

機関番号：15501

研究種目：若手研究(スタートアップ)→研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21880032

研究課題名(和文) 腫瘍関連遺伝子 *FHIT* と担癌犬で検出されたその遺伝子座における変異の解析研究課題名(英文) The Analysis of Canine *FHIT* Gene and *FHIT* Locus Mutation in Spontaneous Canine Tumors.

研究代表者

平岡 博子 (HIRAOKA HIROKO)

山口大学・農学部・助教

研究者番号：10550981

研究成果の概要(和文)：本研究は Fragile Histidine Triad (*FHIT*) 遺伝子座 intron4 領域のゲノム欠失 (Int4D) が犬の腫瘍マーカーと成り得るか検討したものである。結果として Int4D は、*FHIT* 遺伝子発現とは関連しない、体細胞レベルで生じているゲノム欠失であることが明らかとなった。しかしながら、Int4D を腫瘍マーカーとした場合の検出感度は決して高いとは言えず、現時点での実用化は困難と思われた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to determine the feasibility of Int4D as a canine tumor marker. In conclusion, there is a possibility that Int4D is a somatic genomic deletion that does not relate to *FHIT* expression. Hence, the sensitivity of detecting Int4D as a canine tumor marker is questionable. Therefore, at the time being, it is not conclusive that Int4D can be used as a canine tumor genetic marker.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：担癌犬、癌抑制遺伝子 *FHIT*、ゲノム欠失、腫瘍マーカー、獣医学

1. 研究開始当初の背景

FHIT 遺伝子は細胞のアポトーシスや細胞周期チェックポイント機構に関わる遺伝子である。本遺伝子の転写異常、蛋白発現の低下もしくは欠損は、人の固形腫瘍や血液系腫瘍において幅広く報告されており、腫瘍抑制機構に関連する遺伝子とみなされている。申請者はこれまで、本邦で確立された5つの犬のリンパ系腫瘍細胞株における *FHIT* 遺伝子の転写異常ならびに蛋白発現の低下を報告した。さらにその過程で、全てのリンパ球系

腫瘍細胞株に共通に認められる *FHIT* 遺伝子座 intron 4 領域の homo もしくは hetero 接合性のゲノムの欠失(約 200bp:以下 Int4D)の存在を明らかにした。また Int4D 配列は、犬の short interspersed elements (以下 SINE) 配列に一致することが明らかとなった。そこで、様々な犬種に発生した様々な腫瘍組織 DNA を材料として Int4D 発現を調べた所、43/52 サンプル (82.7%) で Int4D が検出された。さらに興味深いことに、現在もしくは過去に腫瘍の発症がある犬の末梢血液(血液塗

抹では腫瘍細胞を認めない)においても、32/38頭(84.2%)でInt4Dが検出された。また、ある担癌犬の腫瘍組織ならびに複数の正常組織(病理組織検査によって腫瘍細胞浸潤が認められなかった)におけるInt4Dは全て同じ欠失パターンを示していた。一方、19/35頭(54.3%)の非腫瘍罹患(もしくは腫瘍罹患歴のない)犬の末梢血液においてもInt4Dが検出されたが、この中で後に腫瘍を発生した1個体が確認されている。これまでの予備実験より、*FHIT* 遺伝子座の intron 領域に位置するInt4Dは、腫瘍発生との関連性が示唆され、さらに正常細胞からも広く検出されることから、担癌犬における先天的なゲノム上の欠失であることが予測された。以上のことから、Int4Dは将来的に腫瘍になりやすい個体を選出するための犬の腫瘍マーカーとなる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

上記の背景を基として、本研究では担癌犬におけるInt4Dの保有率を明らかにし、さらに担癌犬の腫瘍性腫瘍病変、および非腫瘍犬の非腫瘍性腫瘍病変におけるInt4Dと*FHIT*発現との関連性を明らかにする。またInt4Dが犬の腫瘍マーカーとして利用可能か否かを検討するものである。

3. 研究の方法

犬の腫瘍サンプル：2009年11月～2010年7月の間に山口大学動物医療センターで外科的に切除された犬の腫瘍病変[腫瘍性腫瘍病変(良性、悪性含む)39検体、非腫瘍性腫瘍病変8検体]計47検体を対象とした。またサンプルが採取された全ての罹患犬から、正常体細胞として末梢血液を採取した。

