

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02340

研究課題名(和文) AIMによるマクロファージ特異的アポトーシスの機序解明とこれを利用した腫瘍治療

研究課題名(英文) AIM expression, mutation and function in canine 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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：イヌの組織球性肉腫は発生機序や病態に不明な点が多い。本研究では、組織球に主に発現し、細胞の生存に関与するタンパク質であるAIMの関与について調べた。イヌ組織球性肉腫細胞株の培養液に組換えイヌAIMを添加したところ、濃度依存的にアポトーシスが引き起こされた。AIMを過発現する組織球性肉腫細胞株をヌードマウスに移植したところ、腫瘍の増大速度が有意に低下した。組織球性肉腫症例のAIM遺伝子配列には、ミスセンス変異が高確率で発見された。以上より、イヌAIMは組織球性肉腫のアポトーシス促進作用および増大抑制作用を持ち、その発現低下や遺伝子変異が腫瘍発生のきっかけとなる可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでAIMの脂質代謝、肝硬変、腎不全との関連については活発に研究されてきたが、マクロファージや組織球に関わる研究はいわば盲点になっていた。応募者は獣医学的な視点からAIM研究に取り組んだため、定説の盲点をついた仮説にいち早く到達し、独自性のある研究を展開できた。また、マクロファージと腫瘍といえば、腫瘍関連性マクロファージ(TAM)がよく知られている。TAMの分化制御機構は明らかになっておらず、また臨床例においてTAMを駆逐する方法も見つかっていない。本研究の成果はTAMの分化制御機構の解明につながることで期待される。

研究成果の概要(英文)：The molecular pathogenesis of canine histiocytic sarcoma remains unclear. In this study, the relationship of AIM, apoptosis inhibitor of macrophage to this disease was investigated. When recombinant canine AIM was added to the media of canine histiocytic sarcoma cell line, the cell number decreased dose-dependently via apoptosis. When AIM overexpressed cell line was transferred to the nude mice, the tumor growth speed was significantly lower. The AIM genes of the patients had missense mutations with high probability. These results suggest that AIM intrinsically induce the apoptosis of histiocytes in dogs and AIM gene mutation could be one of the triggers of histiocytic sarcoma progression.

研究分野：獣医学

キーワード：組織球 アポトーシス 腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イヌ組織球性肉腫は特定の犬種で好発する組織球の悪性腫瘍である。特にバーニーズ・マウンテン・ドッグやフラットコートド・レトリバーにおいてはその死因の1/4以上を占めると報告されている。腫瘍の発生には遺伝的背景のほか炎症性疾患の罹患歴が関係しているとされているが、詳細な発生機序は不明である。また、有効な治療法も確立されておらず、予後は170日と極めて短い。イヌ組織球性肉腫の発生部位は皮膚や脳、肺、脾臓や関節など様々である上、中には急速に複数の臓器に転移するもの存在し、その病態は多様である。

ヒトにおいても類似の疾患としてランゲルハンス細胞組織球症が存在する。しかし、本疾患は日本で年間15人と発生が稀である上、診断後早期に死に至る悪性度の高い疾患であるため、発生機序や病態・治療法はほとんど分かっていない。イヌ組織球性肉腫を疾患モデルとして用いることでヒトの疾患にも応用できると考えられる。

Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM)は組織球により産生され、組織球自身のアポトーシスを抑制することが知られているタンパク質である。マウスではAIMが炎症の抑制に関与しているとの報告もある。以上の背景は、AIMが組織球の腫瘍化や病態の多様性に影響している可能性を示している。

2. 研究の目的

本研究ではイヌの組織球性肉腫の発生機序や病態を形成するメカニズムを明らかにすることを目的とし、イヌAIMと組織球性肉腫との関わりを探索した。

3. 研究の方法

イヌ正常組織におけるAIM発現、組織球性肉腫に対するAIMの作用、組織球性肉腫におけるAIM発現、組織球性肉腫症例におけるAIMのDNA配列、組織球性肉腫に対する変異AIMの作用の5点について検討することとした。

4. 研究の成果

イヌ正常組織におけるAIM発現

ヒトのAIMは組織球に発現していることが報告されているが、イヌのAIMの発現に関してはこれまで報告が無かった。そこで申請者はイヌAIMの配列を決定し、組換えタンパク質をウサギに免疫することで抗イヌAIMポリクローナル抗体を作出した。決定した配列および作出した抗体を用い、健全なイヌの全身組織におけるmRNA・タンパク質発現を、RT-PCR、in situ hybridization、および免疫組織化学により検討した。

イヌにおいて、組織球の他、これまで報告がなかった単球やBリンパ球、血管内皮細胞においてもAIMの発現があることが明らかとなった。この結果は、組織球性肉腫において、腫瘍細胞自身だけではなくその他の細胞もAIMを発現している可能性が考えられ、免疫反応や血管新生が活発な腫瘍微小環境の形成にもAIMが関与していることが示唆された。

組織球性肉腫に対するAIMの作用

組織球性肉腫に対するAIMの作用を検討するために組織球性肉腫細胞株の培養液に組換えイヌAIMを添加したところ、濃度依存的に細胞数が減少した。TUNEL染色やフローサイトメトリーにより、この細胞数の減少がアポトーシスによるものであることが明らかとなった。さらに、AIMを恒常的に強発現する組織球性肉腫細胞株を作製し、ヌードマウスの皮下に移植したところ、コントロールと比較して腫瘍の増大速度が有意に低下した。このことから、イヌAIMが組織球性肉腫のアポトーシス促進作用および増大抑制作用を持つことが示された。

組織球性肉腫におけるAIM発現

60症例以上の組織球性肉腫の免疫組織化学を実施したところ、約4割の症例はAIMが低発現であったが、約2割がまばらに発現しており、残りの症例では予想に反して発現が亢進していた。まばらに発現していた症例は全て複数の臓器で同時多発的に腫瘍が発生する播種性組織球性肉腫と診断されていた。AIMを高発現する組織球性肉腫が存在したことから、アポトーシス促進作用や増殖抑制作用を持たないAIMの存在が示唆された。

組織球性肉腫症例におけるAIMのDNA配列

組織球性肉腫症例のAIMの遺伝子配列を解析したところ、複数の症例でアミノ酸置換を伴う2つのミスセンス変異を認めた。腫瘍部位以外でも同様の配列が認められたことから、この変異は生殖細胞系列のものであると考えられた。なお、にてAIM発現が亢進していた症例は全て少なくとも1つの変異を有していた。組織球性肉腫症例における各変異の出現頻度を疾患対照群と比較したところ、統計的に有意な高いオッズ比が確認された。組織球性肉腫の発生頻度が最も高い犬種であるバーニーズ・マウンテン・ドッグやフラットコートド・レトリバーでは疾患コントロール群でも変異保有率が高いことが明らかとなった。

以上のことから、いずれの変異も組織球性肉腫の発生に関係しており、特定の犬種で本疾患が多発する1つの原因となっている可能性が示された。

組織球性肉腫に対する変異 AIM の作用

イヌ組織球性肉腫細胞株の AIM を CRISPR-Cas9 システムによりノックアウトし、代わりに変異 AIM 遺伝子を導入した遺伝子改変細胞株を作出した。この細胞株を MTT アッセー、ウェスタンブロット、およびフローサイトメトリーにより解析し、比較した。その結果、変異型 AIM は正常 AIM と比較して有意に増殖活性が亢進しており、飢餓状態においては有意に細胞生存率が上昇していることが明らかになった。

・まとめ

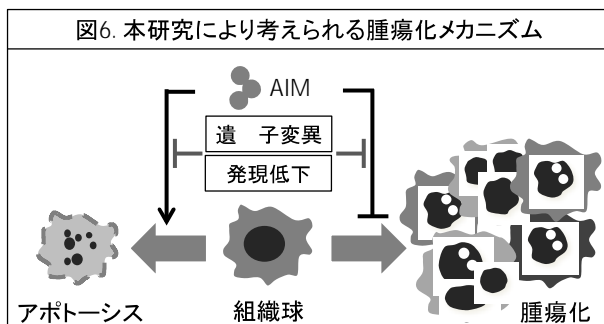
本研究により、組織球性肉腫の発生や病態に AIM が関わっていることが示された。組織球性肉腫の発生原因として、少なくとも AIM の発現低下と変異型 AIM の 2 つが影響していると考えられた(図)。また、変異型 AIM の存在は好発犬種存在に合致する。さらに、AIM がリンパ球や血管内皮細胞に発現していたことや播種性組織球性肉腫に特徴的な発現パターンが存在したことから、腫瘍微小環境の形成や病態の多様性にも AIM が影響している可能性が示された。

本研究では組織球性肉腫の遺伝に関わる因子を初めて明らかにした。これにより、組織球性肉腫が高リスクとなるイヌの掛け合わせをブリーディングの前に察知することができる。また、変異 AIM の機能のさらなる研究により、新たな治療ターゲットの探索にも繋がる。さらに、AIM の病態への関与の詳細が明らかとなれば、組織球性肉腫を分子生物学レベルで細分化できるようになり、より適切な治療選択が可能となる。

イヌと同様、ヒトのランゲルハンス細胞組織球症でも AIM の変異が関与している可能性は大きい。本疾患も遺伝的背景の影響が考えられているため、同様のメカニズムで組織球が腫瘍化している可能性がある。現在本疾患の研究が遅れている要因の一つはその希少さにある。本疾患への AIM の関与が明らかとなれば、今後イヌ組織球性肉腫での知見をよりヒト医療にも役立てやすくすると考えられる。

組織球やリンパ球は、本変異を持つことでより効率よく外来抗原を除去し、生体を守ることができると考えられる。変異 AIM の有無が感染症の重症化や自己免疫疾患の発症にも関与している可能性があり、本研究は様々な疾患の病態解明への糸口となるだろう。

図6. 本研究により考えられる腫瘍化メカニズム



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuboi Masaya, Sakai Kosei, Maeda Shingo, Chambers James K., Yonezawa Tomohiro, Matsuki Naoaki, Uchida Kazuyuki, Nakayama Hiroyuki	4. 巻 56
2. 論文標題 Assessment of HER2 Expression in Canine Urothelial Carcinoma of the Urinary Bladder	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 369～376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0300985818817024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uchida M., Uchida K., Maeda S., Yonezawa T.	4. 巻 58
2. 論文標題 Expression of apoptosis inhibitor of macrophages in tissue macrophages, leukocytes and vascular endothelial cells of dogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tissue and Cell	6. 最初と最後の頁 112～120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tice.2019.05.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maeda Shingo, Murakami Kohei, Inoue Akiko, Yonezawa Tomohiro, Matsuki Naoaki	4. 巻 7
2. 論文標題 CCR4 Blockade Depletes Regulatory T Cells and Prolongs Survival in a Canine Model of Bladder Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 1175～1187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2326-6066.CIR-18-0751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakazawa M., Maeda S., Omori M., Kaji K., Yokoyama N., Nakagawa T., Chambers J.K., Uchida K., Ohno K., Yonezawa T., Matsuki N.	4. 巻 249
2. 論文標題 Duodenal expression of antimicrobial peptides in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease and intestinal lymphoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Veterinary Journal	6. 最初と最後の頁 47～52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tvjl.2019.05.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 NAKAZAWA Maho, MAEDA Shingo, YOKOYAMA Nozomu, NAKAGAWA Taisuke, YONEZAWA Tomohiro, OHNO Koichi, MATSUKI Naoaki	4. 巻 81
2. 論文標題 Sphingosine-1-phosphate (S1P) signaling regulates the production of intestinal IgA and its potential role in the pathogenesis of canine inflammatory bowel disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1249 ~ 1258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Kosei, Maeda Shingo, Saeki Kohei, Yoshitake Ryohei, Goto-Koshino Yuko, Nakagawa Takayuki, Nishimura Ryohei, Yonezawa Tomohiro, Matsuki Naoaki	4. 巻 57
2. 論文標題 ErbB2 Copy Number Aberration in Canine Urothelial Carcinoma Detected by a Digital Polymerase Chain Reaction Assay	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 56 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0300985819879445	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamamoto T, Kumano M, Igarashi H, Yonezawa T	4. 巻 8(4)
2. 論文標題 Clinical usefulness of flash glucose monitoring system in dogs with diabetes mellitus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Vet Sci Med Diagn	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa F, Hasegawa D, Mizoguchi S, Yonezawa T, Matsuki N.	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Excitatory and inhibitory amino acids in cerebrospinal fluid of familial spontaneous epileptic cats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Vet Sci Med Diagn.	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Kosei, Maeda Shingo, Yonezawa Tomohiro, Matsuki Naoaki	4. 巻 195
2. 論文標題 Decreased plasma amino acid concentrations in cats with chronic gastrointestinal diseases and their possible contribution in the inflammatory response	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Veterinary Immunology and Immunopathology	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vetimm.2017.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai K., Maeda S., Yamada Y., Chambers J. K., Uchida K., Nakayama H., Yonezawa T., Matsuki N.	4. 巻 16
2. 論文標題 Association of tumour-infiltrating regulatory T cells with adverse outcomes in dogs with malignant tumours	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 330 ~ 336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 SUGIMOTO Satoko, MAEDA Shingo, TSUBOI Masaya, SAEKI Kohei, CHAMBERS James K., YONEZAWA Tomohiro, FUKUSHIMA Kenjiro, FUJIWARA Reina, UCHIDA Kazuyuki, TSUJIMOTO Hajime, MATSUKI Naoaki, OHNO Koichi	4. 巻 80
