

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 黄 美貴

【緒論】

皮膚肥満細胞腫（MCT）はイヌの皮膚腫瘍の中で最も多い腫瘍である。高悪性度の MCT は、細胞質内顆粒の減少、核分裂像の増加および高 N/C 比等の未分化な肥満細胞の特徴を示し、これらの形質と腫瘍細胞の悪性動態の関連が示唆されている。このため、高悪性度の皮膚 MCT では、正常な分化・成熟の制御が変化し、未分化な状態を維持するメカニズムが存在することが予測され、さらにこれらの制御機構が、腫瘍細胞の増殖や浸潤などの悪性形質の発現にも関与している可能性が示唆される。皮膚の肥満細胞（MC）の分化や増殖には、幹細胞因子（SCF）と SCF 受容体 c-Kit が深く関与していることが知られているが、分化制御に対する他の因子の関与については不明な点が多い。また、MCT においても分化を制御している機序は不明である。血管内皮増殖因子（VEGF）-A は、受容体（VEGFRs）である Flt1 および Flk1 を介して主に血管新生を制御しているが、造血幹細胞および各系統の血液細胞の分化・成熟の制御にも重要な役割を担っている。このため、VEGF-A、Flk1 および Flt1 は、皮膚肥満細胞およびイヌの皮膚 MCT の分化・成熟の制御に関連している可能性が示唆されるが、詳細な検索はなされていない。

本研究では、イヌの皮膚 MCT における組織学的悪性度および分化度に対する VEGF-A と VEGFRs の関与を明らかにすることを目的として、イヌの皮膚 MCT 症例における VEGF-A および VEGFRs の発現と組織学的悪性度および腫瘍細胞の分化度との関連性の解析、発生過程の皮膚 MC における VEGF-A と VEGFRs の発現と MC の分化度との関連性の解析、初代培養 MC を用いた VEGF-A と Flk1 の MC の分化に対する作用の解析を行った。

【実験の概要】

まず第 2 章では、イヌの皮膚 MCT における VEGF-A と VEGFRs 発現と組織

学的悪性度の関係を明らかにするために「イヌの皮膚 MCT における VEGF-A および VEGFRs の発現と組織学的悪性度との関連」に関する研究を行なった。イヌの皮膚 MCT 135 症例を用いて、病理組織学的分類 (Patnaik 分類 : Grade I ~ III、Kiupel 分類 : low-grade と high-grade)、および c-Kit 免疫組織化学陽性反応 (IR) の細胞内局在による分類 (c-Kit pattern I ~ III) によって組織学的悪性度を評価した。同時に、MCT 細胞の増殖能を Ki67 と増殖性細胞核抗原 (PCNA) の免疫組織化学によって評価した。さらに、MCT における VEGF-A、Flk1、Flt1 の免疫組織化学を実施し、MCT 細胞におけるこれら分子の発現と組織学的悪性度との関連性を解析した。その結果、VEGF-A-IR は悪性度の高い MCT (Patnaik 分類 GradeIII と Kiupel 分類 high-grade) および c-Kit patternIII を示す MCT に有意に認められ、Flk1-IR は c-Kit patternIII で有意に多く認められた。さらに、VEGF-A と Flk1 の共発現は、Patnaik 分類 GradeIII と Kiupel 分類 high-grade および c-Kit pattern II と III で有意に多く認められた。一方、Flt1 と腫瘍悪性度との関連性は認められなかった。また、正常な皮膚 MC では、VEGF-A-IR は細胞質内に、Flk1-IR は核内のみに認められたが、MCT では細胞質内と核内に認められた。以上の結果から、イヌの皮膚 MCT において、VEGF-A と Flk1 は腫瘍の悪性化に関連して発現することが示唆された。特に VEGF-A と Flk1 の共発現が高悪性度の MCT に多く認められたことから、VEGF-A/Flk1 オートクラインによるシグナリングが悪性形質発現に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。MC では VEGF-A が Flk1 に作用して細胞の遊走を促進することが報告されている。また、核内 VEGF-A はいくつかのタイプの腫瘍において悪性転化に関与していることが知られており、Flk1 の細胞質内移行の増加は VEGF-A/Flk1 の intracrine シグナリングを増加させ、細胞の生存延長をさせることが報告されている。従って、MCT では VEGF-A と Flk1 が、MCT 細胞の周囲組織への遊走促進と生存の延長によって、腫瘍の悪性形質発現に関与することが示唆された。

次に第 3 章では、VEGF-A と Flk1 の発現とイヌ皮膚 MCT の分化度との関連性を明らかにするために、「イヌの皮膚 MCT における VEGF-A および Flk1

の発現と腫瘍細胞の分化度」に関する研究を行った。皮膚 MC は成熟過程において細胞質内顆粒のアルシアンブルー (AB) とサフラニン O (SO) の染色性が変化し、未成熟 MC では AB 陽性顆粒が SO 陽性顆粒よりも優位 (AB>SO) で、成熟に伴って SO 陽性顆粒が増加し SO 陽性顆粒が AB 陽性顆粒よりも優位になる (AB<SO)。また、分化・成熟に伴って、脱顆粒に関連する GTP 結合タンパク Gi1 の発現や MC 特異的トリプターゼ (MC トリプターゼ) の発現の増加が認められる。そこで、イヌ皮膚 MCT 症例を用いて、細胞質内顆粒の AB-SO 染色、Gi1 および MC トリプターゼの免疫組織化学を行い、MC 細胞の分化度を評価し、MCT 細胞における VEGF-A と Flk1 の発現との関連性を解析した。その結果、AB-SO 陰性、AB>SO および Gi1 陰性の MCT 症例において VEGF-A と Flk1 が有意に認められた。以上から、VEGF-A と Flk1 を発現する腫瘍細胞は、分化・成熟度が低い細胞であると考えられた。このため、VEGF-A/Flk1 シグナリングは MCT 細胞をより未成熟な状態に維持することによって悪性形質の発現に寄与している可能性が示唆された。

第 3 章の結果、VEGF-A と Flk1 が MCT の分化・成熟の制御に関与している可能性が予測された。そこで第 4 章では、正常な皮膚 MC の分化・成熟に対する VEGF-A と Flk1 の関与を明らかにし、その関連性を MCT と比較するために、「発生過程の皮膚 MC における VEGF-A と VEGFRs の発現」に関する研究を行った。胎生期から成長期のラットの皮膚を用い、分化・成熟の指標となる AB-SO 染色、c-Kit、MC トリプターゼ、および Gi1 免疫組織化学、また、高い増殖能を持つ未成熟 MC の指標となる Ki67 免疫組織化学を行い、VEGF-A、Flk1 および Flt1 の発現との関連性を評価した。MC は胎齢 16 日目 (E16) から認められ、生後 7 (D7) ~28 日齢 (D28) にかけて AB>SO MC (未成熟 MC) の減少と AB<SO MC (成熟 MC) の増加、Ki67 陽性 MC の増加が認められたが、D60 と D90 ではほとんどが AB<SO MC であり、Ki67-IR MC は認められなかった。Flk1-IR は E17、Flt1-IR は E19 から MC に認められ、D7~D28 で大部分の MC に発現が認められたが、D60 と D90 ではほとんど認められなかった。VEGF-A-IR は E17 から D90 まで、少数の MC にのみ認められた。これらの結果から、Flk1 と Flt-1 は分化・成熟過程にある皮膚 MC にお

いて発現し、VEGF-A /Flk1 および VEGF-A /Flt1 シグナリングの協調的な制御が MC の分化や成熟に関与している可能性が示唆された。

以上の研究から、VEGF-A と Flk1 の発現がイヌの皮膚 MCT および皮膚 MC の分化・成熟の制御に関与している可能性が示された。そこで、最後に（第 5 章「**mBMMC における VEGF-A と Flk1 の発現と分化に対する作用**」）、MC の分化に対する VEGF-A/Flk1 シグナリングの作用をより詳細に明らかにするために、マウス骨髄由来の初代培養 MC (mBMMC) を用いて、MC の分化過程における VEGF-A および Flk1 の発現と、MC の分化に伴って増加する c-Kit および MC トリプターゼ、MC 系統への分化を誘導する転写因子 GATA2 および MITF の発現との関連性を検討した。その結果、*vegf* と *Flk1* mRNA の発現は培養 3 週から認められ 4 週で有意に増加しその後減少した。また、*vegf* と *Flk1* mRNA の減少後、5 週目から *GATA2* mRNA の発現が増加した。さらに培養 3.5 週の mBMMC に Flk1 inhibitor を添加した結果、*gata2* mRNA の有意な増加が認められた。このことから、VEGF-A/Flk1 シグナリングは主に GATA2 の発現を抑制することによって MC の分化・成熟を制御している可能性が示唆された。

【総括】

本研究では、イヌの皮膚 MCT における組織学的悪性度および分化度に対する VEGF-A と VEGFRs の関与を明らかにすることを目的として研究を行なった。その結果、VEGF-A および VEGFRs の一つである Flk1 を発現する MCT は、細胞分化度が低く悪性度の高い腫瘍であることが明らかになった。さらに Flk1 は、未成熟 MC が皮膚で分化・成熟する過程において GATA2 の発現を抑制することで MC の分化を制御していることが示唆された。これらの研究から、イヌの皮膚 MCT においても、VEGF-A/Flk1 シグナリングが MC の転写因子 GATA2 の発現を制御することによって未成熟 MC の形質をそのまま維持させ、この結果 MCT の悪性形質発現に生じている可能性が示された。この機構を抑制することが、イヌ MCT の悪性化を制御するための新しい戦略につながる可能性が考えられる。