

犬の消化管間質腫瘍(GIST)の臨床的特徴とc-kit遺伝子変異

誌名	日本獣医麻酔外科学雑誌
ISSN	21896623
著者名	衛藤,翔太郎 谷,健二 石井,遥 石田,さおり 伊藤,晴倫 板本,和仁 高橋,雅弘 新田,直正 水野,拓也 中市,統三 檜山,雅人 田浦,保穂
発行元	日本獣医麻酔外科学会
巻/号	47巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 39-46
発行年月	2016年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



■原著

犬の消化管間質腫瘍 (GIST) の臨床的特徴と c-kit 遺伝子変異

Clinical Characterization and Mutations of the c-kit Gene in Dogs with Gastrointestinal Stromal Tumors

衛藤翔太郎¹⁾ 谷 健二^{1)*} 石井 遥¹⁾ 石田さおり¹⁾ 伊藤 晴倫¹⁾
板本 和仁¹⁾ 高橋 雅弘²⁾ 新田 直正³⁾ 水野 拓也¹⁾ 中市 統三¹⁾
檜山 雅人¹⁾ 田浦 保穂¹⁾

Shotaro ETO¹⁾, Kenji TANI^{1)*}, Haruka ISHII¹⁾, Saori ISHIDA¹⁾, Harumichi ITOH¹⁾, Kazuhito ITAMOTO¹⁾, Masahiro TAKAHASHI²⁾,
Naomasa NITTA³⁾, Takuya MIZUNO¹⁾, Munekazu NAKAICHI¹⁾, Masato HIYAMA¹⁾ and Yasuho TAURA¹⁾

¹⁾ Laboratory of Veterinary, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Yamaguchi University, 1677-1 Yoshida Yamaguchi 753-8515, Japan

²⁾ TAKAHASHI Pet Clinic, 6-31 Noborimachi Kasuga Fukuoka 816-0851, Japan

³⁾ Famie Veterinary Hospital, 12-9 Hofu Yamaguchi 747-0053, Japan

Summary: We studied the clinical characteristics of 11 dogs with gastrointestinal stromal tumors and investigated the c-kit gene mutations in the resected tumor tissues. The affected dogs were aged 6 to 14 years, and there were six males and five females. The tumors originated in the cecum in seven cases (63.6%), the small intestine in two cases (18%), and the duodenum and the colon in one case each (both 9%). The type of cancerous growth was classified as extra-luminal in seven cases (63.6%), intra-mural in one case (9%), intra-luminal in two cases (18%), and indistinct in one case (9%). C-kit gene mutations were found in exon 11 in six cases (54.5%), while there were none in exons 8, 9 and 13. C-kit gene mutations occurred in 54.5% of cases and in 80% of the cases involving the cecum and extra-luminal growth; hence, c-kit gene mutation might be related to the cause of canine gastrointestinal stromal tumors.

Key words: dog, GIST, imatinib, mutation, stem cell factor

要約: 外科切除によって病理組織学的に犬消化管間質腫瘍 (GIST) であると診断された 11 症例の臨床的特徴と c-kit 遺伝子の変異について調査した。腫瘍発生部位は、盲腸 7 例 (63.6%)、小腸 2 例 (18%)、十二指腸、結腸各 1 例 (9%) であり、その増殖様式は、管外型 7 例 (63.6%)、壁内型 1 例 (9%)、管内型 2 例 (18%)、不明 1 例 (9%) であった。6 症例 (54.5%) において c-kit 遺伝子のエクソン 11 に変異が見つかったが、エクソン 8、9 および 13 では見つからなかった。c-kit 遺伝子変異は全症例の 54.5% で認められ、最も多く見られた盲腸・管外型病変を呈した症例では 80% と高率に検出されたことから、犬の GIST の病因に c-kit 遺伝子変異が深く関与していることが示唆された。

キーワード: 犬、GIST、イマチニブ、変異、幹細胞因子

Jpn. J. Vet. Anesth. Surg. 47(3): 39–46, 2016.

はじめに

消化管間質腫瘍 (GIST: Gastrointestinal Stromal Tumor) は、消化管の粘膜下に発生する間葉系腫瘍の一つであり、消化管蠕動のペースメーカーであるカハール介在細胞 (ICC) に由来する²¹⁾。ICC はチロシンキナーゼ受容体である CD117 (KIT) を発現しており、リガンドである幹細胞因子 (SCF)

¹⁾ 山口大学共同獣医学部 (〒753-8515 山口市吉田 1677-1)

²⁾ 高橋ペットクリニック (〒816-0851 春日市昇町 6-31)

³⁾ ファミー動物病院 (〒747-0053 防府市開出本町 12-9)

