

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手研究（A）
 研究期間：平成 18 年度～平成 20 年度
 課題番号：18688018
 研究課題名（和文）ネコゲノム解析による造血系腫瘍の発症機構解明とその臨床応用への展開
 研究課題名（英文）Molecular cytogenetic studies on the pathogenesis of feline hematological malignancies and development of pathogenesis-based clinical applications

研究代表者
 氏名（アルファベット） 藤野泰人 Yasuhito Fujino
 所属機関・所属部局名・職名 東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
 研究者番号 70401180

研究成果の概要：

小動物臨床においてしばしば重要な問題となる猫の造血系疾患について、分子細胞遺伝学的手法を用いた病態解析を行い、以下の成果を得た。猫白血病ウイルス（FeLV）感染に伴う造血系腫瘍において、ネコゲノムにおける FeLV 組み込み領域を分子細胞遺伝学的に検出する方法を確立し、新規 FeLV 共通組み込み領域を発見し腫瘍化との関連性を明らかにするとともに、FeLV 関連性腫瘍におけるクローナリティ検出法を開発した。さらに、猫のリンパ腫において新たな細胞免疫学的分類法を確立し、詳細な病型分類、治療指針の策定および予後評価を可能にした。一方、猫免疫不全ウイルス感染症において問題となる血液学的異常を明らかにし、新規抗ウイルス療法の基盤となる方法の開発に成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	11,800,000	3,540,000	15,340,000
平成 19 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
平成 20 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	23,100,000	6,930,000	30,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：獣医学・臨床獣医学

キーワード：ネコゲノム、リンパ・造血系腫瘍、染色体解析、レトロウイルス、FeLV、遺伝子再構成、クローナリティ、CIS

1. 研究開始当初の背景

これまで、動物の造血系腫瘍に関する研究は数多く行われてきたが、そのほとんどはマウスなどの実験動物に関してであり、腫瘍原性ウイルスを実験感染させ発症した腫瘍の解析である。このため、自然発生腫瘍の臨床的挙動を反映しておらず、また実践的な抗腫瘍療法の確立を検討する上では制限がある。獣医臨床においては、腫瘍原性レトロウイルスであるネコ白血病ウイルス（feline leukemia virus; FeLV）に感染し造血系腫瘍

を発症した症例が多い。このような症例では、ヒトの造血系腫瘍と類似した臨床的挙動が認められ、抗腫瘍療法においても共通した薬剤やプロトコルを用いており、自然発生の疾患モデルとして非常に適していると考えられる。

2. 研究の目的

ネコの造血系腫瘍における分子細胞遺伝学的病態を解明することにより、獣医臨床における病態に基づいた診断・治療法への応用

を行うと同時に、それらをヒトの腫瘍性疾患モデルとして利用することを検討するために本研究を計画した。具体的には当該年度内に以下の点に関する基礎および臨床研究を行うこととする。

(1)ネコの悪性腫瘍における染色体異常および関連する遺伝子の解析

(2)ネコの悪性腫瘍における外来性 FeLV 共通組み込み領域および関連する遺伝子の解析

(3)ネコの悪性腫瘍における遺伝子再構成解析および診断・予後判定への臨床応用

3. 研究の方法

(1)ネコの悪性腫瘍における染色体異常および関連する遺伝子の解析

染色体異常および FeLV プロウイルスの染色体組み込み座位に関連する遺伝子を解析することにより猫の造血系腫瘍の分子細胞遺伝学的病態を明らかにする。

(2)ネコの悪性腫瘍における外来性 FeLV 共通組み込み領域および関連する遺伝子の解析

腫瘍細胞における FeLV プロウイルス共通組み込み領域を探索し、関連する遺伝子異常を解析することにより、猫の造血系腫瘍の分子病態を明らかにするとともに、新規腫瘍関連遺伝子を同定する。

(3)ネコの悪性腫瘍における遺伝子再構成解析および診断・予後判定への臨床応用

造血系腫瘍における特異的遺伝子異常あるいは *Ig* または *TCR* 遺伝子の再構成を解析し腫瘍特異的診断法に応用する。

4. 研究成果

(1) FISH 法を用いた分子細胞遺伝学的解析により、猫のリンパ系腫瘍における FeLV プロウイルスの染色体組込座位同定法を確立した。3 種類の猫リンパ系腫瘍細胞株における解析では、それぞれ 6 箇所の組込座位が同定され、それらの一部は重複した座位が認められ、共通組み込み領域の存在が示唆された。また、FeLV 共通組み込み領域である *fit-1* および *pim-1* のネコ染色体上座位を FISH 法により決定した。

