様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 ２４ 日現在

機関番号：３５３０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2022～2024
課題番号：２２Ｋ０６０３５

研究課題名（和文）猫にも起こる人肺難病IPFの病態解明：化生細胞は癌化の初期段階か？

研究課題名（英文）Are distal airway "metaplastic cells" in feline idiopathic pulmonary fibrosis an indication of malignant transformation?

研究代表者
三井　一鬼（Mitsui, Ikki）

岡山理科大学・獣医学部・助教

研究者番号：２０８４４７７３

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）：肺の奥から粘液が絶えず分泌され咳・頻呼吸に苦しむ「気管支漏」と呼ばれる稀少致死疾患を発症した飼猫12匹の肺検体を解析した。全個体で人の難病「特発性肺線維症」に酷似した顕微鏡所見（通常型間質性肺炎）が、うち7頭に悪性腫瘍「肺腺癌」の併発が認められた。主として肺胸膜直下に存在する異常細胞には、組織化学、免疫組織化学、および透過型電子顕微鏡解析の結果、いくつかの肺固有細胞（クララ細胞等）の特徴が混在していた。これらより、既存の扁平な呼吸上皮（Ⅰ型肺胞上皮）細胞が、粘液を活発に分泌する未知の異常細胞に形質変化（化生）し、一部が癌化したと推察された。原因の特定や遺伝子レベルの解析が次なる課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究の学術的意義は、猫の肺の新興疾患「気管支漏」を病理学的に詳細に解析し、粘液を過剰に産生する「化生細胞」が本疾患の根本原因となっている事実を明らかにしたことにある。さらに、猫気管支漏の病巣に頻繁に肺腺癌がみられたことから、化生細胞が癌化して肺腺癌に至った可能性が示唆され、化生細胞を解析することが肺がん発生メカニズム解明の糸口となる可能性がある。社会的意義としては、人と同じ環境に暮らし、人なみの検査や治療が可能になりつつある伴侶動物（今回は猫）における疾患の解析結果を、人の難病やがんの診断・治療法開発にフィードバックできる可能性を示したことにある。

研究成果の概要（英文）：Lung specimens from 12 client-owned cats that had developed a rare fatal disease called “bronchorrhea,” in which mucus is constantly secreted from the distal portion of the lungs to cause coughing and tachypnea, were analyzed. All of them had microscopic findings of usual interstitial pneumonia that closely resembled that of idiopathic pulmonary fibrosis. Seven of them had concurrent development of pulmonary adenocarcinoma. Histochemistry, immunohistochemistry, and transmission electron microscopy revealed that the abnormal mucus-producing cells had mixed features of pulmonary resident cells such as Clara cell. From these results, it was inferred that preexisting respiratory epithelial cells (type I pneumocytes) underwent a transformation (metaplasia) into abnormal cells that actively secrete mucus, and some of these cells further transformed to cancer. A search for the cause and analysis of the responsible genes are the next issues to be addressed.

研究分野：獣医病理学

キーワード：特発性肺線維症　猫　気管支漏　ブロンコレア　化生　肺腺癌　粘液過剰分泌　致死性呼吸器疾患

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

筆者らは、日本の家庭飼育猫に、遠位気道（肺の「奥のほう」）から絶えず粘液が分泌され、臨床的に「ゴロ音（英語で rattle)」と呼ばれる呼吸器症状（気管支漏、英語で bronchorrhea ブロンコレア）が散見されることを近年散発的に経験していた。罹患猫の肺病変の手術検体には、医学の分類により「通常型間質性肺炎」と称される組織像に酷似した病変が共通して認められた。この通常型間質性肺炎の組織像は、人においては、原因不明の指定難病である「特発性肺線維症（idiopathic pulmonary fibrosis: IPF)」の典型所見である。一方医学では、IPF とブロンコレア（医学におけるブロンコレアの定義は、一日 100ml を超える水様の痰の産生）を結び付けた報告はほぼ無く、人のブロンコレアはもっぱら肺の悪性腫瘍、特に上皮内腺癌に関連付けられている。

