

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 長峯 栄路

学位の種類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当

学位論文の題目 イヌの骨原発骨肉腫の組織多様性に関する細胞骨格（中間径フィラメント）の免疫組織化学的評価法ならびに組織学的悪性度における予後的意義の検討

審査委員

主査教授 谷山 弘行（獣医病理学）

副査教授 廉澤 剛（獣医臨床腫瘍学）

副査教授 中出 哲也（画像診断学）

学位論文要旨

イヌの骨原発骨肉腫の組織多様性に関する細胞骨格 (中間径フィラメント) の免疫組織化学的評価法ならびに 組織学的悪性度における予後的意義の検討

酪農学園大学大学院獣医学研究科

獣医病理学 長峯栄路

骨肉腫(OS)はイヌの骨原発骨腫瘍において最も発生頻度が高い悪性腫瘍で、頭部骨原発骨肉腫(OSH)は下顎骨で、四肢骨原発骨肉腫(OSA)は上腕骨、尺骨、大腿骨で多く発生する。また発生学的に頭部骨組織は四肢骨組織とは異なる外胚葉神経堤細胞由来で、OSHとOSAは発生学的な起源が異なっている。OSの組織学的形態は多様性に富み、WHOによる組織型分類において、骨芽細胞型(Ob)、軟骨芽細胞型(Cb)、線維芽細胞型(Fb)、血管拡張型(Te)、未分化型(Pd)、巨細胞型(Gc)の組織型に下位分類されている。また細胞骨格(中間径フィラメント)は細胞形態を保持し、特定の細胞種に特異的な蛋白質で構成されており、免疫組織化学染色によりOSの各組織型における細胞骨格の局在を検索することは、OSの組織多様性を把握する上で重要である。さらにOSは高率な肺転移病変を伴う悪性度の高い腫瘍動態を示し、的確な治療方針の決定のために正確な組織学的悪性度の評価が求められている。

第1章では、イヌのOSH84例およびOSA141例について、その組織多様性を把握しながら組織型分類を行い、OSHとOSAの間で組織学的形態を比較した。OSの半数以上はObを主体とする複合型に分類され、WHOで分類されていない粘液型(My)、円形細胞型(Rc)、上皮型(Ep)の3種類の組織型が新

たに観察された。本研究結果から、OSの基本的な組織学的形態はObであり、ObがCb, Fb, Teなどの様々な組織型へ形態を変化させることにより多様な組織学的形態を示し、その組織多様性にはOSの起源が骨髄間葉系幹細胞であることが関与していると考えられた。またMy, Rc, Epは腫瘍組織を特徴づける組織学的形態を示し、WHOの6種類の組織型に並んで追加分類されるべき組織型であると考えられた。さらにEpがOSHのみで認められたことには、OSHの母組織である頭部骨組織の発生学的な起源が上皮性の外胚葉神経堤細胞であることが関与していると考えられた。

第2章では、イヌのOSH60例およびOSA60例について、cytokeratin(CK), vimentin, α -smooth muscle actin (α -SMA), desmin, glial fibrillary acidic protein (GFAP), neurofilament (NF)に対する一次抗体を用いて、各組織型における細胞骨格の発現性を評価し、OSHとOSAで比較した。OSはその組織学的形態に一致するあるいは一致しない細胞骨格を保持しており、その組織多様性に関連した細胞骨格の発現の多様性は、骨髄組織由来であるOSの腫瘍異質性に起因していると考えられた。CKの発現は様々な組織型の腫瘍細胞で確認され、特にEpの腫瘍細胞で多く認められ、Epの上皮様形態にはCKの発現が関与していることが示唆された。またCK陽性細胞は全てvimentinの共発現を示し、上皮および間葉系両方の細胞骨格を保持していることが明らかになった。本研究はCKの発現および上皮様形態を示すイヌの骨原発OSに関する初めての報告である。 α -SMAの発現はFbおよびTeで強く観察され、腫瘍性骨芽細胞の紡錘形腫瘍細胞への形態変化や血管様嚢胞構造の形成に α -SMAの発現が関与していると考えられた。GFAPの発現はCbおよびMyの腫瘍細胞に多く観察され、GFAPは腫瘍性軟骨組織の形成やそれに連続する粘液産生に関与していると考えられた。DesminおよびNFの発現も多様な組織型の腫瘍細胞で確認されたが、一定した組織学的形態は認められず、必ずしも発現している細胞骨格が

