

博士論文

論文題目 イヌの神経堤由来腫瘍に関する病理学的研究

氏名 鈴木 聡

目次

緒論	1
第1章 悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNSTs)と血管周壁腫瘍(PWTs)に関する病理学的研究	
1-1 MPNSTsの由来細胞の特定、発生部位による病理組織学的、免疫組織化学的相違の検討、および診断基準の確立	
序	5
材料と方法	7
結果	10
考察	12
要約	14
図表	15
1-2 MPNSTsとPWTsの鑑別診断に関する病理学的研究	
序	24
材料と方法	26
結果	28
考察	30
要約	32
図表	33
第2章 舌の顆粒細胞腫瘍(GCTs)の由来と細胞質内顆粒形成に関する病理学的研究	
序	40
材料と方法	42
結果	45
考察	48
要約	51
図表	52
第3章 MPNSTs、GCTs、PWTsの細胞学的特徴とがん幹細胞様細胞の検索	
序	59
材料と方法	61
結果	64
考察	67
要約	71
図表	72
総括	83
謝辞	88
参考文献	89

緒論

神経堤は、脊椎動物の発生期において、神経板背側と表皮との間の領域（神経板境界）に神経管の全長に亘って形成される分節状の細胞集塊である。神経堤細胞は上皮間葉転換能と移動能を有し胚の広範囲に分布する。したがって、これら神経堤細胞に由来する腫瘍は生体内の様々な部位に発生する可能性がある。また、神経堤細胞は万能性を有し、色素細胞、神経細胞、末梢神経系の感覚神経節細胞、自律神経節のグリア細胞、内分泌細胞、頭頸部の結合組織細胞、さらには腱、軟骨、骨、血管平滑筋への分化能を有する間葉系細胞など神経系、非神経系の様々な細胞に分化する^{10,12,56}。

末梢神経鞘腫瘍(peripheral nerve sheath tumors: PNSTs)は、ヒトでは Schwann 細胞、神経周膜細胞、またはその両方に由来するとされ、とくに悪性末梢神経鞘腫瘍(malignant PNSTs: MPNSTs)については、その予後の悪さから、免疫組織化学的特徴、病理発生、遺伝学的基礎、予後因子、治療戦略などの研究が積極的に行われている^{11,24,25,37,50,57,58,71}。ヒトの MPNSTs の診断基準として最も重要なものは、腫瘍細胞が末梢神経鞘に由来することの証明であるが、これは軟部組織や体腔内諸臓器に発生した MPNSTs ではしばしば困難であり、形態学的、免疫組織化学的、および超微形態学的検索により、Schwann 細胞への分化を反映する所見が認められる必要がある⁷¹。一方、イヌの MPNSTs については、十分な検索が行われておらず、その起源や診断基準は未確定で、軟部組織や体腔内諸臓器に発生した MPNSTs の診断はとりわけ困難である。線維肉腫や、近年、血管周壁腫瘍(perivascular wall tumors: PWTs)への再分類が提唱されている^{1,41}。イヌの血管周皮腫(canine hemangiopericytomas: CHPs)など、軟部組織に発生し、組織学的特徴が類似する他の紡錘形細胞腫瘍との鑑別診断は非常に困難である。最新の動物の WHO 腫瘍分類においても、その鑑別診断については、曖昧なままである^{18,26}。

小動物臨床領域では、イヌの MPNSTs と PWTs (CHPs)を同一腫瘍とし、軟部組織に発生する他の紡錘形細胞腫瘍とともに、「軟部組織肉腫」(soft tissue sarcomas: STSs)として

一括して扱う傾向にある。STSs の治療の第一選択肢は外科的切除であり、化学療法や放射線療法は補助的治療選択肢に過ぎない³⁰。MPNSTs や PWTs は浸潤性が強く、完全切除が困難で、再発することが多いが、有効な化学療法や放射線療法の報告はなく、治療が困難となる場合が多い。MPNSTs については、神経束に沿って浸潤するため、中枢神経系に浸潤した場合、その予後は不良となる。分子標的療法など、MPNSTs や PWTs に対する有効な新規治療法の開発を考えると、正確な診断や類似する腫瘍の鑑別診断のみならず、由来細胞や増殖、分化にかかわる因子の解明が重要となる。

Schwann 細胞に由来するとされるもう一つの腫瘍として、顆粒細胞腫瘍(*granular cell tumors: GCTs*)が挙げられる。GCTs は、好酸性微細顆粒を含む豊富な細胞質を有する腫瘍細胞が特徴で、ヒトとイヌでは、舌に発生することが多い^{44,48}。GCTs の多くは良性の経過をたどり、周囲組織への浸潤性も示さないが、まれに悪性 GCTs が発生する^{17,48}。ヒトにおける近年の研究では、腫瘍細胞の由来は Schwann 細胞であるとされ^{17,31,38,46,48,55}、細胞質内顆粒については、オートファゴソームまたはオートファゴリソソームであることが示唆されている^{31,38,55}。動物では GCTs の由来は確定しておらず、細胞質内顆粒の詳細な検索も十分に行われていない。同一の起源を有する MPNSTs と GCTs の形態学的特徴や生物学的挙動が異なる理由を解明することは、腫瘍細胞と微小環境との相互作用、腫瘍細胞の分化についての理解を深め、新規治療法開発の一助となると考えられる。

神経堤には、万能性を有する幹細胞の存在が示唆されている。幹細胞は、自己複製能と分化能の両方を有する細胞であり、胚における万能性幹細胞を始め、成体の血液、小腸、表皮といった代謝回転の早い組織のみならず、脳、骨格筋、前立腺といった一般に最終分化組織と考えられてきた臓器にも存在する。最も未分化な幹細胞は休止状態にあると考えられているが、必要時には顕著な増殖能を示す⁶⁵。がん幹細胞(*cancer stem cells: CSCs*)は、連続的に移植可能な腫瘍を作る能力を持つ幹細胞で、移植後の腫瘍においても、親腫瘍と類似の細胞および組織構築上の不均一性が保たれる。悪性度が高いほどその腫瘍内に存在する幹

細胞様がん細胞は多くなる可能性がある⁶⁵。腫瘍の増殖を説明するモデルとして、クローン進化モデルと CSCs モデルが提唱されている⁷⁰。クローン進化モデルでは、突然変異の蓄積により腫瘍原性を有するクローンが生じる。腫瘍内に存在する細胞に多様性が生じることで、腫瘍の細胞構成が不均一となる。CSCs モデルでは、前駆細胞における突然変異により、幹細胞様の性質を有する CSCs が生じる。CSCs は自己複製能と腫瘍原性を有し、分化によってさまざまな腫瘍細胞を生み出すことで、腫瘍の細胞構成が不均一となる。腫瘍の放射線療法や化学療法に対する抵抗性や再発のメカニズムは CSCs モデルで説明されるが、両モデルは協働することも示唆されている⁷⁰。CSCs の存在様式は複数提唱されており、腫瘍の根治には、腫瘍内に存在するすべての CSCs の駆逐が必要となる。さらに、孤在性腫瘍では遺伝子の不安定性が著しく、持続的な緩解を達成するためには、CSCs と non-CSCs の両方を標的とすることも必要になる可能性がある⁷⁰。このような複雑性から、治療抵抗性を示す腫瘍に対する新規治療戦略を開発するために、CSCs に関するさらなる研究が求められている。

これまで、医学領域において、乳腺腫瘍、膵臓癌、肺癌、肝臓腫瘍、膀胱腫瘍などの上皮系腫瘍で CSCs が認められており⁶⁵、MPNSTs においても CSCs 様細胞の存在が示唆されているが⁵⁷、動物の MPNSTs における CSCs に関する研究はない。MPNSTs に CSCs が存在するか否かを検討することは、新規治療戦略を考案する糸口として有益である。また、同じく神経堤由来と考えられている GCTs と、由来が異なる腫瘍でありながら、MPNSTs と組織学的特徴、生物学的挙動が酷似する PWTs についても、CSCs の存在の可能性を検討し、それぞれの腫瘍における増殖、分化にかかわる因子の相違を明らかにすることは、STSs として一括して扱われている腫瘍群の新規治療法を考案する上で、重要であると考えられる。

本論文は、1) イヌの MPNSTs の由来細胞の特定と診断基準の確立、2) MPNSTs と PWTs の鑑別診断に有用なマーカーの探索、3) GCTs の由来細胞の特定と、GCTs の細胞質内顆粒

の性状の解析、4) これらの腫瘍における CSCs の存在の可能性を検討することを目的とする。第 1 章の第 1 項(1-1)では、ヒトでは Schwann 細胞、神経周膜細胞またはその両方に由来するとされる MPNSTs について、イヌにおける由来細胞を特定し、正確な診断基準を確立することを目的とする。また、第 2 項(1-2)では、病理組織学的特徴が酷似し、以前から鑑別診断が困難で、同一の腫瘍として扱われる傾向さえある MPNSTs と PWTs との鑑別診断に有用なマーカーの探索を行う。第 2 章では、同じくヒトで神経堤細胞由来とされる GCTs について、イヌにおける由来細胞の特定、細胞質内顆粒の性質の解明を行う。第 3 章では、これら神経堤由来とされる MPNSTs と GCTs に加えて、由来が異なりながら、MPNSTs と組織学的特徴、生物学的挙動が酷似する PWTs における CSCs の存在の可能性を検討する。これらにより、STSs として一括して取り扱われる傾向にある腫瘍群について、より正確な病理組織学的診断と新規治療戦略開発への糸口の示唆ができるものと期待される。

第 1 章

悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNSTs)と血管周壁腫瘍(PWTs)に関する病理学的研究

1-1 MPNSTs の由来細胞の特定、発生部位による病理組織学的、 免疫組織化学的相違の検討、および診断基準の確立

序

末梢神経鞘腫瘍(peripheral nerve sheath tumors: PNSTs)は末梢神経系(peripheral nervous system: PNS)のみならず、軟部組織や体腔内諸臓器(non-PNS)にも発生する。PNSTs は紡錘形または多角形の腫瘍細胞で構成され、不規則に交錯する束状配列、渦状配列、花筈状配列、シート状配列、および核の柵状配列を形成する。間質にはさまざまな程度の膠原線維増生を伴っている^{16,18,26,27,50,71}。腫瘍細胞は、Schwann 細胞、神経周膜細胞またはその両方に由来するとされる。ヒトの悪性末梢神経鞘腫瘍(malignant PNSTs: MPNSTs)は、その予後の悪さから、免疫組織化学的特徴、病理発生、遺伝学的基礎、予後因子、治療戦略などについて積極的に研究されているが^{11,24,25,37,50,57,58,71}、獣医学領域では、PNSTs に関する報告は多数あるものの^{2,7,15-18,26-28,43,52,53,61,63,67,68,73}、その診断基準、組織発生、細分類、免疫組織化学的特徴などはほとんど研究されていない。

ヒトの PNSTs の診断基準で最も重要なものは、腫瘍細胞が末梢神経鞘に由来することの証明である⁷¹。PNS に発生した PNSTs では、末梢神経鞘構成成分を検出することは容易であるが、non-PNS に発生した PNSTs では困難である。イヌの MPNSTs では、末梢神経鞘に由来することの証明ができない場合に、non-PNS に発生した MPNSTs の診断に形態学的特徴の類似性が適用可能か否かは確定されていない。また、線維肉腫や、近年、血管周壁腫瘍(perivascular wall tumors: PWTs)への再分類が提唱されている^{1,41}イヌの血管周皮

腫(canine hemangiopericytomas: CHPs)など、軟部組織に発生する他の紡錘形細胞腫瘍との鑑別診断は特に困難である^{33,45}。このような鑑別診断には、まずPNSに発生したMPNSTsについて、形態学および免疫組織化学的特徴を明確にし、MPNSTsの腫瘍発生部位ごとの相違を明らかにし、有用な診断基準を確立することが、特に重要である。

本項では、イヌのMPNSTsの腫瘍発生部位における由来細胞の特定と、発生部位による病理学的特徴の相違の解明、および有用な診断基準の確立を目的として、PNSに発生したMPNSTs 16例とnon-PNSに発生したMPNSTs 14例について、病理組織学および免疫組織化学的特徴を調べて定量化し統計学的解析を行った。

【症例】

2008年から2011年に東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室において、病理組織学的にMPNSTと診断された紡錘形細胞腫瘍30例を対象とした。症例の情報と腫瘍発生部位はTable 1-1に示した。これらの腫瘍はすべて、切除生検または外科的完全切除により得た。30例中16例(症例1~16)はPNSに発生し、14例(症例17~30)はnon-PNSに発生した。non-PNSに発生したものでは、6例(症例17~22)が皮下組織に、4例(症例23~26)が腹腔内臓器に、2例(症例27と28)が歯肉に、1例(症例29)が鼻腔内に、1例(症例30)が右肩甲骨周囲の軟部組織に発生していた。症例11、18、26、27は再発腫瘍であった。症例25と26は転移巣であり、開腹手術によって切除された。30例の平均年齢は 10.3 ± 2.0 歳(7歳~13歳8ヶ月齢)であった。性別は、19例が雄(うち10例は去勢済み)、11例が雌(うち6例は避妊済み)であった。

【病理組織学的検索】

腫瘍はすべて10%リン酸緩衝ホルマリン水溶液で固定し、厚さ2~4 μm のパラフィン包埋ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色標本を作製した。MPNSTの診断には、先行研究の所見^{16,18,26,27,71}を改変した以下の病理組織学的診断基準を用いた。

- (1) 紡錘形腫瘍細胞の不規則な束状交錯状配列、渦状配列、シート状配列からなり、核の柵状配列を示し、さまざまな程度で間質の膠原線維増生を伴う。
- (2) Schwann細胞および/または神経周膜細胞を伴う末梢神経枝が認められ、末梢神経鞘由来が示唆される。
- (3) 腫瘍細胞がある程度の多形性を示し、周囲組織への浸潤が認められる。また、腫瘍内に壊死巣が存在する。

【免疫組織化学的検索】

本項の検索に使用した一次抗体を Table 1-2 に示した。S100、claudin-1、CD57、PRX、desmin、calponin については、抗原賦活処理として、脱パラフィン標本をクエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 121°C 10 分間オートクレーブ処理した。Olig2 については、Target Retrieval Solution (pH 9.0; DAKO, Glostrup, Denmark) 中で 121°C 10 分間オートクレーブ処理した。nestin、NGFR、 α -SMA、neurofilament については、抗原賦活処理は行わなかった。内因性ペルオキシダーゼ活性は、3%過酸化水素加メタノールで室温 5 分間処理し、不活化した。非特異反応は、8%スキムミルク加トリス緩衝生理食塩液(Tris-buffered saline: TBS)で 37°C 30 分間処理し、抑制した。一次抗体との反応は 4°Cで一晩行った。TBS で 3 回洗浄後、Dako EnVision+ System[®] 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ポリマー抗マウス二次抗体または抗ウサギ二次抗体(DAKO)との反応を、室温 10 分間、37°C 40 分間、さらに室温 10 分間行った。TBS で 3 回洗浄後、0.05% 3-3'-ジアミノベンジジンおよび 0.03%過酸化水素加トリス塩酸緩衝液で発色した。後染色にはマイヤーのヘマトキシリンを用いた。陽性コントロールには、5 歳 4 ヶ月齢の神経疾患を持たないパグ犬の腕神経叢の組織切片を用いた。desmin の内因性陽性コントロールには、横紋筋を用いた。陰性コントロールには、一次抗体の代わりに TBS を用いた。各切片について、無作為に抽出した 400 倍 10 視野における陽性細胞数を計数し、各マーカーに対する陽性細胞率を算出した。

【統計学的解析】

統計学的解析には、SPSS 15.0 J (SPSS Japan, Tokyo, Japan)を用いた。各マーカーの発現の相関関係を調べるために、Spearman の相関係数を算出した。PNS に発生した MPNSTs の平均陽性細胞率と non-PNS に発生した MPNSTs の平均陽性細胞率の間の有意差を調べるために、Mann-Whitney の *U* 検定を行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

【クラスター解析】

PNS に発生した MPNSTs と non-PNS に発生した MPNSTs の免疫組織化学的特徴の相

違を調べるために、各マーカーに対する陽性細胞率について、SPSS 15.0 J を用いた Ward 法による多変量クラスター解析を行い、クラスター間の平方ユークリッド距離により、デンドログラムを作成した。

結果

【病理組織学的検索】

上述した診断基準に従い、検索したすべての腫瘍を病理組織学的に MPNST と診断した。PNS に発生した MPNSTs と non-PNS に発生した MPNSTs とで、病理組織学的特徴に違いはなかった。腫瘍は紡錘形細胞で構成され、腫瘍細胞は束状に交錯し、しばしば柵状配列、渦状配列を認めた。また、ときおり、波状の細胞質と核が認められた。腫瘍増殖巣内部には壊死巣が認められ、周囲組織への浸潤も認められた。non-PNS に発生した MPNSTs に、末梢神経枝は認められなかった。

【免疫組織化学的検索】

正常末梢神経鞘構成細胞と MPNSTs の腫瘍細胞における各マーカーの発現部位を Table 1-3 に示した。また、Figure 1-1a-j に正常末梢神経鞘構成細胞における各マーカーの発現パターンを示した。イヌの正常末梢神経鞘では、過去の報告^{3,5,7,21}と同様に、S100、NGFR、claudin-1、CD57 が陽性であった。一方、nestin、Olig2、PRX は正常末梢神経鞘でも発現が認められた。S100 の発現は、Schwann 細胞の核と細胞質に認められた(Figure 1-1a)。Nestin の発現は、血管内皮細胞の細胞質と少数の Schwann 細胞の細胞質に認められた(Figure 1-1b)。NGFR の発現は神経周膜細胞の細胞膜に認められた(Figure 1-1c)。Olig2 の発現は、Schwann 細胞の細胞質に認められた(Figure 1-1d)。claudin-1 の発現は神経周膜細胞の細胞膜に認められた(Figure 1-1e)。CD57 の発現は髄鞘と Schwann 細胞の細胞膜に認められた。(Figure 1-1f)。PRX の発現は髄鞘と Schwann 細胞の核および細胞膜に認められた(Figure 1-1g)。α-SMA の発現は神経周膜と血管平滑筋細胞に認められた(Figure 1-1h)。Neurofilament の発現は軸索に認められた。desmin と calponin の発現は末梢神経鞘では認められなかった(Figure 1-1i、1-1j)。

MPNSTs における各マーカーの発現パターンを Figure 1-2a-n に、各マーカーに対する

腫瘍細胞の陽性細胞率を Table 1-4 に示した。腫瘍細胞の陽性細胞率は症例ごとに大きく異なっていた。S100 (29/30: 96.7%の症例が陽性)、nestin (28/30: 93.3%の症例が陽性)、Olig2 (27/30: 90.0%の症例が陽性)、PRX (12/30: 40.0%の症例が陽性) の発現は腫瘍細胞の核あるいは細胞質に認められた。NGFR (21/30: 70.0%の症例が陽性)、claudin-1 (21/30: 70.0%の症例が陽性)、CD57 (18/30: 60.0%の症例が陽性) の発現は腫瘍細胞の細胞質に認められた(Figure 1-2a-n)。 α -SMA、desmin、calponin の発現は認められなかった。non-PNS に発生した MPNSTs では neurofilament 陽性の末梢神経軸索は認められなかった。

【統計学的解析】

MPNSTs の症例における各マーカーに対する陽性細胞率間の Spearman の相関係数解析の結果を、Table 1-5 に示した。S100 と Olig2 間、nestin と PRX 間、NGFR と CD57 間、Olig2 と CD57 間、CD57 と PRX 間、PRX と desmin 間で中程度の正の相関が認められた。Mann-Whitney の *U* 検定の結果、S100 の平均陽性細胞率 (PNS に発生した MPNSTs : 63.5%、non-PNS に発生した MPNSTs : 34.4%) と Olig2 の平均陽性細胞率 (PNS に発生した MPNSTs : 36.4%、non-PNS に発生した MPNSTs : 18.8%)、claudin-1 の平均陽性細胞率 (PNS に発生した MPNSTs : 26.5%、non-PNS に発生した MPNSTs : 12.2%) は、PNS と non-PNS 間で統計学的有意差があることが確認された(Table 1-4: *, Figure 1-3)。

【クラスター解析】

クラスター解析の結果、MPNSTs は、PNS 群と non-PNS 群の二群には分けられなかった(Figure 1-4)。

考察

S100 と claudin-1 は、それぞれ Schwann 細胞と神経周膜細胞のマーカーであり^{9,14,54,66,71}、イヌの MPNSTs で S100 と claudin-1 の発現が認められたことは、腫瘍細胞の Schwann 細胞あるいは神経周膜細胞への分化傾向を示している。nestin は、ヒト医学領域において、神経外胚葉性幹細胞とがん幹細胞のマーカーとして用いられてきた^{54,57}。本研究で nestin の発現が MPNSTs の腫瘍細胞で認められたことは、神経堤幹細胞あるいはがん幹細胞様細胞がイヌの MPNSTs に存在するというを示唆する。NGFR は Schwann 細胞の分化マーカー^{4,36}に加えて、神経堤前駆細胞または幹細胞のマーカー^{10,57}として用いられてきた。MPNSTs における NGFR の発現についての過去の報告^{7,21}によれば、ヒトの MPNSTs では 10 例中 10 例が、イヌの MPNSTs では 11 例中 7 例が NGFR 陽性であることが示されている。本研究では、30 例中 21 例(70.0%)の MPNSTs が NGFR 陽性であり、イヌの MPNSTs には、未分化な Schwann 細胞あるいは神経堤幹細胞が構成成分の一つとして存在することが示唆された。Olig2 は稀突起膠細胞と中枢神経系前駆細胞のマーカーである³。ヒトでは、稀突起膠細胞と稀突起膠細胞腫の腫瘍細胞で発現しているが、Schwann 細胞と Schwann 細胞腫の腫瘍細胞では発現していないとされている⁷⁵。一方、Olig2 の発現はイヌの正常 Schwann 細胞または MPNSTs では、これまで調べられたことはなかった。本研究の結果、ほぼすべての MPNSTs (27/30: 90.0%)に Olig2 陽性腫瘍細胞が認められた。この結果から、イヌの MPNSTs では、Olig2 が発現することが示された。CD57 は、ヒトでは、Schwann 細胞に対する細胞型特異的マーカーである^{4,71}。また、PRX は、Schwann 細胞に由来するタスマニアンデビル(*Sarcophilus harissii*)の Devil's facial tumor disease の診断マーカーとして用いられている⁶⁷。イヌと Sprague-Dawley ラットを用いた過去の研究で、ミエリン形成性 Schwann 細胞に CD57 と PRX の発現が認められている^{4,51}。しかしながら、これらの発現は、イヌの MPNST では調べられたことはない。本研究では、半

数の MPNSTs のみが CD57 (18/30: 60.0%)あるいは PRX (12/30: 40.0%)を発現した。発現強度は弱陽性から中程度陽性であった。これらの結果から、イヌの MPNSTs の腫瘍細胞におけるミエリン形成性 Schwann 細胞への分化度は低いということが示唆される。α-SMA と calponin は平滑筋に特異的な抗体で、desmin は横紋筋に特異的な抗体である。本研究では、MPNSTs に α-SMA と calponin の発現は認められなかったが、2 例 (症例 10 と 20) だけは desmin に陽性であった。この結果から、MPNSTs は平滑筋には分化しないが、ヒトの MPNSTs のうち、横紋筋芽細胞への分化が認められる Triton 腫瘍⁷¹と同様に、横紋筋への分化を示す例もあることが示された。また、Spearman の相関係数解析の結果は、イヌの MPNSTs の Schwann 細胞への分化を示すものと考えられる。

診断基準が確立されていないことから、イヌでも、末梢神経鞘起源の証明ができない状態での non-PNS に発生した MPNSTs の確定診断は困難である。そのため、PNS に発生した MPNSTs の免疫組織化学的特徴に基づいて、non-PNS に発生した MPNSTs のそれを確認することが必要である。本研究では、PNS に発生した MPNSTs で、S100 と Olig2、claudin-1 の発現強度が、non-PNS に発生した MPNSTs よりも有意に強かったが、他の抗原の発現強度には、両者で統計学的有意差はなかった。さらに、クラスター解析でも、PNS に発生した MPNSTs と non-PNS に発生した MPNSTs は二つの異なるクラスターには分かれなかった。これらのことから、イヌの MPNSTs は、発生部位にかかわらず、Schwann 細胞、神経周膜細胞に由来し、ほぼ同一の形態学および免疫組織化学的特徴を有していることと、ヒトの MPNSTs の診断基準が適用可能であることが示唆された。

MPNSTs と他の紡錘形細胞腫瘍、とくに PWTs との鑑別診断も、形態学的特徴のみでは困難である。第 2 項(1-2)では、イヌの MPNSTs と PWTs の鑑別診断に有用なマーカーについて検証する。

要約

イヌの悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNSTs)は末梢神経系(PNS)のみならず、軟部組織やさまざまな臓器(non-PNS)にも発生する。ヒトの MPNSTs における最も重要な診断基準は、末梢神経鞘に由来することの証明であるが、これは、non-PNS に発生した MPNSTs では困難である。一方、イヌの MPNSTs では明確な診断基準が確立しておらず、non-PNS に発生した MPNSTs と、線維肉腫や血管周壁腫瘍といった、類似した病理組織学的特徴を有する紡錘形細胞腫瘍との鑑別診断は困難である。イヌの MPNSTs の由来を特定し、ヒトの MPNSTs の診断基準が適用可能か否か、また、non-PNS に発生した MPNSTs の診断に、PNS に発生した MPNSTs と同様の形態学的特徴を適用できるかを明らかにするために、PNS に発生した MPNSTs 16 例と non-PNS に発生した MPNSTs 14 例における病理組織学的特徴を調べた。また、S100、nestin、NGFR、Olig2、claudin-1、CD57、PRX、 α -SMA、desmin、calponin の発現を免疫組織化学的に調べた。その結果、イヌの MPNSTs の病理組織学的特徴は、発生部位が PNS か non-PNS にかかわらず類似していた。また、免疫組織化学的特徴は、PNS に発生した MPNSTs では、S100 と Olig2、claudin-1 の発現が non-PNS に発生した MPNSTs よりも有意に強かった。その他のマーカーの発現には、発生部位による有意差は認められなかった。クラスター解析でも、PNS に発生した MPNSTs と non-PNS に発生した MPNSTs とが二つの群には分かれなかった。これらのことから、イヌの MPNSTs はその発生部位にかかわらず、Schwann 細胞、神経周膜細胞に由来し、同一の病理学的特徴を示すことと、その診断には、発生部位にかかわらず、ヒトの MPNSTs と同一の形態学的診断基準を適用できることが示された。

