

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18807

研究課題名(和文) 網内系肉腫細胞株を同種移植したマウスに発生する高フェリチン血症の病態解析

研究課題名(英文) An allograft mouse model with rapid spontaneous metastasis and hyperferritinemia using mouse reticulum cell sarcoma cell line J774

研究代表者

近澤 征史朗 (Seishiro, Chikazawa)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：80566547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：犬の悪性腫瘍の一つ「組織球肉腫」は現代の獣医学ではほとんどが根治困難であるとされ、その主な理由は極めて高い転移性である。転移研究では生体を用いた手法が重要であるが、組織球肉腫には有効な生体モデルが存在しない。本研究ではマウスの組織球肉腫の培養細胞をマウスの皮下に移植した腫瘍形成マウスを作出し、その極めて高い転移性を確認した。本研究成果は犬の組織球肉腫における転移メカニズムの解明に有益な生体モデルを関連研究領域に提供すると考える。

研究成果の概要(英文)：We investigated the characteristics in allograft mouse model using reticulum cell sarcoma cell line J774 and evaluated it for in vivo model of canine histiocytic sarcoma (HS). The median survival time after subcutaneous implantation of 1×10^6 J774 cells for BALB/c mice was 30 days and the mice were observed systemic metastatic lesions in the lung, liver and spleen. Pulmonary tumor embolism and alveolar wall thickening were observed, and diffuse thickening of the alveolar wall was thought to be induced by the expansion of CD204 positive cells. We thought that diffuse spontaneously and hematogenous metastasis of J774 cells were occurred. Furthermore, J774 tumor-bearing EP mice also showed hyp thrombocytopenia and hyperferritinemia. These results suggested that a part of biological behaviors of J774 allograft mouse model were closely resemble for canine HS. We conclude that J774 allograft mice may useful for in vivo model of canine HS.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：組織球肉腫

1. 研究開始当初の背景

小動物臨床分野において近年顕著な増加傾向にある腫瘍性疾患に対する治療法の開発は、獣医学領域に課せられた重要な研究課題の一つである。特定犬種に好発する組織球肉腫 (Histiocytic sarcoma: 以下 HS) は網内系細胞を起源とする悪性腫瘍であり、罹患犬の多くは予後不良である。

本研究では特に犬の HS に特徴的な病態である高フェリチン血症の発現に着目した。血中のフェリチン濃度は古くから生体内貯蔵鉄量の鋭敏な指標として主に鉄過剰症や鉄欠乏性貧血の診断に汎用されてきた。その一方で人および獣医療において生体内貯蔵鉄量に依存しない高フェリチン血症が様々な炎症、腫瘍、免疫介在性疾患に付随して認められる。また、特定の疾患 (人のマクロファージ活性化症候群、犬の組織球性肉腫など) では血清フェリチンの診断マーカーとしての臨床的有用性が示されており、さらに近年では血清フェリチン濃度の上昇が人および犬のリンパ腫における予後不良因子であることが報告されたことから、血清フェリチンが疾患の病態形成にも関与する可能性が指摘されている。

血清フェリチンは HS における腫瘍マーカーであり、HS で極めて高値を示すことが知られている。申請者はこの現象が由来細胞の性質によって起こると仮定し、同系統の可移植性腫瘍細胞株を移植した担癌マウスにおいて同様に高フェリチン血症が発現するのではないかと考えた。さらに高フェリチン血症の発現機序の解明が HS の病態形成機構の理解に重要な役割を果たすことを期待した。

2. 研究の目的

犬の HS の治療を困難にしている主な要因は当該疾患が示す高い転移性にある。申請者は過去に報告されているマウス由来網内系肉腫細胞株 J774 の同種移植によって悪性度

の高い腫瘍を形成することに注目した。過去の報告では J774 担癌マウスについて詳細な病態解析が行われていなかったことから、本研究では担癌マウスの血中フェリチン濃度の推移や致死性、転移性を調べることで犬の HS との類似性を比較した。

3. 研究の方法

リン酸緩衝液 (PBS) に浮遊させた J774 細胞株を 8~10 週齢の雄 BALB/c マウスに、1 頭当たり 1×10^6 個を背部肩甲骨間に皮下接種することで担癌マウスを作出した。J774 接種後は 7、14 日目、エンドポイント (以下 EP: マウスの体重が以前の最高値よりも 10% 以上減少した時点) に達した時点でそれぞれ安楽殺し (各 $n=6 \sim 8$)。対照には PBS を皮下接種後 28 日目のマウス ($n=6$) を用いた。主な比較検討項目は、肺の病理組織学的および免疫組織化学的検索 (CD204)、肺組織ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の有核細胞数、BALF および血漿肺サーファクタント蛋白質 (SP-D) 濃度、血漿フェリチン濃度とし、対照群との間の統計的有意性を解析した。

4. 研究成果

J774 を移植したマウスでは全頭でおよそ 14 日後から接種部位に腫瘍形成を認めた。EP に達した日数は概ね 23~30 日であり、明らかな肺胞壁の肥厚は EP でのみ観察された (図 1)。

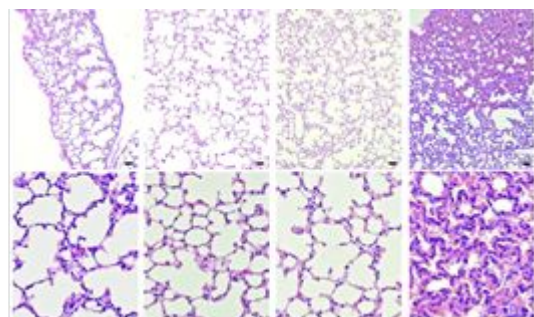


図 1. J774 担癌マウスにおける肺の組織像

左から対照、腫瘍移植後 7 日、14 日、EP であり、上段は低倍率、下段は高倍率を示す。

肺組織 MPO 活性、BALF の有核細胞数と SP-D 濃度は対照と比較して有意差はなく、肥厚した肺胞壁および肺血管内においては主にマクロファージ表面に発現する CD204 に対する免疫染色に陽性を示す細胞が顕著に増加していた。さらに肺間質障害の指標とされる血漿 SP-D 濃度は EP で有意に上昇していたことから、J774 は血行性に肺の広範囲に転移し、且つ肺間質障害を引き起こすことで肺胞壁を肥厚させると考えられた。血漿フェリチン濃度は EP のみで著しく上昇し、高フェリチン血症が発現した。(図 2)

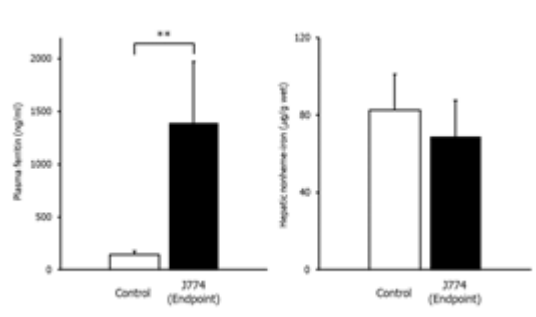


図 2. 血漿フェリチン濃度 (左) および肝臓非ヘム鉄含有量 (右)

対照群 (白棒) と EP (黒棒) との比較では血漿フェリチンレベルでのみ統計的有意差が認められた。

上述した結果から J774 担癌マウスでは早期に全身転移を生じる致死的な悪性腫瘍が形成された。さらに生体内貯蔵鉄量の増加を伴わない高フェリチン血症の発現、由来細胞といった種々の類似点が確認された一方で、J774 担癌マウスでは明らかな腫瘍塊を形成せず、び漫性の転移が生じたこと、高フェリチン血症が病態の初期には認められなかったことなどの相違点も認められた。そのため、当初の目的であった高フェリチン血症モデルマウスとしての有用性についてはさらなる検討を要すると考えられた。

網内系細胞を起源とする腫瘍は人やマウ

ス、犬、猫等に発生するが、どの種においても高悪性度傾向が認められる。このことは種差を超えて網内系細胞由来腫瘍が類似する生物学的挙動を示すことを意味している。また、J774 担癌マウスの肺では明らかな腫瘍血栓が認められたことから、血行性転移が病態の初期に生じることが強く示唆された(図 3)。

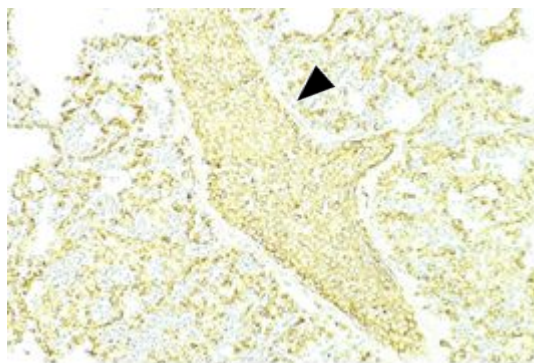


図 3. J774 担癌マウスのエンドポイントにおける肺の腫瘍塞栓像 (CD204 免疫染色)

矢頭で示した CD204 陽性細胞の集塊は肺血管内に位置する。

J774 担癌マウスの早期致死的な全身転移は血行性且つび漫性の自然転移であると考えられた。犬の HS との病態の一致については判断が難しい点もあるが、網内系細胞に特徴的な転移メカニズムを内包している可能性が示された。

本研究において申請者は J774 担癌マウスが早期に全身転移を生じる致死的な腫瘍を形成し、その特徴の一部が犬の HS と類似することを明らかにした。担癌マウスは再現性が高く迅速な病態形成を示すため、犬の組織球肉腫が示す高転移性の発現機序や腫瘍マーカーの由来などを調べるための有効な研究ツールになり得ると考えられた。今後、本研究で確立された J774 担癌マウスを用いて犬の HS の病態解明が進み、新たな治療法が発見されることを期待したい。

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)

[学会発表](計3件)

松田朋子、今野啓祐、近澤征史朗、星史雄、金井一享.

マクロファージ様細胞株を同種移植したマウスに発生する肺間質障害.

第30回北里大学バイオサイエンスフォーラム(2017)

今野啓祐、松田朋子、近澤征史朗、星史雄、金井一享.

マクロファージ様細胞株を同種移植したマウスに発生する肺出血.

第30回北里大学バイオサイエンスフォーラム(2017)

近澤征史朗、前田悠貴、古川哲也、和田紀乃、青木亮介、岩崎喜和子、星史雄.

網内系肉腫細胞株 J774 の同種移植による高フェリチン血症マウスモデルの作出.

第159回日本獣医学会学術集会(2016)

6. 研究組織

(1)研究代表者

近澤 征史朗 (Seishiro, Chikazawa)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：80566547