

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04590

研究課題名(和文) マクロファージ特異的タンパク質AIMによる犬組織球性肉腫の発症機序の解明と治療

研究課題名(英文) The role of canine AIM in histiocytic sarcoma

研究代表者

米澤 智洋 (Yonezawa, Tomohiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：10433715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージ由来の腫瘍である組織球性肉腫は、悪性度が高く治療法がまだ確立していない。本研究では、マクロファージが特異的に産生するタンパク質apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)の転写活性が一部の臓器で高いこと、組織球性肉腫由来細胞株にAIM発現ベクターを導入すると細胞増殖の有意な抑制が認められることを明らかにした。さらに組換えイヌAIMを培養液中に添加するとAIM濃度依存的に死滅した。以上より、イヌAIMは組織球性肉腫細胞に対して用量依存的な殺細胞効果があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Histiocytic sarcoma, macrophage-derived tumor is seriously malignant and therapeutic method is not established. In this study, we focused on apoptosis inhibitor of macrophage (AIM). It is found that AIM is expressed in several normal tissues and histiocytic tumors. When AIM expression vector was transfected into histiocytic cell lines, the cell number was reduced. Canine recombinant AIM also could induce apoptosis of these cells. It is suggested canine AIM has apoptotic inducing effect in histiocytic sarcoma.

研究分野：獣医学

キーワード：マクロファージ 組織球性肉腫 犬

## 1. 研究開始当初の背景

組織球や樹状細胞の腫瘍化によって生じる組織球性肉腫は、犬にできる癌の中でも悪性度が極めて高く、診断後早期に死に至る大変深刻な疾患である。詳細な発症機序は未だ不明で、有効な治療法も存在しない。犬組織球性肉腫は研究分担者の盆子原誠准教授らが複数の犬組織球性肉腫細胞株を樹立し、本疾患の *in vitro* 研究に大きく貢献している。

研究代表者はこれまで、マクロファージ特異的に発現するタンパク質である apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) に着目して研究を行ってきた。AIM は名前のとおり、マクロファージのアポトーシスを抑制するタンパク質として同定された。生体内でも組織中マクロファージ、すなわち組織球において、過酸化物質を貪食した際に AIM 産生が増加し、抗アポトーシス効果を発揮することが報告されている。しかし、組織球の腫瘍である組織球性肉腫と AIM の関係については明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

以上より本研究は組織球性肉腫と AIM の発現の関係を明らかにし、AIM による組織球性肉腫の発症機序と治療法の可能性を探ることを目的とした。具体的には、犬 AIM の遺伝子配列の決定と発現分布の確認、*in vitro* 実験系を用いた組織球性肉腫における AIM の作用機序の解明、組織球性肉腫症例における AIM の病態生理学的検討、*in vivo* 実験系を用いた組織球性肉腫における AIM 補充療法の検討、の4つの実験を実施した。

## 3. 研究の方法

臨床上健康な犬2頭の脾臓より mRNA を抽出し、AIM の遺伝子配列を決定した。さらに、健康な犬における臓器別の AIM の mRNA 発現量を qPCR 法にて比較検討した。複数の犬組織球性肉腫細胞株を用い、組換え AIM を添加した際の細胞数や携帯について詳しく観察するとともに、AIM siRNA を作製してその効果について詳しく検討した。実際の症例の病変において AIM がどのような発現動態を示すかはまだ明らかでない。そこで、組織球性肉腫の症例における AIM の発現量を健康な犬と比較し、組織球性肉腫における AIM の病態生理について検討を行った。臨床的に健康な実験犬と、東京大学、日本獣医生命科学大学にて組織球性肉腫と診断された犬の新鮮凍結組織、病理組織、末梢血を材料として実験を行った。得られた材料の容量が許す範囲で mRNA、タンパク質、ゲノムを抽出し、それぞれリアルタイム PCR、ウェスタンブロット、免疫組織化学染色、ゲノムシーケンシングなどの手法を用いて、組織球性肉腫症例における AIM

