

犬の膀胱移行上皮癌の
早期診断と予後マーカーに関する研究

華園 究

犬の膀胱移行上皮癌の
早期診断と予後マーカーに関する研究

酪農学園大学大学院
獣医学研究科
獣医学専攻博士課程

華園 究

分子診断治療学
指導教員 教授 打出毅

2013

目 次

	頁
凡 例	1
緒 言	2
第 I 章 犬膀胱 TCC における超音波検査所見の診断および予後指標としての有用性の検討	4
1. 小 緒	6
2. 材料および方法	7
1) 対象動物	7
2) 病理組織学的検査	7
3) 超音波検査	8
4) 統計学的分析	9
3. 結 果	10
1) TCC とポリープ状膀胱炎の超音波検査における筋層浸潤所見	10
2) TCC における超音波検査所見と生存期間の関係	11
3) TCC における超音波検査所見と病理組織検査所見の関連性	11
4. 考 察	17
5. 小 括	21
第 II 章 犬膀胱移行上皮癌の予後マーカーの検索 (1)	
－ Epidermal growth factor receptor について －	22
1. 小 緒	23
2. 材料および方法	25
1) 対象動物	25
2) total RNA (tRNA) の抽出	26
3) cDNA の合成	26
4) RT-PCR	27

5)	定量的 real-time RT-PCR	27
6)	病理組織学的検査	28
7)	免疫組織化学染色	29
8)	統計学的分析	30
3.	結果	33
1)	TCC 症例の臨床所見と病理組織検査所見	33
2)	正常膀胱組織と TCC における EGFR mRNA と EGFR 蛋白発現の比較	34
3)	正常膀胱組織、ポリープ状膀胱炎および TCC における EGFR 蛋白発現の比較	34
4)	TCC における EGFR 蛋白発現と臨床・病理学的所見との関連性	35
5)	TCC における EGFR 蛋白発現と予後との関連性	36
6)	TCC における術前化学療法と EGFRmRNA、蛋白発現との関係	36
4.	考察	46
5.	小括	48

第 III 章 犬膀胱移行上皮癌の診断および予後マーカーの検索 (2)

—	p63 と Δ Np63 について	—	50
1.	小 緒		51
2.	材料および方法		54
1)	対象動物		54
2)	病理組織学的検査		54
3)	免疫組織化学染色		54
4)	統計学的分析		55
3.	結果		57
1)	正常膀胱組織、ポリープ状膀胱炎および TCC における p63、 Δ Np63、 β -catenin 発現の比較		57
2)	TCC における p63、 Δ Np63、 β -catenin 蛋白発現と臨床・病理学的所見との関連性		57
3)	TCC における p63、 Δ Np63 発現と予後との関連性		58

4. 考 察	73
5. 小 括	76
総 括	77
謝 辞	80
引用文献	8

凡 例

AJs (Adherent junctions) :接着接合

cDNA (complementary Deoxyribonucleic acid) :相補的デオキシリボ核酸

CI (Confidence interval) :信頼区間

CT (Computed tomography) : コンピューター断層撮影

DNA (Deoxyribonucleic acid) : デオキシリボ核酸

EGF (Epidermal growth factor) : 上皮成長因子

EGFR (Epidermal growth factor receptor) : 上皮成長因子受容体

FPF (false positive fraction) : 偽陽性率

HE (Hematoxylin-Eosin) : ヘマトキシリン-エオジン

HER (Human EGFR-related) : ヒト EGFR 関連物質

hpf (high-power field) : 強拡大

MMP (Matrix metalloproteinase) : マトリックスメタロプロテアーゼ

mRNA (messenger Ribonucleic acid) : 伝令リボ核酸

PCR (Polymerase chain reaction) : ポリメラーゼ連鎖反応

RP19 (Ribosomal protein 19) : リボソーム蛋白質 19

RT-PCR (Reverse transcription Polymerase chain reaction) : 逆転写ポリメ
ラーゼ連鎖反応

SD (Standard Deviation) : 標準偏差

TCC (Transitional cell carcinoma) : 移行上皮癌

total RNA (total Ribonucleic acid) : 全リボ核酸

TPF (True positive fraction) : 真陽性率

緒 言

犬の移行上皮癌（TCC）は膀胱粘膜を構成する移行上皮細胞に由来する腫瘍であり、犬の全悪性腫瘍の 2%、膀胱に発生する悪性腫瘍の 90%以上を占める上皮系の悪性腫瘍である。その浸潤性は強く、転移率が高い（50%）ことが特徴としてあげられる[10,14]。好発犬種はスコティッシュテリア、シェットランドシープドック、ビーグルなどで、解剖学的には膀胱三角部に好発する[10]。

犬の TCC に対する治療法として、腫瘤病巣が膀胱三角部や尿道から離れた位置に発生した場合は外科的切除が第一に選択されるが、術後新たに膀胱内の別の領域で病巣が出現するが多い。一方、外科的治療法が困難と判断された場合は COX-2 阻害作用のあるピロキシカムや核酸合成阻害 topoisomeraseII 阻害、DNA 二重鎖破壊作用を有すミトキサントロンによる内科的治療法が選択されるが、その際の生存期間の中央値はピロキシカム単剤で 195 日、ピロキシカムとミトキサントロンの併用で 291 日と報告されており長期生存は望めない[3,10,14]。生存期間に影響する要因として、腫瘍の増殖性、浸潤性、転移性などの生物学的・臨床的挙動が挙げられるが、進行症例で見られる膀胱三角部や内尿道口領域への腫瘍浸潤に起因する尿路系閉塞、それに伴う二次的合併症（水腎症や腎不全など）も重要とされている[10,14]。したがって、犬の膀胱 TCC の治療成績向上のためには、腫瘍をできるだけ早

期に発見するとともに、腫瘍の生物学的・臨床的挙動を的確に把握し正確な予後判断につなげることが重要となる[10,14]。

犬膀胱 TCC の診断法として、尿検査、細胞診、膀胱造影 X 線検査、超音波検査、CT 検査がこれまでに用いられてきた。なかでも超音波検査は、非侵襲的検査であることに加え、膀胱内の腫瘍性病変を早期（小さい）段階から高感度で検出できる利点を有する。しかしながら、これまでに TCC の早期病変に関する一致した超音波所見は得られておらず、また超音波所見と予後の関連性について十分に検討されてこなかった[36]。また、腫瘍の生物学的・臨床的挙動を把握する一般的手段として、病理組織学的所見によるグレード分類や脈管浸潤の有無、そして臨床所見に基づいた腫瘍の浸潤度（T）、リンパ節浸潤の有無（N）、遠隔転移の有無によりステージ分類をする TNM ステージングなどがあげられるが[10,14,62]、近年、ヒトの膀胱癌では p53、COX-2、Survivin、Uroplakin、EGFR、p63 などの特定の分子が注目を集めており、これらの蛋白質の腫瘍での発現パターンと腫瘍の生物学的・臨床的挙動との関連性が明らかにされている[1,5,7,8,9,64,67,71,99]。犬の TCC においても p53、COX-2、Survivin についての検討はなされたが[17,29,47,56]、TCC の挙動や予後と明確な関連性が示されたマーカー分子は残念ながら見出されていない。

本論文では、犬膀胱 TCC の早期診断および予後診断に有用な超音波検査所見や分子マーカーを模索するために、第 I 章では、超音波検査、第 II 章では EGFR、第 III 章では p63 および Δ Np63 について検討した。

第 I 章

犬膀胱移行上皮癌における超音波検査所見の
診断および予後指標としての有用性の検討

1. 小 緒

犬の膀胱 TCC は一般的に急速かつ進行性の挙動を示し浸潤や転移を伴う [30]。一方ヒトの膀胱癌は転移を伴う急速かつ進行性の挙動をとることは稀で [33]、80%が膀胱壁浸潤を伴わない表在性タイプである [3]。表在性膀胱癌の多くは、経尿道的切除術によって良好にコントロールすることができるが、浸潤性膀胱癌の場合、進行例で膀胱全切除術、化学療法、放射線療法が施されるものの予後は一般的にきわめて悪い [61]。また、ヒト膀胱癌では腫瘍の膀胱壁内浸潤度に加え、広がりも予後に深く関連しており、進行した TNM ステージ (T: 腫瘍の浸潤度、N: リンパ節転移、M: 遠隔転移) は生存期間の短縮につながる [21, 69,70,77,82]。したがって、ヒト医療において術前に正確に膀胱壁内浸潤度を評価することや腫瘍の広がりを評価すること (正確な TNM ステージ分類を行うこと) は適切な治療法の選択や予後判断を行う上で極めて重要となっている。このような状況の中、近年、超音波検査は正確な TNM ステージ分類を行う上で特に重要視されており、1) 超音波検査機器の性能向上によって腫瘍の膀胱壁浸潤度を正確に評価することが可能になったこと、2) 所属リンパ節やその他の腹部リンパ節の評価を同時に行うことができること、3) 肝臓などの腹部臓器への遠隔転移についても評価できることなどかその理由として挙げられている [1,10,11, 41,68]。腫瘍の浸潤度や広がりに関する情報以外にも、超音波検査によって得られる腫瘍の大きさ、形態、エコー輝度など

の所見はヒト膀胱癌の予後因子として有用であることが示され、医学領域では超音波検査所見に基づく予後診断に関心が持たれるようになってきている [2,22,44,65]。

犬膀胱 TCC はヒトの膀胱癌よりも浸潤性・転移性が強く [30]、術前に超音波検査による正確な全身評価を行うことは、適切な治療法の選択や適切な予後判断を行う上で極めて重要と考えられる。しかしながら、これらの評価に関する検討は獣医学領域では十分なされていない。

本章では、犬膀胱 TCC の早期診断および予後診断に有用な超音波検査所見を模索するために、1) 超音波検査による膀胱壁への浸潤度評価の信頼性、2) 超音波検査所見と病理組織所見および生存期間との関連性について検討した。

2. 材料および方法

1) 対象動物

2004 から 2011 年まで膀胱腫瘍を主訴に酪農学園大学附属動物病院に来院し、膀胱腫瘍摘出術を行い、術後の病理組織学検査で TCC (22 例) またはポリープ状膀胱炎 (5 例) と診断された 27 例を対象とした。全例で、臨床所見、超音波検査所見、病理検査所見について調査した。27 例の平均年齢は 9.1 歳 (8-13 歳) で、犬種の内訳はシェットランド・シープドッグが 3 例、マルチーズ、シベリアン・ハスキー、シーズー、雑種が各 2 例、およびその他 16 犬種が各 1 例であった。主な臨床徴候は頻尿、血尿、排尿困難であり、全例でこれらのいずれかが認められた。TCC 症例のフォローアップ期間は平均 17 ヶ月 (1-60 ヶ月) であり、全生存期間は手術から死亡までの月とした。

2) 病理組織学的検査

病理組織学的検査には外科的に摘出された組織を用い、検体はホルマリン固定後 Hematoxylin-Eosin 染色が施された。TCC の症例については筋層浸潤の有無、腫瘍内壊死の有無、核分裂数についても調査した。核分裂数については強拡大で 50 視野当たりに対する核分裂数 (/50hpf) をカウントし、過去の報告に準じ、10/50hpf 以上を「高核分裂数」とした[54]。ポリープ状膀胱炎の症例については炎症病変の筋層浸潤の有無についても調査した。

3) 超音波検査

超音波検査は超音波診断装置 EUB-6500®および Preirus® (HITACHI ALOKA メディカル株式会社, 東京) にて、コンベックスプローブ (7.5MHz) またはリニアプローブ (10-13MHz) を用いて実施した。Geisse らの方法に従い全頭仰臥位で、膀胱内に尿カテーテルを介して 2ml/kg の生理食塩水を注入し、膀胱を十分に膨満させてから検査を開始した[18]。超音波検査所見は腫瘍最大径 (中央値を境界に 20mm 未満または 20mm 以上)、エコーパターン (均一または不均一)、腫瘍形態 (有茎状または非有茎状)、浸潤 (膀胱壁筋層浸潤または非筋層浸潤)、発生部位 (膀胱三角またはその他) を静止画と検査者のコメントをもとに判断した。膀胱壁筋層浸潤の判定は過去の報告より、膀胱壁の低エコー層 (筋層) が腫瘍浸潤により消失した場合を「膀胱壁筋層浸潤」と判定した[10、68]。エコーパターンは腫瘍内部のエコー輝度が均一であった場合を「均一」、高エコーと低エコーが混在している場合を「不均一」とした (図 1-1)。

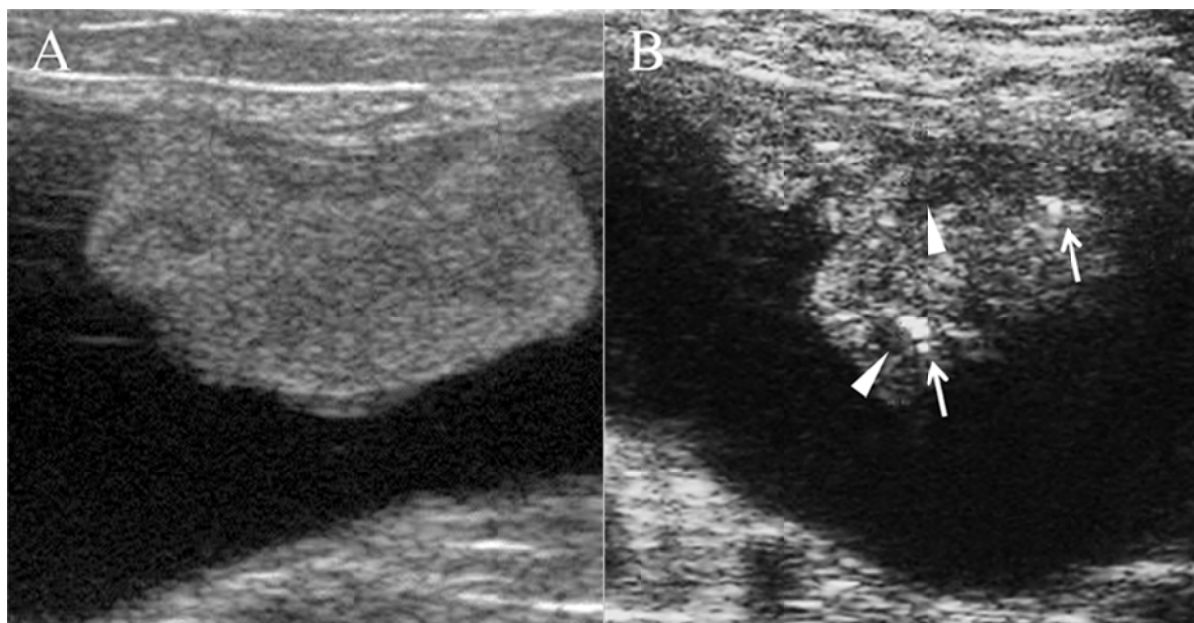


図 1-1 均一エコーパターン (A) と不均一エコーパターン (B)

不均一エコーパターン (B) の腫瘍内部には高エコー領域 (矢印) と低エコー領域 (矢頭) が混在している。

4) 統計学的分析

統計学的分析には、超音波検査所見と病理組織検査所見との関連性についてはカイ 2 乗検定を用い、信頼水準は 95%、有意性は P 値 0.05 未満で「有意性あり」とした。また超音波検査所見ごとに Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を描出し、log rank 検定にて比較を行い、 P 値 0.05 未満で「有意差あり」とした。

3. 結果

1) TCC とポリープ状膀胱炎の超音波検査における筋層浸潤所見

超音波検査による膀胱壁浸潤評価の信頼度を調べるために超音波検査と病理組織検査の比較を行った。超音波検査による膀胱壁浸潤と病理組織学的筋層浸潤の関連性については表 1-1 に、超音波画像に相当する病理組織写真を図 1-2 に示した。

超音波検査による膀胱壁浸潤は検討した 27 頭中 14 例で認められ、全頭が TCC であった。非浸潤は 13 例で、うち 8 例が TCC、5 例がポリープ状膀胱炎であった。超音波検査で膀胱壁浸潤が認められた 14 例のうち 13 例 (93%) が病理組織学的検査において筋層浸潤がみられた。一方超音波検査で膀胱壁浸潤が認められた 14 例のうち 1 例 (7%) で病理組織学的検査にて筋層浸潤が認められなかった。また超音波検査で膀胱壁浸潤が認められなかった 13 例のうち 1 例 (8%) で病理組織学的検査にて筋層浸潤がみられた。

超音波検査による膀胱壁浸潤は有意に病理組織学的筋層浸潤に関連しており ($P=0.00005$)、その感度は 93% (95%信頼区間 (CI) : 79-98%)、特異度 92% (95%CI: 76-98%)、正診率 93% (95% CI: 77-98%) であった。また超音波検査にて膀胱壁浸潤が認められた全 14 例 (100%) と膀胱壁浸潤が認められなかった 13 例のうち 8 例 (62%) が病理組織学的に TCC と診断された。一方膀胱壁浸潤が認められなかった 5 例 (38%) が病理組織学的にポリープ状

膀胱炎と診断された。

2) TCC における超音波検査所見と生存期間の関係

TCC の予後予測における超音波検査の有用性を検討するため、超音波検査所見（膀胱壁浸潤、腫瘍径、エコーパターン、形態、発生部位）と生存期間を TCC 22 症例で評価した（表 1-2）。超音波画像における膀胱壁浸潤が認められた群の生存期間（平均生存期間 14.6 ヶ月）は認められない群（38.3 ヶ月）に比較して有意に短縮していた（ $P=0.03$ ）。また、エコーパターンが不均一であった群の生存期間（10.7 ヶ月）は均一であった群（23.2 ヶ月）に比較して有意に短かった（ $P=0.03$ ）。発生部位は TCC 22 例中 11 例（50%）が膀胱三角領域で最も多く、このうち 6 例（55%）が尿路閉塞を起こしていた。膀胱三角に発生した群の生存期間（15.2 ヶ月）はその他の部位に発生した群（23.9 ヶ月）に比較して有意に短縮していた（ $P=0.01$ ）。

3) TCC における超音波検査所見と病理組織検査所見の関連性

TCC の超音波検査所見と予後との関連を病理組織学的側面から検討するため、TCC の超音波検査所見とヒト膀胱癌において予後と関連する病理組織学的所見（壊死、核分裂数）[55]とを比較した（表 1-3）。

