

犬の腫瘍性疾患における抗酸化タンパク質ペルオキシレドキシン1および2の発現に関する病理学的研究

|       |                                                                                                         |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| メタデータ | 言語: Japanese<br>出版者:<br>公開日: 2023-06-26<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 大塚, 成己<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/00101258">http://hdl.handle.net/20.500.12099/00101258</a>   |

犬の腫瘍性疾患における抗酸化タンパク質  
ペルオキシレドキシシン 1 および 2 の発現に  
関する病理学的研究

2022 年

岐阜大学大学院  
共同獣医学研究科

大 塚 成 己

犬の腫瘍性疾患における抗酸化タンパク質  
ペルオキシレドキシシン 1 および 2 の発現に  
関する病理学的研究

大 塚 成 己

## 目次

|                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------|-----|
| 序　　文                                                                     | 1   |
| 第1章　犬の正常組織および様々な自然発生腫瘍におけるペルオキシレドキシン 1 および 2 の免疫組織化学的検索                  | 6   |
| はじめに                                                                     | 7   |
| 材料および方法                                                                  | 8   |
| 結果                                                                       | 12  |
| 考察                                                                       | 23  |
| 小括                                                                       | 31  |
| 図表                                                                       | 33  |
| 第2章　犬の血管内皮性腫瘍におけるペルオキシレドキシン 1 および 2 の発現と血管肉腫細胞の増殖におけるペルオキシレドキシン 1 の役割の解析 | 74  |
| はじめに                                                                     | 75  |
| 材料および方法                                                                  | 76  |
| 結果                                                                       | 81  |
| 考察                                                                       | 85  |
| 小括                                                                       | 89  |
| 図表                                                                       | 90  |
| 総　　括                                                                     | 103 |
| 謝　　辞                                                                     | 106 |
| 参考文献                                                                     | 107 |
| 和文要旨                                                                     | 133 |



## 序文

今日の動物医療の発展を背景に、伴侶動物の長寿命化が顕著になってきている。2021 年に日本ペットフード協会より発表された平均寿命は、犬では 14.65 歳、猫では 15.66 歳で、これらの年齢は、ヒトに換算すると、犬で約 76 歳、猫で約 79 歳に相当する (5)。このような長寿化に伴い、ヒトと同様に、伴侶動物でも腫瘍性疾患の罹患率および腫瘍性疾患による死亡率が増加しているとされ、アメリカ合衆国では、年間 400 万頭以上の犬が腫瘍性疾患と診断されている (155)。我が国での報告は少ないものの、岐阜県における犬の腫瘍発生に関する研究では、粗腫瘍発生率が 1.5%として報告されている (90)。さらにヒトと同様に、犬などの伴侶動物においても、腫瘍性疾患には致死的なものも多く、その効果的な治療法の開発が望まれている。以上の点から、ヒトのみならず犬を含む伴侶動物においても、腫瘍性疾患は重要な疾患として、注目度はますます高くなってきている (10, 48, 68, 82, 88, 161, 202)。

比較医学の観点から伴侶動物は新しいモデル動物として注目されている。一般的に、ヒトの腫瘍性疾患の研究に際し、げっ歯類が広く用いられているが (28, 35, 109, 110, 111, 147, 205)、これらのげっ歯類で得られた結果をヒトの腫瘍に外挿するためには様々な問題が存在する (141)。げっ歯類をはじめとした実験動物では、化学物質の投与などにより、様々な腫瘍性疾患が誘発可能であるが (52, 81, 115)、これらの腫瘍は誘発された腫瘍であり、発生メカニズムの観点から自然発生した腫瘍とは必ずしも同一なものではない。さらに、げっ歯類は小型であるため、多頭飼育にはメリットがあるものの、腫瘍の画像検査などは、げっ歯類用に特殊化した画像検査装置が必要であったり、投薬経路も腫瘍患者と同じ経路で行うことが不可能だったりするなど、その体格が小型ゆえの問題も少なくない。これら実験動物に対して、獣医療が対象とする伴侶動物に発生する腫瘍は、ヒトと同様の環境にある動物に自然発生するものであり、加えて、近年の伴侶動物に対する獣医療は非常に高度化し、CT や MRI などの画像検査機器、放射線治療装置などは、

医療分野と比較しても遜色のないものが使用され、比較的早期からの腫瘍性疾患の検出や正確かつ効果的な放射線療法も可能となってきた。これらの診断・治療装置は医療分野のものが流用されることが多いため、ヒトの腫瘍性疾患と同様の検査も可能であり、結果の比較も容易である。これらの点から、伴侶動物は、実験動物とヒトとの間をつなぐモデル動物として比較医学的に重要視されつつある(15, 49, 57, 112, 133, 137)。しかしその一方で、伴侶動物とヒトでは、同じ臓器であっても発生する腫瘍の種類は異なることがある。例えば、消化管における腫瘍では、ヒトでは胃がんや大腸がんなどの上皮性腫瘍が多いが、犬や猫では、胃がんや大腸がんなどの上皮性腫瘍は少ないものの、リンパ腫は比較的多い(12, 41, 62, 179, 182)。この様に、発生する腫瘍の種類が異なることは、モデル動物としての短所となりうる可能性があるため、各種の動物における腫瘍の発生状況は正確に把握される必要がある。しかし、ヒトではあまり多く発生しない腫瘍、いわゆる希少がんが伴侶動物で比較的多発することもあり、ヒトの希少がんを研究するうえで、よいモデルとなりうる。その例として、犬に多発する血管肉腫は、ヒトではまれであるものの、悪性度の高い血管肉腫のモデルとして知られている(27, 80, 105, 174)。

以上の様に、ヒトの腫瘍を完全に再現できるモデル動物はないのが現状であるものの、実験動物として頻用されるげっ歯類の他に、腫瘍研究のためのモデル動物として、犬を含めた伴侶動物は新たな視点を供給してくれるものと考えられる。

細胞の腫瘍化に関わる因子として、放射線やある種の化学物質、ストレスなど、様々なものが知られている(123, 132, 145, 204)。その一つとして活性酸素種(Reactive oxygen species, 以下 ROS)が注目されており、ヒトの様々な腫瘍の発生や進行、悪性化への関与が示唆されている(25, 36, 42, 58, 157, 194)。ROS は酸素分子に由来する、反応性の高い化合物の総称であり、過酸化水素(以下  $H_2O_2$ ) およびスーパーオキシドアニオンラジカル、ヒドロキシラジカル、一重項酸素が含まれる(23)。ROS は、ミトコンドリアにおける呼吸や様々な化学物質、放射線によって、常に正常な細胞内に発生しているが、チオレドキシンをはじめとする抗酸化酵素やビタミン

ン C などの抗酸化物質によって、生理的な濃度に保たれている (54, 162)。生理的な濃度の ROS は、様々なタンパク質の酸化還元状態を制御することで、その活性を変化させ、細胞の恒常性の維持に寄与している (17, 40, 71, 77, 156, 160, 193)。しかし、ROS が正常な濃度を越えて細胞内に蓄積すると、DNA の損傷や脂質の過酸化、タンパク質の変性などを引き起こし、細胞の機能低下やアポトーシスを誘導する (116, 146, 159, 177, 178, 183)。ペルオキシレドキシン (Peroxiredoxin, 以下 PRDX) は、ROS の一種である  $H_2O_2$  を水に還元する役割を担う抗酸化酵素ファミリーの一つで、様々な生物に広く保存されている (124)。哺乳類の PRDX には、計 6 つのアイソフォーム (PRDX1~6) が存在し、それらは、 $H_2O_2$  の還元に関与するシステイン残基 (以下 Cys) の数と位置、 $H_2O_2$  の還元様式によって、さらに 3 つのサブタイプ (PRDX1~4, 典型 2-Cys 型; PRDX5, 非典型 2-Cys 型; PRDX6, 1-Cys 型) に分類される (127)。2-Cys 型 PRDX は、2 つのサブユニットで構成されており、各サブユニットの両端に、酸化型 Cys (Peroxidatic Cys, 以下  $C_P$ ) と還元型 Cys (Resolving Cys, 以下  $C_R$ ) をそれぞれ有している。典型 2-Cys 型 PRDX は、2 つのサブユニットが有する  $C_P$  および  $C_R$  間でジスルフィド結合を形成することで、 $H_2O_2$  の還元を行う。一方、同じ 2-Cys 型でも、非典型 2-Cys 型 PRDX は、片方のサブユニットの両端に位置する  $C_P$  と  $C_R$  の間でジスルフィド結合を形成し、 $H_2O_2$  を還元する。また、1-Cys 型 PRDX である PRDX6 は、他の型とは構造的に異なり、サブユニットの片端にそれぞれ  $C_P$  と  $C_R$  のみを有している。PRDX6 は、 $C_P$  側のチオール基 (-SH) を酸化させ、スルフェン酸 (R-SOH) を形成することで  $H_2O_2$  の還元を行う。また、PRDX6 は、カルシウム非依存性ホスホリパーゼ A2 活性やグルタチオンペルオキシダーゼ活性を有していることが明らかになっており (7, 101, 192), PRDX が  $H_2O_2$  の濃度調節のみならず、その酸化還元能により、様々なタンパク質の酸化還元状態を調節し、各種のシグナル伝達経路に関与しているといった、生体内での  $H_2O_2$  の還元以外の機能についても注目されている。

レドックス制御は、生体内の酸化還元状態に応じて、タンパク質の酸化還元状態を調節するこ

とにより、種々の代謝等を調節する重要な制御機構である (61, 73, 95, 117, 172, 196)。レドックス制御を受けるタンパク質の一つとして、低酸素誘導因子 (Hypoxia-inducible factor, 以下 HIF) -1  $\alpha$  が知られている (103)。HIF-1  $\alpha$  は、細胞内が低酸素環境に曝露されると活性化される転写因子で、正常酸素濃度環境では、二原子酸素添加酵素の一種であるプロリルヒドロキシラーゼによってヒドロキシル化され、分解に導かれることで、その活性は抑制されている。一方、細胞内が低酸素状態に陥ると、HIF-1  $\alpha$  は活性化され、血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor, 以下 VEGF) やエリスロポエチン、グルコース輸送体などのタンパク質の転写を促進し、血管新生や嫌気性呼吸などを促進する。主に低酸素刺激によって活性化する HIF-1  $\alpha$  であるが、他にも ROS の刺激によっても活性化することが知られている。HIF-1  $\alpha$  を分解に誘導するプロリルヒドロキシラーゼが ROS によって酸化されると、その機能が低下し、HIF-1  $\alpha$  の分解反応が低下する。その結果、HIF-1  $\alpha$  の濃度が上昇し、血管新生や嫌気性呼吸が促進される。この HIF-1  $\alpha$  の例の様に、ROS の濃度とタンパク質の酸化還元状態は密接に関連しており、ROS の正常濃度からの逸脱によって、種々のシグナル伝達に関わるタンパク質の酸化還元状態が変化し、様々な疾患の発生や悪化に寄与することが示唆されている (29, 91, 170, 171, 198)。そのため、生体内の ROS 濃度の調節が非常に重要であり、その調節に関わっている PRDX の発現異常によっても、様々な疾患が発生する。

ヒトにおいては、PRDX の発現の異常と、腫瘍の発生やその悪性化、腫瘍細胞のアポトーシスの抑制といった腫瘍促進的な役割 (2, 14, 21, 192) や、腫瘍の発生や進行、悪性化の抑制といった腫瘍抑制的な役割 (60, 176, 184) が注目されている。PRDX のアイソフォームの中でも、PRDX1 は、肺がんや子宮頸がん、膀胱がん、骨肉腫などで高発現しており (20, 72, 102, 143)、例えば骨肉腫では、PRDX1 が、セリン/スレオニンタンパク質キナーゼ B (以下 Akt) および mammalian target of rapamycin (以下 mTOR) のリン酸化を促進し、Akt/mTOR シグナル経路を亢進することで、骨肉腫の発生や骨肉腫細胞の増殖、遠隔転移が促進されることが示唆されてい

る (20)。また、PRDX2 は、食道扁平上皮癌や胃がん、大腸がん、非小細胞性肺がんなどで高発現していることが知られている (26, 39, 175, 197)。食道扁平上皮癌では、PRDX2 が、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路および Akt 経路を活性化させることで、扁平上皮癌の発生を促進し、さらに腫瘍細胞のミトコンドリア依存性アポトーシスを抑制している (39)。このように、多くの研究によって、ヒトの腫瘍における PRDX の発現と、その腫瘍動態への関与が解明されてきている。一方、犬を含めた伴侶動物においては、PRDX の発現の異常と腫瘍の動態に関する報告は、ヒトのものと比較しても極めて少なく、検索の限りでは、犬の血管肉腫における PRDX6 の発現と腫瘍細胞のアポトーシスへの関連の報告があるのみであり (6)、腫瘍性疾患の発生が増加し、さらにヒトの希少な腫瘍のモデルともなり得る伴侶動物の腫瘍における PRDX の発現の解析が望まれる。

本研究では、犬に自然発生した腫瘍を対象とし、第 1 章では、犬の様々な組織における PRDX1 および 2 の基礎的な発現状況に関する情報を集積するため、犬の様々な腫瘍組織と正常組織における PRDX1 および 2 の発現を免疫組織化学的に検索した。続く第 2 章では、血管内皮性腫瘍について、その発現の意義を解析するため、詳細な病理組織学的解析および犬血管肉腫由来細胞株を用いた解析を実施した。

## 第 1 章

犬の正常組織および自然発生腫瘍におけるペルオキシレドキシン 1 および 2 の  
免疫組織化学的検索

## I. はじめに

ヒトの様々な正常組織における PRDX の発現がこれまで報告されている。PRDX1~6 の各アイソフォームは、細胞・組織によってその発現の強度は異なり様々である (31)。正常な細胞・組織での PRDX の発現の違いについては、発現する細胞の機能との関連が示唆されているものの、詳細には検討されていない。しかし、外皮や内臓などの生体の各部位では、酸素が豊富な箇所もあれば、酸素分圧が低く、常に低酸素状態に曝される組織も存在し、酸化的リン酸化反応と解糖系の利用の違いが予想される。特に、酸化的リン酸化反応は、ROS の大きな発生源の一つであるため、酸化的リン酸化反応の程度は、細胞の抗酸化作用に影響する可能性がある。さらに細胞内の  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度の変化により、これら PRDX の発現が亢進または低下すると、 $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度の調節という PRDX の本来の役割を越えて、様々なタンパク質の酸化還元状態を変化させ、シグナル伝達経路の活性化または不活性化を誘導する可能性がある。PRDX の発現の変化は、タンパク質の酸化還元状態を変化させることで、代謝系を調節する機構であるレドックス制御に関与し、ヒトの腫瘍においては、その発生や悪性化、遠隔転移、腫瘍細胞のアポトーシスからの回避、がん幹細胞の維持などの腫瘍動態に寄与していると報告されている (38, 59, 92, 164)。しかし、動物の腫瘍においては、PRDX の発現に関する情報は非常に乏しいのが現状である。犬の腫瘍において、PRDX の腫瘍への関連のメカニズムを解明するためには、犬の腫瘍組織および正常組織における PRDX の発現に関する基本的な情報が必要である。

そこで本章では、典型 2-Cys 型 PRDX のアイソフォームであり、これまで犬におけるデータが発表されていない PRDX1 および 2 について、犬の腫瘍組織におけるそれらの発現を、免疫組織化学的に検索した。また、腫瘍組織と共に採取された犬の非腫瘍部の正常組織においても、PRDX1 および 2 の発現を検索し、ヒトやげっ歯類などの他の動物における発現の報告と比較した。

## II. 材料および方法

### 1. 犬の腫瘍組織と正常組織

本検索に用いられた犬の各腫瘍組織検体は、2012 年から 2022 年の間に、岐阜大学獣医病理学研究室で収集され、腫瘍組織検体は病理診断医によって病理組織学的に診断された。正常な組織として、これらの腫瘍組織と共に得られた近傍の非腫瘍組織のうち、形態学的に正常なものを用いた。腫瘍組織検体を採取した犬の品種、年齢、性別、また、腫瘍の発生部位や組織型等の情報は、Table1-1 から Table 1-10 に記載した。また、正常組織として検索した臓器は、皮膚、乳腺、リンパ節、脾臓、腎臓、肝臓および膀胱であった。

全ての摘出組織は、摘出後速やかに 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、定法に従ってパラフィン中に包埋し、ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-fixed paraffin-embedded, 以下 FFPE) ブロックを作製した。FFPE ブロックをミクロトーム (大和光機工業株式会社, 埼玉) にて薄切し、4  $\mu$ m の切片を作製した。切片に、脱パラフィンおよび脱水処理を施した後、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色を実施した。病理組織学的診断は、Tumors in domestic animals (30, 43, 44, 55, 85, 108, 114, 118, 173) および Surgical pathology of tumors of domestic animals Vol. 1-3 (45, 150, 151, 200, 201) に従った。病理組織学的診断の際に、必要に応じて、各種の特殊染色あるいは免疫染色を行い、確定診断を行った。

### 2. ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびウエスタンブロット法による抗ヒト PRDX1 および 2 ウサギポリクローナル抗体の犬のサンプルへの交差性の確認

SDS-PAGE およびウエスタンブロット法を用いて、本実験で使用した抗ヒト PRDX1 あるいは 2 ウサギポリクローナル抗体の、犬の標本への交差性を評価した。PRDX1 および 2 の発現が確認

されている HeLa 細胞株を発現陽性コントロールとして使用し (56, 79), 犬のサンプルとして犬の脾臓の血管肉腫由来である Re12 細胞株を用いた(119)。SDS-PAGE およびウエスタンブロット法は, 以下の通りに実施した (47)。過去の報告に従い, 各細胞をプラスチックシャーレ (直径 9 cm, Cell Culture Dish, SPL LIFE SCIENCES, 大韓民国) に 70%コンフルエントになるまで培養したのち, 各細胞をプロテアーゼインヒビター (AEBSF・HCl 100 mM, Aprotinin 80  $\mu$ M, Bestatin 5 mM, E-64 1.5 mM, EDTA 0.5 M, Leupeptin 2 mM, Pepstatin A 1 mM, Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail (100X), 24  $\times$  100  $\mu$ l microtubes, Thermo Fisher Scientific, マサチューセッツ州, アメリカ合衆国) を加えた Lysis buffer (Tris・HCl 25 mM, pH 7.6, NaCl 150 mM, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, Pierce RIPA Buffer, Thermo Fisher Scientific) にてそれぞれの細胞を溶解し, タンパク質液を作製した。その後, タンパク質液のタンパク質の濃度を, 牛血清アルブミン (Albumin Standard, Thermo Fisher Scientific) を標準として, Lowry 法に基づいた DC Protein Assay (Bio Rad, カリフォルニア州, アメリカ合衆国) にて測定した。1 ウェルあたり 5  $\mu$ g のタンパク質を含む各サンプルを, 4-20%PAGE ゲル (Mini-PROTEIN TGX Gels, Bio Rad) を用い, 電気泳動により分離した後に, フッ化ポリビニリデン膜 (PVDF メンブレン, Cytiva, 東京) に転写した。その後, 非特異的な抗体の結合を避けるため, PVDF メンブレンに ECL Prime Blocking agent (Cytiva) を載せて, 室温で 1 時間ブロッキングした後, 抗ヒト PRDX1 ウサギポリクローナル抗体 (1 : 5,000, ab228780, Abcam, ケンブリッジ, イギリス)あるいは抗ヒト PRDX2 ウサギポリクローナル抗体(1:5,000, ab109367, Abcam) 抗体を載せ, 室温 (20~25°C) で 1 時間反応させた。ローディングコントロールとして, 抗ヒト  $\beta$ -actin ウサギポリクローナル抗体 (1 : 1,000, #4967, Cell Signaling Technology, マサチューセッツ州, アメリカ合衆国)を用いた。PVDF メンブレンをトリス緩衝生理食塩水(pH 7.4)で洗浄した後, 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギ IgG ヤギポリクローナル抗体 (1 : 2,000, #7074, Cell Signaling Technology) を室温で 1 時間反応させた後, PVDF メンブレ

ン上のタンパク質を Immobilon® Forte Western HRP Substrate (Merck Millipore, マサチューセッツ州, アメリカ合衆国) で化学発光により可視化した。シグナルは C-Digit Blot Scanner (LI-COR, ネブラスカ州, アメリカ合衆国) を用いて検出した。

### 3. 免疫組織化学 (IHC)

組織標本上の PRDX1 および 2 のタンパク質の発現を検出するため、犬の腫瘍組織標本を用いて、PRDX1 および 2 に対する免疫組織化学染色を実施した。腫瘍組織の FFPE ブロックから 4  $\mu$ m の薄切切片を作製した。切片に、脱パラフィンおよび脱水処理を施した後、抗原賦活化のため、イムノアクティブ (pH 6.0) (松浪硝子工業株式会社, 大阪) に浸漬し、オートクレーブを用いて加熱した (121°C, 30 分)。室温で十分に冷却した後、内因性ペルオキシダーゼの不活化のため、0.3%  $H_2O_2$ /メタノール溶液に、室温で 20 分間浸漬した。その後、非特異的な抗体の結合を防ぐため、切片に Protein Block Serum-Free Reagent (Dako, カリフォルニア州, アメリカ合衆国) を載せ、室温で 30 分間反応させた。一次抗体として、切片に、抗ヒト PRDX1 ウサギポリクローナル抗体 (1:500, ab228780, Abcam) および抗ヒト PRDX2 ウサギポリクローナル抗体 (1:1,000, ab109367, Abcam) 抗体をそれぞれ載せ、4°C で 12 時間反応させた。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、二次抗体として、抗 PRDX1 および 2 抗体を反応させた標本には Histofine® Simple Stain MAX PO (R) (ニチレイバイオサイエンス, 東京) を満載し、室温で 30 分間反応させた。発色は、Liquid DAB + Substrate Chromogen System (Dako) を用いて行い、ヘマトキシリン (クラファインテックジャパン株式会社, 東京) を用いて対比染色を実施した。

免疫染色標本については、過去の報告に従い、染色強度 (Staining intensity) と染色割合 (Staining ratio) を用いたスコアリングを実施した (102)。染色強度は、陰性コントロールの好中球の染色性を 0 (陰性)、PRDX1 の陽性コントロールとしてアポクリン汗腺や皮脂腺、マクロファージ、線維芽細胞の染色性と、PRDX2 の陽性コントロールとしてアポクリン汗腺や皮脂腺、

赤血球の染色性を 2（陽性）として、以下の様に評価した：0，陰性；1，弱陽性；2，陽性；3，強陽性。続いて、染色割合は、400 倍視野の腫瘍細胞の内、染色されている細胞の割合により、以下の様に評価した：1，<25%；2，25～50%；3，50～75%；4，>75%。視野の全ての腫瘍細胞が陰性を示す場合は、染色割合のスコアは 0 とした。全ての標本において、高倍率（400 倍）で染色強度および染色割合を判定して、それらを掛け合わせた数値を算出し、計 3 視野の平均値を最終的な IHC スコアとした。

また、正常組織における PRDX1 および 2 の発現は、前述した組織中の陽性コントロールと比較して、染色性が高いものを強陽性、同程度のものを陽性、染色性の低いものを弱陽性、染色されないものを陰性として、定性的に評価した。

#### 4. 統計学的解析

腫瘍組織標本における PRDX1 および 2 の IHC スコアを評価するため、統計学的解析を実施した。データは、平均値±標準偏差（SD）で表した。2 群間の比較には Wilcoxon の順位和検定を、3 群以上の比較には Steel-Dwass 検定を用いた。全てのデータ処理は、JMP Pro 16（SAS Institute, ノースカロライナ州, アメリカ合衆国）を用いて実施した。 $p$  値<0.05 のデータを、統計的に有意とみなした。

### III. 結果

#### 1. 抗ヒト PRDX1 および 2 ウサギポリクローナル抗体の犬のサンプルに対する交差性

SDS-PAGE およびウエスタンブロット法より、抗ヒト PRDX1 および 2 ポリクローナル抗体を用いた結果、HeLa 細胞株では明瞭な単一バンドが検出され、同様に Re12 細胞においても明瞭な単一バンドが検出され、これらのバンドは、分子量 22,000 の位置に検出された (Figure 1-1)。また、HeLa 細胞株および Re12 細胞株から抽出したタンパク質に対して抗  $\beta$ -actin 抗体を用いた結果、共に分子量 44,000 の位置に明瞭な単一バンドが検出された。これらの結果から、本研究で用いた抗ヒト PRDX1 および 2 ウサギポリクローナル抗体は、犬においても PRDX1 および 2 を検出できた。

#### 2. 様々な犬の正常組織（皮膚、乳腺、リンパ節、脾臓、腎臓、肝臓および膀胱）における PRDX1 および 2 の発現

##### 2-1. 皮膚

皮膚において、表皮基底層および有棘層の扁平上皮細胞の核は、PRDX1 および 2 に強陽性を示し、細胞質は弱陽性を示した一方、表皮顆粒層の扁平上皮細胞は、PRDX1 および 2 に陰性であった (Figure 1-2 A, 1-4 A)。毛包において、内毛根鞘および外毛根鞘の核は、PRDX1 および 2 に陰性から陽性を示し、毛乳頭のわずかな細胞が弱陽性を示した (Figure 1-2 B, 矢印, 1-4 B, 矢印)。皮脂腺では成熟した皮脂腺上皮細胞および、皮脂腺腺房の基底膜側に存在する未熟な腺細胞である補助細胞は、いずれも PRDX1 および 2 に強陽性を示した (Figure 1-2 B, 矢頭, 1-4 B, 矢頭)。アポクリン汗腺において、分泌上皮細胞は PRDX1 に強陽性を示したが、筋上皮細胞は陰性であった (Figure 1-2 C)。同様にアポクリン汗腺の分泌上皮細胞は PRDX2 に強陽性を示した

が、筋上皮細胞は陰性または弱陽性を示した (Figure 1-4 C)。

マクロファージにおいて、PRDX1 は主に細胞質に発現していたが、PRDX2 は陰性から弱陽性であった (Figure 1-2 D, 1-4 D)。真皮や皮下組織の毛細血管などの血管において、内皮細胞の核および細胞質は、PRDX1 および 2 に陰性を示した (Figure 1-2 E, 1-4 E)。さらに、線維芽細胞は PRDX1 に陰性から陽性を、PRDX2 に陰性から弱陽性を示した (Figure 1-2 F, 1-4 F)。皮下の横紋筋 (皮筋) は、PRDX1 および 2 に陰性を示した (Figure 1-2 G, 1-4 G)。

## 2-2. 乳腺

犬の乳腺組織において、PRDX1 および 2 の発現を観察した。休止期の乳腺腺房の管腔上皮細胞は、PRDX1 に弱陽性から陽性を、PRDX2 に陰性を示した (Figure 1-2 H, 1-4 H)。管腔基底側の筋上皮細胞は、PRDX1 および 2 に陰性を示した (Figure 1-2 H, 矢印, 1-4 H, 矢印)。豊富な細胞質を有する活性化した腺房において、管腔上皮細胞は PRDX1 に陽性から強陽性を、PRDX2 に陰性を示した (Figure 1-2 I, 1-4 I)。活性化した腺房の筋上皮細胞は、休止期の筋上皮細胞と同様に、PRDX1 および 2 に陰性を示した (Figure 1-2 I, 矢印, 1-4 I, 矢印)。

## 2-3. リンパ節

リンパ節では、皮質領域のリンパ濾胞のリンパ球は細胞質が PRDX1 陽性を示した (Figure 1-3 A)。リンパ濾胞の胚中心細胞や胚中心芽細胞に比較して、マントル帯から辺縁帯にかけてのリンパ球の方が PRDX1 の染色性は強かった (Figure 1-3 B)。一方、傍皮質領域のリンパ球は、PRDX1 は陰性であった (Figure 1-3 C)。その他に、リンパ洞内のマクロファージの細胞質、一部で核が PRDX1 陽性を呈し (Figure 1-3 D, 矢印)、赤血球にも PRDX1 が陽性を示すものが認められた。また、髄質の髄索に認められた形質細胞は、PRDX1 が陰性を示した (Figure 1-3 D, 矢頭)。

PRDX2 に関しては、リンパ球は陰性を示した (Figure 1-5 A, B, C)。リンパ濾胞内、傍皮質

領域などでは、ごく少数の PRDX2 陽性細胞が観察された (Figure 1-5 C, 矢印)。これらの PRDX2 陽性細胞は、リンパ濾胞内では、類円形の核と比較的豊富で淡明な細胞質を有する細胞で、リンパ系細胞とは異なる形態を示し、PRDX2 の陽性像は核に認められた。また、濾胞辺縁帯や傍皮質領域にみられる PRDX2 陽性細胞は、紡錘形の核と少量の紡錘形から星状の細胞質を有する細胞で、核および細胞質が陽性を呈していた (Figure 1-5 B, 矢印)。髄質の髄索に認められた形質細胞は、PRDX1 と同様に PRDX2 も陰性を示した (Figure 1-5 D, 矢頭)。辺縁洞や髄洞などのリンパ洞を裏打ちする洞内皮細胞は、核および細胞質が PRDX2 に弱陽性を示した (Figure 1-5 D, 矢印)。マクロファージでは PRDX2 は陰性から弱陽性であった。

#### 2-4. 脾臓

脾臓において、好中球の核および細胞質は、PRDX1 および 2 に陰性を示した (Figure 1-3 E, 1-5 E)。リンパ濾胞のリンパ球および赤芽球を含む赤血球系細胞は、PRDX1 に陽性を示した (Figure 1-3 F, G)。また、リンパ球は PRDX2 に陰性を、赤血球系細胞の細胞質に強陽性を示した (Figure 1-5 F, G)。脾洞内皮細胞は、PRDX1 に陰性から弱陽性を、PRDX2 に陰性を示した (Figure 1-3 H, 1-5 H)。

#### 2-5. 腎臓

腎臓において、糸球体および糸球体包の上皮細胞は、PRDX1 および 2 に陰性を示した (Figure 1-3 I, 黒矢印, 1-5 I, 黒矢印)。近位尿細管の管腔上皮細胞において、核は PRDX1 および 2 に陰性から弱陽性を示した一方、細胞質は陽性を示した (Figure 1-3 I, 白矢印, 1-5 I, 白矢印)。遠位尿細管の核は PRDX1 および 2 に陰性を示し、細胞質は PRDX1 に陽性を、PRDX2 に弱陽性を示した (Figure 1-3 I, 黒矢頭, 1-5 I, 黒矢頭)。集合管の核は PRDX1 に陰性を、PRDX2 に陰性から弱陽性を示し、細胞質は PRDX1 に弱陽性から陽性を、PRDX2 に陽性を示した (Figure 1-3 I,

白矢頭, 1-5 I, 白矢頭)。

## 2-6. 肝臓

肝臓において、肝細胞の核は PRDX1 に陰性から弱陽性を、細胞質には陽性から強陽性を示した。一方、肝細胞は PRDX2 には陰性を示した (Figure 1-3 J, 1-5 J)。また、類洞内皮細胞は、PRDX1 および 2 に陰性を示した (Figure 1-3 J, 黒矢印, 1-5 J, 黒矢印)。また、クッパー細胞は、他の部位のマクロファージと同様に PRDX1 に陽性を、PRDX2 には陰性を示した (Figure 1-3 J, 白矢印, 1-5 J, 白矢印)。肝内あるいは肝外胆管上皮において、核は PRDX1 に陰性から弱陽性を、細胞質は陽性を示した (Figure 1-3 K)。また、核は PRDX2 に陰性から弱陽性を、細胞質は弱陽性を示した (Figure 1-5 K)。

## 2-7. 膀胱

膀胱において、移行上皮細胞の核は PRDX1 に陽性から強陽性を示し、PRDX2 に陰性を示した。また、細胞質は、PRDX1 に強陽性を、PRDX2 に弱陽性を示した (Figure 1-3 L, 1-5 L)。粘膜固有層、粘膜下組織の線維芽細胞は他の臓器と同様に、PRDX1 に陰性から陽性を、PRDX2 に陰性から弱陽性を示した。筋層の平滑筋細胞は、PRDX1 は核および細胞質が陽性を示し (Figure 1-3 M)、PRDX2 は核および細胞質共に、陰性から弱陽性を示した (Figure 1-5 M)。筋層内の神経節では、神経節細胞の核および細胞質は PRDX1 および 2 共に強陽性を示したが (Figure 1-3 N, 1-5 N)、その他の神経節内の細胞は陰性から弱陽性を示した。軸索は PRDX1 および 2 共に陽性を示した (Figure 1-3 O, 1-5 O)。

## 3. 犬の様々な腫瘍における PRDX1 および 2 の発現

上記の結果を受けて、腫瘍細胞の PRDX1 および 2 の発現の免疫組織学的解析において、内在

性コントロールとして、腫瘍と同一切片内の以下の細胞を対象とした。正常な線維芽細胞およびマクロファージを PRDX1 の陽性コントロールとして、正常血管内皮細胞や横紋筋、赤芽球の核、好中球などを陰性コントロールとして観察した。また、アポクリン汗腺や赤芽球を PRDX2 の陽性コントロールとして、正常血管内皮細胞や横紋筋、リンパ球、好中球などを陰性コントロールとして観察した。各腫瘍における PRDX1 および 2 の IHC スコアは Table 1-11 に記載した。

### 3-1. 毛包性腫瘍

毛芽腫において、腫瘍細胞の核および細胞質は、PRDX1 に強陽性を、PRDX2 に陰性から強陽性を示した。腫瘍細胞の細胞質は、PRDX1 に強陽性を、PRDX2 に弱陽性を示した (Figure 1-6 A, B)。毛芽腫における PRDX1 の IHC スコアの平均値は 10.0 (SD±1.24)、PRDX2 の平均値は 8.60 (SD±2.94) であった。

毛包上皮腫において、腫瘍細胞の核および細胞質は、PRDX1 に陰性から弱陽性を、PRDX2 に弱陽性から強陽性を示した (Figure 1-6 C, D)。毛包上皮腫における PRDX1 の IHC スコアの平均値は 3.03 (SD±1.84)、PRDX2 の平均値は 8.84 (SD±2.52) であった。

### 3-2. 扁平上皮癌

皮膚扁平上皮癌において、腫瘍細胞の核は、PRDX1 および 2 に陰性から弱陽性を示し、細胞質は PRDX1 に弱陽性から陽性を、PRDX2 に陽性から強陽性を示した (Figure 1-7 A, B)。皮膚扁平上皮癌における PRDX1 および 2 の IHC スコアの平均値は、それぞれ 3.56 (SD±1.96)、5.28 (SD±3.86) であった。

口腔扁平上皮癌において、腫瘍細胞の核は PRDX1 に陽性を示し、細胞質は陽性を示した (Figure 1-7 C)。また、腫瘍細胞の核は PRDX2 に陰性を、細胞質は弱陽性を示した (Figure 1-7 D)。口腔扁平上皮癌における PRDX1 および 2 の IHC スコアの平均値は、それぞれ 7.95 (SD±3.49)、

2.81 (SD±1.90) であった。

扁平上皮癌の発生部位間で、PRDX1 および 2 の IHC スコアを比較した (Figure 1-6 E, F)。その結果、皮膚扁平上皮癌と比較して、口腔腫瘍で、PRDX1 の IHC スコアが有意に高かった ( $p < 0.05$ )。

### 3-3. 乳腺腫瘍

腫瘍でない正常な乳腺組織における PRDX1 およびの IHC スコアの平均値は、それぞれ 8.58 (SD±1.67), 1.74 (SD±1.76) であった。乳腺単純腺腫において、乳腺上皮由来腫瘍細胞の核および細胞質は、PRDX1 に強陽性を示した (Figure 1-8 A)。さらに、核は PRDX2 に陰性から弱陽性を、細胞質は弱陽性を示した (Figure 1-9 A)。乳腺上皮由来腫瘍細胞における PRDX1 の IHC スコアの平均値は 6.90 (SD±2.40), PRDX2 の IHC スコアの平均値は 5.13 (SD±2.56) であった。

乳腺単純癌において、乳腺上皮由来腫瘍細胞の核は PRDX1 およびに弱陽性を示し、細胞質は強陽性を示した (Figure 1-8 B, 1-9 B)。乳腺上皮由来腫瘍細胞における PRDX1 の IHC スコアの平均値は 5.27 (SD±2.71), PRDX2 の IHC スコアの平均値は 8.98 (SD±2.37) であった。

乳腺複合腺腫において、乳腺上皮由来腫瘍細胞の核および細胞質は、PRDX1 に強陽性を、PRDX2 に陽性を示した (Figure 1-8 C, 黒矢印, 1-9 C, 黒矢印)。乳腺上皮由来腫瘍細胞における PRDX1 の IHC スコアの平均値は 4.93 (SD±1.05), PRDX2 の IHC スコアの平均値は 5.60 (SD±1.58) であった。また、乳腺複合腺腫における筋上皮由来腫瘍細胞の核および細胞質は、PRDX1 および 2 に強陽性を示した (Figure 1-8 C, 白矢印, 1-9 C, 白矢印)。筋上皮由来腫瘍細胞における PRDX1 の IHC スコアの平均値は 4.90 (SD±1.98), PRDX2 の IHC スコアの平均値は 7.30 (SD±2.04) であった。

乳腺複合癌において、乳腺上皮由来腫瘍細胞の核および細胞質は、PRDX1 に陽性を、PRDX2

に陰性から弱陽性を示した (Figure 1-8 D, 黒矢印, 1-9 D, 黒矢印)。乳腺上皮由来腫瘍細胞における PRDX1 の IHC スコアの平均値は 5.77 (SD±1.51), PRDX2 の IHC スコアの平均値は 6.80 (SD±2.77) であった。また, 乳腺複合癌における筋上皮由来腫瘍細胞の核および細胞質は, PRDX1 および 2 に強陽性を示した (Figure 1-8 D, 白矢印, 1-9 D, 白矢印)。筋上皮由来腫瘍細胞における PRDX1 の IHC スコアの平均値は 4.53 (SD±1.68), PRDX2 の IHC スコアの平均値は 6.07 (SD±3.07) であった。

乳腺良性混合腫瘍において, 乳腺上皮由来腫瘍細胞および筋上皮由来腫瘍細胞は, 前述の乳腺複合腺腫と同様の PRDX1 および 2 の染色性を示した。乳腺上皮由来腫瘍細胞における PRDX1 の IHC スコアの平均値は 7.33 (SD±1.39), PRDX2 の IHC スコアの平均値は 8.67 (SD±2.52) であった。また, 筋上皮由来腫瘍細胞における PRDX1 の IHC スコアの平均値は 6.80 (SD±2.35), PRDX2 の IHC スコアの平均値は 11.2 (SD±1.17) であった。腫瘍組織内に観察された軟骨組織において, 軟骨細胞の核および細胞質は, PRDX1 および 2 に陰性から陽性を示した (Figure 1-8 E, 1-9 E)。

乳腺悪性混合腫瘍において, 乳腺上皮由来腫瘍細胞および筋上皮由来腫瘍細胞は, 前述の乳腺複合癌と同様の PRDX1 および 2 の染色性を示した。乳腺上皮由来腫瘍細胞における PRDX1 の IHC スコアの平均値は 7.93 (SD±2.23), PRDX2 の IHC スコアの平均値は 7.57 (SD±2.45) であった。また, 筋上皮由来腫瘍細胞における PRDX1 の IHC スコアの平均値は 7.30 (SD±2.56), PRDX2 の IHC スコアの平均値は 9.23 (SD±4.01) であった。腫瘍組織内に観察された軟骨組織において, 軟骨細胞の核および細胞質は, PRDX1 および 2 に陰性から陽性を示した (Figure 1-8 F, 1-9 F)。

正常な乳腺組織における乳腺上皮細胞と各乳腺腫瘍で観察された乳腺上皮由来腫瘍細胞の PRDX1 および 2 の IHC スコアを比較した。正常な乳腺上皮細胞と比較して, 単純癌, 複合腺腫, 複合癌において乳腺上皮成分の PRDX1 の IHC スコアが有意に低かった (Figure 1-8 G)。また,

PRDX2 についても同様の解析を実施した。正常な乳腺上皮細胞と比較して、全ての種類の腫瘍において乳腺上皮成分の PRDX2 の IHC スコアが有意に高かった (Figure 1-9 G)。

#### 3-4. 移行上皮とそのポリープおよび腫瘍

線維上皮性ポリープにおいて、表面を覆う移行上皮は PRDX1 に強陽性を示し (Figure 1-10 A, \*), PRDX2 には陰性を示した (Figure 1-10 B, \*)。ポリープ内の血管において、内皮細胞は PRDX1 に陰性から弱陽性を示し (Figure 1-10 A, 黒矢印), PRDX2 には陰性を示した (Figure 1-10 B, 黒矢印)。また、増生した線維芽細胞は、PRDX1 および 2 に陰性から弱陽性を示した (Figure 1-10 A, 白矢印, 1-10 B, 白矢印)。線維上皮性ポリープにおける PRDX1 および 2 の IHC スコアの平均値は、それぞれ 6.00 (SD±2.83), 0.00 (SD±0.00) であった。

移行上皮乳頭腫において、腫瘍細胞の核は PRDX1 に陰性から陽性を示し、細胞質は陽性を示した (Figure 1-10 C)。また、腫瘍細胞の核は PRDX2 に陰性を示し、細胞質は弱陽性を示した (Figure 1-10 D)。移行上皮乳頭腫における PRDX1 および 2 の IHC スコアの平均値は、それぞれ 5.67 (SD±1.41), 0.665 (SD±0.940) であった。

移行上皮癌において、腫瘍細胞の核は PRDX1 および 2 に陰性を示し、細胞質は PRDX1 に強陽性を、PRDX2 に弱陽性から陽性を示した (Figure 1-10 E, F)。移行上皮癌における PRDX1 および 2 の IHC スコアの平均値は、それぞれ 6.76 (SD±2.57), 4.73 (SD±3.20) であった。