の動態を解析した。さらに、AIM の動態や遺伝子変異と症例の悪性度、病態の進行、予後との関連性について回顧的に研究した。これらの知見を踏まえ、*in vivo* 実験系を用いた組織球性肉腫における AIM 補充療法の検討を行った。すなわち、HA タグ組換え犬 AIM を発現するベクターの作出し、数ミリグラムの組換え犬 AIM を作出した。そのうえで、鼠蹊部皮下に犬組織球性肉腫細胞を移植したヌードマウスを用意し、定めた用量で1日おきに組換え犬 AIM 投与による腫瘍の大きさ、悪性度、転移巣の変化を観察した。

## 4. 研究成果

犬 AIM は既知のマウス・ヒトの AIM と同様、3つの SRCR ドメインをもつ構造を取る約 40 kDa のたんぱく質であった。他の動物との相同性は 66%程度と決して高くなく、またシステイン残基の配置の異なることから、犬 AIM が他の動物と比べ異なる構造を持つ可能性も示された。健康な犬の各組織での mRNA 発現を qPCR で調べたところ、組織球が多く含まれている肺、肝臓、脾臓などでは高く発現していた。犬組織球性肉腫細胞株に組換え犬 AIM を強発現させたところ、細胞の増殖や異形成は抑制され、ノックダウンするとこれらは促進された。さらに、組換え犬 AIM を様々な腫瘍細胞株の培養液に添加したところ、組織球性肉腫由来の細胞株の全てと、一部の腫瘍細胞において AIM 濃度依存的な細胞死が引き起こされた。この結果は、今までアポトーシス抑制因子と考えられていた AIM の低下が組織球の腫瘍化を引き起こすという、全く新しい発症機序を強く示唆している。今後、さらに犬組織球性肉腫細胞株に組換え犬 AIM ベクターもしくは siAIM をトランスフェクションした後、TUNEL 法を用いたアポトーシス陽性細胞の検出、フローサイトメトリーを用いた細胞周期の観察、スクラッチアッセイやマトリゲルを用いた細胞遊走能の観察、抗がん剤に対する薬物耐性の評価を行う予定である。

東京大学、日本獣医生命科学大学の研究分担者および連携研究者から組織球性肉腫の症例検体をあつめ、10症例の腫瘍組織について免疫組織化学染色を行ったところ、組織中の一部に強い AIM の発現を観察した。別の一部には AIM の発現は全く見られず、斑状に AIM が発現していることが観察された。担癌マウスの腫瘍の成長速度は非常に遅く、エンドポイントまで成長したのちに安楽死して各臓器を調べても転移は全く認められなかった。犬 AIM の投与/非投与による明確な変化は認められなかったが、腫瘍中の AIM 量自体にも変化が認められていないことから、AIM の投薬量を増やすことで明確な影響が得られる可能性がある。

以上より、アポトーシス抑制因子として知られる AIM の低下がむしろ腫瘍化を促進するという、逆説的な仮説が得られた。古典的には、マクロファージは異物を貪食・分解して免疫を活性化させることから、がんの増殖を阻止すると考えられていた。しかし近年では、マクロファージには M1 型、M2 型の 2 種類が存在し、M1 型は抗腫瘍作用を持つが、M2 型は腫瘍化の中心的役割を果たしていると考えられている。この 2 種類のマクロファージの分化調節メカニズムについては未だよく分かっていない。本研究で明らかになる二律背反する AIM の作用は、この 2 種類のマクロファージの機能的分化を調節する中心的因子である可能性があり、学術的に極めて重要な意義をもっていると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

Omori M, Maeda S, Igarashi H, Ohno K, Sakai K, Yonezawa T, Horigome A, Odamaki T, Matsuki N. Fecal microbiome in dogs with inflammatory bowel disease and intestinal lymphoma. *J Vet Med Sci.* 2017 79: 1840-1847.

Inoue A, Maeda S, Kinoshita R, Tsuboi M, Yonezawa T, Matsuki N. Density of tumor-infiltrating granzyme B-positive cells predicts favorable prognosis in dogs with transitional cell carcinoma. *Vet Immunol Immunopathol.* 2017 190: 53-56.