壊死は膀胱壁浸潤が認められた例の 57%（非浸潤：0%）、腫瘍径 20mm 以上の例の 58%（20mm 未満：8%）、エコーパターンが不均一であった例の 67%

(均一：15%)、膀胱三角に発生した例の 63% (その他の部位：9%) でみられた。病理組織学的な壊死所見と有意な関連性が認められた超音波検査所見は膀胱壁浸潤 ($P=0.03$)、腫瘍径 20mm 以上 ($P=0.03$)、不均一なエコーパターン ($P=0.04$)、そして膀胱三角での発生 ($P=0.03$) であった。さらに病理組織学的に壊死を伴う TCC の群では壊死を伴わない群に比較して有意 ($P=0.00004$) に生存期間が短縮しており、平均生存期間はそれぞれ 9.5 ヶ月と 26.2 ヶ月であった。

核分裂数については、膀胱三角で発生がみられた症例の 72% (その他の部位：9%) と非有茎状の形態であった症例の 77% (有茎状：23%) で高核分裂数が認められた。病理組織学的な高核分裂数は超音波検査所見における膀胱三角での発生 ($P=0.03$) と非有茎状 ($P=0.04$) に有意な関連性が認められた。しかしながら、高核分裂数と生存期間の間に有意な関連性はみられなかった ($P=0.2$)。

表 1-1. 超音波検査と病理組織学的検査結果の関連性

超音波検査所見	病理組織学的検査所見	
	筋層浸潤 n=14(14/0)	非筋層浸潤 n=13(8/5)
膀胱壁浸潤 n=14(14/0) †	13 * (13/0)	1 (1/0)
非膀胱壁浸潤 n=13(8/5)	1 (1/0)	12 * (7/5)

統計学的分析：カイ 2 乗検定

*p<0.0001

† (TCC/ポリープ状膀胱炎)

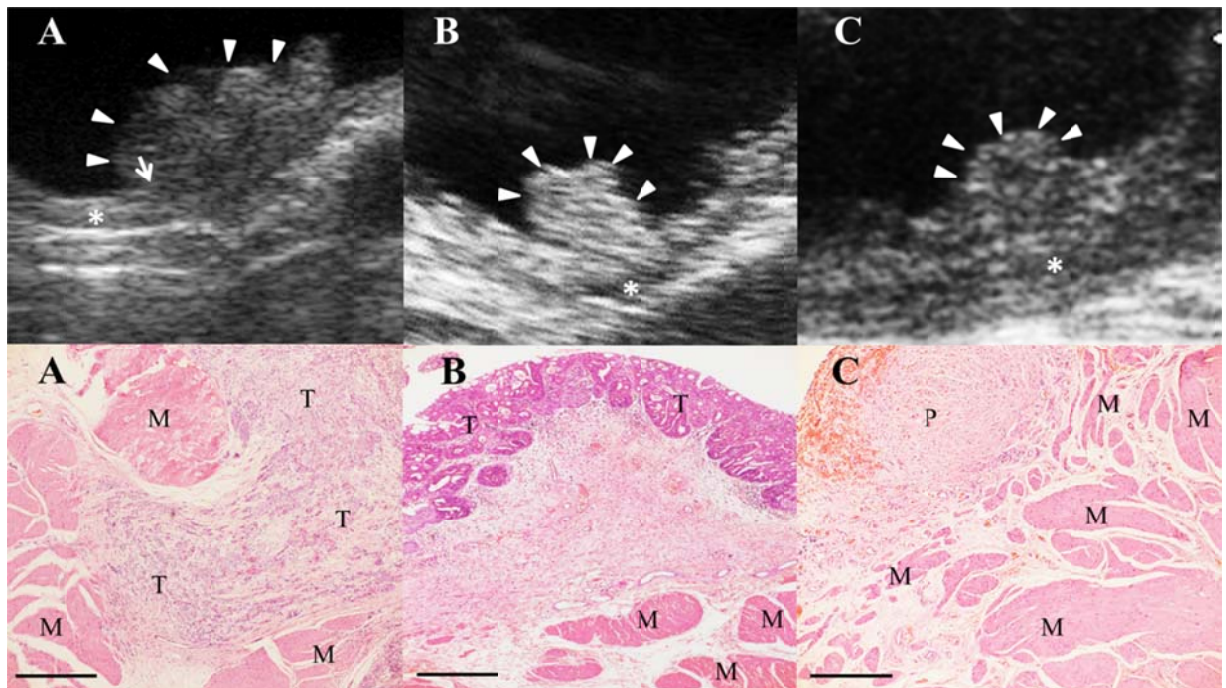


図 1-2. 超音波画像（上図）と相当する病理組織写真（下図）

(A) 病理組織学的に筋層浸潤している TCC

非有茎状の腫瘤（矢頭）が筋層に浸潤し（*）、粘膜固有層の連続性が消失（矢印）しているのが認められる（上図）。病理組織写真では腫瘍組織が筋層に浸潤している（下図）。

(B) 病理組織学的に筋層浸潤していない TCC

超音波画像では有茎状の腫瘤（矢頭）は低エコーの筋層（*）との連絡がみられない（上図）。病理組織写真においても筋層への腫瘍組織の浸潤は認められない（下図）。

(C) ポリープ状膀胱炎

超音波画像上、非有茎状の腫瘤（矢頭）は筋層（*）から離れている（上図）。病理組織写真においても炎症病変は筋層に認めない（下図）。

M: 平滑筋, T: 腫瘍組織, P: ポリープ状膀胱炎病変, Bar =200 μ m

表1-2. TCCにおける超音波検査所見と生存期間との関係

超音波検査所見	平均生存期間(月)
膀胱壁浸潤	
浸潤 (n=14)	14.6*
非浸潤 (n=8)	38.3
腫瘍径	
<20mm (n=12)	20.5
≥20mm (n=10)	18.9
エコーパターン	
均一 (n=13)	23.2
不均一 (n=9)	10.7*
形態	
有茎状 (n=13)	19.3
非有茎状 (n=9)	20.2
発生部位	
膀胱三角 (n=11)	15.2*
その他 (n=11)	23.9

統計学的分析：log rank 検定

*p<0.05

表 1-3. TCC における超音波検査所見と病理組織学的検査所見の関係

超音波検査所見	病理組織学的検査所見	
	壊死 (n=8)	高核分裂数 (n=10)
膀胱壁浸潤		
浸潤 (n=14)	8*	8
非浸潤 (n=8)	0	2
腫瘍径		
<20mm (n=12)	1	3
≥20mm (n=10)	7*	7
エコーパターン		
均一 (n=13)	2	4
不均一 (n=9)	6*	6
形態		
有茎状 (n=13)	4	3
非有茎状 (n=9)	4	7*
発生部位		
膀胱三角 (n=11)	7*	8*
その他 (n=11)	1	2

統計学的分析：カイ2乗検定.

* $P < 0.05$

4. 考 察

腹部超音波検査は非侵襲的かつ CT 検査とは異なり麻酔を必要としないモダリティであるため、獣医学領域においても腹部臓器の評価に広く用いられている。またヒトでは膀胱腫瘍における筋層浸潤は臨床的予後指標であるため、膀胱壁評価の臨床的意義は重要視されている[3,20,71]。

犬の膀胱壁は超音波画像上、二つの高エコー層とその間に挟まれた一つの低エコー層からなり、この低エコー層が筋層に相当する[18]。超音波検査上、筋層は他の層に比べ明瞭に分画されているため、筋層への腫瘍浸潤はほとんどの症例において判定することが可能である。本研究では 27 例中 25 例(93%)で超音波検査による筋層浸潤が病理組織学的浸潤に一致していた。一方 2 例において超音波検査所見と病理組織学的検査所見が一致せず、そのうちの 1 例では「非浸潤」と超音波検査で判定したが病理組織学的検査によって腫瘍細胞の僅かな筋層浸潤が認められた。この結果は、顕微鏡レベルの微細な腫瘍細胞の筋層浸潤を超音波検査によって評価することは難しいことを示している。超音波検査にて「非浸潤」と診断された 13 例で組織学的にも筋層浸潤は確認されなかったが、粘膜下織への腫瘍浸潤は確認された。最近の超音波診断装置においても粘膜下織の層を評価することは困難と言われており[27]、これらのことを考慮すると、超音波検査によって僅かな筋層浸潤を認める初期の TCC や筋層浸潤を認めないが粘膜下織浸潤を認める初期の TCC と筋層病

変を伴わない良性病変（ポリープ状膀胱炎など）を鑑別することは現在の機器では困難と思われた。また、腫瘍が膀胱腹側に発生していたもう 1 例では超音波検査によって「浸潤」と判定したが、病理組織学的検査によって筋層への浸潤は確認されなかった。体表近くの腹側の膀胱壁を評価する際には、超音波の物理的性状により体表構造物から多重反射によるアーティファクトが生じるため、膀胱壁構造が不明瞭となる場合がある[35]。このことが、膀胱腹側に位置する腫瘍に対し誤った評価を下した可能性があると思われた。しかしながら本研究では、1) 超音波診断装置によって高い感度・特異度で筋層浸潤を評価できること、2) 超音波検査によって筋層浸潤所見が確認されたすべての症例が病理組織検査によって TCC と診断されたこと、3) 超音波検査によって膀胱壁浸潤が確認された群は確認されない群に比較して有意に生存期間が短かったことを示した。本研究の結果は、超音波検査が犬膀胱 TCC の診断と予後評価に有用であることを示すものである。

ヒト膀胱腫瘍の予後は核分裂指数や壊死領域の存在といった病理組織学的因子と関連している[55]。ヒトと同様に、犬 TCC においても壊死領域の存在は予後不良に有意に関連していた。さらに本研究では壊死領域は大型またエコーパターンが不均一な TCC の症例でみられており、腫瘍の大きさやエコーパターンは TCC の予後を予測するマーカーになりうるかもしれない。実際に、統計学的分析において不均一なエコーパターンと生存期間の短縮の間に有意な関連性が認められた。一般的には TCC の予後不良の原因因子として、

浸潤、遠隔転移、尿路障害などが想定されるが、腫瘍塊が大きくかつ内部エコーパターンが不均一である TCC が予後不良である理由として、1) 生物学的に攻撃的な挙動をとる腫瘍は内部に壊死領域を伴いながら急速のその大きさ増大させる傾向があること[19,55]、2) 超音波検査では内部に発生した壊死領域は不均一なエコーパターンとして認識される傾向にあることが挙げられる[7,34,38,48,73]。ヒトの消化管間質腫瘍においても、不均一なエコーパターンは予後悪化の予測因子として関心が持たれている[63,79]。

ヒトの膀胱癌において前立腺尿道、膀胱頸、後部膀胱、膀胱三角での発生は予後不良因子として考えられている[46]。本研究における犬膀胱 TCC でも膀胱三角での発生は生存期間の短縮に関連していた。膀胱三角は犬の TCC で最も一般的な発生部位であり、膀胱三角に発生した症例の半分以上が尿路閉塞による尿毒症や腎盂腎炎を合併し、この合併症が罹患犬の予後を著しく悪化させると言われている[23,76]。

本研究は回顧的かつ限られた症例を対象としたものであるが、超音波検査による膀胱壁浸潤度評価の信頼性は高く、膀胱壁浸潤、腫瘍内部の混合エコーパターン、膀胱三角での腫瘍の発生などの所見は生存期間と関連があることが示された。これらのことから超音波検査によって 1) 膀胱壁浸潤度を適切に評価すること、2) 腫瘍内部エコーパターンを評価すること、3) 膀胱三角領域での発生を確認することは、遠隔転移病巣やリンパ節の評価に加え犬 TCC の予後を評価する上で重要な要素であると考えられた。

(本章の内容の一部は, Hanazono, K., Fukumoto, S., Endo, Y., Ueno, H., Kadosawa, T. and Uchida, T. 2013. Ultrasonographic findings related to prognosis in canine transitional cell carcinoma. *Vet. Radiol. Ultrasound*. **in press**.として公表した.)

5. 小 括

ヒト膀胱癌患者における超音波検査は腫瘍の発見のみならず、腫瘍の大きさ、形態、エコー源性、発生位置、膀胱壁への浸潤度の評価にも用いられ、これらの情報は腫瘍の生物学的・臨床的挙動（予後判断）の指標として用いられている。しかしながら獣医領域では超音波検査のこれらの所見に対する意義について十分に検討されていない。本章では犬膀胱 TCC の早期診断および予後診断に有用な超音波検査所見を模索するために、1) 超音波検査による膀胱壁への浸潤度評価の信頼性、2) 超音波検査所見と病理組織所見および生存期間との関連性について検討した。

超音波検査による腫瘍の膀胱壁浸潤所見と病理学的な筋層浸潤の間には有意な関連性が認められた（感度 93%、特異度 92%、 $P=0.00005$ ）。TCC 症例において、超音波検査による膀胱壁浸潤所見（ $P=0.03$, vs 非浸潤）、不均一な内部エコーパターン所見（ $P=0.02$, vs 均一）および膀胱三角での発生（ $P=0.01$ vs その他の部位）は有意に生存期間の短縮と関連していた。

これらの結果から、超音波検査による膀胱壁浸潤度の評価、内部エコーパターン、発生部位の同定は犬膀胱 TCC の予後を評価する上で重要な要素となる。

第Ⅱ章

犬膀胱移行上皮癌の予後マーカーの検索 (1)

－ Epidermal growth factor receptor について －

1. 小 緒

Epidermal growth factor receptor (EGFR) は Erb ファミリー (EGFR、HER2、HER3、HER4) に属するチロシンキナーゼ型受容体の一つである。Epidermal growth factor (EGF) が EGFR に結合するとその刺激は細胞内のいくつかのシグナル伝達経路を経て核内へ伝わり、最終的に細胞増殖に関連する遺伝子の転写活性や蛋白合成が高まる。EGFR の細胞内シグナル伝達経路として、Ras/Raf/MAPK 経路、PI3K/Akt 経路、Jak/STAT 経路が知られており、Ras/Raf/MAPK 経路は主に細胞増殖と生存に関与し、PI3K/Akt 経路は主に細胞の分化、抗アポトーシス、細胞の浸潤・遊走性に関与する[60]。これらのシグナル伝達経路の活性化は腫瘍細胞の持つ性状と密接に関連することから、近年医学領域では、EGFR の過剰発現や EGFR 遺伝子変異に基づく EGFR の持続的活性化が腫瘍化機構の 1 要因として、また腫瘍の増殖性や悪性度を定める要因として注目が集まっている[39,80]。

ヒトの非小細胞性肺癌、大腸癌、胃癌、膵臓癌、卵巣癌、乳癌、膀胱癌では EGFR の過剰発現が報告されており、この過剰発現は患者の予後不良因子として報告されている[49,50]。また、ヒトの乳癌、グリオーマ、前立腺癌、口腔癌、肺癌、大腸癌では EGFR の細胞外ドメインをコードする遺伝子領域に変異が確認されており、腫瘍の細胞増殖活性や悪性度の上昇と関連していることが分かっている[53]。これらの腫瘍のうち、特に肺癌や大腸癌では、

EGFR 遺伝子変異に基づくチロシンキナーゼの持続的活性化を抑えるために、チロシンキナーゼ阻害作用のある分子標的薬が開発・承認され、実際に臨床応用されている[36,45]。獣医学領域において、EGFR の過剰発現は犬の乳腺癌、鼻腔内悪性上皮系腫瘍、骨肉腫において報告されているものの[16,62,66]、膀胱 TCC における EGFR についての情報はない。

本研究の第 I 章で超音波検査が犬 TCC の診断や予後評価に有用であることを示したが、膀胱壁内浸潤が認められない TCC について、超音波所見から良性病変と鑑別することは難しく、超音波所見を補足し術前の診断精度を向上させる臨床マーカーの必要性が示された。そこで本章では、EGFR に着目し、犬膀胱 TCC における診断指標として、また予後指標や治療ターゲットとしての有用性について検討した。

2. 材料と方法

1) 対象動物

2004 から 2011 年まで酪農学園大学附属動物病院にて膀胱腫瘍摘出術後の病理組織学検査にて TCC と診断された組織 25 検体 (25 頭) およびポリープ状膀胱炎と診断された組織 5 検体 (5 頭)、さらに本学で飼育している健常犬から採取した正常膀胱組織 5 検体 (5 頭) を用いた。健常犬 5 頭の内訳は雄 2 頭、雌 3 頭であり、平均年齢は 7.4 ± 0.5 歳 (範囲 : 7-8 歳)、犬種は全頭ビーグルであった。ポリープ状膀胱炎 5 頭の内訳は雄 2 頭、雌 3 頭であり、平均年齢は 9.6 ± 3.7 歳 (範囲 : 4-13 歳)、最も多い犬種はシーズー (2 頭、40%) であった。TCC 25 頭の内訳は雄 9 頭、雌 16 頭であり、平均年齢は 9.7 ± 2.4 歳 (範囲 : 7-13 歳)、最も多い犬種はシェットランド・シープドッグ (5 頭、20%) であった。

蛋白発現の解析は免疫組織化学染色によって、また mRNA 発現の解析は定量的 real-time RT-PCR によって行われた。免疫組織化学染色のための検体は 10%ホルマリンにて固定した後、パラフィン包埋を施し保存した。real-time RT-PCR による解析のためには、上記の検体のうち TCC 4 検体と正常膀胱粘膜組織 3 検体からホルマリン固定前に一部の組織を採取し、氷上で RNAlater (Applied Biosystems) に 30 分浸漬した後、RNAlater 除去後 -80°C にて保存した。

TCC 全例に関する臨床所見（性別、腫瘍の位置、TNM ステージ、転移の有無、生存期間、術前の腫瘍径）、病理組織学的検査所見は記録され、解析に用いられた。TNM ステージ分類は WHO 分類[47]に基づいて行われた(表 2-1)。TCC 症例のフォローアップ期間は平均 16.8 カ月（1-60 カ月）であり、全生存期間は手術から死亡までの月数とした。

なお、本章の研究は、酪農学園大学獣医学部動物実験委員会の承認を受けて実施した（動物実験計画書 VH24A13）。

2) total RNA の抽出

検体は RNeasy Mini kit (QIAGEN) と RNase free DNase kit (QIAGEN) を取扱い説明書に基づいて使用し、total RNA を抽出した。得られた total RNA を cDNA 合成まで-80°Cで保存した。

