

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05967

研究課題名(和文) 犬の骨髄疾患におけるクローン性の検出および原因遺伝子変異の探索

研究課題名(英文) Investigation of gene mutation specific to canine bone marrow diseases

研究代表者

越野 裕子(後藤裕子)(Goto-Koshino, Yuko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任准教授

研究者番号：80436518

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：真性多血症(PV)と診断された2例について原因となる遺伝子変異の探索を試みた。各症例から採取した末梢血単核球をCD3陽性リンパ球(正常細胞群)とCD3陰性有核細胞(異常クローンを含む細胞群)に分離し、両者を比較することにより異常クローン特異的な変異を検索した。当初、全エクソーム解析を行う予定であったが、ゲノムDNAのクオリティが十分でなかったため、腫瘍関連遺伝子を対象としたターゲットリシーケンス解析に変更した。異常クローン細胞を含むCD3陰性細胞群において特異的に認められる変異をさまざまな検索条件で抽出したが、いずれの候補遺伝子変異もサンガーシーケンスで確認することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真性多血症は血液幹細胞の異常によって異常な赤血球増多が起こる疾患である。異常な血液幹細胞は赤血球だけでなく白血球にも分化することが知られているが、白血病と異なり、細胞の機能は正常である。本研究は犬における真性多血症の原因遺伝子を探索し、人の真性多血症において高頻度に認められるJAK2遺伝子変異と同様に診断マーカーとして確立すること、さらに治療のターゲットとしての可能性を検討することを目的として行ったが、研究期間内には有望な遺伝子変異を見出すことができなかった。今後は異常細胞のみを単離して解析を試みる予定である。

研究成果の概要(英文)：Investigation of a polycythemia vera (PV)-specific gene mutation was performed using two dogs diagnosed as PV. CD3 positive lymphocytes were purified as normal cell population, and the remaining CD3 negative nucleated cells were separated as population containing abnormal clone. Two populations were compared to find abnormal clone-specific gene mutation. Whole exome sequencing was designed at first, however, because of the low quality of genome DNA purified from CD3 positive normal cell population, target resequencing of the cancer related genes was adopted instead. Multiple gene mutations specific to the population containing abnormal clone were extracted, however, none of the mutation was validated by Sanger sequencing. It would be necessary to enrich the abnormal clone, for example, purification of erythroid progenitors from PV dogs, for further analysis.

研究分野：獣医内科学

キーワード：真性多血症 犬 網羅的解析

1. 研究開始当初の背景

小動物診療において、白血病をはじめとする様々な犬の骨髄疾患に遭遇する機会は少ない。人において骨髄疾患は、臨床データや血液細胞の形態学的特徴に加え、細胞の表面抗原マーカー発現、遺伝子変異の有無などによって診断・分類されているが、犬の骨髄疾患を診断・分類する方法は確立されていないのが現状である。特に人の骨髄異形成症候群 (MDS) や骨髄増殖性疾患 (MPN) に相当する疾患は、染色体や遺伝子異常に関する知見の蓄積がない犬の症例においては血液細胞の形態学的特徴以外の診断根拠に乏しいため、診断が困難である。

人の MDS や MPN は造血幹細胞の異常によって引き起こされるクローン性疾患群であり、血液細胞のクローン性増殖や分化異常を特徴とする。人の WHO 分類では慢性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群、多血症、本態性血小板血症など様々な疾患を内包しており、現在、その鑑別には *BCR-ABL1* や *PDGFRA* など多くの遺伝子異常の有無がマーカーとして用いられている。一方、犬においては骨髄細胞や末梢血液細胞の形態学的特徴と血液細胞数の増減などの臨床データから診断がなされるものの、人の MDS や MPN と同様に異常細胞のクローン性増殖を本態とする疾患であるとの証明はなされていない。骨髄細胞の表面抗原マーカーも不足しているため、類似疾患との鑑別も不十分であり、雑多な疾患を MDS/MPN に含んで診断している可能性は高い。

本申請では MDS/MPN に分類される真性赤血球増加症 (polycythemia vera, PV) を特に研究の対象とし、①犬の PV はクローン性疾患であるか、②犬の PV の異常クローンに共通した遺伝子以上は何か、を探索するものとする。

2. 研究の目的

PV は人および犬において認められる稀な疾患であり、人の WHO 分類では MPN に分類される (Arber DA, et al, 2016)。赤芽球系細胞の自律性増殖を特徴とするが、人の PV では赤芽球系細胞の他、白血球や血小板も増加することが多く、造血幹細胞の異常クローンに起因する疾患であると考えられている (図 1)。実際、クローン性を検証する HUMARA (human androgen receptor assay) 解析により 60%以上の症例において末梢血細胞 (白血球) のクローン性増殖が検出されており、クローン性増殖が赤芽球系細胞に限られないことが示されている。また、およそ 90%以上の症例において JAK2 遺伝子の特異的部位における変異 (V617F) が報告されており、診断基準の一つであるとともに重要な病因の一つである

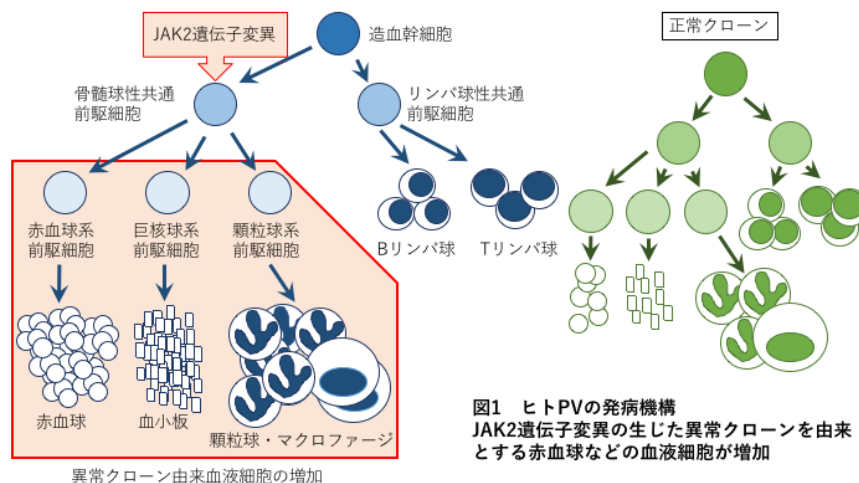


図1 ヒトPVの発病機構
JAK2遺伝子変異の生じた異常クローンを由来とする赤血球などの血液細胞が増加

異常クローン由来血液細胞の増加

表1 ヒトPVとイヌPVにおいて認められる臨床症状・異常の相違

| | 人 PV | 犬 PV |
|-----------|-----------|-----------|
| 赤血球増多 | 100 % | 100 % |
| 白血球・血小板増多 | 30 - 70 % | 10 - 20 % |
| JAK2遺伝子変異 | 70 - 90 % | まれ |

と考えられる。一方、犬における PV は赤血球増多を主訴とし、白血球増多や血小板増多はそれほど一般的ではない(表 1)。診断は類似疾患の除外によって行われ、クローン性の有無は明らかではない。また、V617F 変異に相当する

JAK2 遺伝子変異は稀である。

本申請では犬の PV に関して下記を明らかにすることを目的とする。

①犬の PV におけるクローン性増殖の有無を検証する。

②クローン性増殖が認められた場合、PV の異常クローンにおいて認められる遺伝子変異の探索を行う。

PV を含む犬の MDS、MPN を対象とした分子生物学的な研究はこれまで行われておらず、血液細胞の形態学的特徴を基にした従来の研究からの大きな進歩が期待できる。