OSの細胞形態を決定しているわけではないと思われた。

第3章では、生存データを追跡できたイヌの OSH12 例および OSA13 例について、組織学的悪性度評価法ならびに組織型分類法の予後因子としての有用性を評価し、生存データを含めて OSH と OSA の間で比較した。組織学的悪性度は生存期間および肺転移率に関連し、組織学的悪性度評価法は OS の予後を診断する上で有用であることが示された。また OSH は OSA よりも有意に生存期間が長く、肺転移率が低い結果となり、OSH がより良好な予後を示した。また組織学的悪性度は OSA が OSH よりも有意に高くなり、本研究の生存データを裏付けする結果となり、発生部位により OS の腫瘍動態が異なることが臨床的および組織学的に明らかになった。一方、各組織型と予後の間に関連性は認められず、OS の組織多様性は腫瘍動態に関与しないことが示唆された。しかしながら、過去の研究での組織型の違いによる腫瘍動態は様々であり、予後診断ツールとしての組織型分類法は十分に確立されていないため、新しい組織型や複合型を含めた新たな組織型分類法の開発が必要であると考えられた。

本研究を通して、細胞骨格はイヌの骨原発 OS の細胞形態を特徴づけるだけでなく、軟骨や粘液などの基質産生や血管様構造などの特徴的な組織構造の形成にも関与していることが明らかになった。また複数の細胞骨格を発現する腫瘍細胞はより多彩な組織学的形態を示し、My, Rc, Ep を含めた OS の組織多様性は腫瘍異質性に起因するものであると結論付けられた。

論文審査の要旨および結果

1 論文審査の要旨および結果

審査は、1) 体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2) 科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

論文の概要について

研究の背景と目的

病理組織学的多様性を持つイヌの骨肉腫は、生検時の採取部位によって診断が異なる事があり、かつ予後診断に結びつかない事がしばしば生じる腫瘍である。WHO 分類では6つの組織型分類がなされているが、この他にも3つの組織型が存在する事も知られている。さらに多くの骨肉腫では同一腫瘍組織内にこれらの組織型が複雑に混合する事が知られており、病理組織診断をますます困難にしている。また、頭部骨格と肢体骨格から発生する骨肉腫には組織型や悪性度が異なるとする見方もあり(第1章)、その予後診断も含め、本腫瘍の特質は十分に明らかにされているとは言えない。こうした背景を持つイヌの骨肉腫の組織型多様性を、細胞の形態ならびに機能に関わるとされている細胞骨格、とくに中間系フィラメントの発現を免疫組織化学的に検索し、組織型と中間系フィラメント発現の関連性について、また、頭部ならびに肢体骨格由来骨肉腫間の中間系フィラメント発現の比較を行い、本腫瘍の中間系フィラメントの発現を指標とした特性を明らかにする事を目的とした(第2章)。さらに、これらの特性を持つ骨肉腫について、その予後との関連性について検討する(第3章)。

研究の成果

第1章では、骨肉腫(OS) 225例を、WHO分類基準にしたがって6つの組織型に分類した。その半数以上は複数の組織型が混在する複合型で、骨芽細胞型(O_b)を主体としていた。WHO分類には無い粘液型(My)、円形細胞型(R_c)、上皮型(E_p)の3種類の組織型を新たに追加した。本研究結果から、OSの基本的な組織学的形態はO_bであり、O_bが軟骨芽細胞(C_b)、線維芽細胞(F_b)、血管拡張型(T_e)などの様々な組織型へ形態を変化させることにより多様な組織学的形態を示し、その組織多様性にはOSの起源が骨髄間葉系幹細胞であることが関与していると考えられた。またM、R_c、E_pのそれぞれの型は各腫瘍組織を特徴づける組織学的形態を示し、WHOの6種類の組織型に並んで追加分類されるべき組織型であると考えられた。さらに頭部骨肉腫と肢体部骨肉腫を比較するとE_pは頭部骨肉腫のみで認められ、頭部骨肉腫の起源が上皮性の外胚葉神経堤細胞であることが関与していると考えられた。

