

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292157

研究課題名(和文) 犬の変性性脊髄症、髄膜組織球性肉腫および多発性筋炎の病理発生解明と疾患モデル開発

研究課題名(英文) Researches for the pathogenesis and disease models of canine degenerative myelopathy, leptomeningeal histiocytic sarcoma, and multiple myositis.

研究代表者

内田 和幸 (UCHIDA, Kazuyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：10223554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではペンブローク・ウェルシュ・コーギー(PWC)に好発する疾患、特に組織球性肉腫と脊髄変性症について、その病理的特徴を明らかにした。組織球性肉腫についてはPWCの髄膜に発生した組織球性肉腫由来のCell lineが樹立されるとともに、フラットコートドレトリバーの滑膜の組織球性肉腫および犬のランゲルハンス細胞性皮膚組織球症由来のCell lineを樹立することができた。これら3種のcell lineは、犬やヒトの組織球性肉腫の発がんメカニズムや治療薬開発の基礎研究の有用なツールとなる。また犬の変性性脊髄症については、SOD1変異に加えオートファジー異常が関係することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed the pathological features of breed specific diseases occurring in Pembroke Welsh Corgi(PWC) dogs, especially histiocytic sarcoma and degenerative myelopathy. Regarding histiocytic sarcomas, cell line derived from leptomeningeal histiocytic sarcomas in a PWC dog was established. Two additional cell lines from synovial histiocytic sarcoma of a flat-coated retriever dog and canine cutaneous Langerhans cell histiocytosis have been successfully established. These three types of cell lines will be excellent tools for the basic researches on tumorigenesis and therapeutic drug development on histiocytic sarcomas, not only in dogs but also in humans. Regarding canine degenerative myelopathy, autophagy abnormality is involved in addition to SOD1 mutation in PWC dogs.

研究分野：獣医病理学

キーワード：コーギー犬 組織球性肉腫 Cell line 樹状細胞 マクロファージ ランゲルハンス細胞 変性性脊髄症 筋疾患

1. 研究開始当初の背景

イヌの疾患の一部には、犬種特異性が存在することがよく知られているが、その遺伝的背景まで明確にされているものは比較的少ない。国内で繁殖・飼育されているペンブローク・ウェルシュ・コーギー(PWC)には、舌筋萎縮を特徴とする炎症性筋症、組織球性肉腫、および脊髄変性症がそれぞれの好発年齢で多発している。高齢で発症する変性性脊髄症は、国内外で発症がみられるものの、炎症性筋症と組織球性肉腫については、これまで海外からの報告がなく、日本で繁殖されているPWC特有の疾患である可能性がある。申請者らはPWCの炎症性筋症(Toyoda K. et al. J. Vet. Diagn. Invest. 2010)と頭蓋内組織球性肉腫(Ide T. et al. J. Vet. Diagn. Invest. 2010)および変性性脊髄症(Ogawa M. et al. J. Vet. Med. Sci. 2011)の病態について検討し、PWCの炎症性筋症が抗筋抗体を介した免疫介在性筋症であることを示し、さらに頭蓋内組織球性肉腫が国内ではPWCに高率に発生していること、さらに本犬種の変性性脊髄症では星状膠細胞や小膠細胞から産生されるiNOSやSOD1等の酵素活性が増加していることを明らかにした。これらの疾患はいずれも免疫系において中心的役割を担うマクロファージ異常が病態に関与するため、本犬種にはマクロファージ関連遺伝の異常が複数存在すると考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、上記疾患のうち特にペンブローク・ウェルシュ・コーギー(PWC)の組織球性肉腫に焦点を絞り、組織球性肉腫を発症したPWC症例およびPWC正常例、

およびPWC以外の複数の正常犬より、正常組織、腫瘍組織および発症個体のDNAとRNAをそれぞれ抽出し、特にマクロファージの増殖や機能に関連する遺伝子のうち主要白血球抗原Class II遺伝子の他、マクロファージ/B細胞の増殖に関連する遺伝子群の異常の有無を検討する。また組織球性肉腫の組織より、異常増殖をしめす腫瘍細胞をマイクロダイゼクション法により単離し、腫瘍細胞よりDNAを抽出して、上記遺伝子異常を確認する。以上の研究については、すでにサンプリングや候補遺伝子の絞り込みを実施している。

本研究を通じ、PWCの組織球性肉腫の発生に関与する遺伝的異常が解明できれば、バーニーズ・マウンテン・ドッグ等の他の犬種の組織球増殖性疾患の病理発生解明にも応用が可能である。また、原因遺伝子の解明により生前の遺伝子検査も実施することができ、キャリア犬の事前摘発による不適切な繁殖の予防も可能となる。肥満細胞腫や消化管間質腫瘍(GIST)におけるcKit異常の発見とイマチニブ開発の例のように、原因遺伝子の生理的機能やカスケードがある程度判明している場合は、標的分子により特異的に作用する抗がん剤開発にも発展させることが可能と考えている。小動物臨床の現場では、イヌの組織球増殖疾患に遭遇する機会は比較的多いが、ヒトにおける本疾患の発生は極めて稀であり、医学領域でも、その病理発生が十分解明されていない。このような観点より本研究課題は、組織球増殖疾患病態解明のための情報を臨床獣医領域より提供しうる特色ある研究と考えた。

3. 研究の方法

これまでの申請者らが病理組織学的検索により、組織球性肉腫と診断し現在、経過観察あるいは治療中のベンブローク・ウェルシュ・コーギー犬 (PWC)、正常な PWC、および PWC 以外の複数の正常犬の血液より DNA と RNA をそれぞれ抽出し、主要白血球抗原 Class II 遺伝子、マクロファージ/B 細胞の増殖に関連する遺伝子群について異常の有無を検討する。

また組織球性肉腫の組織より異常増殖をしめす腫瘍細胞をマイクロダイゼクション法により単離・DNA を抽出して、上記遺伝子の異常の有無について確認する。

さらにより詳細な *in vitro* 研究のため、PWC 犬の組織球性肉腫の腫瘍細胞を細胞株化し、上記の研究で異常が確認された遺伝子異常の有無を確認することとした。

4. 研究成果

本研究の対象疾患ごとに以下に研究成果を記載する。

(1) 変性性脊髄症

平成 27 年度には、コーギー犬の変性性脊髄症におけるオートファジーの異常に関する研究成果を *Veterinary Pathology* 誌に公表した(論文)。SOD1 変異をもつ変性性脊髄症に罹患したコーギー犬では、正常犬と比較してウェスタンプロティング法および免疫組織化学的検索のいずれの方法によっても、LC3 などのオートファジー・マーカーの発現あるいは染色性が減弱しており、異常な SOD1 の蓄積に対してオートファジー機能が罹患犬では十分機能していないことが示唆された(表 1)。さらに、ヒトの筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と本疾患

のマウスモデルとして使用される SOD1 変異マウスにおけるこれらのオートファジー・マーカーの局在について比較したところ、これらの 3 者では、神経細胞体の変化やこれらのマーカーの局在に相違があることが明らかになった(表 2)。

	No. ^a	Beclin 1		Atg16 L		p62		LC3-II/LC3-I	
		GM	WM	GM	WM	GM	WM	GM	WM
All dogs	10	-0.53	0.05	-0.66	-0.8	0.64	0.59	0.71	0.76
DM cases excluded ^b	6	-0.49	0.74	0.07	-0.7	-0.77	-0.03	0.27	0.16

Abbreviations: GM, gray matter; LC3, microtubule-associated protein light chain 3; p62, p62/A170SQSTM1; WM, white matter.
^aNumber of PWC and beagle dogs examined for which the age was known.
^bDogs with degenerative myelopathy are not included.

表 1. ウェスタンプロット法による各種オートファジー・マーカーの発現率の正常犬と変性性脊髄症罹患 PWC 犬の比較(論文 より)

	Amyotrophic Lateral Sclerosis (Sporadic)	Canine Degenerative Myelopathy ^a	SOD1 ^{G203A} Mice
LC3	Inclusion bodies, neuronal somata ²¹	Neuronal somata, neurites	Neuronal somata ¹³
p62	Inclusion bodies ²¹	Neuropil as foci	Neuronal somata ²
NBR1	No data	Neuronal somata, astrocytes	No data

^aResults of the present study.

表 2. PWC の変性性脊髄症、ヒトの ALS および SOD1 変異マウスにおける神経細胞体の変化と各種オートファジー・マーカーの局在の相違(論文 より)

また、研究計画に予定した TDP-43 については、本疾患における異常は確認できず、TDP-43 の異常は本犬種の変性性脊髄症に関連しないと思われる。なお本疾患については新規症例を剖検症例として検索する機会を得た。今後、筋組織や末梢神経組織の異常について検討すべく、組織の冷凍保存などをおこなった。また平成 28 年度は新たに 3 例の剖検例を加えることができた、該当年度には、ミトコンドリア特異的なオートファジーであるミトファジー関連分子について検証を進めたが有意なデータは得られていない。

(2) 組織球性肉腫

東京大学動物医療センターを受診したイ

又の組織球性肉腫の犬種別罹患率を調査したところ、本疾患の好発犬種と海外でもよく知られている、フラットコートドレトリバー、バーニーズ・マウンテン・ドッグに次いで、ベンブローク・ウェルシュ・コーギー犬 (PWC) における発生が多いことが確認できた (表 3)。海外では PWC は必ずしも本腫瘍の好発犬種とは考えられていないことから、この傾向は日本独特のものであることが予想される。この内容は 2014 年に国内の学術雑誌に公表した (論文)

Breed	Number of dogs	Odds ratio	95% CL
Flat-Coated Retriever	16	62.0	37.6–102.3
Pembroke Welsh corgi	15	9.7	5.6–17.0
Bernese Mountain dog	14	45.0	26.3–77.2
Golden Retriever	8	5.0	2.4–10.3
Labrador Retriever	6	3.0	1.3–7.0
Others	14		

CL: Confidence Limits

表 3 .東京大学動物医療センターにおける犬種別の組織球性肉腫の発生率 (論文 より)

また犬の組織球性肉腫 54 例を CNS 原発組織球性肉腫 (n = 23) と非 CNS 原発組織球性肉腫 (n = 31) の 2 群に分類し、臨床事項について回顧的に検証するとともに病理組織学的ならびに免疫組織科学的に検索した。検討の結果、CNS 組織球性肉腫は、PWC に有意に多く、一方非 CNS 組織球性肉腫はフラット・コートド・リトリバーに多く認められた。

免疫組織化学的に腫瘍細胞における DC/マクロファージマーカーの発現状態を検索したところ、全 54 例で HLA-DR, Iba-1 および CD204 に腫瘍細胞が陽性であり、CD163 (42 例) lysozyme (22 例) S100 (17 例) および CD208 (25 例) に陽性の腫瘍細胞が確認された。これらのマーカーの発現状況の検討から CNS 組織球性肉腫は高頻度に

マクロファージマーカーを発現し、非 CNS 組織球性肉腫は DC マーカーを発現する傾向があった。また、CNS 原発と非 CNS 原発組織球性肉腫の基本的な組織形態は類似しているものの、腫瘍細胞の分裂活性は、CNS 原発組織球性肉腫で有意に高く (P<0.05) その生物学的挙動が非 CNS 組織球性肉腫と比較して悪性であると予想された。この研究成果は 2016 年に国内の学術雑誌に公表した (論文)

これらの犬の組織球性肉腫関連の病理検索より派生して、多種動物の組織球性肉腫を収集したが、2016 年にはフェレットにおける組織球性肉腫の病理学的特徴を複数例検索し、これについても海外の学術雑誌に公表した (論文)

本研究の開始時より継続して取り組んでいた組織球性肉腫由来の Cell line 樹立については、2 種の異なる種類の組織球性肉腫の組織培養により cell line を確立できた。PWC の髄膜に原発した組織球性肉腫に由来する cell line (PWC-HS01) とフラットコートドレトリバーの関節原発組織球性肉腫に由来する cell line (FCR-HS02) をそれぞれ樹立・定性を行った。

検索の結果、細胞形態に株間で相違はなかったが、免疫組織化学および培養細胞の mRNA 解析の結果、PWC-HS01 は、in vivo, in vitro において常に CD204 (マクロファージマーカー) を発現しているのに対し、FCR-HS02 ではこの発現が認められなかった (図 1)。この結果より、PWC-HS01 はマクロファージと DC のいずれの細胞にも分化可能な未分化細胞であり、一方、FCR-HS02 は DC への分化が決定づけられた細胞であると推察された。

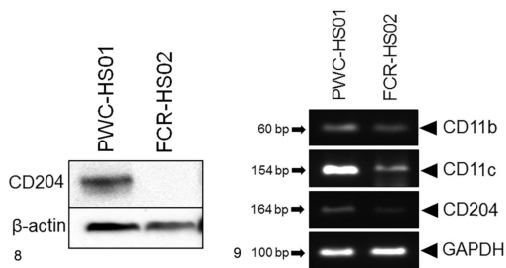


図1. 樹立した2種類のCell lineにおけるCD204mRNAの発現状態の相違(論文より)

また SCID マウスへの移植試験ではいずれの細胞株もマウスへの移植が可能であり原発腫瘍の組織学特徴を反映した腫瘤を形成するとともに、いずれも転移能を有していることが確認された。以上よりこの2種の細胞株は、組織性肉腫の由来の研究や治療薬開発に貴重なツールとなることが示された。これらのCell lineの定性・比較を行った論文は2017年に公表するとともに(論文)、米国の獣医病理学会で口頭発表した(口頭発表)。

これに加え平成28年度新たに、犬の皮膚ランゲルハンス細胞性組織球症に由来する細胞の収集と連続継代に成功した。これまでに樹立した2種の細胞株に加え、ランゲルハンス細胞性組織球症由来のCell lineを新たに確立することで、犬の多様な組織球増殖疾患のCell lineの必要最低限の種類が準備できた。詳細な細胞定性は研究期間の最終年度である平成29年度に継続して実施しているが、犬のランゲルハンス細胞性腫瘍に由来するCell lineの性状と本研究期間にすでに樹立したウェルシュコーギーの髄膜組織球性腫瘍由来のCell line、およびフラットコートドレトリバーの関節組織球性腫瘍由来のCell lineと比較では、基本的に後者の2株は、E-Cadherinの発現が認

められないのに対し、ランゲルハンス細胞由来のcell lineではE-cadherinの発現が維持されていた。ランゲルハンス細胞由来のCell lineについてはこれまで樹立された報告がなく、今後犬の組織球性腫瘍の発がんメカニズムや治療法の検証のための有用な研究ツールになると予想される。この成果については、近く海外学術雑誌に公表する予定である。

(3) 多発性筋炎

ベンブローク・ウェルシュ・コーギー犬(PWC)に特徴的な舌萎縮を特徴とする炎症性筋症については、研究期間中、新規症例の追加が生検・剖検のいずれもなかった。このため本犬種の変性性脊髄症による神経原性筋疾患と筋原性筋疾患について、すでに保存されているホルマリン固定パラフィン包埋組織を利用して、これらの基本的な病変の相違を免疫組織化学的手法により描出する方法を検証した。この目的でまず、slow-myosin および fast-myosin により遅筋と速筋のモザイク構造の確認し、さらにNestin, Myogenin 等の筋芽細胞のマーカーにより再生筋の評価を追加することにより、パラフィン標本でも筋原性筋疾患と神経原性筋疾患を形態学的に分類することが可能になった。これらの結果は海外の学術雑誌に公表した(論文)。

また、本研究によりPWCの変性性脊髄症の筋病変は、比較的典型的な神経原性筋萎縮の特徴を示すことから、SOD1の変異は、神経系組織の異常を誘発するものの、筋組織の直接的な傷害には関与しないものと予想された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文等 計 6 件]

Takahashi M, Tomiyasu H, Hotta E, Asada H, Fukushima K, Kanemoto H, Fujino Y, Ohno K, Uchida K, Nakayama H, Tsujimoto H. Clinical Characteristics and Prognostic Factors in Dogs with Histiocytic Sarcomas in Japan. J Vet Med Sci. 2014, 76(5): 661-666, 2014, doi: <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0414>、査読有

Ogawa M, Uchida K, Yamato O, Mizukami K, Chambers JK, Nakayama H. Expression of autophagy-related proteins in the spinal cord of Pembroke Welsh Corgi dogs with canine degenerative myelopathy. Vet Pathol. 52(6):1099-1107, 2015, doi: 10.1177/0300985815570070. Epub 2015 Mar 2., 査読有

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*). J Vet Diagn Invest. 28(2): 165-170, 2016, doi: 10.1177/1040638715626485, 査読有

Thongtharb A1, Uchida K, Chambers JK, Kagawa Y, Nakayama H. Histological and immunohistochemical studies on primary intracranial canine histiocytic sarcomas. J. Vet. Med. Sci. 78(4):593-599, 2016, doi: 10.1292/jvms.15-0627. Epub 2015 Dec 12

Thongtharb A, Uchida K, Chambers JK, Nakayama H. Variations in Histiocytic Differentiation of Cell Lines From Canine Cerebral and Articular Histiocytic

Sarcomas. Vet. Pathol. 54(3):395-404, 2017. doi: 10.1177/0300985817690211.

Epub 2017 Feb 8., 査読有

Shiga T, Uchida K, Chambers JK, Nakayama H. Immunohistochemical analysis of canine and feline muscle disorders using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. J Vet Diagn Invest. 29(6): 805-813. 2017, doi: 10.1177/1040638717715287. Epub 2017 Jun 9., 査読有

[口頭発表 1 件]

Thongtharb, K. Uchida, J.K. Chambers, and H. Nakayama. Pathological study on primary leptomenigeal histiocytic sarcoma in dogs. 2015 ACVP/ASVCP/STP Combined Annual Meeting (国際学会). 2015年10月17日～2015年10月21日. ミネアポリス、ミネソタ州、アメリカ合衆国

[その他]

該当なし。

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

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