

平成 30 年 7 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2017

課題番号：15KK0275

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  
（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）The role of canine AIM in histiocytic sarcoma(Fostering Joint International Research)

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） 7,800,000 円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：近年、腫瘍に随伴して存在する腫瘍関連マクロファージ（Tumor-associated macrophage, TAM）は様々な腫瘍の増悪を促進することが明らかになってきた。しかしどのようにしてTAMに分化するのかは分かっていない。本研究では、マクロファージに特異的に発現するタンパク質である Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)がその分化に密接に関与することを、犬の組織球性肉腫細胞株とマウスのマクロファージ由来細胞株を用いて明らかにした。さらに、アポトーシス経路のある蛋白質との直接的な関連についても明らかにし、AIMのアポトーシス制御機構を解明した。

研究成果の概要（英文）：Tumor-associated macrophage (TAM) is reported to be closely related to malignancy of tumorigenesis. However, it is unknown how macrophage can transverse into TAM. We have focused on a specific protein, apoptosis inhibitor of macrophage (AIM), which is expressed in macrophages. In this study, it is found that AIM is highly expressed in TAM and AIM inhibited apoptosis of these cells in vitro. It is also found that AIM could bind some factor of apoptosis pathway, suggesting that AIM should inhibit apoptosis via binding it.

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

イヌの組織球性肉腫は、マクロファージを由来とする腫瘍で、発症のメカニズムも効果的な治療法も明らかになっていない。これまで代表者は、マクロファージに特異的に発現するタンパク質である Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) に着目して研究をおこなってきた。その結果、AIM をイヌ組織球性肉腫細胞株に強制発現すると細胞増殖や異形成化(M2型化)が抑制されること、逆に AIM をノックダウンするとこれらが促進されることを見出した。さらに、組換えイヌ AIM を組織球性肉腫細胞の培養液に添加すると、濃度依存のおよび細胞種特異的に細胞数が減少することを明らかにした。これらの結果は、AIM の産生低下がマクロファージの異常増殖と異形成化をもたらすという、全く新しい腫瘍発症メカニズムの存在を示唆している。

もともとマクロファージは異物を貪食・分解し、免疫応答を活性化させる作用を持つことから、がんの増殖を抑制するものと考えられてきた。しかし近年、M2型マクロファージや、腫瘍に随伴して存在する腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophage, TAM) は、様々な腫瘍の増悪を促進することが明らかになってきた。ただ、M1型や未分化なマクロファージがどのようにして M2型や TAM に分化・成熟するのかは、分かっていない。

## 2. 研究の目的

代表者は、これまでの成果をもとに、AIM の産生低下により異常増殖・異形成化したマクロファージが腫瘍に随伴することで TAM に分化する可能性に気がついた。本応募では、AIM が TAM の遊走、増殖、分化、機能調節に及ぼす影響を明らかにするとともに、AIM による抗腫瘍作用を検討することとした。これにより、マクロファージの腫瘍のみならず、マクロファージがもたらす腫瘍の発生メカニズムの解明を目指した。

## 3. 研究の方法

TAM は周辺環境に応じて様々な物質を産生・分泌し、腫瘍細胞の増殖に適した微小環境を構築する細胞で、その性質を変えずに単離培養し実験に用いるには専門的な知識と熟練した手技が必要であった。そこで本応募では、TAM 研究の第一人者であり、University of South Florida 准教授で、Moffitt Cancer Center 研究員の Dr. Brian Ruffell を共同研究者として迎えることとした。Dr. Ruffell のもつ各タイプのマクロファージの分化・機能に関わる単離・培養技術および腫瘍モデルマウスを用いることで本研究を円滑に進めることができる。本研究では下記の 4 つの実験を実施した。

各種マクロファージの AIM 発現:ヒト、イヌ、マウスにおけるマクロファージおよび様々な腫瘍組織を採取し、生体内におけるマクロファージの種類と AIM の発現の違いを検討した。

AIM 強制発現/発現抑制した際のマクロファージの分化・機能解析:マクロファージ培養系に AIM 発現ベクター、AIM siRNA、組換え AIM などを処置し、その後の増殖/分化を観察した。各種阻害剤を用いた AIM のシグナル伝達経路の解明:AIM を処置したマクロファージ培養系に、各伝達経路の阻害剤や膜タンパク質の阻害剤を処置し、AIM の作用機序を調べた。各種モデルマウスにおける AIM の抗腫瘍作用:TAM を豊富に持つ腫瘍発症マウス (MMTV-PyVT) や腫瘍細胞を播種したヌードマウスに AIM を投薬し、AIM の抗腫瘍効果を検討した。

## 4. 研究成果

ヒト、イヌ、マウスにおけるマクロファージおよび様々な腫瘍組織を採取し、生体内におけるマクロファージの種類と AIM の発現の違いを検討したところ、すべての動物においてマクロファージのみならず、単球、Tリンパ球、

Bリンパ球での AIM の発現が認められた。Tリンパ球以外の血球系細胞の発現を認めたのはこれが初めてのことである。他の組織では組織球以外および樹状細胞での明確な発現は認められなかった。ヒトおよびマウスのマクロファージ系の培養細胞株を入手し、AIM 発現ベクター、AIM siRNA、組換え AIM を処置して増殖/分化を観察した。犬 AIM では細胞数の減少が濃度依存的に認められたが、マウス、ヒト AIM では認められなかった。各種阻害剤を用いた AIM のシグナル伝達経路の解明: AIM を処置したマクロファージ培養系に、各伝達経路の阻害剤や膜タンパク質の阻害剤を処置し、AIM の作用機序を調べた。各種モデルマウスにおける AIM の抗腫瘍作用: TAM を豊富に持つ腫瘍発症マウス (MMTV-PyVT) や腫瘍細胞を播種したヌードマウスに AIM を投薬し、AIM の抗腫瘍効果を検討した。

これまで獣医学の臨床研究は、医学の臨床研究の追随になってしまうことが多かった。しかし、獣医学領域ではよくみられるが、医学領域ではあまりみられない疾病を取り扱った場合、そこで得られた知見は獣医学・医学の双方においてブレイクスルーとなる。本研究はまさにその好例で、組織球性肉腫というイヌではみられるがヒトでは珍しい疾病を扱うことで、AIM の産生低下がマクロファージの異常増殖と異形成化をもたらす、という新知見にいち早くたどり着くことができた。この知見を、マクロファージの腫瘍のみならず、マクロファージがもたらす腫瘍に応用することで、様々な腫瘍の発症メカニズムの解明に繋げ、獣医学にも医学にも幅広く活用できる革新的な研究への展開が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 9 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.

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.

[学会発表] (計 2 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

〔産業財産権〕

取得状況(計 2 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

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)研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

Brian Ruffell

Moffitt cancer research center

Florida, USA