

犬のクッシング病の診断・治療に関する研究

(Studies on the diagnosis and treatment of canine Cushing's disease)

佐藤 朝香

犬のクッシング病の診断・治療に関する研究

(Studies on the diagnosis and treatment of canine Cushing's disease)

佐藤 朝香

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教授 原 康)

平成 28 年 3 月

目次

第1章 序論	4
第2章 クッシング病罹患犬における magnetic resonance imaging に基づいた経蝶形骨下垂体切除術適応基準に関する検討	
2-1 緒言	9
2-2 材料および方法	
2-2-1 対象症例	10
2-2-2 クッシング病の診断基準	10
2-2-3 経蝶形骨下垂体切除術	11
2-2-4 MRI に基づいた ACTH 産生性下垂体腫瘍の Grade 分類法	11
2-2-5 P/B value の計測	12
2-2-6 ACTH 産生性下垂体腫瘍の完全切除率および再発率の算出	12
2-2-7 統計学的検討方法	12
2-3 結果	
2-3-1 経蝶形骨下垂体切除術を実施したクッシング病罹患犬の Grade 分布	13
2-3-2 各 Grade 間における内分泌学的検査の比較	13
2-3-3 Grade 分布と P/B value の比較	14
2-3-4 各 Grade における完全切除率および再発率の比較	14
2-4 考察	15
2-5 小括	18
図および表	

第3章 健康成犬およびACTH産生性下垂体腺腫における bone morphogenetic protein 4 および bone morphogenetic protein receptor の発現に関する検討

3-1 緒言	25
3-2 材料および方法	
3-2-1 Quantitative PCR に使用した供試犬および対象症例	26
3-2-2 免疫組織学的検討に使用した供試犬および対象症例	26
3-2-3 <i>BMP4</i> , <i>BMPR I A</i> , <i>BMPR I B</i> , <i>BMPR II</i> mRNA の Quantitative PCR	27
3-2-4 BMP4 および BMPR II の二重蛍光免疫染色	28
3-2-5 統計学的検討方法	29
3-3 結果	
3-3-1 健康成犬下垂体およびACTH産生性下垂体腺腫における <i>BMP4</i> , <i>BMPR I A</i> , <i>BMPR I B</i> , <i>BMPR II</i> mRNA の発現比較	30
3-3-2 健康成犬下垂体における BMP4 の免疫組織学的発現	30
3-3-3 健康成犬下垂体における BMPR II の免疫組織学的発現	30
3-3-4 ACTH産生性下垂体腺腫における BMP4 および BMPR II の二重蛍光免疫染色	31
3-4 考察	31
3-5 小括	34
図および表	

第4章 健康成犬およびACTH産生性下垂体腺腫における somatostatin receptor 2, somatostatin receptor 5 および dopamine D2 receptor の発現に関する免疫組織学的検討

4-1 緒言	42
--------	----

4-2 材料および方法	
4-2-1 供試犬および対象症例	44
4-2-2 ACTH および SSTR2, SSTR5, DA2R, α -Melanocyte-stimulating Hormone の二重蛍光免疫染色	45
4-2-3 P/B value の計測	48
4-3 結果	
4-3-1 健常成犬下垂体 ACTH 陽性細胞における SSTR2, SSTR5 および DA2R 陽性細胞 数の割合	48
4-3-2 ACTH 産生性下垂体腺腫における SSTR2, SSTR5 および DA2R の発現	48
4-4 考察	49
4-5 小括	51
図および表	
第5章 総括	60
謝辞	67
参考文献	68

第1章 序論

犬における自然発生性副腎皮質機能亢進症の原因はその約 80-85%が Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) 産生性下垂体腺腫に起因する下垂体依存性副腎皮質機能亢進症 (Pituitary dependent hypercortisolism; PDH) であり、クッシング病とも呼ばれる。犬の下垂体組織は、下垂体前葉、中間葉、および後葉の3葉構造で構成されており、犬の ACTH 産生性下垂体腺腫の発生は下垂体前葉もしくは中間葉に由来する (Hammer *et al.* 2004, Taoda *et al.* 2011)。犬の ACTH 産生性下垂体腺腫の約 70%が下垂体前葉の ACTH 産生細胞由来であり、約 30%が下垂体中間葉由来である (Halmi *et al.* 1981, Peterson *et al.* 1982)。また、犬の ACTH 産生性下垂体腫瘍の多くは良性の腺腫であり、腺癌の発生は5%程度である (Feldman & Nelson 2004)。コルチゾール産生性副腎皮質腫瘍を原因とする副腎性副腎皮質機能亢進症の発生率は 15-20%である。 (Feldman & Nelson 2004)。ヒトにおいては下垂体以外の組織に発生する異所性 ACTH 産生性副腎皮質機能亢進症が、副腎皮質機能亢進症の約 5-15%を占めるとされているが (Baylin *et al.* 1980, Wajchenberg *et al.* 1994, Isidori *et al.* 2006)、犬における報告は一例のみである (Galac *et al.* 2005)。クッシング病の発生率はヒトでは年間 1,000,000 人に 2-3 人である一方 (Etxabe *et al.* 1994, Lindholm *et al.* 2001)、犬では年間 1,000 頭につき 1-2 頭の発生率であり (de Bruin *et al.* 2008)、犬におけるクッシング病の発生率がヒトの 1000 倍高いことは興味深い。

クッシング病の症状は多様であり、腫瘍化した ACTH 産生細胞からの過剰な ACTH 分泌の結果、両側副腎皮質の過形成および高コルチゾール血症が引き起こされ、多飲多尿、多食、腹囲膨満および皮膚病変などの様々な臨床症状が発現する。これらの臨床症状のうち多飲多尿は副腎皮質機能亢進症における最も一般的な症状である。多食は副腎皮質機能亢進症において頻繁に認められる症状であるが、巨大な下垂体腫瘍を伴う症例では反対に、視床下部の圧迫に伴い食欲が低下もしくは消失する場合もある。腹囲膨満は、コルチゾールによる腹腔内脂肪の増加、肝腫大および腹部筋力の低下が

原因である。また皮膚症状としては脱毛、皮膚の菲薄化、免疫系の抑制に伴った膿皮症および毛包虫症が併発することが多い。さらに、副腎皮質機能亢進症罹患犬では高コルチゾール血症によるインスリン抵抗性のために糖尿病を併発しやすい他、血栓塞栓症を併発することもある (Ishino *et al.* 2010, Feldman & Nelson 2004, Teshima *et al.* 2008)。特筆すべきこととしては、下垂体腫瘍の成長に伴い周辺神経組織への圧排および侵襲といった頭蓋内占拠性病変としての性質を帯び、神経症状が引き起こされることである。症状としては鈍化あるいは凶暴性といった性格の変化、運動失調、徘徊、さらにまれではあるものの眼振、旋回運動、ヘッドプレッシング、失明、発作、昏睡などの神経症状が認められることがある。

近年、Computed tomography (CT) および Magnetic resonance imaging (MRI) の小動物臨床領域への導入により、下垂体の形態を詳細に評価することが可能となった。犬における巨大腺腫 (直径 $\geq 10\text{mm}$) の発生頻度は 10-20%と、微小腺腫 (直径 $< 10\text{mm}$) の発生頻度が高いことが知られている (Bertoy *et al.* 1996, LeCouteur *et al.* 2007)。また、犬における巨大腺腫の約 10%は非機能性下垂体腫瘍であったと報告されている (Feldman & Nelson 2004)。現在では犬の下垂体腫瘍サイズを評価する指標として 1997 年に Kooistra *et al.* によって提唱された pituitary gland height-to-cross sectional area of the brain (P/B) value (P/B value) が一般的に使用されている。これは犬の体格差にとらわれることなく客観的に下垂体サイズを評価するための指標であり、 $\text{P/B value} \leq 0.31\text{mm}^{-1}$ を下垂体の腫大なし、 $\text{P/B value} > 0.31\text{mm}^{-1}$ を下垂体の腫大ありと判定する。 P/B value による評価を行った場合、犬では約 60%の下垂体腫瘍が腫大を伴うことが知られている (Kooistra *et al.* 1997)。

現在クッシング病の治療として医学領域、獣医学領域ともに、内科治療、外科治療、放射線治療が実施されている。医学領域では通常顕微鏡下あるいは内視鏡下による経鼻蝶形骨洞手術による下垂体腫瘍組織の摘出がクッシング病の第一に選択される治療方法であり、最も有効な治療手段として認識されている (Shimon *et al.* 2002, Barker *et al.* 2003, Hammer *et al.* 2004, Atkinson *et al.* 2005, Hofman *et al.* 2008)。しかしながら、下垂体腫瘍の周囲への組織浸潤が著しい場合や腫瘍の再発に対しては放射線治療が適応され

る (Mahmound-Ahmed *et al.* 2002, Vance *et al.* 2005)。一方、獣医学領域においてクッシング病は内分泌疾患としての側面が大きく捉えられ、薬物療法を中心とした治療が主に行われているが、治療選択を行う際には下垂体腫瘍サイズを考慮することが重要である。すなわち初期治療の段階で画像診断により下垂体サイズの評価を行い、下垂体の腫大が認められた場合には、外科治療や放射線治療を考慮するべきである。

現在、犬のクッシング病に対する内科治療には副腎毒性を示す op' -DDD (ミトタン) や 3β -hydroxysteroid dehydrogenase 阻害剤であるトリロスタンといった薬剤が一般的に用いられており、副腎皮質におけるコルチゾール産生および分泌を抑制し、臨床症状を改善することを目的として使用されている。近年では副作用の発現が少ないことからトリロスタンが内科治療の主体として使用されており、その有用性が多数報告されている (Peterson *et al.* 2001, Neiger *et al.* 2002, Baker *et al.* 2003, Braddock *et al.* 2003, Alenza *et al.* 2006, Reine *et al.* 2007)。しかしながら、これらの薬剤により ACTH 産生性下垂体腫瘍の成長が助長される危険性が指摘されている。医学領域において、クッシング病患者に両側副腎切除を実施した場合、下垂体腺腫の成長が助長され Nelson 症候群が引き起こされることが知られている (Nelson *et al.* 1960, Barnett *et al.* 1983, Kasperlikz-Zatuska *et al.* 1983, Kelly *et al.* 1983, Thomas *et al.* 1983, Thomas *et al.* 1984, Pereira *et al.* 1998)。また、医学領域においてコルチゾール分泌抑制薬が使用される機会は少ないが、コルチゾール分泌抑制薬投与の結果、下垂体腺腫の成長が助長される可能性があり、この現象は Chemical Nelson 症候群と呼ばれている (Teramoto 2001)。ゆえに、下垂体腫瘍のサイズを考慮せず内科治療を実施した場合、下垂体腫瘍の成長に伴い神経症状が発現し、さらには生命に危険を及ぼす可能性が考えられる。

獣医学領域においても Rijnberk *et al.* (1968) の報告に始まり、Meij *et al.* (1987) により現在獣医学領域において実施されている経蝶形骨下垂体切除術が導入され、良好な治療成績が報告されている (Meij *et al.* 1998, Hanson *et al.* 2005, Hara *et al.* 2010, Mamelak *et al.* 2014)。その手術方法はヒトのそれとは異なり、手術用拡大鏡を用い口腔内および鼻腔から蝶形骨にアプローチし、ACTH 産生性下垂体腫瘍の摘出を行う。下垂体腫瘍サイズが小さいほど術後成績が良いことが報告されており、P/B value も予

後に影響することが知られている (Hanson *et al.* 2005)。経蝶形骨下垂体切除術による予後は良好であり、獣医学領域においても本手術によるクッシング病の治療が増えてきている。また近年経蝶形骨下垂体切除術の変法として high definition video telescope を使用した下垂体切除術が Mamelak *et al.* (2014) から報告された。しかしながら手術適応となる下垂体腫瘍サイズについて明確な基準が設けられていないため、手術適応の判断は術者の判断に依存するところが多い。また、犬ではヒトと異なり下垂体腫瘍のみの切除が困難であり、正常下垂体組織も含めた下垂体全切除が実施されるため、術後の抗利尿ホルモン、甲状腺ホルモン、コルチコステロイドのホルモン補充療法が全症例で必須となる。このうち、抗利尿ホルモンは通常術後 1-2 週間程度で回復が認められるが (Hara *et al.* 2003)、甲状腺ホルモンおよびコルチコステロイドは生涯投薬が必須となる。

獣医学領域においても放射線治療によるクッシング病の治療が増加しており、メガボルテージを用いた放射線療法では、下垂体腫瘍の縮小が期待できるとされている (Goossens *et al.* 1998, Feldman *et al.* 2004, Kent *et al.* 2007)。しかしながら、放射線治療単独では高コルチゾール血症を管理することは難しく、内科療法の併用が必要である。さらに、放射線治療では組織診断を行うことが現実的に困難であるという問題点が挙げられる。

獣医学領域におけるクッシング病治療では、クッシング病罹患犬の多くが治療導入時ではなく、ACTH 産生性下垂体腺腫の成長が進んだ段階で MRI 検査が実施されることが多い。よって内分泌学的異常の改善および頭蓋内占拠性病変の摘出という二つの目的のために外科治療が選択される場合がある。しかしながら現時点ではどの程度のサイズまで手術によるクッシング病の根治が可能かという点が明らかになっていない。すなわち、外科治療を選択した場合であっても、不完全切除や術後に再発が起こった場合には放射線治療や内科治療がさらに必要となるが、その可能性を明確に提示出来る指標が存在しない。さらに、MRI 撮影時に手術による根治が見込める確率が非常に低いことが予測される場合には、放射線治療が適応となる可能性がある。ゆえに本検討では、現在犬で実施されている経蝶形骨下垂体切除術の MRI に基づいた手術適応基

準を新たに提案し、予後評価に使用することを第一の目的とした。

さらに本検討では、アメリカおよび EU において手術不適応あるいは手術が不奏効であった成人クッシング病患者に対して新たに承認されたパシレオチド および、ソマトスタチンアナログの中で有効性が期待されているオクトレオチドおよびランレオチドの作用起点となるソマトスタチン受容体 (Somatostatin receptor; SSTR)、さらにはヒトにおいて ACTH 産生性下垂体腺腫に有効性を示したとの報告がされているドパミンアゴニスト (Pivonello *et al.* 2004, de Bruin *et al.* 2009, Pivonello *et al.* 2009) の作用起点である Dopamine D2 receptor (DA2R) の ACTH 産生性下垂体腺腫における発現を免疫組織学的に同定し、犬の ACTH 産生性下垂体腺腫でのこれらの薬剤の臨床応用へ向けた可能性を模索することを目的とした。またマウス下垂体腺癌由来 ACTH 産生細胞である AtT20 細胞において、ソマトスタチンアナログはその作用機序の 1 つとして ACTH 産生細胞の Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) シグナルを増強することにより間接的に ACTH の産生抑制に関与していることが報告されている (Tsukamoto *et al.* 2010)。BMP4 は胎児期の下垂体形成に重要な形態形成タンパク質であり、ACTH 産生細胞における BMP4 シグナルは ACTH の産生、細胞分化および腫瘍化を抑制する (Labeur *et al.* 2010, Giacomini *et al.* 2006, Otsuka 2013)。よって本検討ではさらにこの BMP4 シグナルに関与する BMP4 および Bone morphogenetic protein receptors (BMPRs) の健常成犬下垂体および ACTH 産生性下垂体腺腫における発現を検討した。

第2章 クッシング病罹患犬における magnetic resonance imaging に基づいた経蝶形骨下垂体切除術適応基準に関する検討

2-1 緒言

過剰なコルチゾール産生を抑制するトリロスタンやミトタンを用いた内科治療は現在犬におけるクッシング病の主流となる治療方法である一方、医学領域では外科治療による ACTH 産生性下垂体腫瘍の摘出が治療の第一選択となっている (Barker *et al.* 2003)。

ヒトにおけるクッシング病の外科治療は通常顕微鏡下あるいは内視鏡下による経鼻蝶形骨洞手術である。獣医学領域においても Rijnberk *et al.* (1968) の報告に始まり、Meij *et al.* (1997) により現在実施されている経蝶形骨下垂体切除術が導入され、良好な治療成績が報告されている (Meij *et al.* 1998, Hanson *et al.* 2005, Hara *et al.* 2010)。また経蝶形骨下垂体切除術の変法として high definition video telescope を使用した下垂体切除術も報告されている (Mamelak *et al.* 2014)。しかしながら経蝶形骨下垂体切除術の手術適応を判断できる客観的な基準は未だ明確にされておらず、その適応は術者の判断に依存するところが大きい。

下垂体の大きさを評価する指標として P/B value (Kooistra *et al.* 1997) が獣医学領域において広く使用されている。P/B value は下垂体の高さを脳の断面積により補正することにより、犬種差を超えて下垂体の腫大の有無を評価する指標として報告された。ゆえに、P/B value は経蝶形骨下垂体切除術の手術適応基準として発案されたものではなく、下垂体の腫大を判断するものであるため、現在犬のクッシング病に対する経蝶形骨下垂体切除術の明確な手術適応基準は存在しない。

本検討は経蝶形骨下垂体切除術が施術されたクッシング病罹患犬の頭部 MRI を回顧的に調査することにより ACTH 産生性下垂体腫瘍の形態学的特徴に基づいた Grade 分類法を考案することを目的とした。さらに各 Grade の完全切除率および再発率を明

らかにすることにより本 Grade 分類法による経蝶形骨下垂体切除術の手術適応基準を明確にすることを目的とした。

2-2 材料および方法

2-2-1 対象症例

本学付属動物医療センター脳神経外科に副腎皮質機能亢進症を主訴に来院したクッシング病罹患犬 37 頭 (雄 20 頭、うち去勢雄 7 頭; 雌 17 頭、うち避妊雌 9 頭) を対象症例とし回顧的に調査した。症例の年齢の中央値は 8.0 歳 (range: 4-11 歳)、体重の中央値は 10.2 kg (2.15-25.46kg) であった。

2-2-2 クッシング病の診断基準

クッシング病は ACTH 刺激試験、内因性血漿 ACTH 濃度、副腎超音波検査および頭部 MRI 検査によって診断した。ACTH 刺激試験は 0.25mg の合成 ACTH 製剤 (Cortrosyn®, Daiichi-Sankyo, Tokyo, Japan) を静脈内投与後 1 時間の血清コルチゾール濃度を測定した (Immulite 2000 Immunoassay system; Siemens Japan K.K., Tokyo, Japan)。内因性血漿 ACTH 濃度は安静時に測定を行った (Immulite 2000 Immunoassay system; Siemens Japan K.K., Tokyo, Japan)。ACTH 刺激試験は ACTH 刺激後血清コルチゾール濃度が $22.0 \mu\text{g/dL}$ 以上であることを確認した (Frank *et al.* 2015)。内因性血漿 ACTH 濃度の参考基準値範囲は $5.0\text{-}36.0 \text{ pg/mL}$ とした。副腎の超音波検査では両側の副腎が 6.0mm 以上腫大していることを確認した。頭部 MRI 検査は 1.5 Tesla superconducting MR imaging system (Visart, Toshiba, Tokyo, Japan) あるいは 3.0 Tesla superconducting system (Signa HDxt, GE Healthcare, Tokyo, Japan) により T1 強調、T2 強調、ガドリニウム造影 T1 強調矢状断面、横断面 MR 画像を撮影し、下垂体腫瘍の存在を確認した。また、経蝶形骨下垂体切除術により摘出された下垂体腫瘍はすべてヘマトキシリン・エオジン染色および ACTH 免疫染色を行い ACTH 産生性下垂体腺腫であることを病理学的に

診断した。

2-2-3 経蝶形骨下垂体切除術

経蝶形骨下垂体切除術は過去の報告に準じて実施した (Meij *et al.* 1997)。手術直後より、全症例でヒドロコルチゾン (Hydrocortone, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan; 1 mg/kg i.v., 4 times daily)、酢酸デスマプレシン (Desmopressin, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan; 0.1 µg/kg s.c./or 1 drop into the conjunctival sac, SID-BID) (Hara *et al.* 2003) を使用したホルモン補充療法を開始した。症例が飲食可能となった後はヒドロコルチゾンを中止し、プレドニゾン (Predonine, Shionogi & Co., Ltd., Osaka, Japan; 0.5 mg/kg per oral [p.o.], twice daily [BID]) に変更し、レボサイロキシシン (Thyradin-S, Aska Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan; 20 µg/kg, p.o., BID) の投与を開始した。酢酸デスマプレシンの投与は約2週間実施し、尿崩症の改善が認められない症例では投与を継続した。経蝶形骨下垂体切除術を実施した症例のうち8頭で1ヵ月以上の長期にわたり酢酸デスマプレシンの投与が必要となった。