これらの組織における PRDX1 および 2 の IHC スコアを比較した。PRDX1 および 2 において、組織間でそれらの IHC スコアに有意な差はみられなかった。

移行上皮癌においては、その発生部位間での比較を実施した。腎臓 (腎盂) (n=1) (Figure 1-11 A, B), 尿管 (n=1) (Figure 1-11 C, D), 膀胱 (n=25) (Figure 1-11 E, F), 尿道 (n=1) (Figure 1-8 G, H), 前立腺 (n=3) (Figure 1-8 I, J), 腹腔内 (n=1) (Figure 1-8 K, L) に発生した移行上皮癌を用いて、その PRDX1 および 2 の IHC スコアを比較した。しかし、移行上皮癌の発生部

位間で、PRDX1 および 2 の IHC スコアに有意な差はみられなかった (Figure 1-11 M, N)。

### 3-5. リンパ腫

本研究に用いたリンパ腫の免疫表現型とそれぞれの症例数は、B 細胞性リンパ腫 14 例、T 細胞性リンパ腫 13 例であった。

B 細胞性リンパ腫において、腫瘍細胞の核および細胞質は、PRDX1 に弱陽性を示した (Figure 1-12 A)。また、腫瘍細胞は、PRDX2 に陰性を示した (Figure 1-12 B)。B 細胞性リンパ腫における、PRDX1 の IHC スコアの平均値は 4.45 (SD±2.19)、PRDX2 の平均値は 0.0714 (SD±0.267) であった。

T 細胞性リンパ腫において、腫瘍細胞の核および細胞質は、PRDX1 に陽性を示し (Figure 1-12 C)、PRDX2 に陰性を示した (Figure 1-12 D)。B 細胞性リンパ腫における、PRDX1 および 2 の IHC スコアの平均値は、それぞれ 3.64 (SD±2.48)、0.0513 (SD±0.185) であった。

また、腫瘍の免疫表現型の違いによる PRDX1 および 2 の IHC スコアの比較を実施したが、有意な差は得られなかった (Figure 1-12 E, F)。

### 3-6. 皮膚肥満細胞腫

犬の皮膚肥満細胞腫は、Patnaik らの報告 (135) に従って Grade I (n=16)、Grade II (n=18)、Grade III (n=18) および Kiupel らの報告 (86) に従って、Low grade (n=18)、High grade (n=34) に分類された。

Grade I の肥満細胞腫において、核および細胞質は PRDX1 および 2 に弱陽性から陽性を示した (Figure 1-13 A, B)。Grade I の肥満細胞腫における PRDX1 および 2 の IHC スコアの平均値は、それぞれ 4.79 (SD±2.47)、3.71 (SD±1.80) であった。Grade II の肥満細胞腫において、腫瘍細胞は PRDX1 に弱陽性を示した (Figure 1-13 C)。また、腫瘍細胞の核は PRDX2 に弱陽性を

示した (Figure 1-13 D)。Grade II の肥満細胞腫における PRDX1 および 2 の IHC スコアの平均値は、それぞれ 4.30 (SD±2.57), 3.17 (SD±1.77) であった。Grade III の肥満細胞腫において、腫瘍細胞の核および細胞質は、PRDX1 に弱陽性を示した (Figure 1-13 E)。また、腫瘍細胞の核は PRDX2 に陰性を示したが、細胞質には弱陽性から陽性を示した (Figure 1-13 F)。Grade III の肥満細胞腫における PRDX1 および 2 の IHC スコアの平均値は、それぞれ 3.72 (SD±2.54), 5.98 (SD±3.95) であった。

Low grade の肥満細胞腫において、核および細胞質が PRDX1 および 2 に弱陽性から陽性を示した (Figure 1-13 A-D)。また、Low grade の肥満細胞腫における PRDX1 および 2 の IHC スコアの平均値は、それぞれ 4.53 (SD±2.50), 3.42 (SD±1.78) であった。また、High grade の肥満細胞腫において、核および細胞質が PRDX1 および 2 に弱陽性から陽性を示した (Figure 1-13 E, F)。また、High grade の肥満細胞腫における PRDX1 および 2 の IHC スコアの平均値は、それぞれ 3.72 (SD±2.54), 5.98 (SD±3.95) であった。

それぞれの組織学的グレード分類でのグレード間で、PRDX1 および 2 の IHC スコアを比較した。PRDX1 の IHC スコアにおいて、グレード間で有意な差は得られなかった (Figure 1-13 G, I)。しかし、PRDX2 の IHC スコアにおいて、Grade II の肥満細胞腫における PRDX2 の IHC スコアと比較して、Grade III の IHC スコアが有意に高かった ( $p < 0.05$ ) (Figure 1-13 H)。また、Low grade の肥満細胞腫における PRDX2 の IHC スコアと比較して、High grade の IHC スコアが有意に高かった ( $p < 0.05$ ) (Figure 1-13 J)。

### 3-7 皮膚形質細胞腫

皮膚形質細胞腫では、腫瘍細胞の核は PRDX1 に陰性から弱陽性を、PRDX2 に陰性を示し、細胞質は PRDX1 および 2 に弱陽性から陽性を示した (Figure 1-14 A, B)。犬の皮膚形質細胞腫における PRDX1 および 2 の IHC スコアの平均は、それぞれ 3.00 (SD±2.28), 0.203 (SD±0.472)

であった。

### 3-8. 犬皮膚組織球腫

犬皮膚組織球腫では、腫瘍細胞の核および細胞質は、PRDX1 に弱陽性を示した (Figure 1-15 A)。また、腫瘍細胞は PRDX2 に陰性を示した (Figure 1-15 B)。犬皮膚組織球腫における PRDX1 および 2 の IHC スコアの平均値は、それぞれ 4.67 (SD±1.27), 2.65 (SD±2.23) であった。

### 3-9. 線維肉腫

線維肉腫において、腫瘍細胞の核は PRDX1 に陰性から弱陽性を、PRDX2 に陽性を示した。細胞質は、PRDX1 および 2 に弱陽性を示した (Figure 1-16 A, B)。線維肉腫における PRDX1 の IHC スコアの平均値は 3.18 (SD±1.14), PRDX2 の平均値は 4.15 (SD±2.34) であった。

### 3-10. 血管内皮性腫瘍

血管内皮細胞由来の腫瘍として、良性腫瘍である海綿状血管腫 (n=26) および悪性腫瘍である血管肉腫 (n=65) において、PRDX1 および 2 の発現を観察した。詳細については、第 2 章で述べた。

#### IV. 考察

PRDX は、ほとんど全ての真核生物が有する抗酸化酵素であり、それらのアミノ酸配列の相同性は、哺乳類のみならず、あらゆる真核生物において、非常に高度に保存されている (124)。そのため、PRDX は、真核細胞において、必要不可欠な機能を果たしていると考えられる (127)。以前、我々の研究室は、犬の血管肉腫における PRDX6 の過剰発現が、腫瘍細胞に対してアポトーシス保護作用を示すことを報告した (6)。PRDX6 は、PRDX の中でも特徴的なアイソフォームで、ペルオキシダーゼ活性の他にも、カルシウム非依存性ホスホリパーゼ A2 活性を有している (13)。検索の限りでは、PRDX6 と犬の腫瘍の報告はこの 1 例のみであり、さらに他の PRDX アイソフォームに関しては、犬の腫瘍における情報は無いのが現状である。

ヒトを含む哺乳類において、PRDX1 および 2 のアミノ酸配列は、非常に高い相同性を示す (96)。さらに、PRDX1 および 2 の機能的な重要性を考慮すると、各組織におけるそれらの局在は、哺乳類間で類似していると考えられる。しかし、マウス、ラットなどの実験動物として一般的に用いられている哺乳類を除いて、ヒトと動物の全身組織における PRDX1 および 2 の発現の局在を比較した研究はない (33, 67, 70, 84, 87, 93, 106, 113, 130, 190, 199, 203)。そのため、本研究では PRDX のアイソフォームの中でも、典型 2-Cys 型に分類される PRDX1 および 2 について解析した。免疫組織化学的に検索する際に、抗体の特異性、特に市販の抗ヒト分子抗体を用いた場合の犬の分子との交差性の確認が必須であるため、最初に、ウェスタンブロット法を用いて、抗ヒト PRDX1 および 2 抗体の、犬の相当する分子への交差反応性を確認した。抗ヒト PRDX1 および 2 抗体を用いたウェスタンブロット法では、犬の血管肉腫由来の細胞株 Re12 から抽出したタンパク質液から、HeLa 細胞株から抽出した標本と同様の分子量の位置に、明瞭な単一のバンドが検出された。このことから、本研究で用いた抗ヒト PRDX1 および 2 抗体は、犬においても、ヒトの PRDX1 および 2 に相当する分子を検出することができると考えられた。そこで、引き続

き、これらの抗ヒト PRDX1 および 2 抗体を用いて、犬の組織標本を免疫組織化学的に解析した。全体的に、PRDX1 および 2 は、広く上皮細胞に発現している傾向があった。間葉系の細胞は、陰性のものから陽性のものまで様々であった。犬の皮膚において、PRDX1 および 2 は、表皮や毛包の扁平上皮細胞やアポクリン汗腺の様な分泌上皮細胞などで陽性を示した。これらの結果は、ラットの皮膚における報告と一致する (93)。アポクリン汗腺の分泌上皮は、一貫して PRDX1 および 2 に強く陽性を示した。一方で、アポクリン汗腺が特殊化した腺である乳腺上皮細胞は、PRDX1 が強陽性であったものの、PRDX2 には陰性を示した。この乳腺上皮細胞の PRDX1 の染色性は、ヒトの乳腺上皮細胞の報告と一致していた (31)。乳腺上皮細胞の染色性は、泌乳期の活性化した状態あるいは休止期の不活性化状態でも差はなかったことから、ホルモンなどの影響は考えにくく、産生する分泌物の違い等が反映されている可能性があり、興味深い点と考えられる。

ヒトやラットと同様に、クッパー細胞を含むマクロファージの細胞質は、一貫して PRDX1 に陽性を示し、赤血球は PRDX2 に陽性を示した (83, 106, 113, 130)。PRDX1 は、急性炎症の際、マクロファージを酸化ストレスから保護するだけでなく、マクロファージからのプロスタグランジン D2 および E2 の産生を促進し、炎症カスケードの進行に寄与している (69)。また、マクロファージに発現する PRDX1 は、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路等の活性化によって制御され、マクロファージの細菌貪食能を促進し、*Mycobacterium* 属菌などの細胞内寄生細菌のマクロファージ内での生存を抑制することが報告されている (186)。従って、PRDX1 は、感染防御に関与するマクロファージにおいて、それ自身を酸化ストレスから保護するのみならず、いくつかの感染防御メカニズムの制御を担っていることが示唆されている。また、赤血球における PRDX2 の発現は、 $H_2O_2$  による酸化ストレスから赤血球を保護し、その変形能の維持に寄与している (121, 131)。さらに、PRDX2 は、赤血球の膜タンパク質の恒常性の維持を担い、赤血球の老化を抑制している (104)。マウスにおいても、PRDX2 が赤血球のタンパク質の酸化を制御し、溶血等を防いでいる、と報告されている (94)。その発現性から、PRDX2 は、犬の赤血

球においても、酸化ストレスからの保護に加え、その恒常性の維持や老化の遅延に関与している可能性が十分に考えられる。

腎臓では、ヒトと同様に、糸球体は PRDX1 および 2 に陰性を示したが、尿細管および集合管の細胞質は、弱陽性から陽性を示した。(31)。尿細管上皮は、ミトコンドリアを豊富に有しており、 $H_2O_2$  などに誘導される酸化ストレスに対して、非常に脆弱であることが知られている(37, 50, 100)。酸化ストレスに対応するため、特に PRDX3 および 6 が、尿細管上皮のミトコンドリアで高発現している(31)。ヒトにおいても、尿細管の細胞質における PRDX1 および 2 の発現の意味を解析、考察した研究はないものの、細胞質における酸化ストレスの軽減を担っている可能性が考えられる。

また、正常なヒトの肝臓において、PRDX1 は肝細胞で微弱な発現を示すが、PRDX2 は肝細胞で非常に強く発現することが報告されている(31)。本研究では、犬の肝臓で、PRDX1 は肝細胞に強陽性を示し、PRDX2 は弱陽性から陽性を示した。肝臓は、糖質やアミノ酸、脂質といった栄養素から、薬物やアルコールなどの化学物質の代謝といった、生体内の多くの代謝を担っている(65, 138, 152)。PRDX1 および 2 は、肝臓において、これらの代謝経路の一部を担っている。例えば、PRDX1 はグルコースや銅の代謝に、PRDX2 はエタノールの代謝などにそれぞれ関与していると報告されている(24, 107, 149)。今回の研究で得られた犬の肝臓における PRDX1 および 2 の発現は、ヒトの肝臓での報告とはやや異なるものの、肝臓の代謝メカニズムに関与している可能性が考えられる。

本研究の結果に基づいて考えると、いくつかの例外はあるものの、哺乳類における PRDX1 および 2 の局在は一致しており、そのことから、PRDX1 および 2 の発現は普遍的で、様々な生物間で類似した機能を有している可能性が示唆される(31)。

以上より、本研究では、情報がなかった犬の正常組織における PRDX1 および 2 の発現情報を、限られた臓器・組織であるが、明らかにできた。今後、必要に応じ、その他の臓器での発現状況

の検索が望まれる。

犬の毛包腫瘍に関して、毛芽腫および毛包上皮腫においても、PRDX1 および 2 の発現が観察された。PRDX1 に関しては、毛包上皮腫における PRDX1 の発現と比較して、毛芽腫における PRDX1 の発現が有意に高かった。正常な毛包は、ROS の濃度上昇によってその発生や分化が促進され、毛包のサイクルが進行することが知られており (51, 53, 99, 154, 168), その濃度調節が重要となる。毛包組織は、PRDX を発現させることで、ROS の濃度を正常範囲内に調節するが、過剰な ROS の産生や、それに続発する PRDX の過剰発現によって、腫瘍発生が促進されている可能性が考えられる。しかし、腫瘍の種類によってその発現に差がある理由やメカニズム等是不明であり、これまで、ヒトや犬を含めた動物に関して、毛包性腫瘍における PRDX の発現について調査した報告はほとんどなく、今後は、PRDX 1 や 2 以外のアイソフォームの発現の情報を含めた詳細な解析が必要である。

犬の扁平上皮癌は、皮膚や口腔に好発する悪性上皮性腫瘍の一つである (180)。今回の研究では、皮膚および口腔扁平上皮癌における PRDX1 および 2 の発現を評価したが、非腫瘍性の扁平上皮と比較して、腫瘍組織における PRDX1 および 2 の発現に、明確な差はなかった。一方、腫瘍の発生部位の違いで PRDX1 および 2 の発現の差を解析したところ、皮膚扁平上皮癌と比較して、口腔扁平上皮癌で、PRDX1 の発現が有意に高かった。ヒトの扁平上皮癌においては、PRDX1 の過剰発現の報告が多く、腫瘍の発生や増殖、腫瘍細胞の遊走や浸潤の促進、アポトーシスの抑制、再発などに関与していることが示唆されている (46, 129, 165, 188)。さらに、ヒトの口腔扁平上皮癌においては、PRDX1 の高発現は、予後不良因子であると報告されている (158)。その一方で、PRDX1 は、ヒトの扁平上皮癌において腫瘍抑制的な役割を果たすという報告もあり (60), PRDX1 の発現と扁平上皮癌の悪性度に関しては議論の余地がある。犬の場合、口腔扁平上皮癌は、皮膚扁平上皮癌と比較してリンパ節転移しやすく、より悪性度が高いとされる (122)。したがって、犬の口腔扁平上皮癌における PRDX1 の発現は、ヒトの口腔扁平上皮癌と同様に、遠隔

転移を含めた、高い悪性度に関与している可能性がある。犬の扁平上皮癌における PRDX1 の発現に関して、予後との関連など、さらなる調査が必要である。

犬の乳腺腫瘍において、腺上皮由来腫瘍細胞における PRDX1 の発現は、組織病理学的診断の間で有意な差はなかった。しかし、非腫瘍性の乳腺上皮における PRDX1 の発現と比較すると、乳腺単純癌、乳腺複合腺腫/複合癌で有意に低い値が得られた。ヒトの乳腺腫瘍においては、今回の犬の乳腺腫瘍で得られた結果とは反対に、腫瘍において PRDX1 の発現が上昇していると報告されており、ヒトの乳腺腫瘍における腫瘍細胞の悪性化や、浸潤や転移などに関与する膠原線維などの細胞外基質のリモデリングに関与することが知られている (9, 22)。その一方、食道扁平上皮癌や甲状腺癌などにおいては、対応する正常組織と比較して、PRDX1 の発現は低下しており、PRDX1 の腫瘍抑制的役割が示唆されている (60, 128, 187)。特に雌犬においては、乳腺腫瘍は高頻度に発生する腫瘍の一つとして知られており、中でも単純癌は病理組織学的にヒトの乳がんと類似するため、ヒトの乳腺腫瘍の基礎および臨床研究のモデルとしても期待されている (1, 126, 144, 153)。また、ヒトと犬の乳腺腫瘍において、同様の分子機構がいくつか確認されており、このことから、ヒトと犬の乳腺腫瘍が類似していることが伺える。一方で、近年、ヒトと犬の乳腺腫瘍における遺伝子やタンパク質などの発現の違いも発見されており (16, 18, 98)、特に犬の乳腺腫瘍では、筋上皮細胞由来の腫瘍細胞が顕著に増殖する組織型がみられるなど、ヒトとは大きく異なる点も存在する。また、PRDX1 とは反対に、犬の乳腺腫瘍における PRDX2 の発現は、非腫瘍性乳腺組織と比較して上昇していた。特に、悪性腫瘍である癌でその差が顕著であり、PRDX2 の発現が、犬の乳腺腫瘍の発生や腺上皮由来腫瘍細胞の悪性化に関与している可能性が示唆された。

犬の尿路上皮に関連する病変として、線維上皮性ポリープ、移行上皮乳頭腫、移行上皮癌における PRDX1 および 2 の発現について調査した。非腫瘍性の移行上皮は、PRDX1 および 2 に陽性を示し、これはポリープおよび尿路上皮腫瘍において大きな差はなかった。また、PRDX1 および

2 の発現は、ポリープまたは腫瘍間、また腫瘍の悪性度の間で有意な差はなかった。さらに、特に移行上皮癌において、その発生部位間での PRDX1 および 2 の発現を比較したが、有意な差はみられなかった。ヒトの尿路上皮腫瘍、特に移行上皮癌においては、PRDX1 の発現の上昇と、腫瘍の発生や悪性化、再発との関連が報告されており (143)、今回の研究において、犬の移行上皮癌では、正常な移行上皮細胞と比較して、PRDX1 および 2 の発現の有意な上昇は観察されなかったものの、特に膀胱以外に発生する移行上皮癌については、さらに検体数を増やした調査が必要と考えられる。

リンパ節においては、PRDX2 は、リンパ濾胞、傍皮質領域を問わず陰性であったものの、PRDX1 はリンパ濾胞では陽性を示し、T 細胞領域である傍皮質領域では陰性を示した。B 細胞性リンパ腫では、PRDX1 に陽性を、PRDX2 には陰性を示し、非腫瘍性のリンパ球と同様の染色性であったが、T 細胞性リンパ腫の腫瘍細胞は、正常リンパ節の T 細胞とは異なり、PRDX1 が陽性を示した。この T 細胞性リンパ腫の腫瘍細胞の PRDX1 の発現の変化は、腫瘍化による可能性が高く、PRDX1 の T 細胞が主体を占める傍濾胞領域の過形成と腫瘍性変化との鑑別マーカーとしての有用性が期待された。今後は、特に傍濾胞領域の過形成と鑑別が必要な、T 細胞領域の高分化型リンパ腫の症例を収集し、詳細な解析が必要と思われる。また、B 細胞性リンパ腫と T 細胞性リンパ腫間での、PRDX1 および 2 の発現に有意な差は観察されなかった。ヒトの濾胞性リンパ腫において、PRDX1 から 6 の総発現量が、患者の生存率に関連すると報告されており (140)、犬のリンパ腫においても、PRDX の他のアイソフォームの発現を合わせた解析を実施していく必要が考えられる。

ヒトではほとんど発生しないが、犬で多くの発生がみられる腫瘍として、肥満細胞腫が挙げられる (136, 181)。犬の肥満細胞腫は、組織学的なグレード分類と予後に密接な関係があり、現在、Patnaik 分類 (Grade I -III) (135) と Kiupel 分類 (High grade, Low grade) (86) が用いられている。犬の肥満細胞腫において、組織学的グレード間で、PRDX1 の発現に有意な差はなかった。

一方、PRDX2 の発現は、Grade II と比較して Grade III の肥満細胞腫で、また Low grade と比較して High grade の肥満細胞腫で有意に高かった。マウスにおいて、肥満細胞からのヒスタミンの放出は、チオレドキシン（Thioredoxin, 以下 TRX）1 による ROS 濃度の制御およびそれに関連するレドックス制御によって調節されていることが報告されている（163）。TRX は、PRDX と協同してレドックス制御を担う抗酸化酵素として知られているため（8, 125）、PRDX2 を含めた PRDX の各アイソフォームも TRX と同様、肥満細胞からのヒスタミン放出の調節に関与している可能性が考えられる。さらに、PRDX2 の過剰発現は、ヒトの様々な腫瘍において、腫瘍細胞の発生や悪性化に関与していることが報告されている（26, 39, 139）。今回の研究では、PRDX2 は、より悪性度の高い肥満細胞腫で高発現していることが示された。正常な肥満細胞のレドックス制御を担うために発現している PRDX2 が、ROS を含めた何らかの刺激により過剰となり、肥満細胞における腫瘍発生およびその悪性化を誘発した可能性がある。

犬の皮膚形質細胞腫において、腫瘍細胞は PRDX1 に陽性を、PRDX2 に陰性を示した。また、犬皮膚組織球腫において、腫瘍細胞は PRDX1 および 2 に陽性を示した。ヒトの形質細胞は、小胞体での免疫グロブリン産生の際、多数のジスルフィド結合を形成し、それに関連した多量の ROS の産生に対応するため、PRDX1 を豊富に発現するという報告がされている（33）。犬の形質細胞でも同様のメカニズムが働いており、PRDX1 の発現がみられたと考えられる。

ヒトに発生する悪性腫瘍は、その多くが上皮性細胞由来の腫瘍であり、非上皮性細胞由来の肉腫の発生は比較的少ない（4, 63, 66, 89）。しかし、犬における肉腫の発生は多く（19, 48, 161）、ヒトの肉腫の研究モデルとして期待されている。本研究では、犬の線維肉腫において、PRDX1 および 2 の発現を解析した。犬の非腫瘍性組織において、線維芽細胞は PRDX1 に陽性を、PRDX2 に陰性から陽性を示した。また、線維肉腫においても、PRDX1 および 2 の発現は観察され、非腫瘍性の線維芽細胞と比較して、顕著な差はみられなかった。しかし、少ないながらもされているヒトの骨に発生した線維肉腫における研究では、腫瘍組織での PRDX1 の過剰発現が観察され、

腫瘍の進行と遠隔転移を抑制することが報告されている (176)。しかし、本研究における犬の線維肉腫の PRDX1 および 2 の発現は、非腫瘍性の線維芽細胞における PRDX1 および 2 の発現と同程度であった。これらのことから、少なくとも PRDX1 の発現は、ヒトと犬の線維肉腫で、異なる役割を果たしている可能性が考えられる。

今回の研究で、これまで不明であった犬の正常組織および腫瘍における PRDX1 および 2 の発現の情報が得られた。犬の腫瘍の中には、ヒトの腫瘍モデルとして期待されているものも多く、今回得られた犬の腫瘍における PRDX1 および 2 の発現情報は、ヒトの腫瘍における PRDX1 および 2 の発現と比較し、発現の同一性や差を検討することで、腫瘍発生や悪性化等の新たな腫瘍メカニズムの解明に役立つことが期待できる。今後、本研究における犬の各腫瘍における PRDX1 および 2 の発現様式の結果をもとに、腫瘍発生メカニズムへの PRDX の関与の解明や、予後や治療効果との関連、さらにはヒトやその他の動物との比較など、より精密な解析の一助となれば幸いである。

## V. 小括

本章では、これまで報告がなかった犬の正常組織における PRDX1 および 2 の発現の情報を、免疫組織化学的に収集および解析した。正常組織において、表皮の扁平上皮細胞や毛包、皮脂腺、アポクリン汗腺などの上皮性細胞で、PRDX1 および 2 の強い発現が観察された。乳腺組織においては、乳腺上皮細胞は、その活性状態にかかわらず、PRDX1 に陽性を、PRDX2 に陰性を示した。血管の内皮細胞は、いずれにも陰性を示した。また、脾臓、脾臓、腎臓、肝臓の組織における PRDX1 および 2 の発現も観察した。脾臓では、PRDX1 はリンパ球や赤芽球を含む赤血球系細胞に、PRDX2 は赤血球系細胞に発現していた。腎臓では尿細管上皮で、肝臓では肝細胞および胆管上皮で、PRDX1 および 2 の発現が観察された。膀胱移行上皮は PRDX1 に強く陽性を、PRDX2 には陰性を示した。これまで、ヒトやマウス、ラットなどの実験動物の一部の正常組織における PRDX の発現の情報はいくつか報告されており、わずかな例外はあるものの、今回の犬の正常組織における PRDX1 および 2 の発現性は、それらの報告と一致していた。哺乳類における PRDX のアミノ酸配列の相同性が高いことや、PRDX1 および 2 の局在がヒトや犬の間で比較的保存されていることを考慮すると、犬における PRDX1 および 2 は、ヒトと類似または一致した機能を有している可能性が十分に考えられる。

さらに犬の自然発生腫瘍における PRDX1 および 2 の発現について検索した。毛包系腫瘍や扁平上皮癌、乳腺腫瘍、ポリープを含む移行上皮性腫瘍などの上皮性細胞由来の腫瘍においては、PRDX1 および 2 の強い発現が観察された。扁平上皮癌では、口腔扁平上皮癌の方が、皮膚扁平上皮癌に比較して、陽性スコアが高かった。一般的に犬では、口腔扁平上皮癌は皮膚の扁平上皮癌より予後が悪いとされるので、口腔扁平上皮癌における PRDX1 の発現亢進は、悪性化に関与している可能性が考えられた。リンパ腫や皮膚肥満細胞腫、皮膚形質細胞腫、犬皮膚組織球腫などの血球系細胞の腫瘍は、PRDX1 には比較的陽性を示した一方、PRDX2 には陰性を示すもの

が多かった。肥満細胞腫では、Grade が高いもので、PRDX2 の陽性スコアが高かったことより、悪性化への PRDX2 の関与が疑われた。さらに、リンパ節において、T 細胞領域である傍濾胞領域で陰性となる PRDX1 が、T 細胞性リンパ腫では陽性を示すことが明らかとなり、PRDX 1 は腫瘍と過形成を鑑別するマーカーの候補となりうることが示唆された。線維肉腫においては、PRDX1 および 2 の発現を認めたが、正常な線維芽細胞と大差は見られなかった。犬の各腫瘍における PRDX1 および 2 の発現を、ヒトの腫瘍の報告と比較したところ、扁平上皮癌などの様に、ヒトでの報告と一致する腫瘍も見出された。しかし、乳腺腫瘍や線維肉腫など、ヒトにおける報告とは異なる腫瘍も存在し、ヒトと犬の腫瘍において、PRDX1 および 2 が異なる関連メカニズムを有している可能性が示唆された。今後は、今回の研究でヒトとの相違がみられた腫瘍はもちろん、ヒトでの発生が少ない肉腫などの検体数を増やし、犬の腫瘍における PRDX の発現情報をさらに蓄積していくことが重要と考えられる。

## 第 1 章

### 图表

Table 1-1. Individual information of dogs with follicular tumors.

| Tumor             | No. | Breed                | Age     |       | Sex             | Primary site   |
|-------------------|-----|----------------------|---------|-------|-----------------|----------------|
|                   |     |                      | year    | month |                 |                |
| Trichoblastoma    | 1   | Bichon Frise         | 7       | 7     | Female, spayed  | Skin, mandible |
|                   | 2   | Bichon Frise         | 10      | 6     | Female, spayed  | Skin, cheek    |
|                   | 3   | Chihuahua            | Unknown |       | Male            | Skin, neck     |
|                   | 4   | Shih Tzu             | 7       | 3     | Female          | Skin, forelimb |
|                   | 5   | Shih Tzu             | 8       |       | Male, castrated | Skin, neck     |
|                   | 6   | Toy Poodle           | 6       | 10    | Female          | Skin           |
|                   | 7   | Toy Poodle           | 8       | 10    | Female, spayed  | Skin, head     |
|                   | 8   | Toy Poodle           | 10      | 5     | Female          | Skin, neck     |
|                   | 9   | Toy Poodle           | 10      | 11    | Male, castrated | Skin, cheek    |
|                   | 10  | Yorkshire Terrier    | 8       | 10    | Male, castrated | Skin, neck     |
| Trichoepithelioma | 1   | Beagle               | 6       | 1     | Female          | Skin           |
|                   | 2   | Bernese Mountain Dog | 5       | 7     | Female          | Skin, back     |
|                   | 3   | Boxer                | 8       | 10    | Male, castrated | Skin           |
|                   | 4   | Golden Retriever     | 6       | 8     | Female          | Skin, anus     |
|                   | 5   | Golden Retriever     | 11      | 7     | Female, spayed  | Skin           |
|                   | 6   | Miniature Dachshund  | 13      | 7     | Female, spayed  | Skin, thigh    |
|                   | 7   | Miniature Schnauzer  | 9       | 11    | Male            | Skin, back     |
|                   | 8   | Miniature Schnauzer  | 11      | 2     | Male            | Skin, back     |
|                   | 9   | Shih Tzu             | 5       | 10    | Male            | Skin, thigh    |
|                   | 10  | Toy Poodle           | 12      | 3     | Male, castrated | Skin           |

**Table 1-2. Individual information of dogs with squamous cell carcinoma.**

| No. | Breed                      | Age  |       | Sex             | Primary site        |
|-----|----------------------------|------|-------|-----------------|---------------------|
|     |                            | year | month |                 |                     |
| 1   | Beagle                     | 12   |       | Female, spayed  | Skin, neck          |
| 2   | Beagle                     | 14   | 10    | Female, spayed  | Skin, shoulder      |
| 3   | Chihuahua                  | 12   | 5     | Female          | Oral cavity         |
| 4   | Golden Retriever           | 10   |       | Female, spayed  | Skin, neck          |
| 5   | Golden Retriever           | 13   | 8     | Male            | Skin, pinna         |
| 6   | Miniature Dachshund        | 14   |       | Male, castrated | Oral cavity         |
| 7   | Papillon                   | 11   |       | Male            | Oral cavity         |
| 8   | Shiba Inu                  | 8    | 4     | Male, castrated | Skin, abdomen       |
| 9   | Shiba Inu                  | 12   |       | Male            | Oral cavity         |
| 10  | Shiba Inu                  | 14   | 2     | Male            | Oral cavity         |
| 11  | Shiba Inu                  | 14   | 4     | Male            | Oral cavity         |
| 12  | Shiba Inu                  | 14   | 6     | Female, spayed  | Skin                |
| 13  | Shiba Inu                  | 15   | 4     | Male, castrated | Skin, digit         |
| 14  | Shiba Inu                  | 15   | 5     | Female          | Skin, lower abdomen |
| 15  | Shih Tzu                   | 12   | 0     | Male            | Skin                |
| 16  | Shih Tzu                   | 16   |       | Female          | Skin                |
| 17  | Toy Poodle                 | 11   | 10    | Female, spayed  | Oral cavity         |
| 18  | Yorkshire Terrier          | 17   | 8     | Female          | Skin, hip to thigh  |
| 19  | Mix (Toy Poodle×Dachshund) | 13   | 5     | Female, spayed  | Skin, thorax        |

Table 1-3. Individual information of dogs with mammary simple adenoma/carcinoma.

| Tumor                    | No. | Breed                    | Age  |       | Sex            |
|--------------------------|-----|--------------------------|------|-------|----------------|
|                          |     |                          | year | month |                |
| Mammary simple adenoma   | 1   | Chihuahua                | 11   | 3     | Female, spayed |
|                          | 2   | Chihuahua                | 12   | 7     | Female         |
|                          | 3   | French Bulldog           | 11   | 0     | Female, spayed |
|                          | 4   | Italian Greyhound        | 11   |       | Female, spayed |
|                          | 5   | Miniature Dachshund      | 9    | 7     | Female         |
|                          | 6   | Miniature Dachshund      | 11   | 0     | Female, spayed |
|                          | 7   | Miniature Dachshund      | 11   | 5     | Female         |
|                          | 8   | Miniature Dachshund      | 17   | 5     | Female, spayed |
|                          | 10  | Pomeranian               | 10   | 7     | Female         |
|                          | 11  | Toy Poodle               | 5    | 3     | Female         |
|                          | 12  | Toy Poodle               | 6    | 3     | Female         |
|                          | 13  | Toy Poodle               | 6    | 11    | Female         |
|                          | 14  | Toy Poodle               | 8    | 1     | Female, spayed |
|                          | 15  | Toy Poodle               | 9    |       | Female         |
|                          | 16  | Toy Poodle               | 10   | 8     | Female, spayed |
|                          | 17  | Toy Poodle               | 11   | 10    | Female         |
|                          | 18  | Toy Poodle               | 13   |       | Female, spayed |
|                          | 19  | Yorkshire Terrier        | 10   | 1     | Female         |
|                          | 9   | Mix                      | 10   |       | Female         |
|                          | 20  | Unknown                  | 11   |       | Female, spayed |
| Mammary simple carcinoma | 1   | Border Collie            | 15   | 4     | Female         |
|                          | 2   | Chihuahua                | 9    |       | Female, spayed |
|                          | 3   | Chihuahua                | 11   | 8     | Female         |
|                          | 4   | Chihuahua                | 13   | 5     | Female         |
|                          | 5   | Chihuahua                | 15   | 8     | Female, spayed |
|                          | 6   | Dobermann                | 7    | 7     | Female         |
|                          | 7   | Maltese                  | 13   | 10    | Female, spayed |
|                          | 8   | Toy Poodle               | 9    | 9     | Female, spayed |
|                          | 9   | Toy Poodle               | 11   | 5     | Female         |
|                          | 10  | Toy Poodle               | 11   |       | Female         |
|                          | 11  | Toy Poodle               | 13   |       | Female, spayed |
|                          | 12  | Welsh Corgi Pembroke     | 9    | 1     | Female         |
|                          | 13  | Welsh Corgi Pembroke     | 13   | 11    | Female, spayed |
|                          | 14  | Welsh Corgi Pembroke     | 14   |       | Female, spayed |
|                          | 15  | Yorkshire Terrier        | 9    | 11    | Female         |
|                          | 16  | Mix (Toy Poodle×Maltese) | 11   | 4     | Female         |
|                          | 17  | Mix                      | 12   | 2     | Female, spayed |
|                          | 18  | Unknown                  | 9    |       | Female         |
|                          | 19  | Unknown                  | 10   |       | Female         |
|                          | 20  | Unknown                  | 13   | 9     | Female, spayed |

Table 1-4. Individual information of dogs with mammary complex adenoma/carcinoma and mammary mixed tumor.

| Tumor                         | No. | Breed                    | Age     |       | Sex            |
|-------------------------------|-----|--------------------------|---------|-------|----------------|
|                               |     |                          | year    | month |                |
| Mammary complex adenoma       | 1   | Boston Terrier           | 7       | 4     | Female         |
|                               | 2   | Chihuahua                | 14      | 7     | Female, spayed |
|                               | 3   | Maltese                  | 10      | 7     | Female         |
|                               | 4   | Miniature Dachshund      | 9       | 6     | Female         |
|                               | 5   | Miniature Dachshund      | 9       |       | Female         |
|                               | 6   | Miniature Pinscher       | 6       | 11    | Female         |
|                               | 7   | Shih Tzu                 | 10      | 6     | Female         |
|                               | 8   | Toy Poodle               | 11      | 10    | Female         |
|                               | 9   | Yorkshire Terrier        | 8       | 9     | Female         |
|                               | 10  | Unknown                  | 12      |       | Female, spayed |
| Mammary complex carcinoma     | 1   | Chihuahua                | 14      | 7     | Female, spayed |
|                               | 2   | Miniature Dachshund      | 9       | 5     | Female         |
|                               | 3   | Miniature Dachshund      | 9       | 9     | Female, spayed |
|                               | 4   | Miniature Dachshund      | 13      | 9     | Female         |
|                               | 5   | Miniature Dachshund      | 13      | 10    | Female, spayed |
|                               | 6   | Miniature Dachshund      | Unknown |       | Female         |
|                               | 7   | Miniature Dachshund      | Unknown |       | Female, spayed |
|                               | 8   | Toy Poodle               | 8       | 7     | Female, spayed |
|                               | 9   | Yorkshire Terrier        | 12      | 11    | Female         |
|                               | 10  | Mix                      | 8       |       | Female         |
| Mammary benign mixed tumor    | 1   | Kaninchen Dachshund      | 8       | 0     | Female         |
|                               | 2   | Miniature Dachshund      | 8       |       | Female         |
|                               | 3   | Miniature Dachshund      | 14      |       | Female, spayed |
|                               | 4   | Shiba Inu                | 13      |       | Female, spayed |
|                               | 5   | Toy Poodle               | 5       | 6     | Female         |
|                               | 6   | Toy Poodle               | 6       | 11    | Female         |
|                               | 7   | Toy Poodle               | 8       | 2     | Female         |
|                               | 8   | Toy Poodle               | 8       | 6     | Female         |
|                               | 9   | Toy Poodle               | 9       |       | Female, spayed |
|                               | 10  | Toy Poodle               | 10      | 5     | Female         |
| Mammary malignant mixed tumor | 1   | Chihuahua                | 12      | 2     | Female, spayed |
|                               | 2   | Miniature Dachshund      | 12      | 3     | Female, spayed |
|                               | 3   | Miniature Dachshund      | 15      | 7     | Female         |
|                               | 4   | Papillon                 | 12      |       | Female         |
|                               | 5   | Toy Poodle               | 8       | 6     | Female         |
|                               | 6   | Toy Poodle               | 8       | 7     | Female, spayed |
|                               | 7   | Toy Poodle               | 10      | 5     | Female         |
|                               | 8   | Welsh Corgi Pembroke     | Unknown |       | Female         |
|                               | 9   | Mix (Maltese×Toy Poodle) | 12      | 5     | Female, spayed |
|                               | 10  | Unknown                  | 13      | 7     | Female         |

**Table 1-5. Individual information of dogs with fibroepithelial polyp and transitional cell tumors.**

| Tumor/poly                  | No. | Breed                       | Age     |       | Sex             | Primary site     |
|-----------------------------|-----|-----------------------------|---------|-------|-----------------|------------------|
|                             |     |                             | year    | month |                 |                  |
| Fibroepithelial polyp       | 1   | English Cocker Spaniel      | 3       | 8     | Male            | Bladder          |
|                             | 2   | Unknown                     | 10      | 1     | Male            | Bladder          |
| Transitional cell papilloma | 1   | Chihuahua                   | 11      |       | Male, castrated | Bladder          |
|                             | 2   | Shiba Inu                   | 10      | 2     | Female, spayed  | Bladder          |
|                             | 1   | Chihuahua                   | 16      |       | Female          | Bladder          |
|                             | 2   | Chihuahua                   | Unknown |       | Male            | Bladder          |
|                             | 3   | Golden Retriever            | 10      | 3     | Male            | Kidney, pelvis   |
|                             | 4   | Jack Russell Terrier        | 8       |       | Male            | Bladder          |
|                             | 5   | Jack Russell Terrier        | 13      | 3     | Female          | Bladder          |
|                             | 6   | Jack Russell Terrier        | 13      |       | Female, spayed  | Bladder          |
|                             | 7   | Labrador Retriever          | 12      | 11    | Male, castrated | Bladder          |
|                             | 8   | Labrador Retriever          | 12      |       | Female, spayed  | Urethra          |
|                             | 9   | Miniature Dachshund         | 12      | 11    | Female, spayed  | Bladder          |
|                             | 10  | Miniature Dachshund         | 13      | 11    | Female, spayed  | Ureter           |
|                             | 11  | Miniature Dachshund         | 14      | 0     | Male, castrated | Bladder          |
|                             | 12  | Miniature Dachshund         | 14      |       | Female, spayed  | Bladder          |
|                             | 13  | Miniature Dachshund         | 15      |       | Female, spayed  | Bladder          |
|                             | 14  | Miniature Pinscher          | 8       | 8     | Female          | Bladder          |
| Transitional cell carcinoma | 15  | Miniature Pinscher          | 10      |       | Female          | Bladder          |
|                             | 16  | Miniature Pinscher          | 11      | 5     | Female, spayed  | Bladder          |
|                             | 17  | Pekingese                   | 10      |       | Male            | Bladder          |
|                             | 18  | Pomeranian                  | 7       | 8     | Male            | Prostate         |
|                             | 19  | Pomeranian                  | 8       | 10    | Male, castrated | Bladder          |
|                             | 20  | Pug                         | 10      | 9     | Male, castrated | Prostate         |
|                             | 21  | Pug                         | 11      | 1     | Male, castrated | Prostate         |
|                             | 22  | Pug                         | Unknown |       | Male, castrated | Bladder          |
|                             | 23  | Shetland Sheepdog           | 9       | 6     | Female          | Bladder          |
|                             | 24  | Shetland Sheepdog           | 11      | 1     | Female          | Bladder          |
|                             | 25  | Shiba                       | 15      | 4     | Female          | Bladder          |
|                             | 26  | Toy Poodle                  | 8       |       | Male            | Bladder          |
|                             | 27  | Toy Poodle                  | 8       |       | Male, castrated | Bladder          |
|                             | 28  | West Highland White Terrier | 10      | 8     | Female, spayed  | Bladder          |
|                             | 29  | Yorkshire Terrier           | 13      |       | Female, spayed  | Bladder          |
|                             | 30  | Mix (Shiba)                 | 12      |       | Female          | Abdominal cavity |
|                             | 31  | Mix                         | 11      | 8     | Female, spayed  | Bladder          |
|                             | 32  | Mix                         | 14      |       | Female, spayed  | Bladder          |

