

平成 30 年度日本獣医生命科学大学 特色ある研究プロジェクト経費に係る実績報告書

1 動物種間を越えた環境に潜む感染因子の疫学・生態学とその制御に関する研究

1. 研究者の所属・氏名等

獣医保健看護学科 獣医保健看護学基礎部門
准教授 青木博史

2. 研究の目的

「One Health」は、ヒト・動物・環境の関係における総合的な健全性を表す考え方であり、越境性感染症などの地球規模の脅威に対してのみならず身近な感染症についても適応される。しかし、感染性因子の生態に関する調査研究は増えているものの病原体と動物・環境との関係は不明な点が多く、特に身近な感染症に関しての調査報告は限られている。それら知見の体系的な集積によって感染性因子の生態が明らかになれば、One health に貢献する感染対策モデルの提案などへの展開が期待できる。そこで本研究は、都市型獣医療における環境、産業動物の飼養環境、野生動物の生息環境などに関与する本学専門家が既に有するネットワークをブランディングの素材・原点と捉え、諸環境における感染性因子の分布調査を継続的に実施し、疫学解析に展開するためのデータを蓄積することを目的とする。さらに、疫学と生態学を融合した解析が可能な組織を構築し、ヒト・動物・環境の健全化に貢献する情報発信および衛生的提案を図ることを目的とする。

3. 研究の計画・方法

本研究は、申請者（ウイルス学・感染症疫学）、山本俊昭准教授（生態学）および加藤卓也講師（野生動物学）の専門分野の異なるメンバーで構成し、寫本樹助教（生態学）および塩川舞助教（ウイルス学）の2名が連携して遂行する。

本年度は、産業動物および産業動物飼育環境に出没する小・中・大型野生鳥獣（ネズミ、アライグマ、きつね、タヌキ、イノシシ、シカ、野鳥等）又は衛生害虫に由来する検体、家庭動物および住宅環境近隣領域で捕らえた小・中型野生動物（アライグマ、タヌキ等）に由来する検体の収集を試みる。調査対象となる感染性因子としては、検体採取環境を考慮しながら物理化学的抵抗性の高い非エンベロープ小型球形ウイルスを中心に指標ウイルスを選定し、それらウイルスに特異的な遺伝子を PCR/RT-PCR 法またはリアルタイム PCR 法で検出する。対象病原体の遺伝子が増幅された場合には、それら PCR 増幅産物の塩基配列を決定し、分子疫学解析を行う。さらに、一定量の分子疫学データが揃った場合には、各検体の付帯情報（日時・場所・生体情報）をもとに、疫学的・生態学的解析を行う。また、次年度以降の継続を図り、感染性因子の生態解明や

予防策の検討等への展開を目指す。

4. 研究の特色

本研究は、任意の病原ウイルスについての感受性動物における調査あるいは発症を動機とする感染症の調査ではなく、環境に焦点を置くことにより、感受性動物と直接又は間接的に交差しうる異種動物や物質等を対象とした調査を行い、ウイルスを指標に環境におけるリスクの分布を明らかにしようと試みることに特色がある。また、専門分野の異なる教員で調査グループを構成することにより、横断的・融合的な検体収集や解析を可能とし、動物・環境の関係を総合的に捉えようと試みることに特色がある。

5. 研究の成果

1) 産業動物および飼育環境に出没する野生鳥獣に関する調査＊一部非公表とする

牛飼育農場由来検体に対して牛疾病の病原ウイルス5種を、豚飼育農場由来検体に対して豚疾病の病原ウイルス4種を指標とした。同一豚飼育農場で採取した野鳥および中型野生動物糞便および舎内床スワブから特定の病原ウイルス（豚ウイルスAとする）の遺伝子が検出され、ウイルス分離および分子疫学解析を行った。その結果、活性ウイルスは分離できなかったものの、いずれも日本国内で最も多く流行する遺伝子型であること、野鳥糞由来ウイルスが2系統に分けられること、床スワブ由来と中型野生動物糞便由来のウイルスがほぼ同一であることなどが判明した。豚ウイルスAの自然宿主は豚であるが、その分布に野生鳥獣や環境が関与することが明らかになった。

複数の豚飼育農場で採取したネズミ糞、衛生害虫、舎内床スワブから特定の病原ウイルス（豚ウイルスBとする）の遺伝子が検出された。ウイルス分離および分子疫学解析を行った結果、活性ウイルスは分離できなかったものの、数年にわたって当該地域に流行していたこと、農場によって遺伝子型が異なること、経年的に汚染する農場があることなどが判明した。農場にいる衛生害虫やネズミが豚ウイルスB汚染に関与していることが明らかとなった。

2) 家庭動物および住宅環境近隣領域で捕らえた野生動物に関する調査＊一部非公表とする

家庭動物由来検体に対してウイルス属5種を指標とした。収集した家庭動物由来検体のうち、イヌ由来糞便3検体から犬パルボウイルス、ネコ由来7検体からは猫パルボウイルスが検出された。また、ネコ由来検体について分子疫学解析を行った結果、季節および地域性がみられ、ウイルスの土着化の可能性が示唆された。

収集した野生動物由来検体について解析を継続しているが、パルボウイルス属以外の複数のウイルス属のウイルスが検出されている。特に、いずれの野生動物からも特定の

ウイルス属が検出されており、動物種特異性が存在するかなどの詳細な遺伝的および疫学的解析を進めている。

また、2019 年度以降の継続調査に備え、家庭動物および野生動物の検体収集範囲の拡大の計画を立てた。

3) 成果の公表等

- (1) 平成 30 年度近畿中国農業試験研究推進会議（農研機構西日本農業研究センター）重点課題講演：「畜産農場における野生動物が関与する感染症とその対策」、2019 年 1 月 23 日、広島県。
- (2) 平成 30 年度岐阜市民公開講座（岐阜大学大学院）：「ワンヘルスから考える動物の感染症－飼育動物から環境への病原体の放出－；家畜ウイルスの感染戦略－環境に潜むウイルスたち」、2019 年 2 月 7 日、岐阜県。
- (3) 野生動物救護獣医師協会講習会：「家畜ウイルス感染症－野生鳥獣での発生と対策を考える」、2019 年 2 月 17 日、東京都。

2 アレルギー性疾患の発症機序に関する多角的研究

1. 研究者の所属・氏名等

動物科学科 動物生体防御学教室
教授 有村 裕

2. 研究の目的

アレルギー性疾患は、先進国において過去 30 年程の間に増加の一途をたどってきた。しかしながら、症例が増加した原因については衛生仮説を含めていくつか提案されているが確定したものはなく、同様にアレルギー性疾患の発症機序は完全には理解されておらず、治療法についても満足の行く解決策には程遠い状態にある。そこで本研究では、これらの未解明な諸問題を解き明かしていくことを目指す。そのためにまず、アレルギー性疾患の主たるエフェクター細胞であるマスト細胞の性状について、アレルギー反応を誘導しやすいマウスとそうでないマウスを用いて解析する。また IgG ではなく IgE が選択される分子機序について、さらに近年注目が増している好酸球や好塩基球のアレルギーでの役割について、様々に調べを進めて行く。同時に、線虫を用いて寄生虫感染に近い状態で免疫系がどのような影響を受けるのかを解析することで、アレルギー性疾患の発症機序、ならびに疾患が増えた原因の両方についてのヒントを探る。

3. 研究の計画・方法

1) マスト細胞の性状に関する研究

ヒトではアレルギーになりやすい人となりにくい人がいる。マウスでも同様に系統によってアレルギー感受性が異なる。そこで、アレルギーになりやすい傾向が見られる BALB/c マウスとなりにくい C57BL/6 マウスを用いて、その原因に迫る。最も一般的な I 型アレルギーでは、IgE とマスト細胞が中心的な役割を担う。これまで T 細胞やマクロファージの性状には、マウスの系統による差が存在

することが知られているが、マスト細胞では確立されていない。私達は少し前よりマスト細胞の系統差の問題に取り組んでいる。マスト細胞は末梢血に存在しないため、骨髓から *in vitro* で分化誘導した骨髓由来マスト細胞を用いて実験を行ったところ、BALB/c と C57BL/6 マウス由来の細胞では、細胞増殖、分化の仕方、脱顆粒反応の感受性、細胞内シグナル分子のリン酸化などに違いが認められた。そこで、これらの違いがどのような原因に因るのか、さらに解析を試みた。

2) 顆粒球の分化誘導と機能解析

近年、好酸球や好塩基球がアレルギー性疾患の発症機序に深く関わっているという報告がなされている。アレルギー性疾患は必ず IgE 産生を伴うが、抗体のクラススイッチが IgG ではなく IgE に傾くためには、B 細胞が周辺の細胞から IL-4 を受け取ることが必須条件である。従来この IL-4 はヘルパー T 細胞が分泌すると考えられてきたが、ヘルパー T 細胞は元々 IL-4 を産生しやすい細胞ではなく、T 細胞自身もまた予め IL-4 を受け取ることが必要である。最初の IL-4 を産生する細胞が何かが長年の謎であるが、その候補として好酸球や好塩基球があがっている。しかしながら、これらの細胞はマウスの末梢血に 1% 未満しか存在せず、その性状を研究するのは容易ではない。そこで、この項目では始めに、好酸球（や好塩基球）を増やすための条件を検討した。

3) 線虫を用いた衛生仮説の検証

過去 30 年以上にわたりアレルギー性疾患は大幅に増加した。1989 年に提唱された衛生仮説では、環境中の微生物や寄生虫の存在が免疫系に影響を与え、その結果、アレルギー性疾患を抑制してきた可能性について言及している。この説を検証するためにこれまで多くの試みがなされているが、納得できる結論には至っていない。寄生虫感染とアレルギー性疾患が反比例すると言われる時の説明としては、抗原性の異なる IgE に対するマスト細胞の競合抑制モデルである。このモデルを検証するために、線虫を用いて免疫応答の詳細を解析することにする。私達が用いる線虫は *C. elegans* であり非寄生性であるが、最も遺伝子操作のしやすい線虫である。始めに *C. elegans* をマウスに投与して IgE 産生を促すことができるか検討したところ、確かに IgE が産生された。このことから、この線虫は寄生虫感染によって IgE 産生が起きるのかを解析する実験モデルになりうるということが分かった。この系を用いて IgE が産生機序について、さらなる実験を試みた。

4. 研究の特色

アレルギー性疾患には、さまざまな免疫細胞が関与しており、疾患の発症段階によっても、その関わり方は異なる。アレルギーの症状が出る局面では、マスト細胞から脱顆粒が生じ、顆粒に含まれる化学的メディエーターにより、例えば血管透過性が亢進され、発赤、浮腫、痒みなどの種々の症状につながる。マスト細胞が活性化されるまでの段階を遡ると、マスト細胞→IgE 抗体→B 細胞→ヘル

パー T 細胞→樹状細胞→アレルギーの順番であると理解されている。このように多彩な細胞が関与する本疾患を総合的に理解するために、方法にも記載したように、本研究では少なくとも3つの切り口から解析を試みる。1) マスト細胞の性状に関する研究、2) 顆粒球の分化と機能解析、3) 線虫を用いた衛生仮説の検証、である。いずれもアレルギー発症にとって重要な細胞あるいは段階である。本研究では、多面的な解析を進め、本疾患を理解するための多くのヒントを得ることが目標であり特色にもなっている。

5. 研究の成果

1) マスト細胞の性状に関する研究：

BALB/c と C57BL/6 マウス由来のマスト細胞を用いて脱顆粒反応を行い、その際に見られたチロシンリン酸化の違いについて再現性があるかをまず調べた。その結果、①確かに2系統のマスト細胞は異なるリン酸化反応を示した。BALB/c マウス由来の細胞では、100、50、35kDa 付近において C57BL/6 由来細胞よりも強いチロシンリン酸化が見られた。その一方で、75kDa 付近においては逆に C57BL/6 細胞において強いチロシンリン酸化を示した。さらに BALB/c において2~10分で B6 よりも強い ERK のリン酸化が見られた。これらの結果から、リン酸化程度の違いが見られた分子が、脱顆粒に至るシグナルの強弱を決定している可能性が示唆された。そこで過去に報告された分子を文献上で調べ、それらの分子について発現レベルを2系統間で比較することにした。まず1回目のウエスタンブロット実験では、C57BL/6 よりも BALB/c で濃いバンドが見られたのは MKP-1 (43kDa) であり、Hck (55kDa)、Dok-2 (55kDa)、SOCS-3 (34kDa)、SH-PTP1 (60kDa) は同程度のバンドが見られた。2回目の実験では、刺激を0~10分加えて同様の抗体を用いたところ、SOCS-3 は BALB/c で濃いバンドが見られ、Dok-2、MKP-1 は同じ濃さであった。3回目の実験では BALB/c で濃く見られたのは MKP-1、Dok-2 で、SH-PTP1 は同程度のバンドが見られ、Dok-1 で C57BL/6 の方が濃いバンドが見られた。したがって、②少なくとも MKP-1 は BALB/c で発現が高い可能性が示され、Dok-1 についても発現が異なる可能性が残っている。今後は、③これらの分子の発現について再現性をさらに確かめ、また④脱顆粒に対する影響も解析したい。

2) 顆粒球の分化誘導と機能解析：

まず、①末梢血、腹腔における好酸球の正常値を決定した。その結果、好酸球 (SiglecF⁺) は末梢血では0.2-0.9%、腹腔では0.9-3.2%となった。つぎに②IL-5を用いて末梢血細胞、腹腔細胞、骨髓細胞に対して分化を誘導した。BALB/c の末梢血細胞、腹腔細胞ともに day4-5 で好酸球が約4%に微増したのに対し、骨髓細胞は day11 で約49%と大きく増加し、IL-5 の好酸球の誘導は骨髓細胞でより強い効果が認められた。このことから、IL-5 に対する反応性は細胞の未熟度が必要と思われた。つぎに③IL-5 とその他のサイトカインを組み合わせることで骨髓細胞の分化誘

導をより促進するか調べた。その結果、IL-5 と IL-13 を混合することによって、細胞が顕著に増殖していることが示された。そこで④IL-5+IL-13 で増えた細胞を改めて調べたところ、好酸球割合はむしろ IL-5 単独培養で32.5%と最も高い割合になり、FACS の FS/SS (細胞の大きさ/内部構造) プロットでは、IL-5+IL-13 での培養は好酸球ではない分画が増加していることが分かった。つぎに機能的成熟に調べるために、好酸球の脱顆粒についてカルシウムイオノフォアで試みた。その結果、⑤SS 値が736 から694 まで減少したことから、培養で得た好酸球は脱顆粒を誘導できることが分かった。また⑥好酸球の細胞表面のレセプターを調べたところ、FcγR と CCR3 の発現は確認されたが、FcεRI の発現は見られなかった。即ち、IgG-FcγR を介して攻撃対象に結合できる可能性が示された。以上のことから、得られた好酸球は成熟しており、IL-5 のみでも概ね分化が進むことが示され、好酸球の機能を解析可能であると思われた。今後は、逆に末梢血や腹腔細胞ではなぜ IL-5 に反応しにくいのか、CFSE や Ki68 で染色して増殖程度を測定する。またその分子論的な原因を探る。さらに今回用いなかった多種類のサイトカインの組合せで好酸球の分化をスクリーニングする。対照として好塩基球、好中球も解析する。さらに転写因子 (C/EBP α, GATA-1/2, Gfi-1 など) を遺伝子導入して顆粒球分化を解析する。また顆粒内容物の MBP、ECP、EPO、EDN などの測定を試みる。

3) 線虫を用いた衛生仮説の検証：

C. elegans による IgE 産生の様子を調べるために、まず①マウスに C. elegans を複数回投与し、血中 IgE 濃度が増加することを確認した。この時、②投与回数に応じて IgE の産生量が増加するという結果が得られた。一方、投与匹数によって大幅に変動することはなかった。その原因としては C. elegans は成虫でも体長1mm程度であるため、マウスの体にとってはごく微量に過ぎず、そのため匹数の差の影響が出なかった可能性も考えられた。サイトカイン産生については、③C. elegans 投与後の脾臓細胞で IL-4 産生が誘導されたことが分かった。一方で、IFN-γ 産生については、投与の有無にかかわらず大きな変化は見られなかった。この結果から IFN-γ の産生如何にかかわらず、IL-4 産生が開始されれば2型免疫応答を引き起こし、IgE へのクラススイッチが誘導される可能性が示唆された。C. elegans 投与後の初期反応では、死虫体を腹腔および皮下投与し、一定時間後、虫体ならびに腹腔、皮下滲出細胞の回収を試みた。その結果、④統計的有意差はなかったが、腹腔では時間の推移とともに回収できる虫体数が皮下よりも速く減少する傾向が見られた。腹腔滲出細胞の FACS 解析では、⑤投与後の時間経過により Gr-1 陽性細胞 (好中球) が増加したが、反対に CD19 陽性細胞 (B 細胞)、F4/80 陽性細胞 (マクロファージ) の割合は減少していたことが分かった。C. elegans 付着細胞を蛍光染色したところ、⑥主に F4/80、Gr-1 陽性細胞が観察された。FACS

解析や蛍光染色の結果からは、C. elegans に対して先に組織に局在するマクロファージが結合し、その後で好中球が誘導されたという可能性が考えられた。今後は、産生された IgE 抗体が線虫を認識できるか、また IgE の標的分子の同定を試みる。これらの実験を通して、線虫に対する宿主の応答と、線虫が内在する免疫制御の効果の両面を解析する。

3 血液型物質を標的とした感染症・がん研究の基盤形成

1. 研究者の所属・氏名等

獣医保健看護学科 獣医保健看護学基礎部門
教授 近江俊徳

2. 研究の目的

本研究は、日本獣医生命科学大学研究ブランディングを構築するための特色ある研究課題として、欧米の獣医学部に先駆け明らかとした多数の血液型関連遺伝子変異 (Omi et al. PLoS One 2016) を用い、小動物の適性な輸血医療に向けた研究を継続するとともに、近年進展している外来生物のレセプターあるいは疾患による抗原変化など感染症・がん研究の標的分子としての血液型物質に注目し、血液型物質と疾患との関連を探索する。