3. 研究の方法

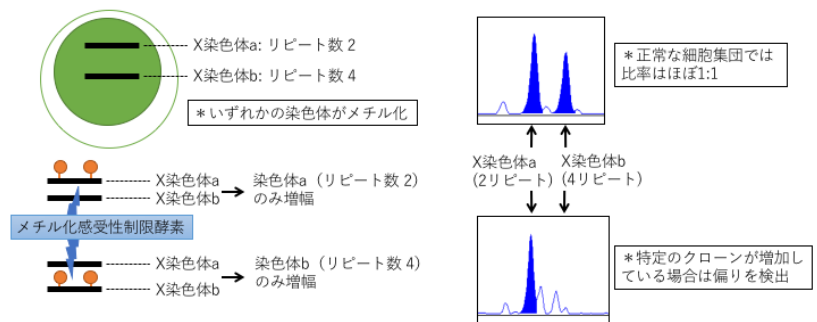
犬 PV 症例の収集

以下の診断基準に従って PV と診断された犬を対象とする。

- ・ ヘマトクリット値 >65 %
- ・ 二次性多血症の除外
- ・ 血清エリスロポエチン濃度 正常～低下 (<17 mU/mL)

クローン性解析

獣医学領域において一般的に用いられているクローン性解析はリンパ球で特異的に起こる免疫レセプターの遺伝子再構成を利用したものであり、対象はリンパ系細胞に限られる。これまでに我々は、リンパ球系以外の細胞群を対象としたクローン



性解析法として犬の X 染色体不活化パターン (X-chromosome inactivation pattern, XCIP) 解析システムを開発した (Mochizuki H et al, 2015)。XCIP 解析は HUMARA と同様、哺乳類のメス個体が有する 2 本の X 染色体のうち一方が胎生期に DNA メチル化を受け、ランダムに不活化される現象を利用した解析法である。正常な細胞群においては両 X 染色体が不活化される頻度はほぼ 1:1 であるが、腫瘍細胞のように単一のクローンに由来する細胞が増殖した場合には XCIP には大きな偏りが生じる。XCIP 解析では 2 本の X 染色体を繰り返し配列のリピート数、メチル化の有無をメチル化感受性制限酵素処理により区別し、この偏りの有無を解析する (図 2)。本研究では XCIP 解析を用いて犬 PV のクローン性を検証する。

犬 PV における原因遺伝子の探索

上記 XCIP 解析でクローン性が認められた犬 PV 症例を対象として Whole-exome シーケンス解析を行い、PV で認められる以上クローンに認められる de novo 変異を抽出する。より精度の高い de novo 変異の検索を行うため、個体内で正常細胞と異常クローンを比較する必要がある。我々はこれまでの予備実験により、末梢血サンプルでクローン性が認められた PV 症例においても、CD3 陽性リンパ球にはクローン性が認められないことを見出している。本研究では正常細胞として CD3 陽性リンパ球、異常クローンを含む細胞群として CD3 陰性末梢血細胞を用いるものとする。

得られた候補遺伝子については XCIP 解析の対象とならなかった PV のホモ個体(メス) およびオス個体を用いてサンガーシーケンスで検証する。

4. 研究成果

クローン性解析の改良

XCIP 解析はリピート数の違いにより 2 本の X 染色体を区別する方法であるため、2 本の X 染色体上のリピート数が同一の個体 (ホモ個体) は解析不可能である。これまでの研究で我々が用いてきた犬の XCIP 解析は androgen receptor (AR) 遺伝子上の 2 箇所のリピート部位を対象としており、メス個体の 57%が解析可能である一方、オス個体およびメス個体の 43%は解析不可能であった。犬の PV は稀な疾患であるため、解析可能な症例をできるだけ増やす必要があった。

我々は XCIP 解析の対象症例を増やすために、さらに SLIT and NTRK-like family member 4 (SLITRK4) 遺伝子上の 2 箇所のリピート部位を加えた解析方法を構築した。この方法によりメス個体の 83%が解析可能となり、従来の 57%と比較して大幅に解析可能個体を増やすことに成功した。本研究成果は学術誌に発表した。

Development of canine X-chromosome inactivation pattern analysis for the detection of cell clonality by incorporating the examination of the SLIT and NTRK-like family member 4 (SLITRK4) gene. Tomita A, Mochizuki H, Tsuboi M, Ogura I, Igarashia H, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Ohmi A, Tomiyasu H, Ohno K, Nakagawa T, Uchida K, Nishimura R, Tsujimoto H. *Res Vet Sci*, 査読有 125:170-175 (2019) doi: 10.1016/j.rvsc.2019.06.004.

