

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658260

研究課題名（和文）レトロウイルス発現ライブラリーを利用したイヌ肥満細胞腫新規腫瘍化メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of novel neoplastic mechanisms of canine mast cell tumors by using a retroviral expression library method.

研究代表者

大森 啓太郎 (OHMORI KEITARO)

東京農工大学・大学院農学研究院・講師

研究者番号：20466915

研究成果の概要（和文）：

イヌ肥満細胞腫において、腫瘍化メカニズムとして報告されている *c-kit* 遺伝子の変異率を解析し、レトロウイルス発現ライブラリー法を利用して *c-kit* 遺伝子以外の腫瘍化メカニズムを探索した。イヌ肥満細胞腫では、半数以上で *c-kit* 遺伝子に変異が検出されなかった。次に、レトロウイルスを作製しイヌ骨髄由来肥満細胞へ感染させたが、感染効率が悪く、本方法を用いて *c-kit* 遺伝子以外の肥満細胞腫瘍化メカニズムを同定することは出来なかった。

研究成果の概要（英文）：

Mutations in *c-kit* gene have been reported to be important as a neoplastic mechanism in canine mast cell tumors (MCTs). In the present study, we investigated the incidence of mutations in *c-kit* gene in canine MCTs in Japan, and explored novel neoplastic mechanisms by using a retroviral expression library method. We found that mutations in *c-kit* gene were not detected in more than half of dogs with MCTs. We, next, created retrovirus and tried to establish a retrovirus-mediated gene transfer system to canine bone marrow derived mast cells. However, since transduction efficiency of retrovirus generated in this study was low, we could not identify *c-kit* gene-independent neoplastic mechanisms of canine MCTs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、臨床獣医学

キーワード：イヌ、腫瘍、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

イヌの皮膚腫瘍の約20%を占める肥満細胞腫の腫瘍化メカニズムには、stem cell factor (SCF) の受容体 KIT をコードする *c-kit* 遺伝子の変異が関与することが明らかとなっている。*c-kit* 遺伝子の変異を有する肥満細胞腫に対しては、分子標的治療薬であるチロシンキナーゼ阻害剤（メシル酸イマチ

ニブ）が著効を示し、治療薬として臨床応用され始めている。しかしながら、メシル酸イマチニブが効果を示す肥満細胞腫の症例は限定的であることは、臨床上良く知られた事実である。イヌの肥満細胞腫における *c-kit* 遺伝子の変異を調べた海外におけるこれまでの研究では、変異の割合はわずかに20%程度のみである。しかし、日本のイヌ肥満細胞

腫症例における *c-kit* 遺伝子の変異率に関する詳細は分かっていない。また、イヌ肥満細胞腫の多くで *c-kit* 遺伝子の変異以外の分子メカニズムが関与すると考えられるが、詳細な腫瘍化メカニズムについては不明である。

2. 研究の目的

本研究においては、イヌ肥満細胞腫の腫瘍化メカニズムにおける *c-kit* 遺伝子の変異およびその他の腫瘍化メカニズムの重要性を明かにし、*c-kit* 遺伝子以外の腫瘍化メカニズムをレトロウイルス発現ライブラリー法を利用して解明することである。

3. 研究の方法

(1) イヌ肥満細胞腫における *c-kit* 遺伝子 mRNA 全長の塩基配列解析

日本において外科的に摘出されたイヌの肥満細胞腫 19 検体、および肥満細胞腫細胞株 2 種類の計 21 検体を用いた。これらの検体から RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を得た。RT-PCR 法により *c-kit* 遺伝子全長を増幅し、DNA 配列解析装置により遺伝子配列を解析した。また、比較の為、正常犬より骨髓細胞を採取し、上記と同様の方法で *c-kit* 遺伝子の配列を解析した。

(2) レトロウイルス発現ライブラリー法による肥満細胞腫腫瘍化メカニズムの探索

①イヌ骨髓由来肥満細胞の樹立

正常犬から骨髓を採取し、CD34 陽性細胞を磁気細胞分離法により精製した後、無血清培地において組換えイヌ SCF の存在下で 4 週間以上培養することでイヌ骨髓由来肥満細胞を樹立した。

②レトロウイルス発現ライブラリーの作製

c-kit 遺伝子に変異を認めないイヌ肥満細胞腫細胞株 (HRMC) から RNA を抽出し、レトロウイルス cDNA 発現ライブラリー用の cDNA を作製した。次いで、パッケージング細胞株 (GP2-293 細胞株) に、レトロウイルス発現プラスミド (pMX) および水疱性口内炎ウイルスのエンベロープ糖タンパクプラスミド (pVSV-G) を遺伝子導入し、イヌの細胞にも感染可能なパントロピックレトロウイルスを作製した。作製したレトロウイルスを、接着系のヒト中皮腫細胞株、浮遊系のヒト肥満細胞性白血病細胞株およびイヌの骨髓由来肥満