2-2-4 MRI に基づいた ACTH 産生性下垂体腫瘍の Grade 分類法

下垂体腫瘍の伸展の評価には頭尾側方向および背側方向に最も下垂体腫瘍が伸展したガドリニウム造影 T1 強調矢状断面および横断面 MR 画像を使用した。MRI の撮影条件は 1.5 Tesla MRI 撮影装置を使用した場合では slice thickness 2 mm, interslice gap 0 mm, matrix 160 × 256, field-of-view 12 cm, 3.0 Tesla MRI 撮影装置を使用した場合では slice thickness 2 mm, interslice gap 0mm, matrix 320 × 256, field-of-view 15 cm であった。視交叉および乳頭体への下垂体腫瘍の伸展を頭尾側方向への下垂体腫瘍の伸展、鞍背、第三脳室および視床間橋への下垂体腫瘍の伸展を背側方向の伸展として評価を行った (Figure 2-1)。さらに下垂体腫瘍の Willis 動脈輪および海綿静脈洞の巻き込みも同様にガドリニウム造影 T1 強調横断面 MR 画像を用いて評価した。

下垂体腫瘍はその伸展段階により 5 つの Grade に分類した。すなわち、Grade 1 は鞍背を超えない下垂体腫瘍、Grade 2 は鞍背を超え、第三脳室への伸展が認められるが、

視交叉およびあるいは乳頭体、視床間橋への接触が認められない下垂体腫瘍、Grade 3 は鞍背を超え視交叉およびあるいは乳頭体への接触が認められるが視床間橋への接触は認められない下垂体腫瘍、Grade 4 は鞍背を超え、視交叉およびあるいは乳頭体、視床間橋への接触が認められる下垂体腫瘍、Grade 5 は第三脳室を占拠する下垂体腫瘍とした。さらに血管の巻き込みを評価するために、Grade 1-5 のすべての Grade に対して、さらに2つの Type に分類した。すなわち、Type A は Willis 動脈輪あるいは海綿静脈洞の巻き込みがない下垂体腫瘍、Type B は Willis 動脈輪あるいは海綿静脈洞の巻き込みがある下垂体腫瘍とした (Table 2-1, Figure 2-1)。

2-2-5 P/B value の計測

P/B value は過去の報告に従って、AZE virtual place software (Virtual Place®, AZE, Tokyo, Japan) を使用してガドリニウム造影 T1 強調横断面 MR 画像を使用して計測した (Kooistra *et al.* 1997)。 P/B value $>0.31 \text{ mm}^{-1}$ を下垂体の腫大有り、P/B value $\leq 0.31 \text{ mm}^{-1}$ を下垂体の腫大無しとして評価した (Kooistra *et al.* 1997)。

2-2-6 ACTH 産生性下垂体腫瘍の完全切除率および再発率の算出

手術直後に撮影した T1 強調, T2 強調およびガドリニウム造影 T1 強調 MR 画像を評価することにより完全切除および不完全切除の判定を実施した。さらに内因性血漿 ACTH 濃度および ACTH 刺激後血清コルチゾール濃度が術後 1 週間以内に参考基準値内に減少した症例を完全切除とした (参考基準値: ACTH 刺激後血清コルチゾール濃度 $\leq 22.0 \text{ } \mu\text{g/dL}$, 内因性血漿 ACTH 濃度 $\leq 36.0 \text{ pg/mL}$)。

内因性血漿 ACTH 濃度 $>36.0 \text{ pg/mL}$, ACTH 刺激後血清コルチゾール濃度が $>22.0 \text{ } \mu\text{g/dL}$ あるいはガドリニウム造影 T1 強調 MR 画像で下垂体腫瘍が確認された場合、再発と判断した。定期検診は術後 1, 3, 6 ヶ月、その後半年ごとに実施した。

2-2-7 統計学的検討方法

統計学的検討は Social Sciences Software (SPSS version 16.0J; SPSS Inc., Tokyo, Japan)

を使用した。Shapiro-Wilk 検定にて正規性を検討し、Leven's testにて等分散性を検討し、等分散であった場合には Student's *t*-testにて2群間の比較を行った。 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

時間事象分析は Kaplan-Meierにて実施した。生存期間は経蝶形骨下垂体切除術を実施してから死亡するまでの期間とした。生存中あるいは術後追跡を離脱した症例はその時点で打ち切りとした。完全切除および不完全切除症例、再発症例と非再発症例の下垂体高および P/B value は平均±標準偏差で示した。各 Grade における P/B value、再発までの期間、術後追跡期間および術後生存期間は中央値で示した。

2-3 結果

2-3-1 経蝶形骨下垂体切除術を実施したクッシング病罹患犬の Grade 分布

クッシング病に対する外科治療を希望し本学付属動物医療センター脳神経外科に来院し MRI を撮影した 37 頭のうち 4 頭は Grade 5B に属しており、経蝶形骨下垂体切除術による下垂体腫瘍の完全切除が困難であると判断され、他の治療方法が選択された。したがって本検討では経蝶形骨下垂体切除術を実施した Grade 1-4 に属する 33 症例に焦点を当てて検討を行った。

33 症例のうち 3 症例が Grade 1A, 3 症例が Grade 2A, 23 症例が Grade 3A, 2 症例が Grade 3B そして 2 症例が Grade 4B に属していた (Table 2-2)。Grade 1B, 2B および 4A に該当する症例は本検討の対象となった 37 症例には存在しなかった。

2-3-2 各 Grade 間における内分泌学的検査の比較

術前の安静時および ACTH 刺激後血清コルチゾール濃度に関して各 Grade 間に顕著な差は認められなかった (Table 2-2)。Grade 3 および Grade 4 に属する症例の内因性血漿 ACTH 濃度は参考基準値 (≤ 36.0 pg/mL) と比較して高値を示した (Table 2-2)。また、下垂体腫瘍が完全に切除された症例の安静時および ACTH 刺激後血清コルチゾール

濃度も各 Grade 間で顕著な差は認められなかった (Table 2-3)。さらに各 Grade において下垂体腫瘍が完全に切除された症例では術前と比較して術後の安静時および ACTH 刺激後血清コルチゾール濃度および内因性血漿 ACTH 濃度の顕著な減少が認められた。一方で、不完全切除となった 4 症例では、内分泌学的な改善が乏しく、特に内因性血漿 ACTH 濃度において改善が乏しかった (Table 2-3)。

2-3-3 Grade 分布と P/B value の比較

Grade 1A の 2 症例および Grade 2A の全症例において P/B value $\leq 0.31 \text{ mm}^{-1}$ であり下垂体の腫大は認められなかった。しかしながら、Grade 3 に属する 25 症例のうちの 24 症例および Grade 4 の 2 症例では P/B value $> 0.31 \text{ mm}^{-1}$ であり下垂体の腫大が認められた。さらに 33 症例中 6 症例 (Grade 3A: 3/23 症例, Grade 3B: 1/2 症例, Grade 4B 2/2 症例) では下垂体高 10mm 以上の巨大腺腫であった。各 Grade における P/B value は Grade 1A, 中央値 = 0.26 mm^{-1} (range: $0.23\text{--}0.32 \text{ mm}^{-1}$); Grade 2A, 中央値 = 0.28 mm^{-1} (range: $0.24\text{--}0.31 \text{ mm}^{-1}$); Grade 3A, 中央値 = 0.43 mm^{-1} (range: $0.31\text{--}0.69 \text{ mm}^{-1}$); Grade 3B, 中央値 = 0.63 mm^{-1} (range: $0.55\text{--}0.71 \text{ mm}^{-1}$); Grade 4B, 中央値 = 0.81 mm^{-1} (range: $0.78\text{--}0.83 \text{ mm}^{-1}$) であった。下垂体高および P/B value は完全切除の症例と比較して不完全切除の症例で有意に高値を示した (11.4 ± 4.1 versus $6.9 \pm 1.9 \text{ mm}$, $P = 0.001$ および 0.68 ± 0.20 versus $0.44 \pm 0.13 \text{ mm}^{-1}$, $P = 0.004$)。また不完全切除となった 4 症例中 3 症例は下垂体高 10 mm 以上であった。しかしながら、寛解症例と再発症例の下垂体高および P/B value には有意差は認められなかった (寛解症例下垂体高: $6.9 \pm 1.9 \text{ mm}$ および P/B value : $0.42 \pm 0.13 \text{ mm}^{-1}$, 再発症例下垂体高: $8.3 \pm 3.5 \text{ mm}$ および P/B value : $0.54 \pm 0.12 \text{ mm}^{-1}$)。

2-3-4 各 Grade における完全切除率および再発率の比較

経蝶形骨下垂体切除術が実施された 33 症例のうち 29 症例 (87.9%) で下垂体腫瘍の完全切除が可能であった。すなわち、Grade 1A、Grade 2A の各 3 症例、Grade 3A の 23 症例中 22 症例および Grade 3B の 2 症例中 1 症例で下垂体腫瘍は完全に切除された。しかしながら Grade 4B の 2 症例は不完全切除となった (Table 2-4)。Grade 1A, 2A およ

び3Aに属する29症例中28症例(96.6%)において下垂体腫瘍の完全切除が成し遂げられた。しかしながらGrade 3BおよびGrade 4Bの4症例のうち完全切除が可能であった症例は1症例のみであった。

さらに、完全切除であった29症例のうち4症例で再発が認められた(13.8%)。これらの症例は完全切除であったGrade 3Aの22症例中3症例およびGrade 3Bの1症例で認められた(Table 2-4)。

術後再発までの期間の中央値は8ヵ月(range: 3-12ヵ月)であった。対象症例中、5頭が死亡し、これらの症例の術後生存期間の中央値は45日(range: 16-1233日)であった。さらにGradeが上がるに従って、生存期間が短くなることが明らかとなった(Figure 2-2)。対象症例の術後追跡期間の中央値は290日(range: 14-2885日)であった。

2-4 考察

医学領域では下垂体腫瘍の伸展や血管の巻き込みを評価することによる下垂体腫瘍の分類方法としてKnosp分類およびHardy分類が使用されている(Knosp *et al.* 1993, Di Ieva 2014)。これらの分類は治療の予後評価にも使用されている(Kim *et al.* 2009, Ramm-Petersen *et al.* 2011, Hong *et al.* 2013)。経蝶形骨下垂体切除術を実施する上でクッシング病罹患犬の手術適応となる症例の選択は重要である。従って、本検討では医学領域で用いられている下垂体腫瘍の形態学的特徴を基準とした分類基準に相当する犬の下垂体腫瘍分類法を新たに考案した。

本検討により経蝶形骨下垂体切除術の手術適応基準を明確にすることが可能となった。経蝶形骨下垂体切除術により治療を受けたクッシング病罹患犬の下垂体腫瘍完全切除率は87.9%であり、再発率は13.8%であった。Grade 1AおよびGrade 2Aに属する症例は不完全切除および再発のリスクは低かったが、症例数が最も多いGrade 3Aでは不完全切除および再発のリスクを伴うことが明らかになった。しかしながらGrade 1A-3Aの症例を経蝶形骨下垂体切除術の適応として考えた場合、完全切除率は96.6%

に上昇し、再発率は 10.7%に低下した。Grade 3B に属した 2 症例はともに不完全切除あるいは術後に再発が認められた。ゆえに、Type A, Grade 1-3 の症例を経蝶形骨下垂体切除術の手術適応とすることにより、経蝶形骨下垂体切除術による良好な予後が期待出来ることが示唆された。

Grade 4B に属する症例では完全切除は困難であることも同時に示唆された。経蝶形骨下垂体切除術を実施する際の蝶形骨の術野は非常に狭く、ゆえに背側方向の下垂体腫瘍を確認することが難しいこと、また海綿静脈洞あるいは Willis 動脈輪の巻き込みがあった場合には下垂体腫瘍への積極的なアプローチが難しく、特に Willis 動脈輪からの出血は致命的となることが要因であると考えられる。

Grade 3B 以上の症例では経蝶形骨下垂体切除術による治療は下垂体腫瘍の減容積となることが推察され、術後の放射線治療が必要となることも合わせてインフォームドコンセントをする必要があると考えられる。これらの症例では初期治療として放射線治療が第一選択となるかもしれない。しかしながら、放射線治療は複数回の全身麻酔が必要であるがゆえに個々の症例で最適な治療方法を検討する必要がある。近年、下垂体腫瘍に対する定位的放射線治療が報告されたことから (Mariani *et al.* 2013)、将来的には下垂体腫瘍に対する放射線治療の全身麻酔の回数を減らすことが可能となることが予測される。一方で、*macroadenoma/macrocarcinoma* に対してミトタンを投与した症例で神経症状が進行したことが報告されており (Nelson *et al.* 1989)、Grade 3B 以上の症例ではコルチゾール分泌抑制薬による内科治療は不適切であると考えられる。近年 Mamelak *et al.* (2014) により報告された *high-definition video telescope* を使用した下垂体切除術により下垂体腫瘍の背側方向の評価がより容易となり、Grade が高い症例の完全切除率も向上するかもしれない。さらに現在 ACTH 産生性下垂体腺腫に直接作用する薬剤としてソマトスタチンアナログであるパシレオチドが医学領域において手術不応あるいは手術が不奏効であった成人クッシング病患者において認可されている。したがって、将来的には獣医学領域においても不完全切除症例や再発症例に対して、パシレオチドの受容体である *somatostatin receptor* の病理学的診断に基づいた選択的化学療法が可能となるかもしれない。

本検討のうち4症例はGrade 5Bに分類され、経蝶形骨下垂体切除術の適応外であるとMRIを撮影した段階で判断した。これはWillis動脈輪および海綿静脈洞の巻き込みにより、術中および術後の出血リスクが非常に高いことが予測されたこと、そして間脳構造の破壊による高体温、高ナトリウム血症による死亡リスク高いことが術前に予測されたためである (Marino *et al.* 2014)。Grade 5Bの症例のうち1症例は放射線治療を受けたが、他の3症例は回顧的調査のためその後の治療は不明であった。

CTの高分解能は経蝶形骨下垂体切除術の骨のランドマークを評価することに有用である一方、MRIはCTと比較してコントラスト分解能に優れている。P/B valueは一般的にCTを使用して計測されるが、MRIを用いて計測してもCTでの測定値と有意差がないことが報告されている (Auriemma *et al.* 2009)。P/B valueと本Grade分類は根本的に異なる目的で発案された指標である。P/B valueが高値になるにつれてGradeも高くなるが、同一のP/B valueであっても同一のGradeに常に属する訳ではない。ゆえに、P/B valueを手術適応基準の判断に使用することは困難である。しかしながらGrade 1AおよびGrade 2Aを合わせた6症例中5症例がP/B value ≤ 0.31 の非腫大下垂体腫瘍であったのに対して、Grade 3Aでは1症例を除いたすべての症例でP/B value > 0.31 の腫大した下垂体腫瘍であった。過去の報告では寛解率は非腫大の下垂体腫瘍でより高く、再発率は腫大した下垂体腫瘍で高いことが報告されている (Hanson *et al.* 2007)。すなわち、Grade 3以上の症例ではもともと非寛解のリスクを持っていることが示唆された。

本検討ではGrade 1B, Grade 2B および Grade 4Aの症例は含まれていなかった。おそらくこれらのGradeに属する症例は稀であることが予測されるが、すべての症例に対して本Grade分類が適応可能となることを目的とし、これらのGradeも本Grade分類に含めた。Grade 1B, Grade 2B および Grade 4Aの症例はおそらく根治は困難であることが予測されるが、本検討ではこれらのGradeに属する症例が存在しなかったためその予後は不明である。

2-5 小括

新たに下垂体腫瘍の **Grade** 分類法を考案したことにより、経蝶形骨下垂体切除術の手術適応基準を明らかにした。すなわち、**Type A, Grade 1-3** に属する症例では良好な予後が期待でき、経蝶形骨下垂体切除術によるクッシング病の治療が推奨される。

Table 2-1. Magnetic resonance imaging-based pituitary gland classification system in dogs with Cushing's disease

	Extending beyond the dorsum sellae and up to the third ventricle	Touching the optic chiasm and/or mammillary body	Touching the interthalamic adhesion	Occupation of the third ventricle	Involvement of the arterial circle of Willis or the cavernous sinus	
					-	+
Grade 1	-	-	-	-		
Grade 2	+	-	-	-		
Grade 3	+	+	-	-	Type A	Type B
Grade 4	+	+	+	-		
Grade 5	+	+	+	+		

ACTH, adrenocorticotrophic hormone

Table 2-2. Grade distributions and clinical characteristics of 33 dogs with Cushing's disease treated with transsphenoidal hypophysectomy

Grade	Type	Case number	Male	Female	Age (years)	Body weight (kg)	P/B value (mm ⁻¹)	Pre-cortisol (µg/dL)	Post-cortisol (µg/dL)	Basal ACTH (pg/mL)
1	A	3	2	1	8.7 ± 2.0	12.1 ± 5.0	0.27 ± 0.05	6.1 ± 4.9	43.2 ± 3.4	53.1
	B	0	–	–	–	–	–	–	–	–
2	A	3	2	1	7.7 ± 1.6	13.0 ± 5.6	0.28 ± 0.04	7.4 ± 0.3	43.1 ± 15.9	n.d.
	B	0	–	–	–	–	–	–	–	–
3	A	23	14	9	8.4 ± 2.1	10.6 ± 5.4	0.47 ± 0.12	8.5 ± 5.9	44.7 ± 16.8	139.6 ± 125.0
	B	2	1	1	5.0 ± 0.0	14.5 ± 1.0	0.63 ± 0.11	13.0 ± 4.0	75.6 ± 5.1	852.5 ± 879.9
4	A	0	–	–	–	–	–	–	–	–
	B	2	0	2	6.5 ± 2.6	5.7 ± 6.7	0.81 ± 0.04	4.4 ± 2.1	44.4 ± 7.9	214.5 ± 51.6

Data are presented as means ± standard deviations.

ACTH, adrenocorticotropic hormone, n.d., no data

P/B value, pituitary gland height divided by the cross-sectional area of the brain

Pre-cortisol, pre-operative serum basal cortisol concentration (Reference value range: 1.0–7.8 µg/dL)

Post-cortisol, pre-operative serum cortisol concentration at 60 min after the intravenous administration of 0.25 mg of synthetic ACTH

(Reference value: ≤22 µg/dL)

Basal ACTH, pre-operative basal plasma ACTH concentration (Reference value range: 5.0–36.0 pg/mL)

Table 2-3. Hormone values in 33 dogs with Cushing's disease treated with transsphenoidal hypophysectomy

Grade	Type	Complete resection cases				Incomplete resection cases			
		Pre-cortisol ($\mu\text{g/dL}$)	Post-cortisol ($\mu\text{g/dL}$)	Pre-operative basal ACTH (pg/mL)	Post-operative basal ACTH (pg/mL)	Pre-cortisol ($\mu\text{g/dL}$)	Post-cortisol ($\mu\text{g/dL}$)	Pre-operative basal ACTH (pg/mL)	Post-operative basal ACTH (pg/mL)
1	A	0.4 ± 0.3	8.1 ± 8.9	53.1	10.9	–	–	–	–
	B	–	–	–	–	–	–	–	–
2	A	1.0 ± 0.6	6.5 ± 1.7	n.d.	n.d.	–	–	–	–
	B	–	–	–	–	–	–	–	–
3	A	1.7 ± 2.0	7.8 ± 5.8	151.6 ± 125.5	9.7 ± 5.9	5.9	16.6	106	40.8
	B	0.2	0.4	1474	9.4	9.3	20.6	231	56.7
4	A	–	–	–	–	–	–	–	–
	B	–	–	–	–	11.5	28.8	214.5 ± 51.6	125.5 ± 159.1

Data are shown as means \pm standard deviations. n.d., no data

Pre-cortisol, post-operative serum basal cortisol concentration (Reference value range: 1.0–7.8 $\mu\text{g/dL}$)

Post-cortisol, post-operative serum cortisol concentration at 60 min after the intravenous administration of 0.25 mg of synthetic ACTH (Reference value: ≤ 22 $\mu\text{g/dL}$)

Pre-operative basal ACTH, pre-operative basal plasma ACTH concentration (Reference value range: 5.0–36.0 pg/mL)

Post-operative basal ACTH, post-operative basal plasma ACTH concentration (Reference value range: 5.0–36.0 pg/mL)

Table 2-4. Complete resection and recurrence rate stratified according to magnetic resonance imaging grade in 33 dogs with Cushing's disease that underwent transsphenoidal hypophysectomy

Grade	Type	Complete resection rate	Recurrence rate
1	A	3/3	0/3
	B	–	–
2	A	3/3	0/3
	B	–	–
3	A	22/23	3/22
	B	1/2	1/1
4	A	–	–
	B	0/2	–
Total		29/33	4/29

Data are presented as numbers of cases.