**Table 1-6. Individual information of dogs with lymphoma.**

| Tumor           | No. | Breed                     | Age     |       | Sex             | Primary site                    |
|-----------------|-----|---------------------------|---------|-------|-----------------|---------------------------------|
|                 |     |                           | year    | month |                 |                                 |
| B cell lymphoma | 1   | American Pit Bull Terrier | 8       |       | Female, spayed  | Popliteal lymph node            |
|                 | 2   | Border Collie             | 8       | 3     | Female, spayed  | Mandibular lymph node           |
|                 | 3   | Border Collie             | 12      | 9     | Male, castrated | Oral cavity                     |
|                 | 4   | Chihuahua                 | Unknown |       | Unknown         | Mandibular lymph node           |
|                 | 5   | Miniature Dachshund       | 14      | 2     | Male, castrated | Small intestine                 |
|                 | 6   | Miniature Dachshund       | Unknown |       | Unknown         | Popliteal lymph node            |
|                 | 7   | Shiba Inu                 | 8       | 9     | Male, castrated | Mandibular lymph node           |
|                 | 8   | Shiba Inu                 | 8       |       | Male            | Popliteal lymph node            |
|                 | 9   | Shiba Inu                 | 13      | 3     | Male            | Rectum                          |
|                 | 10  | Toy Poodle                | 10      | 7     | Female, spayed  | Skin                            |
|                 | 11  | Mix                       | 14      |       | Female, spayed  | Popliteal lymph node            |
|                 | 12  | Mix                       | 14      | 7     | Female, spayed  | Popliteal lymph node            |
|                 | 13  | Unknown                   | 11      |       | Male            | Popliteal lymph node            |
|                 | 14  | Unknown                   | 11      |       | Male            | Superficial cervical lymph node |
| T cell lymphoma | 1   | French Bulldog            | 11      | 0     | Male            | Lip                             |
|                 | 2   | French Bulldog            | 11      | 2     | Male, castrated | Mandibular lymph node           |
|                 | 3   | Golden Retriever          | 7       | 6     | Male            | Superficial cervical lymph node |
|                 | 4   | Italian Greyhound         | 13      | 5     | Male, castrated | Stomach                         |
|                 | 5   | Japanese Dog Breed        | 13      | 9     | Male, castrated | Bladder                         |
|                 | 6   | Shiba Inu                 | 11      | 2     | Female          | Skin, head                      |
|                 | 7   | Shiba Inu                 | 11      |       | Female, spayed  | Skin, back                      |
|                 | 8   | Shiba Inu                 | 12      | 6     | Male            | Jejunum                         |
|                 | 9   | Shih Tzu                  | 13      | 7     | Female          | Alimentary tract                |
|                 | 10  | Standard Poodle           | 10      | 11    | Female, spayed  | Skin                            |
|                 | 11  | Yorkshire Terrier         | 5       | 5     | Male            | Mesenteric lymph node           |
|                 | 12  | Yorkshire Terrier         | 13      | 6     | Female, spayed  | Skin, anus                      |
|                 | 13  | Mix                       | 5       |       | Male            | Mesenteric lymph node           |

Table 1-7. Individual information of dogs with cutaneous mast cell tumor.

| Grade (Patank/Kupel) | No. | Breed                | Age     |       | Sex             | Primary site                   |
|----------------------|-----|----------------------|---------|-------|-----------------|--------------------------------|
|                      |     |                      | year    | month |                 |                                |
| Grade I /Low grade   | 1   | Chihuahua            | 2       | 1     | Male, castrated | Dermis, elbow                  |
|                      | 2   | Chihuahua            | 4       |       | Male, castrated | Dermis, mammary gland          |
|                      | 3   | Chihuahua            | 11      | 7     | Male, castrated | Dermis, shoulder               |
|                      | 4   | French Bulldog       | 4       | 6     | Male            | Dermis                         |
|                      | 5   | Jack Russell Terrier | 12      | 9     | Female          | Dermis, lower abdomen          |
|                      | 6   | Pug                  | 11      | 7     | Female, spayed  | Dermis, genitalium             |
|                      | 7   | Pug                  | 13      | 1     | Female, spayed  | Dermis, digit                  |
|                      | 8   | Shiba Inu            | 7       | 7     | Male            | Dermis, crus                   |
|                      | 9   | Toy Poodle           | 5       | 11    | Female          | Dermis, elbow                  |
|                      | 10  | Toy Poodle           | 7       | 1     | Male, castrated | Dermis, thigh                  |
|                      | 11  | Toy Poodle           | 9       |       | Male, castrated | Dermis, neck                   |
|                      | 12  | Toy Poodle           | 11      | 3     | Female, spayed  | Dermis, back                   |
|                      | 13  | Toy Poodle           | 13      | 3     | Female, spayed  | Dermis, thorax                 |
|                      | 14  | Mix                  | 8       | 11    | Male            | Dermis, thigh                  |
|                      | 15  | Mix                  | Unknown |       | Male, castrated | Dermis                         |
|                      | 16  | Unknown              | 13      | 11    | Female          | Dermis, anus                   |
| Grade II /Low grade  | 1   | Chihuahua            | 11      | 7     | Male, castrated | Dermis to subcutis, backneck   |
|                      | 2   | Jack Russell Terrier | 12      | 11    | Male            | Subcutis, thigh                |
|                      | 3   | Jack Russell Terrier | 13      | 1     | Female, spayed  | Dermis to subcutis, thigh      |
|                      | 4   | Labrador Retriever   | 3       | 11    | Female, spayed  | Dermis to subcutis, forelimb   |
|                      | 5   | Maltese              | 3       | 2     | Female, spayed  | Dermis to subcutis, back       |
|                      | 6   | Maltese              | 5       |       | Female          | Subcutis, lip                  |
|                      | 7   | Schnauzer            | 6       | 9     | Female, spayed  | Subcutis, axilla               |
|                      | 8   | Shiba Inu            | 8       | 10    | Female, spayed  | Dermis to subcutis, head       |
|                      | 9   | Toy Poodle           | 3       | 4     | Female, spayed  | Dermis to subcutis, axilla     |
|                      | 10  | Toy Poodle           | 8       | 0     | Male, castrated | Dermis to subcutis             |
|                      | 11  | Toy Poodle           | 9       | 9     | Female          | Dermis to subcutis, lip        |
|                      | 12  | Toy Poodle           | 11      | 2     | Male, castrated | Subcutis, shoulder             |
|                      | 13  | Toy Poodle           | 11      | 10    | Female          | Dermis, forelimb               |
|                      | 14  | Toy Poodle           | 13      | 4     | Male, castrated | Dermis, thigh                  |
|                      | 15  | Yorkshire Terrier    | 11      | 4     | Female, spayed  | Dermis to subcutis, forelimb   |
|                      | 16  | Unknown              | 11      |       | Female, spayed  | Dermis to subcutis, thigh      |
|                      | 17  | Unknown              | 11      |       | Male            | Dermis, neck                   |
|                      | 18  | Unknown              | 14      |       | Male, castrated | Dermis to subcutis, hindlimb   |
| Grade II /High grade | 1   | French Bulldog       | 11      | 8     | Male, castrated | Dermis to subcutis, hindlimb   |
|                      | 2   | Japanese Dog Breed   | 10      | 3     | Female, spayed  | Dermis to subcutis, digit      |
|                      | 3   | Labrador Retriever   | 9       | 4     | Female, spayed  | Dermis to subcutis, anus       |
|                      | 4   | Labrador Retriever   | 9       | 10    | Male            | Dermis to subcutis, thigh      |
|                      | 5   | Labrador Retriever   | 11      | 5     | Female          | Dermis to subcutis, abdomen    |
|                      | 6   | Labrador Retriever   | 12      | 3     | Male            | Subcutis, toe                  |
|                      | 7   | Labrador Retriever   | 12      | 4     | Female, spayed  | Dermis to subcutis, lip        |
|                      | 8   | Miniature Schnauzer  | 12      | 1     | Male            | Dermis to subcutis, shoulder   |
|                      | 9   | Miniature Schnauzer  | 15      | 0     | Female          | Dermis to subcutis, genitalium |
|                      | 10  | Shiba Inu            | 12      | 4     | Male, castrated | Subcutis, thigh                |
|                      | 11  | Shiba Inu            | 12      | 11    | Male            | Dermis to subcutis, abdomen    |
|                      | 12  | Shiba Inu            | 13      | 0     | Female          | Dermis to subcutis             |
|                      | 13  | Shiba Inu            | 14      | 11    | Female, spayed  | Dermis to subcutis             |
|                      | 14  | Siberian Husky       | 5       |       | Male, castrated | Dermis to subcutis, hindlimb   |
|                      | 15  | Toy Poodle           | 9       | 2     | Female          | Dermis to subcutis, thigh      |
|                      | 16  | Toy Poodle           | 12      | 3     | Female, spayed  | Dermis to subcutis             |
|                      | 17  | Yorkshire Terrier    | 11      |       | Female, spayed  | Dermis to subcutis, lip        |
|                      | 18  | Yorkshire Terrier    | 13      | 2     | Male, castrated | Dermis to subcutis, thorax     |

**Table 1-8. Individual information of dogs with cutaneous plasmacytoma.**

| No. | Breed               | Age  |       | Sex             | Primary site                        |
|-----|---------------------|------|-------|-----------------|-------------------------------------|
|     |                     | year | month |                 |                                     |
| 1   | Chihuahua           | 8    | 2     | Unknown         | Dermis, paw pad                     |
| 2   | Chihuahua           | 9    | 1     | Male, castrated | Dermis to subcutis, neck            |
| 3   | Chihuahua           | 9    | 9     | Unknown         | Dermis, paw pad                     |
| 4   | Chihuahua           | 11   |       | Female, spayed  | Dermis, neck                        |
| 5   | Chihuahua           | 14   | 4     | Female, spayed  | Dermis, interdigital region         |
| 6   | French Bulldog      | 7    |       | Male            | Dermis, interdigital region         |
| 7   | Golden Retriever    | 11   | 9     | Female, spayed  | Dermis, pinna                       |
| 8   | Japanese Dog Breed  | 12   | 7     | Unknown         | Dermis, interdigital region         |
| 9   | Miniature Dachshund | 15   |       | Female          | Dermis                              |
| 10  | Shetland Sheepdog   | 12   | 8     | Female, spayed  | Adipose tissue, axilla              |
| 11  | Shiba Inu           | 9    | 4     | Male, castrated | Dermis to subcutis, neck and thorax |
| 12  | Shiba Inu           | 11   | 6     | Female, spayed  | Dermis, thigh                       |
| 13  | Toy Poodle          | 3    | 0     | Female          | Dermis to subcutis, thorax          |
| 14  | Toy Poodle          | 8    | 4     | Female, spayed  | Dermis, toe                         |
| 15  | Toy Poodle          | 11   | 1     | Male            | Dermis                              |
| 16  | Yorkshire Terrier   | 8    | 7     | Female          | Dermis, interdigital region         |
| 17  | Mix                 | 4    | 5     | Female, spayed  | Dermis to subcutis abdomen          |
| 18  | Mix                 | 9    | 7     | Male            | Dermis, lip                         |

**Table 1-9. Individual information of dogs with canine cutaneous histiocytoma.**

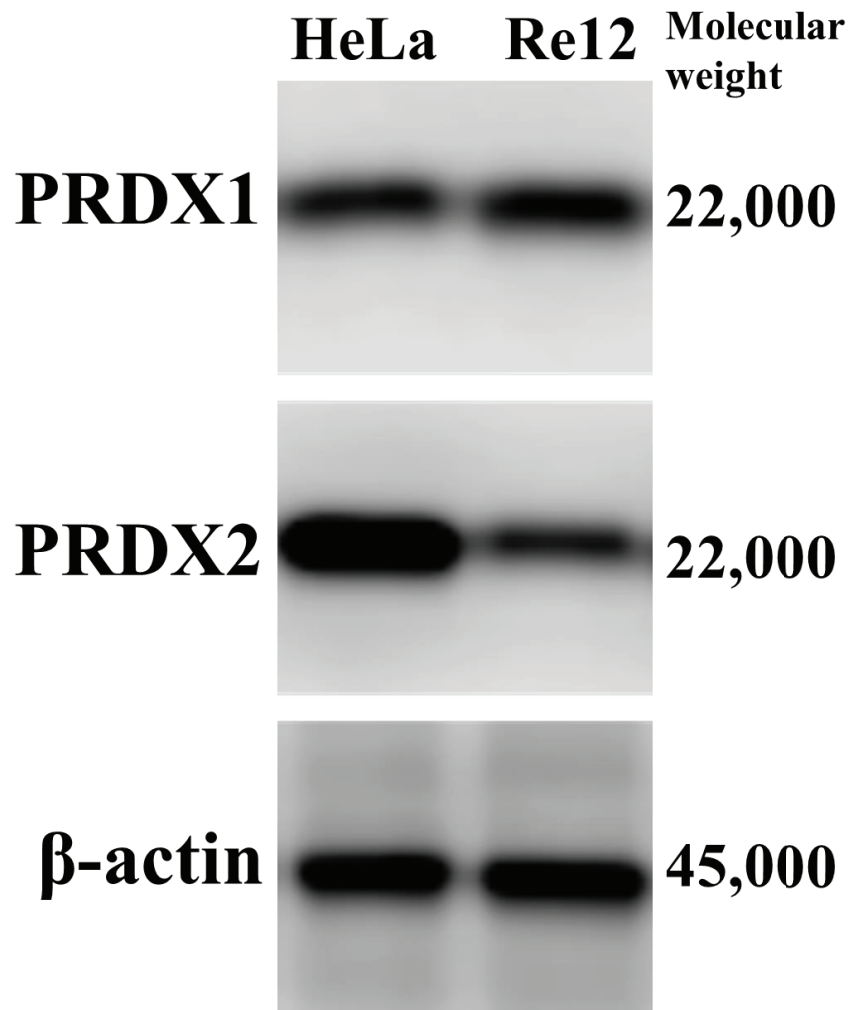
| No. | Breed                         | Age     |       | Sex             | Primary site          |
|-----|-------------------------------|---------|-------|-----------------|-----------------------|
|     |                               | year    | month |                 |                       |
| 1   | Boston Terrier                | 3       | 9     | Female, spayed  | Dermis, forelimb      |
| 2   | Cavalier King Charles Spaniel | 1       | 0     | Female          | Dermis, mandible      |
| 3   | French Bulldog                | 7       | 4     | Male, castrated | Dermis, mandible      |
| 4   | Jack Russell Terrier          | 9       |       | Female, spayed  | Dermis, pinna         |
| 5   | Miniature Dachshund           | 4       |       | Male, castrated | Dermis, mandible      |
| 6   | Miniature Dachshund           | 7       |       | Female          | Dermis                |
| 7   | Miniature Schnauzer           | 11      | 5     | Female, spayed  | Dermis                |
| 8   | Pug                           | 10      | 9     | Female, spayed  | Dermis, crus          |
| 9   | Shiba Inu                     | 1       | 8     | Male, castrated | Dermis                |
| 10  | Shiba Inu                     | 3       | 10    | Female, spayed  | Dermis, forelimb      |
| 11  | Shiba Inu                     | 7       | 10    | Male, castrated | Dermis                |
| 12  | Shiba Inu                     | 10      | 11    | Male, castrated | Dermis, mandible      |
| 13  | Toy Poodle                    | 3       | 0     | Male, castrated | Dermis                |
| 14  | Toy Poodle                    | 9       | 0     | Male            | Dermis, mandible      |
| 15  | Toy Poodle                    | 9       | 4     | Male, castrated | Dermis                |
| 16  | Mix                           | 2       | 8     | Male, castrated | Dermis, mammary gland |
| 17  | Mix                           | 9       | 2     | Female, spayed  | Dermis, hindlimb      |
| 18  | Mix                           | 9       |       | Female, spayed  | Dermis                |
| 19  | Mix                           | Unknown |       | Female, spayed  | Dermis, face          |
| 20  | Unknown                       | 10      |       | Female, spayed  | Dermis, mandible      |

**Table 1-10. Individual information of dogs with fibrosarcoma.**

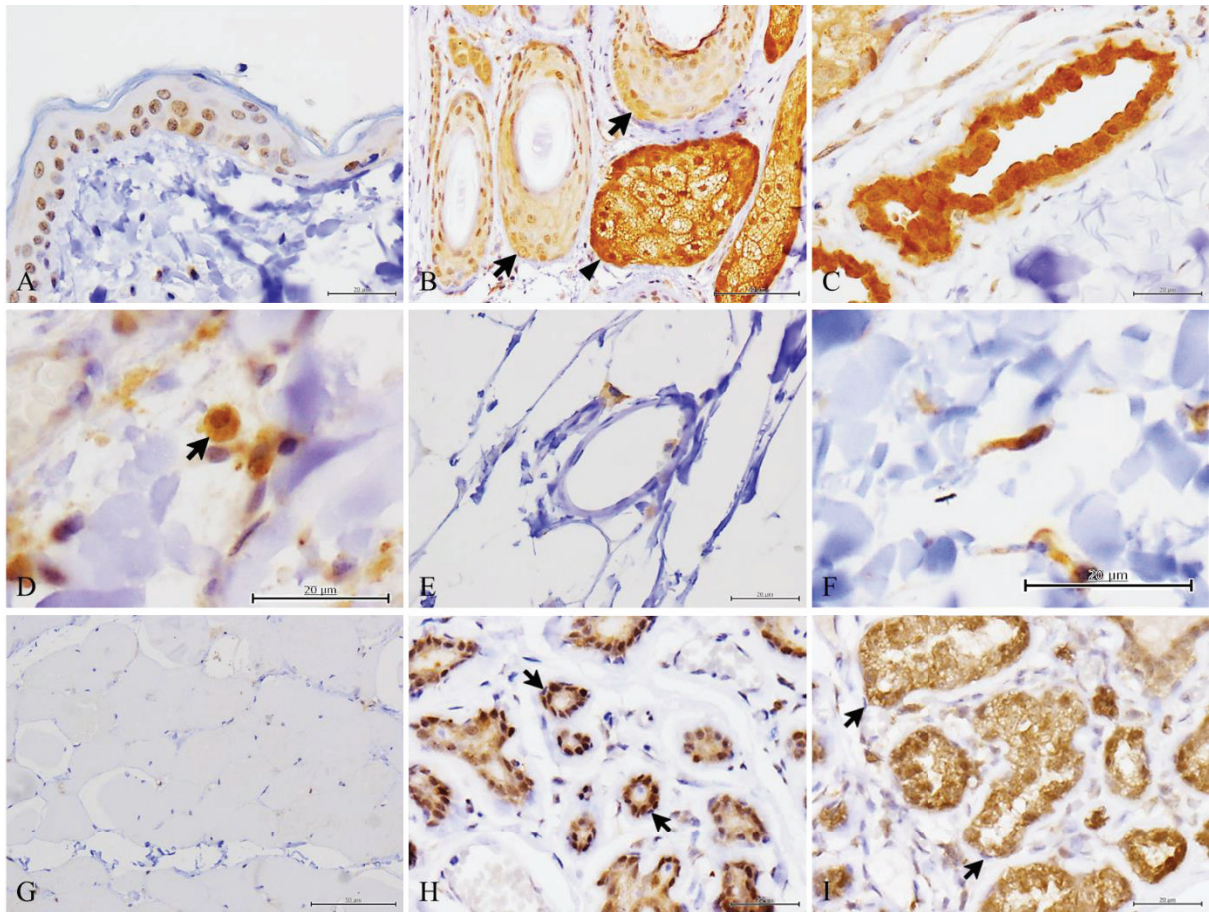
| No. | Breed                       | Age  |       | Sex             | Primary site     |
|-----|-----------------------------|------|-------|-----------------|------------------|
|     |                             | year | month |                 |                  |
| 1   | Beagle                      | 11   |       | Female, spayed  | Lip              |
| 2   | Bernese Mountain Dog        | 3    |       | Female, spayed  | Skin, thigh      |
| 3   | Border Collie               | 10   | 0     | Female, spayed  | Muscle, hindlimb |
| 4   | Border Collie               | 13   | 0     | Female, spayed  | Skin, lip        |
| 5   | Flat-Coated Retriever       | 11   | 1     | Female          | No Data          |
| 6   | French Bulldog              | 9    | 1     | Female          | Skin, shoulder   |
| 7   | Golden Retriever            | 9    | 3     | Male            | Digit            |
| 8   | Labrador Retriever          | 8    | 11    | Male, castrated | Oral cavity      |
| 9   | Miniature Dachshund         | 10   | 0     | Unknown         | Skin             |
| 10  | Miniature Dachshund         | 15   | 1     | Female, spayed  | Oral cavity      |
| 11  | Miniature Pinscher          | 10   | 1     | Female, spayed  | Skin, forelimb   |
| 12  | Miniature Schnauzer         | 10   | 7     | Female, spayed  | Oral cavity      |
| 13  | Shih Tzu                    | 15   | 1     | Female          | Skin             |
| 14  | Soft-Coated Wheaten Terrier | 6    | 0     | Male, castrated | Skin, nose       |
| 15  | Soft-Coated Wheaten Terrier | 6    | 1     | Male, castrated | Skin, nose       |
| 16  | Toy Poodle                  | 8    | 10    | Female          | Oral cavity      |
| 17  | Mix                         | 10   | 4     | Female          | Mammary gland    |
| 18  | Mix                         | 10   | 11    | Male, castrated | Skin             |
| 19  | Mix                         | 16   |       | Female, spayed  | Skin             |
| 20  | Unknown                     | 12   |       | Male            | Skin             |

**Table 1-11. IHC scores of PRDX1 and 2 in canine spontaneous tumors.**

| Tumor (n)                          | PRDX1     |      | PRDX2     |       |
|------------------------------------|-----------|------|-----------|-------|
|                                    | IHC score | SD   | IHC score | SD    |
| Follicular tumor                   |           |      |           |       |
| Trichoblastoma (10)                | 10.0      | 1.24 | 8.60      | 2.94  |
| Trichoepithelioma (10)             | 3.03      | 1.84 | 8.84      | 2.52  |
| Squamous cell carcinoma            |           |      |           |       |
| Skin (12)                          | 3.56      | 1.96 | 5.28      | 3.86  |
| Oral cavity (7)                    | 7.95      | 3.49 | 2.81      | 1.90  |
| Mammary gland                      |           |      |           |       |
| Non-neoplastic mammary gland (19)  | 8.58      | 1.67 | 1.74      | 1.76  |
| Simple adenoma (20)                | 6.90      | 2.40 | 5.13      | 2.56  |
| Simple carcinoma (20)              | 5.27      | 2.71 | 8.98      | 2.37  |
| Complex adenoma (10)               |           |      |           |       |
| Neoplastic luminal epithelial cell | 4.93      | 1.05 | 5.60      | 1.58  |
| Neoplastic myepithelial cell       | 4.90      | 1.98 | 7.30      | 2.04  |
| Complex carcinoma (10)             |           |      |           |       |
| Neoplastic luminal epithelial cell | 5.77      | 1.51 | 6.80      | 2.77  |
| Neoplastic myepithelial cell       | 4.53      | 1.68 | 6.07      | 3.07  |
| Benign mixed tumor (10)            |           |      |           |       |
| Neoplastic luminal epithelial cell | 7.33      | 1.39 | 8.67      | 2.52  |
| Neoplastic myepithelial cell       | 6.80      | 2.35 | 11.2      | 1.17  |
| Malignant mixed tumor (10)         |           |      |           |       |
| Neoplastic luminal epithelial cell | 7.93      | 2.23 | 7.57      | 2.45  |
| Neoplastic myepithelial cell       | 7.30      | 2.56 | 9.23      | 4.01  |
| Transitional cell tumor            |           |      |           |       |
| Fibroepithelial polyp (2)          | 6.00      | 2.83 | 0.00      | 0.00  |
| Transitional cell papilloma (2)    | 5.67      | 1.41 | 0.665     | 0.940 |
| Transitional cell carcinoma (32)   | 6.76      | 2.57 | 4.73      | 3.20  |
| Kidney (1)                         | 4.67      | —    | 1.33      | —     |
| Ureter (1)                         | 8.00      | —    | 2.67      | —     |
| Bladder (25)                       | 6.89      | 2.61 | 5.01      | 3.52  |
| Urethra (1)                        | 9.67      | —    | 4.67      | —     |
| Prostate (3)                       | 5.00      | 2.89 | 4.00      | 0.00  |
| Abdominal cavity (1)               | 6.67      | —    | 5.33      | —     |
| Lymphoma (27)                      | 4.06      | 2.33 | 0.0617    | 0.227 |
| B-cell lymphoma (14)               | 4.45      | 2.19 | 0.0714    | 0.267 |
| T-cell lymphoma (13)               | 3.64      | 2.48 | 0.0513    | 0.185 |
| Cutaneous mast cell tumor          |           |      |           |       |
| Patnaik grading system             |           |      |           |       |
| Grade I (16)                       | 4.79      | 2.47 | 3.71      | 1.80  |
| Grade II (18)                      | 4.30      | 2.57 | 3.17      | 1.77  |
| Grade III (18)                     | 3.72      | 2.54 | 5.98      | 3.95  |
| Kiupel grading system              |           |      |           |       |
| Low grade (34)                     | 4.53      | 2.50 | 3.42      | 1.78  |
| High grade (18)                    | 3.72      | 2.54 | 5.98      | 3.95  |
| Cutaneous plasmacytoma (18)        | 3.00      | 2.28 | 0.203     | 0.472 |
| Canine cutaneous histiocytoma (20) | 4.67      | 1.27 | 2.65      | 2.23  |
| Fibrosarcoma (20)                  | 3.18      | 1.14 | 4.15      | 2.34  |
| Vascular tumor                     |           |      |           |       |
| Cavernous hemangioma (26)          | 3.32      | 3.41 | 1.04      | 1.48  |
| Hemangiosarcoma (65)               | 7.52      | 3.34 | 7.72      | 4.01  |

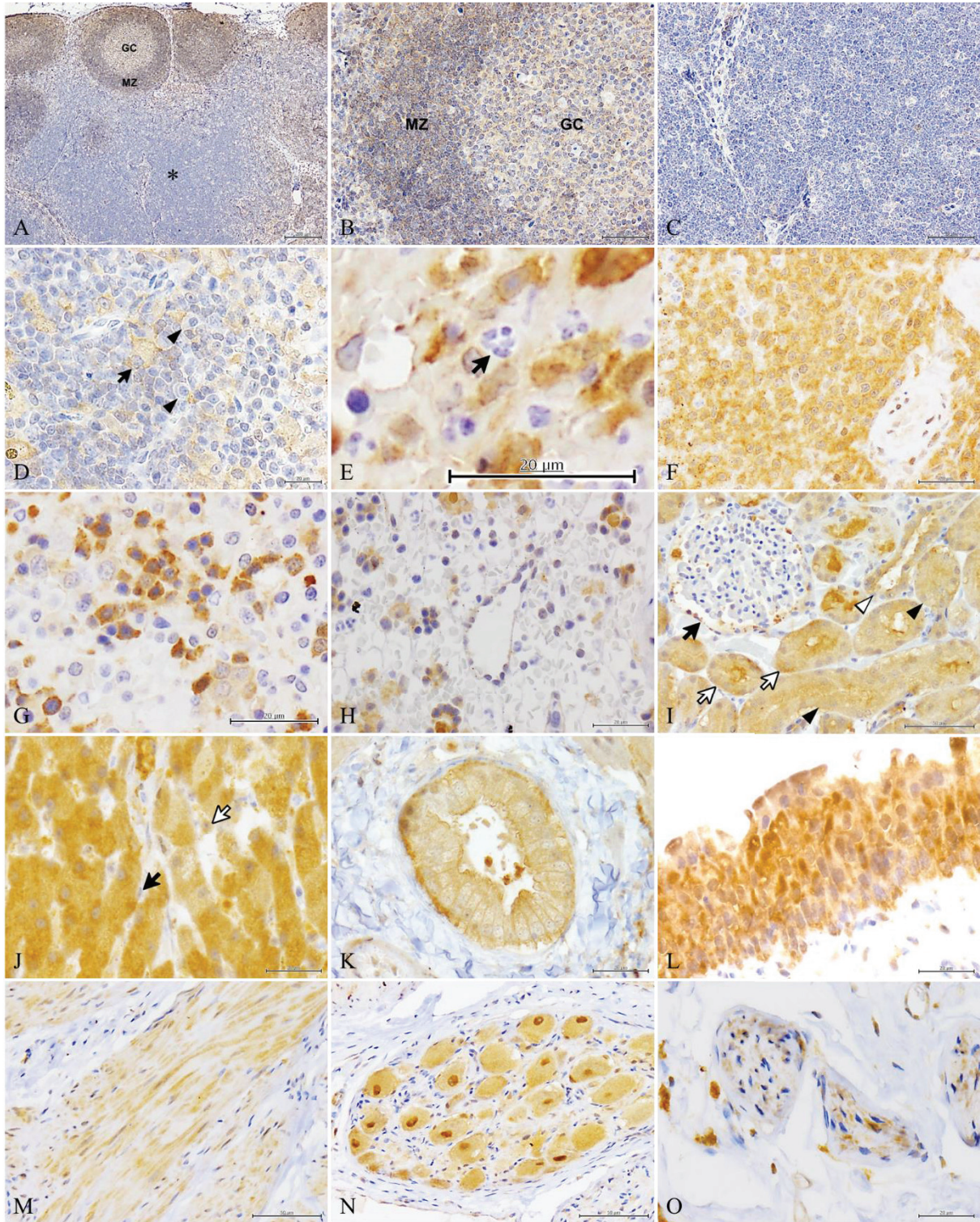


**Figure 1-1.** The images of western blotting of PRDX1, PRDX2 and  $\beta$ -actin. Distinct single bands were detected in lysate from HeLa or Re12 by western blotting using anti-human PRDX1 or 2 antibodies. Molecular weight of the bands was approximately 22,000.  $\beta$ -actin as a loading control was detected at approximately 45,000 in both HeLa and Re12.



**Figure 1-2.** Immunohistochemistry of PRDX1 in normal tissues. (A) Squamous cells in the epidermis. The nuclei of squamous cells located in the basal and spinous layers were strongly positive for PRDX1 and the cytoplasm was weakly positive. However, squamous cells in the granular layer were negative for PRDX1. Bar, 20  $\mu$ m. (B) Squamous cells of hair follicles (arrows) and sebaceous glands (arrowhead). The nuclei of squamous cells were positive for PRDX1 and the cytoplasm was weakly positive. Almost all sebaceous gland cells were strongly positive for PRDX1. Bar, 50  $\mu$ m. (C) Apocrine sweat glands. Glandular epithelial cells were strongly positive for PRDX1, but myoepithelial cells surrounding the glands were negative. Bar, 20  $\mu$ m. (D) Macrophages in the dermis. The nucleus and cytoplasm of macrophages were labeled with PRDX1 (arrow). Bar, 20  $\mu$ m. (E) Blood vessels in the subcutaneous tissue. Almost all the endothelial cells in the blood vessels were negative for PRDX1. Bar, 20  $\mu$ m. (F) Fibroblasts in the dermis. Fibroblasts were negative to

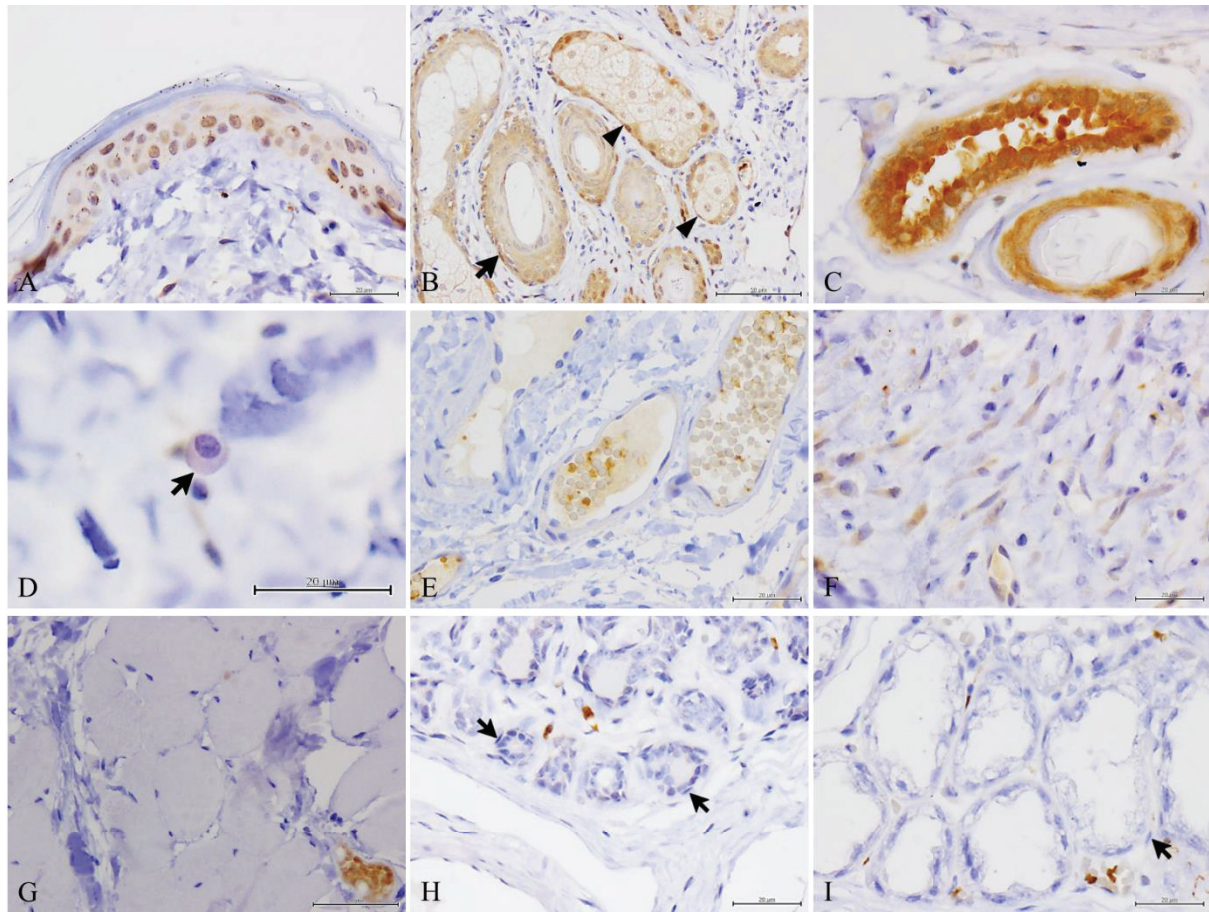
positive for PRDX1. Bar, 20  $\mu\text{m}$ . (G) Striated cutaneous muscle. The nucleus and cytoplasm of striated muscle were negative for PRDX1. Bar, 50  $\mu\text{m}$ . (H) Mammary gland tissues in resting period. The nuclei of inactive luminal epithelial cells in resting period were negative to weakly positive for PRDX1 and the cytoplasm was weakly positive to positive. Myoepithelial cells were negative for PRDX1 (arrows). Bar, 20  $\mu\text{m}$ . (I) Mammary gland tissues in lactation period. The nuclei of active luminal epithelial cells in activated stage were positive to strongly positive for PRDX1 and cytoplasm was positive. Myoepithelial cells were negative for PRDX1 (arrows). Bar, 20  $\mu\text{m}$ .



**Figure 1-3.** Immunohistochemistry of PRDX1 in normal tissues. (A) Normal lymph node. In the lymphoid follicle, the germinal center was weakly positive for PRDX1 (GC), whereas the marginal zone and mantle zone was strongly positive (MZ). The paracortex was negative for PRDX1 (\*).

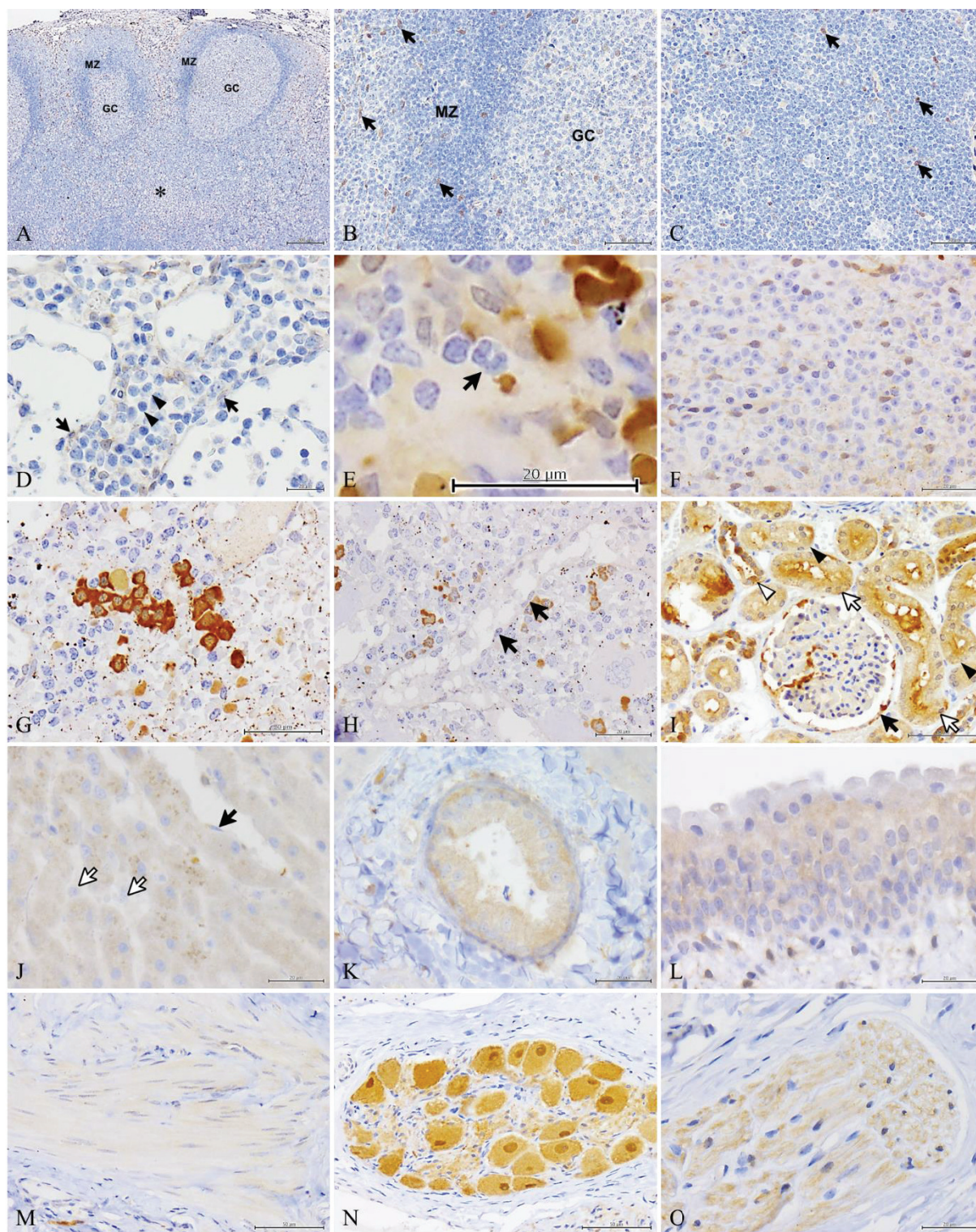
Bar, 200  $\mu\text{m}$ . (B) Lymphoid follicles in normal lymph node. Lymphocytes in the germinal center were negative to weakly positive for PRDX1 (GC), whereas those in the mantle zone were positive to strongly positive (MZ). Bar, 50  $\mu\text{m}$ . (C) Lymphocytes in the paracortex were negative for PRDX1. Bar, 50  $\mu\text{m}$ . (D) The medullary cord in the medulla. The nucleus of macrophages was negative to positive for PRDX1 and the cytoplasm was positive to strongly positive (arrow). The plasmacytes were negative for PRDX1 (arrowheads). Bar, 20  $\mu\text{m}$ . (E) Neutrophil in the spleen. Both of the nucleus and cytoplasm of neutrophils were negative for PRDX1 (arrow). Bar, 20  $\mu\text{m}$ . (F) Lymphocytes in the lymphoid follicles of the spleen. The cytoplasm of the lymphocytes was positive for PRDX1. Bar, 20  $\mu\text{m}$ . (G) Erythroblasts in the spleen. Erythroblasts were positive for PRDX1 expression. Bar, 20  $\mu\text{m}$ . (H) Endothelial cells of the splenic sinusoids. The nuclei of the endothelial cells of the splenic sinusoid were negative to weakly positive for PRDX1. Bar, 20  $\mu\text{m}$ . (I) Kidney. Epithelial cells of the glomerulus and glomerular capsule were negative for PRDX1 (black arrow). Nuclei of epithelial cells in the proximal tubules were negative to weakly positive for PRDX1, whereas the cytoplasm was positive (white arrows). Nuclei of the distal tubules were negative for PRDX1, whereas the cytoplasm was positive (black arrowheads). The nucleus in the collecting ducts was negative, but the cytoplasm was weakly positive to positive for PRDX1 (white arrowhead). Bar, 50  $\mu\text{m}$ . (J) Liver. Nuclei of hepatocytes were negative to weakly positive for PRDX1, whereas the cytoplasm was positive to strongly positive. Sinusoidal endothelial cells were negative for PRDX1 (black arrow). Kupffer cells were positive for PRDX1 (white arrow). Bar, 20  $\mu\text{m}$ . (K) Bile duct observed in liver. The nucleus of epithelial cells in the intrahepatic bile duct was negative to weakly positive for PRDX1, whereas the cytoplasm was positive for PRDX1. Bar, 20  $\mu\text{m}$ . (L) Transitional cells in the urinary bladder. The nuclei of transitional cells were positive to strongly positive. The cytoplasm of transitional cells in the urinary bladder was strongly positive

for PRDX1. Bar, 20  $\mu$ m. (M) Smooth muscles in the muscle layer of the bladder. The nuclei and cytoplasm of smooth muscle cells were positive for PRDX1. Bar, 50  $\mu$ m. (N) The ganglion in the bladder. The nuclei and cytoplasm of ganglion cells were strongly positive for PRDX1. Gliocytes (satellite cells) were negative for PRDX1. Bar, 50  $\mu$ m. (O) Nerve fibers in the bladder. Axons were positive for PRDX1 but Schwann cells were negative. Bar, 20  $\mu$ m.



**Figure 1-4.** Immunohistochemistry of PRDX2 in normal tissues. (A) Squamous cells in the epidermis. The nuclei of squamous cells located in the basal and spinous layers were strongly positive for PRDX2 and the cytoplasm was weakly positive; however, squamous cells in the granular layer were negative for PRDX2. Bar, 20  $\mu$ m. (B) Squamous cells of hair follicles and sebaceous glands. Nuclei of squamous cells were negative to positive for PRDX2 and the cytoplasm was weakly positive (arrow). Immature and mature sebaceous gland cells were strongly positive for PRDX2 (arrowheads). Bar, 50  $\mu$ m. (C) Apocrine sweat glands. The glandular epithelial cells were strongly positive for PRDX2. Myoepithelial cells surrounding the glands were negative to weakly positive for PRDX2 expression. Bar, 20  $\mu$ m. (D) Macrophages in the dermis. Macrophages were negative to weakly positive for PRDX2 (arrow). Bar, 20  $\mu$ m. (E) Microvessels in the dermis. Almost all endothelial cells in microvessels were negative for PRDX2. Bar, 20  $\mu$ m. (F) Fibroblasts in the dermis.

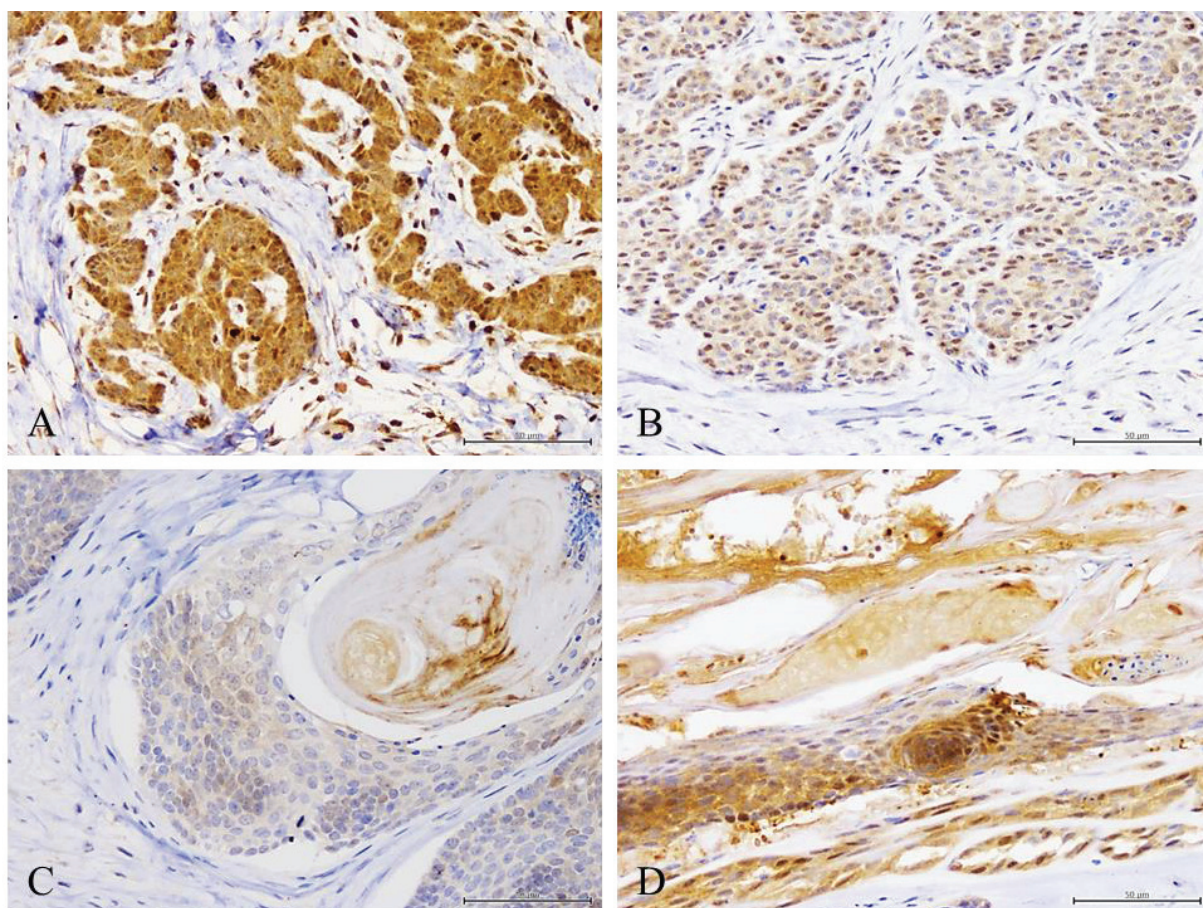
Fibroblasts were negative to weakly positive for PRDX2 although some erythrocytes were strongly positive for PRDX2. Bar, 20  $\mu$ m. (G) Striated cutaneous muscle. The nucleus and cytoplasm of striated muscles were negative for PRDX2. Bar, 50  $\mu$ m. (H) Mammary gland tissues in resting period. The nuclei and cytoplasm of inactive luminal epithelial cells in resting period were negative for PRDX2. Myoepithelial cells were negative for PRDX2 (arrows). Bar, 20  $\mu$ m. (I) Mammary gland tissues in lactation period. The nuclei and cytoplasm of active luminal epithelial cells in activated stage were negative for PRDX2. Myoepithelial cells were negative for PRDX2 (arrow). Bar, 20  $\mu$ m.



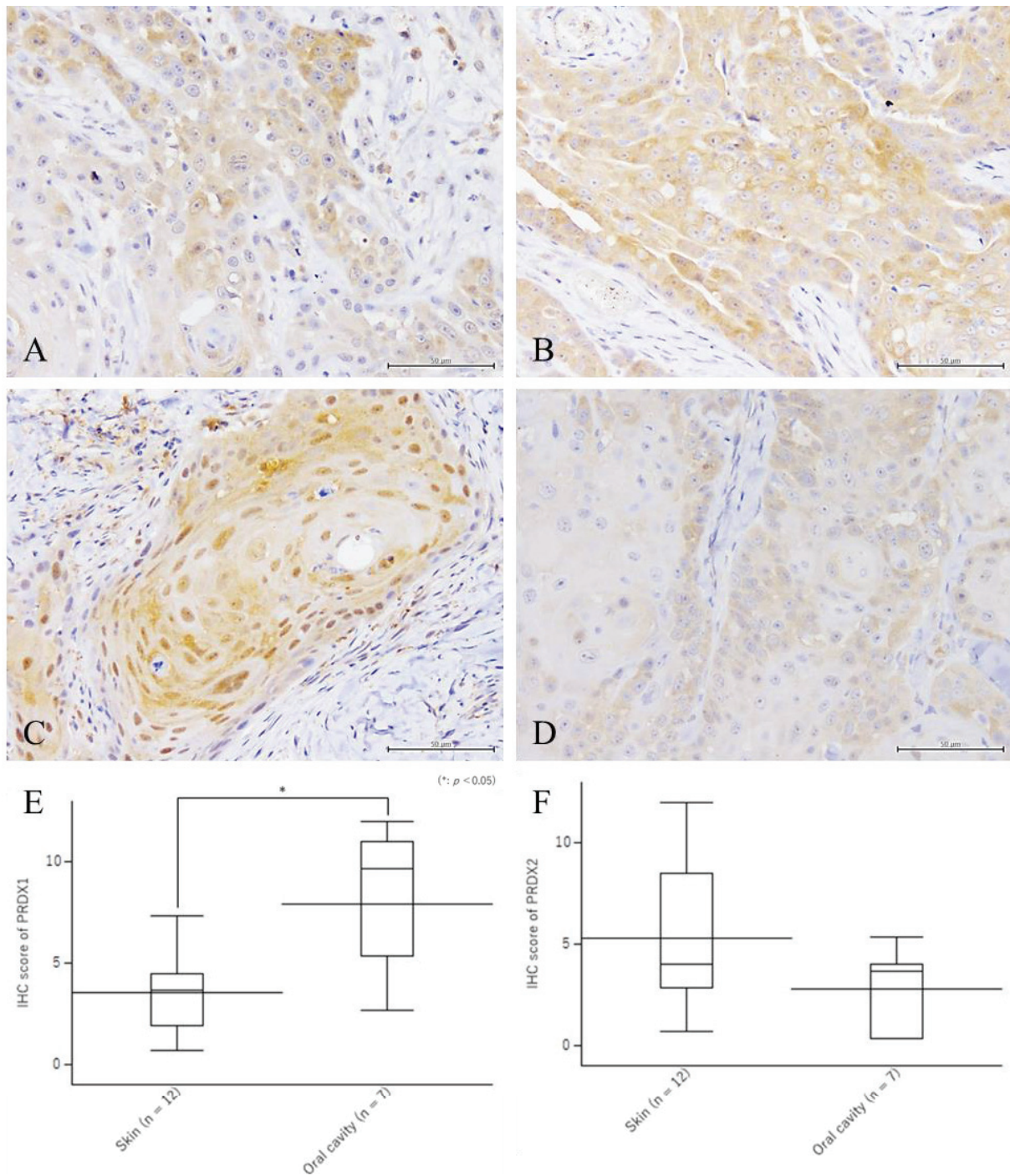
**Figure 1-5.** Immunohistochemistry of PRDX2 in normal tissues. (A) Normal lymph node. In the lymphoid follicle, the germinal center (GC) and the marginal zone and mantle zone were negative for PRDX2 (MZ). The paracortex was negative for PRDX1 (\*). Bar, 200  $\mu$ m. (B) Lymphoid follicles

in normal lymph node. The nucleus of reticular cells was positive for PRDX2 (arrows). However, lymphocytes in the germinal center (GC), the marginal zone and mantle zone (MZ) were negative for PRDX2. Bar, 50  $\mu$ m. (C) The lymphocytes in the paracortex were negative for PRDX2. The nuclei of the cells which have round nucleus and abundant cytoplasm were positive for PRDX2 (arrows). Bar, 50  $\mu$ m. (D) The medullary cord in the medulla. The endothelial cells of lymphatic sinus were weakly positive for PRDX2 (arrows). The plasmacytes were negative for PRDX2 (arrowheads). Bar, 20  $\mu$ m. (E) Neutrophil in the spleen. The nucleus and cytoplasm of neutrophils were negative for PRDX2 (arrow). Bar, 20  $\mu$ m. (F) Lymphocytes in lymphoid follicles of the spleen. Almost all lymphocytes were negative for PRDX2. Bar, 20  $\mu$ m. (G) Erythroblasts in the spleen. The cytoplasm of these cells was found to be strongly positive for PRDX2. Bar, 20  $\mu$ m. (H) Endothelial cells of the splenic sinusoids. Endothelial cells of the splenic sinusoid were negative for PRDX2 (arrows). Bar, 20  $\mu$ m. (I) Kidney. Epithelial cells of the glomerulus and glomerular capsule were negative for PRDX2 (black arrow). Nuclei of epithelial cells in the proximal tubules were negative to weakly positive for PRDX2, and the cytoplasm was positive (white arrows). Nuclei of the distal tubules were negative for PRDX2, whereas the cytoplasm was weakly positive (black arrowheads). In the collecting ducts, the nucleus was negative to weakly positive, but the cytoplasm was positive for PRDX2 (white arrowhead). Bar, 50  $\mu$ m. (J) Liver. The nuclei and cytoplasm of hepatocytes were negative for PRDX2. Sinusoidal endothelial cells were negative for PRDX2 (black arrow). Kupffer cells were negative for PRDX2 (white arrows). Bar, 20  $\mu$ m. (K) Bile duct in the liver. The nuclei of the bile duct epithelial cells were negative to weakly positive for PRDX2, whereas the cytoplasm was weakly positive for PRDX2. Bar, 20  $\mu$ m. (L) Transitional cells in the urinary bladder. The nuclei of transitional cells were negative for PRDX2. The cytoplasm in the lower layer were negative for PRDX2, whereas those in upper layer were negative to weakly positive. Bar, 20  $\mu$ m. (M) Smooth

muscles in the muscle layer of the bladder. Smooth muscle cells were negative to weakly positive for PRDX2. Bar, 50  $\mu$ m. (N) The ganglion in the bladder. The nuclei and cytoplasm of ganglion cells were strongly positive for PRDX2. The nuclei of gliocytes (satellite cells) were negative for PRDX2 and the cytoplasm was negative to weakly positive. Bar, 50  $\mu$ m. (O) Nerve fibers in the bladder. Axons were positive for PRDX2 but Schwann cells were negative. Bar, 20  $\mu$ m.

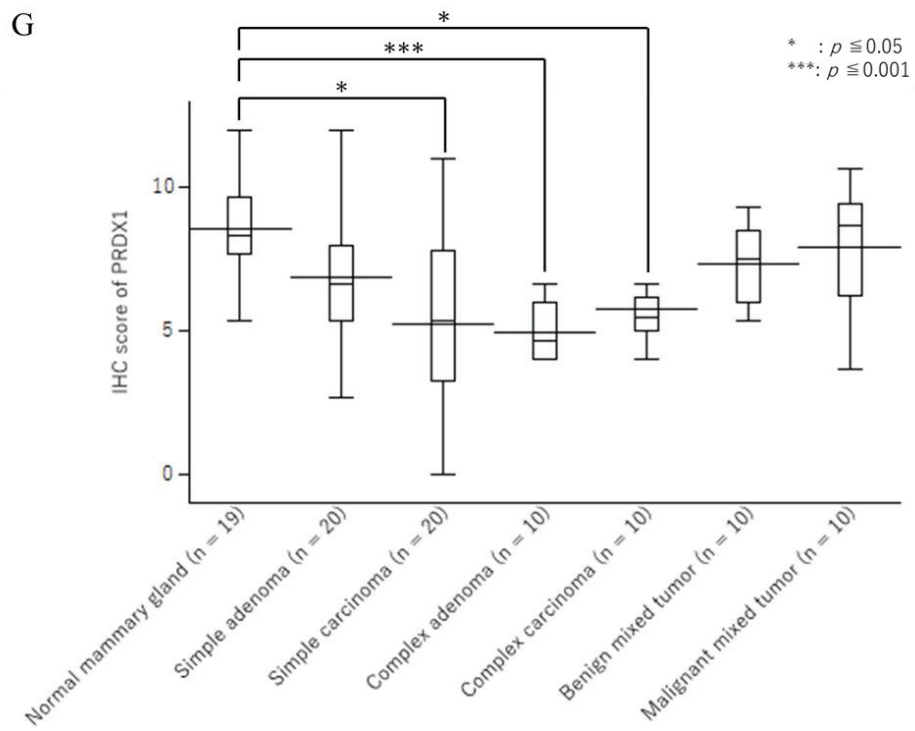
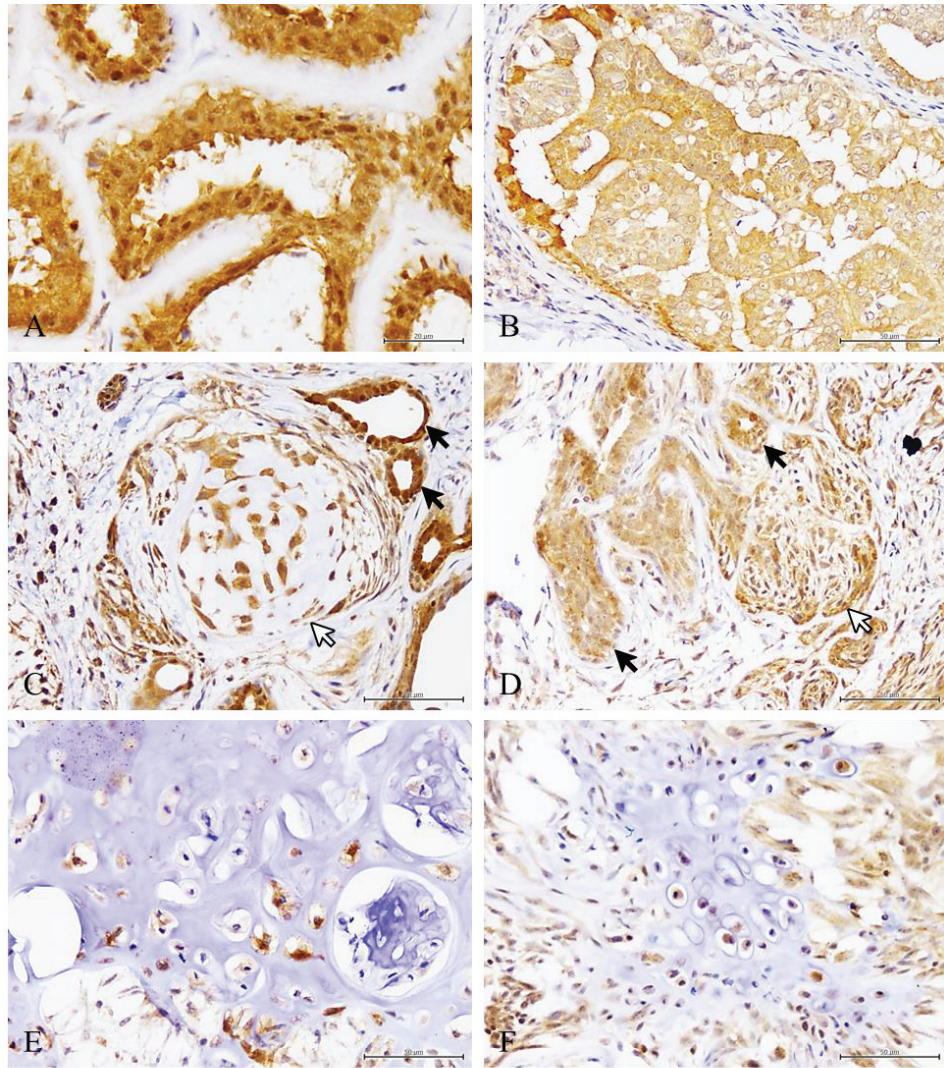


**Figure 1-6.** Immunohistochemistry of PRDX1 and 2 in follicular tumors. (A) Trichoblastoma. The neoplastic cells were strongly positive for PRDX1. The IHC score of PRDX1 in this sample was 9.33. Bar, 50 µm. (B) Trichoblastoma. The nuclei of neoplastic cells were strongly positive for PRDX2 and cytoplasm was weakly positive to positive. The IHC score of PRDX2 in this sample was 8.00. Bar, 50 µm. (C) Trichoepithelioma. The neoplastic cells were negative to weakly positive for PRDX1. The IHC score of PRDX1 in this sample was 5.00. Bar, 50 µm. (D) Trichoepithelioma. The neoplastic cells were weakly positive to strongly positive for PRDX2. The IHC score of PRDX2 in this sample was 7.67. Bar, 50 µm.

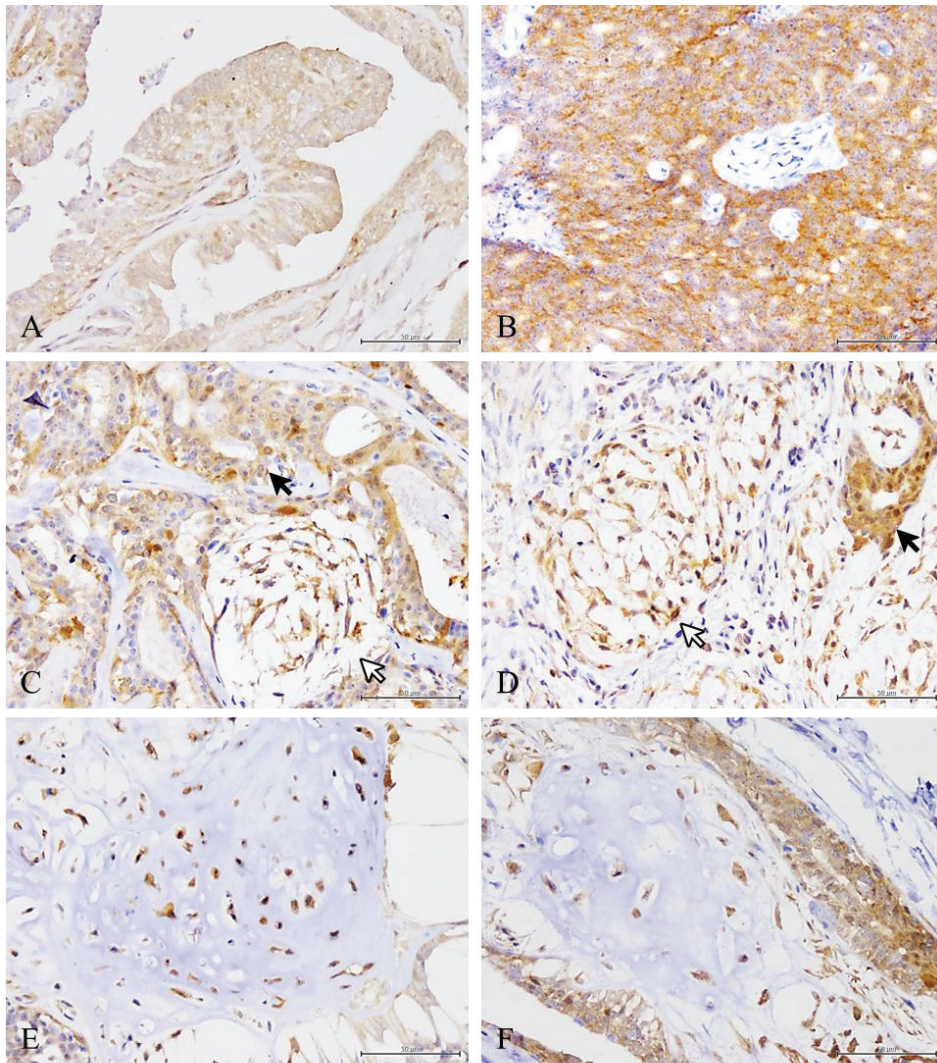


**Figure 1-7.** Immunohistochemistry of PRDX1 and 2 in squamous cell carcinoma. (A) Cutaneous squamous cell carcinoma. The nuclei of squamous cell carcinoma were negative to weakly positive for PRDX1 and cytoplasm was weakly positive to positive. The IHC score of this sample was 3.33. Bar, 50  $\mu$ m. (B) Cutaneous squamous cell carcinoma. The nuclei of neoplastic cells were negative to weakly positive for PRDX2. The cytoplasm was positive to strongly positive. The IHC score of

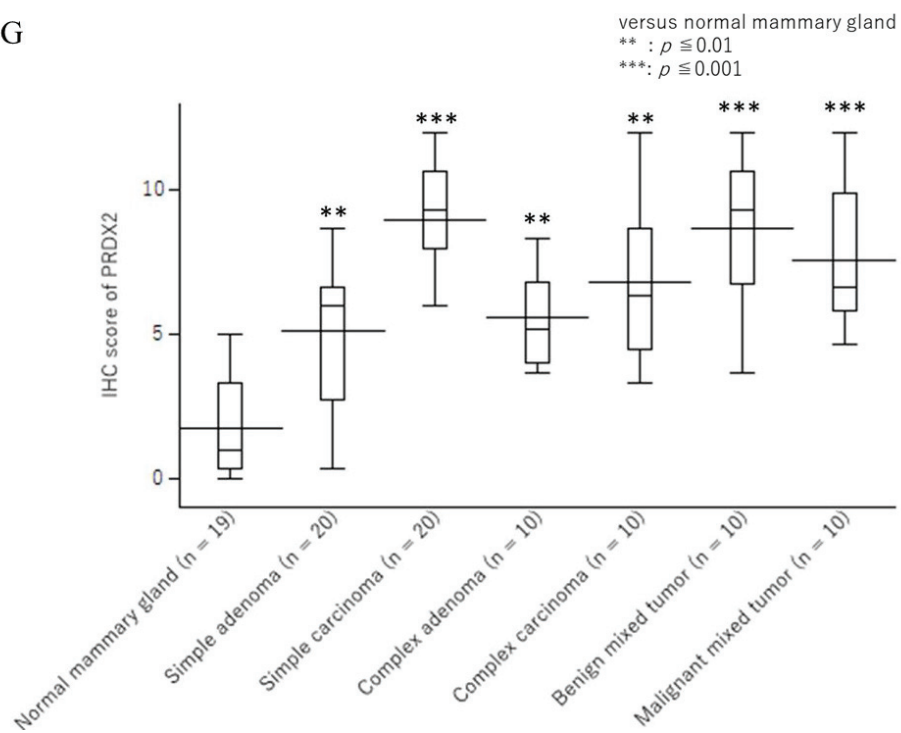
this sample was 4.67. Bar, 50  $\mu$ m. (C) Oral squamous cell carcinoma. The nuclei of neoplastic cells were weakly positive to strongly positive for PRDX1 and cytoplasm was positive. The IHC score of this sample was 9.67. Bar, 50  $\mu$ m. (D) Oral squamous cell carcinoma. The nuclei of neoplastic cells were negative for PRDX2 and cytoplasm was weakly positive. The IHC score of this sample was 2.33. Bar, 50  $\mu$ m. (E) The box-and-whisker plot of PRDX1 IHC scores of squamous cell carcinomas between the skin and oral cavity. There was significant difference of IHC score of PRDX1 between cutaneous and oral squamous cell carcinomas ( $p < 0.05$ ). (F) The box-and-whisker plot of PRDX2 IHC scores of squamous cell carcinomas between the skin and oral cavity. There was no significant difference of IHC score of PRDX2 between cutaneous and oral squamous cell carcinomas.



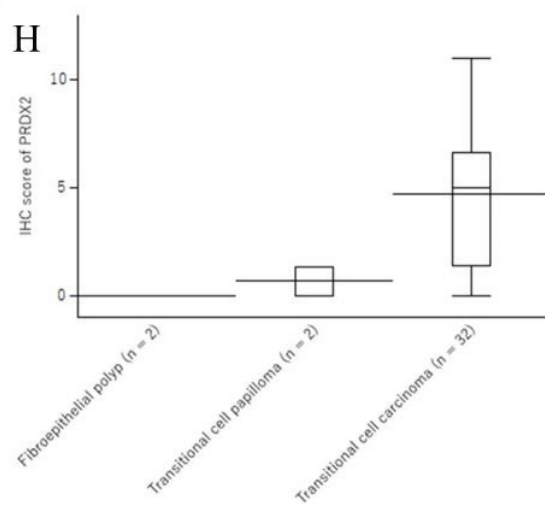
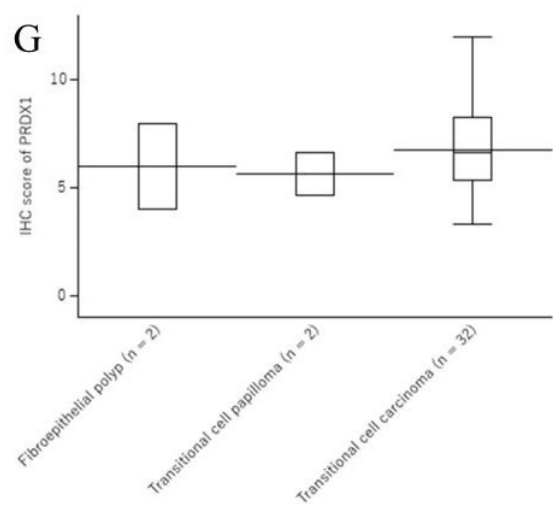
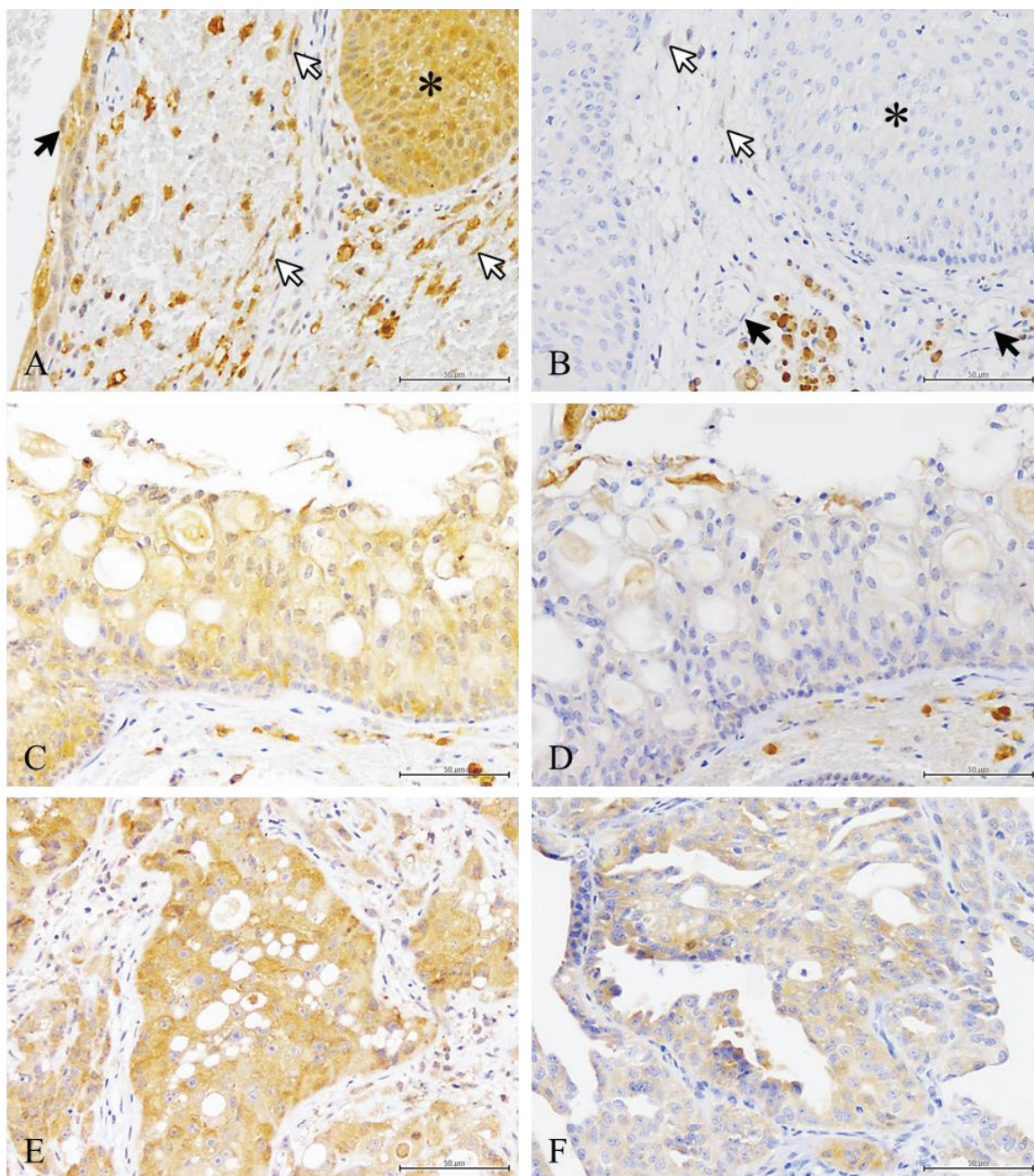
**Figure 1-8.** Immunohistochemistry of PRDX1 in mammary gland tumors. (A) Mammary simple adenoma. The nuclei and cytoplasm of neoplastic luminal epithelial cells were strongly positive for PRDX1. The IHC score of PRDX1 in this sample was 12.00. Bar, 20  $\mu$ m. (B) Mammary simple carcinoma. The nuclei of neoplastic luminal epithelial cells were weakly positive for PRDX1 and cytoplasm was strongly positive. The IHC score of PRDX1 in this sample was 4.00. Bar, 20  $\mu$ m. (C) Mammary complex adenoma. The nuclei and cytoplasm of neoplastic luminal epithelial cells were strongly positive for PRDX1 (black arrows). The PRDX1 IHC score of neoplastic luminal epithelial cells in this sample was 6.00. Neoplastic myoepithelial cells embedded into myxoid matrix were strongly positive for PRDX1 (white arrow). The PRDX1 IHC score of neoplastic myoepithelial cells in this sample was 5.00. Bar, 50  $\mu$ m. (D) Mammary complex carcinoma. Neoplastic luminal epithelial cells were positive for PRDX1 (black arrows). The PRDX1 IHC score of neoplastic luminal epithelial cells in this sample was 5.33. Neoplastic myoepithelial cells were strongly positive for PRDX1 (white arrow). The PRDX1 IHC score of neoplastic myoepithelial cells in this sample was 5.00. Bar, 50  $\mu$ m. (E) Cartilaginous component in mammary benign mixed tumor. The nuclei and cytoplasm of chondrocytes were negative to positive for PRDX1. Bar, 20  $\mu$ m. (F) Cartilaginous component in mammary malignant mixed tumor. Malignant chondrocytes were negative to positive for PRDX1. Bar, 20  $\mu$ m. (G) The box-and-whisker plot of PRDX1 IHC scores of luminal epithelial cells in normal mammary gland and mammary gland tumors. There was significance of IHC scores of PRDX1 in luminal epithelial cells between normal mammary and simple carcinoma ( $p < 0.05$ ), complex adenoma ( $p < 0.001$ ), and complex carcinoma ( $p < 0.05$ ).



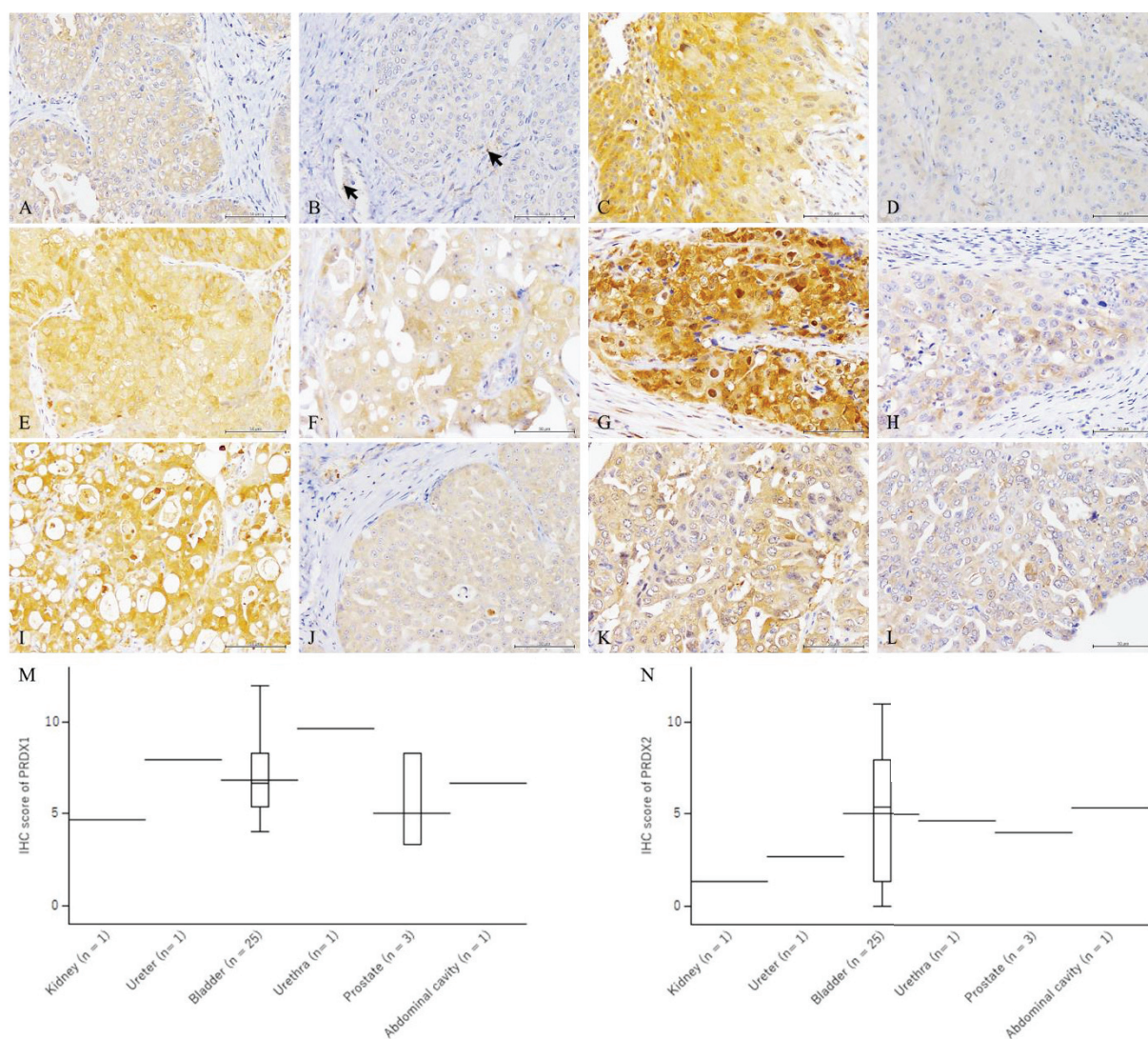
G



**Figure 1-9.** Immunohistochemistry of PRDX2 in mammary gland tumor. (A) Mammary simple adenoma. The nuclei of neoplastic luminal epithelial cells were negative to weakly positive for PRDX2. The cytoplasm was weakly positive. The IHC score of this sample was 5.33. Bar, 50  $\mu$ m. (B) Mammary simple carcinoma. The nuclei of neoplastic luminal epithelial cells were weakly positive for PRDX2 and cytoplasm was strongly positive. The IHC score of this sample was 9.33. Bar, 50  $\mu$ m. (C) Mammary complex adenoma. The nuclei and cytoplasm of neoplastic luminal epithelial cells were positive for PRDX2 (black arrow). The PRDX2 IHC score of luminal epithelial cells in this sample was 6.00. Neoplastic myoepithelial cells were strongly positive for PRDX2 (white arrow). The PRDX2 IHC score of neoplastic myoepithelial cells embedded into myxoid matrix in this sample was 10.67. Bar, 50  $\mu$ m. (D) Mammary complex carcinoma. The nuclei of neoplastic luminal epithelial cells were negative to weakly positive for PRDX2 and cytoplasm was positive (black arrow). The PRDX2 IHC score of luminal epithelial cells in this sample was 6.00. Neoplastic myoepithelial cells were strongly positive for PRDX2 (white arrow). The PRDX2 IHC score of neoplastic myoepithelial cells embedded into myxoid matrix in this sample was 11.00. Bar, 50  $\mu$ m. (E) Cartilaginous component in mammary benign mixed tumor. The nuclei and cytoplasm of chondrocytes were negative to positive for PRDX2. Bar, 50  $\mu$ m. (F) Cartilaginous component in mammary malignant mixed tumor. Malignant chondrocytes were negative to positive for PRDX2. Bar, 50  $\mu$ m. (G) The box-and-whisker plot of PRDX2 IHC scores of luminal epithelial cells in normal mammary gland and mammary gland tumors. There was significance of IHC scores of PRDX2 in luminal epithelial cells between normal mammary and simple adenoma ( $p < 0.01$ ), simple carcinoma ( $p < 0.001$ ), complex adenoma ( $p < 0.01$ ), complex carcinoma ( $p < 0.01$ ), benign mixed tumor ( $p < 0.001$ ) and malignant mixed tumor ( $p < 0.001$ ).