本申請課題は、以上の目的を達成することで、生命・環境を繋ぎ、本学が目指す One Health に貢献する研究拠点構築の一端を担うことが強く期待される。

3. 研究の計画・方法

本研究では未解明である動物における血液型物質と疾患について、主に分子遺伝学的、分子生物学的手法により、ネコおよびイヌの血液型物質の種類とネコおよびイヌパルボウイルス感染症、各種腫瘍培養細胞の性状のを用いた分子生物学的手法を分子 1) パルボウイルス感染個体由来の血液試料およびがん細胞株などの関連を解析するため、細胞膜表面のシアル酸分子種の同定と定量、ウイルス、腫瘍細胞の遺伝子解析を計画している。

4. 研究の特色

本研究課題の基盤となる血液型の研究は、すでに本学で 30 年以上の歴史があり、また血液型の遺伝子研究は現在

欧米の獣医学部としてのぎを削っている。研究室レベルで現在実施している本研究を、特色ある研究として大学として採択されることで、生命と環境を繋ぎ、One Health に貢献する研究へと発展することが期待される。なお、本研究内容の一部は、科学研究費基盤 (C) にも採択され、関連疾患の予防、機序解明、治療などを目的とした当該研究課題の推進は社会的にも意義深い。

5. 研究の成果

①イヌおよびネコの血液型別ゲノムバンクの継続的収集と遺伝子解析

ネコ約 178 例の血液型判定を行い、血液型別ゲノムを収集した。そのうち、CMAH 遺伝子に変異が認められている B 型ネコの 9 例の CMAH 遺伝子の解析を行った。その結果、ディプロタイプ 2 (D2) が 4 例 (44.4%)、D3 が 1 例 (11.2%)、D4 が 4 例 (44.4%) であった。この結果は当研究室が解析した昨年までの結果と同様であり B 型ネコの CMAH 遺伝子のディプロタイプは D2、D3 および D4 がメジャーであることが再確認された。

②パルボウイルス感染症個体の収集・ネットワーク構築
疾患研究において必要なパルボウイルス感染症個体の収集について、開業獣医師及び民間研究所と協力体制を一部構築し、臨床現場にて簡易検査キットによるパルボウイルス感染疑いと判明した個体の血液 (可能な検体のみ)、キット使用済み試薬、口腔粘膜 (可能な検体のみ) などの試料収集に着手するとともに、至適材料の検討などを行った。

③ネコパルボウイルス (FPV) 感染症疑い個体の分子ウイルス学的解析

ネコパルボウイルス感染症疑いのある 9 例のネコについて、試料よりウイルス核酸の抽出および遺伝子増幅、塩基配列の決定を行った結果、8 個体より当該ウイルスを同定した (研究協力青木博史准教授)。この結果をもとに、8 個体はネコパルボウイルス感染症と確定診断した。

④ネコパルボウイルス (FPV) 感染症個体の血液型物質と CMAH 遺伝子解析

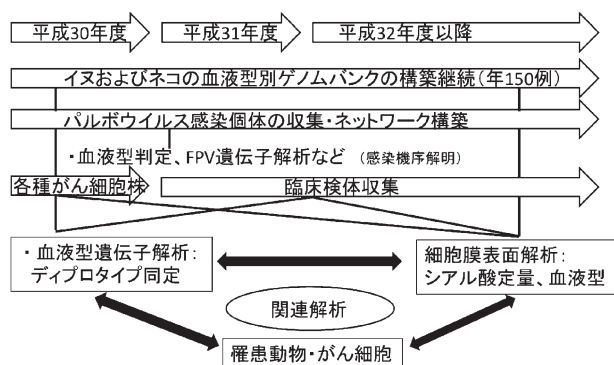
赤血球が得られたネコパルボウイルス (FPV) 感染症個体について、血液型を判定した結果、すべて Neu5Gc を発現する A 型であった。また、CMAH 遺伝子を解析では、変異部位は A 型に相当する配列であった (解析は一部で、現在進行中)。この結果は、ネコおよびイヌでパルボウイルスは、Neu5Gc に吸着するという報告と齟齬はなかった。しかし、ネコ種では Neu5Gc 型が多くを占めるため、今後も解析例数を増やす必要がある。

以上の知見が得られるとともに、本年度は、その他に腫瘍培養細胞の CMAH 遺伝子解析、イヌパルボウイルス検体の収集も一部実施した。したがって、本研究課題は順調に進んでいると考え、継続的な研究体制が整った。

関連業績 (2018 年度 学会等発表)

1. 比較臨床：小動物血液型研究の最前線。

近江俊徳



第 15 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 抄録集
p.142 2019 年 2 月 16 日

2. ネコ AB 式血液型を担う CMAH 遺伝子変異の同定とその応用

近江俊徳、宇田川智野、中澤翔太、宇埜友美子、川上翔太、金岡春央梨、佐藤茉水、本田安里紗、銀 梓、中村知尋、小林輔、浅野潤三、皆上大吾、落合和彦、多田尚美、筒井敏彦、盆子原誠、土田修一

第 1 回ニチジュウシンポジウム 2018 2018 年 12 月 7 日

3. 交差適合試験不適合 B 型ドナーネコの血清学的・遺伝学的解析

近江俊徳、宇埜友美子、川上翔太、土田修一、浅野潤三、落合和彦、皆上大吾、稲垣健志、坂本敦司、小林輔

DNA 多型学会第 27 回学術集会 2018 年 12 月 6 日

4. イヌ CMP-Neu5Ac 水酸化酵素遺伝子翻訳領域の 1 次構造決定と非同義置換 SNPs の同定

宇埜友美子、川上翔太、落合和彦、近江俊徳

DNA 多型学会第 27 回学術集会 2018 年 12 月 6 日

5. ネコ AB 式血液型を担う CMAH 遺伝子のジェノタイプピング：c.364C > T 変異型ホモ接合体を有する AB 型ネコの同定

金岡春央梨、中村知尋、佐藤茉水、本田安里紗、矢口雅美、川上翔太、宇埜友美子、坂本敦司、皆上大吾、盆子原誠、落合和彦、土田修一、近江俊徳

第 161 回日本獣医学会学術集会 2018 年 9 月 12 日

4 ヒスタミン合成酵素 Histidine decarboxylase 欠損マウスを用いた、生体の機能維持及び形態形成におけるヒスタミンの役割に関する研究

1. 研究者の所属・氏名等

獣医学科 獣医解剖学研究室

講師 大塚裕忠

2. 研究の目的

アレルギー反応などの初期症状における主たる原因物質であるヒスタミンは、生体内における生理活性アミンとして非常に古くから研究が進められており、アレルギーのみならず食中毒においても重要な物質である。またアレルギー反応以外にも、ヒスタミンは複数の受容体を介して様々な生体反応に関与しており、癌に対する T 細胞の活性化やリウマチにおける破骨細胞の活性化などにおけるヒスタミンの機能について解明されてきた。

本研究においては、ヒスタミン合成酵素である Histidine decarboxylase（以下 HDC）を遺伝的に欠損したマウスを用いて、野生型マウスと各臓器の発生や、生体における機能、細胞分布などを比較解析することで、生体内で合成されるヒスタミンが生体組織の機能維持に与える作用について解明する。さらに、HDC 欠損マウスにおいて、給餌や常在細菌叢をコントロールし、外因性のヒスタ

ミンの影響を解明することを目的とする。

3. 研究の計画・方法

- 1) ヒスタミン合成酵素 HDC 及びヒスタミン受容体の生体内分布の解析

ヒスタミンの合成酵素である HDC については、肥満細胞以外での生体内局在は不明な点が多い。また遺伝的に HDC を欠損したマウスにおいて、ヒスタミンの受容体の局在が野生型マウスと同様であるかどうかは不明である。1 ヶ年目は、野生型マウスにおける生体内 HDC 発現細胞及び HDC 欠損マウスにおけるヒスタミン受容体の解析を行うために、免疫組織化学による形態学解析を実施する。さらに、様々な条件下における HDC 発現細胞やヒスタミン受容体発現細胞の動態を解析し、ヒスタミンが個体発生時における器官形成や機能維持にどのように関与しているかについて研究を進める。

- ①ヒスタミン合成酵素 HDC 欠損動物各組織における個体発生の解析

器官形成時における内因性ヒスタミンの機能を確認するために、野生型マウスと HDC 欠損マウスを用いて、胎児期、出生時、離乳前、離乳後及び成体の諸臓器を採取し、免疫組織化学やフローサイトメトリー等による形態学解析を中心に実施する。特に 1 ヶ年目でヒスタミン受容体の発現が認められた組織については、重点的に解析を実施する。

- ②内因性ヒスタミン誘導時における成体反応及び形態学的変化の解析

ヒスタミン合成酵素 HDC は、LPS や様々なサイトカインによって誘導される。そこで、成体の野生型マウスに HDC 誘導物質を投与し、血中や各組織でのヒスタミンの濃度の変化、各組織での組織形態の変化について解析を実施する。

- 2) 外来性ヒスタミンが生体に与える影響の解析

野生型及びヒスタミン合成酵素 HDC 欠損マウスにおいて、ヒスタミンフリーの給餌を実施し、それぞれの、マウスの血中や諸臓器におけるヒスタミン濃度を測定する。また、ヒスタミン受容体発現の見られる組織を中心に、免疫組織化学やフローサイトメトリー等により、血中やリンパ性器官などの細胞動態を解析する。さらに、腸内細菌、特にヒスチジン利用細菌についてコントロールし、各臓器におけるヒスタミンの発現や組織形態の変化について解析を実施する。

4. 研究の特色

本研究は、マウスを用いた基礎研究であり、形態学解析に基づいて HDC の機能解明を追求することを目的としている。しかしながら、本研究の結果や HDC 欠損マウスは食品中や常在細菌による外来性ヒスタミンが生体へ与える影響について考察を進めることで、食品の安全性やアレルギー等のヒスタミンに関連した疾患と常在細菌叢との関連性を解明し、食と生命、環境と健康の繋がりへと展開することが期待出来る。

5. 研究の成果

HDC 欠損マウスと野生型の組織を比較したところ、胸腺や脾臓では明確な差異が認められなかった。しかしながら、小腸上皮内リンパ球において、HDC 欠損マウスで明らかな数値増加が確認された。これらの細胞は CD8a 陽性のキラー T 細胞であった。これまでにヒスタミンとリンパ性器官の形態における関連性を示した報告はなく、今後、より詳細な研究を進めることで、個体発生や免疫系制御におけるヒスタミンの新たな機能を示す可能性を示唆する結果である。

なお、本研究の結果については、昭和大学学士会招待講演において、報告を行った他、第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会において、報告を行う予定である。

5 国産肉用乳用種の資源確保に関する畜産経営学的アプローチ「キタウシリ」を事例の中心として一

1. 研究者の所属・氏名等

動物科学科 システム経営学教室
教授 小澤壮行

2. 研究の目的

キタウシリ生産に関する経営実態調査
一豊頃町農業協同組合および足寄町農協を対象に一

本調査の目的は、道東地域の後継牛確保における、地域性究明の一環として雄子牛問題を取りあげて、飼料を完全に自給している乳用種肥育経営の収益性を明らかにするとともに、今後の経営展開について方策を提示する。

3. 研究の計画・方法

チクレングループとの連携により、肉牛経営と酪農経営が共存する豊頃町農協および足寄町管内を調査地に選定し、ヒアリングを実施する。調査では、①肥育素牛供給の地域性および経営形態の差異による収益性の解明、②農協担当より雄子牛の生産状況と性判別精液の利用状況を聴取し、③生産者より経営概況、現在に至るまでの経緯、今後の経営展開等のヒアリングを実施する。なお、システム経営学教室の中村紅葉を帯同者として同行させた。

4. 研究の特色

システム経営学教室では、酪農経営における後継牛確保の一環として、性選別技術の普及に伴う雄分婉比率低下 (45%) の問題を取り上げ、肥育経営の収益性を研究している。キタウシリは北海道を代表する乳用種肥育であり、生産者および会員農協の意向調査を実施し、素牛供給と肥育経営との収益性の関連性を解明することに特徴がある。

5. 研究の成果

調査の結果、乳用雄子牛の供給地である十勝管内の酪農家は、肉牛相場高騰の影響により性選別精液の利用率が低いこと、利用者は、農協の指導において選択性を高めるために雌精液を利用していることが明確になった。しかし、豊頃町農協管内はチクレングループの指導のもとで、あえて性選別技術を用いずに、肥育素牛確保のために乳用雄子

牛を生産していた。性判別精液の利用は、肉牛振興地域と酪農振興地域との地域性が認められ、収益性の高い肥育経営の実態を明らかにした。今後の研究として、北海道の乳用種肥育経営の実態究明と収益性改善をテーマに、北海道チクレンの指導のもと、インテグレーションが進行しているが、養豚経営同様に収益性の高い優良事例として報告論文を作成し提示したい。また、動物科学科の各教室に対し肥育牛に関する研究の推進を図り、産学連携による今後の実績につなげたい。

6 イヌ AR 複合体を起点としたホルモン療法抵抗性前立腺がん診断・治療戦略の創出

1. 研究者の所属・氏名等

獣医保健看護学科 獣医保健看護学基礎部門
准教授 落合和彦

2. 研究の目的

近年の獣医療技術革新により、伴侶動物の寿命は長期化し、それに伴い腫瘍性疾患は増加傾向にある。人と伴侶動物が幸福に共存するには健康寿命の増進こそが不可欠であり、転移や再発を伴う難治性固形がんに対するがん治療ブレイクスルーが必要となっている。申請者は Reduced Expression in Immortalized Cells (REIC) の抗腫瘍効果を中心とした機能解析について研究を進めてきた。REIC はヒトの多種類のがんで高頻度に発現が低下していることが知られており、ヒトがん由来株化細胞接種マウスモデルに REIC 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Ad-REIC) を用いて強制発現させると、アポトーシスを誘導すると同時に全身性に抗がん免疫活性を賦活化する機能を持つことを明らかにした。申請者はこれまでに、REIC 遺伝子の腫瘍特異的アポトーシス誘導能に着目し、イヌおよびネコの乳腺腫瘍細胞株における REIC 遺伝子およびタンパク質発現の減少を立証し、Ad-REIC による抗腫瘍効果についても証明した。

近年、日本人男性で前立腺がんの新規罹患数が増加しているが、本疾病を自然発症する動物はヒトとイヌに限られるという報告がある。多くの雄イヌは飼育を容易にする目的で去勢術が施される。これにより、体内アンドロゲンレベルは著減し、雄性生殖器疾患の発症率は減少するが、しばしば前立腺がんが発生する。アンドロゲン欠乏環境下で生じた前立腺がんの多くは、代表的な治療手段である AR シグナル伝達制御を目的としたホルモン療法に抵抗性を示すため、予後が非常に悪い。これは、ヒト前立腺がんに対するホルモン療法実施過程の一部に生じる難治化病態と近似しており、イヌ前立腺がんの発症・難治化メカニズム解明の意義は大きい。申請者はこれまでに、その一端が Small Glutamine-rich Tetratricopeptide repeat-containing protein α (SGTA) にあり、REIC 投与により、SGTA 機能を制御し、AR シグナル伝達復帰を促すことができる可能性をヒトとイヌで証明した。

本申請課題においては、これまでの研究成果をさらに深化させるために、難治性イヌ前立腺がん由来培養細胞に対する REIC 強制発現によるアポトーシス誘導と、その際に起きる AR 複合体のコンフォメーション変化について細胞生物学的および免疫学的手法を駆使して解析することを目的とした。さらに、関連分子の細胞内動態を精査し、早期発見が難しいイヌ前立腺がんの診断マーカー開発にも挑戦する。

3. 研究の計画・方法

本研究計画は4ヵ年で実施予定である。

1 年目（平成 30 年度）

去勢雄イヌ前立腺がん症例から樹立され、申請者らが性状解析した CHP-1 細胞株における AR 複合体の発現状態および細胞内局在を免疫染色、免疫沈降法で解析する。また、REIC 遺伝子強制発現系（プラスミドおよび必要に応じて Ad-REIC の使用も検討）によるアポトーシス誘導を試みる。新たなイヌ前立腺がん細胞株の樹立を研究計画全体にわたり継続する。

2 年目（平成 31 年度）

前年度に引き続き、REIC 強制発現系によってアポトーシスを誘導した CHP-1 細胞と、その他新たに樹立するにおいて AR 複合体の細胞内局在およびコンフォメーション変化を免疫学的手法により解析する。さらに、ヒトホルモン療法感受性（LNCaP）および抵抗性（PC3）細胞における AR 複合体成熟促進分子 FKBP52 発現状況をプロファイルし、ホルモン療法抵抗性獲得との相関を解析する。

3～4 年目（平成 32, 33 年度）

CRISPER/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて、CHP-1 細胞その他の SGTA および FKBP52 遺伝子を KO し、DHT 刺激依存的／非依存的な AR シグナル伝達機構を解析する。また、本学付属動物医療センターにて診断・治療を行う去勢雄イヌの前立腺がんおよびその発症起点であると考えられる前立腺過形成症例における SGTA および FKBP52 を中心とした AR 複合体構成シャペロン群の発現を遺伝子レベル、タンパク質レベルで精査する。これらから得られる知見を活かし、難治性イヌ前立腺がんの早期診断マーカー開発および創薬起点を探索する。

