

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18797

研究課題名(和文)放射線感受性関連分子のジェネティックおよびエピジェネティックな制御機構の解明

研究課題名(英文)Research for genetic and epigenetic mechanism related to radiosensitivity.

研究代表者

藤原 亜紀(Fujiwara, Aki)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：40709755

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):猫の鼻腔リンパ腫は治療に反応し長期生存する症例が存在する一方で、1年以内に死亡する短期生存症例が存在する。そのような背景より猫のリンパ腫において放射線および化学療法感受性に関連する因子を探索した。ある細胞株では放射線および1種の化学療法に抵抗性であり、複数の放射線療法や化学療法感受性に関わるとされる遺伝子発現に変化を認めた。また長期生存群および短期生存群の症例由来の腫瘍組織を用いた比較においては、発現の差を認める遺伝子が19種類抽出された。

研究成果の概要(英文):The prognosis of feline nasal lymphoma is divided into 2 groups; long-survival group after treatment and short-survival group dying within 1 year after treatment. Therefore, the purpose of this research was to explore some factors related to radiosensitivity and chemosensitivity in feline lymphoma. The one cell line was revealed to be resistant to radiation and one chemotherapeutic agent and expression of some genes which were considered to be sensitivity for radiation and chemotherapy altered compared to that in other cell lines which were sensitive for radiation and chemotherapy. As compared to tumor tissues obtained from cats belonging to long-survival group and short-survival group, the 19 genes were determined to alter their expression.

研究分野：腫瘍内科学

キーワード：猫リンパ腫 放射線療法 化学療法

1. 研究開始当初の背景

近年人医療ではさまざまな疾患においてこれまでの統一された治療に対し、個々の遺伝的背景や病態のサブタイプに基づいて決定される「テーラーメイド治療・個別化医療」が推奨されている。獣医療における個別化医療に関する研究はまだ発展段階であり、基礎的な疾患の病態解明が急がれる。研究代表者(藤原)の先行研究では、診断時に病理組織学的な悪性度や既存のWHOステージでは同一と考えられた猫の鼻腔リンパ腫症例に対し、同一の放射線治療を実施したにも関わらず、症例間に治療反応性や予後に差を認めた。そのような背景より、猫の鼻腔リンパ腫において既存の検査方法では検出できない、放射線感受性に関連する分子が治療反応性を決定づけていると仮説を立てた。また、実際の臨床現場では鼻腔リンパ腫は放射線のみでなく化学療法に対する反応性も高く、放射線抵抗性の症例には化学療法を追加で用いることも多い。そのような症例においては化学療法にも抵抗性であることを多く経験したことから化学療法に対する感受性も同時に調査することとした。

2. 研究の目的

1.-1 猫のリンパ腫症例から樹立した症例の細胞株を用いて、さまざまな線量実施しLD50を決定する。これらの結果に基づいて放射線感受性を決定する。

1.-2 猫のリンパ腫細胞株を用いて、各種化学療法薬剤に対するIC50を決定する。これら結果に基づいて化学療法の感受性を決定する。

2.-1 1で感受性を決定した猫のリンパ腫細胞株を用いて放射線・化学療法感受性に関連する分子を探索する。

2.-2 すでに予後が判明している猫鼻腔リンパ腫症例の治療前組織を用いて、放射線感受性に関わる分子を探索する。

3. 猫鼻腔リンパ腫細胞株の樹立を行う。

3. 研究の方法

1.-1 動物由来腫瘍細胞から樹立された猫のリンパ系腫瘍細胞株5種(A~E)(東京大学獣医内科学教室より譲渡)を用いて、さまざまな線量のX線を照射した。X線照射にはCP160X線照射装置(アクロバイオ社)を用いた。LD50を算出するために、予備実験から算出された予想されるLD50周辺の線量を中心に、X線を照射した。細胞数の測定にはcell counting kit-8(同仁化学)を用いて、吸光度を測定することで実施した。また、実際に治療に用いるプロトコールと同一の方法でも照射を行い、生存率を測定した(6Gyを週に1回6週にわたり実施)。各種実験はtriplicateで各三回ずつ実施し平均値を用いた。

1.-2 1-と同様の細胞株を用いて、6種の化学療法剤とともに培養した。予備実験から算

出されたIC50周辺の濃度を中心に細胞株を培養した。化学療法剤は鼻腔リンパ腫の治療に第一選択で使用される3種(ビンクリスチン、サイクロフォスファミド、ドキシソルピシン)以外に、レスキュープロトコールとして用いる3種(L-アスパラギナーゼ、ACNU、アクチノマイシンD)を選択した。細胞数の測定・実施回数は1-1と同様に実施した。