(2) FeLV 感染により発症した猫の胸腺型リンパ腫において、新たなプロウイルス共通組み込み領域である *flit-1* を同定した。解析した胸腺型リンパ腫における *flit-1* の変異頻度は 25% であり、ゲノム解析により近傍に座位する *ACVRL1* 遺伝子の発現を増強している可能性が示唆された。

(3) FeLV 関連腫瘍におけるプロウイルス組込解析を応用したクローナリティ検出法を確立した。この方法によりリンパ系腫瘍のみならず AML や MDS などにおいてもクローナリティを迅速に

解析することが可能となった。また、未だ明確ではなかった FIV 感染における血液異常について解明し、HIV 感染と類似した病態であることが示唆された。さらに、これまで確立していなかった猫のリンパ腫における詳細な病型分類法を確立した。これは今後の治療指針の策定および予後判定に非常に有用であると考えられる。

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 16 件)

Fujino Y, Nishigaki K, Cho KW, Ohno K, Satoh H, Tsujimoto H. Assignment of the feline *pim-1* and *fit-1*, common integration sites of feline leukemia virus, to chromosome B2 q21.3 and q32. *Cytogenet Genome Res.* Submitted.

Fujino Y, Satoh H, Ohno K, Tsujimoto H. Chromosomal mapping of feline leukemia virus insertions in cat lymphoid tumors. *J Virol Methods.* Submitted.

Chino J, Fujino Y, Yamazaki J, Takeuchi Y, Goto-Koshino Y, Nakashima K, Sakai Y, Uetsuka K, Asai Y, Kariya K, Nakayama H, Ohno K, Tsujimoto H. Cytomorphological and immunological classification of feline lymphomas: a clinical study of 76 cases. *J Comp Pathol.* Submitted.

Takeuchi Y, Iizuka H, Kanemitsu H, Fujino Y, Nakashima K, Uchida K, Ohno K, Nakayama H, Tsujimoto H. Plasma cell leukemia in a cat. *J Feline Med Surg.* Submitted.

Fujino Y, Liao CP, Zhao YS, Pan J, Mathes LE, Hayes KA, Ohno K, Tsujimoto H, Roy-Burman P. Identification of a novel common proviral integration site, *flit-1*, in feline leukemia virus induced thymic lymphoma. *Virology.* 2009 Mar 30;386(1):16-22.

Fujino Y, Horiuchi H, Mizukoshi F, Baba K, Goto-Koshino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Prevalence of hematological abnormalities and detection of infected bone marrow cells in asymptomatic cats with feline immunodeficiency virus infection. *Vet Microbiol.* 2009 May 12;136(3-4):217-25.

Mizukoshi F, Baba K, Goto Y, Setoguchi A, Fujino Y, Ohno K, Oishi S, Kodera Y, Fujii N, Tsujimoto H. Antiviral activity of membrane fusion inhibitors that target gp40 of the feline immunodeficiency virus envelope protein. *Vet Microbiol.* 2009 Apr 14;136(1-2):155-9.

Mizukoshi F, Baba K, Goto-Koshino Y, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, Tamamura H, Oishi S, Fujii N, Tsujimoto H. Inhibitory effect of newly developed CXC-chemokine receptor 4 antagonists on the infection with feline immunodeficiency virus. J Vet Med Sci. 2009 Jan;71(1):121-4.

Ide K, Setoguchi-Mukai A, Nakagawa T, Uetsuka K, Nakayama H, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Disseminated histiocytic sarcoma with excessive hemophagocytosis in a cat. J Vet Med Sci. 2009 Jun;71(6):817-820.

Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: insertional mutagenesis. Vet Immunol Immunopathol. 2008 May 15;123(1-2):138-43.

Takeuchi Y, Matsuura S, Fujino Y, Nakajima M, Takahashi M, Nakashima K, Sakai Y, Uetsuka K, Ohno K, Nakayama H, Tsujimoto H. Hypereosinophilic syndrome in two cats. J Vet Med Sci. 2008 Oct;70(10):1085-9.

Baba K, Goto-Koshino Y, Mizukoshi F, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Inhibition of the replication of feline immunodeficiency virus by lentiviral vector-mediated RNA interference in feline cell lines. J Vet Med Sci. 2008 Aug;70(8):777-83.

Yamazaki J, Baba K, Goto-Koshino Y, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Quantitative assessment of minimal residual disease (MRD) in canine lymphoma by using real-time polymerase chain reaction. Vet Immunol Immunopathol. 2008 Dec 15;126(3-4):321-31.