4. 研究の特色

前立腺がんを自然発症する動物はヒトとイヌに限られるという報告がある。そのなかで、多くの雄イヌは飼育を容易にする目的で去勢術が施される。これにより、体内アンドロゲンレベルは著減し、雄性生殖器疾患の発症率は減少するが、しばしば前立腺がんが発生する。アンドロゲン欠乏環境下で生じた前立腺がんの多くは、代表的な治療手段である AR シグナル伝達制御を目的としたホルモン療法に抵抗性を示すため、予後が非常に悪い。これは、ヒト前立腺がんに対するホルモン療法実施過程の一部に生じる難治化病態と近似しており、イヌの前立腺がん病態解析はヒト難治性前立腺がん病態の解明にも繋がる。また、申請者が一部特許を保有し、イヌで他のがん種に対し特異的かつ強

力にアポトーシスを誘導する REIC を新規治療ツールとして活用することは申請者でしか成し得ない。さらに、申請者は所属機関で樹立したイヌ前立腺がん株化細胞 CHP-1 の性状解析を行い、AR シグナル伝達機構に異常があることを確認している。以上の理由より、獣医領域から前立腺がんにアプローチし、ホルモン療法抵抗性獲得機序解明と新規治療法創出を目指す本研究は、高い独創性・創造性を有するものである。

5. 研究の成果

平成 30 年度はイヌ AR に 2 か所存在し、AR signal 伝達機構に重要な役割を持つ poly Gln (Q) 配列の役割を明らかにするために、イヌ AR poly Q deletion mutant を作成し、アンドロゲン刺激時の AR signaling におよぼす影響をレポーターアッセイにて評価した。これまでの報告では、poly Q 配列が短い場合、前立腺がん罹患リスクが高まるという認識があったが、poly Q deletion mutant 強制発現細胞で AR signaling 反応が上昇した。これは、従来の認識を細胞生物学的手法で裏付けけるものであり、今後さらに複数の実験系で証明しなくてはならない。イヌの前立腺がんはヒトの難治性・ホルモン療法抵抗性前立腺がんと同病態が近似するため、本研究成果はヒト医療にも通じる可能性を持っている。

また、本研究に付随して、伴侶動物のがん関連分子に関する複数の遺伝子群に関する学術論文を発表したので、以下に記載する。

1. Azakami D, Saito A, **Ochiai K**, Ishiwata T, Takahashi K, Kaji N, Kaji D, Kaji N, Michishita M. Chronic Basophilic Leukaemia in a Dog. *J Comp Pathol*. 2019, 166:5-8.
2. Yoshimura H, Otsuka A, Michishita M, Yamamoto M, Ashizawa M, Zushi M, Moriya M, Azakami D, **Ochiai K**, Matsuda Y, Ishiwata T, Kamiya S, Takahashi K. Expression and Roles of S100A4 in Anaplastic Cells of Canine Mammary Carcinomas. *Vet Pathol*. 2019, [Epub ahead of print]
3. Kawata R, Ii T, Hori T, Machida Y, **Ochiai K**, Azakami D, Ishiwata T, Michishita M. Leydig cell tumor in an Amur tiger (*Panthera tigris altaica*). *J Vet Med Sci*. 2019, 81(2):186-189.

7 人の生活圏における野生動物とマダニ類の関係性と感染症伝播のリスク分析

1. 研究者の所属・氏名等

獣医学科 野生動物学研究室
講師 加藤卓也

2. 研究の目的

近年、わが国において野生動物と人の生活圏との重複に

よる諸問題が深刻化している。中山間地域での農業被害や都市近郊部での野生動物の出没事例が目立つ一方、ジビエ肉をはじめとした有害鳥獣の利活用の推進も試みられている。このような背景において、野生動物が関与する共通感染症のリスクを評価することは重要である。とりわけ、都市近郊部においては、日本紅斑熱や重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) のようなマダニ媒介性感染症と野生動物との関係性も注目されつつある。これらの感染症は、人に重篤な健康被害をもたらすことから、患者発生の根底に野生動物の存在がどのように関係しているかを解明することはきわめて高い意義があると考えられる。

国内のマダニ媒介性感染症は、リケッチアやウイルスを含む病原体が *Amblyomma* 属、*Haemaphysalis* 属、*Ixodes* 属などのマダニ類を介して人や動物への感染が成立する。それゆえ、人への主な暴露の機会、病原体を有するマダニ類による刺咬である。マダニ類はその発育ステージに様々な動物を必要としており、野生動物がここに果たす役割も大きいと考えられる。

そこで我々は、在来種であるイノシシ (*Sus scrofa*) 等の大型動物やタヌキ (*Nyctereutes procyonoides*) 等の中型食肉目、また外来種のアライグマ (*Procyon lotor*) をモデル動物とし、環境中および動物体表上のマダニ相、モデル動物と各マダニ類それぞれにおける病原体保有状況、さらに環境因子について統合的に分析し、人の生活圏にせまるマダニ媒介性感染症のリスクを多角的に評価するための研究を計画した。

3. 研究の計画・方法

調査地域

本研究は、「野生動物対策推進に関する包括連携協定」をはじめ官学連携の体制が整っている群馬県、ならびに申請者が長年にわたり研究協力を得てきた神奈川県を対象地域とした。群馬県は高崎市、神奈川県は横須賀市と葉山町 (以下、三浦半島) で実施した。

研究手法

1. 生態学的アプローチ

- 1) モデル動物の生息状況、季節的および日周期の行動パターンを調べるために、高崎市においてセンサーカメラを設置し、撮影頻度のデータを得た。また、三浦半島ではアライグマの捕獲に際して設置回数と設置日数から努力量を算定しており、努力量で捕獲数を除した CPUE という指標を用いて相対密度を評価した。
- 2) 環境中のマダニ相を把握し、またその密度分布を通年で調べ、各マダニ類の基本的な生態的特性を押さえるために、高崎市、葉山町、横須賀市でフランネル白布を用いて定期的に旗振り法を実施して環境中のマダニ類を採集した。研究室室内での形態観察による同定後、種・ステージごとにカウントした。
- 3) モデル動物やマダニ類の分布に影響する環境因子を調べるため、地形や植生についてそれぞれ国土交通

省の基盤地図情報および環境省の自然環境保全基礎調査の植生図からデータを得た。

2. 獣医学的アプローチ

- 1) モデル動物におけるマダニ類咬着率および紅斑熱群リケッチア等の病原体保有率を調べるために、対象地域内で有害獣として捕獲された動物死体のうち中型食肉目を回収し、解剖調査を実施した。生態学的情報を補完するため、性年齢や繁殖状況などの情報も記録した。また、脾臓を採取し、病原体保有状況は PCR により解析を試みた。
- 2) 解剖調査時に動物体表上から採集したマダニ類を形態観察によって同定し、種・ステージごとにカウントした。動物体表上のマダニ類は Shannon - Weiner Index (Index H) によってマダニ類の種の多様性を算出した。また、環境中および体表上それぞれのマダニ検体に対して病原体保有状況を PCR により解析した。
- 3) 前述の環境因子に加え、土地利用や人口密度について関係諸団体の協力を得て入手を試みた。

3. 統合解析の方法

以上より得られたデータについて、地理情報システム (GIS) を利用し、空間分布や季節性を考慮して人の生活圏におけるマダニ媒介性感染症のリスクを評価する。なお、本研究に関連した調査として 2015 年度から上記の一部を実施しているので、それらのデータも加えて解析した。

4. 研究の特色

野生動物はその形態や生態的特性から、人の生活圏への分布拡大が比較的少ないものと、都市環境に適応し人の生活圏を巧みに利用するものと大別できる (図)。このような相違点に着目してマダニ類との関係性を包括的に検討した研究はこれまでに見当たらない。

5. 研究の成果

1. 生態学的アプローチ

高崎市においてセンサーカメラを設置した結果、調査期間を通じて最も撮影頻度の高い動物種はタヌキであり、イノシシ、ハクビシンがこれに続いた。一方、アライグマは

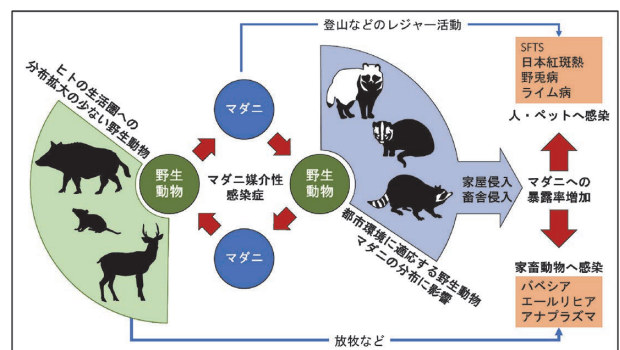


図 4. 野生動物との関係に内在するマダニ媒介性感染症のリスク (作図: 土井寛大)

秋季に撮影頻度が高まる傾向がみられたが、相対的に撮影頻度は低く同地域は分布拡大途上にあると考えられた。三浦半島では、国内でも有数の高密度地域として知られているが、その相対密度は調査地内でもばらつきがあった。

環境中のマダニ類は、横須賀市および葉山町で2属6種 (*H. flava*, *H. longicornis*, *H. megaspinosus*, *I. ovatus*, *I. tanuki*, *I. turdus*) が採取され、高崎市では3属6種 (*H. flava*, *H. longicornis*, *H. megaspinosus*, *I. ovatus*, *I. turdus*, *A. testudinarius*) が採取された。両調査地において環境中のマダニ類の優占種はともに *H. flava* であった (高崎市 97.7% : 横須賀市・葉山町 86.5%)。環境中で優占種であった *H. flava* の季節消長は、幼ダニでは9月頃の秋季に、若ダニでは3月から5月にかけてピークがみられた。

一方、モデル動物の解剖調査においては、横須賀市・葉山町でアライグマ 115 頭、高崎市でアライグマ 38 頭、ハクビシン 47 頭、タヌキ 16 頭の中型食肉目の死体を分析に供した。それぞれマダニ類の咬着率は横須賀市・葉山町のアライグマで 87.0%、高崎市のアライグマが 86.84%、ハクビシンが 55.32%、タヌキが 81.25% であった。横須賀市・葉山町のアライグマにおいてはオスのアライグマで成ダニのオスが有意に多く咬着しており (Mann-Whitney の U 検定、 $P < 0.05$)、アライグマの行動生態にみられる性差がマダニ類の咬着機会に関与している可能性が示唆された。

GIS によりアライグマの地理的な CPUE の分布、マダニ類の採取状況、各アライグマ個体の捕獲地点を統合的に解析した。三浦半島では、マダニの寄生量の多いグループと少ないグループの間に、①アライグマの相対的生息密度、ならびに②寄生マダニの種の多様性に有意な差が認められた (t 検定、① $P < 0.05$ 、② $P < 0.05$)。また、とくに冬季には *H. flava* の寄生優先度が高かった。高崎市ではマダニの宿主選択の嗜好性を Ivlev の資源選択指数で比較すると *H. flava* (幼・若・成)、*H. longicornis* (幼・若・成)、*H. megaspinosus* (幼・成)、*A. testudinarius* (幼・若)、*I. ovatus* (幼・成) がアライグマを積極的に利用している傾向が示された。

以上より、三浦半島においては *H. flava* の成ダニが越冬のためにアライグマを利用し、春先に吸血し、脱落、繁殖を行うためにアライグマの生息密度との間における相関がみられたと考えられる。また、高崎市においては複数のマダニ種が積極的にアライグマを宿主として利用していることが示された一方で、極端に嗜好性が低く見られたハクビシンやアナグマでは咬着しようとするマダニ類を除去する機構を有する可能性が示唆された。

なお、病原体保有状況調査として紅斑熱群リケッチアおよび日本紅斑熱の原因である *R. japonica* について PCR 解析の試行をしたところ、三浦半島で環境中から採取されたマダニ類 10 検体 (*H. flava* 8 検体、*H. longicornis* 2 検体) についてはすべて陰性であった (注：同一系列で実施した他地域の検体では 1 例について紅斑熱群リケッチアの

み陽性)。

今後の展望として、環境中のマダニ類および動物体表上のマダニ類について病原体保有状況の調査をすすめるとともに、三浦半島と高崎市の双方におけるモデル動物の生息状況についてより詳細な検討を予定している。さらに、種々の環境因子に関するデータを追加し、GIS を用いた統合的な解析を明示的にできると考える。

本研究成果の一部は、下記の通り公表した。

<原著論文>

Doi, K., Kato, T., and Hayama, S. 2018. Infestation of introduced raccoons (*Procyon lotor*) with indigenous ixodid ticks on the Miura Peninsula, Kanagawa Prefecture, Japan. International journal for parasitology. Parasites and wildlife, 7: 355-359.

<招待講演>

加藤卓也. 神奈川県三浦半島における外来アライグマとマダニ類の関係. シンポジウム One Health の実践に向けて一次世代研究者と国際協力による感染症制御への挑戦一. 日本大学. 2018 年 11 月 30 日.

8 新規グルコース取込み阻害薬の検索および治療薬としての可能性の検討

1. 研究者の所属・氏名等

獣医学科 獣医薬理学研究室
助教 神田秀憲

2. 研究の目的

GLUT1 および GLUT4 の研究に用いられる、ラット由来骨格筋細胞株 (L6.C11) に対する各種ポリフェノールのグルコース取込みへの影響を調べ、その作用点および作用機序を調べる。さらに、腫瘍細胞株に対する影響についても調べることにより治療薬としての可能性を検討する。

3. 研究の計画・方法

新規 GLUT1 阻害薬である BAY876 および各種プロテアーゼ阻害剤が、ラット回腸平滑筋における高濃度 K^+ 誘発性収縮に及ぼす影響について、マグヌス法を用いて検討した。

ラット回腸平滑筋高濃度 K^+ 誘発性収縮における細胞内 Ca^{2+} 濃度に対する各種プロテアーゼ阻害剤の影響を fura-2 法によって測定した。

当初、ラット由来骨格筋細胞株を使用する予定だったが、予算の関係から Wister 系雄性ラットより細胞を単離、培養し実験に使用した。単離した細胞にグルコース取込み阻害薬およびポリフェノールを適用し、蛍光グルコースの取込み量の変化を測定した。

4. 研究の特色

生体におけるグルコース取込みは、恒常性の維持において非常に重要である。細胞内へグルコースを取込む輸送体は、グルコース輸送体 (GLUT) 1~14 および Na^+ , glucose

共輸送体 (SGLT1~3) が存在しており、それらは臓器特異的に発現している。さらに、グルコース取込み阻害薬は、糖尿病および抗癌治療のターゲットとして注目されており、多くの研究グループから研究され続けている。しかしながら、各種グルコース輸送体に対する特異的な阻害薬はほとんど無い。近年、HIV 治療薬であるプロテアーゼ阻害剤やポリフェノール類の一部にグルコース取込み阻害作用があるという報告があるが、その作用点および作用機序は明らかになったとは言えない。以上より、本研究により種々のプロテアーゼ阻害剤およびポリフェノール類の作用を明らかにすることは、糖尿病や癌に対する治療の新知見につながる可能性がある。

5. 研究の成果

1) ラット回腸平滑筋における高濃度 K^+ 誘発性収縮に対する各種グルコース取込み阻害薬の影響

GLUT1 阻害薬である BAY876 は、ラット回腸平滑筋における高濃度 K^+ 誘発性収縮を有意に抑制した。さらに、その抑制は、エネルギー基質であるグルコースおよびピルビン酸の適用により一部回復した。これらのことから、BAY876 はラット回腸平滑筋における高濃度 K^+ 誘発性収縮を GLUT1 阻害により抑制する可能性が示唆された。しかしながら、エネルギー基質の適用による回復は部分的であったことから、別の作用も有している可能性が示唆された。一方、HIV 治療薬でありプロテアーゼ阻害剤である、indinavir、ritonavir および atazanavir はラット回腸平滑筋における高濃度 K^+ 誘発性収縮および carbachol 誘発性収縮を濃度依存性に抑制した。しかしながら、その抑制はグルコースをピルビン酸に置換しても変化しなかった。さらに、その抑制は、carbachol 誘発性収縮よりも高濃度 K^+ 誘発性収縮をより強く抑制した。以上より、プロテアーゼ阻害剤は、ラット回腸平滑筋における高濃度 K^+ 誘発性収縮および carbachol 誘発性収縮をグルコース取込み阻害以外の経路で抑制する可能性が示唆された。

2) ラット回腸平滑筋の高濃度 K^+ 誘発性収縮における細胞内 Ca^{2+} レベルに対するプロテアーゼ阻害剤の影響

プロテアーゼ阻害剤は、ラット回腸平滑筋の高濃度 K^+ 誘発性収縮における細胞内 Ca^{2+} レベルを有意に低下させた。

現在、PCR 法によりラット回腸平滑筋における GLUT4 発現について検討しており、その結果を含めて 2019 年 3 月の薬理学会で発表予定である。

3) ラット回腸平滑筋単離細胞

現在、ラット回腸平滑筋より単離細胞を作成し、BAY876 および各種プロテアーゼ阻害剤による蛍光グルコース (2-NBDG) 取込み量に対する影響について検討中である。しかしながら、回腸平滑筋単離細胞の長期培養は成功しておらず、更なる検討が必要であると考えられる。

9 新たな免疫応答の場を探る—既知リンパ組織を持たない魚類からのアプローチ—

1. 研究者の所属・氏名等

獣医学科 水族医学研究室

教授 倉田 修

2. 研究の目的

今や免疫系は、感染防御だけでなく、肥満、動脈硬化、アレルギーなどの疾患の発生・制御にも関与する一大システムとなっている。これら作用の基礎となる免疫応答は、微生物由来抗原、死細胞由来やストレスにより放出される自己組織分子の認識に始まり、抗原・分子を認識した免疫細胞から他の免疫細胞への情報伝達により増強される。多くの脊椎動物では、全身で起こり得る免疫応答を円滑に作動させるために、生体外との境界である粘膜組織に、また末梢をリンパ管で繋ぐリンパ節に、そして血流上の脾臓に“免疫応答の場”を備えている。この“免疫応答の場”で、どのような免疫細胞間の相互作用を行うかが、感染防御の成立や疾患の発生・制御を決めていると言っても過言ではない。本研究では、これまで知られていない免疫応答の場を探り、感染防御や免疫系が関与する疾患の機序について新しい視点を生み出すことを目的とする。