2.-1 放射線・化学療法感受性はさまざまな因子(細胞周期、DNA修復、アポトーシス、再生、血管新生など)によって決定されている。これら因子に関連した分子を探索し、複数の候補遺伝子として細胞株におけるmRNA発現をreal-timePCRを用いて調査した。解析にはCt法を用いて相対定量を行った。リファレンス遺伝子にはactb, b2mを用いた。またその発現結果と、放射線および化学療法感受性との関連性を調査した。正常発現コントロールとしては非リンパ腫の猫より採取した末梢血液からリンパ球を分離し、totalRNAを抽出した。

2.-2 放射線療法を実施したが、効果に乏しく化学療法も追加で実施したが1年以内に死亡した3症例(短期生存群)と、放射線療法を実施後に寛解し、無治療で1年以上再発転移を認めずに長期生存した3症例(長期生存群)の診断時腫瘍組織からtotal RNAを抽出した。これら2群間のRNA発現の差を網羅的に比較するために、SolId5500xl(Applied Biosystems)を用いてRNAシーケンズを実施した。得られた6症例の結果を用いて、PCA解析およびクラスター解析を実施し、2群間で発現の異なる遺伝子を抽出した。

3. 鼻腔から採取された組織を洗浄し、RPMIと共に培養した。

4. 研究成果

1-1. 各細胞株のLD50は以下の通りである。

A	B	C	D	E
3.09	2.81	NA	2.13	2.71

(単位: Gy)

また臨床現場で実施しているプロトコールでは、細胞株A, B, D, Eは2週目には細胞がすべて死滅しており試験を終了した一方で、細胞株Cは毎週照射を継続し、7週まで生存した。

細胞株Cは明らかに放射線抵抗性を示しており、今後細胞株Cと他の細胞株間において発現の異なる遺伝子を調査することで放射線抵抗性に関連する因子が決定できると考えられた。ただし、これら細胞株には鼻腔リンパ腫由来の細胞株が含まれていないため、症例の組織を用いた調査も必要であると考えられた。

1.-2 各種細胞株の IC50 は以下の通りである。

	A	B	C	D	E
1(μg/ml)	475	331	665	1330	950
2(ng/ml)	3.69	5.09	18.8	5.83	7.15
3(ng/ml)	0.411	0.395	0.465	0.438	0.356
4(μg/ml)	261	31.7	152	215	154
5(ng/ml)	0.549	0.586	0.512	0.311	0.56
6(IU/ml)	0.323	0.144	0.211	0.157	0.321

A~E：細胞株

1~6：化学療法剤

(1: サイクロフォスファミド、2: ドキソルビシン、3: ピンクリスチン、4: ACNU、5: アクチノマイシンD、6: L-アスパラギナーゼ)

放射線抵抗性株であるCにおいて、化学療法剤2のIC50は他の細胞株に比較して有意に高く、Cに対し抵抗性株であることが判明した。また細胞株Dに関しては、化学療法剤4のIC50が、他の細胞株に比較して有意に低く、Dに対し感受性が高いことが判明した。放射線抵抗性株Cは、ドキソルビシンに抵抗性であったが他の化学療法剤においては差を認めなかった。臨床例では複数の化学療法に抵抗性を示すことが多いため、細胞株での試験結果は臨床例には完全には一致しなかった。

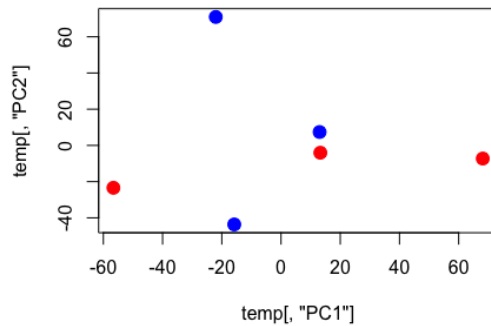
2.-1 放射線・化学療法感受性に関連すると予想される遺伝子20種(atm, p53, mdm2, p21, bax, bcl2, casp3, casp8, casp9, survivin, xiap, p105, p100, rela, relb, 14-3-3, abcc1, abcg2, topo2a, topo2b)の発現を細胞株において検討した。その結果、放射線抵抗性およびドキソルビシン抵抗性である細胞株Cにおいてはatm, p53, mdm2, p21, p105, relb, topo2bの発現が他の細胞株に比較すると低下していることが明らかとなった。他の遺伝子については差を認められなかった。

今回の結果で細胞株Cにおいて低発現であった因子は、放射線や化学療法感受性に関連する因子として報告されているが、予想と異なり差が得られない因子も存在した。また化学療法感受性については細胞株Cにおいてドキソルビシンのみが抵抗性であったため、他の薬剤耐性には関与しない特定のシグナルのみが変動していると考えられた。今後は発現の違いが認められた細胞株において、強制発現もしくはノックダウンによって各遺伝子発現を変化させることによる、放射線もしくは化学療法抵抗性の変化を確認することで、抵抗性を生じる機序の証明を行う必要がある。また、すでに治療反応が証明されている症例組織を用いて、実際の臨床反応との相関を確認する必要がある。

