

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660236

研究課題名(和文) 組織マイクロアレイを用いたイヌの腫瘍診断における新規マーカーの探索

研究課題名(英文) Research for novel canine tumor markers using tissue microarray

研究代表者

チェンバース ジェームズ (Chambers, James)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：00621682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：イヌの全身諸臓器の組織マイクロアレイを用いて、正常組織における蛋白質の発現程度および分布を調べた。その結果を応用して組織球系腫瘍と消化管ポリープを含む複数の腫瘍の診断マーカーを同定した。組織球性腫瘍については、CD204およびCD163が病理診断に有用であることを確認し、また発生部位によって発現程度が異なることが分かった。消化管ポリープについては、ミニチュアダックスフンドとジャックラッセルテリアの病変を検索した。初期病変ではCK20陽性で分化度の高い上皮細胞が増殖するが、進行した病変ではCK20陰性、 β -catenin核内陽性を示す異型上皮を認め悪性転化が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Protein expression in normal canine tissues were examined by using tissue microarray. We next searched for diagnostic markers of various tumors including histiocytic tumors and intestinal polyps. For histiocytic tumors, CD204 and CD163 were found to be reliable diagnostic markers, furthermore expression levels of these markers differed among the site of occurrence of the tumor. In respect of intestinal polyps, we investigated intestinal polyps of Miniature Dachshunds and Jack Russel Terriers. In the early stage, highly differentiated epithelial cells expressed CD20; in the late stage, foci of atypical epithelial cells were negative for CD20 and the nucleus of these cells were positive for β -catenin. These results suggests malignant transformation in canine intestinal polyps.

研究分野：獣医病理学

キーワード：獣医学 組織マイクロアレイ イヌ 腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

獣医臨床において消化管内視鏡やツルーカーカットのような小さな生検材料での腫瘍診断が求められている。一方で、動物における腫瘍発生を解析し、臨床予後に基づく腫瘍分類を作製する上で以下の課題がある。

(1) イヌの正常組織における蛋白質の発現分布やアミノ酸配列がヒトと異なるため、ヒトの腫瘍分子マーカーをイヌの腫瘍に対して直接外挿できない場合がある。近年、イヌやネコの全ゲノム情報が公開されたが、蛋白質発現分布に関する情報については乏しいのが現状であり、動物の腫瘍研究および診断の障害となっている。

(2) 動物の腫瘍分類は、主にイヌやネコの臨床現場で求められるが、経済的理由から低コストで客観的に分類できるマーカーが必要である。日常の診断に使用可能で、国際的にコンセンサスの得られるマーカーとしては、市販抗体を用いることが望ましいにもかかわらず、市販抗体と動物組織との反応に関する情報が少ない。

2. 研究の目的

本研究では、上記の課題を解決する手段として、組織マイクロアレイを用いた網羅的な腫瘍マーカー探索を行う。イヌを対象動物として、全身諸臓器の蛋白質発現分布を調べた上で、日常的な腫瘍診断に応用可能なマーカーを新規同定する。本研究手法により、小さな組織材料における客観的な評価マーカーを探索することで、生検材料での客観的な病理診断を可能にすることが目的である。

具体的には、イヌの組織球系腫瘍、消化管ポリープ、腎細胞癌を主なターゲットとした。これらの腫瘍は、イヌでの発生頻度が高く、腫瘍細胞の起源が不明であるため、腫瘍分類および悪性度評価に有用なマーカーが強く求められている。また、その他の腫瘍についても、並行して新規マーカーを探索した。本研究の成果をもとに、動物腫瘍分類の新しいスタンダードを日本から発信することが発展的な目標である。

3. 研究の方法

(1) 正常イヌ組織における蛋白質発現分布
イヌの全身諸臓器(心臓、肺、脾臓、舌、食道、胃、小腸、大腸、肝臓、膵臓、副腎、甲状腺、乳腺、皮膚、生殖腺、中枢神経組織、末梢神経組織)を含む組織マイクロアレイを用いて蛋白質の発現分布を免疫組織化学的に解析した。

(2) 腫瘍診断マーカーの探索

(1) で得られた結果をもとに、特定の組織・細胞に発現する蛋白質を指標として、イヌの腫瘍組織の分化方向および臨床予後を評価するマーカーを探索するとともに、腫瘍の病理発生について解析した。具体的な対象と方法を以下に示す。