(1) PCR法によるInt4D解析：計47検体の犬の各種腫瘍病変ならびに末梢血液からDNAを抽出し、Int4D領域を増幅するプライマーを用いたPCR解析を行ない、腫瘍病変と非腫瘍病変、また同一個体におけるInt4Dの欠失パターンを検出した。

(2) Int4Dと*FHIT*発現量との関連性：(1)で明らかとなったInt4Dの発現パターンとFhit遺伝子発現との関連性を明らかにするため、各腫瘍病変からRNA、蛋白を抽出し、Real-time PCR法による*FHIT*遺伝子発現量解析、またImmunoblot法によるFhit蛋白発現を解析し、その関連性を検討した。

4. 研究成果

(1) 47検体の犬の腫瘍病変のうち、22/39検体(56.4%)の腫瘍性腫瘍病変において、homo接合性もしくはhetero接合性のInt4Dが検出された。一方、5/8検体(62.5%)の非腫瘍性腫瘍病変においてもInt4Dが検出された。また、これら腫瘍病変で検出されたInt4D

の欠失パターン(Homoもしくはhetero接合性)は、個々の症例の末梢血液サンプルの欠失パターンと一致した(図1)。

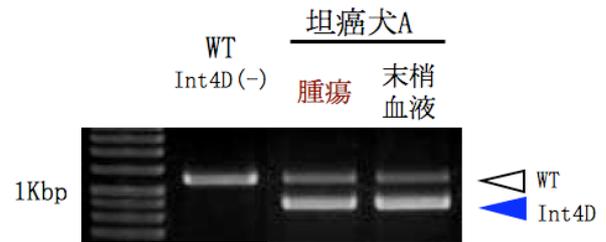


図1 Int4D PCRの例 (hetero接合性)

以上の結果から、Int4Dの欠失は全体細胞レベルで生じるゲノムの欠失であることが明らかとなった。また少なくとも本研究の結果では、Int4Dを保有しない担癌犬が43.6%存在することから、本領域の腫瘍マーカーとしての感度は決して高いとは言えない。しかしながら、非腫瘍犬群でInt4Dが検出された個体に関しては、将来的に腫瘍を発生するか否かの追跡調査が必要と思われる。

(2) Int4Dが全体細胞レベルで生じる遺伝子の欠失であるという(1)の結果をふまえ、腫瘍性腫瘍病変(表1)ならびに非腫瘍性腫瘍病変(表2)における*FHIT*遺伝子発現との関連性を明らかにした。

表に示す通り、多くの腫瘍性腫瘍病変では、Int4D発現の有無に関わらず、Fhit蛋白や*FHIT*遺伝子発現量が低下しており、Int4Dと*FHIT*遺伝子発現との間に関連性を見出すことは出来なかった。また、非腫瘍性腫瘍病変においても*FHIT*遺伝子発現が低下しているサンプルが認められたが、これらサンプルに

表1 腫瘍性腫瘍病変。各サンプルのFhit蛋白ならびに*FHIT*遺伝子発現を示す。

No	腫瘍の内訳	Int4D	Fhit蛋白	<i>FHIT</i> 遺伝子
1	肥満細胞腫	Homo	↓	+
2	肥満細胞腫	-	↓	↓
3	悪性黒色腫	Homo	+	ND
4	悪性黒色腫	Hetero	+	↑
5	悪性黒色腫	Hetero	+	↑
6	無色素性悪性黒色腫	-	↑	↑↑
7	無色素性悪性黒色腫	Hetero	-	↓
8	LGLリンパ腫	Hetero	-	↓
9	リンパ腫	Hetero	↓	↓
10	血管肉腫	Hetero	-	↓
11	血管肉腫	-	-	↓
12	骨肉腫	Homo	-	↓
13	骨肉腫	Homo	-	↓
14	消化管間質腫瘍	-	+	↓
15	線維腫	Homo	↓	↓
16	乳腺癌	Homo	↓	↓
17	乳腺癌	Homo	↓	↓
18	乳腺腫	-	↓	↓
19	高分化型肝臓癌	Hetero	-	↓