ブロンコレアを呈した猫の肺の予備的な組織学的解析において、本来扁平な I 型肺胞上皮細胞（呼吸上皮細胞）が、もともと肺に存在しないような立方形から円柱形で粘液産生が活発な異常細胞に変化（化生）していることが判明した。また、肺腺癌の併発にも頻繁に遭遇した。

２．研究の目的

ブロンコレアと IPF の関係は、人では無し、猫では有りと、正反対のようであるが、筆者らは猫の病態を先入観を排して追及することにした。本研究の究極の目的は、IPF の本質が、医学で疑われている肺組織の「線維化」ではなく、呼吸上皮細胞の「形質転換、多段階発癌」であるという新規仮説を設定し、その妥当性を検証することであるが、小目的として研究当初に下記の 3 項目を掲げた。

⑴　猫ブロンコレア／IPF における化生細胞の形態機能学的特徴、すなわち化生細胞が肺固有の上皮細胞（線毛上皮細胞、杯細胞、クララ細胞、漿液細胞、基底細胞、呼吸上皮細胞、大肺胞上皮細胞）のいずれに近い細胞なのかを探る。

⑵　化生細胞にどのような遺伝子が発現し、どのような変異があるかを知り、化生細胞が癌になる運命にあることや、そのメカニズムを、遺伝子レベルで解明する。

⑶　猫の培養肺細胞に標的遺伝子を導入・抑制するとどのような影響が出るかを調べ、診断および治療のターゲット遺伝子を選定する。

３．研究の方法

当初の計画は、高度な細胞培養技術を有する共同研究者の異動や、ホルマリン固定による遺伝子損傷が想定以上に強いことによると推察される遺伝子解析の失敗により頓挫し、小目的⑴の病理形態学的解析に限定せざるを得なかった。実際に完遂できた研究方法は以下の通りである。

化生細胞、肺癌細胞、正常猫の肺細胞の組織学、組織化学、免疫組織化学、透過型電子顕微鏡による精査。

４．研究成果

第一弾

2023 年 8 月の欧州獣医病理学会（ポルトガル、リスボン）におけるポスター発表(題名 Characterization of metaplastic cells in feline usual interstitial pneumonia/bronchorrhea complex　猫通常型間質性肺炎／ブロンコレア複合疾患における化生細胞の特徴）では、猫ブロンコレア／IPF における化生細胞の特徴について、「1 個体」の解析結果を報告した。結論を簡潔に述べると、化生細胞は免疫組織化学において、クララ細胞を標識するマーカーである CC16 に陽性となったが、多くの種類の肺の上皮細胞に発現する TTF-1 には陰性となった。このことから、化生細胞はクララ細胞由来あるいはクララ細胞への分化を示し、なおかつ、肺の上皮細胞に固有の免疫学的表現型を失っている「異常な細胞」であることが判明した。透過型電子顕微鏡による観察では、化生細胞が、頂側の細胞質に分泌物を貯蔵し、離出分泌を行っていることが確認され、臨床的にブロンコレアとして観察される絶えず湧き出す分泌物を、化生細胞が産生・分泌していることが初めて確認された。従来は気管支腺等がその源と考えらていたため、画期的な成果であった。次ページに本ポスターを掲載するので参考にされたい。

Characterization of metaplastic cells in feline usual interstitial pneumonia/bronchorrhea complex

Ikki Mitsui,[1] DVM, MS, DACVP, DJCVP and **Yukihito Shiroshita**,[2] DVM, PhD
[1]Faculty of Veterinary Medicine, Okayama University of Science, Imabari, Japan.
[2]Veterinary Respiratory Medicine and Surgery Study Group (VeRMS), Kanagawa, Japan.

岡山理科大学
OKAYAMA UNIVERSITY OF SCIENCE

VeRMS

Introduction

A fatal feline lung disease histologically consistent with **usual interstitial pneumonia (UIP)** of human has been diagnosed worldwide. Thorough clinical evaluation by Shiroshita and colleagues revealed that the cats with this disease frequently exhibit symptomatic **watery hypersecretion** from the distal airways (**bronchorrhea**). Pathogenesis of feline **UIP/bronchorrhea complex (UIPBC)** is poorly understood.

Objective

We hypothesize that mucus-secreting **metaplastic cells (MCs)** stretching from the bronchioles to alveoli in human and feline UIP lesions are responsible for hypersecretion. We aimed to characterize MCs to deepen our understanding of the pathogenesis of feline UIPBC.

