

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月13日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780316

研究課題名（和文）犬組織球肉腫の新規迅速診断法の開発と予後因子測定 of 臨床応用

研究課題名（英文）Establishment of a rapid diagnosis system and clinical application of a new prognostic factor.

研究代表者

高木 哲（TAKAGI SATOSHI）

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：50396305

研究成果の概要（和文）：

樹状細胞由来である犬の組織球性肉腫は非常に未分化であり、単純な細胞診や病理組織学的検査では確定診断が困難な場合がある。そこで、本研究では定量的 PCR を用いた簡便かつ迅速な診断法を樹立した。その結果、正診率は 91.7%であった。

また、アポトーシス抑制因子のひとつである Survivin に注目したところ細胞増殖率、抗がん剤感受性および予後に影響していることが明らかとなり、Survivin のノックアウトが有効であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Canine histiocytic sarcoma is highly undifferentiated and normal fine needle aspiration or histopathological diagnosis does not always introduce the final diagnosis. In the present research, we established a rapid and simple diagnosis method. This technique provided 91.7% of accuracy.

Additionally, studies on the influence of survivin, which is one of the IAP families, showed significant correlation with cell growth rate, chemosensitivity against antitumor drugs and prognosis. In vivo and in vitro survivin down-regulation experiment showed effective therapeutic results.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：犬、表面抗原、組織球性肉腫、診断、Survivin

1. 研究開始当初の背景

犬の組織球性肉腫は樹状細胞由来であり、非常に未分化な形態による診断の難しさおよび抗がん剤に対する早期耐性獲得がしばしば臨床的に問題となる腫瘍である。本腫瘍は単純な細胞診や病理組織学的検査では確

定診断が困難な場合があることが広く知られている。

一方、樹状細胞は強力な抗原提示能を有する細胞であり、特に腫瘍免疫においては細胞障害性 T 細胞を強力に誘導することが 1990 年代に明らかにされた。この組織中の樹状細胞は白血球分化の表面抗原である CD11c が陽

性であることが報告されている。

現在、米国においては犬の抗 CD11c 抗体を用いた免疫染色で確定診断を行っているが、他の研究機関への分与は行われていないことから日本では CD11 系統以外の免疫染色 (MHC class II や CD18 の染色性)、HE 染色などの状況証拠で診断を下しているのが現状であるが、初期には非常に診断に苦慮することが少なくない。また、CD11 系統の免疫染色に関しては凍結組織で検証しなければならず、液体窒素が日常的に利用できる大学附属施設のような設備がなければ、その現実的な利用は制限が大きいことが実際に免疫染色をすることが可能な米国の獣医学臨床の現場でも問題となっている。以上のように、腫瘍の分類自体も比較的新しく、本腫瘍の病態に関する知見も歴史的に乏しいため、早急に確実な診断・治療方針を確立する必要がある。

また、組織球性肉腫は通常は化学療法に良好な反応を示す円形細胞腫瘍 (リンパ腫、肥満細胞腫など) に形態的には分類されるが、抗癌剤治療に対して早期に耐性を獲得し、治療が困難な症例が一般的である。この薬剤耐性の発症機序に関してはあまりよくわかっていないが、多くの腫瘍でアポトーシスの制御機構に関連が深いことが報告されている。さらに、症例によっては予後が良い症例も含まれており、これらを判断する指標は現在のところ明らかにされていない。

2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究においては、迅速かつ簡便で生検針分程度の材料で診断できる方法を確立することを最初の課題とした。そこで微量検体で定量性があるものとして real timePCR を選択し、この手法を用いて確定診断が最終的に得られた症例とその他の腫瘍の遺伝子発現量について評価した。

さらに、現在のところ明らかにされていない本腫瘍の予後因子についてもアポトーシス関連遺伝子発現量を評価することで、特に Survivin 高発現症例における生存期間と薬剤耐性との相関関係を臨床例、in vitro および in vivo で評価することを目的とした。

3. 研究の方法

本疾患の病態のアプローチのため、本研究では主に分子生物学的手法による検討を行った。

まず組織球性肉腫の新しい診断法の開発のためにリアルタイム PCR による各種表面抗原遺伝子 (MHC Class II、CD11c、CD11b およ

び CD86) の測定を最適化した。採取したサンプルは MHC Class II および CD18 特異抗体を用いた免疫染色を実施して確定診断し、その精度を評価した。

抗アポトーシス遺伝子である Survivin の発現量と臨床例の予後との相関を検討するために臨床例の検体を解析するとともに生存期間や抗がん剤による無病期間についても Kaplan-Meier 曲線を作成するとともに統計学的に解析を行った。および薬剤耐性に関する検討のため、臨床例から培養細胞株を樹立し、その細胞の薬剤耐性について siRNA を用いて評価した。また、臨床例の予後との相関関係をリアルタイム PCR で評価した。

さらに臨床的な投薬治療を考慮した際に実際に市販されていて利用可能な Survivin 阻害薬である YM155 を使用し、その効果についても検討した。

4. 研究成果

組織球肉腫における各表面抗原 (CD11b, CD11c, CD86 および MHC class II) 発現量の解析により、本腫瘍診断の有用性を前向きに評価した。

Comparison of diagnostic accuracy for HS

	Real-time PCR (This study)	Cytology*	Flow * Cytometry
Sensitivity	93.8 %	44.4 %	66.7 %
Specificity	87.5 %	87.1 %	68.5 %
Positive predictive value	93.8 %	68.0 %	35.3 %
Negative predictive value	87.5 %	86.8 %	81.6 %
Accuracy	91.7 %	78.5 %	67.4 %

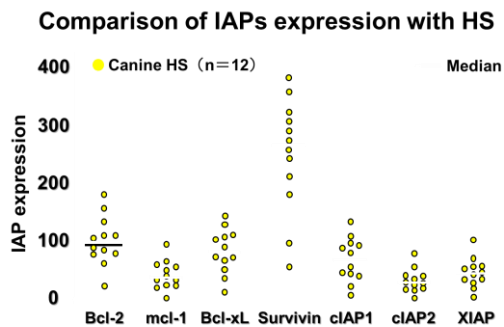
※ : Wiley J. et al 2009

組織球肉腫疑いの犬 24 例を対象に本法の診断精度を調べた結果、その正診率は 91.7% であった。本法は微量検体で迅速に実施できる有用性の高い補助的診断法であることが示唆された (上表)。

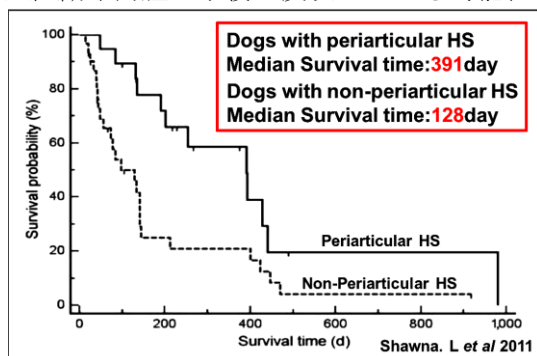
また、実際に本法を臨床例、特に大きな組織サンプルが得にくく、診断が難しいとされる肺の組織球性肉腫において適用し、生前診断と剖検時の検査所見を 5 例で比較検討した結果、全例で病理組織学的検査よりも正確な診断を得ることができた。

本腫瘍の予後因子としてアポトーシス抑制因子のひとつである Survivin が臨床組織検に過剰発現していたため (下図)、組織球性肉腫の細胞株の各 Survivin 発現量に対して、それぞれの細胞増殖率、抗がん剤感受性を比較し、その相関性を評価した。

その結果、Survivin 発現量の高い細胞株は

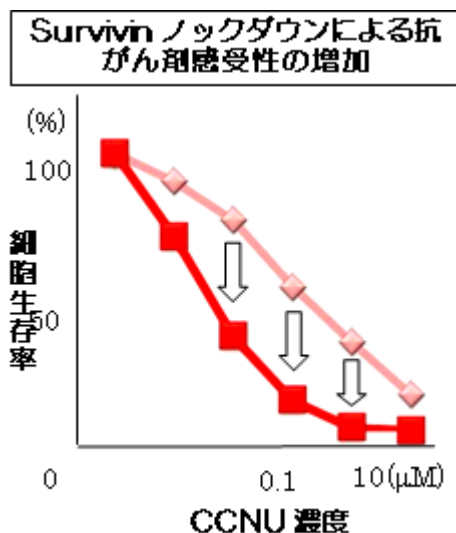


増殖能が高く、抗がん剤感受性が低かった。また、犬組織球肉腫 30 例の予後（生存期間、治療反応期間）と各 Survivin 発現量を比較し、その予後因子としての有用性を評価したところ、Survivin 発現量の高い症例は生存期間が短く、化学療法が奏功しにくいことが判明した（下図）。これらの結果から Survivin は組織球肉腫の予後に反映している可能性



が強く疑われた。

以上の結果から本腫瘍の悪性傾向を制御する因子として Survivin が重要と考えられることに注目し、その発現を SiRNA を用いてノックダウンすることでその増殖率、抗がん剤感受性を評価したところ、約 48 時間にわたって効率的に Survivin 蛋白の発現抑制が認められた。また、抗がん剤の感受性についても下図に示す一例と同様に、全細胞でその



感受性増加が認められた。

さらに、現在入手可能な Survivin 抑制薬として YM155 を用いて同様の試験を実施した。その結果、全細胞で Survivin 蛋白の発現抑制が認められたものの、その程度は様々であり、SiRNA を用いた試験と同様とはならなかった。また、実際の細胞増殖抑制効果や抗がん剤の感受性増強効果は 4 つの細胞株のうち、2 種類でのみ認められ、そのほかの 2 種の細胞株では全く影響を受けなかった。これについては薬剤の特性から持続的な Survivin 抑制効果を得るためには、細胞内への薬剤の取り込まれやすさを考慮する必要があることや薬剤の有効性の維持に必要な薬剤濃度についてさらに検討する必要性が示唆された。

以上より、本研究から得られた結果として、2 つの成果が得られた。まず、現時点では診断が非常に困難なことがあり、臨床的に問題となっている犬の組織球肉腫に対する簡便かつ客観的な補助的診断法をリアルタイム PCR 法を利用することで、従来の病理組織学的検査に匹敵する信頼性の高い補助的診断法を確立することができた。また、臨床例の予後や抗がん剤の感受性などを分析する過程で得られた、Survivin が犬の組織球肉腫で悪性動態を制御する要因として重要な鍵である可能性が考えられ、さらに実験的にこの遺伝子または蛋白を抑制することによって本腫瘍の悪性傾向を制御することが可能となることを明確に示すことができた。

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 1 件）

- 1) Yamazaki H., (2 番目) Takagi S. (他 5 名), Balloon dilatation of a urethral stricture for four dogs with urethral tumor. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 査読有. 65(2012), 530-533.

〔学会発表〕（計 6 件）

- 1) Satoshi Takagi, Hiroki Yamazaki (他 3 名), Significance of diagnostic approach by using surface antigen mRNA expression analysis in 8 histiocytic sarcoma dogs. American college of veterinary internal medicine, 2013.6.15, Seattle (Washington state convention center・アメリカ)
- 2) Hiroki Yamazaki, Satoshi Takagi (他 3 名), The influence on biological activity by Survivin inhibition in

canine histiocytic sarcoma cell lines.
American college of veterinary
internal medicine, 2013.6.15, Seattle
(Washington state convention
center・アメリカ)

- 3) 山崎裕毅, 高木 哲 (他 3 名) . Survivin 遺伝子制御による犬組織球肉腫細胞の形態と機能の変動評価, 第 154 回日本獣医学会, 2012.9.14, 岩手大学 (岩手)
- 4) 山崎裕毅, 高木 哲 (他 2 名) . 表面抗原解析による遺伝子診断が有用であった肺組織球肉腫の犬 5 例, 平成 23 年度日本獣医師会獣医学術学会, 2012.2.4, 札幌コンベンションセンター (札幌)
- 5) 山崎裕毅, 高木 哲 (他 2 名) . 犬の組織球肉腫における Survivin 遺伝子発現の予後因子としての評価, 第 152 回日本獣医学会, 2011.9.20, 大阪府立大学 (大阪)
- 6) 山崎裕毅, 高木 哲 (他 2 名) . 表面抗原解析による補助的診断が有用であった肺組織球肉腫の犬 3 例, 日本小動物獣医学会北海道地方大会, 2011.9.6, 札幌コンベンションセンター (札幌)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 哲 (TAKAGI SATOSHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号 : 50396305