

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15007

研究課題名（和文）疾患スペクトラムの概念を導入した炎症性腸疾患/腸リンパ腫の病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathophysiology of inflammatory bowel disease / intestinal lymphoma based on the concept of disease spectrum

研究代表者

大参 亜紀 (Ohmi, Aki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任助教

研究者番号：50800653

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は犬の炎症性腸疾患と消化管型リンパ腫の病態を解明することを目的とし、その類似点と相違点の両方を見出すことに挑戦した。まず犬の消化管型リンパ腫において、人の腸管リンパ腫でも変異が認められる特定の遺伝子群に変異を検出することができた。さらに同疾患では特に細胞内シグナルの一つであるJAK/STAT経路が破綻していることが疑われたため、これに關与する遺伝子における変異も探索し、複数症例で検出することができた。本成果は犬と人の腸管リンパ腫の一部では共通の遺伝子変異が病態に關与していることを示しており、また犬の炎症性疾患と消化管型リンパ腫の病態を解明するための重要な足掛かりとなるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

犬において慢性的な消化器症状を引き起こす疾患として、炎症性腸疾患と消化管型リンパ腫が知られている。治療法や予後が異なるため両者の鑑別は重要とされているが、臨床症状のみでは鑑別できず、病理組織学的検査でも区別が困難である場合が多い。本研究において消化管型リンパ腫に認められる遺伝子変異を検出することができたため、今後はこの遺伝子変異を診断マーカーとして臨床応用することによって炎症性腸疾患と消化管型リンパ腫の鑑別がより容易になる可能性が示された。またこの遺伝子変異がもたらす生物学的な影響を詳細に解析することで、リンパ腫に対するより特異的な治療法につながる可能性も示された。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the pathology of canine chronic enteritis and gastrointestinal lymphoma, and sought to discover both similarities and differences between these two diseases. First, in canine gastrointestinal lymphoma, I could detect mutations in a specific group of genes that have been also found to be mutated in human intestinal lymphoma. Furthermore, it was suspected that the JAK/STAT pathway, which is one of the intracellular signals, is particularly disrupted in canine gastrointestinal lymphoma. Therefore, I investigated mutations in genes involved in this pathway and detected the mutations in several cases. These results show that common genetic mutations are involved in the pathology of intestinal lymphomas in a part of canine and human cases, and they also provides important information for elucidating the pathogenesis of chronic enteritis and gastrointestinal lymphoma in dogs.

研究分野：獣医学

キーワード：リンパ腫 炎症性腸疾患 慢性腸症 上皮内リンパ球 ゲノム異常

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は人や犬・猫でしばしば認められ、慢性的かつ難治性の消化器症状を呈する。犬や猫では、腸組織におけるリンパ球を主体とする炎症像の検出に基づいて診断され、その病態は原因不明の免疫介在性疾患と考えられているため、免疫抑制療法が適応となる。一方で同様の病理組織像を呈する疾患として消化管型リンパ腫が存在する。臨床症状は炎症性腸疾患と同様の難治性の消化器症状であるが、その治療には抗がん剤が適応となる。このように炎症性腸疾患と消化管型リンパ腫は治療法や予後が異なるため、その鑑別が重要とされている。この鑑別のためにはいくつかの病理組織学的特徴が重要とされているが、現実的には炎症性腸疾患と一部の消化管型リンパ腫の区別が困難である症例が少なくない。

リンパ球は分化の段階でそれぞれ固有の抗原受容体を発現するようになり、リンパ腫であれば単一の腫瘍リンパ球が増殖することから、抗原受容体遺伝子のクローン性を解析することが補助的な診断法として用いられる。しかし、病理組織学的には炎症性腸疾患と診断された症例であっても、このクローン性が認められる症例が 30%程度存在することが報告されており、一部の炎症性腸疾患の症例の腸組織では腫瘍性を疑う変化が起きている可能性が考えられる。実際に人の免疫介在性腸疾患の一つであるセリアック病の患者の一部では、リンパ球がクローン性に増殖し、長期的には消化器型リンパ腫を発症することが知られている。