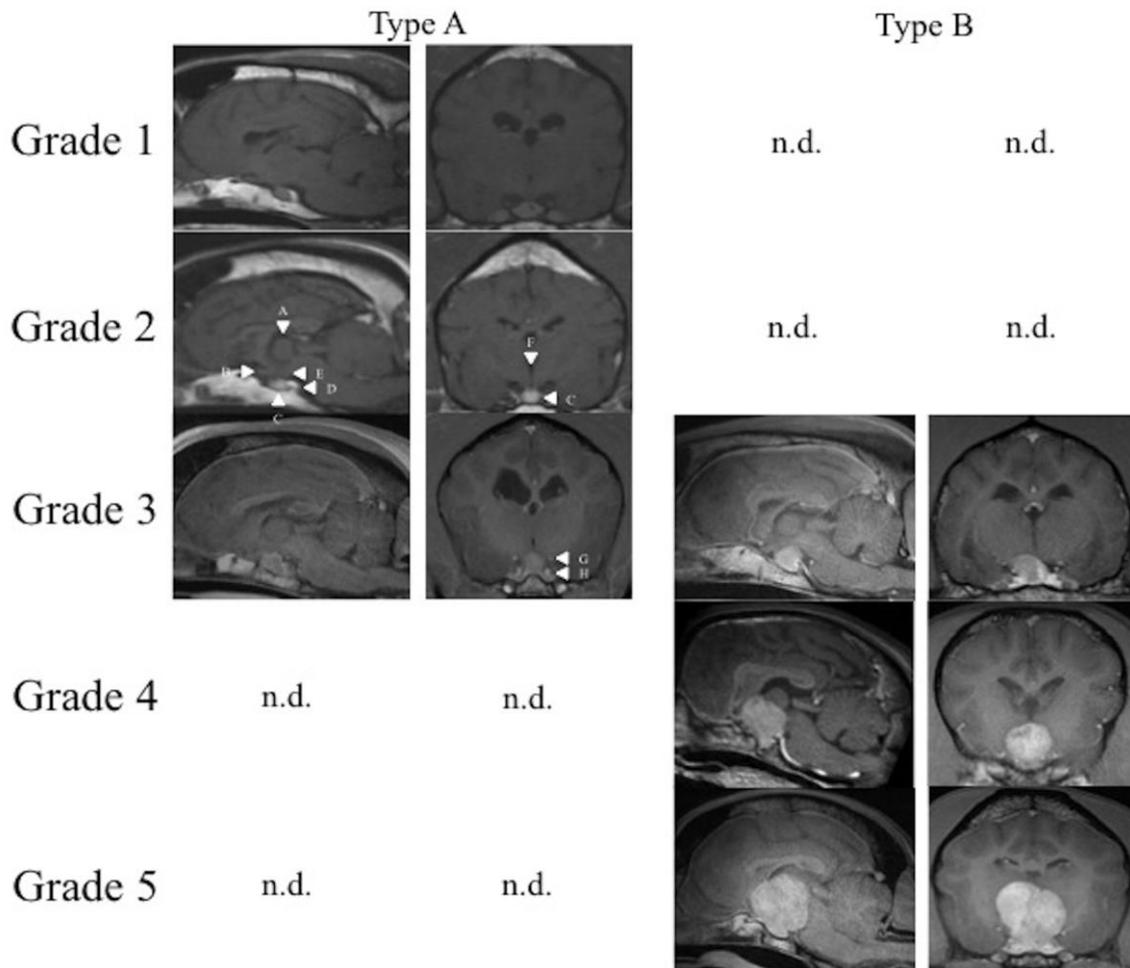


Figure 2-1. Magnetic resonance imaging grade classification system for 37 dogs with Cushing’s disease.

Arrowheads indicate the following anatomic features:

A: Interthalamic adhesion, B: Optic chiasm, C: Pituitary gland, D: Dorsum sellae, E: Mammillary body, F: Third ventricle, G: Arterial circle of Willis, H: Internal carotid artery and surrounding cavernous sinus

n.d., no data

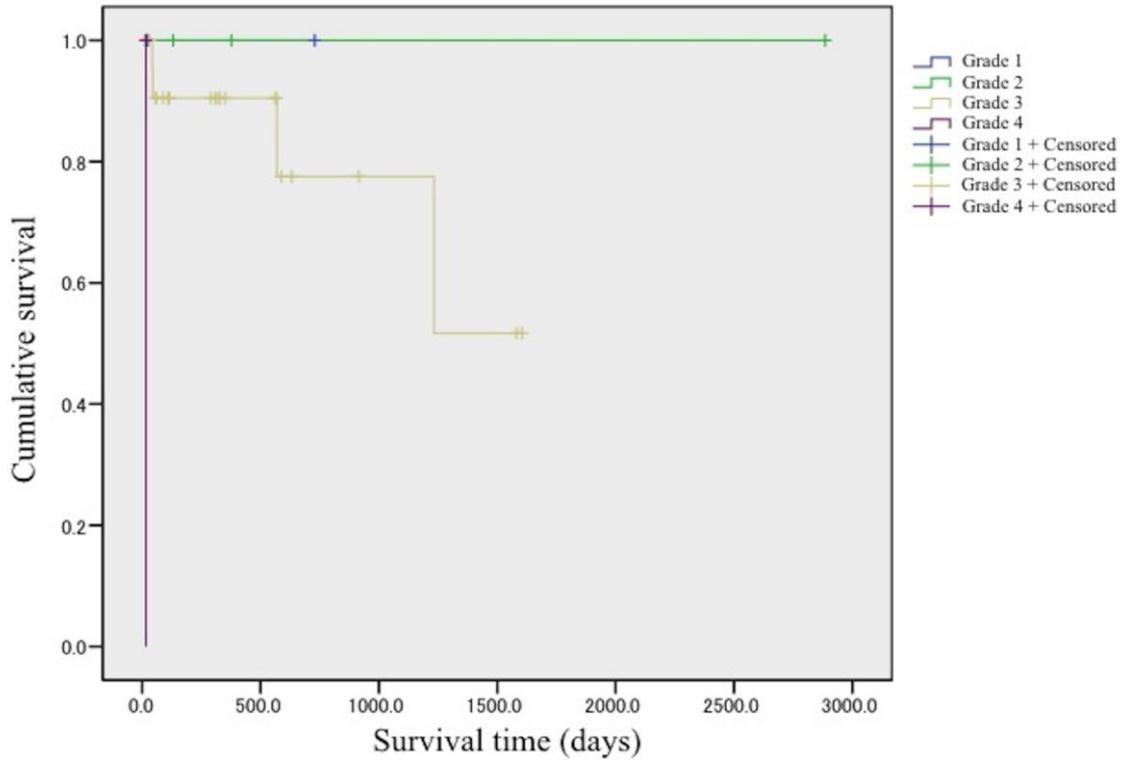


Figure 2-2. Kaplan–Meier analysis of 33 dogs with Cushing’s disease that underwent transsphenoidal hypophysectomy according to grade. Three lines can be observed, because the lines for Grade 1 and Grade 2 are overlapping.

第 3 章 健康成犬および ACTH 産生性下垂体腺腫における bone morphogenetic protein 4 および bone morphogenetic protein receptor の発現に関する検討

3-1 緒言

クッシング病の発生率はヒトでは年間 1,000,000 人に 2-3 人である一方 (Etxabe *et al.* 1994, Lindholm *et al.* 2001)、犬では年間 1,000 頭につき 1-2 頭の発生率である (de Bruin *et al.* 2008)。クッシング病は犬で発生率が高い内分泌疾患であり、疾病モデル動物としての可能性を持っている。また犬の下垂体腫瘍のほとんどは ACTH 産生性下垂体腫瘍であるがヒトではその発生率は下垂体腫瘍の 7.1-15.0% である (Saeger *et al.* 2007, Trouillas 2002)。

Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) は transforming growth factor- β superfamily に属している多機能性分泌蛋白であり、下垂体の組織発生や細胞分化にも関連している (Davis *et al.* 2007)。マウス下垂体腺癌由来 ACTH 産生能を有する AtT20 細胞を使用した *in vitro* の検討から、ACTH 産生細胞の BMP4 シグナルは ACTH の産生、細胞分化、腫瘍化を抑制することが報告されている (Giacomini *et al.* 2006, Labeur *et al.* 2010, Otsuka 2013)。BMP4 シグナルははじめに BMP4 が Bone morphogenetic receptor (BMPR) II に結合した後、BMPRIA/BMPRIB をリン酸化し、次いで SMAD 1 が SMAD4 と結合して ACTH の分泌および細胞分化を調節する (Labeur *et al.* 2010)。さらに BMP4 は間接的にソマトスタチンアナログやレチノイン酸、ラメルテオンといった ACTH 産生性下垂体腺腫に直接作用することが期待される向下垂体治療薬の作用機序の一部に関連していることが報告されている (Giacomini *et al.* 2006, Tsukamoto *et al.* 2010, Tsukamoto *et al.* 2013)。ヒトの下垂体では、BMP4 は ACTH 産生細胞に発現が認められ、その陽性細胞数は ACTH 産生性下垂体腫瘍組織において減少することが報告されている (Giacomini *et al.* 2006)。

BMP4 シグナルが細胞に入るためには ACTH 産生細胞における BMPR II の発現が必

要である。しかしながら BMP4 および BMPR II の健常成犬下垂体および ACTH 産生性下垂体腺腫組織における発現は明らかになっていない。

本検討は健常成犬下垂体および ACTH 産生性下垂体腺腫における BMP4 および BMPR IA, BMPR IB, BMPR II mRNA の発現を比較すること、そして BMP4 シグナルに重要な BMP4 および BMPR II の ACTH 産生細胞におけるタンパク質の発現を免疫組織学的に明らかにすることを目的とした。

3-2 材料および方法

3-2-1 Quantitative PCR に使用した供試犬および対象症例

Quantitative PCR (qPCR) に対して 5 頭 (雄、うち 2 頭去勢雄) のクッシング病罹患犬の下垂体組織を使用した。検討に使用した下垂体腫瘍組織は本学付属動物医療センターにてクッシング病と診断され経蝶形骨下垂体切除術による外科治療を受けた症例から得た組織のうち、本学付属動物医療センター倫理委員会に承認を受け (承認番号; 25-1)、オーナーからの許可を受けた組織を使用した。クッシング病は ACTH 刺激試験、副腎超音波検査および下垂体の MRI 検査にて診断した (第 2 章 2-2-2 クッシング病の診断基準参照)。経蝶形骨下垂体切除術は過去の報告に従い実施した (Meij *et al.* 1997)。切除した下垂体腫瘍はヘマトキシリン・エオジン染色および ACTH 免疫染色にてすべて ACTH 産生性腺腫であることを確認した。qPCR に使用したクッシング病罹患犬の年齢、体重の中央値はそれぞれ 9.4 歳 (range, 5-11 歳)、12.5kg (range, 2.8-25.5kg) であった。コントロールとして qPCR では 3 頭 (雄) の健常ビーグル成犬の下垂体組織を使用した。これらの下垂体組織は本学倫理委員会の承認を得た、他の目的で安楽死された犬から採取した (承認番号; 26S-23)。qPCR に使用したコントロール犬の年齢、体重の中央値はそれぞれ 1.3 歳 (range, 1-2 歳)、9.3kg (range, 8.7-9.7kg) であった。

3-2-2 免疫組織学的検討に使用した供試犬および対象症例

免疫組織学的検討に対して 12 頭 (未避妊雌 3 頭、避妊雌 4 頭、未去勢雄 3 頭、去勢雄 2 頭) のクッシング病罹患犬の下垂体組織を使用した。検討に使用した下垂体組織は本学附属動物医療センターにてクッシング病と診断され経蝶形骨下垂体切除術による外科治療を受けた症例から得られた下垂体腫瘍組織のうち、本学附属動物医療センター倫理委員会に承認を受け、オーナーからの許可を受けた組織を使用した (承認番号; 25-1)。クッシング病は ACTH 刺激試験, 副腎超音波検査および下垂体の MRI 検査にて診断した (第 2 章 2-2-2 クッシング病の診断基準参照)。経蝶形骨下垂体切除術は過去の報告に従い実施した (Meij *et al.* 1997)。切除した下垂体腫瘍はヘマトキシリン・エオジン染色および ACTH 免疫染色にてすべて ACTH 産生性腺腫であることを確認した。免疫組織学的検討に使用したクッシング病罹患犬の年齢、体重の中央値はそれぞれ 8.6 歳 (range, 5-11 歳)、9.1kg (range, 3.2-22.0kg) であった。

対象として 8 頭 (雌 4 頭、雄 4 頭) のビーグル成犬の下垂体組織を使用した。これらの下垂体組織は本学倫理委員会の承認を得た、他の目的で安楽死された犬から採取した (承認番号; 26S-23)。免疫組織学的検討に使用したコントロール犬の年齢、体重の中央値はそれぞれ 1.4 歳 (range, 1-4 歳)、9.3kg (range, 8.6-10.1kg) であった。

3-2-3 *BMP4*, *BMPRI A*, *BMPRI B*, *BMPRII* mRNA の qPCR

健康成犬およびクッシング病罹患犬から採取した下垂体組織は RNA の抽出まで -80°C で保存した。TRI REAGENT (Molecular Research Center, Inc. Ohio, USA) を使用して RNA の抽出を行い、iCycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Tokyo, Japan) にて Super Script VILO cDNA Synthesis Kit (Life Technologies, California, USA) を使用して RNA から cDNA に逆転写を行った。Thermal Cycler Dice Real-time System MRQ (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) にて qPCR SYBR Green ER qPCR SuperMix Universal (Life Technologies, California, USA) を使用して Real-time PCR を行った。*BMP4*, *BMPRI A*, *BMPRI B*, *BMPRII* mRNA レベルは $\Delta \Delta CT$ 法による相対定量にて算出した。使用したプライマー配列は Table 3-1 に示す。

3-2-4 BMP4 および BMPRII の二重蛍光免疫染色

3-2-4-1 組織の準備

クッシング病罹患犬から採取した下垂体組織および正常下垂体組織は 4%パラホルムアルデヒドにて 4°C、overnight で固定を行った。組織はパラフィンに包埋し 3 μm 厚に薄切を行った。組織切片はキシレンおよびエタノールにて脱パラフィンおよび再水和を行った。

3-2-4-2 BMP4 および ACTH, thyroid-stimulating hormone (TSH) の二重蛍光免疫染色

抗原の賦活化は 0.01M クエン酸バッファー (pH 5.6) に浸漬し、オートクレーブにて 121°C、10 分間加熱することにより行った。その後切片を 3% bovine serum albumin (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) にて 1 時間室温で反応させブロッキングを行った。一次抗体は以下のものを使用し、2 種類の 1 次抗体を混合し 4°C、overnight にて反応させた。すなわち、polyclonal rabbit anti-human BMP4 (LifeSpan BioSciences, Inc., Washington, USA, 1:100) と monoclonal mouse anti-ACTH (Dako, California, USA, 1:200) (Teshima *et al.* 2009)あるいは polyclonal rabbit anti-human BMP4 と monoclonal mouse anti-TSH (Advanced Immuno Chemical Inc., California, USA, 1:100) (Teshima *et al.* 2009) を混合して使用した。次いで、F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG H+L (Alexa Fluor 488, Life Technologies, Oregon, USA, 1:200) および F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG H+L (Alexa Fluor 594, Life Technologies, Oregon, USA, 1:200) を混合し室温で 1 時間反応させた。核の染色は 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, Life Technologies, Oregon, USA, 1:50,000) を使用した。BMP4 抗体は犬との交差性が保証済みであるものを使用した。BMP4 の陽性コントロールは健常ビーグル成犬の大脳組織を使用した。

3-2-4-3 BMP II および ACTH, TSH, Growth hormone (GH), S100 の二重蛍光免疫染色

抗原の賦活化は 0.01M クエン酸バッファー (pH 5.6) に浸漬し、オートクレーブにて 121°C、10 分間加熱することにより行った。その後切片を 10% donkey serum (Sigma Aldrich, Missouri, USA) にて 1 時間室温で反応させブロッキングを行った。一次抗体は

以下のものを使用し、2種類の1次抗体を混合し4°C, overnightにて反応させた。すなわち polyclonal goat anti-BMPRII (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, USA, 1:200) (Akiyoshi *et al.* 2004) および monoclonal mouse anti-ACTH (Dako, California, USA, 1:200) (Teshima *et al.* 2009)、monoclonal mouse anti-TSH (Advanced Immuno Chemical Inc., California, USA, 1:100) (Teshima *et al.* 2009)、polyclonal rabbit anti-GH (Dako, Tokyo, Japan, 1:400) (Murai *et al.* 2012)、polyclonal rabbit anti-S100 (Dako, Glostrup, Denmark, 1:200) (Chung *et al.* 2013)。その後、BMPRIIとACTHあるいはBMPRIIとTSHの蛍光二重免疫染色には donkey anti-goat IgG H+L (Alexa Fluor 488, Life Technologies, Oregon, USA, 1:200) および donkey anti-mouse IgG H+L (Alexa Fluor 594, Abcam PLC, Cambridge, UK, 1:200) の二次抗体を混合し、室温にて1時間反応させた。また、BMPRIIとGHあるいはBMPRIIとS100の蛍光二重染色には donkey anti-goat IgG H+L (Alexa Fluor 488, Life technologies, Oregon, USA, 1:200) および donkey anti-rabbit IgG H+L (Alexa Fluor 594, Life technologies, Oregon, USA, 1:200) の二次抗体を混合し、室温にて1時間反応させた。核の染色には DAPI (Life Technologies, Oregon, USA, 1:50000) を使用した。BMPRIIの一次抗体は犬との交差性が保証済みであるものを使用した。BMPRIIの陽性コントロールには健常ビーグル成犬の腎臓組織を使用した。

3-2-4-4 BMP4 および BMPRII 陽性細胞率の評価

DP70 camera (Olympus, Tokyo, Japan) に接続した Olympus BX51 microscope を使用し ×400 の視野にて評価を行った。重複を避けて2切片、各5視野の撮影を行い BMP4 陽性細胞率および BMPRII 陽性細胞率 (平均±標準偏差) を算出した。また、S100に陽性を示した細胞を濾胞星状細胞とした。

3-2-5 統計学的検討方法

統計学的検討は Statistical Package for Social Sciences software version 16.0J (SPSS, Tokyo, Japan) を使用して行った。Shapiro-Wilk 検定にて正規性を検討し、Leven's testにて等分散性を検討した。すべてのデータが等分散であった場合ため、Student's *t*-test

にて2群間の比較を行った。 $P < 0.05$ を有意差有りと判定した。

3-3 結果

3-3-1 健常成犬下垂体および ACTH 産生性下垂体腺腫における *BMP4*, *BMPRI A*, *BMPRI B*, *BMPRII* mRNA の発現比較

qPCR の結果、ACTH 産生性下垂体腺腫における *BMP4* mRNA の発現は正常な下垂体と比較して有意に低値を示した。しかしながら、*BMPRI A*, *BMPRI B* および *BMPRII* mRNA に関して ACTH 産生性下垂体腺腫と正常下垂体との間に有意差は認められなかった (Figure 3-1)。

3-3-2 健常成犬下垂体における *BMP4* の免疫組織学的発現

ACTH 陽性細胞における *BMP4* の発現を調べるため、*BMP4* と ACTH の蛍光二重免疫染色を行った。その結果、*BMP4* と ACTH を共発現している細胞は認められず、*BMP4* は ACTH 陽性細胞に発現していないことが明らかとなった。(Figure 3-2A)。また、下垂体中間葉においても同様に *BMP4* の発現は認められなかった (Figure 3-3A)。しかしながら、下垂体前葉において *BMP4* 陽性細胞が散見され、二重蛍光免疫染色の結果、すべての *BMP4* 陽性細胞は TSH 陽性細胞であることが明らかとなった (Figure 3-2B)。TSH 陽性細胞における *BMP4* 陽性細胞の割合は $51.3 \pm 7.3\%$ であった。

3-3-3 健常成犬下垂体における *BMPRII* の免疫組織学的発現

BMPRII に強陽性を示す細胞は健常成犬の下垂体前葉において認められた。しかしながら、ACTH との二重蛍光免疫染色の結果、*BMPRII* は ACTH 陽性細胞に発現が認められなかった (Figure 3-4A)。また、中間葉においても *BMPRII* の発現は認められなかった (Figure 3-3B)。GH および TSH と *BMPRII* の蛍光二重免疫染色の結果、*BMPRII* の大部分は GH 陽性細胞に (Figure 3-4B)、また TSH 陽性細胞にも僅かに発現が認め