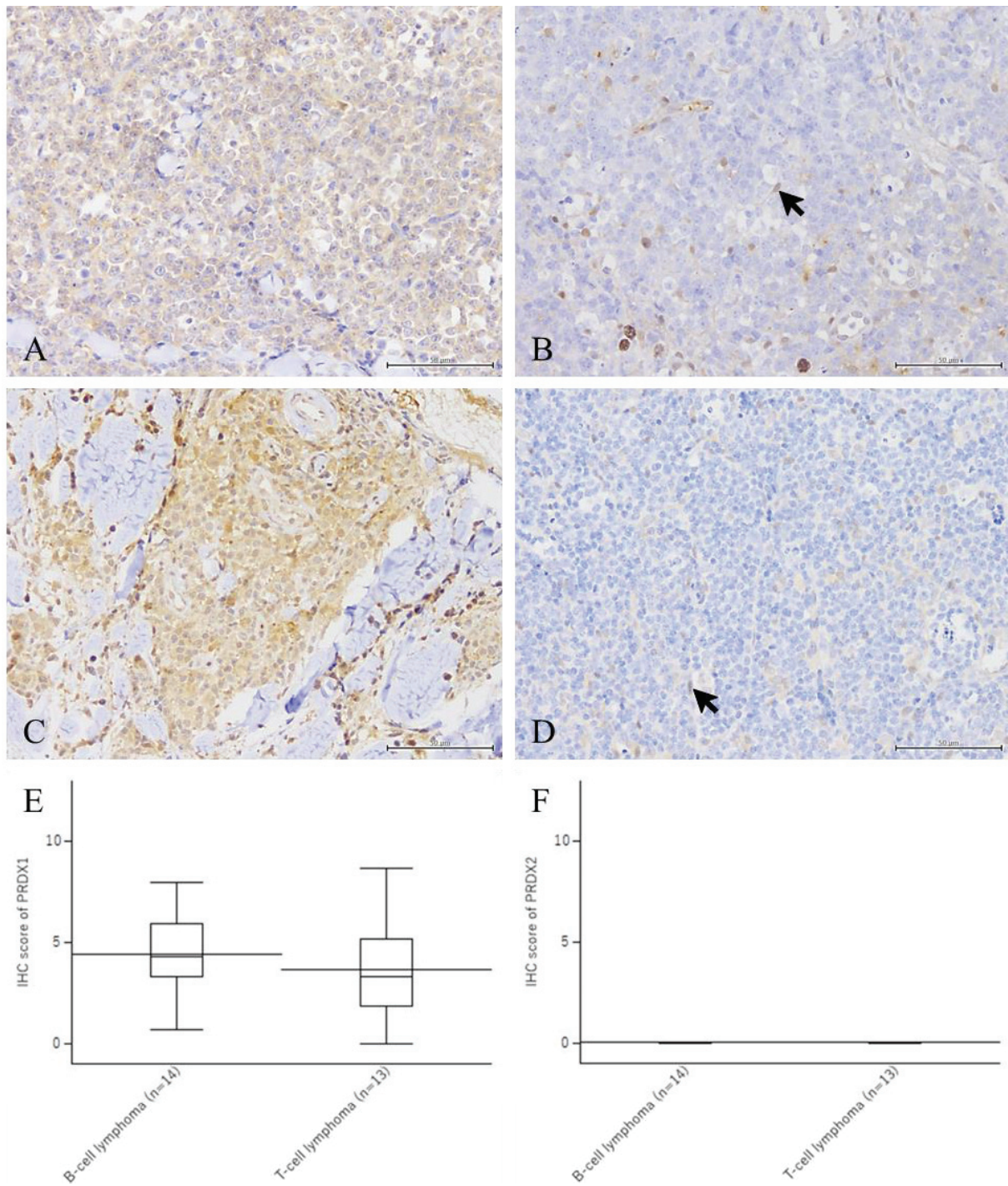


**Figure 1-10.** Immunohistochemistry of PRDX1 and 2 in transitional cell tumors. (A) Fibroepithelial polyp. The nuclei and cytoplasm of transitional cells covering polyp were strongly positive for PRDX1 (\*). The PRDX1 IHC score of these transitional cells in this sample was 8.00. The nuclei of endothelial cells were negative to weakly positive for PRDX1 (black arrow). In fibroblasts, the nuclei were negative for PRDX1, whereas the cytoplasm was weakly positive to positive (white arrows). Bar, 50  $\mu$ m. (B) Fibroepithelial polyp. The nuclei and cytoplasm of transitional cells covering polyp were negative for PRDX2 (\*). The PRDX2 IHC score of these transitional cells in this sample was 0.00. Endothelial cells in these tissues were negative for PRDX2 (black arrows). The nuclei and cytoplasm of fibroblasts were negative to weakly positive for PRDX2 (white arrows). Bar, 50  $\mu$ m. (C) Transitional cell papilloma. The nuclei of neoplastic cells were negative to positive for PRDX1 and cytoplasm was positive. The IHC score of PRDX1 in this sample was 6.67. Bar, 50  $\mu$ m. (D) Transitional cell papilloma. The nuclei of neoplastic cells were negative for PRDX2 and cytoplasm was weakly positive. The IHC score of PRDX2 in this sample was 1.33. Bar, 50  $\mu$ m. (E) Transitional cell carcinoma in the bladder. The nuclei of neoplastic cells were negative for PRDX1, whereas the cytoplasm was strongly positive. The IHC score of PRDX1 in this sample was 8.00. Bar, 50  $\mu$ m. (F) Transitional cell carcinoma in the bladder. The nuclei of neoplastic cells were negative for PRDX2 and cytoplasm was weakly positive to positive. The average of IHC score of PRDX2 in transitional cell carcinoma was 5.33. Bar, 50  $\mu$ m. (G) The box-and-whisker plot of IHC scores of PRDX1 among fibroepithelial polyp, transitional cell papilloma and transitional cell carcinoma. There was no significant difference of IHC score of PRDX1 among histological diagnoses. (H) The box-and-whisker plot of IHC scores of PRDX2 among fibroepithelial polyp, transitional cell papilloma and transitional cell carcinoma. There was significant difference of IHC score of PRDX2 between fibroepithelial polyp and transitional cell carcinoma ( $p < 0.05$ ).



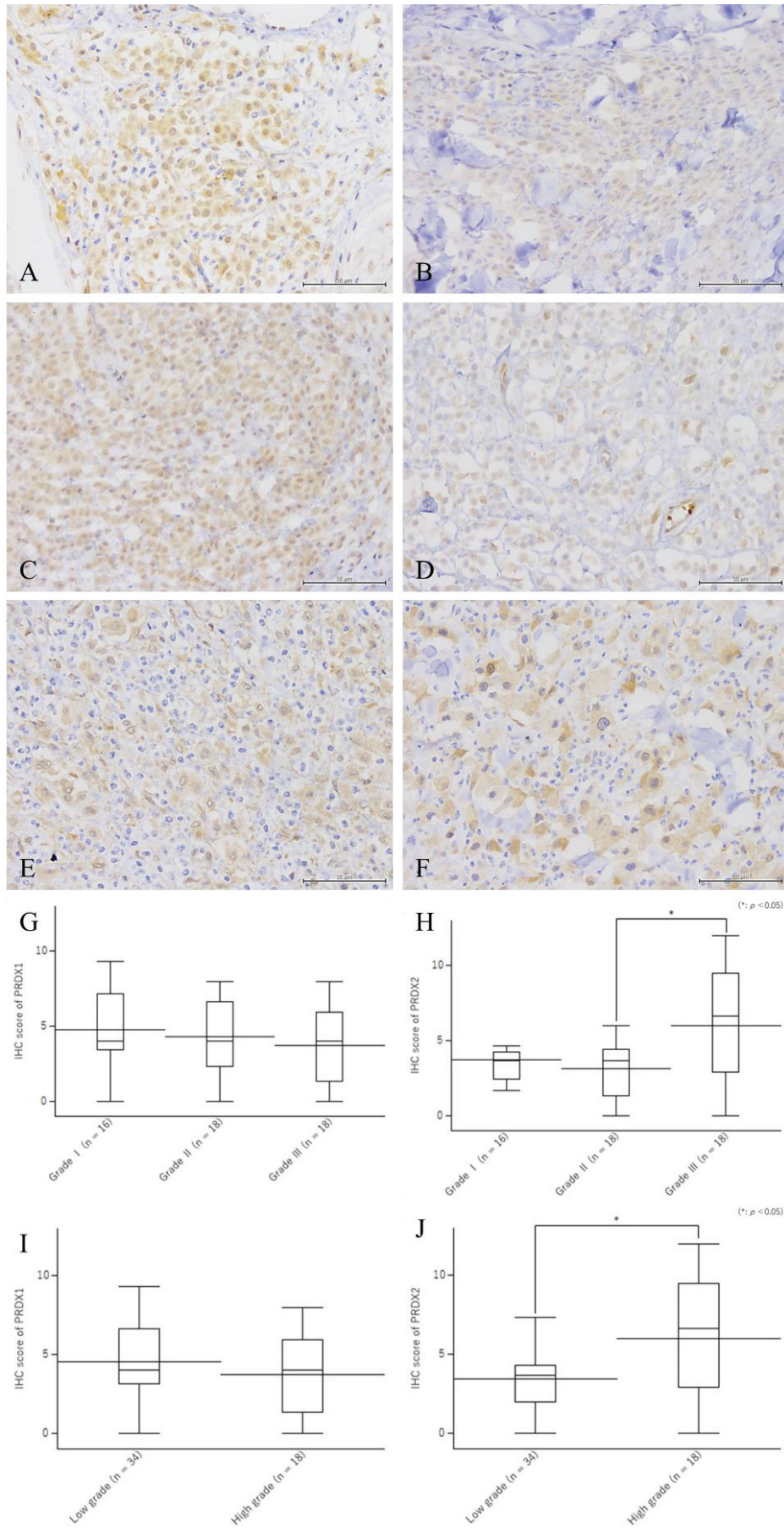
**Figure 1-11.** Immunohistochemistry of PRDX1 and 2 in transitional cell carcinoma. (A) Transitional cell carcinoma in the renal pelvis. The nuclei of neoplastic cells were negative for PRDX1 and cytoplasm was weakly positive. The IHC score of PRDX1 in this sample was 4.67. Bar, 50  $\mu$ m. (B) Transitional cell carcinoma in the renal pelvis. Some of erythrocytes showed positive for PRDX2 (arrows). The nuclei of neoplastic cells were negative for PRDX2 and cytoplasm was weakly positive. The IHC score of PRDX2 in this sample was 1.33. Bar, 50  $\mu$ m. (C) Transitional cell carcinoma in the ureter. The nuclei of neoplastic cells were negative for PRDX1 whereas the cytoplasm was positive to strongly positive. The IHC score of PRDX1 in this sample was 8.00. Bar, 50  $\mu$ m. (D)

Transitional cell carcinoma in the bladder. The nuclei of neoplastic cells were negative for PRDX1 and the cytoplasm was negative to weakly positive for PRDX2. The IHC score of PRDX2 in this sample was 2.67. Bar, 50  $\mu$ m. (E) Transitional cell carcinoma in the bladder. The nuclei of neoplastic cells were negative to weakly positive for PRDX1. The cytoplasm was positive to strongly positive for PRDX1. The IHC score of PRDX1 in this sample was 6.67. Bar, 50  $\mu$ m. (F) Transitional cell carcinoma in the bladder. The nuclei and cytoplasm of neoplastic cells were weakly positive for PRDX2. The IHC score of PRDX2 in this sample was 5.33. Bar, 50  $\mu$ m. (G) Transitional cell carcinoma in the urethra. The nuclei and cytoplasm of neoplastic cells were positive to strongly positive for PRDX1. The IHC score of PRDX1 in this sample was 9.67. Bar, 50  $\mu$ m. (H) Transitional cell carcinoma in the urethra. The nuclei of neoplastic cells were negative for PRDX2 and cytoplasm was weakly positive. The IHC score of PRDX2 in this sample was 4.67. Bar, 50  $\mu$ m. (I) Transitional cell carcinoma in the prostate. The neoplastic cells showed positive to strongly positive for PRDX1. The IHC score of PRDX1 in this sample was 8.33. Bar, 50  $\mu$ m. (J) Transitional cell carcinoma in the prostate. The neoplastic cells were weakly positive for PRDX2. The IHC score of PRDX2 in this sample was 4.00. Bar, 50  $\mu$ m. (K) Transitional cell carcinoma in the abdominal cavity. The nuclei of neoplastic cells were negative for PRDX1, whereas cytoplasm was weakly positive to positive. The IHC score of PRDX1 in this sample was 6.67. Bar, 50  $\mu$ m. (L) Transitional cell carcinoma in the abdominal cavity. The neoplastic cells were weakly positive for PRDX2. The IHC score of PRDX2 in this sample was 5.33. Bar, 50  $\mu$ m. (M) The box-and-whisker plot of IHC scores of PRDX1 among primary sites of transitional cell carcinoma. There was no significant difference of IHC score of PRDX1 among primary sites. (N) The box-and-whisker plot of IHC scores of PRDX2 among primary sites of transitional cell carcinoma. There was no significant difference of IHC score of PRDX2 among primary sites.

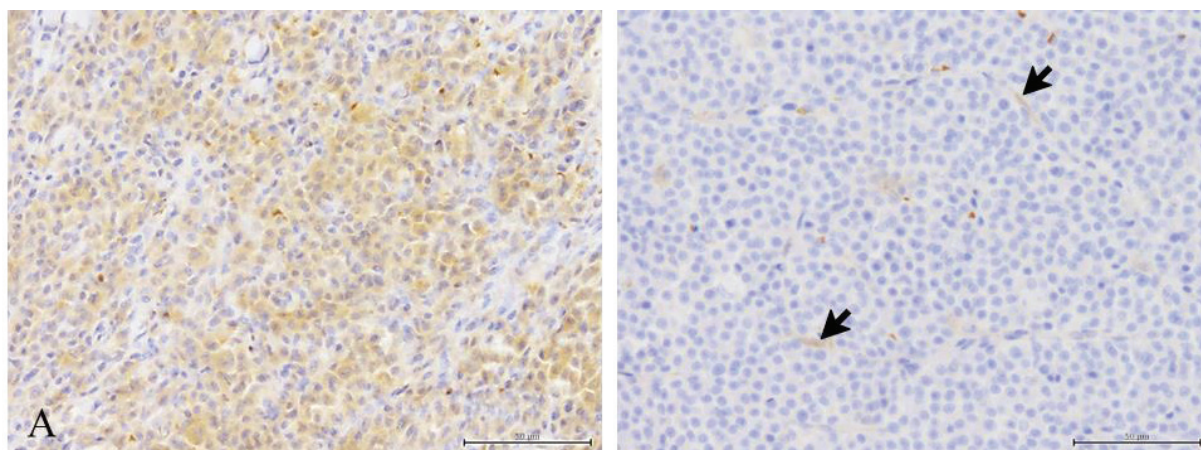


**Figure 1-12.** Immunohistochemistry of PRDX1 and 2 in lymphomas. (A) B-cell lymphoma in the lymph node. Lymphoma cells were weakly positive for PRDX1. The IHC score of PRDX1 in this sample was 4.33. Bar, 50  $\mu$ m. (B) B-cell lymphoma in lymph node. The nuclei of reticular cells in the lymph node showed weakly positive for PRDX2 (arrow). Neoplastic cells were negative for PRDX2. The IHC score of PRDX2 in this sample was 0.00. Bar, 50  $\mu$ m. (C) T-cell lymphoma in the lymph node. Lymphoma cells were weakly positive for PRDX1. The IHC score of PRDX1 in this sample was 4.33. Bar, 50  $\mu$ m. (D) T-cell lymphoma in lymph node. The nuclei of reticular cells in the lymph node showed weakly positive for PRDX2 (arrow). Neoplastic cells were negative for PRDX2. The IHC score of PRDX2 in this sample was 0.00. Bar, 50  $\mu$ m. (E) Box plot showing the IHC score of PRDX1 for B-cell lymphoma (n=14) and T-cell lymphoma (n=13). The y-axis represents the IHC score of PRDX1, ranging from 0 to 10. The x-axis shows the lymphoma types. The median IHC score for B-cell lymphoma is approximately 4.33, and for T-cell lymphoma, it is approximately 3.33. (F) Box plot showing the IHC score of PRDX2 for B-cell lymphoma (n=14) and T-cell lymphoma (n=13). The y-axis represents the IHC score of PRDX2, ranging from 0 to 10. The x-axis shows the lymphoma types. The median IHC score for both B-cell and T-cell lymphoma is 0.00.

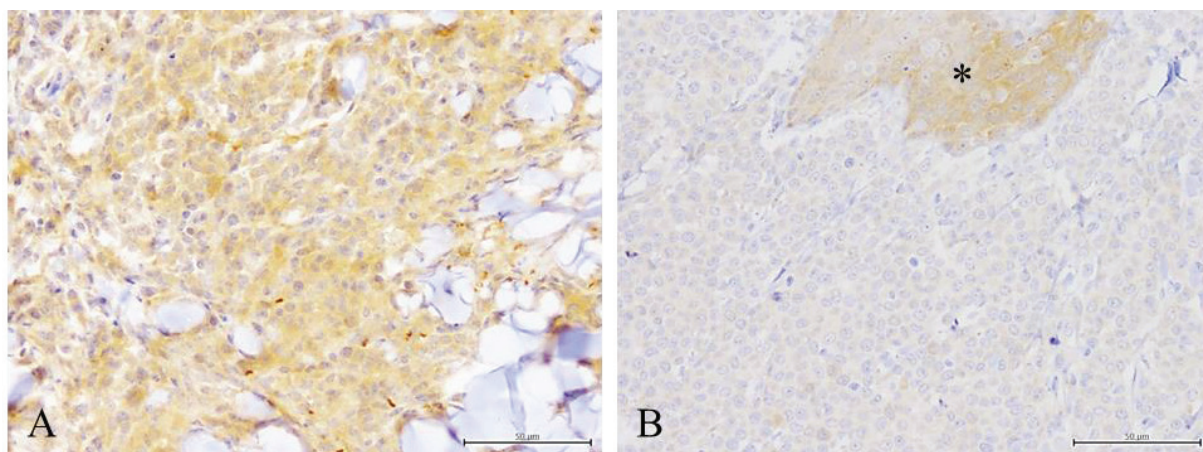
lymph node. The nuclei and cytoplasm of neoplastic cells were positive for PRDX1. The IHC score of PRDX1 in this sample was 5.33. Bar, 50  $\mu$ m. (D) T-cell lymphoma in the lymph node. The nuclei of reticular cells showed weakly positive for PRDX2 (arrow). Neoplastic cells were negative for PRDX2. The IHC score of PRDX2 in this sample was 0.00. Bar, 50  $\mu$ m. (E) The box-and-whisker plot of IHC scores of PRDX1 in B-cell and T-cell lymphomas. There was no significant difference of IHC scores of PRDX1 and 2 between B-cell and T-cell lymphomas. (F) The box-and-whisker plot of IHC scores of PRDX2 in B-cell and T-cell lymphomas. There was no significant difference of IHC scores of PRDX1 and 2 between B-cell and T-cell lymphomas.



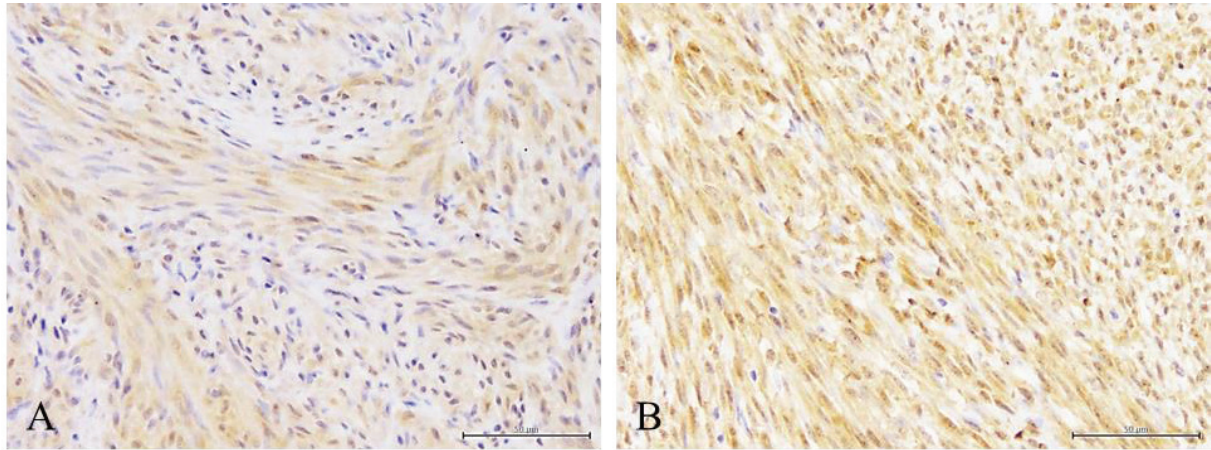
**Figure 1-13.** Immunohistochemistry of PRDX1 and 2 in cutaneous mast cell tumor. (A) Mast cell tumor (Grade I /Low grade, n=16). The nuclei and cytoplasm of neoplastic cells were weakly positive to positive for PRDX1. The IHC score of PRDX1 in this sample was 5.33. Bar, 50  $\mu$ m. (B) Mast cell tumor (Grade I /Low grade). The cytoplasm of neoplastic cells was weakly positive for PRDX2. The IHC score of PRDX2 in this sample was 4.00. Bar, 50  $\mu$ m. (C) Mast cell tumor (Grade II /Low grade, n=18). The neoplastic cells showed weakly positive for PRDX1. The IHC score of PRDX1 in this sample was 4.00. Bar, 50  $\mu$ m. (D) Mast cell tumor (Grade II /Low grade). The nuclei of neoplastic cells were weakly positive for PRDX2. The IHC score of PRDX2 in this sample was 3.67. Bar, 50  $\mu$ m. (E) Mast cell tumor (Grade III/High grade, n=18). The nuclei and cytoplasm of neoplastic cells were weakly positive for PRDX1. The IHC score of PRDX1 in this sample was 3.67. Bar, 50  $\mu$ m. (F) Mast cell tumor (Grade III/High grade). The cytoplasm of neoplastic cells was weakly positive to positive for PRDX2. The IHC score of PRDX2 in this sample was 6.67. Bar, 50  $\mu$ m. (G) The box-and-whisker plot of IHC scores of PRDX1 in mast cell tumors. There was no significant difference of IHC scores of PRDX1 among histological grade of mast cell tumors. (H) The box-and-whisker plot of IHC scores of PRDX2 in mast cell tumors. IHC score in Grade III mast cell tumor was significantly higher than that in Grade II mast cell tumor ( $p < 0.05$ ). (I) The box-and-whisker plot of IHC scores of PRDX1 in mast cell tumors. There was no significant difference of IHC scores of PRDX1 between low and high grade of mast cell tumors. (J) The box-and-whisker plot of IHC scores of PRDX2 in mast cell tumors. IHC score in High grade mast cell tumor was significantly higher than that in Low grade mast cell tumor ( $p < 0.05$ ).



**Figure 1-14.** Immunohistochemistry of PRDX1 and 2 in cutaneous plasmacytoma. (A) Cutaneous plasmacytoma. The nuclei of neoplastic cells were negative to weakly positive for PRDX1 and cytoplasm was weakly positive to positive. The IHC score of PRDX1 in this sample was 5.00. Bar, 50 μm. (B) Cutaneous plasmacytoma. Some of spindle cells showed positive for PRDX2 (arrows). However, neoplastic plasmacytes showed negative to weakly positive for PRDX2. The IHC score of PRDX2 in this sample was 2.67. Bar, 50 μm.



**Figure 1-15.** Immunohistochemistry of PRDX1 and 2 in canine cutaneous histiocytoma. (A) Canine cutaneous histiocytoma. Neoplastic histiocytes were weakly positive for PRDX1. The IHC score of PRDX1 in this sample was 2.33. Bar, 50 µm. (B) Canine cutaneous histiocytoma. Epidermal squamous cells were positive for PRDX2 (\*), however neoplastic histiocytes were negative for PRDX2. The IHC score of PRDX2 in this sample was 0.00. Bar, 50 µm.



**Figure 1-16.** Immunohistochemistry of PRDX1 and 2 in fibrosarcoma. (A) Fibrosarcoma. The nuclei of neoplastic cells were negative to weakly positive for PRDX1 and cytoplasm was weakly positive. The IHC score of PRDX1 in this sample was 4.00. Bar, 50 µm. (B) Fibrosarcoma. The nuclei and cytoplasm showed weakly positive to positive for PRDX2. The IHC score of PRDX2 in this sample was 8.00. Bar, 50 µm.

## 第 2 章

犬の血管内皮性腫瘍におけるペルオキシレドキシン 1 および 2 の発現と  
血管肉腫細胞の増殖におけるペルオキシレドキシン 1 の役割の解析

## I. はじめに

近年の活発な研究により、ヒトの腫瘍性疾患における PRDX の発現とその役割が、徐々に明らかになってきている。肺がんや膵臓がん、肝臓がんのような、様々なヒトの腫瘍において、その正常組織との PRDX の発現の差が発見され (74, 167, 169)、腫瘍発生や増殖、アポトーシス、遠隔転移などの腫瘍動態の変化に関与することが報告されている (64, 97, 102, 176, 197)。さらに、PRDX1 については、大腸がんの遠隔転移や血管新生を、PRDX2 は、非小細胞肺がんの増殖や転移を促進することが知られている (26, 97)。ヒトでは数多くの腫瘍において、PRDX の発現と、腫瘍におけるその役割が研究されており、腫瘍の悪性挙動との関係が明らかとなっている。しかし、動物の PRDX の研究については、犬の血管肉腫における PRDX6 のアポトーシス抑制作用に関する報告があるのみだが (6)、ヒトの腫瘍での知見や第 1 章の正常組織や腫瘍組織での PRDX の発現情報を加味すると、犬の血管肉腫において、PRDX6 と同じペルオキシダーゼファミリーのメンバーである PRDX1 および 2 も、その発生や悪性化に関与している可能性がある。また、PRDX6 とは異なり、PRDX1 および 2 は 2-Cys 型 PRDX であり、これまで PRDX6 で解明されているものとは異なるメカニズムで腫瘍に関与している可能性も考えられ、それらの犬血管肉腫における役割や関連メカニズムは非常に興味深い。

そこで、本章では、犬の腫瘍における検索の中で、良性の血管内皮性腫瘍である海綿状血管腫と、悪性の血管肉腫との間で、PRDX1 および 2 の発現に有意な差があることを見出し、犬の血管肉腫における PRDX1 および 2 の発現について、その組織型や原発部位間の差について解析した。さらに、新生血管が豊富に観察される犬の肉芽組織において、PRDX1 および 2 の発現を免疫組織化学的に検出し、PRDX1 および 2 の発現と病態生理学的な血管新生との関係について考察した。また、PRDX1 に関しては、犬の血管肉腫由来の細胞株を用いた *in vitro* での PRDX1 遺伝子のノックダウン実験によって、犬の血管肉腫細胞の cell viability への影響を評価した。

## II. 材料および方法

### 1. 標本情報

全ての犬の海綿状血管腫 (n=26) および血管肉腫 (n=65) の標本は、2012 年から 2021 年の間に、岐阜大学獣医病理学研究室で収集され、病理診断医によって診断された。海綿状血管腫は、全て皮膚に発生したものであった。血管肉腫は、脾臓 (n=27)、皮膚 (n=27)、腎臓 (n=4)、肝臓 (n=2)、骨 (n=2)、副腎 (n=1)、腸間膜 (n=1)、腹腔 (n=1) に発生したものであった。海綿状血管腫の発生が認められた犬の犬種、年齢、性別は、Table 2-1 に記載した。血管肉腫の発生が認められた個体の情報は、犬種、年齢、性別と共に、発生部位および組織型を追加し、Table 2-2 に記載した。組織型分類は *Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals: Volume 3: Tumors of Soft Tissue* に従った (151)。また、非腫瘍性病変における新生血管での PRDX1 および 2 の発現を検索するために、犬の肉芽組織 (n=24) を収集した。

全ての組織標本は、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、定法に従ってパラフィン中に包埋し、FFPE ブロックを作製した。FFPE ブロックを薄切し、4  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。切片に、脱パラフィンおよび脱水処理を施した後、H&E 染色を実施した。

### 2. 免疫組織化学

組織標本上の PRDX1 および 2 タンパク質の発現を検出するため、犬の肉芽組織および海綿状血管腫、血管肉腫の組織標本を用いて、第 1 章と同様の方法で PRDX1 および 2 に対する免疫組織化学染色を実施した。また、血管肉腫の標本に対しては、他の肉腫との鑑別のため、CD31 に対する免疫組織化学染色も併せて実施した。一次抗体として、切片に、抗ヒト PRDX1 ウサギポリクローナル抗体 (1:500, ab228780, Abcam) および抗ヒト PRDX2 ウサギポリクローナル抗体 (1:1,000, ab109367, Abcam) 抗体、抗ヒト CD31 マウスモノクローナル抗体 (ready-to-use,

JC70A, Dako) を用いた。また、二次抗体として、抗 PRDX1 および 2 抗体を反応させた標本には Histofine® Simple Stain MAX PO (R) (ニチレイバイオサイエンス) を、抗 CD31 抗体を反応させた標本には Histofine® Simple Stain MAX PO (M) (ニチレイバイオサイエンス) を用いた。

犬の肉芽組織および血管内皮性腫瘍の組織標本について、第 1 章の腫瘍組織標本に対して行った方法と同様に、染色強度 (Staining intensity) と染色割合 (Staining ratio) を用いたスコアリングを実施し (102), PRDX1 および 2 の IHC スコアをそれぞれ算出した。PRDX1 および 2 の IHC スコアについて、肉芽組織および海綿状血管腫、血管肉腫間での比較解析を実施し、さらに血管肉腫においては、その組織型間および発生部位間での比較解析も実施した。

### 3. 細胞培養

犬の血管肉腫から樹立された細胞株 (JuA1, JuB2, JuB4, Re12, Re21, Ud2, Ud6) を用いて、PRDX1 および 2 に関する *in vitro* の実験を行った。全ての細胞株は、10%ウシ胎児血清および 100 unit/ml ペニシリン, 100 µg/ml ストレプトマイシン, 0.25 µg/ml アムホテリシン B (ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン B 懸濁液, 富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪), 100 µg/ml カナマイシン (富士フイルム和光純薬株式会社) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (D-MEM) (高グルコース) (L-グルタミン, フェノールレッド含有) (富士フイルム和光純薬株式会社) 中で、37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養された。

### 4. 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法 (qRT-PCR) による犬血管肉腫細胞株における PRDX1 および 2 発現量の検出

各犬血管肉腫細胞株を、プラスチックシャーレ (直径 9 cm, Cell Culture Dish, SPL LIFE SCIENCES) に 70%コンフルエントになるまで培養した後、NucleoSpin RNA Plus (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を用いて総 RNA を抽出し、その後の qRT-PCR に用いるまで -80°C で保存し

た。qRT-PCR には、One Step TB Green® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ株式会社) を用い、取扱説明書に従って、Thermal Cycler Dice® Real Time System TP850 (タカラバイオ株式会社) にて実験を行った。プライマーの設計には Perfect Real Time サポートシステム (<https://www.takara-bio.co.jp/research/prt/intro.htm>, タカラバイオ株式会社) を用い、犬 PRDX1 遺伝子 (GenBank Accession No.: NM\_001252165), 犬 PRDX2 遺伝子 (XM\_003639723) および犬 ATP synthase 遺伝子 (XM\_537027) の遺伝子情報をもとに設計した。使用したプライマーの配列は以下のとおりである。PRDX1, forward 5'-TTC GGC AGA TCA CTG TAA AC-3', reverse 5'-GAT GGT ATC ACT GCC AGG CT-3', PRDX2, forward 5'-GAA GTT CTG CGG CTG CTT CA-3', reverse 5'-TCC TTG CTG TCG TCC ACG TT-3', ATP synthase, forward 5'-CAT TCA ACA GAT CCA GGA TG-3', reverse 5'-GTT CCC GGT AAG TGA GCT CC-3'。ΔΔCt 法を用い、犬 ATP synthase 遺伝子の mRNA の発現量により標準化した PRDX1 および 2 の発現量を得た。実験は 3 回繰り返し、その平均値を算出した。

#### 5. SDS-PAGE およびウエスタンブロット法による犬血管肉腫細胞株における PRDX1 および 2 のタンパク質発現の検出

犬血管肉腫細胞株を、プラスチックシャーレ (直径 9 cm, Cell Culture Dish, SPL LIFE SCIENCES) に 70%コンフルエントになるまで培養した後、第 1 章の材料とおよび方法 2 と同様の方法で、各細胞の総タンパク質を抽出し、SDS-PAGE およびウエスタンブロット法に供するまで -80°C で保存した。各犬血管肉腫細胞株から抽出したタンパク質をサンプルとして、第 1 章の材料および方法 2 と同様に、SDS-PAGE およびウエスタンブロット法による PRDX1 および 2 のタンパク質を検出した。また、C-Digit Blot Scanner (LI-COR) 付属ソフトにより、検出した PVDF 膜上のバンドの濃度からタンパク質発現量を求めた。PRDX1 および 2 のバンドの濃度は、同じサンプルの  $\beta$ -actin のバンドの濃度により補正されたものを用いた。

## 6. small interfering RNA (siRNA) を用いた PRDX1 発現干渉 (PRDX1 ノックダウン)

犬血管肉腫細胞株を、プラスチックシャーレ（直径 9 cm, Cell Culture Dish, SPL LIFE SCIENCES）に 70%コンフルエントになるまで培養した後、6 ウェルプラスチックシャーレ（NUNC MULTIDISH 6, Thermo Fisher Scientific）に、各細胞を  $2.0 \times 10^4$  /well の濃度で播種し、37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件下で 12 時間培養した。その後、遺伝子導入試薬として Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent（Thermo Fisher Scientific）を用いて、以下の各 siRNA を細胞に導入した。PRDX1 mRNA に対する siRNA および siRNA の配列を組み換え、特定のタンパク質をノックダウンしない陰性コントロール RNA (scramble) RNA（以下 scRNA）（Stealth RNAi™ siRNA, Thermo Fisher Scientific）を、Stealth RNAi siRNA カスタムツール（Thermo Fisher Scientific）を用い、犬 PRDX1 遺伝子の配列（GenBank Accession No.: NM\_001252165）をもとに作製した。それぞれの配列は siRNA-PRDX1, 5'-CAA CUG UCA AGU GAU UGG UGC UUC U-3', 5'-A GAA GCA CCA AUC ACU UGA CAG UUG-3' および scRNA-PRDX1, 5'-CAA UGA CGA GUU AGU UGC GUU CUC U-3', 5'-A GAG AAC GCA ACU AAC UCG UCA UUG-3' で、添加後 20 nM になる濃度で導入し、37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件下で 60 時間培養した。その後、前述の方法と同様に、NucleoSpin RNA Plus（タカラバイオ株式会社）を用いて総 RNA を抽出し、qRT-PCR によって、RNA 干渉における PRDX1 および 2 の mRNA 発現量を  $\Delta \Delta C_t$  法にて算出した。また、プロテアーゼインヒビターを加えた Lysis buffer を用いて総タンパク質を抽出し、前述の SDS-PAGE およびウェスタンブロット法によって、RNA 干渉後の PRDX1 および 2 のタンパク質を測定した。

## 7. Cell viability assay

犬血管肉腫細胞株を、プラスチックシャーレ（直径 9 cm, Cell Culture Dish, SPL LIFE

SCIENCES) に 70%コンフルエントになるまで培養した後, 96 ウェルプラスチックシャーレ (NUNC MULTIDISH 96, Thermo Fisher Scientific) に, 各細胞を  $1.5 \times 10^3$  /well の濃度で播種し, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件下で 12 時間培養した。その後, 遺伝子導入試薬として Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて, siRNA-PRDX1 あるいは scRNA-PRDX1 を, 添加後 20 nM になる濃度で導入し, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件下で 60 時間培養した。siRNA-PRDX1 あるいは scRNA-PRDX1 を加えないもの (コントロール) も同じ条件で培養した。その後, 位相差顕微鏡下で細胞の形態を観察した。続いて各ウェルに, Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (タカラバイオ株式会社) を添加し, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件下に 30 分間静置した。30 分間の静置後, マイクロプレートリーダー (iMark Microplate Reader, Bio Rad) を用いて, 450 nm の波長で, 吸光度を測定した。それぞれの条件で, 4 ウェルの吸光度を平均し, siRNA-PRDX1 あるいは scRNA-PRDX1 の吸光度を, コントロールの吸光度で除した値を relative cell viability とした。実験は 3 回繰り返し, その平均値を各条件間で比較した。

## 8. 統計解析

全てのデータは, 平均値±標準偏差 (SD) で表した。2 群間の差の比較には Wilcoxon の順位和検定を, 3 群以上の比較には Steel-Dwass 検定を用いた。全てのデータ処理は, JMP Pro 16 (SAS Institute) を用いて実施した。 $p$  値<0.05 のデータを, 統計的に有意とみなした。

### III. 結果

#### 1. 犬の肉芽組織の新生血管における PRDX1 および 2 の発現

肉芽組織において、血管新生や線維芽細胞などの細胞増殖が旺盛な領域において、不規則な血管腔を形成する新生血管の内皮細胞の核および細胞質において PRDX1 および 2 は強く陽性を示した (Figure 2-1 A, B)。一方、これらの細胞増殖が旺盛な領域に連続し、膠原線維の増生が豊富なより成熟した肉芽組織における成熟した血管の血管内皮細胞では、PRDX1 および 2 は陰性を示した (Figure 2-1 C, D)。また、肉芽組織中の好中球は、PRDX1 および 2 に陰性から弱陽性を、マクロファージは強陽性を示し、線維芽細胞は陰性から陽性を示した。

#### 2. 血管内皮性腫瘍における PRDX1 および 2 の発現

海綿状血管腫において、腫瘍細胞の核および細胞質は、PRDX1 および 2 に陰性を示した (Figure 2-2 A, B)。海綿状血管腫における PRDX1 の IHC スコアの平均値は 3.32 ( $SD \pm 3.41$ )、PRDX2 の平均値は 1.04 ( $SD \pm 1.48$ ) であった。

血管肉腫において、腫瘍細胞の核および細胞質は、PRDX1 および 2 に強陽性を示した (Figure 2-2 C, D)。血管肉腫における PRDX1 の IHC スコアの平均値は 7.52 ( $SD \pm 3.34$ )、PRDX2 の平均値は 7.72 ( $SD \pm 4.01$ ) であった。

海綿状血管腫および血管肉腫の PRDX1 および 2 の IHC スコアをそれぞれ比較した結果、PRDX1, 2 のいずれでも、海綿状血管腫の IHC スコアより血管肉腫の IHC スコアが有意に高かった (Figure 2-2 E, F)。

#### 3. 犬の血管肉腫の組織型間での PRDX1 および 2 の発現の比較

血管肉腫の組織型間で、PRDX1 および 2 の IHC スコアを比較した (Figure 2-3)。PRDX1 の IHC スコアの平均値および中央値は、それぞれ、Conventional 型で 7.73 (SD±3.30) および 8.17, Kaposiform 型で 7.42 (SD±4.27) および 9.33, Epithelioid 型で 7.10 (SD±2.87) および 7.33 であった (Figure 2-3 A)。また、PRDX2 の IHC スコアの平均値および中央値は、それぞれ、Conventional 型で 7.49 (SD±4.21) および 9.50, Kaposiform 型で 8.79 (SD±3.38) および 10.67, Epithelioid 型で 7.54 (SD±4.03) および 9.50 であった (Figure 2-3 B)。これらの血管肉腫の組織型間で、PRDX1 および 2 の IHC スコアに有意な差はなかった。

#### 4. 犬の血管肉腫の発生部位間での PRDX1 および 2 の発現の比較

血管肉腫の発生部位間で、PRDX1 および 2 の IHC スコアを比較した (Figure 2-4)。PRDX1 の IHC スコアの平均値および中央値は、それぞれ、脾臓で 8.48 (SD±3.04) および 9.33, 皮膚で 6.89 (SD±3.38) および 8.00, 腎臓で 5.83 (SD±5.82) および 6.17, 肝臓で 8.83 (SD±2.59) および 8.83, 骨で 8.33 (SD±0.00) および 8.33, 副腎で 4.67 (SD±0.00) および 4.67, 腸間膜で 7.00 (SD±0.00) および 7.00, 腹腔で 4.67 (SD±0.00) および 4.67 であった (Figure 2-4 A)。また、PRDX2 の IHC スコアの平均値および中央値は、それぞれ、脾臓で 7.47 (SD±4.14) および 9.00, 皮膚で 7.72 (SD±3.97) および 10.00, 腎臓で 9.25 (SD±3.59) および 10.50, 肝臓で 5.67 (SD±6.13) および 5.67, 骨で 6.83 (SD±0.00) および 6.83, 副腎で 8.00 (SD±0.00) および 8.00, 腸間膜で 10.00 (SD±0.00) および 10.00, 腹腔で 12.00 (SD±0.00) および 12.00 であった (Figure 2-4 B)。これらの血管肉腫の発生部位間で、PRDX1 および 2 の IHC スコアに有意な差はなかった。

#### 5. 犬血管肉腫由来細胞株における PRDX1 および 2 の mRNA の発現

血管肉腫細胞株における PRDX1 および 2 の mRNA の発現が検出された (Figure 2-5 A, C)。PRDX1 の mRNA の発現の平均値は, Ud6 細胞株で最も高く 6.36 ( $SD \pm 2.04$ ) で, JuB4 細胞株で最も低く 2.92 ( $SD \pm 1.60$ ) であった。一方, PRDX2 の mRNA の発現の平均値は, JuB4 で 1.34 ( $SD \pm 0.0375$ ) と最も高く, JuA1 においては 0.320 ( $SD \pm 0.198$ ) で最も低かった。

#### 6. 犬血管肉腫由来細胞株における PRDX1 および 2 タンパク質の発現

いずれの細胞株においても, PRDX1 および 2 のタンパク質の発現が認められた (Figure 2-5 B, D)。 $\beta$ -actin のタンパク質量で補正した PRDX1 のタンパク質の量は, JuA1 や JuB2, Ud2, Ud6 で高く, JuB4 で最も低かった (Figure 2-5 B)。一方, PRDX2 のタンパク質の発現は, JuA1 や JuB2, JuB4, Re12, Re21 で高く, Ud6 で最も低かった (Figure 2-5 D)。それぞれの細胞の PRDX1 および 2 のタンパク質の発現は, mRNA の発現とおおむね一致していた。

#### 7. siRNA-PRDX1 を用いた犬血管肉腫由来細胞株における PRDX1 発現干渉

PRDX1 のタンパク質の発現量を考慮し, 発現の高かった Ud6 と, 発現の低かった JuB4 の細胞株を, 後述の実験に用いた。血管肉腫細胞株 (JuB4, Ud6) において PRDX1 をノックダウンし, PRDX1 の mRNA およびタンパク質の発現を検索した。scRNA-PRDX1 を導入した細胞と比較して, siRNA-PRDX1 を導入した細胞では, PRDX1 の mRNA の発現は有意に減少した (Figure 2-6 A) ( $p < 0.05$ )。siRNA-PRDX1 を導入した JuB4 における PRDX1 の mRNA の相対値の平均は 0.0272 ( $SD \pm 0.0330$ ), Ud6 は 0.0371 ( $SD \pm 0.0579$ ) であった。また, PRDX1 のタンパク質に関しても, その発現は減少した (Figure 2-6 B)。一方, PRDX2 のタンパク質の発現に変化はなかった (Figure 2-6 B)。

#### 8. siRNA-PRDX1 を用いた犬血管肉腫由来細胞株における PRDX1 干渉後の cell viability

血管肉腫細胞株 (JuB4, Ud6) において PRDX1 をノックダウンした後の位相差顕微鏡下での細胞の形態を Figure 2-7 に示した。siRNA-PRDX1 添加をした JuB4 および Ud6 (Figure 2-7 A, C) の細胞は、scRNA-PRDX1 添加群 (Figure 2-7 B, D) と比較して少なかった。しかし、細胞株の形態に違いは見られず、浮遊している死滅細胞の数などには明らかな差は見られなかった。

また、PRDX1 をノックダウンした後の、血管肉腫細胞株の relative cell viability を算出した (Figure 2-8)。siRNA-PRDX1 および scRNA-PRDX1 を添加した JuB4 の relative cell viability は、それぞれ 0.539 (SD $\pm$ 0.0338) および 0.893 (SD $\pm$ 0.0443) であった。また、siRNA-PRDX1 および scRNA-PRDX1 を添加した Ud6 の relative cell viability は、それぞれ 0.355 (SD $\pm$ 0.00746) および 0.836 (SD $\pm$ 0.0298) であった。scRNA-PRDX1 を導入した細胞株の relative cell viability と比較して、siRNA-PRDX1 を導入した細胞株の relative cell viability は、有意に低下していた ( $p < 0.05$ )。

#### IV. 考察

PRDX1 は、ほとんど全ての生物に発現している抗酸化酵素であり、真核生物の PRDX のアミノ酸配列は、高い相同性を有している。そのため、PRDX は、特に真核生物において、必要不可欠な役割を担っていると考えられる (127)。これまで、動物においては、犬の血管肉腫における PRDX6 の過剰発現と、腫瘍細胞のアポトーシスに対する抵抗性の上昇についての報告がある (6)。唯一の 1-Cys 型 PRDX である PRDX6 は、PRDX のアイソフォームの中でも特徴的で、ペルオキシダーゼとしての役割のみならず、酸性カルシウム非依存性ホスホリパーゼ A2 活性を有するなど、生体において多重的な役割を担うことが分かっている (7)。対照的に、典型 2-Cys 型に分類される PRDX1 および 2 に関しては、それらの発現と犬の腫瘍との関係はほとんど解明されていないため、本研究では PRDX1 および 2 の犬の腫瘍における発現と役割に注目した。

本章では、血管内皮性腫瘍について、良性である海綿状血管腫と悪性である血管肉腫、さらに血管肉腫では、その組織型および発生部位間での PRDX1 および 2 の発現を比較した。血管肉腫での PRDX1 および 2 の発現は、犬の肉芽組織における新生血管の血管内皮細胞での PRDX1 および 2 の発現と比較・考察した。

犬の肉芽組織において、血管新生領域で観察される血管内皮細胞では、その核および細胞質で、PRDX1 および 2 の強い発現が検出された。一方、休止領域の血管内皮細胞は、PRDX1 および 2 に対して陰性から弱陽性を示した。この休止領域の血管の血管内皮細胞の染色性は、正常な犬の真皮や皮下組織で観察される成熟した血管内皮細胞と同様の染色性で、血管内皮細胞での PRDX1 および 2 の発現は、肉芽組織内での増殖状態と関連がある可能性が示唆された。好中球から産生された ROS は、血管内皮細胞に PRDX の発現を誘導することが知られている (166)。肉芽組織の血管新生期には、好中球やマクロファージなどの炎症細胞の浸潤が観察され、ROS の産生が盛んになっていると考えられる。そのため、血管新生期における血管内皮細胞は、高濃度の ROS に

よる酸化ストレスから自身を保護するため、抗酸化酵素である PRDX の発現を亢進している可能性がある。さらに、特に炎症や腫瘍組織における PRDX1 および 2 は、VEGF や HIF-1 などの様々なシグナル因子を介して、血管内皮細胞の新生や増殖に関する重要な役割を果たすことが知られている (75, 97, 148)。また、ヒトの血管内皮細胞において、PRDX2 は、酸化感受性システイン残基を有する VEGF receptor (VEGFR) -2 の不活性化を阻止している (75)。さらに、犬の肉芽組織の新生血管内皮細胞における VEGF や Basic fibroblast growth factor およびそれらの受容体の発現についての報告もある (191)。これらを踏まえると、血管内皮細胞における PRDX の発現は、ROS による酸化ストレスからの保護だけでなく、VEGF を含む様々な成長因子の発現を制御することで、血管新生にも関係している可能性がある。さらに、VEGF とその受容体は、犬の血管肉腫細胞での発現も確認されており (191)、肉芽組織の新生血管と同様に、犬の血管肉腫における VEGF および VEGFR と PRDX との関連も示唆される。

様々な腫瘍組織では、正常組織と比較して、PRDX の発現が変化しており、これは PRDX の発現の変化が、腫瘍の発生および腫瘍細胞の生存や増殖、遠隔転移などの悪性挙動に影響を与えている可能性を示唆している (127)。近年、 $H_2O_2$  を含む ROS が、様々なシグナル伝達経路において、タンパク質の酸化還元状態を制御するレドックス制御のセカンドメッセンジャーとして、重要な役割を果たしていることが知られている (13, 127)。さらに、PRDX の発現の変化は、レドックス制御によって、腫瘍細胞の生存や増殖において重要な役割を果たしている。本研究では、海綿状血管腫と比較して、犬の血管肉腫において、PRDX1 および 2 の有意な高発現が観察された。この結果は、ヒトの膵臓がんや肝臓がん、肺がん、食道扁平上皮癌における PRDX1 および 2 の発現の報告と一致している (26, 39, 78, 167, 169)。これらの研究により、PRDX1 および 2 は、ヒトの悪性腫瘍に発現し、腫瘍の悪性化等を促進しており、犬の血管肉腫においては、その組織型や発生部位に関わらず、血管肉腫の腫瘍細胞に広く発現していることが示唆される。

Cell viability assay において、PRDX1 のノックダウンで、血管肉腫細胞株の relative cell viability は有意に低下した。WST-1 法による Cell viability assay は生細胞中のミトコンドリア脱水素酵素の活性により生細胞数を定量する方法であり、今回の研究では、位相差顕微鏡下で PRDX1 をノックダウンした細胞株で、死滅細胞の増加はみられなかったことを考慮すると、PRDX1 のノックダウンによって、細胞増殖が抑制された可能性が考えられた。ヒトの乳腺腫瘍細胞株を用いた実験において、PRDX1 のノックダウンにより、腫瘍細胞周期の G0/G1 期停止が誘導された報告がある (11)。今回の研究における relative cell viability の低下も、ヒトの乳腺腫瘍での報告にある様に、腫瘍細胞株の細胞周期が停止した可能性が考えられる。

正常細胞および腫瘍細胞の生存、増殖、分化、アポトーシスなどに関わる細胞内シグナル伝達経路として様々なものが知られているが、近年、ヒトの多くの腫瘍において最も頻繁に変化している経路の一つとして、phosphatidylinositol-3 kinase (以下 PI3K) /Akt/ mTOR 経路が注目されている (3, 32, 34, 76, 189, 195)。この経路は、細胞外増殖因子が上皮成長因子受容体などの膜貫通型受容体チロシンキナーゼに結合することで誘発され (134, 185)、PI3K が活性化される。この活性化した PI3K が、Akt を活性化させ、下流のタンパク質中のセリンやスレオニンのリン酸化を促進することで、様々なシグナル伝達経路を活性化する。PRDX1 は、この PI3K/Akt/mTOR 経路を促進することが知られており、ヒトの線維肉腫では、腫瘍細胞の増殖や遠隔転移が促進される (20)。犬の腫瘍においては、血管肉腫でこの経路の亢進が報告されており、血管肉腫細胞の増殖や遊走、VEGF の産生などに関与している、と報告されている (120, 142)。今回の研究では、PRDX1 のノックダウンによって、犬血管肉腫細胞株の細胞増殖率が低下した。今回の血管肉腫細胞株の増殖率の低下が、PRDX1 による PI3K/Akt/mTOR 経路の活性化に依存したものなのかは明らかになっていないが、その一つの候補として、今後のさらなる研究が期待される。今回、検索できなかった PRDX2 やその他の PRDX アイソフォームのノックダウンによる cell viability への影響も非常に興味をもたれる。PRDX アイソフォームは大きく 3 つに分類され、PRDX1 と 2

は同じ典型 2-Cys 型に分類されるので、機能的に近い可能性がある。したがって、PRDX1 に加え、PRDX2 の発現のノックダウンを行えば、cell viability の低下はより顕著になる可能性がある。本研究の予備実験では、PRDX2 の発現を効率的にノックダウンできる siRNA が作製できなかったが、引き続き PRDX2 のノックダウンを検討していきたい。

## V. 小括

本章では、犬の血管内皮性腫瘍および犬の肉芽組織で観察される新生血管における PRDX1 および 2 の発現について、免疫組織化学的な検索と解析を実施した。免疫染色で、犬の肉芽組織において、PRDX1 および 2 は、休止期の血管内皮細胞は陰性を示したが、血管新生期の内皮細胞においては、強い陽性像が観察された。また、良性の腫瘍である海綿状血管腫と比較して、悪性の血管肉腫において、PRDX1 および 2 の陽性スコアが、有意に高かった。さらに、犬の血管肉腫において、その組織型および発生部位間での PRDX1 および 2 の陽性スコアに有意な差はなかった。これらの結果から、犬の血管肉腫の悪性の性状に PRDX1 および 2 の関与が考えられた。また、血管新生時の血管内皮細胞においても PRDX1 および 2 の陽性所見がみられたことから、血管肉腫の腫瘍細胞と増殖性の血管内皮細胞には共通性があり、血管内皮細胞の増生に関わる因子との関連が疑われた。

さらに本章では、犬の血管肉腫から樹立された細胞株を用いて、PRDX1 遺伝子のノックダウン実験を実施し、腫瘍細胞株の cell viability を検索したところ、PRDX1 遺伝子をノックダウンすると、cell viability は低下するが、位相差顕微鏡下では、細胞の形態変化はほとんどなく、死滅細胞もコントロールと比較した違いは見られなかった。以上のことより、PRDX1 のノックダウンによって、細胞増殖活性を低下させている可能性が示唆された。

## 第 2 章

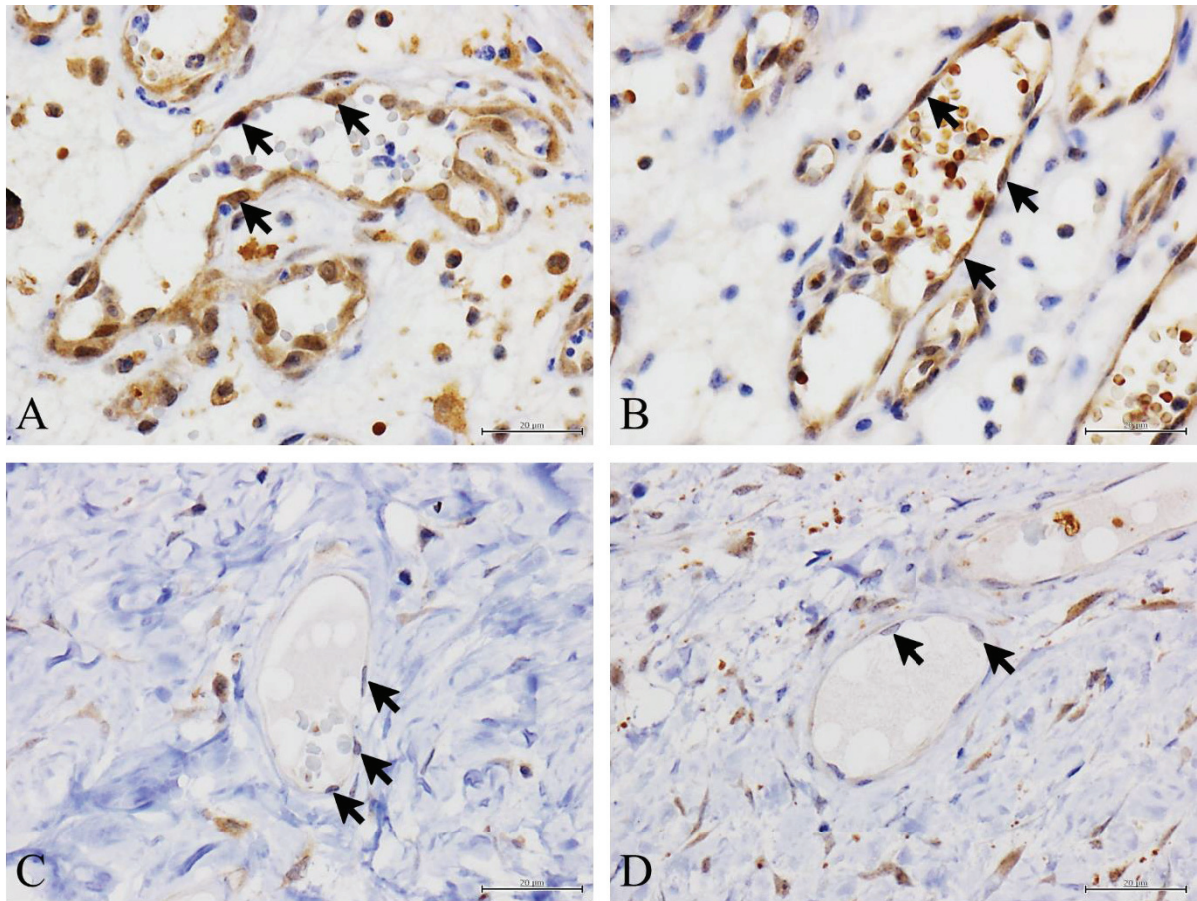
### 图表

**Table 2-1. Individual information of dogs with hemangioma.**

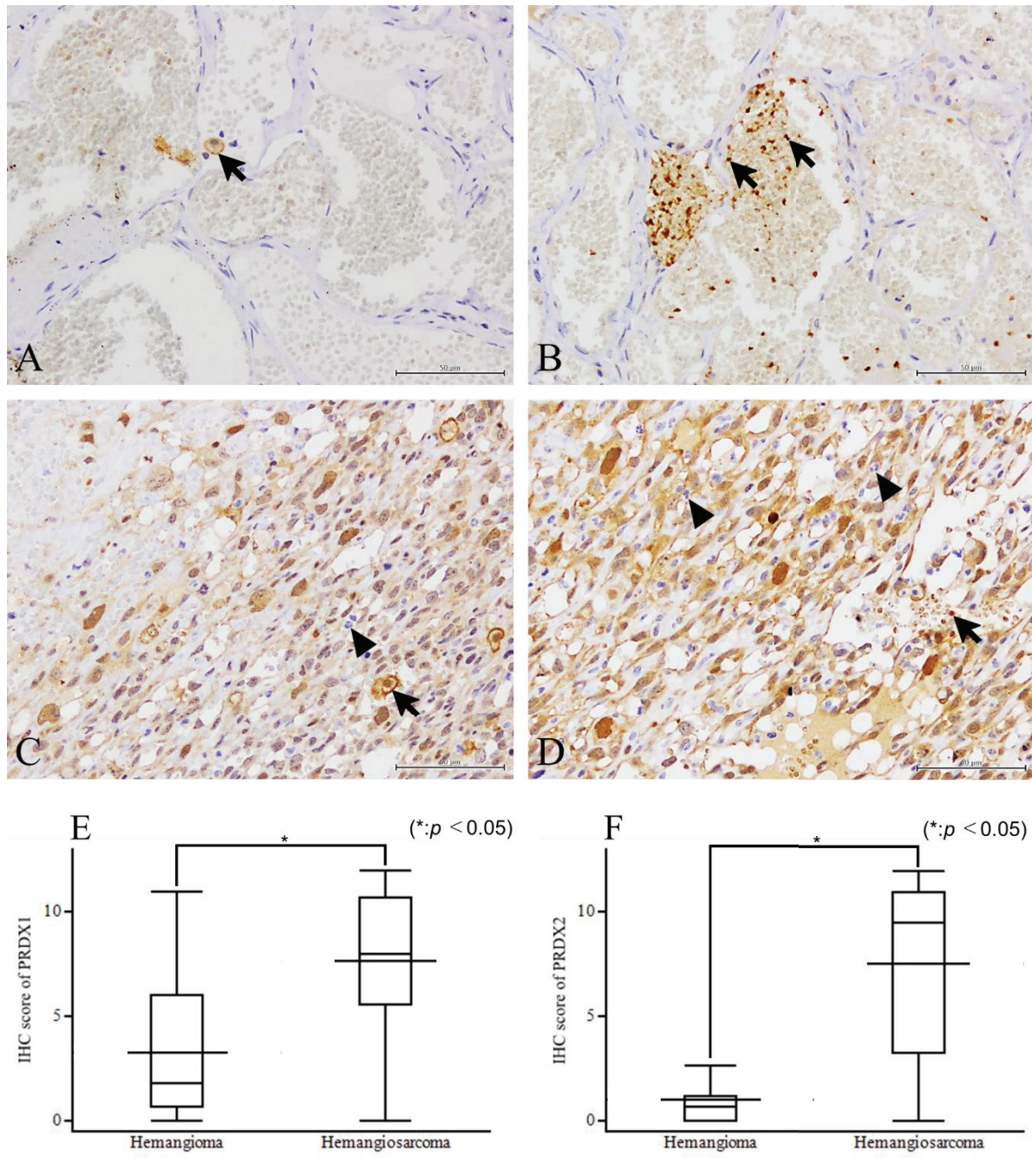
| No. | Breed                | Age     |       | Sex             | Primary site        |
|-----|----------------------|---------|-------|-----------------|---------------------|
|     |                      | year    | month |                 |                     |
| 1   | Beagle               | 13      | 0     | Female, spayed  | Skin, neck          |
| 2   | Border Collie        | 9       | 3     | Female          | Skin, hindlimb      |
| 3   | French Bulldog       | 7       | 8     | Male, castrated | Skin, elbow         |
| 4   | French Bulldog       | 7       | 10    | Female          | Skin, neck          |
| 5   | German Shepherd Dog  | 8       | 2     | Male, castrated | Skin, neck          |
| 6   | German Shepherd Dog  | 9       | 4     | Female          | Skin, back          |
| 7   | Golden Retriever     | 3       | 9     | Female, spayed  | Skin, shoulder      |
| 8   | Golden Retriever     | 4       | 0     | Male, castrated | Skin, thorax        |
| 9   | Golden Retriever     | 4       | 1     | Female          | Skin, hindlimb      |
| 10  | Golden Retriever     | 7       | 4     | Female, spayed  | Skin, pinna         |
| 11  | Golden Retriever     | 8       | 0     | Female, spayed  | Skin, perineum      |
| 12  | Golden Retriever     | 9       | 0     | Female, spayed  | Skin, forelimb      |
| 13  | Miniature Dachshund  | 13      | 7     | Female          | Skin, buttock       |
| 14  | Miniature Dachshund  | 14      | 0     | Male, castrated | Skin                |
| 15  | Miniature Dachshund  | 16      | 3     | Female, spayed  | Skin                |
| 16  | Miniature Schnauzer  | 7       | 8     | Female, spayed  | Skin, neck          |
| 17  | Pembroke Welsh Corgi | 13      | 0     | Female          | Skin, mammary gland |
| 18  | Pembroke Welsh Corgi | 14      | 0     | Male, castrated | Skin, abdomen       |
| 19  | Shiba Inu            | 13      | 1     | Male            | Skin, abdomen       |
| 20  | Shih Tzu             | 9       | 0     | Male, castrated | Skin, back          |
| 21  | Spitz                | 13      | 0     | Male, castrated | Skin, neck          |
| 22  | Toy Poodle           | 4       | 3     | Male, castrated | Skin, hindlimb      |
| 23  | Toy Poodle           | 13      | 6     | Female, spayed  | Skin                |
| 24  | Toy Poodle           | Unknown |       | Female, spayed  | Skin                |
| 25  | Wire Fox Terrier     | 7       | 10    | Male, castrated | Skin, thigh         |
| 26  | Mix                  | 12      | 0     | Female, spayed  | Skin                |

Table 2-2. Histopathological subtype and individual information of dogs with hemangiosarcoma.

| Histopathological subtype | No. | Breed                 | Age  |       | Sex             | Primary site           |
|---------------------------|-----|-----------------------|------|-------|-----------------|------------------------|
|                           |     |                       | year | month |                 |                        |
| Conventional              | 1   | Bernese Mountain Dog  | 9    | 7     | Unknown         | Skin, thigh            |
|                           | 2   | Flat-Coated Retriever | 6    | 0     | Female          | Abdominal cavity       |
|                           | 3   | French Bulldog        | 11   | 3     | Female, spayed  | Skin                   |
|                           | 4   | French Bulldog        | 13   | 2     | Female          | Skin, neck             |
|                           | 5   | French Bulldog        | 13   | 8     | Male            | Spleen                 |
|                           | 6   | French Bulldog        | 13   | 8     | Male, castrated | Spleen                 |
|                           | 7   | German Shepherd Dog   | 6    | 0     | Female          | Spleen                 |
|                           | 8   | Golden Retriever      | 9    | 10    | Male, castrated | Spleen                 |
|                           | 9   | Golden Retriever      | 12   | 6     | Male, castrated | Spleen                 |
|                           | 10  | Golden Retriever      | 15   | 3     | Female, spayed  | Skin                   |
|                           | 11  | Labrador Retriever    | 9    | 10    | Female, spayed  | Skin, lower abdomen    |
|                           | 12  | Labrador Retriever    | 10   | 0     | Male, castrated | Bone                   |
|                           | 13  | Labrador Retriever    | 12   | 0     | Male            | Spleen                 |
|                           | 14  | Miniature Dachshund   | 10   | 0     | Female, spayed  | Spleen                 |
|                           | 15  | Miniature Dachshund   | 12   | 0     | Female, spayed  | Spleen                 |
|                           | 16  | Miniature Dachshund   | 13   | 0     | Male            | Skin                   |
|                           | 17  | Miniature Dachshund   | 14   | 3     | Male, castrated | Spleen                 |
|                           | 18  | Miniature Dachshund   | 17   | 0     | Male            | Skin                   |
|                           | 19  | Pembroke Welsh Corgi  | 12   | 5     | Male, castrated | Skin, lower abdomen    |
|                           | 20  | Pembroke Welsh Corgi  | 12   | 6     | Female          | Kidney                 |
|                           | 21  | Pug                   | 7    | 6     | Male            | Skin, abdomen          |
|                           | 22  | Shetland Sheepdog     | 10   | 2     | Male, castrated | Spleen                 |
|                           | 23  | Shiba Inu             | 14   | 7     | Male            | Skin, neck             |
|                           | 24  | Shih Tzu              | 9    | 0     | Unknown         | Skin, forelimb         |
|                           | 25  | Toy Poodle            | 8    | 7     | Male, castrated | Spleen                 |
|                           | 26  | Toy Poodle            | 11   | 10    | Male            | Kidney                 |
|                           | 27  | Toy Poodle            | 12   | 0     | Male, castrated | Spleen                 |
|                           | 28  | Toy Poodle            | 13   | 0     | Male, castrated | Spleen                 |
|                           | 29  | Toy Poodle            | 15   | 1     | Female, spayed  | Spleen                 |
|                           | 30  | Whippet               | 9    | 0     | Male, castrated | Skin, crus             |
|                           | 31  | Yorkshire Terrier     | 13   | 9     | Female          | Skin, neck             |
|                           | 32  | Mix                   | 9    | 10    | Male, castrated | Adrenal gland          |
|                           | 33  | Mix                   | 11   | 7     | Male            | Spleen                 |
|                           | 34  | Mix                   | 11   | 10    | Male, castrated | Bone                   |
|                           | 35  | Mix                   | 12   | 7     | Male, castrated | Skin                   |
|                           | 36  | Unknown               | 9    | 1     | Male            | Liver                  |
|                           | 37  | Unknown               | 12   | 0     | Male            | Spleen                 |
|                           | 38  | Unknown               | 12   | 11    | Male            | Skin                   |
| Kaposiform                | 1   | Border Collie         | 10   | 10    | Male, castrated | Spleen                 |
|                           | 2   | Border Collie         | 12   | 0     | Female, spayed  | Spleen                 |
|                           | 3   | Chihuahua             | 13   | 6     | Male            | Spleen                 |
|                           | 4   | Golden Retriever      | 9    | 4     | Female, spayed  | Spleen                 |
|                           | 5   | Golden Retriever      | 11   | 0     | Male            | Spleen                 |
|                           | 6   | Miniature Dachshund   | 13   | 0     | Female, spayed  | Spleen                 |
|                           | 7   | Miniature Dachshund   | 13   | 0     | Male, castrated | Kidney                 |
|                           | 8   | Miniature Dachshund   | 13   | 1     | Female          | Kidney                 |
|                           | 9   | Miniature Dachshund   | 13   | 2     | Unknown         | Skin, neck             |
|                           | 10  | Miniature Schnauzer   | 11   | 3     | Female, spayed  | Spleen                 |
|                           | 11  | Wire Fox Terrier      | 10   | 0     | Female          | Skin                   |
| Epithelioid               | 1   | French Bulldog        | 9    | 0     | Female, spayed  | Skin, mammary gland    |
|                           | 2   | Italian Greyhound     | 13   | 5     | Female, spayed  | Skin, neck             |
|                           | 3   | Jack Russell Terrier  | 9    | 11    | Male            | Mesentery              |
|                           | 4   | Jack Russell Terrier  | 10   | 1     | Male            | Skin, lower abdomen    |
|                           | 5   | Japanese Dog Breed    | 14   | 11    | Unknown         | Skin                   |
|                           | 6   | Labrador Retriever    | 9    | 0     | Male, castrated | Spleen                 |
|                           | 7   | Labrador Retriever    | 11   | 8     | Female, spayed  | Skin, neck and abdomen |
|                           | 8   | Labrador Retriever    | 12   | 7     | Male, castrated | Liver                  |
|                           | 9   | Miniature Dachshund   | 8    | 0     | Female, spayed  | Skin                   |
|                           | 10  | Miniature Dachshund   | 11   | 2     | Female, spayed  | Spleen                 |
|                           | 11  | Miniature Dachshund   | 14   | 3     | Female, spayed  | Spleen                 |
|                           | 12  | Miniature Dachshund   | 14   | 3     | Male            | Skin, anus             |
|                           | 13  | Papillon              | 13   | 5     | Unknown         | Skin, neck             |
|                           | 14  | Pembroke Welsh Corgi  | 13   | 0     | Female, spayed  | Spleen                 |
|                           | 15  | Toy Poodle            | 9    | 0     | Male, castrated | Skin                   |
|                           | 16  | Toy Poodle            | 13   | 4     | Female          | Skin, hindlimb         |

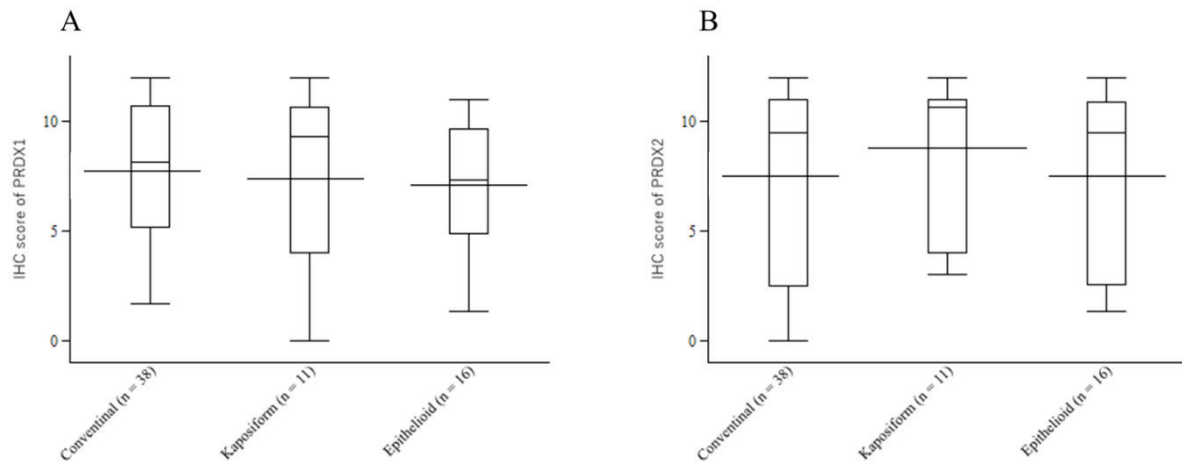


**Figure 2-1.** Immunohistochemistry of PRDX1 and 2 in the newly formed blood vessels of canine granulation tissues. (A) The nucleus and cytoplasm of endothelial cells in angiogenic region were positive for PRDX1 (arrows). Bar, 50 µm. (B) The nucleus and cytoplasm of endothelial cells in angiogenic region were positive for PRDX2 (arrows). Bar, 50 µm. (C) The nucleus and cytoplasm of endothelial cells in resting region were negative for PRDX1 (arrows). Bar, 50 µm. (D) The nucleus and cytoplasm of endothelial cells in resting region were negative for PRDX2 (arrows). Bar, 50 µm.

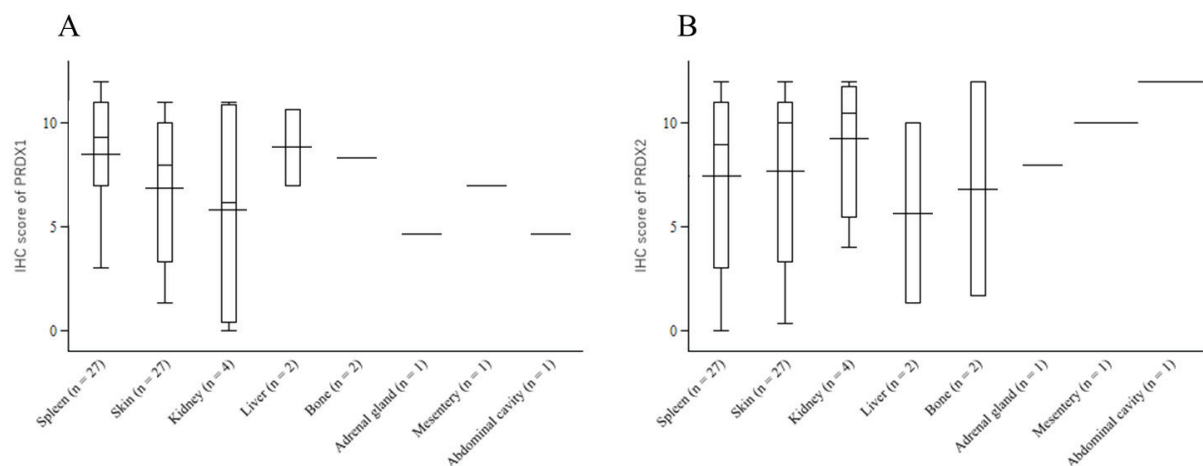


**Figure 2-2.** Immunohistochemistry of PRDX1 and 2 in canine hemangioma (HA) and hemangiosarcoma (HSA) tissues. (A) Immunohistochemical (IHC) staining image for PRDX1 expression in canine HA. Macrophages in HA tissues were positive for PRDX1 (arrow). HA cells were negative for PRDX1. IHC score of this sample is 0.00. Bar, 50  $\mu$ m. (B) IHC staining image for PRDX2 in canine HA. Some erythrocytes were positive for PRDX2 (arrows). HA cells were negative

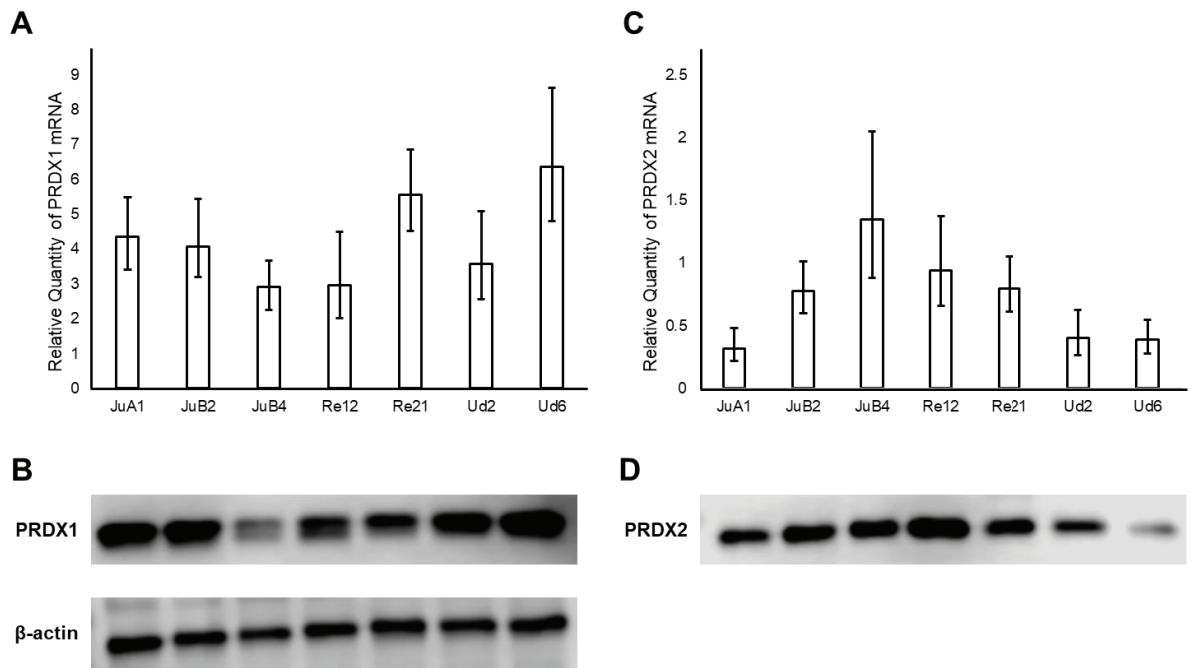
for PRDX2. IHC score of this sample is 0.00. Bar, 50  $\mu$ m. (C) IHC staining image for PRDX1 in canine HSA. Macrophages (arrow) and neutrophils (arrowhead) were observed as positive and negative control for PRDX1, respectively. HSA cells were positive for PRDX1. IHC score of this sample is 12.00. Bar, 50  $\mu$ m. (D) IHC staining image for PRDX2 in canine HSA. Some erythrocytes stained positively (arrow) and neutrophils (arrowheads) were used as positive and negative control for PRDX2, respectively. HSA cells were positive for PRDX2. IHC score of this sample is 12.00. Bar, 50  $\mu$ m. (E) The box-and-whisker plot of IHC scores of PRDX1 in canine HA and HSA. IHC score of PRDX1 in HSA was significantly higher than that in HA. Bar crossing the box-and-whisker plot expresses the sample average ( $p < 0.05$ ). (F) The box-and-whisker plot of IHC scores of PRDX2 in canine HA and HSA. IHC score of PRDX2 in HSA was significantly higher than that in HA. Bar crossing the box-and-whisker plot expresses the sample average ( $p < 0.05$ ).



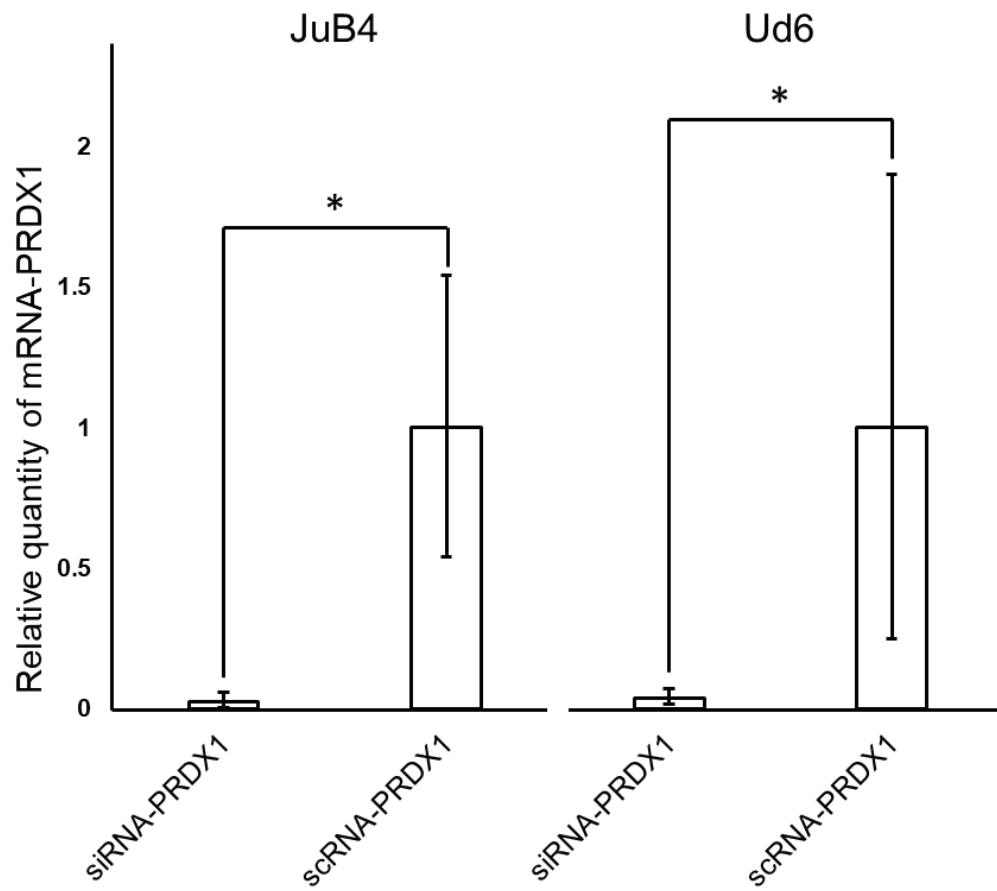
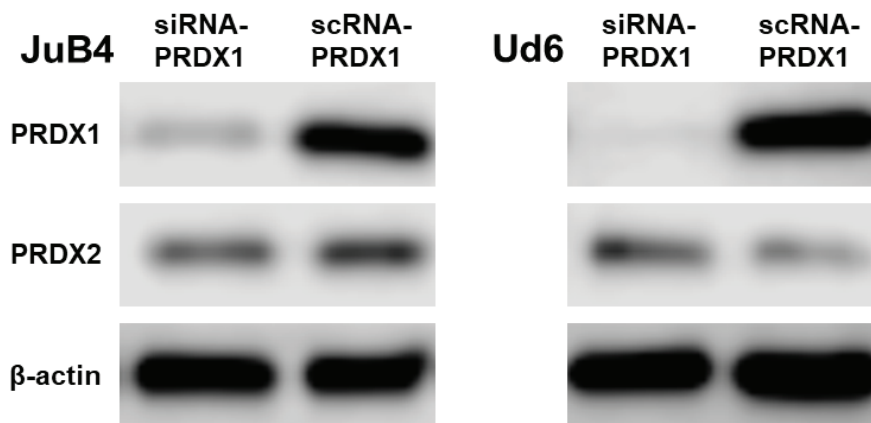
**Figure 2-3.** The comparison of IHC scores of PRDX1 and 2 in histopathological subtypes of canine hemangiosarcoma (HSA). (A) The box-and-whisker plot of the immunohistochemical (IHC) scores of PRDX1 in each histopathological subtypes of canine HSA. There were no significant differences in the expressions of PRDX1 among three subtypes of HSA. (B) The box-and whisker plot of IHC scores of PRDX2 in each histopathological subtypes of canine HSA. There were no significant differences in the expressions of PRDX2 among three subtypes. Bar crossing the box-and-whisker plot expresses the sample average.



**Figure 2-4.** The comparison of IHC scores of PRDX1 and 2 of canine hemangiosarcoma (HSA) among spleen (n=27), skin (n=27), kidney (n=4) liver (n=2), bone (n=2), adrenal gland (n=1), mesentery (n=1), and abdominal cavity (n=1). (A) The box-and-whisker plot of immunohistochemical (IHC) scores of PRDX1 of canine HSA in each primary site. There were no significant differences in the expressions of PRDX1 among primary sites. (B) The box-and-whisker plot of IHC scores of PRDX2 of canine HSA in each primary site. There were no significant differences in the expressions of PRDX2 among primary sites. Bar crossing the box-and-whisker plot expresses the sample average.