図表

症例	犬種	年齢	性別	腫瘍発生部位	
1	チワワ	11歳	雄	延髄-C1硬膜内髄外	PNS
2	ミニチュア・シュнауザー	10歳11ヶ月	雌	C2部位髄外	
3	雑種	7歳	雄	C2脊柱管内	
4	ミニチュア・シュнауザー	7歳	雌	C2-3硬膜内髄外	
5	ミニチュア・ダックスフント	12歳2ヶ月	雄	C5-6神経根	
6	ミニチュア・ダックスフント	13歳1ヶ月	雄	C6-7右側神経根	
7	ヨークシャー・テリア	10歳4ヶ月	去勢雄	C6-7右側神経根	
8	ミニチュア・ダックスフント	10歳	去勢雄	C6-T1右側腕神経叢	
9	シェットランド・シープドッグ	13歳6ヶ月	去勢雄	左側腕神経叢	
10	ウェルシュ・コーギー	9歳5ヶ月	雄	左側尺骨神経	
11	ビーグル	8歳	雄	T8右側椎弓部(再発)	
12	ウェルシュ・コーギー	10歳2ヶ月	避妊雌	L2-3硬膜内髄外	
13	雑種	13歳8ヶ月	避妊雌	L2-3髄外硬膜外	
14	雑種	13歳2ヶ月	去勢雄	L4-硬膜内	
15	アメリカン・コッカー・スパニエル	11歳	避妊雌	L7脊髄	
16	雑種	7歳11ヶ月	避妊雌	軸椎内、神経根	
17	シー・ズー	8歳6ヶ月	雌	左側上腕骨尾側面軟部組織	non-PNS
18	ラブラドル・レトリバー	12歳	雌	左側大腿部(再発)	
19	シェットランド・シープドッグ	10歳	雄	左側大腿部	
20	ゴールデン・レトリバー	7歳4ヶ月	避妊雌	下腹部腹壁	
21	ヨークシャー・テリア	11歳6ヶ月	去勢雄	左側前肢橈尺骨部外側	
22	ウェルシュ・コーギー	9歳9ヶ月	去勢雄	尾根部	
23	ウェルシュ・コーギー	12歳	去勢雄	脾臓	
24	ゴールデン・レトリバー	11歳	雄	脾臓	
25	ビーグル	13歳	去勢雄	脾臓、肝臓、腎臓、肺	
26	ビーグル	9歳3ヶ月	雄	右側副腎、肝臓、尿管(再発)	
27	ゴールデン・レトリバー	10歳2ヶ月	雌	歯肉(再発)	
28	ゴールデン・レトリバー	8歳10ヶ月	去勢雄	歯肉	
29	ビーグル	8歳	去勢雄	鼻腔内	
30	グレート・ピレニーズ	8歳4ヶ月	避妊雌	右側肩甲骨外側軟部組織	

PNS: 末梢神経系、non-PNS: 軟部組織または体腔内臓器

Table 1-2. 用いた一次抗体					
マーカー	クローン	免疫動物	希釈倍率	抗原賦活処理	販売元
S100	Polyclonal	ウサギ	1:4000	クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いた 121°C 10分間のオートクレーブ処理	DAKO, Glostrup, Denmark
Nestin	Polyclonal	ウサギ	1:60	なし	IBL, Gunma, Japan
NGFR	Monoclonal (ME20.4)	マウス	4µg/ml	なし	Abcam, Cambridge, UK
Olig2	Polyclonal	ウサギ	1:500	Target Retrieval Solution (pH 9.0) を用いた 121°C 10分間のオートクレーブ処理	EMD Millipore, Billerica, MA, USA
Claudin-1	Polyclonal	ウサギ	1:200	クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いた 121°C 10分間のオートクレーブ処理	Abcam
CD57	Monoclonal (VC1.1)	マウス	1:2000	クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いた 121°C 10分間のオートクレーブ処理	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PRX	Polyclonal	ウサギ	1:1000	クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いた 121°C 10分間のオートクレーブ処理	Sigma-Aldrich
α-SMA	Monoclonal (1A4)	マウス	1:100	なし	DAKO
Desmin	Monoclonal (D33)	マウス	1:100	クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いた 121°C 10分間のオートクレーブ処理	DAKO
Calponin	Monoclonal (hCP)	マウス	1:30000	クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いた 121°C 10分間のオートクレーブ処理	Sigma-Aldrich
Neurofilament	Monoclonal (2F11)	マウス	希釈済み	なし	DAKO

Table 1-3. 正常末梢神経鞘とMPNSTにおける各マーカーの発現部位

マーカー	発現部位		参考文献
	正常末梢神経細胞	MPNST腫瘍細胞	
S100	核および細胞質	核および/または細胞質	2, 4, 7, 15, 43, 49, 71
Nestin	細胞質	核および/または細胞質	22, 54, 57, 62
NGFR	細胞膜	細胞膜	4, 7, 57, 71
Olig2	細胞質	核および/または細胞質	3, 35, 75
Claudin-1	細胞膜	細胞膜	9, 14, 23, 66, 71
CD57	細胞膜	細胞膜	4, 71
PRX	核および細胞質	核および/または細胞質	51, 67
α-SMA	神経周膜領域の細胞質	陰性	
Desmin	陰性	細胞質	
Calponin	陰性	陰性	1, 23, 41

Table 1-4. MPNSTsの各マーカーに対する陽性細胞率(%)

発生部位	症例	S100	Nestin	NGFR	Olig2	Claudin-1	CD57	PRX	α-SMA	Desmin	Calponin
PNS	1	81.1	0	6.8	78.0	0	8.2	0	0	0	0
	2	66.8	39.2	32.0	21.2	47.3	25.1	0	0	0	0
	3	49.4	34.3	22.3	45.5	16.4	0	0	0	0	0
	4	55.0	0	51.0	29.0	0	25.8	0	0	0	0
	5	80.3	42.5	14.3	46.0	19.3	4.0	0	0	0	0
	6	50.9	42.1	0	76.5	7.1	38.8	55.6	0	0	0
	7	78.1	48.0	48.1	32.2	53.5	10.1	11.4	0	0	0
	8	41.3	61.7	5.7	14.2	8.3	8.6	20.9	0	0	0
	9	60.9	75.6	30.9	25.8	51.2	42.0	37.8	0	0	0
	10	57.5	71.2	25.9	41.7	20.5	13.5	28.6	0	51.6	0
	11	59.1	1.5	0	17.7	56.8	0	0	0	0	0
	12	67.2	6.2	0	7.4	6.1	0	0	0	0	0
	13	69.3	19.6	36.0	32.2	42.7	0	0	0	0	0
	14	46.6	9.4	47.4	39.2	24.6	9.6	9.4	0	0	0
	15	67.6	74.6	8.1	55.9	29.5	0	0	0	0	0
	16	85.1	37.7	40.4	20.6	41.2	8.8	13.8	0	0	0
平均	63.5*	35.2	23.0	36.4*	26.5*	12.2	11.1	0.0	3.2	0.0	
non-PNS	17	4.6	12.5	0	0	0	0	0	0	0	0
	18	0	28.7	0	0	0	0	0	0	0	0
	19	7.6	29.1	0	0	7.6	0	0	0	0	0
	20	33.2	66.5	0	13.4	0	0	32.0	0	59.8	0
	21	29.3	19.7	0	10.2	67.1	4.8	0	0	0	0
	22	18.8	49.8	0	26.0	19.4	0	0	0	0	0
	23	42.0	60.7	1.6	39.3	19.4	15.2	4.3	0	0	0
	24	71.1	34.6	11.0	7.7	0	0	0	0	0	0
	25	56.8	40.7	12.2	34.5	30.5	20.8	3.6	0	0	0
	26	35.9	71.1	66.5	30.0	3.9	0	0	0	0	0
	27	26.6	39.1	48.1	19.0	0	19.7	1.8	0	0	0
	28	2.3	53.3	20.8	2.4	0	4.2	0	0	0	0
	29	79.2	27.8	29.3	34.9	22.8	10.3	0	0	0	0
	30	74.6	57.9	10.4	46.1	0	12.7	72.6	0	0	0
平均	34.4*	42.3	14.3	18.8*	12.2*	6.3	8.2	0.0	4.3	0.0	

数字は各マーカーに対する腫瘍細胞の陽性細胞率を示す。
*:腫瘍発生部位間の平均値間に統計学的有意差あり($P < 0.05$)。

		Nestin	NGFR	Olig2	Claudin1	CD57	PRX	Desmin
S100	Spearman ρ	-0.073	0.343	0.537	0.323	0.215	0.105	-0.097
	<i>P</i> (2-tailed)	0.701	0.063	0.002	0.082	0.254	0.579	0.609
Nestin	Spearman ρ		0.097	0.208	0.066	0.179	0.515	0.354
	<i>P</i> (2-tailed)		0.611	0.270	0.728	0.343	0.004	0.055
NGFR	Spearman ρ			0.294	0.163	0.414	0.098	-0.102
	<i>P</i> (2-tailed)			0.115	0.391	0.023	0.606	0.593
Olig2	Spearman ρ				0.181	0.379	0.272	0.007
	<i>P</i> (2-tailed)				0.337	0.039	0.146	0.970
Claudin1	Spearman ρ					0.184	0.073	-0.117
	<i>P</i> (2-tailed)					0.329	0.703	0.539
CD57	Spearman ρ						0.568	-0.033
	<i>P</i> (2-tailed)						0.001	0.864
PRX	Spearman ρ							0.384
	<i>P</i> (2-tailed)							0.036

赤の太字は統計学的に有意な中程度の正の相関を示す。

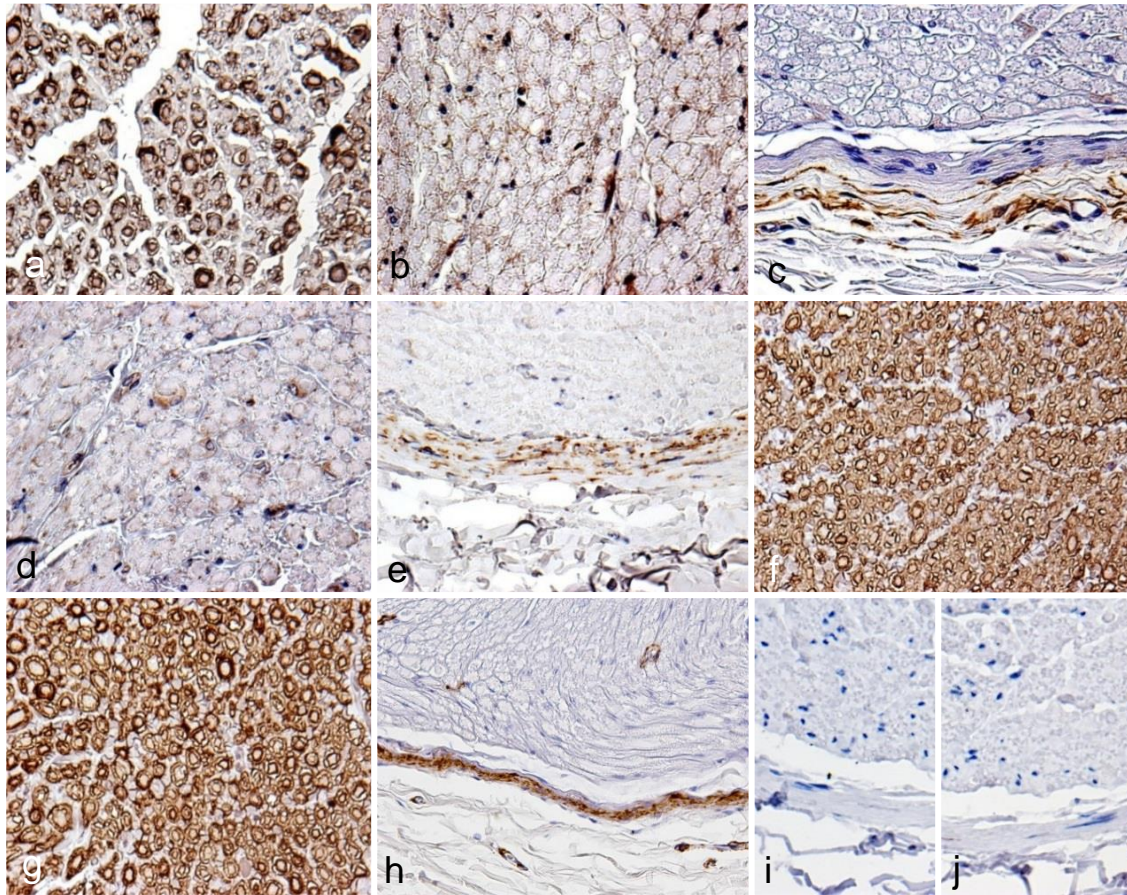


Figure 1-1. 神経症状のないパグ犬の正常腕神経叢における各マーカーに対する免疫組織化学的検索結果。EnVision ポリマー法、後染色：マイヤーのヘマトキシリン。

- a.** 多くの髄鞘と Schwann 細胞の核および細胞質が S100 に陽性。**b.** 少数の Schwann 細胞の細胞質が nestin に陽性。**c.** 神経周膜細胞の細胞膜が NGFR に陽性。**d.** 少数の Schwann 細胞の細胞質が Olig2 に陽性。**e.** 神経周膜細胞の細胞膜が claudin-1 に陽性。**f.** 多くの Schwann 細胞の細胞膜および髄鞘が CD57 に陽性。**g.** 多くの Schwann 細胞の核および細胞質と髄鞘が PRX に陽性。**h.** 神経周膜に存在する平滑筋細胞の細胞質が α -SMA に陽性。**i.** desmin に陰性。**j.** calponin に陰性。

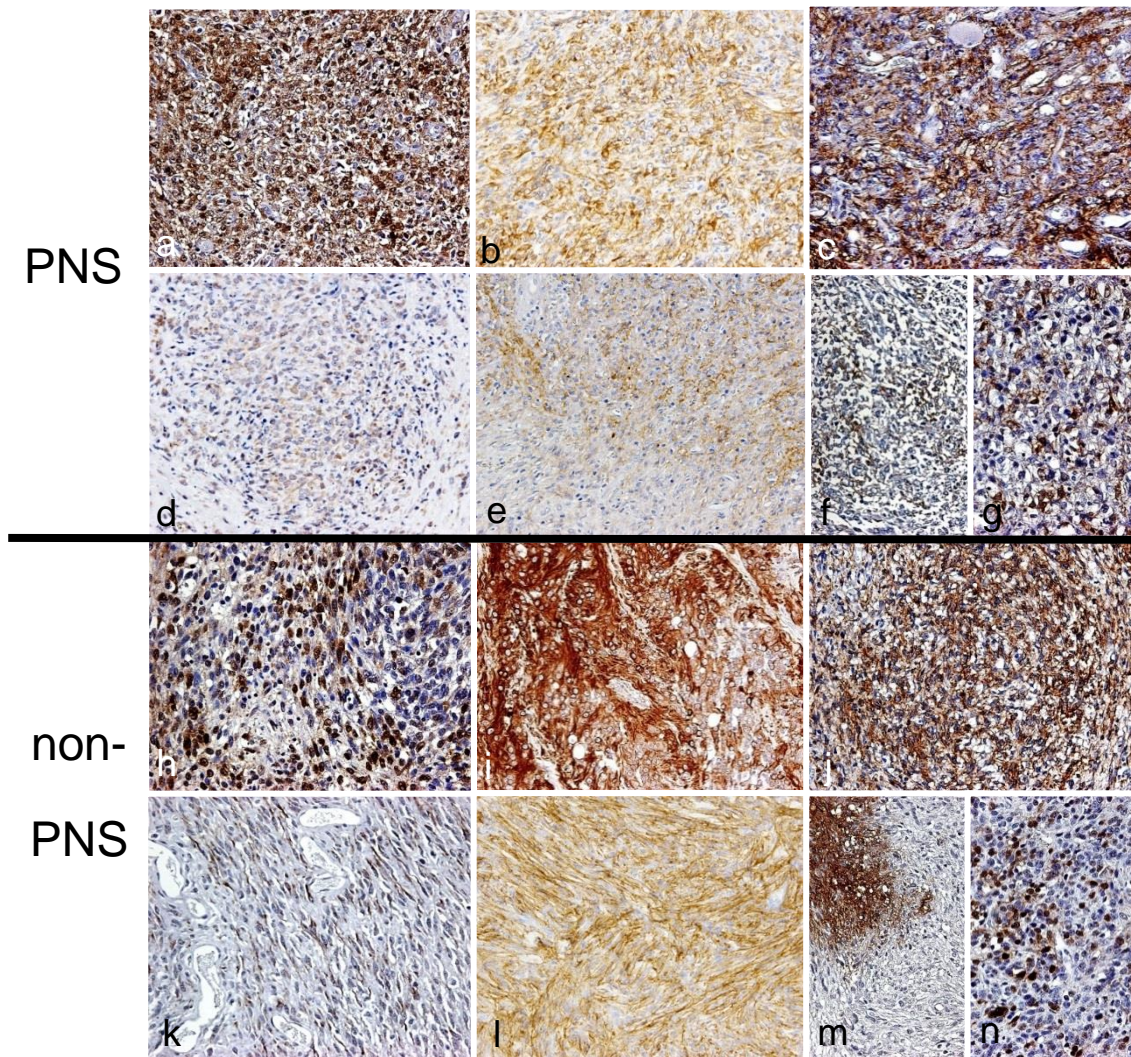


Figure 1-2. MPNSTs における各マーカーに対する免疫組織化学的検索結果。EnVision ポリマー法、後染色：マイヤーのヘマトキシリン。

a. C2 髄外。ミニチュア・シュнауザー。症例 2。腫瘍細胞は S100 に強陽性。**b.** C6-T1 右側腕神経叢。ミニチュア・ダックスフント。症例 8。腫瘍細胞は nestin に強陽性。**c.** C6-7 右側神経根。ヨークシャー・テリア。症例 7。腫瘍細胞は NGFR に中程度陽性。**d.** 軸椎内、神経根。雑種。症例 16。腫瘍細胞は Olig2 に中程度陽性。**e.** T8 右側椎弓。ビーグル。症例 11。腫瘍細胞は claudin-1 に強陽性。**f.** C6-T1。右側腕神経叢。ミニチュア・ダックスフント。症例 5。腫瘍細胞は CD57 に弱陽性。**g.** 左側腕神経叢。シェットランド・シープドッグ。症例 9。腫瘍細胞は PRX に中程度陽性。**h.** 下腹部腹壁。ゴールデン・レトリバー。症例 20。腫瘍細胞は S100 に中程度陽性。**i.** 右側肩甲骨外側軟部組織。グレート・ピレニーズ。症例 30。腫瘍細胞は nestin に強陽性。**j.** 歯肉。ゴールデン・レトリバー。症例 27。腫瘍細胞は NGFR に中程度から強陽性。**k.** 右側副腎。ビーグル。症例 26。腫瘍細胞は Olig2 に中程度陽性。**l.** 左側前肢橈尺骨部外側。ヨークシャー・テリア。症例 2。腫瘍細胞は claudin-1 に強陽性。**m.** 歯肉。ゴールデン・レトリバー。症例 27。腫瘍細胞は CD57 に中程度陽性。**n.** 下腹部腹壁。ゴールデン・レトリバー。症例 20。腫瘍細胞は PRX に中程度陽性。

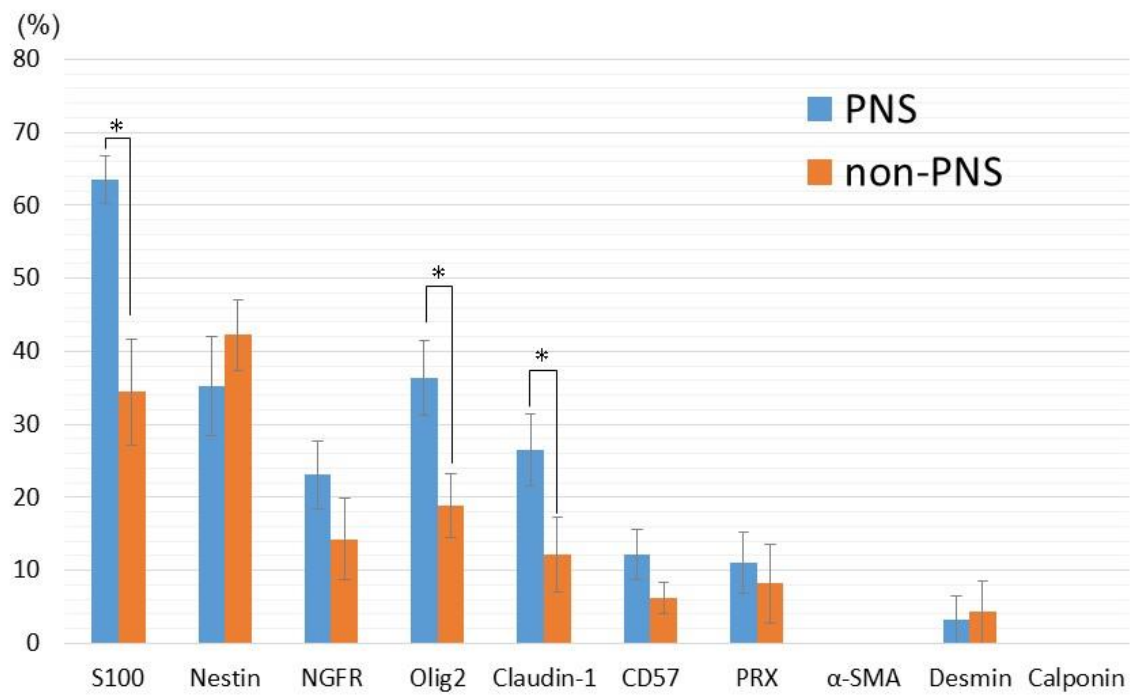


Figure 1-3. MPNSTs の各マーカーに対する平均陽性細胞率の比較。

PNS に発生した MPNSTs では、S100、Olig2、claudin-1 の平均陽性細胞率が、non-PNS のそれと比べて有意に高い。*: $P < 0.05$ (Mann-Whitney の U 検定)。

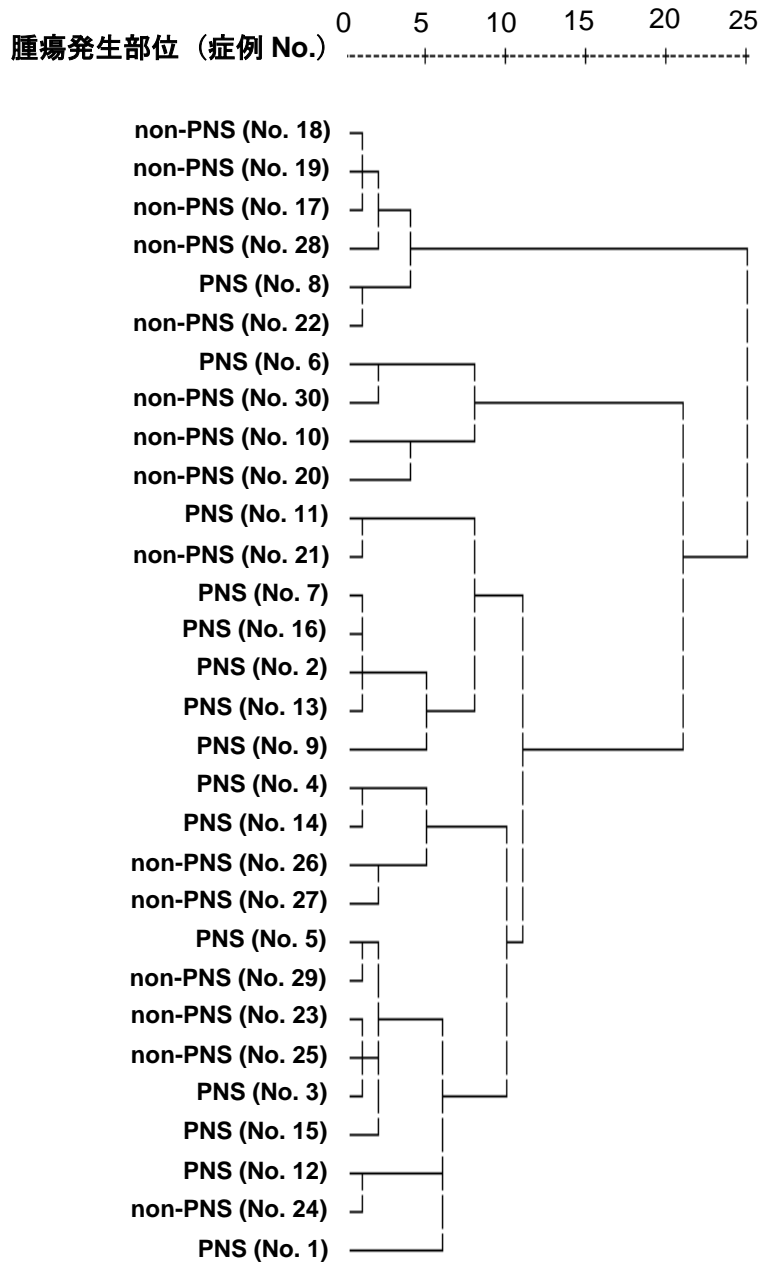


Figure 1-4. MPNSTs の各マーカーに対する陽性細胞率を用いたクラスター解析。

Ward 法により作成したデンドログラム。MPNSTs は、PNS と non-PNS の 2 つの群には分かれていない。

1-2 末梢神経鞘腫瘍(MPNSTs)と血管周壁腫瘍(PWTs)の

鑑別診断に関する病理学的研究

序

イヌの血管周皮腫(CHPs)は、最新の動物の WHO 腫瘍分類¹⁸では、分類不能肉腫とされている。主にイヌの軟部組織に発生し、紡錘形腫瘍細胞の束状交錯状配列、花筵状配列、および血管周囲の渦状配列が特徴である。CHPs の診断では、しばしば悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNSTs)との鑑別診断が問題となる。近年、CHPs は血管周壁腫瘍(perivascular wall tumors: PWTs)に分類することが提唱されている^{1,41}。PWTs は血管周皮腫、血管平滑筋腫、血管平滑筋肉腫、筋周皮腫、血管筋線維芽細胞腫、血管線維腫を含む腫瘍群で、その起源は、未分化幹細胞、血管周囲の線維芽細胞、周皮細胞、筋周皮細胞、平滑筋細胞、筋線維芽細胞などの血管壁の構成細胞、または、これらの移行細胞であると考えられている^{1,41}。CHPs は上記の組織学的特徴に加えて、粘液腫状増殖巣、充実性増殖巣、MPNSTs の柵状配列と類似した Verocay 様配列、鹿の角状や胎盤血管状の血管新生が認められる^{1,41}。現在でも、血管周囲の渦状配列を含む組織学的特徴に基づき、多くの PWTs が CHPs と診断されており、MPNSTs との鑑別診断も問題となっている⁴¹。

PWTs の組織学的特徴は、MPNSTs のそれと酷似するため、特に軟部組織に発生した MPNSTs と PWTs との鑑別診断は困難である。PWTs の免疫組織化学的、または超微形態学的細分類に関する研究はいくつかあるが^{1,23,41}、イヌの MPNSTs と PWTs の免疫組織化学的鑑別診断に関する研究はほとんどない^{7,23}。また近年、小動物臨床領域では、その組織学的特徴と生物学的挙動の類似性から、MPNSTs と CHPs を「軟部組織肉腫(soft tissue sarcomas: STSs)」として、線維肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、粘液肉腫、悪性間葉腫など、軟部組織に発生する他の紡錘形細胞腫瘍と一括して取り扱っている^{30,59}。しかし、近年、

Stefanello らによって、PWTs は「良性」の挙動をとる独特の腫瘍群であるということが示された⁵⁹。腫瘍の分類を過度に単純化し過ぎてしまうことは、正確な予後予測や、腫瘍特異的な治療方法開発の妨げとなる場合がある。分子標的療法などの腫瘍特異的な新規治療戦略を開発するためには、腫瘍それぞれに対して、正確な鑑別診断と予後因子に関する研究が不可欠である。

