

氏名(本(国)籍)	児玉篤史(愛知県)
主指導教員名	岐阜大学 教授 柳井徳磨
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博甲第301号
学位授与年月日	平成22年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	Pathological Study on Expressions of Angiogenesis-associated Homeobox Genes in Canine Spontaneous Hemangiosarcomas and Xenograft Tumors Using Nude Mice (自然発生イヌ血管肉腫およびヌードマウス異種移植腫瘍における血管新生関連ホメオボックス遺伝子群の発現に関する病理学的研究)
審査委員	主査 岐阜大学 教授 丸尾幸嗣 副査 帯広畜産大学 教授 松井高峯 副査 岩手大学 教授 岡田幸助 副査 東京農工大学 教授 三森国敏 副査 岐阜大学 教授 柳井徳磨

## 論文の内容の要旨

血管内皮細胞(EC)由来の悪性腫瘍である血管肉腫(HSA)は一般に予後が悪い。イヌにおけるHSAの発生率はヒトのそれに比べて高く、ヒトHSAの研究に有用とされ、これまでもイヌHASを用いた腫瘍発生メカニズム研究がなされてきた。最近の研究で、イヌおよびヒトの自然発生HSAにおける血管内皮成長因子(VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)およびそれらの受容体の発現が報告され、HSAの増殖環境が血管新生におけるECの活発な増殖期のそれにきわめて類似していることが示された。本論文では、臓器の発生および成体組織の細胞分化・増殖、さらに細胞間相互作用に関連した遺伝子発現に重要な役割を示す転写因子をコードしているホメオボックス(Hx)遺伝子とHAS腫瘍発生の関連に着目し一連の研究を行った。すなわち、Hx遺伝子は病態生理学的な血管新生において、下流の血管新生遺伝子の発現を調節することで、血管新生時の出芽から休止状態に至るECの挙動を制御、また、その発現異常が様々な腫瘍の形成に関連するとされていることから、Hx遺伝子がHAS腫瘍発生において重要な役割を果たしているかと推測した。

第一章では、血管新生性Hx蛋白質の発現と腫瘍発生の関連を解析するために、イヌHSA78例およびイヌ血管腫(HA)30例について、HoxA9, HoxB3, HoxB7 および HoxD3 (血管新生促

進 Hx 蛋白質), Pbx1 および Meis1 (Hox 蛋白質の共役因子) の発現を免疫組織化学的に検討した。さらに、肉芽組織に含まれる増殖期あるいは静止期にある EC のそれと比較検討した。肉芽組織では、増殖性 EC の核および細胞質に HoxA9, HoxB3, HoxB7, HoxD3, Pbx1 および Meis1 の発現を認めた。細胞質での HoxD3 および Pbx1 の発現は、核より強く認められた。一方、増殖休止状態の EC では、HoxB3 と Meis1 が核に強陽性を示したが、細胞質では弱陽性あるいは陰性を示した。HoxA9 と HoxB7 の陽性反応は核にのみ認められ、HoxD3 および Pbx1 は陰性であった。HSA では、HoxB3, HoxD3, Pbx1 および Meis1 の細胞質における発現は約 80%, HoxA9 と HoxB7 は約 20%で観察されたが、HA では、HoxB3 が 40.0%, HoxD3 が 16.7%, Meis1 が 10.0%の検体で細胞質にみられたのみで、HoxA9, HoxB7 および Pbx1 は陰性であった。HoxD3 の細胞質における陽性像は瀰漫性の検体もあったが、ほとんどの HSA では、核周囲に局在していた。HSA の核および細胞質内に HoxA9, HoxB3, Pbx1 および Meis1 の陽性反応が瀰漫性に認められた。HSA における HoxA9, HoxD3, Pbx1 および HoxB3 の陽性検体率(腫瘍細胞の 20%以上が陽性の検体の割合)は、HA に比べて有意に高かった。以上のことから、HSA における Hx 蛋白質の発現が、血管新生時の活性化 EC と類同であり、HA は血管新生表現型でないことが示された。本研究で検出された Hx 蛋白質は、EC の増殖あるいは移行に関与することから、血管新生性 Hx 蛋白質の発現がイヌ HSA における腫瘍性増殖や浸潤に関与している可能性が示された。

第二章では、イヌ HSA ノードマウス異種移植株を作出し、*in vivo* HSA モデルを樹立した。HSA の臨床材料では、Hx 遺伝子を発現した非腫瘍細胞の混入により、厳密な遺伝子発現解析は困難である。そのため、厳密な遺伝子発現解析には腫瘍細胞と混入細胞の遺伝子発現を区別する必要があり、異種移植モデルは有用な方法の一つとされる。13 例の自然発生イヌ HSA をノードマウスの皮下に連続的に異種移植したところ、6 例のイヌ HSA 異種移植株が得られた。次いで、作出された異種移植腫瘍を用い、CD31, von Willebrand factor (EC マーカー), VEGF-A, bFGF, flt-1 および flk-1 (VEGF-A の受容体), bFGF 受容体-1 (FGFR-1) および血管新生性 Hx 遺伝子の発現を病理組織学、免疫組織化学およびイヌ特異プライマーペアによる RT-PCR を用いて検討した。その結果、組織学的に異種移植腫瘍は、紡錘形および多角形から卵円形までの様々な形態の腫瘍細胞の増殖からなり、原発腫瘍と同様の脈管様構造や裂隙が認められた。また、EC マーカー、VEGF-A, bFGF, flt-1, flk-1, FGFR-1, HoxA9, HoxB3, HoxB7, HoxD3, Pbx1 および Meis1 の発現がすべての異種移植腫瘍で検出され、それらの発現は自然発生イヌ HSA と類同であった。したがって、本研究における異種移植モデルは、HAS の悪性増殖の解析、特に Hx 遺伝子発現に関連した悪性増殖の解析に有用であると考えられた。

本研究では、血管新生性 Hx 遺伝子、特に、HoxA9, HoxD3 および Pbx1 がイヌ HSA の悪性増殖に関与し、血管新生時の活性化 EC における Hx 遺伝子と同様に、血管新生促進因子として働く可能性が示された。さらに、原発腫瘍と同様の内皮細胞増殖因子、その受容体および血管新生性 Hx 遺伝子を発現するイヌ HSA 異種移植腫瘍は、HSA における Hx 遺伝子関連悪性増殖メカニズムの解明やヒトおよびイヌにおける新規 HSA 治療法の開発に有用であると考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

血管肉腫 (HSA) は血管内皮細胞 (EC) 由来の悪性腫瘍であり、一般に高度な浸潤増殖および転移により、予後不良を示す。最近の研究で、ヒトおよびイヌに発生した HSA の増殖環境が血管新生における EC の増殖期に類似することが示された。一方、ホメオボックス (Hx) 蛋白質が血管新生において下流の血管新生遺伝子の発現調節に関与し、出芽から休止状態に至る EC の挙動を制御することが明らかにされた。近年、Hx 遺伝子の発現異常が様々な腫瘍形成でみられ、Hx 遺伝子が HSA の腫瘍発生において重要な役割を果たしていることが推測された。本研究では、HSA の腫瘍発生における Hx 遺伝子の意義について明らかにすることを目的とした。

第一章では、血管新生関連 Hx 蛋白質の発現と血管内皮腫瘍の発生との関連を検討するために、自然発生イヌ HSA および血管腫 (HA) について HoxA9, HoxB3, HoxB7, HoxD3, Pbx1 および Meis1 の発現を免疫組織学的に検討した。さらに、肉芽組織に含まれる増殖期 EC および静止期 EC における Hx 蛋白質の動態についても比較検討した。その結果、HAS での Hx 蛋白質の発現が、血管新生時の活性化 EC と類同であり、HA は血管新生表現型を示さないことが示唆された。本研究で発現が認められた Hx 蛋白質は、EC の増殖あるいは移行に関与することから、これらの Hx 蛋白質の発現がイヌ HSA における腫瘍性増殖や浸潤に関与する可能性が示唆された。

第二章では、HSA における厳密な遺伝子発現解析を行うために、イヌ HAS のヌードマウス異種移植腫瘍株を作出した。異種移植腫瘍は組織学的に原発腫瘍に類似していた。さらに、EC マーカー、VEGF-A, bFGF, flt-1, flk-1, FGFR-1, HoxA9, HoxB3, HoxB7, HoxD3, Pbx1 および Meis1 の発現が確認され、それらの発現は自然発生イヌ HSA と類同であった。したがって、樹立された異種移植モデルは、HSA における増殖能の解析、特に Hx 遺伝子発現に関連した悪性増殖能の獲得についての解析に有用であると考えられた。

本研究により、血管新生性 Hx 遺伝子がイヌ HSA において血管新生促進因子として作用し、同腫瘍の増殖および浸潤に関与している可能性が示された。また、イヌ HSA 異種移植腫瘍株は、HAS の Hx 遺伝子に関連した悪性増殖メカニズムの解明、さらにはヒトおよびイヌの HAS に対する新しい治療法の開発に有用であると考えられた。

以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

### 基礎となる学術論文

1) 題 目: Immunohistochemical demonstration of angiogenesis-associated homeobox proteins in canine vascular tumours

著 者 名: Kodama, A., Sakai, H., Murakami, M., Murai, A., Mori, T., Maruo, K., Yanai, T. and Masegi, T.

学術雑誌名: Journal of Comparative Pathology

巻・号・頁・発行年: 141 (2-3): 199-203, 2009

2) 題 目: Establishment of canine hemangiosarcoma xenograft models expressing endothelial growth factors, their receptors, and angiogenesis-associated homeobox genes

著 者 名: Kodama, A., Sakai, H., Matsuura, S., Murakami, M., Murai, A., Mori, T., Maruo, K., Kimura, T., Masegi, T. and Yanai, T.

学術雑誌名: BMC Cancer

巻・号・頁・発行年: 9 (1): 363, 2009

既発表学術論文

- 1) 題 目： The significance of p53 and retinoblastoma pathways in canine hemangiosarcoma  
著 者 名： Yonemaru, K., Sakai, H., Murakami, M., Kodama, A., Mori, T., Yanai, T., Maruo, K. and Masegi, T.  
学術雑誌名： The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年： 69 (3) : 271-278, 2007
  
- 2) 題 目： 犬の消化管間質腫瘍の2例  
著 者 名： 乙部有加, 森崇, 坂井田誠, 山田雅人, 小林慶哉, 児玉篤史, 酒井洋樹, 丸尾幸嗣  
学術雑誌名： 日本獣医師会雑誌  
巻・号・頁・発行年： 60 (10) : 729-732, 2007
  
- 3) 題 目： Acute neuropathogenicity with experimental infection of equine herpesvirus 9 in common marmosets (*Callithrix jacchus*)  
著 者 名： Kodama, A., Yanai, T., Yonemaru, K., Sakai, H., Masegi, T., Yamada, S., Fukushi, H., Kuraishi, T., Hattori, S. and Kai, C.  
学術雑誌名： Journal of Medical Primatology  
巻・号・頁・発行年： 36 (6) : 335-342, 2007
  
- 4) 題 目： Expression of the anti-apoptotic factors Bcl-2 and survivin in canine vascular tumours  
著 者 名： Murakami, M., Sakai, H., Kodama, A., Mori, T., Maruo, K., Yanai, T. and Masegi, T.  
学術雑誌名： Journal of Comparative Pathology  
巻・号・頁・発行年： 139 (1) : 1-7, 2008
  
- 5) 題 目： B-cell intestinal lymphoma with Mott cell differentiation in a 1-year-old miniature Dachshund  
著 者 名： Kodama, A., Sakai, H., Kobayashi, K., Mori, T., Maruo, K., Kudo, T., Yanai, T. and Masegi, T.  
学術雑誌名： Veterinary Clinical Pathology  
巻・号・頁・発行年： 37 (4) : 409-415, 2008
  
- 6) 題 目： Activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 by membrane type 1-MMP and abnormal immunolocalization of the basement membrane components laminin and type IV collagen in canine spontaneous hemangiosarcomas  
著 者 名： Murakami, M., Sakai, H., Kodama, A., Yanai, T., Mori, T., Maruo, K. and Masegi, T.  
学術雑誌名： Histology and Histopathology  
巻・号・頁・発行年： 24 (4) : 437-446, 2009

7)題 目: Avian poxvirus infection in a white-tailed sea eagle  
(*Haliaeetus albicilla*) in Japan  
著 者 名: Saito, K., Kodama, A., Yamaguchi, T., Gotoh, Y.,  
Sakai, H.; Fukushi, H., Masegi, T. and Yanai, T.  
学術雑誌名: Avian Pathology  
卷・号・頁・発行年: 38 (6) : 485-489, 2009