

学 位 論 文 要 旨

氏名 一萬田 正直

題 目 : Integrative Evaluation of Prognostic Factors in Surgically Resected Canine Pulmonary Adenocarcinoma
(犬の切除肺腺癌における予後因子の統合的評価に関する研究)

論文要旨：

犬の原発性肺腺癌 (cPAC) は高齢犬に発生するまれな悪性腫瘍であり、外科切除が根治を期待し得る主な治療である。これまでに腫瘍径などの臨床病理学的因子が術後予後と関連することが示されている。犬の原発性肺腺癌と同様の組織型が含まれるヒトの非小細胞肺癌 (NSCLC) では、*上皮成長因子受容体 (EGFR)* 変異をはじめとするドライバー遺伝子変異や分子標的薬の標的となる分子異常、免疫チェックポイント関連分子の発現や腫瘍微小環境 (TME) の評価など、分子学的・免疫学的アプローチを組み合わせた予後評価と治療選択が進んでいる。一方、獣医領域では、臨床病理学的因子に加えて、犬で比較的高頻度に認められるヒト*上皮成長因子受容体 2 (HER2)* 遺伝子変異や TME の情報を統合して検討した報告は限られている。本研究の目的は、外科切除された犬の肺腺癌症例において、臨床病理学的因子に *HER2* 遺伝子変異および TME 評価を加えて統合的に解析し、術後予後層別化におけるそれらの追加的意義を明らかにすることである。

第 1 章では、cPAC において腫瘍サイズが重要な予後因子とされている点に着目し、とくに中～大型犬を主たる対象として評価されてきた腫瘍径に基づく予後分類が、日本で症例数の多い小型犬にも適用可能かどうかを検討した。外科切除によって治療された体重 15 kg 未満の PAC 罹患犬を対象に、腫瘍径を含む臨床病理学的因子と無増悪進行期間 (PFI) および全生存期間 (OST) との関連を解析した。canine lung carcinoma stage classification (CLCSC) に基づき腫瘍径を 4 群 (≤ 3 cm、 $>3 \sim \leq 5$ cm、 $>5 \sim \leq 7$ cm、 >7 cm) に分類したところ、PFI の単変量解析では腫瘍サイズ分類が 1 段階上がるごとに PFI が短縮する傾向が認められ、腫瘍径が大きい群ほど術後の進行リスクが高くなることが示唆された。これらの結果から、中～大型犬を基盤として構築された CLCSC の腫瘍サイズ分類は、小型犬においても PFI の層別化に有用であることが示された。

第 2 章では、cPAC における *HER2* 遺伝子変異の頻度と予後的意義を検討した。犬では *HER2* 遺伝子変異が最大 38% と比較的高頻度に認められると報告されているものの、その予後的意義はこれまで明らかにされていなかった。そこで、外科切除された cPAC 72 例を対象に *HER2* exon 20 および 21 の直接シークエンスと *HER2* 免疫組織化学染色を行い、他の臨床病理学的因子と合わせて PFI・OST との関連を解析した。69 例のうち 20 例 (29.0%) に exon 20 ミス

センス変異が認められ、そのほとんどは膜貫通領域 V659E 変異であった。*HER2* 遺伝子変異の有無と *HER2* タンパク発現の強度は必ずしも一致しなかった。*HER2* 遺伝子変異が認められることは単変量解析および多変量解析の両方で PFI の延長と有意に関連していた。以上より、cPAC における *HER2* 遺伝子変異は、ヒトとは異なる分子背景を反映するとともに、外科切除後の進行リスクを層別化するうえで有用な指標となり得ることが示唆された。

第 3 章では、外科切除によって治療された cPAC における腫瘍微小環境の特徴と予後への影響を明らかにするため、腫瘍内リンパ球集簇 (LAs) と腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を評価した。外科切除標本の HE 染色および免疫組織化学染色を用いて、腫瘍内の CD8 陽性 T 細胞、Foxp3 陽性細胞、CD20 陽性細胞の分布を解析し、腫瘍内 LAs の有無および各細胞密度と PFI・OST との関連を検討した。その結果、腫瘍内に LAs を認める症例では PFI が短縮しており、LAs を有する犬では腫瘍内 Foxp3 陽性細胞密度が有意に高いことが明らかとなった。これらの結果から、cPAC において腫瘍内 LAs の存在は Foxp3 陽性細胞の集積を伴う特定の腫瘍微小環境を反映し、術後 PFI に不利な影響を及ぼし得る可能性があると考えられた。