3) cDNA の合成

total RNA 抽出液の吸光度を吸光度計（bio spec nano、SHIMADZU）により測定し、含有 total RNA 濃度（ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）を計算した。濃度から $1\mu\text{g}$ の total RNA 量を計算し、超純水（MilliQ）と合わせて $12\mu\text{l}$ となるように調整した。これを $5\times$ Reaction Buffer (Toyobo) $4\mu\text{l}$ 、 10mM dNTP (Takara) $2\mu\text{l}$ 、Oligo dT (Toyobo) $1\mu\text{l}$ 、ReverTra Ace (Toyobo) $1\mu\text{l}$ を加え $20\mu\text{l}$ とし、サーマルサイクラーによっ

て 42°C で 60 分間、90°C で 5 分間処理し、cDNA を合成した。得られた cDNA を PCR まで -20°C で保存した。

4) RT-PCR

本研究で用いたプライマーを表 2-2 に示した。検体の cDNA 1 μ l に対して超純水 (MilliQ) 14.3 μ l、Taq buffer (BioLabs) 2 μ l、Forward と Reverse プライマー (北海道システムサイエンス) 各 1 μ l、10mM dNTP (Takara) 0.5 μ l、Taq DNA polymerase (BioLabs) 0.2 μ l を加えて、95°C で 1 分間処理した後、95°C で 30 秒間、60°C で 30 分間、72°C で 1 分間の反応を 35 回繰り返した後、72°C で 2 分間反応させて 4°C で保存した。6 \times Loading Buffer を混合した後、全量を 2.0% TAE アガロースゲルで 40 分間電気泳動した。エチジウムブロマイドで 50 分間染色した後、紫外線照射下でバンドを確認した (図 2-1)。なお得られた PCR 産物はシーケンサーを用いた塩基配列解析によって目的とした領域の増副産物であることを確認した。

5) 定量的 real-time PCR

定量的 real-time PCR により各検体の EGFR mRNA 発現量を測定した。定量的 real-time PCR は Quantitect SYBR Green PCR kit (Qiagen) および iQ5/MyiQ Single-Color (Bio Rad Laboratories) を使用し、説明書に基づき行われた。目的遺伝子の増幅産物は pSTBlue-1 ベクター (Novagen) と pGEM-T ベクター

(Promega) にサブクローニングし、シーケンサーを用いた塩基配列解析によって目的遺伝子 cDNA が挿入されていることを確認した後、検量線のためのコントロールテンプレートとして用いた。EGFR の検量線はコントロールテンプレート (10^8 、 10^6 、 10^4 、および 10^3 コピー) を cDNA と同一条件 (95°C 1 分間、95°C 30 秒間、60°C 30 分間、72°C 1 分間 35 回) で作成した。各検体中の cDNA コピー数を検量線から算出し、ハウスキーピング遺伝子であるリボソーム蛋白 19 (RP19) をインターナルコントロールとして用い、RP19 の検量線は EGFR と同様にコントロールテンプレートを 95°C1 分間、95°C30 秒間、61°C30 分間、72°C1 分間 35 回の条件で作成した。これらによって得られた値から以下の計算式によって各検体の EGFR mRNA 相対発現量を求めた。また、これら遺伝子実験は酪農学園大学遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得て行った。

計算式：

$$\text{EGFR mRNA 相対発現量} = \text{EGFR cDNA コピー数} / \text{RP19 cDNA コピー数}$$

6) 病理組織学的検査

病理組織学的検査は外科的に摘出された組織を用いて行った。検体はマイクロトームにて $3\mu\text{m}$ に薄切し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を施した。TCC の症例については筋層浸潤の有無、組織グレード、腫瘍内壊死の有無、核分裂数、浸潤度、脈管浸潤の有無について検索した。核分裂数については強拡

大で 50 視野当たりに対する核分裂数 (/50hpf) を計算し、過去の報告に準じ [54]、10/50hpf を境界に 2 群に分けた。組織グレードは Valli らの分類法に基づき分類した[75]。

7) 免疫組織化学染色

マイクロトームにて 3 μ m に薄切した組織切片を脱パラフィン後、抗原の賦活化を目的として proteinase K (Dako) 処理を、室温で 2 分間行った。次に内因性ペルオキシダーゼ除去を目的として 0.3% H₂O₂ に 10 分間浸漬し十分に水洗後、ブロッキング処理として Block Ace® (大日本住友製薬) に 37°C で 30 分間浸漬した。その後、リン酸緩衝液 (PBS) で 50 倍希釈した一次抗体 (抗マウス EGFR モノクローナル抗体: Clone 31G7, Zymed Laboratories) を組織切片に載せ、4°C で 16 時間反応させた。組織切片を PBS で洗浄した後、ビオチン標識二次抗体 (Anti-Mouse IgG antibody : Vector Laboratories) を PBS で 400 倍に希釈し、組織切片に載せ室温で 30 分間反応させた。発色処理は Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories) を用いて行った。細胞膜が染色された細胞を「陽性」とし、陽性対照は EGFR の発現が確認されている犬正常乳腺組織を用い、陰性対照には一次抗体の代わりに PBS を載せた標本を用いた。

免疫染色による EGFR 蛋白発現の定量化については、Shimomitsu らの報告に従い[66]、陽性細胞の発現率によるスコア (Score 0: 0%、Score 1: <10%、Score 2: 10 – 30%、Score 3: 31 – 60%、Score 4: >60%) と、染色強度によるスコアの

(Score 1: 軽度、Score 2: 中等度、Score 3: 強度) の積をその検体における EGFR 蛋白染色スコアとした。

8) 統計学的分析

正常膀胱粘膜組織および TCC における EGFR mRNA と蛋白の発現比較には Mann-Whitney U 検定を、正常膀胱粘膜組織および TCC における EGFR mRNA と蛋白発現の相関性については Spearman の順位相関係数を用いた。さらに正常膀胱粘膜組織、ポリープ状膀胱炎、TCC の EGFR 蛋白発現の比較には Mann-Whitney U 検定、良性（正常膀胱粘膜組織、ポリープ状膀胱炎）と悪性（TCC）のカットオフ値の算定には ROC 曲線を使用した。加えて TCC における臨床・病理所見と EGFR 蛋白発現の関連性についてはカイ 2 乗検定、EGFR 蛋白発現と TCC 症例の予後の比較には Kaplan-Meier 法および log-rank 検定を用いた。いずれも P 値 0.05 未満で有意とした。

表 2-1 TNM ステージ分類

[T]	原発腫瘍	[N]	領域リンパ節
Tis	非浸潤性癌	N0	領域リンパ節に浸潤無し
T0	腫瘍は認められない	N1	領域リンパ節に浸潤有り
T1	表在性の乳頭状腫瘍	N2	領域リンパ節および近傍リンパ節に浸潤有り
T2	膀胱壁に浸潤した腫瘍	[M]	遠隔転移
T3	隣接臓器に浸潤した腫瘍 (前立腺、子宮、膣骨盤管)	M0	遠隔転移無し
		M1	遠隔転移有り

表 2-2 本研究で用いたプライマーの概要

Gene	Primer sequences	Gene Bank accession number	Product size (bp)
EGFR	Forward CGAGCACAAGGACAACATCG	XM 533073.3	288
	Reverse CTCCACACATCGCTTTGGTG		
RP-19	Forward CCTTCCTCAAAAAGTCTGCG	XM 538673	95
	Reverse GTTCTCATCGTAGGGAGC		

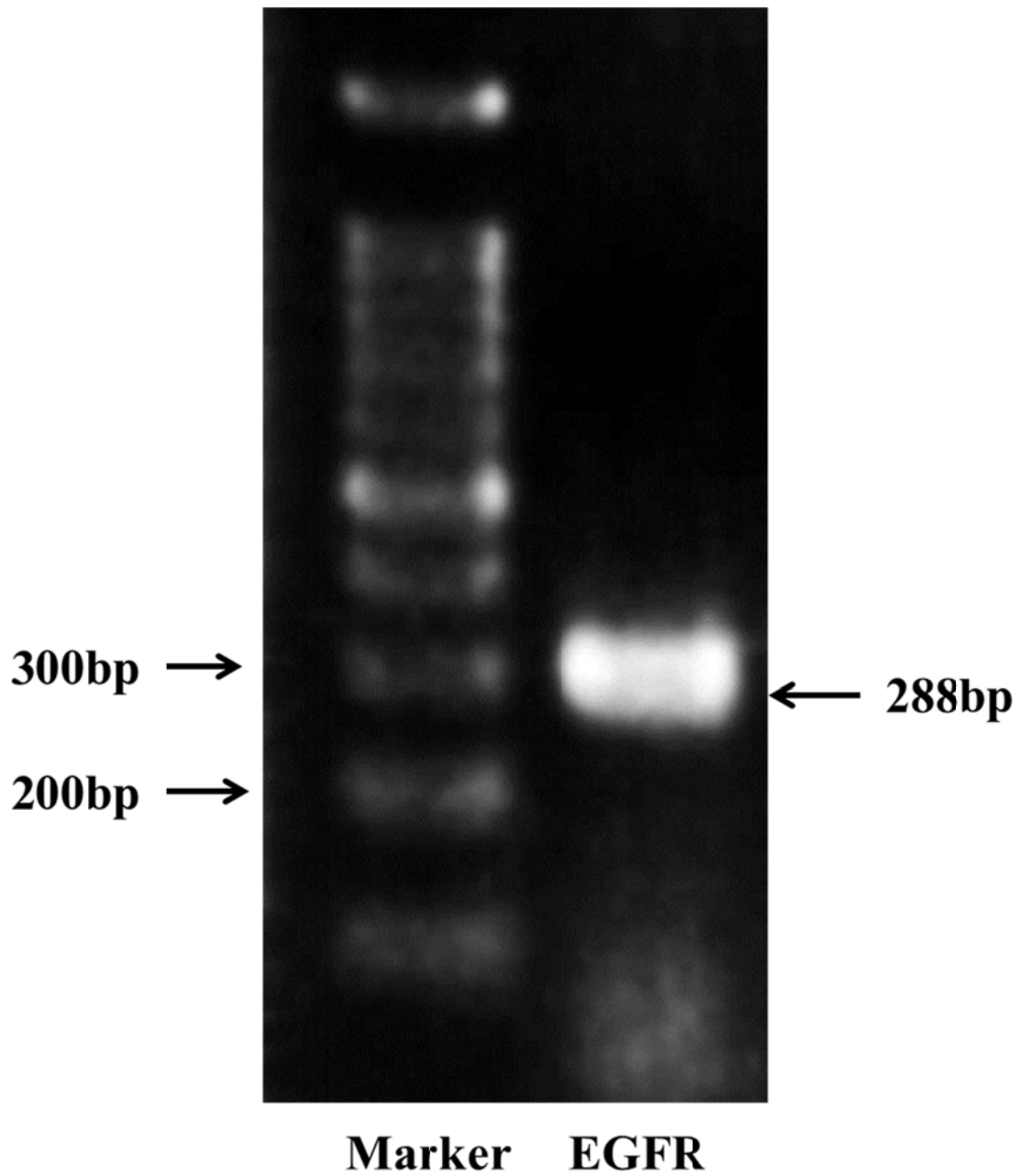


図 2-1 RT-PCR における EGFR のバンドの検出

目的の塩基対の領域（288bp）に明瞭な EGFR のバンドを認める。

3. 結 果

1) TCC 症例の臨床所見と病理組織検査所見

TCCの術前の腫瘍径については1例で記録を確認することができなかったが、確認できたものをまとめると20mm未満が10/24例(42%)、20mm以上が15/24例(58%)であった。発生部位については、膀胱三角部が12/25例(48%)と最も多く、三角部以外は13/25例(52%)であった。T分類およびN分類についてはT1、T2、T3がそれぞれ10/25例(40%)、10/25例(40%)、5/25例(20%)、N0、N1がそれぞれ22/25例(88%)、3/22例(12%)であった。転移が認められた症例は10/25例(40%)で、認められなかった症例は15/25例(60%)であった。

腫瘍の浸潤性、成長様式、筋層浸潤の有無、脈管浸潤の有無、核分裂数、組織内の壊死巣の有無および組織グレードに関する病理組織検査所見について、浸潤性、非浸潤性がそれぞれ23/25例(92%)、2/25例(8%)、乳頭状乳頭状、非乳頭状乳頭状がそれぞれ20/25(80%)、5/25(20%)、筋層浸潤型、非筋層浸潤型がそれぞれ16/25例(64%)、9/25例(36%)、脈管浸潤型、非脈管浸潤型がそれぞれ17/25例(68%)、8/25例(32%)、核分裂数が10/50HPF未満、10/50HPF以上がそれぞれ14例(56%)、11/25例(44%)、壊死巣を含む腫瘍塊、含まない腫瘍塊がそれぞれ14/25例(56%)、11/25例(44%)、組織グレード1、2、3がそれぞれ1/25例(4%)、10/25例(40%)、14/25例(56%)

であった。また、TCC 25 例すべてに関し、生存期間中央値は 19.8 か月であった。

2) 正常膀胱粘膜組織と TCC における EGFR mRNA と EGFR 蛋白発現の比較

正常膀胱粘膜組織と TCC について EGFR mRNA と蛋白発現の差を評価するために、定量的 real-time PCR より求めた EGFR mRNA 相対発現量と免疫組織化学染色より求めた EGFR 蛋白染色スコアの比較を行った (図 2-2 および 2-3)。また、両者の相関性についても検討した。EGFR mRNA 相対発現量について、TCC ($27 \pm 11 \times 10^{-4}$) では正常膀胱粘膜組織 ($6 \pm 9 \times 10^{-4}$) に比較して 4.5 倍と有意 ($P < 0.05$) に高値が認められた。同様に EGFR 蛋白染色スコアについても TCC (8.0 ± 2.83) では正常膀胱粘膜組織 (0.33 ± 0.58) に比較して有意 ($P < 0.01$) に高値が認められた。EGFR mRNA 相対発現量と EGFR 染色スコアの間には有意な正の相関がみられた ($P < 0.05$, $r = 0.78$)。

3) 正常膀胱粘膜組織、ポリープ状膀胱炎および TCC における EGFR 蛋白発現の比較

正常膀胱粘膜組織、良性病変であるポリープ状膀胱炎、および TCC において EGFR 蛋白発現の差を評価するため、免疫組織化学染色より求めた EGFR 蛋白染色スコアの比較解析を行った。正常膀胱粘膜組織、ポリープ状膀胱炎、および TCC の免疫組織化学的染色像を図 2-4 および 2-5 に示した。TCC の

EGFR 蛋白染色スコア (7.36 ± 3.35) は、正常膀胱粘膜組織 (1.00 ± 1.73) とポリープ状膀胱炎 (2.00 ± 0.71) に比較して有意 (vs 正常膀胱粘膜組織: $P < 0.001$ 、vs ポリープ状膀胱炎: $P < 0.005$) に高値を示した。一方、正常膀胱粘膜組織とポリープ状膀胱炎の間には有意差は認められなかった。なお正常膀胱粘膜組織、ポリープ状膀胱炎、および TCC の EGFR 蛋白染色スコアの中央値はそれぞれ 0、2、および 8 であった。

EGFR 染色スコアによる良・悪性の鑑別のため、良性群 (正常膀胱粘膜組織、ポリープ状膀胱炎) と悪性群 (TCC) に分類し ROC 曲線を描出し、カットオフ値を求めた (図 2-6)。EGFR 蛋白染色スコアを「3」でカットオフした場合、真陽性率 (TPF=感度) 92%、偽陽性率 (FPF) 20% (特異度 80%)、オッズ比 46.0 であった。また EGFR 蛋白染色スコアを「4」でカットオフした場合、TPF 88%、FPF 10% (特異度 90%)、オッズ比 66.0 であった。以上より EGFR 蛋白染色スコアのカットオフ値を感度と特異度の合計が最大となる「4」とした。

4) TCC における EGFR 蛋白発現と臨床・病理学的所見との関連性

TCC における EGFR 蛋白発現の臨床的意義を確認するため、免疫組織化学染色より求めた TCC 25 例の EGFR 蛋白染色スコアの中央値を境界に 8 未満を「EGFR 低発現」、8 以上を「EGFR 高発現」と 2 群に分類し、それぞれの群と臨床・病理所見との関連性について検討した (表 2-3 および 2-4)。その結果、

EGFR 蛋白発現と臨床所見および病理組織学的所見との間に有意な関連性は認められなかった。

5) TCC における EGFR 蛋白発現と予後との関連性

TCC における EGFR 蛋白発現と予後との関連性を調査するために、免疫組織化学染色より求めた TCC 25 例の EGFR 蛋白染色スコアの中央値を境界に 8 未満を「EGFR 低発現」、8 以上を「EGFR 高発現」と 2 群に分類し、各群の生存期間を比較した。それぞれの生存曲線については図 2-7 に示した。EGFR 低発現群と高発現群の生存期間中央値はそれぞれ 15 ヶ月と 19 ヶ月であり、両群間に有意差は認められなかった ($P=0.546$)。

6) TCC における術前化学療法と EGFRmRNA、蛋白発現との関係

TCC における術前化学療法の有無と EGFRmRNA 相対発現量、EGFR 蛋白スコアの結果を表 2-5 に示した。TCC25 症例中、術前に化学療法を行ったのは 1 例（症例 No23）でピロキシカムの投与のみ行われており、EGFRmRNA 相対発現量は測定した 4 例中最も低値であった。EGFR 蛋白スコアが最も低値を示したのは症例 No3 であり、術前の化学療法は受けていなかった。