網羅的解析による PV 症例特異的遺伝子変異の検索

真性多血症 (PV) と診断された 2 例の雌犬について網羅的解析を行なった。1 例は XCIP 解析によりクローン性が示されており、1 例については XCIP 解析が不可能であった。いずれの症例についても末梢血単核球を分離し、それぞれ抗 CD3 モノクローナル抗体と磁気ビーズを用いて CD3 陽性リンパ球(正常細胞群)と CD3 陰性有核細胞(異常クローンを含む細胞群)の 2 群に分離して解析を行なった。当初の研究計画ではエクソーム解析を行う予定であったが、CD3 陽性細胞群から抽出した ゲノム DNA のクオリティが十分でないと考えられたことから、腫瘍関連遺伝子を対象としたターゲットリシーケンスに解析方法を変更した。まず、異常クローン細胞を含む CD3 陰性細胞群において特異的に認められた変異のうち、2 症例に共通の遺伝子を検索したところ、WT1, RAF1, PTCH1 が候補として抽出された。しかし、いずれの遺伝子もサ

ンガーシーケンス法で変異を確認することはできなかった。カバレッジの閾値、片方の症例のみで認められた変異など、検索条件を様々に変更した結果、CBL、FANCCなどいくつかの遺伝子変異がさらに候補として抽出されたものの、いずれの遺伝子変異もサンガーシーケンスで確認することはできなかった。

今回、有用な候補遺伝子変異が見出せなかった理由として、

- ・正常細胞群から抽出したゲノム DNA のクオリティが不十分であった
- ・異常クローン率が低かったために遺伝子変異が抽出できなかった

などの要因が考えられた。今後、異常クローン率を高めるために、赤芽球系細胞の単離を検討する必要があるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Tomita A, Mochizuki H, Tsuboi M, Ogura I, Igarashi H, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Ohmi A, Tomiyasu H, Ohno K, Nakagawa T, Uchida K, Nishimura R, Tsujimoto H | 4. 巻 125 |
| 2. 論文標題 Development of canine X-chromosome inactivation pattern analysis for the detection of cell clonality by incorporating the examination of the SLIT and NTRK-like family member 4 (SLITRK4) gene. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Res Vet Sci | 6. 最初と最後の頁 170-175 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rvsc.2019.06.004 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Asada H, Chambers JK, Kojima M, Goto-Koshino Y, Kanagawa T, Yokoyama N, Tsuboi M, Uchida K, Tsujimoto H, Ohno K | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Variations in ATP7B in cats with primary copper-associated hepatopathy. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Feline Med Surg | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1098612X19884763 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Sakai K, Maeda S, Saeki K, Yoshitake R, Goto-Koshino Y, Nakagawa T, Nishimura R, Yonezawa T, Matsuki N | 4. 巻 57 |
| 2. 論文標題 ErbB2 Copy Number Aberration in Canine Urothelial Carcinoma Detected by a Digital Polymerase Chain Reaction Assay. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Vet Pathol | 6. 最初と最後の頁 56-65 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0300985819879445 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Nagao I, Ohno K, Nagahara T, Yokoyama N, Nakagawa T, Fujiwara R, Yamamoto K, Goto-Koshino Y, Tomiyasu H, Tsujimoto H | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Evaluation of visceral fat mass in dogs by computed tomography. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Vet Med Sci | 6. 最初と最後の頁 1552-1557 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.19-0254 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Asada H, Toiyasu H, Goto-Koshino Y, Ohno K, Tsujimoto H | 4. 巻 80 |
| 2. 論文標題 Effect of a two-base insertion mutation of the TP53 gene on expression of p53 protein in canine histiocytic sarcoma cells. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Am J Vet Res | 6. 最初と最後の頁 680-688 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2460/ajvr.80.7.680 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Asada H, Yomiyasu H, Uchikai T, Ishihara G, Goto-Koshino Y, Ohno K, Tsujimoto H | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Comprehensive analysis of miRNA and protein profiles within exosomes derived from canine lymphoid tumour cell lines. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 PLoS One | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0208567 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Asada H, Tomiyasu H, Okada K, Chambers JK, Goto-Koshino Y, Uchida K, Kagawa Y, Ohno K, Tsujimoto H. | 4. 巻 124 |
| 2. 論文標題 Clinical significance of the two-base insertion mutation in the TP53 gene in canine histiocytic sarcoma. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Res Vet Sci | 6. 最初と最後の頁 57-60 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rvsc.2019.03.003 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Asada H, Ichii O, Tomiyasu H, Uchida K, Chambers JK, Goto-Koshino Y, Ohno K, Kon Y, Tsujimoto H. | 4. 巻 81 |
| 2. 論文標題 The intratumor heterogeneity of TP53 gene mutations in canine histiocytic sarcoma. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Vet Med Sci | 6. 最初と最後の頁 353-356 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.18-0419 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Asada H, Kojima M, Nagahara T, Goto-Koshino Y, Chambers JK, Nakagawa T, Yokoyama N, Uchida K, Tsujimoto H, Ohno K. | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 Hepatic copper accumulation in a young cat with familial variations in the ATP7B gene. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Vet Intern Med | 6. 最初と最後の頁 874-878 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jvim.15399 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Nagahara T, Ohno K, Kanemoto H, Kakimoto T, Fukushima K, Goto-Koshino Y, Tsujimoto H. | 4. 巻 79 |
| 2. 論文標題 Effect of prednisolone administration on gallbladder emptying rate and gallbladder bile composition in dogs. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Am J Vet Res | 6. 最初と最後の頁 1050-1056 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2460/ajvr.79.10.1050 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Akiyoshi M, Hisasue M, Neo S, Akiyoshi M, Goto-Koshino Y. | 4. 巻 48 |
| 2. 論文標題 A case of hemophagocytic syndrome progressing into large granular lymphoma in a dog. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Vet Clin Pathol | 6. 最初と最後の頁 71-77 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vcp.12704 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Matsumoto I, Nakashima K, Goto-Koshino Y, Chambers JK, Tsujimoto H, Nakayama H, Uchida K. | 4. 巻 56 |
| 2. 論文標題 Immunohistochemical Profiling of Canine Intestinal T-Cell Lymphomas. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Vet Pathol | 6. 最初と最後の頁 50-60 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0300985818800015 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Toniyasu H, Doi A, Chambers JK, Goto-Koshino Y, Ohmi A, Ohno K, Tsujimoto H. | 4. 巻 59 |
| 2. 論文標題 Clinical and clinicopathological characteristics of acute lymphoblastic leukaemia in six cats. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 J Small Anim Pract | 6. 最初と最後の頁 742-746 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jsap.12917 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Motegi T, Toniyasu H, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Hiyoshi-Kanemoto S, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. | 4. 巻 79 |
| 2. 論文標題 Prognostic value of CD44 variant isoform expression in dogs with multicentric high-grade B-cell lymphoma. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Am J Vet Res | 6. 最初と最後の頁 961-969 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2460/ajvr.79.9.961 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Matsumoto I, Uchida K, Nakashima K, Goto-Koshino Y, Chambers JK, Tsujimoto H, Nakayama H. | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Pathological features of intestinal T-cell lymphoma in Shiba dogs in Japan. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Vet Comp Oncol | 6. 最初と最後の頁 417-423 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12396 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Sato M, Mochizuki H, Goto-Koshino Y, Fujiwara-Igarashi A, Takahashi M, Ohno K, Tsujimoto H. | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Prognostic significance of hypermethylation of death-associated protein kinase (DAPK) gene CpG island in dogs with high-grade B-cell lymphoma. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Vet Comp Oncol | 6. 最初と最後の頁 409-415 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12395 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|