本項では、MPNSTs と PWTs の鑑別診断に有用なマーカーを探索することを目的として、イヌの MPNSTs 30 例と PWTs 31 例について、免疫組織化学的特徴を比較し、統計学的解析を行った。

材料と方法

【症例】

2008年から2011年にかけて、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室に提出された61例のイヌの紡錘形細胞腫瘍を検索対象とした。このうち、30例はMPNSTと、31例はPWTと病理組織学的に診断した。対象としたMPNSTsの症例は前項と同じで、詳細はTable 1-1に、PWTsの症例情報と腫瘍発生部位はTable 1-6に示した。これらの腫瘍はすべて、切除生検または外科的完全切除により得られた。PWTs 31例は、全例が皮下組織に発生し、頭頸部（2例：症例31、32）、前肢または後肢（22例：症例33-43、51-61）、体幹（7例：症例44-50）がその発生部位であった。症例の平均年齢は、 11.1 ± 2.2 歳（7歳5ヶ月齢から15歳1ヶ月齢）であった。性別は、雄が13例（うち去勢済みが4例）、雌が17例（うち避妊済みが6例）であった。症例48については、年齢と性別は記録されていなかった。

【病理組織学的検索】

腫瘍はすべて10%リン酸緩衝ホルマリン水溶液で固定し、厚さ2~4 μm のパラフィン包埋ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色標本を作製した。MPNSTsの診断には、上記1-1で用いた診断基準を用いた。PWTsの診断には、最近の研究の所見^{1,41}を基にした以下の病理組織学的診断基準を用いた。

- (1) 紡錘形腫瘍細胞の不規則な束状交錯状配列、粘液腫状増殖、充実性増殖、花筵状配列、Verocay様配列からなる。
- (2) 腫瘍細胞の血管周囲の渦状配列、鹿の角状または胎盤血管状の血管新生を認める。

【免疫組織化学的検索】

本研究に使用した一次抗体をTable 1-2に示した。S100、claudin-1、CD57、PRX、desmin、calponinについては、抗原賦活処理として、脱パラフィン標本をクエン酸緩衝液(pH 6.0)中

で 121°C10 分間オートクレーブ処理した。Olig2 については、Target Retrieval Solution (pH 9.0; DAKO, Glostrup, Denmark)中で 121°C10 分間オートクレーブ処理した。nestin、NGFR、 α -SMA、neurofilament については、抗原賦活処理は行わなかった。内因性ペルオキシダーゼ活性は、3%過酸化水素加メタノールで室温 5 分間処理し、不活化した。非特異反応は、8%スキムミルク加 TBS で 37°C30 分間処理し、抑制した。一次抗体との反応は 4°Cで一晩行った。TBS で 3 回洗浄後、Dako EnVision+ System⁺ 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ポリマー抗マウス二次抗体または抗ウサギ二次抗体(DAKO)との反応を、室温 10 分間、37°C40 分間、さらに室温 10 分間行った。TBS で 3 回洗浄後、0.05% 3-3'-ジアミノベンジジンおよび 0.03%過酸化水素加トリス塩酸緩衝液で発色した。後染色にはマイヤーのヘマトキシリンを用いた。陽性コントロールには、5 歳 4 ヶ月齢の神経疾患を持たないパグ犬の腕神経叢の組織切片を用いた。desmin の内因性陽性コントロールには、横紋筋を用いた。陰性コントロールには、一次抗体の代わりに TBS を用いた。各切片について、無作為に抽出した 400 倍 10 視野における陽性細胞数を計数し、各マーカーに対する陽性細胞率を算出した。

【統計学的解析】

統計学的解析には、SPSS 15.0 J (SPSS Japan, Tokyo, Japan)を用いた。各マーカーの発現の相関関係を調べるために、Spearman の相関係数を算出した。MPNSTs の平均陽性細胞率と PWTs の平均陽性細胞率の間の有意差を調べるために、Mann-Whitney の *U*検定を行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

【クラスター解析】

MPNSTs と PWTs の免疫組織化学的特徴の相違を調べるために、各抗体に対する陽性細胞率について、SPSS 15.0 J を用いた Ward 法による多変量クラスター解析を行い、クラスター間の平方ユークリッド距離により、デンドログラムを作成した。

結果

【病理組織学的検索】

MPNSTs の病理組織学的所見は、前項に記載したとおりであった。PWTs の病理組織学的特徴は、MPNSTs のそれと酷似し、多形性のある紡錘形細胞で構成され、束状交錯状配列(3/31)、粘液腫状増殖(14/31)、充実性増殖(18/31)、花筵状配列(12/31)、Verocay 様配列(1/31)、血管周囲の渦状配列(14/31)、鹿の角状血管新生(1/31)、胎盤血管状血管新生(4/31)が認められた。17 例では周囲組織への浸潤像を認め、22 例では腫瘍増殖巣内に壊死巣を認めた。

【免疫組織化学的検索】

MPNSTs と PWTs の腫瘍細胞における各マーカーの発現部位を Table 1-7 に示した。MPNSTs における各マーカーの発現パターン、および、各マーカーに対する腫瘍細胞の陽性細胞率を、それぞれ Figure 1-2a-n と Table 1-4 に示した（前項）。また、PWTs における各マーカーの発現パターンを Figure 1-5a-j に、各マーカーに対する腫瘍細胞の陽性細胞率を Table 1-8 に示した。腫瘍細胞の染色強度は症例ごとに大きく異なっていた。PWTs において、S100 (11/31: 35.5%の症例が陽性)、nestin (26/31: 83.8%の症例が陽性)、Olig2 (6/31: 19.4%の症例が陽性) の発現は、腫瘍細胞の核あるいは細胞質に認められた。NGFR (5/31: 16.1%の症例が陽性)、claudin-1 (17/31: 54.8%の症例が陽性)、CD57 (1/31: 3.2%の症例が陽性) の発現は、腫瘍細胞の細胞膜に認められた。α-SMA (7/31: 22.6%の症例が陽性)、desmin (9/31: 29.0%の症例が陽性)、calponin (7/31: 22.6%の症例が陽性) の発現は、腫瘍細胞の細胞質に認められた(Figure 1-5a-j)。PRX の発現は認められなかった。

【統計学的解析】

PWTs の症例における各マーカーに対する陽性細胞率間の相関係数解析の結果を、Table 1-9 に示した。S100 と Olig2 間、nestin と NGFR または Olig2 間、NGFR と Olig2 間、

α -SMA と calponin 間、desmin と calponin 間で中程度の正の相関が認められた。Mann-Whitney の *U* 検定の結果、 α -SMA と calponin 以外のすべてのマーカーについて、MPNSTs の平均陽性細胞率は、PWTs のそれよりも有意に高かった。 α -SMA と calponin については、PWT の平均陽性細胞率が、MPNST のそれよりも有意に高かった。(Figure 1-6)。

【クラスター解析】

クラスター解析の結果、以下の 9 症例を除き、MPNSTs と PWTs は異なる 2 つのクラスターに分けられた(Figure 1-7)。3 例の MPNSTs (症例 17-19) は PWTs のクラスターに分類された。これら 3 例は、上腕部または大腿部に発生し、ほぼすべてのマーカーに対して陰性であった。症例 17 は S100 に弱陽性(4.6%)で、nestin には中程度陽性(12.5%)であった。症例 18 は、nestin にのみ中程度陽性(28.7%)であった。症例 19 は、S100 (7.6%)と claudin-1 (7.6%)に弱陽性で、nestin に中程度陽性(29.1%)であった(Table 1-4)。一方、6 例の PWTs (症例 33、35、42、56、57、59) は、MPNSTs のクラスターに分類された。これら腫瘍はすべて、前肢または後肢に発生し、S100、nestin、NGFR、Olig2 あるいは claudin-1 に陽性で、 α -SMA、desmin、calponin には陰性であった(Table 1-8)。

考察

検索した PWTs では、S100 は 11 例(35.5%)で弱陽性から強陽性、nestin は 26 例(83.9%)で弱陽性から強陽性、NGFR は 5 例(16.1%)で弱陽性から中程度陽性、Olig2 は 6 例(19.4%)で中程度陽性から強陽性、claudin-1 は 17 例(54.8%)で弱陽性から中程度陽性、CD57 は 1 例(3.2%)のみで弱陽性、PRX は全例で陰性、 α -SMA は 7 例(22.6%)で弱陽性から中程度陽性、desmin は 9 例(29.0%)で弱陽性、calponin は 7 例(22.6%)で弱陽性から中程度陽性であった。さらに、 α -SMA、desmin、calponin、claudin-1 に対する免疫組織化学的検索の結果から、今回検索した PWTs には、血管周皮腫（症例 34 と 44）、筋周皮腫（症例 43）、血管線維腫（症例 32、39、47、48、60、61）が含まれることが示唆された。一方、症例 31、38、46、52 は claudin-1 のみに陽性、症例 36、49、53、54 は claudin-1 と desmin に陽性、症例 37 と 50 は claudin-1、desmin、および calponin に陽性、症例 45 は claudin-1 と calponin に陽性、症例 40 と 41 は claudin-1 と α -SMA に陽性、症例 58 は desmin のみに陽性、症例 55 は α -SMA のみに陽性であり、近年の研究結果^{1,23,41}に基づくと、これら 15 例の PWTs は、未分化型の PWT に分類されると考えられた。

イヌの MPNSTs と CHPs (PWTs)の鑑別診断は、従来の免疫組織化学的検索および超微形態学的検索では困難である¹⁸。さらに、病理組織学的特徴と生物学的挙動の類似性から、両者は同一の腫瘍として取り扱われる傾向にある³⁰。しかし、近年の研究では、PWTs の由来細胞や生物学的挙動が、MPNSTs や他の軟部組織肉腫とは異なることも報告されている^{1,7,23,41,59}。MPNSTs と他の紡錘形細胞腫瘍、特に PWTs との鑑別診断には、形態学的特徴と免疫組織化学的特徴に基づいた鑑別診断を試みるのが重要であるが、イヌにおいて、MPNSTs と PWTs との鑑別診断に有用なマーカーについての研究は、十分に行われていない^{7,23}。そこで、本項では、これまでのイヌの MPNSTs と PWTs の研究では用いられていなかった神経系マーカーおよび筋系マーカーを含めて免疫組織学的検索を行い、その結果

を定量化し、統計学的に解析した。

前項で示したように、MPNSTs の S100、nestin、NGFR、Olig2、claudin-1 に対する陽性細胞率は中程度陽性から強陽性であり、CD57、PRX に対しては弱陽性、desmin に対しては 2 例のみ陽性、 α -SMA および calponin に対しては陰性であった。MPNSTs の陽性細胞率は、 α -SMA と desmin を除くほぼすべてのマーカーについて、PWTs よりも有意に高かった。さらに、クラスター解析により、MPNSTs と PWTs は 2 つの異なる群に分類された。しかし、non-PNS に発生した 3 例の MPNSTs は PWT の群に分類され、NGFR あるいは Olig2 を発現していた 6 例の PWTs は MPNST の群に分類された。これら PWT 群に再分類された 3 例の MPNSTs は、ほぼすべてのマーカーに対して陰性であり、未分化型の PWT であると考えられた。一方、MPNST 群に再分類された 6 例の PWTs は神経系マーカーのみが陽性であったことから、non-PNS に発生した MPNSTs であると考えられた。この結果から、HE 染色標本のみで non-PNS に発生した MPNSTs と PWTs との鑑別診断を試みると、ときに誤診を招くことが示唆される。さらに、S100、nestin、claudin-1 は少数から多くの PWTs で発現していたが、MPNST 群に分類されなかった PWTs は、NGFR が全例で陰性、Olig2 が 2 例を除き陰性であったことから、NGFR と Olig2 は、MPNSTs と PWTs を免疫組織化学的に鑑別診断するための最も有用なマーカーであると考えられた。

MPNSTs と PWTs に対して、分子標的療法のような新規治療戦略を開発するためには、これらの腫瘍の由来を特定し、増殖や浸潤にかかわる細胞内シグナル情報伝達経路を研究することが重要である^{5,54}。神経堤幹細胞マーカーである nestin と NGFR が発現していたという本項の結果から、イヌの MPNSTs には、神経堤幹細胞またはがん幹細胞様細胞が含まれていることが示唆される。これらの細胞は有用な治療標的となり得る。MPNSTs と PWTs を、STSs として軟部組織に発生する他の紡錘形細胞腫瘍と一括りに分類し続けることは、MPNSTs と PWTs における特異的治療方法開発の妨げとなり、予後の改善も期待されない。これらの腫瘍に対する新規治療戦略開発につながる更なる研究が求められる。

要約

イヌの悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNSTs)と、近年、血管周壁腫瘍(perivascular wall tumors: PWTs)という再分類が提唱されている^{1,41} イヌの血管周皮腫(CHPs)の病理組織学的特徴は酷似し、特に、軟部組織に発生した MPNSTs で末梢神経鞘の関与が確認されない場合、両者の鑑別診断は極めて困難である。本項では、MPNSTs と PWTs の鑑別診断に有用なマーカーの探索を目的として、MPNSTs 30 例と PWTs 31 例における S100、nestin、NGFR、Olig2、claudin-1、CD57、PRX、 α -SMA、desmin、calponin の発現を免疫組織化学的に調べ、その結果を定量化し、統計学的に解析した。MPNSTs の各マーカーに対する平均陽性細胞率は、 α -SMA と calponin を除いて、PWTs の各マーカーに対する平均陽性細胞率よりも有意に高かった。 α -SMA と calponin に対する平均陽性細胞率は、PWTs で MPNSTs のそれよりも有意に高かった。各症例の各マーカーに対する陽性細胞率を用いたクラスター解析により、ほとんどの MPNSTs と PWTs が 2 つの異なる群に分類されたが、3 例の MPNSTs は PWT 群に、NGFR あるいは Olig2 を発現していた 6 例の PWTs は MPNST 群に分類された。PWT 群に再分類された 3 例の MPNSTs は、ほぼすべてのマーカーに対して陰性であり、未分化型の PWT であると考えられた。また、MPNST 群に再分類された 6 例の PWTs は、神経系マーカーにのみ陽性であったことから、non-PNS に発生した MPNSTs であると考えられた。MPNST 群に分類されなかった PWT 症例では、NGFR が全例で陰性、Olig2 が 2 例を除き陰性であったことから、NGFR と Olig2 は、MPNSTs と PWTs の鑑別診断に最も有用なマーカーであるということが示唆された。

図表

Table 1-6. 用いたPWTs症例					
症例	犬種	年齢	性別	腫瘍発生部位	
31	ウェルシュ・コーギー	12歳	去勢雄	右側頬部	頭頸部
32	シー・ズー	12歳	雌	左側頸部	
33	雑種	9歳6ヶ月	避妊雌	左側肩部	前肢
34	ゴールデン・レトリバー	12歳7ヶ月	雌	左側腋窩	
35	ミニチュア・ダックスフント	9歳10ヶ月	去勢雄	左側腋窩から胸腔(再発)	
36	雑種	14歳8ヶ月	雄	左側肘部	
37	ビーグル	15歳	雌	左側肘部	
38	ポストン・テリア	9歳2ヶ月	避妊雌	左側肘部	
39	柴	13歳6ヶ月	雄	右側肘部	
40	雑種	15歳1ヶ月	雄	左側肘部	
41	シェットランド・シープドッグ	9歳10ヶ月	避妊雌	左側肘部	
42	ポメラニアン	13歳11ヶ月	雌	左側前肢(再発)	
43	ラブラドル・レトリバー	10歳	雌	右側前肢	
44	ボクサー	8歳11ヶ月	雄	胸壁	体幹
45	チワワ	9歳	雌	右側腰部	
46	ウェルシュ・コーギー	13歳3ヶ月	雌	腰背部	
47	ラブラドル・レトリバー	9歳2ヶ月	去勢雄	左側臀部	
48	シェットランド・シープドッグ	不明	不明	臀部	
49	ゴールデン・レトリバー	13歳4ヶ月	避妊雌	左側臀部	
50	雑種	9歳3ヶ月	雄	左側臀部	
51	ポメラニアン	10歳2ヶ月	避妊雌	左側下腿部	後肢
52	雑種	13歳10ヶ月	雄	左側大腿部(再発)	
53	ウェルシュ・コーギー	9歳7ヶ月	雄	右側大腿部	
54	シェットランド・シープドッグ	10歳11ヶ月	雌	左側大腿部	
55	雑種	10歳	雄	大腿部	
56	ドーベルマン	11歳3ヶ月	雌	大腿部	
57	ウェルシュ・コーギー	7歳5ヶ月	避妊雌	大腿部	
58	ゴールデン・レトリバー	13歳	去勢雄	腰下リンパ節(右側後肢腫瘍の転移病巣)	
59	ラブラドル・レトリバー	8歳4ヶ月	雄	右側足根関節部(再発)	
60	ゴールデン・レトリバー	8歳6ヶ月	雌	左側足根部(再発)	
61	ヨークシャー・テリア	9歳2ヶ月	雌	右側後肢第二、三指間	

Table 1-7. MPNSTsとPWTsの腫瘍細胞における各マーカーの発現部位			
マーカー	発現部位		参考文献
	MPNST腫瘍細胞	PWT腫瘍細胞	
S100	核および/または細胞質	核および/または細胞質	正常組織での陽性細胞 神経細胞、グリア細胞、Schwann細胞、メラノサイトなど
Nestin	核および/または細胞質	核および/または細胞質	神経外胚葉性幹細胞、神経前駆細胞、Schwann細胞
NGFR	細胞膜	細胞膜	Schwann細胞、神経周膜細胞、血管周囲線維芽細胞、神経細胞、神経堤前駆細胞または幹細胞など
Olig2	核および/または細胞質	核および/または細胞質	稀突起膠細胞、稀突起膠細胞腫、Schwann細胞
Claudin-1	細胞膜	細胞膜	神経周膜細胞
CD57	細胞膜	細胞膜	ミエリン形成性Schwann細胞
PRX	核および/または細胞質	細胞質	Schwann細胞
α-SMA	陰性	細胞質	平滑筋細胞
Desmin	細胞質	細胞質	骨格筋細胞、心筋細胞
Calponin	陰性	細胞質	平滑筋細胞

Table 1-8. PWTsの各マーカーに対する陽性細胞率

発生部位	症例	S100	Nestin	NGFR	Olig2	Claudin-1	CD57	PRX	α-SMA	Desmin	Calponin	
頭頸部	31	0	35.5	0	0	29.3	0	0	0	0	0	
	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	平均	0.0	17.8	0	0	14.6	0	0	0	0	0	
前肢	33	0	61.7	2.4	0	0	0	0	0	0	0	
	34	0	0	0	0	0	0	0	26.2	0	19.4	
	35	78.4	68.0	39.5	55.8	10.5	0	0	0	0	0	
	36	0	24.1	0	14.4	20.3	0	0	0	2.3	0	
	37	0	19.9	0	0	5.1	0	0	0	6.4	16.9	
	38	0	0	0	0	12.9	0	0	0	0	0	
	39	0	5.9	0	0	0	0	0	0	0	0	
	40	0	11.8	0	0	5.1	0	0	1.8	0	0	
	41	0	0	0	0	9.5	0	0	3.0	0	0	
	42	0	47.7	27.9	0	0	0	0	0	0	0	
	43	0	17.3	0	0	18.9	0	0	24.5	6.3	15.4	
	平均	7.1	23.3	6.3	6.4	7.5	0	0	5.0	1.4	4.7	
体幹	44	5.3	20.1	0	0	10.4	0	0	3.9	0	29.1	
	45	5.3	23.2	0	0	19.1	0	0	0	0	5.0	
	46	0	11.3	0	0	33.2	0	0	0	0	0	
	47	16.5	12.7	0	0	0	0	0	0	0	0	
	48	0	12.4	0	0	0	5.3	0	0	0	0	
	49	31.0	4.2	0	0	10.2	0	0	0	3.5	0	
	50	0	9.7	0	0	26.2	0	0	0	4.3	29.2	
		平均	8.3	13.4	0	0	14.1	0.8	0	0.6	1.1	9.0
	51	0	6.1	0	0	0	0	0	5.9	10.0	6.5	
	52	7.7	14.8	0	0	29.7	0	0	0	0	0	
後肢	53	5.7	2.1	0	0	3.5	0	0	0	7.6	0	
	54	0	30.0	0	0	25.7	0	0	0	4.9	0	
	55	0	8.1	0	0	0	0	0	3.9	0	0	
	56	22.5	16.2	0	54.5	12.0	0	0	0	0	0	
	57	11.1	85.9	43.7	19.3	0	0	0	0	0	0	
	58	4.9	5.3	0	0	0	0	0	0	3.1	0	
	59	12.6	60.5	6.5	66.7	0	0	0	0	0	0	
	60	0	28.3	0	22.1	0	0	0	0	0	0	
	61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		平均	5.9	23.4	4.6	14.8	6.4	0	0	0.9	2.3	0.6

数字は各抗体に対する腫瘍細胞の陽性率を示す。

赤の太字で示した症例は、クラスター解析により、MPNST群に分類された。

Table 1-9. PWTの症例における各マーカー間のSpearmanの相関係数解析

	Nestin	NGFR	Olig2	Claudin1	CD57	α -SMA	Desmin	Calponin
S100	Spearman ρ 0.239	0.311	0.442	0.053	-0.131	-0.268	-0.072	-0.152
	<i>P</i> (2-tailed)	0.089	0.013	0.776	0.482	0.144	0.699	0.413
Nestin	Spearman ρ	0.639	0.531	0.138	-0.020	-0.269	-0.122	-0.056
	<i>P</i> (2-tailed)	0.000	0.002	0.458	0.913	0.143	0.513	0.765
NGFR	Spearman ρ		0.506	-0.288	-0.080	-0.233	-0.274	-0.233
	<i>P</i> (2-tailed)		0.004	0.116	0.670	0.207	0.136	0.207
Olig2	Spearman ρ			-0.054	-0.089	-0.260	-0.196	-0.260
	<i>P</i> (2-tailed)			0.772	0.635	0.158	0.290	0.158
Claudin1	Spearman ρ				-0.182	-0.111	0.185	0.158
	<i>P</i> (2-tailed)				0.327	0.553	0.320	0.396
CD57	Spearman ρ					-0.098	-0.115	-0.098
	<i>P</i> (2-tailed)					0.602	0.539	0.602
α -SMA	Spearman ρ						0.084	0.500
	<i>P</i> (2-tailed)						0.653	0.004
Desmin	Spearman ρ							0.380
	<i>P</i> (2-tailed)							0.035

赤の太字は統計学的に有意な中程度の正の相関を示す。

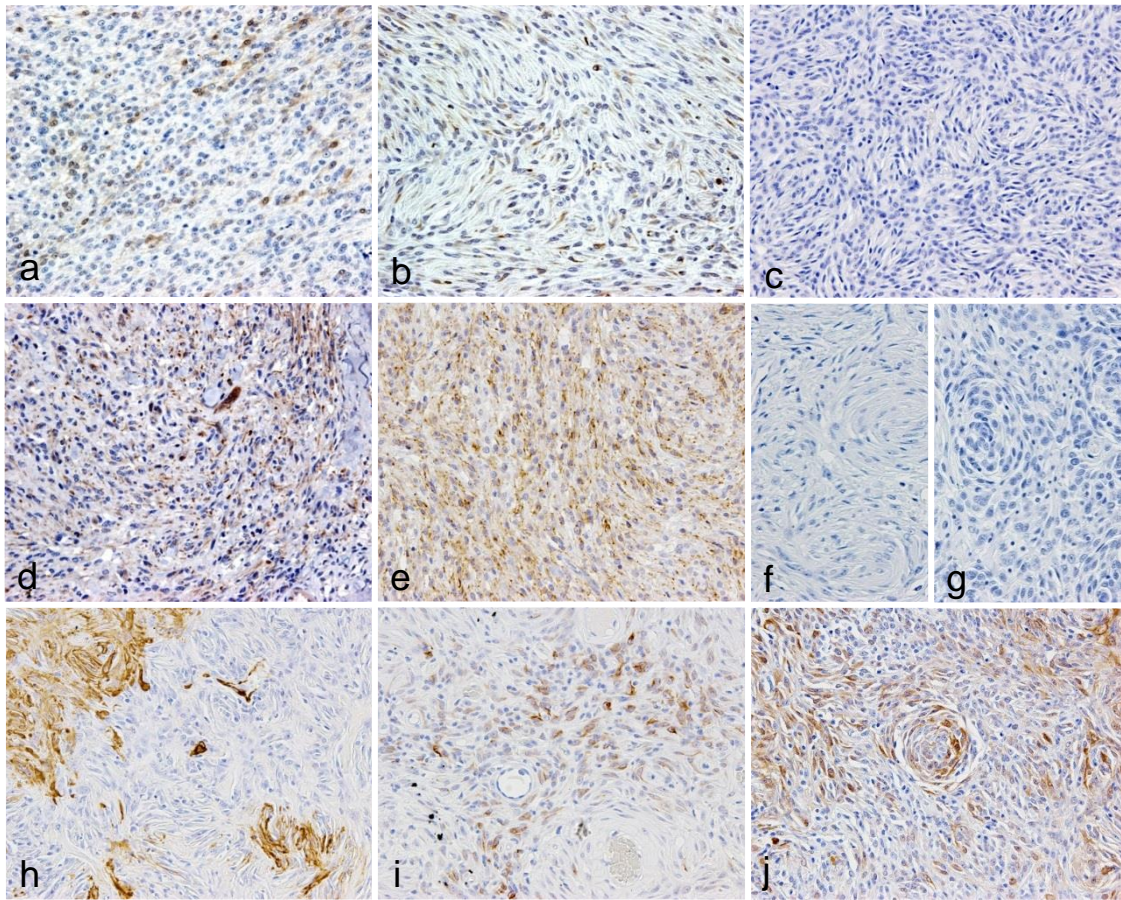


Figure 1-5. 血管周壁腫瘍(PWTs)における各マーカーに対する免疫組織化学的検索結果。

EnVision ポリマー法。後染色：マイヤーのヘマトキシリン。

- a.** 腰下リンパ節（右側後肢腫瘍の転移病巣）。ゴールデン・レトリーバー。症例 58。腫瘍細胞は S100 に弱陽性。**b.** 左側下腿部。ポメラニアン。症例 51。腫瘍細胞は nestin に弱陽性。**c.** 左側肘部。ビーグル。症例 37。腫瘍細胞は NGFR に陰性。**d.** 左側足根部。ゴールデン・レトリーバー。症例 60。腫瘍細胞は Olig2 に中程度陽性。**e.** 左側臀部。雑種。症例 50。腫瘍細胞は claudin-1 に中程度陽性。**f.** 右側前肢。ラブラドル・レトリーバー。症例 43。腫瘍細胞は CD57 に陰性。**g.** 右側腰部。チワワ。症例 45。腫瘍細胞は PRX に陰性。**h.** 左側腋窩部。ゴールデン・レトリーバー。症例 34。腫瘍細胞は α -SMA に中程度陽性。**i.** 左側肘部。ビーグル。症例 37。腫瘍細胞は desmin に弱陽性。**j.** 左側臀部。雑種。症例 50。腫瘍細胞は calponin に中程度陽性。

