

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06408

研究課題名（和文）イヌ乳腺腫瘍におけるFGFRの発現解析

研究課題名（英文）Expression analysis of FGFR in canine mammary tumor

研究代表者

山本 昌美（Yamamoto, Masami）

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：30530026

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：イヌの正常組織と乳腺腫瘍における線維芽細胞増殖因子受容体（Fibroblast growth factor receptor：FGFR）の発現と腫瘍における機能を検討した。ヒトの様々ながんにおいて発現が報告されているFGFR1-4はヒトで発現が高いとされる臓器組織でイヌにおいても高いRNA発現をしていることが確認され、イヌの乳腺腫瘍細胞株、乳腺腫瘍組織を用いた解析で、発現量が高い細胞株および症例があることがreal-time RT-PCRで確認された。またFGFR1-3は腫瘍の悪性度に、またFGFR4は転移能に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FGFRはヒトにおいてがんの発生母体組織によって、そのサブタイプ1-4の発現量との関連が認められることが報告されている。FGFRはヒト腫瘍に対する新しい分子標的マーカーとしても注目されており、ヒトでの分子標的治療薬として期待されているが、獣医領域ではFGFRの正常ならびに腫瘍での発現量や機能についての報告はほとんどない。本研究によりイヌの正常組織と乳腺腫瘍において各サブタイプのFGFRが発現していることが確認でき、その腫瘍にかかわる機能の一部を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：The expression and function of fibroblast growth factor receptor (FGFR) in normal canine tissues and mammary tumors were investigated. It was confirmed that FGFR1-4, which are reported to be expressed in various human cancers and highly expressed in human organs, also showed high RNA expression in dogs. Using canine mammary tumor cell lines and tumor tissues, it was confirmed by real-time RT-PCR analysis that there are cell lines and cases with high expression levels. Additionally, FGFR1-3 were suggested to be associated with the malignancy of tumors, while FGFR4 was suggested to be involved in metastatic potential.

研究分野：獣医病理学

キーワード：イヌ 乳腺腫瘍 FGFR 乳腺腫瘍細胞株 real-time RT-PCR 免疫組織化学染色

1. 研究開始当初の背景

近年ヒトのがん研究では、乳腺腫瘍を含む様々ながんにおいて線維芽細胞増殖因子受容体 (Fibroblast growth factor receptor : FGFR) の発現が認められること、そしてそのサブタイプ 1-4 とがんの発生源母体組織との間に関連が認められることが報告されている。FGFR はヒト腫瘍に対する新しい分子標的マーカーとしても注目されており、ヒトでの分子標的治療薬として期待されているが、イヌをはじめとする動物の腫瘍組織における発現については解析が進んでいない。イヌでは乳腺腫瘍の発生が多く、複雑な組織像を示すことから詳細な組織分類、腫瘍細胞の由来細胞の同定、またそれに伴って予後を含めた悪性度の評価が困難となる症例も少なくない。

2. 研究の目的

イヌ乳腺腫瘍において各サブタイプの FGFR 発現を検索し、その発現量と悪性度の関連を探ることがこの研究の目的である。この研究によって、FGFR がイヌにおける新しい悪性指標マーカーあるいは分子標的として、診断・治療に新しいツールとなることを期待する。

3. 研究の方法

(1) イヌの正常組織および乳腺腫瘍における FGFR RNA の発現解析

本研究室にて病理解剖に供されたイヌの各種臓器の正常部位から小片を採取し、RNA 保存液に浸漬後冷凍した。また病理検査に供されたイヌ乳腺腫瘍からも、標本作製のためのホルマリン固定前に、一部を RNA 保存液に浸漬したのち冷凍保存した。ホルマリン固定イヌ乳腺腫瘍からパラフィン包埋組織切片を作製し、病理診断をおこなった。それぞれの冷凍保存組織はビーズ式破砕装置による処理後、RNA 抽出をおこない、イヌ FGFR1-4 に対する Taqman Probe を用いた real-time RT-PCR によって発現量を確認した。

