

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15991

研究課題名（和文）ミニチュア・ダックスフンドに好発する非再生性貧血の病態解明

研究課題名（英文）Pathophysiology of non-regenerative anemia in miniature dachshunds

研究代表者

森下 啓太郎（Morishita, Keitaro）

北海道大学・獣医学研究院・助教

研究者番号：30637046

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）：本邦のミニチュア・ダックスフンドには、原因不明の非再生性貧血が好発する。本研究では脾臓摘出によって造血能が劇的に回復するという知見を基に、罹患犬脾臓および脾摘前後の血清を用いたマルチオミクス解析を行った。脾臓では1,385の発現変動遺伝子が検出され、S100A12、S100A8、S100A9など707遺伝子の発現上昇が明らかとなった。免疫組織化学により、罹患犬脾臓ではS100A8/A9蛋白質の発現量が有意に高いことが確認された。血清プロテオーム解析では22種の蛋白質発現に有意差が認められ、脾摘前のレクチン経路を主とした補体活性化が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、罹患犬脾臓におけるS100A8/A9蛋白質の発現増加が補体レクチン経路を活性化し、赤芽球系細胞のオプソニン化によって非再生性貧血を発症するという新たな仮説が導かれた。本疾患の病態を分子レベルで検証した報告は限られており、研究成果は補体関連疾患という既知の理解とは異なる疾患概念の可能性を示した。市場には補体関連疾患に対する種々の補体標的薬が販売されていることから、本研究の成果が病態解明の足掛かりとなり、補体標的薬による新たな治療戦略の開発につながり得る。

研究成果の概要（英文）：Miniature dachshunds are known to be predisposed to non-regenerative anemia. Based on the finding that splenectomy dramatically restores hematopoiesis, we performed a multi-omics analysis using the spleen and serum samples from affected dogs. We identified a total of 1,385 differentially expression genes between spleen samples from normal dogs and affected dogs. Of these, 707 genes were upregulated, including S100A12, S100A8, and S100A9. Immunohistochemistry confirmed significantly higher expression of S100A8/A9 in the spleen of affected dogs. A total of 22 proteins were differentially expressed between the pre- and post-splenectomy serum samples. The reactome pathways “Lectin pathway of complement activation” were over-represented in our list of pathways upregulated before splenectomy.

研究分野：血液内科

キーワード：非再生性貧血 ミニチュア・ダックスフンド 脾臓 補体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

犬は原因不明の非再生性貧血を発症することが知られている。罹患犬は重度の非再生性貧血を呈するが、骨髄中の赤芽球系細胞は過形成を示す。すなわち、骨髄中で盛んな造血が誘発されているにもかかわらず、成熟赤血球の産生に至らない「無効造血」の状態にある。免疫抑制療法によって一定の効果が得られることから、本疾患は骨髄中の赤芽球系細胞に対する自己免疫反応が原因とされ、非再生性免疫介在性貧血(Nonregenerative immune-mediated anemia: NRIMA)あるいは、Precursor cell-targeted immune-mediated anemia(PIMA)と呼称されているが、その病態を分子レベルで検証した報告はない。

本邦では近年、NRIMA/PIMA に罹患したミニチュア・ダックスフンドの症例報告が蓄積している。申請者らは、内科療法が無効であったミニチュア・ダックスフンドの多くが、脾臓摘出術後に造血能の顕著な亢進および貧血の改善を認めることを見出した。

2. 研究の目的

研究は、免疫抑制治療が有効ではないミニチュア・ダックスフンドの非再生性貧血が、脾臓摘出によって改善するという事象を足がかりに、ミニチュア・ダックスフンドに好発する非再生性貧血が、脾臓における TGF- β 過剰産生、または骨髄における TGF- β シグナル異常に起因する造血障害であるという仮説のもと、病態と発症機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脾臓における TGF- β 過剰産生の有無を解析

脾摘によって造血能が回復した有効群(8頭)、脾摘後も貧血が持続した無効群(3頭)に分け、脾臓における TGF- β およびそのシグナル伝達関連分子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法によって定量し、健常犬(対照群4頭)と比較した。罹患犬の脾臓パラフィン包埋切片を用いて TGF- β に対する免疫組織化学を実施し、発現量の評価および発現細胞の同定を行った。

(2) 罹患犬脾臓のトランスクリプトーム解析および免疫組織化学

罹患犬 15 頭と健常犬 3 頭の脾臓サンプルを用いてトランスクリプトーム解析を実施し、両群間の発現変動遺伝子(differentially expressed genes, DEGs)を同定した。上位 300 の DEGs について、pathway 解析を実施した。赤血球造血と関連する *S100A8/A9* については、罹患犬 21 頭の脾臓パラフィン包埋切片を用いてタンパク質発現量および局在を検討し、健常犬 3 頭と比較した。

(3) 脾摘前後での血清蛋白質の変化

脾臓摘出術によって輸血依存性が改善した 4 症例に関して、脾摘前後の血清を対象に SWATH-MS 法による網羅的蛋白質解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 脾臓における TGF- β 過剰産生の有無

脾臓摘出術を受けた症例の脾臓における TGF- β mRNA の発現レベルを図 1 に示した。脾摘有効群では脾臓での TGF- β mRNA 発現量が高い傾向にあったが、対照群を含めた 3 群比較では、有効群と無効群の TGF- β mRNA 発現量に統計学的有意差は認められなかった ($p = 0.059$)。

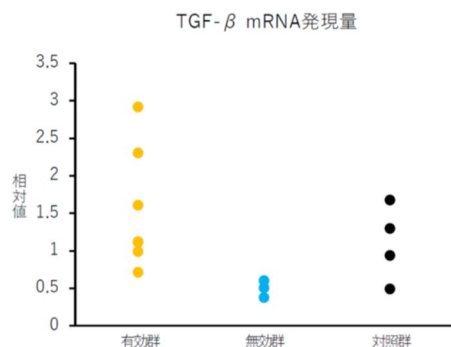


図 1 脾臓における TGF- β mRNA 発現量比較

脾臓における TGF- β シグナル伝達関連分子の mRNA 発現レベルを図 2 に示した。有効群では、T R , T R , SMAD2, SMAD3 について対照群に比べ mRNA 発現が増加しており、一方で SMAD7 は発現低下が認められた。しかし有効群の全頭で一貫した結果が得られず、摘出した脾臓を対象とした免疫組織化学では TGF- β 発現を観察することはできなかった。

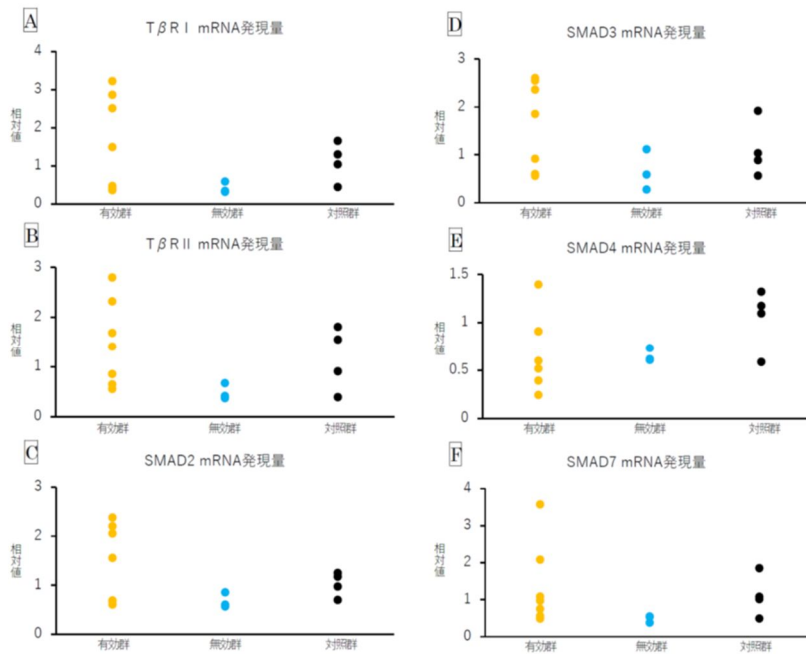


図2 脾臓におけるTGF-βシグナル伝達分子の mRNA発現量比較

(2) 罹患犬脾臓のトランスクリプトーム解析および免疫組織化学

トランスクリプトーム解析の結果、脾臓から 15,903 遺伝子が検出され、罹患犬と健常犬では 1,385 の DEGs を認めた。発現上昇が認められた top 10 DEGs のうち、赤血球造血と関連するダメージ関連パターン分子である S100A8/A9 について免疫組織化学を実施したところ、罹患犬脾臓の赤脾髄に多くの陽性細胞が観察され (図 3)、陽性細胞数は健常犬に比べ有意に増加していた ($p = 0.0412$)。

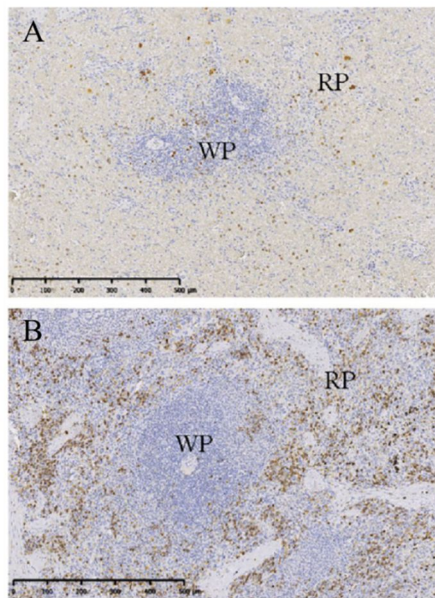


図3. 脾臓のS100A8/9に対する免疫組織化学
(A) 健常犬 (B) 罹患犬

(3) 脾摘前後での血清蛋白質の変化

脾臓摘出術によって輸血依存性が改善した 4 症例に関して、脾摘前後の血清を対象に SWATH-MS 法による網羅的蛋白質解析を実施した。同一個体のサンプル間で 22 種の蛋白質発現に有意差が認められ、Pathway 解析の結果、脾摘前のレクチン経路を主とした補体系の活性化が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugawara-Suda Mei, Morishita Keitaro, Ichii Osamu, Namba Takashi, Aoshima Keisuke, Kagawa Yumiko, Kim Sangho, Hosoya Kenji, Yokoyama Nozomu, Sasaki Noboru, Nakamura Kensuke, Yamazaki Jumpei, Takiguchi Mitsuyoshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Transcriptome and proteome analysis of dogs with precursor targeted immune-mediated anemia treated with splenectomy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0285415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0285415	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 Sugawara-Suda Mei, Morishita Keitaro, Iwanaga Yuto, Yamazaki Jumpei, Kagawa Yumiko, Yokoyama Nozomu, Sasaki Noboru, Ohta Hiroshi, Nakamura Kensuke, Takiguchi Mitsuyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Investigation of the therapeutic effects, predictors, and complications of long-term immunosuppressive therapy in dogs with precursor-targeted immune-mediated anemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 -
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 菅原 芽伊, 山崎 淳平, 森下 啓太郎, 金 尚昊, 細谷 謙次, 佐々木 東, 中村 健介, 滝口 満喜
2. 発表標題 非再生性免疫介在性貧血の犬における脾臓摘出術前後の血清中蛋白の網羅的解析
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 菅原芽伊, 森下啓太郎, 今井健友, 山崎淳平, 佐々木東, 大田寛, 細谷謙次, 滝口満喜
2. 発表標題 非再生性貧血のミニチュア・ダックスフンド11例に対する脾臓摘出術の治療成績
3. 学会等名 第16回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sugawara-Suda M, Yamazaki J, Morishita K, Imai K, Kim S, Hosoya K, Sasaki N, Nakamura K, Takiguchi M.
2. 発表標題 Comprehensive protein and gene expression analysis of spleen from dogs with non-regenerative immune-mediated anemia.
3. 学会等名 2022 American College of Veterinary Internal Medicine Forum (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------