*連絡担当者: 谷 健二 E-mail: ktani@yamaguchi-u.ac.jp

受付日 2016年9月16日 受理日 2016年12月22日

がKITに結合することで、二量体を形成、チロシンキナーゼが活性化し、細胞の分化・増殖が誘導される¹¹⁾。c-kit遺伝子はKITタンパクをコードする遺伝子であり、その機能獲得性変異が発生すると、SCFの結合とは無関係に増殖シグナルの恒常的な伝達が起こり、腫瘍性増殖が惹起される¹¹⁾。ヒトGIST患者の約65～90%に機能獲得性変異が認められ¹⁷⁾、GISTの病因にc-kit遺伝子変異が深く関与しており、臨床的特徴や予後評価の報告も多く存在する。

一方、獣医療において、元来GISTは消化管非リンパ性間葉系腫瘍と認識されており、平滑筋腫、平滑筋肉腫、神経線維肉腫、線維肉腫および神経節細胞腫などが包含されていたが¹⁴⁾、Frostら⁵⁾やMaasら¹⁶⁾によってこれらの腫瘍の一部がGISTであると再分類され、認知されるようになった。これ以降、犬GISTの病因研究が進み、GISTに罹患した犬の28～50%でヒトGISTと同様にc-kit遺伝子変異が認められたと報告されている^{5,8,22)}。しかしヒトGISTと比較して、臨床的特徴や予後評価に関する情報は乏しい。Hanazonoら⁹⁾は犬GISTの超音波検査所見から転移予測を試み、臨床的所見を報告しているが、c-kit遺伝子変異のゲノタイプは明らかにされていない。また、Takanosuらの報告では²²⁾、c-kit遺伝子のexon11の変異の有無とそのゲノタイプを報告しているが、症例の臨床的特徴や予後についての検討は行っていない。そこで本研究では、病理組織学的にGISTと診断された犬11症例の臨床的特徴について検討した。さらにc-kit遺伝子変異の有無とゲノタイプを解析し、臨床所見との関連性について検討した。

材料及び方法

臨床的特徴：2008年2月～2011年3月に山口大学共同獣医学部附属動物医療センターにおいて、消化管腫瘍の外科的切除を実施し、病理組織学的にGISTと診断された犬11症例を対象とした(表1)。病理組織学的診断は、non-lymphogenic sarcomaから平滑筋腫瘍や末梢神経腫瘍を除外し、必要に応じてKIT染色を用いて確定した。症例の臨床所見として、犬種、性別、年齢、腫瘍の発生部位、臨床症状、再発等の臨床経過について検討し、また単純X線検査、X線CT検査所見、腫瘍の肉眼的所見についても検討を加えた。

塩基配列解析：外科的に切除した腫瘍から切り出した組織をサンプルとして用いた。サンプルからQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany)を用いてDNAを抽出し、-20℃で保存した。Polymerase Chain Reaction (PCR)法を用いて犬c-kitのexon8,9,11,13について塩基配列解析を行った。

ダイレクトシーケンス

GenBank：NP_001003181から作成した各種プライマー対(表2)を使用し、PCR法によって犬c-kit DNA産物を得た。反応にはKOD-Plus-Neo (TOYOBO, Japan)を用い、KOD-Plus-Neo 0.4 μ l、2×PCR Buffer 10 μ l、各プライマー (10 μ M) 0.6 μ lずつ、サンプルDNA 0.2 μ lにMilli-Q水を足した計20 μ lで反応を行った。プログラムテンプレートコントロールシステム：model PC707 (ASTEC, Japan)にて、94℃で2分間プレヒートを行い、熱変性98℃ 10秒、アニーリング68℃ 30秒を40サイクル繰り返し、70℃ 2分間伸張反応を行った。反応産物は2%アガロースゲルで電気泳動、エチジウムブロマイドにて染色し、遺伝子増幅を確認した。しかし症例2、5ではDNAの増幅が認められなかったため、プライマー11shF (exon10)と11shR (intron11)(表2)を使用したところ、再びゲノムDNAから上記と同様のPCR法によってexon11を含む362 bpのDNA産物を得ることに成功した。

増幅が認められたPCR産物はWizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA)を用いて精製後、-20℃で保存した。その後Big Dye Terminator ver.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)を用いてシーケンス反応を行い、山口大学遺伝子実験施設にて、塩基配列を決定した。

決定された塩基配列は健常犬c-kit遺伝子塩基配列〔GenBank：AF044249〕と比較し、変異の有無を検討した。ダイレクトシーケンスで変異が疑われたサンプルは引き続きサブクローニングを行い、再び塩基配列を決定しゲノムタイプを解析した。

サブクローニング

10×A-attachment mix (TOYOBO, Japan)を用い、上記の条件でPCRを行った増幅DNA産物の3'末端にdAを付加した。その後pGEM-T Easy System I (Promega, USA)を用いてヒートショック法にて大腸菌 (JM109 High-Efficiency Competent Cells)