(2) イヌ乳腺癌細胞株における FGFR RNA の発現解析

本研究室で維持している 6 種類のイヌ乳腺腫瘍細胞株 6 種類 (CIPp、CTBp、CNMp、CHMp、NV-CML、17-442) およびその転移巣由来細胞株から RNA を抽出し、前項 (1) 同様にイヌ FGFR1-4 に対する Taqman Probe を用いた real-time RT-PCR によってそれぞれの発現量を解析した。さらに癌の性状や悪性度をはかる指標として一般的に知られている各種遺伝子 (上皮細胞接着因子である E-cadherin、E-cadherin を抑制する SNAI1 (Snail)、SNAI2 (Slug)、TWIST2、間葉系マーカーの Vimentin、N-Cadherin、S100A4、幹細胞マーカーである Nestin、Oct4) についての RNA 発現量との関連を解析した。

(3) イヌ乳腺癌細胞株におけるタンパク発現の解析

3 種類のイヌ乳腺細胞株 (CIPp、CNMp、CHMp) とそれぞれの転移巣由来細胞株における FGFR のタンパク発現について検索するために Western Blotting を実施した。解析にもちいる抗体はイヌへの交差が期待される複数の抗ヒト抗体の中から、さらにイヌの臓器に対する免疫染色を実施した結果も参考に選択した抗体を用いた。

(4) イヌ乳腺腫瘍における免疫染色による FGFR 発現解析

イヌの正常組織と乳腺腫瘍組織を用いて、FGFR のタンパク発現量を組織上で確認するために、免疫組織化学的解析をおこなった。HE 組織で正常および過形成、良性腫瘍、悪性腫瘍、さらにその組織型を分類したホルマリン固定イヌ乳腺腫瘍組織の検体をパンチアウトして 150 検体の組織マイクロアレイ (Tissue Microarray : TMA) を作製した。FGFR1-4 の複数種類の抗体を用いて免疫組織化学染色をおこなうとともに、腺上皮と筋上皮の細胞マーカーの発現を解析し、その細胞特性と FGFR 発現量の関係を探した。

4. 研究成果

(1) イヌの正常組織および乳腺腫瘍における FGFR RNA の発現解析

FGFR1-4 での正常組織での RNA 発現は、FGFR1、2 および 3 において脳で最も高い値で確認され、FGFR4 では、結腸と肝臓が高い値を示した。すべての FGFR で骨格筋は低値を示した。

正常組織の RNA 発現量の傾向はおおねヒトの組織で知られている発現と同様であることが明らかとなり、イヌ FGFRs に対する Taqman Probe が発現解析に有効であることが確認された。

各乳腺腫瘍組織においては、腫瘍組織での FGFR1-3 の発現量は腫瘍検体による差は少なく同様の傾向を示したが、FGFR4 の発現量は逆の傾向を示していた。また、我々はこれまで FGFR4 についてマウス細胞株を用いた研究で発現量と転移能が関与することを示しているが、今回の検索において FGFR4 が原発乳腺腫瘍に比べて転移巣において著しく発現量が増加する症例が確認された。

乳腺腫瘍の発現から、FGFR1-3 と FGFR4 では乳腺腫瘍における機能が異なる可能性が示され、また FGFR4 は転移能に関与している可能性が示された。

(2) イヌ乳腺癌細胞株における FGFR RNA の発現解析

各乳腺腫瘍細胞株での RNA 発現解析の結果、FGFR1-3 は、今回扱った細胞株の中で唯一の複合癌由来であり低悪性度を示す 17-442 細胞株が低い値を示していた。FGFR4 はどの細胞株も非常に低い値を示していたが、検索した細胞株の中では 17-442 細胞株が相対的に最も高い値を示した。FGFR1-3 ではいずれの細胞株においても原発腫瘍と転移巣との比較に統一した傾向は確認できず、FGFR4 は細胞株での発現量が少なく、培養細胞の原発腫瘍と転移巣での比較をおこなうことができなかった。FGFR1 および 2 は CIPp 細胞株で高い発現を示していた。この細胞は上皮マーカーの E-cadherin の発現が低く、間葉系マーカーである Vimentin、N-Cadherin、S100A4、幹細胞マーカーである Nestin、E-cadherin を抑制する SNAI、TWIST2 の発現が高い細胞株であった。

FGFR1-3 の発現は比較的低悪性と考えられている複合癌由来の細胞株で発現が低く、また FGFR 1 および 2 は悪性度に関わる遺伝子発現との関連が認められたことから、FGFR と腫瘍の悪性度に関連がある可能性が考えられた。

(1) での乳腺腫瘍組織と乳腺腫瘍培養細胞を比較すると、すべての FGFR において細胞株では乳腺腫瘍組織に比べて発現量が低く、これには乳腺腫瘍組織では腫瘍細胞のみでなく周囲組織が含まれていることの影響が考えられた。

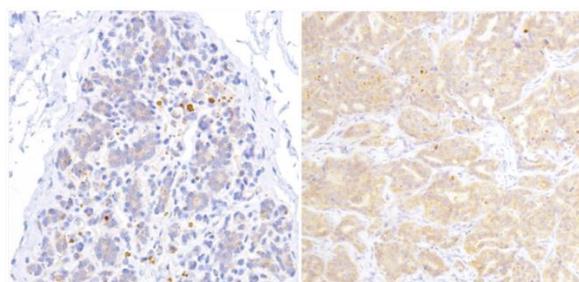
(3) イヌ乳腺癌細胞株におけるタンパク発現の解析

Western Blotting の結果、FGFR1、2、4 では目的の大きさ付近にバンドが確認され、今回用いた抗体がイヌ FGFR に対して交差性を有することが示唆された。FGFR3 に関しては、バンドを確認することができなかった。細胞株ごとの差、原発腫瘍由来または転移巣由来の細胞株間での発現量の違いは FGFR1、2 においては認められなかった。FGFR4 では、1つの転移巣由来細胞株においてその原発および他細胞株に比べて著しく高い発現が確認された。

(4) イヌ乳腺腫瘍における免疫染色による FGFR 発現解析

免疫組織化学染色によってイヌの正常組織と乳腺腫瘍症例組織における FGFR のタンパク発現量を確認したところ、いずれの抗体においても正常乳腺の腺上皮が弱陽性に染色された。

腫瘍においても腺上皮由来腫瘍細胞に陽性像が認められ、陽性率は良性、悪性腫瘍ともにいずれの FGFR においても 70-80%以上の陽性率を示し、悪性度ならびに組織型との間に関連は確認できなかった (図 1)。



正常乳腺 乳腺癌
図 1. FGFR 1 の免疫組織化学染色による発現

今回の研究から、イヌの正常組織および乳腺腫瘍において FGFRs が発現されていることが、遺伝子発現およびタンパク発現の解析によって明らかとなった。FGFR1-3 は腫瘍の悪性度の進展に、また FGFR4 はその中でも転移能の獲得に関与をしている可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Masaki Konnai, Masami Yamamoto, Keiko Ito, Hanae Yamabe, Takuya E. Kishimoto, Hiroshi Aoki, Yukino Machida, Masaki Michishita, Makoto Haritani, Hisashi Yoshimura	4. 巻 201
2. 論文標題 Infective endocarditis with systemic bacterial embolism caused by <i>Staphylococcus aureus</i> in a free-ranging Amami rabbit (<i>Pentalagus furnessi</i>)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Pathology	6. 最初と最後の頁 27-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcpa.2022.12.008	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 Hisashi Yoshimura, Kazushi Torikai, Anna Takahashi, Masaki Michishita, Takuya E Kishimoto, Masami Yamamoto, Makoto Haritani, Kimimasa Takahashi, Shinji Kamiya	4. 巻 201
2. 論文標題 Histological, immunohistochemical and ultrastructural features of polyglucosan bodies in uterine smooth muscle of pet rabbits (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Pathology	6. 最初と最後の頁 23-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcpa.2022.12.009	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 Yukino Machida, Marika Higo, So Doge, Tomokazu Nagashima, Takuya E. Kishimoto, Hisashi Yoshimura, Masami Yamamoto, Kazuki Okada, Naoko Yayoshi, Hitoshi Hatakeyama, Masaki Michishita	4. 巻 197
2. 論文標題 Adenomatous Hyperplasia of Bowman's Capsule Epithelium in a Dog with Metastatic Nasal and Hepatic Neuroendocrine Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Pathology	6. 最初と最後の頁 19-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcpa.2022.06.005	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 Marika Maeda, Kazuhiko Ochiai, Masaki Michishita, Masami Morimatsu, Hiroki Sakai, Nayuta Kinoshita, Motoharu Sakaue, Eri Onozawa, Daigo Azakami, Masami Yamamoto, Katsumi Ishioka, Takuya Sadahira, Masami Watanabe, Yoshikazu Tanaka	4. 巻 47
2. 論文標題 In vitro anticancer effects of alpelisib against PIK3CA-mutated canine hemangiosarcoma cell lines.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology reports	6. 最初と最後の頁 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2022.8295.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hisashi Yoshimura, Maiko Moriya, Ayaka Yoshida, Masami Yamamoto, Yukino Machida, Kazuhiko Ochiai, Masaki Michishita, Takayuki Nakagawa, Yoko Matsuda, Kimimasa Takahashi, Shinji Kamiya, Toshiyuki Ishiwata	4. 巻 58
2. 論文標題 Involvement of Nestin in the Progression of Canine Mammary Carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary pathology	6. 最初と最後の頁 994-1003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/03009858211018656.	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 Sasaki Norihiko, Gomi Fujiya, Yoshimura Hisashi, Yamamoto Masami, Matsuda Yoko, Michishita Masaki, Hatakeyama Hitoshi, Kawano Yoichi, Toyoda Masashi, Korc Murray, Ishiwata Toshiyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 FGFR4 Inhibitor BLU9931 Attenuates Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Invasion While Inducing Senescence: Evidence for Senolytic Therapy Potential in Pancreatic Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2976 ~ 2976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12102976	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Daisuke Fujimori, Jun Kinoshita, Takahisa Yamaguchi, Yusuke Nakamura, Katsuya Gunjigake, Takashi Ohama, Koichi Sato, Masami Yamamoto, Tetsuya Tsukamoto, Sachiyo Nomura, Tetsuo Ohta, Sachio Fushida	4. 巻 20
2. 論文標題 Established fibrous peritoneal metastasis in an immunocompetent mouse model similar to clinical immune microenvironment of gastric cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-07477-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 仲山 孝, 古屋 信二, 高橋 和徳, 山本 淳史, 滝口 光一, 芦沢 直樹, 庄田 勝俊, 中山 裕子, 山本 昌美, 野村 幸世, 塚本 徹哉
2. 発表標題 胃癌腹膜播種形成における血小板の役割
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本佳奈, 渡邊由香, 岸本拓也, 吉村久志, 山本昌美
2. 発表標題 イヌ乳腺複合癌の腺上皮細胞由来培養細胞株の樹立とその特徴付け
3. 学会等名 第31回日本動物看護学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉村 久志, 山本 昌美, 岸本 拓也, 町田 雪乃, 道下 正貴, 落合 和彦, 中川 貴之, 松田 陽子, 高橋 公正, 石渡 俊行
2. 発表標題 犬の乳腺腫瘍におけるnestinの発現と悪性挙動への関与
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本昌美、野村幸世、立松正衛、塚本徹哉
2. 発表標題 マウス胃癌細胞株の樹立とそのFGFR4発現の解析
3. 学会等名 第2回ニチジュウシンポジウム2020
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤瑠惟、渡邊由香、吉村久志、山本昌美、播谷亮、中川貴之、松田陽子、石渡俊行、神谷新司
2. 発表標題 イヌの乳腺癌細胞における長鎖non-coding RNA H19の発現
3. 学会等名 第7回日本獣医病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------