

犬の肝細胞癌の診断と治療に関する研究

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻

博士課程

飯田 玄德

2013

略語

AFP; α -fetoprotein α -フェトプロテイン

ALP; Alkaline phosphatase アルカリフォスファターゼ

ALT; Alanine aminotransferase アラニンアミノトランスフェラーゼ

Ang; Angiopoietin アンギオポイエチン

AST; Aspartate aminotransferase アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ

CT; Computed tomography コンピュータ断層撮影

GGT; γ -glutamyl transpeptidase γ -グルタミルトランスフェラーゼ

EGF; Epidermal growth factor 上皮細胞増殖因子

EGFR; Epidermal growth factor receptor 上皮細胞増殖因子受容体

GPC-3; Glypican-3 グリピカン-3

HB-EGF; Heparin-binding EGF-like growth factor ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子

HGF; Hepatocyte growth factor 肝細胞増殖因子

ICG; Indocyanine green インドシアニングリーン

IGF; Insulin-like growth factor インスリン様成長因子

IGFR; Insulin-like growth factor receptor インスリン様成長因子受容体

PDGF; Platelet-derived growth factor 血管壁細胞増殖因子

PDGFR; Platelet-derived growth factor receptor 血管壁細胞増殖因子受容体

TGF; Transforming growth factor 形質転換増殖因子

VEGF; Vascular endothelial growth factor 血管内皮細胞増殖因子

VEGFR; Vascular endothelial growth factor receptor 血管内皮細胞増殖因子受容体

目次

	頁
序	1
第1章 犬の肝細胞癌における回顧的研究	6
1. 緒言	7
2. 材料と方法	8
3. 結果	9
4. 考察	17
5. 小括	21
第2章 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 有用性に関する検討	22
1. 緒言	23
2. 材料と方法	25
3. 結果	31
4. 考察	39
5. 小括	42
第3章 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	44

1. 緒言	45
2. 材料と方法	47
3. 結果	50
4. 考察	58
5. 小括	61
第4章 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	63
1. 緒言	64
2. 材料と方法	67
3. 結果	72
4. 考察	76
5. 小括	80
総括	82
謝辞	91
引用文献	92

序

犬の原発性肝臓腫瘍には肝細胞癌、肝細胞腺腫、胆管癌、胆管腺腫、肝カルチノイド、原発性肉腫（血管肉腫や線維肉腫など）があり、その中でも肝細胞癌の発生が最も多く報告されている[Patnaik *et al.* 1980, Trigo *et al.* 1982, Hammer *et al.* 1995]。犬の肝細胞癌の多くは、単葉に孤立性の腫瘍病変を形成する場合が多い[Patnaik *et al.* 1980]。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[Kosovsky *et al.* 1989, Liptak *et al.* 2004]。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でないと発現しないことが多く、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。また、後大静脈や門脈、肝動脈など脈管系への癒着や圧迫、巻き込みなどが発生している場合もある。したがって、肝臓腫瘍がより早期に発見できれば良好な予後につながるものと考えられる。

医学領域において、バイオマーカーによる肝細胞癌の早期発見、予後予測および最適な治療薬の選択や薬剤の治療効果、副作用発現の有無などの判断を行っている。ヒトの肝細胞癌においても腫瘍マーカーが複数存在しており、なかでも腫瘍胎児性蛋白質である α -フェトプロテイン(α -fetoprotein; AFP)は広く臨床応用されている。AFP は肝細胞癌の早期診断に寄与するばかりでなく、生物学的悪性度や予後予測の指標として意義が明らかにされている[Kobayashi *et al.* 1985, Lazarevich. 2000, Bartlett *et al.* 2011]。さらに、ヒトの cDNA マイクロアレイ解析データ[Okabe *et al.* 2001]を用いて肝細胞癌特異的に高発現する新規癌胎児抗原としてグリピカン-3(glypican-3; GPC-3)が同定された[Nakatsura *et al.* 2003]。GPC-3 は正常な肝細胞と比較して肝癌細胞に高発現しており、成人の正常組織にほとんど発

現していないことに加え、肝細胞癌患者の血清中では可溶性 GPC3 が検出されるのに対して、健常人、慢性肝炎、その他の肝疾患では検出されないことから、新たな腫瘍マーカーとして有用であることが示唆されている[Capurro *et al.* 2003, Nakatsura *et al.* 2003, Hippo *et al.* 2004, Nakatsura and Nishimura. 2005]。同様に、獣医学領域においても、伴侶動物の高齢化に伴って腫瘍の罹患率が増えてきているため、犬においても腫瘍マーカーの確立が望まれている。現時点で、日常的に臨床応用されている犬の肝臓腫瘍を検出するための腫瘍マーカーは確立されていない。犬の肝細胞癌における AFP についてはいくつか報告されているものの[Lowseth *et al.* 1991, Yamada *et al.* 1999, Kitao *et al.* 2006]、その遺伝子発現については調べられておらず、GPC-3 についてもほとんど報告されていない。

肝細胞癌に対する外科的切除を行う上で、癌の浸潤や広がり術中評価は主に肉眼所見に基づいているため、完全切除ができていないか否かについては切除後の病理組織学的検査を待たねばならない。医学領域では、術中超音波検査が臨床応用され、癌の術中評価に役立つと言われているものの、病変の鑑別ができず、確実性に劣るため、新たな術中診断法の確立が望まれていた。近年、インドシアニングリーン (indocyanine green; ICG) の蛍光特性を利用した肝細胞癌の新たな同定法が報告され[Gotoh *et al.* 2009, Ishizawa *et al.* 2009a, 2009b, 2010]、注目を集めている。ICG は血液中の蛋白質と結合し、ほとんどが肝臓に取り込まれたのちに胆汁中に排出され、腸肝循環や腎排泄されない特徴をもつ。さらに、760 nm 前後の励起光によって 830 nm にピークをもつ蛍光を発するという特性も有している [Landsman *et al.* 1976, Mordon *et al.* 1998]。この蛍光は不可視である近赤外光で生体内透過性が高く、近赤外光を観察するカメラ装置で観察可能である。この蛍光特

性を利用した ICG 蛍光法は、分化度の高い肝細胞癌では胆汁産生能を保持するものの胆汁排泄障害があること、癌周囲の肝実質も癌の圧排を受けて胆汁排泄障害をきたす可能性があることから、手術前に ICG を静注することで肝細胞癌の内部あるいは転移巣周囲の肝実質に滞留した ICG を蛍光法で抽出することによって、術中診断が可能となることが報告されている[Gotoh *et al.* 2009, Ishizawa *et al.* 2009a, 2009b, 2010]。しかし、犬における ICG 蛍光法を利用した術中診断の有用性については報告が見当たらず、検討がなされていない。

さらに、近年の分子生物学の進歩により癌の生物学的特性が明らかになるにつれ、癌細胞に特有の分子を標的とした抗腫瘍薬の開発が進められている。癌の進展、増殖にかかわるさまざまなシグナル伝達経路や遺伝子異常、腫瘍による血管新生の機序などが明らかにされており、それらに基づく診断や分子標的治療薬などが開発されている。肝細胞癌においても外部情報の受容と伝達に關与する増殖因子とレセプター、細胞内シグナル伝達や作用に關与する分子が同定され、これらを標的とした分子標的治療薬が注目されている[Shen *et al.* 2010, Cervello *et al.* 2012]。現在、ヒトの肝細胞癌に対して唯一認可を受けた分子標的治療薬である sorafenib (Nexavar[®])の作用は、肝細胞における増殖シグナルとして主要な細胞内シグナル伝達経路のひとつと考えられる Ras-MAPK カスケードの重要なシグナル伝達物質である Raf のセリン・スレオニンキナーゼ活性阻害に加え、c-Kit、VEGFR-1, 2, 3 や PDGFR- β などの受容体型チロシンキナーゼ活性阻害を標的としたマルチキナーゼ阻害薬である。臨床においては SHARP Trial [Llovet *et al.* 2008]、Asia-Pacific Trial [Cheng *et al.* 2009]という 2 つの二重盲検ランダム化比較試験により sorafenib の生存期間延長効果が示され、本邦や欧米において進行性肝細胞癌に

における標準治療薬として確立されている。しかし、犬の肝細胞癌における分子生物学的特徴については未だ不明である。

以上のことから、犬の肝細胞癌における診断と治療法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、腫瘍の発生部位や外科手術手技、予後、生存期間などについて調べた。次いで、第2章では犬の肝臓腫瘍症例における AFP および GPC-3 の遺伝子発現の定量解析、免疫組織化学活性および血漿中濃度を測定して臨床的有用性を検討した。第3章では犬の肝臓腫瘍症例に対して、ICG 蛍光法を用いて腫瘍の摘出を行い、その臨床的有用性について検討した。最後に、第4章では肝細胞癌の分子標的と予想される血管新生因子、増殖因子および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。

第 1 章

犬の肝細胞癌における回顧的研究

1. 緒言

犬の肝臓に腫瘤を形成する病態としては、肝臓腫瘍、結節性過形成、肝嚢胞、肝膿瘍などが挙げられる。肝臓腫瘍は主に原発性と転移性に分類されるが、原発性には肝細胞腺腫、肝細胞癌、胆管腺腫、胆管癌、肝カルチノイド、原発性肉腫（血管肉腫、線維肉腫など）が含まれる。犬では、原発性肝臓腫瘍のうち肝細胞癌の発生が最も多いと報告されている[Patnaik *et al.* 1980, Trigo *et al.* 1982]。

犬の肝臓腫瘍は孤立型、結節型、びまん型の3つの形態に分けられ、孤立型では単一の肝葉に大きな腫瘤が形成され、結節型では複数の肝葉に多数の腫瘤が形成されるのに対し、びまん型では複数の肝葉全域に腫瘍性細胞が浸潤するような形態をとる[Patnaik *et al.* 1980]。犬の肝細胞癌は孤立型の形態をとり、単一の肝葉に発生することが多いとされている[Patnaik *et al.* 1980]。したがって、外科的切除が肝細胞癌治療の第一選択であり、完全切除できた場合には予後は比較的良好であると報告されている[Kosovsky *et al.* 1989, Liptak *et al.* 2004]。

しかし、犬の肝臓腫瘍に関する報告は少なく、肝細胞癌に罹患した犬における疫学について述べた報告も少ない。そこで、本研究では犬の肝細胞癌における臨床的特徴や腫瘍の発生部位、予後などについて解析した。

2. 材料と方法

1) 症例

2002年7月から2013年7月に日本大学生物資源科学部附属動物病院に来院し、腹部超音波検査あるいはコンピュータ断層撮影(Computed tomography; 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とした。

2) 方法

供試犬の医療記録から品種、性別、年齢、体重、臨床症状を調べた。全頭について、血液検査、血液化学検査、胸部および腹部 X 線検査、腹部超音波検査を実施した。また、肝臓の病理組織学検査は腹腔鏡検査あるいは外科手術時に採材したものを供試材料とした。さらに、肝細胞癌の発生部位、外科手術手技、予後や生存期間などについて詳細に調査した。

3) 統計学的解析

年齢、体重、血液検査、血液化学検査に関しては中央値(範囲)で表わした。予後について、生存曲線を Kaplan-Meier 法を用いて、生存期間の中央値を求めた。

3. 結果

対象となった犬は全部で71頭であった。犬種はシー・ズーが14頭(20%)と多く、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%)、ビーグルが5頭(7%)、ヨークシャー・テリアが4頭(6%)、ゴールデン・レトリバーが3頭(4%)、シベリアン・ハスキー、ジャック・ラッセル・テリア、チワワ、マルチーズ、ラブラドル・レトリバーが各2頭(3%)、ジャーマン・シェパード、スタンダード・プードル、フラット・コーテッド・レトリバー、ポインター、ボーダー・コリー、ポメラニアン、ミニチュア・シュナウザーが各1頭(1%)であった(表 1-1)。

性別は避妊雌が28頭(39%)、去勢雄が23頭(32%)、雌が12頭(17%)、雄が8頭(11%)と雌雄差は認められなかった。年齢の中央値は11歳(範囲; 6-15歳)であり、高齢での発生が多い傾向が認められた。体重の中央値は9.3 kg(範囲; 2.25-30.1 kg)であった。

臨床症状は49頭(69%)で認められ、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、下痢は14頭(20%)、腹囲膨満が10頭(14%)、体重減少が8頭(11%)であった(図 1-1)。その他の臨床症状として、発作が4頭(6%)、多飲多尿が3頭(4%)、発熱、血尿、血便が各2頭(3%)、全身の脱毛、ふらつきが各1頭(1%)で観察された。残りの22頭(31%)では臨床症状が認められず、健康診断時や他の疾患での来院時に肝臓腫瘍が発見された。

初診時に血液検査、血液化学検査および血液凝固検査を実施した(表 1-2)。血液検査では、白血球数(WBC)の増加が9頭(12.7%)、赤血球数(RBC)の低下が18頭

(25.4%)、ヘモグロビン濃度(Hb)の低下が 16 頭(22.5%)、ヘマトクリット値(PCV)の低下が 27 頭(38%)で認められた。血小板の増加は 47 頭(66.2%)、血小板の減少は 9 頭(12.7%)でそれぞれ認められた。血液化学検査では、血清アルカリフォスファターゼ濃度(alkaline phosphatase; ALP)の増加が 64 頭(90.1%)、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ濃度(alanine aminotransferase; ALT)の増加が 40 頭(58%)、血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ濃度(aspartate aminotransferase; AST)の増加が 40 頭(57.1%)、血清 γ -グルタミルトランスフェラーゼ濃度(γ -glutamyl transpeptidase; GGT)の増加が 42 頭(61.8%)で認められた。また、血清アルブミン濃度(Alb)の低下は 2 頭(2.8%)、血糖値(Glu)の低下は 8 頭(11.8%)で認められ、血清総ビリルビン濃度(TBil)に異常は認められず、肝機能の低下が認められた症例は少なかった。さらに、血液凝固検査ではプロトロンビン時間(PT)の延長が 27 頭(44.3%)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の延長が 16 頭(26.2%)、血中フィブリノーゲン濃度(Fib)の増加が 13 頭(21.3%)、アンチトロンビン-III (AT-III)活性の増加が 13 頭(21%)で認められた。その他に、血清中フィブリノーゲン・フィブリン分解産物濃度(FDP)の増加が 21 頭(38.2%)、C 反応性蛋白濃度(CRP)の増加が 34 頭(48.6%)で認められた。

腹部 X 線検査、腹部超音波検査および CT 検査にて肝臓腫瘍が検出され、全頭で外科手術を実施した。また、手術時におけるその他の併発疾患として、胆嚢粘液嚢腫が 4 頭(6%)、副腎腫瘍が 3 頭(4%)、胆嚢粘膜過形成、門脈体循環シャント、インスリノーマが各 2 頭(3%)、肝嚢胞、慢性肝炎が各 1 頭(1%)で認められた。

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(表 1-3)。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。単一の大型腫瘍が形成される孤立型は 63 頭(89%)で認められ、7 頭(10%)では孤立型の病変の他に、複数の肝葉に結節性の病変が認められたことから、結節型に分類された。また、残りの 1 頭(1%)では全葉にわたって腫瘍性病変が認められことから、びまん型に分類された。

外科的切除には、完全肝葉切除術が 48 頭(68%)、部分肝葉除術が 18 頭(25%)で行われた。残りの 5 頭(7%)では、外科的切除が不可能であったため、部分的にバイオプシーを実施した。切除した肝葉は 1 葉のみが 44 頭(62%)、2 葉が 21 頭(30%)、3 葉が 1 頭(1%)であった。

予後調査が可能であった 70 症例について、術後生存期間の中央値は外科的切除を行った 65 頭では 770 日であったのに対し、切除不可だった 5 頭では 116 日であった(図 1-2)。術中および術後における周術期の死亡は 8 頭(12%)で認められた。死因は大量の出血によって術中に死亡した症例が 1 頭、術後 1 日目に死亡した症例が 2 頭であった。残りの 5 頭は入院中に死亡した。周術期を乗り越えた症例は 57 頭(88%)であった。また、術後に再発した症例は 7 頭(11%)であった。

表 1-1. 肝細胞癌と診断された犬種別発生頻度

犬種	頭数	割合 (%)
シー・ズー	14	20
雑種	9	13
柴犬	7	10
シェットランド・シープドッグ	6	8
ミニチュア・ダックスフンド	6	8
ビーグル	5	7
ヨークシャー・テリア	4	6
ゴールデン・レトリバー	3	4
シベリアン・ハスキー	2	3
ジャック・ラッセル・テリア	2	3
チワワ	2	3
マルチーズ	2	3
ラブラドル・レトリバー	2	3
ジャーマン・シェパード	1	1
スタンダード・プードル	1	1
フラット・コーテッド・レトリバー	1	1
ポインター	1	1
ボーダー・コリー	1	1
ポメラニアン	1	1
ミニチュア・シュナウザー	1	1

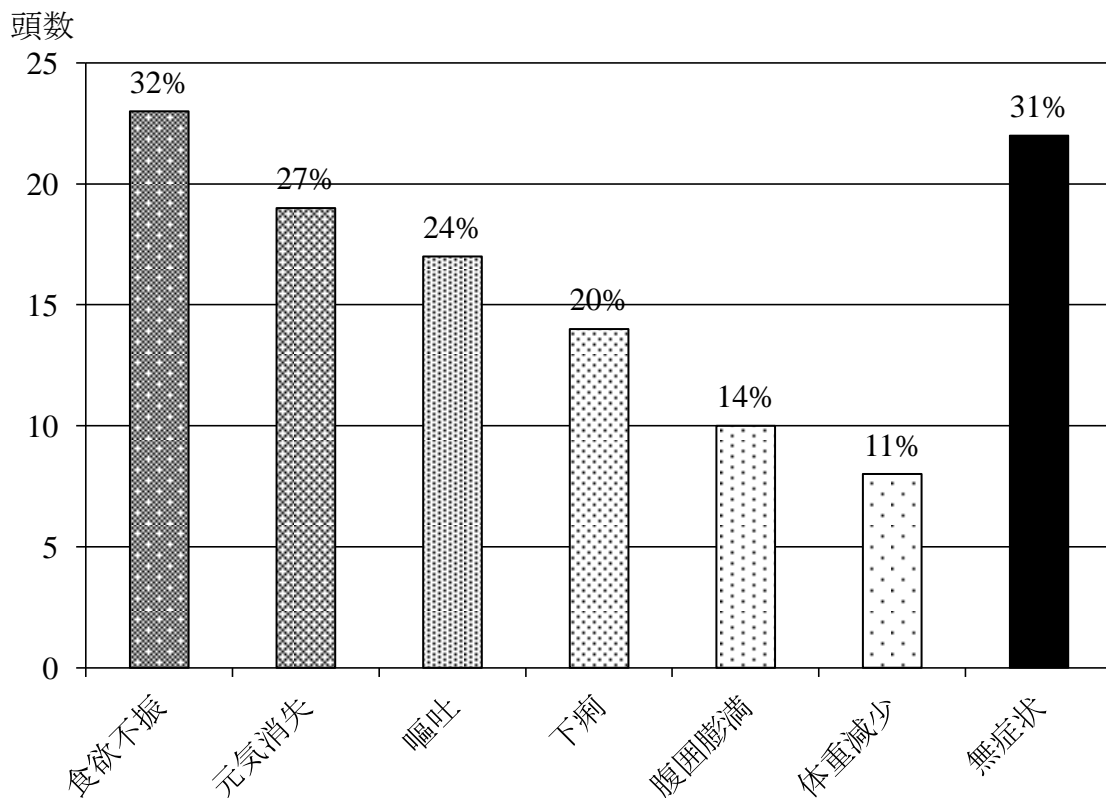


図 1-1. 犬の肝細胞癌症例における臨床症状

表 1-2. 犬の肝細胞癌症例における血液検査、血液化学検査および血液凝固検査結果

項目	中央値	範囲	(正常範囲)	高値症例 (%)	低値症例 (%)	症例数	
WBC	/ μ l	11,000	4,700-50,000	6,000-17,000	12.7	7.0	71
RBC	$\times 10^6$ / μ l	6.18	3.53-8.96	5.5-8.5	2.8	25.4	71
Hb	g/dl	14.3	8.2-18.4	12.0-18.0	4.2	22.5	71
PCV	%	40.0	23-54	37-55	0	38.0	71
Plt	$\times 10^3$ / μ l	538.0	17-1,120	200-400	66.2	12.7	71
ALP	U/l	882.0	56-11,400	23-212	90.1	0	70
ALT	U/l	284.0	32-3,723	10-100	58.0	0	69
AST	U/l	59.0	0-732	0-50	57.1	0	70
GGT	U/l	18.0	0-934	0-7	61.8	0	68
Alb	g/dl	3.4	2.1-4.8	2.2-3.9	5.6	2.8	71
Glu	mg/dl	102.0	29-147	70-143	1.5	11.8	68
TBil	mg/dl	0.1	0-0.6	0-0.9	0	0	55
Glob	g/dl	3.9	1-6.2	2.5-4.5	9.9	2.8	71
TP	g/dl	7.3	4.2-9	5.2-8.2	7.0	1.4	71
PT	sec	7.7	4.6-13.7	6.0-8.0	44.3	8.2	61
APTT	sec	13.9	10-76.9	10.0-16.0	26.2	0	61
Fib	mg/dl	296.0	68.7-631	86-375	21.3	1.6	61
ATIII	%	131.0	69-247	102-156	21.0	8.1	62
FDP	μ g/dl	1.3	2.5-40	0-4	38.2	0	55
CRP	mg/dl	1.0	0-15	0-1	48.6	0	70

表 1-3. 肝細胞癌の発生部位と頻度

部位	頭数	割合 (%)
外側左葉	20	28
内側左葉	11	15
方形葉	7	10
外側右葉	17	24
内側右葉	14	20
尾状葉尾状突起	10	14
尾状葉乳頭突起	5	7

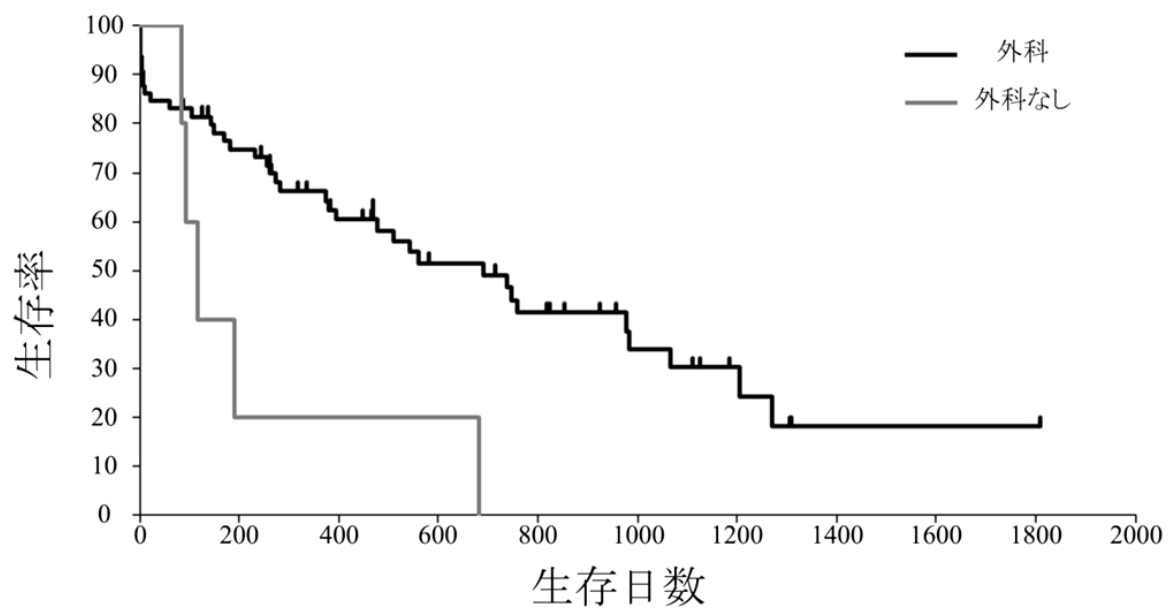


図 1-2. 肝細胞癌犬 70 症例における生存曲線

4. 考察

犬における原発性肝臓腫瘍の発生は全腫瘍の 1.5%以下であり、転移性肝臓腫瘍と比較してまれである[Trigo *et al.* 1982, Hammer *et al.* 1995, Liptak *et al.* 2004]。犬の肝臓原発性腫瘍のなかでは肝細胞癌の発生が最も多く、36.5-50%を占めると報告されている[Patnaik *et al.* 1980, Trigo *et al.* 1982, Hammer *et al.* 1995]。肝細胞癌の好発品種は知られていないが、海外では大型犬種に多いと報告されているもの[Patnaik *et al.* 1980, Liptak *et al.* 2004]、本研究ではシー・ズーに多く発生する傾向が認められた。また、本研究では肝細胞癌患者の体重の中央値は 9.3 kg であったのに対し、以前の報告では 21.6 kg であり[Liptak *et al.* 2004]、本研究では小～中型犬種で多く認められた。この相違は飼育頭数の違いによる可能性があり、欧米では大型犬種の飼育が多く、本邦では小～中型犬種が多く飼育されていることに起因している可能性が考えられた。性別については、以前の報告では若干雄で多く発生する傾向が報告されているものの、統計学的に有意差は認められず[Patnaik *et al.* 1980, Liptak *et al.* 2004]、本研究においても性差は確認されなかった。また、年齢の中央値は 11 歳と比較的高い傾向が認められ、以前の報告[Patnaik *et al.* 1980, Hammer *et al.* 1995, Liptak *et al.* 2004]と同様に高齢動物で多発する傾向が認められた。

臨床症状は約 70%の症例に認められ、非特異的であると報告されている[Liptak *et al.* 2004]。本研究においても、69%の症例で認められ、食欲不振、元気消失、嘔吐、下痢、腹囲膨満、体重減少など非特異的なものが多く、以前の報告[Liptak *et al.* 2004]とほぼ同様の結果であった。一方で、31%の症例については臨床症状を示さ

ず、来院時における身体検査や画像診断などで肝臓腫瘍が発見される症例が多く認められた。

血液検査および血液化学検査所見では、WBC 増加、PCV 減少、血小板増加および血清肝酵素値の顕著な上昇を認めることが多いとされる[Patnaik *et al.* 1980, Liptak *et al.* 2004]。本研究においても、WBC 増加、PCV 減少、血小板増加、ALP 増加、ALT 増加、AST 増加、GGT 増加が認められ、以前の報告[Patnaik *et al.* 1980, Liptak *et al.* 2004]と同様の傾向を示していた。WBC 増加は炎症と腫瘍の巨大化に伴った壊死に起因していると考えられている[Patnaik *et al.* 1980, Kosovsky *et al.* 1989]。貧血は軽度で非再生であると報告されている[Patnaik *et al.* 1980, Liptak *et al.* 2004]が、原因は不明であり、慢性疾患、炎症、赤血球の隔離、鉄欠乏性貧血などが関与していると考えられている[Rogers. 2000]。血小板増加の原因として、貧血、鉄欠乏、炎症性サイトカイン、腫瘍に伴ったトロンボポイエチン生成の影響などが推察されている[Patnaik *et al.* 1980, Liptak *et al.* 2004]。血清肝酵素値の上昇は特に ALP と ALT で認められることが多く[Patnaik *et al.* 1980, Liptak *et al.* 2004]、本研究でも同様の結果が得られたが、血清肝酵素値の上昇は肝細胞の障害または胆汁うっ滞の程度を反映しており、肝臓腫瘍に特異的なものではない。また、肝機能の低下が認められた症例は少なかったことに加え、肝臓が予備能力と再生能力が優れていることから、臨床症状も肝機能低下に起因するものではなく、腫瘍の拡大による胃や腸管など腹部臓器の圧迫、腫瘍の壊死、出血、循環障害などにより引き起こされている可能性が考えられた。

血液凝固時間の延長や特異的凝固因子の異常として、PT および APTT の延長や FDP、Fib の増加が犬の肝臓胆管腫瘍において確認されている[Badylak *et al.* 1983]。

本研究においても、PT および APTT の延長、FDP、Fib および AT-III 活性の増加が認められ、犬の肝細胞癌においては凝固異常に伴う出血にも注意が必要であると考えられた。

肝臓腫瘍の3つの形態のうち、肝細胞癌は孤立型が最も一般的であり、左肝区域での発生が多いと報告されている[Patnaik *et al.* 1980, Kosovsky *et al.* 1989, Liptak *et al.* 2004]。本研究でも孤立型が89%であり、これまでの報告と一致していたものの、外科手術を適応した症例を対象にしたため、偏りが生じている可能性も考えられた。区域別の発生率について、以前の報告[Liptak *et al.* 2004]では左肝区域が68.3%、中央肝区域が19.5%、右肝区域が12.2%と左肝区域での発生が高かった。外側左葉における肝細胞癌の発生率が高い理由としては、左葉は肝容積量が大きいためであると考えられている[Kosovsky *et al.* 1989]。一方、本研究では左肝区域が39%、中央肝区域が27%、右肝区域が35%と区域別発生率に差は認められなかった。これまでの報告は主に米国のデータであったが、本研究では日本における部位別発生頻度を解析したものであり、地域によって差異が生じたのかもしれない。

予後については、外科的切除できた症例で長期生存することが明らかになったものの、複数の肝葉切除を行った症例が31%、切除不可であった症例も7%存在することが明らかになった。また、切除不可であった症例の腫瘍発生部位は外側右葉が3頭、内側左葉が1頭、全葉性のびまん型が1頭であった。さらに、術中および術直後1日目に死亡した3頭はいずれも右肝区域に腫瘍の発生が認められた。右肝区域では後大静脈および肝静脈が肝臓実質の中に埋没しているため、肝切除に際して後大静脈や肝静脈の損傷による大出血、あるいは腫瘍の外科的操作

に伴う後大静脈の牽引による循環動態の変動が生じる危険性がある。また、病変が尾状葉に発生した場合には、解剖学的構造により後大静脈を圧平しやすいことが考えられる。以上の理由から、右肝区域の肝切除は左肝区域と比較すると技術的に困難であり、手術成績が悪くなるものと推察された。

以上、本研究の結果から、犬の肝細胞癌において、無症状でもより早期に発見できた場合には、腫瘍の浸潤も少なく、より安全に手術でき良好な予後につながるものと考えられた。また、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困難な症例も存在することから、外科手術手技や治療法について、さらなる検討の必要があると考えられた。

5. 小括

2002年7月から2013年7月に日本大学生物資源科学部附属動物病院に来院し、腹部超音波検査あるいは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、回顧的研究を行った。

その結果、犬の肝細胞癌は高齢で発症し、31%の症例で無症状であることが明らかになった。腫瘍の発生部位は左肝区域だけでなく、右肝区域にも発生が多いことが明らかになった。また、複数の肝葉切除を行う場合や切除不可であった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になった。

したがって、無症状でも、より早期に発見できた場合には、腫瘍の浸潤も少なく、より安全に手術でき良好な予後につながるものと考えられた。そのため、犬においても早期発見のための腫瘍マーカーが有効であると考えられた。

第2章

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の有用性に関する検討

1. 緒言

第1章により、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な症例も存在することが明らかになったことから、早期発見のための腫瘍マーカーが必要であると考えられた。

医学領域では、ヒトの肝細胞癌における腫瘍マーカーが複数存在している。腫瘍胎児性蛋白である α -フェトプロテイン(AFP)は各種動物の胎生期に認められる蛋白として発見され、その後、肝癌を移植したマウス血中やヒトの肝癌患者血中に認められることが明らかになり、肝細胞癌の診断に利用されるようになった [Kobayashi *et al.* 1985, Lazarevich. 2000, Bartlett *et al.* 2011]。AFP は分子量約 70k、血清の電気泳動による分析で α_1 グロブリン分画に位置する糖蛋白であり、構成しているアミノ酸組成および遺伝子構成はアルブミンに部分的に似ている [Kioussis *et al.* 1981]。産生部位は動物種によって多少異なるが、ヒトにおいては胎生期の卵黄嚢や肝臓で産生される。

また、cDNA マイクロアレイ解析による癌組織と正常組織における遺伝子発現解析により [Okabe *et al.* 2001]、ヒトの肝細胞癌に高発現する新規癌胎児性抗原としてグリピカン-3(GPC-3)が同定された [Nakatsura *et al.* 2003]。GPC-3 は分子量約 60k のコア蛋白質にヘパラン硫酸糖鎖修飾が加わった膜蛋白質であり、ヒトにおいては AFP 同様、胎児期の肝臓組織中で産生されるが出生後発現しなくなる [Grozdanov *et al.* 2006]。しかし、GPC-3 は肝細胞癌において再び発現が認められることに加え、癌患者の血中から検出できることから、新たな腫瘍マーカーとして報告されている [Capurro *et al.* 2003, Nakatsura *et al.* 2003, Hippo *et al.* 2004,

Nakatsura and Nishimura. 2005]。

これまでの犬の肝細胞癌における腫瘍マーカーに関する検討では、犬の AFP について述べた報告はいくつかあるものの[Shinomiya *et al.* 1973, Madsen *et al.* 1980, 1984, Lowseth *et al.* 1991, Yamada *et al.* 1999, Kitao *et al.* 2006]、その遺伝子発現に関しては検討されていない。また、犬の GPC-3 に関する研究は少なく [van Sprundel *et al.* 2010]、肝細胞癌における遺伝子発現や症例の血中濃度を測定した報告は見当たらない。したがって、本研究では、犬の肝臓腫瘍症例から得られた組織における AFP と GPC-3 の遺伝子発現、免疫組織化学活性および各症例における血中濃度を測定し、その有用性について検討した。

2. 材料と方法

1) 症例

2010年3月から2012年7月に日本大学生物資源科学部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21頭を対象とした。21頭の内訳は肝細胞癌症例が17頭、結節性過形成症例が4頭であった。摘出された肝臓腫瘍と付随する非腫瘍部の肝臓を採取し、直ちに裁断して液体窒素にて凍結、 -80°C で保存した。採取した組織は病理組織学的診断の結果から、肝細胞癌17検体、結節性過形成10検体、非腫瘍部の肝組織11検体が得られた。また、各症例から術前、術後に血液サンプルの採材を行った。

2) 対照動物

健常対照犬として、身体検査、血液および血液生化学検査、胸部および腹部X線検査、腹部超音波検査によって健常と確認されたビーグル成犬26頭を用いた。そのうち、22頭からは正常な血液サンプル、4頭からは正常な肝臓を採材した。

肝臓の採材を行った4頭の健常対照犬には、麻酔前処置として橈側皮静脈に22G留置針を設置した。最初に、硫酸アトロピン(0.04 mg/kg)を皮下投与後、塩酸ミダゾラム(0.2 mg/kg)と酒石酸ブトルファノール(0.2 mg/kg)を静脈内投与した。麻酔導入にはプロポフォール(4 mg/kg)を静脈内投与し、気管チューブを挿管した。吸入麻酔にはイソフルラン(1-2%)と酸素(2 L/min)で維持した。

麻酔導入後、腹部正中切開を行って外側左葉に対してギロチン法による肝臓部分切除を行った。得られた肝組織は直ちに裁断して液体窒素にて凍結し、 -80°C

で保存した。その後、イソフルラン(5%)による深麻酔下に維持し、塩化カリウム(40 mEq/head)の静脈内投与にて安楽殺を行った。これらの犬は、日本大学生物資源科学部動物実験指針および手引きに従って管理した。

3) 全 RNA の抽出

得られた組織からの全 RNA の調整には RNA 抽出用試薬 Trizol[®] (Life Technologies Corporation, Tokyo, Japan)を用いた。凍結保存した組織(10 mg) に Trizol[®] 試薬 1 ml を加えてホモジナイズし、クロロホルムを混合後、直ちに激しく攪拌した。次いで、10 分間室温にて静置後、15,000 rpm、4°C 15 分間遠心分離を行い、上清の水層を回収した。これにイソプロパノール 1 ml を混和し、10 分間室温にて静置後、15,000 rpm、4°C 15 分間遠心分離を行い、沈渣を回収した。沈渣は 75%エタノールで洗浄し、風乾後に RNase free water 50 µl にて溶解した。その後、RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Inc, Tokyo, Japan)を用いて RNA 精製処理を行い、吸光度計 (NanoDrop 1000, LMS Co., Ltd., Tokyo, Japan)にて全 RNA の濃度を算出した。

4) 一本鎖 cDNA の合成

抽出された全 RNA は相補的な一本鎖 DNA を合成するために、PrimeScript[®] RT reagent kit with gDNA Eraser (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)を用いて、逆転写反応を行った。氷上にて、全 RNA 500 µg に反応液を加え、37°C 15 分間、85°C 5 秒間にて cDNA 合成した。

5) Real-time RT-PCR 法

犬の AFP と GPC-3 の遺伝子発現を定量解析するために、Real-time RT-PCR 法を用いた。内在性コントロール遺伝子には β -glucuronidase (GUSB)を用いた。

Real-time RT-PCR 法に用いたセンスおよびアンチセンスプライマーは Perfect Real Time Primer Support System (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)を用いて、犬の RefSeq 登録遺伝子に対して設計、合成されたものを使用した(表 2-1)。

Real-time PCR には SYBR[®] Premix ExTM Taq (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)を用いて、Thermal Cycler Dice[®] Real Time System II (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)により実施した。Real-Time PCR の条件は 95°C30 秒間の熱変性を行った後に、95°C5 秒間、60°C30 秒間を 40 サイクル行った。その後、融解曲線分析を行い増幅産物の Tm 値を確認した。定量解析には TaKaRa Multiplate RQ (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)を用いて、 $\Delta\Delta$ Ct 法にて解析した。

6) 免疫組織化学染色

得られた組織のうち、肝細胞癌 14 検体、結節性過形成 4 検体、非腫瘍部の肝臓 10 検体について、10%中性緩衝ホルマリンに 48 時間浸漬固定後、パラフィンによる包埋処理を行った。パラフィンブロックは大型滑走式マイクロトーム(大和光機工業株式会社, 埼玉, 日本)を用いて 5 μ m に薄切後、Hydrophilic Silanized Slide (Dako Japan Ltd, Tokyo, Japan)に組織を貼付させた。

作製した組織切片スライドは脱パラフィン処理後に、Target Retrieval Solution (Dako Japan Ltd, Tokyo, Japan)に浸漬させ、オートクレーブで 121°C15 分間の抗原の賦活化処理を行い、0.3%過酸化水素加メタノール 30 分間室温による内因性ペ

ルオキシターゼ不活化処理を実施した。一次抗体には抗ヒト AFP ウサギポリクローナル抗体 (1 : 10, Shima Laboratories Co., Tokyo, Japan)と抗ヒト GPC-3 マウスモノクローナル抗体 (1: 100, BioMosaics Inc., Burlington, VT)を使用して、4°Cで1晩反応させた。また、陰性対照として、抗体希釈液を使用した。その後、EnVision™+ Dual Link, Single Reagents (Dako Japan Ltd, Tokyo, Japan)を用いて酵素標識ポリマー法を用いて、3,3'-diaminobendine (DAB)によって可視化し、ヘマトキシリンによる核染色を行った。免疫活性は++(強陽性)、+(弱陽性)、-(陰性)と分類し、病理組織学的診断と比較した。

7) AFP および GPC-3 測定

血液サンプルは頸静脈より採血後、ベノジェクト® II 真空採血管 (EDTA-2Na, TERUMO Corporation, Tokyo, Japan)に入れ、4°C、3,500 rpm、10 分間遠心を行い、血漿を分離して検査まで-80°Cにて凍結保存を行った。血漿中 AFP 濃度の測定はラテックス凝集比濁法(Shima Laboratories Co., Tokyo, Japan)を用いて実施した。また、血漿中 GPC-3 濃度の測定は酵素免疫測定法(Usn Life Science Inc., Hubei, China)を用いて実施した。

8) 統計学的分析

各血漿中濃度の値は中央値(四分位数範囲 ; 25-75%値)で表わした。遺伝子発現量および血漿中濃度の比較には Kruskal-Wallis 検定を用い、有意差が認められた場合には Post-hoc test として Dunn's test を用いた。各血漿中濃度の術前、術後の比較には、Wilcoxon の符号付き順位検定を用いた。各 mRNA 発現と血漿中濃度

との相関には、Spearman の順位相関係数による検定を行った。 p 値が 0.05 未満を統計学的に有意差ありと判断した。

表 2-1. Real-Time PCR に用いたプライマー

遺伝子	方向性	塩基配列(5'-3')	Tm 値(°C)	増幅産物(bp)
AFP	Forward	5'-GCCAACTCAGTGAGGACAGACAAC-3'	75.9	114
	Reverse	5'-ACTGGCCGACACCAGGATTTATAG-3'		
GPC-3	Forward	5'-TGGATGTGGATGATGCTCCTG-3'	78.2	126
	Reverse	5'-CGGAGACTGCCAAGCTGGTAA-3'		
GUSB	Forward	5'-ACATCGACGACATCACCGTCA-3'	76.0	90
	Reverse	5'-GGAAGTGTTCACTGCCCTGGA-3'		

Forward: センスプライマー、Reverse: アンチセンスプライマー

3. 結果

1) 遺伝子定量解析

犬の肝癌細胞における AFPmRNA 発現量は、結節性過形成や非腫瘍部の肝臓と比較して、有意に高値を示した(図 2-1)。一方、犬の肝癌細胞における GPC-3mRNA 発現量は非腫瘍部の肝臓と比較して、有意に低値を示した(図 2-1)。

2) 免疫組織化学的検討

犬の肝組織において、AFP および GPC-3 の免疫活性が認められた(図 2-2)。犬の肝組織における免疫組織化学的検討に関して、病理組織学的分類と各免疫活性との関連性を表 2-2 にまとめた。

AFP の免疫活性は細胞質内に認められた。肝細胞癌 14 検体のうち、++を示したものが 9 検体、+が 5 検体であった。結節性過形成 4 検体はすべて+であった。非腫瘍部の肝臓 10 検体のうち、+を示したものが 5 検体、-を示したものが 5 検体であった。

一方、GPC-3 の免疫活性は細胞膜あるいは細胞質内に認められた。肝細胞癌 14 検体のうち、++を示したものが 2 検体、+を示したものが 12 検体であった。結節性過形成 4 検体は++を示したものが 2 検体、+を示したものが 2 検体であった。非腫瘍部の肝臓 10 検体のうち、++を示したものが 8 検体、+を示したものが 2 検体であった。

3) 血漿中 AFP および GPC-3 測定

肝細胞癌犬 17 頭、結節性過形成犬 4 頭と健常犬 22 頭の血漿中濃度を調べたところ、血漿中 AFP 濃度は肝細胞癌犬では 444 ng/ml (42–1358)、結節性過形成犬では 53.5 ng/ml (39.73–90.65)、健常犬では 25 ng/ml (23.25–28)であった。一方、血漿中 GPC-3 濃度は肝細胞癌犬では 0.19 ng/ml (0–0.36)、結節性過形成犬では 0.19 ng/ml (0.11–0.32)、健常犬では 0.25 ng/ml (0.1–0.44)であった。血漿中 AFP 濃度は肝細胞癌犬で健常犬に比較して有意に高値を示したものの、血漿中 GPC-3 濃度は各群で有意差は認められなかった(図 2-3)。

術後に採血できた肝細胞癌犬 10 頭について、術前の血漿中濃度を比較したところ、血漿中 AFP 濃度は有意に低下が認められたのに対し、血漿中 GPC-3 濃度は有意に増加が認められた(図 2-4)。

さらに、AFPmRNA 発現量と血漿中 AFP 濃度は有意な正の相関を示した($r = 0.872$)(図 2-5)。一方、GPC-3mRNA 発現量と血漿中 GPC-3 濃度に有意な相関性は認められなかった(図 2-5)。

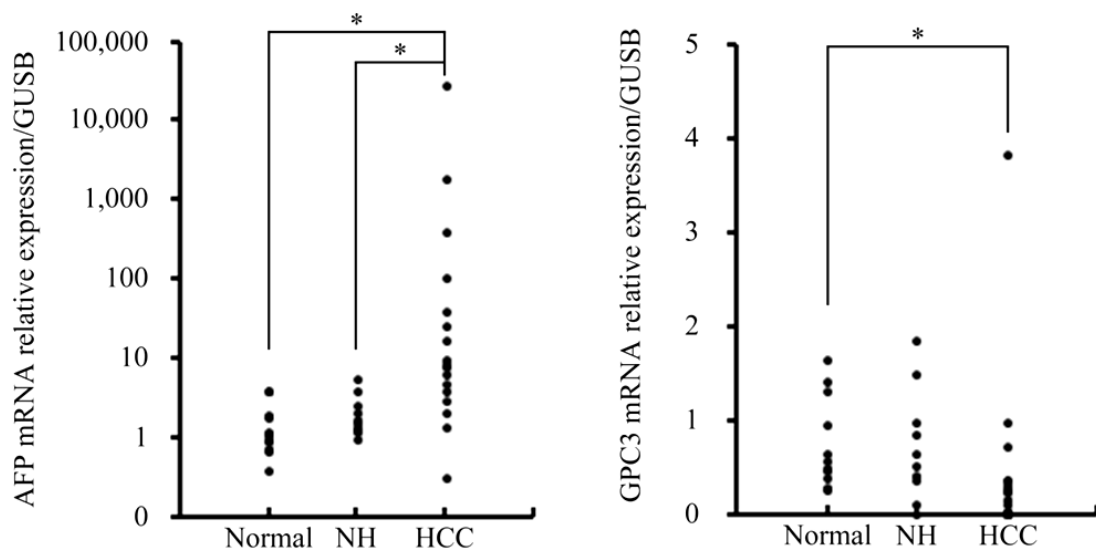


図 2-1. 犬の肝臓腫瘍における AFPmRNA および GPC-3mRNA の遺伝子発現

Normal: 非腫瘍部の肝組織、NH: 結節性過形成、HCC: 肝細胞癌

AFPmRNA 発現量は結節性過形成や非腫瘍部の肝臓と比較して、肝細胞癌で有意に高値を示した。

GPC-3mRNA 発現量は非腫瘍部の肝臓と比較して、肝細胞癌で有意に低値を示した。

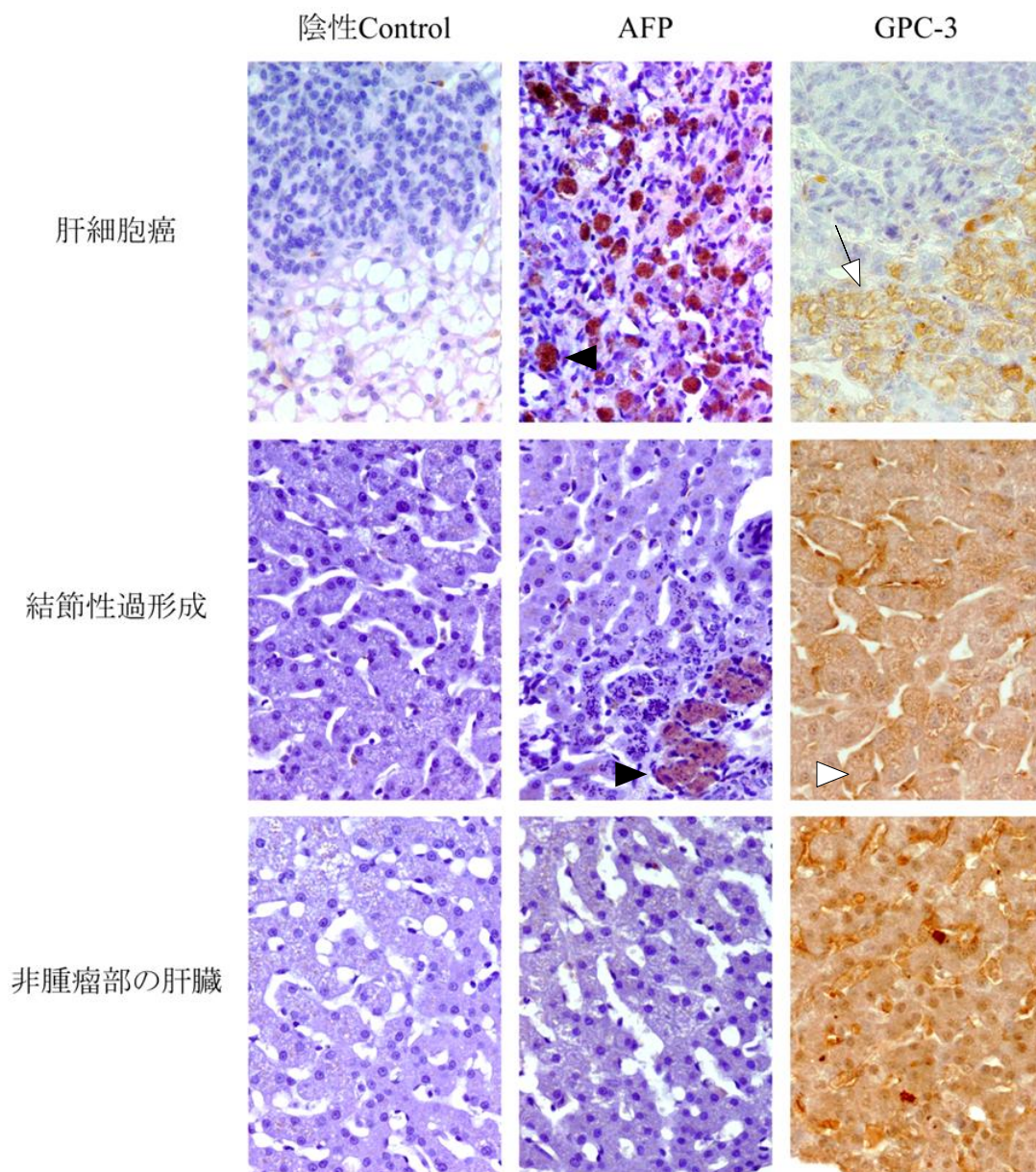


図 2-2. 犬の肝臓腫瘍における AFP および GPC-3 の免疫組織化学染色

AFP の免疫活性は細胞質内（黒矢頭）に認められ、結節性過形成や非腫瘍部の肝臓と比較して、肝細胞癌で強染色性を示した。

GPC-3 の免疫活性は細胞膜（白矢印）あるいは細胞質内（白矢頭）に認められ、肝細胞癌と比較して、結節性過形成や非腫瘍部の肝臓で強染色性を示した。

表 2-2. 犬の肝細胞癌、結節性過形成および非腫瘍部肝臓における免疫活性

肝細胞癌	AFP 免疫活性	GPC-3 免疫活性
++	9	2
+	5	12
-	0	0

結節性過形成	AFP 免疫活性	GPC-3 免疫活性
++	0	2
+	4	2
-	0	0

非腫瘍部の肝臓	AFP 免疫活性	GPC-3 免疫活性
++	0	8
+	5	2
-	5	0

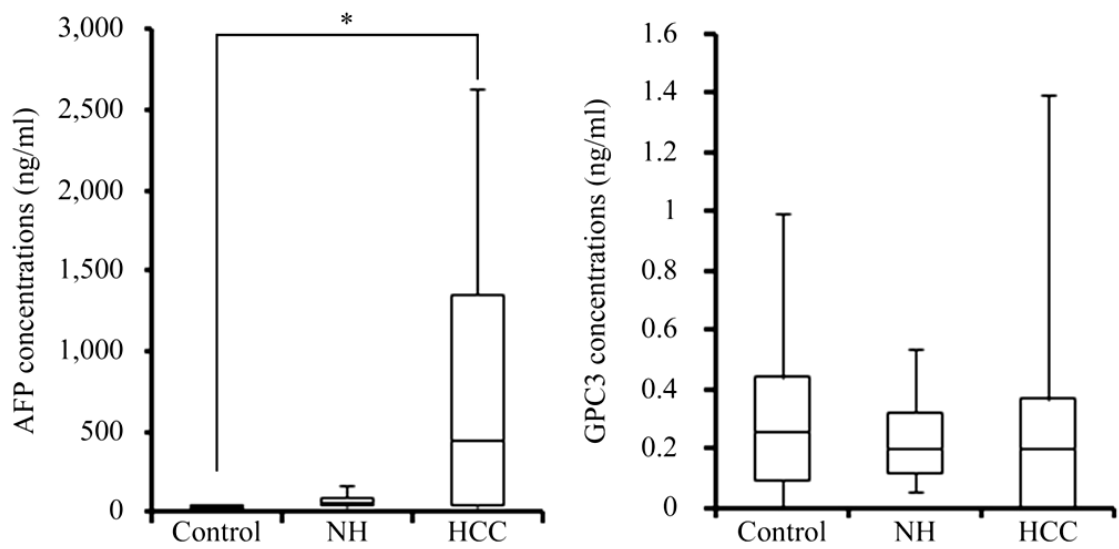


図 2-5. 肝細胞癌犬および結節性過形成犬における術前の血漿中濃度の比較

Control: 健常犬、NH: 結節性過形成犬、HCC: 肝細胞癌犬

血漿中 AFP 濃度は健常犬と比較して、肝細胞癌犬で有意に高値を示した。

血漿中 GPC-3 濃度は各群で有意差は認められなかった。

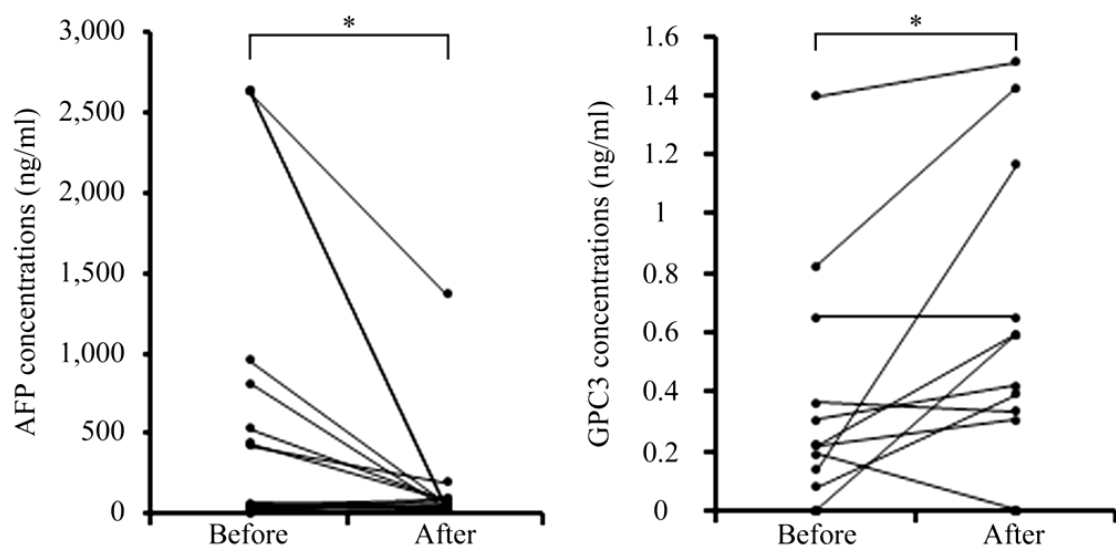


図 2-6. 犬の肝細胞癌症例における術前と術後の血漿中濃度の比較

Before: 術前、After: 術後

血漿中 AFP 濃度は術前と比較して、術後に有意に低下した。

血漿中 GPC-3 濃度は術前と比較して、術後に有意に増加した。

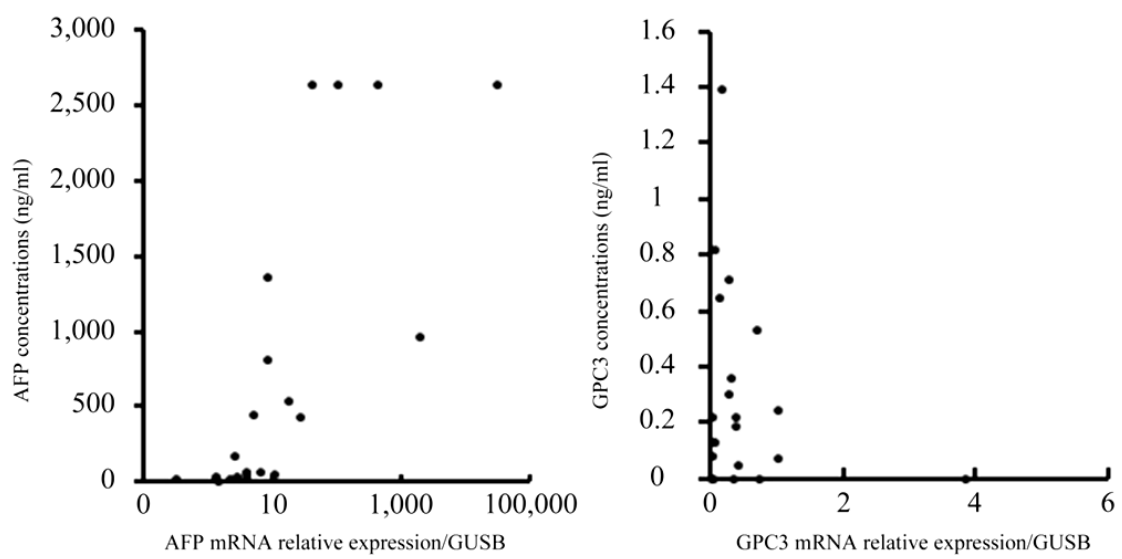


図 2-7. AFP および GPC-3 の遺伝子発現と血漿中濃度との相関性

AFPmRNA 発現量と血漿中 AFP 濃度は有意な正の相関を示した。

GPC-3mRNA 発現量と血漿中 GPC-3 濃度に有意な相関性は認めらなかった。

4. 考察

本研究では、犬の肝臓腫瘍症例における AFP および GPC-3 の遺伝子発現を確認した結果、肝細胞癌において高い AFPmRNA 発現が認められた。一方、肝細胞癌における GPC-3mRNA 発現は非腫瘍部の肝組織と比較して低値を示した。

肝細胞癌の本質的病因に AFP が関与するかについていくつか報告があり、AFP トランスジェニックマウスでは T 細胞の成熟障害や甲状腺炎を起こすものの、肝細胞癌は発症せず[Matsuura *et al.* 1999]、AFP 転写抑制に重要な ZBTB20 の肝細胞特異的ノックアウトマウスでも AFP 発現の脱抑制下では肝細胞は非増殖状態を維持すると報告されている[Xie Z *et al.* 2008]。また、AFP ノックアウトマウスの結果から、AFP は細胞増殖の必要条件ではないことも判明している

[González-Martínez *et al.* 2008]。医学領域では、AFP は細胞増殖に必須ではないものの、肝細胞癌特異的に発現しているという特性を利用して早期診断や予後予測の指標として考えられている。したがって、犬においても肝細胞癌で AFP 遺伝子の高発現が確認できたことで、癌化に伴って発現が高まる可能性が考えられた。

その一方で、ヒトの GPC-3 は肝細胞癌にのみ発現し、前癌病変あるいは正常肝組織では発現が認められないと報告されている[Libbrecht *et al.* 2006, Wang *et al.* 2006, Di Tommaso *et al.* 2007]。また、GPC-3 が Wnt と結合することにより、Wnt シグナルを活性化し、肝細胞癌の増殖を促進することが報告されている[Capurro *et al.* 2005]。しかし、本研究では結節性過形成や非腫瘍部の肝臓でも GPC-3 の発現が認められ、肝細胞癌においては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る可能性が考えられた。GPC-3 はアポトーシスの誘導に関連が

あること [Gonzalez *et al.* 1998]や悪性中皮腫[Murthy *et al.* 2000]、乳癌[Xiang *et al.* 2001]、卵巣癌[Lin *et al.* 1999]、肺腺癌[Powell *et al.* 2002, Kim *et al.* 2003]、胆管癌 [Man *et al.* 2005]などその他の悪性腫瘍では発現が抑制されることも報告されている。

AFP の免疫組織化学的検討では、細胞質に AFP 免疫活性が認められ、これまでの報告と同様の結果となった[Martín de las Mulas *et al.* 1995, Tashbaeva *et al.* 2007]。また、肝細胞癌において強陽性を示す検体が多く認められることから、肝細胞癌において AFP は蛋白質レベルでも発現していることが考えられた。しかし、肝細胞癌においても弱陽性を示す検体が存在し、結節性過形成や非腫瘍部の肝臓において同様の染色性を示す検体が認められることから、肝細胞癌においても AFP の発現が弱い場合や正常な肝臓でも AFP は発現していることが考えられた。

その一方、GPC-3 の免疫組織化学的検討でも、細胞膜および細胞質に GPC-3 免疫活性が認められ、これまでの報告と同様の結果となった[van Sprundel *et al.* 2010]。以前の報告では、犬において一部の肝細胞癌のみ陽性を示した[van Sprundel *et al.* 2010]。しかし、本研究では肝細胞癌において染色性が低下する傾向が認められ、結節性過形成や非腫瘍部の肝臓でも強陽性を示した。このことから、犬の肝臓において GPC-3 は蛋白質レベルでの発現は認められるものの、肝細胞癌では発現が弱まる可能性も考えられた。

血漿中 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、これまでの犬での報告と同様の結果となった[Lowseth *et al.* 1991, Yamada *et al.* 1999, Kitao *et al.* 2006]。また、犬の肝臓における AFP の産生は、障害を受けた肝細胞が修復する過程で上昇することも報告されている[Shinomiya *et al.* 1973, Madsen *et al.*

1980, 1984]。しかし、肝細胞癌摘出後に有意に AFP 濃度が低下することも報告されており [Yamada *et al.* 1999, Kitao *et al.* 2006]、本研究でも同様の結果が得られた。加えて、術後の肝細胞癌再発に伴って上昇することも報告されているため [Yamada *et al.* 1999, Kitao *et al.* 2006]、術後に AFP 濃度を追跡調査することは、治療反応のモニタリングに有用であると考えられた。しかし、血漿中 AFP 濃度は胆管癌やリンパ腫、非腫瘍性肝疾患でも上昇することが報告されていることから [Hahn *et al.* 1995, Yamada *et al.* 1999]、AFP 濃度の検出のみでは肝細胞癌を確定診断できないものと考えられた。

一方、本研究では血漿中 GPC-3 濃度に有意差は認められなかった。ヒトにおいては、肝細胞癌患者の血中に可溶性 GPC-3 が検出され、健常人、慢性肝炎、その他の肝疾患ではほとんど検出されないと報告されている [Capurro *et al.* 2003, Nakatsura *et al.* 2003, Hippo *et al.* 2004, Nakatsura and Nishimura. 2005]。さらに、AFP 同様、肝細胞癌摘出後に GPC-3 濃度は低下すると考えられているが、本研究では健常犬や結節性過形成症例の血漿中でも検出できることに加え、肝細胞癌摘出後には GPC-3 濃度の上昇が認められた。また、遺伝子発現量と血漿中濃度の相関についても、AFP では有意に相関を示したのに対して、GPC-3 では相関性は認められなかった。したがって、犬において GPC-3 は肝細胞癌の発生と関連していない可能性が考えられた。

以上のことから、AFP は犬の肝細胞癌における腫瘍マーカーになり得ることが明らかになった。一方、GPC-3 は犬の肝細胞における腫瘍マーカーとして、適切ではないと判断された。

5. 小括

第1章の結果から、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な症例も存在することが明らかになり、犬においても腫瘍マーカーが必要であると考えられた。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 AFP は広く臨床応用されている。AFP は肝細胞癌の早期診断に寄与するばかりでなく、生物学的悪性度や予後予測の指標として意義が明らかにされている。さらに、ヒトの cDNA マイクロアレイ解析データから肝細胞癌特異的に高発現する新規癌胎児抗原として GPC-3 が同定された。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に、遺伝子定量解析、免疫組織化学活性および血中濃度の解析を行った。

2010年3月から2012年7月に日本大学生物資源科学部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肝細胞癌の犬17症例と結節性過形成の犬4症例を対象に、摘出された肝臓腫瘍と付随する非腫瘍部の肝臓における遺伝子発現解析と免疫組織化学的解析、各症例の術前、術後における血中濃度の測定解析を行った。

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。

以上より、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 は犬の肝細胞癌における腫瘍マーカーとして適切ではないと判断された。

第3章

犬の肝細胞癌における インドシアニンググリーン蛍光法の有用性に関する検討

1. 緒言

第1章の結果から、犬の肝細胞癌は外科的に完全切除できた症例においては、予後が良好であることを明らかにした。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。医学領域において、主に肉眼所見によって腫瘍の位置と浸潤程度を評価するが、最近では術中超音波検査を用いることによってより正確に判断できるようになった。しかし、術中超音波検査を用いたとしても、小型の腫瘍を術中に同定することが困難な場合があり、特に早期肝細胞癌は癌部と非癌部との境界が不明瞭であるため、切除標本を全割しても腫瘍の浸潤範囲を確認できるわけではない。そこで近年、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 [Aoki *et al.* 2008, 2010, Mitsuhashi *et al.* 2008, Harada *et al.* 2010, Tagaya *et al.* 2010]、肝細胞癌や転移性肝腫瘍の同定にも応用され始めてきた [Gotoh *et al.* 2009, Ishizawa *et al.* 2009a, 2009b, 2010]。

ICGは暗緑青色の色素で、肝機能検査や心機能検査で利用される検査薬である。ICGは血液中の蛋白質と結合し、ほとんどが肝臓に取り込まれた後に胆汁中に排出され、腸肝循環や腎排泄されない特徴を持つ。さらに、760 nm前後の励起光によって830 nmにピークをもつ蛍光を発するという特性も有している [Landsman *et al.* 1976, Mordon *et al.* 1998]。この蛍光は不可視である近赤外光で生体内透過性が高く、近赤外光を観察するカメラで撮影することが可能である。この蛍光特性を利用して、血流や組織分布 [Rubens *et al.* 2002, Taggart *et al.* 2003]、リンパ流を観察する方法が乳腺腫瘍 [Motomura *et al.* 1999, Kitai *et al.* 2005]、胃癌 [Nimura *et al.* 2004,

Ishikawa *et al.* 2007]、肺癌[Ito *et al.* 2004, Soltesz *et al.* 2005]、食道癌[Parungo *et al.* 2005]などにおいて応用され、ICG 蛍光法として広まってきた。

しかし、犬においては ICG 蛍光法の有用性に関して研究がなされておらず、臨床応用した報告は見当たらない。そこで、本研究では犬の肝臓腫瘍に対して ICG 蛍光法を応用し、その有用性について検討した。

2. 材料と方法

1) 症例

2011年3月から2012年9月に日本大学生物資源科学部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。すべての症例は身体検査、血液および血液化学検査、胸部および腹部X線検査、腹部超音波検査、CT検査を行い、術中にICG蛍光法を実施した。すべての症例から得られた組織は病理組織学的診断に供した。

2) ICG 蛍光法

手術12~18時間前にICG (Diagnogreen, Daiichi Sankyo Co. Ltd., Tokyo, Japan)を添付の注射用水で5 mg/mlに希釈し、0.5 mg/kgを橈側皮静脈より静脈内投与した。術中では、腹部正中切開後、露出された肝臓に対して肝臓腫瘍を肉眼的に確認した。確認された肝臓腫瘍に対し、外科的切除を行う前に、肝表面を赤外観察カメラにて撮影を行った。撮影時には无影灯を消灯し、肝表面から30~50 cm離れた状態で撮影を行った。蛍光所見に関わらず、外科的切除が適応となった肝臓腫瘍の摘出を行った。さらに、肝臓腫瘍切除後の離断面に関しても同様の撮影を行った。摘出された切除標本に対しては周囲を遮蔽した観察箱にて同様の条件で撮影し、標本断面の比較を行った。

3) 赤外観察カメラ

ICG 蛍光法の近赤外線カラービデオカメラシステムには HyperEye Medical

System (HEMS) (Mizuho Medical Co. Ltd, Tokyo, Japan)を使用した (図 3-1)。ICG が体内血中蛋白質と結合後、近赤外線領域の励起・蛍光波長を有することを利用し、励起光(760~780 nm)の照射および蛍光(800~850 nm)の観察を HEMS にて行った。

4) 病理組織学的所見との比較検討

得られた組織は 10%中性緩衝ホルマリンに 48 時間浸漬固定後、パラフィンによる包埋処理を行った。パラフィンブロックは大型滑走式マイクローム(大和光機工業株式会社, 埼玉, 日本)を用いて 5 μ m に薄切後、Hydrophilic Silanized Slide (Dako Japan Ltd, Tokyo, Japan)に組織を貼付させた。次いで、ヘマトキシリン・エオジン (H-E)染色を行い、病理組織学的所見と蛍光所見との比較検討を行った。

5) 統計学的解析

病理組織学的診断により、肝細胞癌と診断された結節について、ICG 蛍光法による感度と特異度を 2 \times 2 分割表にて数値的検討を行った。

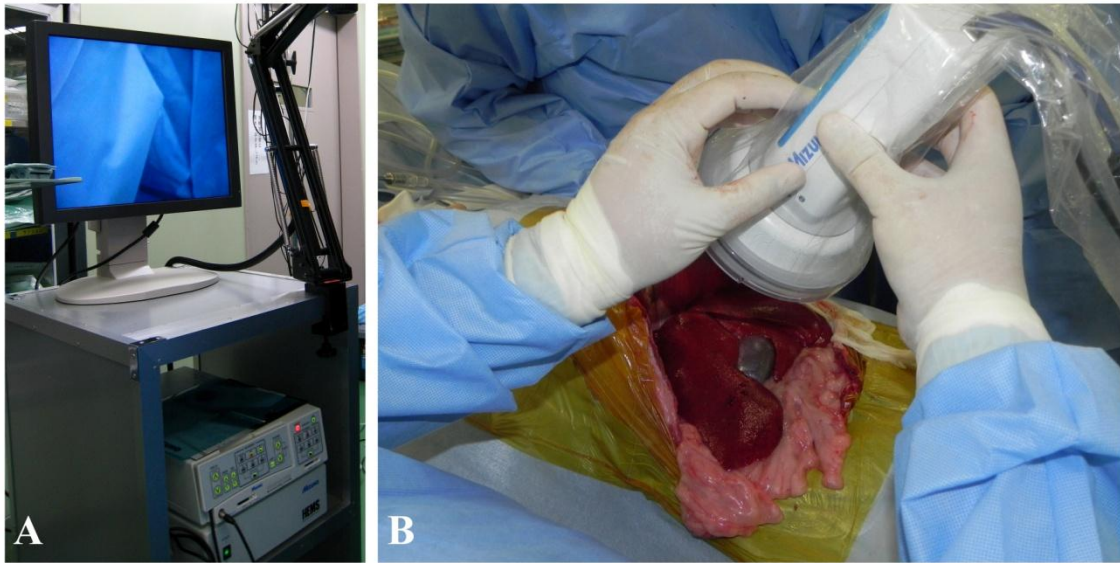


図 3-1. 近赤外線カラービデオカメラシステム(HEMS)と術中写真

A: カメラで捉えた近赤外光をリアルタイムに映し出すモニター

B: 滅菌ドレープを取り付けた LED 装備付 CCD カメラユニット

3. 結果

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(表 3-1)。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(表 3-2)。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(表 3-3, 図 3-2 および 3)。ICG 蛍光法による肝細胞癌同定の感度と特異度はそれぞれ 80%と 71.4%であった。

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(図 3-4)。すべての症例において、肝臓腫瘍切除後の離断面に関して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。

病理組織学的所見との比較検討では、蛍光を示した肝細胞癌では正常な肝実質を圧迫するように腫瘍が形成され、正常な三つ組構造は認められず、肝細胞索の太さや走行は不整であった(図 3-5A)。一方、蛍光を示さなかった肝細胞癌でも正常な三つ組構造は認めらなかったものの、複数の拡張した類洞が確認された(図 3-5B)。また、蛍光を示した結節性過形成では三つ組構造や中心静脈は認められるものの、小葉間構造が不整で肝細胞のびまん性腫大やグリコーゲン蓄積が確認された(図 3-5C)。一方、蛍光を示さなかった結節性過形成では三つ組構造が確認され、小葉間構造は保たれており、肝細胞索も規則的に配列されていた(図 3-5D)。

表 3-1. 本研究に用いた肝臓腫瘍症例

No.	犬種	性別	年齢	体重	腫瘍発生部位	結節数
1	ビーグル	雄	9	17.05	内側右葉、方形葉	2
2	ミニチュア・ダックスフンド	避妊雌	10	7.95	内側右葉、内側左葉	2
3	雑種	避妊雌	9	23.75	外側右葉、尾状葉、外側左葉	4
4	雑種	去勢雄	12	17.3	内側右葉、内側左葉	2
5	ミニチュア・ダックスフンド	避妊雌	14	4.25	外側右葉	1
6	ミニチュア・ダックスフンド	雄	12	6.45	尾状葉乳頭突起	1

表 3-2. 犬の肝細胞癌および結節性過形成における病理組織学的診断と ICG 蛍光所見

No.	結節数	病理組織学的診断		蛍光を示した結節	
		肝細胞癌	結節性過形成	肝細胞癌	結節性過形成
1	2	1	1	1	0
2	2	1	1	1	0
3	4	1	3	1	1
4	2	2	0	1	0
5	1	1	0	0	0
6	1	0	1	0	0

表 3-3. 犬の肝細胞癌および結節性過形成における

結節	ICG 蛍光性	
	蛍光	
	+	-
肝細胞癌	4	2
結節性過形成	1	5

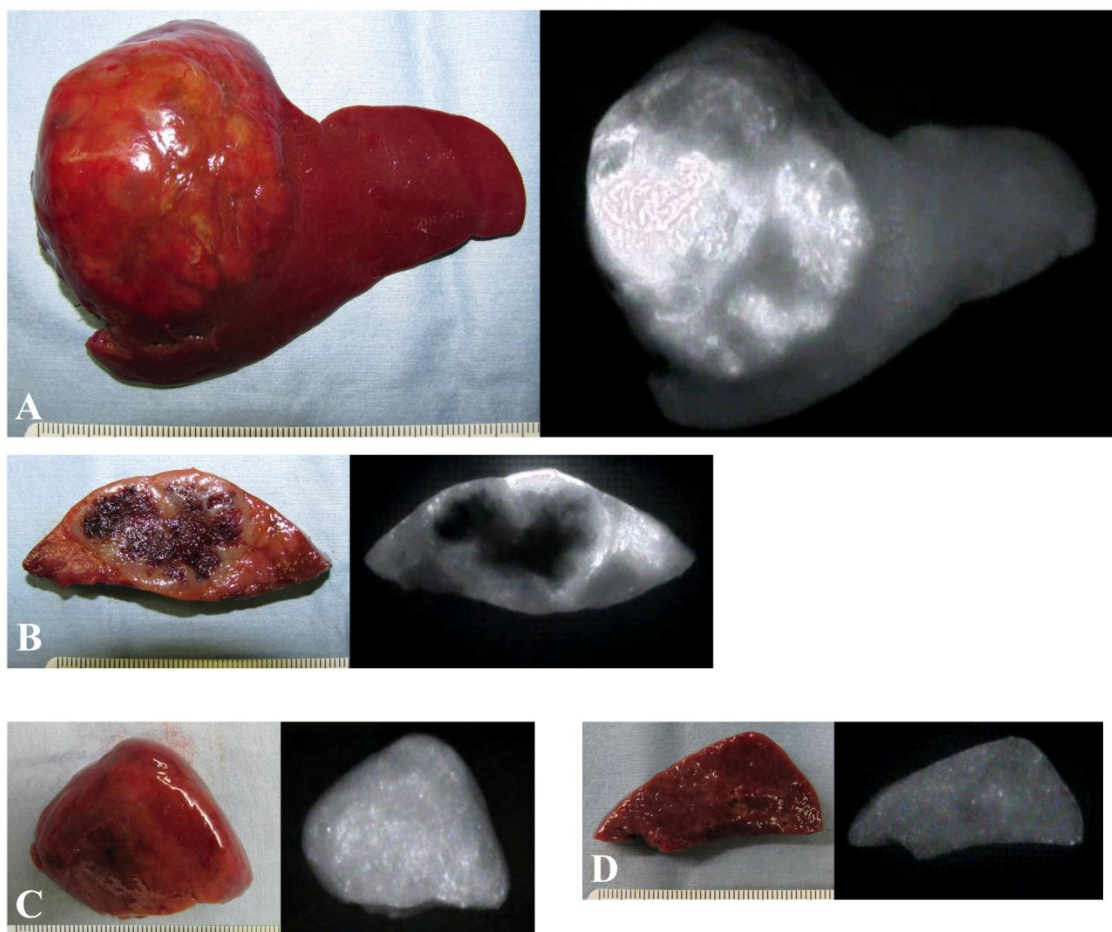


図 3-2. ICG 蛍光法にて蛍光を示した犬の肝臓腫瘍症例(No.2)

- A: 蛍光を示した肝細胞癌の切除標本(内側右葉)の肉眼所見との比較
- B: 内側右葉の標本断面の肉眼所見との比較
- C: 蛍光を示さなかった結節性過形成の切除標本(内側左葉)の肉眼所見との比較
- D: 内側左葉の標本断面の肉眼所見との比較

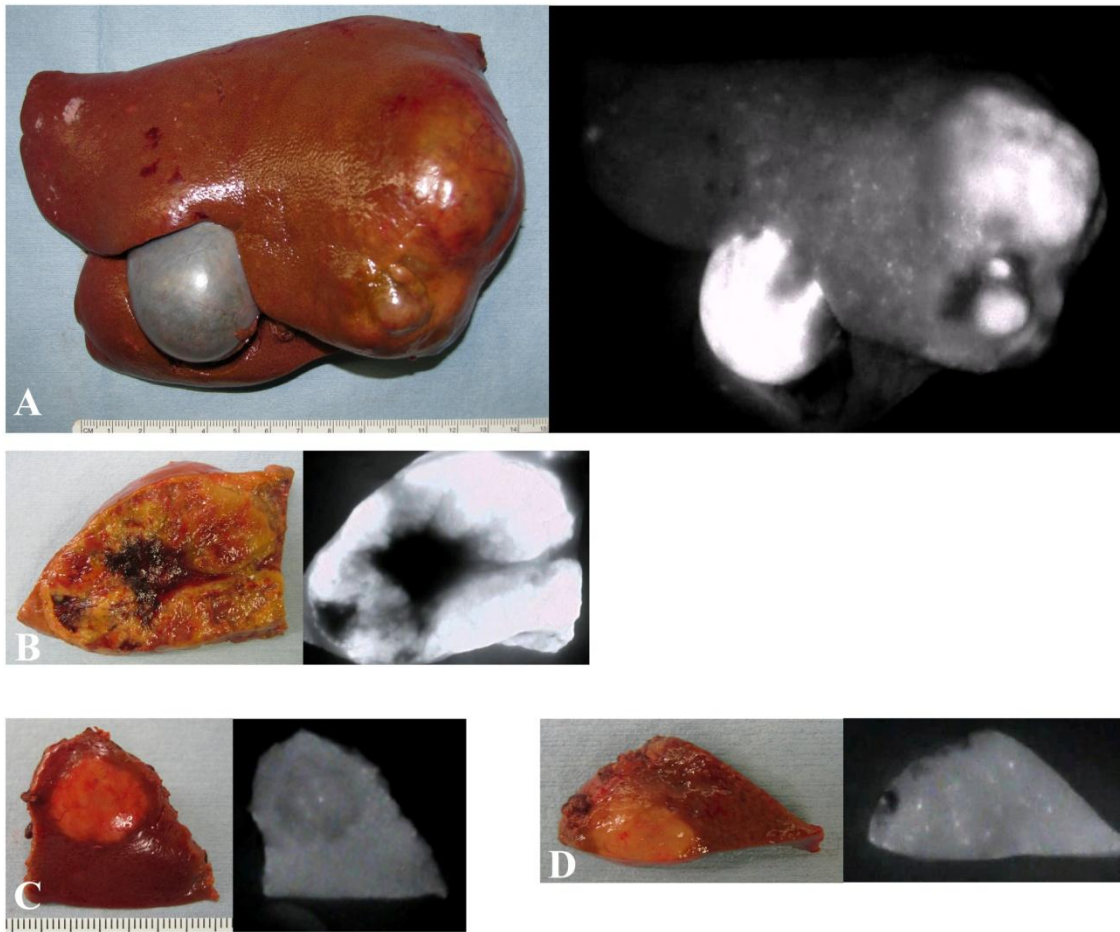


図 3-3. ICG 蛍光法にて蛍光を示した犬の肝臓腫瘍症例(No.4)

- A: 蛍光を示した肝細胞癌の切除標本(内側右葉)の肉眼所見との比較
- B: 内側右葉の標本断面の肉眼所見との比較
- C: 蛍光を示さなかった肝細胞癌の切除標本(内側左葉)の肉眼所見との比較
- D: 内側左葉の標本断面の肉眼所見との比較

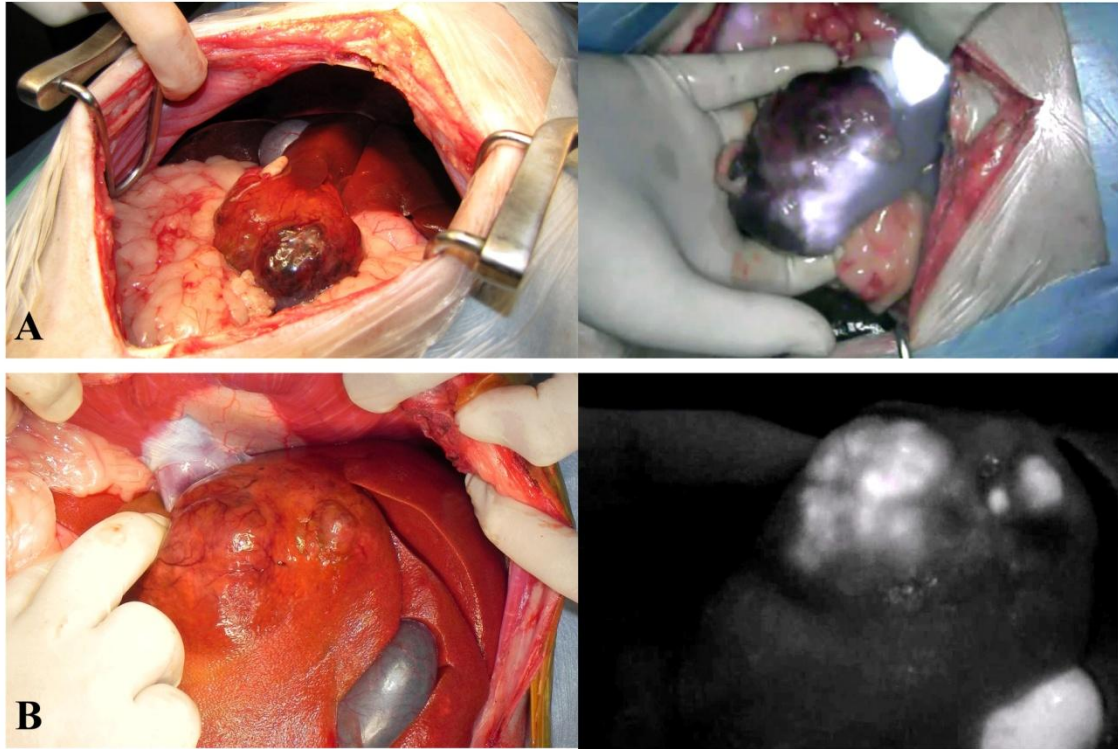


図 3-4. ICG 蛍光法にて外科的切除前に蛍光を示した肝表面

A: 内側右葉に発生した肝細胞癌(No.1)の術中写真と蛍光カラー画像

B: 内側右葉に発生した肝細胞癌(No.4)の術中写真と蛍光モノクロ画像

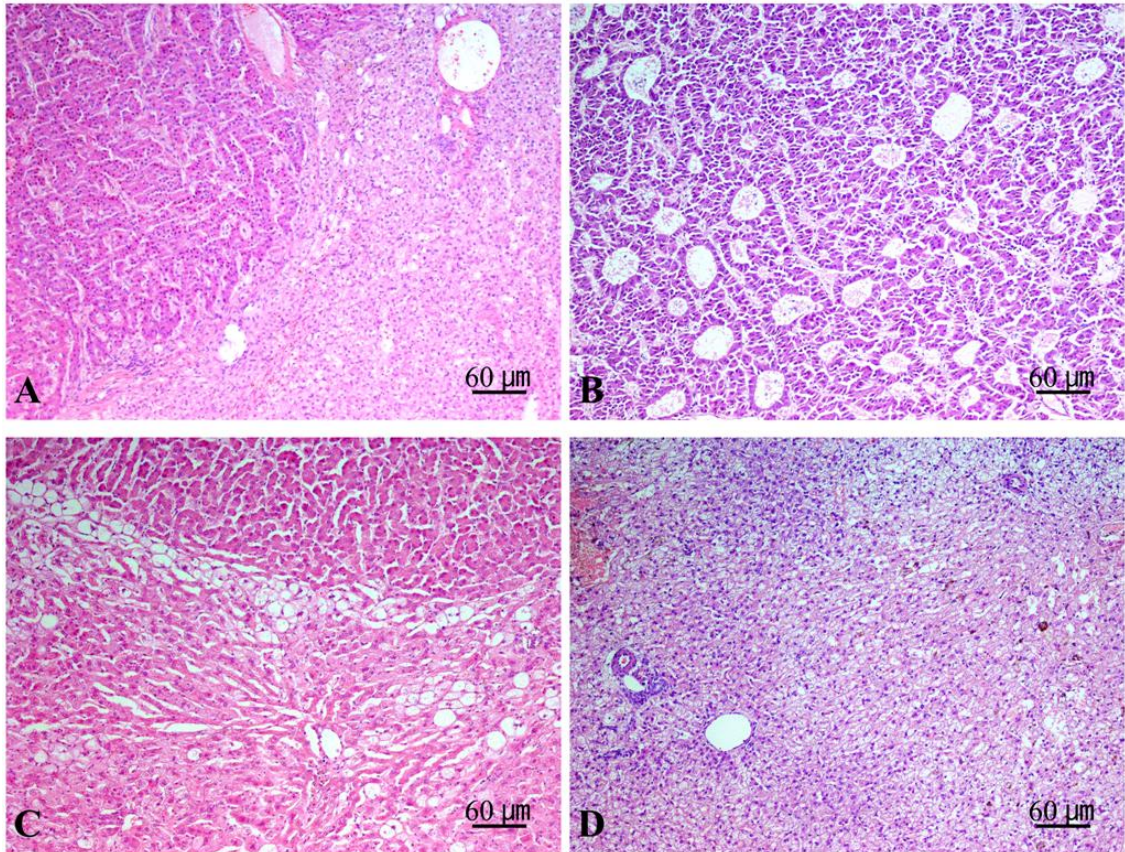


図 3-5. ICG 蛍光法を実施した犬の肝臓腫瘍における病理組織学的所見

A: 蛍光を示した肝細胞癌の H-E 染色像

正常な肝実質を圧迫するように腫瘍が形成され、正常な三つ組構造は認められず、肝細胞索の太さや走行は不整であった。

B: 蛍光を示さなかった肝細胞癌の H-E 染色像

正常な三つ組構造は認められなかったものの、複数の拡張した類洞が確認された。

C: 蛍光を示した結節性過形成の H-E 染色像

三つ組構造や中心静脈は認められるものの、小葉間構造が不整で肝細胞のびまん性腫大やグリコーゲン蓄積が確認された。

D: 蛍光を示さなかった結節性過形成の H-E 染色像

三つ組構造が確認され、小葉間構造は保たれており、肝細胞索も規則的に配列されていた。

4. 考察

本研究では、犬の肝臓腫瘍症例において ICG 蛍光法を実施した結果、肝細胞癌 4 結節が同定可能であった。

医学領域において、肉眼所見での同定が困難とされる早期肝細胞癌のような小型の肝臓腫瘍においても ICG 蛍光法が有用であると報告されている[Gotoh *et al.* 2009, Ishizawa *et al.* 2009a, 2009b, 2010]。さらに、病理組織学的に肝細胞癌と診断されたすべての結節において蛍光所見が得られており、ICG 蛍光法によりはじめて抽出可能であった肝細胞癌も報告されている[Ishizawa *et al.* 2009b]。その一方で、再生性大結節や胆管増生などの良性病変でも蛍光を示す結節の存在が報告されている[Gotoh *et al.* 2009, Ishizawa *et al.* 2009b]。本研究でも、蛍光を示す結節性過形成が存在し、また肝細胞癌でも蛍光を示さない結節が含まれていた。これまでの報告では、分化度の高い肝細胞癌では胆汁産生能を保持するものの胆汁排泄障害があること、癌周囲の肝実質も癌の圧排を受けて胆汁排泄障害をきたす可能性があることから、肝細胞癌の内部あるいは癌周囲の肝実質に滞留した ICG が蛍光法で検出されると考えられている[Ishizawa *et al.* 2009b]。なかでも、分化度と蛍光所見についての検討では、低分化の肝細胞癌では癌組織自体は蛍光を示しておらず、腫瘍に圧排された正常肝実質に胆汁排泄障害が起こることで蛍光所見を示すと考えられている[Ishizawa *et al.* 2009b]。本研究における病理組織学的診断との比較検討では、蛍光を示した肝細胞癌では正常な実質が圧迫されるように腫瘍が形成されて三つ組構造が認められなかったことから、胆汁排泄障害が起きている可能性が考えられた。一方、蛍光を示さなかった肝細胞癌でも三つ組構造は認められな

かったものの、複数の拡張した類洞が存在することで胆汁排泄経路が保たれている可能性が考えられたことから、蛍光を示さなかったものと思われた。また、蛍光を示した結節性過形成についても小葉間構造の不整や肝細胞の変性が認められたことから、胆汁排泄障害が起きることで蛍光を示している可能性が考えられた。この ICG 蛍光法により蛍光所見が得られる機序についてはまだ不明な点が多く、ICG 蛍光法のみで新規に発見された病変を追加で切除することについては慎重を期す必要があると思われた。しかし、術前に画像診断が得られている病変の位置を術中に正確に把握することや切除標本の肉眼的な評価を補助することには有効であると思われた。さらには、肝切除後の離断面を蛍光法で観察することにより癌の残存を同定できることも報告されている[Ishizawa *et al.* 2009b]。本研究では肝臓腫瘍切除後の離断面の観察を行ったところ、すべての症例で蛍光を示していなかったことから腫瘍の取り残しがないことが確認できた。このことから、ICG 蛍光法は病変が確実に切除されたことを術中に確認することができ、手術の正確性向上に寄与するものと考えられた。

その他の肝臓腫瘍や投与経路、投与量についても議論されており、胆管腫瘍の浸潤や胆管の塞栓により胆汁うっ滞を起こしている肝区域が ICG 蛍光法で同定され、また胆管癌は蛍光を示さないことが報告されている[Harada *et al.* 2010]。別の投与経路として、術中に肝臓への血行遮断下にて、切除予定の門脈枝に ICG を局注した 1 分後に蛍光観察を行ったところ、肝細胞癌が蛍光を示さなかったことも報告されている[Aoki *et al.* 2008]。ヒトにおいて、ICG は肝機能検査に利用される検査薬であることから、肝細胞癌患者には手術前日～1 週間前に投与されることが多い。ICG 蛍光法による正常肝実質の蛍光強度は、ICG の排泄能が悪い患者、

術前 24 時間以内に投与された患者で蛍光強度が強いと報告されており、肝硬変患者を除いては手術 2 日以上前に ICG を投与することでより良いコントラストが得られることも報告されている [Ishizawa *et al.* 2009b]。本研究では術前 12~18 時間に ICG を静脈内投与していたが、投与時期や投与経路についてさらなる検討が必要であると思われた。また、投与量について、肝機能検査の推奨量とされる 0.5 mg/kg の約 1/10 量以下でも十分な蛍光観察が可能であることが報告されている [Mitsubishi *et al.* 2008]。一方で、ICG は重篤な副作用が約 0.003% に発症することも報告されており [Cherrick *et al.* 1960]、投与量についてもより詳細な検討が必要であると思われた。

以上のことから、犬においても ICG 蛍光法により肝細胞癌が検出可能であることが明らかになった。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。ICG 蛍光法は肝臓に存在する胆汁排泄障害を画像化しているものと推察された。今後はさらに例数を重ね、遺伝子発現解析などの手法を用いて、肝細胞癌および結節性過形成に存在する胆汁排泄障害の原因や蛍光パターンとの関連について検討する必要があると思われた。

5. 小括

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、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なく、検討がなされていない。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。

2011年3月から2012年9月に日本大学生物資源科学部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0.5 mg/kgで静注した。開腹下にて、肝表面および肝離断面を赤外線観察カメラにて撮影を行い、切除標本に対しても同様の条件にて撮影し、標本割面の観察を行った。さらに、病理組織学的診断と蛍光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。

以上より、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。

第4章

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

1. 緒言

第1章の結果から、犬の肝細胞癌は腫瘍の大きさや発生部位により、複数の肝臓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。そのような症例では、治療を断念して経過観察を余儀なくされることがある。

近年、分子生物学の進歩により癌の生物学的特性が明らかになるにつれ、癌細胞に特有の分子を標的とした抗腫瘍薬の開発が進められている。医学領域では、癌の進展、増殖にかかわるさまざまなシグナル伝達経路や遺伝子異常、腫瘍による血管新生の機序などが明らかにされており、それらに基づく診断や分子標的治療薬などの開発も進歩している。ヒトの肝細胞癌においても外部情報の受容と伝達に關与する増殖因子とレセプター、細胞内シグナル伝達や作用に關与する分子が同定され、これらを標的とした分子標的治療薬が注目されている[Shen *et al.* 2010, Cervello *et al.* 2012]。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(vascular endothelial growth factor; VEGF)、血管壁細胞増殖因子(platelet-derived growth factor; PDGF)が重要とされ、VEGF/VEGF受容体(VEGF receptor; VEGFR)シグナルとPDGF/PDGF受容体(PDGF receptor; PDGFR)シグナルが相乗的に作用することも報告されている[Kuhnert *et al.* 2008]。また、肝細胞癌血管新生因子としてアンギオポイエチン(Angiopoietin; Ang)/Tie2 (tyrosine kinases with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains 2)シグナルが知られている[Tanaka *et al.* 2002]。さらに、増殖因子とレセプターとして、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(epidermal growth factor; EGF)/EGF受容体(EGF receptor; EGFR)

シグナル、インスリン様成長因子(insulin-like growth factor; IGF)/IGF 受容体(IGF receptor; IGF-R)シグナル、肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor; HGF)/ MET シグナルが挙げられる[Shen *et al.* 2010, Cervello *et al.* 2012]。EGFR のリガンドにはさらに形質転換増殖因子(transforming growth factor- α ; TGF- α)やヘパリン結合性 EGF 様増殖因子(heparin-binding EGF-like growth factor; HB-EGF)が知られており、いずれもリガンド結合による二量体形成を伴って細胞内チロシンキナーゼの活性化が起こるとされる。このような増殖因子レセプターのシグナルは、自己リン酸化により細胞内シグナル伝達経路が開始される。主要となるシグナル伝達経路には、Ras-MAPK カスケードと PI3K-Akt カスケードの 2 通りがあり、これらが活性化されることにより肝細胞増殖に必要な転写の促進や抗アポトーシス作用を生じるとされている。

現在、ヒトの肝細胞癌に対して唯一認可を受けた分子標的治療薬である sorafenib (Nexavar[®])の作用は、前述した Ras-MAPK カスケードの重要なシグナル伝達物質である Raf のセリン・スレオニンキナーゼ活性阻害に加え、c-Kit、VEGFR-1, 2, 3 や PDGFR- β などの受容体型チロシンキナーゼ活性阻害を標的としたマルチキナーゼ阻害薬である。臨床においては SHARP Trial [Llovet *et al.* 2008]、Asia-Pacific Trial [Cheng *et al.* 2009]という二つの二重盲検ランダム化比較試験により sorafenib の生存期間延長効果が示され、本邦や欧米において進行性肝細胞癌における標準治療薬として確立されている。

一方、獣医学領域では肥満細胞腫に対する分子標的薬として imatinib (Glivec[®])の報告はあるものの、肝細胞癌に対する報告は見当たらず、その分子生物学的特徴も未だ不明である。そこで本研究では、肝細胞癌の分子標的と予想される血管

新生因子、増殖因子やそれらのレセプターを含めた 17 遺伝子を選択し、その発現を定量解析することにより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。

2. 材料と方法

1) 症例

2010年3月から2012年7月に日本大学生物資源科学部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22頭を対象とした。22頭の内訳は肝細胞癌症例が18頭、結節性過形成症例が4頭であった。摘出された肝臓腫瘍と付随する非腫瘍部の肝臓を採取し、直ちに裁断して液体窒素にて凍結、 -80°C で保存した。採取した組織は病理組織学的診断の結果から、肝細胞癌18検体、結節性過形成10検体、非腫瘍部の肝組織11検体が得られた(表4-1)。

2) 対照動物

健常対照犬として、身体検査、血液および血液化学検査、胸部および腹部X線検査、腹部超音波検査によって健常と確認されたビーグル成犬4頭を用い、コントロールとして正常な肝臓を採材した。

肝臓の採材を行った4頭の健常対照犬には、麻酔前処置として橈側皮静脈に22G留置針を設置した。最初に、硫酸アトロピン(0.04 mg/kg)を皮下投与後、塩酸ミダゾラム(0.2 mg/kg)と酒石酸ブトルファノール(0.2 mg/kg)を静脈内投与した。麻酔導入にはプロポフォール(4 mg/kg)を静脈内投与し、気管チューブを挿管した。吸入麻酔にはイソフルラン(1-2%)と酸素(2 L/min)で維持した。次いで、腹部正中切開後、外側左葉に対してギロチン法による肝臓部分切除を行った。得られた肝組織は直ちに裁断して液体窒素にて凍結し、 -80°C で保存した。その後、イソフルラン(5%)による深麻酔下に維持し、塩化カリウム(40 mEq/head)の静脈内投与に

て安楽殺を行った。これらの犬は、日本大学生物資源科学部動物実験指針および手引きに従って管理した。

3) 全 RNA の抽出

得られた組織からの全 RNA の調整には RNA 抽出用試薬 Trizol[®] (Life Technologies Corporation, Tokyo, Japan)を用いた。凍結保存した組織(10 mg) に Trizol[®] 試薬 1 ml を加えてホモジナイズし、クロロホルムを混合後、直ちに激しく攪拌した。次いで、10 分間室温にて静置後、15,000 rpm、4°C 15 分間遠心分離を行い、上清の水層を回収した。これにイソプロパノール 1 ml を混和し、10 分間室温にて静置後、15,000 rpm、4°C 15 分間遠心分離を行い、沈渣を回収した。沈渣は 75%エタノールで洗浄し、風乾後に RNase free water 50 μ l にて溶解した。その後、RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Inc, Tokyo, Japan)を用いて RNA 精製処理を行い、吸光光度計 (NanoDrop 1000, LMS Co., Ltd., Tokyo, Japan)にて全 RNA の濃度を算出した。

4) 一本鎖 cDNA の合成

抽出された全 RNA は相補的な一本鎖 DNA を合成するために、PrimeScript[®] RT reagent kit with gDNA Eraser (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)を用いて、逆転写反応を行った。氷上にて、全 RNA 500 μ g に反応液を加え、37°C 15 分間、85°C 5 秒間にて cDNA 合成した。

5) Real-time RT-PCR 法

選択した 17 遺伝子の発現を定量解析するために、Real-time RT-PCR 法を用いた。内在性コントロール遺伝子には TATA-box binding protein (TBP) と β -glucuronidase (GUSB) を用いた。Real-time RT-PCR 法に用いたセンスおよびアンチセンスプライマーは Perfect Real Time Primer Support System (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて、犬の RefSeq 登録遺伝子に対して設計、合成されたものを使用した(表 4-2)。

Real-time PCR には SYBR[®] Premix Ex[™] Taq (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて、Thermal Cycler Dice[®] Real Time System II (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) により実施した。Real-Time PCR の条件は 95°C 30 秒間の熱変性を行った後に、95°C 5 秒間、60°C 30 秒間を 40 サイクル行った。その後、融解曲線分析を行い増幅産物の T_m 値を確認した。定量解析には TaKaRa Multiplate RQ (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて、 $\Delta\Delta C_t$ 法にて解析した。

8) 統計学的分析

遺伝子発現量の比較には、Kruska-Wallis 検定を用いて Post-hoc test として Dunn's test を用いた。p 値が 0.05 未満を統計学的に有意差ありと判断した。

表 4-1. 本研究に用いた肝臓腫瘍症例

No.	犬種	性別	年齢	体重	病理組織学的診断		非腫瘍部 肝臓
					肝細胞癌	結節性過形成	
1	チワワ	去勢雄	10	7.15	1	0	1
2	雑種	去勢雄	11	24.2	1	0	1
3	柴犬	雄	12	11.76	1	1	0
4	シベリアン・ハスキー	避妊雌	13	19.45	1	0	1
5	ゴールデン・レトリバー	避妊雌	11	30.1	1	0	0
6	ビーグル	避妊雌	10	8.35	1	1	0
7	柴犬	雄	13	13.7	1	0	1
8	柴犬	避妊雌	11	8	1	1	0
9	雑種	避妊雌	13	13.74	1	1	0
10	シェットランド・シープドッグ	雌	14	13	1	0	1
11	ミニチュア・ダックスフンド	避妊雌	10	5.94	1	0	1
12	シー・ズー	雌	13	4.62	1	0	1
13	シー・ズー	避妊雌	11	7.02	1	0	1
14	ヨークシャー・テリア	避妊雌	12	2.9	1	0	1
15	ウェルシュ・コーギー	雌	10	12	1	1	0
16	ラブラドル・レトリバー	雌	10	27.58	1	0	1
17	ビーグル	雄	9	17.05	1	1	0
18	シー・ズー	去勢雄	10	8.15	1	0	1
19	トイ・プードル	雌	7	4.64	0	1	1
20	雑種	避妊雌	13	12.4	0	1	1
21	ミニチュア・ダックスフンド	去勢雄	12	6.45	0	1	0
22	雑種	避妊雌	13	6.45	0	1	0

表4-2. Real-Time PCRに用いたプライマー

遺伝子	方向性	塩基配列(5'-3')	Tm値 (°C)	増幅産物 (bp)
GUSB	Forward	5'-ACATCGACGACATCACCGTCA-3'	76	90
	Reverse	5'-GGAAGTGTTCACTGCCCTGGA-3'		
TBP	Forward	5'-ATGGTGTGTACGGGAGCCAAG-3'	76	184
	Reverse	5'-ACTGTTGGTGGGTCAGCACAAG-3'		
VEGF-A	Forward	5'-TCAGGACACTGCTGTACTTTGAGG-3'	79.1	133
	Reverse	5'-GGCTTGTCAGGAGCAAGTGAA-3'		
VEGFR-1	Forward	5'-CACCTGGGCTGAGAGCAAAC-3'	77.2	117
	Reverse	5'-CCACACCTGGAATGGCAGAA-3'		
VEGFR-2	Forward	5'-CTTGGACAGCATCACCAAGTAGTCAG-3'	75	131
	Reverse	5'-TGAGATGCTCCAAGGTCAGGAA-3'		
VEGFR-3	Forward	5'-GGATGGAGTTCCTGGCCTCA-3'	77.9	142
	Reverse	5'-TTTCGCACATAGTCAGGGTCTTTG-3'		
PDGF-B	Forward	5'-TACGAGATGCTGAGCGACCAC-3'	79.1	112
	Reverse	5'-ATCGGGTCAAATTCAGGTCCAA-3'		
PDGFR-β	Forward	5'-TGAGGGCAAGCTGGTCAAGA-3'	77.7	155
	Reverse	5'-ACACGTCGCTCAGGGTGGTA-3'		
EGF	Forward	5'-CTATGGCCCTCAAGGATGGTG-3'	75.1	125
	Reverse	5'-GCAGCCTTGCTCTGTGTCTTA-3'		
TGF-α	Forward	5'-GTGGTGTCCCACTTCAACGACT-3'	77	85
	Reverse	5'-TGTCCTCCTGCACCAGAAACC-3'		
HB-EGF	Forward	5'-GCTCTGGCCACACCCAGTAA-3'	75.3	113
	Reverse	5'-CCATGGATGCAGAAGTCCTTGTA-3'		
EGFR	Forward	5'-TGCATTTGCCAAGCCCTACA-3'	75.1	90
	Reverse	5'-GGTACTCGTCAGCATCCACAACA-3'		
HGF	Forward	5'-GGCTACTGCTCCCAAATTC-3'	71.9	124
	Reverse	5'-CCCACATTGAACATGTTAGTCCAGA-3'		
MET	Forward	5'-ACCAGTGAAGTGGATGGCTTTAGAA-3'	75.5	135
	Reverse	5'-AAGGTGTTGACGTCAGGATAAGGTG-3'		
IGF1	Forward	5'-GATAGAGCCTGCGCAATGGAA-3'	71.3	120
	Reverse	5'-CTGGAAATGAATTGGTTAGCAGGAA-3'		
IGF1R	Forward	5'-ATGGTGGCCGAAGATTCACA-3'	75.1	120
	Reverse	5'-AGGTGACATCCAGCGCACAG-3'		
IGF2R	Forward	5'-CACAGTGCCTGACTTACGGAAAC-3'	76.2	84
	Reverse	5'-CCAGAGCAGGAATCCCAAGTG-3'		
Ang-2	Forward	5'-TGGGTGGACGGTCATTCAG-3'	74.7	106
	Reverse	5'-CAGCCAGTGTTCCGAGAAAG-3'		
Tie2	Forward	5'-GCGGGAATGACTTGCCTGA-3'	76.9	146
	Reverse	5'-AGGGCCAGAGTTCCTGAGTTGA-3'		

Forward: センスプライマー、Revers: アンチセンスプライマー

3. 結果

犬の肝癌細胞において、正常肝臓、非腫瘍部肝臓および結節性過形成と比較した結果、5つの遺伝子で有意差が認められた。PDGF-B 遺伝子は正常肝臓と比較して、肝細胞癌で有意に高値を示した(図 4-1)。一方、TGF- α 遺伝子と EGFR 遺伝子では有意に低値を示した(図 4-2 および 3)。また、EGF 遺伝子は結節性過形成と比較して、有意に低値を示した(図 4-4)。さらに、HGF 遺伝子では非腫瘍部肝臓と比較して、有意に低値を示した(図 4-5)。

加えて、有意差は認められなかったものの、Ang-2 遺伝子は肝細胞癌で高発現傾向が認められ、また正常肝臓と比較し、非腫瘍部肝臓でも中央値で 5 倍以上の高発現を示した(図 4-5)。

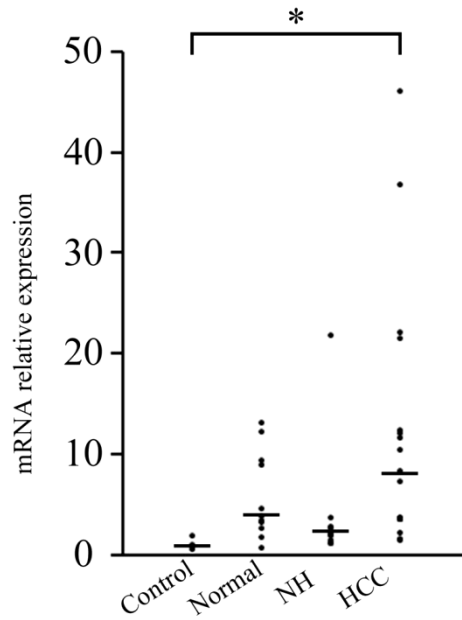


図 4-1. 犬の肝臓腫瘍における PDGF-B の遺伝子発現

肝細胞癌において、有意に高値を示した。

Control: 正常肝臓、Normal: 非腫瘍部肝臓、NH: 結節性過形成、HCC: 肝細胞癌

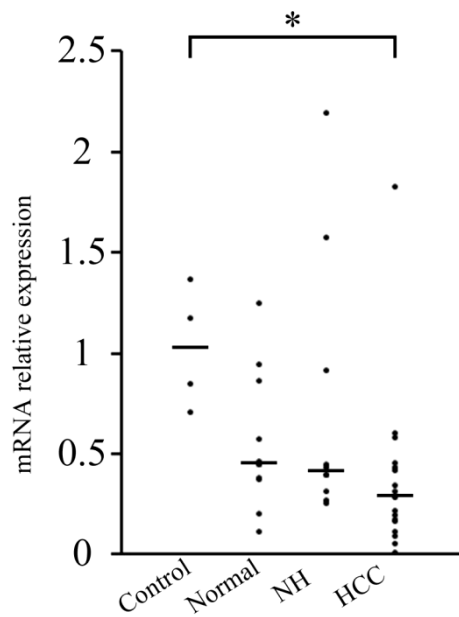


図 4-2. 犬の肝臓腫瘍における TGF-α の遺伝子発現

肝細胞癌において、有意に低値を示した。

Control: 正常肝臓、Normal: 非腫瘍部肝臓、NH: 結節性過形成、HCC: 肝細胞癌

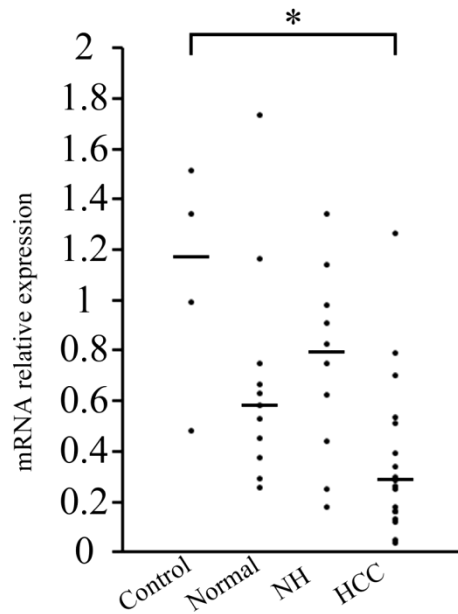


図 4-3. 犬の肝臓腫瘍における EGFR の遺伝子発現

肝細胞癌において、有意に低値を示した。

Control: 正常肝臓、Normal: 非腫瘍部肝臓、NH: 結節性過形成、HCC: 肝細胞癌

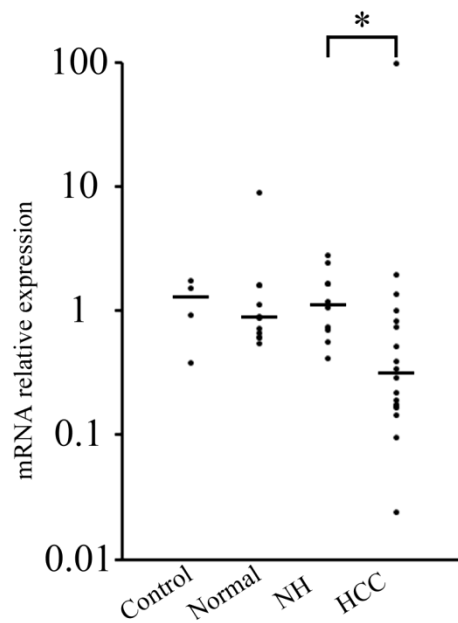


図 4-4. 犬の肝臓腫瘍における EGF の遺伝子発現

肝細胞癌において、有意に低値を示した。

Control: 正常肝臓、Normal: 非腫瘍部肝臓、NH: 結節性過形成、HCC: 肝細胞癌

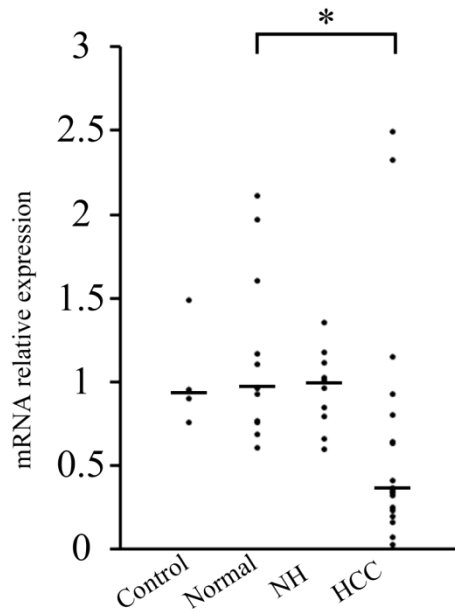


図 4-5. 犬の肝臓腫瘍における HGF の遺伝子発現

肝細胞癌において、有意に低値を示した。

Control: 正常肝臓、Normal: 非腫瘍部肝臓、NH: 結節性過形成、HCC: 肝細胞癌

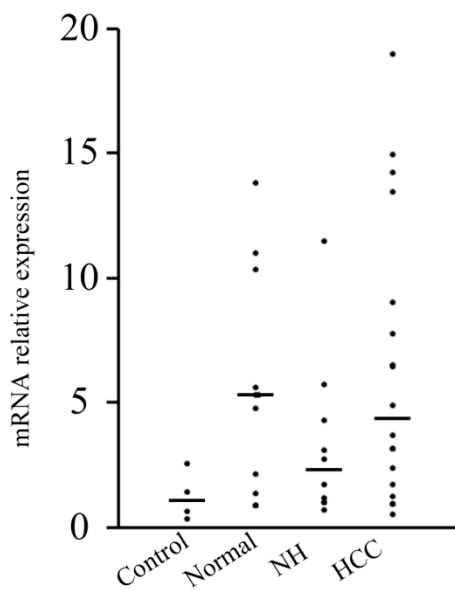


図 4-6. 犬の肝臓腫瘍における Ang-2 の遺伝子発現

肝細胞癌と非腫瘍部の肝臓で高い傾向を示した。

Control: 正常肝臓、Normal: 非腫瘍部肝臓、NH: 結節性過形成、HCC: 肝細胞癌

4. 考察

医学領域において、肝細胞癌は血管新生活性を呈する腫瘍とされており、癌の進展に伴い新生血管が増加し、血管新生シグナルに高い依存性をもつと考えられている[Tanaka and Aii. 2010]。また、肝炎から肝硬変に至る過程の中で血管新生および血管構造の異常が肝細胞癌の進展に関与していることが報告されている[Fernández *et al.* 2009]。血管新生は促進因子と抑制因子のバランスによって制御される現象とされ、促進において中心的な役割を果たしている因子は VEGF、PDGF、Ang と考えられている[Yancopoulos *et al.* 2000, Fernández *et al.* 2009]。PDGF については4つのファミリーメンバーの中でも、血管新生において内皮細胞の産生する PDGF-B が特に重要とされており、周皮細胞が発現する PDGFR- β に作用することで走化性因子として周皮細胞の新生血管への集積を促す結果、成熟した血管が構築されると報告されている[Lindahl *et al.* 1999, Ferrara *et al.* 2005, Song *et al.* 2005]。本研究において、PDGF-B の遺伝子発現は正常肝臓と比較して、肝細胞癌で有意に高値を示していた。したがって、犬の肝細胞癌における血管新生因子として PDGF-B は重要な役割を担っている可能性があるかと推察された。

また、Ang-2 の遺伝子発現には有意差が認められなかったものの、肝細胞癌で高い発現を示す検体が含まれていた。血管新生において重要とされる Ang は、主に周皮細胞の血管内皮への接着を調節するとされている。3つのファミリーメンバーのうち、特に重要なのは Ang-1 と Ang-2 であり、Ang-1 は主に周皮細胞で、Ang-2 は主に内皮細胞で産生される。Ang-1 は内皮細胞が発現する Tie2 に結合して細胞内チロシンキナーゼドメインをリン酸化するアゴニストであるのに対して、

Ang-2 は Tie2 のリン酸化作用は極めて弱く、結果的に Ang-1 に拮抗するアンタゴニストとして考えられている [Maisonpierre *et al.* 1997, Yancopoulos *et al.* 2000, Ferrara *et al.* 2005]。血管新生のトリガーとして低酸素が最もよく知られているが、腫瘍を含めたその他の要因の結果、内皮細胞に Ang-2 の発現が誘導されると Tie2 からシグナルは遮断され周皮細胞が離脱し、血管が不安定な状態になることにより血管新生を促すとされている [Yancopoulos *et al.* 2000, Ferrara *et al.* 2005]。Ang-2 はマウスの肝細胞癌モデルにて生理的、病理学的に重要な役割を示すと報告されており [Tanaka *et al.* 1999]、正常組織での発現が少なく、腫瘍中の血管新生に重要な役割を果たしていることから、Ang-2 の抑制が腫瘍部分に効果があると報告されている [Oliner *et al.* 2004]。しかし、本研究において、犬の肝細胞癌症例では非腫瘍部肝臓でも Ang-2 の高発現傾向が認められたことから、正常組織においても血管新生に関与している可能性が考えられた。また、ヒトの肝細胞癌は主要な発癌原因が明らかになっている癌のひとつであり、その最も重要な発癌原因は慢性ウイルス性肝炎とされ、肝炎から肝硬変に至る過程の中で起きる血管新生および血管構造の異常が肝細胞癌に関与していると考えられている。国内では約 80% が C 型肝炎ウイルス、10~15% が B 型肝炎ウイルスの持続感染による慢性肝炎、肝硬変を背景に発生する。肝臓の発癌機構として、ウイルス蛋白や化学物質そのものに加えて、炎症と繰り返す肝細胞壊死、再生過程における遺伝子異常が蓄積され、異型結節などの前癌病変や早期肝細胞癌の段階を経て、既存の構造を破壊する進行性肝細胞癌へ至ると考えられている。一方、獣医学領域では、犬の肝細胞癌と肝炎ウイルスとの関連は不明であり、その発癌原因はわかっていない。ヒトと同様に、前癌病変から段階的に肝細胞癌になっていくことも証明されていない

ことに加え、PDGFは肝臓に特異的な分子ではなく、またそのレセプターであるPDGFRやその他の血管新生因子やレセプターに有意差が認められないことから、犬の肝細胞癌において血管新生が関与しているか否かについて今後さらなる検討が必要であると思われる。

その一方で、TGF- α 、EGFやEGFRの遺伝子発現は肝細胞癌で有意に低値を示していた。EGFRはhuman epidermal growth factor receptor (HER)ファミリーの一つであり、EGFRとHER2~4が含まれる。HER3以外は細胞内にチロシンキナーゼドメインを有しており、外部ドメインにリガンドが結合することで、細胞増殖や分化に関与するとされる [Ciardiello and Tortora. 2008]。また、TGF- α とEGFはEGFRのリガンドとして細胞増殖に関与するとされる [Massagué. 1990, Ciardiello and Tortora. 2008]。肝細胞癌において、EGFRは高頻度に過剰発現が認められると報告されており [Kira *et al.* 1997, Buckley *et al.* 2008]、TGF- α は肝細胞癌形成に関与すると考えられている [Kira *et al.* 1997, Harada *et al.* 1999]。TGF- α についてはヒト [Kira *et al.* 1997]とマウス [Jhappan *et al.* 1990, Sandgren *et al.* 1993] においてもその遺伝子発現が肝細胞増殖と肝細胞癌形成と関与すると報告されている。しかしながら、肝細胞癌におけるEGFRの発現については議論されており [Hamazaki *et al.* 1997, Altimari *et al.* 2003]、TGF- α については非腫瘍部の肝臓における再生過程でも増加することが報告されている [Jhappan *et al.* 1990]。また、免疫染色においてTGF- α は肝細胞癌に比較して非腫瘍部の肝臓で強染色性を示し、EGFRでは有意差が認められなかったとの報告もある [Kiss *et al.* 1997]。本研究においても、EGFRシグナルに関与する遺伝子発現は肝細胞癌で低値を示しており、腫瘍部以外での発現が認められることから、犬においては肝細胞癌形成には関連せず、また正常

肝細胞における増殖や分化に関与している可能性が考えられた。

さらに、HGF の遺伝子発現も肝細胞癌で有意に低値を示していた。HGF とそのレセプターである MET は肝細胞癌をはじめ、さまざまな腫瘍において過剰発現や遺伝子変異・増幅が報告されており、血管新生や細胞増殖、浸潤、転移能獲得に関与すると報告されている[Comoglio *et al.* 2008]。HGF は正常肝臓ではほとんど発現せず、部分肝切除後や肝損傷時に肝細胞の再生に伴って発現すると考えられている[Nakamura *et al.* 1989]。また、マウス肝細胞の培養組織において、肝再生時の細胞増殖とアルブミン分泌を促進することが報告されている[Takehara *et al.* 1992]。一方、HGF が肝細胞癌の成長を妨げること[Shiota *et al.* 1992]や HGF・TGF- α トランスジェニックマウスにおいて HGF が肝細胞癌の発生率を低下させる可能性も報告されている[Shiota *et al.* 1995]。本研究では、肝細胞癌で低値を示しており、非腫瘍部での発現が認められることから、犬においては HGF の遺伝子発現の低下は肝細胞癌と関連している可能性が考えられた。

以上のことから、犬の肝細胞癌では PDGF-B が高発現することが明らかとなり、腫瘍部分のみで高発現が認められることから標的分子となる可能性が考えられた。一方、細胞増殖因について、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。

5. 小括

第1章の結果から、犬の肝細胞癌は腫瘍の大きさや発生部位により、複数の肝臓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。そのような症例では、治療を断念せざるを得ず、経過観察を余儀なくされているのが現状である。近年、ヒトの肝細胞癌において外部情報の受容と伝達に関与する増殖因子とレセプター、細胞内シグナル伝達や作用に関与する分子が同定され、これらを標的とした分子標的治療薬が注目されている。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、分子標的薬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。

2010年3月から2012年7月に日本大学生物資源科学部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肝細胞癌の犬18症例と結節性過形成の犬4症例を対象に、摘出された肝臓腫瘍と付随する非腫瘍部の肝臓における遺伝子発現解析を行った。発現解析する遺伝子には、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。

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。

以上より、犬の肝細胞癌では PDGF-B が高発現することが明らかとなり、腫瘍部分のみで高発現が認められることから、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。

総括

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場合が多い。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型、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、免疫組織化学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、免疫組織化学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 0.5 mg/kg で静注した。開腹下にて肝表面および離断面を赤外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ギオポイエチン(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。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の終始懇篤なる御指導および御校閲を賜りました日本大学生物資源科学部獣医学科総合臨床獣医学研究室 亘敏広教授ならびに同学部 浅野和之准教授に深甚なる謝意を表します。また、貴重な御助言および御校閲を賜りました、同学部獣医病理学研究室 佐藤常男教授、同学部獣医生化学研究室 杉谷博士教授に深謝致します。

また、本研究を進めるにあたり御協力ならびに御助言を頂いた同学部獣医外科学研究室 田中茂男名誉教授、枝村一弥専任講師、手島健次助教、同学部獣医内科学研究室 坂井学専任講師、同学部総合臨床学研究室 関真美子助教、同大学附属動物病院の支援獣医師である石垣久美子先生ならびに久楽賢治先生、ノースラボ 賀川由美子先生に深謝致します。

日々の多忙な診療と研究の中で、終始甚大なる御協力を惜しまれなかった同大学附属動物病院研修医一同、同学部獣医外科学研究室室員に深謝致します。

最後に、本研究に供しました犬たちに心から感謝致します。

引用文献

1. Altimari, A., Fiorentino, M., Gabusi, E., Gruppioni, E., Corti, B., D'Errico, A. and Grigioni, W. F. 2003. Investigation of ErbB1 and ErbB2 expression for therapeutic targeting in primary liver tumours. *Dig Liver Dis.* 35:332–8.
2. Aoki, T., Murakami, M., Yasuda, D., Shimizu, Y., Kusano, T., Matsuda, K., Niiya, T., Kato, H., Murai, N., Otsuka, K., Kusano, M. and Kato, T. 2010. Intraoperative fluorescent imaging using indocyanine green for liver mapping and cholangiography. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 17:590–4.
3. Aoki, T., Yasuda, D., Shimizu, Y., Odaira, M., Niiya, T., Kusano, T., Mitamura, K., Hayashi, K., Murai, N., Koizumi, T., Kato, H., Enami, Y., Miwa, M. and Kusano, M. 2008. Image-guided liver mapping using fluorescence navigation system with indocyanine green for anatomical hepatic resection. *World J Surg.* 32:1763–7.
4. Badylak, S. F., Dodds, W. J., Van Vleet, J. F. 1983. Plasma coagulation factor abnormalities in dogs with naturally occurring hepatic disease. *Am J Vet Res.* 44:2336-40
5. Bartlett, D. L., DiBisceglie, A. M. and Dawson, L. A. 2011. Cancer of the liver. In: *Cancer: principles and practice of oncology.* 9th edn. Eds: De-Vita, V. T. Lawrence, T. S. and Rosenberg, S. A. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp:997-1018
6. Buckley, A. F., Burgart, L. J., Sahai, V. and Kakar, S. 2008. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in conventional hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 129:245–51.
7. Capurro, M., Wanless, I. R., Sherman, M., Deboer, G., Shi, W., Miyoshi, E. and

- Filmus, J. 2003. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 125:89–97.
8. Capurro, M. I., Xiang, Y. -Y., Lobe, C. and Filmus, J. 2005. Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res*. 65:6245–54.
9. Cervello, M., McCubrey, J.A., Cusimano, A., Lampiasi, N., Azzolina, A. and Montalto, G. 2012. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: novel agents on the horizon. *Oncotarget*. 3:236–60.
10. Cheng, A. L., Kang, Y. K., Chen, Z., Tsao, C. J., Qin, S., Kim, J. S., Luo, R., Feng, J., Ye, S., Yang, T. S., Xu, J., Sun, Y., Liang, H., Liu, J., Wang, J., Tak, W. Y., Pan, H., Burock, K., Zou, J., Voliotis, D., Guan, Z. 2009. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*. 10:25-34.
11. Cherrick, G. R., Stein, S. W., Leevy, C. M. and Davidson, C. S. 1960. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J Clin Invest*. 39:592–600.
12. Ciardiello, F. and Tortora, G. 2008. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*. 358:1160–74.
13. Comoglio, P. M., Giordano, S. and Trusolino, L. 2008. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat Rev Drug Discov*. 7:504–16.
14. Di Tommaso, L., Franchi, G., Park, Y. N., Fiamengo, B., Destro, A., Morenghi,

- E., Montorsi, M., Torzilli, G., Tommasini, M., Terracciano, L., Tornillo, L., Vecchione, R. and Roncalli, M. 2007. Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. *Hepatology*. 45:725–34.
15. Fernández, M., Semela, D., Bruix, J., Colle, I., Pinzani, M., Bosch, J. 2009. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol*. 50:604-20.
16. Ferrara, N. and Kerbel, R. S. 2005. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 438:967–74.
17. Gonzalez, A. D., Kaya, M., Shi, W., Song, H., Testa, J. R., Penn, L. Z. and Filmus, J. 1998. OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. *J Cell Biol*. 141:1407–14.
18. González-Martínez, D., De Mees, C., Douhard, Q., Szpirer, C. and Bakker, J. 2008. Absence of gonadotropin-releasing hormone 1 and Kiss1 activation in alpha-fetoprotein knockout mice: prenatal estrogens defeminize the potential to show preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology*. 149:2333–40.
19. Gotoh, K., Yamada, T., Ishikawa, O., Takahashi, H., Eguchi, H., Yano, M., Ohigashi, H., Tomita, Y., Miyamoto, Y. and Imaoka, S. 2009. A novel image-guided surgery of hepatocellular carcinoma by indocyanine green fluorescence imaging navigation. *J Surg Oncol*. 100:75–9.
20. Grozdanov, P. N., Yovchev, M. I. and Dabeva, M. D. 2006. The oncofetal protein glypican-3 is a novel marker of hepatic progenitor/oval cells. *Lab Invest*. 86:1272–84.
21. Hahn, K. and Richardson, R. 1995. Detection of serum alpha-fetoprotein in dogs

- with naturally occurring malignant neoplasia. *Vet Clin Pathol.* 24:18–21.
22. Hamazaki, K., Yunoki, Y., Tagashira, H., Mimura, T., Mori, M. and Orita, K. 1997. Epidermal growth factor receptor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Detect Prev.* 21:355–60.
23. Hammer, A. S. and Sikkema, D. A. 1995. Hepatic neoplasia in the dog and cat. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 25:419–35.
24. Harada, K., Shiota, G. and Kawasaki, H. 1999. Transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Liver.* 19:318–25.
25. Harada, N., Ishizawa, T., Muraoka, A., Ijichi, M., Kusaka, K., Shibasaki, M., Yamamoto, K., Hasegawa, K., Bandai, Y. and Kokudo, N. 2010. Fluorescence navigation hepatectomy by visualization of localized cholestasis from bile duct tumor infiltration. *J Am Coll Surg.* 210:e2–6.
26. Hippo, Y., Watanabe, K., Watanabe, A., Midorikawa, Y., Yamamoto, S., Ihara, S., Tokita, S., Iwanari, H., Ito, Y., Nakano, K., Nezu, J., Tsunoda, H., Yoshino, T., Ohizumi, I., Tsuchiya, M., Ohnishi, S., Makuuchi, M., Hamakubo, T., Kodama, T., Aburatani, H. 2004. Identification of soluble NH₂-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 64:2418–2423.
27. Ishikawa, K., Yasuda, K., Shiromizu, A., Etoh, T., Shiraishi, N. and Kitano, S. 2007. Laparoscopic sentinel node navigation achieved by infrared ray electronic endoscopy system in patients with gastric cancer. *Surg Endosc.* 21:1131–4.
28. Ishizawa, T., Bandai, Y., Harada, N., Muraoka, A., Ijichi, M., Kusaka, K.,

- Shibasaki, M. and Kokudo, N. 2010. Indocyanine green-fluorescent imaging of hepatocellular carcinoma during laparoscopic hepatectomy: An initial experience. *Asian J Endosc Surg.* 3:42–45.
29. Ishizawa, T., Fukushima, N., Shibahara, J., Masuda, K., Tamura, S., Aoki, T., Hasegawa, K., Beck, Y., Fukayama, M. and Kokudo, N. 2009a. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer.* 115:2491–504.
30. Ishizawa, T., Tamura, S., Masuda, K., Aoki, T., Hasegawa, K., Imamura, H., Beck, Y. and Kokudo, N. 2009b. Intraoperative fluorescent cholangiography using indocyanine green: a biliary road map for safe surgery. *J Am Coll Surg.* 208:e1–4.
31. Ito, N., Fukuta, M., Tokushima, T., Nakai, K. and Ohgi, S. 2004. Sentinel node navigation surgery using indocyanine green in patients with lung cancer. *Surg Today.* 34:581–5.
32. Jhappan, C., Stahle, C., Harkins, R. N., Fausto, N., Smith, G. H. and Merlino, G. T. 1990. TGF alpha overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell.* 61:1137–46.
33. Kim, H., Xu, G -L., Borczuk, A. C., Busch, S., Filmus, J., Capurro, M., Brody, J. S., Lange, J., D'Armiento, J. M., Rothman, P. B. and Powell, C. A. 2003. The heparan sulfate proteoglycan GPC3 is a potential lung tumor suppressor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 29:694–701.
34. Kioussis, D., Eiferman, F., Van de Rijn, P., Gorin, M. B., Ingram, R. S. and Tilghman, S. M. 1981. The evolution of alpha-fetoprotein and albumin. II. The structures of the alpha-fetoprotein and albumin genes in the mouse. *J Biol Chem.* 256:1960–7.

35. Kira, S., Nakanishi, T., Suemori, S., Kitamoto, M., Watanabe, Y. and Kajiyama, G. 1997. Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in human hepatocellular carcinoma. *Liver*. 17:177–82.
36. Kiss, A., Wang, N. J., Xie, J. P. and Thorgeirsson, S. S. 1997. Analysis of transforming growth factor (TGF)-alpha/epidermal growth factor receptor, hepatocyte growth factor/c-met, TGF-beta receptor type II, and p53 expression in human hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res*. 3:1059–66.
37. Kitai, T., Inomoto, T., Miwa, M. and Shikayama, T. 2005. Fluorescence navigation with indocyanine green for detecting sentinel lymph nodes in breast cancer. *Breast Cancer*. 12:211–5.
38. Kitao, S., Yamada, T., Ishikawa, T., Madarame, H., Furuichi, M., Neo, S., Tsuchiya, R. and Kobayashi, K. 2006. Alpha-fetoprotein in serum and tumor tissues in dogs with hepatocellular carcinoma. *J Vet Diagn Invest*. 18:291–5.
39. Kobayashi, K., Sugimoto, T., Makino, H., Kumagai, M., Unoura, M., Tanaka, N., Kato, Y. and Hattori, N. 1985. Screening methods for early detection of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 5:1100–5.
40. Kosovsky, J. E., Manfra-Marretta, S., Matthiesen, D. T., Patnaik, A. K. 1989. Results of partial hepatectomy in 18 dogs with hepatocellular carcinoma. *J Am Anim Hosp Assoc*. 25:203-6.
41. Kuhnert, F., Tam, B. Y. Y., Sennino, B., Gray, J. T., Yuan, J., Jocson, A., Nayak, N. R., Mulligan, R. C., McDonald, D. M. and Kuo, C. J. 2008. Soluble receptor-mediated selective inhibition of VEGFR and PDGFRbeta signaling during physiologic and tumor

- angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:10185–90.
42. Landsman, M. L., Kwant, G., Mook, G. A. and Zijlstra, W. G. 1976. Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green. *J Appl Physiol*. 40:575–83.
43. Lazarevich, N. L. 2000. Molecular mechanisms of alpha-fetoprotein gene expression. *Biochemistry (Mosc)*. 65:117–33.
44. Libbrecht, L., Severi, T., Cassiman, D., Vander Borgh, S., Pirenne, J., Nevens, F., Verslype, C., Van Pelt, J. and Roskams, T. 2006. Glypican-3 expression distinguishes small hepatocellular carcinomas from cirrhosis, dysplastic nodules, and focal nodular hyperplasia-like nodules. *Am J Surg Pathol*. 30:1405–11.
45. Lin, H., Huber, R., Schlessinger, D. and Morin, P.J. 1999. Frequent silencing of the GPC3 gene in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*. 59:807–10.
46. Lindahl, P., Boström, H., Karlsson, L., Hellström, M., Kalén, M. and Betsholtz, C. 1999. Role of platelet-derived growth factors in angiogenesis and alveogenesis. *Curr Top Pathol*. 93:27–33.
47. Liptak, J. M., Dernell, W. S., Monnet, E., Powers, B. E., Bachand, A. M., Kenney, J. G. and Withrow, S. J. 2004. Massive hepatocellular carcinoma in dogs: 48 cases (1992-2002). *J Am Vet Med Assoc*. 225:1225–30.
48. Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F., de Oliveira, A. C., Santoro, A., Raoul, J. L., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, T. F., Galle, P. R., Seitz, J. F., Borbath, I., Häussinger, D., Giannaris, T., Shan, M., Moscovici, M., Voliotis, D., Bruix, J. 2008. Sorafenib in advanced

- hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 359:378-90.
49. Lowseth, L. A., Gillett, N. A., Chang, I. Y., Muggenburg, B. A. and Boecker, B. B. 1991. Detection of serum alpha-fetoprotein in dogs with hepatic tumors. *J Am Vet Med Assoc.* 199:735-41.
 50. Madsen, A. C. and Rikkers, L. F. 1984. Alpha-fetoprotein secretion by injured and regenerating hepatocytes in the dog. *J Surg Res.* 37:402-8.
 51. Madsen, A. C., Rikkers, L. F., Moody, F. G. and Wu, J. T. 1980. Alpha-fetoprotein as a marker for hepatic regeneration in the dog. *J Surg Res.* 28:71-6.
 52. Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., Daly, T. J., Davis, S., Sato, T. N. and Yancopoulos, G. D. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 277:55-60.
 53. Man, X.-B., Tang, L., Zhang, B.-H., Li, S.-J., Qiu, X.-H., Wu, M.-C. and Wang, H.-Y. 2005. Upregulation of Glypican-3 expression in hepatocellular carcinoma but downregulation in cholangiocarcinoma indicates its differential diagnosis value in primary liver cancers. *Liver Int.* 25:962-6.
 54. Martín de las Mulas, J., Gómez-Villamandos, J. C., Pérez, J., Mozos, E., Estrado, M. and Méndez, A. 1995. Immunohistochemical evaluation of canine primary liver carcinomas: distribution of alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen, keratins and vimentin. *Res Vet Sci.* 59:124-7.
 55. Massagué, J. 1990. Transforming growth factor-alpha. A model for

- membrane-anchored growth factors. *J Biol Chem.* 265:21393–6.
56. Matsuura, E., Kang, Y., Kitakawa, H., Ogata, A., Kotani, T., Ohtaki, S. and Nishi, S. 1999. Modulation of T cell function by alpha-fetoprotein: An in vivo study on porcine thyroid peroxidase-induced experimental autoimmune thyroiditis in transgenic mice producing human alpha-fetoprotein. *Tumour Biol.* 20:162–71.
57. Mitsuhashi, N., Kimura, F., Shimizu, H., Imamaki, M., Yoshidome, H., Ohtsuka, M., Kato, A., Yoshitomi, H., Nozawa, S., Furukawa, K., Takeuchi, D., Takayashiki, T., Suda, K., Igarashi, T. and Miyazaki, M. 2008. Usefulness of intraoperative fluorescence imaging to evaluate local anatomy in hepatobiliary surgery. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 15:508–14.
58. Mordon, S., Devoisselle, J. M., Soulie-Begu, S. and Desmettre, T. 1998. Indocyanine green: physicochemical factors affecting its fluorescence in vivo. *Microvasc Res.* 55:146–52.
59. Motomura, K., Inaji, H., Komoike, Y., Kasugai, T., Noguchi, S. and Koyama, H. 1999. Sentinel node biopsy guided by indocyanine green dye in breast cancer patients. *Jpn J Clin Oncol.* 29:604–7.
60. Murthy, S. S., Shen, T., De Rienzo, A., Lee, W. C., Ferriola, P. C., Jhanwar, S. C., Mossman, B. T., Filmus, J. and Testa, J. R. 2000. Expression of GPC3, an X-linked recessive overgrowth gene, is silenced in malignant mesothelioma. *Oncogene.* 19:410–6.
61. Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K. and Shimizu, S. 1989. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature.* 342:440–3.

62. Nakatsura, T. and Nishimura, Y. 2005. Usefulness of the novel oncofetal antigen glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma. *BioDrugs*. 19:71–7.
63. Nakatsura, T., Yoshitake, Y., Senju, S., Monji, M., Komori, H., Motomura, Y., Hosaka, S., Beppu, T., Ishiko, T., Kamohara, H., Ashihara, H., Katagiri, T., Furukawa, Y., Fujiyama, S., Ogawa, M., Nakamura, Y. and Nishimura, Y. 2003. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun*. 306:16–25.
64. Nimura, H., Narimiya, N., Mitsumori, N., Yamazaki, Y., Yanaga, K. and Urashima, M. 2004. Infrared ray electronic endoscopy combined with indocyanine green injection for detection of sentinel nodes of patients with gastric cancer. *Br J Surg*. 91:575–9.
65. Okabe, H., Satoh, S., Kato, T., Kitahara, O., Yanagawa, R., Yamaoka, Y., Tsunoda, T., Furukawa, Y. and Nakamura, Y. 2001. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res*. 61:2129–37.
66. Oliner, J., Min, H., Leal, J., Yu, D., Rao, S., You, E., Tang, X., Kim, H., Meyer, S., Han, S. J., Hawkins, N., Rosenfeld, R., Davy, E., Graham, K., Jacobsen, F., Stevenson, S., Ho, J., Chen, Q., Hartmann, T., Michaels, M., Kelley, M., Li, L., Sitney, K., Martin, F., Sun, J.-R., Zhang, N., Lu, J., Estrada, J., Kumar, R., Coxon, A., Kaufman, S., Pretorius, J., Scully, S., Cattley, R., Payton, M., Coats, S., Nguyen, L., Desilva, B., Ndifor, A., Hayward, I., Radinsky, R., Boone, T. and Kendall, R. 2004. Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. *Cancer Cell*. 6:507–16.

67. Parungo, C. P., Ohnishi, S., Kim, S.-W., Kim, S., Laurence, R. G., Soltesz, E. G., Chen, F. Y., Colson, Y. L., Cohn, L. H., Bawendi, M. G. and Frangioni, J. V. 2005. Intraoperative identification of esophageal sentinel lymph nodes with near-infrared fluorescence imaging. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 129:844–50.
68. Patnaik, A. K., Hurvitz, A. I. and Lieberman, P.H. 1980. Canine hepatic neoplasms: a clinicopathologic study. *Vet Pathol.* 17:553–564.
69. Powell, C. A., Xu, G., Filmus, J., Busch, S., Brody, J. S. and Rothman, P.B. 2002. Oligonucleotide microarray analysis of lung adenocarcinoma in smokers and nonsmokers identifies GPC3 as a potential lung tumor suppressor. *Chest.* 121:6S–7S.
70. Rogers, K. S. 2000. Anemia. In: *Textbook of veterinary Internal medici.* 5th edn. Eds: Ettinger, S. J., Feldman, E. C. WB Saunders, Philadelphia. 1:198-203
71. Rubens, F. D., Ruel, M. and Femes, S. E. 2002. A new and simplified method for coronary and graft imaging during CABG. *Heart Surg Forum.* 5:141–4.
72. Sandgren, E. P., Luetkeke, N. C., Qiu, T. H., Palmiter, R. D., Brinster, R. L. and Lee, D. C. 1993. Transforming growth factor alpha dramatically enhances oncogene-induced carcinogenesis in transgenic mouse pancreas and liver. *Mol Cell Biol.* 13:320–30.
73. Shen, Y.-C., Hsu, C. and Cheng, A.-L. 2010. Molecular targeted therapy for advanced hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. *J Gastroenterol.* 45:794–807.
74. Shinomiya, Y., Hirao, K., Matsumura, K., Imagawa, A., Enomoto, Y., Fukai, Y. and Ito, N. 1973. α -Fetoprotein during hepatocarcinogenesis in dogs treated with

- chemical carcinogens. *Gann Monograph on Cancer Res.* 14:301–13.
75. Shiota, G., Kawasaki, H., Nakamura, T. and Schmidt, E. V. 1995. Characterization of double transgenic mice expressing hepatocyte growth factor and transforming growth factor alpha. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 90:17–24.
76. Shiota, G., Rhoads, D. B., Wang, T. C., Nakamura, T. and Schmidt, E. V. 1992. Hepatocyte growth factor inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:373–7.
77. Soltesz, E. G., Kim, S., Laurence, R. G., DeGrand, A. M., Parungo, C. P., Dor, D. M., Cohn, L. H., Bawendi, M. G., Frangioni, J. V. and Mihaljevic, T. 2005. Intraoperative sentinel lymph node mapping of the lung using near-infrared fluorescent quantum dots. *Ann Thorac Surg.* 79:269–77.
78. Song, S., Ewald, A. J., Stallcup, W., Werb, Z. and Bergers, G. 2005. PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat Cell Biol.* 7:870–9.
79. Tagaya, N., Shimoda, M., Kato, M., Nakagawa, A., Abe, A., Iwasaki, Y., Oishi, H., Shirotani, N. and Kubota, K. 2010. Intraoperative exploration of biliary anatomy using fluorescence imaging of indocyanine green in experimental and clinical cholecystectomies. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 17:595–600.
80. Taggart, D. P., Choudhary, B., Anastasiadis, K., Abu-Omar, Y., Balacumaraswami, L. and Pigott, D. W. 2003. Preliminary experience with a novel intraoperative fluorescence imaging technique to evaluate the patency of bypass grafts in total arterial revascularization. *Ann Thorac Surg.* 75:870–3.

81. Takehara, T., Matsumoto, K. and Nakamura, T. 1992. Cell density-dependent regulation of albumin synthesis and DNA synthesis in rat hepatocytes by hepatocyte growth factor. *J Biochem.* 112:330–4.
82. Tanaka, S. and Arii, S. 2010. Current status of molecularly targeted therapy for hepatocellular carcinoma: basic science. *Int J Clin Oncol.* 15:235–41.
83. Tanaka, S., Mori, M., Sakamoto, Y., Makuuchi, M., Sugimachi, K. and Wands, J. R. 1999. Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest.* 103:341–5.
84. Tanaka, S., Sugimachi, K., Yamashita Yi, Y., Ohga, T., Shirabe, K., Shimada, M., Wands, J. R. and Sugimachi, K. 2002. Tie2 vascular endothelial receptor expression and function in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 35:861–7.
85. Tashbaeva, R. E., Hwang, D.-N., Song, G.-S., Choi, N.-H., Lee, J.-H., Lyoo, Y.-S., Lee, S.-J., Jung, D.-I., Kim, H.-Y. and Sur, J.-H. 2007. Cellular characterization of multidrug resistance P-glycoprotein, alpha fetoprotein, and neovascular endothelium-associated antigens in canine hepatocellular carcinoma and cirrhotic liver. *Vet Pathol.* 44:600–6.
86. Trigo, F. J., Thompson, H., Breeze, R. G. and Nash, A. S. 1982. The pathology of liver tumours in the dog. *J Comp Pathol.* 92:21–39.
87. van Sprundel, R. G., van den Ingh, T. S., Desmet, V. J., Katoonizadeh, A., Penning, L. C., Rothuizen, J., Roskams, T. and Spee, B. 2010. Keratin 19 marks poor differentiation and a more aggressive behaviour in canine and human hepatocellular tumours. *Comp Hepatol.* 9:4.

88. Wang, X. Y., Degos, F., Dubois, S., Tessiore, S., Allegretta, M., Guttman, R. D., Jothy, S., Belghiti, J., Bedossa, P. and Paradis, V. 2006. Glypican-3 expression in hepatocellular tumors: diagnostic value for preneoplastic lesions and hepatocellular carcinomas. *Hum Pathol.* 37:1435–41.
89. Xiang, Y. Y., Ladedda, V. and Filmus, J. 2001. Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer. *Oncogene.* 20:7408–12.
90. Xie, Z., Zhang, H., Tsai, W., Zhang, Y., Du, Y., Zhong, J., Szpirer, C., Zhu, M., Cao, X., Barton, M.C., Grusby, M. J. and Zhang, W. J. 2008. Zinc finger protein ZBTB20 is a key repressor of alpha-fetoprotein gene transcription in liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105:10859–64.
91. Yamada, T., Fujita, M., Kitao, S., Ashida, Y., Nishizono, K., Tsuchiya, R., Shida, T. and Kobayashi, K. 1999. Serum alpha-fetoprotein values in dogs with various hepatic diseases. *J Vet Med Sci.* 61:657–9.
92. Yamada, T., Kakinoki, M., Totsuka, K., Ashida, Y., Nishizono, K., Tsuchiya, R. and Kobayashi, K. 1995. Purification of canine alpha-fetoprotein and alpha-fetoprotein values in dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 47:25–33.
93. Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J. and Holash, J. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 407:242–8.