表1 対象症例の臨床所見

症例	犬種	年齢	性別	発生部位	臨床症状	KIT染色
1	ビーグル	7歳10ヶ月	雄	盲腸	嘔吐	陽性
2	G.ピレネーズ	9歳6ヶ月	雄	盲腸	消瘦、腫瘤触知	陽性
3	雑種	15歳	雄	盲腸	偶発的	陽性
4	M.ダックス	9歳1ヶ月	去勢雄	十二指腸	貧血	陽性
5	チェサーピーク	9歳	去勢雄	盲腸	偶発的	陽性
6	シーズー	8歳8ヶ月	雌	結腸	偶発的	陽性
7	雑種	6歳4ヶ月	雌	小腸	貧血	陽性
8	雑種	10歳5ヶ月	雄	盲腸	偶発的	陽性
9	コーギー	12歳	避妊雌	盲腸	嘔吐	NE
10	キャバリア	9歳	雌	盲腸	腹部膨満	NE
11	コーギー	8歳	雌	十二指腸	黒色タール便、貧血	NE

NE: 未検査.

表2 PCR反応に用いたプライマー対

	プライマー	方向*	塩基配列(5'→3')	サイズ
exon8	8F	F	GAATATGTTCCCTCAGGGTCCTCTTC	303 bp
	8R	R	AAGTTCAACTACCCTGCTGTCCTTC	
exon9	9shF	F	CATGCATCCTCACACCCTTGTTGA	546 bp
	9s1R	R	GATGACAGCATGGTACAATGTGGA	
	9s1F	F	CGTATGCCAATTCCAATGTGATTGATTG	276 bp
	9s2R	R	ATATGGCAGGCAGAGCCTAAACATC	
exon11	11F	F	CAAATCCATCCCCACACCCTGTTTAC	645 bp
	11R	R	CACTTTCCCGAAGGCACCAGCACCC	
	11shF	F	CGCAGCTGGAATGATGTGCATTATCGTG	362 bp
	11shR	R	AGAACAAAGGAAGCTAATGGGGTTCCT	
exon13	13F	F	TTAAGTCGGATGCGGCCATGACTG	467 bp
	13R	R	TGCAACGCCCATGACAGTAACTAGG	

* F: forward primer, R: reverse primer. bp: 塩基対.

への組み込みを行い、ライゲーション反応は2× Rapid Ligation Buffer 5 μ l, pGEM-T Easy Vector (50 ng) 1 μ l, T4 DNA Ligase 1 μ l, PCR産物1～2 μ l ($\approx$ 150 ng) に Milli-Q 水を足した計10 μ lを4℃で一晩反応させた。LB/ampicillin/X-Gal plate上で37℃の条件下で一晩インキュベートした。白色コロニーを鋳型に、プライマー M13FとM13Rを用いて、コロニーPCRを実施した。

増幅が確認されたサンプルはダイレクトシーケンスと同様に Big Dye Terminator ver.3.1 Cycle Sequencing Kitを用いてシーケンス反応を行い、少なくともそれぞれ6クローンについてエタノール沈殿後、山口大学遺伝子実験施設にて、塩基配列を決定した。

結 果

1. 臨床所見

対象症例11例の臨床所見について検討した(表1)。発症年齢は6歳4ヶ月齢から15歳齢であり、平均年齢は9歳6ヶ月齢であった。犬種は雑種3例(27.2%)、ウェルシュ・コーギー・ペンブローク2例(18.2%)、ビーグル、グレート・ピレネーズ、ミニチュア・ダックスフンド、チェサーピーク・レトリバー、シーズー、キャバリア・キングチャールズ・スパニエル各1例(各9.1%)で、性別は、雄6例(含去勢雄2例、54.5%)、雌5例(含避妊雌1例、45.5%)であった。腫瘍の発生部位は11例中盲腸7例(63.6%)、十二指腸2例(18.2%)、小腸、

結腸各1例(各9.1%)であった。臨床症状としては、嘔吐が1例、食欲減少、消瘦、腫瘍触知が1例、貧血が2例、偶発的に発見された症例が4例、3例は詳細不明である。11例中8例でKITタンパクの発現を調べたところ、8/8例(100%)でKIT陽性であった。

2. 画像所見、肉眼所見

代表的な症例(症例2、7)の画像所見、術中肉眼所見を図1に示した。X線検査では11症例中9症例で腹腔内腫瘍によると考えられるX線不透過性亢進が認められた(図1-A)。一方で、症例7のようにX線検査では著変は認められなかった症例も存在した(図1-D)。このうち7症例でX線CT検査を実施したが、すべての症例で腹腔内腫瘍が認められた。大型化した腫瘍を形成している症例が多く、そのような症例では、腸管壁由来であることは断定できないが、肝臓、脾臓、腎臓などの腹腔内の主要臓器由来を否定することは可能であった(図1-B)。X線検査では著変が認められなかった症例7では、腸管由来の可能性が高いと思われる腫瘍病変が認められた(図1-E)。また造影強調効果はすべての症例で認められ、腫瘍内部が不均一に淡く造影されていた。