Materials and methods

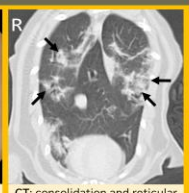
The surgically excised **left caudal lobe** of a **10-y castrated-male Scottish Fold cat** with intermittent tachypnea, labored breathing, coarse crackles, and clinical diagnosis of feline bronchorrhea was examined by histology, histochemistry, immunohistochemistry (IHC), and transmission electron microscopy (TEM). PCR of laryngeal swab of the cat was negative for FHV-1, FCV, H1N1 Influenza, *Chlamydophila felis*, *Mycoplasma felis*, *Bordetella bronchiseptica*.

Conclusion

MCs in feline UIPBC lesion were suspected to be of **Clara (club) cell origin** but **lacked a common pulmonary cell immunophenotype.** A need for further study is apparent.

Results

Bronchoscopy: watery hypersecretion (arrow).



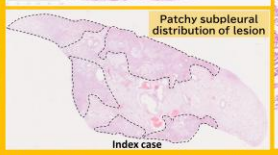
CT: consolidation and reticular opacities (arrows).

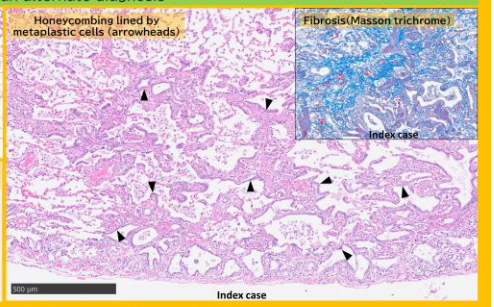
Gross image (**unfixed**, dorsal view): non-collapsing lobe with a mottled gray and red solid area and rough pleura.

Gross image (**fixed**, serial sections): multiple subpleural consolidated areas (arrows).

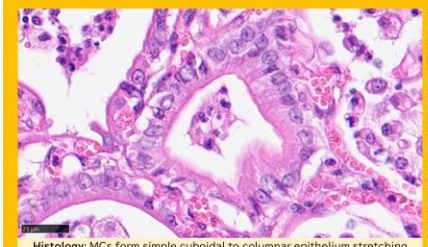
Histologic features of the index case are consistent with human UIP.

- Predominant subpleural and/or paraseptal distribution of fibrosis
- Patchy involvement of lung parenchyma by fibrosis
- Dense fibrosis with architectural distortion (i.e., destructive scarring and/or honeycombing)
- Fibroblast foci
- Absence of features to suggest an alternate diagnosis

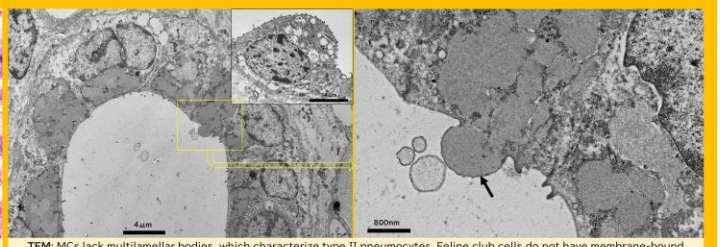




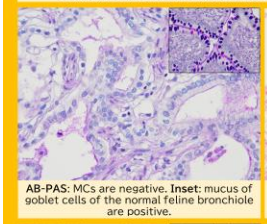
Metaplastic cells somehow resemble Clara (club) cells but secrete "something other than usual mucin" and are immunonegative to TTF-1.



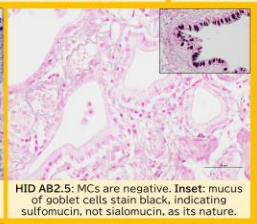
Histology: MCs form simple cuboidal to columnar epithelium stretching from the bronchioles to alveoli. MCs are morphologically reminiscent of non-ciliated epithelial cells of the distal airways (club cells).



TEM: MCs lack multilamellar bodies, which characterize type II pneumocytes. Feline club cells do not have membrane-bound cytoplasmic granules as seen in other species. MCs have few microvilli, many variably-sized apical-cytoplasmic secretary vesicles laden with intermediately electron dense homogeneous substance with occasional apical blebbing (arrow). **Inset**: normal club cell.