興味深いことに、“免疫応答の場”である二次リンパ組織の位置や形態は動物種によって異なっている。特に、下等脊椎動物である魚類はリンパ節や粘膜関連リンパ組織（扁桃、パイエル板）を保有していない。しかしながら魚類は、高等脊椎動物のように獲得免疫応答（抗体産生、T 細胞性応答）を示すことができる。このことは、魚類には“未知の免疫応答の場”が存在することを示唆している。魚類における“免疫応答の場”の研究は、魚類免疫学の発展だけでなく、高等脊椎動物の免疫応答機構に新たな概念を提唱する可能性をも秘めている。

3. 研究の計画・方法

各種免疫細胞のマーカーを用いた免疫組織染色技術を確認し、抗原刺激後に生じる免疫細胞の集積や免疫細胞間の接着が高頻度に生じる部位（免疫応答の場）を探索する。研究材料には、申請者の研究実績があり、全ゲノム情報が公開されているヒラメを用いる。

①各種マーカー分子に対する抗体の作製

免疫応答の場を構成する主要な免疫細胞（T 細胞、B 細胞および抗原提示細胞）のマーカー分子（CD4-1*, CD4-2*, CD8 α 、CD28、IgM、CD80）に対するペプチド抗体を作製する。申請者は先行研究において、MHC クラス II α に対するペプチド抗体を作製し、ヒラメ各種組織に対する免疫組織染色の基本技術を確認した。* 魚類では CD4 分子にアイソタイプが存在する。

②マルチカラー免疫組織染色技術の確立

抗血清から Protein A/G により抗体を精製し、KLH（ペプチド抗体作製時のキャリアタンパク）アセトンパウダーで吸収処理を行う。各種精製抗体はマルチカラー免疫

組織染色に適用できるように蛍光標識する。ヒラメ組織切片に対し、各種抗体を用いたマルチカラー免疫組織染色の最適条件を決定する。

③抗原刺激と標本作製

ヒラメ病原細菌である *Edwardsiella tarda* および *Streptococcus iniae* の両ホルマリン死菌、他動物種赤血球、等によるワクチネーションにより、抗原刺激を行う。刺激後、継時的に試験魚を取り上げ、免疫組織観察のための標本を準備する。これまでの経験から、ペプチド抗体による免疫組織染色はパラフィン切片標本で実施可能だが、必要に応じて凍結切片標本の作製も行う。

④マルチカラー免疫組織染色による“免疫応答の場”の探索

抗原刺激後の各種組織に対し、マルチカラー免疫組織染色を実施する。T細胞、B細胞、そして抗原提示細胞の集積および細胞間接着が顕著な部位を探索する。

4. 研究の特色

免疫細胞が存在する組織は魚類においても知られていたが、そこで見られる細胞種に関する知見は乏しい。また、抗原刺激により免疫応答が活性化された際の組織構造の変化も十分に理解されていない。本研究は、各種白血球マーカーに対する抗体を使った免疫組織染色技術により、組織で見られる細胞種の同定を試みる。さらに、抗原刺激により変化する組織構造を形態学的に理解すると共に、増減する細胞の特定、細胞種毎の組織内分布など、質的な変化を明らかにする。

魚類白血球に対する抗体は商品として取り揃えられていないため、自身で作製しなければならない。従って、本研究の成果には、魚類（ヒラメ）の白血球マーカーに対する抗体の蓄積も挙げられる。これら抗体の整備はヒラメ免疫研究の発展に貢献する。

5. 研究の成果

本年度、CD4-1、CD28、CD80、IgM H鎖のペプチド（アミノ酸10～15残基）に対するウサギ抗血清を作製した。ProteinA/Gを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、抗血清中のイムノグロブリンを精製し、免疫時に使用したキャリアタンパク（KLH）に対する抗体をKLHアセトンパウダーで吸収除去した。各分子の組換えタンパク（大腸菌で作製）に対する反応性をウエスタンブロットにより調べたところ、抗CD4-1抗体を除き陽性であった。正常ヒラメの腸から抽出したタンパクに対する反応性を同様にウエスタンブロットで調べたが、現在までのところ陽性を確認出来ていない。抗CD4-1抗体を除く3種の抗体を用いた免疫組織染色を脾臓組織に対し実施したが、明瞭な陽性像は確認できなかった。来年度、抗原刺激により活性化した各種組織を材料とし、ウエスタンブロットおよび免疫組織染色による各種抗体の反応性について引き続き検討を行う。また、本年度作製できなかったCD4-1分子を含め他の白血球マーカーに対する抗体の作製を進める予定である。

10 二酸化炭素マイクロバブルの乳加工への適用

1. 研究者の所属・氏名等

食品科学科 食品工学教室

講師 小林史幸

2. 研究の目的

近年開発した二酸化炭素マイクロバブル（CO₂MB）は、常温域で強力な殺菌効果・タンパク質変性（酵素失活）作用を有することから、一昨年、新たな清酒の殺菌・酵素失活技術として実用化した。このタンパク質変性作用は、CO₂の溶解によるpH低下だけでなく、CO₂自体がタンパク質に作用すると考えられ、従来の酸、加熱、酵素反応などとは異なると予想される。これまでに、CO₂MBにより牛乳を殺菌した際にカゼインのプロテアーゼ耐性が変化することを報告しており、現段階で、CO₂MBにより乳タンパク質が不溶化し、凝乳固形物を作り出すことを確認している。そこで本研究では、CO₂MBにより牛乳中のタンパク質を凝集させる最適条件を検討し、凝乳固形物の形態観察を行った。本研究により得られた成果を元に、将来的にCO₂MBを殺菌・酵素失活以外の新規食品製造技術として確立し、新たなチーズ開発を目指すことで畜産分野の発展に貢献する。

3. 研究の計画・方法

以下の方法により、CO₂MBによる乳タンパク質を回収するための最適条件を検討した。

- ・試料：市販の低温殺菌牛乳（LTLT乳）および超高温殺菌牛乳（UHT乳）を用いた。
- ・CO₂MB処理：乳タンパク質を凝集させるためのCO₂MBの温度（冷蔵および加温）、圧力（1および2 MPa）、処理時間（0、1および2 h）などの最適処理条件を検討した。
- ・乳タンパク質の凝集の観察：CO₂MB処理後の装置内を目視により観察した。
- ・総タンパク質濃度：CO₂MB処理後に得られた上清をケルダール法により測定し、以下の式により回収率を算出した。

$$\text{タンパク質の回収率} = (\text{未処理のタンパク質濃度} - \text{処理後のタンパク質濃度}) \div \text{未処理のタンパク質濃度} \times 100$$
- ・脂質濃度：CO₂MB処理後に得られた上清をゲルベル法により測定し、以下の式により回収率を算出した。

$$\text{脂質の回収率} = (\text{未処理の脂質濃度} - \text{処理後の脂質濃度}) \div \text{未処理の脂質濃度} \times 100$$
- ・形態観察：凝乳固形物をグルタルアルデヒドおよび四酸化オスミウムにより固定し、アルコール脱水を行い、ヒプチルアルコールに置換後、凍結乾燥した。その試料を白金蒸着して走査型電子顕微鏡により観察した。

4. 研究の特色

通常、リコッタチーズは牛乳を酢酸などにより酸性化して60℃以上に加熱することで作成するが、添加した酸の

風味への影響が懸念される。しかしながら、CO₂は無害、無味無臭、安価な気体であり、非常に使いやすい。これまでに、CO₂を使用したチーズ製造は行われておらず、本研究はその先駆けとなる。

5. 研究の成果

2 MPaで加温しながらCO₂MB処理したLTLT乳から排出した上清は処理時間の増加に伴い白濁が薄くなり(図1)、タンパク質濃度および脂質濃度が減少していることがうかがえた。そのため、CO₂MBによるLTLT乳からの乳タンパク質凝集物の回収率について、上清中のタンパク質濃度および脂質濃度を測定して算出した(表1)。上清中のタンパク質濃度および脂質濃度ともに2 MPaにおいてCO₂MBが飽和に達した段階(処理時間0 h)で著しく減少し、その後、処理時間を延ばすことでさらに徐々に減少した。よって、CO₂MBにより乳タンパク質が装置内で凝集していることが示唆された。加えて、CO₂MB処理を冷却したまま行った際のタンパク質および脂質の回収率は加温よりも少ないものの処理時間に伴い減少した(表2)。また、処理圧力1 MPaでCO₂MB処理を行った際のタンパク質および脂質の回収率は2 MPaで処理した時よりも著しく低くなった(表3)。処理圧力1および2 MPaで加温しながらCO₂MB処理したLTLT乳からの乳タンパク質凝集物は同様の状態に見えたが、2 MPaで冷蔵状態でのCO₂MB処理によりLTLT乳から得られた乳タンパク質凝集物は固形状にはなっていないことから(図2)、濃縮された状態であることが示唆された。また、処理圧力2 MPaで冷却したままCO₂MB処理したUHT乳からの乳タンパク質凝集物は固形状にはなっていないが、25℃に加温することで固形状となり(図3)、タンパク質および脂質の回収率は1 hの処理で100%に達した(表4)。さらに、走査型電子顕微鏡により処理圧力2 MPaで加温しながらCO₂MB処理したLTLT乳から得られた乳タンパク質凝集物は網目状構造を形成していたことが観察できたことから(図4)、リコッタチーズと同様の凝集をしていたことが示唆された。

以上の結果から、処理圧力2 MPaで加温しながらのCO₂MBは牛乳からリコッタチーズ様の乳タンパク質凝集物を形成可能であることが認められた。

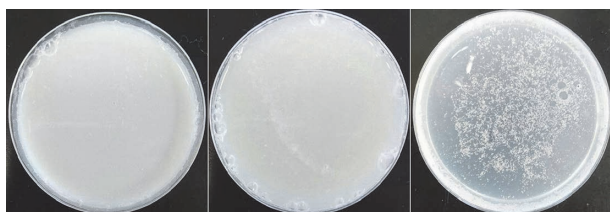


図 1. 処理圧力2 MPaで加温しながらCO₂MB処理したLTLT乳から排出した上清 左：処理直後(処理時間0 h) 真中：1 h後 右：2 h後

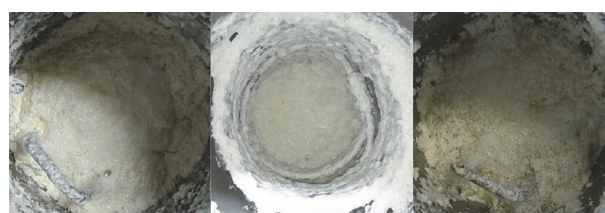


図 2. LTLT乳を2 h CO₂MB処理した後の装置内の様子 左：2 MPaで加温 真中：2 MPaで冷却 右：1 MPaで加温

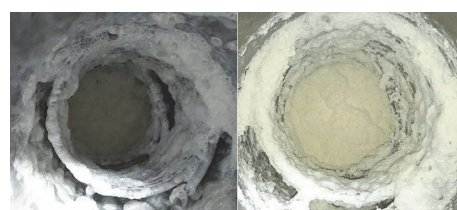


図 3. UHT乳を2 MPaで2 h CO₂MB処理した後の装置内の様子 左：冷却 右：25℃

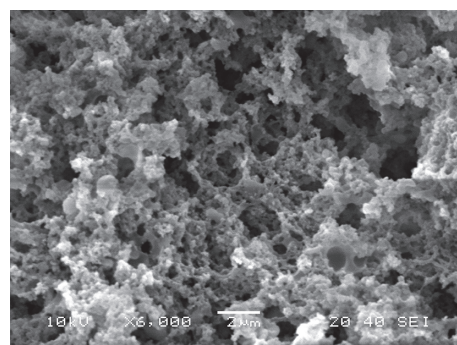


図 4. LTLT乳を2 h CO₂MB処理後に形成した乳タンパク質凝集物の走査型電子顕微鏡写真

表 1. 2 MPaで加温しながらCO₂MB処理したLTLT乳からのタンパク質および脂質回収率

	未処理	0 h	1 h	2 h
温度(℃)	10	16	32	43
タンパク質回収率(%)	0.0	72.6	73.4	75.0
脂質回収率(%)	0.0	94.6	100.0	100.0

表 2. 2 MPaで冷却したままCO₂MB処理したLTLT乳からのタンパク質および脂質回収率

	未処理	0 h	1 h	2 h
温度(℃)	10	16	10	7
タンパク質回収率(%)	0.0	46.4	58.7	72.1
脂質回収率(%)	0.0	89.7	100.0	100.0

表 3. 1 MPa で加温しながら CO₂MB 処理した LTLT 乳からのタンパク質および脂質回収率

	未処理	0 h	1 h	2 h
温度 (°C)	10	22	46	55
タンパク質回収率 (%)	0.0	15.6	22.9	47.1
脂質回収率 (%)	0.0	30.0	42.5	55.0

表 4. 2 MPa および 25°C で CO₂MB 処理した UHT 乳からのタンパク質および脂質回収率

	未処理	0 h	1 h	2 h
温度 (°C)	10	16	25	25
タンパク質回収率 (%)	0.0	94.7	100.0	100.0
脂質回収率 (%)	0.0	90.9	100.0	100.0

11 糖尿病モデル動物としてのスunks (Suncus murinus)

1. 研究者の所属・氏名等

獣医学科 獣医生化学研究室
准教授 佐々木典康

2. 研究の目的

糖尿病は医療、獣医療にとって重要な疾患であり、これまでも数多くのモデル動物を用いて、重要な知見が得られてきた。糖尿病モデル動物は主にマウスやラット等、げっ歯類が用いられてきたが、これらは草食に近い雑食動物である。一方、現代社会で問題視される 2 型糖尿病の危険因子は、高脂肪食や高タンパク質食といった欧米型の食事であり、げっ歯類の飼料とは大きく異なる。

トガリネズミ科の実験小動物であるスunks (*Suncus murinus*) は、本来が食虫性の動物であるため、養鱒用飼料、キャットフードなど日常的に高タンパク質を摂取している実験動物である。

研究代表者は、このスunks 2 系統を本学内で維持・繁殖しており、1 系統はバングラディッシュ起源のスunks (BK 系)、もう 1 つの系統は早期糖尿病発症 (Early-onset Diabetes in Suncus) の EDS 系である。特に EDS 系は生後 3~8 週齢で顕著な多尿・尿糖・高血糖を発症し、インスリン抵抗性 (2 型糖尿病) を示し、面白いことに幼若期を過ぎると症状が寛解し、老齢まで生存できるという特徴がある。このようにスunks の糖尿病モデルは、マウスやラットなどのげっ歯類とは異なるユニークな病態を示す。またスunks は体脂肪が少ないため、肥満型ではない 2 型糖尿病のモデルになることも興味深い。EDS 系は初期に数回の報告があって以降、詳細な解析がなされないまま現在まで維持されており、かつ現在では EDS 系を維持している研究機関も少なく、貴重な実験動物ともいえる。

本研究プロジェクトにより、糖尿病モデルとしてのスunks の特徴や可能性が新しく描き出され、新たな糖尿病モデル動物として再発見できる可能性が高い。特に肉食動物である猫の糖尿病モデルになる可能性が高く、獣医学領域

でも大いに期待できると思われる。

3. 研究の計画・方法

世界的にもスunks を利用した糖尿病研究は非常に少ない。本研究プロジェクトでは獣医学部獣医学科の教員 5 名がそれぞれの得意分野である解析技術を使って、多角的に糖尿病スunks (EDS 系) における病態解明を行うことを計画した。

以下に当初の研究分担者とその解析項目を列挙する。

- 1) 佐々木典康 (准教授・獣医生化学)：研究代表者・プロジェクトオーガナイザー
スunks の維持・繁殖、遺伝子解析 (特に脂肪組織、肝臓での代謝関連酵素の解析)、血中レプチンおよび血中アディポネクチン濃度と病態との関連の検討
- 2) 金田剛治 (教授・獣医薬理学)：
腎臓における SGLT2 の作用の検討、SGLT2 阻害薬による糖尿病治療起点の検討
- 3) 神田秀憲 (助教・獣医薬理学)：
骨格筋でのグルコーストランスポーター GLUT および SGLT の解析
- 4) 片山欣哉 (准教授・生体分子化学)：
MALDI-TOF-MS を用いた血中タンパク質糖化率の分析による病態解析
- 5) 佐藤稲子 (講師・生体分子化学)：
スunks 血清 (血漿) 中の有機酸とアミノ酸の GC-MS 分析

本プロジェクトは 5 年間で実施することを前提に計画しており、研究構想は 2 部構成とし前半 3 年と後半 2 年に分けて遂行する計画とした。特に研究の大半は最初の 3 年で終了し、そこから得られた知見を元に、残り 2 年の方針を再検討する予定とした。

最初の 3 年間 (2018~2020 年度) では、BK 系を用いてスunks の基礎的な代謝パラメーターを取得することを目指した。特に代謝産物では、血中の有機酸やアミノ酸に着目して解析を実施する予定であった (佐藤が担当)。また、代謝調節のキーファクターとしてレプチンやアディポネクチンといったホルモンの血中濃度を測定する計画とした (佐々木が担当)。

一方の糖尿病モデル EDS 系でも同様に代謝産物解析 (佐藤)、レプチン、アディポネクチン濃度測定 (佐々木)、を行うとともに、糖尿病の病態把握には血中タンパク質糖化率を利用し、その経年齢変化を特に検討する (片山が担当)。インスリン抵抗性の原因解明の一端として、骨格筋や他の組織での GLUT や SGLT 発現や機能の解析を行い (神田が担当)、近年新しい糖尿病治療法として期待されている腎臓における SGLT2 阻害剤の作用と治療の可能性について薬理的に検討を行う計画である (金田が担当)。

3 年目に総合的な検討を行い、糖尿病病態形成に重要と思われるパラメーターや機構を再検討し、残りの 2 年間 (2021~2022 年度) で、より細かい条件で深く解析を実施

していく方針とした。

しかしながら配分された予算が当初の予想を大きく下回ったため、全体としての実行は不可能と判断し、とりあえず本年度は先行して、スunksアディポネクチン遺伝子のクローニングと GC/MS 解析の予備実験のみを行うこととした。

4. 研究の特色

EDS 系統が育成され始めた 1991 年当時からは糖尿病研究のアプローチ法は飛躍的に発展した。そこで本研究プロジェクトでは、この EDS 系に再び注目し、最新の知見と技術によってその病態形成メカニズムを詳細に解き明かすことを目標とする。そのために複数の研究者がそれぞれの得意な解析分野を担当することで効率良く、また的確に解析を行うことを目指している。従来のげっ歯類モデルとは異なる、スunks糖尿病モデルを利用した病態形成メカニズムの解明や新たな治療起点の検討は、人や伴侶動物での糖尿病研究のブレイクスルーになると考えられる。

5. 研究の成果

BK 系スunksの鼠径部皮下脂肪組織より抽出した RNA を出発材料にしてスunksアディポネクチン cDNA の全長クローニングを行った。コード領域を含むほぼ全長の cDNA を得ることができたが、配列の決定のためのシーケンス作業を続けている状況である。得られたスunksアディポネクチンの cDNA 配列ならびに推測されるアミノ酸一次配列は、すでに公共データベースに登録されている他の動物種のアディポネクチンと非常に高い相同性があることが確認できた。

今後はこのアディポネクチン cDNA を使って大腸菌に組換え体を発現させ、機能解析を行うとともに、他の代謝産物との相互関係について検討を行う予定である。

12 ウイルス感染症の生ワクチン候補株の作出

1. 研究者の所属・氏名等

獣医保健看護学科 獣医保健看護学基礎部門
助教 塩川 舞

2. 研究の目的

ウイルス感染症の予防に必須である生ワクチン株を作出する際には、ウイルスを弱毒化することが必須である。そこで、本研究では、ウイルスの弱毒化を効率的に行うことや、ワクチン株作出に伴う実験動物使用頭数の減少を目指して、培養細胞を用いた *in vitro* の実験系でウイルスの病原性を低下させることが出来るのかどうか明らかにし、ウイルス感染症の生ワクチン候補株を作出することを最終的な目的とする。

まずは、産業動物の感染症の中でも被害件数が多い牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) を対象ウイルスとして、培養細胞を用いたウイルス継代によってウイルスの性状がどう変化するのか検討を試みた。

3. 研究の計画・方法

ウイルスの自然宿主ではない異種動物またはそれに由来する培養細胞を用いたウイルス継代によって、そのウイルスの病原性が減弱することが豚コレラウイルス (CSFV) を用いた実験等から明らかになっている。異種動物 (牛及びモルモット) 由来細胞で繰り返し継代された CSFV の豚に対する病原性は顕著に低下し、尚且つ、宿主の免疫応答を誘導する能力は維持されていたため、このウイルス株は現在日本で使用されている CSFV の生ワクチン株として活用されるに至った。

BVDV と近縁の CSFV で得られた上記の研究結果を参考に、BVDV でも異種動物由来細胞を用いたウイルス継代によって、ウイルスの性状が変化するのかどうか解析を行った。ウイルスが弱毒されたか否かは、動物を用いた感染実験によってのみ知ることが出来るため、本研究の実施範囲とはしない。本研究では、まず、異種動物由来細胞で繰り返し継代された BVDV の自然宿主 (牛) に対する感染性がどう変化するのか、培養細胞を用いて検討を実施した。

4. 研究の特色

BVDV の感染宿主域は広く、牛以外にも豚、羊、山羊、鹿等を含む野生反芻獣に感染可能であることが分かっている。BVDV が、牛以外の動物に感染した例 (アルパカに対する BVDV の感染報告など) は多く報告がある中で、BVDV を人工的に異種動物または異種動物由来細胞に順化させた試みはなされていない。

本研究の特色は、積極的に自然宿主 (牛) ではない異種動物由来細胞に BVDV を順化させようとする点であり、回収されたウイルスには、自然宿主に感染するため/異種動物に感染するために必要な遺伝子領域を知るヒントや、BVDV の宿主域を規定する要因を明らかにするきっかけが含まれている。また、ウイルスが有する免疫制御能の変化を経時的に知ることも可能であり、生ワクチン株として必要な性状を発現する責任領域を一挙に同定できる可能性を有している。

5. 研究の成果

当研究室で保有している様々な動物由来培養細胞に対して BVDV の感染実験を行った。その結果、豚腎由来株化 CPK 細胞と、ネコ腎由来株化 CRFK 細胞に BVDV が効率よく感染出来ることが分かった。これらの細胞以外にも、ヒト胎児腎由来株化 293T 細胞、アフリカモリザル腎由来株化 Vero 細胞、シリアンハムスター腎由来 BHK 細胞を用いて BVDV の感染性の評価を行ったが、これらの細胞には BVDV が侵入出来ない可能性が強く示唆される結果となった。従って、BVDV の自然宿主 (牛) ではない、豚腎由来及びネコ腎由来培養細胞を用いて BVDV の継代を実施した。

豚腎由来 CPK 細胞で BVDV を継代した結果、継代 10 回 (CPK/BVDV P.10) まで培養上清中に感染性粒子が産生され、BVDV が豚由来細胞でもその感染を維持できる

ことが明らかになった (図 1)。しかし、P.4 以降は急激に力価が低下し、その後は低い力価を維持する形で推移した。更に長期に渡ってウイルス継代を実施することで豚由来細胞に対する順化を高められると考え、現在も CPK 細胞を用いてウイルスの継代実験を実施中である。

また、自然宿主ではない豚由来細胞で 10 回継代したウイルスが、どのような遺伝子変化を遂げたのか調べるために、CPK/BVDV P.10 (培養上清) に含まれるウイルス RNA を抽出し、シーケンス解析を実施した。遺伝子配列解析は、細胞受容体との結合に密接に関与するウイルスのエンベロープ蛋白質 (E2) をコードする領域を対象とした (図 2)。その結果、シーケンス解析に供した CPK/BVDV P.10 の 7 クローンのウイルス遺伝子中 5 クローンで E2 領域にアミノ酸変異を伴う遺伝子変化が生じていることが分かった。10 回異種動物細胞を通過しただけでも、BVDV のエンベロープ領域には変異が生じており、さらに豚細胞に順化させた BVDV でも同様の変異が認められるのかどうか、非常に興味深い結果となった。今後は、豚細胞に対してさらに順化した BVDV を回収し、そして、そのウイルスの遺伝子変化を詳細に知るために、次世代シーケンス解析も視野に入れて継続的に実験を行う予定である。

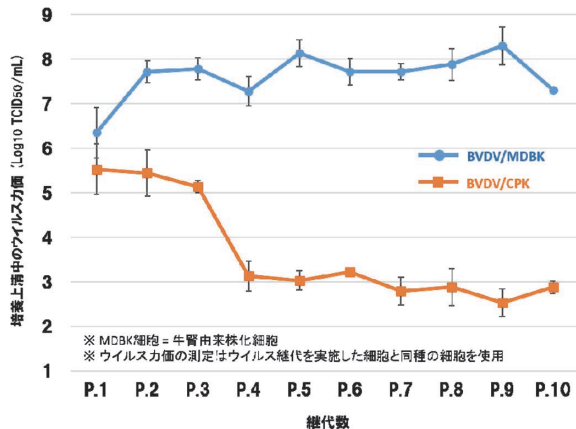


図 1. 豚腎由来 CPK 細胞で継代した BVDV のウイルス力価の変化

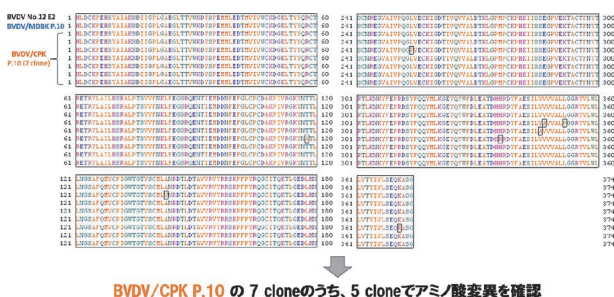


図 2. CPK 細胞で継代した BVDV P.10 の遺伝子変化 (E2 領域)

ネコ腎由来 CRFK 細胞を用いたウイルス継代では、自然宿主 (牛) から遠縁の動物種であるにも関わらず、非常に効率的な BVDV の増殖が認められた。特に、BVDV の中でも感染後に宿主の I 型インターフェロン (IFN) 産生を抑制する END⁺ウイルスタイプがネコ由来の CRFK 細胞内で効率よく増殖・複製できることが明らかになった。一方で、感染すると宿主の I 型 IFN 産生を強力に誘導する END⁻ウイルスタイプは CRFK 細胞で増殖することが困難である可能性が示唆された (図 3)。以上の結果から、BVDV のウイルスタイプによっては、この細胞に順化できる可能性が高いと判断し、CRFK 細胞を用いた BVDV の継代実験も、上記の豚腎由来 CPK 細胞を用いた感染実験と同時進行で実施することにした。

CRFK 細胞に BVDV を感染させ、ウイルス継代を現在まで 25 回実施した。CRFK 細胞を 15 回通過した BVDV (以下 CRFK/BVDV P.15 とする) を試料として、ウイルスの増殖レベル及びネコ腎由来 CRFK 細胞への順化程度の評価を行った。

まず、自然宿主ではないネコ腎由来 CRFK 細胞でウイルスが継続的に増殖できていたのかどうか知るために、ウイルスの検出法として感度が高い遺伝子検出実験から実施した。CRFK/BVDV P.15 試料から全 RNA を抽出し、BVDV の遺伝子を増幅するプライマーセット (BVDV の 5' 非翻訳領域を増幅) を用いて RT-PCR 法によるウイルス遺伝子の検出を試みた。その結果、宿主の I 型 IFN 産生を抑制するタイプの BVDV END⁺ウイルスは、CRFK 細胞を 15 回通過したにも関わらず、ウイルスの増殖・複製を維持できていたことが分かった。さらに興味深いことに、感染すると宿主の I 型 IFN 産生を強力に誘導する BVDV END⁻ウイルスも、CRFK 細胞を 15 回通過することで、異種動物細胞に適応しはじめ、培養上清中にウイルス粒子を微量ながらも産生している可能性が示唆された (図 4)。

遺伝子検出実験の結果を踏まえて、CRFK 細胞を 15 回通過した BVDV が培養上清中に産生されている可能性が強く示唆された。次は、培養上清中にどのくらいウイルスが産生されているのかを調べると同時に、CRFK 細胞に対する BVDV の順化程度の評価を実施した。接種した BVDV が CRFK 細胞に順化し始めていれば、CRFK 細胞で測定した力価は高値を示し、牛由来の MDBK 細胞で測

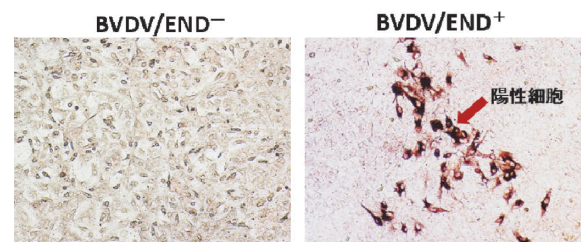


図 3. ねこ腎由来 CRFK 細胞に対する BVDV の感染症

定した力価は低値を示すのではないかと仮説を立て、2種の細胞を用いて CRFK/BVDV P.15 及び P.20 のウイルス力価の測定を行った。その結果、CRFK/BVDV END⁺は、CRFK 細胞で 10^{6.0} TCID₅₀/mL 以上の高い感染力価を示したものの、MDBK 細胞では更に高値の 10^{7.0} TCID₅₀/mL 以上を示した。すなわち、①ネコ腎由来 CRFK 細胞で効率的に増殖できるが、未だ自然宿主である牛腎由来 MDBK 細胞にも高度に順化している② CRFK 細胞に順化したウイルスと MDBK 細胞に順化したウイルスが混在している、という2つの可能性が考えられた。一方で、CRFK/BVDV END⁻ウイルスは、P.20 において、培養上清中に感染性粒子が存在していることが分かった。加えて、CRFK 細胞を使用したときにのみ感染力価を測定可能であり、この CRFK/BVDV END⁻ P.20 は、MDBK 細胞よりも CRFK 細胞により順化している可能性が高いと考えられた (図 5)。

今後さらに長期のウイルス継代実験を実施することで、ネコ腎由来 CRFK 細胞に順化した BVDV を回収する予定である。宿主に対する免疫応答が異なる2つのウイルスタイプ (BVDV END⁺ 及び END⁻ ウイルス) を CRFK 細胞に順化させられる可能性も見いだされ、特に BVDV END⁻ ウイルスの異種動物細胞への順化の成功は、本研究の目的である BVDV の生ワクチン候補株の作出を達成するための大きな一歩になると考えられる。

13 日獣大ビーフ (仮称) の生産体制構築とブランディング

1. 研究者の所属・氏名等

動物科学科 動物栄養学教室

准教授 柴田昌宏

2. 研究の目的

現在の肉用牛肥育は、肥育期間の短縮や脂肪交雑に偏重した生産から、これまで安価で入手可能であった穀物飼料へ依存した生産体系となっている。しかし、穀物飼料の約 90% は輸入に依存 (2015) しているため、肉用牛肥育の飼料自給率は 10 数 % と低迷し、さらに国内飼料生産基盤の脆弱化から、飼料自給率の向上に対して負の連鎖反応が起こっている。一方、現在の穀物多給の肥育では、脂肪交雑が過度となる傾向にあるが、消費者の健康志向から従来よりも脂肪含量が少ない適度な脂肪交雑の良質な牛肉への関心が高くなり、牛肉の消費は霜降りから赤身牛肉まで多様化している。

こうした観点から、本研究では、穀物飼料に依存しない、草食獣としてのウシの機能を最大限に活用した、放牧や粗飼料等の自給飼料を主体とした肉用牛生産技術ならびにその肥育技術の研究、開発に取り組み、資源循環型の自立した生産体系の構築を目的とする。この生産体系から生産された牛肉は、従来のものとは異なり、飼料自給率、アニマルウェルフェアあるいは国土保全等を考慮した付加価値

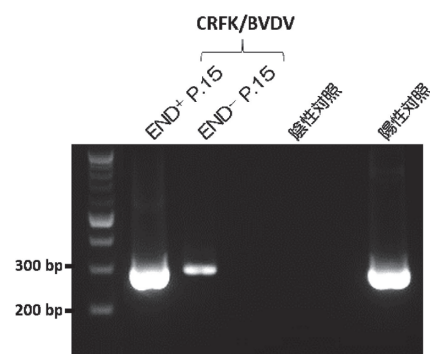


図 4. CRFK/BVDV P.15 からのウイルス遺伝子検出

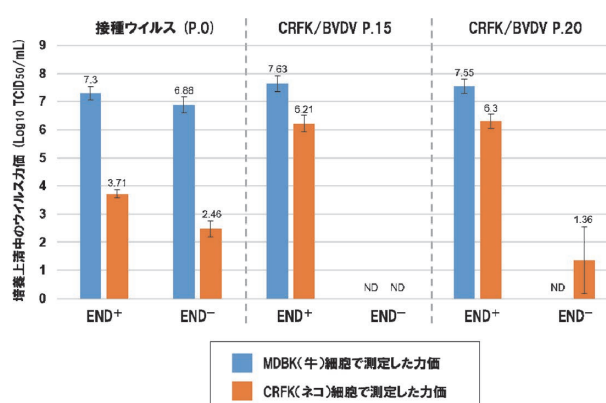


図 5. CRFK 細胞に対する BVDV の順化程度の評価 (感染力価を指標として)

値ある牛肉として、また、マーケットインを意識した本学発のブランドの確立を目指す。

3. 研究の計画・方法

本研究のゴールは、自給飼料を積極的に活用した特徴ある牛肉の生産とそのブランディングであり、さらに、その加工品の生産となっている。このため、5つのユニットから研究を構成し、最初のユニットは、輸入穀物飼料に代わる自給飼料を安定供給するための生産基盤の構築とその生産技術の開発となっている。ここで生産した自給飼料あるいは放牧地を活用し、肉用牛生産ユニットが構成され、これらは繁殖、哺育・育成、肥育の3区分となっている。繁殖ユニットでは、近年、和牛繁殖牛が減少傾向にある中、肥育素牛の安定供給のため、受胎率の向上ならびに計画的な子牛生産技術を開発する。哺育・育成ユニットでは、その後の肥育を効率的に進めるためのカラダ作り、特にルーメン機能の維持、向上に徹底した飼養管理技術の開発を行い、肥育ユニットでは、和牛を中心とした多様な品種において牛肉の生産性ならびに高品質化を図るための肥育技術の開発を進める。また、ブランディングした牛肉について全てを有効利用するため、精肉として活用できる部位は精肉加工として、これに不向きな部位は、牛肉加工を施すことでさらなる高付加価値化を図る。

今年度は、牛肉の新たなブランド化を目指すため、現時点で慣行的に肥育されている牛肉の特徴を明らかにするため、その分析、ならびに地域資源の飼料としての有用性について検討を行った。

4. 研究の特色

この研究は、今年度牛舎が改築される富士アニマルファームを活用し、ここを地域の肉用牛の生産拠点として位置付け、これに関連する飼料生産から素牛生産、肥育技術に関する研究開発を実施し、生産した牛肉の特徴を明確化すると共に、ブランド化につなげる。さらに、肉用牛ならびに飼料作物等の生産者ならびにそれらの関係機関との連携を図りながら、ブランディングしたプロダクトの生産体制の構築と円滑な市場導入を進める。また、富士アニマルファームでは、飼料の生産から肥育までユニット毎に、肉用牛の生産現場として実学に近い形で経験する場を構築し、附属牧場としての研究・実習機能の強化を図り、卒業研究や学生実習でも積極的に活用することで、実社会において即戦力となる学生の育成を目指す。

5. 研究の成果

5-1) 牛肉の特徴

慣行的に肥育されている牛肉の特徴を明らかにするため、黒毛和種、ホルスタイン種、ブラウンスイス種の牛肉の成分、物性についてそれぞれ評価を行った（表1）。黒毛和種では、他の品種と比較して、粗脂肪含量が多いことが改めて確認された。物性評価では、保水性はいずれの品種でも差は認められなかったが、保水性と水分含量を加味した多汁性指標では、ブラウンスイス種で水分保持力があることが示唆された。今後は、脂肪酸組成、遊離アミノ酸組成及びビタミン含量等について検討を行い、ブランド化に向けた牛肉の特徴とは何か、明らかにする必要がある。

表 1 肉用牛 3 品種の最長筋の特徴

	黒毛和種	ホルスタイン種	ブラウンスイス種
栄養成分			
粗タンパク質, %	15.3	21.1	20.3
粗脂肪, %	35.0	12.6	8.19
水分, %	46.7	65.9	68.4
物性評価			
保水性, %	71.2	71.1	73.6
多汁性指標	0.33		0.50

多汁性指標：保水性×水分

5-2) 地域飼料資源の有用性

地域飼料資源として、武蔵野市にある 26K ブルワリーの地ビールの生産過程で産出されるビール粕について、飼料原料としての有用性を検討するため、成分組成について分析を実施した（表2）。日本標準飼料成分表に掲載されているビール粕（生）と比較すると、粗タンパク質含量及び粗脂肪含量について、当該ビール粕で低値となった。

表 2 26K ブルワリービール粕の栄養成分 (%)

	水分 (原物)	粗タンパク質 (DM)	粗脂肪 (DM)	粗灰分 (DM)
26K ブルワリー	73.5	7.9	5.2	4.0
日本標準飼料成分	72.3	24.8	10.1	4.3

DM：乾物

このビール粕について、ロット間（季節）差を検討するために、通年を通してビール工房より試料を採取し、6、7 月を春季、8、9 月を夏季及び 10、11 月を秋季と分類し、栄養成分の比較を行った（表3）。季節間では、粗脂肪含量が春季に他の季節よりも高値となり、灰分は、春季に低値となった。これは、季節間差とも考えられたが、その後の調査で、ビールの仕込み内容、すなわち麦芽とホップの種類と混合割合が、製造するビールの種類によって変えられているため、その成分分析には仕込み内容を考慮する必要がある。また、本研究では、3 成分についての分析を行ったが、飼料化を目指すためには、今後、デタージェント分析についても検討を行っていく必要があると考える。

表 3 26K ブルワリービール粕の栄養成分の季節変化

	春季	夏季	秋季
粗脂肪, %	7.1	4.6	5.4
粗タンパク質, %	7.8	7.8	8.1
粗灰分, %	2.6	4.5	4.7

14 ニドウイルス目のウイルス複製制御を担うウイルス側因子および細胞側因子の同定とその機能解析

1. 研究者の所属・氏名等

獣医学科 獣医衛生学研究室

教授 田中良和

2. 研究の目的

申請者および海外研究者は、ヒト、ウマ、ブタ、ネコ、マウス、ニワトリを宿主とするニドウイルス目のコロナウイルス、アルテリウイルスでサイクロスポリン A (CsA) が、ウイルス複製阻害効果を持つことを発見した。ニドウイルス目による感染症は、獣医・畜産領域において重要な疾患で、特に豚伝染性胃腸炎、豚流行性下痢、豚繁殖・呼吸障害症候群は多大な経済的損失を招く。また、猫伝染性腹膜炎 (FIP) は致死率の高い感染症のため、伴侶動物医療において重要である。このうち、最も病原性の高いネココロナウイルス (FCoV) 感染症による FIP は、ワクチンがなく、発症すると致死的な経過をたどる。臨床現場における FIP 発症ネコでの CsA 治療効果は、多くの症例で寛解を認めるが、治癒率が低いので、国内外の獣医療でさらに有効な FIP の予防薬・治療薬の開発が切望されている。FIP ウイルス (FIPV) は、FCoV の強毒株と位置づけら

れているが、他のウイルス同様、細胞側およびウイルス側因子がウイルス複製を制御している。このため、ウイルス複製制御に関連する因子を同定・解析し、詳細なウイルス複製機構を明らかにすることが予防薬・治療薬の開発にとって極めて重要である。本研究は家畜伝染病予防法や実験動物のバイオセキュリティに制約されない FIPV をモデルとし、ウイルス複製制御を担う蛋白質の同定とその複製機構における役割を解明することで、他のニドウイルス目のウイルスにも適用できる新たな予防法・治療法開発への基盤を構築することが目的である。

3. 研究の計画・方法

「CsA の FIPV 複製抑制に関わるウイルス側因子の同定と解析」

すべてのコロナウイルスの複製は、CsA によって抑制されるため、コロナウイルス科全般に共通した複製機構が存在する。このため、以下の研究を実施する。なお、準備状況として、FIPV 79-1146 株のすべての構造遺伝子と非構造遺伝子のクローニングおよび発現ベクターへの遺伝子構築はすでに申請者の研究室で準備している。

- ① CsA 存在下で FIPV を継代し、各細胞継代時のウイルスを回収する。
- ② リアルタイム PCR 法による遺伝子定量によりウイルス複製効率を評価する。
- ③ 複製効率の増加が認められたウイルス群でディープシーケンスを実施し、ウイルス全遺伝子に対し初代感染時からのアレル頻度の変化を算出する。さらにウイルス複製に関連する遺伝子および変異を絞り込み、強制発現・抑制時におけるウイルス複製への影響がみられたものを CsA 耐性ウイルス遺伝子・変異として同定する。

4. 研究の特色

FIP はネコで最も致死率の高い感染症であるが、未だ効果的なワクチン開発が成功しておらず、治療法も確立していない。申請者は CsA 処置した FIP 発症ネコが一度は寛解するものの、その後再発するケースを多く診ている。このため、CsA 選択下で FIPV 株を継代することで CsA 耐性ウイルスを分離し、その全ゲノム解析を行うことで CsA 応答遺伝子を同定することができると考えた。

CsA は全てのコロナウイルスに対して増殖抑制効果をもつことからすべてのコロナウイルスにおいて共通な複製

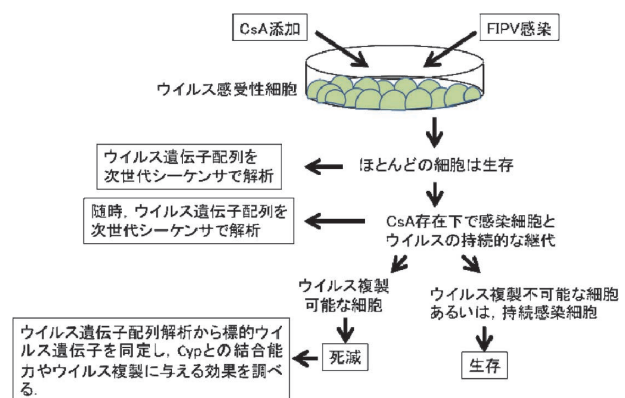
阻害機構が起きていると考えられる。このため、本研究の成果は、ヒトを含む抗コロナウイルス感染症薬の開発にとっても重要な成果となりうる。また、ワンヘルスとしての感染症対策として応用することが期待できる。

5. 研究の成果

FIPV 79-1146 株を fcwf-4 細胞でブラインド継代をおこなった結果、4 継代目に到っては、無処理のものと同様、感染 20 時間後で細胞変性効果が 90% 以上の細胞で起こり、CsA 耐性ウイルスが分離できた。初代より 4 継代目までのウイルス粒子より全ウイルスゲノム RNA を抽出し、次世代シーケンサにて遺伝子を読み込み、ゲノム配列をアセンブリすることにより、継代ごとのウイルスゲノムのアレル頻度変化をスコア化した。

その結果、非構造蛋白質 NS3 をコードする遺伝子（ゲノム位置 5557 番目）がシトシンからチミンへの変異（アミノ酸変化としてヒスチジンからチロシンへの変化）と構造蛋白質である S をコードする遺伝子（ゲノム位置 4334 番目）がシトシンからアラニンへの変異（アミノ酸変化としてプロリンからグルタミンへの変化）が 3% 以上のアレル・フレクエンシーで認められた。

今後はこれらのアミノ酸変化がウイルス複製に与える影響を解析し、ウイルス複製制御法の開発のための基盤を構築していく予定である。



Non-synonymous, >1%_allele_frequency, >50_Quality (mapping の精度)

Region 79-1146株での位置	Type	Reference	Allele	Origin_Randomの allele_frequency_ (B)	CS_Randomの allele_frequency_ (A)	Δ allele_Frequency (A)-(B)	Other variants within codon	gene name	Coding region change	Amino acid change	Oligoの系での SNV検出
5868	SNV	C	T	4.756460096	34.31462741	29.55816732	Yes	polyprotein 1a, polyprotein 1ab	nsp3 5557C>T	His1853Tyr	+
24539	SNV	C	A	3.434295254	26.37580565	22.9415104	No	S	spike 4334C>A	Pro1445Gln	+
20849	SNV	G	C	1.407211961	5.705925384	4.298713423	No	S	spike 644G>C	Arg215Pro	-
17199	SNV	G	T	1.941946034	5.68627451	3.744328475	No	polyprotein 1ab	nsp14 16889G>T	Gly5630Val	+
3891	SNV	A	G	0	3.673210893	3.673210893	No	polyprotein 1a, polyprotein 1ab	nsp3 3580A>G	Ile1194Val	+
3038	SNV	T	A	0	3.65990991	3.65990991	No	polyprotein 1a, polyprotein 1ab	nsp3 2727T>A	Asn909Lys	+
8005	SNV	A	G	0	3.400470834	3.400470834	No	polyprotein 1a, polyprotein 1ab	nsp4 7694A>G	Gln2565Arg	+
3346	Replacement	T	GC	0	3.336045566	3.336045566	Yes	polyprotein 1a, polyprotein 1ab	nsp3 3035delTinsGG	Ile1012fs	+
3343*3344	Insertion	-	GG	0	3.084415584	3.084415584	No	polyprotein 1a, polyprotein 1ab	nsp3 3032_3033insGG	Ile1012fs	+
11932	SNV	C	T	0	3.083700441	3.083700441	No	polyprotein 1a, polyprotein 1ab	nsp10 11621C>T	Thr3874Ile	+

15 担がん犬における骨髓由来抑制性細胞を標的とした新規治療候補薬の探索

1. 研究者の所属・氏名等

獣医学科 獣医臨床病理学研究室

助教 田村恭一

2. 研究の目的

近年のがん免疫の研究において、担がん生体では、がん細胞により多様な免疫抑制因子や免疫抑制細胞が誘導されることによりがん組織や所属リンパ節などでの局所的免疫抑制環境が構築されるだけでなく、全身性に免疫抑制環境が成立することが大きな問題となっている。このような経緯から、がんの免疫制御のためには免疫応答を増強するだけでなく、免疫抑制・抵抗性を是正することが重要である。実際、がん細胞が発現する免疫抑制分子を標的とした免疫チェックポイント阻害療法は従来のがん治療法を大きく上回る奏効率や生存期間の延長が認められ、現在重要な標準治療として確立しつつある。申請者はこれまでに、悪性黒色腫においては他のがんと異なり骨髓由来抑制細胞（myeloid-derived suppressor cells: MDSC）が発現する DC-associated heparin sulfate proteoglycans-dependent integrin ligand (DC-HIL) ががんの構築する免疫抑制環境において主体をなすことを明らかにした。このことから、がんにより誘導される MDSC による免疫抑制機構はがん種により様々な機構が存在すると推測された。これらの研究成果を踏まえ、本研究ではがん種により異なると推測される MDSC との相互関係において T 細胞が依存するシグナル経路を阻害することにより抗免疫抑制効果が得られる薬剤を探索することで、種々のがんに対しキナーゼ阻害剤を用いた MDSC の免疫抑制機能制御を目的とした新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の計画・方法

本研究計画では、犬の骨髓細胞と株化腫瘍細胞を用いて MDSC を分化誘導し、その細胞を用いて種々のがんにより誘導される MDSC による免疫抑制機構を調節しているシグナル経路を網羅的に解析する。さらに、がん種により異なると推測されるそのシグナル経路を阻害することにより種々の犬悪性腫瘍に対する新規治療候補薬を探索する。

本年度の支援経費を用いた研究計画では、犬の骨髓細胞と種々の株化腫瘍細胞を用いた MDSC 分化誘導法の確立およびその機能解析を予定した。種々のがんにより誘導される MDSC による免疫抑制機構を調節しているシグナル経路を *in vitro* において網羅的に解析するためには大量の MDSC が必要となる。そこで、はじめに犬の骨髓細胞と種々の株化腫瘍細胞を用いた MDSC の分化誘導を試みる。具体的な方法としては、マウスの骨髓細胞や人の末梢血単球からの MDSC の分化誘導法に基づいて、健常犬の骨髓単核球を GM-CSF および IL-6 存在下で培養し、さらに種々の株化腫瘍細胞培養上清を添加する。また、直接株化腫瘍細胞と共培養することもあわせて検討する。培養した

細胞からフローサイトメーターを用いたソーティングにより CD11b+Gr-1+ 細胞を精製し、Arginase 活性、一酸化窒素（Nitric Oxide: NO）、活性酸素種（Reactive Oxygen Species: ROS）および IL-10 産生能を検討する。また、骨髓単核球を採取した同一個体の末梢血から T 細胞を精製し、抗犬 CD3 抗体存在下で精製した CD11b+Gr-1+ 細胞と共培養して T 細胞増殖抑制能を評価する。さらに培養上清中の IL-2 および IFN- γ 濃度を ELISA 法で測定する。これらの実験により、犬の骨髓細胞と種々の株化腫瘍細胞を用いて分化誘導した MDSC が担がん個体で誘導される MDSC に特徴的な免疫抑制機能を有するかを明らかにすることができる。

4. 研究の特色

近年、腫瘍反応性 T 細胞に対する免疫抑制の阻害を目的とした免疫チェックポイント阻害薬が開発され、その優れた治療効果によりがん免疫療法的重要性が高く注目されるようになった。実際、Science 誌はこの抗体医薬による免疫チェックポイント阻害療法の研究をがん免疫療法における大きな進歩であると位置づけ、「Breakthrough of the Year 2013」に選出した。さらに、本邦において、免疫チェックポイント分子 PD-1 の同定および機能解析に基づき免疫チェックポイント阻害薬の開発に尽力した本庶佑博士が 2018 年にノーベル生理学・医学賞を受賞している。現在、新規免疫チェックポイント阻害薬の開発や免疫チェックポイント阻害薬とその他の抗がん治療との組み合わせによる臨床試験が数多く実施されている。しかしながら、抗体医薬である免疫チェックポイント阻害薬は、高い製剤コストが治療費を高額にする一因となっているため、製造コストの安い抗体代替薬の開発が期待される。本研究により、「キナーゼ阻害薬を用いた担がん状態における免疫抑制機能制御」を達成することは獣医学領域だけでなく医学領域においても大きなブレイクスルーとなると考えられる。本研究の達成により、がんに対する新たな治療コンセプトが提示でき、高額化する医療費の抑制に繋がる可能性があり、トランスレーショナルリサーチとして医学領域にも大きく寄与することが期待される。

5. 研究の成果

研究計画に示した実験の結果、犬の骨髓単核球を GM-CSF および IL-6 存在下で培養し、さらに株化腫瘍細胞培養上清を添加することにより、犬の骨髓単核球から効率的に CD11b+Gr-1+ 細胞を分化誘導できた。また、培養した細胞からフローサイトメーターを用いたソーティングにより CD11b+Gr-1+ 細胞を精製し、その機能を解析したところ、CD11b+Gr-1+ 細胞は MDSC に特徴的な機能である Arginase 活性、NO および ROS といった免疫抑制因子を有していた。このことから、犬の骨髓細胞から GM-CSF および IL-6 を用いて MDSC を効率的に分化誘導できることが明らかとなった。さらに、骨髓細胞から分化誘導した MDSC は、添加する株化腫瘍細胞培養上清の種類により、その免疫抑制機能に相違が認められた。このことは、種々

の株化腫瘍細胞により培養上清中に分泌される液性因子が異なっているためと考えられた。これらの結果は、担がん生体において誘導される MDSC ががん種により異なる免疫抑制機構を有していることと類似しており、本研究により確立した犬の骨髓細胞を用いた MDSC の分化誘導法が今後の犬の悪性腫瘍に対する新規治療候補薬の探索に有用であると考えられた。

16 犬や猫の脂肪由来間葉系幹細胞を用いたインスリン産生細胞への分化誘導と機能解析

1. 研究者の所属・氏名等

獣医学科 獣医内科学研究室

講師 手嶋隆洋

2. 研究の目的“脂肪由来間葉系幹細胞から産生したインスリン産生細胞によって糖尿病を治療する”

小動物臨床分野において犬や猫の糖尿病は代表的な内分泌疾患であり、ヒトと同様にインスリンの永続的な投与が必要になる症例がほとんどである。インスリン投与に代わる治療法として、インスリンを産生分泌する膵島β細胞の移植が研究されているが、ドナーの確保など様々な欠点が挙げられており、臨床応用への展開には解決し難い問題が立ちはだかっている。近年、このような欠点を回避するために、幹細胞を利用した細胞療法が様々な疾患に対して検討されており、糖尿病への応用も研究されている。