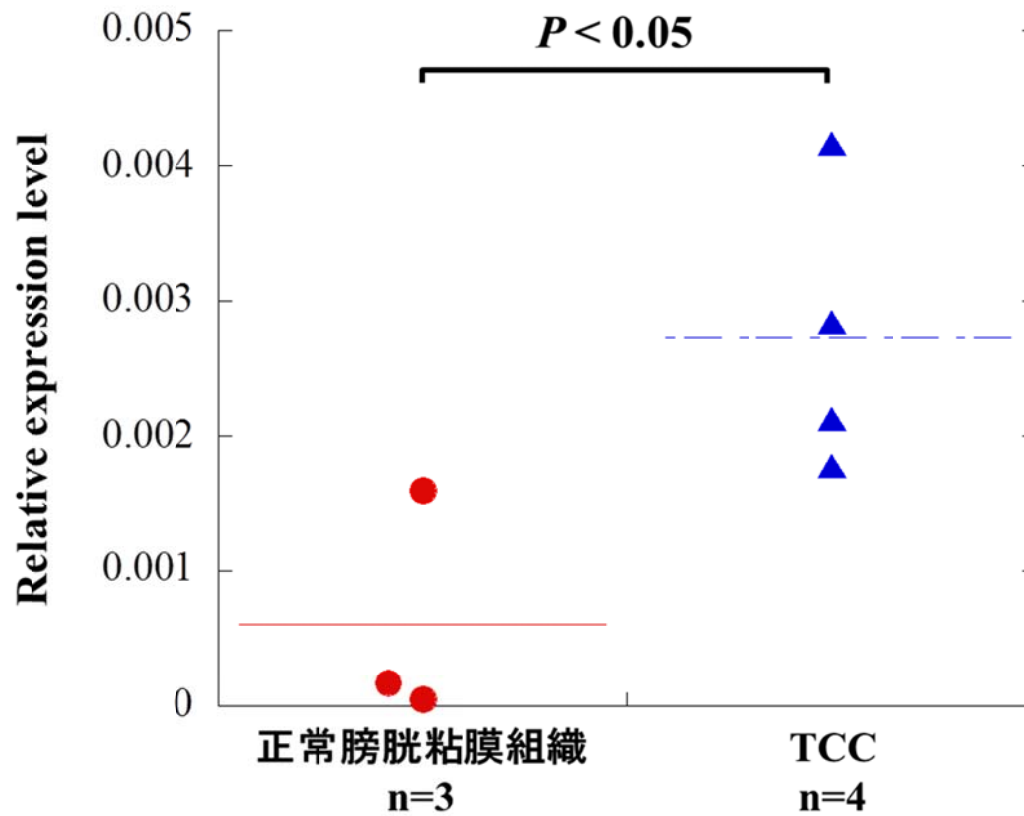


図 2-2 正常膀胱粘膜組織と TCC における EGFR 遺伝子相対発現量の比較

TCC の EGFR mRNA 相対発現量 (Relative expression) は正常膀胱組織に比較して有意に高値 ($P < 0.05$) を認めた (統計学的分析: Mann-Whitney U 検定)。

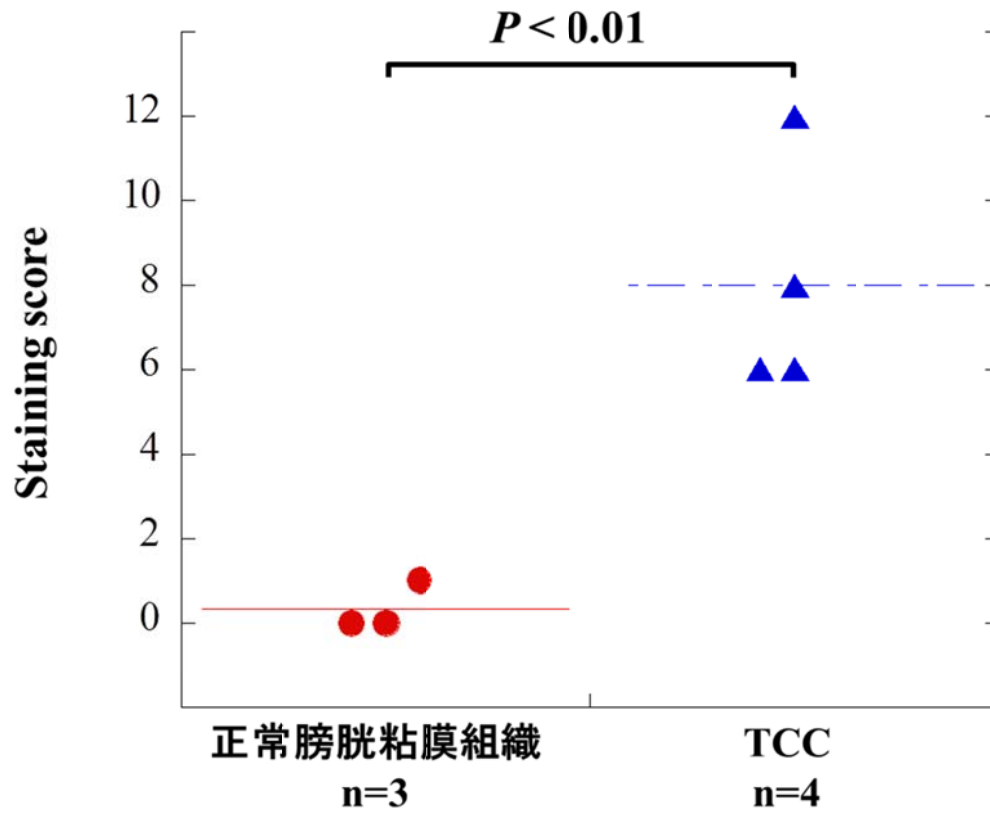


図 2-3 正常膀胱粘膜組織と TCC における EGFR 蛋白染色スコアの比較

TCC の EGFR 蛋白染色スコア (Staining score) は正常膀胱粘膜組織に比較して有意に高値 ($P < 0.01$) を認めた (統計学的分析: Mann-Whitney U 検定)。

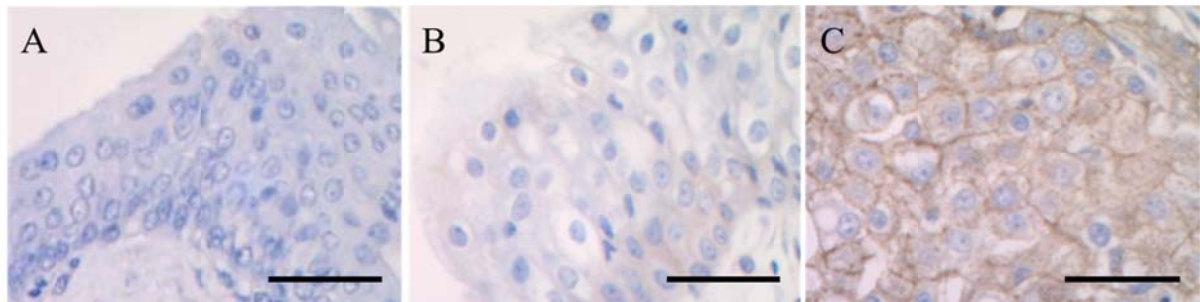


図 2-4 各組織の免疫化学的組織染色による EGFR 発現

(A) 正常膀胱組織：細胞膜はほとんど染色されていない (B) ポリープ状膀胱炎：一部の細胞膜が弱く染色されている (C) TCC：何れの細胞膜も強く染色されている。

Bar:100 μ m

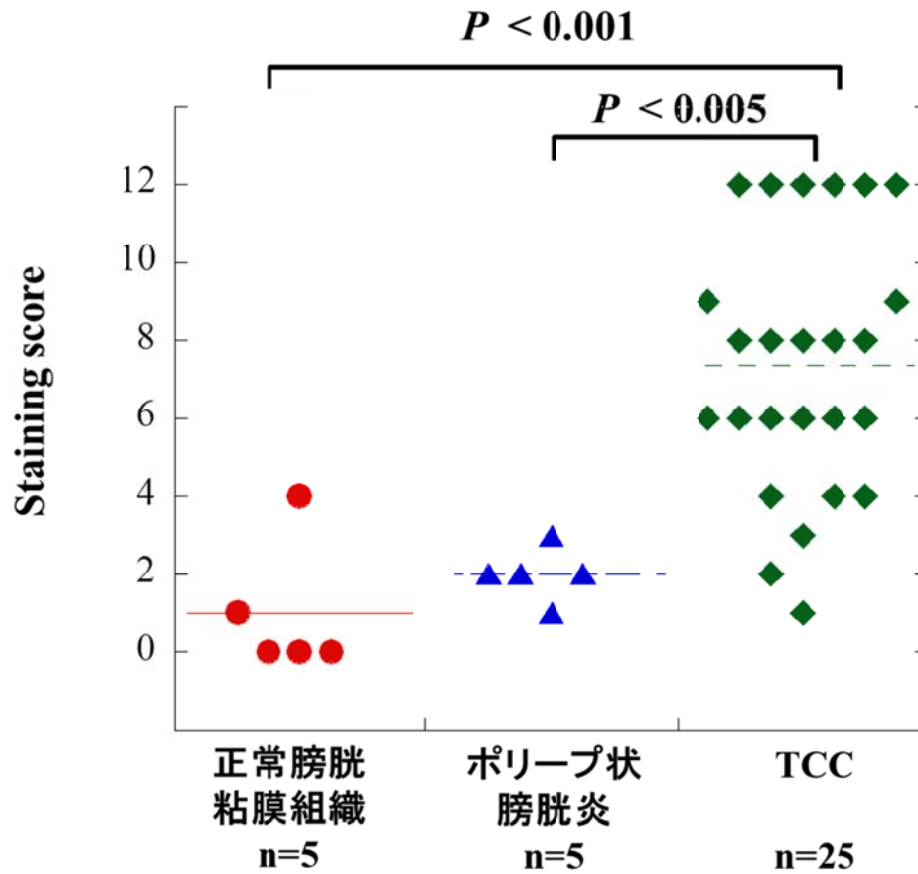


図 2-5 正常膀胱粘膜組織、ポリープ状膀胱炎および TCC における EGFR 蛋白染色スコアの比較

TCC の EGFR 蛋白染色スコア (Staining score) は正常膀胱粘膜組織 ($P < 0.001$) およびポリープ状膀胱炎 ($P < 0.001$) に比較して有意に高値を認めた (統計学的分析: Mann-Whitney U 検定)。

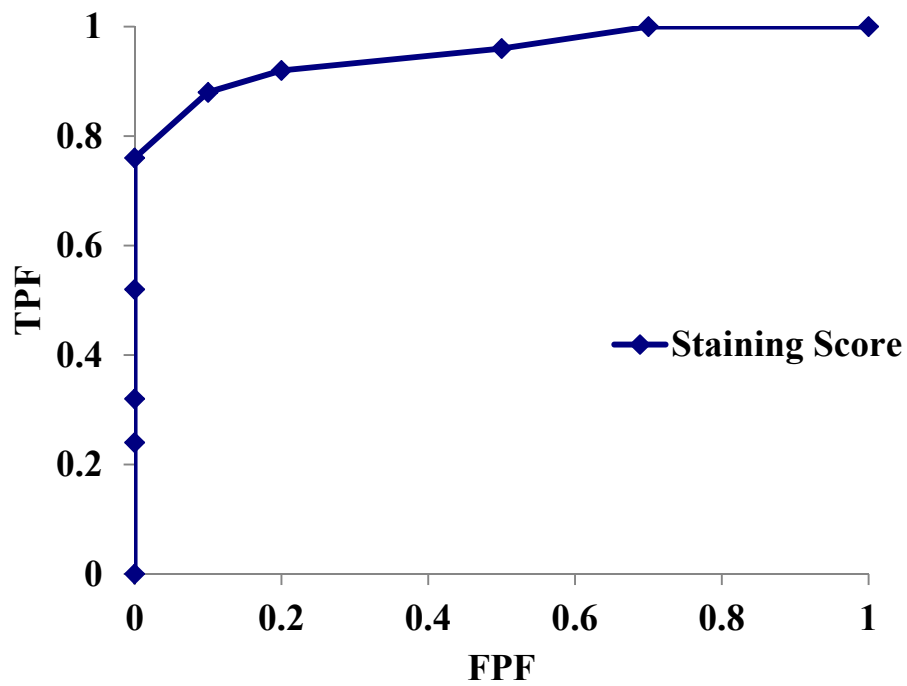


図 2-6 良性と悪性に分類した場合の EGFR 蛋白染色スコアの ROC 曲線

ROC 曲線は左上隅に非常に近接する曲線を描出している。TPF は真陽性率、FPF は偽陽性率を示す。

表 2-3 TCC における EGFR 蛋白発現と臨床所見との関連性

臨床所見		N	EGFR 低発現 (n=12)	EGFR 高発現 (n=13)	P
性別	雄	9	4	5	0.885
	雌	16	8	8	
腫瘍の位置	膀胱三角	13	9	4	0.070
	その他	12	3	9	
T ステージ	T1-2	20	8	12	0.271
	T3	5	4	1	
転移	無	15	8	7	0.806
	有	10	4	6	
腫瘍径	<2cm	10	7	3	0.111
	≥2cm	14	4	10	

統計学的分析：カイ 2 乗検定

表 2-4 TCC における EGFR 蛋白発現と臨床所見との関連性

病理組織学的所見		N	EGFR 低発現 (n=12)	EGFR 高発現 (n=13)	P
組織グレード	1-2	11	7	4	0.325
	3	14	5	9	
筋層浸潤	無	9	3	6	0.494
	有	16	9	7	
脈管浸潤	無	8	5	3	0.571
	有	17	7	10	
核分裂数	<10/50hpf	15	7	8	0.806
	≥10/50hpf	10	5	5	
壊死	無	14	7	7	0.859
	有	11	5	6	

統計学的分析：カイ 2 乗検定

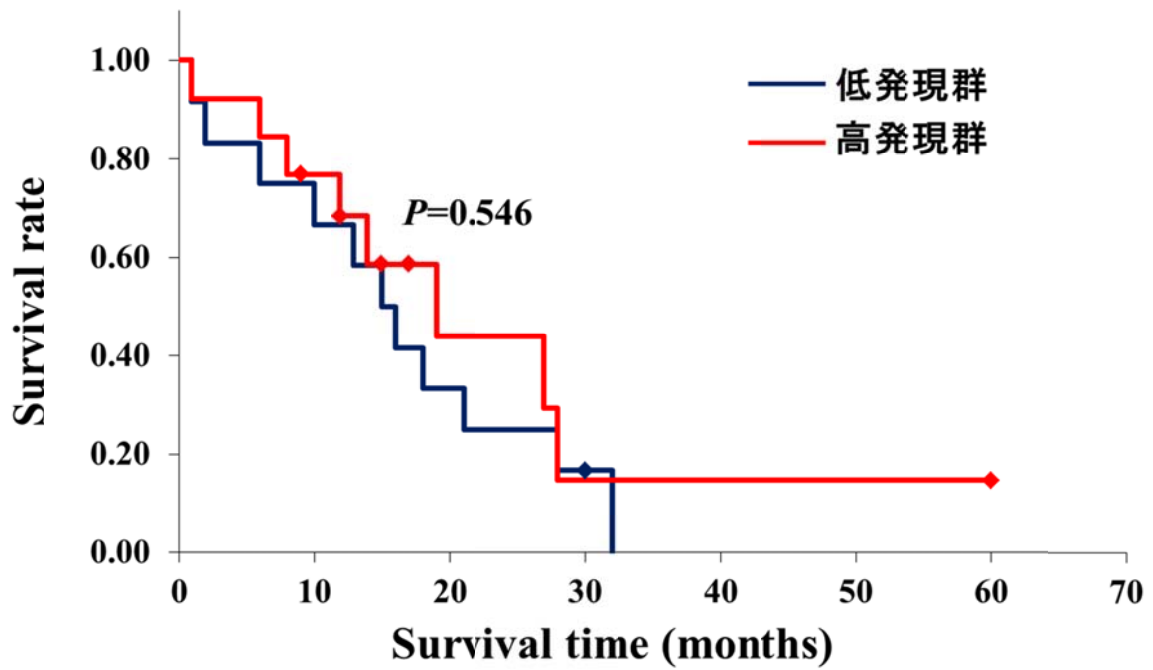


図 2-7 EGFR 蛋白発現と生存期間の比較

EGFR 蛋白低発現群と高発現群との間に有意な生存期間の差は認められなかった（統計学的分析：log rank 検定）。

表 2-5 TCC 症例における術前化学療法と EGFR 発現の関係

症例 No	術前化学療法	EGFRmRNA 相対発現量	EGFR 蛋白 スコア
1	なし	NE	3
2	なし	NE	9
3	なし	NE	1
4	なし	NE	6
5	なし	NE	2
6	なし	NE	4
7	なし	NE	12
8	なし	NE	8
9	なし	NE	8
10	なし	NE	8
11	なし	NE	6
12	なし	NE	6
13	なし	NE	4
14	なし	NE	12
15	なし	NE	9
16	なし	0.0021	12
17	なし	0.0042	6
18	なし	NE	6
19	なし	NE	4
20	なし	NE	12
21	なし	NE	6
22	なし	0.0028	12
23	ピロキシカム	0.0018	8
24	なし	NE	8
25	なし	NE	12

NE：実施せず

4. 考 察

ヒト膀胱癌における EGFR 蛋白の過剰発現は 30 年以上前から報告されており[49]、EGFR 蛋白量と EGFR mRNA 発現量が正の相関を示すことも知られている[72,78]。筆者はヒトの膀胱癌と同様に犬 TCC 組織においても EGFR 蛋白と EGFR mRNA の過剰発現がみられることを確認し、かつ蛋白発現スコアと mRNA 発現量の間には正の相関があることを示した。ヒト膀胱癌で EGFR の過剰発現が腫瘍化機構と関連していることが明らかになっているが[13]、犬 TCC において観察された EGFR の高発現についても、同様の関連性を推測することができる。EGFR 蛋白染色スコアを「4」でカットオフした場合、高い TPF と特異度で良性病変と TCC を鑑別することが可能であり、この結果は膀胱病変の病理組織学的診断はもちろん、カテーテル吸引などによる細胞学的診断の補助として EGFR 蛋白染色スコアを利用できることを示している。

EGFR 蛋白の過剰発現の機序については、遺伝子増幅や exon 19、21 などにおける遺伝子変異が関連するものと考えられてきた[51]。しかしながら最近のヒト膀胱癌における研究では、EGFR 蛋白の高発現と exon 19、21 における遺伝子変異との間に関連性を見出すことはできていない [6]。また、ヒト膀胱癌では EGFR 蛋白の過剰発現は病理組織学的高グレード、臨床的高ステージ、高浸潤性の性状、そして臨床的な予後の悪さと関連性が示されているが [9,37,43]、犬 TCC では EGFR 高発現と腫瘍の脈管浸潤性、転移性および