られた (Figure 3-4C)。しかしながら濾胞星状細胞には発現が認められなかった (Figure 3-4D)。GH 陽性細胞および TSH 陽性細胞における BMPR II 陽性率はそれぞれ、 $94.7\pm 3.6\%$ および $19.9\pm 5.2\%$ であり、BMPR II の発現は GH 陽性細胞で有意に高値を示した ($P < 0.001$)。

3-3-4 ACTH 産生性下垂体腺腫における BMP4 および BMPRII の二重蛍光免疫染色

ACTH 産生細胞が腫瘍化することにより BMP4 および BMPR II の発現に影響を及ぼすかを検討する目的で ACTH 産生性下垂体腫瘍においても同様の検討を行った。その結果、BMP4 および BMPR II とともに ACTH 産生性下垂体腺腫細胞において発現が認められなかった (Figure 3-5)。

ヒトと異なり犬の経蝶形骨下垂体切除術においては正常下垂体組織から ACTH 産生性腺腫組織のみを切除することが困難であるため、腫瘍の周囲に存在する正常下垂体組織とともに腺腫組織を摘出する。この ACTH 産生性下垂体腺腫と同時に摘出された下垂体正常組織における BMP4 陽性細胞数を検討した結果、TSH 陽性細胞における BMP4 陽性細胞率は健常成犬の下垂体組織では $51.3\pm 7.3\%$ であったのに対して、クッシング病罹患犬では $8.3\pm 7.9\%$ に有意に低下していた。しかしながら、GH 陽性細胞および TSH 陽性細胞における BMPR II 陽性細胞率に有意差は認められなかった (Figure 3-6)。

3-4 考察

BMP4 はヒトの正常下垂体組織において ACTH 陽性細胞の 30-50% に発現が認められることが免疫組織学的検討で明らかとなっている (Giacomini *et al.* 2006)。一方、本検討において犬の正常下垂体組織 ACTH 陽性細胞において BMP4 は認められず、BMP4 は TSH 陽性細胞に発現が認められた。よって、ヒトと犬の間には下垂体における BMP4 の発現に動物種差が認められることが明らかとなった。

次に BMP4 シグナルが細胞内に入るために BMP4 が最初に結合する受容体である BMPR II の発現を検討した結果、BMPR II も BMP4 と同様に ACTH 陽性細胞には発現が認められず、BMPR II は GH 陽性細胞と TSH 陽性細胞に発現が認められた。さらにホルモンの産生・分泌は行っていないが、下垂体内で細胞間コミュニケーションに関与していると報告されている濾胞星状細胞 (Denef 2008) における BMPR II の発現を検討したところ、BMPR II の発現は認められなかった。ヒトの下垂体における BMPR II の発現分布は報告されていないが、雌羊の下垂体において BMPR II は Gonadotroph に認められることが報告されている (Faure *et al.* 2005)。ゆえに下垂体における BMPR II の発現に関しても動物種差が存在することが明らかとなった。

ヒト ACTH 産生性下垂体腺腫において、ACTH 陽性細胞における BMP4 の発現が顕著に低下していることが報告されている (Giacomini *et al.* 2006)。さらに AtT 20 細胞においても、BMP4, BMPR I A および BMPR II タンパク質が発現していることがウエスタンブロットによって明らかとなっている (Tsukamoto *et al.* 2010)。ゆえに ACTH 産生細胞の腫瘍化が BMP4 および BMPR II の発現に影響を及ぼす可能性を考慮して ACTH 産生性下垂体腫瘍における BMP4 および BMPRs の発現を qPCR および免疫組織学的に検討を行った。

その結果、BMP4 mRNA の発現は正常下垂体と比較して ACTH 産生性下垂体腺腫において有意に低下していた。BMP4mRNA の低下が ACTH 産生性下垂体腺腫と正常下垂体組織との細胞のポピュレーションの違いによるものである可能性が考えられたため、免疫組織学的検討を行い BMP4 の発現率を検討した。その結果、免疫組織学的検討においても TSH 陽性細胞における BMP4 陽性細胞率が有意に低値を示した。一方、BMPR II mRNA の発現に有意差は認められず、免疫組織学的検討においても健常成犬の下垂体と比較して、ACTH 産生性下垂体腺腫とともに摘出された腫瘍周囲の正常下垂体組織における GH 陽性細胞および TSH 陽性細胞における BMPR II 陽性細胞数に有意差は認められなかった。ゆえに、ヒトと犬の間には下垂体における BMP4 の発現細胞に動物種差が存在するものの、クッシング病に罹患した下垂体組織において BMP4 の発現が低下するという現象は双方で認められた。しかしながら、そのメカニ

ズムは不明である。さらに、本検討では健常成犬とクッシング病罹患犬の年齢に差があり、年齢が下垂体における BMP 4 の発現に影響を与える可能性も考慮する必要があると考えられる。

ソマトスタチンアナログおよびレチノイン酸が犬のクッシング病に有効であったと報告されている (Castillo *et al.* 2009, Castillo *et al.* 2011)。ソマトスタチンアナログに属するオクトレオチドおよびパシレオチドは、犬の ACTH 産生性下垂体腫瘍を使用した *in vitro* の検討において ACTH の産生を抑制したことが報告されている (de Bruin *et al.* 2008)。またクッシング病罹患犬に対してパシレオチドを投与した *in vivo* の検討においても ACTH の産生、尿中コルチゾール/クレアチニン比および下垂体腫瘍サイズを有意に減少させたことが報告されている (Castillo *et al.* 2011)。その他にクッシング病罹患犬にレチノイン酸を使用した検討では下垂体腫瘍サイズの減少が報告されている (Castillo *et al.* 2009)。AtT20 細胞を使用した検討では、これらの薬剤の作用機序の 1 つとして BMP4 シグナルの増強が報告されている (Giacomini *et al.* 2006, Tsukamoto *et al.* 2010)。しかしながら本検討での結果を考慮に入れると、BMP4 は犬の ACTH 産生性下垂体腫瘍に対するこれらの薬剤の作用機序としての重要性は低いことが推察された。

ヒトの ACTH 陽性細胞、AtT20 細胞および犬の ACTH 陽性細胞における BMP4 の発現には顕著な違いが認められた。さらに BMPR II もまた犬の ACTH 陽性細胞には発現が認められなかった。これらの動物種差が犬におけるクッシング病の高発症率に対して影響を及ぼしているかは不明であるが、クッシング病を高率に発症する犬において ACTH の産生を抑制し細胞分裂を抑制する作用を持つ BMP4 およびその受容体である BMPR II の発現が認められないことは興味深い。また、犬をクッシング病のモデル動物として使用する場合、あるいはヒトにおける検討および AtT20 細胞を使用した検討を犬に外挿する際にはこの動物種差を考慮する必要があることが示唆された。

3-5 小括

ACTH 陽性細胞における BMP4 および BMPR II の発現には種差が存在することが明らかとなった。すなわち健常犬の下垂体 ACTH 陽性細胞および ACTH 産生性下垂体腺腫には BMP4 および BMPR II の発現が認められなかった。ゆえにソマトスタチンアナログの犬における作用機序に BMP4 シグナルを介した作用の関連性は低いことが示唆された。さらに、犬をクッシング病のモデル動物として使用する場合、BMP4 に関して動物種差が存在することを考慮に入れるべきであることが示唆された。

Table 3-1. Primer sequences.

Gene		Sequence (5'→3')	Length (bp)	Melting temperature (°C)
<i>BMP4</i>	For	TAGCAAGAGCGCCGTCATC	19	66.5
	Rev	GTTCTCTGGGATGCTGCTGAG	21	66.3
<i>BMPRIA</i>	For	GCAGACGTCGTTACAATCGTG	21	65.5
	Rev	ATCTGCTTGGCGATAGTTCG	20	64.1
<i>BMPRIB</i>	For	AAGTTAGAGGAGCGGAGCAC	20	62.4
	Rev	ACGCAAGATCTTTGGACGAG	20	64.2
<i>BMPRII</i>	For	GGCTGACTGGAAATAGACTGG	21	62.5
	Rev	TCACAGTCCCTCAGGTTTAC	20	62.9
<i>GUS</i>	For	CCTCCTGCCGTATTACCCTTG	21	66.4
	Rev	TCTGGACGAAGTAACCCTTGG	21	65.1

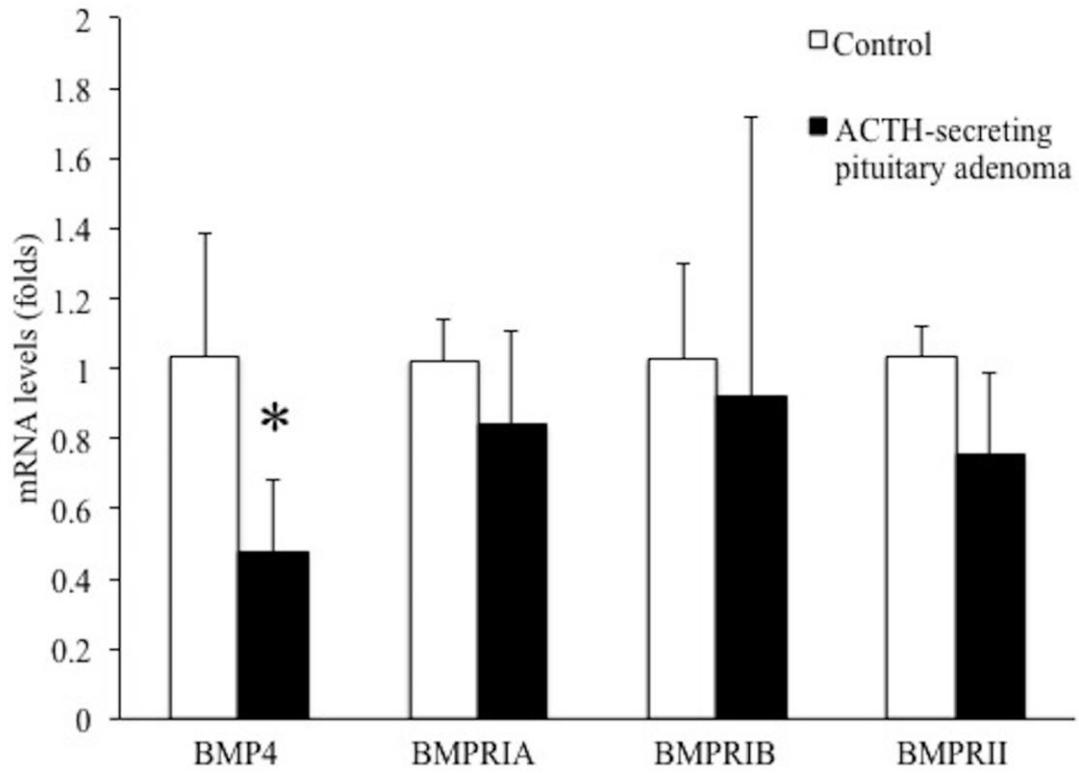


Figure 3-1. mRNA expression levels of bone morphogenetic protein 4 (*BMP4*), bone morphogenetic protein receptor (*BMPR*) IA, IB, and II in adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-secreting pituitary adenomas. * $P < 0.05$ versus normal canine pituitaries.

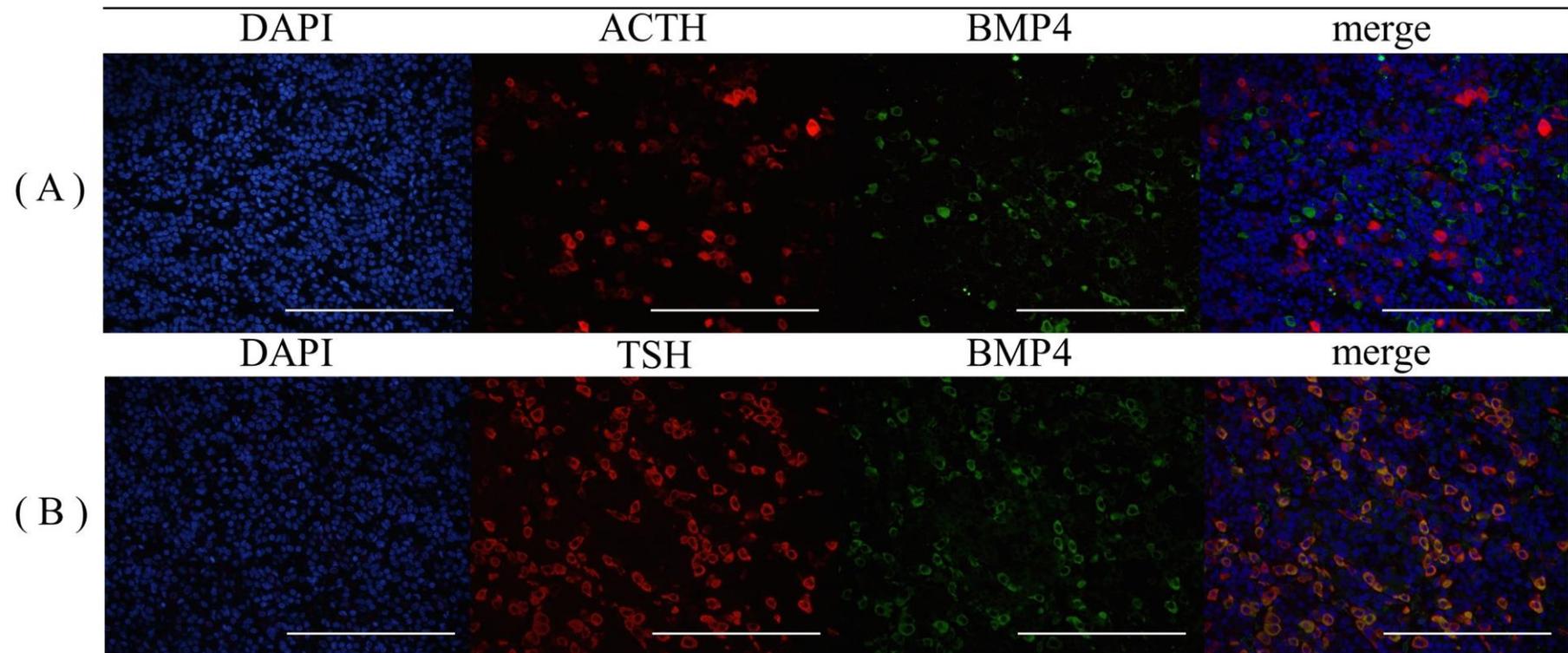


Figure 3-2. Double immunofluorescence staining of (A) bone morphogenetic protein 4 (BMP4) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH), and (B) BMP4 and thyroid-stimulating hormone (TSH) in the normal canine anterior pituitary. Bar = 200 μ m.

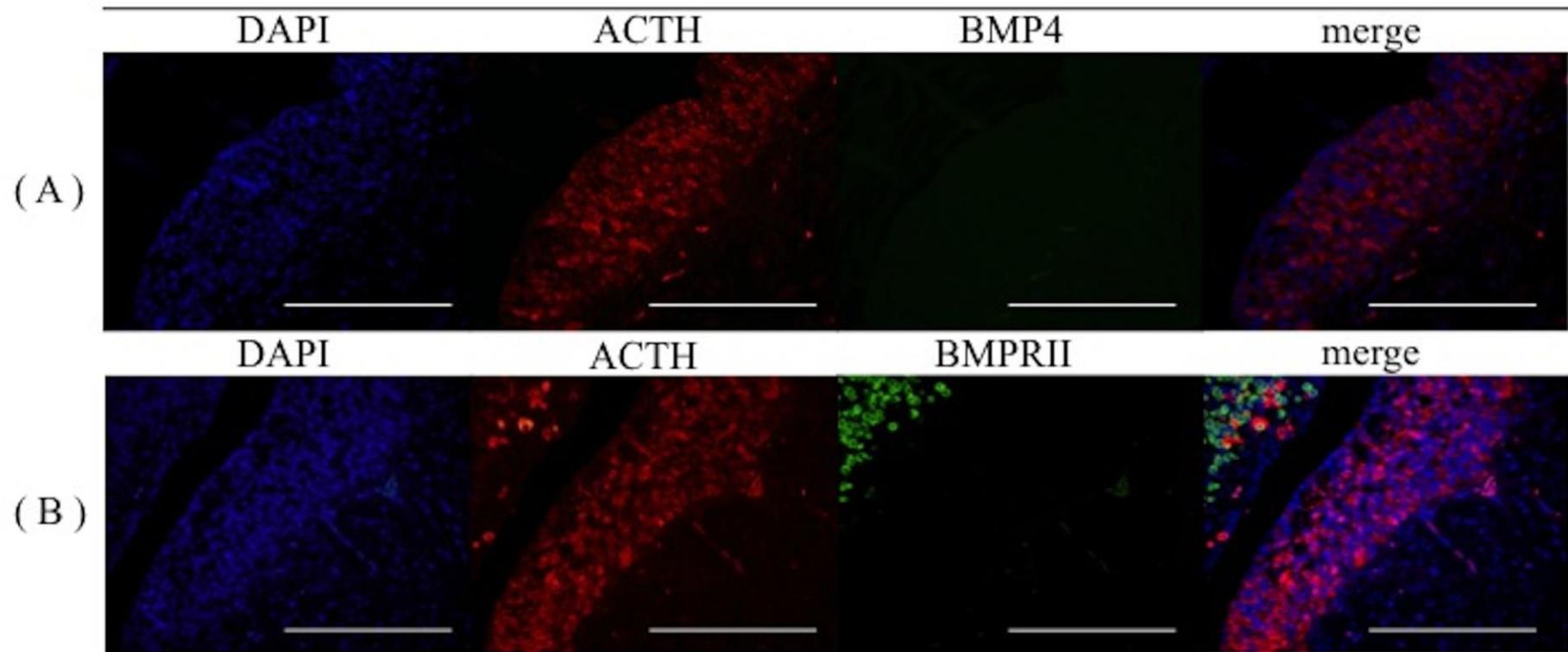


Figure 3-3. Double immunofluorescence staining of (A) bone morphogenetic protein 4 (BMP4) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH), and (B) bone morphogenetic receptor II (BMPRII) and ACTH in the normal canine intermediate pituitary. Bar = 200 μ m.

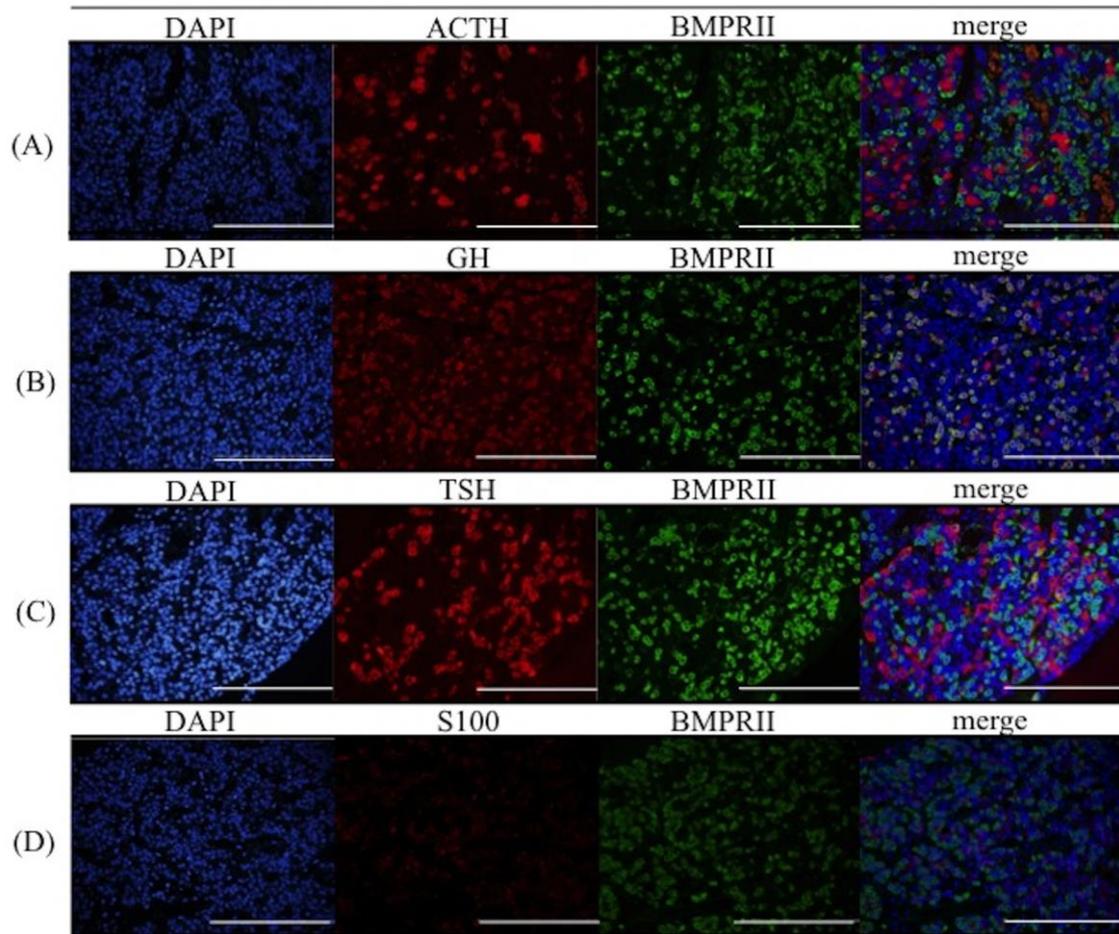


Figure 3-4. Double immunofluorescence staining of (A) bone morphogenetic protein receptor II (BMPRII) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH), (B) BMPRII and growth hormone (GH), (C) BMPRII and thyroid-stimulating hormone (TSH), and (D) BMPRII and S100 in the normal canine anterior pituitary. Bar = 200 μ m.

