

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06429

研究課題名(和文) 犬の腫瘍における抗酸化酵素ペルオキシレドキシンの役割の解明

研究課題名(英文) Study on the role of the antioxidant enzyme peroxiredoxin in canine tumors.

研究代表者

酒井 洋樹 (Sakai, Hiroki)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：40283288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：犬の正常組織でのPRDX1および2の発現は他の動物種と同様であった。犬の扁平上皮癌では、予後が悪い口腔扁平上皮癌において、皮膚扁平上皮癌よりPRDX1の陽性スコアが高く、口腔扁平上皮癌においてPRDX1、その悪性動態に関与している可能性が考えられた。正常なリンパ節では陰性を示すPRDX1が、T細胞性リンパ腫で陽性であったことから、PRDX1免疫染色はリンパ節の過形成とリンパ腫を鑑別しうる可能性を見出した。悪性の血管肉腫で、PRDX1および2の陽性スコアが顕著に高く、犬の血管肉腫細胞株での、PRDX1の発現抑制により、PRDX1は犬の血管肉腫細胞の細胞増殖亢進に関与する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、これまで報告のなかった犬の正常組織および腫瘍におけるPRDX1および2の発現についての免疫組織学的特徴を明らかにした。さらに扁平上皮癌、T細胞性リンパ腫、血管肉腫をはじめとした、いくつかの腫瘍では、腫瘍におけるPRDXの発現亢進の、腫瘍化や悪性化への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The expression of PRDX1 and 2 in normal tissues of dogs was similar to that in other animal species. In canine squamous cell carcinoma, the positive score of PRDX1 was higher in oral squamous cell carcinoma with poor prognosis than in cutaneous squamous cell carcinoma, suggesting that PRDX1 may be involved in the malignant dynamics in oral squamous cell carcinoma. PRDX1 immunostaining may differentiate lymph node hyperplasia from lymphoma, as PRDX1 is negative in normal lymph nodes but positive in T-cell lymphomas. The positive scores of PRDX1 and PRDX2 were significantly higher in malignant hemangiosarcomas, and the suppression of PRDX1 expression in canine hemangiosarcoma cell lines suggests that PRDX1 may be involved in the increased cell proliferation of canine hemangiosarcoma cells.

研究分野：獣医病理学

キーワード：ペルオキシレドキシシ 犬 腫瘍

1. 研究開始当初の背景

Peroxiredoxin (PRDX) は6つのアイソフォーム (PRDX1-6) を有する抗酸化酵素群である。PRDXの主な機能は、活性酸素種の一つである H_2O_2 の水への還元であるが、この機能のみならず、様々なタンパク質の酸化還元状態を調節することで、シグナル伝達経路を制御 (レドックス制御) することも知られており、ヒトの様々な腫瘍で PRDX の発現の異常が見られ、PRDX の発現の変化によるレドックス制御の異常と腫瘍発生や悪性化などとの関連が明らかとなりつつある。一方、犬の腫瘍における PRDX の発現に関する研究はほとんどなく、さらに正常な組織における PRDX の発現に関する情報も非常に乏しいのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、犬の腫瘍における PRDX の発現の基礎的情報を得るために、犬の正常組織と各種の腫瘍における PRDX1 および2の発現を免疫組織化学的に検索した。さらに、犬の血管肉腫においては免疫組織化学的検索に加えて、犬の血管肉腫細胞株を用いて、PRDX1 の発現の意義を検索した。

3. 研究の方法

まず、ほとんど情報のない犬の正常組織と代表的な自然発生腫瘍における PRDX1 および2の発現を、免疫組織化学的に検索した。続いて、犬では、比較的多く発生し、悪性化すると致死率も高い血管内皮性腫瘍における PRDX1 および2の発現を免疫組織化学的に検索し、さらに犬の血管肉腫における PRDX1 の役割を解析するため、犬の血管肉腫から樹立された細胞株を用いて、PRDX1 の発現の検索および PRDX1 発現のノックダウン実験を実施した。