AB-PAS: MCs are negative. **Inset**: mucus of goblet cells of the normal feline bronchiole are positive.

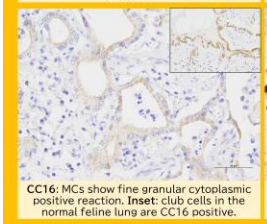


HID AB2.5: MCs are negative. **Inset**: mucus of goblet cells stain black, indicating sulfomucin, not sialomucin, as its nature.

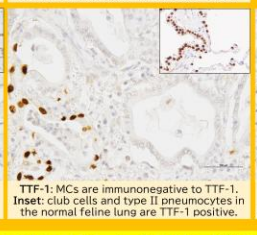
Table 1. Summary of the results of histochemistry and IHC

Stain/cell	Type I PC	Type II PC	Clara (club) cell	Bronchiolar ep	Bronchial ep	Metaplastic cell
AB-PAS	N	N	N	P (goblet cell)	P (goblet cell)	N
HID AB2.5	N	N	N	P (goblet cell)	P (goblet cell)	N
CK AE1/3	P	P	P	P	P	P
Vimentin	N	N	N	N	N	N
CC16	N	rarely P	P	N	N	P*
TTF-1	N	P	P	P	P	N
EGFR	N	N	P	N	N	P*

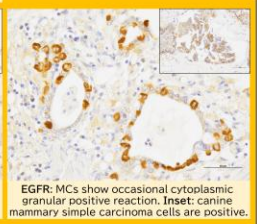
Abbreviations: PC: pneumocyte, **ep**: epithelium, **N**: negative, **P**: positive, *: occasional cytoplasmic granular positive reaction, **AB**: alcian blue, **HID**: high iron diamine, **CK**: cytokeratin, **CC16**: Clara cell protein 16, **TTF-1**: thyroid transcription factor 1, **EGFR**: epidermal growth factor receptor.



CC16: MCs show fine granular cytoplasmic positive reaction. **Inset**: club cells in the normal feline lung are CC16 positive.



TTF-1: MCs are immunonegative to TTF-1. **Inset**: club cells and type II pneumocytes in the normal feline lung are TTF-1 positive.



EGFR: MCs show occasional cytoplasmic granular positive reaction. **Inset**: canine mammary simple carcinoma cells are positive.

Question, suggestion, etc. ➡ mitsui@no-boundaries.jp

Selected references

- Plantier L et al., Ectopic respiratory epithelial cell differentiation in bronchiolised distal airspaces in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*. 2011;66:651-657.
- Plopper CG et al., Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung: II. A comparison of horse, steer, sheep, dog, and cat. *Exp Lung Res*. 1980 Jun;1(2):155-69.
- Shiroshita Y et al, Feline bronchorrhea: a retrospective study of 18 cases (2012-2017). E-Poster presentation at 2019 ACVIM annual conference, Phoenix, Arizona.
- Smith ML. The histologic diagnosis of usual interstitial pneumonia of idiopathic pulmonary fibrosis. Where we are and where we need to go. *Mod Pathol*. 2022 Jan;35(Suppl 1):8-14.
- Williams K et al, Identification of spontaneous feline idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2004:125(6):2278-2288.