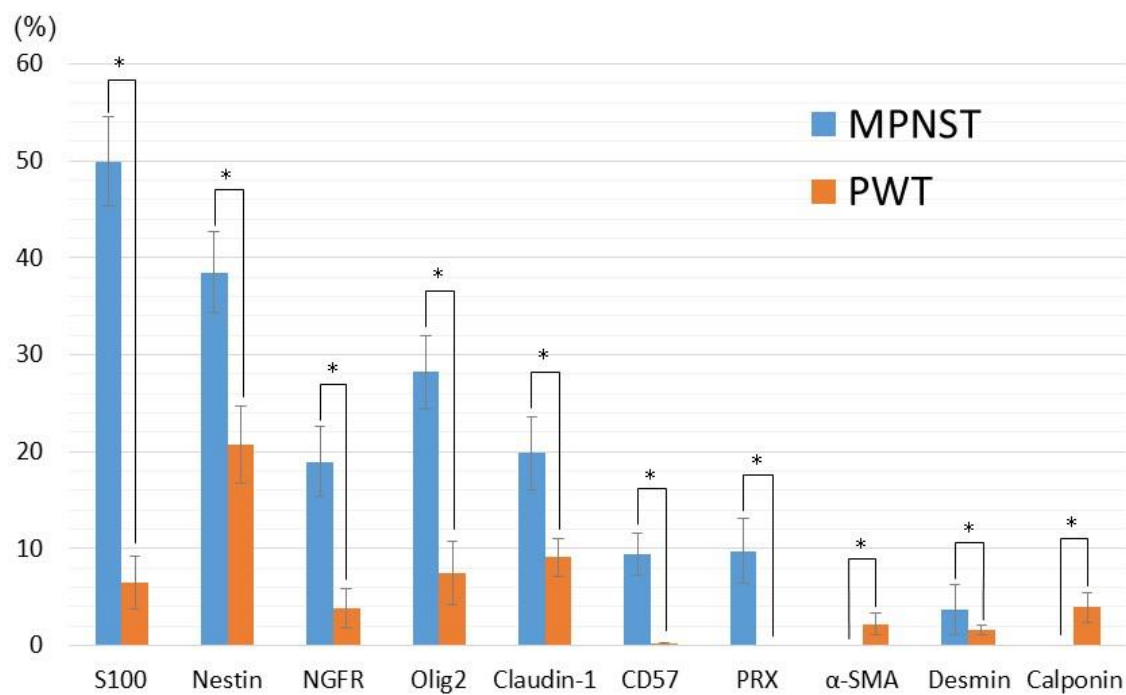


Figure 1-6. MPNSTs と PWTs の各マーカーに対する平均陽性細胞率の比較。

α-SMA と calponin を除き、すべてのマーカーに対して、MPNSTs の平均陽性細胞率は PWTs のそれよりも有意に高かった。α-SMA と calponin については、PWTs の平均陽性細胞率方が MPNSTs のそれよりも有意に高かった。(平均値±標準誤差)。*: $P < 0.05$ (Mann-Whitney の U 検定)。

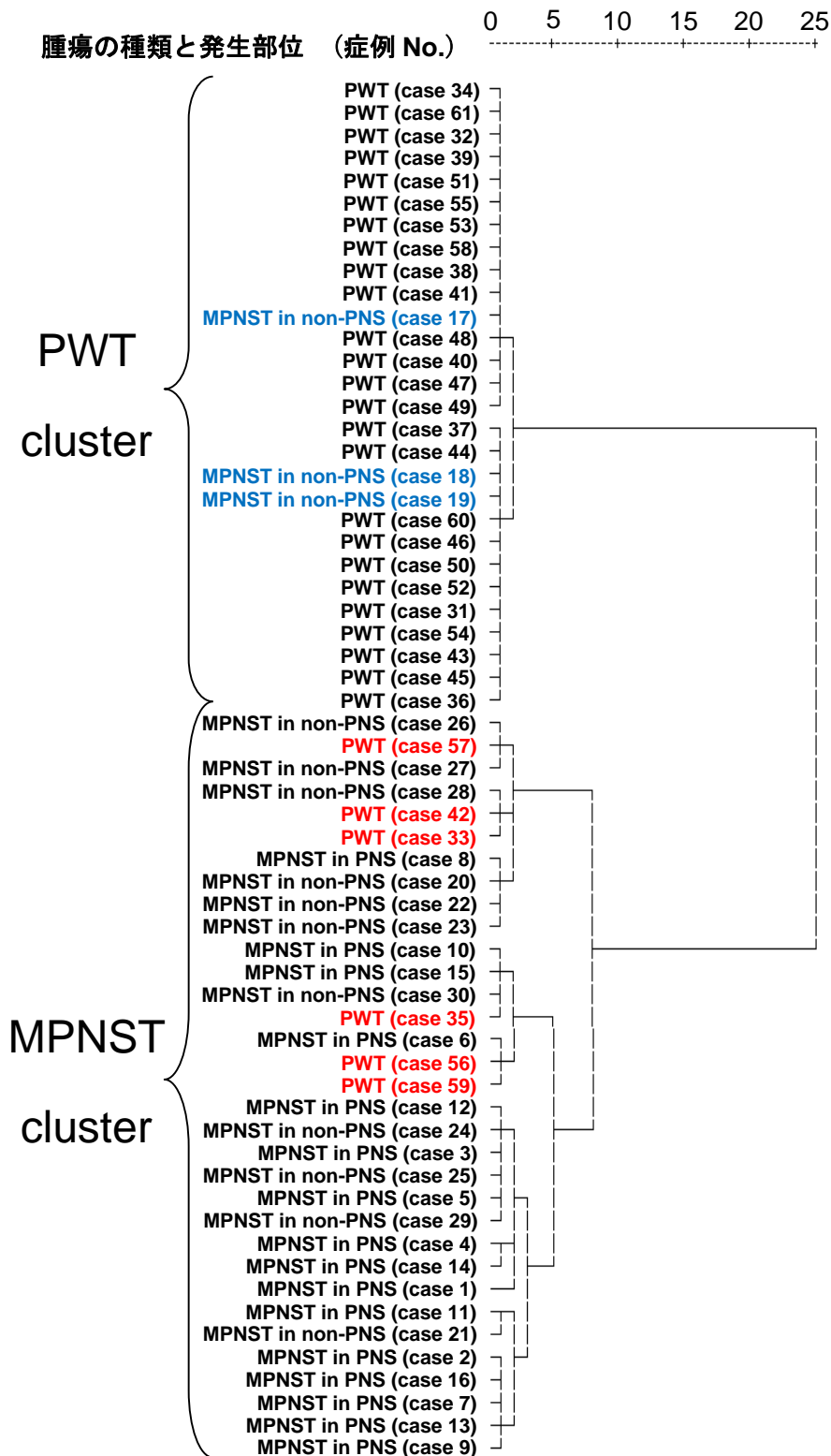


Figure 1-7. MPNSTs と PWTs 症例のクラスター解析。

Ward 法を用いて作成したデンドログラム。MPNSTs と PWTs は 2 つの異なる群に分けられた。Non-PNS に発生した 3 例の MPNSTs (症例 17-19 : 青字) は PWT の群に、一方、6 例の PWTs (33、35、42、56、57、59 : 赤字) は MPNST の群に分類された。

第2章 舌の顆粒細胞腫瘍(GCTs)の由来と 細胞質内顆粒形成に関する病理学的研究

序

顆粒細胞腫瘍(granular cell tumors: GCTs)は、豊富な好酸性顆粒状細胞質を有する均一な多角形腫瘍細胞の増殖を特徴とする。GCTsは身体の中の部位にも発生し得るが、ヒトでは口腔内、特に舌に⁴⁸、イヌでは口腔内に最も多く発生する⁴⁴。通常、GCTsはヒトでも動物でも良性の挙動を示すが、まれに悪性化する^{17,48}。ヒトでは、紡錘形腫瘍細胞、大型核小体を伴う空胞状の核、分裂活性の増加、核/細胞質比の増大、多形性、および壊死といった基準のうち、3つ以上を満たしたときに、悪性と診断する⁴⁶。

GCTsの組織起源はいまだ明らかになっていない^{17,48}。以前には、骨格筋細胞、神経細胞、線維芽細胞、組織球、あるいは筋上皮細胞が腫瘍細胞の起源であると考えられていた⁴⁷。さらには、細胞に生じた退行性変化や、外傷によって誘導された増殖が、この腫瘍細胞の特徴的な形態変化にかかわっていると考えられたこともあった^{31,48}。近年では、免疫組織化学的検索および電子顕微鏡所見により、GCTsの起源は、神経堤組織、特にSchwann細胞であることが、ヒトと動物の両方で示唆されている^{17,31,38,46,48,55}。神経堤細胞からは、神経細胞、グリア細胞、Schwann細胞、色素細胞、内分泌細胞、筋細胞、頭蓋の軟骨と骨が分化する^{12,56,72}。前章で取り上げた末梢神経鞘腫瘍(PNSTs)も、Schwann細胞、神経周膜細胞、またはその両方から発生する⁶⁴が、GCTsの病理組織学的特徴はPNSTsのそれとは異なる。

GCTsの腫瘍細胞の細胞質内顆粒は、その超微形態学的特徴から、リソソーム、オートファゴソーム、またはオートファゴリソソームであると考えられている^{31,38,55}。オートファジーは、細胞が自身の構成要素を自己消化する作用であり、これにより栄養素を作り出し、飢餓状態においても生命維持に必要な細胞機能を維持し、かつ過剰な、または傷害を受けた細

胞内小器官、異常な折り畳み構造のタンパク質などを細胞内から除去することができる。オートファジーは、栄養飢餓状態、成長因子の枯渇、生体エネルギー要求の上昇、発生変化、酸化ストレス、感染、タンパク質凝集蓄積時などに急速に活性化される。オートファジーの制御には、栄養状態、ホルモン、温度、酸素濃度、細胞密度が関与している^{29,74}。ヒトのGCTsでは、腫瘍細胞にオートファジーマーカーであるLC3が発現しており、実際に細胞質内顆粒はオートファゴソームまたはオートファゴリソソームであると考えられている⁵⁵。

これに対し、イヌのGCTsにおける細胞質内顆粒の正確な性状について調べた報告はこれまでない。本章では、イヌのGCTsの起源と細胞質内顆粒の性状を解明するために、舌に発生したGCTs 12例について、病理組織学的検索、免疫組織化学的検索、超微形態学的検索、細胞培養および免疫不全マウスへの異種移植実験を行った。

材料と方法

【症例】

2010年から2013年にかけて、日本動物高度医療センターと東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室に提出された12例のイヌの舌の腫瘍を対象とした。症例情報、舌内での腫瘍発生部位、腫瘍の生物学的挙動をTable 2-1に示した。犬種、年齢(10~15歳)、性別(雄5例、雌7例)に素因は認められなかった。

【病理組織学的検索および免疫組織化学的検索】

切除生検された腫瘍組織を10%リン酸緩衝ホルマリン水溶液で固定し、パラフィン包埋した。また、初代培養のために、症例3の新鮮腫瘍組織を採取した。パラフィン包埋組織からは、厚さ2~4 μm のHE染色標本と過ヨウ素酸シッフ(PAS)染色標本を作製するとともに、Table 2-2に示した一次抗体を用いた免疫組織化学的検索を行った。S100、vimentin、Melan A、CD133、LC3、p62、NBR1、Iba1、desminについては、抗原賦活処理として、クエン酸緩衝液(pH 6.0)中で121°C10分間オートクレーブ処理した。nestin、NGFR、ubiquitin、 α -SMAについては、抗原賦活処理は行わなかった。内因性ペルオキシダーゼ活性は、3%過酸化水素加メタノールで室温5分間処理し、不活化した。非特異反応は、8%スキムミルク加TBSで37°C30分間処理し、抑制した。一次抗体との反応は4°Cで一晩行った。TBSで3回洗浄後、Dako EnVision+ System[®] 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ポリマー抗マウス二次抗体または抗ウサギ二次抗体(DAKO, Glostrup, Denmark)との反応を、室温10分間、37°C40分間ののち、さらに室温10分間行った。TBSで3回洗浄後、0.05% 3,3'-ジアミノベンジジンおよび0.03%過酸化水素加トリス塩酸緩衝液で発色した。後染色にはマイヤーのヘマトキシリンを用いた。それぞれの一次抗体に対する陽性コントロールとして用いた組織切片はTable 2-2に示した。陰性コントロールには、一次抗体の代わりにTBSを用いた。

【透過型電子顕微鏡検索】

症例 12 のホルマリン固定腫瘍組織から切り出した小片を 0.1M リン酸緩衝液(phosphate buffer: PB)で洗浄後、2.5%グルタルアルデヒド加 0.1M PB により 4°Cで 2 時間、その後、1%四酸化オスミウムにより 4°Cで 2 時間固定した。エタノール系列による脱水と QY-1 (Nisshin EM Corporation, Tokyo, Japan)による置換後、組織を Quetol651 resin (Nisshin EM)に包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色し、超微細構造を Hitachi H-7500 透過型電子顕微鏡(Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan)で観察した。

【細胞培養および免疫不全マウスへの腫瘍異種移植実験】

症例 3 の新鮮腫瘍組織を細切後、細胞を解離し、10%牛胎児血清(fetal bovine serum: FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)と 1%ペニシリンーストレプトマイシン (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を加えた Dulbecco 変法 Eagle 培地 (DMEM; Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)を入れた細胞培養用フラスコに播種した。培養細胞がコンフルエントに達したときに、継代を行った。継代 8 代目の細胞について、免疫細胞化学的検索により細胞の特徴を確認した。その後、継代を 23 代以上続けて培養細胞を株化した。この株化細胞を用いて倍加時間の測定と形態観察を行った。

初代培養から継代 13 代目の培養細胞を回収し、リン酸緩衝食塩液(phosphate buffered saline: PBS)に懸濁し、移植能の検討のために、5 週齢の雌 nude マウス(BALB/cAJcl-*nu/nu*; CLEA Japan, Tokyo, Japan) 3 匹の腰背部皮下組織に、それぞれ 1.0×10^6 個接種した。さらに、免疫不全状態の違いによる形態学的特徴の変化を調べるために、継代数の異なる培養細胞を、5 週齢の雌 SCID マウス(FOX CHASE SCID C.B-17/*lcr-scid/scid*Jcl; CLEA Japan, Tokyo, Japan) 3 匹の腰背部皮下組織に、それぞれ 3.7×10^6 個、 2.2×10^6 個、 1.1×10^6 個接種した。接種部位に触知可能な腫瘍が確認された後、腫瘍体積を(長径) × (短径) × (高さ) × 3.14/6 の式を用いて毎日算出した。(1) 腫瘍体積が体重の 10%を超えたとき、(2) 2~3

日間で体重が 20%減少したとき、または、(3) 1 週間で体重が 25%減少したときに、マウスを安楽殺、剖検し、腫瘤を採取した。腫瘤は、10%リン酸緩衝ホルマリン水溶液で固定し、パラフィン包埋した。厚さ 2~4 μm の連続切片を用いて、HE 染色標本、PAS 反応標本、Fontana-Masson 銀染色標本を作製し、病理組織学的検索と免疫組織化学的検索を行った。一連の動物実験はすべて、東京大学バイオサイエンス委員会動物実験専門委員会により承認された。

結果

【病理組織学的検索および免疫組織化学的検索】

検索した 12 例すべての腫瘍を、病理組織学的に顆粒細胞腫瘍(GCTs)と診断した。症例 12 を除く 11 例は、良性 GCT と診断した。これらの腫瘍は、豊富な好酸性顆粒状細胞質を有する多角形細胞で構成されていた(Figure 2-1a)。細胞質内顆粒は、症例 2~4、6~8、10~12 で PAS 反応陽性、ジアスターゼ抵抗性であった(Figure 2-1b)。症例 12 は悪性 GCT と診断した。この腫瘍は、主に顆粒を持たない紡錘形から多角形の腫瘍細胞で構成されていたが、まれに豊富な好酸性細胞質内顆粒を有する細胞を認めた(Figure 2-1c)。腫瘍細胞の骨格筋への浸潤像、広範囲の壊死巣も認められた。

各症例の免疫組織化学的検索の結果を Table 2-3 に示した。S100 は、症例 8、10、12 の腫瘍細胞が陽性で、症例 10 では強陽性(Figure 2-1d)、症例 8、12 では弱陽性であった。vimentin は、全症例の腫瘍細胞が強陽性であった(Figure 2-1e)。nestin は、症例 12 の腫瘍細胞が強陽性であった(Figure 2-1f)。NGFR は、症例 9、12 の腫瘍細胞が陽性で、症例 9 では弱陽性、症例 12 では強陽性であった(Figure 2-1g)。desmin は、症例 7、12 の腫瘍細胞が陽性で、症例 7 では弱陽性、症例 12 では強陽性であった(Figure 2-1h)。Melan A、Iba1、 α -SMA は全症例で陰性であった。CD133 は、症例 2、3、8、10~12 の腫瘍細胞の細胞質内顆粒が陽性で、症例 3 では弱陽性(Figure 2-1i)、症例 10 では中程度陽性、症例 2、8、11、12 では強陽性であった。各オートファジーマーカーの発現は、細胞質内顆粒に一致して認められた。LC3 は、症例 2~4、7、8、10~12 の腫瘍細胞が強陽性(Figure 2-1j)、症例 9 の腫瘍細胞が弱陽性であった。p62 は、全症例で強陽性であった(Figure 2-1k)。NBR1 は、症例 3、8、10~12 の腫瘍細胞が強陽性(Figure 2-1l)、症例 2、9 の腫瘍細胞が弱陽性であった。ubiquitin は、症例 8、10~12 の腫瘍細胞が強陽性、症例 2~4、9 の腫瘍細胞が弱陽性であった(Figure 2-1m)。

【透過型電子顕微鏡検索】

症例 12 の腫瘍細胞の細胞質に、多くの小胞状構造物とリソソーム様の電子密度の高い顆粒状構造物が認められた (Figure 2-2a 矢頭)。複数の細胞内小器官を含むオートファゴソーム様の膜状構造物 (Figure 2-2b 矢頭) や、ミエリン様の多層性膜状構造物 (Figure 2-2c 矢頭) も認められた。

【細胞培養】

初代培養から継代後数代までは、フラスコ内に円形細胞と紡錘形細胞が混在して認められたが、継代が進むと円形細胞が優勢となった。株化した培養細胞の倍加時間は 30.6 時間であった (Figure 2-3a)。その形態は、紡錘形または円形を示し (Figure 2-3b)、固定後には円形に変化した (Figure 2-3c)。核は円形から楕円形で、核/細胞質比は高く、複数の明瞭な核小体が認められた。これらの細胞は、中程度から高度の核異型と細胞異型を有していた。培養細胞の免疫細胞化学的検索結果を Table 2-3 に示した。S100、vimentin、nestin、CD133、LC3、p62、NBR1、ubiquitin、Iba1 が強陽性であった。Melan A は、少数の細胞の細胞質に顆粒状に発現していた。NGFR、 α -SMA、desmin は陰性であった。

【免疫不全マウスへの腫瘍異種移植実験】

nude マウスでは、培養細胞接種後 22 日後または 47 日後に、3 匹中 2 匹の腰背部皮下組織に腫瘍が触知された (Figure 2-3d)。SCID マウスでは、接種後 13 日後から 15 日後に、すべてのマウスの腰背部皮下組織に腫瘍が触知された (Figure 2-3e)。形成された腫瘍は紡錘形から多角形の腫瘍細胞で構成されていた。腫瘍細胞は束状交錯状配列または渦状配列をとり、壊死巣周囲に偽柵状配列が認められた (Figure 2-4a)。また、少数の腫瘍細胞に PAS 反応陽性、ジアスターゼ耐性の好酸性細胞質内顆粒が認められた (Figure 2-4b)。nude マウスおよび SCID マウスに形成されたすべての腫瘍で、少数の腫瘍細胞の細胞質内に Fontana-Masson 銀染色陽性のメラニン顆粒が認められた (Figure 2-4c)。

移植腫瘍の免疫組織化学的検索結果を Table 2-3 に示した。腫瘍細胞の細胞質に S100、

vimentin、nestin、Melan A、CD133、p62、ubiquitin の発現が認められた。S100 と Melan A は、一部の腫瘍細胞で弱陽性であった(Figures 2-4d, e)。NGFR は、SCID マウス(2/3)のみ、少数の腫瘍細胞の細胞膜に弱い発現が認められた。vimentin と nestin は、び漫性に強陽性であった(Figures 2-4f, g)。CD133 は、弱陽性から強陽性であった(Figure 2-4h)。複数の腫瘍細胞に認められた細胞質内顆粒は、ubiquitin、LC3、p62、NBR1 に陽性であった(Figure 2-4i-l)。LC3 と NBR1 は、細胞質内顆粒を有する細胞でのみ、顆粒に一致して強陽性であった。p62 と ubiquitin は、顆粒の有無にはかかわらず、多くの腫瘍細胞で発現し、p62 は全例でび漫性に強陽性、ubiquitin は全例で弱陽性から強陽性であった。Iba1、 α -SMA、desmin は、すべて陰性であった。

考察

本章で検索した 11 例の良性 GCTs の形態学的特徴は、過去に報告された所見^{17,31,44,46-48,55}と一致していた。一方、症例 12 のみが悪性 GCT と診断された。細胞質内顆粒は良性 GCT と悪性 GCT の両方で認められ、これらは、症例 1、5、9、12 を除く 8 例で PAS 反応陽性、ジアスターゼ耐性であった。これらの所見から、GCTs の細胞質内顆粒は、腫瘍の悪性度にかかわらず、特定の糖タンパク質を含むことが示唆された。

S100 と NGFR の発現は、症例 8、9、10、12 の腫瘍細胞で認められた。desmin の発現は、症例 7、12 で認められ、CD133 の発現は、症例 2、3、8、10、11、12 で認められた。nestin の発現は、症例 12 でのみ認められた。これらの結果から、腫瘍細胞は神経堤から生じる Schwann 細胞または横紋筋細胞に由来する可能性が示唆された。また、nestin、NGFR、CD133 は、それぞれ神経堤幹細胞マーカー、またはがん幹細胞(CSCs)マーカーである^{10,12,54,57}ことから、GCTs に CSCs が存在する可能性も考えられた。

腫瘍細胞の細胞質内顆粒は、LC3、p62、NBR1、ubiquitin に陽性であった。LC3 はオートファゴソームの膜に限局し、オートファジーの有用なマーカーである⁵⁵。一方、p62 と NBR1 は、ユビキチン化されたタンパク質に結合する。また、p62 は、ubiquitin と LC3 の両方のアダプタータンパク質でもある^{29,42}。オートファゴソームの形成には、これらの分子が必要である。さらに、透過型電子顕微鏡観察の結果、腫瘍細胞の細胞質にオートファゴソーム様の膜状構造物が認められた。以上のことから、イヌの舌における GCTs の細胞質内顆粒は、オートファゴソームまたはオートファゴリソソームであることが示唆された。さらに、CSCs のマーカーである CD133 の発現が、原発腫瘍、培養細胞、移植腫瘍のいずれにおいても、細胞質内顆粒に一致して認められた。Chen らは、肝細胞腺腫の研究から、CD133 は、オートファジーとエネルギー代謝に関与しており、微小環境における CSCs の生存に有益であると報告している⁶。これらの知見から、GCTs においても、CD133 の発現は、CSCs

の存在の可能性を示唆するとともに、腫瘍細胞の微小環境への適応の結果、オートファジーにより細胞質内顆粒が形成されることが示唆される。

今回、培養下では、GCTs の培養細胞に特徴的な細胞質内顆粒は認められず、形態学的には悪性の所見が認められた。また、神経系マーカー、オートファジーマーカー、幹細胞マーカーの発現が認められた。Melan A は少数の培養細胞で顆粒状に発現していた。これらの所見から、腫瘍細胞は培養により脱分化して、神経堤幹細胞の性質を獲得したことが示唆された。また、複数の細胞は Schwann 細胞またはメラノサイトへ分化したことも示唆された。さらに、培養下でも、オートファジーは活性化しているということが示唆された。Widera らは、Schwann 細胞が培養によって脱分化し、多分化能を獲得する可能性があるとして報告した⁷²。この報告と本章で得られた所見から、GCTs は神経堤細胞に由来するという仮説が支持される。

異種移植により免疫不全マウスに形成された腫瘍は、多角形から紡錘形の腫瘍細胞の束状交錯状配列から成り、壊死巣の周囲に偽柵状配列が認められた。また、まれに、腫瘍細胞の細胞質に微細な好酸性顆粒や暗褐色のメラニン顆粒が認められた。微細顆粒状細胞質を有する腫瘍細胞は、オートファジーマーカーに陽性であり、暗褐色のメラニン顆粒を有する腫瘍細胞は、Melan A に陽性であった。これに対し、原発腫瘍の腫瘍細胞は、オートファジーマーカーには陽性であるが、Melan A には陰性であった。これらのことから、腫瘍細胞は培養により脱分化し、異種移植によりメラノサイトに再分化したことが示唆された。

Dupin らは、胚における色素細胞と Schwann 細胞は、新しい環境条件下で、多分化能を取り戻すことができ、神経堤に由来する細胞は、多方向性分化能があることを報告した¹²。過去の報告^{12,72}からも、GCTs の腫瘍細胞が神経堤細胞に由来し、培養により脱分化し、異種移植によりメラノサイトに再分化したという仮説が支持される。異種移植により形成された腫瘍では、p62 と ubiquitin の発現は、細胞質内顆粒の有無にかかわらず、び漫性に認められたが、LC3 と NBR1 の発現は、細胞質内顆粒を有する腫瘍細胞でのみ認められた。こ

これらの所見から、異種移植により形成された腫瘍の腫瘍細胞には、アダプタータンパク質と結合したユビキチン化タンパク質が存在しているものの、オートファジーは一部の腫瘍細胞でのみ活性化しているということが示唆された。オートファジーは、腫瘍の発生初期には腫瘍の成長に抑制的に働くが、後期には成長の維持に働くと考えられている³²。このことから、良性 GCTs および培養条件化での腫瘍細胞内におけるオートファジーは腫瘍細胞の維持に働いていると考えられ、移植腫瘍においては、腫瘍の成長抑制または維持に働いているものと考えられる。

したがって、本章の結果より、イヌの舌の GCTs は神経堤細胞に由来すること、その細胞質内顆粒は、オートファジーによって形成され、腫瘍細胞の形態は、周囲の微小環境の変化に依存して変化することが考えられた。