手術中の肉眼所見では、症例2のように、管外に向かって増殖している大型化した腫瘍が多く認められた(図1-C)。一方で、症例7のように明らかな管外への増殖が認められない腫瘍病変もあった(図1-F)。

摘出した腫瘍病変の断面を観察したところ、ヒトと同様に、増殖様式を管外型、壁内型、管内型に分類することができた(図2)。症例1,2,3,4,6,9,10は管外型、症例8は壁内型、症例7,11は管内型であり、管外型が7例/10例(70%)と最も多かった。また発生部位を考慮すると、盲腸に発生した管外型が5例/10例で最も多く認められた。

3. c-kit 遺伝子解析

exon8,9および13に関しては、それぞれ解析した全症例で変異は認められなかったが、exon11に関しては7例/11例で変異が認められ、うち6例でアミノ酸変異を伴うと予測される変異が認められた。症例ごとの変異の有無、ゲノタイプ、アミノ酸変異を表3にまとめた。

さらにc-kit遺伝子変異の有無と増殖様式につい

表3 c-kit遺伝子の塩基配列解析結果

症例	exon 8,9,13 c-kit変異	exon 11	
		c-kit変異	KITタンパク変異
1	無	9 bp欠失	V559-E561欠失
2	無*	無	無
3	無	9 bp欠失	V559-E561欠失
4	無	1 bp置換	無
5	無	無	無
6	無	81 bp挿入	Y582-D583挿入
7	無	無	無
8	無	3 bp欠失	W556Q, K557欠失
9	無	6 bp欠失	W556-K557欠失
10	無	6 bp欠失	W556-K557欠失
11	無	無	無

* exon9,13は解析不可。bp：塩基対。

V：バリン、E：グルタミン酸、Y：チロシン、D：アスパラギン酸、W：トリプトファン、K：リシン。

て比較し、関連があるかを検討した(表4)。その結果、5例/10例(50%)が盲腸の管外型病変を呈しており、そのうち4例でc-kit変異が認められた。

考 察

GISTの発生部位はヒトと犬で異なる所見の一つと考えられ、ヒトでは70%が胃、20%が小腸に発生するとされているのに対して¹⁸⁾、イヌでは48%が大腸(うち70%が盲腸)、29%が小腸、19%が胃に発生したという報告がある⁵⁾。我々が対象とした11症例においても、盲腸が7例(63.6%)、十二指腸が2例、小腸、結腸がそれぞれ1例、胃での発生は認められず、犬では小腸・結腸、特に盲腸での発生が多く、胃での発生は少ないものと考えられた。

GISTは消化管の粘膜下から膨張性に増大する性質を持ち、浸潤傾向が少ないため、一般に腫瘍径が大きくなるまでは無症状なことが多いとされている。今回の症例では、嘔吐などの消化器症状、貧血を呈した症例もあったが、偶発的な発見による症例が4例であった。どの症例でもGISTに特異的と言える症状は認められず、発見された腫瘍が非常に大型化していた症例が多かったことから、臨床症状による早期発見は、比較的困難であると考えられた。

X線検査では、ほとんどの症例で腹腔内腫瘍を疑

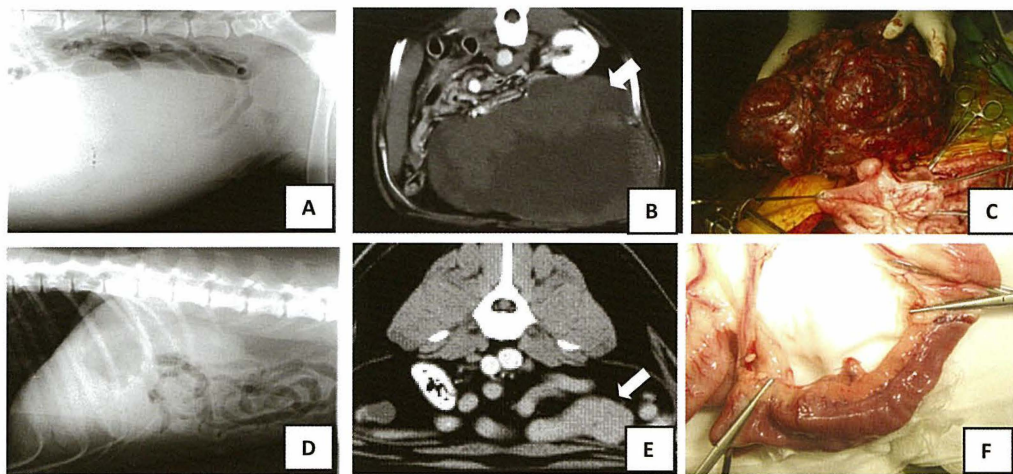


図1 症例2(上段)、症例7(下段)の単純X線検査(A, D)、X線CT検査(B, E)、術中肉眼所見(C, F)