本研究の代表者は犬や猫に発生する様々な内科疾患の診断と治療に長年携わっており、特に日本国内の犬において特定の品種で好発する消化器疾患に着目して研究を精力的に行ってきた。このような活動を通して、過去に知られていなかった品種特異的な消化器疾患を報告し、特に柴犬では炎症性腸疾患が好発すること、その他の犬種に比べて予後が極めて不良であること、また炎症性腸疾患と診断された柴犬では消化管においてリンパ球のクローン性増殖が高率で検出されることを示した。さらに犬において炎症性腸疾患から消化管型リンパ腫への変化を疑う症例を複数経験してきた。このような背景から、本研究では犬の炎症性腸疾患と消化管型リンパ腫は連続したスペクトラムを持つような疾患群ではないかという仮説が立案された。

## 2. 研究の目的

上記のような仮説に基づき、本研究では腸組織に浸潤するリンパ球に着目して、犬の炎症性腸疾患と消化管型リンパ腫のそれぞれにおいて腸組織に認められるリンパ球の分子生物学的特徴における類似点と相違点を検討することを当初の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Photo Isolation Chemistry 技術を用いたリンパ球の空間的遺伝子発現解析

炎症性腸疾患と消化管型リンパ腫の病変組織においてはリンパ球だけではなく上皮細胞などの様々な細胞が混在しているため、腸組織中に存在する細胞の中からリンパ球のみの遺伝子発現を解析する必要があると考えた。そのため本研究では近年開発された Photo Isolation Chemistry (以下、PIC) 技術を導入することとした。これは、蛍光顕微鏡下で光照射した領域に存在する細胞の RNA のみを抽出する技術であり、高解像度な位置情報を保持したまま遺伝子発現の解析を可能とするものである。この技術を駆使して、それぞれの疾患の上皮内あるいは粘膜固有層に存在する CD3<sup>+</sup> T リンパ球から RNA を採取し RNA-sequencing によって遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析することを計画していた。

しかしながら、種々の条件検討を実施したものの、腸組織を用いた場合にはその組織の特徴から PIC 技術では遺伝子発現解析を行うに十分な RNA を抽出することが困難であり、残念ながらその実施は困難と判断せざるを得なかった。

### (2) 消化管型リンパ腫における遺伝子変異の網羅的解析

そこで研究期間中に方針を転換し、次世代シーケンサーを用いて犬の消化管型リンパ腫における腫瘍細胞の遺伝子変異解析を実施することとした。

具体的には、まずは犬の消化管型リンパ腫症例から得た腫瘍組織を用いて Whole exome sequencing (WES) を実施し、正常な犬のゲノム配列と比較することで腫瘍細胞に認められる遺伝子変異を網羅的に抽出した。続いて、同定された遺伝子変異のうち、複数の症例に共通して変異が認められた遺伝子を抽出した。また、人の T 細胞性腸管リンパ腫において頻繁に変異が認められる遺伝子における変異が、犬の消化管型リンパ腫の腫瘍細胞にも認められているか探索した。

これらの検討から抽出された遺伝子変異、さらにはこの変異遺伝子群が関与していると考えられた細胞内シグナル経路の一つである JAK/STAT 経路に着目し、特に重要な制御因子である *STAT3*, *STAT5b*, *JAK1* 遺伝子における変異も含めて、より多くの症例を用いて Targeted next-generation sequencing (Targeted NGS) によって腫瘍細胞における変異の有無を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) WES を用いた犬の消化管型リンパ腫における遺伝子変異の網羅的解析

まずは消化管型リンパ腫に罹患した犬 4 症例の腫瘍組織を用いて WES を実施し、正常な犬ゲノム配列と比較することで網羅的に遺伝子変異を探索したところ、それぞれの症例において 1910-4602 の遺伝子変異が検出された。これらの遺伝子変異のうち、十分な read depth が得られているもの、そしてコードしているタンパクのアミノ酸配列に変化を及ぼすなど大きなインパクトがあると考えられる変異のみを抽出したところ、それぞれの症例において 2-147 の遺伝子変異が抽出され、症例間で非常に大きなばらつきがあることが示された。

これらの変異のうち、複数の症例に共通して変異が認められた遺伝子を探索したところ *NACC1* 遺伝子では 2 症例で共通して変異が認められた。続いて、人の T 細胞性消化管型リンパ腫において頻繁に変異が認められる遺伝子に着目したところ、*ASXL3*, *SOCS3*, *PRDM1*, *FYN*, *TET2* および *ZDBF2* 遺伝子における変異が 1 症例において認められた。また、これらの遺伝子群には JAK/STAT 経路の活性制御に関与する遺伝子が含まれていたことから、犬の消化管型リンパ腫の腫瘍細胞では人の T 細胞性消化管型リンパ腫と同様に JAK/STAT 経路の制御破綻が起きている可能性が見いだされた。

##### (2) Targeted NGS を用いた犬の消化管型リンパ腫における遺伝子変異の探索

次に、(1)の解析から抽出された遺伝子変異、および JAK/STAT 経路の重要な制御因子である *STAT3*, *STAT5b*, *JAK1* 遺伝子における変異の保有率に関してより多くの症例で検討することとした。

まず、35 症例の消化管型リンパ腫罹患犬の腫瘍組織および末梢血液由来 DNA を用いた Targeted NGS によって上記遺伝子に認められた変異の有無を探索し、末梢血液由来 DNA には認められず腫瘍組織のみに認められるものを体細胞変異として抽出したところ、*ZDBF2* 遺伝子を除く 6 遺伝子においてはいずれの症例においても当該変異は認められなかった。一方で、*ZDBF2* 遺伝子に関しては WES ですでに変異が検出された 1 症例とは別にもう 1 症例で同じ体細胞変異が認められた。この結果を受けて、35 症例の上記検体を用いて同様の手法で *ZDBF2* 遺伝子の全エクソン領域の DNA 配列を解析しその変異を探索したところ、新たに 3 症例において別の部位における体細胞変異が検出された(表 1)。*ZDBF2* は人の T 細胞性腸管リンパ腫の一つである単形性上皮向性腸管 T 細胞リンパ腫に罹患した患者の 44% で変異が認められると報告されているものの、同遺伝子における変異がその病態にどのように関与しているかは不明であり、人医学領域および獣医学領域の双方における今後の検討課題である。

表 1. 本研究により抽出された犬消化管型リンパ腫における *ZDBF2* 遺伝子変異

染色体番号	変異を認めた部位	リファレンス配列	変異配列	変異アノテーション
37	14886987	G	A	ミスセンス変異
37	14891841	G	T	ミスセンス変異
37	14893233	C	T	ミスセンス変異
37	14893518	C	T	ミスセンス変異
37	14892393	TA	T	フレームシフト

続いて、31 症例の消化管型リンパ腫罹患犬の腫瘍組織および末梢血液由来 DNA を用いて *STAT3*, *STAT5b*, および *JAK1* の 3 遺伝子における体細胞変異を上記と同様の手法で探索した。はじめに、人の T 細胞性腸管リンパ腫で高頻度に変異が認められるホットスポット点変異を探索したところ、1 症例で *STAT3* 遺伝子に人と共通する部位の変異が認められた。さらに、Targeted NGS によって上記検体を用いて *STAT3*, *STAT5b*, *JAK1* の 3 遺伝子の全エクソン領域の DNA 配列を解析しその変異を探索したところ、2 症例において *STAT3* 遺伝子の体細胞変異が、1 症例において *JAK1* 遺伝子の体細胞変異がそれぞれ認められた(表 2)。これらの遺伝子における変異は人の T 細胞性腸管リンパ腫の一つである腸管型 T 細胞リンパ腫に罹患した患者の 90% で変異が認められると報告されており、犬の消化管型リンパ腫の一部では人と同様に JAK/STAT 経路の制御破綻が起きている可能性が改めて示された。

表 2. 本研究により抽出された犬消化管型リンパ腫における *STAT3* および *JAK1* 遺伝子変異

遺伝子	染色体番号	変異を認めた部位	リファレンス配列	変異配列	変異アノテーション
<i>STAT3</i>	9	20601542	T	C	ミスセンス変異
	9	20607589	A	G	ミスセンス変異
	9	20608161	A	T	ミスセンス変異
<i>JAK1</i>	5	45404151	G	T	ミスセンス変異
	5	45404099	A	G	ミスセンス変異

本研究から得られた結果は、犬の消化管型リンパ腫症例の一部では人の腸管リンパ腫と同様の遺伝子変異が病態に関与していることを示すものである一方で、消化管型リンパ腫に罹患した症例の大部分に共通する遺伝子変異はなく、その分子病態は様々である可能性が示唆された。

本研究の当初の目的を考慮すると、今後この遺伝子変異をマーカーとして、炎症性腸疾患においても少ない頻度でこれらの変異を有する細胞が存在することを示すことで、両疾患が連続したスペクトラムを持つ疾患群であることを証明できるものと考えており、本研究はその足掛かりとなる実績を得ることができたと言える。

またこの遺伝子変異がもたらす生物学的な影響を詳細に解析することで、リンパ腫に対するより特異的な治療法につながる可能性も示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Ohmi Aki, Tanaka Miho, Rinno Jun, Tsuboi Masaya, Chambers James K., Uchida Kazuyuki, Goto Koshino Yuko, Tomiyasu Hiroataka, Ohno Koichi, Tsujimoto Hajime	4. 巻 9
2. 論文標題 Clinical characteristics and outcomes of Mott cell lymphoma in nine miniature dachshunds	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Veterinary Medicine and Science	6. 最初と最後の頁 609 ~ 617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/vms3.975	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 Kanemoto Hideyuki, Fujiwara-Igarashi Aki, Kobayashi Tetsuya, Harada Kei, Ichimata Masanao, Kim Sangho, Hosoya Kenji, Tomiyasu Hiroataka, Ohmi Aki, Tsujimoto Hajime	4. 巻 25
2. 論文標題 Retrospective study of feline tracheal mass lesions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Feline Medicine and Surgery	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) 10.1177/1098612X231164611	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松村尚季, 後藤裕子, 松本悠貴, 水上圭二郎, 碧井智美, 山田良子, 中川泰輔, 阪本恵美, 大参亜紀, チェンバース ジェームズ, 内田和幸, 桃沢幸秀, 富安博隆
2. 発表標題 犬の消化器型大細胞性リンパ腫における遺伝子変異の探索
3. 学会等名 第19回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ohmi, A., Mizuno, T., Chambers, J.K., Uchida, K., Tomiyasu, H
2. 発表標題 Pulmonary toxicity associated with nimustine (ACNU) in cats.
3. 学会等名 World Veterinary Cancer Congress (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 稲積 遥, 酒井 秀夫, 井手 香織, 笠原 幸一, 辻本 元, 原田 慶, 小林 哲也, 高橋 雅, 大参 亜紀, ジェームズ・K・チェンバース, 内田 和幸, 後藤 裕子, 富安 博隆
2. 発表標題 フローサイトメトリーを用いた犬のT細胞性慢性リンパ性白血病とT領域リンパ腫における抗原発現解析
3. 学会等名 第20回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 北川 弘之, 大参 亜紀, 小林 太地, 西村 亮平, 池田 彬人, 山本 貴恵, チェンバース・ジェームズ, 内田 和幸, 富安 博隆
2. 発表標題 PEG化リボソーム封入型ドキシソルピシンが奏効した肉腫NOSの犬の1例
3. 学会等名 第20回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2024年

〔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
---------	---------