患者の生存期間との間に有意な関連性を見いだせなかった。最近のヒト膀胱癌における報告では、EGFR 単独での予後評価に限界が示されており、Erb ファミリー全体で評価する必要性が報告されている [5,8,42]。ヒト膀胱癌では Erb ファミリーのうち EGFR と HER2 の発現は予後の悪化、HER3、HER4 の発現は良好な予後に関連し、また EGFR が高発現である場合には HER3、HER4 の発現程度により予後が左右されると報告されている[5,42]。犬 TCC においても、HER2、HER3、HER4 の発現についても検討する必要がある。

本研究では検体数が少なく、因果関係を明確にすることができなかったが、術前ピロキシカムを投与されていた症例で最も EGFRmRNA 相対発現量が低値を示す結果となった。このことはピロキシカムにより EGFR 遺伝子の発現に影響を及ぼすことが示唆され、今回は実施できなかったが犬 TCC 細胞株を用いてピロキシカム投与による EGFR 発現について調査する必要があると思われる。

結論として、TCC における EGFR の過剰発現は、TCC 診断時に細胞学的・病理学的マーカーとして有用かもしれないが、EGFR 発現と臨床・病理学的所見や生存期間との関連は認められず、EGFR 発現だけを基にして予後判断を行うことはできないものと考えられた。

5. 小 括

EGFR は細胞内に増殖シグナルを伝達する受容体である。ヒトの膀胱癌では EGFR の過剰発現が認められ、膀胱癌発生機構の 1 因子として考えられている。今回我々は犬の膀胱 TCC について、EGFR の発現解析を mRNA・蛋白レベルで行い、臨床的、病理的性状との関連性について考察した。

犬の正常膀胱組織、ポリープ状膀胱炎、TCC を対象とし、EGFR mRNA 発現量を real-time PCR にて、EGFR 蛋白発現を免疫組織化学法にて解析し比較した。また、TCC を対象として、EGFR 蛋白発現と腫瘍の臨床的（生存期間、転移の有無）および病理的（腫瘍径、T ステージ、組織グレード、筋層浸潤の有無、脈管浸潤の有無）性状との関連性を統計学的に解析した。

TCC の EGFR mRNA 相対発現量は正常膀胱組織の 4.5 倍と有意 ($P<0.05$) に高値を示し、また免疫組織化学法における EGFR 蛋白発現スコアも TCC では正常膀胱組織に比較して有意 ($P<0.01$) に高値を示した。また、TCC では正常膀胱、ポリープ状膀胱炎と比較して発現スコアが有意 ($P<0.001$ 、 <0.005) に高値であったが、発現スコアと臨床・病理学的性状との間に関連性は認められなかった。

TCC における EGFR の過剰発現は、TCC 診断時の細胞学的・病理学的マーカーとして、また TCC における EGFR の過剰発現はこの分子をターゲットとした分子標的治療の可能性が期待できるかもしれないが、EGFR 発現だけを

基にして予後判断を行うことはできないものと考えられた。ただし今回の研究ではリガンドである EGF を評価していないため、この影響についても検討は必要なものと考えられる。

第Ⅲ章

犬膀胱移行上皮癌の診断および予後マーカーの検索 (2)

— p63 と Δ Np63 について —

1. 小 緒

p63 遺伝子は p53 遺伝子と同じ遺伝子ファミリーに属する癌抑制遺伝子の 1 つであり、その遺伝子産物である p63 蛋白は p53 蛋白と同様にアポトーシス誘導因子をアップレギュレートさせアポトーシス誘導作用を有する。p63 蛋白の発現低下や p63 蛋白の非機能性ミュータントの出現は細胞の無秩序な増殖につながるため、p63 蛋白発現異常は癌化の一因とも考えられている[31,74]。近年、ヒトの膀胱癌では腫瘍の増殖性、浸潤・転移性に関係する分子として p63 蛋白が注目されており、特に高グレード浸潤性膀胱癌では p63 蛋白の発現低下とともに予後悪化との関連性が示めされている[31,74]。また正常膀胱では p63 蛋白は上皮細胞の細胞接着因子の発現を誘導していると考えられているため[31]、腫瘍における p63 蛋白の発現低下は細胞接着因子である β -catenin の発現低下につながるとの指摘もあり、腫瘍細胞の浸潤・転移性などの生物学的性質を決める要因としても注目を集めている[31]。

p63 遺伝子から N 末端側にトランス活性化ドメインを有する TAp63 と活性化ドメインを持たない Δ Np63 の 2 つのアイソフォームを生じ、これらを総じて p63 蛋白と呼ばれる。その発現はそれぞれ個々のプロモーターによって制御されている。また、p63 遺伝子は転写後に選択的スプライシングを受け、生成する p63 蛋白はスプライシングバリエントの違いからさらに α 、 β 、 γ に細分類される[81]。TAp63 と Δ Np63 の機能については現時点でも不明確な点が

多いが、TAp63はp21遺伝子のようなp53標的遺伝子をトランス活性化させ、過剰な細胞増殖時のアポトーシス誘導を担い[81]、反対にΔNp63はp53やTAp63によるこのトランス活性化を抑制すると考えられている[81]。ΔNp63はヒトの扁平上皮癌などの悪性腫瘍で過剰発現しており、前述の機能からも発癌性に関与していることが示唆されてきた[25,52]。しかしながら、ヒトの膀胱腫瘍においてΔNp63の発現低下と悪性挙動を関連づける報告もあり、ΔNp63と腫瘍との関連性については現在論争的となっている[15,31,32]。また、ヒトの高グレードの浸潤性尿路上皮癌ではΔNp63の発現低下と共にβ-cateninの発現低下も報告されており、p63と同様にΔNp63とβ-cateninの発現制御機構間に何らかの関連性が指摘されている。β-cateninの発現低下は細胞間のadherent junctions (AJs)の低形成を招くため[15]、ΔNp63の発現低下は腫瘍の浸潤と関連することが示唆されている[32]。

犬のTCCでは、p53、COX-2、Survivin、TAG-72などの分子マーカーの発現について検討した報告はあるものの[17,29,47,56]、いずれについても予後との関連性については証明されておらず、犬TCCの予後指標となる分子マーカーは明らかになっていない。第II章でEGFRについて検討したが、TCCでEGFRが過剰発現していることは確認されたものの、予後との関連性は認められなかった。そこで、本研究では犬TCCで検討がなされていないp63とΔNp63に着目し、犬の正常膀胱、ポリープ状膀胱炎、TCCにおけるp63とΔNp63発現率の検討、およびp63とΔNp63発現率と病理組織検査所見、臨床所見との

関連性を検討することにより、TCCにおける p63 発現の臨床的意義を考察した。さらに p63 と Δ Np63 発現率と腫瘍細胞の浸潤性の関連を明らかにするために細胞接着因子である β -catenin の発現を併せて検討した。

2. 材料と方法

1) 対象動物

対象動物は第Ⅱ章と同じであるため、概要については第Ⅱ章を参照とする。

2) 病理組織学的検査

病理学的検査は第Ⅱ章と同じ方法にて実施したため、概要については第Ⅱ章を参照とする。なお、これらの結果についても第Ⅱ章の結果 2) で述べたので本章では割愛する。

3) 免疫組織化学染色

p63、 Δ Np63、 β -catenin を対象に免疫組織化学染色を行った。組織切片を脱パラフィン後、抗原の賦活化を目的としては 1mol/L Tris EDTA 緩衝液 (pH9.0) に浸漬してオートクレーブ (15 分間、121°C) にて加熱処理を行った。内因性ペルオキシダーゼの除去を目的として 0.3% H_2O_2 に 10 分間浸漬後、十分に水洗した。非特異的反応を抑える目的で Block Ace (大日本住友製薬) に 37°C で 30 分間浸漬した。その後、リン酸緩衝液 (PBS) で至適濃度に希釈した p63、 Δ Np63、 β -catenin に対する各一次抗体 (表 3-1) を組織切片に載せ、p63 と β -catenin は 4°C で 16 時間、 Δ Np63 は室温で 1 時間反応させた。一次抗体の反応後、組織切片を PBS で洗浄し、ビオチン標識二次抗体 (Anti-rabbit IgG

antibody : Vecter Laboratories) を PBS で 400 倍に希釈し、組織切片に載せ 30 分間、室温にて反応させた。発色処理は Vectastain Elite ABC Kit (Vecter Laboratories) を用いて行った。

免疫組織化学染色の定量化について、p63、 Δ Np63 は顕微鏡下で核が染色された細胞を陽性細胞として細胞 1000 個当たりの陽性細胞率 (%) を計算した。 β -catenin は Resnick らの報告に従い、細胞膜に染色が全く認められなかったものを Score 0、細胞膜に染色が認められるが不完全なものを Score 1、細胞膜の全周に軽度から中等度の染色が認められるものを Score 2、細胞膜の全周に強度の染色が認められるものを Score 3 とした[58]。

4) 統計学的分析

正常膀胱粘膜組織、ポリープ状膀胱炎、TCC における p63、 Δ Np63、 β -catenin 蛋白発現の比較解析には Mann-Whitney U 検定を、p63、 Δ Np63、 β -catenin 蛋白発現の相関性については Spearman の順位相関係数を使用した。TCC における臨床・病理所見と各蛋白の発現との比較については Mann-Whitney の U 検定を、p63、 Δ Np63、 β -catenin 蛋白発現と TCC 症例の予後の比較には Kaplan-Meier 法および log-rank 検定を用いた。いずれも P 値 0.05 未満で有意とした。

表 3-1 一次抗体の概要

Antibody	Clonarity	Dilution	Isotype	Supplier
p63	Polyclonal H137	1:100	Rabbit IgG	Santa Cruz
Δ Np63	Polyclonal Anti serum	1:2000	Rabbit IgG	Calbiochem
β-catenin	Polyclonal Anti serum	1:2500	Rabbit IgG	Millipore

3. 結果

1) 正常膀胱組織、ポリープ状膀胱炎およびTCCにおける p63、 Δ Np63、 β -catenin 発現の比較

正常膀胱組織、ポリープ状膀胱炎、TCC における p63、 Δ Np63、 β -catenin の免疫組織化学染色像を図 3-1~3-9 に示した。p63 発現率の解析を行った結果、TCC ($11.3 \pm 20.1\%$) では正常膀胱組織 ($90.1 \pm 5.9\%$)、ポリープ状膀胱炎 (84.8 ± 13.5) と比較して p63 発現率が有意 ($P < 0.001$) に低値を示した (図 3-10)。また、 Δ Np63 発現率も p63 発現率と同様の傾向を示し、TCC ($10.70 \pm 16.1\%$) では正常膀胱粘膜組織 ($90.70 \pm 4.6\%$)、ポリープ状膀胱炎 ($81.90 \pm 9.7\%$) と比較し発現率が有意 ($P < 0.001$) に低値を示した (図 3-11)。 β -catenin 発現も、正常膀胱粘膜組織 (2.60 ± 0.55)、ポリープ状膀胱炎 (2.60 ± 0.55) と比較して TCC (1.70 ± 0.94) で有意 ($P < 0.05$) に低値を示した (図 3-12)。p63、 Δ Np63、 β -catenin のいずれも正常膀胱粘膜組織とポリープ状膀胱炎の間に有意な差はみられなかった。TCC における p63、 Δ Np63 発現率の中央値はいずれも 5% であった。また p63 発現率と Δ Np63 発現率との間に有意 ($P < 0.001$) な正の相関 ($r=0.92$) が認められ、さらに β -catenin は p63、 Δ Np63 のいずれにも有意 ($P < 0.01$) な正の相関 (vs p63: $r=0.48$, vs Δ Np63: $r=0.54$) を認めた (図 3-13 および 3-14)。

2) TCC における p63、 Δ Np63、 β -catenin 蛋白発現と臨床・病理学的所見との

関連性

臨床所見・病理組織検査所見に基づいて TCC を二群に分けて p63 発現率、 Δ Np63 発現率、 β -catenin 発現性を比較した結果を表 3-2~3-4 に示した。p63 と Δ Np63 の双方において、脈管浸潤、転移が認められた群は認められない群に対して有意（脈管浸潤： $P<0.01$ 、転移： $P<0.05$ ）に発現率の低値を示した。 β -catenin 発現の比較では、筋層浸潤が認められた群が認められない群に対して、また三角部に発生した群がその他の部位に発生した群に対して、それぞれ有意（ $P<0.05$ ）に低値を示した。

3) TCC における p63、 Δ Np63 発現と予後との関連性

p63 および Δ Np63 発現率と予後との関連性を検討するため、中央値を境界に低発現群（発現率 5%未満）と高発現群（5%以上）の 2 群に分類し生存期間を比較した（図 3-16 および 3-17）。p63 低発現群と p63 高発現群における生存期間中央値は、それぞれ 13 ヶ月と 21 ヶ月であり、有意（ $P=0.046$ ）な差を認めた。また、 Δ Np63 低発現群と Δ Np63 高発現群における生存期間中央値はそれぞれ 13 ヶ月と 21 ヶ月であり、有意（ $P=0.035$ ）な差を認めた。

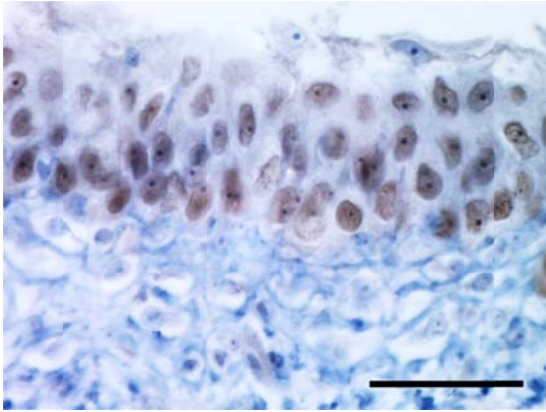


図 3-1 正常膀胱粘膜組織の p63 発現
膀胱粘膜全層、特に基底層の細胞で核内に
p63 発現が認められる。

Bar: 100 μ m

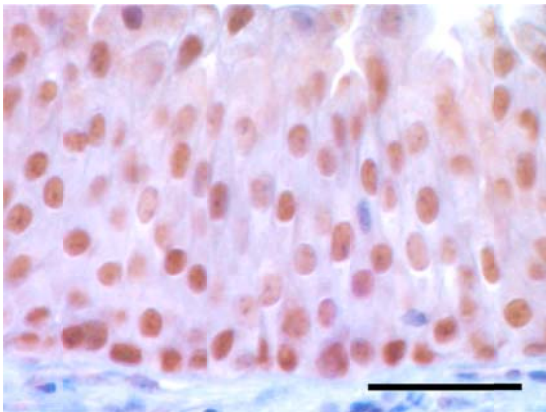


図 3-2 ポリープ状膀胱炎の p63 発現
膀胱粘膜全層、特に基底層の細胞で核内に
p63 発現が認められる。

Bar: 100 μ m

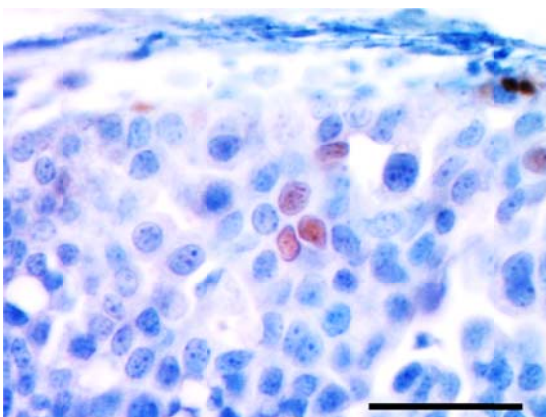


図 3-3 TCC の p63 発現
腫瘍細胞において散在性に少数の細胞で核
内に p63 発現が認められる。

Bar: 100 μ m

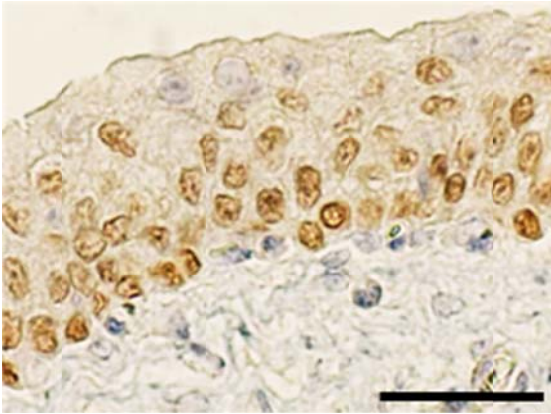


図 3-4 正常膀胱粘膜組織の Δ Np63 発現
膀胱粘膜全層、特に基底層の細胞で核内に
 Δ Np63 発現が認められる。

Bar: 100 μ m

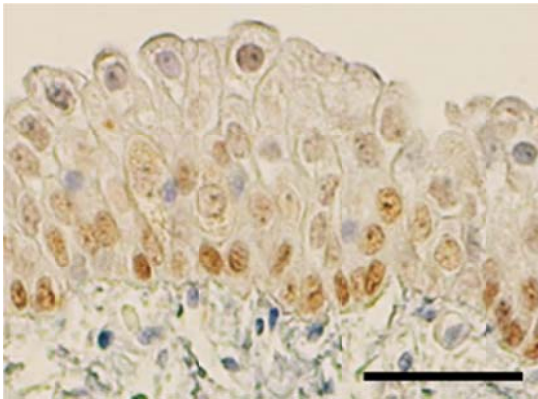


図 3-5 ポリープ状膀胱炎の Δ Np63 発現
膀胱粘膜全層、特に基底層の細胞で核内に
 Δ Np63 発現が認められる。

Bar: 100 μ m

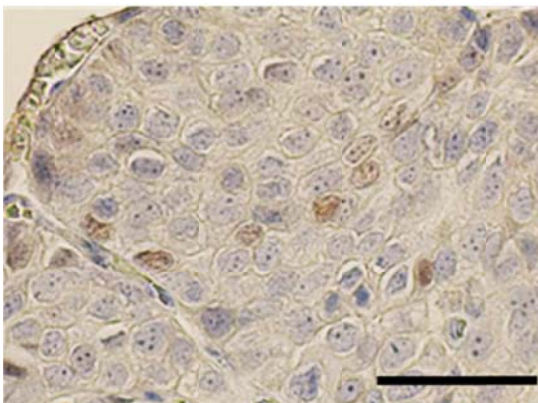


図 3-6 TCC の Δ Np63 発現

腫瘍細胞において散在性に少数の細胞で
核内に Δ Np63 発現が認められる。

Bar: 100 μ m

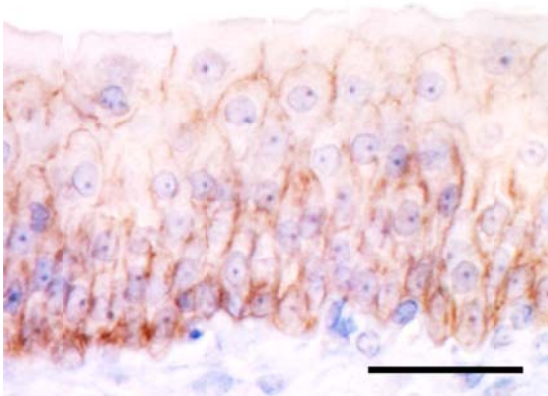


図 3-7 正常膀胱の β -catenin 発現
細胞境界において細胞膜の β -catenin
の発現が認められ、蜂巢状の陽性所
見が認められる。

Bar: 100 μ m

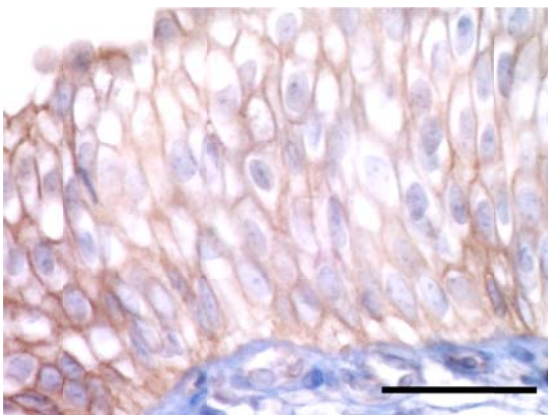


図 3-8 ポリープ状膀胱炎の β -catenin
発現
細胞境界において細胞膜の β -catenin
の発現が認められ、蜂巢状の陽性所
見も認められる。

Bar: 100 μ m

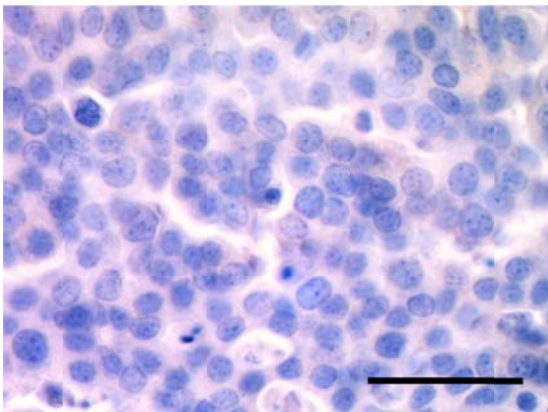


図 3-9 TCC の β -catenin 発現
細胞境界において細胞膜の β -catenin
発現は認められない。

Bar: 100 μ m

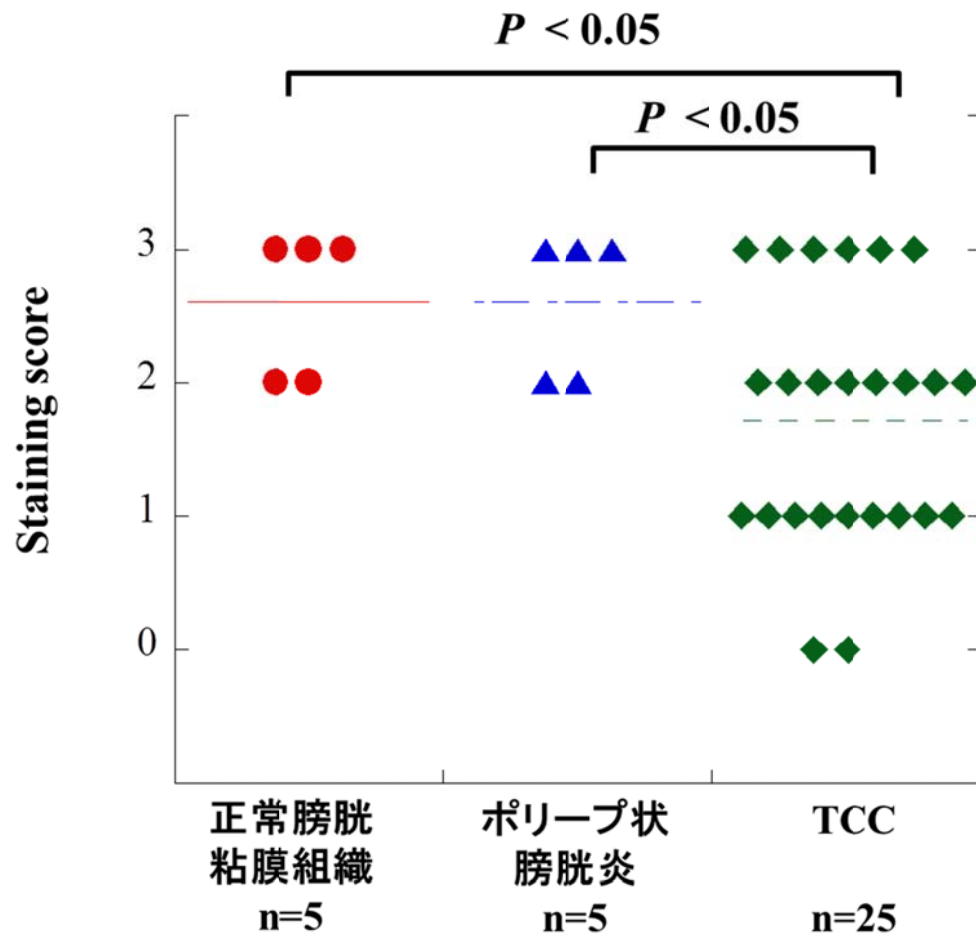


図 3-12 正常膀胱粘膜組織、ポリープ状膀胱炎および TCC における β -catenin 蛋白発現強度の比較

β -catenin 蛋白発現率は正常膀胱粘膜組織とポリープ状膀胱炎と比較して TCC で有意 ($P < 0.05$) に低値であった (統計学的分析: Mann-Whitney U 検定)。

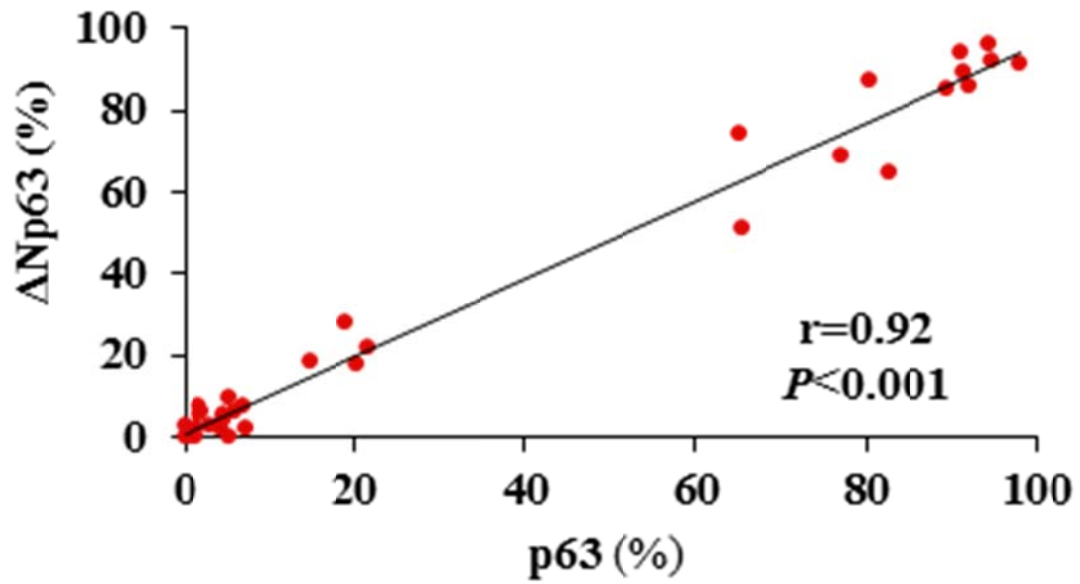


図 3-13 p63 と ΔNp63 の相関性

p63 と ΔNp63 の間に有意な強い正の相関 ($r=0.92$ 、 $P<0.001$) を認めた (統計学的分析: Spearman の順位相関係数)。

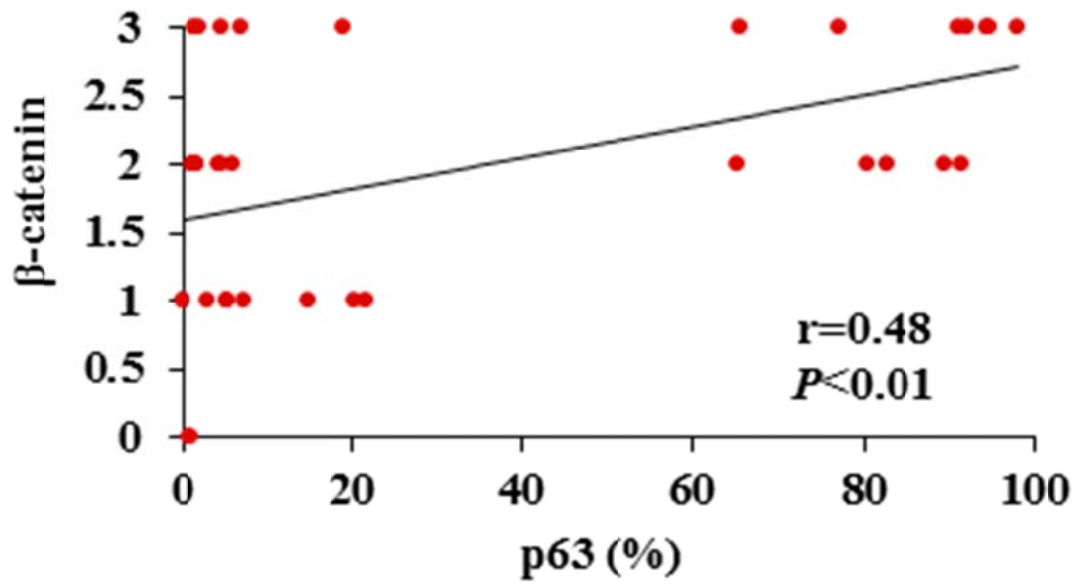


図 3-14 p63 と β-catenin の相関性

p63 と β-catenin の間に有意な正の相関 ($r=0.48$ 、 $P<0.01$) を認めた (統計学的分析: Spearman の順位相関係数)。

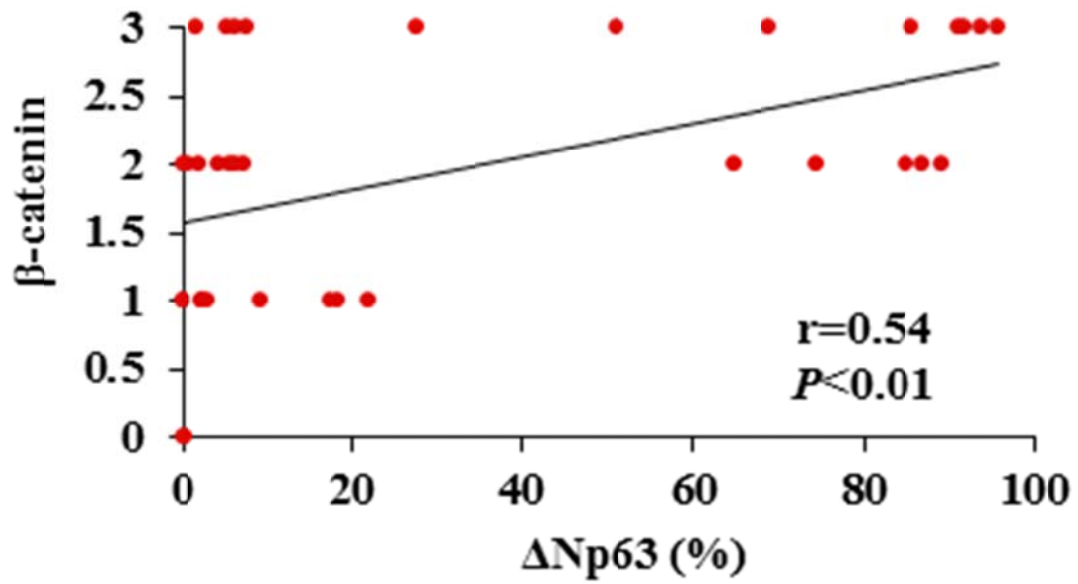


図 3-15 ΔNp63 と β-catenin の相関性

ΔNp63 と β-catenin の間に有意な正の相関 ($r=0.54$ 、 $P<0.01$) を認めた (統計学的分析: Spearman の順位相関係数)。

表 3-2 TCC における p63 蛋白発現率と臨床・病理組織学的所見との比較

比較項目		N	p63 Mean±SD (%)
成長様式	乳頭状	20	12.3±22.1
	非乳頭状	5	7.40±8.20
組織グレード	1-2	11	16.60±29.20
	3	14	7.20±6.80
核分裂数	<10 /50hpf	14	16.80±25.40
	≥10 /50hpf	11	4.30±5.70
壊死	無	14	17.30±25.10
	有	11	3.70±5.80*
筋層浸潤	無	9	14.18±14.90
	有	16	7.90±17.00
脈管浸潤	無	8	25.30±31.10
	有	17	4.70±6.00**
腫瘍径	<20mm	10	20.43±29.27
	≥20mm	15	5.25±6.34
発生部位	三角部	12	11.60±23.30
	その他	13	11.10±17.60
T ステージ	T1-T2	10	13.00±19.80
	T3	15	10.20±20.90
N ステージ	N0	22	12.60±21.10
	N1	3	2.10±2.30
転移	無	15	17.30±25.10
	有	10	3.70±5.80*

統計学的分析：Mann-Whitney の U 検定

* $P<0.05$

** $P<0.01$

表 3-3 TCC における Δ Np63 蛋白発現率と臨床・病理組織学的所見との比較

比較項目		N	Δ Np63 Mean \pm SD (%)
成長様式	乳頭状	20	11.50 \pm 17.60
	非乳頭状	5	7.20 \pm 8.60
組織グレード	1-2	11	15.30 \pm 22.70
	3	14	7.06 \pm 7.13
核分裂数	<10 /50hpf	14	15.50 \pm 20.00
	\geq 10 /50hpf	11	4.50 \pm 5.43
壊死	無	14	15.70 \pm 19.90
	有	11	4.30 \pm 5.14
筋層浸潤	無	9	13.40 \pm 14.90
	有	16	7.90 \pm 17.00
脈管浸潤	無	8	22.90 \pm 22.70
	有	17	4.90 \pm 7.30**
腫瘍径	<20mm	10	17.93 \pm 22.42
	\geq 20mm	15	5.82 \pm 7.69
発生部位	三角部	12	10.10 \pm 18.40
	その他	13	11.20 \pm 14.40
T ステージ	T1-T2	20	11.60 \pm 17.70
	T3	5	7.02 \pm 6.63
N ステージ	N0	22	11.70 \pm 16.90
	N1	3	2.90 \pm 1.35
転移	無	15	16.10 \pm 19.10
	有	10	2.53 \pm 2.02*

統計学的分析：Mann-Whitney の U 検定

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

表 3-4 TCC における β -catenin 蛋白発現率と臨床・病理組織学的所見との比較

比較項目		N	β -catenin Mean \pm SD
成長様式	乳頭状	20	1.65 \pm 0.93
	非乳頭状	5	2.00 \pm 1.00
組織グレード	1-2	11	1.73 \pm 1.19
	3	14	1.71 \pm 0.73
核分裂数	<10 /50hpf	14	1.93 \pm 1.00
	\geq 10 /50hpf	11	1.45 \pm 0.82
壊死	無	14	2.07 \pm 0.92
	有	11	1.27 \pm 0.79
筋層浸潤	無	9	2.33 \pm 0.87
	有	16	1.38 \pm 0.81*
脈管浸潤	無	8	2.00 \pm 0.93
	有	17	1.59 \pm 0.94
腫瘍径	<20mm	10	2.10 \pm 0.88
	\geq 20mm	15	1.50 \pm 0.94
発生部位	三角部	12	1.41 \pm 0.67*
	その他	13	2.00 \pm 1.08
T ステージ	T1-T2	20	1.70 \pm 0.98
	T3	5	1.80 \pm 0.84
N ステージ	N0	22	1.68 \pm 0.95
	N1	3	2.00 \pm 1.00
転移	無	15	1.87 \pm 0.83
	有	10	1.50 \pm 1.08

統計学的分析：Mann-Whitney の U 検定

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

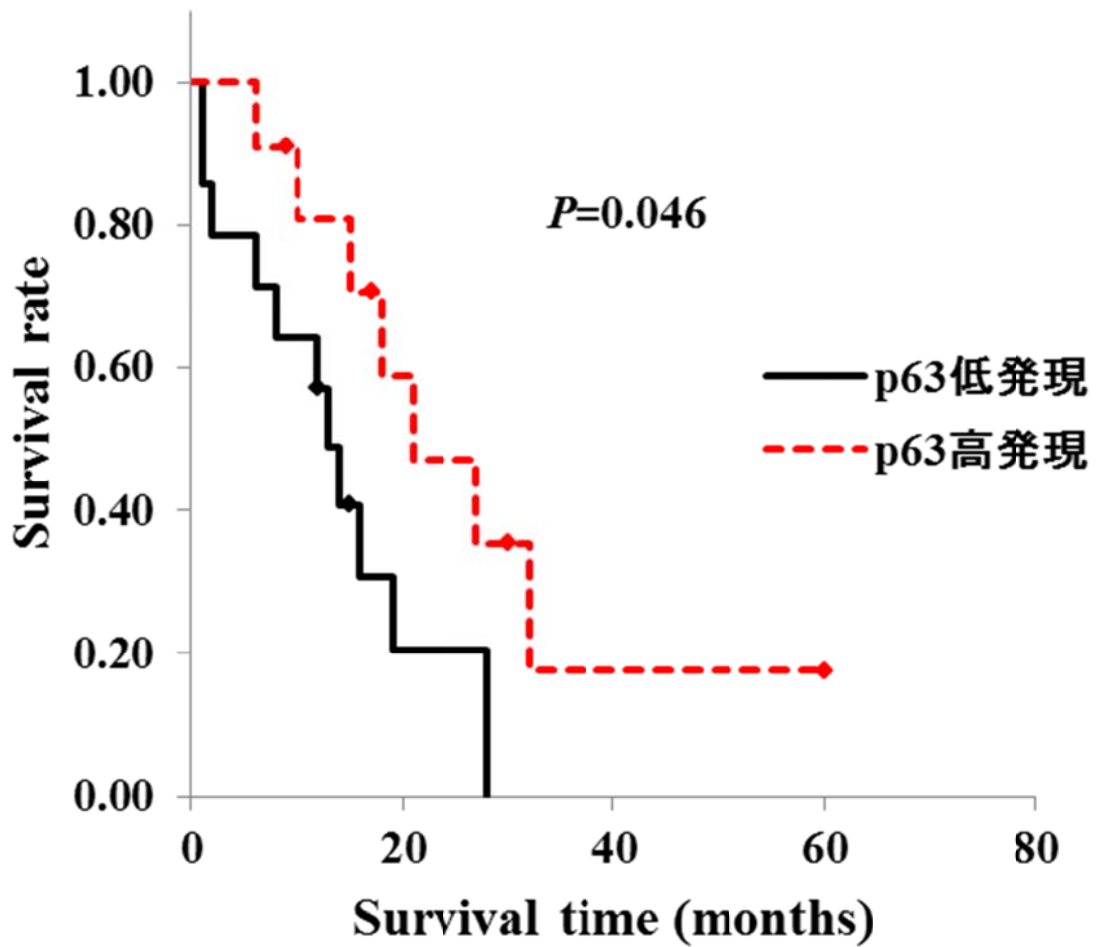


図 3-16 p63 蛋白発現と生存期間の比較

p63 低発現群 (n=11) は p63 高発現群 (n=14) に有意 ($P=0.035$) に生存期間が短かった (統計学的分析: log rank 検定)。