第2章、頭部骨肉腫(OSH) 60例および肢体部骨肉腫(OSA) 60例について、cytokeratin

(CK)、vimentin、 α -smooth muscle actin (α -SMA)、desmin、glial fibrillary acidic protein (GFAP)、NF の 6 種の間系フィラメントについて、各組織型における発現性を評価し、かつ OSH と OSA の間で比較した。その結果、発現した細胞骨格は、その組織学的形態に必ずしも一致するものでは無かったが、その組織多様性に関連した細胞骨格の多様な発現性は、骨髄組織由来である OS の腫瘍異質性に起因していると考えられた。CK の発現は特に Ep の腫瘍細胞で多く認められ、Ep の上皮様形態には CK の発現が関与していることが示唆された。イヌにおいて、本研究が CK の発現および上皮様形態を示す骨原発 OS に関する初めての報告である。 α -SMA の発現は Fb および Te で強く認められ、Fb の紡錘形細胞への形態変化や Te の血管様嚢胞構造の形成に α -SMA が関与していると考えられた。GFAP の発現は Cb および My の軟骨基質や粘液を産生する腫瘍細胞に多く認められ、GFAP はこれら基質産生に関与していると考えられた。Desmin、NF の発現も多様な組織型で確認されたが、一定した細胞形態は認められず、必ずしも発現している細胞骨格が OS の細胞形態を決定しているわけではなく、他の因子の関与の可能性も示唆された。

第 3 章、生存データを追跡できたイヌの OSH12 例および OSA13 例について、組織学的悪性度および組織型分類の予後因子としての有用性を評価し、生存データを含めて OSH と OSA の間で比較した。組織学的悪性度は生存期間および肺転移率に関連し、組織学的悪性度評価法は OS の予後を診断する上で有用であることが示された。また OSH は OSA よりも有意に生存期間が長く、肺転移率が低くなり、OSH がより良好な予後を示した。組織学的悪性度は OSH が OSA よりも有意に低くなり、これは本研究の生存データを裏付けする結果であると考えられ、発生部位により OS の腫瘍動態が異なることが臨床的および組織学的に明らかになった。一方、各組織型と予後の間に関連性は認められず、OS の組織学的形態は腫瘍動態に関与しないことが示唆された。しかしながら、過去の研究における組織型の違いによる腫瘍動態は様々であり、新しい組織型や複合型を含めた新たな組織型分類法の開発が必要であると考えられた。

研究の評価

本研究は、多数例のイヌの骨肉腫症例を対象に、本腫瘍の持つ組織型多様性をその腫瘍細胞が発現する細胞骨格（中間系フィラメント）を免疫組織化学的に検索し、組織多様性との関連性を明らかにすることを目的とした研究である。複雑な組織像を、その細胞形態を決定付ける中間系フィラメントの発現をもとに解析した。免疫組織化学的に 6 種の間系フィラメントの発現を総合的に検索し、かつ組織型の関連性について検討した研究は、イヌの骨肉腫では始めてであり、極めて高い新規性を持つものである。特に、上皮系細胞に特異的に発現するとされるサイトケラチン（CK、上皮系腫瘍の免疫組織化学的検索マーカー）の発現が認められる症例や筋系腫瘍のマーカーであるデスミンや SMA の発現が認められる症例の検出等、本研究では新しい知見が多く含まれている。ま

た、腫瘍の起原が異なるとされている頭部と肢体骨格由来の骨肉腫の比較において、異なる特質と共有する特質を明らかにした事も科学的価値を含むものである。さらに、組織学分類と予後との関連性について、頭部と肢体部起原の骨肉腫では予後が異なる事、それぞれの予後が組織学的分類に依存する可能性が高い事を指摘した。これらの成果は、組織学的多様性を特徴とする骨肉腫は病理腫瘍診断を目的とした生検において、腫瘍の発生部位や採材される部位によって診断が左右される可能性を示唆する点において、臨床獣医領域に対しても重要な情報を含む研究と言える。

以上のことから、本論文は研究目的が明らかであり、用いた研究材料、検索手法、研究計画も適切で、かつ、論文は規定に沿って作成されており、その成果は、獣医学領域のみならず医学的領域に置いても学術的意義は大きいと判断し、博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

2 最終試験の結果

審査委3名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2015年 2月18日

審査員

副査	教授	谷山	弘行
副査	教授	廉澤	剛
副査	教授	中出	哲也