4. 研究成果

Figure 1 および2に PRDX1 または2の免疫染色像を示した。

正常な皮膚では、表皮の扁平上皮細胞や毛包、皮脂腺およびアポクリン汗腺などの上皮細胞で、PRDX1 および2が強陽性を示した。乳腺では、活性化あるいは休止状態にかかわらず、管腔上皮細胞は PRDX1 陽性かつ PRDX2 陰性であった。腎臓では尿細管上皮が、また肝臓では肝細胞および胆管上皮細胞が PRDX1 および2に陽性を示したが、膀胱移行上皮細胞は、PRDX1 が強陽性、PRDX2 は陰性であった。PRDX1 は様々な上皮細胞で陽性であったが、PRDX2 は陰性のものみみられた。非上皮細胞においては、血管内皮細胞は PRDX1 および2のいずれにも陰性で、脾臓においては、PRDX1 はリンパ球や赤芽球を含む赤血球系細胞で陽性、PRDX2 は赤血球系細胞のみで陽性を示した。今回の犬の正常組織における PRDX1 および2の発現性は、これまでのヒトやげっ歯類の正常組織における PRDX の発現の報告とおおむね一致していた。哺乳類では PRDX のアミノ酸配列の相同性が高いことや、PRDX1 および2の局在性が哺乳類間で比較的共通していることを考慮すると、PRDX1 および2は、哺乳類では同様の機能を発揮していると考えられた。

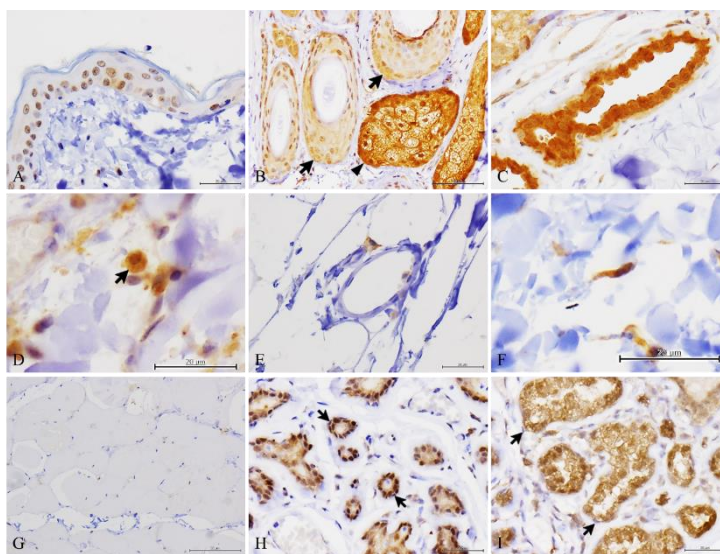


Figure 1 Immunohistochemistry of PRDX1 in normal tissues.

(A) Squamous cells in the epidermis. (B) Squamous cells of hair follicles (arrows) and sebaceous glands (arrowhead). (C) Apocrine sweat glands. (D) Macrophages in the dermis. (E) Blood vessels in the subcutaneous tissue. (F) Fibroblasts in the dermis. (G) Striated cutaneous muscle. (H) Mammary gland tissues in resting period. (I) Mammary gland tissues in lactation period.

今回の犬の正常組織における PRDX1 および2の発現性は、これまでのヒトやげっ歯類の正常組織における PRDX の発現の報告とおおむね一致していた。哺乳類では PRDX のアミノ酸配列の相同性が高いことや、PRDX1 および2の局在性が哺乳類間で比較的共通していることを考慮すると、PRDX1 および2は、哺乳類では同様の機能を発揮していると考えられた。

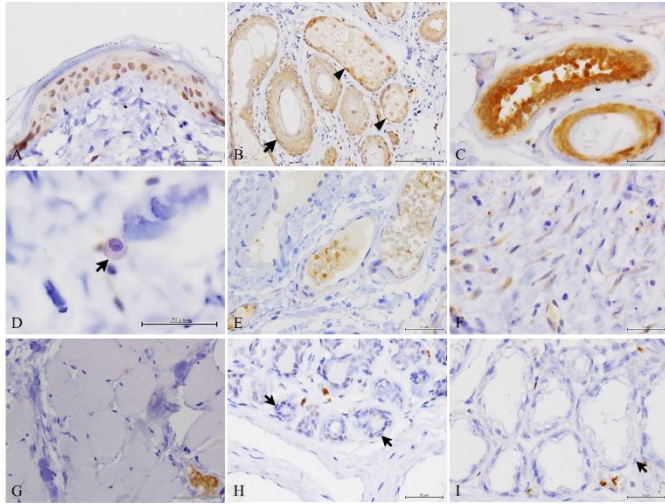


Figure 2. Immunohistochemistry of PRDX2 in normal tissues. (A) Squamous cells in the epidermis. (B) Squamous cells of hair follicles (arrow) and sebaceous glands. (C) Apocrine sweat glands. (D) Macrophages in the dermis. (E) Microvessels in the dermis. (F) Fibroblasts in the dermis. (G) Striated cutaneous muscle. (H) Mammary gland tissues in resting period. (I) Mammary gland tissues in lactation period. Myoepithelial cells were negative for PRDX2 (arrow). Bar, 20 μ m.

疫染色はリンパ節の傍皮質領域の過形成とリンパ腫の鑑別に有用である可能性が見出された

犬の代表的な自然発生腫瘍における PRDX1 および 2 の発現を検索した結果、毛包性腫瘍や扁平上皮癌、乳腺腫瘍、移行上皮癌などの上皮細胞由来の腫瘍では、腫瘍細胞が PRDX1 および 2 に強陽性を示した。扁平上皮癌では、転移しやすく予後が悪い口腔原発の扁平上皮癌において、皮膚原発の扁平上皮癌と比較して PRDX1 の陽性スコアが有意に高かったことより、口腔扁平上皮癌における PRDX1 の発現亢進は、その悪性動態に関与している可能性が考えられた (Figure 3)。また、リンパ腫、肥満細胞腫、皮膚形質細胞腫および犬皮膚組織球腫では、PRDX1 に陽性を、PRDX2 には陰性を示すものが多かった。この中で、T 細胞性リンパ腫は PRDX1 が陽性であった。しかし、正常なリンパ節の T 細胞が優勢な傍皮質領域では PRDX1 が陰性であったことから、PRDX1 の免

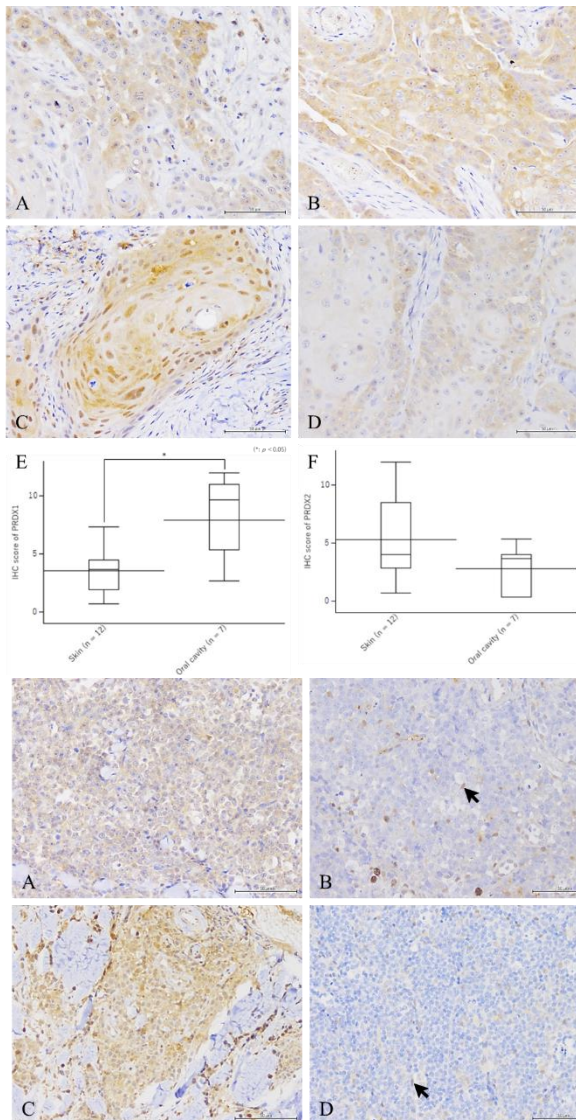


Figure 3. Immunohistochemistry of PRDX1 and 2 in squamous cell carcinoma.

(A) Cutaneous squamous cell carcinoma. The IHC score of this sample was 3.33. (B) Cutaneous squamous cell carcinoma. The IHC score of this sample was 4.67. (C) Oral squamous cell carcinoma. The IHC score of this sample was 9.67. Bar, 50 μ m. (D) Oral squamous cell carcinoma. The IHC score of this sample was 2.33. Bar, 50 μ m. (E) The box-and-whisker plot of PRDX1 IHC scores of squamous cell carcinomas between the skin and oral cavity. There was significant difference of IHC score of PRDX1 between cutaneous and oral squamous cell carcinomas ($p < 0.05$). (F) The box-and-whisker plot of PRDX2 IHC scores of squamous cell carcinomas between the skin and oral cavity. There was no significant difference of IHC score of PRDX2 between cutaneous and oral squamous cell carcinomas.