要約

顆粒細胞腫瘍(GCTs)は、豊富な好酸性顆粒状細胞質を有する多角形の腫瘍細胞を特徴とする。ヒトでは、その起源は Schwann 細胞であり、細胞質内顆粒はオートファゴソーム、または、オートファゴリソームであると考えられている。しかし、イヌの GCTs では、腫瘍細胞の由来や細胞質内顆粒の性状は十分に調べられていない。本章では、イヌの舌に発生した 12 例の GCTs について、免疫組織化学的検索、透過型電子顕微鏡 (TEM) 検索、細胞培養、免疫不全マウスへの異種移植実験を行い、腫瘍細胞の由来と細胞質内顆粒の性状を調べた。複数の原発腫瘍で S100、CD133、desmin の発現が認められ、また、細胞質内顆粒はオートファジーマーカーである LC3、p62、NBR1、ubiquitin に陽性であった。TEM 観察により、オートファゴソーム様の構造が細胞質に認められた。良性 GCT を培養したところ、培養細胞は、S100、nestin、Melan A、CD133、LC3、p62、NBR1、ubiquitin を発現していた。これらのことから、イヌの GCTs の腫瘍細胞は神経堤に由来すること、培養により脱分化し、一部はメラノサイトに再分化すること、オートファジーの活性化が起こることが示された。この培養細胞を免疫不全マウスに移植することで形成された腫瘍は、紡錘形から多角形の細胞で構成され、少数の細胞にのみ細胞質内顆粒が存在し、複数の細胞の細胞質には、メラニン顆粒が認められた。腫瘍細胞は S100、nestin、Melan A、CD133 を発現していた。さらに、オートファジーマーカーのうち、p62 と ubiquitin が細胞質内顆粒の有無にかかわらず、び漫性に陽性であったが、LC3 と NBR1 は細胞質内顆粒を有する腫瘍細胞でのみ陽性であった。これらのことから、培養によって脱分化した GCTs の腫瘍細胞は、異種移植により一部がメラノサイトへ再分化することと、オートファジーが活性化した細胞でのみ細胞質内顆粒が認められることが示された。したがって、イヌの舌の GCTs は神経堤細胞に由来し、その細胞質内顆粒はオートファジーによって形成され、また、腫瘍細胞の形態はその微小環境に依存して変化すると考えられた。

図表

症例	犬種	年齢	性別	腫瘍の舌内の発生部位	生物学的挙動
1	不明	10歳	避妊雌	両側舌側面	良性
2	ミニチュア・ダックスフント	13歳6ヶ月	雌	舌側面	良性
3	雑種	12歳	雌	舌腹側	良性
4	ウェルシュ・コーギー	11歳	雌	舌腹側面中央部	良性
5	ミニチュア・ダックスフント	11歳	雄	舌腹側面	良性
6	パピヨン	13歳	避妊雌	舌辺縁部	良性
7	ミニチュア・ピンシャー	10歳	雄	舌根部両側	良性
8	雑種	15歳	避妊雌	舌辺縁部(多発性)	良性
9	ミニチュア・ダックスフント	13歳	雄	舌側面	良性
10	トイ・プードル	12歳2ヶ月	雌	舌(詳細不明)	良性
11	ウェルシュ・コーギー	12歳8ヶ月	雄	舌腹側面	良性
12	雑種	13歳6ヶ月	雄	舌根部右側および舌内部	悪性

マーカー	クローン	免疫動物	希釈倍率		IHCにおける抗原賦活処理	陽性コントロール	販売元
			IHC	ICC			
S100	Polyclonal	ウサギ	1:4000	1:500	クエン酸緩衝液(pH 6.0)を用いた 121°C10分間のオートクレーブ処理	Schwann細胞	DAKO, Glostrup, Denmark
Vimentin	Monoclonal (V9)	マウス	1:200	1:50	クエン酸緩衝液(pH 6.0)を用いた 121°C10分間のオートクレーブ処理	間葉系細胞	DAKO
Nestin	Polyclonal	ウサギ	1:60	1:20	なし	Schwann細胞	IBL, Gunma, Japan
NGFR	Monoclonal (ME20.4)	マウス	4µg/ml	1:100	なし	神経周膜細胞	Abcam, Cambridge, UK
Melan A	Monoclonal (A103)	マウス	1:50	1:50	クエン酸緩衝液(pH 6.0)を用いた 121°C10分間のオートクレーブ処理	副腎皮質細胞	DAKO
CD133	Polyclonal (ab19898)	ウサギ	1:500	1:500	クエン酸緩衝液(pH 6.0)を用いた 121°C10分間のオートクレーブ処理	腎臓ボウマン嚢および 近位尿管上皮細胞	Abcam
LC3	Polyclonal	ウサギ	1:1000	1:1000	クエン酸緩衝液(pH 6.0)を用いた 121°C10分間のオートクレーブ処理	プルキンエ細胞	MBL, Nagoya, Japan
P62	Polyclonal	ウサギ	1:1000	1:500	クエン酸緩衝液(pH 6.0)を用いた 121°C10分間のオートクレーブ処理	軸索	MBL
NBR1	Polyclonal	ウサギ	1:300	1:50	クエン酸緩衝液(pH 6.0)を用いた 121°C10分間のオートクレーブ処理	軸索	Proteintech group, Chicago, USA
Ubiquitin	Polyclonal	ウサギ	1:100	1:100	なし	老犬の正常小脳組織内 神経細胞	DAKO
Iba1	Polyclonal	ウサギ	1:250	1:250	クエン酸緩衝液(pH 6.0)を用いた 121°C10分間のオートクレーブ処理	組織球性肉腫細胞、 小膠細胞	Wako, Osaka, Japan
α-SMA	Monoclonal (1A4)	マウス	1:100	1:2000	なし	血管壁平滑筋細胞	DAKO
Desmin	Monoclonal (D33)	マウス	1:100	1:100	クエン酸緩衝液(pH 6.0)を用いた 121°C10分間のオートクレーブ処理	骨格筋細胞、心筋細胞	DAKO

IHC:免疫組織化学、ICC:免疫細胞化学

Table 2-3. 原発腫瘍、培養細胞、移植腫瘍における腫瘍細胞の免疫組織化学的検索または免疫細胞化学的検索結果

腫瘍の種類	症例/マウス	S100	Vimentin	Nestin	NGFR	Melan A	CD133	LC3	P62	NBR1	Ubiquitin	Iba1	α-SMA	Desmin
原発腫瘍	1	-	+++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
	2	-	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+	+	-	-	-
	3*	-	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++	+	-	-	-
	4	-	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	+	-	-	-
	5	-	+++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
	6	-	+++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
	7	-	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+
	8	+	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
	9	-	+++	-	-	+	-	+	+++	+	+	+	-	-
	10	+++	+++	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
	11	-	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
	12	+	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++
培養細胞*		+++	+++	+++	-	±	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
異種移植腫瘍	Nudeマウス	+	+++	+++	-	+	+++	±~+	+++	-~+	+++~+++	-	-	-
	SCIDマウス	+	+++	+++	-~±	+	+++~+++	±	+++	±	+++~+++	-	-	-

-: 陰性, ±: 一部で弱陽性, +: 弱陽性, ++: 中程度陽性, +++: 強陽性

*: 症例3の新鮮腫瘍組織から培養した継代8代目の培養細胞における検索結果。

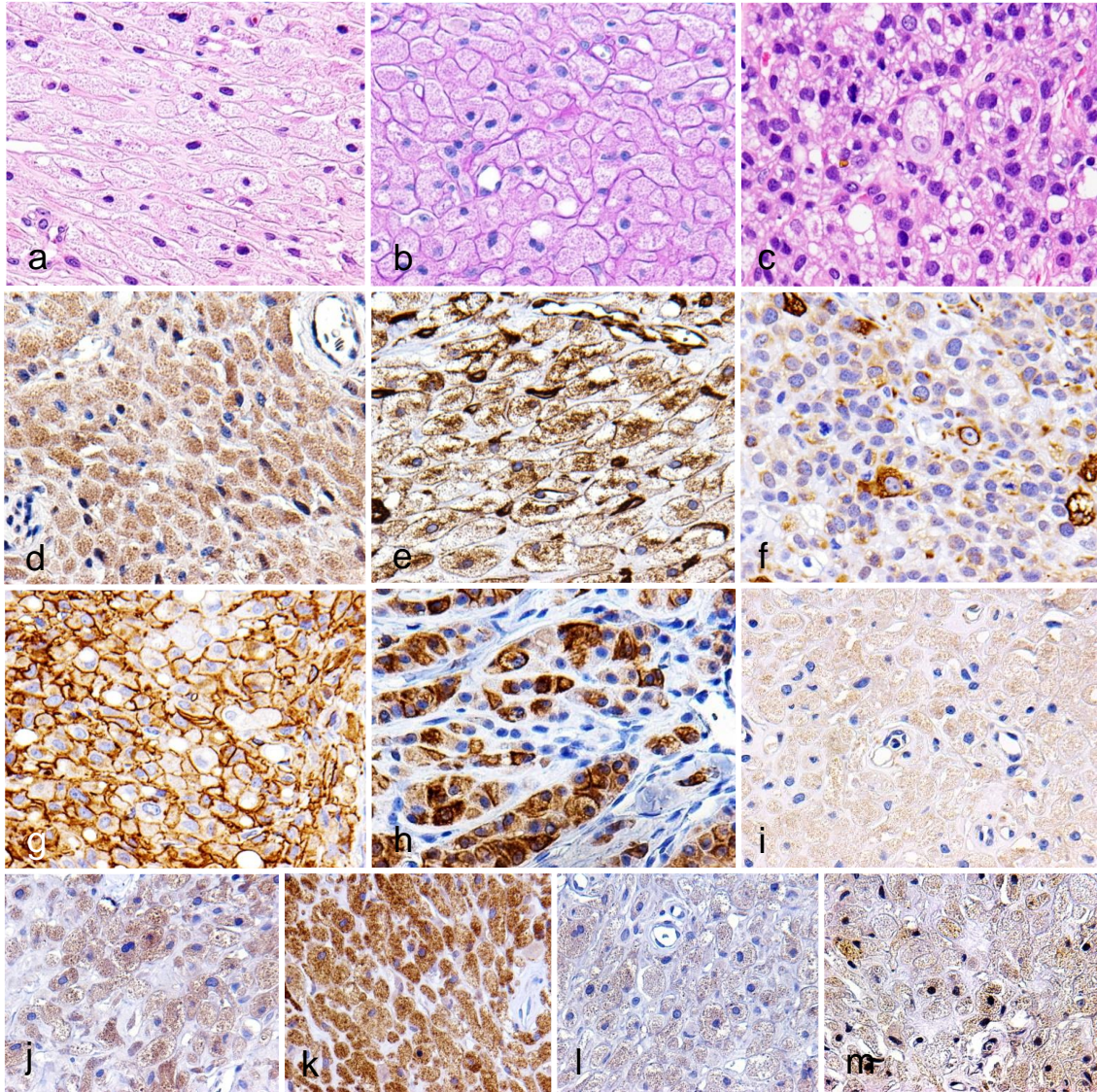


Figure 2-1. 原発腫瘍の病理組織学的検索結果(a-c)および各マーカーに対する免疫組織化学的検索結果(d-m)。a および c : ヘマトキシリン・エオジン染色(HE)、b : 過ヨウ素酸シッフ(PAS)反応、d-m : EnVision ポリマー法、後染色 : マイヤーのヘマトキシリン。

a. 症例 3。腫瘍は、豊富な好酸性顆粒状細胞質を有する均一な多角形の腫瘍細胞で構成される。**b.** 症例 3。細胞質内顆粒は、PAS 反応陽性、ジアスターゼ抵抗性。**c.** 症例 12。悪性 GCT。腫瘍は、中程度の核異型を有し、核/細胞質比の高い、紡錘形から多角形の腫瘍細胞で構成される。ときおり、豊富な好酸性顆粒状細胞質を有する腫瘍細胞を認める。**d.** 症例 10。細胞質内顆粒は、S100 に強陽性。**e.** 症例 3。細胞質内顆粒は vimentin に強陽性。**f.** 症例 12。腫瘍細胞の細胞質が nestin に強陽性。**g.** 症例 12。腫瘍細胞の細胞膜が NGFR に強陽性。**h.** 症例 12。腫瘍細胞の細胞質と細胞質内顆粒が desmin に陽性。**i.** 症例 3。細胞質内顆粒が CD133 に弱陽性。**j.** 症例 3。細胞質内顆粒が LC3 に強陽性。**k.** 症例 3。細胞質内顆粒が p62 に強陽性。**l.** 症例 3。細胞質内顆粒が NBR1 に強陽性。**m.** 症例 3。細胞質内顆粒が ubiquitin に弱陽性。

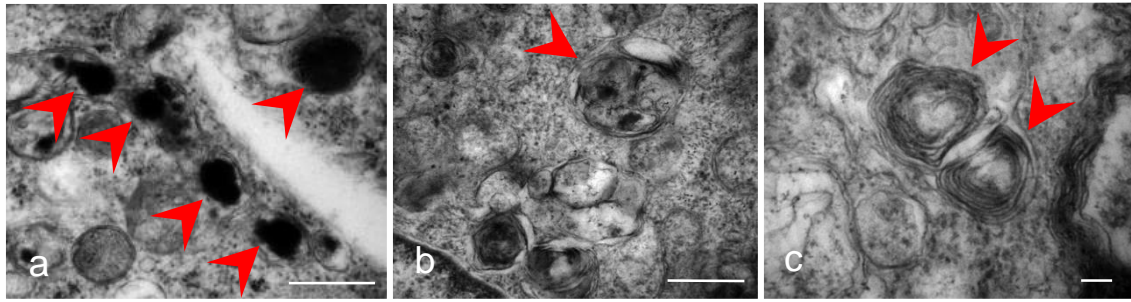


Figure 2-2. 原発腫瘍の透過型電子顕微鏡検索結果。症例 12。悪性 GCT。

- a.** 腫瘍細胞の細胞質内に、多数の小胞状構造物と電子密度の高い顆粒状構造物（矢頭）が認められる。スケールバーは 500nm。
- b.** 腫瘍細胞の細胞質内に、複数の細胞内小器官を取り込んだオートファゴソーム様の膜状構造物（矢頭）が認められる。スケールバーは 500nm。
- c.** 腫瘍細胞の細胞質内にミエリン様の多層性膜状構造物（矢頭）が認められる。スケールバーは 100nm。

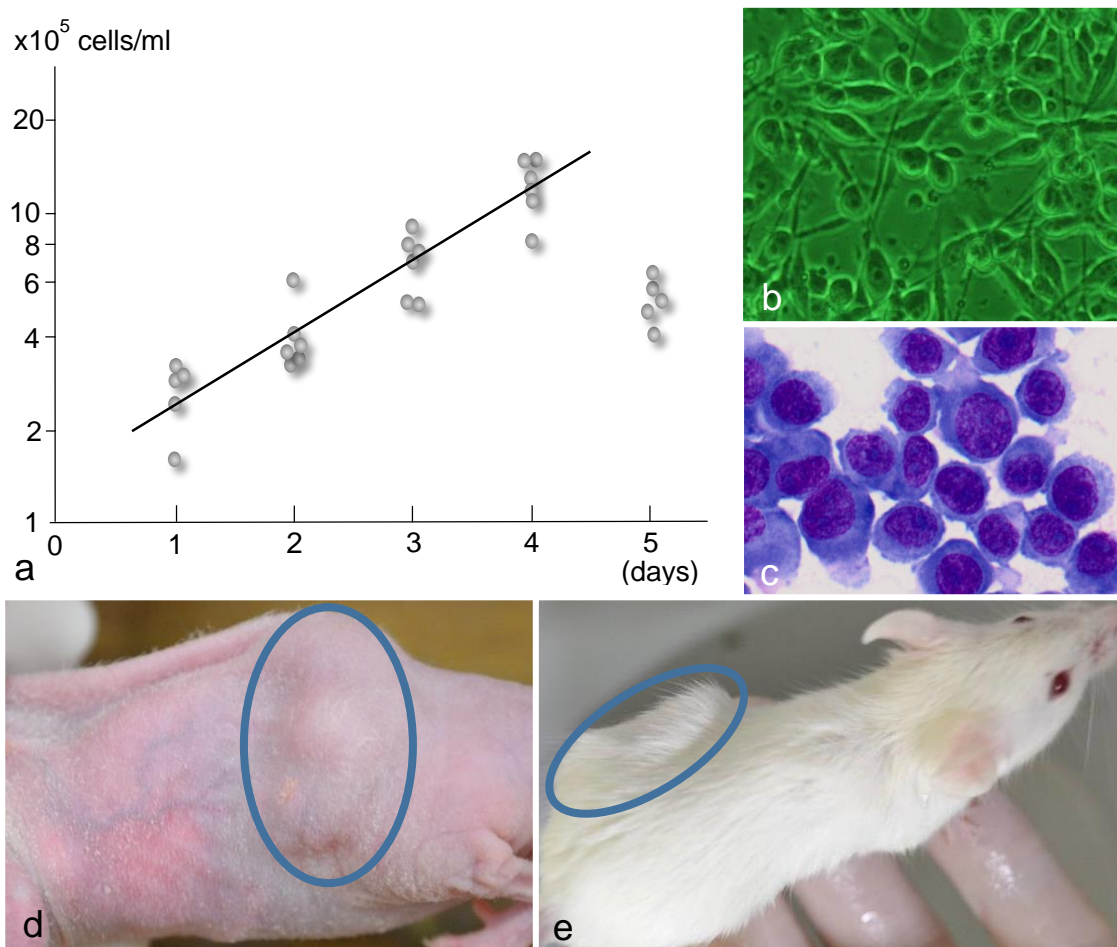


Figure 2-3. 症例 3 の新鮮腫瘍組織から培養し、23 代以上継代して株化した培養細胞の増殖曲線と形態学的特徴(a-c)、および初代培養から継代 13 代目の培養細胞を免疫不全マウスへ異種移植して形成された腫瘍の肉眼像 (d および e)。

a. 株化細胞の増殖曲線。倍加時間は 30.6 時間であった。縦軸は培養細胞数の対数値を、横軸は培養後の日数を示す。**b.** 株化細胞 (継代 6 代目) の形態学的特徴。培養細胞は紡錘形または円形を示す。位相差顕微鏡像。**c.** 株化細胞の形態学的特徴。固定すると、細胞の形態は円形に変化した。塗抹標本、Wright-Giemsa 染色。**d.** 初代培養から継代 13 代目の培養細胞の異種移植によって形成された nude マウス腰背部皮下組織の腫瘍。移植後 22 日後または 47 日後に触知可能な腫瘍 (青円) が認められた。腫瘍体積の倍加時間は約 2 日であった。**e.** 初代培養から継代 13 代目の培養細胞の異種移植によって形成された SCID マウス腰背部皮下組織の腫瘍。接種後 13 日後から 15 日後に触知可能な腫瘍 (青円) が認められた。腫瘍体積の倍加時間は約 2 日であった。

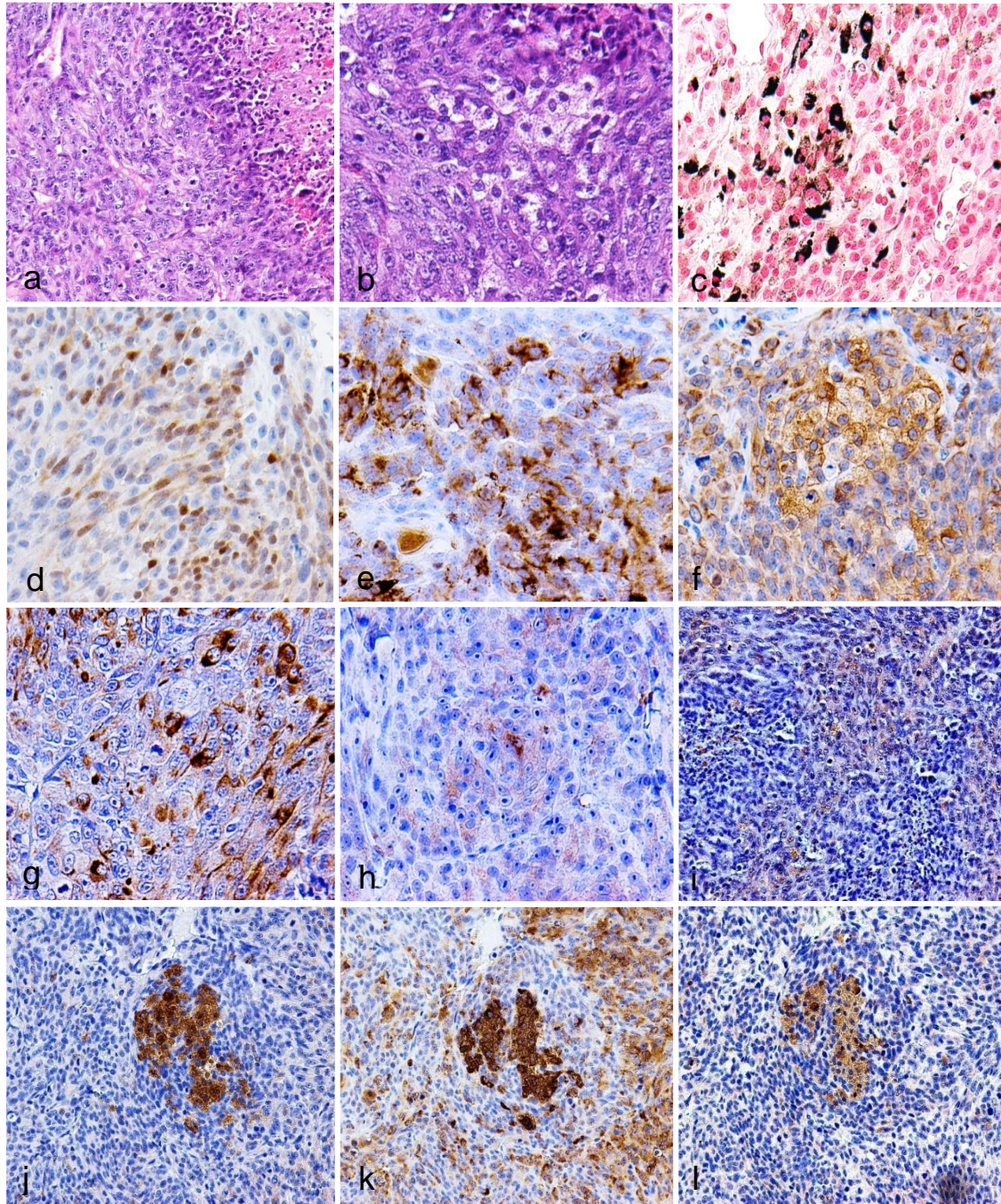


Figure 2-4. 異種移植により nude マウスの腰背部皮下組織に形成された腫瘍の病理組織学的特徴(a-c)および各マーカーに対する免疫組織化学的検索結果(d-l)。a, b : HE、c : Fontana-Masson 銀染色、d-l : EnVision ポリマー法、後染色 : マイヤーのヘマトキシリン。

a. 腫瘍は紡錘形から多角形の腫瘍細胞で構成され、腫瘍細胞の束状交錯状配列と壊死巣周囲の偽柵状配列が特徴的である。**b.** 少数の腫瘍細胞に好酸性細胞質内顆粒を認める。**c.** 複数の腫瘍細胞にメラニン顆粒を認める。**d.** 一部の腫瘍細胞が S100 に弱陽性。**e.** メラニン顆粒の有無にかかわらず、複数の腫瘍細胞が Melan A に弱陽性。**f.** 多数の腫瘍細胞が vimentin に強陽性。細胞質内顆粒も vimentin に陽性。**g.** 多数の腫瘍細胞が nestin に強陽性。**h.** 腫瘍細胞が CD133 に弱陽性。**i.** 細胞質内顆粒の有無にかかわらず、多数の腫瘍細胞が ubiquitin に陽性。**j.** 細胞質内顆粒を有する腫瘍細胞のみが LC3 に強陽性。**k.** 細胞質内顆粒の有無にかかわらず、多数の腫瘍細胞が p62 に強陽性。**l.** 細胞質内顆粒を有する腫瘍細胞のみが NBR1 に弱陽性。

第3章 MPNSTs、GCTs、PWTs の細胞学的特徴とがん幹細胞様細胞の検索

序

神経堤には、全身の様々な組織の細胞に分化する能力を持った幹細胞の存在が示唆されている^{10,12}。神経堤細胞から発生する腫瘍として、MPNSTs や GCTs、悪性黒色腫などが挙げられる。一般に、腫瘍発生のメカニズムとして、クローン進化モデルとがん幹細胞 (CSCs)モデルが提唱されている⁷⁰。固形腫瘍の CSCs のマーカーとしては、主として ABCG5、ALDH1、CD24、CD34、CD44、CD90、CD133、EpCAM などが用いられてきたが⁶⁹、中でも CD133 は最も多く用いられている。近年の研究では、SSEA-1、CD15、Lewis X、 $\alpha 6$ -integrin などのマーカーも注目されている⁷⁰。また、近年の CSCs 研究では、移植実験への新鮮腫瘍組織や継代初期の移植片の使用が注目されており、異種移植実験により形成された腫瘍の性質の評価が CSCs の存在の確認に重要であるという認識が高まっている⁷⁰。

イヌの MPNSTs は Schwann 細胞および神経周膜細胞に由来し、GCTs は Schwann 細胞やメラニン細胞への分化能を有する神経堤細胞に由来することが、第1章および第2章で確かめられた。また、ヒトの MPNSTs で、nestin、NGFR、CD34、CD133 が発現することから、CSCs 様細胞の存在が示唆されている⁵⁷。これに対し、イヌでは乳腺腫瘍^{13,34}、肺腺癌⁴⁰、肝細胞癌および胆管細胞癌⁸、膠芽腫⁶⁰で CSCs 様細胞の存在が示唆されているが、MPNSTs と GCTs では、その存在を調べた研究はない。第1章と第2章で、イヌの MPNSTs と GCTs では腫瘍細胞に nestin、NGFR、CD133 という幹細胞マーカーの発現が認められたことから、これら2腫瘍においても CSCs 様細胞が存在する可能性がある。

過去の報告と第2章までの所見を踏まえ、本章では、MPNSTs と、神経堤由来ではないが、組織学的特徴が MPNSTs と酷似する PWTs について、腫瘍細胞の細胞学的特徴を調べた。また、CSCs の存在の可能性を検討するために、MPNSTs 37例と PWTs 35例につい

て、特に幹細胞マーカーの発現に注目して、免疫組織化学的検索、細胞培養、SCID マウスへの異種移植実験を行った。また、これらの結果と、第2章で得られたGCTsにおけるnestin、NGFR、CD133の発現およびCD34の発現パターンとを比較し、MPNSTs、PWTs、およびGCTsにおけるCSCsの存在の可能性を検討した。

【症例】

第 1 章のクラスター解析の結果を受け、再度分類した MPNSTs 症例 30 例および PWTs 症例 31 例に、2011 年から 2013 年にかけて、切除生検または外科的切除後、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室において、病理組織学的検索および免疫組織化学的検索により MPNST または PWT と診断された 11 例を加えた都合 MPNSTs 37 例と、PWTs 35 例とを対象とした。最近の研究結果^{1,23,64}に基づいて、HE 染色標本で MPNST と診断した症例のうち、平滑筋マーカーのみを発現した症例、もしくはどのマーカーも発現しなかった症例は PWT に再分類した。また、HE 染色標本で PWT と診断した症例のうち、神経系マーカーを発現し平滑筋マーカーを発現しない症例は MPNST に再分類した。MPNSTs の症例を Table 3-1 に、PWTs の症例を Table 3-2 に示した。MPNSTs は 18 例が末梢神経系に、19 例が軟部組織または体腔内臓器に発生していた。PWTs は 35 例すべてが皮下組織に発生していた。PWTs の腫瘍発生部位は、頭頸部 (2 例 : 症例 38、39)、前肢または後肢 (25 例 : 症例 40-53、61-71)、体幹 (8 例 : 症例 54-60) であった。症例の平均年齢は、MPNSTs が 9.9 ± 2.4 歳齢 (3 歳齢から 13 歳 11 ヶ月齢)、PWTs が 11.2 ± 2.2 歳齢 (5 歳 5 ヶ月齢から 15 歳 1 ヶ月齢) であった。性別は、MPNSTs では、雄が 23 例 (13 例は去勢済み)、雌が 14 例 (9 例は避妊済み) で、PWTs では、雄が 18 例 (5 例は去勢済み)、雌が 16 例 (5 例は避妊済み) であった。症例 59 については、年齢と性別は記録されていなかった。

