

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14863

研究課題名(和文) 犬種特異的大腸ポリープの病理発生解明に関する研究

研究課題名(英文) Pathogenesis of canine breed-specific colorectal polyps

研究代表者

中山 裕之(Nakayama, Hiroyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：40155891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は犬種特異性のある消化管腫瘍の病理発生を解明することを目的に実施した。ジャックラッセル・テリアでは若年発生で広範囲で多発することが確認された。ミニチュアダックスフンドの炎症性ポリープは犬種特異的であり、腫瘍化にはCOX IIやFGF II等の因子が関連すると考えられた。Polypoid typeの腫瘍はBeta-cateninの核内発現が高く、Beta-catenin/Wntシグナル経路を介した機構が関与していると考えられた。一方non polypoid typeの腫瘍は正常な上皮細胞から直接癌細胞が悪性転化して発生するde novo癌であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to elucidate the pathogenesis of canine gastrointestinal epithelial tumors. The study revealed that gastrointestinal tumors in Jack Russell Terriers can occur from a young age, thorough the stomach and rectum, suggesting some genetic background in the canine breed such as the mutation of APC gene mutation. Inflammatory polyps of the Dachshund dog breed was also considered as a breed specific diseases, and COX II and/or FGF-II may play the important role on their progression and malignant transformation. The intra-nuclear expression of Beta-catenin found frequently in the polypoid growth type of epithelial tumors, suggesting tumorigenesis via the beta-catenin/Wnt signaling pathway. Besides, the absence of beta-catenin expression in carcinomas of non-polypoid growth type, such as signet ring cell carcinomas, might indicate that the de novo carcinogenesis in which the malignant transformation occur directly from normal epithelial cells.

研究分野：獣医病理学

キーワード：大腸ポリープ 腺腫 腺癌 ミニチュアダックスフント ジャックラッセルテリア 犬

1. 研究開始当初の背景

小動物医療分野において内視鏡検査が普及し、特に2次診療施設においては、一般的な消化器系疾患の検査ツールとなっている。特にイヌではタンパク漏出性腸症を示す慢性炎症性疾患や低グレードリンパ腫とならび大腸のポリープ病変を経験する機会が非常に多い。ヒトにおいても大腸ポリープは大腸癌の前駆病変として非常に重要であり、従来から家族性ポリポーシスの様に遺伝的背景をもつ病態も知られている。イヌにおける大腸ポリープの発生は、特にミニチュア・ダックスフントに多く、次いでジャックラッセル・テリアに多い傾向がみられるが、これらの犬種における大腸ポリープの臨床病理的特徴には大きな相違が認められる。すなわち前者では局所の炎症を背景に腺上皮の増殖が生じるのに対して、後者では若年より消化管の各所に多発性の腺腫としてポリープが形成される。この相違はそれぞれの疾患の病理発生機構の相違を反映していると考えられ、犬種特異性が高い現象であることから、それぞれの遺伝的背景に起因する可能性が非常に高い。本研究ではこの点に着眼し、これらの2犬種におけるポリープ病変の病理発生を解明することを目的とした。

2. 研究の目的

日本で飼育されているミニチュア・ダックスフントの大腸ポリープは重度の炎症病変を背景とする病態であるが、国内の本犬種では異物に対し過剰な肉芽腫形成を示す症例が存在することが良く知られている。縫合糸肉芽腫等は、その代表的な病態と考えられる。本犬種でなぜこのような過剰な炎症反応が生じるのかについては解明されていない。

申請者らは細胞内寄生性の細菌感染による肉芽腫形成に関連の深いインターフェロン・ガンマ (IFN γ) 等の異常が本犬種には存在するのではいかと推測した。本犬種の大腸ポリープについては症例の蓄積が進んでいることから、これらのサイトカインの異常について研究期間内に明らかにするとともに、マウスモデルによる疾患モデル作出を行う。一方ジャックラッセル・テリアの病態はヒトの家族性腺腫性ポリポーシスと類似点が多いため、本犬種には APC 遺伝子異常などが遺伝的背景として存在する可能性が高いと推測しており、この点を明確にすることを研究期間内の到達目標とした。

本研究で対象疾患とするミニチュア・ダックスフントの大腸ポリープとジャックラッセル・テリアの多発性腺腫性ポリープ症は、世界的には確立した疾患概念ではない。国内では高い発生頻度があるにも関わらず、海外より類似の症例報告が殆ど認められないことより、日本国内でブリーディングされた犬に特有にみられる現象である可能性が高い。このため本研究の結果、それぞれの疾患に関する原因遺伝子が特定できれば、世界的に

