

論文の内容の要旨

氏名：飯田 玄 徳

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：犬の肝細胞癌の診断と治療に関する研究

犬の原発性肝臓腫瘍においては、肝細胞癌の発生が最も多く、単葉に孤立性の腫瘍病変を形成するケースが多い。そのため、肝細胞癌治療の第一選択は外科的切除であり、完全切除が可能な場合は予後良好であると報告されている。しかし、肝臓は非常に予備能力の高い臓器であるため、臨床症状は病態が進行してから発現することが多く、肝臓に腫瘍病変が確認された時点では、腫瘍は巨大化していることが少なくない。ヒトの肝細胞癌では、B、C型肝炎ウイルス感染などからの慢性肝炎や肝硬変が背景にあり、結節型や浸潤型が多く、予後が悪いことから様々な治療法が存在する。一方、犬の肝細胞癌は、ウイルスとの関連はわかっておらず、未だ原因不明とされ、診断や治療に関する治験は少ないのが現状であり、ヒトの肝細胞癌に関する知見を単純に外挿することはできないものと推察される。

以上のことから、犬の肝細胞癌における診断と治療について検討することを目的として、第1章では犬の肝細胞癌の回顧的解析を行い、臨床的特徴、腫瘍の発生部位や切除部位について調査した。次いで、第2章では犬の肝細胞癌における腫瘍マーカーの遺伝子定量解析、免疫活性および血中濃度を測定して臨床的有用性を検討した。第3章では肝細胞癌を含む肝臓腫瘍を持つ犬に対して、肝臓腫瘍摘出術時に蛍光法による腫瘍の術中同定を行い、その臨床的有用性について検討した。最後に、第4章では犬の肝細胞癌の分子標的になり得ると予想される血管新生因子、増殖因子およびそのレセプターの遺伝子発現を定量解析し、犬の肝細胞癌における分子生物学的特徴について検討した。

1. 犬の肝細胞癌における回顧的研究

本研究は、2002年7月から2013年7月に本学附属動物病院に来院し、腹部超音波検査、コンピュータ断層撮影(CT)検査によって検出された肝臓腫瘍に対し、外科的切除を行って病理組織学的に肝細胞癌と診断された犬を対象に、シグナルメント、臨床症状、腫瘍の発生部位や予後などについて検討した。

その結果、対象となった犬は71頭であり、犬種はシー・ズーが14頭(20%)と最も多く認められ、次いで雑種が9頭(13%)、柴犬が7頭(10%)、シェットランド・シープドッグ、ミニチュア・ダックスフンドが各6頭(8%)であった。性別に雌雄差は認められず、年齢の中央値は11歳と高齢で発症し、体重の中央値は9.3kgと小～中型犬での発生が多いことが認められた。臨床症状は49頭(69%)に認められ、主な臨床症状として、食欲不振が23頭(32%)、元気消失が19頭(27%)、嘔吐が17頭(24%)と多く認められた。一方、残りの22頭(31%)は無症状であった。腫瘍の発生部位は外側左葉が20頭(28%)、内側左葉が11頭(15%)、方形葉が7頭(10%)、内側右葉が14頭(20%)、外側右葉が17頭(24%)、尾状葉尾状突起が10頭(14%)、尾状葉乳頭突起が5頭(7%)であった。区域別では、左肝区域が28頭(39%)、中央肝区域が19頭(27%)、右肝区域が25頭(35%)であった。切除した肝葉は一葉のみとなった症例が44頭(62%)、二葉以上切除した症例が22頭(31%)、切除不可だった症例が5頭(7%)であった。術後生存期間の中央値は、外科的切除を行った症例では770日間であったのに対し、切除不可だった症例では116日間であった。また、術後に再発した症例は7頭(11%)であった。

以上、犬の肝細胞癌は高齢で発生し、無症状で進行する場合や複数の肝葉を切除しなくてはならない症例が存在したものの、外科的切除できた症例の予後は良好であり、長期生存することが明らかとなった。

2. 犬の肝細胞癌における α -フェトプロテインとグリピカン-3の有用性に関する研究

第1章によって、犬の肝細胞癌は無症状で進行する場合や、診断時には腫瘍が巨大化し、複数の肝葉切除が必要となる症例も存在することが明らかになったことから、犬においても腫瘍マーカーが必要であると考えた。ヒトの肝細胞癌における腫瘍マーカーとして、腫瘍胎児性蛋白である α -フェトプロテイン(AFP)が臨床応用されており、近年新規に同定されたグリピカン-3(GPC-3)が有望視されている。そこ

で、これら腫瘍マーカーの犬における臨床的有用性を検討するため、遺伝子定量解析、免疫活性および血中濃度の解析を行った。

本研究は、2010年3月から2012年7月に本学附属動物病院に来院し、外科的切除を行った肝細胞癌の犬17症例および結節性過形成の犬4症例を用いた。各症例から摘出した肝臓腫瘍と付随する非腫瘍部の肝臓は遺伝子発現解析と免疫組織化学的解析に用いた。また、術前、術後における血中濃度の測定解析を行った。

得られた組織は病理組織学的診断から、肝細胞癌17検体、結節性過形成10検体、非腫瘍部肝臓11検体であった。AFPのmRNA発現量は肝細胞癌で有意に高値を示したのに対し、GPC-3は有意に低値を示していた。AFPの免疫活性は肝細胞癌で強染色性を示す検体が多いのに対し、GPC-3は肝細胞癌で弱まる傾向が認められた。さらに、術前高値を示していた血中AFP濃度は術後に有意に低下したのに対し、術前後での血中GPC-3濃度は有意な変動がなく、むしろ術後に上昇する傾向を示していた。遺伝子発現と血中濃度の関連性について、AFPは有意な相関が認められたのに対し、GPC-3は相関が認められなかった。犬の肝細胞癌においてもAFPの高発現が認められたことから、犬においても癌化に伴って発現が高まる可能性が考えられた。一方、GPC-3は結節性過形成や非腫瘍部肝臓でも発現が認められ、肝細胞癌において低値を示していたことから、犬の肝細胞癌では発現が抑制された可能性が考えられた。さらに、AFPの免疫組織化学的検索では、肝細胞癌において強染色性を示す検体が多く認められたことから、AFPは蛋白質レベルでも高発現していることが考えられた。一方、GPC-3は肝細胞癌において染色性が弱まる傾向が認められ、結節性過形成や非腫瘍部肝臓で染色性を示していたことから、正常な肝臓でも産生される可能性が考えられた。血中AFP濃度は、健常犬と比較して肝細胞癌症例で有意に高値を示したことから、術前診断に役立つ可能性が考えられた。また、術後に有意に低下していたことから再発の早期発見など術後モニタリングに役立つ可能性も考えられた。一方、血中GPC-3濃度に有意差は認められず、術後に上昇していたことから肝細胞癌とは関連していない可能性が考えられた。

以上、犬の肝細胞癌においてもAFPは腫瘍マーカーとなり得ることを明らかにした。しかし、GPC-3は腫瘍マーカーとして適切ではないと判断された。

3. 犬の肝細胞癌におけるインドシアニングリーン蛍光法の有用性に関する検討

第1章の結果から、外科的に完全切除できた症例において、予後が良好であることが明らかになった。しかし、肝細胞癌はその大きさや発生部位により術中に正確な位置を把握することが困難な場合がある。近年、医学領域において、インドシアニングリーン(ICG)の蛍光特性を利用した肝区域や胆管の同定法が報告され、肝細胞癌や転移性肝腫瘍の同定にICG蛍光法として試みられている。一方、犬におけるICG蛍光法の有用性に関しては報告が見当たらず、検討はなされていない。そこで、犬の肝臓腫瘍に対してICG蛍光法を応用し、その臨床的有用性を検討した。

本研究は、2011年3月から2012年9月に本学附属動物病院に来院し、肝臓腫瘍と診断され、外科的切除を適応した犬6頭を対象とした。術前12~18時間にICGを0.5mg/kgで静注した。開腹下にて肝表面および離断面を赤外線観察カメラにて観察し、切除標本に対しても同様に観察した。さらに、病理組織学的検査所見と蛍光観察所見の比較を行った。

対象となった肝臓腫瘍症例6頭から切除された結節は全部で12結節であった。病理組織学的に肝細胞癌6結節と結節性過形成6結節と診断され、ICG蛍光法にて蛍光所見を示す結節が得られた。蛍光を示した結節は肝細胞癌4結節と結節性過形成1結節であった。一方、残りの肝細胞癌2結節と結節性過形成5結節については蛍光を示さなかった。また、蛍光を示した結節については肝表面にて同様に蛍光観察が可能であった。全症例において、肝臓腫瘍切除後の離断面に蛍光は観察されなかったことから、術中に完全切除できたと判断することが可能であった。しかし、結節性過形成でも蛍光を示す結節が存在したことから、胆汁鬱滞を伴うものに関しては、ICGが腫瘍内部に留まる可能性が考えられた。

以上、犬においてもICG蛍光法により肝細胞癌が同定可能であることを明らかにした。また、術中に病変部位を正確に把握することが可能であったことから、術中に完全切除できたと判断できることを明らかにした。

4. 犬の肝細胞癌における増殖因子、増殖因子レセプターの遺伝子発現解析

第1章の結果から、腫瘍の大きさや発生部位により、複数の肝葉切除が必要な場合や外科的切除が難しい症例が存在することが明らかになった。肝細胞癌は特に、血管新生が豊富な腫瘍として考えられており、血管新生には血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、血管壁細胞増殖因子(PDGF)が重要とされ、VEGF/VEGF 受容体(VEGFR)シグナルと PDGF/PDGF 受容体(PDGFR)シグナルが相乗的に作用することも報告されている。また、肝細胞癌血管新生因子としてアンジオポイエチン(Ang)/ Tie2 シグナルが知られている。さらに、肝細胞における増殖シグナルが亢進すると考えられているものに、上皮細胞増殖因子(EGF)/EGF 受容体(EGFR)シグナル、インスリン様成長因子(IGF)/IGF 受容体(IGFR)シグナル、肝細胞増殖因子(HGF)/ MET シグナルが挙げられる。ヒトの進行性肝細胞癌では、上記のシグナルを阻害する分子標的治療薬であるソラフェニブが本邦や欧米において臨床応用されている。しかし、犬の肝細胞癌における分子生物学的特徴は未だ不明であり、そのような治療が可能か否かについては検討されていない。そこで、肝細胞癌の分子標的になり得ると予想される血管新生因子、増殖因子およびそのレセプターの遺伝子発現を定量解析し、犬の肝細胞癌における分子生物学的特徴について検討した。

本研究は、2010年3月から2012年7月に本学附属動物病院に来院し、外科的切除を行った肝細胞癌の犬18症例および結節性過形成の犬4症例を用いた。各症例から摘出された肝臓腫瘍と付随する非腫瘍部の肝臓は遺伝子定量解析に用いた。定量解析する遺伝子として、VEGF-A、VEGFR-1, 2, 3、PDGF-B、PDGFR- β 、Ang-2、Tie2、EGF、TGF- α 、HB-EGF、EGFR、HGF、MET、IGF1、IGF1R、IGF2Rの17遺伝子を選択した。

得られた組織は病理組織学的診断から、肝細胞癌18検体、結節性過形成10検体、非腫瘍部肝臓11検体であった。今回解析した17遺伝子のうち5つの遺伝子において有意差が認められた。PDGF-B mRNA 発現量は正常肝臓と比較して、肝細胞癌で有意に高値を示した。一方、TGF- α と EGFR mRNA 発現量は正常肝臓と比較して、肝細胞癌で有意に低値を示した。また、EGF mRNA 発現量は結節性過形成と比較して、肝細胞癌で有意に低値を示し、HGF mRNA 発現量は非腫瘍部肝臓と比較して、肝細胞癌で有意に低値を示した。PDGF-B は肝細胞癌において有意に高値を示していたことから、犬の肝細胞癌における血管新生因子として重要である可能性が考えられた。一方、細胞増殖因子について、有意差が認められた因子はいずれも肝細胞癌で低値を示していたことから、今回調べた因子については犬における肝細胞癌の増殖には関わっていない可能性が考えられた。

以上、犬の肝細胞癌において PDGF-B 遺伝子は高発現していたことから、その増殖に関与している可能性が考えられ、ヒトとは異なる細胞増殖シグナルを示している可能性が示唆された。

本研究によって、犬の肝細胞癌の臨床学的特徴を明らかにした。また、犬の肝細胞癌における腫瘍マーカーとして、AFP が有用であることが確認できた。さらに、ICG 蛍光法が術中診断に有効であることを初めて示し、十分に臨床応用が可能であることを明らかにした。最後に、犬の肝細胞癌における分子生物学的特徴を明らかにし、PDGF-B が分子標的となり得る可能性を示した。以上のことから、本研究により犬の肝細胞癌における診断と治療に関して、新たな知見が得られ、小動物臨床に大きく寄与するものと思われた。