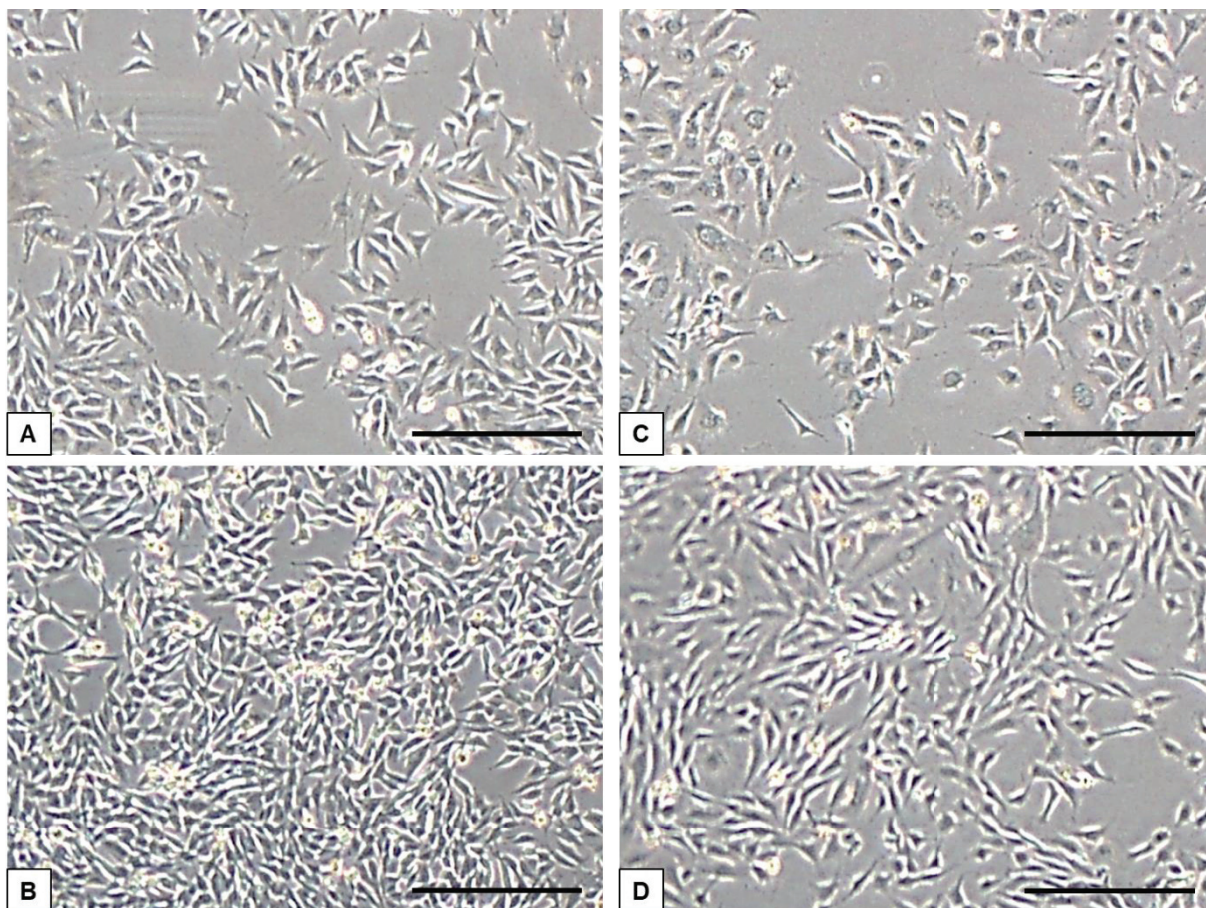


**Figure 2-5.** Analysis of PRDX1 and 2 expressions by real time reverse transcriptase-PCR and western blotting with the canine hemangiosarcoma cells (JuA1, JuB2 JuB4, Re12, Re21, Ud2 and Ud6). (A) The relative expression of PRDX1 mRNA in the hemangiosarcoma cells. (B) The protein expression of PRDX1 and  $\beta$ -actin in the hemangiosarcoma cells. (C) The relative expression of PRDX2 mRNA in the hemangiosarcoma cells. (D) The protein expression of PRDX2 in the hemangiosarcoma cells.

**A**(\*:  $p < 0.05$ )**B**

**Figure 2-6.** Analysis of PRDX1 and 2 expressions by real time reverse transcriptase-PCR and western blotting in PRDX1-knockdown experiment with the hemangiosarcoma cells (JuB4 and Ud6) added siRNA-PRDX1 (20 nM) or scRNA-PRDX1 (control) (20 nM). (A) The relative expression of PRDX1 mRNA in JuB4 and Ud6 cell lines added siRNA-PRDX1 or scRNA-PRDX1.

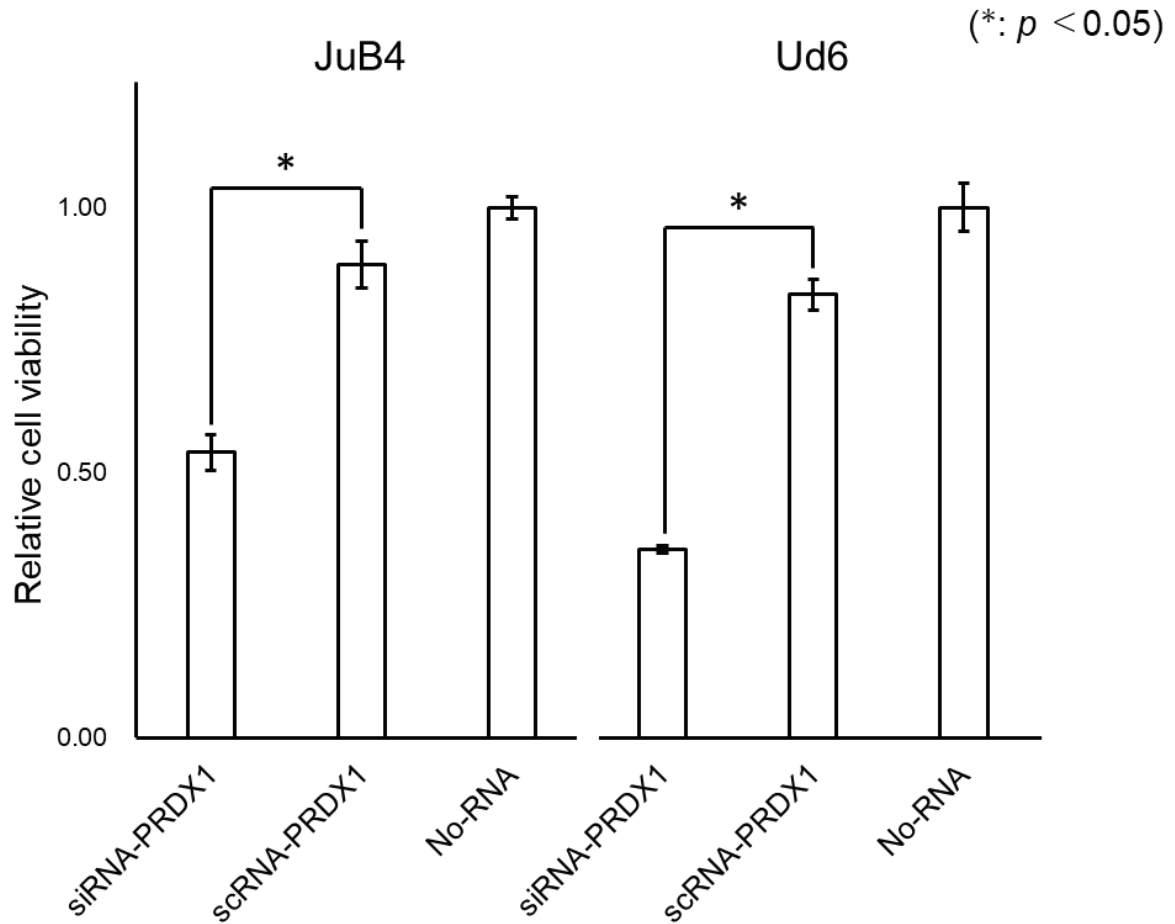
The expression level of PRDX1 mRNA in the hemangiosarcoma cell lines added siRNA-PRDX1 was lower than those in the cell lines added scRNA-PRDX1 ( $p < 0.05$ ). (B) The protein expression of PRDX1, PRDX2 and  $\beta$ -actin proteins in JuB4 and Ud6 cell lines added siRNA-PRDX1 or scRNA-PRDX1. The protein expression of PRDX1 in hemangiosarcoma cell lines added siRNA-PRDX1 was decrease in comparison to that in cell lines added scRNA-PRDX1. However, there was no change of the PRDX2 protein expression in cell lines added siRNA-PRDX1 and scRNA-PRDX1.



**Figure 2-7.** Caine hemangiosarcoma cells (JuB4 and Ud6) added siRNA-PRDX1 or scRNA-PRDX1.

(A) JuB4 cell added siRNA-PRDX1. Bar, 50 µm. (B) JuB4 cell added scRNA-PRDX1. Bar, 50 µm.

(C) Ud6 cell added siRNA-PRDX1. Bar, 50 µm. (D) Ud6 cell added scRNA-PRDX1. Bar, 50 µm.



**Figure 2-8.** The cell viability of canine hemangiosarcoma cell lines (JuB4 and Ud6) added siRNA-PRDX1 or scrRNA-PRDX1. The absorbances of samples added each RNA-PRDX1 were normalized by the absorbance of sample added medium instead of RNA-PRDX1 (No-RNA). The relative cell viability of siRNA-PRDX1 (JuB4) and scrRNA-PRDX1 (JuB4) were 0.539 ( $SD \pm 0.0338$ ) and 0.893 ( $SD \pm 0.0443$ ). The relative cell viability of siRNA-PRDX1 (Ud6) and scrRNA-PRDX1 (Ud6) were 0.355 ( $SD \pm 0.00746$ ) and 0.836 ( $SD \pm 0.0298$ ). The cell viability of siRNA-PRDX1 cell lines was lower than that of scrRNA-PRDX1 cell lines ( $p < 0.05$ ).

## 総括

本研究では、犬の様々な正常組織および腫瘍組織において、抗酸化酵素の一群である PRDX1 および 2 の発現を明らかにした。これまで、ヒトや、マウス、ラットなどの実験動物における PRDX の発現に関する研究は存在したものの、犬を含む伴侶動物の正常および腫瘍組織における PRDX の発現に関する研究報告というのは、非常に乏しいのが現状であった。その一方で、ヒトの腫瘍はもちろん、年々増加しつつある伴侶動物の腫瘍の発生や、遠隔転移などの悪性挙動のメカニズムを解明するため、ヒトのみならず動物においても、非腫瘍および腫瘍組織における PRDX の発現情報の蓄積が望まれている。

第 1 章では、まずこれまで報告がなかった犬の正常組織における PRDX1 および 2 の発現を、免疫組織化学的に検索した。犬の正常組織において、表皮の扁平上皮細胞や毛包、皮脂腺、アポクリン汗腺などの上皮性細胞で PRDX1 および 2 が強く発現する傾向にあった。アポクリン汗腺とアポクリン汗腺の変化した乳腺では、分泌上皮の PRDX1 および 2 の陽性像が異なるという所見が得られ、分泌物の成分等の影響が示唆された。腎臓の尿細管上皮で、また肝臓では肝細胞および胆管上皮で、PRDX1 および 2 が陽性を示したが、膀胱移行上皮は PRDX1 に強く陽性を、PRDX2 には陰性を示した。全般的に PRDX1 は様々な上皮細胞で陽性所見が得られたものの、PRDX2 は陰性のものもあった。真皮や皮下組織など様々な組織に分布する血管の内皮細胞は、いずれにも陰性を示した。脾臓では、PRDX1 はリンパ球や、赤芽球を含む赤血球系細胞に、PRDX2 は赤血球系細胞に発現していた。これまで、ヒトやマウス、ラットなどの実験動物の一部の正常組織における PRDX の発現の情報はいくつか報告されており、わずかな例外はあるものの、今回の犬の正常組織における PRDX1 および 2 の発現性は、それらの報告とおおむね一致していた。哺乳類における PRDX のアミノ酸配列の相同性が高いことや、PRDX1 および 2 の局在がヒトやマウス、ラットなどの間で比較的保存されていることを考慮すると、PRDX1 および

2 は、哺乳類全体を通し、各細胞・組織で、同様の機能を発揮している可能性が十分に考えられた。今回は、全ての臓器において検索ができなかったため、今後必要に応じてさらなる検索が必要と考えられた。

続いて、犬の代表的な自然発生腫瘍における PRDX1 および 2 の発現について免疫組織化学的に検索した。毛包系腫瘍や扁平上皮癌、乳腺腫瘍、ポリープを含む移行上皮性腫瘍などの上皮性細胞由来の腫瘍においては、PRDX1 および 2 の強い陽性所見が観察された。この中で、扁平上皮癌では、一般的に犬では、転移が頻発し、予後が悪いとされる口腔扁平上皮癌の方が、皮膚扁平上皮癌と比較して陽性スコアが高かった。このことから、口腔扁平上皮癌における PRDX1 の発現亢進は、悪性化に関与している可能性が考えられた。リンパ腫や皮膚肥満細胞腫、皮膚形質細胞腫、犬皮膚組織球腫などの血球系細胞の腫瘍は、PRDX1 には比較的陽性を示した一方、PRDX2 には陰性を示すものが多かった。ただ、皮膚肥満細胞腫では、Grade が高いもので、PRDX2 の陽性スコアが高値を示したことから、悪性化への PRDX2 の関与が疑われた。さらに、正常なリンパ節において、T 細胞領域である傍濾胞領域で陰性となる PRDX1 が、T 細胞性リンパ腫では陽性を示すことが明らかとなり、PRDX 1 は腫瘍と過形成を鑑別するマーカーの候補となる可能性が示唆された。線維肉腫においては、PRDX1 および 2 の発現を認めたが、正常な線維芽細胞と大差は見られなかった。

様々な腫瘍において、PRDX1 および 2 の陽性像が観察され、良性のものと悪性のもの、正常と腫瘍で有意な差がないものも少なくなかったが、扁平上皮癌では PRDX1 が、肥満細胞腫では PRDX2 が、悪性のものほど、有意に陽性スコアが高かった点から、腫瘍の種類によっては PRDX が悪性化に関与する可能性が示唆され、症例数を増やし、臨床所見や予後調査と組み合わせたより精密な解析が必要と考えられた。

犬の各腫瘍における PRDX1 および 2 の発現を、ヒトの腫瘍の報告と比較したところ、扁平上皮癌などの様に、ヒトでの報告と一致する腫瘍も見出された。しかし、乳腺腫瘍や線維肉腫な

ど、ヒトにおける報告とは異なる腫瘍も存在し、ヒトと犬の腫瘍において、PRDX1 および 2 が異なる関連メカニズムを有している可能性が示唆された。今後は、今回の研究でヒトとの相違がみられた腫瘍はもちろん、ヒトでの発生が少ない肉腫などの症例数を増やし、犬の腫瘍における PRDX の発現情報をさらに充実していくことが重要と考えられる。

第 2 章では、PRDX1 および 2 の発現と、血管内皮細胞の関係を明らかにするため、犬の血管内皮性腫瘍における PRDX1 および 2 の発現を免疫組織化学的に観察した。また、腫瘍性ではない新生血管におけるそれらの発現情報を得るため、血管新生の盛んな肉芽組織において、PRDX1 および 2 の発現を、同じく免疫組織学的に検索し、血管内皮細胞における PRDX の発現について考察した。その結果、良性の血管内皮性腫瘍である海綿状血管腫と比較して、悪性の血管肉腫において、PRDX1 および 2 の陽性スコアが顕著に高いことが明らかになった。さらに、血管肉腫において、その組織型および発生部位間で、それらの陽性所見に有意な差はなく、PRDX1 および 2 は、組織型や発生部位に依存せず、悪性の血管内皮性腫瘍に普遍的に陽性を示していることが明らかとなった。犬の血管肉腫における PRDX 発現の役割を動的に、実験的に解析するために、犬の血管肉腫から樹立された細胞株を用いて、PRDX1 のノックダウン実験を実施したところ、腫瘍細胞の cell viability が有意に低下したが、細胞の形態変化は観察されず、死滅細胞の増加もみられなかった。これらのことから、犬の血管肉腫において腫瘍細胞をアポトーシスから保護する PRDX6 とは異なり、PRDX1 は細胞増殖の促進などを起こす可能性が疑われた。

本研究では、犬の非腫瘍および腫瘍組織における PRDX1 および 2 の発現についての情報を蓄積し、さらに血管内皮性腫瘍におけるその役割の一部を解明した。今後は、PRDX の発現と腫瘍の関連について、その詳細なメカニズムを明らかにする研究に期待したい。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり，本研究に対し，ご指導，ご鞭撻いただき，ご高閲を賜った，岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科獣医病理学教授の酒井洋樹先生ならびに獣医分子病態学教授の森崇先生，鳥取大学農学部共同獣医学科獣医病理学教授の森田剛仁先生に深く感謝いたします。

また，本稿作成に関して，懇篤なご指導，ご助言を賜りました，岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科獣医病理学助教の平田暁大先生ならびに獣医分子病態学助教の村上麻美先生に深く感謝いたします。

そして，本研究を終えるにあたり，ご助言，ご協力をいただき，温かく支えてくださいました客員臨床准教授の米丸加余子先生，病理診断医の後藤みなみ先生，技術補佐の入山千香子氏，高橋ゆかり氏，神谷美佐氏，共に研鑽を積んだ獣医病理学研究室の学生のみなさんならびに本研究に関わっていただいた全ての方々に感謝いたします。

最後に，4年間の大学院生活を支えてくれた両親に，心から感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Abdelmegeed, S. M. and Mohammed, S. 2018. Canine mammary tumors as a model for human disease (Review). *Oncol Lett* **15**: 8195–8205.
- 2) Aihaiti, Y., Tuerhong, X., Zheng, H., Cai, Y. S., Yang, M. and Xu, P. 2022. Peroxiredoxin 4 regulates tumor-cell-like characteristics of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis through PI3k/Akt signaling pathway. *J Clin Immunol* **237**: 108964.
- 3) Alzahrani, A. S. 2019. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside. *Semin Cancer Biol* **59**: 125–132.
- 4) Amadeo, B., Penel, N., Coindre, J. M., Coquard, I. R., Ligier, K., Delafosse, P., Bouvier, A. M., Plouvier, S., Gallet, J., Lacourt, A., Coureau, G., Monnereau, A., Pélissier, S. M. and Desandes, E. 2020. Incidence and time trends of sarcoma (2000–2013): Results from the French network of cancer registries (FRANCIM). *BMC Cancer* **20**: 190–200.
- 5) American Veterinary Medical Association. <https://www.avma.org/resources-tools/pet-owners/petcare/senior-pets> [accessed on 2022/10/17].
- 6) Anwar, S., Yanai, T. and Sakai, H. 2016. Overexpression of Peroxiredoxin 6 protects neoplastic cells against apoptosis in canine haemangiosarcoma. *J Comp Pathol* **155**: 29–39.
- 7) Arevalo, J. A. and Vázquez, M. J. P. 2018. The role of peroxiredoxin 6 in cell signaling. *Antioxidants* **7**: 172–183.
- 8) Arner, E. S. J. and Holmgren, A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* **267**: 6102–6109.
- 9) Attaran, S., Skoko, J. J., Hopkins, B. L., Wright, M. K., Wood, L. E., Asan, A., Woo, H. A., Feinberg, A. and Neumann, C. A. 2021. Peroxiredoxin-1 Tyr194 phosphorylation regulates

- LOX-dependent extracellular matrix remodelling in breast cancer. *Br J Cancer* **125**: 1146–1157.
- 10) Avallone, G., Rasotto, R., Chambers, J. K., Miller, A. D., Kelly, E. B., Monti, P., Berlato, D., Valenti, P. and Roccabianca, P. 2021. Review of histological grading systems in veterinary medicine. *Vet Pathol* **58**: 809–828.
  - 11) Bajor, M., Zych, A. O., Jarzynka, A. G., Muchowicz, A., Firczuk, M., Trzeciak, L., Gaj, P., Domagala, A., Siernicka, M., Zagozdzon, A., Siedlecki, P., Kniotek, M., O’Leary, P. C., Golab, J. and Zagozdzon, R. 2018. Targeting peroxiredoxin 1 impairs growth of breast cancer cells and potently sensitises these cells to prooxidant agents. *Mol Cell Biol* **119**: 873–884.
  - 12) Balakrishnan, M., George, R., Sharma, A. and Graham, D. Y. 2017. Changing trends in stomach cancer throughout the world. *Curr Gastroenterol Rep* **19**: 36–45.
  - 13) Barata, A. G. and Dick, T. P. 2020. A role for peroxiredoxins in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- and MEKK-dependent activation of the p38 signaling pathway. *Redox Biol* **28**: 101340.
  - 14) Basu, B., Banerjee, H., Rojas, H., Martinez, S. R., Roy, S., Jia, Z., Lilly, M. B., Leon, M. D. and Casiano, C. A. 2011. Differential expression of peroxiredoxins in prostate cancer: Consistent upregulation of PRDX3 and PRDX4. *Prostate* **71**: 755–765.
  - 15) Beck, J., Ren, L., Huang, S., Berger, E., Bardales, K., Mannheimer, J., Mazcko, C. and LeBlanc, A. 2022. Canine and murine models of osteosarcoma. *Vet Pathol* **59**: 399–414.
  - 16) Bergholtz, H., Lien, T., Lingaas, F. and Sorlie, T. 2022. Comparative analysis of the molecular subtype landscape in canine and human mammary gland tumors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **27**: 171–183.
  - 17) Bertelli, S., Zuccolini, P., Gavazzo, P. and Pusch, M. 2022. Molecular determinants underlying volume-regulated anion channel subunit-dependent oxidation sensitivity. *J Physiol* **17**: 3965–3982.

- 18) Brandao, Y. O., Toledo, M. B., Chequin, A., Cristo, T. G., Sousa, R. S., Ramos, E. A. S. and Klassen, G. 2018. DNA methylation status of the estrogen receptor a gene in canine mammary tumors. *Vet Pathol* **55**: 510–516.
- 19) Bray, J. P., Polton, G. A., McSporran, K. D. and Whitbread, T. M. 2014. Canine soft tissue sarcoma managed in first opinion practice: Outcome in 350 cases. *Vet Surg* **43**: 774–782.
- 20) Cai, A. L., Zeng, W., Cai, W. L., Liu, J. L., Zheng, X. W., Liu, Y., Yang, X. C., Long, Y. and Li, J. 2018. Peroxiredoxin-1 promotes cell proliferation and metastasis through enhancing Akt/mTOR in human osteosarcoma cells. *Oncotarget* **9**: 8290–8302.
- 21) Cao, X., Chen, X. M., Xiao, W. Z., Li, B., Zhang, B., Wu, Q. and Xue, Q. 2021. ROS-mediated hypomethylation of PRDX5 promotes STAT3 binding and activates the Nrf2 signaling pathway in NSCLC. *Int J Mol Med* **47**: 573–582.
- 22) Cha, M. K., Suh, K. H. and Kim, I. H. 2009. Overexpression of peroxiredoxin I and thioredoxin1 in human breast carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* **28**: 93–104.
- 23) Checa, J. and Aran, J. M. 2020. Reactive oxygen species: drivers of physiological and pathological processes. *J Inflamm Res* **13**: 1057–1073.
- 24) Chen, C., Wang, S., Yu, L., Mueller, J., Fortunato, F., Rausch, V. and Mueller, S. 2021. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated autophagy during ethanol metabolism. *Redox Biol* **46**: 102081.
- 25) Chen, J., Wang, Y., Zhang, W., Zhao, D., Zhang, L., Fan, J., Li, J. and Zhan, Q. 2020. Membranous NOX5-derived ROS oxidizes and activates local Src to promote malignancy of tumor cells. *Signal Transduct Target Ther* **5**: 139–150.
- 26) Chen, Y., Yang, S., Zhou, H. and Su, D. 2020. PRDX2 promotes the proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer *in vitro* and *in vivo*. *BioMed Res Int* **2020**: 8359860.
- 27) Conic, R. R. Z., Damiani, G., Frigerio, A., Tsai, S., Bragazzi, N. L., Chu, T. W., Mesinkovska,

- N. A., Koyfman, S. A., Joshi, N. P., Budd, G. T., Vidimos, A. and Gastman, B. R. 2019. Incidence and outcomes of cutaneous angiosarcoma: A SEER population-based study. *J Am Acad Dermatol* **83**: 809–816.
- 28) Crespo, J. J. A., Armiñán, A., Charbonnier, D., Deladriere, C., Schätzlein, M. P., Domingo, R. L., Forteza, J., Lucena, A. P. and Vicent, M. J. 2019. Characterization of triple-negative breast cancer preclinical models provides functional evidence of metastatic progression. *Int J Cancer* **145**: 2267–2281.
- 29) Cross, L. W., Resta, T. C. and Jernigan, N. L. 2019. Redox regulation of ion channels and receptors in pulmonary hypertension. *Antioxid Redox Signal* **31**: 898–915.
- 30) Cullen, J. M. 2016. Tumors of the Liver and Gallbladder. In: (Meuten, D. J. ed.) Tumors in Domestic Animals, 5 ed. pp. 602–631. Willey & Sons.
- 31) Dammeyer, P. and Arnér, E. S. J. 2011. Human protein atlas of redox systems — What can be learnt? *Biochim Biophys Acta* **1810**: 111–138.
- 32) DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. and Thompson, C. B. 2007. The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* **7**: 11–20.
- 33) Demasi, A. P. D., Ceratti, D., Furuse, C., Cury, P., Junqueira, J. L. C. and Araújo, V. C. 2007. Expression of peroxiredoxin I in plasma cells of oral inflammatory diseases. *Eur J Oral Sci* **115**: 334–337.
- 34) Dobbin, Z. C. and Landen, C. N. 2013. The importance of the PI3K/AKT/MTOR pathway in the progression of ovarian cancer. *Int J Mol Sci* **14**: 8213–8227.
- 35) Doria, J. R., Stevens, C., Maddage, C., Lasky, K. and Koblisch, H. K. 2020. Characterization of human cancer xenografts in humanized mice. *J Immunother Cancer* **8**: e000416.
- 36) Echizen, K., Horiuchi, K., Aoki, Y., Yamada, Y., Minamoto, T., Oshima, H. and Oshima, M.

2019. NF- $\kappa$ B-induced NOX1 activation promotes gastric tumorigenesis through the expansion of SOX2-positive epithelial cells. *Oncogene* **38**: 4250–4263.
- 37) Eirin, A., Lerman, A. and Lerman, L. O. 2017. The emerging role of mitochondrial targeting in kidney disease. *Handb Exp Pharmacol* **240**: 229–250.
- 38) Elko, E. A., Cunniff, B., Seward, D. J., Chia, S. B., Aboushousha, R., Wetering, C., Velden, J., Manuel, A., Shukla, A., Heintz, N. H., Anathy, V., Vliet, A. and Heininger, Y. M. W. J. 2019. Peroxiredoxins and beyond; Redox systems regulating lung physiology and disease. *Antioxid Redox Signal* **31**: 1070–1091.
- 39) Feng, A. L., Han, X., Meng, X., Chen, Z., Li, Q., Shu, W., Dai, H., Zhu, J. and Yang, Z. 2020. PRDX2 plays an oncogenic role in esophageal squamous cell carcinoma via Wnt/ $\beta$ -catenin and AKT pathways. *Clin Transl Oncol* **22**: 1838–1848.
- 40) Feng, P., Yang, Q., Luo, L., Sun, Y., Lv, W., Wan, S., Guan, Z., Xiao, Z., Liu, F., Li, Z., Dong, Z. and Yang, M. 2021. The kinase PDK1 regulates regulatory T cell survival via controlling redox homeostasis. *Theranostics* **11**: 9503–9518.
- 41) Frank, J. D., Reimer, S. B., Kass, P. H. and Kiupel, M. 2007. Clinical outcomes of 30 cases (1997-2004) of canine gastrointestinal lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc* **43**: 313–321.
- 42) Frank, W., Robert, H., William, W. W., Samuel, W., Joy, J., Marcos, L., Balaraman, K., Gökhan, M. M., Scott, B. and Navdeep, S. C. 2010. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *PNAS* **107**: 8788–8793.
- 43) Goldschmidt, M. H. and Goldschmidt, K. H. 2016. Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin. In: (Meuten, D. J. ed.) *Tumors in Domestic Animals*, 5 ed. pp. 88–141. Willey & Sons.
- 44) Goldschmidt, M. H., Munday, J. S., Scruggs, J. L., Klopffleisch, R. and Kiupel, M. 2018. Tumors of the Epidermis. In: (Kiupel, M. ed.) *Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals*.

- Volume 1: Epithelial Tumors of the Skin. pp. 25–80. the Davis-Thompson DVM Foundation.
- 45) Goldschmidt, M. H., Munday, J. S., Scruggs, J. L., Klopfleisch, R. and Kiupel, M. 2018. Tumors with Adnexal Differentiation. In:(Kiupel, M. ed.) Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals. Volume 1: Epithelial Tumors of the Skin. pp. 81–188. the Davis-Thompson DVM Foundation.
- 46) Gong, F., Hou, G., Liu, H. and Zhang, M. 2015. Peroxiredoxin 1 promotes tumorigenesis through regulating the activity of mTOR/p70S6K pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol***32**: 25–33.
- 47) Goto, M., Owaki, K., Hirata, A., Yanai, T. and Sakai, H. 2019. Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in canine hemangiosarcoma cells in vitro. *Vet Comp Oncol***17**: 285–297.
- 48) Griffin, M. A., Culp, W. T. N. and Rebhun, R. B. 2021. Canine and feline haemangiosarcoma. *Vet Rec***2021**: e585.
- 49) Gustafson, D. L., Duval, D. L., Regan, D. P. and Thamm, D. H. 2018. Canine sarcomas as a surrogate for the human disease. *Pharmacol Ther***188**: 80–96.
- 50) Gyuraszova, M., Gurecka, R., Babickova, J. and Tothova, L. 2020. Oxidative stress in the pathophysiology of kidney disease: Implications for noninvasive monitoring and identification of biomarkers. *Oxid Med Cell Longev***2020**: 5478708.
- 51) Hamanaka, R. B., Glasauer, A., Hoover, P., Yang, S., Blatt, H., Mullen, A. R., Getsios, S., Gottardi, C. J., DeBerardinis, R. J., Lavker, R. M. and Chandel, N. S. 2014. Mitochondrial reactive oxygen species promote epidermal differentiation and hair follicle development. *Sci Signal***6**: ra8.
- 52) Han, Y. H., Zhang, Y. Q., Jin, M. H., Jin, Y. H., Qiu, M. Y., Li, W. L., He, C., Yu, L.Y., Hyun, J.

- W., Lee, J., Yoon, D. Y., Sun, H. N. and Kwon, T. 2020. Peroxiredoxin I deficiency increases keratinocyte apoptosis in a skin tumor model via the ROS-p38 MAPK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **529**: 635–641.
- 53) Haslam, I. S., Jadkauskaite, L., Szabo, I. L., Staeger, S., Brinckmann, J. H., Jenkins, G., Bhogal, R. K., Lim, F. L., Farjo, N., Farjo, B., Biro, T., Schafer, M. and Paus, R. 2017. Oxidative damage control in a human (mini-) organ: Nrf2 activation protects against oxidative stress-induced hair growth inhibition. *J Invest Dermatol* **137**: 295–304.
- 54) He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T. and Ma, X. 2017. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cell Physiol Biochem* **44**: 532–553.
- 55) Hendrick, M. J. 2016. Mesenchymal Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: (Meuten, D. J. ed.) *Tumors in Domestic Animals*, 5 ed. pp. 142–175. Wiley & Sons.
- 56) He, T., Hatem, E., Vernis, L., Lei, M. and Huang, M. E. 2015. PRX1 knockdown potentiates vitamin K3 toxicity in cancer cells: A potential new therapeutic perspective for an old drug. *J Exp Clin Cancer Res* **34**: 152–164.
- 57) Hicks, J., Platt, S., Kent, M. and Haley, A. 2015. Canine brain tumours: A model for the human disease? *Vet Comp Oncol* **15**: 252–272.
- 58) Hojo, T., Maishi, N., Towfik, A. M., Akiyama, K., Ohga, N., Shindoh, M., Hida, Y., Minowa, K., Fujisawa, T. and Hida, K. 2017. ROS enhance angiogenic properties via regulation of NRF2 in tumor endothelial cells. *Oncotarget* **8**: 45484–45495.
- 59) Hopkins, B. L., Nadler, M., Skoko, J. J., Bertomeu, T., Pelosi, A., Shafaei, P. M., Levine, K., Schempff, A., Pennarun, B., Yang, B., Datta, D., Bucur, O., Ndebele, K., Oesterreich, S., Yang, D., Rizzo, M. G., Far, R. K. and Neumann, C. A. 2018. A peroxidase Peroxiredoxin 1-specific redox regulation of the novel FOXO3 microRNA target let-7. *Antioxid Redox Signal* **28**: 62–77.

- 60) Hoshino, I., Matsubara, H., Akutsu, Y., Nishimori, T., Yoneyama, Y., Murakami, K., Sakata, H., Matsushita, K. and Ochiai, T., 2007. Tumor suppressor Prdx1 is a prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma patients. *Oncol Rep* **18**: 867–871.
- 61) Huang, J. H., Co, H. K. C., Lee, Y. C., Wu, C. C. and Chen, S. 2021. Multistability maintains redox homeostasis in human cells. *Mol Syst Biol* **17**: e10480.
- 62) Huguen, S., Thomas, R. E., German, A. J., Burgener, I. A. and Mandigers, P. J. J. 2016. Gastric carcinoma in canines and humans, a review. *Vet Comp Oncol* **15**: 692–705.
- 63) Hung, G. Y., Horng, J. L., Chen, P. C. H., Lin, L. Y., Chen, J. Y., Chuang, P. H., Chao, T. C. and Yen, C. C. 2019. Incidence of soft tissue sarcoma in Taiwan: A nationwide population-based study (2007–2013). *Cancer Epidemiol* **60**: 185–192.
- 64) Hu, X., Lu, E., Pan, C., Xu, Y. and Zhu, X. 2020. Overexpression and biological function of PRDX6 in human cervical cancer. *J Cancer* **11**: 2390–2400.
- 65) Hyun, J., Han, J., Lee, C., Yoon, M. and Jung, Y. 2021. Pathophysiological aspects of alcohol metabolism in the liver. *Int J Mol Sci* **22**: 5717.
- 66) Icht, O., Lewin, R., Yosef, L., Fichman, S., Silverman, B. and Zer, A. 2021. Sarcoma incidence and subtype distribution in Israel – A population-based study. *Cancer Epidemiol* **70**: 101876.
- 67) Immenschuh, S., Baumgart-Vogt, E., Tan, M., Iwahara, S., Ramadori, G. and Fahimi, H. D. 2003. Differential cellular and subcellular localization of heme-binding protein 23/ peroxiredoxin I and heme oxygenase-1 in rat liver. *J Histochem Cytochem* **51**: 1621–1631.
- 68) Isaza, D., Robinson, N. A., Pizzirani, S. and Pumphrey, S. A. 2020. Evaluation of cytology and histopathology for the diagnosis of feline orbital neoplasia: 81 cases (2004-2019) and review of the literature. *Vet Ophthalmol* **23**: 682–689.
- 69) Ishii, T. 2015. Close teamwork between Nrf2 and peroxiredoxins 1 and 6 for the regulation of

- prostaglandin D2 and E2 production in macrophages in acute inflammation. *Free Radic Biol Med* **88**: 189–198.
- 70) Ishii, T., Itoh, K., Akasaka, J., Yanagawa, T., Takahashi, S., Yoshida, H., Bannai, S. and Yamamoto, M. 2000. Induction of murine intestinal and hepatic peroxiredoxin MSP23 by dietary butylated hydroxyanisole. *Carcinogenesis* **21**: 1013–1016.
- 71) Ivan, B. and Barbara, A. N. 2014. Redox regulation of ion channels. *Antioxid Redox Signal* **21**: 859–862.
- 72) Jiang, H., Wu, L., Mishra, M., Chawsheen, H. A. and Wei, Q. 2014. Expression of peroxiredoxin 1 and 4 promotes human lung cancer malignancy. *Am J Cancer Res* **4**: 445–460.
- 73) Jones, A. R. IV, Meshulam, T., Oliveira, M. F., Burritt, N. and Corkey, B. E. 2016. Extracellular redox regulation of intracellular reactive oxygen generation, mitochondrial function and lipid turnover in cultured human adipocytes. *PLOS ONE* **11**: e0164011.
- 74) Joo, H. K., Paul, N. B., Sun, H. B., Nithya, R., Ping, L., Hak, R. K., Chris, A. and Young, M. P. 2008. Up-regulation of peroxiredoxin 1 in lung cancer and its implication as a prognostic and therapeutic target. *Clin Cancer Res* **14**: 2326–2333.
- 75) Kang, D. H., Lee, D. J., Lee, K. W., Park, Y. S., Lee, J. Y., Lee, S. H., Koh, Y. J., Koh, G. Y., Choi, C., Yu, D. Y., Kim, J. and Kang, S. W. 2011. Peroxiredoxin II is an essential antioxidant enzyme that prevents the oxidative inactivation of VEGF receptor-2 in vascular endothelial cells. *Mol Cell* **44**: 545–558.
- 76) Karami, M. F., Ebrahimi, M., Nourbakhsh, E., Hazara, A. Z., Mirzaei, A., Shafieyari, S., Salehi, A., Hoseinzadeh, M., Payandeh, Z. and Barati, G. 2022. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells. *Pathol Res Pract* **237**: 154010.
- 77) Khacho, M., Clark, A., Svoboda, D. S., Azzi, J., MacLaurin, J. G., Meghaizel, C., Sesaki, H.,

- Lagace, D. C., Germain, M., Harper, M. E., Park, D. S. and Slack, R. S. 2016. Mitochondrial dynamics impacts stem cell identity and fate decisions by regulating a nuclear transcriptional program. *Cell Stem Cell* **19**: 232–247.
- 78) Kim, J. H., Bogner, P. N., Baek, S. H., Ramnath, N., Liang, P., Kim, H. R., Andrews, C. and Park, Y. M. 2008. Up-regulation of peroxiredoxin 1 in lung cancer and its implication as a prognostic and therapeutic target. *Clin Cancer Res* **14**: 2326–2333.
- 79) Kim, J. H., Graef, A. J., Dickerson, E. B. and Modiano, J. F. 2015. Pathobiology of hemangiosarcoma in dogs: Research advances and future perspectives. *Vet Sci* **2**: 388–405.
- 80) Kim, J. H., Megquier, K., Thomas, R., Sarver, A. L., Song, J. M., Kim, Y. T., Cheng, N., Schulte, A. J., Linden, M. A., Murugan, P., Oseth, L., Forster, C. L., Elvers, I., Swofford, R., Maier, J. T., Karlsson, E. K., Breen, M., Toh, K. L. and Modiano, J. F. 2021. Genomically complex human angiosarcoma and canine hemangiosarcoma establish convergent angiogenic transcriptional programs driven by novel gene fusions. *Mol Cancer Res* **19**: 847–861.
- 81) Kim, W., Chu, T. H., Nienhüser, H., Jiang, Z., Portillo, A. D., Remotti, H. E., White, R. A., Hayakawa, Y., Tomita, H., Fox, J. G., Drake, C. G. and Wang, T. C. 2021. PD-1 signaling promotes tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells and gastric tumorigenesis in mice. *Gastroenterology* **160**: 781–796.
- 82) Kim, W. S., Vinayak, A. and Powers, B. 2021. Comparative review of malignant melanoma and histologically well-differentiated melanocytic neoplasm in the oral cavity of dogs. *Vet Sci* **8**: 261–271.
- 83) Kinnula, V. L., Lehtonen, S., Kaarteenaho-Wiik, R., Lakari, E., Pääkkö, P., Kang, S. W., Rhee, S. G. and Soini, Y. 2002. Cell specific expression of peroxiredoxins in human lung and pulmonary sarcoidosis. *Thorax* **57**: 157–164.

- 84) Kinnula, V. L., Lehtonen, S., Sormunen, R., Kaarteenaho-Wiik, R., Kang, S. W., Rhee, S. G. and Soini, Y. 2002. Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma. *J Pathol* **196**: 316–323.
- 85) Kiupel, M. 2016. Mast Cell Tumors. In: (Meuten, D. J. ed.) *Tumors in Domestic Animals*, 5 ed. pp. 176–202. Willey & Sons.
- 86) Kiupel, M., Webster, J. D., Bailey, K. L., Best, S., DeLay, J., Detrisac, C. J., Fitzgerald, S. D., Gamble, D., Ginn, P. E., Goldschmidt, M. H., Hendrick, M. J., Howerth, E. W., Janovitz, E. B., Langohr, I., Lenz, S. D., Lipscomb, T. P., Miller, M., A., Misdorp, W., Moroff, S., Mullaney, T. P., Neyens, I., O'Toole, D., Vara, J. R., Scase, T. J., Schulman, F. Y., Sledge, D., Smedley, R. C., Smith, K., Snyder, P. W., Southorn, E., Stedman, N. L., Steficek, B. A., Stromberg, P. C., Valli, V. E., Weisbrode, S. E., Yager, J., Heller, J. and Miller, R. 2011. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet Pathol* **1**: 147–155.
- 87) Kinnula, V. L., Lehtonen, S., Kaarteenaho-Wiik, R., Lakari, E., Pääkkö, P., Kang, S. W., Rhee, S. G. and Soini, Y. 2002. Cell specific expression of peroxiredoxins in human lung and pulmonary sarcoidosis. *Thorax* **57**: 157–164.
- 88) Kok, M. K., Chambers, J. K., Tsuboi, M., Nishimura, R., Tsujimoto, H., Uchida, K. and Nakayama, H. 2019. Retrospective study of canine cutaneous tumors in Japan, 2008–2017. *J Vet Med Sci* **81**: 1133–1143.
- 89) Kollár, A., Rothermundt, C., Klenke, F., Bode, B., Baumhoer, D., Arndt, V. and Feller, A. 2019. Incidence, mortality, and survival trends of soft tissue and bone sarcoma in Switzerland between 1996 and 2015. *Cancer Epidemiol* **63**: 101596.
- 90) 駒沢敏, 柴田真治, 酒井洋樹, 伊藤祐典, 川部美史, 村上麻美, 森崇, 丸尾幸嗣. 2016. 平成

25 年度岐阜県犬腫瘍登録データによる家庭犬の腫瘍発生状況. 日獣会誌 **69**, 395~400.