も非常にユニークな情報を発信しうるのみならず、予防医学的観点よりこれらの疾患の低減に寄与できる。さらに本研究の結果を基礎データとして将来的にはヒトの類似疾患のモデル動物として確立し、より効果的な新規治療方法を検討することにより、医学領域にも有用な情報を提供しうると考えた。

3. 研究の方法

本研究では、ミニチュア・ダックスフントの大腸ポリープとジャックラッセル・テリアの腺腫性ポリープ症についてそれぞれ、病態把握を目的とする病理形態学的検討、ポリープ内および周囲正常組織における細胞増殖関連分子および炎症性サイトカインの発現状態の検討、罹患個体のゲノム解析、遺伝子改変げっ歯類モデルによる病態の再現をそれぞれ行った。一連の研究遂行は、申請者の研究室 (東京大学獣医病理学研究室) が主体となり実施したが、臨床症例の組織や血液の収集には、東京大学動物医療センター (VMC)、日本動物高度医療センター (JARMeC) および日本小動物医療センター (JSAMC) の協力を得た。以下に疾患別の研究計画方法を記載する

(1)ミニチュア・ダックスフントの大腸炎症性ポリープ

病理形態的特徴の把握：過去に申請者らの研究室に集積された症例を回顧的に検討し、本疾患の病態の進行による病理像の変化を把握する。特に炎症の進行と上皮細胞増殖あるいは癌化に注目して検討する。

増殖関連分子の発現状況：ポリープ病巣および周囲粘膜の上皮細胞における COX II、カテニン、E-カドヘリン、APC、P53 等の細胞増殖調整分子の発現状況を調査し、Win シグナルや COX II の経路中心にその癌化のメカニズムを推測する。

病原因子の有無の検討：～ の検討は、ポリープ形成から癌化への進行過程を重視した検討となるが、ポリープ形成のトリガーについては解明されていないため、病理組織学的に病変部および周囲粘膜におけるらせん菌あるいは細胞内寄生性細菌の有無について検証する。

サイトカイン発現状況：先行研究として、すでに toll-like receptors や IL-1, IL-6, IL-8/CXCL8, あるいは TNF- α 等のサイトカインの mRNA については検討した結果が公表されているため、本研究では特にインターフェロン (IFN) の および の mRNA の発現状況について、ポリープ内および周囲粘膜でそれぞれ調査し、可能であれば免疫組織化学的に組織内の分布状況を把握する。

罹患動物のゲノム解析：大腸ポリープの罹患犬および非罹患犬について血液より DNA を採取し、IFN 等の炎症に関連する遺伝子について集中的に検討し、大腸ポリープ罹患犬に特異的な遺伝子変異の有無を調査する。特異

的な遺伝子変異が確認された場合は、簡易な検出方法を検討して、多症例によるスクリーニングを実施し、国内における本遺伝子変異の浸透状況を把握する。

遺伝子改変マウスによる病態再現実験：の結果にもとづき IFN 等に変異が確認できれば、これまで開発されたノックアウトマウス（IFN 欠損マウス等）を用いて、デキストラン硫酸 ナトリウム（DSS）等の大腸炎誘発化学物質で暴露し、その病態の再現を試みる。

(2) ジャックラッセル・テリアの腺腫性ポリープ症

病理形態的特徴の把握：本犬種におけるポリープは多発性の腺腫形成を基本病変とするが、ヒトの腺腫性ポリポーシスでは、大腸病変が癌化すると考えられている。このため本犬種のポリープについて、形成部位による形態的特徴を比較検討し、ヒトの類似疾患との相同性を明確にする。

増殖関連分子の発現状況：上記のミニチュア・ダックス同様、COX II、カテニン、E-カドヘリン、APC、P53 等の細胞増殖調整分子の発現状況を調査する。

APC 遺伝子産物の病巣内および正常部の発現状況調査：特に APC 遺伝子産物については周囲の正常上皮細胞における核内移行を詳細に検討し、病変の初期段階における本遺伝子産物の分布異常の有無を確認する。

罹患動物のゲノム解析：イヌの大腸癌における APC 遺伝子変異に関する調査は過去に実施されているが、一定の見解は得られていない。本研究では単一犬種における特徴のある病態に罹患した動物とそれ以外の正常犬を比較することで、特定の APC 遺伝子変異を描出しうる可能性が高いと考えている。

遺伝子改変マウスによる病態再現実験：必要に応じて、Min マウスを購入し、ジャックラッセル・テリアの腺腫性ポリープ症との病態の比較や外因暴露による病態再現を行う。

4. 研究成果

本研究により（1）ミニチュア・ダックスフントの大腸炎症性ポリープ、（2）その他の犬種における消化管腫瘍、（3）げっ歯類モデルによる慢性炎症からの大腸がん再現の3分野についてそれぞれ知見が得られたので、その概要を記載する。

（1）ミニチュア・ダックスフントの大腸炎症性ポリープ

ミニチュア・ダックスフントの大腸ポリープに関する詳細な病理組織学的研究は実施されていなかったため、イヌの大腸ポリープ

状病変 53 例を収集して病理学的に検討し、炎症性ポリープ(26 例)、腺腫(18 例)、腺癌(9 例)に分類した。炎症性ポリープと診断された 26 例はすべてミニチュア・ダックスフントであり、この病態が本犬種に極めて特異性の高いものであることが示された。



図 1 ダックスフントの結腸にみられる炎症性ポリープの肉眼所見（内視鏡像）

本犬種に認められるポリープ病変は内視鏡検査では、上記の図 1 で示すように、多くが多発性であったが、基本的に結腸に局限して認められた。組織学的に炎症性ポリープと診断される病態は、粘液分泌が亢進して、大量の粘液を貯留し嚢胞状を呈する粘膜と、粘膜固有層の水腫、および好中球やマクロファージを主体とする炎症反応、および軽度の細胞異型を示す上皮細胞の増殖巣から構成されていた。この異型上皮細胞については腫瘍化に関連する病変と考えられたため、病巣中の上皮細胞における COX-2 や FGF-2 の発現状況を腺腫や腺癌を含む全 53 症例で検討した。

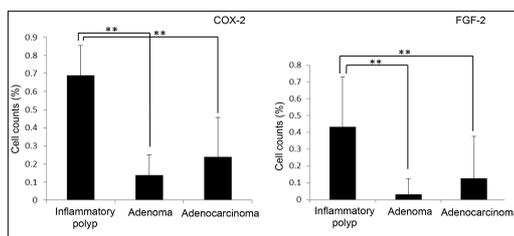


図 2 炎症性ポリープ、腺腫、腺癌の上皮成分における COX-2 と FGF-2 の発現頻度

その結果、炎症性ポリープ内に認められる上皮細胞には COX-2 と FGF-2 の発現が他の病態と比較して有意に高く、これらの分子が炎症性ポリープにおける上皮細胞増殖に関与することが示された。これらの結果を中心に投稿論文として取りまとめて、Veterinary Pathology 誌に投稿し、2016 年に公表された。

次に本犬種におけるポリープの特徴を詳細に検索するために 71 症例（炎症性ポリープ：69、腺腫：30、腺癌：25、計：124 サンプル）を病理組織学的に解析し、免疫組織化学染色として、APC (Adenomatous polyposis coli)、Beta-catenin、CK5/6、E-cadherin、p53 に対する抗体を用いてそれぞれの病態におけるこれらの分子の発現状況を調べた。

その結果 Beta-catenin の核内陽性率は、炎症性ポリープ(6.4%)、腺腫(46.4%)、腺癌(75.4%)と有意に増加することが明らかになった。腫瘍性病変では、APC はモザイク状に発現の強弱を認め、E-cadherin では発現の低下が認められた。p53 陽性率は腺癌で有意に高値を示した。

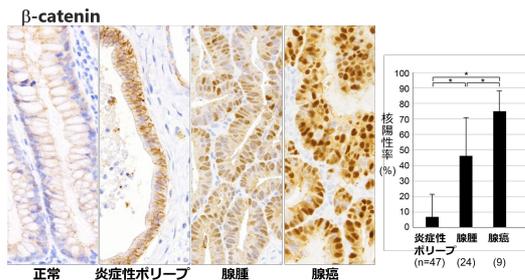


図3 カテニンの核内移行の比率

これらの研究成果よりミニチュア・ダックスフントの炎症性ポリープの腫瘍化の過程には Beta-catenin および APC の制御不全が関与すると考えられた。これらの結果についても 2016 年中に取りまとめを行い、Veterinary Pathology 誌に投稿した。現在審査中ではあるが、基本的には掲載可能との判断であり、リバイスを実施している。

(2) その他の犬種における消化管腫瘍

本研究では、ヒトの消化器腫瘍で腫瘍発生や悪性化に関与するとされているマーカーの発現を犬の消化管腫瘍についてその臨床的特徴を明確にするとともに癌化に関連する因子について免疫組織学的に検索し、組織型ごとに比較した。

検索には内視鏡または外科手術で採取された犬の消化管腫瘍組織、131 例を用いた。これらの症例について発生部位別に検討した結果、胃の上皮性腫瘍の発症年齢は平均 9.8 歳であり、38 例中 33 例と約 87% が悪性腫瘍であった。発生部位としては、幽門部が最も多かった。小腸の上皮性腫瘍の発症年齢は平均 11.9 歳で、全例が悪性腫瘍であった。大腸の上皮性腫瘍の発症年齢は平均 9.3 歳で、80 例中 45 例、56% が悪性腫瘍であった。特に結腸に好発する傾向が認められた。

犬種に注目して検討したところ、胃、小腸、大腸、すべての部位で、ジャックラッセル・テリアとミニチュアダックスフントが一位、二位を占めた(表 1)。

組織学的には内腔に突出するように増殖する腫瘍を Polypoid growth type とし、内腔に突出せず、粘膜の文を変えずに増殖するものを Non polypoid growth type して大きく分類し、さらに、WHO 分類に基づき、腺腫、腺癌、粘液癌、印環細胞癌、未分化癌に細分類して、それぞれの腫瘍について Beta-catenin, E-cadherin, p53 の染色性や発現比率を比較検証した。Beta-catenin は、APC や beta-catenin に異常があると核内に蓄

積し、細胞の増殖や幹細胞性の維持などに関与することが知られており、特に核内以降所見に注目して検証した結果、Beta-catenin の核への発現頻度は、Polypoid growth type では高率に陽性が認められるのに対し、non polypoid growth type では一例を除いて、核陽性反応はなかった。p53 については、Polypoid growth type と比較して、non polypoid growth type で比較的高頻度に発現していた。E-cadherin については染色性に差が大きく、統計学的には明らかな傾向は確認できなかった。

以上の結果より日本国内では犬の消化管腫瘍はミニチュアダックスフントとジャックラッセル・テリアに集中して発生している状況が明らかになった。特にジャックラッセル・テリアでは若年齢からの発生すること、胃から直腸へと広範囲で多発することから APC 遺伝子の変異など、何らかの遺伝的背景による発生が疑われた。実際に岐阜大学の研究グループが同様の経過を示すジャックラッセル・テリアに APC 遺伝子変異があったことを学会で報告している。本研究でも APC 遺伝子変異について検討を予定していたが、岐阜大学へのサンプル提供で協力したいと考えている。一方、ミニチュアダックスフントは日本において飼育頭数が多いことに加え、炎症性ポリープという犬種特異的な疾患があり、この炎症性ポリープの腫瘍化により発生頻度が増加したものと考えられる。

	Adenoma	ACA	SRC	MUC	UND	Total	%
Stomach**	5	16	14	0	3	38	
Jack russell terrier	3	9	0	-	0	12	31.6
Miniature dachshund	0	2	0	-	1	3	7.9
French Bulldog	0	2	1	-	0	3	7.9
Mix	0	1	3	-	0	4	10.5
Belgian Shephrd Dog	0	1	0	-	0	1	2.6
English Cocker Spaniel	0	1	0	-	0	1	2.6
Leonberger	0	1	0	-	0	1	2.6
Maltese	2	0	0	-	0	2	5.3
Miniature schnauzer	0	0	1	-	0	1	2.6
Shih Tzu	0	0	0	-	1	1	2.6
West highland white terrier	0	1	0	-	0	1	2.6
Small intestines	0	6	1	5	1	13	
Miniature dachshund	-	2	0	1	0	3	7.9
Jack russell terrier	-	2	0	0	2	4	10.5
M. Schnauzer	-	0	0	2	0	2	5.3
American Cocker Spaniel	-	0	0	1	0	1	2.6
Chinese Crested Dog	-	0	1	0	0	1	2.6
Mix	-	1	0	0	0	1	2.6
Papillon	-	1	0	0	0	1	2.6
Unknown	-	1	0	0	1	2	5.3
Large intestines**	35	41	3	1	0	80	
Miniature dachshund	25	21	0	0	0	46	57.5
Jack russell terrier	2	10	0	0	-	12	15.1
Boston terrier	2	0	0	0	-	2	2.6
French Bulldog	3	0	0	0	-	3	3.8
Border collie	1	0	0	0	-	1	1.3
Lakeland Terrier	0	2	0	0	-	2	2.6
Mix	0	0	2	0	-	2	2.6
Papillon	1	1	0	0	-	2	2.6
Shetland sheepdog	1	1	0	0	-	2	2.6
Welsh Corgi	1	0	1	0	-	2	2.6
Belgian Shephrd Dog (Tervueren)	0	1	0	0	-	1	1.3
Toy poodle	0	1	0	0	-	1	1.3
Yorkshire Terrier	1	0	0	0	-	1	1.3
Unknown	0	2	0	1	-	3	3.8

Abbreviation: ACA, Adenocarcinoma; SRC, Signet-ring cell carcinoma; MUC, Mucinous adenocarcinoma; UND, Undifferentiated carcinoma, -, not applicable **; p<0.01

表 1 消化管腫瘍の部位別および犬種別発生率

Polypoid growth type の上皮性腫瘍では Beta-catenin の発現が高く、Beta-catenin/Wnt シグナル経路を介した、Adenoma-carcinoma-sequence が関与していると考えられた。一方印環細胞癌等の non polypoid growth type では Beta-catenin の発現がほぼ認められないことから、正常上皮から直接癌細胞が悪性転化により生じる De novo 癌であることが示唆された。

以上の結果は現在投稿論文として準備中であり、Journal of Toxicologic Pathology

等での公表を予定している。

(3)げっ歯類モデルによる慢性炎症からの大腸がん再現

当研究室で管理飼育中の遺伝子改変マウスである、IFN 欠損マウスおよび関節リウマチモデルマウス (interleukin 1 receptor antagonist knockout mice) をそれぞれ用いて、デキストラン硫酸 ナトリウム(DSS)等の大腸炎誘発化学物質で暴露し、潰瘍性大腸炎を誘発して、炎症からがん発生に至る病態を再現し、ミニチュア・ダックスフントの大腸炎症性ポリープとの病態比較を行った。いずれのマウスにおいてもDSSの長期投与により潰瘍性大腸炎から大腸癌を誘発することができたが、誘発された炎症および腺癌病変は、ミニチュア・ダックスフントの炎症性ポリープや腺癌、あるいはジャックラッセル・テリアの腺腫/腺癌とは病理組織学的に異なるものであった。現在増殖する上皮細胞における分子発現について検討し、イヌの病態との比較を行っている。

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. Uchida E, Chambers JK, Nakashima K, Saito T, Ohno K, Tsujimoto H, Nakayama H, Uchida K. Pathologic Features of Colorectal Inflammatory Polyps in Miniature Dachshunds. Vet Pathol. 2016 53(4): 833-9. doi: 10.1177/0300985815618436. 査読有.

[学会発表](計3件)

1. 齋藤 翼、内田和幸、中山裕之(他4名). の消化管上皮性腫瘍における悪性化関連マーカーの発現. 第33回日本毒性病理学会総会および学術集会. 2017年1月26日~27日 堺市ビッグアイ(堺市、大阪府)
2. 齋藤 翼、内田和幸、中山裕之(他4名). ニチュア・ダックスフントにおける炎症性ポリープ腫瘍化機構の検索. 第159回日本獣医学会. 2016年9月6日~8日. 日本大学(藤沢市、神奈川県)
3. 二瓶和美、内田和幸(他8名). ジャックラッセル・テリアの消化管ポリープに関する臨床および病理学的検討. 第3回獣医病理学専門家協会学術集会. 2016年3月29日~30日 三鷹市民公会堂(三鷹市、東京都)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 裕之(NAKAYAMA, Hiroyuki)
東京大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号: 40155891

(2)研究分担者

内田 和幸(UCHIDA, Kazuyuki)
東京大学・農学生命科学研究科・准教授
研究者番号: 10223554

(3)連携研究者

チェンバース ジェームズ(CHAMBERS, James)
東京大学・農学生命科学研究科・助教
研究者番号: 00621682

坪井 誠也(TSUBOI, Masaya)

東京大学・農学生命科学研究科・特任助教
研究者番号: 20721963

(4)研究協力者

大野 耕一(OHNO, Koichi)
東京大学・農学生命科学研究科・准教授

中島 亘(NAKAJIMA, Kou)

日本小動物医療センター・理事(獣医師)

二瓶 和美(NIBE, Kazumi)

日本動物高度医療センター・獣医師