

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850208

研究課題名(和文) 犬のリンパ腫における腫瘍ウイルスの網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of oncogenic viruses in canine lymphoma

## 研究代表者

馬場 健司 (Baba, Kenji)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：90452367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イヌのリンパ腫におけるウイルス性因子の関与を検討した。網羅的探索では、イヌのリンパ腫細胞からはウイルスは検出されなかった。また、ヒトの一部のリンパ腫の発生に關与することが知られているEpstein-Barr virus (EBV)の感染についても、イヌのリンパ腫における感染率は極めて低いと考えられた。以上より、イヌのリンパ腫においては、ウイルス感染による発生機構は一般的ではないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, viral involvement was investigated in canine lymphoma. No virus was found in the tumor cells from dogs with naturally occurring lymphoma by comprehensive analysis. The prevalence of Epstein-Barr virus (EBV) known as an oncogenic virus in some forms of human lymphoma was very low in canine lymphoma. In summary, viral involvement seemed to be less common in canine lymphoma.

研究分野：獣医学

キーワード：リンパ腫 イヌ 腫瘍ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) リンパ腫はリンパ系組織から発生する悪性腫瘍であり、イヌの腫瘍全体の7~24%、造血器腫瘍の約90%を占める非常に発生率の高い悪性腫瘍である。イヌのリンパ腫は、好発犬種、解剖学的発生部位、組織学的形態、免疫表現型において多種多様であることから、多因子性の疾患であると考えられている。これまでに、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常、遺伝的素因などが発生要因として示唆されているが、その全貌はいまだ不明な点が多い。このように、現状では明確な病因が不明なままリンパ腫に対して一様に化学療法や放射線療法が行われているが、その平均生存期間は約1年程度であり、十分に奏効しているとは言えない。したがって、今後の治療成績の向上には病因の解明が不可欠であり、病因に応じた治療戦略を構築する必要がある。

(2) バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、NK/T細胞型リンパ腫といったヒトの一部のリンパ腫では、Epstein-Barr virus (EBV)などのウイルス感染が原因となることが知られている。興味深いことに、近年、イヌのB細胞型リンパ腫からもEBVに類似したウイルスが検出され、リンパ腫の発生に關与している可能性も示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ウイルス性リンパ腫がイヌにも存在するという仮説のもと、イヌのリンパ腫における感染ウイルスを探索し、発癌因子としての関与を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) Rapid determination system for viral nucleic acid sequences (RDV)法による感染ウイルスの網羅的探索

検体：山口大学動物医療センターにおいてリンパ腫と診断されたイヌ14頭を対象とした。症例から腫瘍細胞を含む検体（リンパ節針吸引または胸水・腹水）を採取した。得られた細胞を*in vitro*で3日間培養した後、培養上清からRNAを抽出し、RDV法に供した。

RDV法：用途に合わせていくつか確立されているRDV法の中で、本研究では多検体解析を目的としたRDV version 3.1を用いた。

(2) イヌのリンパ腫におけるEBV様ウイルスの感染に関する検討

EBV遺伝子の検出：イヌリンパ腫細胞株7種（B細胞由来：3種、T細胞由来：4種）におけるEBV様ウイルスの感染をPCR法により検討した。

抗EBV抗体の検出：山口大学動物医療セン

ターにおいてリンパ腫と診断されたイヌ52頭および対照としてリンパ腫以外の疾患35頭から採取された血漿または血清を用いて、ELISA法にてEBVカプシド蛋白に対する抗体の陽性率を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 全てのリンパ腫検体において、RDV法により複数の増幅遺伝子断片が得られた（図1）。しかし、シーケンス解析の結果、これらの遺伝子断片はいずれもウイルスに由来するものではなく、本研究においてはウイルスの感染を明らかにすることはできなかった。

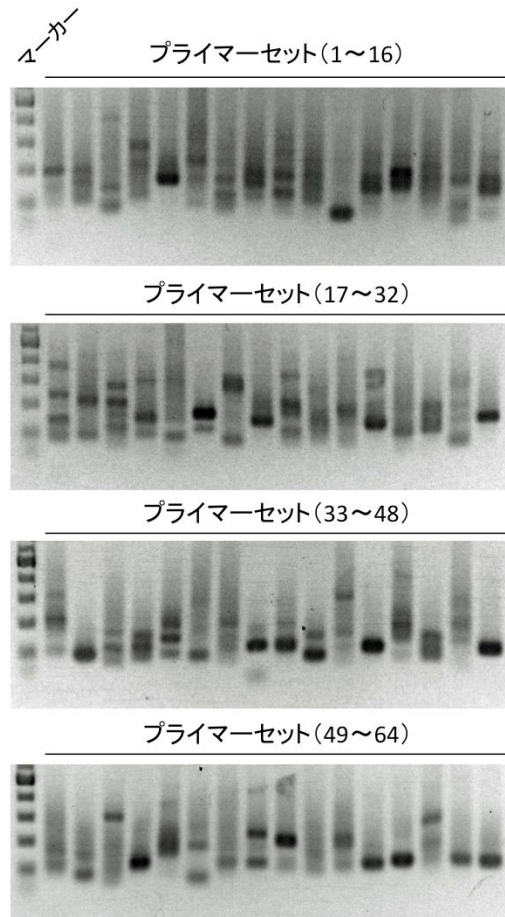


図1 RDV法による遺伝子断片増幅の1例

本研究で増幅された遺伝子断片の多くはシュードモナス属などの細菌に由来する遺伝子であった。その原因として、検体採取時または検体処理時の混入やアッセイ試薬への混入が考えられた。RDV法はごく微量な遺伝子も増幅可能な高感度検出系であるため、特に臨床検体においては環境中の微生物の混入に細心の注意を払う必要があると考えられた。また、一部の検体では細胞由来のリボソームRNAなどの遺伝子断片が検出された。RDV法は組織や細胞の核酸が多く含まれる検体ではこれらの遺伝子が増幅されてしまうため目的のウイルス由来遺伝子を検出することが困難となる。そのため本研究では、in

*in vitro* で短期間培養した細胞の上清を検体として用いたが、培養上清中に混入した微量の細胞由来の核酸がノイズとなりウイルスの検出力を低下させた可能性も考えられた。一方で、ウイルス由来遺伝子がいずれの検体からも検出されなかったことから、少なくともイヌのリンパ腫におけるウイルス感染は一般的ではないものと考えられた。

(2) 次にイヌのリンパ腫と EBV 様ウイルス感染の関連性を検討した。まず、イヌのリンパ腫細胞株における EBV 様ウイルスの感染を解析した結果、いずれの細胞株においても EBV 様ウイルスの感染は認められなかった(図2)。

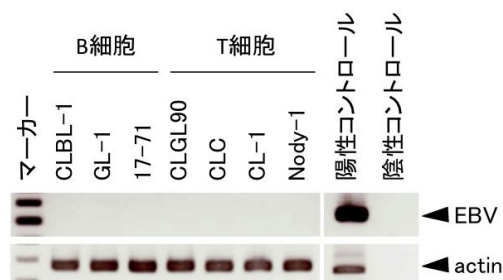


図2 PCR法によるEBVの検出結果

次に、イヌのリンパ腫症例 52 頭および非リンパ腫症例 35 頭における抗 EBV 抗体の保有状況を検討した(図3)。O.D 値の平均±標準偏差は、リンパ腫群で  $0.078 \pm 0.033$ 、非リンパ腫群で  $0.071 \pm 0.020$  であり、両群間に有意差は認められなかった(*t* 検定、 $p=0.29$ )。ただし、リンパ腫症例のうち1頭では、やや高い O.D 値(0.214)が認められ、抗 EBV 抗体が陽性である可能性が示唆された。この検体は過去に採取され冷凍保存されていたものであったため、残念ながらその他の解析を行うことはできなかった。そのため、この症例における EBV 様ウイルスの感染を確定することはできなかった。

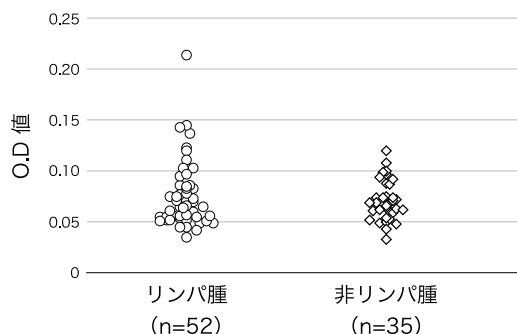


図3 抗EBV抗体の検出

過去の報告では、イヌにおける抗 EBV 抗体の陽性率は、リンパ腫 48 頭中 8 頭(16.7%)および非リンパ腫 41 頭中 3 頭(7.3%)であった<sup>1)</sup>。この報告と比較して本研究でリンパ腫

群および非リンパ腫群のどちらにおいても抗 EBV 抗体の陽性率が低かった理由として、調査の対象となった国・地域の違いや検出系の違いが考えられた。したがって、EBV 様ウイルスがイヌのリンパ腫の発症および病態に關与している可能性については、同一の検出系による世界各地での疫学的データのさらなる蓄積が必要と考えられた。

本研究では当初の目的であるイヌのリンパ腫に關与するウイルスは検出されなかったため、少なくともウイルスが一般的な発症要因ではないと考えられた。しかし、EBV 様ウイルスを含めたウイルスによる発症機構は否定できないため、今後もさらなる解析が望まれる。

(参考文献)

1) Huang SH et al., Evidence of an oncogenic gammaherpesvirus in domestic dogs. *Virology*, 427, 2012, pp107-117.

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2件)

Kabayashi S, Igase M, Kobayashi K, Kimura A, Shimokawa-Miyama T, Baba K, Noguchi S, Mizuno T, Okuda M. Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  expression and effects of its inhibitors in canine lymphoma. *J. Vet. Med. Sci.*, 査読有, 77, 2015, pp1405-1412.  
DOI: <http://doi.org/10.1292/jvms.15-0258>

Kabayashi S, Minami K, Ogawa Y, Hamaji T, Hwang CC, Igase M, Hiraoka H, Miyama TS, Noguchi S, Baba K, Mizuno T, Okuda M. Expression of  $\text{O}^6$ -methylguanine-DNA methyltransferase causes lomustine resistance in canine lymphoma cells. *Can. J. Vet. Res.*, 査読有, 79, 2015, pp201-209.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26130852>

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権] 出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

馬場 健司 (BABA, Kenji)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：90452367

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし