

平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07736

研究課題名(和文) 犬の肥満細胞腫における新たな分子標的候補遺伝子に関する基礎的な検討

研究課題名(英文) Basic research of new molecular target genes in canine mast cell tumor

研究代表者

富張 瑞樹 (TOMIHARI, MIZUKI)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：00552754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：犬の肥満細胞腫は皮膚悪性腫瘍の中で最も一般的な腫瘍である。これに対し我々は、同腫瘍の家族性発症が疑われる症例群(F群)に遭遇し、マイクロアレイ解析と既報をもとに、13種の候補遺伝子を想定した。これらに対しmRNAの定量解析を行ったところ、F群においてPRKCE、PPP2R1A、CD3E、C6の4種の遺伝子に有意な差異を認めた。とくにPRKCEとC6に注目して解析を進めたが、遺伝子配列には有意な変異は認められず、この差異は周囲の反応に影響されたものと思われた。本検討により、肥満細胞種の発症への関与が示唆される4種の遺伝子が新たに見出された。今後、さらに詳細な解析が期待されるものである。

研究成果の概要(英文)：Mast cell tumor (MCT) is most common skin malignant tumor in dogs. We encountered the dogs to be suspected as a familial MCT (F group), and assumed 13 candidate genes that might be related to MCT onset, according to our DNA microarray analysis and previous report. As we examined a quantification of mRNA in MCT tumors for these 13 genes, we found 4 genes, PRKCE, PPP2R1A, CD3E, C6, had a significantly different mRNA level in F group compared to other MCTs. We focused PRKCE and C6, however these cDNA sequencing revealed no significant mutations among these genes. Therefore, these different mRNA levels might be affected by surrounding conditions in MCT. In this study, there were new 4 candidate genes suspected to association with familial MCT onset. Further analysis is required for the clarification of the mechanism.

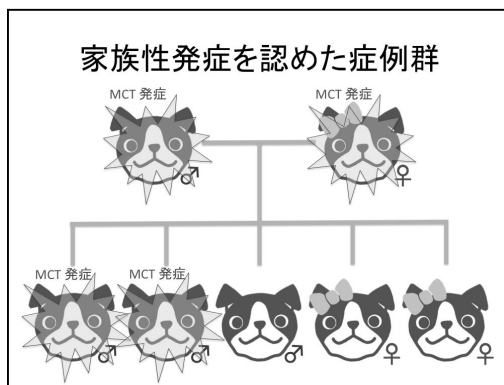
研究分野：腫瘍学、獣医外科学

キーワード：犬 肥満細胞種 遺伝子 家族性発症

1. 研究開始当初の背景

犬の肥満細胞腫 (Mast cell tumor: MCT) は、皮膚に発生する悪性腫瘍の中で最も一般的に (7-27%) 認められる腫瘍であり、周囲組織への浸潤、再発、また近傍リンパ節への移行、遠隔転移などを起こしやすい難治性疾患のひとつである (転移率: 10->95%)。またとくに、ブルドッグ由来の犬種 (ボクサー、ボストン・テリア) や、ゴールデン・レトリバーなどの特定の犬種で好発することが報告されている。最も重要な予後因子は組織学的グレードであるとされており、古典的には Patnaik の分類を用いた3段階の分類法が使用されてきたが、より精度の良い指標として、Kiupel らの分類 (2012) や、Ki67、AgNOR、PCNA などを用いた新たな病理組織学的分類が検討・報告されてきている。従来の治療法 (外科的切除、化学療法、放射線療法) に加え、後述する分子標的薬の併用などが高い奏功性を示してはいるが、高グレードの症例ではそもそも治療への反応性自体が乏しく、新たなブレイクスルーが待望されているのが現状である。

これに対し我々は、2009年から2013年までの間に、家族7頭のうち父母を含む4頭においてMCT発症を認めたフレンチ・ブルドッグの症例群と遭遇した。この4頭のうち父を含むオスの3頭はすべて鼠径部に多発性に腫瘍が認められ、発生の仕方や場所、悪性度が高い点など様々な共通点があり、また家族内における発生率も高かったことから、本症例群におけるMCTの**家族性発症**を疑うに至った。



MCTに関する2014年当時の研究動向の特徴として、KIT 蛋白質の遺伝子変異、ならびに阻害剤/分子標的薬に関する報告が著しく多い。London らが、犬肥満細胞腫における c-kit 遺伝子の変異により SCF 非依存的に増殖シグナル (リン酸化) が恒常的に発生し、結果として腫瘍化することを報告して以来 (1996, 1999)、この機序をブロックする目的で KIT 阻害剤 (Imatinib, Toseranib, Masitinib) の臨床応用が進んだ。さらに川畑らは、肥満細胞腫細胞株に対する網羅的な解析を試み、KIT 遺伝子自体の変異のみならず、p27Kip1

と NFκB-p65 などといった KIT によりリン酸化修飾を受ける周辺の蛋白質も、今後の治療・診断の標的分子候補となり得ることを報告している (2012)。

これらを受けて我々は、上述の家族性発症を認めた4頭のうち、症例群として父と子の2頭 (F 群)、またコントロール群として F 群とは全く遺伝学的に関連のない MCT 症例犬の3頭 (C 群)、計5頭の cDNA に対し、全ての c-kit 遺伝子配列の解析を行うとともに、c-kit に依存しない異なる原因を探るため **DNA マイクロアレイ解析**を行った。この結果、5頭全てにおいて c-kit 遺伝子の変異は認められなかったが、アレイ解析により、F 群の発現量が C 群の発現量に比較して高い (8倍以上) 遺伝子が93種類認められた。また、F 群の発現量が C 群の発現量に比較して低い (1/8以下) 遺伝子は7種類認められた。このうち、既に腫瘍との関連が報告されている遺伝子は9種類であった。これらより、とくに F 群において mRNA の発現に異常を認める候補遺伝子 (9種) の情報を得ることができた (平成 26 年度日本獣医師会学術大会で発表)。

我々と並行して、同様の研究が Giantin ら (2014) により報告されている。彼らは、犬肥満細胞腫を自然発症した51頭から採材した腫瘍組織に対し、全く同様のチップを用いた DNA マイクロアレイ解析を行い、450種類の発現亢進した候補遺伝子と、147種類の発現低下した候補遺伝子を認め、このうち13種類を選んで発現量と予後の相関を検討し、FOXO1、GSK3β、FEN1、KIP1 の4種において顕著な相関を認めたことを報告している。この13種類の候補遺伝子は、我々が得た F 群に特異性の高い9種の候補遺伝子とはまったく重複しておらず、家族性発症に特徴的な発現動態であることが裏付けられた。

これらを踏まえて我々は、上述の候補遺伝子に対し、まず症例の腫瘍組織由来 cDNA における発現動態の解析を行うものとした。さらにこの結果を踏まえ、有望と思われる候補遺伝子を絞り込み、家族性発症を認めた症例群 (生存する個体を含む) において、mRNA レベルでの遺伝子配列解析を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、家族性発症の疑われたフレンチブルドッグの症例群において、原因となる候補遺伝子の解析と、その発症機序の新たな解明を目指すものである。

3. 研究の方法

(1)症例群の設定

家族性発症を疑ったフレンチブルドッグの症例2頭から得られたサンプルをF群、またF群とは全く遺伝学的に関連のないMCT症例犬14頭から得られたサンプルをC群とした。さらに、MCTと比較するその他の腫瘍発生群として、MCT以外の腫瘍発生犬20頭(メラノーマ9、移行上皮癌1、血管周皮腫1、混合型肝細胞/胆管癌1、乳腺癌3、乳腺腺腫1、平滑筋腫2、腺癌2)をO群とした。

また、C群の14症例のうち、手術または生検実施後の経過を追えた症例について4ヶ月以内(120日以内)に死亡したものを予後不良、それ以外を予後良好として、予後不良であった症例群をCb群(n=7)、予後良好であった症例群をCg群(n=7)とした。

(2)候補遺伝子の選定

我々が同定した候補遺伝子9種は以下の通りである。

- ・ F群の発現量が、C群の発現量に比較して高い(8倍以上)ポジティブ候補遺伝子(93種類)のうち、腫瘍に関連した報告のある7種類(PRKCE, PPP2R1A, CD3E, ERCC1, DOK2, GIMAP4, SYK)
- ・ F群の発現量がC群の発現量に比較して低い(1/8以下)ネガティブ候補遺伝子(7種類)のうち、腫瘍に関連した報告のある2種類(C6, SLC1A3)

Giantinら(2012)が報告した候補遺伝子13種は以下の通りである。

- ・ Patnaikの分類とKiupelの分類を複合し、高分化型、低分化型の2分類に分け、この分類と候補遺伝子の発現量との相関性が強かった13種の候補遺伝子(CCNB2, CDC20, CDCA8, CDNPP, FEN1, FOXM1, GSN, KPNA2, NUF2, NUSAP1, PRC1, RAD51, UBE2S)
- ・ このうち、FOXM1, GSN, FEN1, KPNA2の4種は、とくに発現量と生存率(50ヶ月まで)において有意な相関が認められた。

上記の候補遺伝子それぞれに対し、参照されている配列を参考にリアルタイムPCR用のプライマーを設計した。リアルタイムPCRはこれまでと同様に、当研究室でプロトコルをもつライトサイクラー/Taqmanプローブのシステム(Roche Diagnostics, USA)を使用した。このためプライマー設計も当研究室の保有するUniversal Probe Libraryに適した配列を、アッセイデザインセンター(<https://qpcr.probefinder.com/organism.jsp>)にて設計した。

(3)犬肥満細胞腫の自然発症症例の腫瘍組織の採材

帯広畜産大学動物医療センターに来院された自然発症の肥満細胞腫症例、ないし他腫瘍症例に対し、臨床データを解析した。また症例の病期を追って継続的に採材し、初回外科的切除時、再発時、転移した組織、あるいは剖検時にいたるまで、病期ステージ分類に

対応させて可能な限り採材を継続した。

外科的切除により採材した腫瘍組織に対しては、一部をRNA later® Stabilization Solutionに浸した後、出来る限り迅速に液体窒素により瞬間凍結させ、-80℃にてmRNA用に保存した。

(4)腫瘍組織中の候補遺伝子mRNAの発現量の解析

保有している肥満細胞腫腫瘍組織よりcDNAを調整し、候補遺伝子ごとに設計したプライマーペアを用いてPCRにて増幅後、電気泳動にて増幅産物が目的の塩基長であることと、single-bandであることを確認した。同時にPCR産物をpositive controlとし、検量線を描くことでcopy数の絶対値を求めた。適切なプライマーペア、検量線を作成後、症例由来の肥満細胞腫腫瘍組織中の候補遺伝子mRNA量の絶対数(copy数)を定量、解析した。内部標準としては、GAPDH, Ribosomal protein L32, TATA box binding protein(TBP)の3種を用い、その適合性についてRefFinder(<http://www.leonxie.com/referencegene.php>)にて最適と判断したものを使用した。

(5)家族性発症を認めた症例群、ならびにブルドッグ犬種におけるmRNA遺伝子配列解析

候補遺伝子についてある程度絞り込んだ後、家族性発症を認めた症例群の腫瘍組織由来cDNA(2頭)に対し、ダイレクトシーケンス法にて特定候補遺伝子(PRKCEならびにC6)の遺伝子配列を解析した。Genebankの情報からexon-intronの配列を考慮し、プライマーペアを適切に設計してPCRにより増幅させ、ダイレクトシーケンスにより配列を解読した。

4. 研究成果

(1)プライマー設計

まず、候補遺伝子9種と内部標準マーカー3種とに対し、プライマーを設計し、これらによる増幅産物がシングルバンドであることを確認した(図1)。これらのプライマーペアを用いて、腫瘍組織中のmRNA量の解析を行った。

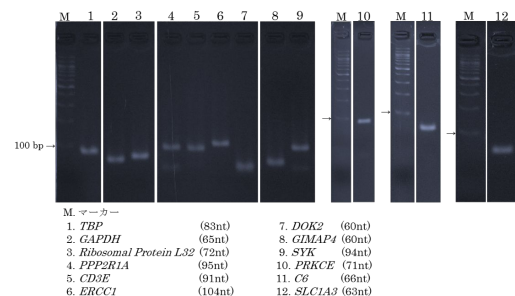


図1

(2)腫瘍組織中の候補遺伝子 mRNA の発現量の解析

F 群 vs C 群

我々が最初に着目した9種類の遺伝子について、より詳細な検討を行うことを目的として、F群におけるC群に対する発現傾向について比較を行った。図2.Aに7種類のポジティブ遺伝子、図2.Bに2種類のネガティブ遺伝子の結果を示した。

まず、ポジティブ遺伝子では、F群においてC群に対し、以前の報告と同様の発現増加傾向が *PPP2R1A* (約35倍) および *CD3E* (約5.1倍) の2種類の遺伝子で認められた。また、以前の報告とは異なるものの、F群においてC群に対し、*PRKCE* で顕著な発現減少傾向 (約 6.0×10^{-4} 倍) を、さらに *DOK2* において顕著ではないものの発現減少傾向 (約 9.1×10^{-2} 倍) を認めた。他の3種類の遺伝子についてはとくに傾向は認めなかった。

次に、ネガティブ遺伝子では、F群においてC群に対し、以前の報告と同様の発現減少傾向が *C6* (約 9.0×10^{-4} 倍) で認められた。*SLC1A3* についてはとくに傾向は認めなかった。

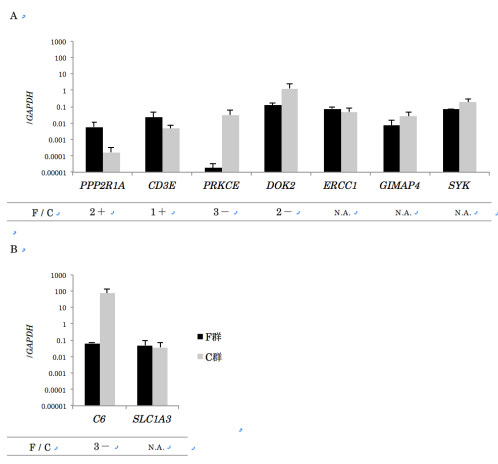


図2: F群とC群とのmRNA発現量の比較

A. ポジティブ遺伝子: F群においてC群に対し、*PPP2R1A* と *CD3E* で発現増加傾向が、*PRKCE* と *DOK2* で発現減少傾向が認められた。

B. ネガティブ遺伝子: F群においてC群に対し、*C6* で発現減少傾向が認められた。

棒グラフの下の表は、各遺伝子に対応しており、F群におけるC群に対する発現傾向を示した。1+, 2+, 3+ではそれぞれ5倍以上、10倍以上、100倍以上の差があったことを示した。また、1-, 2-, 3-ではそれぞれ1/5倍以下、1/10倍以下、1/100倍以下の差があったことを示した。また、N.A.は傾向がなかったことを示した。縦軸は対数で表している。

F 群 vs C 群 vs 0 群

次に、MCT 同士で比較を行うだけでなく、MCT 以外の腫瘍についても比較を行うことを目的として、F群における0群に対するの発

現傾向、ならびにC群における0群に対するの発現傾向についても比較を行った。図3.Aに7種類のポジティブ遺伝子、図3.Bに2種類のネガティブ遺伝子、図3.Cに *survivin* の結果を示した。

まず、7種類のポジティブ遺伝子の中では、F群においてC群のみならず、0群に対しても検討1と同様の発現増加傾向が *CD3E* (約6.5倍) で、また有意な発現減少が *PRKCE* (約 7.4×10^{-4} 倍) で認められた。また、F群において0群に対する発現増加傾向が *DOK2* (約22倍) および *SYK* (約7.5倍) の2種類の遺伝子で認められ、*SYK* については有意な発現増加であった。他の3種類の遺伝子ではとくに傾向は認めなかった。

次に、ネガティブ遺伝子では、F群において0群に対する発現減少傾向が *C6* (約 1.3×10^{-1} 倍) で認められた。*SLC1A3* についてはとくに傾向は認めなかった。

一方で、ポジティブ遺伝子の中で、C群において0群に対する発現増加傾向が *DOK2* (約237倍) および *SYK* (約20倍) の2種類の遺伝子で認められた。また、C群において0群に対する有意な発現減少が *PPP2R1A* (約 9.1×10^{-3} 倍) で認められた。

また、ネガティブ遺伝子の中ではC群において0群に対する発現増加傾向が *C6* (約145倍) で認められた。

多くの種類の腫瘍において一般的に上昇が認められている *survivin*[6,7]では、F群およびC群において0群に対し、ほぼ同等の発現量 (F群: 約 4.4×10^{-1} 倍、C群: 約4.7倍) であった。

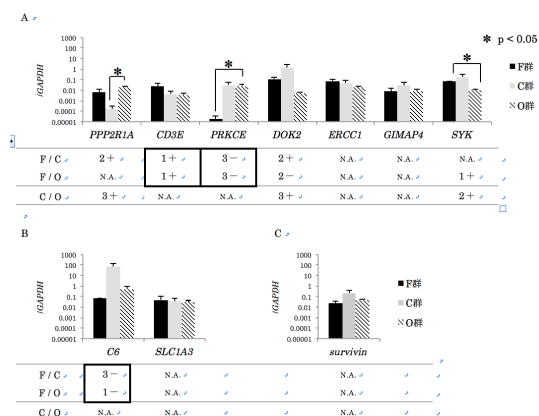


図3: F群、C群および0群でのmRNA発現量の比較

A. ポジティブ遺伝子: F群において0群に対し、*CD3E*、*DOK2* および *SYK* の3種類で発現増加傾向が、また *PRKCE* で顕著な発現減少傾向が認められた。

B. ネガティブ遺伝子: F群において0群に対し、*C6* で発現減少傾向が認められた。

C. *survivin* 遺伝子: 3つの群の間で傾向は認めなかった。

棒グラフの下の表は図2と同様に示した。さらに、およびで共通した発現傾向が認め

られた遺伝子については、太枠で囲んだ。縦軸は対数で表している。

F 群 vs Cb 群 vs Cg 群

さらに、MCT の家族性発症を認めた症例間で予後不良であったことが共通点としてあげられていたことから、これらの予後についても検討を行うことを目的として、F 群における Cg 群に対する発現傾向についての比較を行った。また、MCT として予後に関与している発現動態を示す可能性についても検討を行うことを目的として、Cb 群における Cg 群に対する発現傾向についての比較を行った。図 4.A に 7 種類のポジティブ遺伝子、図 4.B に 2 種類のネガティブ遺伝子の結果を示した。

まず、ポジティブ遺伝子の中では、F 群において Cg 群に対する発現増加傾向が *PPP2R1A* (Cg 群で発現量が 0)、*PRKCE* (約 5.5 倍) および *GIMAP4* (約 15 倍) の 3 種類の遺伝子で認められた。また、F 群における Cg 群に対する発現減少傾向が *SYK* (約 1.1×10^{-1} 倍) で認められた。

次に、ネガティブ遺伝子の中では、F 群における Cg 群に対する発現増加傾向が *SLC1A3* (約 34 倍) で、発現減少傾向が *C6* (約 2.9×10^{-2} 倍) で認められた。

一方で、ポジティブ遺伝子の中で、Cb 群において Cg 群に対する発現増加傾向が *PPP2R1A* (Cg 群で発現量が 0)、*PRKCE* (約 959 倍) および *GIMAP4* (約 7.8 倍) の 3 種類の遺伝子で認められた。また、Cb 群において Cg 群に対する発現減少傾向が *CD3E* (約 1.6×10^{-1} 倍) で認められた。

また、ネガティブ遺伝子の中で、Cb 群における Cg 群に対する発現増加傾向が *SLC1A3* (約 20 倍) で、発現減少傾向が *C6* (約 7.7×10^{-3} 倍) で認められた。

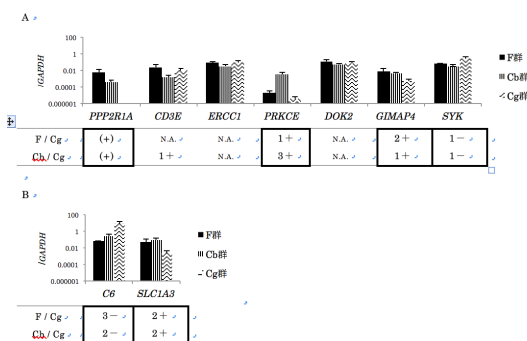


図 4 : F 群、Cg 群および Cb 群での mRNA 発現量の比較

A. ポジティブ遺伝子: F 群において Cg 群に対し、*PPP2R1A*、*PRKCE* および *GIMAP4* の 3 種類で発現増加傾向が、また *SYK* で発現減少傾向が認められた。一方、Cb 群で Cg 群に対し、*PPP2R1A*、*PRKCE* および *GIMAP4* の 3 種類で発現増加傾向が、また *CD3E* および *SYK* の 2 種類で発現減少傾向が認められた。

B. ネガティブ遺伝子: F 群および Cb 群の両群において Cg 群に対し、*SLC1A3* で発現増加傾向が、また *C6* で発現減少傾向が認められた。棒グラフの下の表は、図 2、3 と同様に示した。さらに、F 群と Cb 群とで共通した発現傾向が認められた遺伝子については太枠で囲んだ。

PRKCE ならびに C6 の cDNA 配列に関するシーケンス結果

上記結果より、とくに差が大きかった PRKCE に着目し、F 群の 2 症例、ならびに C 群の 2 症例における cDNA 配列に対しダイレクトシーケンスを行った。この結果、PRKCE では 2 箇所のサイレント変異、C1674T (サイレント Leu) および C504A (サイレント Gly) が認められた。

またネガティブ遺伝子である C6 においても同様の解析を行ったが、3 箇所のサイレント変異 T302A (サイレント Leu)、T1997A (サイレント Val)、A2420T (サイレント Thr) のみが認められた。

Giantin らの候補遺伝子に関する検討

Giantin らの報告している FOXM1、GSN、FEN1、KPN2 の 4 種の候補遺伝子について、F 群ならびに C 群との比較を行った。しかしながら、これら 4 種において、両群における有意な差異は認められなかった。(図 5)

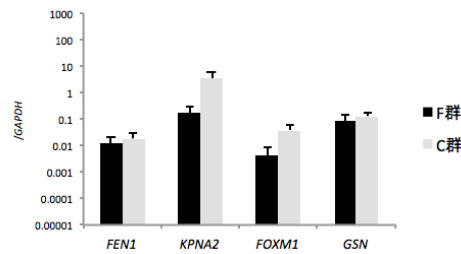


図 5

考察

で、F 群において C 群に対する発現傾向が、以前の報告と同様であった遺伝子は *PPP2R1A*、*CD3E* および *C6* の 3 種類であった。とくに、以前の報告とは異なる発現傾向を認めた遺伝子は *PRKCE* と *DOK2* の 2 種類であり、これらはどちらもポジティブ遺伝子であったにも関わらず、F 群において C 群に対する発現減少傾向が認められた。さらにこれら 2 種類の遺伝子における F 群と C 群との発現量の差異は大きいものであったことから、F 群の家族性発症との関連性は高いものと考えられた。

では、*CD3E*、*PRKCE* および *C6* の 3 種類の遺伝子で、F 群において C 群のみならず 0 群に対しても検討 1 と同様の発現傾向が認められた (図 3 中の太枠)。一方で、*PPP2R1A* と *DOK2* の 2 種類の遺伝子では、F 群において C 群に対して認められた発現傾向は 0 群に対しては認められなかった。これらのことから、

CD3E, PRKCEおよびC6の3種類の遺伝子では、MCTのみならず他の腫瘍との比較においても、F群の家族性発症に特徴的な発現動態を示すものと考えられた。

では、PPP2R1A, PRKCE, GIMAP4, SYKおよびC6の5種類の遺伝子で、Cg群と比較してF群とCb群の両群に共通の発現傾向が認められた。これらのうち、PRKCEについては、Cb群での発現量が突出して高く（F群に対し174倍、Cg群に対し959倍）、Cg群に対する共通の傾向というよりはむしろ、Cb群のみに突出した発現増加傾向であるものと考えられた。F群の2症例自体はどちらも予後が悪いものであったことから、PRKCEを除いたPPP2R1A, GIMAP4, SYKおよびC6の4種類の遺伝子は、F群ならびにMCTにおける予後不良因子となっている可能性が考えられた。

から の結果を通して考えると、とくにC6において、F群の家族性発症との関連性が高いことに加え（ ）、F群における予後不良因子となっている可能性（ ）も示唆されたことから、C6はF群の家族性発症の原因究明につながる可能性が高い遺伝子であると考えられた。また、CD3EおよびPRKCEの2種類の遺伝子では、 の結果よりF群における予後不良因子である可能性は低いものと考えられたが、 および においてF群に特徴的な発現傾向を認めたことから、F群の家族性発症に何らかの形で関与している可能性が考えられた。

これらの点を踏まえて、著しい差のあったポジティブ遺伝子であるPRKCE、ならびに有意な差を認めたネガティブ遺伝子であるC6にそれぞれ着目し、ダイレクトシーケンスによりmRNA遺伝子配列を解読した。しかしながら、F群の2症例においては、どちらの遺伝子においてもサイレント変異のみで有為な変異を認めなかった。このことは、これら遺伝子の周辺における影響が、PRKCEならびにC6の発現を変化させている可能性が考えられた。

今回の研究からは、C6, CD3EおよびPRKCEの3種類の遺伝子でF群の家族性発症との関連性が高いことが考えられた。とくに、C6ではF群における腫瘍増悪因子である可能性も示唆されたことから、C6の発現動態が変化することが、F群との関連性が非常に高いものと考えられた。

しかしながら、今回の研究はmRNAの発現量のみでの検討であったことから、遺伝子配列解析やタンパク発現解析などのより詳細な解析を行い、F群における遺伝的素因の関与についてさらなる検討を重ねる必要があるものと考えられた。今後、様々な角度から研究を継続していくことで、F群においてのみならず、MCT全体においても遺伝的素因との関連性が明らかになっていくものと考え

られた。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 2件)

Tagawa M, Yamamoto Y, Shimbo G, Iguchi A, Xuan X, Tomihari M, Miyahara K. *J Vet Med Sci*. 2017 May 18;79(5):871-875. doi: 10.1292/jvms.16-0583. 査読あり
Gene and protein expression of a soluble form of CTLA-4 in a healthy dog.

Mie K, Tomihari M, Hoshi K, Nakamura T, Yamaguchi T, Miyahara K, Shimada T. *J Vet Med Sci*. 2016 May 3;78(4):579-85. doi: 10.1292/jvms.15-0626. 査読あり
Influence of transfusion of lymphokine-activated T killer cells on inflammatory responses in dogs after laparotomy.

〔学会発表〕(計 0件)

〔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〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

富張 瑞樹(TOMIHARI MIZUKI)
帯広畜産大学・獣医学研究部門・臨床獣医学分野・伴侶動物獣医療学系・准教授
研究者番号: 00552754

(2)研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕
なし

〔その他の研究協力者〕
なし