

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22688026

研究課題名(和文) 犬・猫の造血系腫瘍の分子病態に基づく予後評価法の確立とテラーメイド療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel prognostic evaluation and therapy of hematological neoplasms in dogs and cats

研究代表者

藤野 泰人 (Fujino, Yasuhito)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：70401180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,500,000円、(間接経費) 6,150,000円

研究成果の概要(和文)：犬リンパ腫において遺伝子解析による腫瘍細胞の微小残存病変測定法を確立し、治療効果や予後評価に極めて有用であることを示した。また、複数の腫瘍関連因子異常を明らかにし、一部は予後に関与、一部は新規治療標的分子候補となることを示した。さらに、猫リンパ腫において腫瘍細胞形態による病型分類を確立し、病型による悪性度が予後に関与していることを明らかにした。一方、犬肥満細胞腫において分子標的薬の抗腫瘍効果を解析し、新規治療への基盤的成果を示した。さらに、犬肥満細胞腫の遺伝子変異や腫瘍悪性度分類が治療反応性や予後に関与することを明らかにした。本成果は動物の血液腫瘍における治療指針や予後評価に極めて有用である。

研究成果の概要(英文)：The minimal residual disease assay by the gene analysis in canine lymphoid neoplasms was established and showed extremely useful for curative effect and a prognostic evaluation. In addition, plural tumor-related factors abnormality was clarified, and a part participated in the outcome and indicated to be with candidate novel treatment target molecules. Furthermore, the cytomorphological classification in feline lymphomas was established and it was clarified that the malignancy according to the classification was significantly associated with the outcome. On the other hand, antitumor effects of molecular target agents were analyzed in canine mastocytoma and the results showed potentials of novel treatment strategy. Furthermore, genetic mutations and the malignancy classification of canine mastocytoma participated in treatment efficacy and the outcome. The results are extremely useful for treatment guidelines and the prognostic evaluation in hematological neoplasms of animals.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：獣医学・臨床獣医学

キーワード：リンパ系腫瘍 肥満細胞腫 微小残存病変 分子標的療法 予後解析

1. 研究開始当初の背景

近年、小動物臨床においても医学分野と同様に腫瘍性疾患症例の増加は顕著であり、悪性腫瘍症例においては多くが致死的な転帰を辿る。これら悪性腫瘍のうち、発生頻度が高く、臨床的に重要な疾患はリンパ腫、肥満細胞腫などを含む造血系腫瘍である。小動物のリンパ腫はヒトと同様に化学療法への反応性が認められ、過去 20 年余りの間に多数の化学療法プロトコルが研究されているが、その治療成績はイヌでは中央生存期間が約 12 か月、ネコでは約 10 か月という限界を打破できていないのが現状である。また肥満細胞腫においては、造血系腫瘍がゆえに全身浸潤を伴う場合が多く、そのような症例では化学療法が用いられる。しかし、どちらの腫瘍も既存の画一的治療への反応性を示す症例がいる一方で、反応性が悪く早期に死亡する症例も多い。そのため症例ごとの病態を分析し、予後をできるだけ予測し、それらを考慮に入れた上で個々の症例に適した治療を選択する、いわゆるテーラーメイド診療が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は以上の現状における臨床的問題を鑑みて、小動物の造血系腫瘍における分子病態を解明し応用することにより、詳細な治療効果判定システムおよび予後予測法を確立し、既存の治療限界を凌駕する新規治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、発生頻度が高く小動物の臨床現場において重要性の高いリンパ腫と肥満細胞腫を対象として、それぞれの分子病態を解析し、その結果を臨床にフィードバックするために、以下の内容・手法において遂行した。

- 1) リンパ腫の分子病態に基づく MRD 定量による治療効果判定・再発予測法の確立
- 2) リンパ腫における症例特異的 MRD-guided 療法の開発
- 3) 肥満細胞腫における TK 遺伝子変異・リン酸化解析に基づく治療効果判定・予後予測法の確立
- 4) 肥満細胞腫における症例特異的 TK リン酸化異常を標的とした新規分子標的療法の開発

4. 研究成果

リンパ腫の分子病態に基づく微小残存病変 (MRD) 定量による治療効果判定・再発予測法の確立に関しては、犬において最も発生頻度の高い B 細胞性高悪性度リンパ腫に対し

