

令和 2 年 11 月 25 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02478

研究課題名(和文) 肥満細胞腫のコンパニオン診断とリスク評価ツリーの構築

研究課題名(英文) Companion diagnostics and risk management on mast cell tumors in dogs

研究代表者

田中 あかね (Tanaka, Akane)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80418673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,700,000円

研究成果の概要(和文)：in vitro細胞培養系を用いて、イヌ肥満細胞腫細胞においてはGRの発現量がグルココルチコイド感受性を決めていることを明らかにした。また、臨床症例サンプルを用いたGR発現量の解析を行い、グルココルチコイド反応性と比較したところ、臨床症例においてもグルココルチコイド治療への反応性とGR発現量とは相関性が認められた。このことから、GRの発現強度を検出すれば、グルココルチコイドに有効性が評価できることを示すことができた。また循環がん細胞を検出し、再発をいち早く予測する方法として、フローサイトメトリー法で1/10000の確率で肥満細胞腫細胞が検出できるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床獣医学、中でも小動物臨床への社会的要請は高い。小動物臨床の現場における、伴侶動物の死因のトップは悪性腫瘍であり、発見や診断が遅れた場合の予後は悪い。肥満細胞腫は、ヒトには少ないが、小動物、とりわけイヌに好発し、初期治療が遅れると極めて悪性の転機をたどることから、厄介な腫瘍と考えられてきた。しかしながら代表者らが中心となって実施してきた分子生物学的手法を用いた解析研究から、イヌ肥満細胞腫に対する理解が深まり、様々な治療プロトコル、とりわけ分子標的治療という選択肢が付加されたことは、この腫瘍の攻めに大きく貢献した。さらに肥満細胞が関与するアレルギーの制御についても知見を提供した。

研究成果の概要(英文)：Using in vitro experiments, we showed that protein expression levels of GR were closely related to glucocorticoid sensitivity of the host dog. By the analysis of GR protein expression levels in clinical samples, we found the significant correlation between GR protein levels and glucocorticoid sensitivity of the host. Thus, detecting GR protein levels may predict glucocorticoid sensitivity in the treatment of dogs with mast cell tumors. We also established the flow cytometric method for detecting circulating mast cell tumor cells for early diagnosis for recurrence of mast cell tumors in dogs.

研究分野：獣医臨床免疫学

キーワード：肥満細胞腫 病態 診断 検査 遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分子標的薬とは、分子生物学的な研究成果に基づき、疾患の原因となるある種の細胞が持つ特異的な分子を標的として効率よく作用するように創られた薬の総称である。標的分子を発現する細胞だけを狙って作用するため、副作用を最小限に抑えながら高い治療効果が期待できる。しかし標的となる分子は、同一個体に発生した悪い細胞のみに発現するとは限らず、時として正常な細胞にも殺滅作用を発揮する可能性があるため、腫瘍化メカニズムの研究は必須である。

獣医学領域でも、近年分子標的治療に対する関心が高まり、動物用医薬品としての分子標的治療薬開発が進んでいる。動物医療の中で分子標的薬が注目されたのは、間違いなくイヌ肥満細胞腫に対するイマチニブを用いた治療法がきっかけであった。かつて肥満細胞腫の治療法は、3 cm 以上のマージンを取った大規模な外科的切除が第一の選択肢であったが、しばしば不十分なマージンにより再発を繰り返したり、組織や臓器の機能が失われ患犬の生活の質が大きく低下したりすることがあった。オンコピンやシクロフォスファミドなどを用いた多剤併用化学療法も実施されてきたが、効果は限定的であった。放射線治療の有効性が報告されたが、肺や肝臓などへの遠隔転移が問題となり、大幅な生存率の向上には至らなかった。このように肥満細胞腫は、制御しにくい腫瘍であり続けていた。イマチニブがヒトで臨床応用されたのと同時期の 1999 年、肥満細胞腫での KIT 受容体遺伝子変異の存在が報告されたことが背景となり、肥満細胞腫の治療に分子標的薬を使用する試みが始まった。これは分子生物学的研究成果に立脚した、新たな獣医療の始まりを期待させた。実際にその後、分子標的治療薬を適用した多くの症例報告がなされているが、投与前の有効性や副作用のリスク評価や、内科的及び外科的あらゆる治療法の中から選択した根拠の提示は不十分であった。イマチニブが獣医領域では適応外使用されてきた薬剤であるのに対し、マスチニブおよびトセラニブはイヌ肥満細胞腫を適応症として、2000 年代後半に欧州や米国で相次いで承認され、日本でも使用が始まっている。これらはイマチニブと同じように KIT チロシンキナーゼの自己活性化を抑制する分子標的薬で、いずれも KIT だけではなく VEGF 受容体や PDGF 受容体にも抑制効果を発揮するマルチキナーゼ阻害剤である。イマチニブと同様に、トセラニブおよびマスチニブの 2 剤とも KIT exon 11-12 に繰り返し配列が挿入される変異 (ITD) を有する症例での有効率は明らかに高いが、ITD を有する確率は全体の 20% 以下である。ITD を有さない症例の一部でも効果が報告されているが、無効症例も 50% 以上存在する。イマチニブなどの有効性を評価するために KIT 遺伝子解析実施されるが、これは前述の ITD を検出するための PCR 解析であり、ITD を有さない症例では薬剤感受性をまったく評価できていないのが現状であった。