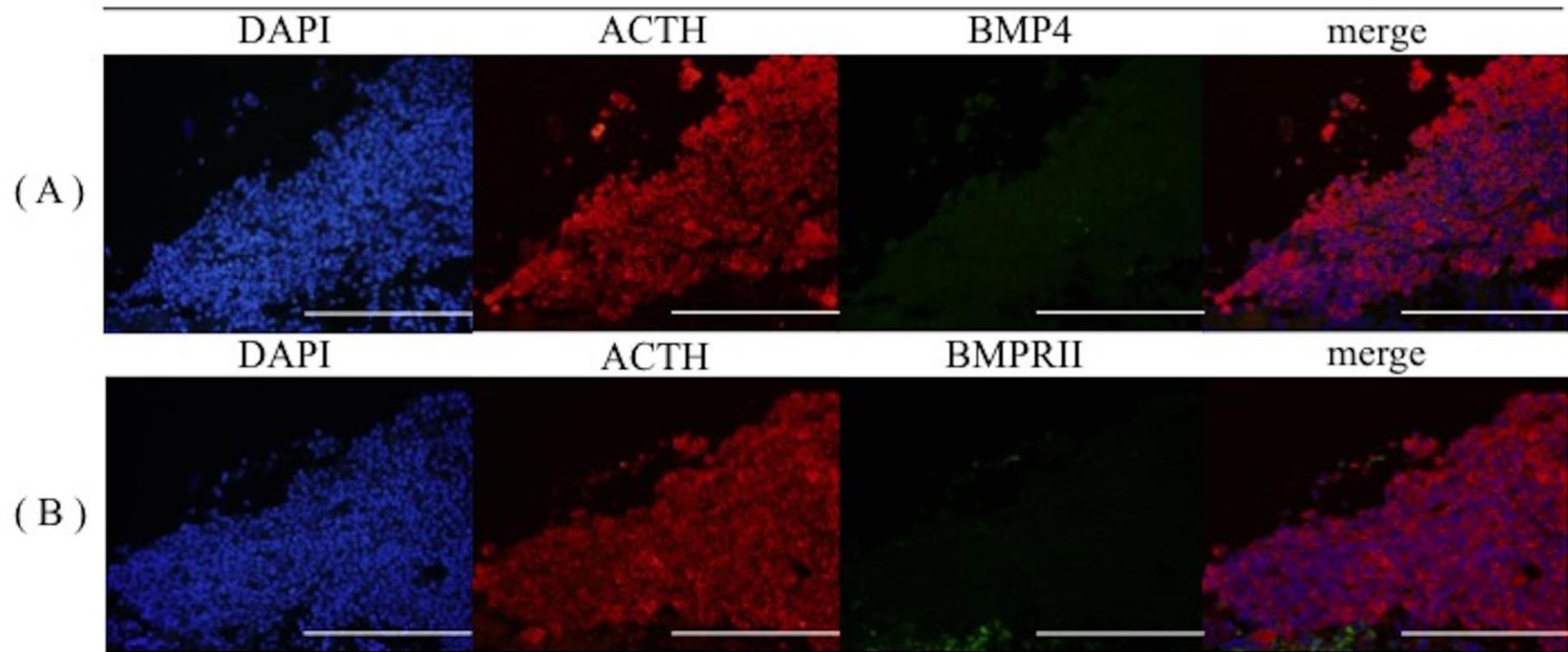


Figure 3-5. Double immunofluorescence staining of (A) bone morphogenetic protein 4 (BMP4) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH), and (B) bone morphogenetic receptor II (BMPRII) and ACTH in the ACTH-secreting pituitary adenoma. Bar = 200 μ m.

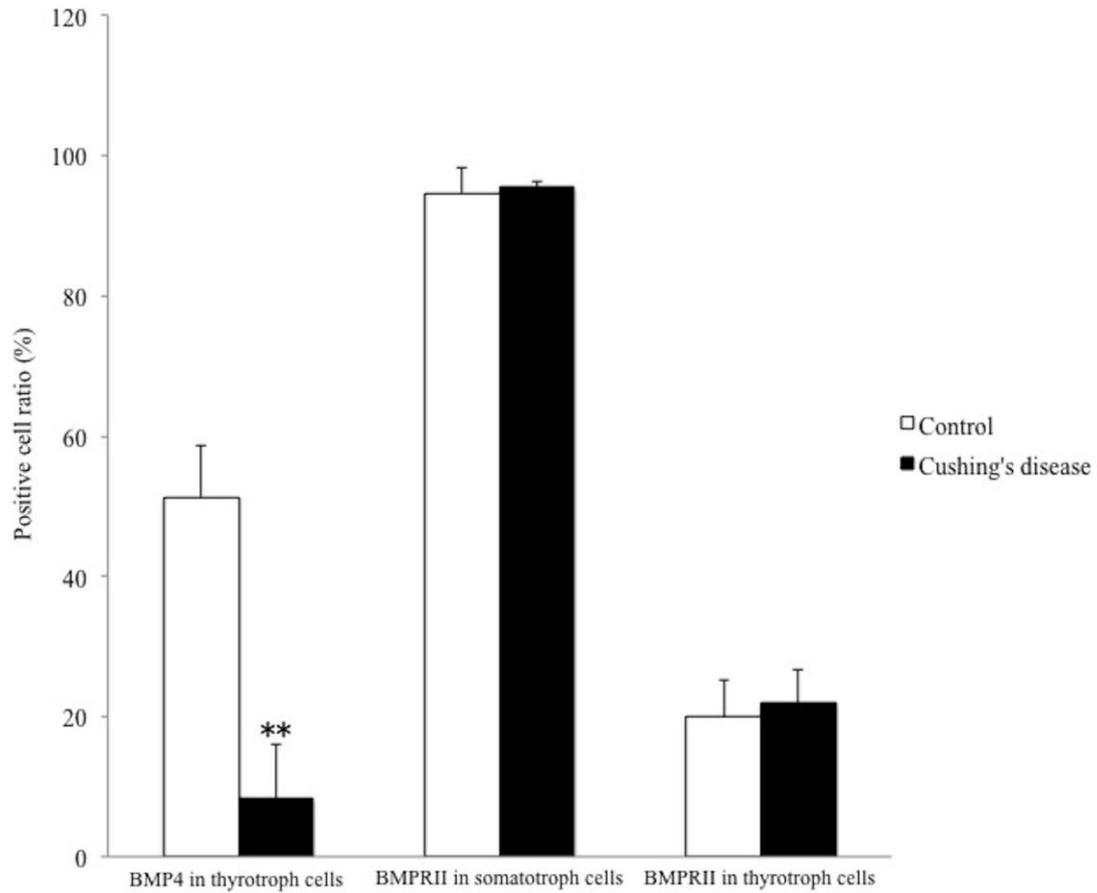


Figure 3-6. The positive cell ratios of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) in thyrotroph cells, bone morphogenetic protein receptor II (BMPRII) in somatotroph cells, and BMPRII in the thyrotroph cells surrounding the normal pituitary tissues obtained from resected adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-secreting pituitary adenomas. ** $P < 0.01$ versus normal canine anterior pituitaries.

第4章 健常成犬および ACTH 産生性下垂体腺腫における somatostatin receptor 2, somatostatin receptor 5 および dopamine D2 receptor の発現に関する免疫組織学的検討

4-1 緒言

クッシング病の治療は獣医学領域においても医学領域と同様に内科治療、外科治療、放射線治療から選択可能である。医学領域においては ACTH 産生性下垂体腫瘍の摘出がクッシング病治療の第一選択である一方、現在獣医学領域においては多くのクッシング病罹患犬はトリロスタンに代表されるコルチゾール分泌抑制薬を使用し、臨床症状の改善を行っている (Peterson *et al.* 2001, Neiger *et al.* 2002, Baker *et al.* 2003, Braddock *et al.* 2003, Alenza *et al.* 2006, Reine *et al.* 2007)。

近年、ソマトスタチンアナログに属するパシレオチド、オクトレオチド、ランレオチドおよびドパミンアゴニストであるブロモクリプチン、カベルゴリンが ACTH 産生性下垂体腺腫自体に作用する可能性がある薬剤として報告された (Pivonello *et al.* 2009, Godbout *et al.* 2010, Mancini *et al.* 2010, Vilar *et al.* 2010, Ahmed *et al.* 2012, van der Pas *et al.* 2012, Murasawa *et al.* 2014)。

ソマトスタチンは中枢神経では視床下部室周囲核のニューロンで合成されて下垂体門脈に分泌され、成長ホルモン (Growth hormone: GH) 分泌を抑制することが広く知られている。その他、消化管内神経細胞や胃 D 細胞でも合成され、胃のヒスタミン、ガストリン、胃酸分泌をはじめ種々の消化管ホルモンの分泌を抑制する。また膵臓のランゲルハンス島の膵 D 細胞からも分泌され、インスリンやグルカゴンの分泌も抑制する。92 のアミノ酸残基からなるソマトスタチン前駆体タンパク質からはプロセッシングの違いによりソマトスタチン 28 とソマトスタチン 14 が産生される (Cuevas-Ramos *et al.* 2014)。Somatostatin receptor (SSTR) には SSTR1-5 の 5 種類のサブタイプが存在することが知られており (Cuevas-Ramos *et al.* 2014)、サブタイプはリガンドに対して異なった親和性を示す。Human SSTR (hSSTR) 1-4 はソマトスタチン 14 に hSSTR5 はソマ

トスタチン 28 に対して高親和性を示す (Patel *et al.* 1993)。hSSTR1-5 のうち hSSTR2 および hSSTR5 にはホルモンの産生を抑制する作用があり、さらに細胞周期を休止させる作用を持っていることが hSSTR の作用として報告されている (Cuevas-Ramos *et al.* 2014)。

オクトレオチドおよびランレオチドは hSSTR 2 に高親和性をもち、hSSTR3 および hSSTR5 には中程度の親和性を持つが、hSSTR1 および hSSTR 4 には結合しない (Ben-Shlomo & Melmed 2008)。一方、パシレオチドはオクトレオチドと比較して、hSSTR5, hSSTR1 および hSSTR3 に対する親和性がそれぞれ 40 倍, 30 倍, 5 倍であり、hSSTR2 に対する親和性が 2.5 倍低い (Bruns *et al.* 2002)。近年、アメリカおよび EU においてパシレオチドは手術不適応あるいは手術が不奏効であった成人クッシング病患者に対して認可された (Cuevas-Ramos *et al.* 2014)。パシレオチドで治療されたクッシング病患者では 6 ヶ月後、尿中遊離コルチゾールが 48% 減少し (Colao *et al.* 2012)、それに伴い血圧、体重の減少および生活の質が向上したことが報告されている (Webb *et al.* 2008, Colao *et al.* 2012)。またクッシング病罹患犬においてもパシレオチドが ACTH の産生、尿中コルチゾール/クレアチニン比および腫瘍サイズを減少させ、臨床症状を改善させたことが報告されている (Castillo *et al.* 2011)。

ドパミンは視床下部-下垂体系において、視床下部弓状核や脳室周囲領域にある隆起漏斗系ドパミン・ニューロンで産生され、正中隆起より下垂体門脈中に視床下部因子として放出され、dopamine D2 receptor (DA2R) を介して下垂体ホルモンの分泌を調節する。特にドパミンはプロラクチン抑制因子として強い作用をもち、プロラクチン分泌調節の最も重要な因子と考えられている。また視床下部内で神経伝達物質として、種々の視床下部ホルモンの分泌にも関与する。

ドパミンアゴニストは特にプロラクチン産生腺腫に対する治療効果が高く、ヒトのプロラクチン産生性腺腫ではカベルゴリンあるいはブロモクリプチンが治療の第一選択となっている。ドパミンアゴニストは DA2R に結合することにより作用を発揮する。ヒト ACTH 産生腺腫細胞の約 80% には DA2R が発現することが報告されており (Pivonello *et al.* 2004)、ヒトのクッシング病に対する治療効果も報告されるようになった。

た。ブロモクリプチンはヒトの中間葉由来 ACTH 産生性下垂体腺腫に対して有効であることが推測されており、ブロモクリプチンの投与により初期の ACTH 分泌の抑制が約半数で認められるも長期的な治療反応は少数に限られることが報告されている (de Bruin *et al.* 2009)。カベルゴリンはブロモクリプチンと比較して DA2R に対する親和性が高く作用時間が長いことが知られており、カベルゴリンにより 3 ヶ月間治療したクッシング病患者では 60% の症例で尿中遊離コルチゾールが有意に減少し、40% の症例では正常化したことが報告されている (Pivonello *et al.* 2004)。さらに、カベルゴリンにより 24 ヶ月間治療したクッシング病患者では 20% の症例で腫瘍の減少が認められたことが報告されている (Pivonello *et al.* 2009)。

このようにソマトスタチンアナログおよびドパミンアゴニストはクッシング病の治療においてヒトで有効性が明らかとなっている。しかしながら、犬の正常下垂体および ACTH 産生性下垂体腺腫におけるこれらの薬剤の作用起点となる SSTRs および DA2R のタンパク質発現は明らかとなっていない。本検討は SSTRs の中でも特にホルモン分泌抑制作用に関連する SSTR2 および SSTR5、そして DA2R の健常成犬下垂体および ACTH 産生性下垂体腺腫におけるタンパク質の発現を免疫組織学的に明らかにすることを目的とした。

4-2 材料および方法

4-2-1 供試犬および対象症例

14 頭 (雌 3 頭、避妊雌 5 頭、雄 4 頭、去勢雄 2 頭) のクッシング病罹患犬から経蝶形骨下垂体切除術により摘出した下垂体組織を使用して検討を行った。本検討は本学附属動物医療センターの倫理委員会にて承認されており (承認番号: 26-6)、検討に使用した下垂体組織は症例のオーナーより承諾を得たものを使用した。年齢の中央値は 9 歳 (range: 4-11 歳)、体重の中央値は 10.0 kg (range: 3.2-25.5kg) であった。クッシング病の診断は ACTH 刺激試験、副腎の超音波検査および MRI 検査により行った (第 2 章

2-2-2 クッシング病の診断基準参照)。経蝶形骨下垂体切除術は過去の報告に準じて実施した (Meij *et al.* 1997)。健常成犬の下垂体組織は他の目的により安楽死された健常ビーグル成犬 6 頭 (雄 3 頭、雌 3 頭) の下垂体組織を使用した (承認番号: S26J-28)。年齢の中央値は 16.8 ヶ月齢 (range: 16-19 ヶ月)、体重の中央値は 9.8kg (range: 8.2-11.6kg) であった。

4-2-2 ACTH および SSTR2, SSTR5, DA2R, α -Melanocyte-stimulating Hormone の二重蛍光免疫染色

4-2-2-1 組織の準備

クッシング病罹患犬から採取した下垂体組織および健常ビーグル成犬から採取した正常下垂体組織は 4%パラフォルムアルデヒドにて 4°C、overnight で固定を行った。組織はパラフィンに包埋し 3 μ m 厚に薄切を行った。組織切片はキシレンおよびエタノールにて脱パラフィンおよび再水和を行った。

4-2-2-2 SSTR2 および ACTH の二重蛍光免疫染色

抗原の賦活化は 0.01M クエン酸バッファー (pH5.6) を使用し 65°C のウォーターバスで 1 時間加熱することにより行った。5% goat serum (Dako, California, USA) を室温で 1 時間組織に反応させブロッキングを行った。その後、polyclonal rabbit Anti-SSTR2 antibody - Extracellular domain (Abcam PLC, Cambridge, UK, 1:40) および monoclonal mouse anti-ACTH (Dako, California, USA, 1:200) (Teshima *et al.* 2009) を混合し 4°C、overnight で一次抗体を反応させた。二次抗体は F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG H+L (Alexa Fluor 488, Life Technologies, Oregon, USA, 1:200) および F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG H+L (Alexa Fluor 594, Life Technologies, Oregon, USA, 1:200) を混合し室温で 1 時間反応させた。4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, Life Technologies, Oregon, USA, 1:50,000) を使用し核の染色を行った。健常成犬の膵臓組織を陽性コントロールとし、本抗体が免疫蛍光染色のみならず、免疫組織化学染色でも

使用可能であることを確認するため健常成犬の下垂体組織および膵臓組織を用いて酵素抗体法である 3, 3'- diaminobenzidine (DAB) 染色を行ってその染色性を確認した (Figure 4-1 A)。

4-2-2-3 SSSTR5 および ACTH の蛍光二重免疫染色

抗原の賦活化は 0.01M クエン酸バッファー (pH5.6) を使用し 65°C のウォーターバスで 1 時間加熱することにより行った。Block Ace (DS Pharma Biomedical Co., Ltd, Osaka, Japan) を室温で 1 時間組織に反応させブロッキングを行った。その後、polyclonal rabbit Anti-SSSTR5 antibody (Antibodies, Georgia, USA, 1:100) および monoclonal mouse anti-ACTH (Dako, California, USA, 1:200) (Teshima *et al.* 2009) を混合し 4°C, overnight で一次抗体を反応させた。二次抗体は F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG H+L (Alexa Fluor 488, Life Technologies, Oregon, USA, 1:200) および F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG H+L (Alexa Fluor 594, Life Technologies, Oregon, USA, 1:200) を混合し室温で 1 時間反応させた。4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, Life Technologies, Oregon, USA, 1:50,000) を使用し核の染色を行った。健常成犬の副腎組織を陽性コントロールとし、本抗体が免疫蛍光染色のみならず、免疫組織化学染色でも使用可能であることを確認するため健常成犬の下垂体組織および副腎組織を用いて酵素抗体法である DAB 染色を行ってその染色性を確認した (Figure 4-1 B)。

4-2-2-4 DA2R および ACTH の蛍光免疫二重染色

抗原の賦活化は 0.01M クエン酸バッファー (pH5.6) を使用し 65°C のウォーターバスで 1 時間加熱することにより行った。Block Ace (DS Pharma Biomedical Co., Ltd, Osaka, Japan) を室温で 1 時間組織に反応させブロッキングを行った。その後、polyclonal rabbit Anti-Dopamine D2 receptor antibody (Abcam PLC, Cambridge, UK, 1:100) および monoclonal mouse anti-ACTH (Dako, California, USA, 1:200) (Teshima *et al.* 2009) を混合し 4°C, overnight で一次抗体を反応させた。二次抗体は F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG H+L (Alexa Fluor 488, Life Technologies, Oregon, USA, 1:200) および F(ab')₂

fragment of goat anti-mouse IgG H+L (Alexa Fluor 594, Life Technologies, Oregon, USA, 1:200) を混合し室温で 1 時間反応させた。4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, Life Technologies, Oregon, USA, 1:50,000) を使用し核の染色を行った。健常成犬の脳組織を陽性コントロールとし、本抗体が免疫蛍光染色のみならず、免疫組織化学染色でも使用可能であることを確認するため健常成犬の下垂体組織および脳組織を用いて酵素抗体法である DAB 染色を行ってその染色性を確認した (Figure 4-1 C)。