A: 腹腔内腫瘍を疑うX線不透過性亢進が認められた。B: 巨大な腫瘍病変を認めた(矢印)。主要臓器由来であることは否定された。C: 管外に向かって増殖している大型化した腫瘍病変を認めた。D: 異常所見は認められなかった。E: 腸管由来の可能性が高いと思われる腫瘍病変が認められた(矢印)。F: 明らかな管外への増殖が認められない腫瘍病変は認められなかった。

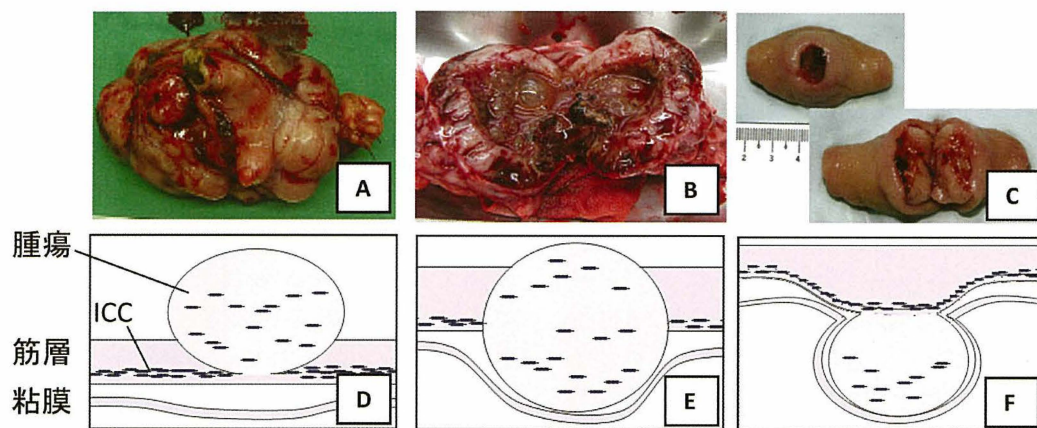
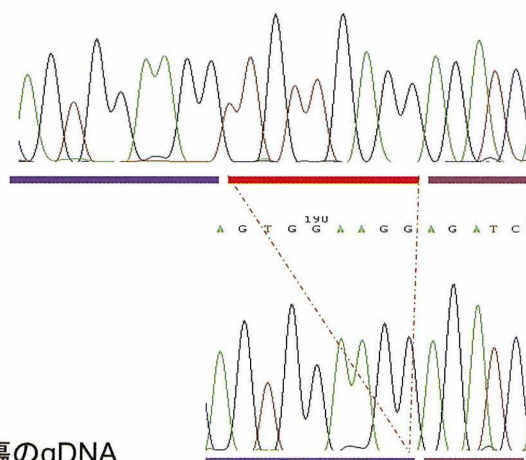


図2 腫瘍の増殖様式の肉眼所見と模式図

A: 症例3の腫瘍外観、B: 症例8の腫瘍外観、C: 症例4の腫瘍外観、D: 模式図(管外型)、E: 模式図(壁内型)、F: 模式図(管内型)。

体細胞のgDNA



腫瘍のgDNA

う所見が得られたが、これはGISTが臨床症状を呈し難く、非常に大型化している症例が多かったためであると考えられた。X線CT検査では、腫瘍と他臓器との位置関係を描出することができるが、今回我々は、腸管由来、もしくは腸管に接している腫瘍病変であること、また、腫瘍が肝臓、脾臓、腎臓などの他の主要臓器由来ではないことをGIST症例におけるCT画像所見として得ることができた。このように、犬GISTにおいて、X線CT検査は病変の局在の決定に非常に有用であると考えられた。

図3 症例1,3の変異タイプ

腫瘍細胞のgDNAではTTGTTGAGGが欠失していた。

表4 c-kit遺伝子変異の有無と臨床的悪性度と予後

症例	変異	増殖様式	部位	予後(再発等)
1	有	管外	盲腸	術後12ヶ月後再発、摘出 イマチニブ治療奏効、術後42ヶ月後死亡
2	無	管外	盲腸	腹腔内播種、術後114日死亡
3	有	管外	盲腸	術後10ヶ月後死亡(老衰) 再発なし
4	無	管外	十二指腸	術後4ヶ月後に肝内転移、イマチニブ治療無効 術後29ヶ月後に生存確認、以降追跡不可
5	無	NE	盲腸	術後25ヶ月後再発、イマチニブ治療奏功 術後46ヶ月後結腸に再再発、摘出 術後55ヶ月後に生存確認、以降追跡不可
6	有	管外	結腸	術後41ヶ月後に生存確認、以降追跡不可 再発なし
7	無	管内	小腸	術後10ヶ月後に生存確認、以降追跡不可 再発なし
8	有	壁内	盲腸	術後7ヶ月後に生存確認、以降追跡不可 再発なし
9	有	管外	盲腸	術後41ヶ月後、腹腔内播種、死亡
10	有	管外	盲腸	術後12ヶ月後肝転移、 術後48ヶ月後死亡
11	無	管内	十二指腸	術後22ヶ月後死亡(クッシング症候群) 再発なし