細胞に感染させた。

4. 研究成果

(1) イヌ肥満細胞腫における *c-kit* 遺伝子 mRNA 全長の塩基配列解析

イヌ肥満細胞腫 21 検体および正常犬の *c-kit* 遺伝子の配列と、GenBank に報告されている配列を比較すると、第 96・781・1022・2035 番目の一塩基置換が高率に認められた。中にはアミノ酸置換を伴う変異が存在したが、腫瘍化への関与は不明であった。*c-kit* 遺伝子エクソン 11 の遺伝子変異の 1 つである Internal Tandem Duplication (ITD) は 5 検体 (23.8%) において認められた。また上記以外のアミノ酸置換を伴う点突然変異が、4 検体 (19.0%) において認められた。これらの変異が KIT の活性に影響を与える可能性はあるが、分布に規則性は認められなかった。また、12 検体 (57.1%) においては、アミノ酸置換を伴う *c-kit* 遺伝子の変異は確認されなかった。

以上の結果より、イヌの肥満細胞腫では *c-kit* 遺伝子の変異による KIT の恒常的活性化が主要な腫瘍化メカニズムと考えられてきたが、半数以上の症例で *c-kit* 遺伝子に変異が確認出来なかったことから、*c-kit* 遺伝子の変異以外の肥満細胞腫腫瘍化機構が存在することが示唆された。

(2) レトロウイルス発現ライブラリー法による肥満細胞腫腫瘍化メカニズムの探索

①イヌ骨髓由来肥満細胞の樹立

造血幹細胞および血液前駆細胞のマーカーの 1 つである CD34 を指標に、正常犬から採取した骨髓細胞中の CD34 陽性細胞を磁気細胞分離法を用いて分離した。その結果、90% 以上の精製度で CD34 細胞を分離することができた。次に、分離した CD34 陽性細胞を無血清培地においてイヌ組換え SCF の存在下で 4 週間以上培養することで、イヌ骨髓由来肥満細胞を培養することに成功した。

②レトロウイルス発現ライブラリーの作製

パッケージング細胞株に、pVSV-G と GFP 発現プラスミドを遺伝子導入して、イヌの細胞にも感染可能な GFP 発現レトロウイルスを作製した。次に、接着系の中皮腫細胞株に作製したレトロウイルスを感染させ感染効率を算出した結果、50% 以上の細胞においてレトロウイ

ルスを感染させることができたことから、高力価のウイルスを作成することに成功した。

③イヌ骨髄細胞およびイヌ骨髄由来肥満細胞へのレトロウイルス感染

イヌ骨髄細胞を分離し、上述の方法に従ってイヌ骨髄由来肥満細胞を培養した。分離後のイヌ骨髄細胞およびイヌ骨髄由来肥満細胞に②で作製したレトロウイルスを感染させたが、ほとんどの細胞に対し遺伝子導入が認められなかった。レトロウイルスは分裂期の細胞に対し感染することから、イヌ骨髄細胞およびイヌ骨髄由来肥満細胞を様々なサイトカインで刺激した後にレトロウイルスを感染させたが、同様にほとんどの細胞に対し遺伝子導入が認められなかった。一方、ヒト肥満細胞性白血病細胞株 (HMC-1) に対しては、約10~20%の細胞においてレトロウイルスによる遺伝子導入が認められた。

これらの結果から、レトロウイルス発現ライブラリー法を用いてイヌの肥満細胞腫における新しい腫瘍化メカニズムを発見することはできなかった。イヌ骨髄細胞およびイヌ骨髄由来肥満細胞に対しては、レトロウイルスよりもレンチウイルスを用いた遺伝子導入の方が効率的であると考えられ、この方法を用いることで新しい腫瘍化メカニズムが検出できる可能性が考えられた。

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 12 件)

(1) Ohmori K, Nishikawa S, Oku K, Oida K, Amagai Y, Kajiwara N, Jung K, Matsuda A, Tanaka A, Matsuda H. Circadian rhythms and the effect of glucocorticoids on expression of the clock gene period1 in canine peripheral blood mononuclear cells. *Vet. J.* 2013 in press 査読有 DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.10.010.

(2) Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Jung K, Ohmori K, Matsuda H. Stem cell factor contributes to tumorigenesis of mast cells via an autocrine/paracrine mechanism. *J. Leukoc. Biol.* 93(2) 245-250. 2013. 査読有 DOI: 10.1189/jlb.0512245

(3) Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Jang H, Kajiwara N, Amagai Y, Oida K, Ahn G, Ohmori K, Kang KG, Matsuda H. Daily intake of Jeju groundwater improves the skin condition of the model mouse for human atopic dermatitis. *J. Dermatol.* 40(3) 193-200, 2013. 査読有 DOI: 10.1111/1346-8138.12055.

(4) Matsuda A, Tanaka A, Pan W, Okamoto N, Oida K, Kingyo N, Amagai Y, Xia Y, Jang H, Nishikawa S, Kajiwara N, Ahn G, Ohmori K, Matsuda H. Supplementation of the fermented soy product ImmBalance™ effectively reduces itching behavior of atopic NC/Tnd mice. *J. Dermatol. Sci.* 67(2), 130-139, 2012. 査読有 DOI: 10.1016/j.jdermsci.2012.05.011.

(5) Tsukui T, Sakaguchi M, Kurata K, Maeda S, Ohmori K, Masuda K, Tsujimoto H, Iwabuchi S. Measurement of canine IgE using canine recombinant high affinity IgE receptor α chain (Fc ϵ RI α). *J. Vet. Med. Sci.* 74(7):851-856, 2012. 査読有 DOI: 10.1292/jvms.10-0520.

(6) Matsuda A, Tanaka A, Amagai Y, Ohmori K, Nishikawa S, Xia Y, Karasawa K, Okamoto K, Oida K, Jang H, Matsuda H. Glucocorticoid sensitivity depends on expression levels of glucocorticoid receptors in canine neoplastic mast cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144(3-4):321-328, 2011. 査読有 DOI: 10.1016/j.vetimm.2011.08.013.

(7) Tanaka A, Nomura Y, Matsuda A, Ohmori K, Matsuda H. Mast cells function as an alternative modulator of adipogenesis through 15-deoxy-delta-12, 14-prostaglandin J2. *Am. J. Physiol.* 301: C1360-C1367. 2011. 査読有 DOI: 10.1152/ajpcell.00514.2010.

(8) Okamoto N, Tanaka A, Jung K, Karasawa K, Orito K, Matsuda A, Amagai Y, Oida K, Ohmori K, Matsuda H. Silencing of Int6 gene restores function of the ischemic hindlimb

in a rat model for peripheral arterial disease. *Cardiovasc. Res.* 92: 209-217. 2011. 査読有 DOI: 10.1093/cvr/cvr203.

(9) Jung K, Tanaka A, Fujita H, Matsuda A, Oida K, Karasawa K, Okamoto N, Ohmori K, Jee Y, Shin T, Matsuda H. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated suppression of dendritic cell function prevents the onset of atopic dermatitis in NC/Tnd mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127(2):420-429.e1-6. 2011. 査読有 DOI: 10.1016/j.jaci.2010.10.043.

(10) Karasawa K, Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Okamoto N, Oida K, Ebihara N, Ohmori K, Matsuda H. Retinal degeneration and ed1 mutation in NC/Tnd mice—a human atopic dermatitis model. *Curr. Eye Res.* 36: 350-357. 2011. 査読有 DOI: 10.3109/02713683.2010.542268.

(11) Karasawa K, Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Okamoto N, Oida K, Ohmori K, Matsuda H. Patterns of aquaporin expression in the canine eye. *Vet. J.* 190: 72-77. 2011. 査読有 DOI: 10.1016/j.tvjl.2010.12.027.

(12) Qi X, Nishida J, Chaves L, Ohmori K, Huang H. CCAAT/enhancer-binding protein alpha (EBPalpha) is critical for interleukin-4 expression in response to FcepsilonRI receptor cross-linking. *J. Biol. Chem.* 286: 16063-16073. 2011. 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M110.213389.

〔学会発表〕(計5件)

(1) 北村亮、田中あかね、大森啓太郎、松田彬、雨貝陽介、松田浩珍. イヌ肥満細胞腫におけるc-kit mRNA全長の塩基配列解析. 第154回日本獣医学会学術集会. 2012年09月15日. 岩手大学(岩手県)

(2) 雨貝陽介、田中あかね、松田彬、大森啓太郎、松田浩珍. イヌ肥満細胞腫における幹細胞因子自己産生メカニズム. 第154回日本獣医学会学術集会. 2012年09月15日. 岩手大学(岩手県)

(3) 西川翔、田中あかね、松田彬、大森啓太郎、松田浩珍. ラジオ波を用いた癌温熱療法の効果についての分子生物学的検討. 第154回日本獣医学会学術集会. 2012年09月15日. 岩手大学(岩手県)

(4) 松田彬、田中あかね、雨貝陽介、大森啓太郎、松田浩珍. イヌ肥満細胞腫におけるグルココルチコイド感受性に関する検討. 第152回日本獣医学会学術集会. 2011年09月19日. 大阪府立大学(大阪府)

(5) 大森啓太郎、宮川まどか、高井政貴、田中あかね、吉成佑治、松田浩珍. *Scedosporium apiospermum*に対する高純度軟化水およびパルミチン酸塩の増殖抑制効果. 第152回日本獣医学会学術集会. 2011年09月19日. 大阪府立大学(大阪府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大森 啓太郎 (OHMORI KEITARO)

東京農工大学・大学院農学研究院・講師

研究者番号: 20466915