4-2-2-5 α - Melanocyte-stimulating Hormone および ACTH の二重蛍光免疫染色

切片を 3% bovine serum albumin (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) にて 1 時間室温で反応させブロッキングを行った。その後一次抗体として polyclonal rabbit Anti-Melanocyte-stimulating Hormone (Progen Biotechnik GmbH, Heiderberg, German, 1:800) と monoclonal mouse anti-ACTH (Dako, California, USA, 1:200) (Teshima *et al.* 2009) を混合して 4°C, overnight にて反応させた。二次抗体は F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG H+L (Alexa Fluor 488, Life Technologies, Oregon, USA, 1:200) および F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG H+L (Alexa Fluor 594, Life Technologies, Oregon, USA, 1:200) を混合し室温で 1 時間反応させた。4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, Life Technologies, Oregon, USA, 1:50,000) を使用し核の染色を行った。

4-2-2-6 SSTR2, SSTR5 および DA2R 陽性細胞率の算出

DP70 camera (Olympus, Tokyo, Japan) に接続した Olympus BX51 microscope を使用して $\times 400$ にて重複を避けて撮影を行った。正常下垂体においては前葉および中間葉において最低 1000 個の ACTH 陽性細胞の観察を行い、ACTH 陽性細胞における SSTR2, SSTR5 および DA2R 陽性細胞率 (平均 \pm 標準偏差) を算出した。また、ACTH 産生性下垂体腺腫においても同様に最低 1000 個の ACTH 陽性細胞の観察を行い、各受容体の陽性細胞率を計算した。ACTH 陽性細胞のうち SSTR2, SSTR5 あるいは DA2R の発

現が認められる細胞数が 10%以下の場合を陰性 (-)、10-15%の場合を弱陽性 (+)、50-80%の場合を中陽性 (++)、80%以上場合を強陽性 (+++) とした。

4-2-3 P/B value の計測

P/B value は過去の報告に従って、AZE virtual place software (Virtual Place®, AZE, Tokyo, Japan) を使用してガドリニウム造影 T1 強調画像を使用して行った (Kooistra *et al.* 1997)。P/B value $>0.31 \text{ mm}^{-1}$ を下垂体の腫大有り、P/B value $\leq 0.31 \text{ mm}^{-1}$ を下垂体の腫大無しとして評価した (Kooistra *et al.* 1997)。

4-3 結果

4-3-1 健常成犬下垂体 ACTH 陽性細胞における SSTR2, SSTR5 および DA2R 陽性細胞数の割合

SSTR2、SSTR5 および DA2R の発現は健常成犬の下垂体前葉および中間葉の双方で認められた、これらの受容体の発現は前葉の陽性細胞と比較して中間葉で強陽性を示した。

健常成犬の下垂体前葉 ACTH 陽性細胞における SSTR2、SSTR5 および DA2R 陽性細胞率はそれぞれ $27.0 \pm 8.6\%$ 、 $27.9 \pm 5.9\%$ 、 $34.0 \pm 9.4\%$ であった。一方健常成犬の下垂体中間葉の ACTH 陽性細胞における SSTR2、SSTR5 および DA2R 陽性細胞率はそれぞれ $97.8 \pm 1.5\%$ 、 $94.1 \pm 4.4\%$ 、 $96.1 \pm 6.6\%$ であった (Table 4-1, Figure 4-2, -3, -4)。

4-3-2 ACTH 産生性下垂体腺腫における SSTR2, SSTR5 および DA2R の発現

SSTR2 は 14 症例中 11 症例で、SSTR5 は 14 症例中 12 症例で、DA2R は 14 症例中 6 症例で陽性を示した。陽性を示した症例のうち SSTR2 では 4 症例が、SSTR5 では 7 症例が強陽性を示したが、DA2R で強陽性を示した症例は認められなかった (Table 4-2, Figure 4-5)。SSTR2 および SSTR5 とともに強陽性を示した症例は 4 症例認められ、その

うち2症例は α -Melanocyte-stimulating Hormone (α -MSH) に強陽性を示す中間葉由来のACTH産生性下垂体腺腫であった (Table 4-2, Figure 4-6)。SSTR2 および SSTR5 に強陽性を示す症例の P/B value の中央値は0.56 (range: 0.42-0.72) であった。また P/B value が大きくなるに従い、SSTR2 および SSTR5 に陽性を示す症例が増える傾向が認められた (Table 4-2)。

4-4 考察

本検討では SSTR2, SSTR5 および DA2R の健常成犬下垂体の前葉および中間葉における発現分布を明らかにした。いずれの受容体に関しても下垂体前葉および中間葉ともに発現が認められ、SSTR2, SSTR5 および DA2R に陽性を示す細胞の多くは ACTH に陽性を示す細胞であった。興味深いことにこれらの受容体の発現はいずれも中間葉で非常に強いことが明らかとなった。ソマトスタチンは下垂体前葉において GH、prolactin (PRL)、TSH および ACTH の産生を抑制することがラット (GH, PRL)、ヒト (TSH)、マウス AtT20 (ACTH) で明らかになっており、さらにソマトスタチンは細胞周期を休止させる作用を持つことが明らかとなっている (Cuevas-Ramos *et al.* 2014)。また、SSTR2 ノックアウトマウスでは ACTH の分泌が増加することから、SSTR2 は ACTH の分泌を調節している可能性が示唆されているが、SSTR2 と比較し、SSTR5 では ACTH の分泌を抑制する作用がより強いことが報告されている (Hofland *et al.* 2005)。一方、ヒトにおいて正常な ACTH 産生細胞で DA2R により ACTH の分泌が調節されているかは未だ結論が出ていない (de Bruin *et al.* 2009)。本検討より健常成犬の下垂体における SSTR2, SSTR5 および DA2R が ACTH 陽性細胞において発現していることを考慮すると、犬の下垂体において SSTR2、SSTR5 および DA2R は ACTH の産生および細胞分裂等に関連性がある受容体である可能性が推測された。

本検討において犬の ACTH 産生性下垂体腺腫の多くで SSTR2 および SSTR5 が陽性を示すことが明らかとなった。また、SSTR2 と比較して、SSTR5 に陽性を示す症例の

割合が多いことも明らかとなった。ヒト ACTH 産生性下垂体腺腫における hSSTR2 および hSSTR5 陽性率はそれぞれ 75% であることが報告されているが (Cuevas-Ramos *et al.* 2014)、細胞膜における受容体密度は hSSTR2 では少なく、hSSTR5 では多いことも報告されている (de Bruin *et al.* 2009)。これは SSTR2 が高コルチゾール血症により影響を受けやすく受容体のダウンレギュレーションを起こす一方、SSTR5 は高コルチゾール血症の影響を受けにくいことが理由として考えられている (de Bruin *et al.* 2009)。しかしながら、犬の ACTH 産生性下垂体腺腫を使用した *in vitro* の検討では、デキサメサゾンの添加により SSTR2 がアップレギュレーションすることが報告されている (de Bruin *et al.* 2008)。本検討において、SSTR2 に対して陽性を示す症例数は SSTR5 に陽性を示す症例数と比較して少なかったことから、生体における慢性的な高コルチゾール血症による SSTR2 への作用は *in vitro* での反応とは異なる可能性も考えられる。また対象とした 14 症例中 7 症例で SSTR5 が強陽性を示したことから、SSTR5 に対する親和性が強いパシレオチドが臨床的に有効性を示す可能性が高いことが示唆され、これはクッシング病罹患犬に対するパシレオチドの有効性が示された報告を裏付けるものであった (Castillo *et al.* 2011)。また、本検討において健常成犬の下垂体中間葉において SSTR2 および SSTR5 が強発現を示したことから、中間葉由来の ACTH 産生性下垂体腫瘍に対してのみその有効性が予測されたが、SSTR2 あるいは SSTR5 に対して強陽性を示した症例のうち α -MSH に対して陽性を示した中間葉由来の ACTH 産生性下垂体腺腫症例は 2 症例であり、その他の ACTH 産生性下垂体腺腫は前葉由来であった。ゆえに、ソマトスタチンアナログは犬において前葉および中間葉由来双方の ACTH 産生性下垂体腺腫に対して有効性を示す可能性が示唆された。しかしながら、SSTR2 あるいは SSTR5 の発現が弱いあるいは発現が認められない症例が存在するため、ACTH 産生性下垂体腺腫の組織学的診断に基づいて薬剤の使用を検討する必要があると考えられる。

一方で、DA2R に強陽性を示す症例は本検討では存在しなかった。また、DA2R の発現が認められる症例においても ACTH 陽性細胞における陽性率は非常に少なく、クッシング病罹患犬においてドパミンアゴニストに治療反応を示す可能性がある症例は

ソマトスタチンと比較して少ないことが予測された。しかしながらカベルゴリンにより治療されたクッシング病罹患犬において42.5%が治療反応を示し、ACTH、 α -MSH、尿中コルチゾール/クレアチニン比および腫瘍サイズが有意に減少し、さらにケトコナゾールで治療された症例と比較してカベルゴリンに反応した症例では生存期間が延長したことが報告されている (Castillo *et al.* 2008)。本検討において14症例中6症例(42.9%)と前述した *in vivo* での治療反応率と同程度の症例数に弱から中程度のDA2R陽性細胞率が認められたことを考慮すると、大部分の腫瘍細胞において発現が認められない場合でも治療反応が期待出来るのかもしれない。しかしながら本検討に使用した症例数は少なく、今後症例数を増やして更なる検討を行う必要があると考えられる。

以上の結果から、外科的に摘出した下垂体組織に関してSSTR2, SSTR5 およびDA2Rの免疫染色を実施することは重要であると考えられる。これらの受容体に陽性を示した場合、不完全切除症例や再発症例に対してソマトスタチンアナログやドパミンアゴニストが治療の選択肢となり得る可能性が示唆された。

4-5 小括

本検討より、健常成犬の下垂体においてSSTR2, SSTR5 およびDA2Rが下垂体前葉および中間葉のACTH陽性細胞に発現しており、中間葉では前葉と比較して陽性率が非常に高いことが明らかとなった。また、ACTH産生性下垂体腺腫の多くでSSTR2およびSSTR5が陽性を示した一方、DA2Rに陽性を示す症例は少数であり、その陽性細胞率も低値であった。以上の結果より、外科治療により寛解が得られなかった症例に対するACTH産生性下垂体腺腫をターゲットとした向下垂体治療薬によるクッシング病の治療を考慮する場合には、病理学的診断に基づきその使用を検討するべきであることが示唆された。

Table 4-1. Expressions of somatostatin receptor (SSTR) 2 and 5 and dopamine D2 receptor (DA2R) in the normal canine pituitary gland.

		SSTR2	SSTR5	DA2R
Immunofluorescence-positive cell	AL	27.0±8.6	27.9±5.9	34.0±9.4
ratios in ACTH-positive cells (%)	IL	97.8±1.5	94.1±4.4	96.1±6.6

ACTH, adrenocorticotrophic hormone

AL, anterior lobe

IL, intermediate lobe

Table 4-2. Expression of somatostatin receptor (SSTR) 2, SSTR5, and dopamine D2 receptor (DA2R) in canine adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-secreting pituitary adenomas.

Case	Breed	Sex	Age (y)	BW (kg)	P/B value (mm ⁻¹)	Pituitary hormone	SSTR2	SSTR5	DA2R
1	Cavalier King Charles Spaniel	FS	7	6.8	0.30	ACTH	+	+++	-
2	Beagle	M	11	11.6	0.31	ACTH	-	-	-
3	Yorkshire Terrier	MC	6	5.6	0.34	ACTH	+	++	-
4	Pembroke Welsh Corgi	F	4	11.2	0.37	ACTH	-	+++	-
5	Mongrel	FS	10	15.2	0.37	ACTH	+	+	+
6	French Bulldog	M	9	8.5	0.41	ACTH	+	+	+
7	Miniature Dachshund	F	9	8.0	0.42	ACTH	+++	+++	+
8	Yorkshire Terrier	FS	11	3.2	0.43	ACTH	+	+++	+
9	Pembroke Welsh Corgi	MC	9	25.5	0.45	ACTH, α -MSH	+++	+++	++
10	Mongrel	F	8	10.9	0.53	ACTH	++	++	-
11	Shiba	FS	11	15.2	0.55	ACTH	++	++	-
12	Miniature Dachshund	M	11	8.0	0.67	ACTH	+++	+++	+
13	Beagle	M	8	17.0	0.72	ACTH, α -MSH	+++	+++	-
14	French Bulldog	FS	5	9.0	0.79	ACTH	-	-	-

F, female; FS, female spayed; M, male; MC, male castrated; P/B value, pituitary/brain value; -, <10%; +, 10–50%; ++, 50–80%; +++, >80%

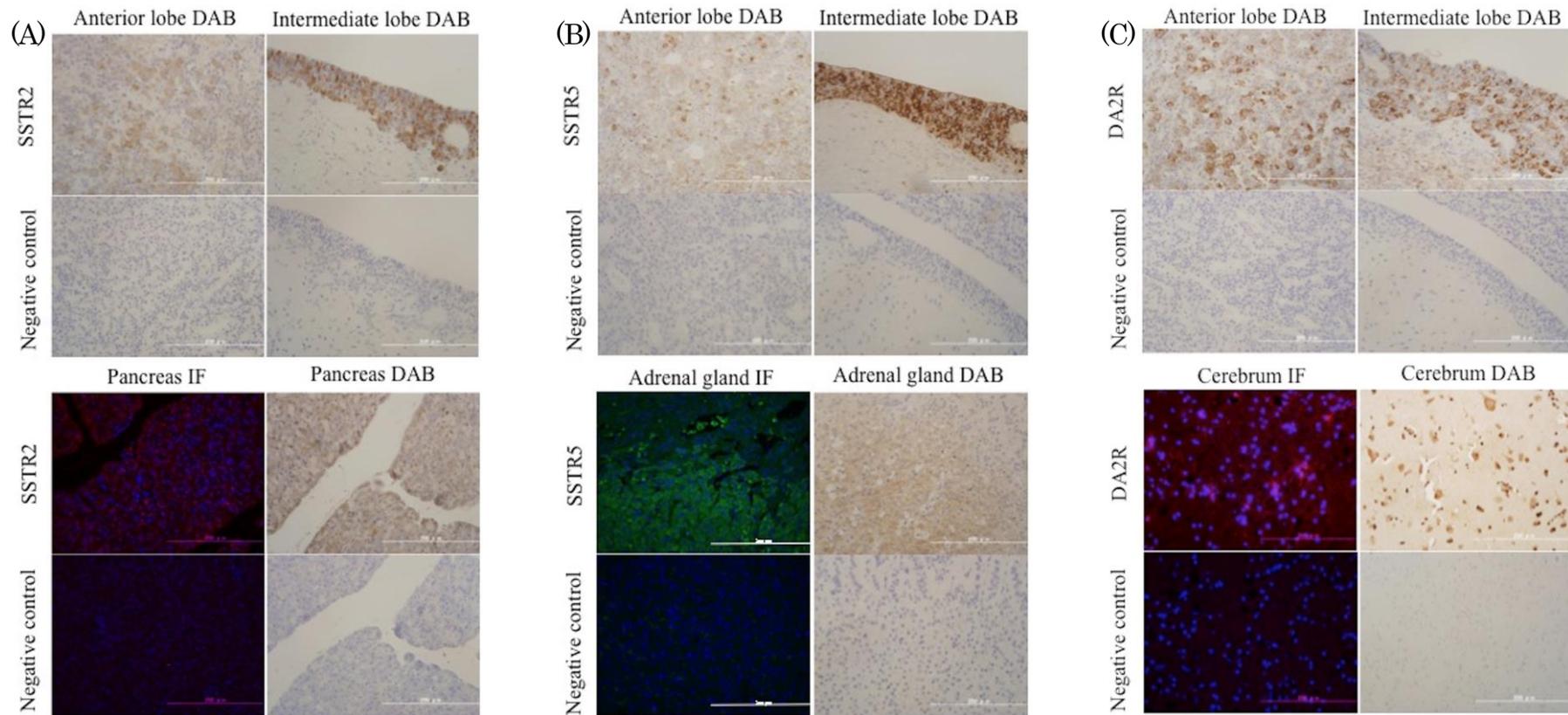


Figure 4-1. (A) Immunohistochemical staining (DAB) of somatostatin receptor 2 (SSTR2) in the anterior and intermediate lobes of the normal canine pituitary gland. Immunofluorescence (IF) and DAB of SSTR2 in the normal canine pancreas gland. (B) DAB of SSTR5 in the anterior and intermediate lobes of the normal canine pituitary gland. IF and DAB of SSTR5 in the normal canine adrenal gland. (C) DAB of dopamine D2 receptor (DA2R) in the anterior and intermediate lobes of the normal canine pituitary gland. IF and DAB of DA2R in the normal canine Cerebrum. Bar = 200 μ m

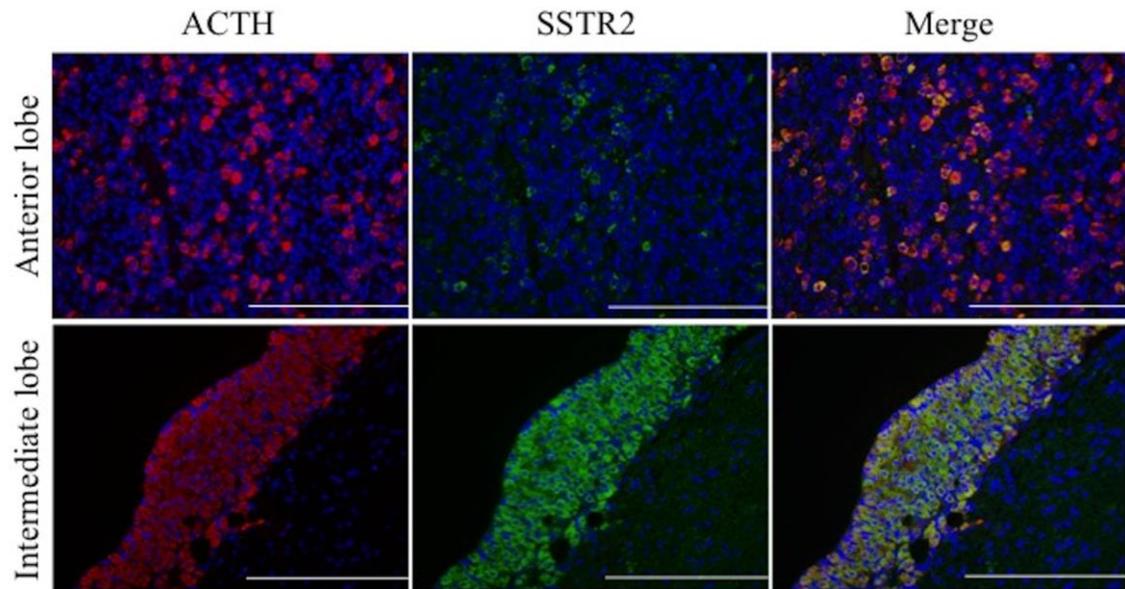


Figure 4-2. Double immunofluorescence staining of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and somatostatin receptor (SSTR) 2 in the normal canine anterior and intermediate lobes of the pituitary gland. Bar = 200 μ m

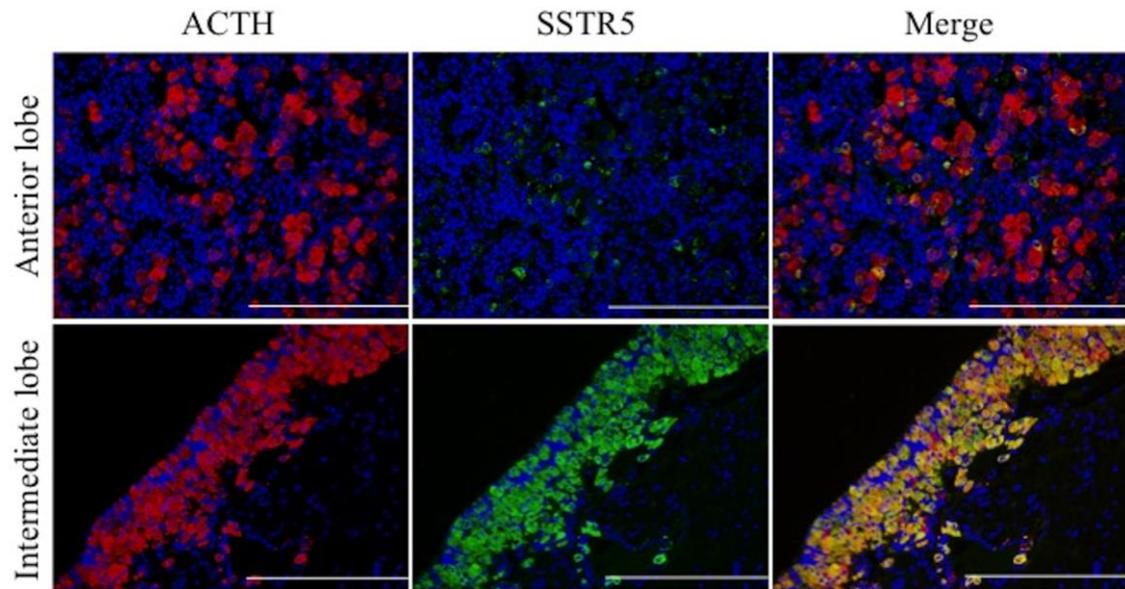


Figure 4-3. Double immunofluorescence staining of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and somatostatin receptor (SSTR) 5 in the normal canine anterior and intermediate lobes of the pituitary gland. Bar = 200 μ m