医学領域では、各種免疫染色によって平滑筋腫瘍や神経鞘腫などと鑑別診断され、特にKIT発現の有無が重要となる。近年獣医領域においてもGISTは組織学的特徴と免疫染色によって診断されるようになった。犬を対象としたいくつかの遡及的研究で、平滑筋腫瘍と診断されていた消化管間葉系腫瘍の52%あるいは55%がKIT陽性であったとする報告や^{6,20)}、同じく犬平滑筋腫瘍72例の遡及的研究で、61例(85%)でGISTが疑われ、うち68.8%でKIT陽性であったとする報告がある¹⁶⁾。今回我々が免疫染色を行った8症例のうち、全ての症例でKIT陽性であった。GISTは他の消化管間葉系腫瘍と比較して悪性度が高く、放射線治療や一般的な抗がん剤への感受性も低いことから、慎重な鑑別診断が必要となる。このように、GISTの確定診断にKITの免疫染色は重要であると考えられた。

犬GISTにおけるc-kit遺伝子変異に関する報告はいくつか存在する。GISTと診断された犬46例に対してc-kit遺伝子exon11変異の有無を調査した報告では、32.6%の症例でgDNAに変異が認められており²²⁾、そのほかの報告においても、exon11

のみで変異が認められた^{5,8)}。ヒトGISTにおいてもexon11での変異が多く、c-kit変異の80%以上を占めるといわれている¹⁾。今回我々の研究においてもc-kit遺伝子変異が認められた7例は全てexon11の変異であった。また今回の研究では、exon8,9,13では変異が認められなかった。Gregoryらの報告でもexon8,9,13および17では変異が認められなかったとされている⁸⁾。しかし、ヒトGISTでは、exon11に次いでexon9が15%、exon13,17で少数報告があるとされ¹⁾、また獣医療においてもIrieらがexon9の変異を認めたGISTの犬1例を報告している¹²⁾。このことから、犬GISTのc-kit遺伝子変異はexon11の変異が大半を占めるが、exon9をはじめとする他の変異も少数ながら存在する可能性が示された。また医学領域では、初診時にはexon11の変異のみであったが、8年後の再発時にはexon13の変異が加わっていたという症例¹⁰⁾も存在するが、獣医療ではこのような報告は無く、本研究においても初診時と再発時で解析を行った症例1ではどちらも同様の9 bpの欠失が認められたのみであった。

今回発見された4種類の塩基配列変異(表3)の

うち、症例1,3における変異はヒトGISTにおいて同様の変異報告がある²³⁾。また今回発見された4種類の変異のうち3種類がW556-E560の領域に集中しており、うち2種類はW556-K557の領域で起こっていた。ヒトGISTではコドン550-560の領域がホットスポットとされ、特にW556-K557の欠失が多いという報告がある²⁾。獣医療においても、2003年に報告された変異2種類のうち1種類が、また2010年に報告された2種類両方が、この領域において発見されている。さらに2015年の報告では、c-kit遺伝子exon11のgDNAに変異が認められた15例中13例がW556-E560の領域の変異であり、うち11例がW556-K557の欠損であった²²⁾。このように、獣医療においてもこの領域が変異のホットスポットであると考えられた。また犬肥満細胞腫(MCT)でも15～30%でc-kit変異が発見されており、特にexon11での重複配列挿入(ITD)変異が多いとされている¹⁵⁾。しかしヒトGISTにおいては、exon11のITD変異は報告は認められるが、犬GISTでは未だ報告されていない。本研究においても81 bpの挿入変異が1例見つかったものの、ITD変異は認められなかった。また今回、盲腸・管外型病変の80%で変異が認められたことから、盲腸・管外型病変の症例ではc-kit変異を伴う可能性が高いと考えられた。

