

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 for canine Cushing's disease)

学位論文の内容の要約

獣医生命科学研究科獣医学専攻博士課程平成 24 年入学

佐藤朝香
(指導教員：原 康)

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 adrenocorticotrophic hormone (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。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。ゆえにクッシング病の初期治療選択時に magnetic resonance imaging (MRI) による画像診断が実施され、その結果に基づき内科治療、外科治療および放射線治療から個々の症例に応じて適切な治療方法を選択することが望まれる。その中で現在経蝶形骨下垂体切除術の手術適応基準は定められておらず、これを明瞭化することは治療選択肢を提示する上で重要である。さらに外科治療において不完全切除となった症例や再発症例に対しては、摘出された ACTH 産生性下垂体腺腫における somatostatin receptor (SSTR) および dopamine D2 receptor (DA2R) の発現を免疫組織学的に検討することにより、ACTH 産生性下垂体腫瘍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あるいはドパミンアゴニストといった向下垂体治療薬が術後に使用出来る可能性が考えられる。

本研究では、MRI に基づいた ACTH 産生性下垂体腺腫の Grade 分類法を新たに考案することにより、経蝶形骨下垂体切除術の客観的な手術適応基準を明確にした。加えて、不完全切除症例および再発症例に対する内科治療の選択肢として、犬の ACTH 産生性下垂体腺腫における SSTR および DA2R の発現を明らかにし、さらにソマトスタチンアナログの作用機序の一つに関連することが報告されている bone morphogenetic protein 4 (BMP4) および bone morphogenetic protein receptor (BMPR) の ACTH 産生性下垂体腺腫における発現を明らかにした。

1. クッシング病罹犬における MRI 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

本検討は ACTH 産生性下垂体腫瘍の伸展を MRI に基づいて Grade 分類することにより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。さらに各 Grade に対して Type A を 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 を 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て分類を行った。

ACTH 産生性下垂体腺腫の完全切除は対象症例 33 症例中、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外科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、手術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 BMP4 および BMPR の発現に関する検討

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。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。

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。

Quantitative PCR 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 thyroid-stimulating hormone (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** は下垂体前葉広域に認められ、TSH 陽性細胞 ($19.9 \pm 5.2\%$) および growth hormone (GH) 陽性細胞 ($94.7 \pm 3.6\%$) に認められたが、**ACTH** 陽性細胞には認められなかった。同様に **ACTH** 産生性下垂体腺腫においても **BMP4** および **BMPR II** は **ACTH** 陽性細胞に認められなかった。**ACTH** 産生性下垂体腺腫とともに摘出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 ($P<0.001$)。

ヒト正常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、本検討において犬とヒトの下垂体では **BMP4** の発現パターンに種差が存在することが明らかとなった。またソマトスタチンアナログであるパシレオチドが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という過去の報告を考慮に入れると、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 **SSTR2**, **SSTR5** および **DA2R** の発現に関する免疫組織学的検討

近年、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が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。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。

本検討は犬の ACTH 産生性下垂体腺腫におけるソマトスタチン受容体である 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 およびドパミン受容体である 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索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 ACTH 陽性細胞において 80%以上の陽性率を示したが、DA2R で 80%以上の陽性率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 80%以上の陽性率を示した症例は 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、不完全切除や再発が認められた症例に対しては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も治療選択肢となり得ることが示唆された。

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, Grade1-3 に属する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。

さらに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対して

SSTR2、SSTR5 および DA2R の発現を免疫組織学的に検討することにより不完全切除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による内科治療という選択肢が提供可能となる可能性が示唆された。本研究内容を考慮すると犬における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。