

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658263

研究課題名(和文)ペンブローク・ウェルシュコーギー犬における組織球異常のゲノム解析

研究課題名(英文)Genomic analysis of histiocytic proliferative disorders in Pembroke Welsh corgi dog

研究代表者

内田 和幸 (UCHIDA, Kazuyuki)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10223554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ウェルシュコーギー犬(PWC)の組織球性肉腫の分子病理発生機構を明らかにすることを目的として実施した。まずPWCの組織球性肉腫の罹患率を検討する目的で、本学附属動物医療センターにおけるイヌの組織球性肉腫の疫学調査を実施し、海外と異なり日本ではPWCにおける組織球性肉腫の発生率が高いことを示した。また組織球性肉腫に罹患したPWCのDNAを次世代型シーケンサーで解析したが、現在までに原因遺伝子変異の特定に至っていない。一方、*in vitro*研究に細胞株などの実験ツールは確立することができた。この細胞株は今後の組織球性肉腫研究の有用なツールになると考えている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research project is to clarify the molecular pathogenesis of the histiocytic sarcomas in Pembroke Welsh corgi dogs (PWC). To know the prevalence of histiocytic sarcomas of the PWC in Japan, an epidemiological study for histiocytic sarcomas of dogs in Veterinary Medical Center of the University of Tokyo, was conducted. The results revealed the high incidence of histiocytic sarcomas in the PWC, unlike the previous reports from foreign countries. We also analyzed the DNA of the affected PWC using next-generation sequencers, but so far yet to identify the gene mutations directly associated to tumorigenesis of histiocytic sarcomas. Besides, the cell line from histiocytic sarcoma from a PWC dog has been successfully established, that would be the useful experimental tools for the investigation of the tumorigenesis of histiocytic sarcoma in PWC dogs.

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：組織球性肉腫 イヌ 遺伝子異常 コーギー

1. 研究開始当初の背景

イヌの疾患の一部には犬種特異性が存在することが古くより知られているが、その遺伝的背景まで明確にされているものは比較的少ない。近年、特に国内で繁殖・飼育されている PWC 犬には、舌筋萎縮を特徴とする炎症性筋症、組織球性肉腫、および脊髄変性症がそれぞれの好発年齢で多発している。高齢で発症する変性性脊髄症は、国内外で発症がみられるものの、炎症性筋症と組織球性肉腫については、これまで海外からの報告がなく、日本で繁殖されている PWC 犬特有の疾患である可能性がある。申請者らは PWC 犬の炎症性筋症と頭蓋内組織球性肉腫の病態について検討し、PWC 犬の炎症性筋症が抗筋抗体を介した免疫介在性筋症であることを示し、さらに頭蓋内組織球性肉腫が通常の好発犬とされるバーニーズ・マウンテン・ドッグ等よりも国内では PWC 犬に高率に発生していることを既に明らかにした。これらの疾患は免疫系において中心的役割を担うマクロファージ異常に基づく疾患である可能性が高い。このため本犬種にはマクロファージ関連遺伝の異常が存在すると考えた。

そこで本研究では PWC 犬における組織球性肉腫が多発する背景を明確にするために主に遺伝子異常の有無に着目して研究を実施することとした。これまで、特定腫瘍が特定犬種に発生する機序については不明であったが、海外ではバーニーズ・マウンテン・ドッグやフラットコートドレトリバー犬における組織球性肉腫が多発する機序について盛んに分子生物学的見地より検証する研究が実施されている。このような分子生物学的研究は、対象とする腫瘍の腫瘍発生機序を詳細に解明するだけでなく、分子標的薬の解明に非常に重要な情報をもたらすものであり、特にヒトでは発生が稀な組織球系腫瘍にも応用が可能な学術情報となることが期待される。国内の獣医領域では、まだまだこのような分子探索研究は立ち遅れている。このため国内の特定犬種で発生している腫瘍疾患の分子的な腫瘍発生機序が解明される意味は非常に大きいと考えた。

2. 研究の目的

国内で繁殖飼育されているペンブローク・ウェルシュコーギー犬(PWC)には、若齢時(2~5才)に舌萎縮を特徴とする炎症性筋症、中年齢時(5~10才)に組織球性肉腫、高齢時(10才以上)に変性性脊髄症などの疾患が多発することが明らかになっている。本犬種の変性性脊髄症については、ヒトの筋萎縮性側索硬化症(ALS)の遺伝性発群の原因とされる SOD1 遺伝子変異と同様の変異が関連していることが明らかにされているが、炎症性筋症や組織球性肉腫の発症に関連する遺伝子異常については解明されていない。

本研究では特に本犬種の組織球性肉腫罹患症例について、その発症と単球・マクロフ

ァージの増殖に関連する遺伝子群の異常の有無に注目して検討し、その結果より組織球系細胞の異常のメカニズムを追究することを目的とした。この目的のために本研究では組織球性肉腫に罹患した複数の症例の血液より DNA を採取し、本疾患に特有の遺伝子異常を検証した。さらに罹患症例の腫瘍組織より、細胞培養を実施し、PWC の組織球性肉腫由来の細胞株を作出・定性して、*in vitro*での検証が可能な研究ツールを開発することも試みた。

3. 研究の方法

これまでの申請者らが病理組織学的検索により、組織球性肉腫と診断し現在、経過観察あるいは治療中のペンブローク・ウェルシュコーギー(PWC)犬、正常な PWC 犬、および PWC 以外の複数の正常犬の血液より DNA と RNA をそれぞれ抽出し、次世代型シーケンサーを用いて、全ゲノムを読み取り、*in silico* 解析により、組織球性肉腫罹患犬において、特徴的に認められる遺伝子異常について検討する。さらに解析の絞り込み項目として、主要白血球抗原 Class II 遺伝子、マクロファージ/B 細胞の増殖に関連する *Lyn* 遺伝子、*Dok* 遺伝子群、骨髄細胞の増殖に關与する *BMX* 遺伝子、必要に応じこれらの下流遺伝子群について特に着目して異常の有無を検討する。

また組織球性肉腫の組織より、異常増殖を止めず腫瘍細胞をマイクロダイゼクション法により単離・DNA を抽出して、上記遺伝子の異常の有無について確認する。

さらに *In vitro* 研究の実用的なツールを開発するために PWC 犬の組織球性肉腫より組織培養を行い、腫瘍細胞を細胞株化する。さらに確立された細胞株の性状を確認するために、既存の細胞株とその表面抗原マーカーの出現パターンや貪食能あるいは生理活性物質による反応などを比較検証した。さらに上記の研究で異常が確認された遺伝子異常の有無を確認した。

4. 研究成果

本研究は、ウェルシュコーギー犬(PWC)における組織球性肉腫の病理発生機構を明らかにすることを目的として実施した。

研究期間では、まず PWC の組織球性肉腫の罹患率を検討する目的で、本学附属動物医療センター(VMC)における過去の疫学調査を実施し、過去にイヌで組織球性肉腫と診断した症例の来院状況が調査された。調査期間において組織学的に 44 例、細胞診断に 29 例が組織球性肉腫と診断されたが、これらの症例のうちフラットコートドレトリバーが 16 例(odds ratio [OR] 62.0)、PWC が 15 症例(OR 9.7)、バーニーズ・マウンテン・ドッグが 14 例(OR 45.0)であり、PWC における組織球性肉腫の発生率が高い点で、明らかに海外の報告と異なっていることが確認された。

本結果は、平成 25 年度に学術雑誌に内容を公表した(論文業績 1)。本研究結果より、国内の PWC が高い確率で組織球性肉腫を発症しており、その発生に遺伝的背景が存在することを改めて示唆された。

また組織球性肉腫に罹患した PWC、正常な PWC、および PWC 以外の複数の正常犬の血液より DNA を抽出し、次世代型シーケンサーで全ゲノムを読み込み、in silico 解析を実施した。この際、組織球性肉腫の症例にのみ、SNP 解析で変異が確認でき、かつ白血球の増殖に関与することが明らかにされている遺伝子として BMX 遺伝子をその原因遺伝子として絞りこんだが、その後の解析で、標準として設定したボクサー犬の BMX 遺伝子が特殊であることが検証実験で明らかになった。現在、この結果については全ゲノムの絞り込み条件を再設定して検討を継続している。

また、組織球性肉腫の腫瘍発生、特に増殖活性に関わる遺伝子の変化を調べる目的で、市販されているゴールデン・レトリバー犬の皮下の組織球性肉腫より確立された細胞株における増殖シグナル系について BXM や EMR 4 を中心に探索した(学会発表 1)。本研究ではエレクトロポレーション法によりゴールデン・レトリバー犬の皮下腫瘍より確立された悪性組織球症由来の DH82 細胞株に 2 種類の EMR4-siRNA を導入し、目的遺伝子をノックダウン(KD)した。この KD 細胞を 72 時間後から 144 時間後にかけて 24 時間毎に Growth assay を行い、その増殖活性について評価した。また、KD72 時間後に回収した細胞から total RNA を抽出し、Canine オリゴ DNA マイクロアレイを用いて約 40000 プローブの発現情報をスキャンした。得られたデータを Genespring GX を用いて解析し、KD 群と control 群の間で有意な発現変化の認められた遺伝子群を抽出した。抽出した遺伝子群を用いて Gene Ontology 解析および Pathway 解析を行い、KD により発現が変動したシグナル経路を探索した。その結果、DH82 細胞への EMR4-siRNA 導入により約 70% の KD に成功した。Growth assay では、KD96 時間後に有意な増殖抑制がみられ、以後 144 時間後まで持続的な増殖抑制が認められた。マイクロアレイ解析では、Integrin などの細胞接着に関与する遺伝子や、HLA-DR、Iba1、CD163、CD204 など単球/組織球特異的分子の遺伝子発現が有意に低下していた。発現低下遺伝子群の Gene ontology 解析では、inflammatory response や response to wounding のカテゴリが抽出された。Pathway 解析では G タンパクシグナル伝達経路や Ras/MAPK 経路の他、コレステロール合成や B 細胞受容体シグナル経路に関与する遺伝子が多数発現減少していた。本研究により、EMR4 がイヌ組織球性肉腫における自律的細胞増殖に重要な役割を担っていることが示された。これは細胞増殖に関わる Ras/MAPK 経路が抑制されたためだと考えられた。また、網羅的遺伝子発現解析

により細胞接着や細胞分化、免疫応答などへの関与も示唆され、EMR4 が細胞増殖以外にも様々な役割を担っている可能性が考えられた。特に Integrin など細胞接着に関与する分子は、癌の浸潤性や転移能に深く関与することから、これらをタンパク質レベルでも詳しく検索することで、組織球性肉腫特有の高い浸潤・転移のメカニズムを解明できると考えられた。現在上記のと同様の検討を PWC より樹立した細胞株でも実施することを計画している。

さらに現在継代している PWC の組織球性肉腫由来細胞と上記の市販の組織球性肉腫由来細胞株との性状を比較検証し、PWC の組織球性肉腫の特異性を検証するための基礎データを収集した。PWC の組織球性肉腫由来の細胞株については、初期継代時より定期的に in vitro およびマウスへの移植を利用した in vivo における細胞定性を実施した。検索の結果、本研究で確立された培養細胞系は、DH82 細胞と同様、Iba-1、HLA-DR、CD163、CD204 等の樹状突起細胞あるいはマクロファージの表面抗原をよく発現しており、その発現はターンに相違は認められなかった。さらに両細胞の貪食能を in vitro で比較したが、明瞭な相違は認められず、マウスへの移植能や増殖能にも明瞭な相違は認められなかった。これらの結果より、本研究で確立された細胞株はほぼ市販の DH82 細胞と同様の性状を有していることが明らかになった。今後は本細胞株と市販細胞株のゲノムを比較検証して、犬種の相違による差異を検証する予定である。

これまでのところ、本研究で当初目的とした PWC の組織球性肉腫の原因遺伝子変異の特定にはまだ至っていないが、そのために必要な基礎データと細胞株などの実験ツールは本研究を通じてほぼ準備できたと評価している。今後これらを利用して、最終的に PWC における組織球性肉腫の腫瘍発生メカニズムを詳細に解明し、その治療法の確立に有用な情報を提供したいと考える。

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 1 件)

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. 2014. J Vet Med Sci. In press. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.13-0414>
(査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

坪井誠也, 井手鉄哉, 渡邊 学, 内田 和

幸, 菅野純夫, 中山裕之. イヌ組織球性肉腫細胞における EMR4 の機能解析およびシグナル探索. 2013 獣医内科学アカデミー (2013 年 2 月 22 日-24 日、パシフィコ横浜)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vet.m.u-tokyo.ac.jp/byouri/research03/research03.htm>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

内田 和幸 (UCHIDA, Kazuyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：

10223554