て、多剤併用化学療法中に MRD を測定し、個々の抗癌剤の客観的かつ詳細な効果判定法として MRD 測定が極めて有用であり、抗癌剤の種類によって効果に有意差が生じることを示した。さらに、抗腫瘍寛解導入療法の特に初期において MRD の経時的変化が症例の予後に有意な影響を及ぼすことが明らかとなり、犬のリンパ腫における MRD 測定の臨床的有用性が示された。一方、犬のリンパ腫において p14, p15, p16, ABCB1, ABCG2 の各遺伝子は後成的変化などにより mRNA 発現に変化を生じている可能性があり、p16 発現は症例の予後と有意な相関を示していた。また、NFkB の各蛋白が過剰発現しており、阻害薬であるボルテゾミブが腫瘍増殖抑制効果を示すことを明らかにした。さらに、猫のリンパ腫における細胞形態学的分類法を確立し、形態的分類に基づく悪性度が症例の予後に有意な影響を及ぼしていることを明らかにし、臨床的に極めて有用な分類法であることが示唆された。

肥満細胞腫における TK 遺伝子変異・リン酸化解析に基づく治療効果判定・予後予測法の確立に関しては、異なる c-kit 塩基配列を有する犬の肥満細胞腫に対して、臨床的に使用可能である TK 阻害分子標的薬による抗腫瘍効果を解析し、c-kit 塩基配列により効果を示す薬剤および薬用量が異なることを明らかにした。さらに、c-kit 変異および腫瘍細胞形態に基づく悪性度分類は症例の治療反応性や予後に有意な影響を及ぼすことを明らかにし、犬の肥満細胞腫において極めて臨床的有用性の高い新たな治療指針および予後評価法を示した。

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 56 件)

1. Sato H, Fujino Y, Chino J, Takahashi M, Fukushima K, Goto-Koshino Y, Uchida K, Ohno K, Tsujimoto H. Prognostic Analyses on Anatomical and Morphological Classification of Feline Lymphoma. J Vet Med Sci. 2014 in press.
2. 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 Jun 2;76(5):661-6.
3. Fujiwara-Igarashi A, Goto-Koshino Y, Sato M, Maeda S, Igarashi H, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Prognostic significance of the expression levels of the p16,

- p15, and p14 genes in dogs with high-grade lymphoma. *Vet J.* 2014 Feb;199(2):236-44.
4. Tomiyasu H, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Epigenetic regulation of the ABCB1 gene in drug-sensitive and drug-resistant lymphoid tumour cell lines obtained from canine patients. *Vet J.* 2014 Jan;199(1):103-9.
 5. Tomiyasu H, Watanabe M, Sugita K, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Ohno K, Sugano S, Tsujimoto H. Regulations of ABCB1 and ABCG2 expression through MAPK pathways in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Anticancer Res.* 2013 Dec;33(12):5317-23.
 6. Tomiyasu H, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. The regulation of the expression of ABCG2 gene through mitogen-activated protein kinase pathways in canine lymphoid tumor cell lines. *J Vet Med Sci.* 2014 Mar 1;76(2):237-42.
 7. Fujino Y, Nakamura Y, Matsumoto H, Fukushima K, Takahashi M, Ohno K, Tsujimoto H. Development and evaluation of a novel in-clinic automated hematology analyzer, ProCyte Dx, for canine erythrocyte indices, leukogram, platelet counts and reticulocyte counts. *J Vet Med Sci.* 2013 Nov;75(11):1519-24.
 8. Takeuchi Y, Fujino Y, Watanabe M, Takahashi M, Nakagawa T, Takeuchi A, Bonkobara M, Kobayashi T, Ohno K, Uchida K, Asano K, Nishimura R, Nakayama H, Sugano S, Ohashi Y, Tsujimoto H. Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: a retrospective cohort study. *Vet J.* 2013 Jun;196(3):492-8.
 9. Fujiwara-Igarashi A, Goto-Koshino Y, Mochizuki H, Maeda S, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Simultaneous inactivation of the p16, p15 and p14 genes encoding cyclin-dependent kinase inhibitors in canine T-lymphoid tumor cells. *J Vet Med Sci.* 2013;75(6):733-42.
 10. Kojima K, Fujino Y, Goto-Koshino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Analyses on activation of NF- κ B and effect of bortezomib in canine neoplastic lymphoid cell lines. *J Vet Med Sci.* 2013;75(6):727-31.
 11. Chino J, Fujino Y, Kobayashi T, Kariya K, Goto-Koshino Y, Ohno K, Nakayama H, Tsujimoto H. Cytomorphological and immunological classification of feline lymphomas: clinicopathological features of 76 cases. *J Vet Med Sci.* 2013;75(6):701-7.
 12. Tomiyasu H, Watanabe M, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Ohno K, Sugano S, Tsujimoto H. Regulation of expression of ABCB1 and LRP genes by mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway and its role in generation of side population cells in canine lymphoma cell lines. *Leuk Lymphoma.* 2013 Jun;54(6):1309-15.
 13. Maeda S, Fujino Y, Tamamoto C, Suzuki S, Fujita A, Takahashi M, Ohno K, Uchida K, Tsujimoto H. Lymphangiomas of the systemic skin in an old dog. *J Vet Med Sci.* 2013 Feb;75(2):187-90.
 14. Sato M, Yamzaki J, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. The prognostic significance of minimal residual disease in the early phases of chemotherapy in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Vet J.* 2013 Mar;195(3):319-24.
 15. Mochizuki H, Goto-Koshino Y, Sato M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Comparison of the antitumor effects of an MDM2 inhibitor, nutlin-3, in feline lymphoma cell lines with or without p53 mutation. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012 Jun 30;147(3-4):187-94.
 16. Takeuchi Y, Takahashi M, Tsuboi M, Fujino Y, Uchida K, Ohno K, Nakayama H, Tsujimoto H. Intestinal T-cell lymphoma with severe hypereosinophilic syndrome in a cat. *J Vet Med Sci.* 2012 Aug;74(8):1057-62.
 17. Mochizuki H, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. X-chromosome inactivation pattern analysis for the assessment of cell clonality in cats. *Vet Pathol.* 2012 Nov;49(6):963-70.
 18. Mochizuki H, Nakamura K, Sato H, Goto-Koshino Y, Sato M, Takahashi M, Fukushima K, Nakashima K, Fujino Y, Ohno K, Uchida K, Nakayama H, Tsujimoto H. GeneScan analysis to detect clonality of T-cell receptor γ gene

- rearrangement in feline lymphoid neoplasms. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012 Jan 15;145(1-2):402-9.
19. Sato M, Goto-Koshino Y, Mochizuki H, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Perfusion method for harvesting bone marrow cells from dogs. *Am J Vet Res.* 2011 Oct;72(10):1344-8.
 20. Tomiyasu H, Fujino Y, Takahashi M, Ohno K, Tsujimoto H. Spontaneous acute erythroblastic leukaemia (AML-M6Er) in a dog. *J Small Anim Pract.* 2011 Aug;52(8):445-7.
 21. Mochizuki H, Nakamura K, Sato H, Goto-Koshino Y, Sato M, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Uchida K, Nakayama H, Tsujimoto H. Multiplex PCR and Genescan analysis to detect immunoglobulin heavy chain gene rearrangement in feline B-cell neoplasms. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011 Sep 15;143(1-2):38-45.
 22. Takeuchi Y, Fujino Y, Watanabe M, Nakagawa T, Ohno K, Sasaki N, Sugano S, Tsujimoto H. Screening of therapeutic targets for canine mast cell tumors from a variety of kinase molecules. *J Vet Med Sci.* 2011 Oct;73(10):1295-302.
 23. Takeuchi Y, Fujino Y, Fukushima K, Watanabe M, Nakagawa T, Ohno K, Sasaki N, Sugano S, Tsujimoto H. Biological effect of tyrosine kinase inhibitors on three canine mast cell tumor cell lines with various KIT statuses. *J Vet Pharmacol Ther.* 2012 Feb;35(1):97-104.
 24. Sato H, Fujino Y, Uchida K, Ohno K, Nakayama H, Tsujimoto H. Comparison between immunohistochemistry and genetic clonality analysis for cellular lineage determination in feline lymphomas. *J Vet Med Sci.* 2011 Jul;73(7):945-7.
 25. Sato M, Yamazaki J, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Evaluation of cytoreductive efficacy of vincristine, cyclophosphamide, and Doxorubicin in dogs with lymphoma by measuring the number of neoplastic lymphoid cells with real-time polymerase chain reaction. *J Vet Intern Med.* 2011 Mar-Apr;25(2):285-91.
 26. Sato M, Yamazaki J, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Increase in minimal residual disease in peripheral blood before clinical relapse in dogs with lymphoma that achieved complete remission after chemotherapy. *J Vet Intern Med.* 2011 Mar-Apr;25(2):292-6.
 27. Sato M, Kanemoto H, Kagawa Y, Kobayashi T, Goto-Koshino Y, Mochizuki H, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Evaluation of the prognostic significance of BCL6 gene expression in canine high-grade B-cell lymphoma. *Vet J.* 2012 Jan;191(1):108-14.
 28. Mochizuki H, Takahashi M, Nishigaki K, Ide T, Goto-Koshino Y, Watanabe S, Sato H, Sato M, Kotera Y, Fujino Y, Ohno K, Uchida K, Tsujimoto H. Establishment of a novel feline leukemia virus (FeLV)-negative B-cell cell line from a cat with B-cell lymphoma. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011 Apr 15;140(3-4):307-11.
 29. Sato M, Goto-Koshino Y, Kanemoto H, Mochizuki H, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Characterization of canine BCL6 cDNA and detection systems for its protein expression. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011 Mar 15;140(1-2):166-9.
- 〔学会発表〕(計 44 件)
1. 藤野泰人、犬のリンパ腫 病型と治療指針、日本獣医学フォーラム京都地区大会 (招待講演) 2014年3月23日、メルパルク京都
 2. 藤野泰人、猫のリンパ腫 病型と治療指針、日本獣医学フォーラム九州地区大会 (招待講演) 2014年3月9日、福岡国際会議場
 3. 藤野泰人、免疫介在性貧血の病態と診断、日本獣医学フォーラム東北地区大会 (招待講演) 2014年3月2日、仙台国際センター
 4. 藤野泰人、リンパ球増加症の鑑別、CLL・低悪性度リンパ腫の診断分類と治療、日本獣医内科学アカデミー(招待講演) 2014年2月7-9日、パシフィコ横浜
 5. 藤野泰人、血球貪食症候群、動物臨床医学会(招待講演) 2013年11月15-17日、大阪国際会議場
 6. 藤野泰人、白血球系の異常を診極める、動物臨床医学会 (招待講演) 2012年11月16-18日、大阪国際会議場
 7. 藤野泰人、症例検討ライブ~先進のCBCツール「ドットプロット」を含む臨床検査データの読み方、動物臨床医学会 (招待講演) 2012年11月16-18日、大阪国際会議場
 8. 藤野泰人、血液疾患を極める! ~免疫介

- 在性血小板減少症の病態と診断、日本獣
医内科学アカデミー（招待講演）2013年
2月22 - 24日、パシフィコ横浜
9. 藤野泰人、輸血適応となる病態、日本獣
医内科学アカデミー（招待講演）2013年
2月22 - 24日、パシフィコ横浜
 10. 藤野泰人、猫とレトロウイルスの攻防、
日本獣医内科学アカデミー（招待講演）
2013年2月22 - 24日、パシフィコ横浜
 11. 藤野泰人、難治性免疫介在性溶血性貧
血・免疫介在性血小板減少症の治療、日
本獣医内科学アカデミー（招待講演）2013
年2月22 - 24日、パシフィコ横浜
 12. 藤野泰人、FeLV感染症にみられる血液異
常：退行性疾患と免疫異常、日本獣医内
科学アカデミー（招待講演）2012年2月
17 - 19日、パシフィコ横浜
 13. 藤野泰人、非再生性免疫介在性貧血
（NRIMA）、日本獣医内科学アカデミー（招
待講演）2012年2月17 - 19日、パシフ
ィコ横浜
 14. 藤野泰人、輸血療法の実際、動物臨床医
学会（招待講演）2011年11月19 - 21日、
大阪国際会議場

〔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

藤野 泰人（FUJINO, Yasuhito）
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助
教
研究者番号：70401180

(2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：