2. 研究の目的

獣医臨床において厄介な悪性腫瘍であり続けた肥満細胞腫に対する理解は、この 10 年で大きく変化した。分子生物学的解析によりイヌに特徴的な KIT 受容体の遺伝子変異が解析されると、分子標的治療への期待が高まり、ついにはイヌ用の分子標的治療薬の開発・認可に至った。しかしながら肥満細胞腫に対する分子標的治療薬適用の適切性を判断する基準は未だ不十分で、臨床獣医師が最適な内科的あるいは外科的治療法を選択する根拠を提供できていない。本研究では、KIT 遺伝子解析に依らない KIT 依存性・非依存性腫瘍の分別法、薬剤応答性や副作用の発現リスクを見極める方法、及び循環がん細胞検出法を確立、新時代の獣医腫瘍学における最適な治療法の選択に根拠を与えるために必須となるコンパニオン診断とリスク評価ツリーの構築に向けた基礎研究を実施した。

3. 研究の方法

本研究では、4 年間に以下に挙げた解析を行い肥満細胞腫への多角的アプローチを行った。

(1) 化学療法剤選択指標の決定

肥満細胞腫への投与が想定される化学療法剤の中でも、特に使用頻度が増えている分子標的治療薬および古典的薬剤ではあるが有効性の高いグルココルチコイドに関して、獣医師が根拠を持って投与できるコンパニオン診断法確立のための基礎研究を遂行する。具体的には、臨床現場で実施可能な針生検サンプルからの、KIT 受容体の自己リン酸化の検出、細胞外及び膜近傍ドメインの変異の存在を示す KIT 二量体化の評価、機能的グルココルチコイド受容体 (GR) 発現の検出、解糖系亢進の評価、小胞体ストレス応答の検出などについて、代表者らが所有する 6 種類のイヌ肥満細胞腫細胞株を用いて、遺伝子学的および分子生物学的解析を実施した。期間の後半では、実際の肥満細胞腫症例から得られたサンプルを検査系に適用し、コンパニオン診断結果と、実際の治療反応性との相関性を確認した。

(2) 薬物の有効性や副作用の発現予測

分子標的治療薬への薬物感受性の低下は、新たな遺伝子変異の追加や一塩基多型 (SNP) の存在が原因であることが多い。グルココルチコイド耐性の原因として代表者らは、機能的 GR の発現状況の検証、GR に関する遺伝子異常の検出、GR 発現調節機構の分子生物学的解析を実施した。

(3) 循環がん細胞の高感度検出法の確立による再発や転移の早期診断

フローサイトメトリー法による肥満細胞腫の循環がん細胞検出の予備検討を行い、イヌ血液中に様々な濃度で混入させた肥満細胞腫細胞を、KIT および高親和性 IgE 受容体を指標として、感度良く検出できる条件を設定した。次に症例の血液サンプルを用いて、肉眼的に再発が確認

される2ヶ月ほど前から末梢血中のKIT陽性細胞数が増加するというデータを得た。循環血中の肥満細胞をより高感度に検出するために、KIT及びイヌ特異的肥満細胞プロテアーゼ(dMCP)を指標とした検出系を確立し、調整サンプルを用いて検出系を確立した。

4. 研究成果

(1) 平成27年度

代表者らが維持しているイヌ肥満細胞腫由来細胞株を用いて、*in vitro*培養系と細胞生存率の評価(フローサイトメトリー法、MTTアッセイ、BrdU取り込み方など)によってグルココルチコイド感受性を調べたところ、細胞によって感受性にばらつきがあることがわかった。そこで細胞質内に存在するグルココルチコイド受容体(GR)について、その発現量を核抽出物を用いたウエスタンブロット法で調べ感受性と比較したところ、GR発現量とグルココルチコイド感受性には相関関係が認められた。GRの発現量に影響を与える機序として、遺伝子異常が想定されたため、イヌGRのゲノム解析を実施したが、アミノ酸置換や欠失を伴うような遺伝子異常は検出できなかった。また薬物耐性遺伝子であるMDR1についても解析を行ったが、グルココルチコイド感受性との間に関連性は見出せなかった。さらにヒトで見つかっている機能性GRおよび機能を阻害するGRについて、イヌ肥満細胞での解析を実施したが、イヌの細胞においてこのようなGRのサブタイプは見つからなかった。これらの結果から、イヌ肥満細胞腫細胞においてはGRの発現量がグルココルチコイド感受性を決めていることが明らかとなった。

(2) 平成28年度

前年度の結果を受けて、臨床症例サンプルを用いたGR発現量の解析を行い、グルココルチコイド反応性と比較したところ、臨床症例においてもグルココルチコイド治療への反応性とGR発現量とは相関性が認められた。75%以上のイヌ肥満細胞腫臨床症例にはグルココルチコイド治療が有効である。このことから、摘出あるいは生検で採取した肥満細胞腫サンプルからGRの発現強度を検出すれば、グルココルチコイドに有効性が評価できることを示すことができた。

肥満細胞腫に対して使用されるチロシンキナーゼ阻害薬に対する耐性腫瘍の出現が問題となっていることから、薬物反応性の肥満細胞腫細胞を低容量チロシンキナーゼ阻害薬に暴露し耐性細胞株を作出した。耐性肥満細胞腫細胞から遺伝子を抽出し、遺伝子解析を実施したが、c-kit遺伝子のアミノ酸置換や欠失などの変異は見つけられなかった。このことから、薬物耐性はc-kit遺伝子の新たな変異以外の機序で誘発されている可能性が示唆された。

(3) 平成29年度

前年度からの継続で、循環肥満細胞腫細胞を検出する手技の確立を行なった。まず試験サンプルとして、イヌ血液中に様々な濃度の肥満細胞腫細胞を混入し、KITおよび高親和性IgE受容体を指標として、フローサイトメトリー法での検出を行なった。その結果、1/10000の確率で存在する肥満細胞腫細胞が検出できるようになった。

また、同様に継続研究として、肥満細胞腫細胞の低酸素反応性や小胞体ストレス応答についての分子生物学的解析を進めた。小胞体ストレス応答について、肥満細胞では細胞の活性化によってIRE1の活性が亢進し、その標的であるXBP1 mRNAのスプライシングが誘導された。また阻害剤を用いてIRE1の活性を阻害したところ、肥満細胞の活性化が強く抑制された。これらの結果から、小胞体ストレス応答経路は肥満細胞に対する新たな分子標的となる可能性が示唆された。

(4) 平成30年度

前年度からの継続で、肥満細胞腫細胞の低酸素応答性を分子生物学的に解析したところ、皮膚において肥満細胞は低酸素状態に置かれており、HIF1を強く発現して血管誘導因子を産生していることが明らかとなった。このことから、低酸素反応性因子関連のシグナル分子についても、肥満細胞腫の増殖や浸潤を抑制する分子標的となる可能性が示唆された。

研究期間を通じて様々な臨床サンプルの解析を行い、KITの細胞外ドメインに、腫瘍性の自己増殖を誘導する新たな点変異を見つけた。この変異が腫瘍化を誘導するものであることは、遺伝子導入の手法を用いて証明した。またこの変異を有するKIT分子の三次元構造モデリングを行い、我々が発見した点変異が生ずることで、stem cell factor非存在下でもKITの二量体化が誘導され、腫瘍性増殖が起こることを証明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計13件)

1. Urayama S, Tanaka A, Kusano K, Sato H, Nagashima T, Fukuda I, Fujisawa C, Matsuda H. Oral Administration of meloxicam suppresses low-dose endotoxin challenge-induced pain in Thoroughbred horses. J Equine Vet Sci. 2019 77:139-143. DOI: 10.1016/j.jevs.2019.03.001. 査読あり
2. Muko R, Amagai Y, Matsuda K, Matsuda H, Tanaka A. Cloning and detection of equine histidine-rich glycoprotein. J Equine Vet Sci 2019 73:121-126. DOI: 10.1016/j.jevs.2018.12.009. 査読あり

3. Kim J, Ahn M, Choi Y, Ekanayake P, Park CM, Moon C, Jung K, Tanaka A, Matsuda H, Shin T. Gene Expression Profile of Olfactory Transduction Signaling in an Animal Model of Human Multiple Sclerosis. *Exp Neurobiol.* 2019 28:74-84. DOI: 10.5607/en.2019.28.1.74. 査読あり
4. Amagai Y, Makita Y, Takai M, Muko R, Matsuda H, Tanaka A. Reduction in the colonization of *Staphylococcus aureus* on the skin surface under calcium-/magnesium-depleted conditions. *Lett Appl Microbiol.* 2018 67:343-347. DOI: 10.1111/lam.13037. 査読あり
5. Matsuda K, Okamoto N, Kondo M, Arkwright PD, Karasawa K, Ishizaka S, Yokota S, Matsuda A, Jung K, Oida K, Amagai Y, Jang H, Noda E, Kakinuma R, Yasui K, Kaku U, Mori Y, Onai N, Ohteki T, Tanaka A, Matsuda H. Mast cell hyperactivity underpins the development of oxygen-induced retinopathy. *J Clin Invest.* 2017 127:3987-4000. DOI: 10.1172/JCI89893. 査読有り
6. Einhorn L, Hofstetter G, Brandt S, Hainisch EK, Fukuda I, Kusano K, Scheynius A, Mittermann I, Resch-Marat Y, Vrtala S, Valenta R, Marti E, Rhyner C, Cramer R, Satoh R, Teshima R, Tanaka A, Sato H, Matsuda H, Pali-Schöll I, Jensen-Jarolim E. Molecular allergen profiling in horses by microarray reveals Fag e 2 from buckwheat as a frequent sensitizer. *Allergy.* 2018 73:1436-1446. DOI: 10.1111/all.13417. 査読有り
7. Matsuda S, Nakajima E, Nakanishi T, Hitsuji A, Zhang H, Tanaka A, Matsuda H, Momma T, Osaka T. Effective induction of death in mesothelioma cells with magnetite nanoparticles under an alternating magnetic field. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017 81:90-96. DOI: 10.1016/j.msec.2017.07.023. 査読有り
8. Amagai Y, Katsuta C, Nomura Y, Oida K, Matsuda K, Jang H, Ahn G, Hamasaki T, Matsuda H, Tanaka A. Amelioration of atopic-like skin conditions in NC/Tnd mice by topical application with distilled *Alpinia intermedia* Gagnep extracts. *J Dermatol.* 2017 44:1238-1247. DOI: 10.1111/1346-8138.13995. 査読有り
9. Jang H, Makita Y, Jung K, Ishizaka S, Karasawa K, Oida K, Takai M, Matsuda H, Tanaka A. Linoleic acid salt with ultrapure soft water as an antibacterial combination against dermato-pathogenic *Staphylococcus* spp. *J Appl Microbiol.* 2016 120:280-288. DOI: 10.1111/jam.13012. 査読有り
10. Matsuda K, Orito K, Amagai Y, Jang H, Matsuda H, Tanaka A. Swing time ratio, a new parameter of gait disturbance, for the evaluation of the severity of neuropathic pain in a rat model of partial sciatic nerve ligation. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2016 79:7-14. DOI: 10.1016/j.vascn.2015.12.004. 査読有り
11. Shoji K, Yoneda M, Fujiyuki T, Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Ogihara K, Naya Y, Ikeda F, Matsuda H, Sato H, Kai C. Development of new therapy for canine mammary cancer with recombinant measles virus. *Mol Ther Oncolytics.* 2016 3:15022. DOI: 10.1038/mt.2015.22. 査読有り
12. Jensen-Jarolim E, Fazekas J, Singer J, Hofstetter G, Oida K, Matsuda H, Tanaka A. Crosstalk of carcinoembryonic antigen and transforming growth factor- via their receptors: comparing human and canine cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2015 64:531-537. DOI: 10.1007/s00262-015-1684-6. 査読有り
13. Amagai Y, Matsuda A, Jung K, Oida K, Jang H, Ishizaka S, Matsuda H, Tanaka A. A point mutation in the extracellular domain of KIT promotes tumorigenesis of mast cells via ligand-independent auto-dimerization. *Sci Rep.* 2015 DOI: 10.1038/srep09775. 査読有り