本研究の最終目標は、犬や猫の脂肪由来間葉系幹細胞(AT-MSCs)をインスリン産生細胞(IPCs)へと分化誘導し、生体へと移植することで永続的なインスリン治療に代わる新たな治療法を確立することである。そのための基盤研究として、① 犬や猫の AT-MSCs を効率的に IPCs へと分化誘導する方法の確立と、② 分化誘導した IPCs の機能解析を目的として本研究を計画した。

3. 研究の計画・方法

本研究の目的は、犬や猫の AT-MSCs を効率的に IPCs へ分化誘導する方法を確立すること、分化誘導した IPCs の機能解析である。そこで、本研究では下記の 3 つの課題を検討する。

① 犬や猫の AT-MSCs を IPCs へと分化誘導することは可能か？

② 効率的な IPCs への分化誘導法の確立

③ 分化誘導した IPCs の機能解析

① 犬や猫の AT-MSCs を IPCs へと分化誘導することは可能か？

ヒトやマウスの AT-MSCs から IPCs への分化誘導については数種類の方法が報告されている。犬や猫では報告されていないが、臨床応用への展開を考慮すると、Two-step 法が培養期間等の点から最も適しているのではと考えている。そこで、ヒトやマウスの Two-step 法を参考に、犬や猫の AT-MSCs を IPCs へと分化させる誘導条件を検討する。

② 効率的な IPCs への分化誘導法の確立

ヒトやマウスの IPCs を臨床応用へと展開するにあたって、改良すべき点が 2 つ挙げられている。i) IPCs へと分化誘導する細胞数の割合の向上、ii) 生体内への移植を考慮した場合のインスリン分泌能の向上、である。これまで、AT-MSCs の機能や分化誘導される細胞数は、脂肪を採取した個体の年齢や継代数に依存すると考えられていた。しかし、近年では年齢や継代数といった要因だけでなく、培養環境も大きな影響を与えることが示唆されている。

そこで、犬や猫の AT-MSCs を IPCs へと効率的に分化誘導する方法を確立するために、従来の二次元的な培養方法で可能な誘導方法(①の検討)を三次元的な培養へと応用し、インスリン分泌を含めた機能を最大限に発揮できる効率的な IPCs の分化誘導法を検討する。

③ 分化誘導した IPCs の機能解析

AT-MSCs から分化誘導した IPCs については、下記の項目を検討する。二次元培養によって IPCs への分化誘導を確認後に、三次元培養へと応用し比較検討を行う。

i) インスリン産生能の評価

分化誘導した IPCs を DTZ 染色やインスリン染色によって確認する。

ii) 膵島β細胞や内分泌系細胞に特異的な遺伝子発現の評価

PDX-1, insulin, glucagon, somatostatin などβ細胞や内分泌系細胞に特異的な遺伝子の発現を比較検討する

iii) グルコースに対するインスリン分泌応答の評価

グルコースの添加にตอบสนองするインスリンや c-peptide の分泌を、培養上清を用いて測定する。

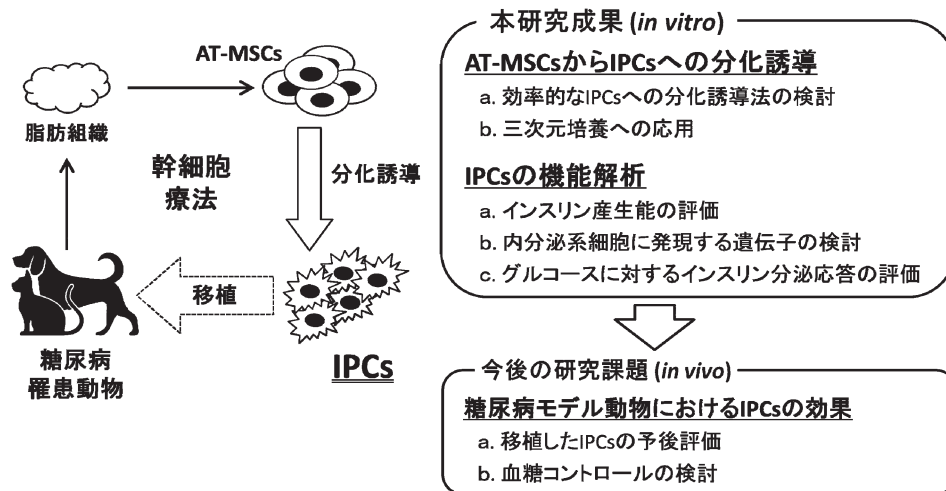
本研究は IPCs による糖尿病治療を臨床応用へと展開するための基盤研究に位置付けている。本研究では、インスリン産生能やグルコースへの応答性といった機能解析によって IPCs の効果が最大限に発揮される培養条件を確立することが目的である。

本研究から犬や猫の AT-MSCs を IPCs へと分化誘導する最適な方法が確立された後は、前臨床試験として *in vivo* における糖尿病モデル動物での検討を計画している。具体的には alloxan/streptozotocin によって膵島β細胞を選択的に破壊することで糖尿病モデルを作製し、このモデル動物へ AT-MSCs より分化誘導した IPCs を移植する。移植した IPCs の長期的な動向を検討するとともに、血糖コントロールを評価する。糖尿病モデル動物での研究によって良好な結果が得られれば、実際の糖尿病症例への応用を計画する予定である。

4. 研究の特色

本研究は、自己の脂肪組織からインスリン産生細胞を作製し、自家移植することで治療を完結させる新たな治療法を確立するための基盤研究である。

本研究の構想とその後の展望



5. 研究の成果

① 犬や猫の AT-MSCs を IPCs へと分化誘導することは可能か？

本研究では、ヒトやマウスでの報告を参照し、複数の誘導条件を検討した。その結果、犬の AT-MSCs を IPCs へと分化誘導することは可能であることが明らかとなった。

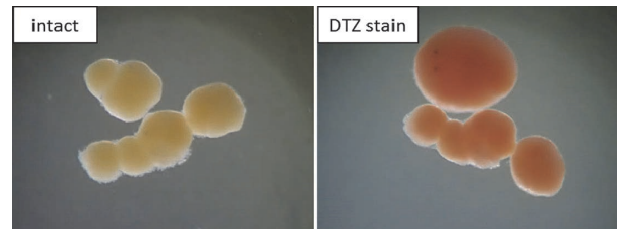
② 効率的な IPCs への分化誘導法の確立

IPCs へと分化誘導できることが明らかとなったことから、より効率的な分化誘導について検討を行った。検討内容としては、一般的な二次元培養によって、分化誘導前の AT-MSCs を培養皿に接着した状態から分化誘導を行う方法と、スフェノイド形成を促した状態で分化誘導を行う方法を比較した。その結果、初回の播種細胞数は同じであってもスフェノイド形成後に分化誘導を行う方がより IPCs としての能力が高いことが③の検討から明らかとなった。

③ 分化誘導した IPCs の機能解析

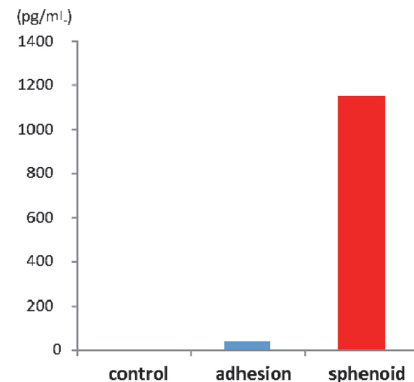
IPCs の機能を確認するために、DTZ 染色とグルコースに対するインスリン分泌応答能を確認した。その結果、二次元培養法と比較して、スフェノイド形成を行った方が、DTZ に対して強い染色性を示した。また、インスリン分泌量に関しても、スフェノイド形成によって明らかな増加が得られることが示された。

今後は、インスリン抗体を用いた免疫染色、膵島β細胞や内分泌系細胞に特異的な遺伝子発現の評価を加えたうえで再現性を確認し、生体内への移植に適した方法をさらに検討していく予定である。



分化誘導後の Dithizone (DTZ) 染色

DTZ によって強く染色されることから、インスリン産生能を有していることが確認できた。



グルコースに対するインスリン分泌応答性

25mM Glucose 存在下でのインスリン産生量を ELISA によって測定した。その結果、同じ分化誘導法であっても sphenoid 形成によってインスリン産生能が顕著に増加することが明らかとなった。

17 輸入野生動物が保有する寄生虫病のリスク分析に関する研究

1. 研究者の所属・氏名等

獣医学科 獣医寄生虫学研究室

講師 常盤俊大

2. 研究の目的

ペット用あるいは展示用として国内に輸入される動物に随伴する形で、各種病原体が持ち込まれることがある。これらの微生物を原因とする輸入動物の大量死や人獣共通感染症の発生事例、家畜・野生動物への伝播などが報告されており、公衆・家畜衛生上重要な問題として捉えられている。本研究は、これら輸入野生動物の保有する原虫類、蠕虫類および節足動物に着目し、実際に国内に定着、拡散する可能性のある病原体や感染症について基礎的知見を集積し、保有状況や感染性、病原性を調べることでリスク分析を行うことを目的としている。

3. 研究の計画・方法

本研究は、輸入動物の保有する原虫類、蠕虫類および節足動物に着目し、生物学的特性を明らかにし、病原性解析および国内流行状況調査を通じてそのリスクを分析した。動物病院や取扱業者、動物園水族館で発生した輸入野生動物の大量死事例や不明病原体の検査・通報体制を構築し、本研究に活用した。得られた微生物について形態および遺伝子解析を実施し、病原性が高いもの、ヒトに感染する可能性が高いもの、生物生態系の損失に繋がる可能性のあるもの、あるいは新規感染症と推定されたものについて、学会発表や論文発表を通じて警鐘を鳴らすとともに、適切な機関に通報した。

4. 研究の特色

昨今の飼育動物種の多様化に伴い、イヌやネコ以外の、いわゆるエキゾチック・アニマルと呼ばれる動物が、国内外で多く流通している。それらの動物は、ヒトとの歴史が浅いことから飼育方法が確立していないだけでなく、保有している病原体についても不明な部分が多い。実際に、このような動物の移動に随伴する形で持ち込まれた微生物が、人に感染して病気を引き起こした事例や、野生在来生物に感染して大量死を引き起こし、生物多様性の損失や生態系の劣化を起こした事例が国内外で報告されている。

申請課題で扱う外来性の病原体は、現状のペットの輸入体制では摘発することが困難である。今後も非意図的に動物に随伴して国内に持ち込まれ、ヒトのみならず家畜、野生動物に感染して甚大な影響を与える可能性がある。申請課題は、エキゾチックアニマルを扱う業界（獣医師、業者、動物園）との連携し、実際に定着、拡散する可能性のある病原体や感染症についてその基礎的知見を集積し、国内で輸入・繁殖されている哺乳類、両性類、爬虫類の実際の保有状況や感染性、病原性を調べるという独創的な研究である。各々の病原体や感染症のリスクを分析し、特殊動物の流通量や診察する動物病院が国内で最も多い東京とい

う地の利を生かし、速やかに発信することで社会的な問題意識の高揚につなげ、実務的な対策の考案に貢献することで、病原体の新たな国内侵入や拡散の防止を目指す。また、得られる病原体は未記載種や新株（系統）である可能性が高く、それらを詳細に解析することで数多くの知見が得られるものと期待される。

5. 研究の成果

輸入動物の新規感染症について、以下のような結果が得られた。①チンチラ13頭から国内で初めて *Cryptosporidium ubiquitum* を検出した。11頭は下痢等を呈し、8頭は死亡した。複数施設で流行が確認されたことから、輸入前あるいは輸入中での感染拡大が疑われた。遺伝子解析の結果、ヒトに感染する可能性が極めて高い系統であることを確認されたことから、これらの調査結果について *Parasitol Int* 誌にて報告を行った。②キンカジャウ回虫 (*Baylisascaris potosis*) はアライグマ科キンカジャウを模式宿主とする寄生性線虫で、2014年に申請者が新種記載した種である。スナネズミやリスザルに感染して幼虫移行症を引き起こすことが知られていたが、今回、マウスに脳移行症を引き起こすことが確認され、その詳細について *J Parasitol* 誌にて報告した。③下痢を呈した輸入後間もないコツメカワウソ幼獣複数頭から検出されたコクシジウムを *Cystoisospora cf. rivolta* と同定した。コツメカワウソにおける初のコクシジウム検出事例として、その概要を *Int J Parasitol PAW* 誌にて報告した。

学術論文

- A) **Tokiwa T**^{*}, Ohnuki A, Kubota R, Tamukai K, Ike K (2018) Morphological and molecular characterization of *Cystoisospora* sp. from Asian small-clawed otters *Aonyx cinereus*. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 7: 268-273. (* Corresponding author)
- B) Kubota R, Matsubara K, Tamukai K, Ike K, **Tokiwa T**^{*} (2019) Molecular and histopathological features of *Cryptosporidium ubiquitum* infection in imported chinchillas *Chinchilla lanigera* in Japan. *Parasitol Int* 68: 9-13. (* Corresponding author)
- C) Taira K, Nakamura S, **Tokiwa T**, Une Y. Larva migrans of *Baylisascaris potosis* in experimental animals. *J Parasitol* 104: 424-428.

学会発表（国内）

- A) 男網慶、岩城ひかり、土井寛大、**常盤俊大**、ギリシャリクガメのイボマダニ感染。第34回獣医臨床寄生虫学研究会例会。2018年12月2日
- B) **常盤俊大**、大貫愛、田向健一。コツメカワウソのコクシジウム感染症。第34回獣医臨床寄生虫学研究会例会。2018年12月2日
- C) 羽田野真一郎、伊澤伸元、上田通裕、小嶋篤史、周洵、**常盤俊大**。飼育フクロウ類に寄生する *Caryospora* 属の基礎的研究。鳥類臨床研究会 第22

回大会 2018年10月7日

- D) 窪田理恵、松原且季、另網慶、岡本実、**常盤俊大**、飼育爬虫類由来 *Cryptosporidium* 属原虫の分子生物学的特徴および新規ゲノタイプ。第88回 日本寄生虫学会。2019年3月15日。
- E) **常盤俊大**、羽田野真一郎。カリオスポラ属 (*Coccidia*, Apicomplexa) の分類学的再検討。第88回 日本寄生虫学会。2019年3月15日。
- F) 大貫愛、田向健一、**常盤俊大**。輸入コツメカワウソにおける *Cystoisospora* 属原虫感染。2019年3月15日。
- G) 羽田野真一郎、伊澤伸元、上田通裕、小嶋篤史、**常盤俊大**。飼育猛禽類の寄生虫保有状況調査。第88回 日本寄生虫学会 2019年3月15日。

学内シンポジウム

- A) **常盤俊大**、松原且季、小嶋篤史、田向健一、周洵、窪田理恵、大貫愛、羽田野真一郎。エキゾチックアニマルとコクシジウム感染症。第1回 ニチジュウシンポジウム。2018年12月7日

18 腸管オルガノイドを用いた食品成分の腸管機能調節作用評価系の構築

1. 研究者の所属・氏名等

食品科学科 食品機能化学教室
教授 戸塚 護

2. 研究の目的

腸管は消化吸収、糞塊の形成以外にも、体内最大の免疫臓器として生体防御に関わり、腸内細菌叢が健康に大きな影響を与えることが明らかにされつつある。さらに、脳腸相関を介して神経系の働きにも関与することが示されている。腸管は、機能性食品成分の作用点として特に重要な役割を果たしている。

このような腸管の機能には、食品成分や共生菌と直接の相互作用がある腸管上皮細胞の働きが大きな役割を果たしている。小腸上皮細胞は栄養素の消化吸収を担う吸収上皮細胞のほか、それぞれ粘液、消化管ホルモン、抗菌ペプチドを分泌する杯細胞、腸内分泌細胞、パネート細胞、さらに免疫応答に関与するタフト細胞が存在する。しかしながら、腸管の正常上皮細胞の初代培養系の確立は非常に困難であり、正常な分化細胞を安定に維持することができないことから、その細胞機能の解析は困難を極めてきた。この問題を解決する方法の一つとして、腸管オルガノイドの利用が期待されている。オルガノイドとは、各臓器に存在する体性幹細胞の *in vitro* 培養により、三次元的に構築された臓器に類似した組織体のことである。2009年にマウス小腸上皮幹細胞から、長期培養が可能な小腸オルガノイドが確立されたことを契機に、腸管の組織レベルの生理的な反応を試験管内で再現することが可能となってきた。この技術は、今後食品機能の解析においても必要不可欠な手法

となるものと考えられる。

本研究では、腸管オルガノイドを食品機能解析に応用するための基礎的技術を確立することを目的とした。腸管オルガノイドと食品成分との相互作用を解析する上で問題となるのは、食品成分を腸管上皮細胞の管腔側から作用させるために、三次元的に構築したオルガノイドの内部に注入しなければならない点である。そこで本研究では、マウス小腸上皮幹細胞の培養により一度立体的に構築した腸管オルガノイドを展開して、平面上で培養・解析できるようにする技術の確立を目指した。また、食事摂取にตอบสนองして腸管に分泌される胆汁に含まれる胆汁酸が、腸管オルガノイド形成に与える影響について解析した。

3. 研究の計画・方法

マウス小腸オルガノイド調製法の確立

これまでの研究で、マウス小腸を用いてオルガノイド培養系の構築を試みた。すなわち、成体 BALB/c マウスから小腸を摘出して小さな組織片に断片化し、EDTA 溶液処理により、Lgr-5 陽性の小腸上皮幹細胞を含む陰窩（クリプト）部分を調製した。これを培養することで構築した腸管オルガノイドを液体窒素中で凍結保存した。本研究では、この凍結細胞をもとに小腸オルガノイドの再構築を行った。

腸管オルガノイドは主に Wnt シグナル、Notch シグナル、骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein ; BMP) シグナルによって制御される。Wnt シグナルを増強する R-spondin 1、BMP 阻害タンパク質である Noggin、および上皮成長因子 (EGF) を添加した培地を用い、ラミニンとコラーゲンを豊富に含む基底膜を模倣したマトリゲル中で、腸管上皮幹細胞を含む細胞を7日間培養することで、小腸オルガノイドを調製した。