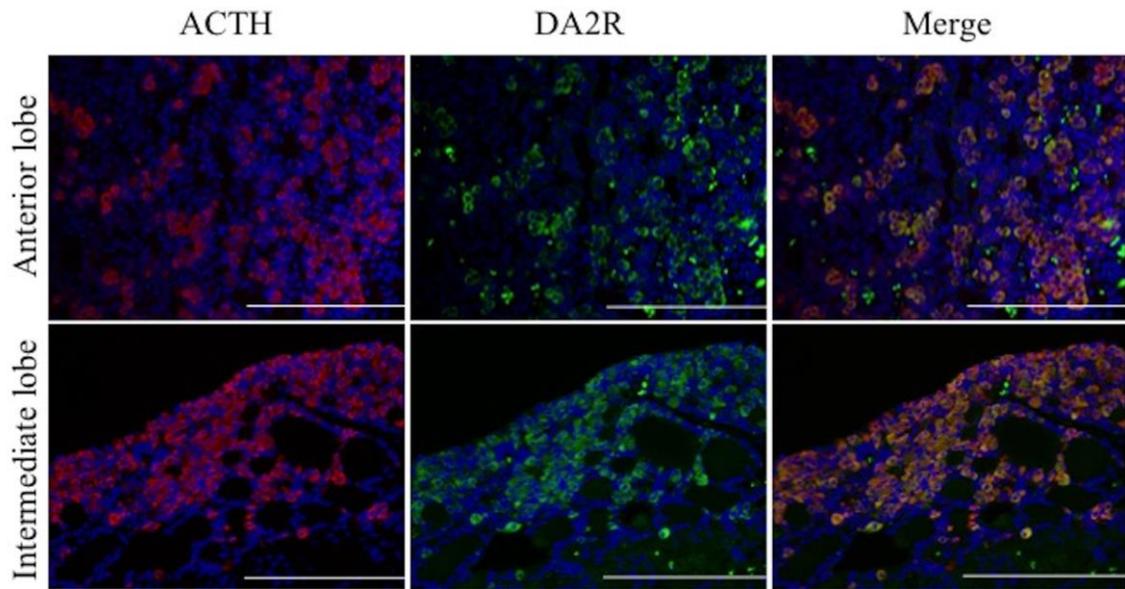


Figure 4-4. Double immunofluorescence staining of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and dopamine D2 receptor (DA2R) in the normal canine anterior and intermediate lobes of the pituitary gland. Bar = 200 μ m

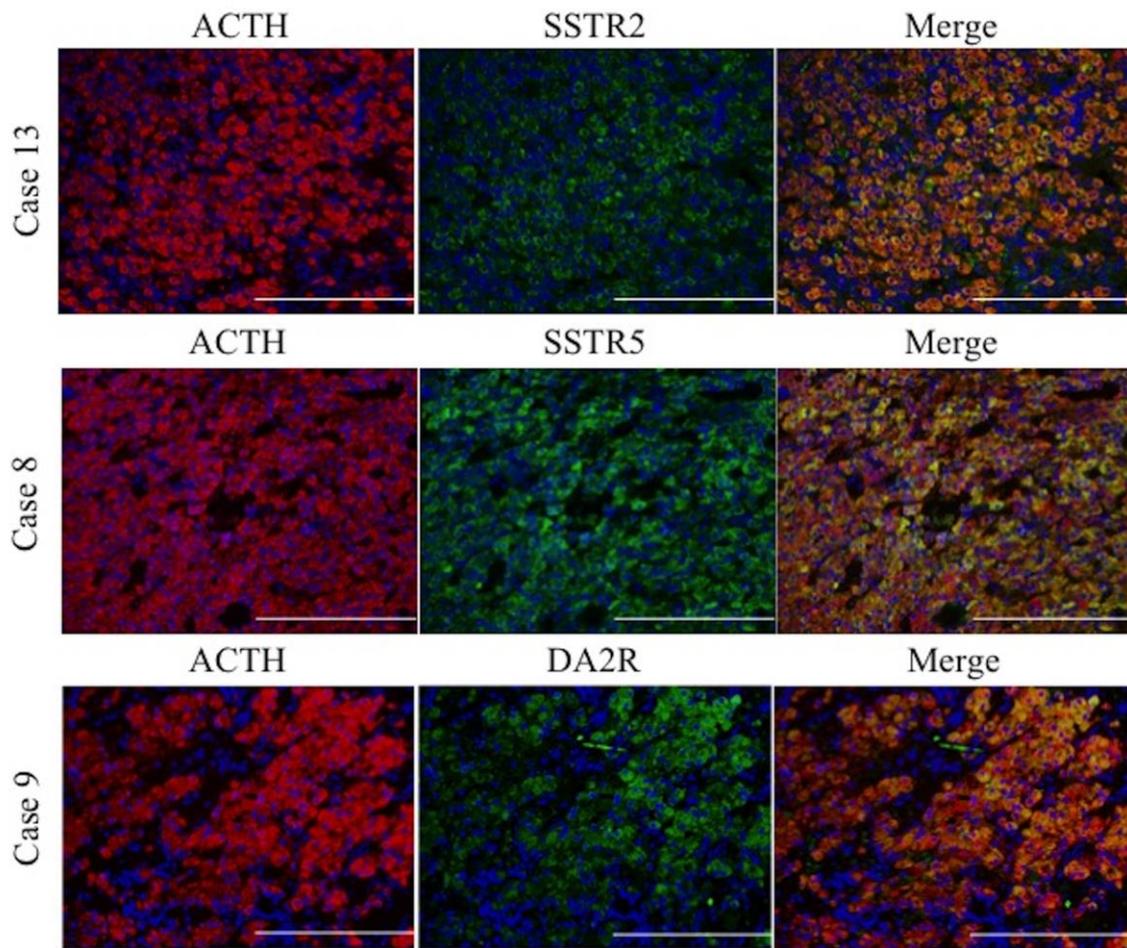


Figure 4-5. Double immunofluorescence staining of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and somatostatin receptor (SSTR) 2 (Case 13), SSTR5 (Case 8), dopamine D2 receptor (DA2R) (Case 9) in the canine ACTH-secreting pituitary adenomas. Case numbers refer to those shown in Table 4-2. Bar = 200 μ m

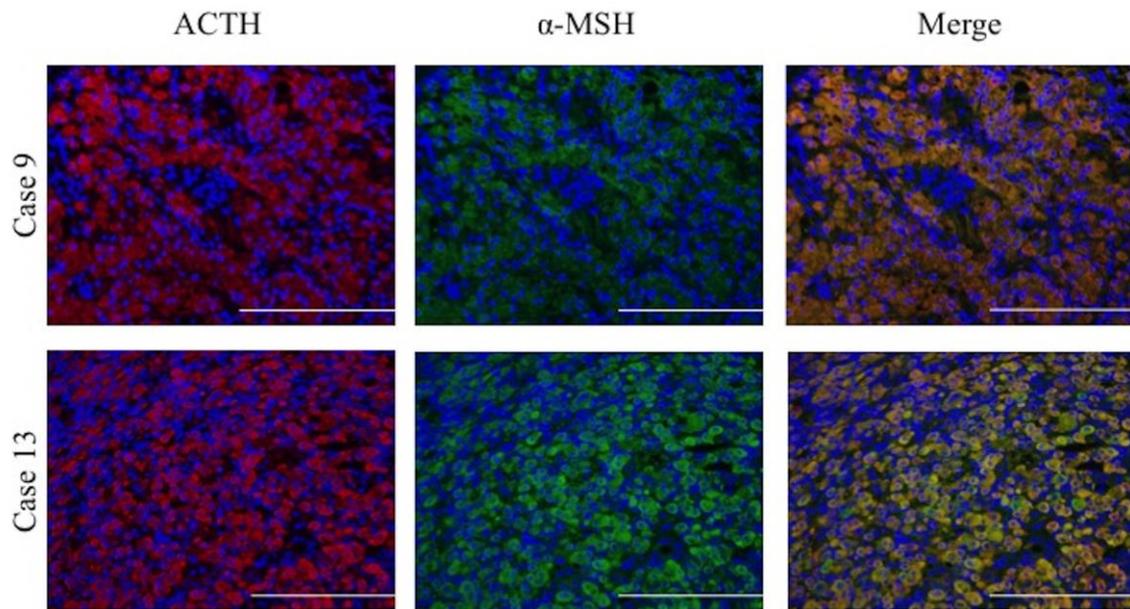


Figure 4-6. Double immunofluorescence staining of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) in the canine ACTH-secreting pituitary adenomas. Case numbers refer to those shown in Table 4-2. Bar = 200 μ m

第5章 総括

副腎皮質機能亢進症は犬で頻繁に遭遇する内分泌疾患であり、その約 80-85%が ACTH 産生性下垂体腺腫を原因とする下垂体依存性副腎皮質機能亢進症である (Feldman & Nelson 2004)。ゆえにクッシング病とも呼ばれる本疾患は内分泌疾患であると同時に頭蓋内占拠性病変としての性質を併せ持つ。さらに本疾患の犬における発生率は年間 1,000 頭につき 1-2 頭であり (de Bruin *et al.* 2008)、ヒトと比較すると約 1,000 倍高い発生率であることは非常に興味深い。

クッシング病の最善の治療方法はヒトで第一選択である顕微鏡下あるいは内視鏡下で実施する経蝶形骨洞手術による ACTH 産生性下垂体腫瘍の切除であろう。なぜなら、ヒトでは正常下垂体組織を温存し ACTH 産生性下垂体腺腫のみの摘出が可能であるため、手術により内分泌疾患および頭蓋内占拠性病変としての性質双方の治療が可能であり、さらに正常下垂体組織の温存が可能であるからである。

獣医療におけるクッシング病治療の問題点として、本疾患が疑われた場合に MRI による下垂体腫瘍のサイズが評価されることなく、コルチゾール分泌抑制薬による内科治療が開始される症例数が多いことが挙げられる。すなわち内分泌疾患としての側面に大きく焦点が当てられ、頭蓋内占拠性病変としての性質は重要視されていない。犬の ACTH 産生性腫瘍の多くは小型腺腫であることが疫学的な調査で明らかにされており (Nelson *et al.* 1989)、治療方法としてトリロスタンに代表されるコルチゾール分泌抑制薬による治療が妥当であると考えられる症例が多数であることは事実である。獣医学領域における現状の経蝶形骨下垂体切除術は医学領域のように ACTH 産生性下垂体腫瘍のみの摘出が困難であり、正常下垂体組織も含めた切除となるため術後のホルモン補充療法を生涯継続する必要がある。これは獣医学領域において特に日本では小型犬が本手術の対象となることが多く、蝶形骨に *baring* によって開けた非常に小さい孔から拡大鏡ルーペにて下垂体を摘出するためである。犬におけるクッシング病の多くが小型腺腫であるが、約 15%には直径 10mm 以上の巨大腺腫が存在することを

我々は常に念頭におくべきである (Nelson *et al.* 1989)。事実、本学付属動物医療センター脳神経外科には MRI により第三脳室まで伸展する下垂体腫瘍を持つ症例が多く見受けられる。この腫瘍が年月を経て成長を続けた場合、視床下部など周辺神経組織を圧排し鈍化、無関心、食欲低下、運動失調、四肢不全麻痺、徘徊、眼振、旋回運動、ヘッドプレッシング、失明、発作、昏睡などの神経症状を呈し、生命に関わると同時に QOL も著しく低下させる。さらに、*macroadenoma/macrocarcinoma* に対してミトタンを投与した症例で神経症状が進行したことが報告されており、コルチゾール分泌抑制薬の投与により下垂体腫瘍の成長が促進される可能性も否めない (Nelson *et al.* 1989)。ゆえに MRI による画像診断を実施せず、治療の第一選択として安易にコルチゾール分泌抑制薬を使用することは症例を危険にさらす可能性がある。

ゆえに今後の獣医療におけるクッシング病治療として期待されることは、まず初期治療の選択時に画像診断を実施すること、MRI により下垂体に腫瘍が認められた場合、経蝶形骨下垂体切除術の適応基準が明瞭化され個々の症例の下垂体腫瘍のサイズ、形態学的特徴により予測される完全切除率、再発率を治療方針の選択時に提示可能となること、また外科治療において不完全切除となった症例や再発をした症例に対して ACTH 産生性下垂体腫瘍に直接作用するソマトスタチンアナログやドパミンアゴニストが使用できるようになることである。

従って本研究では、MRI に基づいた ACTH 産生性下垂体腺腫の Grade 分類法を新たに提案することにより、経蝶形骨下垂体切除術の客観的な適応基準および予後評価を可能にすることを第一の目的とした。次に、ACTH 産生性下垂体腺腫自体に作用することが報告されているソマトスタチンアナログ及びドパミンアゴニストの受容体である SSTR2, SSTR5 および DA2R の ACTH 産生性下垂体腺腫における発現を明らかにすること、またソマトスタチンアナログの作用機序の一部に関連していると報告されている BMP4 および BMPR の犬の下垂体における発現を明らかにすることを目的とした。

1. クッシング病罹患犬における **Magnetic resonance imaging** に基づいた経蝶形骨下垂

体切除術適応基準に関する検討 (第2章)

本検討は ACTH 産生性下垂体腫瘍の伸展を MRI に基づいて Grade 分類し経蝶形骨下垂体切除術の手術適応の客観的指標を明らかにし、それぞれの Grade における予後を明らかにすることを目的とした。

Grade 分類は腫瘍の頭側および尾側方向への伸展および背側への伸展に基づいて Grade 1-5 の5段階評価を行った。すなわち Grade 1 は鞍背を超えない下垂体腫瘍、Grade 2 は鞍背を超え、第三脳室への伸展が認められるが、視交叉およびあるいは乳頭体、視床間橋への接触が認められない下垂体腫瘍、Grade 3 は鞍背を超え視交叉およびあるいは乳頭体への接触が認められるが視床間橋への接触は認められない下垂体腫瘍、Grade 4 は鞍背を超え、視交叉およびあるいは乳頭体、視床間橋への接触が認められる下垂体腫瘍、Grade 5 は第三脳室を占拠する下垂体腫瘍とした。さらに血管の巻き込みを評価するために、Grade 1-5 のすべての Grade に対して、さらに2つの Type に分類した。すなわち Type A はウイルス動脈輪あるいは海綿静脈洞の巻き込みがない下垂体腫瘍、Type B はウイルス動脈輪あるいは海綿静脈洞の巻き込みがある下垂体腫瘍とした。

ACTH 産生性下垂体腺腫の完全切除は Grade 1A および Grade 2A に分類された各3症例、Grade 3A に分類された23症例中22症例および Grade 3B に分類された2症例中1症例で達成された。しかしながら Grade 4B に分類された2症例は不完全切除となった。また、Grade 5 に分類された症例は経蝶形骨下垂体切除術の適応ではないと判断し、他の治療方法が選択された。再発は完全切除が達成された29症例のうち4症例で発生し、すべて Grade 3 に属していた。

以上の結果から、クッシング病罹患犬に対する経蝶形骨下垂体切除術は Type A, Grade 1-3 に属する症例では良好な予後が期待でき、経蝶形骨下垂体切除術の適応であることが示唆された。しかしながら、Type B, Grade 3 および Grade 4 以上の症例は経蝶形骨下垂体切除術による根治は望めない可能性が示唆された。

2. 健常成犬および ACTH 産生性下垂体腺腫における Bone morphogenetic protein 4 および Bone morphogenetic protein receptor の発現に関する検討 (第 3 章)

BMP4 は ACTH 産生細胞において ACTH の産生、細胞分化、腫瘍化を抑制することが報告されている (Giacomini *et al.* 2006, Labeur *et al.* 2010, Otuka 2013)。さらに BMP4 は間接的にソマトスタチンアナログやレチノイン酸、ラメルテオンといった ACTH 産生性下垂体腫瘍に直接作用することが期待される薬剤の作用機序に関連していることが報告されている (Giacomini *et al.* 2006, Tsukamoto *et al.* 2010, Tsukamoto *et al.* 2013)。特にソマトスタチンアナログであるパシレオチドはクッシング病罹患犬において ACTH の産生、尿中コルチゾール/クレアチニン比および下垂体腫瘍サイズを有意に減少させたことが報告されている (Castillo *et al.* 2011)。また、ヒトの下垂体組織では BMP4 は ACTH 産生細胞に発現が認められ、その陽性細胞数は ACTH 産生性下垂体腫瘍において減少することが報告されている (Giacomini *et al.* 2006)。

本検討は BMP4 およびその受容体である BMPR I および BMPR II の健常成犬および ACTH 産生性下垂体腫瘍における発現を検討することを目的とした。

qPCR の結果、*BMP4* mRNA は健常成犬下垂体と比較して ACTH 産生性下垂体腺腫において有意に低値を示した ($P=0.03$)。しかしながら、*BMPR IA*、*BMPR IB* および *BMPR II* mRNA の発現に有意差は認められなかった。蛍光免疫二重染色の結果、健常成犬の下垂体組織において BMP4 は TSH 陽性細胞に認められ ($51.3 \pm 7.3\%$)、ACTH 陽性細胞には認められなかった。BMPR II は下垂体前葉の広域に認められ、TSH 陽性細胞 ($19.9 \pm 5.2\%$) および GH 陽性細胞 ($94.7 \pm 3.6\%$) にその発現が認められたが、ACTH 陽性細胞には認められなかった。同様に ACTH 産生性下垂体腫瘍においても BMP4 および BMPR II は ACTH 陽性細胞に認められなかった。さらに ACTH 産生性下垂体腺腫と同時に採取された正常下垂体組織の TSH 陽性細胞における BMP4 陽性細胞の割合は $8.3 \pm 7.9\%$ であり正常下垂体組織と比較し有意に低値を示した

($P < 0.001$)。

ヒト下垂体組織においてBMP4はACTH陽性細胞に発現が認められることが報告されており (Giacomini *et al.* 2006)、本検討において犬とヒトの下垂体ではBMP4の発現パターンに動物種差が存在することが明らかとなった。さらに本検討により犬の下垂体におけるBMPRIIの発現細胞が明らかとなった。これらのBMP4に関する動物種差は犬をクッシング病の疾病モデル動物として使用する場合に考慮すべきであると考えられる。また、ソマトスタチンアナログの犬における作用機序にBMP4シグナルを介した作用の関連性は低いことが示唆された。

3. 健常成犬およびACTH産生性下垂体腺腫における somatostatin receptor 2, somatostatin receptor 5 および dopamine D2 receptor の発現に関する免疫組織学的検討 (第4章)

近年、ソマトスタチンアナログに属するパシレオチド、オクトレオチド、ランレオチドおよびドパミンアゴニストであるブロモクリプチン、カベルゴリンがACTH産生性下垂体腺腫自体に作用する可能性がある薬剤として報告された (Pivonello *et al.* 2009, Godbout *et al.* 2010, Mancini *et al.* 2010, Vilar *et al.* 2010, Ahmed *et al.* 2012, van der Pas *et al.* 2012, Murasawa *et al.* 2014)。特にアメリカおよびEUにおいて、ソマトスタチンアナログの一種であるパシレオチドは手術不適応あるいは手術が不奏効であった成人クッシング病患者に対して認可されている (Cuevas-Ramos *et al.* 2014)。また、ドパミンアゴニストであるカベルゴリンおよびブロモクリプチンにおいてもヒトACTH産生性下垂体腺腫に対する治療効果が報告されている (de Bruin *et al.* 2009, Pivonello *et al.* 2009)。

本検討は犬のACTH産生性下垂体腺腫におけるSSTR 1-5のうちホルモン分泌および細胞周期に関連するSSTR2, SSTR5 およびDA2Rのタンパク質発現を免疫組織学的に明らかにすることにより、ソマトスタチンアナログおよびドパミンアゴニストの