Figure 4. Immunohistochemistry of PRDX1 and 2 in lymphomas.

(A) B-cell lymphoma in the lymph node. Lymphoma cells were weakly positive for PRDX1. The IHC score of PRDX1 in this sample was 4.33. Bar, 50 μ m. (B) B-cell lymphoma in lymph node. The nuclei of reticular cells in the lymph node showed weakly positive for PRDX2 (arrow). Neoplastic cells were negative for PRDX2. The IHC score of PRDX2 in this sample was 0.00. Bar, 50 μ m. (C) T-cell lymphoma in the lymph node. The nuclei and cytoplasm of neoplastic cells were positive for PRDX1. The IHC score of PRDX1 in this sample was 5.33. Bar, 50 μ m. (D) T-cell lymphoma in the lymph node. The nuclei of reticular cells showed weakly positive for PRDX2 (arrow). Neoplastic cells were negative for PRDX2. The IHC score of PRDX2 in this sample was 0.00. Bar, 50 μ m.

(Figure 4)。さらに肥満細胞腫では、Gradeが高いものでPRDX2の陽性スコアが高く、悪性度へのPRDX2の関与が疑われた。以上より、様々な犬の腫瘍においてPRDX1および2の陽性像が認められたが、PRDX1およびPRDX2は、それぞれ扁平上皮癌とT細胞性リンパ腫および肥満細胞腫の腫瘍化や悪性化に関与している可能性が示唆された。

犬の血管内皮性腫瘍におけるPRDX1および2の発現を免疫組織化学的に検索した、良性の海綿状血管腫と比較して、悪性の血管肉腫において、PRDX1および2の陽性スコアが顕著に高いことが明らかになった(Figure 5)。

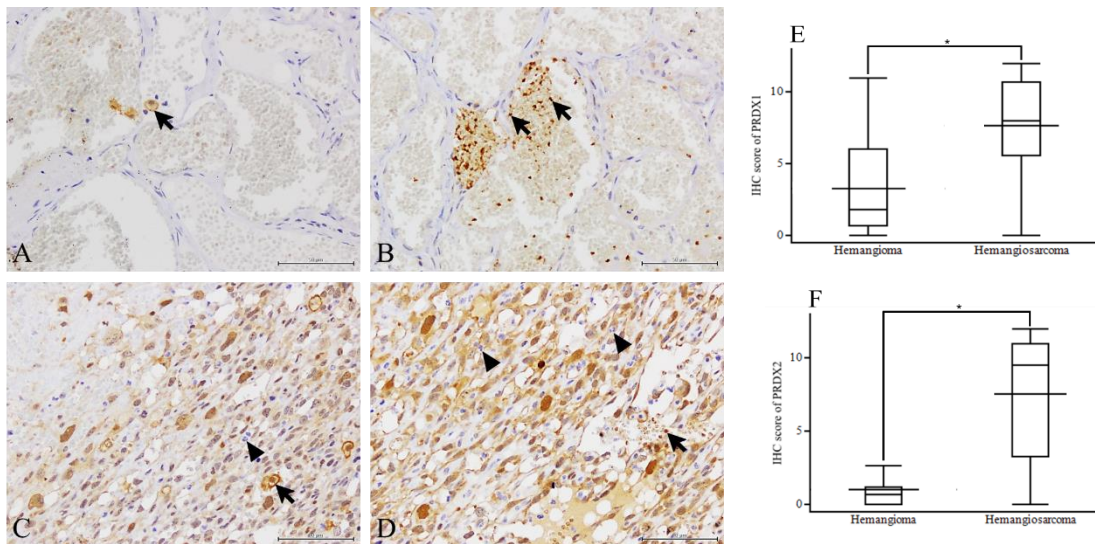


Figure 5. Immunohistochemistry of PRDX1 and 2 in canine hemangioma (HA) and hemangiosarcoma (HSA) tissues.