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 向 亮、雨貝陽介、松田浩珍、田中あかね ウマ histidine-rich glycoprotein のクローニング及び検出 第 31 回日本ウマ科学会学術集会 2018 年 12 月 4 日
2. 雨貝陽介、松田浩珍、田中あかね 生体内におけるマスト細胞の低酸素応答機構の解析 第 161 回日本獣医学会学術集会 筑波市(茨城県) 2018 年 9 月 12 日
3. 松田研史郎、田中あかね、松田浩珍 未熟網膜症病態発現機構の分子解析: マスト細胞の必要性 第 161 回日本獣医学会学術集会 筑波市(茨城県) 2018 年 9 月 12 日
4. 籾山綾子、松田浩珍、田中あかね NC/Tnd マウスにおける皮膚炎誘導によるフィラグリン過発現の検討 第 27 回国際痒みシンポジウム 秋葉原(東京) 2017 年 11 月 11 日
5. Amagai Y, Matsuda H, Tanaka A. Amelioration of atopic-itch sensation in NC/Tnd mice by beta-pinene, the major component contained in distilled *Alpinia intermedia* Gagnep extracts. 9th World Congress on Itch. ヴォルツワフ(ポーランド) 2017 年 10 月 17 日
6. 田中あかね 伴侶動物のアレルギー病態と病態モデルとしての有用性 日本アレルギー学会学術集会(招待講演), 東京国際フォーラム(東京) 2017 年 6 月 16 日
7. 田中あかね 皮膚バリアとアレルギー疾患との関係 第 6 回 TOBIRA 研究交流フォーラム 御茶ノ水ソラシティーホール(東京) 2017 年 5 月 12 日
8. Amagai Y, Matsuda H, Tanaka A. Pathological proliferation of mast cells resulting

- from either an extracellular domain mutation or stem cell factor autocrine/paracrine.
欧州アレルギー・臨床免疫学会 2016, ウィーン (オーストリア) 2016 年 6 月 12 日
9. 雨貝陽介、松田浩珍、田中あかね 細胞外ドメインの点変異による KIT 活性化機構の解析
第 158 回日本獣医学会学術集会、北里大学 (青森県十和田市) 2015 年 9 月 8 日
 10. 雨貝陽介、松田浩珍、田中あかね Distinct activation of dimerized KIT receptors
resulting from a point mutation in the extracellular domain and KIT inhibitor actions.
Conference for BioSignal and Medicine 2015, エクシブ那須白河 (福島県西白河市) 2015
年 7 月 1 日

〔図書〕(計 1 件)

Amagai Y and Tanaka A. Mast cell tumors (Chapter 4 in Canine Medicine), INTECH, 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

研究室ホームページ : http://web.tuat.ac.jp/~mol_path/index.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 古市 達哉

ローマ字氏名 : (FURUICHI Tatsuya)

所属研究機関名 : 岩手大学

部局名 : 農学部

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 30392103

研究分担者氏名 : 永岡謙太郎

ローマ字氏名 : (NAGAOKA Kentaro)

所属研究機関名 : 東京農工大学

部局名 : 農学研究科

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 60376564

研究分担者氏名 : 種田久美子

ローマ字氏名 : (OIDA Kumiko)

所属研究機関名 : 東京農工大学

部局名 : 農学研究科

職名 : 研究員

研究者番号 (8 桁) : 40750469

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。