2. 論文標題 Multiple acquired portosystemic shunts secondary to primary hypoplasia of the portal vein in a cat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 874 ~ 877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.17-0648	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai K., Maeda S., Yamada Y., Chambers J. K., Uchida K., Nakayama H., Yonezawa T., Matsuki N.	4. 巻 16
2. 論文標題 Association of tumour-infiltrating regulatory T cells with adverse outcomes in dogs with malignant tumours	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 330 ~ 336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Kosei, Maeda Shingo, Yonezawa Tomohiro, Matsuki Naoaki	4. 巻 195
2. 論文標題 Decreased plasma amino acid concentrations in cats with chronic gastrointestinal diseases and their possible contribution in the inflammatory response	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Veterinary Immunology and Immunopathology	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vetimm.2017.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 INOUE A, MOTEGI T, YONEZAWA T, MAEDA S
2. 発表標題 Impact of thrombocytosis on lung metastasis and survival in dogs with urothelial carcinoma
3. 学会等名 The 2nd Asian Small Animal Specialist Veterinary Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西 玲央, 茂木 朋貴, 前田 真吾, 玉原 智史, 松木 直章, 米澤 智洋
2. 発表標題 尿道括約筋不全症の避妊雌犬に対するテストステロン製剤投与の臨床評価
3. 学会等名 日本獣医腎泌尿器学会2019年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mona UCHIDA, Kazuyuki UCHIDA, Hiroyuki TANI, Makoto BONKOBARA, Shingo MAEDA, Tomohiro YONEZAWA
2. 発表標題 Expression and genetic variation of apoptosis inhibitor of macrophage in canine histiocytic sarcoma
3. 学会等名 American College of Veterinary Internal Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田萌菜, 内田和幸, 前田真吾, 米澤智洋
2. 発表標題 イヌにおけるApoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM) の 生体内発現分布
3. 学会等名 日本獣医臨床病理学会2019年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西玲央・内田萌菜・中原理人・前田真吾・林明男・岩谷直・田中徹・米澤智洋
2. 発表標題 5-ALAの内服は慢性腎臓病の猫の尿蛋白/クレアチニン比を減少させる
3. 学会等名 第9回ポルフィリン ALA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣瀬結衣、内田萌菜、坪井誠也、中川貴之、栗木優五、神谷真子、浦野泰照、前田真吾、米澤智洋
2. 発表標題 -グルタミルトランスペプチダーゼ活性検出蛍光プローブを用いた犬の乳腺腫瘍の可視化の試み
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田萌菜、米澤智洋、茂木朋貴、藤井渉、盆子原誠、原田慶、小林哲也、前田真吾、桃井康行
2. 発表標題 犬の組織球性肉腫の発生・病態におけるApoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM)の 遺伝子変異による影響の検討
3. 学会等名 第16回日本獣医内科学アカデミー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米澤智洋、松宮佑樹、三澤嘉久、藤原夏樹、茂木朋貴、前田真吾、桃井康行
2. 発表標題 ドコサヘキサエン酸を投与した特発性てんかんの犬の5例
3. 学会等名 第16回日本獣医内科学アカデミー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤 瞬, 今井 巡, 松宮 佑樹, 米澤 智洋
2. 発表標題 先天性下垂性矮小症と診断したトイ・プードルの1例
3. 学会等名 第16回日本獣医内科学アカデミー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Function, expression and genetic variation of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) on canine histiocytic sarcoma
2. 発表標題 Mona UCHIDA, Kazuyuki UCHIDA, Hiroyuki TANI, Makoto BONKOBARA, Shingo MAEDA, Tomohiro YONEZAWA
3. 学会等名 The 10th Joint Symposium of Veterinary Research in East Asia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Hirose, M Uchida, Y. Urano, M. Tsuboi, S. Maeda, T. Yonezawa
2. 発表標題 Feasibility of clinical application of gamma-glutamyl hydroxymethyl rhodamine green for detection of canine breast cancer
3. 学会等名 Proceedings of the 18th biennial congress of the international society for animal clinical pathology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Uchida, Y. Matsumiya, M. Bonkobara, S. Maeda, T. Yonezawa
2. 発表標題 Expression of apoptosis inhibitor of macrophage in canine histiocytic sarcoma and its relation to tumor malignancy
3. 学会等名 Proceedings of the 18th biennial congress of the international society for animal clinical pathology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 米澤智洋・内田萌菜・中原理人・前田真吾・林明男・岩谷直・田中徹
2. 発表標題 5-ALAの内服が慢性腎臓病の猫の血中・尿中マーカーに与える影響
3. 学会等名 第8回ボルフィリン ALA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 陳文、内田萌菜、米澤智洋、小松浩一郎、中島和久、出野 尚、二藤 彰、汾陽光盛
2. 発表標題 A pilot study on abnormal behaviors in Annexin A5 knockout mice
3. 学会等名 第4回 日本アネキシン研究会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	盆子原 誠 (Makoto Bonkobara) (50343611)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授 (32669)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	角田 茂 (Shigeru Kakuta) (80345032)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授 (12601)	
研究分担者	前田 真吾 (Shingo Maeda) (80755546)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関