単球、顆粒球やリンパ球には反応を示さず、肝クッパー細胞などの組織固着マクロファージや小膠細胞などの滲出マクロファージに反応すると報告されている[8,34,35]。

頭蓋内原発の組織球性肉腫の増殖パターンは大きく孤在型とび漫型の 2 つに分類されるが、本章の検索では両型の組織学的特徴に明確な相違は認められなかった。バーニーズ・マウンテン・ドッグなどを好発犬種とする通常の組織球性肉腫および悪性組織球症（播種性組織球性肉腫）の起源は骨髄由来の樹状細胞とされており、ともに CD1、CD11c、MHC class II、intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) を発現する腫瘍細胞から構成されている[1]。今回用いたマーカーである HLA-DR (MHC class II) および Iba1 に関しては、頭蓋内原発の組織球性肉腫では孤在型やび漫型に関わらず、多くの腫瘍性組織球で発現が認められた。また、CD163 および CD204 は孤在型の多くの症例（16/18 例）で腫瘍性組織球に発現していたものの、少数の症例（2/18 例）では発現がほとんど認められなかった。加えて、び漫型（2/2 例）でもほとんど発現していなかった。以上の結果より、頭蓋内原発の組織球性肉腫の起源は髄膜組織常在のマクロファージであることが示唆された。さらに、CD163 および CD204 をマーカーとして用いれば孤在型とび漫型をある程度は区別可能であると推察された。

さらに、Iba1 は一部の B リンパ球が陽性を示す HLA-DR とは異なり、単球・組織球系細胞に特異的なマーカーであることに加え、本研究によって HLA-DR よりも高感度に単球・組織球系細胞を検出できることが判明したため、パラフィン切片を用いた場合にマクロファージ・組織球系細胞の特異的なマーカーとして有用であると考えられた。

WHO 分類には、髄膜上皮以外の細胞に由来する髄膜腫瘍としてび漫性髄膜肉腫症

がある[33]。髄膜肉腫症は延髄～脊髄の髄膜の広範囲に広がる多形性細胞の腫瘍で、多核巨細胞が多く出現する傾向があるなど、本研究で明らかになったび漫型組織球性肉腫との類似点が非常に多い。したがって、過去にび漫性髄膜肉腫症と診断された腫瘍は、び漫型の組織球性肉腫であった可能性が非常に高い。今後、イヌの頭蓋内原発の組織球性肉腫の病態を解明していくためには、孤在型とび漫型の組織球性肉腫をより客観的に鑑別できる分子マーカーの探究や、ウェルシュ・コーギー・ペンブローク犬における組織球性肉腫の発症に関わる遺伝的背景の解明など、分子生物学的なアプローチが不可欠と考えられる。

要約

イヌでは近年、頭蓋内の組織球性肉腫が多く診断されるようになり、髄膜腫との鑑別が必要になっている。通常の組織球性肉腫は内臓諸臓器に病巣を形成し、バーニーズ・マウンテン・ドッグなどの大型犬種に好発することが知られているが、頭蓋内組織球性肉腫では内臓諸臓器に特に病変がなく、頭蓋内に限局する症例が圧倒的に多い。そのため、本章では頭蓋内原発の組織球性肉腫 20 症例の病理組織学的特徴および腫瘍細胞の免疫組織化学的特徴を詳細に検討した。頭蓋内原発の組織球性肉腫はその発症に性差はなく、平均発症年齢は 8.4 歳であり、多くの症例で、てんかん発作、姿勢反応低下や四肢不全麻痺などの神経症状を呈していた。また、中型犬種であるウェルシュ・コーギー・ペンブローク犬に高率（60%）に発症していることが明らかになった。本研究では頭蓋内原発の組織球性肉腫の増殖パターンは大きく 2 つに分類した。すなわち、髄膜腫のように髄外に孤在性腫瘤を形成するもの（孤在型）が 18 症例、髄膜の広範囲にび漫性に浸潤するもの（び漫型）が 2 症例認められた。しかしながら、両型の細胞形態に相違は認められなかった。さらに、マクロファージ・組織球系列のマーカーである Human leukocyte antigen (HLA)-DR alpha-chain、ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) およびマクロファージのマーカーである cluster of differentiation (CD) 163、CD204 に対する免疫組織化学的検索を行ったところ、CD163 および CD204 が孤在型とび漫型を区別するマーカーとして有用であることが明らかになった。加えて、頭蓋内原発の組織球性肉腫と通常の組織球性肉腫では腫瘍形成部位および好発犬種が明らかに異なることから、それぞれに異なる病因因子が関与していると考えられた。

症例				主な神経症状	腫瘍発生部位	腫瘍増殖パターン
case	犬種	性別	年齢			
1	ワイヤー・フォックス・テリア	♂	7歳齢	てんかん発作、姿勢反応の低下	右頭頂葉～右後頭葉	孤在型
2	ロットワイラー	♂	6歳齢	起立不能	右前頭葉	孤在型
3	バーニーズ・マウンテン・ドッグ	♀	8歳齢	左側旋回運動	側脳室下領域	孤在型
4	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	♀	6歳齢	てんかん発作、失禁	左前頭葉	孤在型
5	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	♀	11歳齢	姿勢反応の低下	左前頭葉	孤在型
6	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	♂	9歳齢	てんかん発作、姿勢反応の低下	左頭頂葉～左後頭葉	孤在型
7	ニューファンドランド	♀	8歳齢	てんかん発作	右後頭葉	孤在型
8	バーニーズ・マウンテン・ドッグ	♂	7歳齢	左側不全麻痺、意識障害	腰髄	孤在型
9	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	♂	5歳10ヶ月齢	四肢不全麻痺	右頭頂葉	孤在型
10	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	♀	8歳10ヶ月齢	てんかん発作、姿勢反応の低下	左側頭葉	孤在型
11	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	♂	10歳齢	姿勢反応の低下、てんかん発作	左側頭葉	孤在型
12	ノーフォーク・テリア	記載なし	記載なし	発作、姿勢異常	右側頭葉	孤在型
13	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	♀	6歳齢	四肢不全麻痺、意識障害	右大脳半球	孤在型
14	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	♀	12歳齢	起立不能	左前頭葉～左頭頂葉	孤在型
15	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	♀	9歳6ヶ月齢	右側不全麻痺、意識障害	右前頭葉	孤在型
16	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	♀	9歳8ヶ月齢	後肢不全麻痺	胸髄	孤在型
17	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	♂	10歳4ヶ月齢	記載なし	右大脳	孤在型
18	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	♀	6歳齢	姿勢反応の低下	右側頭葉	孤在型
19	チワワ	♀	記載なし	記載なし	左大脳半球～頭髄	び漫型
20	ミニチュア・シュナウザー	♀	8歳齢	姿勢反応の低下	右大脳半球～頭髄	び漫型

Table 3-1. 検索に用いた症例の主な神経症状、腫瘍発生部位、腫瘍増殖パターン。

抗体		希釈倍率	販売元	認識細胞	抗原賦活化
HLA-DR	Mouse anti-human, monoclonal, TAL.1B5	1:100	Dako Japan ¹⁾	小膠細胞、クッパー細胞	クエン酸バッファー (pH6.0)
Iba1	Rabbit anti-human, polyclonal	1:250	Wako ²⁾	小膠細胞、クッパー細胞	クエン酸バッファー (pH6.0)
CD163	Mouse anti-human, monoclonal, AM-3K	1:20	TransGenic ³⁾	小膠細胞、クッパー細胞	クエン酸バッファー (pH2.0)
CD204	Mouse anti-human, monoclonal, SRA-E5	1:20	TransGenic	小膠細胞、クッパー細胞	Target retrieval solution (pH9.0) (Dako)
E-cadherin	Mouse anti-human, monoclonal, 4A2C7	1:100	Invitrogen ⁴⁾	クモ膜上皮細胞、上皮系細胞	Target retrieval solution (pH9.0) (Dako)
CD3	Rabbit anti-human, polyclonal	1:50	Dako Japan	T リンパ球	クエン酸バッファー (pH6.0)
CD20	Rabbit anti-human, polyclonal	1:400	NeoMarkers ⁵⁾	B リンパ球	賦活化なし
Ki-67	Mouse anti-human, monoclonal, MIB-1	Ready-to-use	Dako Japan	増殖細胞	クエン酸バッファー (pH6.0)

¹⁾Dako Japan, Kyoto, Japan. ²⁾Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan.

³⁾TransGenic, Hyogo, Japan. ⁴⁾Invitrogen Corporation, Camarillo, CA. ⁵⁾NeoMarkers, Fremont, CA.

Table 3-2. 免疫染色に使用した一次抗体。

case	増殖パターン	HLA-DR	Iba1	CD163	CD204	E-cadherin	Ki-67
1	孤在型	76.2*	63.5	97.7	94.2	0	8.6
2	孤在型	61.5	91.3	76.9	83.5	0	36.7
3	孤在型	43.0	50.7	81.9	86.2	0	7.7
4	孤在型	83.5	90.6	92.0	96.5	0	13.7
5	孤在型	18.3	74.0	62.3	52.6	0	11.9
6	孤在型	23.0	37.8	7.3	12.9	0	21.0
7	孤在型	95.4	76.4	3.9	2.0	0	9.2
8	孤在型	28.9	68.1	92.2	86.5	0	43.5
9	孤在型	69.2	88.4	87.5	93.2	0	9.7
10	孤在型	93.3	91.9	78.9	71.4	0	8.8
11	孤在型	91.0	76.8	69.5	83.2	0	19.0
12	孤在型	27.5	89.1	91.0	94.1	0	13.8
13	孤在型	54.1	94.2	82.8	75.1	0	7.2
14	孤在型	39.2	73.2	78.6	62.2	0	16.5
15	孤在型	71.2	80.3	64.7	82.6	0	12.0
16	孤在型	43.0	61.6	90.1	76.9	0	9.2
17	孤在型	56.6	92.0	93.2	97.0	0	13.7
18	孤在型	43.2	82.5	77.1	87.2	0	11.7
19	び漫型	16.4	84.2	3.0	1.2	0	10.5
20	び漫型	51.3	89.6	1.3	2.9	0	8.9

*: 陽性細胞率(%)

Table 3-3. イヌの頭蓋内組織球性肉腫における各種マーカー陽性細胞の割合。

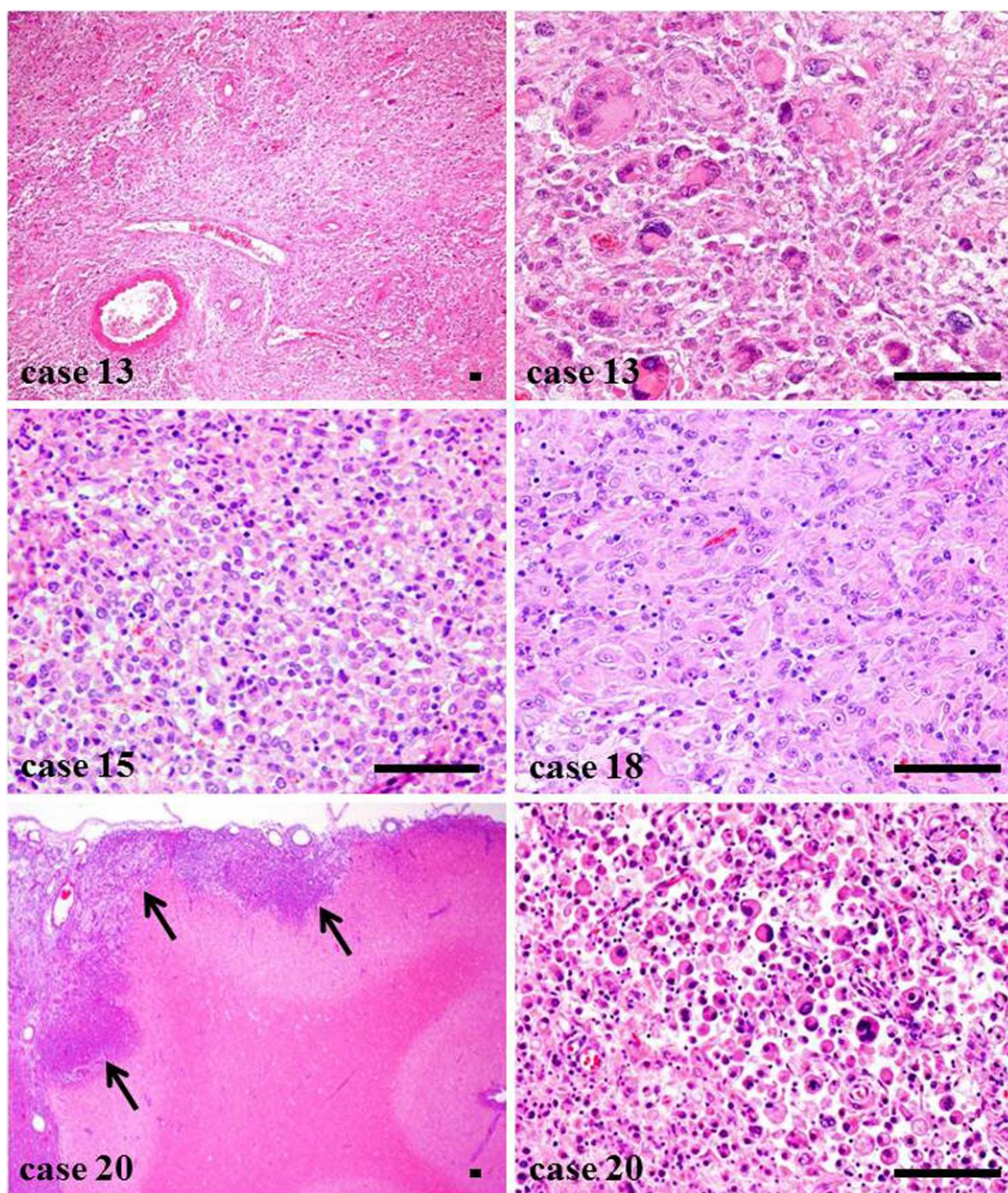


Fig.3-1. イヌの頭蓋内組織球性肉腫の組織像。孤在型（cases 13, 15, 18）では、異型性・多形性を示す腫瘍細胞が充実性に増殖し、一部に小型リンパ球が混在する。び漫型（case 20）では、孤在型と同様の異型性・多形性を示す腫瘍細胞が髄膜に広範囲慢性に浸潤増殖する。HE 染色。Scale bar = 50mm。

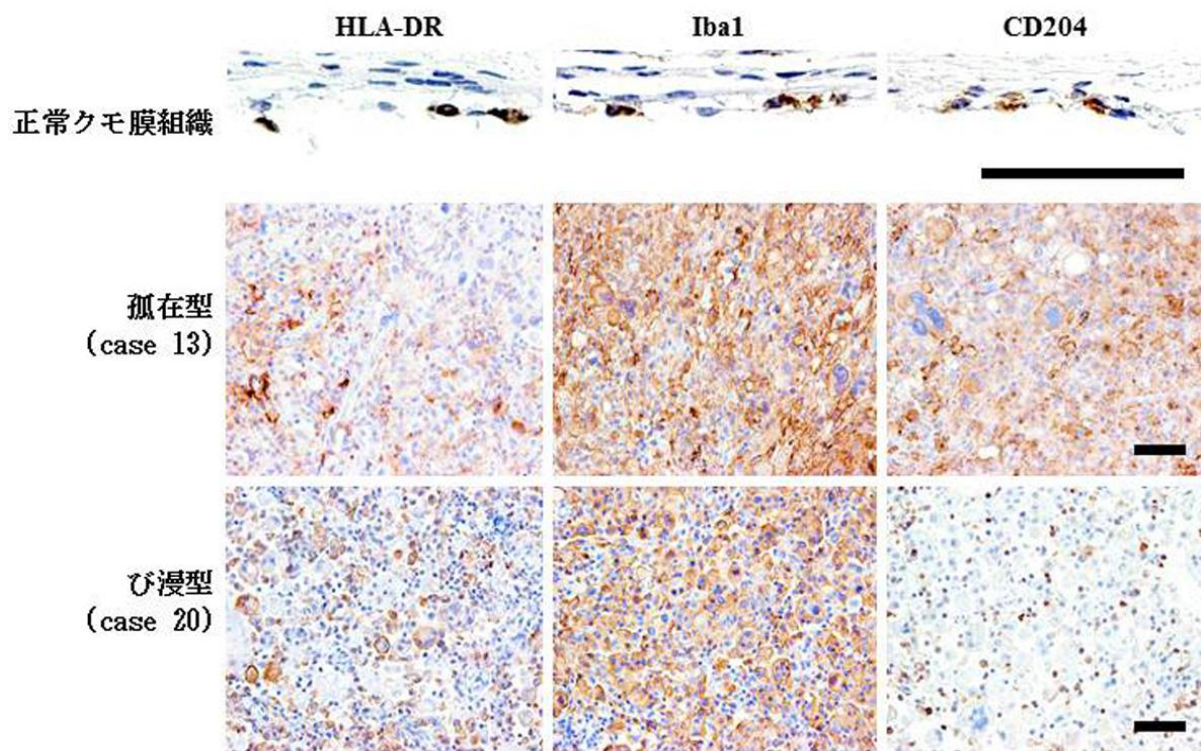


Fig.3-2. イヌの頭蓋内組織球性肉腫の免疫染色像。正常のクモ膜組織には HLA-DR、Iba1、CD204 に陽性の組織固着マクロファージが存在する。孤立型では多くの症例で腫瘍細胞は CD204 を発現する傾向があるが、び漫型では腫瘍細胞は CD204 をほとんど発現しない。HE 染色。Scale bar = 50mm。

第4章

ウェルシュ・コーギー・ペンブローク犬における

組織球性肉腫の疾患関連遺伝子の検索

序

第3章で明らかにしたように、日本国内で繁殖・飼育されているウェルシュ・コーギー・ペンブローク（WCP）犬には、中年齢時（平均発症年齢 8.4 歳）に頭蓋内組織球性肉腫の発生が多い。海外では本犬種の組織球性肉腫は報告されていないため、本腫瘍は日本国内の WCP 犬にとくに多発している可能性が高いと予想される。通常、イヌの組織球性肉腫はリンパ性組織や軟部組織の腫瘍としてバーニーズ・マウンテン・ドッグやフラット・コーテッド・レトリバーなどの大型犬種に好発することが知られている[33,60]。一方、国内の WCP 犬における頭蓋内以外の組織球性肉腫の発生状況に関する詳細な報告はない。

イヌでは犬種特異性が存在する疾患が知られている[22]。イヌの品種（犬種）は人為的交配により特定形質が固定されたもので、この過程で特定の疾患に関連する遺伝子が選抜されている可能性が高い[31]。このような遺伝的要因は、疾患感受性遺伝子

（susceptibility gene）によって規定されているが、近年のゲノム医学の進歩により、連鎖解析（linkage analysis）や相関解析（association analysis）の手法を用いることで、ゲノム内の疾患感受性遺伝子領域を同定することが可能になった[24]。しかし、各個体のゲノムには複数の一塩基多型（SNP）、挿入や欠失、重複、逆位、転位などの多型や、遺伝子の重複によるコピー数変化などの遺伝的な多様性が存在し、この多様性によるゲノム構造の違いが疾患感受性と密接に関連していることが明らかになっている[64]。特定の疾患の発症やそのリスクを検討する場合、ゲノム内の全ての多型を網羅的に解析する必要があり、そのため

ゲノム配列を決定することが重要と考えられる。

近年、高速かつ高精度な塩基配列決定を可能にする次世代シーケンサーが次々と登場し、短い配列長のデータをイヌのリファレンスゲノムにマッピング（リシーケンス）することでゲノム構造の違いを検出し、全ゲノム配列を決定することが可能になった[64]。また、2005年12月にイヌゲノムの全配列が決定したことでリファレンスゲノムの入手が可能となり、イヌの疾患においても次世代シーケンサーを利用した解析が行える環境が整いつつある[31]。

第3章の結果から、国内のWCP犬には、組織球性肉腫の罹患リスクに関連するゲノム・遺伝子群に何らかの多型を有する家系が存在すると考えた。これを受けて、第4章ではWCP犬における過去3年間の組織球性肉腫の発生状況をしらべ、その上で組織球性肉腫罹患症例および組織球性肉腫の好発年齢と考えられる年齢より高齢の健常症例について、それぞれ次世代シーケンサーにより全ゲノム配列を決定し、組織球性肉腫罹患症例が共通して保有する全エクソン領域のSNPのみを抽出した。さらに、腫瘍組織の網羅的遺伝子発現解析により、実際の腫瘍細胞で発現している遺伝子群に関連するSNPを選択し、これらのSNPから遺伝子機能への影響が大きいSNPのみを選択することで、WCP犬の組織球性肉腫罹患リスクに関連する疾患関連遺伝子の同定を行った。

材料と方法

【疫学調査】

2009 年から 2011 年の 3 年間で、WCP 犬に発生した腫瘍のうち、病理組織学的に組織球性肉腫と診断された 33 例を用いた。これら 33 例について、性別、平均発症年齢および腫瘍発生部位をしらべた。用いた症例を Table 4-1 に示す。

【ゲノム DNA の抽出】

ゲノム DNA を抽出するため、組織球性肉腫罹患歴のある WCP 犬 3 例および臨床病歴のない健常 WCP 犬 1 例の血液を採取した (Table 4-1)。臨床病歴のない症例として、組織球性肉腫の好発年齢よりも高齢である 13 歳 6 ヶ月齢雌の血液を用いた。血液を採取した症例は Table 4-1 に追記する。採取した血液は全て 12,000rpm で 10 分間遠心し、buffy coat の白血球から QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN, Valencia, CA) を用いてゲノム DNA を抽出し、使用するまで -20°C で保存した。抽出したゲノム DNA は NanoDrop spectrophotometer (ND-1000 v3.2.1, Thermo Scientific, Wilmington, DE) を用いてその濃度および品質を測定した。

【全ゲノム配列決定】

全ゲノム配列決定には、SOLiDTM System (Life Technologies, Foster City, CA) を用いた全ゲノムリシーケンシング法を使用した[64]。

① サンプル調整・シーケンシング

血液から得た 2.5 μg のゲノム DNA をソニケーター (Covaris, Woburn, MA) により 100~150bp に断片化し、末端修復後アデニンを付加し、DNA 断片の両側に P1、P2 アダプターを付加した。これらのテンプレートライブラリーを PCR により増幅し、各ライブラリー

量は Taqman PCR を用いた半定量的 RT-PCR 法にて測定した。濃度測定後、EZ Beads システム E80 の系を用いて DNA サンプルの調整を行った。まず、磁気ビーズとゲノムライブラリー混合液をオイル中に滴下し、エマルジョンを作製した。このエマルジョン液をプラスチックバック内に注入してエマルジョン PCR を行い、ビーズ上で DNA を増幅した。DNA フラグメントが結合しているビーズを選別し、シーケンス可能なものについてエンリッチメントを行い、3'端を修飾後、4℃にて保存した。各シーケンスビーズは work flow analysis にて質および至適濃度を算出し、シーケンシング反応用のスライドガラスに固定した。その後、ビーズ上の 1 本鎖 DNA を鋳型にして、蛍光標識されたプローブを順次結合させることにより、2 塩基ずつ配列を決定する段階的ライゲーション法を行った。塩基ごとに異なる蛍光をカメラで撮影し、paired end 法にて 35bp-50bp または 25bp-50bp のシーケンスデータを得た。

② マッピングおよび SNP 検出

各検体のゲノムシーケンスの結果は、Bioscope の Map Data ソフト (Life Technologies) を用いて 2 次解析した。リファレンスゲノムには、Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/>) より multi-fasta 形式でダウンロードしたボクサー犬のゲノム配列を使用した[31]。

③ イヌのリファレンスゲノムとの比較による変異候補の抽出と SNP 判定

3 次解析として、リファレンスゲノム上へのマッピング後、Bioscope の Find SNPs ソフトを用いて、SNP の検出を行った。すべての組織球性肉腫罹患症例での SNP を検出し、健常症例の SNP と比較し、リファレンスゲノムとは異なる SNP を検出した。健常症例にも存在する SNP を取り除き、組織球性肉腫罹患症例に特有の SNP のみを抽出した。得られた新規変異候補の SNP に対して、変異をサポートするリード数、クオリティー値などでフィルタリングを行い、新規変異リストを作成した。

④ 組織球性肉腫関連遺伝子候補の抽出

新規変異候補リストに遺伝子名や予想されるアミノ酸変異などを追記した後、ナンセンス変異、ミスセンス変異など、遺伝子機能への影響が大きい SNP を抽出し、組織球性肉腫関連遺伝子候補を絞り込んだ。

【腫瘍組織の total RNA 抽出】

case19 から採取した腫瘍組織を RNA later (QIAGEN) で固定し、Tissue-Tek OTC compound 4583 (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan) に包埋し、 -80°C で凍結した。クリオスタット (Leica CM1900, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) で $10\mu\text{m}$ の厚さに薄切し、RNase-Free フォイル付きスライドガラス (Leica Microsystems) に貼布した。スライドガラス上の組織を RNA later で 1 分間再固定し、RNase-free 水で包埋剤を洗浄した後、0.05% トルイジンブルー溶液 (pH7.0, Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を組織上に乗せて 4°C にて 1 分間染色した。RNase-free 水で洗浄後、スライドガラスを真空乾燥機内で 10 分間吸引乾燥した。その後、レーザー・マイクロダイセクション (LMD7000, Leica Microsystems) により、壊死組織や血管を除いた純粋な腫瘍組織のみをレーザーでフォイルとともに回収し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて腫瘍組織から total RNA を抽出した。抽出した total RNA は NanoDrop spectrophotometer (ND-1000 v3.2.1, Thermo Scientific) を用いて濃度を測定し、使用するまで -80°C で保存した。

