

イヌおよびネコ乳腺腫瘍の癌微小環境に関する病理学的研究

吉 村 久 志

日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医保健看護学科 応用部門 病態病理学研究分野・助教

日獣生大研報 65, 1-3, 2016.

背 景

乳癌は女性における最も重要な腫瘍の一つである。近年、愛玩動物においても長命化に伴い腫瘍の発生数が増加しており、ヒトと同様に悪性腫瘍が最も多い死因の一つとなっている。生体組織検査に供される愛玩動物はイヌ、ネコ、ジャンガリアンハムスターの順で多いが、この3種の動物共に乳腺腫瘍の発生頻度が高く、その研究はヒト乳癌の生物学的理解に資する可能性がある¹⁻³⁾。

癌組織には腫瘍細胞だけでなく、線維芽細胞、血管構成細胞、炎症細胞、間葉系幹細胞などの非腫瘍性の間質細胞や、細胞外基質、細胞外因子などが含まれ、癌微小環境 (cancer microenvironment) を形成している。従来、これら間質成分は軽視される傾向にあった。しかしその一方で、硬癌のように間質線維芽細胞の増殖の強い癌は一般に予後が悪いことが知られており、間質成分が癌細胞に対して何らかの生物学的影響を持つことが示唆されていた。癌の間質に存在する活性化線維芽細胞は α -SMA に陽性を示す筋線維芽細胞の形質を持つが、近年、医学領域では、これら癌間質線維芽細胞 (筋線維芽細胞) を carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) と呼び、癌の進行に重要な役割を果たす細胞であるとみなしている⁴⁻⁷⁾。イヌやネコの乳腺癌においても間質筋線維芽細胞の存在は古くから知られていたが⁸⁾、それに着目した研究はほとんど行われなかった。

Tenascin-C (Tn-C) は、胎児組織で発現する細胞外基質蛋白の一つで、細胞外基質中を移動する細胞の運動に関わっている。成体の正常組織ではほとんど発現しないが、病的状況下、特に癌の間質においてしばしば高発現し、癌細胞の浸潤・転移や血管新生を促進し、癌の進行に役割を果たしていると考えられている⁹⁻¹¹⁾。Tn-C はヒトの乳癌の悪性度の指標になるが^{12,13)}、イヌの乳腺腫瘍では低悪性度の腫瘍でもしばしば高発現するとされている^{14,15)}。また、ネコの乳腺腫瘍ではTn-Cに関する研究は行われていない。

そこで本研究では、免疫組織化学的手法を用いて、イヌおよびネコの正常、過形成および腫瘍乳腺組織における筋線維芽細胞の出現と Tn-C 発現について検討し、腫瘍の悪

性度との関連性を調べた。また、イヌの乳腺癌組織において高感度 *in situ* hybridization 法を用いて、Tn-C 産生細胞の同定を試みた。

イヌの乳腺腫瘍における間質筋線維芽細胞と Tenascin-C 発現の検討¹⁶⁾

最初に、イヌの正常、過形成および腫瘍乳腺組織における間質筋線維芽細胞の出現を評価し、乳腺癌に関して筋線維芽細胞の増生の程度と悪性グレード、脈管内浸潤およびリンパ節転移の有無との間の関連性を検討した。その結果、正常および過形成乳腺組織では筋線維芽細胞がほとんど認められないのに対し、単純型乳腺腫では約半数の症例 (55%) で、単純型乳腺癌ではほぼ全ての症例 (93%) で間質筋線維芽細胞を認めた。単純型乳腺癌では、筋線維芽細胞の増生の程度と悪性グレードの間で正の相関を示した。また脈管内浸潤やリンパ節転移のみられる症例で、みられない症例より有意な筋線維芽細胞の増生を認めた。

次に、イヌの正常、過形成および腫瘍乳腺組織における Tn-C 発現の局在パターンを評価した。その結果、“間質における発現”と“基底膜領域における発現”の主に2つの局在パターンが明らかになった。間質に発現する Tn-C は、正常および過形成乳腺組織ではほとんど認められないのに対し、乳腺腫では約半数の症例 (55%) で、乳腺癌ではほぼ全ての症例 (93%) で認められた。単純型乳腺癌では、間質 Tn-C 発現の程度と悪性グレードの間で正の相関を示した。また間質 Tn-C 発現が脈管内浸潤の有る症例で無い症例より有意に増加した。連続切片における α -SMA と Tn-C の免疫染色の比較および二重免疫組織化学により、間質筋線維芽細胞と Tn-C の分布領域が多くの場合一致していた。このようにイヌの乳腺腫瘍において、間質筋線維芽細胞が Tn-C を過剰に産生することで癌の進行を助長している可能性が示唆された。

一方で、基底膜領域に沈着する Tn-C は、正常乳腺、良性病変、低グレードの乳腺癌において認められ、間質 Tn-C とは異なり腫瘍の悪性度とは相関しなかった。基底膜領域の Tn-C はその分布から、筋線維芽細胞ではなく基底膜の内側に存在する筋上皮細胞がその分泌に関わってい

ることが推測された。

ネコの乳腺腫瘍における間質筋線維芽細胞と Tenascin-C 発現の検討¹⁷⁾

ネコの乳腺癌は侵襲性が強いことで知られ、その組織像はイヌや齧歯類よりもヒトの乳癌に類似するため、ヒトの高グレード乳癌のモデルとされている。そこで、イヌで行ったのと同様の方法で、ネコの正常、過形成および腫瘍乳腺組織における間質筋線維芽細胞出現と Tn-C 発現を評価し、イヌでの結果と比較した。

間質筋線維芽細胞は正常および過形成乳腺組織ではほとんど認められないのに対し、乳腺腫では一部の症例 (38%) で、乳腺癌では全ての症例 (100%) で観察された。間質に発現する Tn-C は筋線維芽細胞とはほぼ同様の分布を示し、正常および過形成乳腺組織ではほとんど認められず、乳腺腫では一部の症例 (38%) で、乳腺癌ではほぼ全ての症例 (93%) で認められた。ネコ乳腺癌では、間質筋線維芽細胞増生および Tn-C 発現の程度は、悪性グレード、脈管内浸潤、リンパ節転移の有無に関連せず高かった。以上のことから、ネコの乳腺癌の侵襲性には間質筋線維芽細胞や、その産生する Tn-C が何らかの役割を果たしていると考えられた。

一方で、ネコの乳腺腫瘍では、基底膜領域の Tn-C 発現は乳腺腫ではみられたが乳腺癌では 1 例を除いて観察されなかった。これはネコの乳腺癌にはイヌと異なり筋上皮細胞層がほとんど存在しないことが原因と考えられ、この点においてもネコの乳腺癌はヒトの乳癌と類似していた。

高感度 *in situ* hybridization 法を用いたイヌの乳腺 癌における Tenascin-C 産生細胞の同定¹⁸⁾

イヌの乳腺癌には Tn-C 蛋白の局在部位が主に次の 3 つ確認された: 1) 高グレードの単純型乳腺癌の間質、2) 低グレードの単純型乳腺癌の基底膜領域、および 3) 複合型乳腺癌の筋上皮細胞増殖領域。それぞれの局在部位における Tn-C 産生細胞を同定するために、*in situ* hybridization 法による Dog Tn-C mRNA の検出を試みた。

間質において Tn-C 蛋白が豊富にみられたイヌの単純型乳腺癌において *in situ* hybridization-免疫組織化学二重染色を行ったところ、 α -SMA 陽性の筋線維芽細胞および α -SMA 陰性の線維芽細胞に Tn-C mRNA が検出された。基底膜領域に Tn-C 蛋白がみられた乳腺癌では、基底膜の内側に位置する筋上皮細胞に Tn-C mRNA のシグナルが観察された。複合型乳腺癌の筋上皮細胞増殖領域では免疫染色により Tn-C 蛋白が豊富に存在し、増殖筋上皮細胞に Tn-C mRNA が証明された。

これらの結果から、高グレードのイヌの単純型乳腺癌において間質筋線維芽細胞／線維芽細胞が Tn-C の主要な産生源であることが証明された。一方、低グレードの単純型乳腺癌において基底膜領域にみられる Tn-C 蛋白は筋上皮細胞が産生しており、その機能は異なると考えられた。

終 わ り に

本研究からイヌとネコの乳腺癌において、間質筋線維芽細胞が細胞外基質蛋白 Tn-C を過剰に産生し、癌の進行に関与することが示された。従って、間質における筋線維芽細胞の増生と Tn-C の高発現は腫瘍の悪性度を知る指標となる可能性がある。さらに、イヌの乳腺癌では多くの症例で、癌の進行に直接関与しない筋上皮細胞が産生する Tn-C も存在することが明らかになった。このように Tn-C には機能の異なる複数の isoform が存在することが示唆される。現在はヒトの膀胱癌細胞に発現する isoform の同定を行っている。一部の isoform はすでに同定し終え、その配列を組み込んだプラスミドを遺伝子導入することで特定の isoform を過剰発現する細胞株を作製している。今後はそれらの細胞株を用いて Tn-C のそれぞれの isoform の機能を特定し、癌に関連する isoform を標的とした治療法の開発を目指していきたい。