犬GISTの予後に関する報告では、外科的切除を行った犬GIST 61例のうち、小腸原発42例の1年生存率：62.6%、2年生存率：52.3%、1年再発率：19.9%、2年再発率：32.8%であり、盲腸原発19例では、1年生存率：84.2%、2年生存率：61.9%、1年再発率：16.7%、2年再発率：38.1%であったと報告されている¹⁶⁾。本研究における平均生存期間は28ヶ月(中央値29ヶ月)であった。再発率は54%(6例/11例)であり、1年再発率は27%(3例/11例)、2年再発率は36%(4例/11例)であった。このことから、犬GISTは外科的切除によって比較的長期の予後が期待できるものの、再発率は比較的高いことが示唆された。また今回再発した症例はすべて管外型であり、症例2を除くすべての症例で切除マージンは十分確保されていた。症例数が少ないため断定できないが、切除マージンと再発率の関連性は低く、増殖様式が予後因子になるかもしれない。

犬GISTの予後評価に関して、核分裂指数や増殖細胞標識率(MIB-1 index)、臨床症状の有無、腫

瘍径などが予後に影響すると報告がある一方で¹⁶⁾、増殖マーカーや核分裂指数と予後に相関性はなかったという報告も存在する⁶⁾。本研究では、腫瘍の増殖様式や発生部位、c-kit遺伝子変異の有無と予後との関係は、症例数が少ないこと、予後の追跡が不可能であった症例が多く含まれていたことなどから、検討することはできなかった。医学領域では、GISTの予後評価として、腫瘍径、発生部位、核分裂指数、c-kit変異の有無などが有用であるとされている^{13,19)}。獣医学領域においてもGISTの症例数を蓄積しつつ、予後因子を明らかにしていくことが重要であると考えられた。

分子標的薬の一つであるイマチニブは、ATPと競合拮抗することでチロシンキナーゼのリン酸化を抑制するチロシンキナーゼインヒビターである。近年、医学領域では、GIST治療にも分子標的薬の有効性が認知されており、c-kit exon11変異例ではイマチニブ奏効率が67%であり、非変異例の39%を有意に上回っており、また無病生存期間も有意に長いとする報告がある^{4,7,10)}。さらに外科的切除が困難な症例に対しても、イマチニブ投薬による腫瘍退縮も報告されている³⁾。その一方で、イマチニブの投薬継続による耐性獲得が問題化しており、それらの耐性獲得やイマチニブ無効症例に対しては、現在、KITをはじめとする複数のチロシンキナーゼレセプターを標的とするスニチニブの使用が承認されており、臨床的な効果を挙げている^{4,7)}。

今回我々は、メシル酸イマチニブ投薬治療を再発症例である症例1,4,5に対して行った。変異を伴う症例1ではイマチニブが奏効し、変異が認められなかった症例4では、イマチニブによる治療効果は認められなかった。しかし同様に変異が認められなかった症例5では、イマチニブが奏効した。これらは犬MCTやヒトGISTにおける報告と矛盾せず、犬GIST症例においてもイマチニブなどの分子標的薬による効果が期待できる可能性が示唆されたが、適応症例を蓄積し、イマチニブ奏効率とc-kit遺伝子変異との関連、耐性獲得の有無等のさらなる検討が必要であると考えられた。

今回、犬GISTの臨床的特徴として、盲腸由来の症例が63.6%を占め、腫瘍の増殖様式としては管外型が70%を占めた。またc-kit遺伝子変異が全症例の54.5%で認められ、最も多く見られた盲腸・管外型病変を呈した症例では80%と高率に検出されたことから、犬におけるGISTの発生にc-kit遺

伝子が深く関与していることが示唆された。また今回我々は、症例数は少ないものの、イマチニブ治療による臨床的効果が犬でも期待されることを報告した。GISTは獣医領域において、研究過程にある腫瘍性疾患の1つであり、今後も症例の臨床的特徴、遺伝子変異、分子標的薬治療に関する情報の蓄積が重要であると考えられた。