Baba K, Mizukoshi F, Goto-Koshino Y, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Application of RNA interference for inhibiting the replication of feline immunodeficiency virus in chronically infected cell lines. Vet Microbiol. 2007 Mar 10;120(3-4):207-16.

Matsuura S, Koto H, Ide K, Fujino Y, Setoguchi-Mukai A, Ohno K, Tsujimoto H. Induction of chemoresistance in a cultured canine cell line by retroviral transduction of the canine multidrug resistance 1 gene. Am J Vet Res. 2007 Jan;68(1):95-100.

Mizukoshi T, Fujino Y, Yasukawa K, Matumoto H, Matsumura S, Nagasaki T, Ohno K, Tsujimoto H, Shimoda T. Essential thrombocytopenia in a dog. J Vet Med Sci. 2006 Nov;68(11):1203-6.

〔学会発表〕(計16件)

李有晶、藤野泰人、後藤裕子、大野耕一、辻本元：Detection of proviral integration sites by linker mediated PCR in FeLV-related hemolymphatic neoplasms and its clinical application to analyze tumor clonality. 2008年9月、第146回日本獣医学会学術集会、宮崎

関敬泰、藤野泰人、平山健太郎、高橋雅、中島亘、大野耕一、辻本元：猫の各種疾患症例における血中チミジンキナーゼ活性測定とその臨床的有用性：2008年11月、第29回動物臨床医学会年次大会、大阪

藤野泰人：輸血療法のすべて：2008年11月、第29回動物臨床医学会年次大会、大阪

藤野泰人：リンパ造血系腫瘍における抗がん剤の使い方：2009年1月、平成20年度日本獣医師会学会年次大会、岩手

藤野泰人：リンパ腫診療最前線～細胞学的分類に基づく治療戦略とレスキュー療法～：2009年2月、日本獣医内科学アカデミー・日本獣医臨床病理学会2009年大会、東京

藤野泰人：輸血の適応と方法：2009年2月、日本獣医内科学アカデミー・日本獣医臨床病理学会2009年大会、東京

藤野泰人：東京大学動物医療センターにおける献血プログラム：2009年2月、日本獣医内科学アカデミー・日本獣医臨床病理学会2009年大会、東京

巽永美子、中島亘、高橋雅、藤野泰人、大野耕一、辻本元：肝内動脈門脈瘻と診断された猫の1例：2009年2月、日本獣医内科学アカデミー・日本獣医臨床病理学会2009年大会、東京

関敬泰、藤野泰人、高橋雅、中島亘、大野耕一、辻本元：ビルビン酸キナーゼ欠乏症と診断したアビシニアンの一例：2009年2月、日本獣医内科学アカデミー・日本獣医臨床病理学会2009年大会、東京

望月浩之、高橋雅、藤野泰人、リング・スラットマン、内田和幸、中山裕之、辻本元：胸腔内に肉腫様癌の発生が認められた猫の一例：2009年2月、日本獣医内科学アカデミー・日本獣医臨床病理学会2009年大会、東京

神徳幸子、藤野泰人、中島亘、佐々木めぐみ、上塚浩司、中山裕之、磯谷真弓、盆子原誠、大野耕一、辻本元：消化管間質腫瘍が認められた猫の2例：2008年2月、日本獣医臨床病理学会2008年大会、埼玉

中嶋真弓、藤野泰人、高橋雅、中島亘、大野耕一、辻本元：猫のリンパ腫における予後因子の解析：2008年2月、日本獣医臨床病理学会2008年大会、埼玉

大平麻路、藤野泰人、高橋雅、中島亘、大野耕一、辻本元：猫の骨髓異形成症候群および急性骨髄性白血病における予後の比較検討：2008年2月、日本獣医臨床病理学会2008年大会、埼玉

茅野順子、山崎淳平、竹内由則、後藤裕子、苅谷和廣、浅井洋子、白井活光、小林哲也、坂井祐介、上塚浩司、中山裕之、藤野泰人、大野耕一、辻本元：猫のリンパ腫における細胞学的分類および免疫学的表現型に関する検討：2007年11月、第28回動物臨床医学会年次大会、大阪

神徳幸子、岡部幹、高橋雅、中島亘、藤野泰人、大野耕一、辻本元：猫のDICにおける臨床的特徴：2007年11月、第28回動物臨床医学会年次大会、大阪

藤野泰人：免疫介在性血液疾患の診断と治療：2007年8月、第4回日本獣医内科学アカデミー学術大会、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野泰人 (FUJINO YASUHI TO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：70401180

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし