

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32669

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25660244

研究課題名(和文) 犬の顆粒細胞腫細胞の黒色腫細胞への形質転換に関わる遺伝子動態

研究課題名(英文) Changes of DNA profile in canine granular tumor cells transformed to melanoma cells

研究代表者

盆子原 誠 (Bonkobara, Makoto)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50343611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：顆粒細胞腫瘍株化細胞の培養経過、ヌードマウス移植腫瘍、発生部位(口腔、爪床、眼)の異なる悪性黒色腫株化細胞について遺伝子動態を解析した。培養経過では細胞増殖シグナル伝達系、腫瘍化に関連する遺伝子の有意な発現増加と酸化的リン酸化遺伝子の減少が、腫瘍では細胞増殖シグナル伝達系、腫瘍化、酸化的リン酸化、細胞間接着に関する遺伝子の有意な増加が認められた。眼悪性黒色腫細胞は口腔と爪床に比較し、細胞増殖シグナル伝達系、酸化的リン酸化、腫瘍化、細胞間接着に関連する遺伝子の有意な高発現と細胞増殖シグナル伝達系、メラニン形成、黒色腫腫瘍化に関連する遺伝子の低発現が認められ、腫瘍化に関連する遺伝子が異なっていた。

研究成果の概要(英文)：Gene profile was examined in 3 passages of granular cell tumor (GCT), 3 masses developed on nude mouse with GCT and 3 established malignant melanoma cells from oral, nail bed and ocular. Genes related to cell proliferation signaling pathway (PI3K, MAPK, PPAR) and pathways in cancer were significantly increased in GCT with advanced passages, whereas genes related to oxidative phosphorylation were significantly decreased. Significant increase of genes related to cell proliferation signaling pathway (VEGF etc), pathways in cancer, gap and tight junction, and oxidative phosphorylation were observed in developed mass with advanced weeks. In addition, gene profile in ocular melanoma cell was quite different from another 2 cells, showing significant higher expression of genes related to cell proliferation signaling pathway (PI3K), pathways in cancer, gap and tight junction, and lower expression of genes related to cell proliferation signaling pathway, melanogenesis, and melanoma.

研究分野：獣医学

科研費の分科・細目：臨床獣医学

キーワード：顆粒細胞腫 黒色腫 形質転換機構 遺伝子動態 犬

1. 研究開始当初の背景

犬の顆粒細胞腫 (granular cell tumor) は、おもに口腔 (口唇、歯肉、舌) に発生する比較的まれな良性腫瘍である。本腫瘍細胞は、細胞質内のエオジン好性顆粒を特徴とし、vimentin 陽性、S-100 陽性、NSE (neuron specific enolase) 陽性の円形細胞で、神経系の細胞由来と推測されている。しかしながら、その細胞形態や免疫組織学的特徴は悪性末梢神経鞘腫、血管周皮腫あるいは横紋筋腫と類似する点も多く、顆粒細胞腫細胞は細胞形態や形質の変化する未分化な細胞と推測されている。一方、これまでに顆粒細胞腫の株化細胞を樹立し、SCID マウスに接種したところ、メラニン顆粒を有する黒色腫細胞からなる腫瘍を形成した。したがって、この株化細胞の遺伝子動態を経時的に検討することで、顆粒細胞腫細胞の黒色腫細胞への形質転換機構が解明できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、樹立した顆粒細胞腫株化細胞の遺伝子動態を継代培養の経過について、またヌードマウスに接種して腫瘍形成までを経時的に解析する、ならびに悪性黒色腫株化細胞の遺伝子動態と比較することで、顆粒細胞腫細胞の黒色腫細胞への形質転換機構を解明しようとするものである。

3. 研究の方法

顆粒細胞腫株化細胞の培養経過については、培養 8 代目、13 代目、16 代目の株化細胞を用いた。また腫瘍形成の経過については 13 代目の株化細胞 (約 2×10^6 個) をヌードマウスの背部に移植し、2 週、3 週、4 週後に形成された腫瘍を採取した。その他、対照として発生部位 (口腔、爪床、眼) の異なる 3 種の悪性黒色腫株化細胞を用いた。

得られた継代数の異なる株化細胞、腫瘍、対照とした株化細胞について、常法に従い total mRNA を抽出し、DNA マイクロアレイ Ver. 2 (Agilent Technology Co.) を用いて、Agilent Expression Array 解析を行った。また、原発腫瘍、顆粒細胞腫株化細胞 (8 代、23 代目)、形成された腫瘍 (4 週後) の検体についてはマーカー蛋白 (desmin、-SMA、CD133、vimentin、nestin、S-100、NGFR、Melan A) についてその発現を検討した。

4. 研究成果

1) マーカー蛋白の発現

原発腫瘍では、CD133 陽性、vimentin 強陽性と顆粒細胞腫の特徴を示し、8、23 代目の株化細胞は、いずれも CD133 強陽性、vimentin 強陽性、S-100 強陽性、nestin 強陽性と株化ならびに継代により神経幹細胞に脱分化しているものと考えられた。また形成した腫瘍では CD133 陽性、vimentin 強陽性、S-100 陽性、nestin 強陽性、melanA 陽性と顆粒細胞腫株化細胞を移植して形成させた腫

瘍は黒色腫に変化したことが再確認された (表 1)。

表 1. 原発腫瘍、株化細胞、形成された腫瘍に於けるマーカー蛋白の発現

	Original Tumor cell	cultured cells		transplanted tumor cells
		P8	P23	
-SMA	-	-	-	-
desmin	-	-	-	-
vimentin	+++	+++	+++	+++
S100	-	+++	+++	+
Nestin	-	+++	+++	+++
NGFR	-	-	-	-
Melan A	-	-	-	+
CD133	+	+++	+++	+

2) 遺伝子動態

株化細胞の継代培養に伴う変動: 図 1 に株化した顆粒細胞腫瘍細胞の培養経過 (第 8, 13, 16 代目) に伴う変動を示した。培養

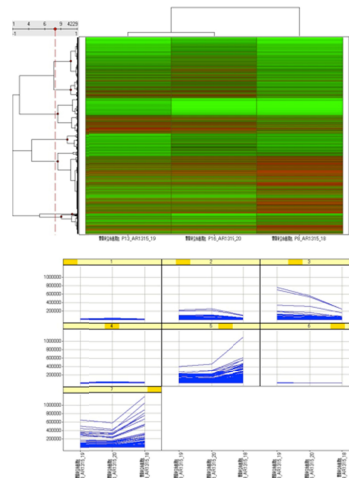
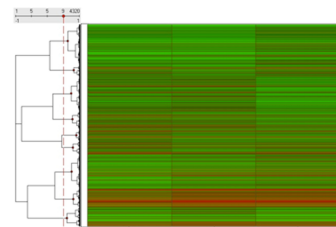


図 1. 顆粒細胞腫瘍細胞の培養経過 (第 8, 13, 16 代目) に伴う変動
上段: mapping 下段: クラスター毎の変動

経過に伴って有意に発現が増加する遺伝子群では細胞増殖のシグナル伝達系、腫瘍化に関連する遺伝子が、有意に減少する遺伝子群では酸化的リン酸化に関連する遺伝子が上げられた。

形成された腫瘍における変動: 株化細胞をヌードマウスに移植して 2 週、3 週、4 週後に形成された腫瘍における変動を図 2 に示した。



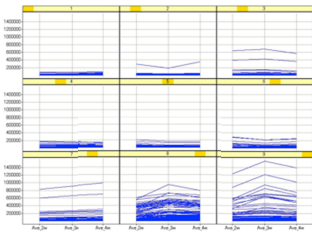


図 2. 形成された腫瘍（2 週、3 週、4 週目）の経過に伴う変動
上段：mapping 下段：クラスター毎の変動

株化細胞を移植して得られた腫瘍では、有意に発現が増加する遺伝子群では細胞増殖のシグナル伝達系、腫瘍化、酸化的リン酸化、細胞間接着に関する遺伝子が上げられたが、有意に減少する遺伝子群は認められなかった。

悪性黒色腫株化細胞の遺伝子動態：
発生部位の異なる悪性黒色腫株化細胞の遺伝子動態を図 3 に示した。口腔ならびに爪

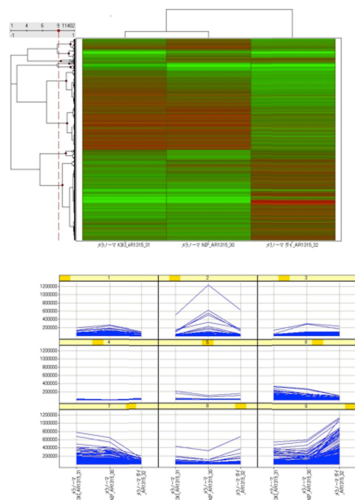


図 3. 発生部位の異なる悪性黒色腫株化細胞の遺伝子動態
上段：mapping 下段：クラスター毎の変動

床と眼由来株化細胞とでは遺伝子プロファイルが著しく異なっていた。すなわち、眼由来悪性黒色腫株化細胞では口腔ならびに爪由来株化細胞に比較して、有意な高発現を示す遺伝子群には細胞増殖のシグナル伝達系、酸化的リン酸化、腫瘍化、細胞間接着に関連する遺伝子が、有意な低発現を示す遺伝子群には細胞増殖のシグナル伝達系、メラニン形成、黒色腫瘍化に関連する遺伝子が上げられ、眼に発生する悪性黒色腫瘍細胞はその腫瘍化に関連する遺伝子が口腔や爪の腫瘍細胞とは異なることが明らかになった。

以上のように、顆粒細胞腫細胞は継代培養をすると脱分化が起これと考えられ、関連

する遺伝子は細胞増殖のシグナル伝達系、腫瘍化に関連する遺伝子ならびに酸化的リン酸化に関連する遺伝子に存在すると推測された。また腫瘍形成過程ならびに黒色腫細胞への形質転換には細胞増殖のシグナル伝達系、腫瘍化、酸化的リン酸化、細胞間接着に関する遺伝子が関与すると推測された。さらに、悪性黒色腫細胞は発生する部位により腫瘍化に関連する遺伝子が異なるものと考えられた。

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 0 件)
なし

〔学会発表〕(計 1 件)

・犬の顆粒細胞腫瘍の株化と株化細胞の特性
山下傑夫、鈴木聡、岡野久美子、二瓶和美、田村俊介、内田和幸、盆子原誠、小野憲一郎、小川博之
第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年

・ここまで使えるフローサイトメトリー
盆子原誠
獣医臨床病理学会 2013 年大会、2013 年
・分子標的薬による肥満細胞腫の治療
獣医臨床フォーラム、2013 年

〔図書〕(計 0 件)
イマチニブによる肥満細胞腫の治療
Veterinary Oncology, 34-41. 2014.
インターズー

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
なし

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

盆子原誠 (MAKOTO BONKOBARA)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授
研究者番号：50343611

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

