

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 華園 究

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 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

審査委員

主査教授 打出 毅（分子診断治療学）

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）

副査教授 萩原 克郎（獣医ウイルス学）

副査教授 谷山 弘行（獣医病理学）

学位論文要旨

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 獣医学研究科 獣医学専攻博士課程 伴侶動物医療学教室
華園 究

犬の膀胱 TCC は犬の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 章では膀胱粘膜組織における 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 発現量は正常膀胱粘膜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粘膜組織と比較して 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。

第Ⅲ章では膀胱粘膜組織における 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粘膜組織、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膀胱粘膜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。

論文審査の要旨および結果

本論文の審査は、研究の目的が明確であること、材料および方法が適切であること、結果が明確で合理的に整理されていること、さらに科学および臨床獣医学の発展に寄与するものであることに視点を置いて行われた。

論文の概要について

研究の背景と目的

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%以上を占める悪性腫瘍である。その浸潤性は強く、転移率が高いことが特徴である。生存期間に影響する要因として、腫瘍の増殖性、浸潤性、転移性などが挙げられるが、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することが重要となる。

犬膀胱 TCC の早期診断法として、超音波検査は非侵襲的であることに加え、膀胱内の腫瘍性病変を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、これまでに超音波所見と TCC の予後との関連性について明確な情報は得られていない。また近年、人の膀胱癌では腫瘍の生物学的・臨床的挙動を把握する指標として Epidermal growth factor receptor (EGFR)、p63 などの特定の分子が注目を集めている。犬の TCC においてもこれまでいくつかの分子について検討はなされたが、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見出されていない。

本研究では、犬膀胱 TCC における I. 超音波検査所見、II. EGFR の発現、III. p63 と $\Delta Np63$ の発現を解析し、犬膀胱 TCC の早期診断および予後診断に有用な超音波所見およびマーカー分子について考察した。

研究の成果

I. 犬膀胱 TCC における超音波検査所見

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 TCC の予後を評価する上で重要な要素となると考えられた。

II. 犬膀胱 TCC の予後マーカーの検索 (1) - Epidermal growth factor receptor について

本章では人の膀胱癌で過剰発現し膀胱癌発生要因の 1 つとして考えられている Epidermal growth factor receptor (EGFR) に着目し、犬の膀胱 TCC での EGFR 発現解析を行うことで、その発現と臨床的・病理的性状との間の関連性について検討した。犬の正常膀胱粘膜組織、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 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。

III. 犬膀胱 TCC の診断および予後マーカーの検索 (2) - p63 と Δ Np63 について

本章ではヒトの浸潤性膀胱癌で発現低下が認められ、かつ予後指標となっている p63 と Δ Np63 に着目し、犬の膀胱 TCC での p63 と Δ Np63 の発現解析を行うことで、その発現と臨床的、病理的性状との関連性について検討した。また腫瘍の転移・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 発現は診断および予後の指標となる可能性が示された。

研究の評価

本論文は、犬の膀胱腫瘍で最も多い移行上皮癌に着目し、診断および予後指標となるマーカーについて検討したものである。1 章では超音波検査を用いた移行上皮癌の診断精度、超音波所見と病理学的進行度および予後との関連性について検討し、臨床現場で応用可能な情報とその限界について検討を行っている。2、3 章では 1 章で明らかになった超音波検査の限界を補い診断や予後判断の精度を向上させる分子マーカーについて、蛋白および

mRNA レベルで検討を行っている。論文全体として臨床研究から基礎研究へと段階的に内容を深める構成となっている。得られた結果は犬の膀胱移行上皮癌の早期診断、予後評価に有用であると考えられ、予後が悪いこの腫瘍の治療成績の向上に貢献することが期待される。

以上のことから、本論文は、科学的にも臨床獣医学的にも意義が大きいと判断でき、博士（獣医学）の学位を授与する価値を認める。

2014年2月18日

審査員

主査	教授	打出	毅
副査	教授	谷山	弘行
副査	教授	廉澤	剛
副査	教授	中出	哲也
副査	教授	萩原	克郎