

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成22年度博士課程 入学

氏名 鈴木 聡

指導教員名 中山 裕之

論文題目 イヌの神経堤由来腫瘍に関する病理学的研究

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。神経堤細胞から発生する腫瘍として、悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNSTs)、顆粒細胞腫瘍(GCTs)、悪性黒色腫などが挙げられる。イヌにおいては、MPNSTs、GCTsの由来細胞は特定されておらず、詳細な研究も進んでいない。

本論文では、イヌのMPNSTsの診断基準の確立、MPNSTsと組織学的特徴が酷似する血管周壁腫瘍(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の解明、および、これらの腫瘍におけるがん幹細胞(CSCs)の存在の可能性の検討を目的として、病理組織学的、細胞学的、免疫組織化学的検索を行った。

第1章第1項では、イヌのMPNSTsの由来細胞の特定と、診断基準の確立に関する研究を行った。イヌの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、イヌの MPNSTs では明確な診断基準が確立していない。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と、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、PNS に発生した MPNSTs では、S100 と Olig2 の発現が non-PNS に発生した MPNSTs よりも有意に強かったが、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 章第 2 項では、イヌの MPNSTs と病理組織学的特徴が酷似するイヌの血管周壁皮腫瘍(PWTs)との鑑別診断に有用なマーカーを探索するために、両者の免疫組織化学的特徴を比較・検討した。MPNSTs 30 例と PWTs 31 例について、第 1 項と同様のマーカーの発現を免疫組織化学的に調べた。MPNSTs の各マーカーに対する平均陽性細胞率は、 α -SMA と desmin、calponin を除いて、PWTs のそれよりも有意に高かった。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ジーにより形成されると考えら

れている細胞質内顆粒について、イヌの GCTs の細胞質内顆粒の性質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 例について、病理組織学的検索、免疫組織化学的検索、透過型電子顕微鏡(TEM)検索を行った。さらに、1 例の良性 GCT の新鮮腫瘍組織から細胞培養と免疫不全マウスへの異種移植を行った。その結果、複数の GCTs で S100、vimentin、nestin、NGFR、CD133、desmin の発現が認められ、また、腫瘍細胞の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。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。良性 GCT を培養したところ、培養細胞は、形態学的に悪性所見を有し、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が示された。異種移植により免疫不全マウスに形成された腫瘍は、紡錘形から多角形の腫瘍細胞で構成され、少数の腫瘍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、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、腫瘍細胞の形態はその微小環境に依存して変化することが示唆された。

第 3 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 章の検索結果に加えて、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 マウスへの異種移植実験を行った。その結果、免疫組織化学的検索により、MPNSTs において nestin、NGFR、CD34、CD133 (W6B3C1) を発現する症例が複数認められ、PWTs でも、nestin、CD34、CD133 (W6B3C1) を発現する症例が認められ、CSCs 様細胞の存在が示唆された。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、原発腫瘍の細胞学的、組織学的特徴を維持したまま自己複製する能力と多分

化能を有する CSCs 様細胞が存在することが示唆された。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。これらの所見より、イヌの 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 様細胞が存在することが示唆された。

以上の結果より、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に依存して変化すること、4) 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 5) 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された。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。