No	腫瘍の内訳	Int4D	Fhit蛋白	FHIT遺伝子
20	高分化型肝臓癌	Hetero	↓	↑
21	高分化型肝臓癌	-	↓	↓
22	アポクリン腺癌	Homo	↓	↓
23	肛門周囲腺上皮腫	Homo	↓	↓
24	肛門周囲腺腫	Homo	+	↓
25	肛門周囲腺腫	Homo	↓	↓
26	セミノーマ	Homo	+	+
27	セミノーマ	-	↓	-
28	間質細胞腫	-	↓	↑↑
29	セミノーマ/間質細胞腫併発	Hetero	+	↓
30	鼻腺癌	Hetero	↓	↓
31	鼻腺癌	Hetero	+	↑
32	鼻腔移行性癌	Homo	+	↓
33	気管支肺胞上皮癌	Homo	+	↑
34	甲状腺濾胞癌	Homo	-	↓
35	扁平上皮癌	Homo	-	↓
36	唾液腺癌	-	↓	↓
37	副腎皮質癌	-	↑	↑↑
38	非定型線維脂肪腫	Homo	-	↓
39	高悪性度腺癌	-	↓	↓

Homo: Homo接合性のInt4D, Hetero: Hetero接合性のInt4D, -: Int4D (もしくはFhit蛋白) 発現が認められない、
↑または↓: 増加または低下 (対健康犬正常肺組織)、+: 健康犬正常肺組織と同等の発現量、
ND: 遺伝子の増幅が認められない

関しても Int4D の発現との関連性は認められなかった。

表2 非腫瘍性腫瘍病変。各サンプルのFhit蛋白ならびにFHIT遺伝子発現を示す。

No		Int4D	Fhit蛋白	FHIT遺伝子
1	線維付属器過誤腫	Homo	↓	↓
2	線維付属器異形成	Homo	↓	↓
3	脂肪織炎	Homo	+	↓
4	化膿性肉芽腫性脂肪織炎	Homo	+	↓
5	脾臓出血, 随外造血	Hetero	-	↓
6	ポリープ状好酸球性膀胱炎	-	↓	+
7	耳下腺炎	-	↓	+
8	炎症性ポリープ	-	-	↓

Homo: Homo接合性のInt4D, Hetero: Hetero接合性のInt4D
-: Int4D(もしくはFhit蛋白)発現が認められない
↑または↓: 増加または低下(対健康犬正常肺組織)
+: 健康犬正常肺組織と同等の発現量

(1)および(2)の結果から、Int4D が犬において全体細胞レベルで生じるゲノム欠失であることが強く示唆されたが、本領域を腫瘍マーカーとした場合、その感度は高いとは言えず、さらに非腫瘍犬群が将来的に腫瘍を発生するかなどの追加調査が必要となるため、現段階で本領域を臨床的に利用することは困難と思われた。

他方、本領域は犬の SINE 配列であり、また FHIT 遺伝子座の Intron 領域に存在することから、犬種もしくは個体により配列の異なる遺伝子領域である可能性も考えられた[ちなみに現在 NCBI で公開されている健康犬(犬種: ボクサー) のゲノム配列には、Int4D は認められない]。そのため本研究の結果において、犬種ごとの Int4D 発現傾向を検討した。すると、柴犬では 4/ 4 検体で Homo 接合性の

Int4D を、また M. ダックスフントでは、7 検体中 4 検体が Homo、3 検体が Hetero 接合性の Int4D を示していた。そこでこれら 2 犬種に関し、さらに末梢血 DNA サンプルを収集し、解析したところ、柴犬では 7/ 7 検体 (腫瘍罹患犬 4 検体、非腫瘍性疾患罹患犬 3 検体) が Homo 接合性の Int4D を、M. ダックスフントでは 5/ 6 検体 (腫瘍罹患犬 2 検体: Homo 2 検体、非腫瘍性疾患罹患犬 3 検体: Homo 1 検体、Hetero 2 検体) で Int4D が検出された。よって、少なくともこれら 2 犬種では Int4D の発現に一定の傾向を示す可能性が示唆された。そのため将来的には、様々な犬種の体細胞 DNA を国内外から収集し、犬種特異的な Int4D の発現解析を検討することで、犬種特異的な疾患群との関連性が見出せる可能性も示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① Kozi MINAMI, Hiroko HIRAOKA *et al.*, Identification of Methylguanine-DNA Methyltransferase in Relation to Lomustine Cytotoxicity in Canine Lymphoma Cell Lines, 2010 ACVIM Forum, 2010.6.9-12, CA (USA)

② 平岡 博子、院内細胞診のすすめ、獣医日本内科学アカデミー/日本獣医臨床病理学会 2010 年大会、2010 年 2 月 12 日、京王プラザホテル (東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平岡 博子 (HIRAOKA HIROKO)

山口大学・農学部・助教

研究者番号: 10550981

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし