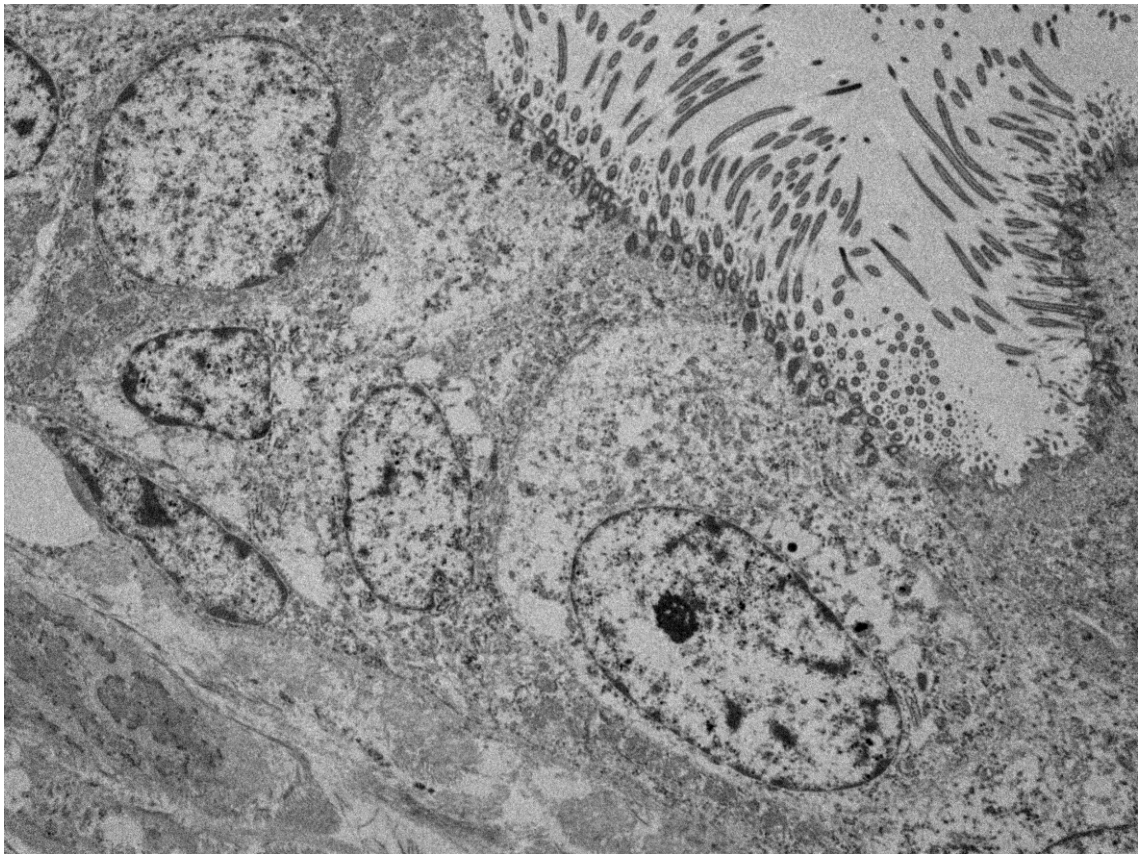
Acknowledgements

Dr. Mary Durbin's proofreading is much appreciated. We also thank FUJIFILM VET Systems Co., Ltd., Hanaichi Ultrastructure Research Institute, Co., Ltd., and Kyodo Byouri Co., Ltd. for technical assistance.

第二弾

第一弾の解析を 12 頭の猫(うち一例は第一弾と同じ症例)の肺検体に対して拡大して行った。さらに、猫の主治医から情報を得て詳細な臨床情報（臨床徴候や臨床検査の結果等）を加筆している最中である。この内容を本年中に学術誌に投稿する予定であり、臨床獣医師にも研究者にも役立つ内容になると想定している。

参考までに、第二弾の解析で新たに得られた興味深い透過型電子顕微鏡所見は、化生細胞の一部に「線毛」が認められ、化生細胞がクララ細胞のみならず、気管支や細気管支の線毛上皮細胞への分化を示唆していることである（下の写真参照。本見解は、現状では未確定であり、今後変わる可能性がある)。猫ブロンコレア／IPF において、扁平な呼吸器上皮細胞が様々な系統の肺の上皮細胞に分化（化生）していることを形態学的に裏付ける初めての報告になると期待している。



透過型電子顕微鏡写真：化生細胞の自由表面に多数の線毛を認める。

以上となります。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

1．発表者名 Ikki Mitsui
2．発表標題 Characterization of metaplastic cells in feline usual interstitial pneumonia/bronchorrhea complex
3．学会等名 2023 Annual Meeting of the European College of Veterinary Pathologists（国際学会）
4．発表年 2023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	藤原　信行 (Fujiwara Nobuyuki) (30805875)	岡山理科大学・獣医学部・講師 (35302)	

	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
研究協力者	城下　幸仁 (Shiroshita Yukihito)	犬・猫の呼吸器臨床研究会・事務局長	

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