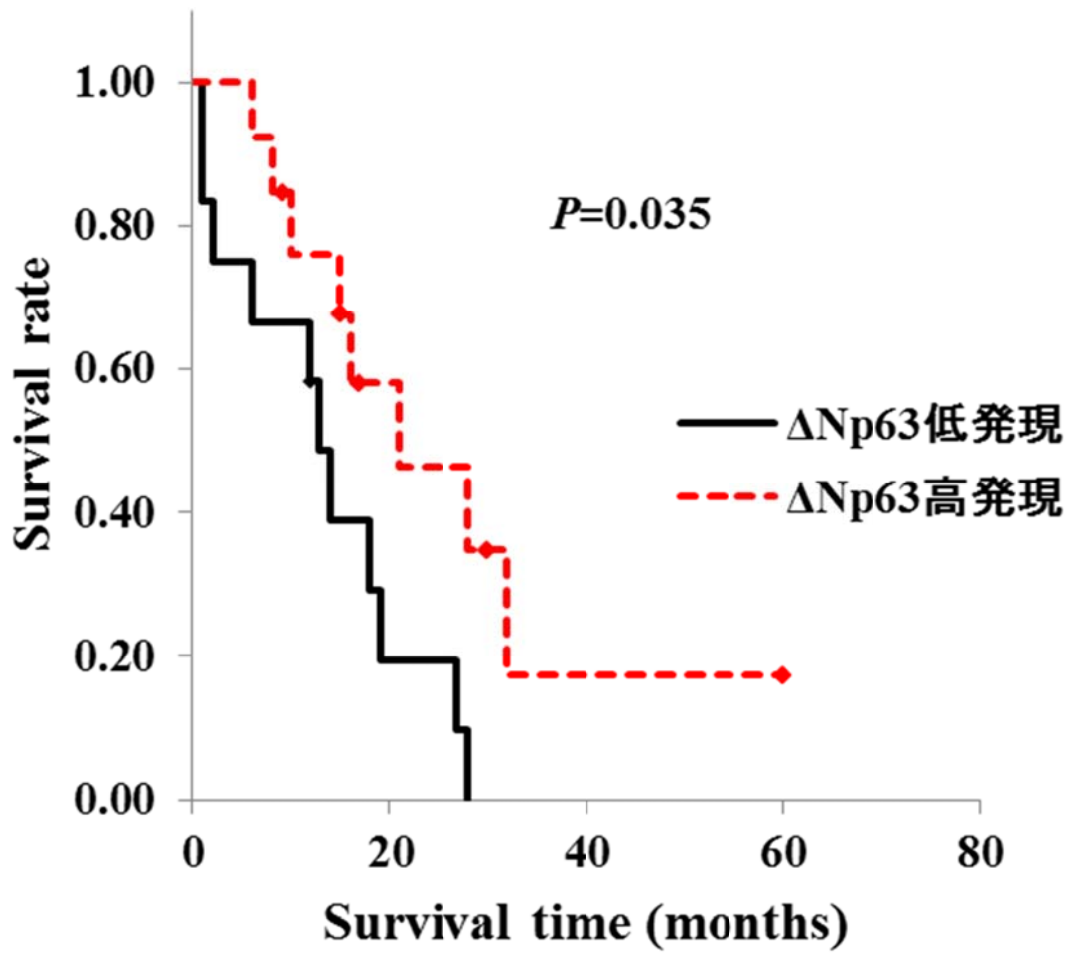


図 3-17 ΔNp63 蛋白発現と生存期間の比較

ΔNp63 低発現群 (n=12) は ΔNp63 高発現群 (n=13) に有意 ($P=0.035$) に生存期間が短かった (統計学的分析: log rank 検定)。

4. 考 察

p63 mRNA は、ヒトやマウスの皮膚、前立腺、乳腺そして膀胱の上皮細胞や基底細胞で発現が確認されている[12,26,67,74]。p63 蛋白の機能は p63 遺伝子のノックアウトマウスによって詳細に検討され、ノックアウトマウスの皮膚、乳腺、前立腺などの上皮細胞で正常な細胞分化がみられないことから、p63 蛋白はこれらの上皮細胞の分化に重要な役割を果たしていると考えられている[74]。p63 蛋白のこのような役割からヒト医療では p63 蛋白の腫瘍における役割が注目され、ヒト浸潤性膀胱癌における研究で正常膀胱上皮にくらべ浸潤性膀胱癌で p63 発現が有意に低下していることが報告された[74]。また、p63 発現低下が TNM ステージの進行した患者の膀胱腫瘍組織で認められることから、p63 発現低下は患者の予後マーカーとしても注目されている[31]。犬における本研究では、1) TCC における p63 蛋白発現が正常膀胱組織や良性病変(ポリープ状膀胱炎)での発現と比較し、有意に低下していること、2) TCC における p63 蛋白発現の低下が腫瘍の脈管浸潤や転移、罹患犬の生存期間の短縮に関連することを示した。これらの結果は、ヒトの膀胱癌における研究結果と一致しており、p63 が犬 TCC においても診断や予後のマーカーとなりえることを示している。

ヒト膀胱癌における $\Delta Np63$ の研究でこれまでに一貫した結果は得られていない。Karni-Schmidt らは非浸潤性膀胱癌に比べ浸潤性膀胱癌で $\Delta Np63$ の発現は高いと報告している[28]。一方 Koga らは、 $\Delta Np63$ は p63 と同様の発現傾向を示し、正常膀胱組織や低グレードの膀胱癌ではその発現が維持され、浸潤性膀胱癌で発現が失

われていると報告している[32]。また Bertagnolli らは犬乳腺腫瘍において p63 と Δ Np63 の発現の間に高い正の相関性 ($r=0.8323$; $P<0.0001$) を見出している[4]。本研究では Koga ら、Bertagnolli らの報告と一致して、1) TCC における Δ Np63 発現が正常膀胱組織や良性病変(ポリープ状膀胱炎)での発現にくらべ有意に低値を示すこと、2) TCC における p63 と Δ Np63 発現の間に高い正の相関性が有ることを示した。また、本研究は TCC における Δ Np63 蛋白発現の低下が腫瘍の脈管浸潤や転移、罹患犬の生存期間の短縮に関連することをも示した。

TA p63 は N 末端に p53 と同様のトランス活性ドメインを有し、p53 と同様のがん抑制作用を発揮すると考えられている。一方、 Δ Np63 は N 末端側にこのトランス活性ドメインを欠くことで p53 が持つがん抑制作用を欠損している。また Δ Np63 は p53 や TA p63 と同一の DNA 結合ドメインを有するため、結合するプロモーター領域を互いに争うことによって p53 や TA p63 が有するがん抑制作用に拮抗する[81]。これらの分子的背景や実際に扁平上皮癌で過剰発現している事実を踏まえ、 Δ Np63 の過剰発現と発癌性の関連性が注目されてきた[25,52]。今回の結果は、これらの概念と一致せず矛盾する結果となったが、ヒト膀胱癌において Δ Np63 のうちの Δ Np63 α の欠損が悪性挙動を示すことが複数報告されている[31,32,47]。 Δ Np63 α の発現低下は腫瘍の浸潤・転移に関与する蛋白である N-cadherin をアップレギュレートし、また細胞間マトリックス蛋白を分解する MMP-9 の産生を亢進させることが示されており[15]、これらのことから Δ Np63 の発現低下は腫瘍の浸潤、転移を促す可能性が示唆される。残念ながら、本研究では Δ Np63 α と N-cadherin を評価しておらず、犬 TCC におけるこの機

序の実際については不明である。

ヒトの高グレードの浸潤性尿路上皮癌では、 $\Delta Np63$ の発現低下と β -catenin の発現低下との間に関連性が示されており[31,32]、 β -catenin の減少は細胞間の AJs の形成低下を引き起こし、尿路上皮癌の浸潤や転移を助長すると考えられている[15]。本研究においても β -catenin は筋層浸潤している TCC は筋層浸潤していない TCC に比較して発現が有意に低下していた。また、 β -catenin の発現低下は p63 蛋白および $\Delta Np63$ 蛋白の発現低下と有意に相関していた。これらの結果を考慮すると、ヒトの報告と同様に p63 および $\Delta Np63$ の発現低下が β -catenin 発現低下を招き、結果として腫瘍の浸潤性の助長している可能性が当初想定された。しかしながら β -catenin の発現低下と脈管浸潤、転移と関連性を統計的に解析した結果、有意な関連性を見いだせなかった。腫瘍の脈管浸潤や転移と言った性質には多くの因子が関わっており、N-cadherin や MMP-9 の観点からも検討が必要と考える。

5. 小 括

ヒトの浸潤性膀胱癌において p63 蛋白の発現低下が証明され、この低下は腫瘍の予後悪化と関連していることが報告されている。また、p63 の 1 つのアイソフォームである Δ Np63 についても、ヒトの高グレードの浸潤性尿路上皮癌でその発現低下が示され、この低下は β -catenin の発現低下と関連していることが報告されている。本研究では犬の TCC で検討がなされていない p63 と Δ Np63 に焦点を当て、犬の正常膀胱、ポリープ状膀胱炎、TCC における発現比較、発現と病理組織学的所見および臨床所見との比較、そして予後因子としての有用性について検討した。また Δ Np63 発現と腫瘍の転移・浸潤性との関連性を検討するために β -catenin の発現解析も併せて行った。

p63 と Δ Np63 発現は正常膀胱、ポリープ状膀胱炎に比較して TCC で有意 ($P<0.001$) に低値を示した。また、p63 と Δ Np63 発現の間には強い正の相関 ($r=0.92$ 、 $P<0.001$) が認められ、p63 および Δ Np63 の発現低下は TCC における脈管浸潤 ($P<0.01$)、転移および生存期間 ($P<0.05$) の短縮と有意に関連していた。さらに p63 および Δ Np63 の発現低下は β -catenin の発現低下と有意 ($P<0.01$) に関連していた。これらの結果から、TCC における p63 と Δ Np63 発現は悪性評価および予後の指標となる可能性が示された。

総括

犬の膀胱 TCC は犬の全悪性腫瘍の 2%、膀胱に発生する悪性腫瘍の 90%以上を占める上皮系悪性腫瘍であり、浸潤性が強く、転移率も高い。治療には外科的な切除が第一選択となるが、その浸潤性と転移率の高さのため、再発や転移がその後認められることが多い。進行症例では形成された腫瘍塊によって尿路系が閉塞され、それに伴う二次的合併症はさらなる生存期間の短縮、QOL の低下をもたらす。したがって、TCC の治療成績の改善には早期診断、的確な予後判断の上に立った早期治療が最も重要であり、このために有用となる診断および予後マーカーの検討は臨床上極めて重要な意義を持つ。そこで本論文では、ヒト膀胱癌において報告されている診断や予後に関連する超音波検査所見と分子マーカーに着目し、犬 TCC における有用性について検討した。

第 I 章では、犬膀胱 TCC の超音波検査所見と病理組織所見および生存期間との比較を行い、犬 TCC における超音波検査所見の診断および予後指標としての有用性について検討した。超音波検査による腫瘍の膀胱壁浸潤所見は病理組織学的な筋層浸潤に有意 ($P=0.00005$) に関連し (感度 93%、特異度 92%)、超音波検査によって筋層浸潤が確認された症例は病理組織学的にすべて TCC と診断された。また、超音波検査による膀胱壁浸潤所見、腫瘍内部の不均一なエコーパターン所見、膀胱三角部での発生所見は生存期間の短縮に有意

($P=0.01$)に関連していた。これらの結果より、超音波検査によって筋層浸潤を評価することで TCC の予測診断が可能であり、また膀胱壁浸潤度、腫瘍内部のエコーパターン、腫瘍の発生部位を評価することによって、TCC の予後を評価することが可能であると考えられた。

第Ⅱ章では膀胱組織における EGFR の発現を解析し、病理組織所見あるいは生存期間と比較することで、犬 TCC における EGFR 発現の診断および予後指標としての有用性について検討した。TCC において EGFR mRNA 発現量は正常膀胱組織と比較して有意 ($P<0.05$) に高値を示し、また EGFR 蛋白の発現スコアも正常膀胱組織と比較して TCC で有意 ($P<0.01$) に高いスコアを認めた。しかしながら、EGFR 発現スコアは T ステージ、病理組織グレード、筋層浸潤の有無、脈管浸潤の有無、転移の有無、生存期間と関連しなかった。これらの結果は EGFR の過剰発現を細胞学的・病理学的マーカーとして TCC の診断に応用可能であることを示すものであるが、EGFR 発現と臨床的・病理学的所見や生存期間との間に関連性を見出すことはできず、EGFR 発現だけを基に予後判断を行うことはできないものと考えられた。EGFR は腫瘍細胞の増殖には大きく関与するかもしれないが、浸潤については他のファクターが必要なのかもしれない。

第Ⅲ章では膀胱組織における p63 および Δ NP63 の発現を解析し、病理組織所見あるいは生存期間と比較することで、犬 TCC における p63 および Δ NP63 発現の診断および予後指標としての有用性について検討した。また Δ Np63 発

現と腫瘍の転移性、浸潤性との関連性を検討するために β -catenin の発現解析を合わせて行った。TCCにおいて p63 および Δ Np63 蛋白の発現率は正常膀胱、ポリープ状膀胱炎に比較して有意 ($P<0.001$) に低値を示し、p63 および Δ Np63 の発現低下は TCC における脈管浸潤、転移、生存期間の短縮と有意 (脈管浸潤: $P<0.01$ 、転移・生存期間: $P<0.05$) に関連していた。また、p63 および Δ Np63 の発現低下は β -catenin 発現低下とも有意 ($P<0.01$) に関連していた。これらの結果は p63、 Δ Np63 の発現低下を細胞学的・病理学的マーカーとして TCC の診断に応用可能であることを示し、また TCC の予後指標として利用できる可能性も示すものと考えられた。

犬 TCC における超音波検査所見、EGFR および p63 の発現パターンは正常ならびに良性のポリープ状膀胱炎と比較し特徴的な所見を示し、これらを総合的に評価することで TCC の早期診断、予後の適切な評価につなげることができるものと考えた。

謝辞

本研究において、ご指導を賜りました本学大学院 獣医学研究科ならびに伴侶動物医療教育群伴侶動物内科学Ⅱユニット 打出 毅教授に心より感謝いたします。また検体および患者情報をご提供いただきました伴侶動物外科学Ⅱユニット 廉澤 剛教授、遠藤 能史助教授、組織標本のご提供、免疫組織化学染色のご指導を賜りました獣医病理学ユニット 谷山 弘行 教授、松田 一哉准教授、平山 和子先生、河村 芳朗先生、溝奥 尋子先生、遺伝子検査のご指導を承りました、獣医生化学ユニット 横田 博教授、岩野 英知准教授、本論文をまとめるにあたり多大なる助言をいただきました、画像診断学ユニット 中出 哲也教授、獣医ウイルス学ユニット 萩原 克郎教授に厚く御礼申し上げます。また本研究を手伝っていただきました伴侶動物内科学Ⅱユニット、大学院生 福本 真也獣医師、西森 大洋君、熊澤 りえさんに深く感謝致します。

最後に、契約期間中にも関わらず大学院進学を快く許していただいたアニマルランド北島動物病院、北島 哲也院長、在学中に多くのアドバイスをいただいた公益財団法人動物臨床医学研究所、山根 義久先生、高島 一昭先生、山根 剛先生、そして、これまで精神的、経済的に支えてくれた両親に感謝の意を表したいと思えます。

引用文献

1. Abu-Yousef, M. M., Narayana, A. S., Brown, R. C. and Franken, E. A. Jr. 1984. Urinary bladder tumors studied by cystosonography. Part II. Staging. *Radiology* **153**: 227-231.
2. Babiker, A., Shearer, R. J. and Chilvers, C. E. 1989. Prognostic factors in a T3 bladder cancer trial. Co-operative Urological Cancer Group. *Br. J. Cancer* **59**: 441-444.
3. Babjuk, M., Oosterlinck, W., Sylvester, R., Kaasinen, E., Böhle, A. and Palou-Redorta, J. 2008. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur. Urol* **54**: 303-314.
4. Bertagnolli, A.C., Cassali, G.D., Genelhu, M.C., Costa, F.A., Oliveira, J.F. and Gonçalves, P.B. 2009. Immunohistochemical expression of p63 and Δ Np63 in mixed tumors of canine mammary glands and Its relation with p53 expression. *Vet. Pathol* **46**: 407-415.
5. Black, P. C. and Dinney, C. P. 2008. Growth factors and receptors as prognostic markers in urothelial carcinoma. *Curr. Urol. Rep* **9**: 55-61.
6. Chaux, A., Cohen, J.S., Schultz, L., Albadine, R., Jadallah, S., Murphy, K.M., Sharma, R., Schoenberg, MP. and Netto G.J. 2012. High epidermal growth factor receptor immunohistochemical expression in urothelial carcinoma of the bladder is not associated with EGFR mutations in exons 19 and 21: a study using formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *Human. Pathology* **43**: 1590-1595
7. Chen, J. J., Changchien, C. S., Chiou, S. S., Tai, D. I., Lee, C. M. and Kuo, C. H. 1992. Various sonographic patterns of smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract: a comparison with computed tomography. *J. Ultrasound. Med.* **11**: 527-531.
8. Chow, N. H., Chan, S. H., Tzai, T. S., Ho, C. L. and Liu, H. S. 2001. Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in

- primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin. Cancer Res.* **7**: 1957-1962.
9. Chow, N. H., Liu, H.S., Lee, E.I., Chang, C.J., Chan, S.H., Cheng, H.L., Tzai, T.S. and Lin, J.S. 1997. Significance of urinary epidermal growth factor and its receptor expression in human bladder cancer. *Anticancer Res.* **17**: 1293-1296.
 10. Denkhaus, H., Crone-Münzebrock, W. and Huland, H. 1985. Noninvasive ultrasound in detecting and staging bladder carcinoma. *Urol. Radiol.* **7**: 121-131.
 11. Dershaw, D. D. and Scher, H. I. 1987. Sonography in evaluation of carcinoma of bladder. *Urology.* **29**: 454-457.
 12. Di Como, C.J., Urist, M.J., Babayan, I., Drobnjak, M., Hedvat, C.V., Teruya-Feldstein, J., Pohar, K., Hoos, A., and Cordon-Cardo, C., 2002. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res.* **8**: 494-501.
 13. el-Marjou, A., Delouvé, A. Thiery JP. and Radvanyi, F. 2000. Involvement of epidermal growth factor receptor in chemically induced mouse bladder tumour progression. *Carcinogenesis.* **21**: 2211-2218.
 14. Esrig, D., Spruck, C.H. 3rd., Nichols, P.W., Chaiwun, B., Steven, K., Groshen, S., Chen, S.C., Skinner, D.G., Jones, P.A., and Cote, R. J. 1993. p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am. J. Pathol.* **143**: 1389-1397.
 15. Fukushima, H., Koga, F., Kawakami, S., Fujii, Y., Yoshida, S., Ratovitski, E., Trink, B. and Kihara, K. 2009. Loss of Δ Np63 α promotes invasion of urothelial carcinomas via N-Cadherin/Src homology and collagen/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Cancer Res* **69**: 9263-9270.