参考文献

- 1) Blay, J.Y. (2011): A decade of tyrosine kinase inhibitor therapy: Historical and current perspectives on targeted therapy for GIST. *Cancer treatment reviews*. 37:373-384.
- 2) Du, C.Y., Shi, Y.Q., Zhou, Y.E., Fu, H. and Zhao, G. (2008): The analysis of status and clinical implication of KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Journal of surgical oncology*. 98:175-178.
- 3) DeMatteo, R.P., Ballman, K.V., Antonescu, C.R., Maki, R.G., Pisters, P.W., Demetri, G.D., Blackstein, M.E., Blanke, C.D., Mehren, M.V., Brennan, M.F., Patel, S., McCarter, M.D., Polikoff, J.A., Tan, B.R. and Owzar, K. (2009): Adjuvant imatinib mesylate after resection of localised, primary gastrointestinal stromal tumour: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 373:1097-1104.
- 4) Demetri, G.D., van Oosterom, A.T., Garrett, C.R., Blackstein, M.E., Shah, M.H., Verweij, J., McArthur, G., Judson, I.R., Heinrich, M.C., Morgan, J.A., Desai, J., Fletcher, C.D., George, S., Bello, C.L., Huang, X., Baum, C.M. and Casali, P.G. (2006): Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *The Lancet*. 368:1329-1338.
- 5) Frost, D., Lasota, J. and Miettinen, M. (2003): Gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas in the dog: a histopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 50 cases. *Veterinary Pathology Online*, 40:42-54.
- 6) Gillespie, V., Baer, K., Farrelly, J., Craft, D. and Luong, R. (2011): Canine gastrointestinal stromal tumors immunohistochemical expression of cd34 and examination of prognostic indicators including proliferation markers ki67 and AgNOR. *Veterinary Pathology Online*. 48:283-291.
- 7) Goodman, V.L., Rock, E.P., Dagher, R., Ramchandani, R.P., Abraham, S., Gobburu, J.V., Booth, B.P., Verbois, S.L., Morse, D.E., Liang, C.Y., Chidambaram, N., Jiang, J.X., Tang, S., Mahjoob, K., Justice, R. and Pazdur, R. (2007): Approval summary: sunitinib for the treatment of imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 13:1367-1373.
- 8) Gregory-Bryson, E., Bartlett, E., Kiupel, M., Hayes, S. and Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2010): Canine and human gastrointestinal stromal tumors display similar mutations in c-KIT exon 11. *BMC cancer*. 10:1.
- 9) Hanazono, K., Fukumoto, S., Hirayama, K., Takashima, K., Yamane, Y., Natsuhori, M., Kadosawa, T. and Uchida, T. (2012): Predicting metastatic potential of gastrointestinal stromal tumors in dog by ultrasonography. *Journal of Veterinary Medical Science*. 74:1477-1482.
- 10) Heinrich, M.C. and Corless, C.L. (2005): Gastric GI stromal tumors (GISTs): the role of surgery in the era of targeted therapy. *Journal of surgical oncology*. 90:195-207.
- 11) Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kiyoshi Kawano, Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., Tunio, G.M., Matsuzawa, Y., Kanakura, Y., Shinomura, Y. and Kitamura, Y. (1998): Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 279:577-580.
- 12) Irie, M., Takeuchi, Y., Ohtake, Y., Nagata, N., Miyoshi, T., Kagawa, Y. and Yamaguchi, T. (2015): Imatinib mesylate treatment in a dog with gastrointestinal stromal tumors with a c-kit mutation. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 77:1535.
- 13) Kim, T.W., Lee, H., Kang, Y.K., Choe, M.S., Ryu, M.H., Chang, H.M., Kim, J.S., Yook, J.H., Kim, B.S. and Lee, J.S. (2004): Prognostic significance of c-kit mutation in localized gastrointestinal stromal tumors. *Clinical Cancer Research*. 10:3076-3081.
- 14) LaRock, R.G. and Ginn, P.E. (1997): Immunohistochemical staining characteristics of canine gastrointestinal stromal tumors. *Veterinary Pathology Online*. 34:303-311.
- 15) Letard, S., Yang, Y., Hanssens, K., Palmérini, F., Leventhal, P.S., Guéry, S., Moussy, A., Kinet, J-P., Hermine, O. and Dubreuil, P. (2008): Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Molecular Cancer Research*. 6:1137-1145.
- 16) Maas, C.P., Ter Haar, G., Van Der Gaag, I. and Kirpensteijn, J. (2007): Reclassification of small intestinal and cecal smooth muscle tumors in 72 dogs: clinical, histologic, and immunohistochemical evaluation. *Veterinary Surgery*. 36:302-313.
- 17) Miettinen, M. and Lasota, J. (2006): Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 130:1466-1478.
- 18) Miettinen, M., Leslie, H. and Lasota, J. (2002): Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review. *Human pathology*. 33:478-483.
- 19) Miettinen, M. and Lasota, J. (2006): Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. In *Seminars in diagnostic pathology*. WB Saunders. Vol. 23:70-83.
- 20) Russell, K.N., Mehler, S.J., Skorupski, K.A., Baez, J.L., Shofer, F.S. and Goldschmidt, M.H. (2007). Clinical and immunohistochemical differentiation of gastrointestinal stromal tumors from leiomyosarcomas in dogs: 42 cases (1990-2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 230:1329-1333.
- 21) Sircar, K., Hewlett, B.R., Huizinga, J.D., Chorneyko, K., Berzin, I. and Riddell, R.H. (1999). Interstitial cells of Cajal as precursors of gastrointestinal stromal tumors. *The American journal of surgical pathology*. 23:377-389.
- 22) Takanosu, M., Amano, S. and Kagawa, Y. (2016): Analysis of c-KIT exon 11 mutations in canine gastrointestinal stromal tumors. *The Veterinary Journal*. 207:118-123.
- 23) Taniguchi, M., Nishida, T., Hirota, S., Isozaki, K., Ito, T., Nomura, T., Matsuda, H. and Kitamura, Y. (1999): Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Research*. 59:4297-4300.