謝 辞

本賞を贈呈していただきました池本学長をはじめ、選考委員会の先生方に謹んで御礼申し上げます。またご推薦いただきました獣医保健看護学応用部門の神谷新司教授、山本昌美講師、受賞した研究題目をご指導下さった獣医病理学研究室の高橋公正教授、塚田晃三准教授、道下正貴准教授、東京都健康長寿医療センター(元日本医科大学病理学講座)の石渡俊行研究部長、松田陽子医長に心より感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) VAIL, D.M., MACEWEN, E.G. (2000). Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest.*, **18**, 781-792.
- 2) YOSHIMURA, H., NAKAHIRA, R., KISHIMOTO, T.E., MICHISHITA, M., OHKUSU-TSUKADA, K., TAKAHASHI, K. (2014). Differences in indicators of malignancy between luminal epithelial cell type and myoepithelial cell type of simple solid carcinoma in the canine mammary gland. *Vet. Pathol.*, **51**, 1090-1095.
- 3) YOSHIMURA, H., KIMURA-TSUKADA, N., ONO, Y., MICHISHITA, M., OHKUSU-TSUKADA, K., MATSUDA, Y., ISHIWATA, T., TAKAHASHI, K. (2015). Characterization of Spontaneous Mammary Tumors in Domestic Djungarian Hamsters (*Phodopus sungorus*). *Vet. Pathol.*, **52**, 1227-1234.
- 4) EGEHLAD, M., LITTLEPAGE, L.E., WERB, Z. (2005). The fibroblastic coconspirator in cancer progression. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **70**, 383-388.
- 5) LITTLEPAGE, L.E., EGEHLAD, M., WERB, Z. (2005). Coevolution of cancer and stromal cellular responses. *Cancer Cell.*, **7**, 499-500.

-
- 6) LI, H., FAN, X., HOUGHTON, J. (2007). Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J. Cell Biochem.*, **101**, 805-815.
 - 7) MCANULTY, R.J. (2007). Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**, 666-671.
 - 8) DESTEXHE, E., LESPAGNARD, L., DEGEYTER, M., HEYMAN, R., COIGNOUL, F. (1993). Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial, and connective tissue cells in canine mammary tumors. *Vet. Pathol.*, **30**, 146-154.
 - 9) CHIQUET-EHRISMANN, R., CHIQUET, M. (2003). Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J. Pathol.*, **200**, 488-499.
 - 10) OREND, G. (2005). Potential oncogenic action of tenascin-C in tumorigenesis. *Int J Biochem. Cell Biol.*, **37**, 1066-1083.
 - 11) OREND, G., CHIQUET-EHRISMANN, R. (2006). Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Lett.*, **244**, 143-163.
 - 12) HOWEEDY, A.A., VIRTANEN, I., LAITINEN, L., GOULD, N.S., KOUKOULIS, G.K., GOULD, V.E. (1990). Differential distribution of tenascin in the normal, hyperplastic, and neoplastic breast. *Lab. Invest.*, **63**, 798-806.
 - 13) ISHIHARA, A., YOSHIDA, T., TAMAKI, H., SAKAKURA, T. (1995). Tenascin expression in cancer cells and stroma of human breast cancer and its prognostic significance. *Clin. Cancer Res.*, **1**, 1035-1041.
 - 14) AAI, K., NAOI, M., UEHARA, K. (1994). Immunohistochemical examination of neural cell adhesion molecule (NCAM), tenascin and fibronectin on the development of cartilaginous tissue in canine mammary mixed tumors. *J. Vet. Med. Sci.*, **56**, 809-811.
 - 15) FAUSTINO, A.M., VAN GARDEREN, E., SCHALKEN, J.A., NEDERBRAGT, H. (2002). Tenascin expression in normal, hyperplastic, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues. *J. Comp. Pathol.*, **126**, 1-8.
 - 16) YOSHIMURA, H., MICHISHITA, M., OHKUSU-TSUKADA, K., TAKAHASHI, K. (2011). Increased presence of stromal myofibroblasts and tenascin-C with malignant progression in canine mammary tumors. *Vet. Pathol.*, **48**, 313-321.
 - 17) YOSHIMURA, H., MICHISHITA, M., OHKUSU-TSUKADA, K., TAKAHASHI, K. (2011). Appearance and distribution of stromal myofibroblasts and tenascin-C in feline mammary tumors. *Histol. Histopathol.*, **26**, 297-305.
 - 18) YOSHIMURA, H., MICHISHITA, M., OHKUSU-TSUKADA, K., MATSUDA, Y., ISHIWATA, T., NAITO, Z., TAKAHASHI, K. (2015). Cellular sources of tenascin-C in canine mammary carcinomas. *Vet. Pathol.*, **52**, 92-96.
-