犬における臨床応用の可能性を探查することを目的とした。

SSTR2、SSTR5 および DA2R の健常成犬下垂体における発現は前葉と比較して中間葉において強陽性を示した。ACTH 陽性細胞における SSTR2、SSTR5 および DA2R 陽性細胞率はそれぞれ $27.0 \pm 8.6\%$ 、 $27.9 \pm 5.9\%$ 、 $34.0 \pm 9.4\%$ であった。一方中間葉の ACTH 陽性細胞における SSTR2、SSTR5 および DA2R 陽性細胞率はそれぞれ $97.8 \pm 1.5\%$ 、 $94.1 \pm 4.4\%$ 、 $96.1 \pm 6.6\%$ であった。

犬の ACTH 産生性下垂体腺腫において SSTR2 は 14 症例中 11 症例で、SSTR5 は 14 症例中 12 症例で、DA2R は 14 症例中 6 症例で陽性を示した。陽性を示した症例のうち SSTR2 では 4 症例が、SSTR5 では 7 症例が強陽性を示したが、DA2R で強陽性を示した症例は認められなかった。また SSTR2 および SSTR5 とともに強陽性を示した症例は 4 例認められ、そのうち 2 症例は α -Melanocyte stimulating hormone に強陽性を示す中間葉由来の ACTH 産生性下垂体腺腫であった。

本検討より、ACTH 産生性下垂体腺腫をターゲットとしたクッシング病の治療を考慮する場合、犬においてソマトスタチンアナログおよびドパミンアゴニストに対する受容体の発現が多く症例で認められたことから、これらの薬剤が犬のクッシング病においても有効である可能性が示唆された。しかしながら、臨床例で使用する場合には病理学的診断に基づき使用を検討すべきであると考えられる。

本研究において新たに考案した Grade 分類法に基づいてクッシング病罹患犬の手術適応を考えた場合 Type A, Grade 1-3、すなわち海綿静脈洞および Willis 動脈輪の巻き込みがなく、下垂体腫瘍が視床間橋へ接していない症例では完全切除率が高く、良好な予後が期待できることが明らかになった。一方 Type B, Grade 3 以上の症例では完全切除率は低いため、治療の第一選択として放射線治療を選択するか、あるいは外科治療を実施する場合には減容積を目的とした手術となることを考慮に入れる必要があることが示唆された。

さらに本検討において経蝶形骨下垂体切除術により摘出された ACTH 産生性下垂

体腺腫において **SSTR2** および **SSTR5** に陽性を示す症例が多いことから、今後は手術により摘出された **ACTH** 産生性下垂体腺腫に対して **SSTR2**、**SSTR5** および **DA2R** の発現を免疫組織学的に検討し、不完全切除症例および再発症例に対してソマトスタチンアナログあるいはドパミンアゴニストの使用による内科治療という治療選択肢が提供可能となる可能性が示唆された。AtT20 細胞を使用した検討においてソマトスタチンアナログの作用機序に **BMP4** シグナルのアップレギュレーションが報告されているが、本研究内容を考慮すると犬において、ソマトスタチンアナログの作用機序に **BMP4** の関連性は低いことが示唆された。クッシング病の発生率が非常に高い犬において **ACTH** 産生および細胞分裂を抑制する **BMP4** の発現および **BMPRII** の発現が **ACTH** 陽性細胞に欠如していることは非常に興味深い。しかしながら、これが犬のクッシング病の発生率の高さに直接関連しているかは不明であり、更なる検討が必要であると考えられる。

謝辞

はじめに本研究を行うに際して終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました、日本獣医生命科学大学獣医外科学研究室 原康教授に深甚なる謝意を表します。

本研究に対し有益な御指導と御援助を賜りました、日本獣医生命科学大学獣医外科学研究室 多川政弘名誉教授、原田恭治准教授、余戸拓也講師、神野信夫助教、東京医科歯科大学細胞生理学分野 越智広樹助教に深く感謝の意を表します。

また本研究を行うに際して終始多大な御助言、御協力を頂き、数々の御配慮を賜りました日本獣医生命科学大学獣医解剖学研究室 尼崎肇教授、添田聡准教授、大石元治講師、樺山実幸助教、日本獣医生命科学大学獣医微生物学研究室 片岡康准教授、日本獣医生命科学大学 獣医病理学研究室 高橋公正教授、道下正貴講師、日本獣医生命科学大学獣医内科学研究室 手嶋隆洋講師、北里大学 小動物第一外科学研究室 石野寛和助教に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり終始多大な御協力を頂きました、小勝負健一学士、稲葉佑記学士、大山隆司学士、梅田直樹、加藤あかね、田島瑛、秋間諒、松岡沙矢佳の各氏に深く感謝の意を表します。

最後に本研究を行うに際し、犠牲となった動物たちに深く感謝し、御冥福をお祈りいたします。

参考文献

Akiyoshi T, Uchida K., *et al.* (2004) Expression of bone morphogenetic protein-6 and bone morphogenetic protein receptors in myoepithelial cells of canine mammary gland tumors. *Veterinary pathology* 41, 154–163

Ahmed A, Furqan S., *et al.* (2012) Disappearance of pituitary macro adenoma with combination of ketoconazole and cabergoline treatment: an unusual case of Cushing's syndrome with interesting findings. *BMJ Case Reports* doi: 10.1136

Alenza DP, Arenas C., *et al.* (2006) Long-term efficacy of trilostane administered twice daily in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism. *Journal of the American Animal Hospital Association* 42, 269-276

Atkinson AB, Kennedy A., *et al.* (2005) Long-term remission rates after pituitary surgery for Cushing's disease: the need for long-term surveillance. *Clinical endocrinology* 63, 549-559

Auriemma E, Barthez PY., van der Vlugt-Meijer, R. H., *et al.* (2009) Computed tomography and low-field magnetic resonance imaging of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 11 cases (2001-2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 235, 409-414

Barker FG. 2nd, Klibanski A. & Swearingen B. (2003) Transsphenoidal surgery for pituitary tumors in the United States, 1996–2000: mortality, morbidity, and the effects of hospital and surgeon volume. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88, 4709-4719

Barneett AH, Livesey JH., *et al.* (1983) Comparison of preoperative and postoperative ACTH

concentrations after bilateral adrenalectomy in Cushing's disease. *Clinical endocrinology* 18, 301-305

Baylin SB, Mendelsohn G. (1980) Ectopic (inappropriate) hormone production by tumors: mechanisms involved and the biological and clinical implications. *Endocrine reviews* 1, 45-77

Ben-Shlomo A & Melmed S. (2008) Somatostatin agonist for treatment of acromegaly. *Molecular and Cellular Endocrinology* 286, 192-198

Bertoy EH, Feldman EC., *et al.* (1996) One-year follow-up evaluation of magnetic resonance imaging of the brain in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 15, 208, 1268-1273

Braddock JA, Church DB., (2003) Trilostane treatment in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Australian veterinary journal* 81, 600-607

Bruns C, Lewis I., *et al.* (2002) SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *European Journal of Endocrinology* 146, 707-716

Castillo VA, Gómez NV., *et al.* (2008) Cushing's disease in dogs: Cabergoline treatment. *Research in Veterinary Science* 85, 26-34.

Castillo VA, Cabrera Blatter MF., *et al.* (2009) Diurnal ACTH and plasma cortisol variations in healthy dogs and in those with pituitary-dependent Cushing's syndrome before and after treatment with retinoic acid. *Research in veterinary Science* 86, 223–229.

Castillo V, Theodoropoulou M., *et al.* (2011) Effect of SOM230 (pasireotide) on corticotropic cells: action in dogs with Cushing's disease. *Neuroendocrinology* 94, 124–136

Chung CS, Fujita N., *et al.* (2013) A comparison of neurosphere differentiation potential of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells. *The Journal of veterinary medical science.* 75, 879–886

Colao A, Petersenn S., *et al.* (2012) A 12-month phase 3 study of pasireotide in Cushing's disease. *New England Journal of Medicine* 366, 914-924

Cuevas-Ramos D, Fleseriu M., *et al.* (2014) Somatostatin receptor ligands and resistance to treatment in pituitary adenomas. *Journal of Molecular Endocrinology* 52, R223-240

Davis SW, Camper SA. (2007) Noggin regulates Bmp4 activity during pituitary induction. *Developmental Biology* 305, 145–160

de Bruin C, Hanson JM., *et al.* (2008) Expression and functional analysis of dopamine receptor subtype 2 and somatostatin receptor subtypes in canine cushing's disease. *Endocrinology* 149, 4357–4366

de Bruin C, Feelders RA., *et al.* (2009) Somatostatin and dopamine receptors as targets for medical treatment of Cushing's Syndrome. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 10, 91-102

Denef C. (2008) Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *J Neuroendocrinology* 20, 1–70

Di Ieva A, Rotondo F, Syro LV., *et al.* (2014) Aggressive pituitary adenomas—diagnosis and emerging treatments. *Nature Reviews Endocrinology* 10, 423-435

Etxabe J, Vazquez JA. (1994) Morbidity and mortality in Cushing's disease: an epidemiological approach. *Clinical Endocrinology* 40, 479–484

Faure MO, Nicol L., *et al.* (2005) BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. *The journal of endocrinology* 186, 109-121

Feldman EC. & Nelson RW. (2004) Canine hyperadrenocorticism (Cushing's syndrome). In: Canine and feline endocrinology and reproduction. Eds E. C. Feldman and R. W. Nelson. W. B. Saunders, Philadelphia. pp 252-357

Frank LA, Henry G A, Whittemore JC., *et al.* (2015) Serum cortisol concentrations in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism and atypical hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29, 193-199

Galac S, Kooistra HS., *et al.* (2005) Hyperadrenocorticism in a dog due to ectopic secretion of adrenocorticotrophic hormone. *Domestic animal endocrinology* 28, 338-348

Giacomini D, Páez-Pereda M., *et al.* (2006) Bone morphogenetic protein-4 control of pituitary pathophysiology. *Frontiers Hormone Research* 35, 22–31

Giacomini D, Páez-Pereda M., *et al.* (2006) Bone morphogenetic protein-4 inhibits corticotroph tumor cells: involvement in the retinoic acid inhibitory action. *Endocrinology* 147, 247–256

Godbout A, Manavela M., *et al.* (2010) Cabergoline monotherapy in the long-term treatment of

Cushing's disease. *European Journal of Endocrinology* 163, 709-716

Goossens MM, Feldman E., *et al.* (1998) Efficacy of cobalt 60 radiotherapy in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *The journal of the American Veterinary Medical Association* 212, 374-376

Halmi NS, Peterson ME *et al.*, *et al.* (1981) Pituitary intermediate lobe in dog: two cell types and high bioactive adrenocorticotropin content. *Science* 211, 72-74

Hammer GD, Tyrrell JB., *et al.* (2004) Transsphenoidal microsurgery for Cushing's disease: initial outcome and long-term results. *The journal of clinical endocrinology and metabolism* 89, 6348-6357

Hanson JM, van 't HM, Voorhout G., *et al.* (2005) Efficacy of transsphenoidal hypophysectomy in treatment of dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19, 687-694

Hanson JM, Teske E, Voorhout G., *et al.* (2007) Prognostic factors for outcome after transsphenoidal hypophysectomy in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Neurosurgery* 107, 830-840

Hara Y, Masuda H, Taoda T., *et al.* (2003) Prophylactic efficacy of desmopressin acetate for diabetes insipidus after hypophysectomy in the dog. *Journal of Veterinary Medical Science* 65, 17-22

Hara Y, Teshima T, Taoda T., *et al.* (2010) Efficacy of transsphenoidal surgery on endocrinological status and serum chemistry parameters in dogs with Cushing's disease.

Journal of Veterinary Medical Science 72, 397-404

Hong JW, Ku CR, Kim SH., *et al.* (2013) Characteristics of acromegaly in Korea with a literature review. *Endocrinology and Metabolism (Seoul)* 28, 164-168

Hofman BM, Hlavac M., *et al.* (2008) Long-term results after microsurgery for Cushing disease: experience with 426 primary operation over 35 years. *Journal of neurosurgery* 108, 9-18

Hofland LJ, van der Hoek J., *et al.* (2005) The multi-ligand somatostatin analogue SOM230 inhibits ACTH secretion by cultured human corticotroph adenomas via somatostatin receptor type 5. *European Journal of Endocrinology* 152, 645-654

Ishino H, Hara Y., *et al.* (2010) Hypophysectomy for a dog with coexisting Cushing's disease and diabetes mellitus *The journal of veterinary medical science* 27, 343-348

Isidori AM, Kaltsas GA., *et al.* (2006) Ectopic ACTH syndrome. *Frontiers of hormone research* 35, 143-156

Kasperlik-Zatuska AA, Nielubowicz J., *et al.* (1983) Nelson's syndrome: incidence and prognosis. *Clinical endocrinology* 19, 693-698

Kelly WF, MacFarlane IA., *et al.* (1983) Cushing's disease treated by total adrenalectomy: long-term observation of 43 patients. *The Quarterly journal of medicine* 52, 224-231

Kent MS, Bommarito D., *et al.* (2007) Survival, neurologic response, and prognostic factors in dogs with pituitary masses treated with radiation therapy and untreated dogs. *Journal of*

veterinary internal medicine 21, 1027-1033

Kim MS, Jang HD, Kim OL. (2009) Surgical results of growth hormone-secreting pituitary adenoma. *Journal of Korean Neurosurgical Society* 45, 271-274

Knosp E, Steiner E, Kitz K., *et al.* (1993) Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: a magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings. *Neurosurgery* 33, 610-617

Kooistra HS, Voorhout G, Mol JA., *et al.* (1997) Correlation between impairment of glucocorticoid feedback and the size of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Endocrinology* 152, 387-394

Labeur M, Páez-Pereda M. (2010) Pituitary tumors: cell type-specific roles for BMP-4. *Molecular and Cellular Endocrinology* 326, 85–88

LeCouteur RA, Withrow SJ., *et al.* (2007) Tumors of the Nervous System. *Small animal clinical oncology*. 4th ed, pp659-685

Lindholm J, Juul S, Jørgensen JO., *et al.* (2001) Incidence and late prognosis of Cushing's syndrome: a population-based study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86, 117–123.

Mahmound-Ahmed AS, Suh JH. (2002) Radiation therapy for Cushing's disease: a review. *Pituitary* 5, 175-180

Mamelak AN, Owen TJ. & Bruyette D. (2014) Transsphenoidal surgery using a high definition

video telescope for pituitary adenomas in dogs with pituitary dependent hypercortisolism: methods and results. *Veterinary Surgery* 43, 369-379

Mancini T, Porcelli T., *et al.* (2010) Treatment of Cushing disease: overview and recent findings. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 6, 505-516

Mariani CL, Schubert TA, House RA., *et al.* (2013) Frameless stereotactic radiosurgery for the treatment of primary intracranial tumours in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology* doi: 10.1111/vco.12056.

Marino DJ, Dewey CW, Loughin CA., *et al.* (2014) Severe hyperthermia, hypernatremia, and early postoperative death after transethmoidal cavitron ultrasonic surgical aspirator (CUSA)-assisted diencephalic mass removal in 4 dogs and 2 cats. *Veterinary Surgery* 43, 888-894

Meij BP, Voorhout G, Van den Ingh TS., *et al.* (1997) Transsphenoidal hypophysectomy in beagle dogs: evaluation of a microsurgical technique. *Veterinary Surgery* 26, 295-309

Meij BP, Voorhout G, Van den Ingh TS., *et al.* (1998) Results of transsphenoidal hypophysectomy in 52 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Veterinary Surgery* 27, 246-261

Murai A, Nishii N., *et al.* (2012) GH-producing mammary tumors in two dogs with acromegaly. *The Journal of veterinary medical science* 4, 771-774

Murasawa S, Kageyama K., *et al.* (2014) Inhibitory effects of SOM230 on adrenocorticotrophic hormone production and corticotroph tumor cell proliferation in vitro and in vivo. *Molecular*

and Cellular Endocrinology 394, 37-46

Neiger R, Ramsey I, *et al.* (2002) Trilostane treatment of 78 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *The Veterinary record* 150, 799-804

Nelson DH, Meakin JW., *et al.* (1960) ACTH-producing tumor of the pituitary gland. *The New England journal of medicine.* 259, 161-164

Nelson RW, Ihle SL, Feldman EC. (1989) Pituitary macroadenomas and macroadenocarcinomas in dogs treated with mitotane for pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 13 cases (1981-1986). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 194, 1612-1617

Otsuka F. (2013) Multifunctional bone morphogenetic protein system in endocrinology. *Acta Medica Okayama.* 67, 75–86.

Patel YC, Greenwood MT., *et al.* (1993) Multiple gene transcripts of the somatostatin receptor SSTR2: tissue active distribution and cAMP regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 192, 288-294

Pereira MA, Halpern A., *et al.* (1998) A study of patients with Nelson's syndrome. *Clinical endocrinology* 49, 533-539

Peterson ME, Krieger DT., *et al.* (1982) Immunocytochemical study of the hypophysis in 25 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism *Acta endocrinologica* 101, 15-24

Peterson ME. (2001) Medical treatment of canine pituitary-dependent hyperadrenocorticism

(Cushing's syndrome). *The veterinary clinics of North America. Small animal practice.* 31, 1005-1014

Pivonello R, Ferone D., *et al.* (2004) Dopamine receptor expression and function in corticotroph pituitary tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89, 2452-2462

Pivonello R, De Martino MC., *et al.* (2009) The medical treatment of Cushing's disease: effectiveness of chronic treatment with the dopamine agonist cabergoline in patients unsuccessfully treated by surgery. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94, 223-230

Ramm-Pettersen D, Berg-Johnsen J, Hol PK., *et al.* (2011) Intra-operative MRI facilitates tumour resection during trans-sphenoidal surgery for pituitary adenomas. *Acta Neurochirurgica* 153, 1367-1373

Reine NJ. (2007) Medical management of pituitary-dependent hyperadrenocorticism: mitotane versus trilostane. *Clinical techniques in small animal practice* 22, 18-25

Rijnberk A, der Kinderen PJ., *et al.* (1968) Spontaneous hyperadrenocorticism in the dog. *The Journal of Endocrinology* 41, 397-406

Saeger W, Lüdecke DK., *et al.* (2007) Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *European Journal of Endocrinology* 156, 203-216

Shimon I, Ram Z., *et al.* (2002) Transsphenoidal surgery for Cushing's disease: endocrinological follow-up monitoring of 82 patients. *Neurosurgery* 51, 57-61

Taoda T, Hara Y., *et al.* (2011) Magnetic resonance imaging assessment of pituitary posterior lobe displacement in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *The journal of veterinary medical science* 73, 725-731

Teramoto A. (2001) Diagnosis and treatment of Cushing's disease. *Japanese journal of neurosurgery* 10, 86-91

Teshima T, Hara Y., *et al.* (2008) Cushing's disease complicated thrombosis in a dog. *The journal of veterinary medical science* 70, 487-491

Teshima T, Hara Y., *et al.* (2009) Coexistence of corticotroph adenoma and thyrotroph hyperplasia in a dog. *The Journal of veterinary medical science* 71, 93-98

Thomas CG Jr, Smith AT., *et al.* (1984) Nelson's syndrome after Cushing's disease in childhood: a continuing problem. *Surgery* 96, 1067-1077

Thomas JP, Hall R. (1983) Medical management of pituitary disease. *Clinics in endocrinology and metabolism* 12, 771-788

Trouillas J. (2002) Pathology and pathogenesis of pituitary corticotroph adenoma. *Neurochirurgie* 48, 149-162

Tsukamoto N, Otsuka F., *et al.* (2010) Effects of bone morphogenetic protein (BMP) on adrenocorticotropin production by pituitary corticotrope cells: involvement of up-regulation of BMP receptor signaling by somatostatin analogs. *Endocrinology* 51, 1129-1141

Tsukamoto N, Otsuka F., *et al.* (2013) Melatonin receptor activation suppresses adrenocorticotropin production via BMP-4 action by pituitary AtT20 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 375, 1–9

Vance ML. (2005) Pituitary radiotherapy. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 34, 479-487

van der Pas R, de Herder WW., *et al.* (2012) New developments in the medical treatment of Cushing's syndrome. *Endocrine-Related Cancer* 19, R205-R223

Vilar L, Naves LA., *et al.* (2010) Effectiveness of cabergoline in monotherapy and combined with ketoconazole in the management of Cushing's disease. *Pituitary* 13, 123-129

Wajchenberg BL, Mendonca BB., *et al.* (1994) Ectopic adrenocorticotrophic hormone syndrome. *Endocrine reviews* 15, 752-787

Webb SM, Badia X., *et al.* (2008) Evaluation of health-related quality of life in patients with Cushing's syndrome with a new questionnaire. *European Journal of Endocrinology* 158, 623-630