以上の結果から、cPAC の外科的切除後の予後は、腫瘍サイズなどの臨床病理学的因子に加えて、*HER2* 遺伝子変異の有無および TME の影響を受けることが示唆される。CLCSC に基づく腫瘍サイズを含むステージ分類はベースラインとなるリスク評価の実用的な基盤を提供し、*HER2* 遺伝子変異は術後経過がより良好なサブグループを定義し、腫瘍内 LAs の存在は早期に進行するリスクを検出できる可能性がある。これらの臨床病理学的・分子生物学的・免疫学的因子を併用することで、単独のパラメータよりも精緻な層別化が可能となり、cPAC を有する犬のモニタリングや、将来の補助療法または全身療法の開発に関する意思決定に役立つ可能性がある。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	一萬田 正直
審 査 委 員	主 査：山口大学 教 授 水 野 拓 也
	副 査：山口大学 教 授 大 濱 剛
	副 査：山口大学 教 授 谷 健 二
	副 査：鹿児島大学 教 授 三 浦 直 樹
	副 査：山口大学 准教授 伊賀瀬 雅 也
題 目	Integrative Evaluation of Prognostic Factors in Surgically Resected Canine Pulmonary Adenocarcinoma (犬の切除肺腺癌における予後因子の統合的評価に関する研究)
審査結果の要旨： 犬の原発性肺腺癌（cPAC）は、比較的高齢の個体に発生する悪性腫瘍であり、外科的切除が第一選択となるものの、術後の再発や転移により予後不良な転帰をたどる症例も少なくない。ヒトの非小細胞肺癌（NSCLC）領域では、TNM 分類に基づく臨床病理学的ステージングに加え、EGFR 変異等のドライバー遺伝子変異や PD-L1 発現などの免疫学的指標を組み合わせた「プレシジョン・メディシン」が標準化されている。一方で、獣医療においては、腫瘍径やリンパ節転移といった古典的な指標による評価が依然として主流であり、分子生物学的背景や腫瘍免疫微小環境（TME）を考慮した多角的な予後予測システムは確立されていない。本論文は、外科切除された cPAC 症例を対象に、臨床疫学、分子遺伝学、そして腫瘍免疫学という 3 つの異なる視点から解析を行い、これらを統合することで、より精度の高い術後予後予測モデルの構築を目指した研究である。 第 1 章では、肺腺癌において腫瘍サイズが重要な予後因子とされている点に着目し、とくに中～大型犬を主たる対象として評価されてきた腫瘍径に基づく予後分類が、日本で症例数の多い小型犬にも適用可能かどうかを検討した。外科切除によって治療された体重 15 kg 未満の肺腺癌（pulmonary adenocarcinoma: PAC）罹患犬を対象に、腫瘍径を含む臨床病理学的因子と無増悪期間（progression-free interval: PFI）および全生存期間（overall survival time: OST）との関連を解析した。canine lung carcinoma stage classification（CLCSC）に基づき腫瘍径を 4 群（≤3 cm、>3～≤5 cm、>5～≤7 cm、>7 cm）に分類したところ、PFI の単変量解析では腫瘍サイズ分類が 1 段階上がるごとに PFI が短縮する傾向が認められ、腫瘍径が大きい群ほど術後の進行リスクが高かった。これらの結果から、中～大型犬を基盤として構築された CLCSC の腫瘍サイズ分類は、小型犬集団においても PFI の層別化に有用であることが示され	

た。

第 2 章では、cPAC における *HER2* 遺伝子変異の頻度と予後的意義を検討した。犬では *HER2* 遺伝子変異が最大 38%と比較的高頻度に認められると報告されているものの、その予後的意義はこれまで明らかにされていなかった。そこで、外科切除された cPAC 72 例を対象に *HER2* exon 20 および 21 の直接シーケンスと *HER2* 免疫組織化学染色を行い、他の臨床病理学的因子と合わせて PFI・OST との関連を解析した。69 例のうち 20 例 (29.0%) に exon 20 ミセンス変異が認められ、そのほとんどは膜貫通領域 V659E 変異であった。*HER2* 遺伝子変異の有無と *HER2* タンパク発現の強度は必ずしも一致しなかったが、単変量・多変量解析ともに、*HER2* 遺伝子変異陽性は PFI 延長の独立した良好な予後因子であった。以上より、cPAC における *HER2* 遺伝子変異は、ヒトとは異なる分子背景を反映するとともに、外科切除後の進行リスクを層別化するうえで有用な指標となり得ることが示唆された。この成果は、イヌとヒトの腫瘍生物学的な相違点を明確にし、比較腫瘍学的な観点からも非常に興味深い。

第 3 章では、外科切除によって治療された cPAC における腫瘍微小環境の特徴と予後への影響を明らかにするため、腫瘍内リンパ球集簇 (lymphoid aggregates: LAs) と腫瘍浸潤リンパ球 (tumour-infiltrating lymphocytes: TIL) を評価した。外科切除標本の HE 染色および免疫組織化学染色を用いて、腫瘍内の CD8 陽性 T 細胞、Foxp3 陽性細胞、CD20 陽性細胞の分布を解析し、腫瘍内 LAs の有無および各細胞密度と PFI・OST との関連を検討した。その結果、腫瘍内に LAs を認める症例では PFI が短縮しており、LAs を有する犬では腫瘍内 Foxp3 陽性細胞密度が有意に高いことが明らかとなった。これらの結果から、cPAC において腫瘍内 LAs の存在は Foxp3 陽性細胞の集積を伴う特定の腫瘍微小環境を反映し、術後 PFI に不利な影響を及ぼし得る可能性があると考えられた。さらに、第 1 章の腫瘍径、第 2 章の *HER2* 変異、そして第 3 章の免疫パラメータを組み合わせた多変量解析を行い、これらが互いに独立した予後因子であることを証明した。

総括として、本論文は、古典的な疫学情報に留まっていた犬の肺腺癌研究に対し、ゲノム解析と免疫微小環境解析という現代的な手法を導入し、疾患の不均一性を多層的に解明しようとした労作である。特に、「小型犬へのステージ分類の適応拡大」「*HER2* 変異の予後良好因子としての確立」「免疫微小環境の予後予測への有用性」という 3 つの主要な発見は、いずれも新規性が高く、かつ臨床的応用への道筋を示すものである。申請者は、膨大な臨床データの解析と精緻な分子生物学的実験を遂行し、論理的な考察を経て結論を導き出しており、その研究能力は高く評価できる。本研究で得られた知見は、獣医腫瘍学における肺癌診療のガイドライン策定に資するだけでなく、比較腫瘍学の発展にも大きく寄与するものである。以上により、審査委員一同は、本論文が博士 (獣医学) の学位を与えるに十分な内容を有するものと判断した。