【免疫組織化学的検索】

切除した腫瘍を 10%リン酸緩衝ホルマリン水溶液で固定し、パラフィン包埋した。また、初代培養のために、症例 28 (MPNST)および症例 69 (PWT)から新鮮腫瘍組織を採取した。パラフィン包埋組織から厚さ 2~4 μm の切片を作製し、Table 3-3 に示した一次抗体を用い

て免疫組織化学的検索を行った。がん幹細胞マーカーとして CD34 と CD133 の発現を調べたが、CD133 の発現検索には、異なるエピトープを認識する 2 つの抗体 ab19898 (polyclonal; Abcam, Cambridge, UK) と W6B3C1 (monoclonal; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いた。原発腫瘍についての免疫染色には、W6B3C1 のみを用いた。S100、Claudin-1、CD34、CD133 (ab19898)、Calponin、Desmin については、抗原賦活処理として、脱パラフィン標本をクエン酸緩衝液(pH 6.0)中で 121°C10 分間オートクレーブ処理した。Olig2 については、Target Retrieval Solution (pH 9.0; DAKO, Glostrup, Denmark)中で 121°C10 分間オートクレーブ処理した。CD133 (W6B3C1)については、シトロン酸ナトリウム水溶液(Immunosaver®; Nisshin EM, Tokyo, Japan)中で 98°C45 分間加温処理した。nestin、NGFR、 α -SMA に対しては、抗原賦活処理は行わなかった。内因性ペルオキシダーゼ活性は、3%過酸化水素加メタノールで室温 5 分間処理し、不活化した。非特異反応は、8%スキムミルク加 TBS で 37°C30 分間処理し、抑制した。一次抗体との反応は 4°Cで一晩行った。TBS で 3 回洗浄後、CD34 については、ビオチン標識抗ヤギ IgG (H+L) ウサギポリクローナル抗体(KPL, Gaithersburg, Maryland, USA)と、他の抗体については、Dako EnVision+ System⁺ 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ポリマー抗マウス二次抗体または抗ウサギ二次抗体(DAKO)と、室温 10 分間、37°C40 分間、さらに室温 10 分間反応させた。TBS で 3 回洗浄後、CD34 のみ、さらに Streptavidin (DAKO)と室温 40 分間反応させた。TBS で 3 回洗浄後、すべてのマーカーについて、0.05% 3,3'-ジアミノベンジジンおよび 0.03%過酸化水素加トリス塩酸緩衝液で発色した。後染色にはマイヤーのヘマトキシリンを用いた。それぞれの一次抗体に対する陽性コントロールとして用いた組織切片を Table 3-3 に示した。陰性コントロールには、一次抗体の代わりに TBS を用いた。CD34 および CD133 の発現強度を半定量的に評価し、MPNSTs と PWTs 間で χ^2 二乗検定を行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

【細胞培養】

症例 28 (MPNST)および 69 (PWTs)の新鮮腫瘍組織を細切後、細胞を解離し、10% FBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)と 1%ペニシリンーストレプトマイシン (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を加えた DMEM (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)を容れた細胞培養用シャーレに播種した。培養細胞がコンフルエントに達したときに、継代を行った。継代初期の細胞について、上述した抗体を用いた免疫細胞化学的検索により、細胞の特徴を確認した。CD133 の発現検索には、ab19898 を用いた。

【SCID マウスへの異種移植実験】

初代培養から継代 2 代目 (MPNST 症例 28) または継代 6 代目 (PWT 症例 69) で細胞を回収して PBS に懸濁し、5 週齢の雌 SCID マウス(FOX CHASE SCID C.B-17/lcr-scid/scidJcl; CLEA Japan, Tokyo, Japan) 3 匹の腰背部皮下に移植した。移植した細胞数は、MPNST 培養細胞は、それぞれ 2.4×10^7 個、 2.4×10^7 個、 1.6×10^7 個、PWT 培養細胞は、それぞれ 2.3×10^6 個、 2.3×10^6 個、 1.2×10^6 個であった。移植部位に触知可能な腫瘍が確認された後、腫瘍体積を (長径) \times (短径) \times (高さ) $\times 3.14/6$ の式を用いて、週 2 回以上算出した。(1) 腫瘍体積が体重の 10%を超えたとき、(2) 2~3 日間で体重が 20%減少したとき、または(3) 1 週間で体重が 25%減少したときに、マウスを安楽殺、剖検し、腫瘍を採取した。腫瘍は、10%リン酸緩衝ホルマリン水溶液で固定し、パラフィン包埋した。厚さ 2~4 μm の HE 染色標本を作製し、病理組織学的検索と免疫組織化学的検索を行った。CD133 の発現検索には、ab19898 と W6B3C1 の両方を用いた。一連の動物実験はすべて、東京大学バイオサイエンス委員会動物実験専門委員会により承認された。

【GCTs についての免疫組織化学的検索および免疫細胞化学的検索】

GCTs 症例からの材料の採取方法については、第 2 章に示したとおりである。本章では、CD34 および CD133 (W6B3C1)に対する免疫組織化学的検索を追加で行った。

結果

【原発腫瘍の病理組織学的所見、培養細胞の形態学的特徴、および異種移植実験】

MPNSTs、GCTs、PWTs 各症例の病理組織学的所見は第 1 章、第 2 章に示したとおりである。MPNSTs、GCTs、PWTs の初代培養に用いた原発腫瘍の組織像、培養細胞（MPNST：継代 4 代目、PWT：継代 2 代目）の位相差顕微鏡像、および異種移植実験により形成された腫瘍の組織像を Figure 3-1a-i に示した。

原発腫瘍は、MPNST、PWT ともに紡錘形腫瘍細胞の不規則な交錯状配列や渦状配列により構成され(Figure 3-1a, b)、周囲組織への浸潤を認めた。GCT 原発腫瘍の病理組織学的所見は、第 2 章で示したとおりである(Figure 3-1c)。培養細胞は、MPNST、PWT ともに、二極性または多極性に繊細な突起を有する紡錘形を呈していた(Figure 3-1 d, e)。GCT 培養細胞の形態は、第 2 章で示したとおりである(Figure 3-1f)。異種移植実験においては、MPNST 培養細胞移植群では、移植後 77、95、または 112 日後に全個体で触知可能な腫瘍が認められた。腫瘍サイズは増大、減少を繰り返したが、移植後 251 日後でも end point の条件を超えなかったため、実験終了とし安楽死、剖検を行った。形成された腫瘍は大腿筋に深く浸潤していた。PWT 培養細胞移植群では、移植後 278 日後まで触知可能な腫瘍は認められなかったため、実験終了とし、安楽死、剖検を行った。剖検時に、3 例中 2 例の左側腰背部皮下組織に白色小腫瘍を認めた。MPNST 移植腫瘍および PWT 移植腫瘍は、いずれも原発腫瘍と同様の紡錘形腫瘍細胞の不規則な交錯状配列や渦状配列で構成され(Figure 3-1g, h)、周囲骨格筋組織への浸潤を認めた。GCT 移植腫瘍の病理組織学的所見は、第 2 章で示したとおりである(Figure 3-1i)。

【免疫組織化学的検索】

MPNSTs と PWTs 各症例における各マーカーの発現強度をそれぞれ Tables 3-4、3-5 に示した。CD34、CD133 以外の各マーカーの発現は第 1 章で示したとおりである。また、

MPNSTs と PWTs における CD34 および CD133 (W6B3C1)の発現パターンを Figure 3-2a-d に示した。

CD34 の発現は腫瘍細胞の細胞膜または細胞質に認められ、MPNSTs では 37 例中 7 例が陰性、18 例が弱陽性、5 例が中程度陽性、7 例が強陽性であった。CD34 陽性細胞は、充実性増殖巣または Antoni B タイプに相当する粘液腫状増殖巣に認められた(Figure 3-2a)。PWTs では、35 例中 1 例が陰性、4 例が弱陽性、11 例が中程度陽性、19 例が強陽性であった(Figure 3-2b)。PWTs における発現強度は、MPNSTs のそれより有意に高かった($P = 0.00029$)。CD133 の発現は腫瘍細胞の細胞膜または細胞質に認められ、MPNSTs では、37 例中 21 例が陰性、13 例が弱陽性、1 例が中程度陽性、2 例が強陽性であった(Figure 3-2c)。CD133 が弱陽性であった症例では、腫瘍増殖巣内のごく一部の腫瘍細胞のみが陽性のもから、複数の細胞集団が陽性のもまで、さまざまな程度で認められた。CD133 が中程度陽性または強陽性であった 3 例 (症例 8、11、27) では、nestin および NGFR も中程度から強陽性であった。このうち、症例 11 の腫瘍細胞は desmin も発現していた。CD34 と CD133 の発現には、負の相関の傾向が認められた。PWTs では、35 例中 22 例が陰性、9 例が弱陽性、1 例が中程度陽性、3 例が強陽性であった(Figure 3-2d)。CD133 が弱陽性であった症例では、ごく一部の腫瘍細胞のみが陽性のもから、複数の細胞集団が陽性のもまで認められた。CD133 が中程度陽性または強陽性であった 3 例 (症例 47、48、67) では、nestin の発現も認められた。症例 49 は nestin に陰性であったが、CD133 は強陽性であった。MPNSTs と PWTs 間で、発現強度に有意差は認められなかった($P = 0.17$)。

初代培養に用いた原発腫瘍、培養細胞、移植腫瘍における各マーカーの発現強度は Table 3-6 に示したとおりである。また、MPNSTs 移植腫瘍と PWTs 移植腫瘍における CD34 および CD133 (W6B3C1)の発現パターンを Figure 3-3a-d に示した。

原発腫瘍において、S100、NGFR、Olig2、 α -SMA、desmin、calponin の発現強度は、MPNST、PWT ともに陰性から弱陽性であった。Nestin は、MPNST、PWT ともに中程度

から強陽性であった。claudin-1 は、MPNST では陰性、PWT では中程度陽性であった。

CD34 は、MPNST、PWT ともに強陽性であった。CD133 (W6B3C1)は、MPNST は弱陽性、PWT は陰性であった。

MPNST の培養細胞は、すべてのマーカーに中程度陽性から強陽性であった。PWT の培養細胞は、nestin と CD133 (ab19898)は強陽性、S100、Olig2、claudin-1、calponin は中程度陽性、 α -SMA、NGFR、desmin は弱陽性であった。

異種移植によって形成された腫瘍における各マーカーの発現は、MPNST 移植腫瘍では、S100、nestin、desmin が一部で弱陽性であった。PWT 移植腫瘍では、S100 が一部で弱陽性であった。CSCs マーカーについては、CD34 は MPNST 移植腫瘍では弱陽性から中程度陽性(Figure 3-3a)、PWT 移植腫瘍では強陽性であった(Figure 3-3b)。CD133 は MPNST 移植腫瘍、PWT 移植腫瘍ともに陰性であった(Figure 3-3c, d)。他のマーカーは陰性であった。

【GCTs の免疫組織化学的および免疫細胞化学的検索】

GCTs における CSCs マーカーの発現を、Table 3-7 および Figure 3-4a-f に示した。原発腫瘍では、CD34 の発現は 12 例中 11 例で認められた。症例 2、3、7、11、12 では細胞質内顆粒に一致して認められ、症例 1、4、5、8、9、10 では細胞膜に認められた。症例 6 は陰性であった。症例 12 では細胞質内顆粒を有する腫瘍細胞のみが陽性となった。CD133 (ab19898)に対しては、原発腫瘍では 12 例中 6 例で弱陽性から強陽性であった。また、CD133 (W6B3C1)に対しては、原発腫瘍のうち症例 11 のみが一部で弱陽性で、他は陰性であった。移植腫瘍では、CD34 は nude マウスでは陰性から弱陽性、SCID マウスでは陰性から一部で弱陽性であった。CD133 (ab19898)は、nude マウスでは弱陽性から中程度陽性、SCID マウスでは弱陽性から強陽性であった。CD133 (W6B3C1)は、nude マウスでは一部で弱陽性、SCID マウスでは陰性から一部で弱陽性であった。

考察

本章で検索した症例のうち、MPNSTs では 37 例中 16 例(43.2%)で、PWTs では 35 例中 13 例(37.1%)で CD133 の発現が認められた。これらの症例では一部の腫瘍細胞のみが陽性、もしくは複数の腫瘍細胞集団が陽性となった。また、多くの症例で、nestin、NGFR、CD34 といった他の幹細胞マーカーも陽性であった。MPNSTs で CD133 が中程度陽性または強陽性となった 3 例（症例 8、11、27）では、nestin および NGFR も中程度陽性から強陽性であった。とくに、症例 11 では desmin も強陽性で、多方向性分化を示す症例では、CD133 陽性の CSCs 様細胞が多数含まれている可能性が示唆された。ヒトの MPNSTs では CSCs 様細胞が同定されており、幹細胞マーカーである CD133、Oct4、nestin、NGFR の発現が上昇していることが報告されている⁵⁷。本章で検索したイヌの MPNSTs でも、CD133、nestin、NGFR の発現が認められたことから、イヌの MPNSTs にも神経堤幹細胞に由来する CSCs 様細胞が存在する可能性が示唆された。また、PWTs でも CD133 が中程度陽性から強陽性となった 4 例（症例 47、48、49、67）のうち、症例 49 を除く 3 例に nestin の発現が認められた。イヌの PWT に CSCs が存在するという報告はこれまでないが、イヌの PWTs は、血管壁周囲に存在する未分化幹細胞、線維芽細胞、周皮細胞、筋周皮細胞、平滑筋細胞、筋線維芽細胞、またはこれらの性質が重複する移行細胞を起源とする可能性が指摘されている⁴¹。本章で検索した PWTs においても、幹細胞マーカーの発現が認められたことから、PWTs の起源として、血管壁周囲の未分化幹細胞が考えられ、CSCs 様細胞が存在する可能性も示唆された。また、細胞培養を行った MPNST（症例 28）と PWT（症例 69）について、継代初期の培養細胞は SCID マウスへの移植能を有し、原発腫瘍の形態学的特徴を保持する腫瘍を形成することが確認された。

GCTs においては、CD133 (ab19898)の発現が、原発腫瘍 12 例中 6 例で認められたが、CD133 (W6B3C1)の発現は、原発腫瘍 12 例中 1 例のみに認められたにすぎなかった。移植

腫瘍でも、ab19898 が全例で弱陽性から強陽性であったのに対して、W6B3C1 は陰性から一部で弱陽性であった。GCTs では、ab19898 で検出された CD133 陽性細胞は、W6B3C1 では、症例 11 の一部でしか検出されなかったが、MPNSTs および PWTs では、W6B3C1 で検出される CD133 陽性細胞が認められた。CD133 抗体のうち、W6B3C1 は糖化された細胞外エピトープ 1 を認識し、ab19898 は糖化されていない細胞内エピトープを認識する。このことから、MPNSTs および PWTs では、糖化されたエピトープ 1 を有する CSCs 様細胞が存在し、GCTs では、糖化されていない細胞内エピトープを有する CSCs 様細胞が存在する可能性が示唆された。しかしながら、CSCs は分化するときに糖化状態が変化する可能性があることが報告されており^{19,39}、糖化抗原を認識する抗体では、すべての CSCs を検出できていない可能性がある。GCTs では、第 2 章で示したように、移植により原発腫瘍とは病理組織学的に異なる組織像を示す腫瘍が形成されることから、GCTs の起源となる神経堤細胞は、MPNSTs のそれよりも形態学的不安定性が強く、より多方向性分化能が高い可能性が考えられる。

CD34 は、PWTs で MPNSTs よりも有意に高い発現が認められた。CD34 は膜貫通型の糖タンパク質であり、リンパ造血器系の幹細胞または前駆細胞、小血管の内皮細胞、胚性線維芽細胞、胎児および成体の神経組織の細胞に発現することが知られている。とくに未熟な幹細胞で最も強く発現する。PWTs における CD34 の発現は、過去の報告¹と同様、ほぼ全例で中程度から強陽性であった。MPNSTs でも 30 例が弱陽性から強陽性であった。ヒトの MPNSTs では、CD34 の発現は、Antoni B タイプの増殖巣における神経内膜由来の線維芽細胞様細胞で認められることが報告されているが²⁰、本章におけるイヌでの検索の結果、充実性増殖巣および Antoni B タイプに相当する粘液腫状増殖巣に CD34 陽性の腫瘍細胞が認められた。CD133 は、CD34 陽性の幹細胞または前駆細胞に発現することが知られている^{39,69}。本研究でも、CD34 陽性、CD133 陽性の腫瘍細胞を含むと考えられる症例が

MPNSTs、PWTs とともに認められた。この所見からも、両腫瘍において CSCs 様細胞が存在する可能性が示唆される。

MPNST、PWT の細胞培養および異種移植実験においては、原発腫瘍と培養細胞、移植腫瘍それぞれで、腫瘍細胞の形態、組織学的構築が類似していた。移植腫瘍についての免疫組織化学的検索の結果、MPNST 移植腫瘍、PWT 移植腫瘍ともに、神経系マーカーは陰性から一部で弱陽性、平滑筋マーカーは陰性であった。また、CD34 は、MPNST 移植腫瘍において弱陽性から中程度陽性、PWT 移植腫瘍において強陽性であった。CD133 は、いずれの移植腫瘍とも ab19898、W6B3C1 とともに陰性であったが、CD34 の発現から、CSCs 様細胞が存在する可能性が示唆された。

本章では、イヌの MPNSTs、GCTs、PWTs について、免疫組織化学的検索によって、CSCs マーカーに陽性の細胞が認められ、異種移植実験によって、原発腫瘍と同一の細胞学的、組織学的特徴を示す腫瘍が形成されたことから、これら腫瘍には CSCs が存在する可能性が示唆された。CSCs の正確な同定には、培養細胞の *in vitro* でのクローニング、sphere assay、フローサイトメトリー法による sub population assay や aldefluor assay などによって CSCs を単離した上で、main population と sub population の細胞を 1×10^3 個や 1×10^4 個といった少数の細胞数で移植し、腫瘍原性の強さの比較と、原発腫瘍と同一の細胞学的特徴、組織学的不均一性を保った腫瘍を形成するか否かを確認する必要がある。さらに、培養細胞の移植実験により形成された腫瘍から再度培養を行って、他個体の免疫不全マウスへの移植を繰り返し、連続して同一の特徴を示す腫瘍を形成する能力のある細胞が含まれていることを確認する必要がある。本章では、正確な CSCs の単離はできておらず、また、移植した細胞数は、MPNST は 1.6×10^7 個と 2.4×10^7 個、GCT は 1.0×10^6 個、 1.1×10^6 個、 2.2×10^6 個、 3.7×10^6 個、PWT は 1.2×10^6 個と 2.3×10^6 個であった。そのため、CSCs の正確な同定には、今後更なる研究が必要であると考えられる。人医療域では、CSCs を標

的とする新規治療法に関する研究が盛んに行われている。獣医領域でも、今後、これら CSCs 様細胞を標的とした新規治療法の開発を視野に入れた研究が必要になると考えられる。

要約

固形腫瘍のがん幹細胞(CSCs)マーカーとしては、CD133 が最も多く用いられている。近年では、移植実験への新鮮腫瘍組織や継代初期の移植片の使用が注目されており、異種移植実験により形成された腫瘍の性質の評価が CSCs の存在の確認に重要であるという認識が高まっている。ヒトの MPNSTs においては、nestin、NGFR、CD34、CD133 の発現により、CSCs 様細胞の存在が示唆されているが、これまで、イヌの MPNSTs、GCTs、PWTs において、その存在について調べた研究はない。本章では、イヌの MPNSTs、GCTs、PWTs における CSCs の存在の可能性を検討することを目的として、第 1 章、第 2 章で得られた所見とともに、CSCs マーカーである CD34 と CD133 (ab19898, W6B3C1)の発現を調べた。MPNSTs と PWTs では W6B3C1 のみを用いた。また、1 例の MPNST と 1 例の PWT の新鮮腫瘍組織から初代培養を行い、培養細胞の細胞学的特徴を調べるとともに、SCID マウスの腰背部皮下組織に移植し、原発腫瘍と同一の腫瘍形成能を有するかを検討した。その結果、MPNSTs において nestin、NGFR、CD34、CD133 (W6B3C1)を発現する症例が複数認められ、CSCs 様細胞が存在する可能性が示唆された。PWTs でも、nestin、CD34、CD133 (W6B3C1)を発現する症例が認められ、CSCs 様細胞が存在する可能性が示唆された。細胞培養および異種移植実験では、MPNSTs、PWTs とともに、原発腫瘍、培養細胞、移植腫瘍それぞれの腫瘍細胞の形態、組織学的構築は類似していた。GCTs では、CD34 と CD133 (ab19898)の発現が多く、原発腫瘍および移植腫瘍で認められたが、CD133 (W6B3C1)の発現は、原発腫瘍 1 例と移植腫瘍において、一部の細胞でしか認められなかった。以上の所見より、イヌの MPNSTs、GCTs、PWTs について、免疫組織化学的検索によって、CSCs マーカーに陽性の細胞が認められ、異種移植実験によって、原発腫瘍と同一の細胞学的、組織学的特徴を示す腫瘍が形成されたことから、これら腫瘍には CSCs が存在する可能性があるが、その正確な同定には、今後更なる研究が必要であると考えられる。

図表

症例	品種	年齢	性別	腫瘍発生部位	
1	チワワ	11歳	雄	延髄-C1硬膜内髄外	PNS
2	フレンチ・ブルドッグ	6歳4ヶ月	雄	C1-2硬膜内髄外	
3	ミニチュア・シュナウザー	10歳11ヶ月	雌	C2部位髄外	
4	雑種	7歳	雄	C2脊柱管内	
5	ミニチュア・シュナウザー	7歳	雌	C2-3硬膜内髄外	
6	ミニチュア・ダックスフント	12歳2ヶ月	雄	C5-6神経根	
7	ミニチュア・ダックスフント	13歳1ヶ月	雄	C6-7右側神経根	
8	ヨークシャー・テリア	10歳4ヶ月	去勢雄	C6-7右側神経根	
9	ミニチュア・ダックスフント	10歳	去勢雄	C6-T1右側腕神経叢	
10	シェットランド・シープドッグ	13歳6ヶ月	去勢雄	左側腕神経叢	
11	ウェルシュ・コーギー	9歳5ヶ月	雄	左側尺骨神経	
12	ビーグル	8歳	雄	T8右側椎弓部(再発)	
13	ウェルシュ・コーギー	10歳2ヶ月	避妊雌	L2-3硬膜内髄外	
14	雑種	13歳8ヶ月	避妊雌	L2-3髄外硬膜外	
15	雑種	13歳2ヶ月	去勢雄	L4-硬膜内	
16	アメリカン・コッカー・スパニエル	11歳	避妊雌	L7脊髄	
17	雑種	7歳11ヶ月	避妊雌	軸椎内、神経根	
18	ビーグル	9歳7ヶ月	避妊雌	坐骨神経	
19	ゴールデン・レトリバー	7歳4ヶ月	避妊雌	下腹部腹壁	non-PNS
20	雑種	9歳6ヶ月	避妊雌	左側肩部	
21	ミニチュア・ダックスフント	9歳10ヶ月	去勢雄	左側腋窩から胸腔(再発)	
22	ヨークシャー・テリア	11歳6ヶ月	去勢雄	左側前肢橈尺骨部外側	
23	ポメラニアン	13歳11ヶ月	雌	左側前肢(再発)	
24	雑種	3歳	去勢雄	左側大腿内側	
25	ドーベルマン	11歳3ヶ月	雌	大腿部	
26	ウェルシュ・コーギー	7歳5ヶ月	避妊雌	大腿部	
27	ラブラドル・レトリバー	8歳4ヶ月	雄	右側足根関節部(再発)	
28*	ウェルシュ・コーギー	10歳9ヶ月	去勢雄	尾根部	
29	ウェルシュ・コーギー	9歳9ヶ月	去勢雄	尾根部	
30	ウェルシュ・コーギー	12歳	去勢雄	脾臓	
31	ゴールデン・レトリバー	11歳	雄	脾臓	
32	ビーグル	13歳	去勢雄	脾臓、肝臓、腎臓、肺	
33	ビーグル	9歳3ヶ月	雄	右側副腎、肝臓、尿管(再発)	
34	ゴールデン・レトリバー	10歳2ヶ月	雌	歯肉(再発)	
35	ゴールデン・レトリバー	8歳10ヶ月	去勢雄	歯肉	
36	ビーグル	8歳	去勢雄	鼻腔内	
37	グレート・ピレニーズ	8歳4ヶ月	避妊雌	右側肩甲骨外側軟部組織	

PMS: 末梢神経系、non-PNS: 軟部組織または体腔内臓器
 *: 症例28の新鮮腫瘍組織用いて細胞培養を実施。

症例	品種	年齢	性別	腫瘍発生部位	
38	ウェルシュ・コーギー	12歳	去勢雄	右側頬部	頭頸部
39	シー・ズー	12歳	雌	左側頸部	
40	シー・ズー	8歳6ヶ月	雌	左側上腕骨尾側面軟部組織	前肢
41	ゴールデン・レトリバー	12歳7ヶ月	雌	左側腋窩	
42	雑種	14歳8ヶ月	雄	左側肘部	
43	ビーグル	15歳	雌	左側肘部	
44	ポストン・テリア	9歳2ヶ月	避妊雌	左側肘部	
45	雑種	15歳1ヶ月	雄	左側肘部	
46	シェットランド・シープドッグ	9歳10ヶ月	避妊雌	左側肘部	
47	シェットランド・シープドッグ	12歳4ヶ月	雄	左側肘部	
48	雑種	13歳6ヶ月	雄	左側肘部外側	
49	ヨークシャー・テリア	11歳9ヶ月	雄	右側肘部	
50	ウィペット	5歳5ヶ月	去勢雄	右側肘部	
51	柴	13歳6ヶ月	雄	右側肘部	
52	柴	11歳4ヶ月	雄	右側前肢付け根	
53	ラブラドル・レトリバー	10歳	雌	右側前肢	
54	ウェルシュ・コーギー	12歳9ヶ月	去勢雄	右腋窩から前胸部	体幹
55	ボクサー	8歳11ヶ月	雄	胸壁	
56	チワワ	9歳	雌	右側腰部	
57	ウェルシュ・コーギー	13歳3ヶ月	雌	腰背部	
58	ラブラドル・レトリバー	9歳2ヶ月	去勢雄	左側臀部	
59	シェットランド・シープドッグ	不明	不明	臀部	
60	ゴールデン・レトリバー	13歳4ヶ月	避妊雌	左側臀部	
61	雑種	9歳3ヶ月	雄	左側臀部	
62	ポメラニアン	10歳2ヶ月	避妊雌	左側下腿部	後肢
63	雑種	13歳10ヶ月	雄	左側大腿部(再発)	
64	ラブラドル・レトリバー	12歳	雌	左側大腿部(再発)	
65	シェットランド・シープドッグ	10歳	雄	左側大腿部	
66	シェットランド・シープドッグ	10歳11ヶ月	雌	左側大腿部	
67	ウェルシュ・コーギー	9歳7ヶ月	雄	右側大腿部	
68	雑種	10歳	雄	大腿部	
69*	雑種	12歳11ヶ月	避妊雌	大腿部外側および内側	
70	ゴールデン・レトリバー	13歳	去勢雄	腰下リンパ節(右側後肢腫瘍の転移病巣)	
71	ゴールデン・レトリバー	8歳6ヶ月	雌	左側足根部(再発)	
72	ヨークシャー・テリア	9歳2ヶ月	雌	右側後肢第二、三指間	

*: 症例69の新鮮腫瘍組織を用いて細胞培養を実施。

Table 3-3. 用いた一次抗体

マーカー	クローン	免疫動物	希釈倍率		IHCにおける抗原賦活処理	陽性コントロール	販売元
			IHC	ICC			
S100	Polyclonal	ウサギ	1:4000	1:500	クエン酸緩衝液(pH 6.0)を用いた 121°C10分間のオートクレーブ処理	Schwann細胞	DAKO, Glostrup, Denmark
Nestin	Polyclonal	ウサギ	1:60	1:20	なし	Schwann細胞	IBL, Gunma, Japan
NGFR	Monoclonal (ME20.4)	マウス	4µg/ml	1:100	なし	神経周膜細胞	Abcam, Cambridge, UK
Olig2	Polyclonal	ウサギ	1:500	1:500	Target Retrieval Solution (pH 9.0)を用いた 121°C10分間のオートクレーブ処理	稀突起膠細胞	EMD Millipore, Billerica, MA, USA
Claudin-1	Polyclonal	ウサギ	1:200	1:200	クエン酸緩衝液(pH 6.0)を用いた 121°C10分間のオートクレーブ処理	神経周膜細胞	Abcam
CD34	Polyclonal	ウサギ	1:80	ND	クエン酸緩衝液(pH 6.0)を用いた 121°C10分間のオートクレーブ処理	血管内皮細胞	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
CD133	Polyclonal (ab19898)	ウサギ	1:500	1:500	クエン酸緩衝液(pH 6.0)を用いた 121°C10分間のオートクレーブ処理	腎臓ボウマン嚢および 近位尿管上皮細胞	Abcam
CD133	Monoclonal (W6B3C1)	マウス	1:10	ND	シトロン酸ナトリウム水溶液を用いた 98°C45分の加温処理	腎臓ボウマン嚢および 近位尿管上皮細胞	Mitenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
α-SMA	Monoclonal (1A4)	マウス	1:100	1:2000	なし	血管壁平滑筋細胞	DAKO
Calponin	Monoclonal (hCP)	マウス	1:30000	1:30000	クエン酸緩衝液(pH 6.0)を用いた 121°C10分間のオートクレーブ処理	平滑筋細胞	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Desmin	Monoclonal (D33)	マウス	1:100	1:100	クエン酸緩衝液(pH 6.0)を用いた 121°C10分間のオートクレーブ処理	骨格筋細胞、心筋細胞	DAKO

IHC: 免疫組織化学、ICC: 免疫細胞化学、ND: 実施せず

Table 3-4. MPNST腫瘍細胞の各マーカーの発現強度

発生部位	症例	S100	Nestin	NGFR	Olig2	Claudin-1	CD34	CD133 ^a	α-SMA	Desmin	Calponin
PNS	1	+++	-	±	+++	-	+++	+	-	-	-
	2	++	±	±	±	++	+++	+	-	-	-
	3	+++	++	++	+	++	±	±	-	-	-
	4	++	++	+	++	+	+++	-	-	-	-
	5	+++	-	+++	++	+	±	-	-	-	-
	6	+++	++	+	++	+	±	-	-	-	-
	7	+++	++	-	+++	±	-	-	-	-	-
	8	+++	++	++	++	+++	-	+++	-	-	-
	9	++	+++	±	+	±	±	±	-	-	-
	10	+++	+++	++	++	+++	±	±	-	-	-
	11	+++	+++	++	++	+	+++	+++	-	+++	-
	12	+++	±	-	+	+++	-	-	-	-	-
	13	+++	±	-	±	±	±	+	-	-	-
	14	+++	+	++	++	++	+++	-	-	-	-
	15	++	±	++	++	+	±	-	-	-	-
	16	+++	+++	±	+++	++	++	-	-	-	-
	17	+++	+++	++	+	++	-	±	-	-	-
	18	++	+++	+++	+++	+++	±	+	-	-	-
non-PNS	19	++	+++	-	+	-	+++	-	-	+++	-
	20	-	+++	±	-	-	++	-	-	-	-
	21	+++	+++	++	+++	+	±	-	-	-	-
	22	++	+	-	+	+++	++	±	-	-	-
	23	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-
	24	±	+++	+++	±	-	+	-	-	-	-
	25	+	+	-	+++	+	++	+	-	-	-
	26	+	+++	++	+	-	+	±	-	-	-
	27	+	+++	±	+++	-	±	+++	-	-	-
	28 ^b	±	+++	-	-	-	+++	+	-	-	-
	29	+	++	-	++	+	+++	-	-	-	-
	30	++	+++	±	++	+	-	-	-	-	-
	31	+++	++	+	±	-	-	-	-	-	-
	32	+++	++	+	++	++	±	-	-	-	-
	33	++	+++	+++	++	±	+	-	-	-	-
	34	++	++	++	+	-	++	-	-	-	-
	35	±	+++	+	±	-	±	-	-	-	-
	36	+++	+++	++	++	+	±	-	-	-	-
	37	+++	+++	+	++	-	±	-	-	-	-

-: 陰性, ±: 一部で弱陽性, +: 弱陽性, ++: 中程度陽性, +++: 強陽性

a: CD133の発現解析には、W6B3C1を用いた。

b: 症例28の新鮮腫瘍組織を用いて細胞培養を実施。

Table 3-5. PWT腫瘍細胞の各マーカーの発現強度

発生部位	症例	S100	Nestin	NGFR	Olig2	Claudin-1	CD34	CD133 ^a	α-SMA	Desmin	Calponin
頭頸部	38	-	++	-	-	++	+++	-	-	-	-
	39	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
前肢	40	±	+	-	-	-	±	-	-	-	-
	41	-	-	-	-	-	+++	-	++	-	+
	42	-	+	-	+	+	+++	-	-	±	-
	43	-	+	-	-	±	++	±	-	±	+
	44	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-
	45	-	+	-	-	±	+++	-	±	-	-
	46	-	-	-	-	±	+++	-	±	-	-
	47	±	+++	-	-	-	++	+++	-	-	-
	48	±	++	-	-	+	+++	++	-	-	-
	49	-	-	-	-	+	+++	+++	-	-	+
	50	-	-	-	-	-	++	±	-	-	-
	51	-	±	-	-	-	++	-	-	-	-
	52	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-
53	-	+	+	-	+	++	-	+	±	+	
体幹	54	+	++	-	±	++	++	±	-	-	-
	55	±	+	-	-	+	+++	-	±	-	++
	56	±	+	-	-	+	+++	-	-	-	±
	57	-	+	-	-	++	+	-	-	-	-
	58	+	+	-	-	-	++	-	-	-	-
	59	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-
	60	++	±	-	-	++	+++	-	-	±	-
	61	-	±	-	-	++	+++	±	-	±	++
	62	-	±	-	-	-	+++	±	±	+	±
	63	±	+	-	-	++	+++	-	-	-	-
後肢	64	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	65	±	++	-	-	±	+++	±	-	-	-
	66	-	++	-	-	++	++	-	-	±	-
	67	±	±	-	-	±	+++	+++	-	±	-
	68	-	+	-	-	-	++	-	±	-	-
	69 ^b	-	+++	-	-	++	+++	±	+	-	±
	70	±	±	-	-	-	+++	±	-	±	-
	71	-	++	-	+	-	±	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	++	±	-	-	-

-: 陰性, ±: 一部で弱陽性, +: 弱陽性, ++: 中程度陽性, +++: 強陽性
a: CD133の発現解析には、W6B3C1を用いた。
b: 症例69の新鮮腫瘍組織を用いて細胞培養を実施。

Table 3-6. 原発腫瘍、培養細胞、移植腫瘍における各マーカーの発現強度

症例	腫瘍の種類	S100	Nestin	NGFR	Olig2	Claudin-1	CD34	CD133*	α-SMA	Desmin	Calponin
28	MPNST	±	+++	-	-	-	+++	+	-	-	-
	培養細胞	+++	+++	++	+++	+++	ND	+++	++	ND	ND
	移植腫瘍	±	- ~ ±	-	-	-	+ ~ +++	-	-	±	-
69	原発腫瘍	-	+++	-	-	++	+++	-	+	-	±
	培養細胞	++	+++	±	++	++	ND	+++	+	±	++
	移植腫瘍	±	-	-	-	-	+++	-	-	ND	-

-: 陰性、±: 一部で弱陽性、+: 弱陽性、++: 中程度陽性、+++: 強陽性、ND: 実施せず

*: CD133の発現検索には、原発腫瘍ではW6B3C1を、培養細胞ではab19898を、移植腫瘍では両者を用いた。

Table 3-7. GCTsにおけるがん幹細胞マーカーの発現				
腫瘍の種類	症例/マウス	CD34	CD133	CD133
			(ab19898)	(W6B3C1)
原発腫瘍	1	+++	-	-
	2	+++	+++	-
	3*	+++	+	-
	4	+++	-	-
	5	+++	-	-
	6	-	-	-
	7	+++	-	-
	8	+++	+++	-
	9	+++	-	-
	10	+++	++	-
	11	+++	+++	±
	12	+	+++	-
培養細胞*		ND	+++	ND
異種移植腫瘍	Nudeマウス	- ~ +	+ ~ ++	±
	SCIDマウス	- ~ ±	++ ~ +++	- ~ ±
-: 陰性、±: 一部で弱陽性、+: 弱陽性、++: 中程度陽性、+++ : 強陽性				
ND: 実施せず				
*: 症例3の新鮮腫瘍組織を培養した継代8代目の結果。				

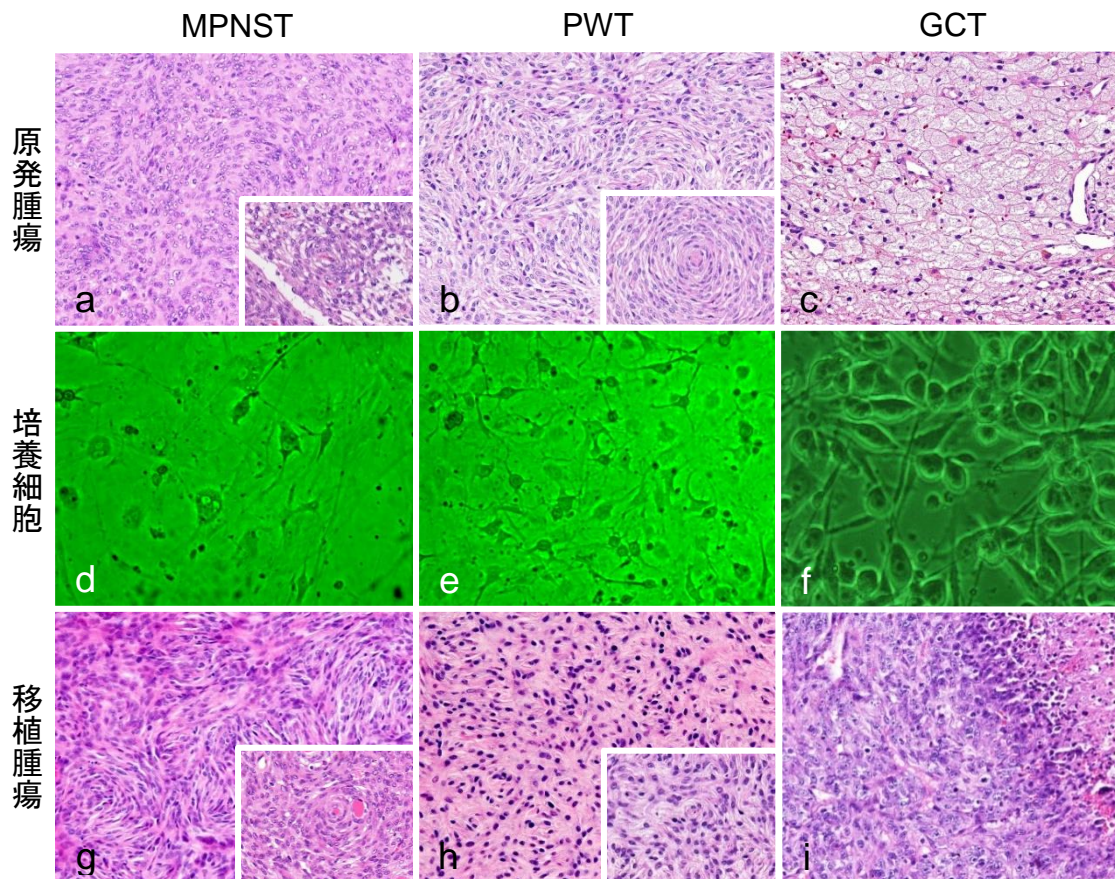


Figure 3-1a-i. 異種移植実験に用いた MPNST、PWT、GCT の原発腫瘍、培養細胞、移植腫瘍の病理組織学的および細胞学的特徴。a, b, c, g, h, i : HE 染色。d, e, f : 位相差顕微鏡像。

a. 尾根部。ウェルシュ・コーギー。症例 28。MPNST。原発腫瘍は紡錘形腫瘍細胞の不規則な交錯状配列や渦状配列（挿入図）で構成される。**b.** 大腿部外側および内側。雑種。症例 69。PWT。原発腫瘍は紡錘形腫瘍細胞の不規則な交錯状配列や渦状配列（挿入図）により構成される。**c.** 舌腹側。雑種。症例 3。GCT。腫瘍は豊富な好酸性顆粒状細胞質を有する均一な多角形の腫瘍細胞で構成される。**d, e.** MPNST 培養細胞（継代 4 代目: d）、PWT 培養細胞（継代 2 代目: e）の形態学的特徴。ともに培養細胞は二極性または多極性の繊細な突起を有する。**f.** GCT 株化細胞（継代 6 代目）の形態学的特徴。培養細胞は紡錘形または円形を示す。**g, h.** MPNST 培養細胞、PWT 培養細胞の SCID マウスへの異種移植実験の結果。MPNST 移植群(g)、PWT 移植群(h)ともに、腫瘍細胞は原発腫瘍と同様、紡錘形で、不規則な交錯状配列や渦状配列（挿入図）を示す。**i.** GCT 培養細胞の nude マウスへの異種移植実験の結果。腫瘍は紡錘形から多角形の腫瘍細胞で構成され、腫瘍細胞の束状交錯状配列と壊死巣周囲の偽柵状配列が特徴的である。

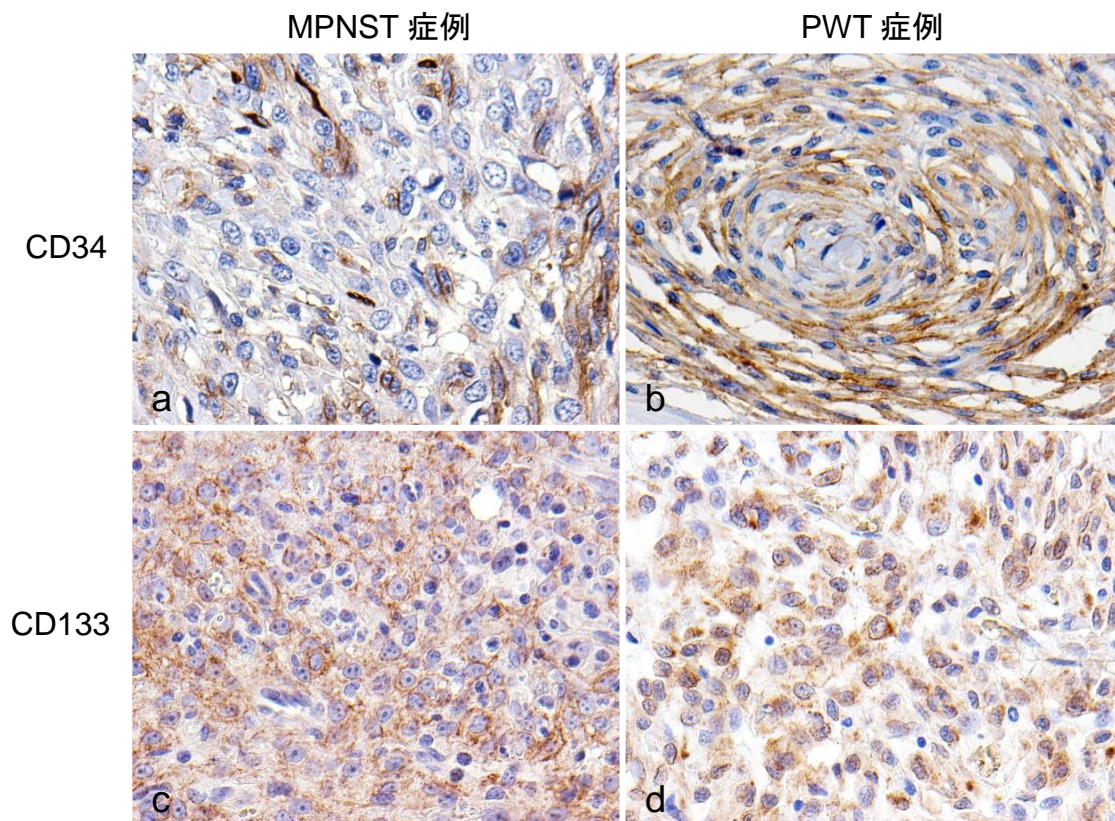


Figure 3-2a-d. MPNST、PWT 症例における CD34 と CD133 の発現。a, b : LSAB 法。c, d : EnVision ポリマー法。後染色 : マイヤーのヘマトキシリン。

- a.** 左側尺骨神経。ウェルシュ・コーギー。症例 11。MPNST 腫瘍細胞が CD34 に弱陽性。
- b.** 大腿部外側および内側。雑種。症例 69。PWT 腫瘍細胞が CD34 に強陽性。
- c.** C6-7 右側神経根。ヨークシャー・テリア。症例 8。MPNST 腫瘍細胞が CD133 (W6B3C1) に強陽性。
- d.** 左側肘部。シェットランド・シープドッグ。症例 47。PWT 腫瘍細胞が CD133 (W6B3C1) に強陽性。

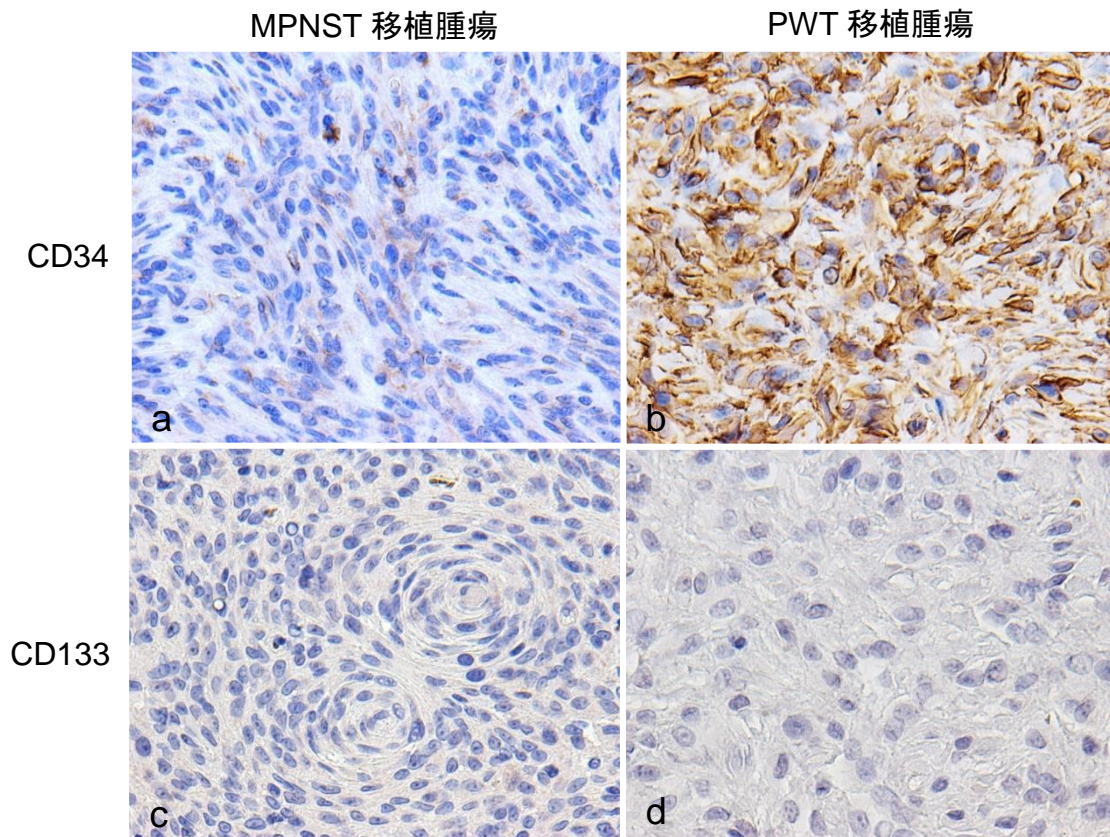


Figure 3-3a-d. MPNST 培養細胞、PWT 培養細胞それぞれの異種移植により SCID マウスの腰背部皮下組織に形成された腫瘍における CD34 と CD133 の発現。a, b : LSAB 法。c, d : EnVision ポリマー法。後染色：マイヤーのヘマトキシリン。

a. MPNST 移植腫瘍。腫瘍細胞は CD34 に弱陽性。**b.** PWT 移植腫瘍。腫瘍細胞は CD34 に強陽性。**c.** MPNST 移植腫瘍。腫瘍細胞は CD133 に陰性。**d.** PWT 移植腫瘍。腫瘍細胞は CD133 に陰性。

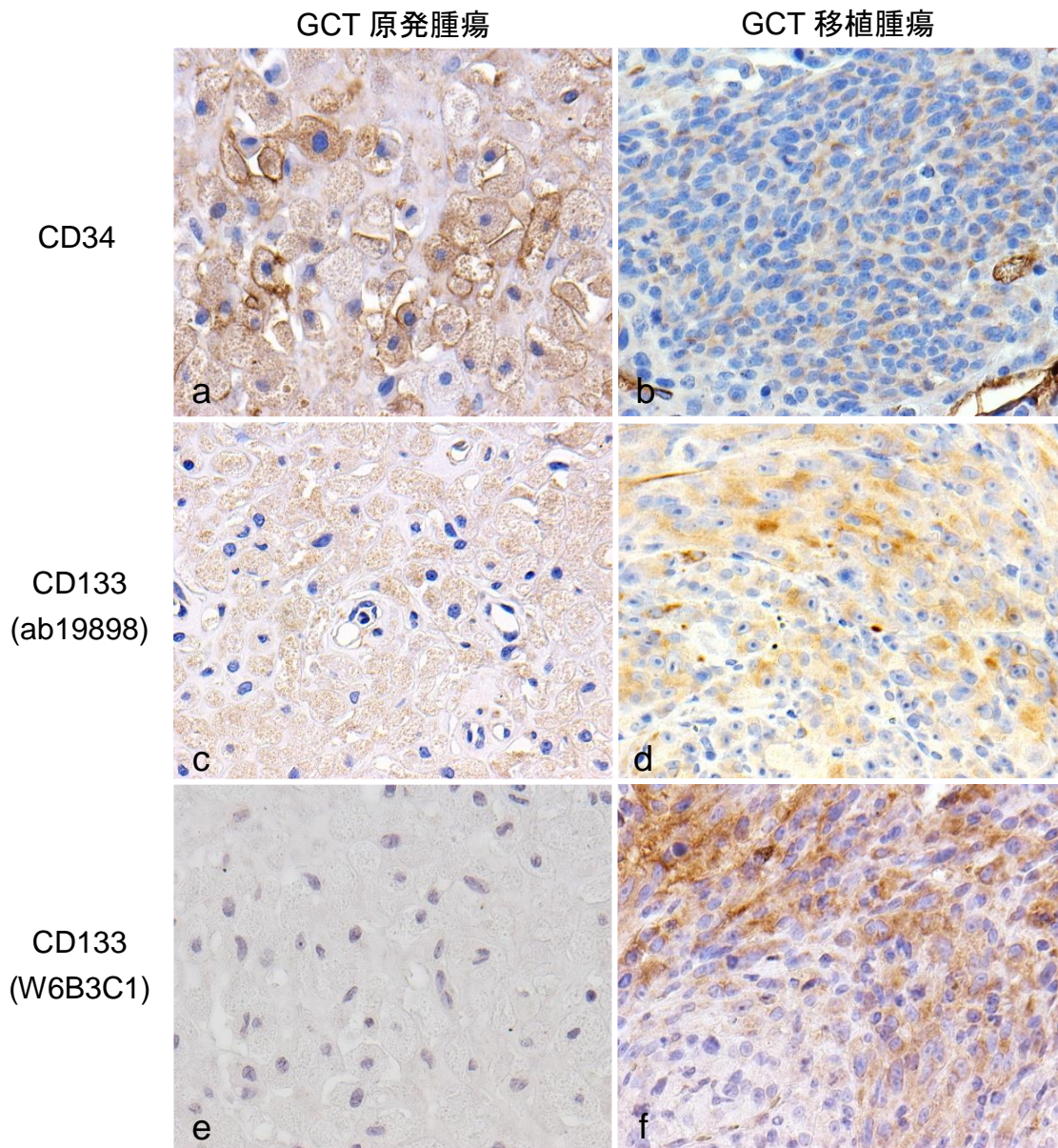


Figure 3-4a-f. GCT の原発腫瘍、および、異種移植により nude マウスの腰背部皮下組織に形成された腫瘍の CD34 (a, b)、CD133 (ab19898: c, d)、および CD133 (W6B3C1: e, f) に対する免疫組織化学的検索結果。a, b : LSAB 法。c, d, e, f : EnVision ポリマー法。後染色 : マイヤーのヘマトキシリン。

a. 症例 3。GCT。腫瘍細胞の細胞質内顆粒と細胞膜が CD34 に強陽性。**b.** GCT 移植腫瘍。腫瘍細胞の細胞質が CD34 に弱陽性。**c.** 症例 3。GCT。腫瘍細胞の細胞質内顆粒が CD133 (ab19898) に弱陽性。**d.** GCT 移植腫瘍。腫瘍細胞の細胞質が CD133 (ab19898) に弱陽性。**e.** 症例 3。GCT。腫瘍細胞の細胞質内顆粒と細胞膜が CD133 (W6B3C1) に陰性。**f.** GCT 移植腫瘍。腫瘍細胞の細胞質が CD133 (W6B3C1) に弱陽性。

総括

本研究では、イヌの悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNSTs)、血管周壁腫瘍(PWTs)、顆粒細胞腫瘍(GCTs)について、MPNSTs の診断基準の確立、MPNSTs と PWTs の鑑別診断に有用なマーカーの探索、MPNSTs と GCTs の由来細胞の特定、GCTs の細胞質内顆粒の性状解析、および、これらの腫瘍におけるがん幹細胞(CSCs)の存在の可能性を検討することを目的として、病理組織学的、細胞学的、免疫組織化学的に詳細に検討し、以下のような成果を得た。

第1章の第1項では、ヒトでは Schwann 細胞、神経周膜細胞、またはその両方に由来するとされる MPNSTs について、イヌにおける由来細胞を確定し、正確な診断基準を確立することを目的として、イヌの MPNSTs を末梢神経系(PNS)に発生した 16 例と軟部組織または体腔内臓器(non-PNS)に発生した 14 例に分け、それぞれの病理組織学的特徴と S100、nestin、NGFR、Olig2、claudin-1、CD57、PRX、 α -SMA、desmin、calponin の発現の相違を比較・検討した。その結果、イヌの MPNSTs の病理組織学的特徴は、発生部位が PNS か non-PNS かにかかわらず類似していた。また、発生部位にかかわらず、S100、nestin、NGFR、Olig2、claudin-1、CD57、PRX の発現が認められた。また、2 例でのみ desmin の発現が認められた。発生部位ごとの平均陽性細胞率の比較では、PNS に発生した MPNSTs では、S100、Olig2、Claudin-1 の平均陽性細胞率が non-PNS に発生した MPNSTs のそれよりも有意に高かったが、その他のマーカーの発現には、発生部位による有意差は認められなかった。クラスター解析でも、PNS に発生した MPNSTs と non-PNS に発生した MPNSTs とは、二つの群には分かれなかった。これらのことから、イヌの MPNSTs はその発生部位にかかわらず、Schwann 細胞、神経周膜細胞に由来し、同一の病理学的特徴を示すことと、発生部位にかかわらず、ヒトの MPNSTs と同一の形態学的診断基準を適用できることが示された。

第1章の第2項では、病理組織学的特徴が酷似し、以前から鑑別診断が困難で、同一の腫瘍として扱われる傾向さえある MPNSTs と PWTs との鑑別診断に有用なマーカーの探索を目的として、MPNSTs 30例と PWTs 31例における S100、nestin、NGFR、Olig2、claudin-1、CD57、PRX、 α -SMA、desmin、calponin の発現を免疫組織化学的に調べた。その結果、MPNSTs の各マーカーに対する平均陽性細胞率は、 α -SMA と calponin を除いて、PWTs のそれよりも有意に高かった。 α -SMA と calponin については、PWTs の平均陽性細胞率が、MPNST のそれよりも有意に高かった。各症例の各マーカーに対する陽性細胞率を用いたクラスター解析により、ほとんどの MPNSTs と PWTs が 2 つの異なる群に分類されたが、3例の MPNSTs は PWT 群に、NGFR あるいは Olig2 を発現していた 6例の PWTs は MPNST 群に分類された。PWT 群に再分類された 3例の MPNSTs は、ほぼすべてのマーカーに対して陰性であり、未分化型の PWT であると考えられた。また、MPNST 群に再分類された 6例の PWTs は、神経系マーカーのみが陽性であったことから、non-PNS に発生した MPNSTs であると考えられた。S100、nestin、claudin-1 は少数から多くの PWTs で発現していたが、MPNST 群に分類されなかった PWT 症例では、NGFR が全例で陰性、Olig2 が 2例を除き陰性であったことから、NGFR と Olig2 は、MPNSTs と PWTs の鑑別診断に最も有用なマーカーであるということが示唆された。

第2章では、ヒトで Schwann 細胞由来とされる GCTs について、イヌにおける由来細胞を特定することと、ヒトではオートファゴソームまたはオートファゴリソームであるとされる細胞質内顆粒について、イヌの GCTs の細胞質内顆粒の性状を解明することを目的として、イヌの舌に発生した良性 GCTs 11例および悪性 GCT 1例の病理組織学的特徴と、S100、vimentin、nestin、NGFR、Melan A、CD133、Iba1、 α -SMA、desmin、および、オートファジー関連マーカーである LC3、p62、NBR1、ubiquitin の発現を調べた。また、透過型電子顕微鏡(TEM)により、細胞質内顆粒の超微形態学的特徴を調べた。さらに、1例の良性 GCT の新鮮腫瘍組織から初代培養を行い、その細胞学的特徴を形態学および免疫

細胞化学的に調べるとともに、**nude** マウスおよび **SCID** マウスの腰背部皮下組織に移植することで、培養細胞が移植能および、原発腫瘍と同一の腫瘍形成能を有するかを検討した。その結果、良性 GCTs の病理組織学的特徴は過去の報告と一致し、細胞質内顆粒は PAS 反応陽性、ジアスターゼ耐性であった。免疫組織化学的検索では、**vimentin** は全例で、**S100** と **NGFR** は 4 例で発現していた。**desmin** は 2 例で発現し、**CD133** は 6 例で発現していた。**nestin** は悪性 GCTs のみで発現していた。**Melan A** は発現していなかった。これらの結果から、腫瘍細胞は神経堤から生じる **Schwann** 細胞または横紋筋細胞に由来する可能性が示唆された。また、神経堤幹細胞マーカーである **nestin**、**NGFR**、および **CSCs** マーカーである **CD133** の発現が認められたことから、GCTs に **CSCs** が存在する可能性も考えられた。腫瘍細胞の細胞質内顆粒は、**LC3**、**p62**、**NBR1**、**ubiquitin** に陽性であり、さらに、**TEM** 観察の結果、腫瘍細胞の細胞質にオートファゴソーム様の膜状構造物が認められたことから、イヌの舌における GCTs の細胞質内顆粒は、オートファゴソームまたはオートファゴリソームであることが示された。培養細胞は、形態学的に悪性所見を有し、神経系マーカー、オートファジーマーカー、幹細胞マーカーの発現が認められた。**Melan A** は少数の培養細胞で顆粒状に発現していた。これらの所見から、腫瘍細胞は培養により脱分化して、神経堤幹細胞の性質を獲得したことが示唆された。また、複数の細胞は **Schwann** 細胞またはメラノサイトへ分化したことも示唆された。異種移植により免疫不全マウスに形成された腫瘍は、多角形から紡錘形の腫瘍細胞の束状交錯状配列から成り、壊死巣の周囲に偽柵状配列が認められた。また、まれに、腫瘍細胞の細胞質に好酸性顆粒やメラニン顆粒が認められた。顆粒状細胞質を有する腫瘍細胞は、オートファジーマーカーに陽性であり、暗褐色のメラニン顆粒を有する腫瘍細胞は、**Melan A** に陽性であった。これらのことから、一部の腫瘍細胞は、異種移植によりメラノサイトに再分化したことが示唆された。また、移植腫瘍の細胞質内に **p62** と **ubiquitin** の発現が、細胞質内顆粒の有無にかかわらず認められたが、**LC3** と **NBR1** の発現は、細胞質内顆粒を有する腫瘍細胞でのみ認められた。これらのこと

から、異種移植により形成された腫瘍の腫瘍細胞には、アダプタータンパク質と結合したユビキチン化タンパク質が存在しているものの、オートファジーは一部の腫瘍細胞でのみ活性化していることが示唆された。したがって、イヌの舌の GCTs は神経堤細胞に由来すること、その細胞質内顆粒は、オートファジーによって形成されること、また、腫瘍細胞の形態は、周囲の微小環境の変化に依存して変化することが示唆された。

第 3 章では、神経堤由来とされる MPNSTs と GCTs、および、由来が異なりながら MPNSTs と組織学的特徴、生物学的挙動が酷似する PWTs における CSCs の存在の可能性を検討することを目的として、第 1 章、第 2 章の検索結果に加えて、CSCs マーカーである CD34 と CD133 の発現を調べた。CD133 の発現解析には、糖化されていない細胞内エピトープを認識する ab19898 と、糖化されたエピトープ 1 を認識する W6B3C1 を用いた。MPNSTs と PWTs では W6B3C1 のみを用いた。また、1 例の MPNST と 1 例の PWT の新鮮腫瘍組織から初代培養を行い、培養細胞の細胞学的特徴を調べるとともに、SCID マウスの腰背部皮下組織に移植し、移植能と原発腫瘍と同一の腫瘍形成能を有するかを検討した。その結果、MPNSTs では 37 例中 16 例で CD133 (W6B3C1) の発現が認められた。ほとんどの症例で、一部の腫瘍細胞のみ、もしくは、複数の腫瘍細胞集団が陽性となった。また、多くの症例で、nestin、NGFR、CD34 といった幹細胞マーカーも陽性であった。1 例では、desmin と CD133 が強陽性となり、多方向性分化を示す症例においては、CD133 陽性の CSCs 様細胞が多数含まれる可能性が示唆された。これらの結果から、イヌの MPNSTs にも神経堤幹細胞に由来する CSCs 様細胞が少数から多数存在する可能性が示唆された。また、PWTs では 35 例中 13 例で CD133 (W6B3C1) の発現が認められ、ほとんどの症例で nestin および CD34 の発現が認められ、CSCs 様細胞が存在する可能性が示唆された。細胞培養および異種移植実験では、MPNST、PWT ともに、原発腫瘍、培養細胞、移植腫瘍それぞれの腫瘍細胞の形態、組織学的構築は類似し、培養細胞は移植能と原発腫瘍と同一の腫瘍形成能を有することが確認された。GCTs では、CD34 と CD133 (ab19898) の発現が多

くの原因腫瘍および移植腫瘍で認められたが、CD133 (W6B3C1)の発現は、原発腫瘍 1 例と移植腫瘍において、一部の細胞でしか認められなかった。以上の検索結果より、イヌの MPNSTs、GCTs、PWTs について、免疫組織化学的検索によって、CSCs マーカーに陽性の細胞が認められ、異種移植実験によって、原発腫瘍と同一の細胞学的、組織学的特徴を示す腫瘍が形成されたことから、これら腫瘍には CSCs が存在する可能性が示唆されたが、その正確な同定には、今後更なる研究が必要であると考えられる。人医療域では、CSCs を標的とする新規治療法に関する研究が盛んに行われている。獣医領域でも、今後、これら CSCs 様細胞を標的とした新規治療法の開発を視野に入れた研究が必要になると考えられる。

本研究の結果より、1) イヌの MPNSTs の起源は Schwann 細胞および神経周膜細胞であり、ヒトの MPNSTs の診断基準と同じ診断基準が適用できること、2) MPNSTs と PWTs の鑑別診断には NGFR と Olig2 が有用であること、3) イヌの舌の GCTs は神経堤細胞由来であり、腫瘍細胞の形態は微小環境の変化に依存して変化すること、GCTs の細胞質内顆粒はオートファジーによって形成されること、および 4) これらの腫瘍には、CSCs 様細胞が存在する可能性があることが示唆された。

腫瘍における治療抵抗性や再発には CSCs が関与している可能性が考えられているが、MPNSTs や PWTs においても治療抵抗性や再発に CSCs が関与している可能性が考えられる。MPNSTs と PWTs は由来が異なるが、形態学的特徴が類似し、MPNSTs と GCTs はともに神経堤細胞に由来するが、形態学的特徴は異なった。由来や性質の異なる腫瘍の分類を過度に単純化したままだと、腫瘍特異的な治療法の開発や予後の改善が妨げられる。分子標的療法などの腫瘍特異的な治療法の開発には、正確な診断や、分化に関わる因子の解析、CSCs の増殖、分化にかかわる細胞内情報伝達経路などに関する研究が重要になると考えられる。本研究で得られた成果は、イヌの神経堤由来腫瘍、および軟部組織肉腫として一括して取り扱われる傾向にある腫瘍群について、より正確な病理組織学的診断を可能とし、新規治療法開発の糸口として重要な知見を提供するものと思われる。

謝辞

本研究を進める上で、多大なご指導をいただきました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室の中山 裕之 教授、内田 和幸 准教授、および James K Chambers 助教に深く敬意を表し、感謝いたします。

また、本研究に取り組むうえで、欠かすことのできない貴重な臨床症例をご提供いただきました、奥野 征一 先生（アニマルクリニックこばやし）、石川 憲一 先生（石川ペットクリニック）、杉山 伸樹 先生（海の中道動物病院）、小澤 剛 先生（おざわ動物病院、Kyoto AR）、大谷 功 先生（くどう動物病院）、田近 智彦 先生（たちか動物病院）、玉田 弘嘉 先生（玉田動物病院）、田村 慎司 先生（たむら動物病院）、諸角 元二 先生（とがさき動物病院）、藤田 淳 先生（西原動物病院）、稲垣 武彦 先生、岡野 久美子 先生、二瓶 和美 先生、市川 美佳 先生、松永 悟 先生、小野 憲一郎 先生（日本動物高度医療センター）、越後 良介 先生（北海道大学動物医療センター）、佐々木 伸雄 先生（東京大学名誉教授、一般財団法人日本生物科学研究所）、佐伯 亘平 氏、坪井 誠也 氏、高橋 雅 先生、入江 なつは 先生、中川 貴之 先生、大野 耕一 先生、望月 学 先生、西村 亮平 先生（東京大学附属動物医療センター）、東京大学附属動物医療センター研修医の皆様、ならびに、症例のご家族の皆様に深く感謝いたします。

最後に、日々の研究活動を支えてくれた東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室事務補佐の土居 千代 さんを始め、同研究室の大学院生および学生諸氏に感謝いたします。

参考文献

1. Avallone G, Helmbold P, Caniatti M, et al. The spectrum of canine cutaneous perivascular wall tumors: morphologic, phenotypic and clinical characterization. *Vet Pathol.* 2007;44(5):607-620.
2. Bergmann W, Burgener IA, Roccabianca P, et al. Primary splenic peripheral nerve sheath tumour in a dog. *J Comp Pathol.* 2009;141(2-3):195-198.
3. Binder E, Rukavina M, Hassani H, et al. Peripheral nervous system progenitors can be reprogrammed to produce myelinating oligodendrocytes and repair brain lesions. *J Neurosci.* 2011;31(17):6379-6391.
4. Bock P, Beineke A, Techangamsuwan S, et al. Differential expression of HNK-1 and p75 (NTR) in adult canine Schwann cells and olfactory ensheathing cells in situ but not in vitro. *J Comp Neurol.* 2007;505(5):572-585.
5. Borrego-Diaz E, Terai K, Lialyte K, et al. Overactivation of Ras signaling pathway in CD133+ MPNST cells. *J Neurooncol.* 2012;108(3):423-434.
6. Chen H, Luo Z, Dong L, et al. CD133/prominin-1-mediated autophagy and glucose uptake beneficial for hepatoma cell survival. *PLoS ONE* 2013;8(2): e56878. doi:10.1371/journal.pone.0056878.
7. Chijiwa K, Uchida K, Tateyama S. Immunohistochemical evaluation of canine peripheral nerve sheath tumors and other soft tissue sarcomas. *Vet Pathol.* 2004;41(4):307-318.
8. Cogliati B, Aloia TP, Bosch RV, et al. Identification of hepatic stem/progenitor cells in canine hepatocellular and cholangiocellular carcinoma. *Vet Comp Oncol.* 2010;8(2):112-121.
9. Cornelis I, Chiers K, Maes S, et al. Claudin-1 and Glucose Transporter 1 Immunolabelling in a Canine Intraneural Perineurioma. *J. Comp. Path.* 2012;147(2-3):186-190.
10. Crane JF, Trainor PA. Neural Crest Stem and Progenitor Cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2006;22:267-286.
11. Demestre M, Herzberg J, Holtkamp N, et al. Imatinib mesylate (Glivec) inhibits Schwann cell viability and reduces the size of human plexiform neurofibroma in a xenograft model. *J Neurooncol.* 2010;98(1):11-19.
12. Dupin E, Calloni G, Real C, et al. Neural crest progenitors and stem cells. *C R Biol.* 2007;330(6-7):521-529.
13. Ferletta M, Grawé J, Hellmén E. Canine mammary tumors contain cancer stem-like cells and form spheroids with an embryonic stem cell signature. *Int J Dev Biol.*

- 2011;55(7-9):791-799.
14. Folpe AL, Billings SD, McKenney JK, et al. Expression of claudin-1, a recently described tight junction-associated protein, distinguishes soft tissue perineurioma from potential mimics. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(12):1620-1626.
 15. Gaitero L, Añor S, Fondevila D, et al. Canine cutaneous spindle cell tumours with features of peripheral nerve sheath tumours: a histopathological and immunohistochemical study. *J Comp Pathol*. 2008;139(1):16-23.
 16. Goldschmidt MH, Hendrick MJ. Tumors of the skin and soft tissues. In: Meuten DJ, ed. *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed., Ames, IA, Iowa State Press, 2002:45-117.
 17. Head KW, Cullen JM, Dubielzig RR, et al. *WHO International histological classification of tumors of domestic animals. Histological classification tumors of the alimentary system of domestic animals*. 2nd series, vol. 10, Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology; 2003.
 18. Hendrick MJ, Mahaffrey EA, Moore FM. et al. *WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals Histological Classification of Mesenchymal Tumors of Skin and Soft Tissues of Domestic Animals*, 2nd series, vol. 3, Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology; 1999.
 19. Hermansen SK, Christensen KG, Jensen SS, et al. Inconsistent immunohistochemical expression patterns of four different CD133 antibody clones in glioblastoma. *J Histochem Cytochem*. 2011;59(4):391-407.
 20. Hirose T, Tani T, Shimada T, et al. Immunohistochemical demonstration of EMA/Glut1-positive perineurial cells and CD34-positive fibroblastic cells in peripheral nerve sheath tumors. *Mod Pathol*. 2003;16(4):293-298.
 21. Hoshi N, Hiraki H, Yamaki T, et al. Frequent expression of 75 kDa nerve growth factor receptor and phosphotyrosine in human peripheral nerve tumours: an immunohistochemical study on paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch*. 1994;424:563-568.
 22. Ide T, Uchida K, Kikuta F, et al. Immunohistochemical characterization of canine neuroepithelial tumors. *Vet Pathol*. 2010;47(4):741-750.
 23. Jakab C, Gálfi P, Jerzsele Á, et al. Expression of claudin-1 in canine peripheral nerve sheath tumours and perivascular wall tumours. Immunohistochemical study. *Histol Histopathol*. 2012 Jul;27(7):905-917.
 24. Jouhilahti EM, Peltonen S, Callens T, et al. The Development of Cutaneous Neurofibromas. *Am J Pathol*. 2011;178(2):500-505.
 25. Jouhilahti EM, Peltonen S, Heape AM, et al. The pathoetiology of neurofibromatosis 1. *Am J Pathol*. 2011;178(5):1932-1939.

26. Koestner A, Bilzer T, Fatzer R, et al. *WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals Histological Classification of Tumors of the Nervous System in Domestic Animals*, 2nd series, vol. 5, Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology; 1999.
27. Koestner A, Higgins RJ. Tumors of the nervous system. In: Meuten DJ, ed. *Tumors in Domestic Animals*, 4th ed., Ames, IA, Iowa State Press, 2002:697-738.
28. LeCouteur RA, Withrow SJ. Tumors of the nervous system. in: Withrow AJ., Vail DM., ed. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 4th ed., Saunders. 2007:659-685.
29. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42.
30. Liptak JM, Forrest LJ. Soft tissue sarcomas. in: Withrow AJ., Vail DM., ed. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 4th ed., Saunders. 2007:425-454.
31. Lu JE, Dubielzig R. Canine eyelid granular cell tumor: a report of eight cases. *Vet Ophthalmol*. 2012;15(6):406-410.
32. Lu SZ, Harrison-Findik DD. Autophagy and cancer. *World J Biol Chem*. 2013;4(3):64-70.
33. Mazzei M, Millanta F, Citi S, et al. Haemangiopericytoma: histological spectrum, immunohistochemical characterization and prognosis. *Vet Dermatol*. 2002;13(1):15-21.
34. Michishita M, Akiyoshi R, Yoshimura H, et al. Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. *Res Vet Sci*. 2011;91(2):254-260.
35. Millán Y, Mascort J, Blanco A, et al. Hypomyelination in three Weimaraner dogs. *J Small Anim Pract*. 2010;51(11):594-598.
36. Miller SJ, Rangwala F, Williams J, et al. Large-scale molecular comparison of human Schwann cells to malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines and tissues. *Cancer Res*. 2006;66(5):2584-2591.
37. Miller SJ, Jessen WJ, Mehta T, et al. Integrative genomic analyses of neurofibromatosis tumours identify SOX9 as a biomarker and survival gene. *EMBO Mol Med*. 2009;1(4):236-248.
38. Miwa K, Hattori T, Hosokawa Y, et al. Granular cell tumor of the esophagus. *Gastroenterol Jpn*. 1986;21(5):508-512.
39. Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: molecule of the moment. *J Pathol*. 2008;214(1):3-9.
40. Nemoto Y, Maruo T, Sato T, et al. Identification of cancer stem cells derived from a

- canine lung adenocarcinoma cell line. *Vet Pathol.* 2011;48(5):1029-1034.
41. Palmieri C, Avallone G, Cimini M, et al. Use of electron microscopy to classify canine perivascular wall tumors. *Vet Pathol.* 2013;50(2):226–233.
 42. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem.* 2007;282(33):24131-24145.
 43. Park JW, Woo GH, Jee H, et al. Malignant peripheral nerve sheath tumour in the liver of a dog. *J Comp Pathol.* 2011;144(2-3):223-226.
 44. Patnaik AK. Histologic and immunohistochemical studies of granular cell tumors in seven dogs, three cats, one horse, and one bird. *Vet Pathol.* 1993;30:176-185.
 45. Pérez J, Bautista MJ, Rollón E, et al. Immunohistochemical characterization of hemangiopericytomas and other spindle cell tumors in the dog. *Vet Pathol.* 1996;33(4):391-397.
 46. Rallis TS, Tontis DK, Soubasis NH, et al. Immunohistochemical study of a granular cell tumor on the tongue of a dog. *Vet Clin Pathol.* 2001;30:62-66.
 47. Rao D, Rylander H, Drees R, et al. Granular cell tumor in a lumbar spinal nerve of a dog. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22:638-642.
 48. Rejas RA, Campos MS, Cortes AR, et al. The neural histogenetic origin of the oral granular cell tumor: An immunohistochemical evidence. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal.* 2011;16(1):e6-10.
 49. Rodriguez FJ, Folpe AL, Giannini C, et al. Pathology of peripheral nerve sheath tumors: diagnostic overview and update on selected diagnostic problems. *Acta Neuropathol.* 2012;123(3):295-319.
 50. Scheithauer BW, Woodruff JM, Erlandson RA. Primary malignant tumors of peripheral nerve. In: Rosai J, ed. *Atlas of Tumor Pathology*, 3rd series, fascicle 24, Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology, 1997:303-421.
 51. Scherer SS, Xu YT, Bannerman PG, et al. Periaxin expression in myelinating Schwann cells: modulation by axon-glia interactions and polarized localization during development. *Development.* 1995;121(12):4265-4273.
 52. Schöniger S, Valentine BA, Fernandez CJ, et al. Cutaneous Schwannomas in 22 Horses. *Vet Pathol.* 2011;48(2):433-442.
 53. Schöniger S, Summers BA. Localized, plexiform, diffuse, and other variants of neurofibroma in 12 dogs, 2 horses, and a chicken. *Vet Pathol.* 2009;46(5):904-915.
 54. Shimada S, Tsuzuki T, Kuroda M, et al. Nestin expression as a new marker in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Pathol Int.* 2007;57(2):60-67.
 55. Shintaku M. Immunohistochemical localization of autophagosomal membrane-

- associated protein LC3 in granular cell tumor and schwannoma. *Virchows Arch.* 2011;459:315-319.
56. Sommer L. Generation of melanocytes from neural crest cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24(3):411-421.
 57. Spyra M, Kluwe L, Hagel C, et al. Cancer Stem Cell-Like Cells Derived from Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *PLoS ONE* 2011;6(6):e21099. doi:10.1371/journal.pone.0021099.
 58. Staser K, Yang FC, Clapp DW. Mast cells and the neurofibroma microenvironment. *Blood.* 2010;116(2):157-164.
 59. Stefanello D, Avallone G, Ferrari R, et al. Canine cutaneous perivascular wall tumors at first presentation: clinical behavior and prognostic factors in 55 cases. *J Vet Intern Med.* 2011;25(6):1398-1405.
 60. Stoica G, Lungu G, Martini-Stoica H, et al. Identification of cancer stem cells in dog glioblastoma. *Vet Pathol.* 2009;46(3):391-406.
 61. Stoica G, Tasca SI, Kim H-T. Point mutation of neu oncogene in animal peripheral nerve sheath tumors. *Vet Pathol.* 2001;38(6):679-688.
 62. Sugawara K, Kurihara H, Negishi M, et al. Nestin as a marker for proliferative endothelium in gliomas. *Lab Invest.* 2002;82(3):345-351.
 63. Sugiyama A, Morita T, Shimada A, et al. Primary malignant peripheral nerve sheath tumor with eosinophilic cytoplasmic globules arising from the greater omentum in a dog. *J Vet Med Sci.* 2008;70(7):739-742.
 64. Suzuki S, Uchida K, Nakayama H. The effects of tumor location on diagnostic criteria for canine malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs) and the markers for distinction between canine MPNSTs and canine perivascular wall tumors. *Vet Pathol.* 2013. Sep 5. [Epub ahead of print] DOI: 10.1177/0300985813501336.
 65. Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res.* 2012;22(3):457-472.
 66. Thway K, Fisher C, Debiec-Rychter M, et al. Claudin-1 is expressed in perineurioma-like low-grade fibromyxoid sarcoma. *Hum Pathol.* 2009;40(11):1586-1590.
 67. Tovar C, Obendorf D, Murchison EP, et al. Tumor-Specific Diagnostic Marker for Transmissible Facial Tumors of Tasmanian Devils: Immunohistochemistry Studies. *Vet Pathol.* 2011;48(6):1195-1203.
 68. Uchida K, Nakayama H, Sasaki N, et al. Malignant schwannoma in the spinal root of a dog. *J Vet Med Sci.* 1992;54(4):809-811.
 69. Visvader JE and Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(10):755-768.

70. Visvader JE and Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*. 2012;10(6):717-728.
71. Weiss SW, Goldblum JR. Malignant tumors of the peripheral nerves. In: Enzinger FM, Weiss SW, Goldblum JR, ed. *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*, 5th ed., St Louis, MO, Mosby Elsevier, 2008:903-944.
72. Widera D, Heimann P, Zander C, et al. Schwann cells can be reprogrammed to multipotency by culture. *Stem Cells Dev*. 2011;20(12):2053-2064.
73. Wohlsein P, Cichowski S, Baumgärtner W. Primary endocardial malignant spindle-cell sarcoma in the right atrium of a dog resembling a malignant peripheral nerve sheath tumour. *J Comp Pathol*. 2005;132(4):340-345.
74. Xu Y, Xia X, Pan H. Active autophagy in the tumor microenvironment: A novel mechanism for cancer metastasis. *Oncol Lett*. 2013;5:411-416.
75. Yokoo H, Nobusawa S, Takebayashi H, et al. Anti-human Olig2 antibody as a useful immunohistochemical marker of normal oligodendrocytes and gliomas. *Am J Pathol*. 2004;164(5):1717-1725.