

## 論文審査の結果の要旨

申請者名 佐藤 朝香

提出された佐藤朝香氏の学位論文について、平成 28 年 1 月 20 日、5 名の審査委員（原 康、新井敏郎、小山秀一、藤田道郎、盆小原 誠）が最終試験を行った。論文審査の結果は以下の通りである。佐藤朝香氏の学位論文のテーマは犬のクッシング病の診断・治療に関する研究であり、本論文は第一章（序論）に始まり総括を含め全部で五章構成となっている。小動物臨床領域において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クッシング病である。クッシング病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。医学領域においてクッシング病治療の第一選択は外科治療であるのに対して、獣医学領域においてはコルチゾール合成阻害薬による内科治療が選択されることが多い。獣医学領域におけるクッシング病治療の問題点として、診断時に magnetic resonance imaging (MRI) による腫瘍サイズの判定を行わずに内科治療が選択される点、および唯一の根治的治療である外科治療に関して明確な適応基準が存在しない点である。申請者は 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、現在犬のクッシング病に対する外科治療として実施されている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することを目的の一つとして本研究を行っている。さらに、近年 ACTH 産生性下垂体腺腫自体に直接作用する向下垂体治療薬としてアメリカおよび 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。認可されたパシレオチド以外にもドパミンアゴニスト、レチノイン酸、ラメルテオン等、ACTH 産生性下垂体腺腫に作用する可能性が示唆されている薬物が報告されている。この中でクッシング病患者に対して臨床的に使用

され、効果が報告されている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 ACTH 産生性下垂体腺腫に対する臨床応用の可能性を探索する目的で申請者はソマトスタチンおよびドパミン受容体の ACTH 産生性下垂体腺腫における発現を明らかにすることを目的とし本研究を実施している。さらに上記の各種向下垂体治療薬の作用機序の一つに関連し、ACTH 分泌抑制および細胞増殖の抑制に関与していることが報告されている bone morphogenetic protein 4 (BMP4) の犬の下垂体における発現を明らかにすることを検討目的としている。

## 第 2 章

申請者は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 MRI を回顧的に調査し、ACTH 産生性下垂体腺腫を Grade 1-5 の 5 段階に分け新たな Grade 分類を考案している。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、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ている。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。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。以上の結果は、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を示唆している。

## 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。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。申請者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 bone morphogenetic protein receptor (BMPR) の発現を mRNA およびタンパク質の発現で評価している。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 I A*、*BMPR I B* 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、本検討は、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を示唆している。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を本検討は示唆している。

#### 第 4 章

申請者は健常成犬下垂体および ACTH 産生性下垂体腺腫における somatostatin receptor 2 (SSTR2)、somatostatin receptor 5 (SSTR5) および

dopamine D2 receptor (DA2R) の発現を免疫組織学的に検討している。SSTR2, SSTR5, 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  $\alpha$ -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。本検討は、外科治療後の不完全切除や再発が認められた症例に対する術後の治療と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が治療選択肢となり得ることを示唆している。

以上のように、本論文は画像診断に基づいたクッシング病に対する経蝶形骨下垂体切除術の適応基準を初めて明らかにし、さらに外科治療によって寛解が得られなかった症例に対する新たな薬物療法の可能性を示唆したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。