組織球系腫瘍：イヌの髄膜および関節に発生

した組織球性肉腫について免疫組織化学的に検索した。加えて、髄膜の組織球性肉腫および関節の組織球性肉腫の培養細胞株を樹立し、それぞれの蛋白質発現を免疫染色、ウェスタンブロッティング、PCR で評価した。また、フェレットの組織球性肉腫についても同様に検索した。

消化管ポリープ：ミニチュアダックスフントおよびジャックラッセルテリアの消化管に発生したポリープについて、内視鏡ポリペクトミーにて採取したサンプルを用いて免疫組織化学的に検索した。

腎細胞癌：イヌの腎細胞癌について免疫組織化学的に検索した。

その他の腫瘍：イヌの胸腺腫、イヌおよびネコのメルケル細胞癌について免疫組織化学的に検索した。

4. 研究成果

(1) 組織球系腫瘍

従来のマーカー(HLA-DR、Iba-1等)に加えてCD204およびCD163がイヌの組織球腫瘍のマーカーとして有用であることを確認した。また、髄膜に発生する組織球性肉腫と関節に発生する組織球性肉腫とではCD204の発現程度が異なり、これらの腫瘍細胞が異なる特徴を有することが免疫組織化学的に示された。これについては、さらに髄膜の組織球性肉腫(PWC-HS01)および関節の組織球性肉腫(FCR-HS02)の細胞株を樹立したうえで、RT-PCRおよびウェスタンブロッティングにより、CD204の発現程度が髄膜の組織球性肉腫の方が関節の組織球性肉腫よりも有意に高いことを細胞レベルで確認した。また、イヌの髄膜に発生する組織球性肉腫については、樹状細胞とマクロファージの両方のフェノタイプを示すことが分かった。これについては結果の解釈が難しく、今後さらに解析する必要がある。組織学的評価の部分については既に論文報告しており、培養細胞を用いた研究結果は現在論文を投稿中。

上記に加えて、フェレットの組織球性肉腫についてもCD163の診断マーカーとしての有用性を確認した。フェレットの組織球性肉腫は脾臓の腫大が特徴的であり、臨床像と合わせて、免疫染色マーカーについて論文報告した。

(2) 消化管ポリープ

ミニチュアダックスフントでは大腸に炎症性ポリープが好発し、初期病変ではcytokeratin 20陽性で分化度の高い上皮細胞が増殖するが、進行した病変では、そのなかに異型上皮の増殖巣が形成されることが分かった。この異型上皮はcytokeratin 20陰性、 β -cateninの核内移行を認めるなど悪性転化を示唆する所見を認めた。また、ミニチュアダックスフントの炎症性ポリープでは、上皮細胞がCOX-2およびFGF-2を発現しており、アラキドン酸カスケードが病態形成に関与していることが示唆された。以上について

は既に論文報告した。

ジャックラッセルテリアは胃から大腸にかけて腺腫性ポリープが発生し、p53、E-cadherin、 β -cateninの染色性が悪性腫瘍（浸潤性）との鑑別に有用であることを明らかにした。以上については、現在論文執筆中。

(3) 腎細胞癌

CD10、TGF β 、E-cadherin、N-cadherinを指標にして腎細胞癌を細分類し、これまでの動物の腫瘍分類には無かった肉腫様を呈する腎細胞癌について解析した。特にCD10は、腎細胞癌の診断に有用であると考えており、症例数を増やして検討する予定である。

(4) 胸腺腫瘍

イヌの胸腺腫瘍の診断マーカーとしてp63の有用性を確認した。さらに、cytokeratin 5/6、cytokeratin 19に対する抗体を用いることで、正常および腫瘍性の胸腺組織における上皮細胞の種類（皮質、髄質）を区別することができた。現在、イヌの胸腺腫瘍の分類は形態学的評価に依存しているが、上記のマーカーを用いることにより、より客観的な分類が可能になると考えている。上記マーカーの有用性については既に論文報告した。