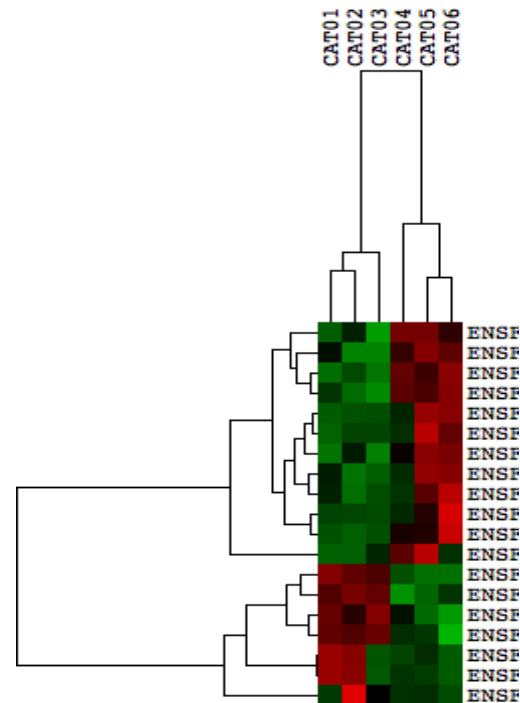
2.-2

短期生存群(赤)および長期生存群(青)の2群

間でPCA解析を実施した。これら6症例において明らかな傾向は認められなかった。



また、2群間において発現が異なる遺伝子を抽出したところ、19遺伝子が抽出された。これらのクラスター解析の結果は以下の通りである。



抽出された19遺伝子の発現を、今後は治療反応および予後が判明している症例由来の組織を用いて発現の検討を行う。これらのうち、実際に多くの症例において発現に差を認める遺伝子が決定できれば、追加で細胞株における機能解析を実施することで放射線や化学療法感受性への関連を調査することができる。

3. いずれの症例においても細胞株は樹立できなかった。理由としては、猫は鼻の大きさから病理組織検査の残りとしては多くの組織が採取できないこと、炎症・感染が強く好中球やマクロファージも多く混合していることなどが考えられた。現在樹立されている

細胞株の多くは胸水や腹水由来の細胞株であり、純度の高い腫瘍細胞が多く採取できる条件が必要であると考えられた。しかしながら鼻腔リンパ腫の研究には鼻腔由来の腫瘍細胞株が必要となるため、今後も試みが必要である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

鈴木佳奈子、富安博隆、藤原亜紀、後藤裕子、大参亜紀、大野耕一、藤田道郎、辻本元猫の鼻腔内リンパ 56 症例における治療法と予後に関する回顧的研究、第 14 回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2018 年 2 月 17 日、横浜

藤原亜紀

放射線治療アップデート～これまでの国内治療成績～、第 13 回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2017 年 2 月 19 日、横浜

藤原亜紀

日本獣医生命科学大学における放射線治療の現状、第 16 回日本獣医がん学会、2017 年 1 月 28 日、大阪

藤原亜紀

動物看護師が知っておくべき放射線治療、第 18 回日本臨床獣医学フォーラム、2016 年 9 月 24 日、東京

⑤藤原亜紀

猫のくしゃみ・逆くしゃみの正体は！？(2)治療編、第 12 回日本獣医内科学アカデミー、2016 年 2 月 21 日、横浜

Aki Fujiwara-Igarashi, Toshiki Fujimori, Yuri Nishimura, Daisuke Hasegawa, Yuko Goto-Koshino, Hajime Tsujimoto, Michio Fujita

Evaluation of minimal residual disease in peripheral blood by using the real-time polymerase chain reaction in feline high-grade nasal lymphoma, Asian Meeting of Animal Medicine Specialties, 2015 年 11 月 1 日、クワラルンプール

〔図書〕(計 2 件)

藤原亜紀 他、緑書房、猫の診療指針(担当:縦隔気腫、鼻炎・鼻腔内腫瘍、鼻咽頭狭窄、喉頭炎・喉頭腫瘍)、2017 年

藤原亜紀 他、インターズー、犬と猫の治療ガイド 2015 私はこうしている(担当:アス

ベルギルス性鼻炎、短頭種気道症候群、鼻腺癌、鼻リンパ腫)、2015 年

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤原 亜紀 (FUJIWARA, Aki)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・獣医学科・講師
研究者番号：40709755

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

渡邊学 (WATANABE, Manabu)
東京大学・新領域創成科学研究科・准教授

富安博隆 (TOMIYASU, Hiroataka)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教