(A) Immunohistochemical (IHC) staining image for PRDX1 expression in canine HA. HA cells were negative for PRDX1. IHC score of this sample is 0.00. Bar, 50 μ m. (B) IHC staining image for PRDX2 in canine HA. HA cells were negative for PRDX2. IHC score of this sample is 0.00. Bar, 50 μ m. (C) IHC staining image for PRDX1 in canine HSA. HSA cells were positive for PRDX1 (arrows). IHC score of this sample is 12.00. Bar, 50 μ m. (D) IHC staining image for PRDX2 in canine HSA. HSA cells were positive for PRDX2 (arrow). IHC score of this sample is 12.00. Bar, 50 μ m. (E) The box-and-whisker plot of IHC scores of PRDX1 in canine HA and HSA. IHC score of PRDX1 in HSA was significantly higher than that in HA. Bar crossing the box-and-whisker plot expresses the sample average. (F) The box-and-whisker plot of IHC scores of PRDX2 in canine HA and HSA. IHC score of PRDX2 in HSA was significantly higher than that in HA. Bar crossing the box-and-whisker plot expresses the sample average (* $p < 0.05$).

血管肉腫において、その組織型および発生部位間で、それらの陽性所見に有意差はなく、PRDX1および2は、組織型や発生部位に依存せず、血管肉腫に普遍的に陽性を示していることが明らかとなった(Figure 6)。

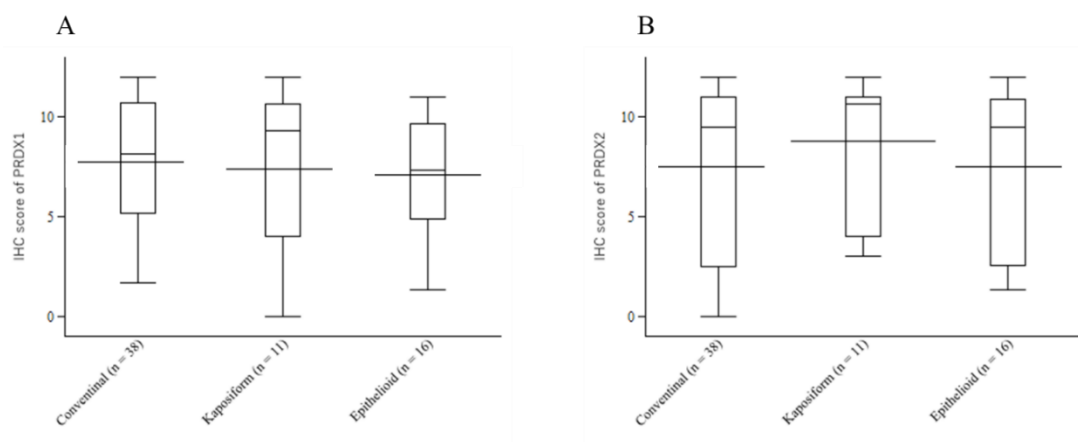


Figure 6. The comparison of IHC scores of PRDX1 and 2 in histopathological subtypes of canine hemangiosarcoma (HSA).

(A) The box-and-whisker plot of the immunohistochemical (IHC) scores of PRDX1 in each histopathological subtypes of canine HSA. There were no significant differences in the expressions of PRDX1 among three subtypes of HSA. (B) The box-and-whisker plot of IHC scores of PRDX2 in each histopathological subtypes of canine HSA. There were no significant differences in the expressions of PRDX2 among three subtypes. Bar crossing the box-and-whisker plot expresses the sample average.

犬の血管肉腫から樹立された細胞株を用いて、PRDX1 のノックダウン実験を実施したところ (Figure 7), 血管肉腫細胞の cell viability が低下した。しかし、細胞の形態は変化せず、死滅細胞の増加もみられなかった。よって、PRDX1 のノックダウンにより、細胞増殖の遅延が生じた可能性が示唆され、PRDX1 は犬の血管肉腫細胞の細胞増殖の亢進に關与する可能性が考えられた。