Maeda S, Goto-Koshino Y, Chambers JK, Yonezawa T, Uchida K, Matsuki N. Endoscopic Cytology for the Diagnosis of Chronic Enteritis and Intestinal Lymphoma in Dogs. *Vet Pathol.* 2017 54: 595-604.

Yonezawa T, Sato K, Uchida M, Matsuki N, Yamazaki A. Presence of contagious yawning in sheep. *Anim Sci J.* 2017 Jan;88(1):195-200. doi: 10.1111/asj.12681.

Yonezawa T, Uchida M, Tomioka M, Matsuki N. Cycle Influences Spontaneous Delivery in Cows. *PLoS One.* 2016 Aug 31;11(8):e0161735. doi: 10.1371/journal.pone.0161735.

Uchida M, Saeki K, Maeda S, Tamahara S, Yonezawa T, Matsuki N. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) reduces cell number in canine histiocytic sarcoma cell lines. *J Vet Med Sci.* 2016 78(9):

1515-1520.

Rieanrakwong D, Laoharatchathanin T, Terashima R, Yonezawa T, Kurusu S, Hasegawa Y, Kawaminami M. Prolactin suppression of Gonadotropin releasing hormone initiation of mammary gland involution in female rats. *Endocrinol* 2016; 157(7): 2750-8.

Murakami K, Maeda S, Yonezawa T, Matsuki N. Synovial fluid matrix metalloproteinase-2 and -9 activities in dogs suffering from joint disorders. *J Vet Med Sci.* 2016; 78(6): 1051-4.

Murakami K, Yonezawa T, Matsuki N. Synovial fluid total protein concentration as a possible marker for canine idiopathic polyarthritis. *J Vet Med Sci.* 2016 Jan;77(12):1715-7. doi: 10.1292/jvms.15-0263.

Yonezawa T, Watanabe A, Kurusu S, Kawaminami M. Gonadotropin-releasing hormone is prerequisite for the constitutive expression of pituitary annexin A5. *Endocr J.* 2015; 62(12): 1127-32.

Yonezawa T, Chen KH, Ghosh MK, Rivera L, Dill R, Ma L, Villa PA, Kawaminami M, Walker AM. Anti-metastatic outcome of isoform-specific prolactin receptor targeting in breast cancer. *Cancer Lett.* 2015; 366: 84-92.

Laoharatchathanin T, Terashima R, Yonezawa T, Kurusu S, Kawaminami M. Augmentation of Metastin/Kisspeptin mRNA Expression by the Proestrous Luteinizing Hormone Surge in Granulosa Cells of Rats: Implications for Luteinization. *Biol Reprod.* 2015; 93(1): 1-9, 15.

Sakai K, Yonezawa T, Yamawaki H, Oyamada T. Alteration of somatostatin receptor 2 expression in canine mammary gland tumor. *J Vet Med Sci.* 2015; 77(10): 1319-22.

[学会発表](計 11 件)

Tomohiro Yonezawa, Dai Ishiyama, Mona Uchida, Michiko Tomioka, Kazunori Ishii, Shizuko Maeda, Yoji Sasai, Masatsugu Asada, Tadashi Kawamura, Yoshihiro Nakamura, Eimei Sato, Shingo Maeda, Naoaki Matsuki Relationship between lunar cycle and spontaneous delivery date in Holstein cows. 4th World Congress of Reproductive Biology (WCRB 2017) 27-29 September 2017 Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan.

Mona Uchida, Kohei Saeki, Shingo Maeda, Tomohiro Yonezawa, Naoaki Matsuki and Mitsumori Kawaminami Syngeneic ANXA5 inhibition of mammary tumor cell growth in the dog Annexin Conference 2017

村上康平、前田真吾、米澤智洋、松木直章 イヌの特発性多発性関節炎における CXCL8 と CCL2 の好中球走化作用 獣医臨床病理学会 2016 年大会 パシフィコ横浜 横浜市 神奈川県 2016.02.19

内田萌菜、酒居幸生、米澤智洋、汾陽光盛 イヌ乳腺腫瘍におけるアネキシン A5 (Anxa5) の発現 第 1 回日本アネキシン研究会 東京大学 文京区 東京都 2015.10.11

Mona Uchida, Kosei Sakai, Tomohiro Yonezawa, Mitsumori Kawaminami Down-regulation of Annexin A5 (ANXA5) expression in canine mammary tumor cells and a possibility of therapeutic application of ANXA5 Annexin Conference 2015 Amrath Grand Hotel De L'Empereur Maastricht Nederland 2015.09.08

村上康平、前田真吾、米澤智洋、松木直章 犬の特発性多発性関節炎における滑液中の多形核白血球走化因子に関する検討 第 158 回日本獣医学会学術集会 北里大学 十和田市 青森県 2015.09.07

Mona Uchida, Shintaro Tomura, Kohei Saeki, Shingo Maeda, Satoshi Tamahara, Tomohiro Yonezawa, Naoaki Matsuki Apoptosis inhibitor of macrophage in dog: molecular characterization and inhibitory effect on histiocytic sarcoma cell proliferation in vitro International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages 2015 東京大学 文京区 東京都 2015.07.09

村上康平、前田真吾、米澤智洋、松木直章 犬の特発性多発性関節炎における新規バイオマーカー：Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 の発見 獣医臨床病理学会 2014 年大会 日本獣医生命科学大学 武蔵野市 東京都 2015.05.30

前田真吾、米澤智洋、松木直章、大野耕一、内田和幸、辻本元 イヌの炎症性腸疾患および消化管リンパ腫における Foxp3 陽性 regulatory T cell の免疫組織化学的検討 獣医臨床病理学会 2015 年大会 日本獣医生命科学大学 武蔵野市 東京都 2015.05.30

内田萌菜、米澤智洋、佐伯亘平、益子原誠、前田真吾、松木直章 Apoptosis

inhibitor of macrophage (AIM) がイヌ組織球性肉腫株化細胞にもたらす影響 獣医臨床病理学会 2015 年大会 日本獣医生命科学大学 武蔵野市 東京都 2015.05.30

酒居幸生、米澤智洋、松木直章、山脇英之、小山田敏文 イヌの乳腺腫瘍におけるソマトスタチン受容体発現の変化 獣医臨床病理学会 2016 年大会 日本獣医生命科学大学 武蔵野市 東京都 2015.05.30

〔図書〕(計 1 件)

米澤智洋 (監訳) イラストレイテッド 獣医代謝・内分泌学 (著書) 2015. 1-205 Inter Zoo

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：Therapeutic agent for tumor derived from immune cells and use thereof  
発明者：Tomohiro Yonezawa, Mona Uchida, Naoaki Matsuki

権利者：The University of Tokyo

種類：アメリカ仮出願

番号：US Prov Appl 62/167,274

出願年月日：2015 年 5 月 28 日

国内外の別：国外

取得状況 (計 3 件)

名称：抗癌剤及び癌の診断キット

発明者：汾陽光盛、米澤智洋

権利者：北里大学

種類：特許

番号：特許第 6249450 号

取得年月日：2017 年 12 月 1 日

国内外の別：国内

名称：腫瘍の治療剤およびその使用

発明者：米澤智洋、内田萌菜、松木直章、金村優香、川上和夫

権利者：東京大学

種類：PCT

番号：PCT/JP2016/65568

取得年月日：2016 年 5 月 26 日

国内外の別：国内

名称：マウスの交配誘引剤、マウスの交配促進方法およびネズミ類の捕獲方法

発明者：米澤智洋、大畑素子

権利者：北里大学

種類：特許

番号：特許第 5757543 号

取得年月日：2015 年 6 月 12 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

米澤智洋 (Yonezawa, Tomohiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授

研究者番号：10433715

### (2) 研究分担者

松木直章 (Matsuki, Naoaki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：40251417

盆子原誠 (Bonkobara, Makoto)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：50343611