【腫瘍組織の網羅的遺伝子発現解析】

網羅的遺伝子発現解析には Agilent Technologies 社の DNA マイクロアレイを使用し、1 アレイに 1 サンプルをハイブリダイズする 1 色法を行った。total RNA の質を Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) にて確認した後、poly T-T7 プライマーを用いた逆転写反応を行い、さらに RNaseH を反応させて ds-cDNA を合成した。その後、T7

プロモーターを用いて cRNA 増幅を行い、cRNA に Cyamine 3 色素を付加することで標識した。標識 cRNA をアルカリを用いて断片化し、Canine オリゴ DNA マイクロアレイ Ver.2.0 (Agilent Technologies) に 16 時間ハイブリダイズさせた。スライドをマイクロアレイ用洗浄液にて洗浄後 DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies) で蛍光強度を検出した。データ解析には GeneSpring GX version 11 (Agilent Technologies) を使用した。

【アミノ酸配列解析】

SNP によるアミノ酸配列変化の検討には、日本 DNA データバンクの Clustal W (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を用いたアライメントを行った。また、アミノ酸配列のモチーフ検索には、PROSITE のモチーフデータベース (<http://prosite.expasy.org/>) を利用した。

結果

【組織球性肉腫の発生状況】

過去3年間で組織球性肉腫に罹患した WCP 犬 33 例の腫瘍発生部位を検討したところ、頭蓋内に発生した症例が 14 例（42%）で最も多く、次いで肺に発生したものが 10 例（30%）、頭蓋内と肺の両方に発生したものが 2 例（6%）であり、WCP 犬の組織球性肉腫は特に頭蓋内と肺に好発することが明らかになった。また、皮膚に発生したものが 3 例（9%）、肝臓および脾臓に発生したものが 2 例（6%）、鼻腔に発生したものが 1 例（3%）、小腸に発生したものが 1 例（3%）であった。雄は 18 例（55%）、雌は 16 例（45%）であり、性差は認められなかった。平均発症年齢は 9.3 歳（5 歳 6 ヶ月齢～13 歳 1 ヶ月齢）であった。

【疾患関連遺伝子候補の選択】

組織球性肉腫に罹患した WCP 犬 3 例および健常な WCP 犬 1 例のそれぞれ全ゲノムについて、次世代シーケンサーを用いた大規模シーケンス解析を行った。シーケンス後の全ゲノムにおけるタグのカバーレージおよびリファレンスゲノムへのマップ率を Table 4-2 に示す。

罹患症例 3 例の SNP 解析結果をもとに健常症例との比較を行った結果、罹患症例に特異的に検出された SNP は Case 11 では 276,419 個、Case 19 では 154,421 個、Case 25 では 215,194 個であった。このうち、エクソン領域で検出された SNP は Case 11 では 5,926 個、Case 19 では 4,152 個、Case 25 では 6,170 個であった。また、罹患症例 3 例のエクソン領域に共通して存在する SNP は 782 個であった。

さらに、Case 19 の腫瘍組織凍結サンプルを用いて、腫瘍組織特異的マイクロディセクションを行い、DNA マイクロアレイを利用した網羅的遺伝子発現解析により同部で発現している遺伝子群の同定を行った結果、17315 遺伝子が有意に発現していることが確認さ

れた。

罹患 3 例のエクソン領域に共通してみられた 782 個の SNP について、腫瘍細胞で発現が認められた遺伝子群に存在する SNP のみを抽出したところ、294 個の SNP が選択された。これらを遺伝子機能 (annotation) により分類したところ、単球・マクロファージの増殖に直接関与すると推察される遺伝子上に存在していた SNP は 11 個であった (Table 4-3)。これらの SNP の中から、同部をコードするアミノ酸配列が変化し、さらにアミノ酸の側鎖の性質も変化することが予測される有意な SNP を検討したところ、2 種類の SNP を得ることができた。アミノ酸の側鎖の性質による分類を Table 4-4 に示す。

上記 2 種の SNP は、X 染色体上の *BMX* (*Bone marrow kinase gene on X chromosome*) 遺伝子における第 11,724,700 番塩基の G から A への変化 (第 237 番アミノ酸が Ala から Thr へと変化) と、第 4 染色体上の *FYB* (*FYN binding protein*) 遺伝子における第 73,054,095 番塩基の A から C への変化 (第 758 番アミノ酸が His から Pro へと変化) である。

【アミノ酸配列解析】

日本 DNA データバンクの Clustal W により、イヌ、ヒトおよびマウスの *BMX* と *FYB* のリファレンスアミノ酸配列のアライメントを行った。さらに、PROSITE によりこれらのタンパク質のモチーフ検索を行うことで、*BMX* の第 237 番アミノ酸と *FYB* の第 758 アミノ酸がモチーフ上に存在するかどうかを確認した。その結果、本研究で認められた組織球性肉腫罹患歴のある WCP 犬で特異的に変異していた *BMX* の第 237 番アミノ酸は、src homology 3 (SH3) 様ドメイン相同部位に存在することが判明した (Fig. 4-1)。また、*FYB* の第 758 アミノ酸は、ドメイン上には存在しないことが明らかになった。

考察

本研究により、日本国内の **WCP** 犬の組織球性肉腫は、とくに頭蓋内と肺に好発することが判明した。また、その発症に明確な性差は認められず、平均発症年齢は 9.3 歳であることが明らかになった。したがって、同犬種の組織球性肉腫はバーニーズ・マウンテン・ドッグやフラット・コーテッド・レトリバーなどの大型犬種に好発し、リンパ性組織や軟部組織に発生する通常の組織球性肉腫とは、異なる病理発生を有していると推察された。

また、次世代シーケンサーにより全ゲノム配列を決定した結果、罹患症例に共通して存在する **BMX** 遺伝子エクソン 8 の SNP により、**BMX** の第 237 番アミノ酸が Ala から Thr へと変異し、同タンパク質の SH3 様ドメインの構造および極性が大きく変化することが考えられた。このアミノ酸変異は有意な変化と考えられたため、**BMX** 遺伝子を **WCP** 犬の組織球性肉腫関連遺伝子候補とした。しかし、**BMX** は X 染色体上に存在する遺伝子である。にもかかわらず、本研究では組織球性肉腫の発症に明確な性差は認められなかった。これは、全罹患症例で父方からも母方からも同様の SNP を有する X 染色体を受け継いでいたためと考えられた。

BMX は Tec キナーゼファミリーに属する非受容体型チロシンキナーゼである [44,57,61,68]。Tec キナーゼは、N アミノ末端側に、pleckstrin homology (PH) ドメイン、Btk motif および Proline rich region から構成される Tec homology (TH) ドメインを有することが特徴であり、その他、src homology 3 (SH3) ドメイン、src homology 2 (SH2) ドメインおよび kinase ドメインも有する [16,61]。Tec キナーゼファミリーにおいて、**BMX** は TH ドメインの Proline rich region を欠き、SH3 ドメインの代わりに SH3 ドメインのアミノ酸配列に類似した SH3 様ドメインを有することが特徴である。**BMX** は、マウスでは単球および顆粒球に最も強く発現しており、心臓と肺にわずかに発現している [68]。ヒトでは上皮細胞や内皮細胞での発現が主体であり、顆粒球には発現が認められるものの、単球には発現しない

ことが報告されている[5,30,68]。本研究では、イヌにおける **BMX** 発現部位の詳細な検討は行っていないが、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により組織球性肉腫の腫瘍細胞には **BMX** 遺伝子が有意に発現していることが確認された。そのため、イヌにおいてもマウスと同様に、単球系列の細胞には **BMX** が発現している可能性が高い。また、**BMX** は増殖シグナルの中でもとくに **JAK-STAT** シグナル経路の活性化に深く関与している[5,57]。さらにヒトでは乳がん、前立腺がんなど様々な腫瘍の細胞分化や腫瘍発生を調節していることも報告されている[5,11,27]。したがって、**BMX** がイヌで単球・マクロファージ系の腫瘍化に関与している可能性は高いと考えられた。

Tec キナーゼファミリーでは、**SH3** ドメインは分子内相互作用および他のシグナル分子との相互作用に重要であるため、**BMX** の **SH3** 様ドメインも同様の役割を果たしていると考えられている[61]。今回検索した組織球性肉腫罹患 **WCP** 犬には共通して **BMX** の **SH3** 様ドメインに有意なアミノ酸変異が認められた。したがって、これらの **WCP** 犬は、先天的に **BMX** の機能が異常であった可能性が高く、これが同犬種における組織球性肉腫の発症に関与していると推測された。以上の結果から、国内の **WCP** 犬では、**BMX** 遺伝子エクソン 8 の **SNP** を検出することは、組織球性肉腫罹患リスクの予測に有用と考えられた。

近年、バーニーズ・マウンテン・ドッグおよびフラット・コーテッド・レトリバーに発生する通常型の組織球性肉腫細胞で、**p53** シグナル経路や **Rb** シグナル経路において重要な **CDKN2A/B** (*Cyclin-dependent kinase 2A/B*)、**RB1** (*Retinoblastoma 1*)、**PTEN** (*Phosphatase and tensin homolog*) 遺伝子が共通して欠失していることが報告された[22]。したがって、これらの犬種では、**BMX** 遺伝子ではなく、上記遺伝子に何らかの異常があるものと推察される。

本研究により、日本国内の **WCP** 犬に組織球性肉腫が多発し、とくに頭蓋内と肺に多く発生することが明らかになった。国内では、本犬種をブリーディングする際に、組織球性肉腫関連遺伝子と予想された **BMX** 遺伝子のエクソン 8 に **SNP** を有する繁殖犬が集中し

て用いられた可能性が高い。今後は多症例における *BMX* 遺伝子のエクソン 8 の SNP の有無を検討し、*BMX* 遺伝子の機能を詳細に検討していくことが重要と考えられる。

要約

第3章の結果より、WCP 犬には組織球性肉腫が多発すること判明した。第4章では、その原因を明らかにするため、国内の WCP 犬における過去3年間の組織球性肉腫の発生状況をしらべたところ、とくに頭蓋内と肺に多発することが明らかになった。そのため、WCP 犬は組織球性肉腫罹患リスクに関連するゲノム・遺伝子群に特有の SNP (一塩基多型) を有していると予想し、組織球性肉腫罹患症例3例および健常症例1例について、次世代シーケンサーにより全ゲノム配列を決定し、組織球性肉腫罹患症例に特有の SNP を明らかにした。罹患症例のエクソン領域に共通してみられる SNP を検出し、さらに腫瘍組織の網羅的遺伝子発現解析により、実際の腫瘍細胞で発現している遺伝子群に存在する SNP を抽出し、これらの SNP からとくに遺伝子機能への影響が大きい SNP のみを選択した。その結果、罹患症例には共通して *Bone marrow kinase gene on X chromosome (BMX)* 遺伝子のエクソン8に SNP が存在し、第237番アミノ酸が Ala から Thr へと変異し、同タンパク質の SH3 様ドメインの構造が変化することが明らかになった。BMX は JAK-STAT シグナル経路を活性化し、ヒトでは様々な腫瘍の病理発生に関与している。本研究では、イヌの組織球性肉腫でも *BMX* 遺伝子が有意に発現していることが確認された。したがって、*BMX* の変異が本腫瘍の病理発生にも関与している可能性は高い。以上の結果から、国内の WCP 犬で *BMX* 遺伝子エクソン8の SNP の検出は、組織球性肉腫罹患リスクを予測するうえで有用であると考えられた。

Case	性別	年齢	腫瘍発生部位			
			頭蓋内	肺	皮下組織	その他
1	♀	11歳2ヶ月齢	+	+		
2	♀	7歳1ヶ月齢	+	+		
3	♀	6歳齢	+			
4	♀	11歳齢	+			
5	♂	9歳齢	+			
6	♂	5歳10ヶ月齢	+			
7	♀	8歳10ヶ月齢	+			
8	♂	10歳齢	+			
9	♀	6歳齢	+			
10	♀	12歳齢	+			
11*	♀	9歳6ヶ月齢	+			
12	♂	10歳4ヶ月齢	+			
13	♀	6歳齢	+			
14	♂	8歳4ヶ月齢	+			
15	♂	9歳8ヶ月齢	+			
16	♂	13歳	+			
17	♀	5歳6ヶ月齢		+		
18	♀	8歳齢		+		眼球
19*	♀	11歳齢		+		
20	♂	8歳4ヶ月齢		+		
21	♂	7歳11ヶ月齢		+		
22	♀	13歳1ヶ月齢		+		
23	♂	11歳齢		+		
24	♂	8歳6ヶ月齢		+		
25*	♂	9歳4ヶ月齢		+		
26	♀	13歳齢		+		
27	♂	10歳齢			+	
28	♂	12歳齢			+	
29	♂	10歳齢			+	
30	♂	10歳齢				肝臓、脾臓
31	♂	9歳齢				肝臓、脾臓
32	♂	7歳齢				鼻腔
33	♀	9歳7ヶ月齢				小腸

* 血液からゲノムDNAを抽出した症例 (Case11、Case19、Case25)

Table 4-1. 組織球性肉腫罹患 WCP 犬の性別、年齢、腫瘍発生部位。

		Case11	Case19	Case25	健常症例
F3	リード数	393697571	240823403	289614414	408418654
	マップ率	77.33%	67.55%	73.33%	79.83%
F5	リード数	280333803	189898366	240936003	241647664
	マップ率	55.02%	53.27%	61.01%	47.23%
	リシークエンスゲノム カバレッジ	10.37075835	5.700071392	7.002553432	9.008062671

Table 4-2. 全ゲノムにおけるタグのカバーレージおよびリファレンスゲノムへの
マップ率。

遺伝子名	遺伝子ID	染色体	SNP座	正常塩基	SNP	エクソン	正常アミノ酸	変異後アミノ酸	腫瘍細胞における発現 (蛍光強度)
<i>BMX</i> (Bone marrow kinase gene on chromosome X)	XM_548870.2	X	11,724,700	G	A	8	Ala	Thr	871
<i>CDC123</i> (Cell division cycle 123 homolog)	XM_535189.2	2	27,031,151	T	C	11	Pro	Pro	28100
<i>FYB</i> (FYN binding protein)	XM_536495.2	4	73,054,095	A	C	14	His	Pro	899
<i>RBBP6</i> (Retinoblastoma binding protein 6)	XM_855941.1	6	24,508,479	T	C	11	Glu	Glu	3100
<i>PTPRC</i> (Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C isoform 3, precursor)	XM_547374.2	7	7,135,126	C	T	22	Gly	Gly	10100
<i>TP53BP2</i> (Tumor protein p53 binding protein, 2)	XM_547518.3	7	43,288,690	G	C	12	Val	Leu	1200
<i>NF1</i> (Neurofibromin 1)	XM_537738.2	9	44,833,206	A	G	42	Leu	Leu	2040
<i>TRIB1</i> (Tribbles homolog)	XM_539160.2	13	26,382,617	G	A	4	Pro	Pro	4640
<i>MLL5</i> (Myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia 5)	XM_533102.2	18	18,259,876	T	C	7	Ile	Ile	8110
<i>OSGIN2</i> (oxidative stress induced growth inhibitor family member 2)	XM_544167.3	29	38,393,887	T	C	6	Ile	Ile	440
<i>MAPK6</i> (Mitogen-activated protein kinase 6)	XM_535486.2	30	20,727,364	G	A	9	ORF領域外に存在		2170

Table 4-3 組織球性肉腫罹患 WCP 犬のエクソン領域に共通して存在する SNP を有する、単球・マクロファージ増殖関連遺伝子。

アミノ酸	親水性 (極性)	電荷を持つ	酸性	Asp, Glu
			塩基性	Arg, Lys, His
		電荷を持たない		Gly, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr
	疎水性 (非極性)			Ala, Val, Leu, Ile, Met, Trp, Phe, Pro

Table 4-4 アミノ酸の側鎖の性質による分類。

Human	---MDTKSILEELLKRSQKKKMSPNNYKERLFVLTKTNLSYYEYDKMKRGSRKGSIE	54	PHドメイン
Dog	---MDTKSILEELLKRSQKKKMSPNNYKERLFVLTKTNLSYYEYDKMKRGSRKGSIE	54	
Mouse	MDDNMEKSIILEELLKRSQKKKMSPNNYKERLFVLTKTNLSYYEYDKMKRGSRKGSIE	60	

Human	IKKIRCVEKVNLEEQTVERQYPFQIVYKDGLLYVYASNEESRSQWLKALQKEIRGNPHL	116	
Dog	IKKIRCVEKVNLEEQTVERQYPFQIVYKDGLLYVYASNEESRSQWLKALQKEIRGNPHL	116	
Mouse	IKKIRCVEKVNLEEQTVERQYPFQIVYKDGLLYVYASNEESRSQWLKALQKEIRGNPHL	120	

Human	LVKYHSGFFVDGKFLCCQSQCKAAPGCTLWEAYANLHTAVNEEKHRVPTFPDRVLKIPRA	176	
Dog	L IKYHSGFFVDGKFLCCQSQCKAAPGCTLWEAYADLHITTHEEKHRVPTFPDRVLKIPRA	176	
Mouse	L IKYHSGFFVDGKFLCCQSQCKAAPGCTLWEAYADLHIAISDEKHRAPTFFERLLKIPRA	180	

Human	VPVLKMDAPSSSTTLAQYDNESKKNYSQPPSSSTSLAQYDSSNKKIYGSQPNFNMQYIP	236	SH3様ドメイン
Dog	VPIFKMNEPSSSTTVAPYDSKKNYG-----SQLNANMOHF	214	
Mouse	VPVLKMDASSSGAILPQYDSYKSCG-----SQPTSNIRYIP	218	

Human	REDFPDWWQVRKLKSSSSSEDAASSNQKERN-VNHTTSKISWEFPSSSSSEEEENLDDYD	296	
Dog	REDCPDWWQVLTCKVFCRSSDDFAGSNQRERTGVNHSTSKMSWGFPESSSSSEEEENLEDYD	274	
Mouse	REDCPDWWQVRKLK---SEEDIACSNQLERNIAHSTSKMSWGFPESSSSSEEEENLHAYD	275	

Human	WFAGNISRSQSEQLLRQKGKEGAFMVRNSSQVGMYYTVSLFSKAVNDKKGTVKHYHVHTNA	356	SH2ドメイン
Dog	WFAGNISRSQSEQLLRQKGKEGAFMVRNSSQVGMYYTVSLFSKAMNDKKGTVKHYHVHTNA	334	
Mouse	WFAGNISRSQSEQLLRQKGKEGAFMVRNSSQVGMYYTVSLFSKAVNDKKGTVKHYHVHTNA	335	

Human	ENKLYLAENYCFDSIPKLIHYHQHNSAGMITRLRHPVSTKANKVPDSVSLGNGIWELKRE	416	
Dog	ENKLYLAENYCFDSIPKLIHYHQHNSAGMITRLRHPVSTKANKVPDSVSLGSGIWELKRE	394	
Mouse	ENKLYLAENYCFDSIPKLIHYHQHNSAGMITRLRHPVSTKANKVPVSVSLGSGIWELKRE	395	

Human	EITLLKELGSGQFQGVVQLGKWKQYDVAVKMIKEGSMSEDEFFQEAQTMMLKSHPKLVKF	476	
Dog	EITLLKELGSGQFQGVVHLGKWKQYDVAIKMIKEGSMSEDEFFQEAQTMMLKSHPKLVKF	454	
Mouse	EITLLKELGNGQFQGVVQLGQWKQYDVAVKMIKEGAMSEDEFFQEAQTMMLKSHPKLVKF	455	

Human	YGVCSEKYPYIYIVTEYISNGCLLNYLRSHGKGLEPSQLLEMCYDVCEGMAFLESHQFIHR	536	kinaseドメイン
Dog	YGVCSEKYPYIYIVTEYITNGCLLNYLRSHGKGLEASQLLEMCYDVCEGMAFLESHQFIHR	514	
Mouse	YGVCSEKYPYIYIVTEYITNGCLLNYLRSHGKGLESCQLLEMCYDVCEGMAFLESHQFIHR	515	

Human	DLAARNCLVDRDLGVKVSDFGMTRYVLDQYVSSVGTGFVKWSAPEVFHYFKYSSKSDV	596	
Dog	DLAARNCLVDSLVKVSDFGMTRYVLDQYVSSVGTGFVKWSAPEVFHYFKYSSKSDV	574	
Mouse	DLAARNCLVDSLVKVSDFGMTRYVLDQYVSSVGTGFVKWSAPEVFHYFKYSSKSDV	575	

Human	WAFGILMWEVFLSGKQPYDLYDNSQVVLKVSQGHRLYRPHLASDTIYQIMYSCWHELPEK	656	
Dog	WAFGILMWEVFLSGKQPYDLYDNSQVVKVSQGHRLYRPHLASDTIYQIMYGCWHELPEK	634	
Mouse	WAFGILMWEVFLSGKQPYDLYNSEVVKVSQGHRLYRPHLASDTIYQIMYSCWHELPEK	635	

Human	RPTFQQLSSIEPLREKDKH	676	
Dog	RPTFQQLSSIEPLREKDKP	654	
Mouse	RPTFQQLSAIEPLREKDKP	655	

イヌBMXの第237番アミノ酸(赤色BOX)

- A - Dog(リファレンス)
- A - 健常WCP犬
- T - 組織球性肉腫罹患WCP犬(Case 11)
- T - 組織球性肉腫罹患WCP犬(Case 19)
- T - 組織球性肉腫罹患WCP犬(Case 25)

Fig. 4-1 ヒト、イヌ、マウスにおける BMX のリファレンスアミノ酸配列の比較。イヌ（リファレンスのボクサー犬）および健常な WCP 犬の第 237 番アミノ酸は Ala であるが、組織球性肉腫に罹患した WCP 犬では、共通して Ala が Thr へと変異している。

総括

本研究では、イヌの頭蓋内腫瘍の生物学的特徴を正確に把握することを目的に、神経上皮性腫瘍、髄膜腫および組織球性肉腫の病理発生機序や進展機序を詳細に検討し、以下のような成果を得た。

第1章では、イヌの神経上皮性腫瘍の分類および組織発生に関する研究を行った。動物の神経系腫瘍のWHO分類では、腫瘍細胞が示す分化の特徴に従い大まかに神経上皮性腫瘍を分類している。しかし近年、幹細胞に関する知見が飛躍的に増加し、神経組織においても神経幹細胞の概念が確立され、従来の動物の神経上皮性腫瘍の組織診断分類や病態解釈が大きく修正される可能性がある。本章では、イヌの神経上皮性腫瘍30例について、細胞の分化や増殖に関連するマーカーの発現を免疫染色にて検索し、その結果に基づいて階層クラスター解析を行うことで、イヌの神経上皮性腫瘍の分類を再検討した。その結果、WHO分類の記載の通り、星状膠細胞性腫瘍、脈絡叢腫瘍、神経細胞腫および神経芽腫は、比較的均一な分化方向を示す腫瘍細胞より構成され、髄芽腫および原始神経外胚葉性腫瘍は極めて多彩な分化傾向を示す腫瘍細胞より構成されることが明らかになった。しかし、形態学的に稀突起膠細胞性腫瘍と診断されていた腫瘍は、原始神経外胚葉性腫瘍と同様の多彩な分化能を有する神経幹細胞の腫瘍であり、由来不明の膠細胞性腫瘍とされていた大脳膠腫症は、様々な膠細胞の反応性増生を伴う神経幹細胞の脳内浸潤亢進を特徴とする疾患であることが判明した。さらに、イヌの神経上皮性腫瘍における細胞増殖関連シグナル伝達系の関与を評価したところ、星状膠細胞性腫瘍と一部の原始神経外胚葉性腫瘍で、チロシンキナーゼ受容体であるEGFRとc-erbB2のシグナル経路の異常が腫瘍発生に関与していることが示唆された。また、多くのイヌの神経上皮性腫瘍で、Bcl-2とBcl-xLが相補的に腫瘍細胞のアポトーシスを抑制し、結果として腫瘍細胞の生存・増殖を助長していると考えられた。

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

第3章では頭蓋内原発の組織球性肉腫の病理組織学的特徴および腫瘍細胞の免疫組織化学的特徴を詳細に検討した。イヌでは近年、頭蓋内の組織球性肉腫が多く診断されるようになり、髄膜腫との鑑別が必要になっている。通常の組織球性肉腫はリンパ性組織や軟部組織に病巣を形成し、バーニーズ・マウンテン・ドッグなどの大型犬種に好発する

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

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

関与している。*BMX* 遺伝子が組織球性肉腫の腫瘍細胞でも有意に発現していることが確認されたことから、本腫瘍の病理発生に関与している可能性は高いと考えた。以上の結果から、**WCP** 犬において *BMX* 遺伝子のエクソン 8 に存在する **SNP** を検出することは、組織球性肉腫罹患リスクを予測するうえで有用と考えた。

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

謝辞

本研究を進める上で多大なご指導を頂きました東京大学農学生命科学研究科獣医病理学研究室の中山裕之 教授および内田和幸 准教授、東京大学大学院新領域創成科学研究科ゲノム制御医科学分野の菅野純夫 教授および渡邊学 助教に深く敬意を表し感謝いたします。

また、本研究を行ううえで欠かすことの出来ない貴重な臨床症例をご提供いただきました賀川由美子 先生 (病理組織検査・ノースラボ)、田村慎司 先生 (たむら動物病院)、諸角元二 先生 (戸ヶ崎動物病院)、小澤剛 先生 (おざわ動物病院)、市川美佳 先生 (日本動物高度医療センター)、稲垣武彦 先生 (日本動物高度医療センター)、二瓶和美 先生 (日本動物高度医療センター)、吉田桂子 先生 (サンリツセルコバ検査センター)、宇根智 先生 (ネオ・ベッツ VR センター)、高橋邦昭 先生 (陽だまりの動物病院) に深く感謝いたします。

参考文献

1. Affolter VK, Moore PF: 2002, Localized and disseminated histiocytic sarcoma of dendritic cell origin in dogs. *Vet Pathol* **39**:74–78.
2. Akat K, Bleck CK, Lee YM, Haselmann-Weiss U, Kartenbeck J: Characterization of a novel type of adherens junction in meningiomas and the derived cell line HBL-52. *Cell Tissue Res* **331**:401–412, 2008.
3. Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD: A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* **2**: 287–293, 2001.
4. Andersson U, Guo D, Malmer B, Bergenheim AT, Brännström T, Hedman H, Henriksson R: Epidermal growth factor receptor family (EGFR, ErbB2–4) in gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol* **108**:135–142, 2004.
5. Bagheri-Yarmand R, Mandal M, Taludker AH, Wang RA, Vadlamudi RK, Kung HJ, Kumar R: Etk/Bmx tyrosine kinase activates Pak1 and regulates tumorigenicity of breast cancer cells. *J Biol Chem* **276**: 29403–29409, 2001.
6. Bosch FX, Leube RE, Achtstätter T, Moll R, Franke WW: Expression of simple epithelial type cytokeratins in stratified epithelia as detected by immunolocalization and hybridization in situ. *J Cell Biol* **106**:1635–1648, 1988.
7. Brunner EC, Romeike BF, Jung M, Comtesse N, Meese E: Altered expression of beta-catenin/E-cadherin in meningiomas. *Histopathology* **49**:178–187, 2006.
8. Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G: Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and anti-inflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* **67**:97–103, 2000.
9. Cantile C, Campani D, Menicagli M, Arispici M: Pathological and immunohistochemical studies of choroid plexus carcinoma of the dog. *J Comp Pathol* **126**:183–193, 2002.
10. Chandra AM, Ginn PE: Primary malignant histiocytosis of the brain in a dog. *J Comp Pathol*

121:77–82, 1999.

11. Cohen I, Maoz M, Turm H, Grisaru-Granovsky S, Maly B, Uziely B, Weiss E, Abramovitch R, Gross E, Barzilay O, Qiu Y, Bar-Shavit R: Etk/Bmx regulates proteinase-activated-receptor1 (PAR1) in breast cancer invasion: signaling partners, hierarchy and physiological significance. *PLoS One* **15**:5, 2010.
12. Cory S, Adams JM: The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**:647–656, 2002.
13. Daou MC, Smith TW, Litofsky NS, Hsieh CC, Ross AH: Doublecortin is preferentially expressed in invasive human brain tumors. *Acta Neuropathol* **5**:472–480, 2005.
14. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME: Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* **13**:2905–2927, 1999.
15. Ducray F, Idbaih A, de Reynies A, Bieche I, Thillet J, Mokhtari K, Lair S, Marie Y, Paris S, Vidaud M, Hoang-Xuan K, Delattre O, Delattre JY, Sanson M: Anaplastic oligodendrogliomas with 1p19q codeletion have a proneural gene expression profile. *Mol Cancer* **20**:41, 2008.
16. Ekman N, Lymboussaki A, Väström I, Sarvas K, Kaipainen A, Alitalo K: Bmx tyrosine kinase is specifically expressed in the endocardium and the endothelium of large arteries. *Circulation* **96**: 1729-1732, 1997.
17. Eliasson C, Sahlgren C, Berthold CH, Stakeberg J, Celis JE, Betsholtz C, Eriksson JE, Pekny M: Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J Biol Chem* **274**:23996–24006, 1999.
18. Figarella-Branger D, Pellissier JF, Bouillot P, Bianco N, Mayan M, Grisoli F, Rougon G: Expression of neural cell-adhesion molecule isoforms and epithelial cadherin adhesion molecules in 47 human meningiomas: correlation with clinical and morphological data. *Mod Pathol* **7**:752–761, 1994.
19. Figarella-Branger D, Roche PH, Daniel L, Dufour H, Bianco N, Pellissier JF: Cell-adhesion molecules in human meningiomas: correlation with clinical and morphological data. *Neuropathol Appl Neurobiol* **23**:113–122, 1997.

20. Hatta K, Takeichi M: Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature* **320**:447–449, 1986.
21. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA: Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* **148**:779–790, 2000.
22. Hedan B, Thomas R, Motsinger-Reif A, Abadie J, Andre C, Cullen J, Breen M: Molecular cytogenetic characterization of canine histiocytic sarcoma: A spontaneous model for human histiocytic cancer identifies deletion of tumor suppressor genes and highlights influence of genetic background on tumor behavior. *BMC Cancer* **11**:201, 2011.
23. Hwang SL, Chai CY, Lin HJ, Howng SL: Expression of epidermal growth factor receptors and c-erbB-2 proteins in human astrocytic tumors. *Kaohsiung J Med Sci* **13**:417–424, 1997.
24. Ikegawa S: New gene associations in osteoarthritis: what do they provide, and where are we going? *Curr Opin Rheumatol* **19**: 429-434, 2007.
25. Imai Y, Iбата I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S: A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* **224**:855–862, 1996.
26. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S: Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, *Iba1*. *Brain Res Mol Brain Res* **7**:1–9, 1998.
27. Jiang X, Borgesi RA, McKnight NC, Kaur R, Carpenter CL, Balk SP. Activation of nonreceptor tyrosine kinase Bmx/Etk mediated by phosphoinositide 3-kinase, epidermal growth factor receptor, and ErbB3 in prostate cancer cells. *J Biol Chem* **282**: 32689-32698, 2007.
28. Jouhilahti EM, Peltonen S, Peltonen J: Class III beta-tubulin is a component of the mitotic spindle in multiple cell types. *J Histochem Cytochem* **56**:1113–1119, 2008.
29. Katsetos C, Legido A, Perentes E, Morik S: Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *J Child Neurol* **18**:851–866, 2003.

30. Kaukonen J, Lahtinen I, Laine S, Alitalo K, Palotie A: BMX tyrosine kinase gene is expressed in granulocytes and myeloid leukaemias. *Br J Haematol* **94**: 455-460, 1996.
31. Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ 3rd, Zody MC, Mauceli E, Xie X, Breen M, Wayne RK, Ostrander EA, Ponting CP, Galibert F, Smith DR, DeJong PJ, Kirkness E, Alvarez P, Biagi T, Brockman W, Butler J, Chin CW, Cook A, Cuff J, Daly MJ, DeCaprio D, Gnerre S, Grabherr M, Kellis M, Kleber M, Bardeleben C, Goodstadt L, Heger A, Hitte C, Kim L, Koepfli KP, Parker HG, Pollinger JP, Searle SM, Sutter NB, Thomas R, Webber C, Baldwin J, Abebe A, Abouelleil A, Aftuck L, Ait-Zahra M, Aldredge T, Allen N, An P, Anderson S, Antoine C, Arachchi H, Aslam A, Ayotte L, Bachantsang P, Barry A, Bayul T, Benamara M, Berlin A, Bessette D, Blitshteyn B, Bloom T, Blye J, Boguslavskiy L, Bonnet C, Boukhgalter B, Brown A, Cahill P, Calixte N, Camarata J, Cheshatsang Y, Chu J, Citroen M, Collymore A, Cooke P, Dawoe T, Daza R, Decktor K, DeGray S, Dhargay N, Dooley K, Dooley K, Dorje P, Dorjee K, Dorris L, Duffey N, Dupes A, Egbiremolen O, Elong R, Falk J, Farina A, Faro S, Ferguson D, Ferreira P, Fisher S, FitzGerald M, Foley K, Foley C, Franke A, Friedrich D, Gage D, Garber M, Gearin G, Giannoukos G, Goode T, Goyette A, Graham J, Grandbois E, Gyaltzen K, Hafez N, Hagopian D, Hagos B, Hall J, Healy C, Hegarty R, Honan T, Horn A, Houde N, Hughes L, Hunnicutt L, Husby M, Jester B, Jones C, Kamat A, Kanga B, Kells C, Khazanovich D, Kieu AC, Kisner P, Kumar M, Lance K, Landers T, Lara M, Lee W, Leger JP, Lennon N, Leuper L, LeVine S, Liu J, Liu X, Lokyitsang Y, Lokyitsang T, Lui A, Macdonald J, Major J, Marabella R, Maru K, Matthews C, McDonough S, Mehta T, Meldrim J, Melnikov A, Meneus L, Mihalev A, Mihova T, Miller K, Mittelman R, Mlenga V, Mulrain L, Munson G, Navidi A, Naylor J, Nguyen T, Nguyen N, Nguyen C, Nguyen T, Nicol R, Norbu N, Norbu C, Novod N, Nyima T, Olandt P, O'Neill B, O'Neill K, Osman S, Oyono L, Patti C, Perrin D, Phunkhang P, Pierre F, Priest M, Rachupka A, Raghuraman S, Rameau R, Ray V, Raymond C, Rege F, Rise C, Rogers J, Rogov P, Sahalie J, Settupalli S, Sharpe T, Shea T, Sheehan M, Sherpa N, Shi J, Shih D, Sloan J, Smith C, Sparrow T, Stalker J, Stange-Thomann N, Stavropoulos S, Stone C, Stone S, Sykes S, Tchuinga P, Tenzing P, Tesfaye S, Thoulutsang D, Thoulutsang Y, Topham K, Topping I, Tsamla T, Vassiliev H, Venkataraman V, Vo A, Wangchuk T, Wangdi T, Weiland M, Wilkinson J, Wilson A, Yadav S, Yang S, Yang X, Young G, Yu Q, Zainoun J, Zembek L, Zimmer A, Lander ES : Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* **438**: 803-819, 2005.

32. Kleihues P, Cavenee WK: Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System, pp. 2–10. IARC, Lyon, France, 1997.
33. Koestner A, Bilzer T, Fatzer R, Schulman FY, Summers BA, Van Winkle TJ: Histological Classification of Tumors of the Nervous System of Domestic Animals, 2nd series, vol. 5, pp. 17–33. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1999.
34. Komohara Y, Hirahara J, Horikawa T, , Kawamura K, Kiyota E, Sakashita N, Araki N, Takeya M: AM-3K, an anti-macrophage antibody, recognizes CD163, a molecule associated with an anti-inflammatory macrophage phenotype. *J Histochem Cytochem* **54**:763–771, 2006.
35. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M: 2008, Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol* **216**:15–24.
36. Lallemand D, Curto M, Saotome I, Giovannini M, McClatchey AI: NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilising adherens junctions. *Genes Dev* **17**:1090–1100, 2003.
37. Lariviere RC, Julien JP: Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol* **58**:131–148, 2004.
38. Ma YH, Mentlein R, Knerlich F, Kruse ML, Mehdorn HM, Held-Feindt J: Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol* **86**:31–45, 2008.
39. Mandell JW, Hussaini IM, Zecevic MJ, VandenBerg SR: In situ visualization of intra tumor growth factor signaling: immunohistochemical localization of activated ERK/MAP kinase in glial neoplasms. *Am J Pathol* **153**:1411–1423, 1998.
40. Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, Nakamura S, Baba S, Moriya Y, Hirohashi S: Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer. *Oncology* **59**:302–309, 2000.
41. Masui K, Mawatari SY, Suzuki SO, Iwaki T: Evaluation of sensitivity and specificity of doublecortin immunostaining for the detection of infiltrating glioma cells. *Brain Tumor Pathol* **25**:1–7, 2008.

42. Meese E, Blin N, Zang KD: Loss of heterozygosity and the origin of meningioma. *Hum Genet* **77**:349–351, 1987.
43. Montoliu P, Anor S, Vidal E, Pumarola M: Histological and immunohistochemical study of 30 cases of canine meningioma. *J Comp Pathol* **135**:200–207, 2006.
44. Nars M, Vihinen M: Coevolution of the domains of cytoplasmic tyrosine kinases. *Mol Biol Evol* **18**: 312–321, 2001.
45. Nieder C, Schlegel J, Andratschke N, Thamm R, Grosu AL, Molls M: The role of growth factors in central nervous system tumors. *Anticancer Res* **23**:1681–1686, 2003.
46. Panagopoulos AT, Lancelotti CLP, Veiga JCE, de Aguiar PHP, Colquhoun A: Expression of cell adhesion proteins and proteins related to angiogenesis and fatty acid metabolism in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *J Neurooncol* **89**:73–87, 2008.
47. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P: An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**:1807–1812, 2008.
48. Platt N, Gordon S: Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional?—The mouse's tale. *J Clin Invest* **108**:649–654, 2001.
49. Ribas JL, Mena H, Braund KG, Sesterhenn IA, Toivio-Kinnucan M: A histological and immunohistochemical study of choroid plexus tumors of the dog. *Vet Pathol* **26**:55–64, 1989.
50. Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, Delattre O, Thomas G, Nordenskjöld M, Collins VP, Dumanski JP, Rouleau GA: Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet* **6**:180–184, 1994.
51. Sakai H, Noda A, Shirai N, Iidaka T, Yanai T, Masegi T: Proliferative activity of canine mast cell tumours evaluated by bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 expression. *J Comp Pathol* **127**:233–238, 2002.
52. Schiffer D: Brain Tumor Pathology: Current Diagnostic Hotspots and Pitfalls, pp. 3–27.

Springer, Dordrecht, Netherlands, 2006.

53. Schiffer D, Cavalla P, Migheli A, Giordana MT, Chiado`-Piat L: Bcl-2 distribution in neuroepithelial tumors: an immunohistochemical study. *J Neurooncol* **27**:101–109, 1996.
54. Schiffer D, Manazza A, Tamagno I: Nestin expression in neuroepithelial tumors. *Neurosci Lett* **400**:80–85, 2006.
55. Schlegel J, Piontek G, Mennel HD: Activation of the antiapoptotic Akt/protein kinase B pathway in human malignant gliomas in vivo. *Anticancer Res* **22**:2837–2840, 2002.
56. Shimada S, Ishizawa K, Hirose T: Expression of E-cadherin and catenins in meningioma: ubiquitous expression and its irrelevance to malignancy. *Pathol Int* **55**:1–7, 2005.
57. Smith CI, Islam TC, Mattsson PT, Mohamed AJ, Nore BF, Vihinen M: The Tec family of cytoplasmic tyrosine kinases: mammalian Btk, Bmx, Itk, Tec, Txk and homologs in other species. *Bioessays* **23**: 436-446, 2001.
58. Stoica G, Kim HT, Hall DG, Coates JR: Morphology, immunohistochemistry, and genetic alterations in dog astrocytomas. *Vet Pathol* **41**:10–19, 2004.
59. Sulahian TH, Pioli PA, Wardwell K, Guyre P: Crosslinking of FcR triggers shedding of the haemoglobinhaptoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* **76**:271–277, 2004.
60. Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A: Tumors of the central nervous system. In: *Veterinary Neuropathology*, pp. 351–401. Mosby, St. Louis, MO, 1995.
61. Takesono A, Finkelstein LD, Schwartzberg PL: Beyond calcium: new signaling pathways for Tec family kinases. *J Cell Sci* **115**: 3039-3048, 2002.
62. Tamura S, Tamura Y, Nakamoto Y, Ozawa T, Uchida K: MR imaging of histiocytic sarcoma of the canine brain. *Vet Radiol Ultrasound* **50**:178–181, 2009.
63. Thio T, Hilbe M, Grest P, Pospischil A: Malignant histiocytosis of the brain in three dogs. *J Comp Pathol* **134**:241–244, 2006.

64. Toyoda A, Fujiyama A: Next-generation sequencing. *Exp med* **27**: 1929-1935, 2009.
65. Uchida K, Morozumi M, Yamaguchi R, Tateyama S: Diffuse leptomenigeal malignant histiocytosis in the brain and spinal cord of a Tibetan Terrier. *Vet Pathol* **38**:219–222, 2001.
66. Utsuki S, Oka H, Sato Y, Kawano N, Tsuchiya B, Kobayashi I, Fujii K: Invasive meningioma is associated with a low expression of E-cadherin and beta-catenin. *Clin Neuropathol* **24**:8–12, 2005.
67. Van Aken E, De Wever O, Correia da Rocha AS, Mareel M: Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch* **439**:725–751, 2001.
68. Weil D, Power MA, Smith SI, Li CL: Predominant expression of murine Bmx tyrosine kinase in the granulo-monocytic lineage. *Blood* **90**: 4332-4340, 1997.
69. Weinberg RA: Moving out: invasion and metastasis. In: *The Biology of Cancer*, pp. 587–654. Garland Science, New York, NY, 2007.
70. Zimmerman K, Almy F, Carter L, Higgins M, Rossmeisl J, Inzana K, Duncan R: Cerebrospinal fluid from a 10-year-old dog with a single seizure episode. *Vet Clin Pathol* **35**:127–131, 2006.

原著論文

1. Ide T, Uchida K, Kikuta F, Suzuki K, Nakayama H. Immunohistochemical Characterization of Canine Neuroepithelial Tumors. *Vet Pathol* **47**:741-750, 2010.
2. Ide T, Uchida K, Suzuki K, Kagawa Y, Nakayama H. Expression of Cell Adhesion Molecules and Doublecortin in Canine Anaplastic Meningiomas. *Vet Pathol* **48**:292-301, 2011.
3. Ide T, Uchida K, Suzuki K, Kagawa Y, Nakayama H. Pathological and Immunohistochemical Features of Subdural Histiocytic Sarcomas in 15 Dogs. *J Vet Diagn Invest* **23**:127-132, 2011.