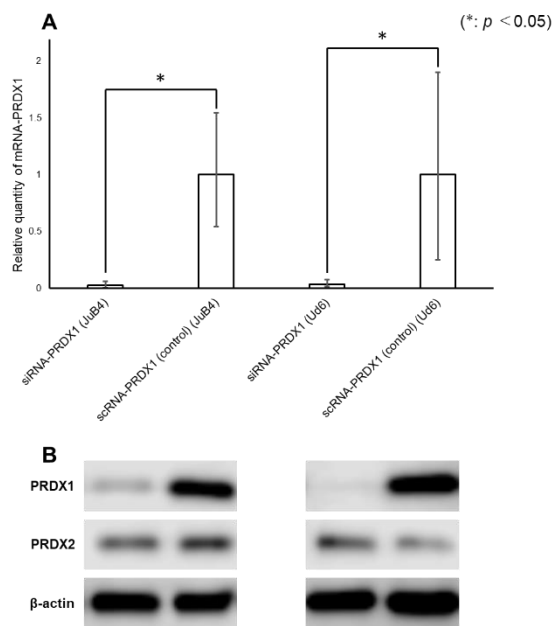


Figure 7. Analysis of PRDX1 and 2 expressions by real time reverse transcriptase-PCR and western blotting in PRDX1-knockdown experiment with the hemangiosarcoma cells (JuB4 and Ud6) added siRNA-PRDX1 (20 nM) or scRNA-PRDX1 (20 nM).

(A) The relative expression of PRDX1 mRNA in JuB4 and Ud6 cell lines added siRNA-PRDX1 or scRNA-PRDX1. The expression level of PRDX1 mRNA in the hemangiosarcoma cell lines added siRNA-PRDX1 was lower than those in the cell lines added scRNA-PRDX1 ($p < 0.05$). (B) The protein expression of PRDX1, PRDX2 and β -actin proteins in JuB4 and Ud6 cell lines added siRNA-PRDX1 or scRNA-PRDX1. The protein expression of PRDX1 in hemangiosarcoma cell lines added siRNA-PRDX1 was decrease in comparison to that in cell lines added scRNA-PRDX1. However, there was no change of the PRDX2 protein expression in cell lines added siRNA-PRDX1 and scRNA-PRDX1.

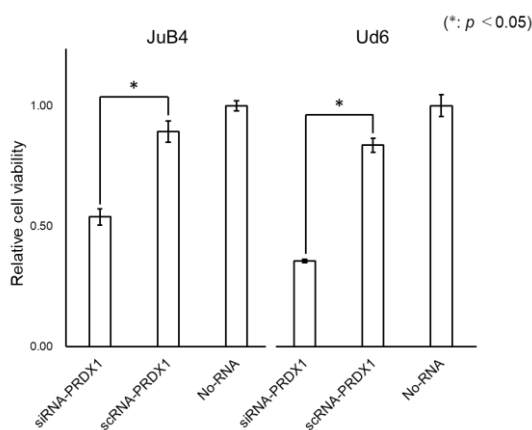


Figure 8. The cell viability of canine hemangiosarcoma cell lines (JuB4 and Ud6) added siRNA-PRDX1 or scRNA-PRDX1.

The absorbances of samples added each RNA-PRDX1 were normalized by the absorbance of sample added medium instead of RNA-PRDX1 (No-RNA). The relative cell viability of siRNA-PRDX1 (JuB4) and scRNA-PRDX1 (JuB4) were 0.539 (SD \pm 0.0338) and 0.893 (SD \pm 0.0443). The relative cell viability of siRNA-PRDX1 (Ud6) and scRNA-PRDX1 (Ud6) were 0.355 (SD \pm 0.00746) and 0.836 (SD \pm 0.0298). The cell viability of siRNA-PRDX1 cell lines was lower than that of scRNA-PRDX1 cell lines ($p < 0.05$).

以上より、本研究において、これまで報告のなかった犬の正常組織および腫瘍における PRDX1 および 2 の発現についての免疫組織学的特徴を明らかにした。さらに血管肉腫をはじめとした、いくつかの腫瘍では、腫瘍における PRDX の発現亢進の、腫瘍化や悪性化への関与が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Narumi Otsuka, Kairi Ishimaru, Mami Murakami, Minami Goto, Akihiro Hirata and Hiroki Sakai	4. 巻 -
2. 論文標題 The immunohistochemical detection of peroxiredoxin 1 and 2 in canine spontaneous vascular endothelial tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The 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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大塚成己, 石丸海里, 後藤みなみ, 村上麻美, 平田暁大, 酒井洋樹
2. 発表標題 犬の血管内皮腫瘍におけるPeroxi redoxin 1 および 2 の発現
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術大会（Web）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Narumi Otsuka, Kairi Ishimaru, Mami Murakami, Minami Goto, Akihiro Hirata and Hiroki Sakai
2. 発表標題 Immunohistochemical detection of peroxiredoxin 1 and 2 in canine vascular endothelial tumors
3. 学会等名 The 6th international symposium, association of Japan-Indonesia veterinary education 2022（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
研究分担者	村上 麻美 (Murakami Mami) (30597125)	岐阜大学・応用生物科学部・助教 (13701)	

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