16. Gama, A., Gärtner, F., Alves, A. and Schmitt, F. 2009. Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Res. Vet. Sci* **87**: 432-437.
17. Gamblin, R. M., Sagartz, J. E. and Couto, C. G. 1997. Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. *Am. J. Vet. Res* **58**: 857-863.
18. Geisse, A. L., Lowry, J. E., Schaeffer, D. J. and Smith, C. W. 1997. Sonographic evaluation of urinary bladder wall thickness in normal dogs. *Vet. Radiol. Ultrasound* **38**: 132-137.
19. Giyanani, V. L. and Eisenberg, R. L. 1983. Sonographic findings in gastric leiomyosarcoma. *South. Med. J* **76**: 386-388.
20. Grossman, H. B., Natale, R. B., Tangen, C. M., Speights, V. O., Vogelzang, N. J., Trump, D. L., deVere White, R. W., Sarosdy, M. F., Wood, D. P. Jr., Raghavan, D. and Crawford, E. D. 2003. Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N. Engl. J. Med* **349**: 859-866.
21. Gschwend, J. E., Dahm, P. and Fair, W. R. 2002. Disease specific survival as endpoint of outcome for bladder cancer patients following radical cystectomy. *Eur. Urol* **41**: 440-448.
22. Hellsten, S., Ljungerud, S. and Glibberg, I. 1983. Bladder carcinoma. Long-term survival and late recurrence. *Scand. J. Urol. Nephrol* **17**: 57-61.
23. Henry, C. J. 2003. Management of transitional cell carcinoma. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract* **33**: 597-613.
24. Henry, C. J., McCaw, D. L., Turnquist, S. E., Tyler, J. W., Bravo, L., Sheafor, S., Straw, R. C., Dernell, W. S., Madewell, B. R., Jorgensen, L., Scott, MA., Higginbotham, M. L. and Chun, R. 2003. Clinical evaluation of mitoxantrone and piroxicam in a canine model of

- human invasive urinary bladder carcinoma. *Clin. Cancer. Res* **9**: 906-911.
25. Hibi, K., Trink, B., Patturajan, M., Westra, W.H., Caballero, O.L., Hill, D.E., Ratovitski, E.A., Jen, J. and Sidransky, D. 2000. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 5462–5467
26. Ho, P. L., Kurtova, A. and Chan, K.S., 2012. Normal and neoplastic urothelial stem cells: getting to the root of the problem. *Nat. Rev. Urol* **9**: 583-594.
27. Horiuchi, K., Shimizu, H., Yoshida, K. and Nishimura, T. 2005. Identification of the layers of the bladder wall on high-frequency endoluminal ultrasonography by a needle puncture experiment. *Ultrasound. Med. Biol* **31**: 307-309.
28. Karni-Schmidt, O., Castillo-Martin, M., Shen, TH., Gladoun, N., Domingo-Domenech, J., Sanchez-Carbayo, M., Li, Y., Lowe, S., Prives C. and Cordon-Cardo C. 2011. Distinct expression profiles of p63 variants during urothelial development and bladder cancer progression. *Am. J. Pathol* **178**: 1350-1360.
29. Khan, K. N., Knapp, D. W., Denicola, D. B. and Harris, R. K. 2000. Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *Am. J. Vet. Res* **61**: 478-481.
30. Knapp, D. W., Glickman, N. W., Denicola, D. B., Bonney, P. L., Lin, T. L. and Glickman, L. T. 2000. Naturally occurring canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder. A relevant model of human invasive bladder cancer. *Urol. Oncol* **5**: 47-49.
31. Koga, F., Kawakami, S., Fujii, Y., Saito, K., Ohtsuka, Y., Iwai, A., Ando, N., Takizawa, T., Kageyama, Y. and Kihara K. 2003. Impaired p63 expression associates with poor prognosis and uroplakin III expression in invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Clin Cancer. Res* **15**: 5501-5507.

32. Koga, F., Kawakami, S., Kumagai, J., Ando, N., Takizawa, T., Kageyama, Y. and Kihara, K. 2003. Impaired Δ Np63 Expression Associates with reduced β -catenin and aggressive phenotypes of Urothelial neoplasms. *Br. J. Cancer* **88**: 740-747.
33. Kramer, M. W., Waalkes, S., Hennenlotter, J., Serth, J., Stenzl, A. and Kuczyk, M. A. 2010. Merseburger AS. Maspin protein expression correlates with tumor progression in non-muscle invasive bladder cancer. *Oncol. Lett* **1**: 621-626.
34. Lau, S. Tam, K. F., Kam, C. K., Lui, C. Y., Siu, C. W., Lam, H. S. and Mak, K. L. 2004. Imaging of gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Clin. Radiol* **59**: 487-498.
35. Leveille, R., Biller, D. S., Partington, B. P. and Miyabayashi T. 1992. Sonographic investigation of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in small animals. *Vet. Radiol. Ultrasound* **33**: 103-107.
36. Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J., Kussie, P. and Ferguson, K. M. 2005. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer. Cell* **7**: 301-311.
37. Lipponen, P. and Eskelinen, M. 1994. Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. *Br. J. Cancer* **69**: 1120-1125.
38. Lisi, D., Kondili, L. A., Ramieri, M. T., Giuseppetti, R., Bruni, R., Della Rocca, C., De Santis, A. and Rapicetta, M. 2003. Ultrasonography in the study of hepatocellular carcinoma in woodchucks chronically infected with WHV. *Lab. Anim* **37**: 233-240.
39. Marmor, M. D., Skaria, K. B. and Yarden, Y. 2004. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys* **58**: 903-913.

40. 松本和将. 2012. 膀胱がんに対する免疫組織学的探索を用いた予後予見について. *泌尿器外科* **25**:11-16
41. McLaughlin, I. S., Morley, P., Deane, R. F., Barnett, E., Graham, A. G. and Kyle, K. F. 1975. Ultrasound in the staging of bladder tumours. *Br. J. Urol* **47**: 51-56.
42. Memon, A. A., Sorensen, B. S., Meldgaard, P., Fokdal, L., Thykjaer, T. and Nexø, E. 2006. The relation between survival and expression of HER1 and HER2 depends on the expression of HER3 and HER4: a study in bladder cancer patients. *Br. J. Cancer* **94**: 1703-1709.
43. Mellon, K., Wright, C., Kelly, P., Horne, CH. and Neal, D.E. 1995. Long-term outcome related to epidermal growth factor receptor status in bladder cancer. *J. Urol* **153**: 919-925.
44. Mihara, S., Kuroda, K., Yoshioka, R. and Koyama, W. 1999. Early detection of renal cell carcinoma by ultrasonographic screening--based on the results of 13 years screening in Japan. *Ultrasound. Med. Biol* **25**: 1033-1039.
45. Mitsudomi, T., Kosaka, T., Endoh, H., Horio, Y., Hida, T., Mori, S., Hatooka, S., Shinoda, M., Takahashi, T. And Yatabe, Y. 2005. "Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence". *J. Clin. Oncol* **23**: 2513-2520
46. Mulders, P. F., Meyden, A. P., Doesburg, W. H., Oosterhof, G. O. and Debruyne, F. M. 1994. Prognostic factors in pTa-pT1 superficial bladder tumours treated with intravesical instillations. The Dutch South-Eastern Urological Collaborative Group. *Br. J. Urol* **73**: 403-408.
47. Mutsaers, A.J., Widmer, W.R. and Knapp, D.W. 2003. Canine transitional cell carcinoma. *J. Vet. Intern. Med* **17**:136-144.

48. Myers, N. C. and Penninck, D. G. 1994. Ultrasonographic diagnosis of gastrointestinal smooth muscle tumors in the dog. *Vet. Radiol. Ultrasound* **35**: 391-397.
49. Neal, D.E., Marsh, C., Bennett, M.K., Abel, P.D., Hall, R.R., Sainsbury, J.R. and Harris, A.L. 1985. Epidermal-growth factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours. *Lancet* **1**: 366–368.
50. Nutt, J.E., Mellon, J.K., Qureshi, K. and Lunec, J. 1998. Matrix metalloproteinase-1 is induced by epidermal growth factor in human bladder tumour cell lines and is detectable in the urine of patients with bladder tumours. *Br. J. Cancer* **78**: 215–220.
51. Ono, M. and Kuwano, M. 2006. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clin. Cancer. Res* **12**: 7242–7251.
52. Parsa, R., Yang, A., McKeon, F. and Green, H. 1999. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol* **113**: 1099–1105.
53. Pedersen, M. W., Meltorn, M., Damstrup, L. and Poulsen, H. S. 2001. The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann. Oncol* **12**: 745-760.
54. Pich, A, Chiusa L, Formiconi A, Galliano D, Bortolin P, Comino A. and Navone, R. 2002. Proliferative activity is the most significant predictor of recurrence in noninvasive papillary urothelial neoplasms of low malignant potential and grade 1 papillary carcinomas of the bladder. *Cancer* **95**: 784-790.
55. Portillo Martín, J. A., Val Bernal, F., Garijo Ayenza, F., Buelta Carrillo, L., Martín García, B., Hernández Rodríguez, R., Gutiérrez Baños, J. L., Correas Gómez, M. A., Concepción Masip, T. and Fernández Gómez, J. M. 1991. Prognostic factors in 243 transitional

- carcinomas of the bladder (II): microscopic parameters of the tumor and staging. *Arch. Esp. Urol* **44**:161-168.
56. Rankin, W. V, Henry, C. J., Turnquist, S. E., Turk, J. R., Beissenherz, M. E., Tyler, J. W., Rucker, E. B., Knapp, D. W., Rodriguez, C. O. and Green, J. A. 2008. Identification of survivin, an inhibitor of apoptosis, in canine urinary bladder transitional cell carcinoma. *Vet. Comp. Oncol* **6**: 141-150.
57. Resnick, M. I. and Kursh, E. D. 1988. Transurethral ultrasonography of the urinary bladder. *World. J. Urol* **6**: 22-26.
58. Resnick, M.B., Routhier, J., Konkin, T., Sabo, E., Pricolo, V.E., 2004. Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study. *Clin. Cancer. Res* **10**: 3069-3075.
59. Ristimäki, A., Nieminen, O., Saukkonen, K., Hotakainen, K., Nordling, S. and Haglund, C. 2001. Expression of cyclooxygenase-2 in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am. J. Pathol* **158**: 849-853.
60. Scaltriti, M. and Baselga, J. 2006. The epidermal growth factor receptor pathway. a model for targeted therapy. *Clin. Cancer. Research* **12**: 5268-5272.
61. Scattoni, V., Da Pozzo, L. F., Colombo, R., Nava, L., Rigatti, P., De Cobelli, F., Vanzulli, A. and Del Maschio, A. 1996. Dynamic gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging in staging of superficial bladder cancer. *J. Urol* **155**: 1594-1599.
62. Selvarajah, G. T., Verheije, M. H., Kik, M., Slob, A., Rottier, P. J., Mol, J. A. and Kirpensteijn, J. 2012. Expression of epidermal growth factor receptor in canine osteosarcoma: association with clinicopathological parameters and prognosis. *Vet. J* **193**: 412-419.

63. Shah, P., Gao, F., Edmundowicz, S. A., Azar, R. R. and Early, D. S. 2009. Predicting malignant potential of gastrointestinal stromal tumors using endoscopic ultrasound. *Dig Dis Sci* **54**: 1265-1269.
64. Shariat, S. F., Karakiewicz, P. I., Godoy, G., Karam, J. A., Ashfaq, R., Fradet, Y., Isbarn, H., Montorsi, F., Jeldres, C., Bastian, P. J., Nielsen, M. E., Müller, S.C., Sagalowsky, A. I. and Lotan, Y. 2009. Survivin as a Prognostic Marker for Urothelial Carcinoma of the Bladder: A Multicenter External Validation Study. *Clin. Cancer. Res* **15**: 7012-7019.
65. Shimizu, M., Ussmüller, J., Hartwein, J., Donath, K. and Kinukawa, N. 1999. Statistical study for sonographic differential diagnosis of tumorous lesions in the parotid gland. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod* **88**: 226-233.
66. Shiomitsu, K., Johnson, C.L., Malarkey, D.E., Pruitt, A.F. and Thrall, D.E. 2009. Expression of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor in malignant canine epithelial nasal tumours. *Vet. Comp. Oncol* **7**: 106-114.
67. Signoretti, S., Waltregny, D., Dilks, J., Isaac, B., Lin, D., Garraway, L., Yang, A., Montironi, R., McKeon, F. and Loda, M. 2000. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am. J. Pathol* **157**: 1769-1775.
68. Singer, D., Itzchak, Y. and Fischelovitch, Y. 1981. Ultrasonographic assessment of bladder tumors. Part II. Clinical staging. *J. Urol* **126**: 34-36.
69. Sobin, D. H. and Wittekind, Ch. TNM Classification of Malignant Tumours. 6th ed. New York: Wiley-Liss, 2002: 199-202.
70. Stein, J. P., Cai, J., Groshen, S. and Skinner, D. G. 2003. Risk factors for patients with pelvic lymph node metastases following radical cystectomy with en bloc pelvic lymphadenectomy: concept of lymph node density. *J. Urol* **170**: 35-41.

71. Stein, J. P., Lieskovsky, G., Cote, R., Groshen, S., Feng, A. C., Boyd, S., Skinner, E., Bochner, B., Thangathurai, D., Mikhail, M., Raghavan, D. and Skinner, D. G. 2001. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol* **19**: 666-675.
72. Thøgersen, V.B., Jørgensen, P.E., Sørensen, B.S., Bross, P., Orntoft, T., Wolf, H. and Nexø, E. 1999. Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in human bladder cancer. *Scand. J. Clin. Lab. Invest* **59**: 267-277.
73. Ueno, T., Tanaka, Y. O., Nagata, M., Tsunoda, H., Anno, I., Ishikawa, S., Kawai, K. and Itai, Y. 2004. Spectrum of germ cell tumors: from head to toe. *Radiographics* **24**: 387-404.
74. Urist, M.J., Di Como, C.J., Lu, M.L., Charytonowicz, E., Verbel, D., Crum, C.P., Ince, T.A., McKeon, F.D. and Cordon-Cardon, C. 2002. Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Am. J. Pathol* **161**: 1199-1206.
75. Valli, V. E., Norris, A., Jacobs, R. M., Laing, E., Withrow, S., Macy, D., Tomlinson, J., McCaw, D., Ogilvie, G. K., Pidgeon, G. and Henderson R. A. 1995. Pathology of canine bladder and urethral cancer and correlation with tumour progression and survival. *J. Comp. Pathol* **113**: 113-130.
76. Weisse, C., Berent, A., Todd, K., Clifford, C. and Solomon, J. 2006. Evaluation of palliative stenting for management of malignant obstructions in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc* **229**: 226-234.
77. Whitmore, W. F. 1983. Management of invasive bladder neoplasms. *Semin. Urol* **1**: 34-41.
78. Wood, D.P. Jr., Fair, W.R. and Chaganti, R.S. 1992. Evaluation of epidermal growth factor receptor DNA amplification and mRNA expression in bladder cancer. *J. Urol* **147**: 274-277.

79. Wronski, M., Cebulski, W., Slodkowski, M. and Krasnodebski, I. W. 2009. Gastrointestinal stromal tumors: ultrasonographic spectrum of the disease. *J. Ultrasound. Med* **28**: 941-948.
80. Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. 2001. Untangling the ErbB signaling network. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* **2**: 127-137.
81. Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dotsch, V., Andrews, N.C., Caput, D. and McKeon, F. 1998. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominantnegative activities. *Mol. Cell* **2**: 305-316
82. Yiou, R., Patard, J. J., Benhard, H., Abbou, C. C. and Chopin, D. K. 2002. Outcome of radical cystectomy for bladder cancer according to the disease type at presentation. *BJU. Int* **89**: 374-378.