- 91) Korac, B., Kalezic, A., Vaughan, V. P., Korac, A. and Jankovic, A. 2021. Redox changes in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. *Redox Biol* **42**: 101887.
- 92) Kwon, T., Bak, Y., Park, Y. H., Jang, G. B., Nam, J. S., Yoo, J. E., Park, Y. N., Bak, I. S., Kim, J. M., Yoon, D. Y. and Yu, D. Y. 2016. Peroxiredoxin II is essential for maintaining stemness by redox regulation in liver cancer cells. *Stem Cells* **34**: 1188–1197.
- 93) Lee, S. C., Chae, H. Z., Lee, J. E., Kwon, B. D., Lee, J. B., Won, Y. H., Ahn, K. Y. and Kim, Y. P. 2000. Peroxiredoxin is ubiquitously expressed in rat skin: isotype-specific expression in the epidermis and hair follicle. *J Invest Dermatol* **115**: 1108–1114.
- 94) Lee, T. H., Kim, S. U., Yu, S. L., Kim, S. H., Park, D. S., Moon, H. B., Dho, S. H., Kwon, K. S., Kwon, H. J., Han, Y. H., Jeong, S., Kang, S. W., Shin, H. S., Lee, K. K., Rhee, S. G. and Yu, D. Y. 2003. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood* **101**: 5033–5038.
- 95) Lennicke, C. and Cocheme, H. M. 2021. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Mol Cell* **81**: 3691–3707.
- 96) Leyens, G., Donnay, I. and Knoop, B. 2003. Cloning of bovine peroxiredoxins—gene expression in bovine tissues and amino acid sequence comparison with rat, mouse and primate peroxiredoxins. *Comp Biochem Physiol B* **136**: 943–955.
- 97) Li, H. X., Sun, X. Y., Yang, S. M., Wang, Q. and Wang, Z. Y. 2018. Peroxiredoxin 1 promoted tumor metastasis and angiogenesis in colorectal cancer. *Pathol Res Pract* **214**: 655–660.
- 98) Liu, D., Xiong, H., Ellis, A. E., Northrup, N. C., Rodriguez, C. O. Jr., O'Regan, R. M., Dalton, S. and Zhao, S. 2014. Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. *Cancer Res* **74**: 5045–5056.

- 99) Liu, M., Liu, X., Wang, Y., Sui, Y., Liu, F., Liu, Z., Zou, F., Zuo, K., Wang, Z., Sun, W., Xu, Q., Liu, D. and Liu, J. 2022. Intrinsic ROS drive hair follicle cycle progression by modulating DNA damage and repair and subsequently hair follicle apoptosis and macrophage polarization. *Oxid Med Cell Longev* **2022**: 8279269.
- 100) Locatelli, F., Canaud, B., Eckardt, K. U., Stenvinkel, P., Wanner, C. and Zoccali, C. 2003. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* **18**: 1272–1280.
- 101) Lu, B., Chen, X., Hong, Y., Zhu, H., He, Q., Yang, B., Ying, M. and Cao, J. 2019. Identification of PRDX6 as a regulator of ferroptosis. *Acta Pharmacol Sin* **40**: 1334–1342.
- 102) Lu, E., Hu, X., Pan, C., Chen, J., Xu, Y. and Zhu, X. 2020. Up-regulation of peroxiredoxin-1 promotes cell proliferation and metastasis and inhibits apoptosis in cervical cancer. *J Cancer* **11**: 1170–1181.
- 103) Manuelli, V., Pecorari, C., Filomeni, G. and Zito, E. 2022. Regulation of redox signaling in HIF-1-dependent tumor angiogenesis. *FEBS J* **289**: 5413–5425.
- 104) Matté, A., Pantaleo, A., Ferru, E., Turrini, F., Bertoldi, M., Lupo, F., Siciliano, A., Zoon, C. H. and Franceschi, L. D. 2014. The novel role of peroxiredoxin-2 in red cell membrane protein homeostasis and senescence. *Free Radic Biol Med* **76**: 80–88.
- 105) Megquier, K., Maier, J. T., Swofford, R., Kim, J. H., Sarver, A. L., Wang, C., Sakthikumar, S., Johnson, J., Koltookian, M., Lewellen, M., Scott, M. C., Schulte, A. J., Borst, L., Tonomura, N., Alfoldi, J., Painter, C., Thomas, R., Karlsson, E. K., Breen, M., Modiano, J. F., Elvers, I. and Toh, K. L. 2019. Comparative genomics reveals shared mutational landscape in canine hemangiosarcoma and human angiosarcoma. *Mol Cancer Res* **17**: 2410–2421.
- 106) Mei, W., Peng, Z., Lu, M., Liu, C., Deng, Z., Xiao, Y., Liu, J., He, Y., Yuan, Q., Yuan, X.,

- Tang, D., Yang, H. and Tao, L. 2015. Peroxiredoxin 1 inhibits the oxidative stress induced apoptosis in renal tubulointerstitial fibrosis. *Nephrology (Carlton)* **20**: 832–842.
- 107) Merry, T. L., Tran, M., Dodd, G. T., Mangiafico, S. P., Wiede, F., Kaur, S., McLean, C. L., Andrikopoulos, S. and Tiganis, T. 2016. Hepatocyte glutathione peroxidase-1 deficiency improves hepatic glucose metabolism and decreases steatohepatitis in mice. *Diabetologia* **59**: 2632–2644.
- 108) Meuten, D. J. and Meuten, T. L. K. 2016. Tumors of the Urinary System. In:(Meuten, D. J. ed.) *Tumors in Domestic Animals*, 5 ed. pp. 632–688. Willey & Sons.
- 109) Miao, J. X., Wang, J. Y., Li, H. Z., Guo, H. R., Dunmall, L. S. C., Zhang, Z. X., Cheng, Z. G., Gao, D. L., Dong, J. Z., Wang, Z. D. and Wang, Y. H. 2020. Promising xenograft animal model recapitulating the features of human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* **26**: 4802–4816.
- 110) Mittal, V. K., Bhullar, J. S. and Jayant, K. 2015. Animal models of human colorectal cancer: Current status, uses and limitations. *World J Gastroenterol* **21**: 11854–11861.
- 111) Miwa, T., Kanda, M., Umeda, S., Tanaka, H., Shimizu, D., Tanaka, C., Kobayashi, D., Hayashi, M., Yamada, S., Nakayama, G., Koike, M. and Kodera, Y. 2019. Establishment of peritoneal and hepatic metastasis mouse xenograft models using gastric cancer cell lines. *In Vivo* **33**: 1785–1792.
- 112) Mizuno, T. 2021. Spontaneously occurring canine cancer as a relevant animal model for developing novel treatments for human cancers. *Translat Regulat Sci* **3**: 51–59.
- 113) Mizusawa, H., Ishii, T. and Bannai, S. 2000. Peroxiredoxin I (macrophage 23 kDa stress protein) is highly and widely expressed in the rat nervous system. *Neurosci Lett* **283**: 57–60.
- 114) Moore, P. F. 2016. Canine and Feline Histiocytic Diseases. In:(Meuten, D. J. ed.) *Tumors*

- in Domestic Animals, 5 ed. pp. 322–336. Willey & Sons.
- 115) Moreira, E. L. T., Camargo, J. L. V., Rodrigues, M. A. M., Barbisan, L. F. and Salvadori, D. M. F. 2000. Dose- and sex-related carcinogenesis by N-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine in Wistar rats. *Jpn J Cancer Res* **91**: 368–374.
  - 116) Moris, D., Spartalis, M., Tzatzaki, E., Spartalis, E., Karachaliou, G. S., Triantafyllis, A. S., Karaolani, G. I., Tsilimigras, D. I. and Theocharis, S. 2017. The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and regulation. *Ann Transl Med* **5**: 324–331.
  - 117) Morris, G., Gevezova, M., Sarafian, V. and Maes, M. 2022. Redox regulation of the immune response. *Mol Immunol* **19**: 1079–1101.
  - 118) Munday, J. S., Löhr, C. V. and Kiupel, M. 2016. Tumors of the Alimentary Tract. In: (Meuten, D. J. ed.) Tumors in Domestic Animals, 5 ed. pp. 499–601. Willey & Sons.
  - 119) Murai, A., Asa, S. A., Kodama, A., Hirata, A., Yanai, T. and Sakai, H. 2012. Constitutive phosphorylation of the mTORC2/Akt/4E-BP1 pathway in newly derived canine hemangiosarcoma cell lines. *BMC Vet Res* **8**: 128.
  - 120) Murai, A., Asa, S. A., Kodama, A., Sakai, H., Hirata, A. and Yanai, T. 2012. Immunohistochemical analysis of the Akt/mTOR/4E-BP1 signalling pathway in canine haemangiomas and haemangiosarcomas. *J Comp Pathol* **147**: 430–440.
  - 121) Nagababu, E., Mohanty, J. G., Friedman, J. S. and Rifkind, J. M. 2013. Role of peroxiredoxin-2 in protecting RBCs from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Free Radic Res* **47**: 164–171.
  - 122) Nagamine, E., Hirayama, K., Matsuda, K., Okamoto, M., Ohmachi, T., Uchida, K., Kadosawa, T. and Taniyama, H. 2017. Invasive front grading and epithelial-mesenchymal transition in canine oral and cutaneous squamous cell carcinomas. *Vet Pathol* **54**: 783–791.

- 123) Nakamura, N. 2020. A hypothesis: Radiation carcinogenesis may result from tissue injuries and subsequent recovery processes which can act as tumor promoters and lead to an earlier onset of cancer. *Br J Radiol***93**: 20190843.
- 124) Nelson, K. J., Knutson, S. T., Soito, L., Klomsiri, C., Poole, L. B. and Fetrow, J. S. 2010. Analysis of the peroxiredoxin family: Using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins* **79**: 947–964.
- 125) Netto, L. E. S. and Antunes, F. 2016. The roles of peroxiredoxin and thioredoxin in hydrogen peroxide sensing and in signal transduction. *Mol Cells* **39**: 65–71.
- 126) Newton, A., Predina, J., Mison, M., Runge, J., Bradley, C., Stefanovski, D., Singhal, S. and Holt, D. 2020. Intraoperative near-infrared imaging can identify canine mammary tumors, a spontaneously occurring, large animal model of human breast cancer. *PLOS ONE***15**: e0234791.
- 127) Nicolussi, A., D'Inzeo, S., Capalbo, C., Giannini, G. and Coppa, A. 2017. The role of peroxiredoxins in cancer. *Mol Clin Oncol***6**: 139–153.
- 128) Nicolussi, A., D'Inzeo, S., Mincione, G., Buffone, A., Marcantonio, M. C. D., Cotellesse, R., Cichella, A., Capalbo, C., Gioia, C. D., Nardi, F., Giannini, G. and Coppa, A. 2014. PRDX1 and PRDX6 are repressed in papillary thyroid carcinomas via BRAF V600E-dependent and -independent mechanisms. *Int J Oncol***44**: 548–556.
- 129) Niu, W., Zhang, M., Chen, H., Wang, C., Shi, N., Jing, X., Ge, L., Chen, T. and Tang, X. 2016. Peroxiredoxin 1 promotes invasion and migration by regulating epithelial-to-mesenchymal transition during oral carcinogenesis. *Oncotarget* **7**: 47042–47051.
- 130) Oberley, T. D., Verwiebe, E., Zhong, W., Kang, S. W. and Rhee, S. G. 2001. Localization of the thioredoxin system in normal rat kidney. *Free Radic Biol Med* **30**: 412–424.
- 131) Ogasawara, Y., Ohminato, T., Nakamura, Y. and Ishii, K. 2012. Structural and functional

- analysis of native peroxiredoxin 2 in human red blood cells. *Int J Biochem Cell Biol* **44**: 1072–1077.
- 132) Oliveira, P. A., Colaco, A., Chaves, R., Pinto, H. G., Cruz, L. P. and Lopes, C. 2007. Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc* **79**: 593–616.
- 133) Palma, S. D., McConnell, A., Verganti, S. and Starkey, M. 2021. Review on canine oral melanoma: An undervalued authentic genetic model of human oral melanoma? *Vet Pathol* **58**: 881–889.
- 134) Papadimitrakopoulou, V. 2012. Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **7**: 1315–1326.
- 135) Patnaik, A. K., Ehler, W. J. and MacEwen, E. G. 1984. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol* **21**: 469–474.
- 136) Patruno, R., Arpaia, N., Gadaleta, C. D., Passantino, L., Zizzo, N., Misino, A., Lucarelli, N. M., Catino, A., Valerio, P., Ribatti, D. and Ranieri, G. 2009. VEGF concentration from plasma-activated platelets rich correlates with microvascular density and grading in canine mast cell tumour spontaneous model. *J Cell Mol Med* **13**: 555–561.
- 137) Paulin, M. V., Couronné, L., Beguin, J., Poder, S. L., Delverdier, M., Semin, M. O., Bruneau, J., Bensussan, N. C., Malamut, G., Cellier, C., Benckroun, G., Tired, L., German, A. J., Hermine, O. and Freiche, V. 2018. Feline low-grade alimentary lymphoma: An emerging entity and a potential animal model for human disease. *BMC Vet Res* **14**: 306.
- 138) Paulusma, C. C., Lamers, W. H., Broer, S. and Graaf, S. F. J. 2022. Amino acid metabolism, transport and signalling in the liver revisited. *Biochem Pharmacol* **201**: 115074.
- 139) Peng, L. L., Wang, R., Shang, J. K., Xiong, Y. F. and Fu, Z. Z. 2017. Peroxiredoxin 2 is

- associated with colorectal cancer progression and poor survival of patients. *Oncotarget* **8**: 15057–15070.
- 140) Peroja, P., Haapasaari, K. M., Mannisto, S., Miinalainen, I., Koivunen, P., Leppä, S., Lindsberg, M. L. K., Kuusisto, M. E. L., Hujanen, T. T., Kuittinen, O. and Karihtala, P. 2016. Total peroxiredoxin expression is associated with survival in patients with follicular lymphoma. *Virchows Arch* **468**: 623–630.
  - 141) Pijuan, J., Barceló, C., Moreno, D. F., Maiques, O., Sisó, P., Marti, R. M., Macià, A. and Panosa, A. 2019. *In vitro* cell migration, invasion, and adhesion assays: From cell imaging to data analysis. *Front Cell Dev Biol* **7**: 107–122.
  - 142) Pyuen, A. A., Meuten, T., Rose, B. J. and Thamm, D. H. 2018. *In vitro* effects of PI3K/mTOR inhibition in canine hemangiosarcoma. *PLOS ONE* **13**: e0200634.
  - 143) Quan, C., Cha, E. J., Lee, H. L., Han, K. H., Lee, K. M. and Kim, W. J. 2006. Enhanced expression of peroxiredoxin I and VI correlates with development, recurrence and progression of human bladder cancer. *J Urol* **175**: 1512–1516.
  - 144) Queiroga, F. L., Raposo, T., Carvalho, M. I., Prada, J. and Pires, I. 2011. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: Most recent findings. *In Vivo* **25**: 455–466.
  - 145) Rakoczy, K., Szlasa, W., Sauer, N., Saczko, J. and Kulbacka, J. 2022. Molecular relation between biological stress and carcinogenesis. *Mol Biol Rep* **49**: 9929–9945.
  - 146) Rani, V., Deep, G., Singh, R. K., Palle, K. and Yadav, U. C. S. 2016. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci* **148**: 183–193.
  - 147) Regua, A. T., Arrigo, A., Doheny, D., Wong, G. L. and Lo, H. W. 2021. Transgenic mouse models of breast cancer. *Cancer Lett* **516**: 73–83.
  - 148) Riddell, J. R., Maier, P., Sass, S. N., Moser, M. T., Foster, B. A. and Gollnick, S. O. 2012.

- Peroxiredoxin 1 stimulates endothelial cell expression of VEGF via TLR4 dependent activation of HIF-1  $\alpha$ . *PLOS ONE* **7**: e50394.
- 149) Roberts, E. A. and Sarkar, B. 2008. Liver as a key organ in the supply, storage, and excretion of copper. *Am J Clin Nutr* **88**: 851S–854S.
  - 150) Roccabianca, P., Schulman, F. Y., Avallone, G., Foster, R. A., Scruggs, J. L., Dittmer, K. and Kiupel, M. 2018. Fibrous Tumors. In:(Kiupel, M. ed.) *Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals. Volume 3: Tumors of Soft Tissue*. pp. 80–123. the Davis-Thompson DVM Foundation.
  - 151) Roccabianca, P., Schulman, F. Y., Avallone, G., Foster, R. A., Scruggs, J. L., Dittmer, K. and Kiupel, M. 2018. Vascular tumors. In:(Kiupel, M. ed.) *Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals. Volume 3: Tumors of Soft Tissue*. pp. 149–201. the Davis-Thompson DVM Foundation.
  - 152) Rui, L. 2014. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* **4**: 177–197.
  - 153) Saad, E. S., Milley, K. M., Al-Khan, A. A., Nimmo, J. S., Bacci, B., Tayebix, M., Day, M. J., Richardson, S. J. and Danks, J. A. 2017. Canine mixed mammary tumour as a model for human breast cancer with osseous metaplasia. *J Comp Path* **156**: 352–365.
  - 154) Sánchez, M. I. C., Martos, S. F., Montoya, J. J. and Espada, J. 2019. Intrinsic activation of cell growth and differentiation in ex vivo cultured human hair follicles by a transient endogenous production of ROS. *Sci Rep* **9**: 4509–4518.
  - 155) Schiffman, J. D. and Breen, M. 2015. Comparative oncology: What dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philos Trans R Soc B* **370**: 20140231.
  - 156) Shadel, G. S. and Horvath, T. L. 2015. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell* **163**: 560–569.

- 157) Sharma, L. K., Fang, H., Liu, J., Vartak, R., Deng, J. and Bai, Y. 2011. Mitochondrial respiratory complex I dysfunction promotes tumorigenesis through ROS alteration and AKT activation. *Hum Mol Genet* **20**: 4605–4616.
- 158) Shen, Y., Xu, H., Li, L., Lu, Y., Zhang, M., Huang, X. and Tang, X. 2021. Assessment of potential prognostic value of peroxiredoxin 1 in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Manag Res* **13**: 5725–5737.
- 159) Shi, T., Soest, D. M. K., Polderman, P. E., Burgering, B. M. T. and Dansen, T. B. 2021. DNA damage and oxidant stress activate p53 through differential upstream signaling pathways. *Free Radic Biol Med* **172**: 298–311.
- 160) Sies, H. and Jones, D. P. 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Mol Cell Biol* **21**: 363–383.
- 161) Simpson, S., Dunning, M. D., Brot, S., Roma, L. G., Mongan, N. P. and Rutland, C. S. 2017. Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics. *Acta Vet Scand* **59**: 71–81.
- 162) Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V., Melnikova, N. V., Krasnov, G. S. and Dmitriev, A. A. 2019. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxid Med Cell Longev* **2019**: 6175804.
- 163) Son, A., Nakamura, H., Kondo, N., Matsuo, Y., Liu, W., Oka, S., Ishii, Y. and Yodoi, J. 2006. Redox regulation of mast cell histamine release in thioredoxin-1 (TRX) transgenic mice. *Cell Res* **16**: 230–239.
- 164) Song, I. S., Jeong, Y. J., Jung, Y., Park, Y. H., Shim, S., Kim, S. J., Eom, D. W., Hong, S. M., Lee, P. C. W., Kim, S. U. and Jang, S. W. 2021. The sulfiredoxin-peroxiredoxin redox system regulates the stemness and survival of colon cancer stem cells. *Redox Biol* **48**: 102190.

- 165) Song, Y., Liu, H., Cui, C., Peng, X., Wang, C., Tian, X. and Li, W. 2019. Silencing of peroxiredoxin 1 inhibits the proliferation of esophageal cancer cells and promotes apoptosis by inhibiting the activity of the PI3K/AKT pathway. *Cancer Manag Res* **11**: 10883–10890.
- 166) Stacey, M. M., Vissers, M. C. and Winterbourn, C. C. 2012. Oxidation of 2-cys peroxiredoxins in human endothelial cells by hydrogen peroxide, hypochlorous acid, and chloramines. *Antioxid Redox Signal* **17**: 411–421.
- 167) Sun, Y. L., Cai, J. Q., Liu, F., Bi, X. Y., Zhou, L. P. and Zhao, X. H. 2015. Aberrant expression of peroxiredoxin 1 and its clinical implications in liver cancer. *World J Gastroenterol* **21**: 10840–10852.
- 168) Tang, Y., Luo, B., Deng, Z., Wang, B., Liu, F., Li, J., Shi, W., Xie, H., Hu, X. and Li, J. 2016. Mitochondrial aerobic respiration is activated during hair follicle stem cell differentiation, and its dysfunction retards hair regeneration. *PeerJ* **4**: e1821.
- 169) Taniuchi, K., Furihata, M., Hanazaki, K., Iwasaki, S., Tanaka, K., Shimizu, T., Saito, M. and Saibara, T. 2015. Peroxiredoxin 1 promotes pancreatic cancer cell invasion by modulating p38 MAPK activity. *Pancreas* **44**: 331–340.
- 170) Tasdogan, A., Ubellacker, J. M. and Morrison, S. J. 2021. Redox regulation in cancer cells during metastasis. *Cancer Discov* **11**: 2682–2692.
- 171) Tsuchiya, M., Ichiseki, T., Ueda, S., Ueda, Y., Shimazaki, M., Kaneuji, M. and Kawahara, N. 2018. Mitochondrial stress and redox failure in steroid-associated osteonecrosis. *Int J Med Sci* **15**: 205–209.
- 172) Valentin, N. S., Drzewicka, K., König, C., Schiebel, E. and Melchior, F. 2016. Redox regulation of SUMO enzymes is required for ATM activity and survival in oxidative stress. *EMBO J* **35**: 1312–1329.

- 173) Valli, V. E., Bienzle, D., Meuten, D. J. and Linder, K. E. 2016. Tumors of the Hemolymphatic System. In:(Meuten, D. J. ed.) Tumors in Domestic Animals, 5 ed. pp. 203–321. Willey & Sons.
- 174) Wang, G., Wu, M., Durham, A. C., Radaelli, E., Mason, N. J., Xu, X. W. and Roth, D. B. 2020. Molecular subtypes in canine hemangiosarcoma reveal similarities with human angiosarcoma. *PLOS ONE* **15**: e0229728.
- 175) Wang, W., Wei, J., Zhang, H., Zheng, X., Zhou, H., Luo, Y., Yang, J., Deng, Q., Huang, S. and Fu, Z. 2021. PRDX2 promotes the proliferation of colorectal cancer cells by increasing the ubiquitinated degradation of p53. *Cell Death Dis* **12**: 605.
- 176) Wang, Y., Liu, M., Yang, P. and Peng, H. 2018. Peroxiredoxin 1 (PRDX1) suppresses progressions and metastasis of osteosarcoma and fibrosarcoma of bone. *Med Sci Monit* **24**: 4113–4120.
- 177) Wen, C., Wang, H., Wu, X., He, L., Zhou, Q., Wang, F., Chen, S., Huang, L., Chen, J., Wang, H., Ye, W., Li, W., Yang, X., Liu, H. and Peng, J. 2019. ROS-mediated inactivation of the PI3K/AKT pathway is involved in the antgastric cancer effects of thioredoxin reductase-1 inhibitor chaetocin. *Cell Death Dis* **10**: 809–824.
- 178) Wiernicki, B., Dubois, H., Tyurina, Y. Y., Hassannia, B., Bayir, H., Kagan, V. E., Vandenabeele, P., Wullaert, A. and Berghe, T. V. 2020. Excessive phospholipid peroxidation distinguishes ferroptosis from other cell death modes including pyroptosis. *Cell Death Dis* **11**: 922–932.
- 179) Willard, M. D. 2012. Alimentary neoplasia in geriatric dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **42**: 693–706.
- 180) Willcox, J. L., Marks, S. L., Ueda, Y. and Skorupski, K. A. 2018. Clinical features and

- outcome of dermal squamous cell carcinoma in 193 dogs (1987-2017). *Vet Comp Oncol* **17**: 130–138.
- 181) Willmann, M., Hadzijusufovic, E., Hermine, O., Dacasto, M., Marconato, L., Bauer, K., Peter, B., Gamperl, S., Eisenwort, G., Jarolim, E. J., Müller, M., Arock, M., Vail, D. M. and Valent, P. 2018. Comparative oncology: The paradigmatic example of canine and human mast cell neoplasms. *Vet Comp Oncol* **17**: 1–10.
- 182) Wong, M. C. S., Huang, J., Lok, V., Wang, J., Fung, F., Ding, H. and Zheng, Z. J. 2021. Differences in incidence and mortality trends of colorectal cancer worldwide based on sex, age, and anatomic location. *Clin Gastroenterol Hepatol* **19**: 955–966.
- 183) Wu, T., Liang, X., Liu, X., Li, Y., Wang, Y., Kong, L. and Tang, M. 2020. Induction of ferroptosis in response to graphene quantum dots through mitochondrial oxidative stress in microglia. *Part Fibre Toxicol* **17**: 30–48.
- 184) Xiao, H., Yang, T., Yan, L., Feng, J., Huang, B. and Jiang, Y. 2020. PRDX1 is a tumor suppressor for nasopharyngeal carcinoma by inhibiting PI3K/AKT/TRAF1 signaling. *OncoTargets Ther* **13**: 9123–9133.
- 185) Xu, F., Na, L., Li, Y. and Chen, L. 2020. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell Biosci* **10**: 54–65.
- 186) Yabaji, S. M., Mishra, A. K., Chatterjee, A., Dubey, R. K., Srivastava, K. and Srivastava, K. K. 2017. Peroxiredoxin-1 of macrophage is critical for mycobacterial infection and is controlled by early secretory antigenic target protein through the activation of p38 MAPK. *Biochem Biophys Res Commun* **494**: 433–439.
- 187) Yanagawa, T., Ishikawa, T., Ishii, T., Tabuchi, K., Iwasa, S., Bannai, S., Omura, K., Suzuki, H. and Yoshida, H. 1999. Peroxiredoxin I expression in human thyroid tumors. *Cancer Lett* **145**:

127–132.

- 188) Yanagawa, T., Omura, K., Harada, H., Ishii, T., Uwayama, J., Nakaso, K., Iwasa, S., Koyama, Y., Onizawa, K., Yusa, H. and Yoshida, H. 2005. Peroxiredoxin I expression in tongue squamous cell carcinomas as involved in tumor recurrence. *Int J Oral Maxillofac Surg* **34**: 915–920.
- 189) Yanga, J., Pia, C. and Wang, G. 2018. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. *Biomed Pharmacother* **103**: 699–707.
- 190) Yonglitthipagon, P., Pairojkul, C., Chamgramol, Y., Loukas, A., Mulvenna, J., Bethony, J., Bhudhisawasdi, V. and Sripa, B. 2012. Prognostic significance of peroxiredoxin 1 and ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 in cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* **43**: 1719–1730.
- 191) Yonemaru, K., Sakai, H., Murakami, M., Yanai, T. and Masegi, T. 2006. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and their receptors (flt-1, flk-1, and flg-1) in canine vascular tumors. *Vet Pathol* **43**: 971–980.
- 192) Yun, H., Park, K., Lee, H. P., Lee, D. H., Jo, M., Shin, D. H., Yoon, D., Han, S. B. and Hong, J. T. 2014. PRDX6 promotes lung tumor progression via its GPx and iPLA2 activities. *Free Radic Biol Med* **69**: 367–376.
- 193) Zarkovic, N. 2020. Roles and functions of ROS and RNS in cellular physiology and pathology. *Cells* **9**: 767–771.
- 194) Zhang, J., Lia, H., Wua, Q., Chena, Y., Denga, Y., Yanga, Z., Zhang, L. and Liu, B. 2019. Tumoral NOX4 recruits M2 tumor-associated macrophages via ROS/PI3K signaling-dependent various cytokine production to promote NSCLC growth. *Redox Biol* **22**: 101116.
- 195) Zhang, K., Wu, S., Wu, H., Liu, L. and Zhou, J. 2021. Effect of the Notch1-mediated PI3K-

- Akt-mTOR pathway in human osteosarcoma. *Aging* **13**: 21090–21101.
- 196) Zhang, L., Wang, X., Cueto, R., Effi, C., Zhang, Y., Tan, H., Qin, X., Ji, Y., Yang, X. and Wang, H. 2019. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biol* **26**: 101284.
  - 197) Zhang, S., He, J., Tang, M. and Sun, H. 2020. Prdx2 upregulation promotes the growth and survival of gastric cancer cells. *Pathol Oncol Res* **26**: 1869–1877.
  - 198) Zhang, Y., Park, J., Han, S. J., Yang, S. Y., Yoon, H. J., Park, I., Woo, H. A. and Lee, S. R. 2020. Redox regulation of tumor suppressor PTEN in cell signaling. *Redox Biol* **34**: 101553.
  - 199) Zhao, S., Su, G., Yang, W., Yue, P., Bai, B., Lin, Y., Zhang, J., Ba, Y., Luo, Z., Liu, X., Zhao, L., Xie, Y., Xu, Y., Li, S., Meng, W., Xie, X. and Li, X. 2017. Identification and comparison of differentiation-related proteins in hepatocellular carcinoma tissues by proteomics. *Technol Cancer Res Treat* **16**: 1092–1101.
  - 200) Zappulli, V., Pena, L., Rasotto, R., Goldschmidt, M. H., Gama, A., Scruggs, J. L. and Kiupel, M. 2018. Benign Epithelial Neoplasms. In:(Kiupel, M. ed.) *Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals. Volume 2: Mammary Tumors.* pp. 72–92. the Davis-Thompson DVM Foundation.
  - 201) Zappulli, V., Pena, L., Rasotto, R., Goldschmidt, M. H., Gama, A., Scruggs, J. L. and Kiupel, M. 2018. Malignant Epithelial Neoplasms. In:(Kiupel, M. ed.) *Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals. Volume 2: Mammary Tumors.* pp. 95–123. the Davis-Thompson DVM Foundation.
  - 202) Zheng, H., Du, C., Tang, X., Zhang, Y., Huang, R., Yu, C. and Xie, G. 2022. The development of molecular typing in canine mammary carcinomas. *Mol Biol Rep* **49**: 8943–8951.
  - 203) Zhu, H., Tao, X., Zhou, L., Sheng, B., Zhu, X. and Zhu, X. 2019. Expression of thioredoxin

- 1 and peroxiredoxins in squamous cervical carcinoma and its predictive role in NACT. *BMC Cancer* **19**: 865–873.
- 204) Zhu, Y. and Costa, M. 2020. Metals and molecular carcinogenesis. *Carcinogenesis* **41**: 1161–1172.
- 205) Zou, S., Ye, M., Zhang, J., Ji, H., Chen, Y. and Zhu, X. 2022. Establishment and genetically characterization of patient-derived xenograft models of cervical cancer. *BMC Med Genomics* **15**: 191–201.

## 和文要旨

Peroxiredoxin (PRDX) は 6 つのアイソフォーム (PRDX1-6) を有する抗酸化酵素群である。PRDX の主な機能は、活性酸素種の一つである  $\text{H}_2\text{O}_2$  の水への還元であるが、この機能のみならず、様々なタンパク質の酸化還元状態を調節することで、シグナル伝達経路を制御 (レドックス制御) することも知られており、ヒトの様々な腫瘍で PRDX の発現の異常が見られ、PRDX の発現の変化によるレドックス制御の異常と腫瘍発生や悪性化などとの関連が明らかとなりつつある。一方、犬の腫瘍における PRDX の発現に関する研究はほとんどなく、さらに正常な組織における PRDX の発現に関する情報も非常に乏しいのが現状である。そこで本研究では、犬の腫瘍における PRDX の発現の基礎的情報を得るために、犬の正常組織と各種の腫瘍における PRDX1 および 2 の発現を免疫組織化学的に検索した。さらに、犬の血管肉腫においては、免疫組織化学的検索に加えて、犬の血管肉腫細胞株を用いて、PRDX1 の発現の意義を検索した。

第 1 章では、最初に、犬の正常組織と自然発生腫瘍における PRDX1 および 2 の発現を免疫組織化学的に検索した。正常な皮膚では、表皮の扁平上皮細胞や毛包、皮脂腺およびアポクリン汗腺などの上皮細胞で、PRDX1 および 2 が強陽性を示した。乳腺では、活性化あるいは休止状態にかかわらず、管腔上皮細胞は PRDX1 陽性かつ PRDX2 陰性であった。腎臓では尿細管上皮が、また肝臓では肝細胞および胆管上皮細胞が PRDX1 および 2 に陽性を示したが、膀胱移行上皮細胞は、PRDX1 が強陽性、PRDX2 は陰性であった。PRDX1 は様々な上皮細胞で陽性であったが、PRDX2 は陰性のものもみられた。非上皮細胞においては、血管内皮細胞は PRDX1 および 2 のいずれにも陰性で、脾臓においては、PRDX1 はリンパ球や赤芽球を含む赤血球系細胞で陽性、PRDX2 は赤血球系細胞のみで陽性を示した。今回の犬の正常組織における PRDX1 および 2 の発現性は、これまでのヒトやげっ歯類の正常組織における PRDX の発現の報告とおおむね一致していた。哺乳類では PRDX のアミノ酸配列の相同性が高いことや、PRDX1 および 2 の局在性が

哺乳類間で比較的共通していることを考慮すると、PRDX1 および 2 は、哺乳類では同様の機能を発揮していると考えられた。

続いて、犬の代表的な自然発生腫瘍における PRDX1 および 2 の発現について免疫組織化学的に検索した。毛包性腫瘍や扁平上皮癌、乳腺腫瘍、移行上皮癌などの上皮細胞由来の腫瘍では、腫瘍細胞が PRDX1 および 2 に強陽性を示した。扁平上皮癌では、転移しやすく予後が悪い口腔原発の扁平上皮癌において、皮膚原発の扁平上皮癌と比較して PRDX1 の陽性スコアが有意に高かったことより、口腔扁平上皮癌における PRDX1 の発現亢進は、その悪性動態に関与している可能性が考えられた。また、リンパ腫、肥満細胞腫、皮膚形質細胞腫および犬皮膚組織球腫では、PRDX1 に陽性を、PRDX2 には陰性を示すものが多かった。この中で、T 細胞性リンパ腫は PRDX1 が陽性であった。しかし、正常なリンパ節の T 細胞が優勢な傍皮質領域では PRDX1 が陰性であったことから、PRDX1 の免疫染色はリンパ節の傍皮質領域の過形成とリンパ腫の鑑別に有用である可能性が見出された。さらに肥満細胞腫では、Grade が高いもので PRDX2 の陽性スコアが高く、悪性度への PRDX2 の関与が疑われた。以上より、様々な犬の腫瘍において PRDX1 および 2 の陽性像が認められたが、PRDX1 および PRDX2 は、それぞれ扁平上皮癌と T 細胞性リンパ腫および肥満細胞腫の腫瘍化や悪性化に関与している可能性が示唆された。

第 2 章では、犬の血管内皮性腫瘍における PRDX1 および 2 の発現を免疫組織化学的に検索した。その結果、良性の海綿状血管腫と比較して、悪性の血管肉腫において、PRDX1 および 2 の陽性スコアが顕著に高いことが明らかになった。さらに、血管肉腫において、その組織型および発生部位間で、それらの陽性所見に有意差はなく、PRDX1 および 2 は、組織型や発生部位に依存せず、血管肉腫に普遍的に陽性を示していることが明らかとなった。続いて、犬の血管肉腫における PRDX1 の役割を解析するため、犬の血管肉腫から樹立された細胞株を用いて、PRDX1 のノックダウン実験を実施したところ、血管肉腫細胞の cell viability が低下した。しかし、細胞の形態は変化せず、死滅細胞の増加もみられなかった。よって、PRDX1 のノックダウンにより、細胞増殖の

遅延が生じた可能性が示唆され、PRDX1 は犬の血管肉腫細胞の細胞増殖の亢進に関与する可能性が考えられた。

以上より、本研究において、これまで報告のなかった犬の正常組織および腫瘍における PRDX1 および 2 の発現についての免疫組織学的特徴を明らかにした。さらに血管肉腫をはじめとした、いくつかの腫瘍では、腫瘍における PRDX の発現亢進の、腫瘍化や悪性化への関与が示唆された。

## 英文要旨

Peroxiredoxin (PRDX) is a group of antioxidant enzymes with 6 isoforms (PRDX1-6). The main function of PRDX is to reduce  $H_2O_2$ , one of the reactive oxygen species, to water. In addition to this function, it is also known to regulate signaling pathways by modulating the redox state of various proteins. In various human neoplasms, the abnormal expressions of PRDX have been observed, and it has been elucidated the association of the aberration of the redox regulations due to the changes of the PRDX expressions with the development and progression of neoplasms. On the other hand, there are few studies on the expressions of PRDX in canine neoplasms, and the information on the expressions of PRDX in canine normal tissues is also very scarce. Therefore, in the present study, the expressions of PRDX1 and 2 in canine normal and various neoplastic tissues were detected immunohistochemically to obtain the basic information about their expressions in canine neoplasms. Furthermore, in canine hemangiosarcoma, in addition to the immunohistochemical examination on PRDX1 and 2, the significance of the PRDX1 expression was investigated using canine hemangiosarcoma cell lines.

In Chapter 1, first, the expressions of PRDX1 and 2 in canine normal tissues and spontaneous neoplasms were investigated immunohistochemically. In the normal skin, the epithelial cells such as squamous cells in the epidermis, hair follicles, sebaceous glands and apocrine sweat glands showed strongly positive for PRDX1 and 2. In the mammary gland, the luminal epithelial cells showed positive for PRDX1 and negative for PRDX2, independent of their lactating activity. Tubular epithelial cells in the kidney, and hepatocytes and epithelial cells of the bile duct in the liver showed positive for PRDX1 and 2, but transitional cells in the bladder were strongly positive for PRDX1, but negative for PRDX2. Various epithelial cells were positive for PRDX1, however some were

negative for PRDX2. In non-epithelial cells, endothelial cells of the blood vessels were negative for PRDX1 and 2. In the spleen, lymphocytes and erythroid cells including erythroblasts were positive for PRDX1, and only erythroid cells were positive for PRDX2. The PRDX1 and 2 expression profile in canine normal tissues of the present study were mostly consistent with the previous reports on the PRDX expressions in normal tissues of humans and experimental rodents. Considering that the amino acid sequence of PRDX1 or 2 is highly homologous and their localizations are common among mammals, PRDX1 and 2 are thought to exert similar functions in mammals.

Next, the PRDX1 and 2 expressions in canine representative spontaneous tumors were investigated immunohistochemically. In the neoplasms derived from epithelial cells such as hair follicular tumors, squamous cell carcinomas, mammary gland tumors and transitional cell carcinomas, neoplastic cells were strongly positive for PRDX1 and 2. In squamous cell carcinomas, the positive score of PRDX1 was significantly higher in oral squamous cell carcinomas, which is more likely to metastasize and have a worse prognosis, than in cutaneous squamous cell carcinomas, suggesting that the increased expression of PRDX1 in oral squamous cell carcinomas may be related to their malignant behavior. In addition, lymphomas, mast cell tumors, cutaneous plasmacytomas and canine cutaneous histiocytomas showed positive for PRDX1 and negative for PRDX2. T-cell lymphomas were positive for PRDX1. However, in the normal lymph node, PRDX1 was negative in the paracortex, which is T-cell-dominant area, suggesting that the immunostaining for PRDX1 may be useful in the differentiation of lymphoma from hyperplasia in the paracortex of the lymph node. Furthermore, in mast cell tumors, those with higher grades showed the higher positive scores for PRDX2, suggesting the involvement of PRDX2 in their malignancy. According to the above results, it was suggested that PRDX1 and PRDX2 may be involved in tumorigenesis and malignant transformation of squamous cell carcinoma and T-cell lymphoma, and mast cell tumor, respectively.

In Chapter 2, the expressions of PRDX1 and 2 in canine vascular endothelial neoplasms were detected immunohistochemically. As a result, it was revealed that the positive scores of PRDX1 and 2 in canine hemangiosarcoma, which is the malignant endothelial neoplasm, were significantly higher than those in hemangioma, which is the benign endothelial neoplasm. Furthermore, in canine hemangiosarcoma, there were no significant difference in the PRDX1 and 2 positive findings among the histological subtypes or primary sites, indicating that PRDX1 and 2 are universally expressed in canine hemangiosarcoma, independent of their histological subtypes and primary sites. Subsequently, the PRDX1 knockdown was performed using cell lines derived from canine hemangiosarcoma to analyze the role of PRDX1 in canine hemangiosarcoma. As a result, the cell viability of canine hemangiosarcoma cells was decreased. However, there was no morphological changes of the cells, and there was no increase in dead cells. Therefore, it is suggested that PRDX1 knockdown may cause the retardation of cell proliferation, and PRDX1 may be involved in the enhancement of cell proliferation of canine hemangiosarcoma cells.

In conclusion, in the present study, immunohistochemical profiles of the PRDX1 and 2 expressions in canine normal tissues and tumors, which have not been reported previously, were revealed. Furthermore, in some canine neoplasms, such as hemangiosarcoma, it was suggested that the increased expression of PRDXs in neoplasms can be involved in tumorigenesis or malignant transformation.