(5) メルケル細胞腫瘍

イヌおよびネコの皮膚における正常なメルケル細胞の蛋白質発現を明らかにし、cytokeratin 18、cytokeratin 20、p63がメルケル細胞癌の診断マーカーとして有用であることを確認した。イヌとネコのメルケル細胞癌の培養細胞株を継代し、培養細胞での発現も確認した。ネコのメルケル細胞癌マーカーについては既に論文報告した。

まとめ

これまで獣医学領域では研究に応用されていなかった組織マイクロアレイを用いることによって、150種類の蛋白質の発現分布をイヌの正常組織で確認し、その中から複数の腫瘍関連マーカーを新規に同定した。特に消化管ポリープについては、内視鏡で採取した限られた組織サンプルを用いて、悪性転化を示唆する指標が得られたので、本指標と臨床予後の関連性について解析を進めている。組織球性腫瘍については、国内のウェルシュコーギーペンブローク犬で発生が多い髄膜の組織球性肉腫においてCD204の発現が高いことを明らかにした。CD204発現の意義については、本犬種の遺伝的背景とあわせて検討していく必要があると考えている。また、胸腺腫瘍やメルケル細胞癌については比較的稀な腫瘍であるため、これまで診断基準となるマーカーが確立されていなかったが、本研究を通して市販抗体を用いて客観的に診断することが可能になった。

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 6件)

Uchida E, Chambers JK, Nakashima K, Saito T, Ohno K, Tsujimoto H, Nakayama H, Uchida K. Pathologic Features of Colorectal Inflammatory Polyps in Miniature Dachhunds. *Veterinary Pathology. in press.*

Dohata A, Chambers JK, Uchida K, Nakazono S, Kinoshita Y, Nibe K, Nakayama H. Clinical and Pathologic Study of Feline Merkel Cell Carcinoma with Immunohistochemical Characterization of Normal and Neoplastic Merkel Cells. *Veterinary Pathology. 2015;52:1012-1018.*
DOI: 10.1177/0300985815570484.

Chambers JK, Yoshino Y, Fujiwara R, Nishimura R, Nakayama H, Uchida K. Thymic Carcinoma with Cartilage Formation in a Dog. *Journal of Comparative Pathology. 2016;154:38-41.*
DOI: 10.1016/j.jcpa.2015.11.001.

Chambers JK, Nakamori T, Kishimoto T, Nakata M, Miwa Y, Nakayama H, Uchida K. Lacrymal Gland Basal Cell Adenocarcinoma in a Ferret. *Journal of Comparative Pathology. in press.*
Thongtharb A, Uchida K, Chambers JK, Miwa Y, Murata Y, Nakayama H. Histological and Immunohistochemical Features of Histiocytic Sarcoma in Four Domestic Ferrets (*Mustela putorius furo*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2016;28:165-170.*
DOI: 10.1177/1040638715626485.

Thongtharb A, Uchida K, Chambers JK, Kagawa Y, Nakayama H. Histological and Immunohistochemical Studies on Primary Intracranial Canine Histiocytic Sarcomas. *the Journal of Veterinary Medical Science. 2016;78:593-599.*
DOI: 10.1292/jvms.15-0627.

[学会発表](計 3件)

内田 英里、チェンバース ジェームズ、内田 和幸、中島 亘、大野 耕一、中山 裕之「ミニチュア・ダックスフントの結直腸炎症性ポリープに関する病理学的研究」第157回日本獣医学会学術集会 日本獣医病理学会
二瓶 和美、鈴木 敬子、小野 澤、中島 亘、齊藤 翼、内田 英里、チェンバース ジェームズ、坪井 誠也、内田 和幸、小野 憲一郎「ジャック・ラッセル・テリアの消化管ポリープに関する臨床および病理学的検討」第3回JCVP学術集会

Thongtharb A, Uchida K, Chambers JK,
Nakayama H. Pathological Study on
Primary Leptomeningeal Histiocytic
Sarcoma in Dogs. 2015 ACVP annual
meeting

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

チェンバース ジェームズ (CHAMBERS,
James)

東京大学大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：00621682

(2) 研究分担者

中山 裕之 (NAKAYAMA, Hiroyuki)

東京大学大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：40155891

内田 和幸 (UCHIDA, Kazuyuki)

東京大学大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：10223554

(3) 連携研究者

()

研究者番号：