胆汁酸が小腸オルガノイド誘導に与える影響

胆汁は食事摂取にตอบสนองして、胆管を経て十二指腸に分泌され、界面活性作用により食物由来の脂質や脂溶性ビタミンの消化や吸収を促進する。肝臓で合成された一次胆汁酸であるコール酸およびケノデオキシコール酸や、その腸内細菌の代謝により形成される二次胆汁酸であるデオキシコール酸およびリトコール酸が、小腸オルガノイド形成に与える影響について解析した。すなわち、胆汁酸を添加した培地で小腸オルガノイドを誘導し、誘導した小腸オルガノイドにおける幹細胞マーカーおよび分化細胞マーカーの mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR で解析した。

腸管オルガノイドの平面培養法の確立

腸管オルガノイドを調製した後、細胞を平面培養に持ち込む方法として、腸管オルガノイドの構造を機械的に破壊する方法、部分的な酵素処理を行う方法、完全に酵素処理して単細胞懸濁液にしたものを培養する方法などがある。今回は、腸管オルガノイドの構造を機械的に破壊して平面培養する方法を試みた。

4. 研究の特色

機能性食品成分の腸管に対する作用を調べる目的で腸管

オルガノイドを利用するための基礎的な技術を確認することを目指した研究である。その際に問題となるのが、三次元構造をもつ腸管オルガノイドはその内部が腸管腔にあたり、食品成分は内部から作用させないと腸管上皮細胞の正しい応答は観察できない。それを解決する方法の一つとして、一度構築した腸管オルガノイドを平面培養上に再展開する方法が検討されている。本研究では、その基盤技術を本学において確立することを目的としている。ここまでは既報の方法を検討するが、その後、腸管上皮幹細胞に発現制御可能な状態で不死化遺伝子を導入し、分化後にのみ不死化遺伝子を発現させる仕組みを作ることにより、腸管上皮細胞に含まれる 5 種類の分化状態の異なる細胞、すなわち、吸収上皮細胞、杯細胞、パネト細胞、腸内分泌細胞、タフト細胞の機能を保った細胞株を樹立することを計画している。このような試みはこれまでに報告されておらず、独創的な研究となることが期待される。

また、現在はマウスでの基礎的実験に留まるが、この方法を産業動物、愛玩動物の腸管に応用することで、家畜用の機能性飼料の開発に利用することができる可能性を有する点も本研究の特色である。

5. 研究の成果

マウス小腸上皮幹細胞を培養することにより構築した小腸オルガノイドを凍結保存したものを解凍し、トリプシン処理により細胞懸濁液とした後、これを培地とマトリゲル中で 7 日間培養することで、小腸オルガノイドを再度構築できることが確認できた (図 1)。

再構築した小腸オルガノイドをトリプシン処理により細胞懸濁液とした後、96-well plate の well 中で培養を試みたが、現在のところ、その後の解析に十分な細胞数を得るには至っていない。今後さらに培地成分や培養方法の再検討が必要である。

パルミチン酸添加により小腸オルガノイド内の幹細胞数が増加し、オルガノイド誘導立が高まることが報告されているため、パルミチン酸をポジティブコントロールとして、一次胆汁酸 (コール酸、ケノデオキシコール酸)、および二次胆汁酸 (デオキシコール酸、リトコール酸) を添加した場合の影響を検討した。幹細胞マーカーおよび分化細胞マーカーの mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR で解析した結果、リトコール酸を添加して誘導した小腸オルガノイドにおいて、幹細胞マーカーである Lgr5 の mRNA 発現が有意に上昇することが明らかとなった。また、パルミチン酸およびリトコール酸の添加は、小腸オルガノイドに対して突起構造が少ない形態を誘導した (図 2)。より球に近い形態は、未分化な構造であると考えられており、このことからパルミチン酸およびリトコール酸の添加は、オルガノイド内で幹細胞の割合を増加させている可能性が示唆された。

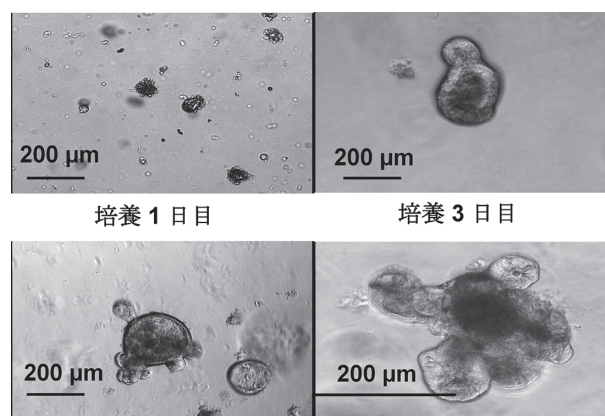


図 1. マウス小腸オルガノイド

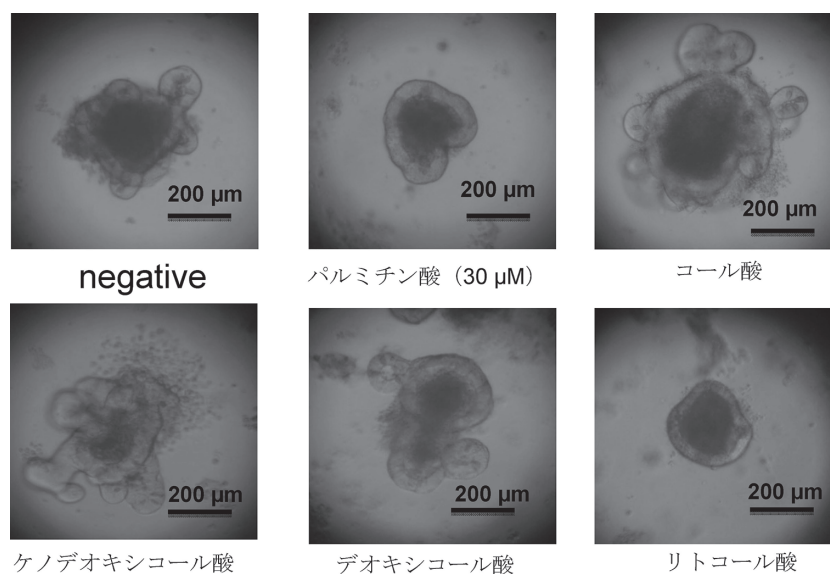


図 2. パルミチン酸、各種胆汁酸 (100 μ M) 存在下で形成したマウス小腸オルガノイド

19 近隣公園・大学付属牧場のモグラ類を利用した、視覚退化動物の匂い受容機構の解明

1. 研究者の所属・氏名等

獣医学科 比較動物医学研究室

講師 中田友明

2. 研究の目的

嗅覚は特に哺乳動物において、摂食行動や外敵または同種内他個体の認知などの社会行動の発現に関わる重要な因子の1つであるが、その受容能は種ごとに大きく異なっていることが知られている。従って、嗅覚を介した農業害獣防除の取り組みなどがすでに行われているが、具体的な対象動物における忌避剤や、そのほかの匂い分子がいかなる生物学的機序によっているかは未解明の課題であり、今後の野性動物と人間活動の共存社会を目指す上で、種特異的に働く忌避香料の効率的に利用する際に極めて重要な情報である。

申請者は、これまでに協力者より提供を受けて宇都宮市や、その他の地区で駆除もしくは自身で学術捕獲したアズマモグラを用いてモグラ類に特有の嗅覚神経基盤を遺伝学的(RNA-Seqによるde novoトランスクリプトーム解析)、解剖学的(嗅覚関連タンパク質の免疫染色)に調べてきた。その結果、地中生活に適応し、視覚系を退化させたモ

グラでは、他の哺乳動物よりも嗅覚機能を司る組織・遺伝子セットが共に他の脊椎動物に比して発達していることを見出した(下図:解剖学的なモグラ嗅覚系の特異性の例)。

本研究は、近隣都立公園ならびに付属牧場に生息するコウベモグラ・アズマモグラのにおい受容処理機構を分子/形態/生理・行動/個体群という多角的視点で解析、解明し、食虫類での嗅覚研究の基盤を確立し、将来的には農業害獣の防除や野性動物の保護に資することを目的とする。

3. 研究の計画・方法

[動物入手(捕獲)]

捕獲法は生け捕り罠の利用を原則とし、東京都ならびに山梨県知事の鳥獣捕獲許可のもと、すでに捕獲許可を得ている付属牧場『富士アニマルファーム』ならびに『都立野川公園』において、捕獲する。3-7時間おきに設置した自作のモルトラップを巡回して捕獲された動物を生きのまま回収する。捕獲設備の詳細については下図に図示した。

[分子生物学・神経解剖学的解析研究]

捕獲動物を速やかに当学研究室内へ運搬し、麻酔薬による安楽死を行ったのちに、嗅覚器官(吻部(鼻腔)から脳(嗅球から梨状皮質・扁桃体等の大脳基底核を含む))を解剖によって採材し、研究に供する。得られた組織は鼻腔・鋤鼻器の嗅覚受容神経およびその投射先である脳領域(嗅球・副嗅球)に分け、超薄切片を作成したのちに、免疫組

Distribution of Gaolf- and Gao-immunoreactive sensory cells

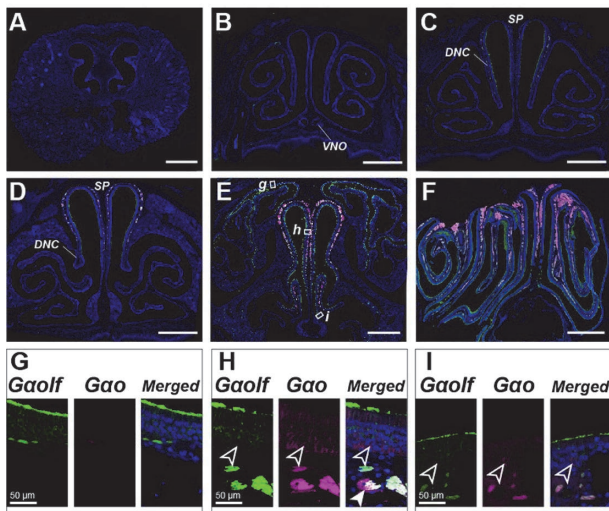
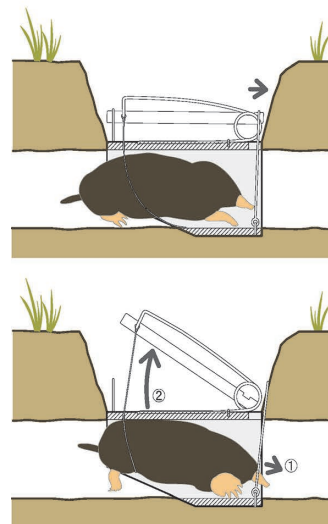
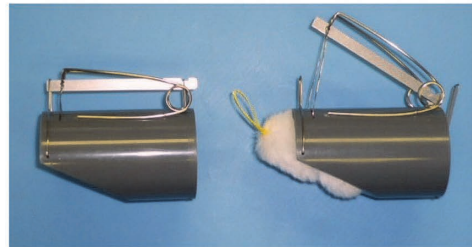


図 1. モグラの嗅覚神経分布

吻部先端(A)から鼻腔後端(F)までの連続組織切片。通常の哺乳動物と同様に一般的な匂い受容を担う嗅神経マーカーであるGaolfタンパク質(カラーでは緑色)が鼻腔の中部(C)から後端部(F)にかけてみられる一方で同時に、他の脊椎動物では鋤鼻器に限局在する鋤鼻神経マーカーであるGaoタンパク質(カラーではマゼンダ)がみられる。すなわち、モグラの鼻腔では、嗅神経の他に鋤鼻神経が多数存在・機能しているユニークな嗅覚系が存在していることが示された。

もぐら用くり罠

[L 84 mm、パイプ内径40mm / 塩ビ管、ステンレス材]



・モグラの通り道に穴を掘り仕掛ける
・ストッパーを解除しておく

・モグラが通ろうとすると①が押され②が跳ね上がる
・モグラはパイプの中で締めつけられ抜け出せなくなる



組織化学的染色法もしくは *in situ hybridization* 法によって、各種機能タンパク質の発現パターンならびに嗅覚系神経回路の解析を行いモグラの嗅覚機能を探る。

これらの解析は、昨年度実施した、アズマモグラの RNA-Seq 解析によって得られた *de novo* トランスクリプトームデータセット（アズマモグラの嗅覚器官に発現する約 15,000 種の遺伝子部分長を同定した）を活用することで、地下生活に特化したモグラの嗅覚受容体遺伝子の発現パターン同定をマウスなどのモデル動物と同等のレベルで行うことが可能である。

[生理学・行動学的解析研究]

一部の捕獲動物は、大学の定める規程に沿って行動科学実験に供する計画である。嗅覚は先に述べた通り、摂食や外敵または同種内他個体の認知などの社会行動の発現に関わる重要な因子であるので、モグラにとって摂食や忌避を誘起する行動の発因子（例えば、潜在的な餌生物や捕食者）を同定し、さらにそれらに含まれる匂い物質の同定を試みる為に、嗅覚嗜好性試験（Y 字迷路選択試験）を行う。モグラはその生態的特殊性から既存の実験装置を利用できないため、専用の行動解析装置を試作している（上図：透明パイプと滑り止めネットを利用した Y 字迷路）。この装置では、嗜好性を判断したいものと陰性対照物を写真上方のサンプルチャンバーにそれぞれ設置し、小型ファンによる送風を行った際に写真下に導入した動物がどちらのサンプルチャンバー方向を選択するかを調べる。

さらに生殖行動に関しては、世界のどの動物園・研究機関においてもモグラ類の繁殖実績がないため、より自然界での環境に近い状況で世界初のモグラの繁殖行動を観察・記録することを目的とし、嗅覚との関連を調べたいと思っている。そのためには、モグラをストレスなく安定して飼育する施設が必要となるため、国内でもっとも長期のモグラ飼育実績をもつ多摩動物公園と協力することとした。

4. 研究の特色

都心部に程近い本学の在巨する武蔵野市および隣接する三鷹市は、吉祥寺など巨大な繁華街を有し、農地が宅地化されるなど急速な都市化を迎えている一方で、井の頭・小金井・野川・武蔵野・浅間山・府中の森公園など、都内有

数の大公園群を抱える自然豊かな地域でもある。これらの都立公園では、23 区内や開発区画では見ることはできなくなった、ニホンアナグマやハクビシン、アズマモグラなどの野生動物たちが生息している。これらの動物たちは、都市開発部での自然環境保全の観点からは重視される一方で、農業・生活害獣としての側面を持っており、いかにその生命資源を維持したまま人間活動と共存してゆくかは未解決の課題となっている。モグラ類では大食で 24 時間も絶食に絶えることのできない生理特性をもつ上に、住处として舗装されてない土壤中に広大な個体占有のトンネルを必要とするため、餌生物を含めた土壌生物環境の指標動物として最適なものであるとともに、農地やゴルフ場・堤防に侵入した場合、水田の水を抜いてしまうなどの農業被害や、河川決壊の原因となるため害獣としても重要な動物である。

そこで私どもは、モグラの生得的忌避物質を同定するために、昨年度より野川公園ならびに多摩動物公園や複数の研究機関と共同で、モグラ類の嗅覚機能についての研究を開始しました。現在までに CT スキャンや比較形態学的な古典的手法から、次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq などの新しい手技を活用して、モグラの嗅覚器形態やそこに発現する嗅覚受容体ファミリーの遺伝子レパートリーなどを明らかにするとともに、モグラの嗅覚嗜好性検査による嗅覚機能解析を行ってきました。

いうまでもなく、われわれ人間のさまざまな活動と動物・生命といった自然との共栄は、20 世紀の公害問題、最近の災害や原発問題を経験した国民にとって 21 世紀の達成目標の一つであり、本学の教育・研究の特色もまた、獣医師・動物看護師であれ、動物・食品の研究者や専門家であれ、それぞれの現場で人と生命をつなぎそのうちに自身の能力を発揮するためのものであります。身近な周辺地域の命と人間の活動をつないだ研究スキームが本研究の特色であると考えている。

5. 研究の成果

当初、本研究は 2-3 年期間での実施を念頭に計画されたものであり、その全てを当該助成研究の採択より遂行する事はできていないが、以下に示す研究活動を行い一定の成果を得た。

[動物の入手について]

本研究採択後、学長ならびに動物実験委員会、都知事等の承認を得て、本学第一校舎内に生息するアズマモグラの捕獲と遺伝的特性について調べた。現在までに 7 匹を同校舎内で捕獲し、ミトコンドリアゲノム DNA 上の遺伝子（*Cyt-b*）を解析した結果、既存データベースの配列としては軽井沢で捕獲されたアズマモグラに最も遺伝的距離が近いとわかった。上記データベースには関東圏のモグラの情報は一切がなく、軽井沢は、データベースに含まれるモグラ類の捕獲場所として地理的に本学に最も近いものであった。なお、別途三鷹市野川公園にて捕獲したのアズマモグラ（RNA-Seq によって遺伝子データベースを構築した

個体群)とは同質一ないしは極めて近い遺伝関係を示したことから、本学に生息するアズマモグラは自然分布によって古来より大学所在地区で生息しているものと考えられ、また、過去の研究データとの整合性も取ることが可能と推測できた。

また、多摩動物公園と共同で捕獲作業・飼育を行う、助成金によって飼育設備を整えるなど本研究遂行上に最も大きな障害となると予想していた動物の入手と飼育についての安定性を確保した。

[神経解剖学的研究]

上記した学内捕獲モグラは、ミトコンドリアゲノムの解析の他に現在嗅覚神経回路の解析を行っている。具体的には嗅覚受容細胞の存在する吻部への神経接続を残した状態で脳を露出させた固定標本を作成し、嗅球ならびに副嗅球へのニューラルトレーサーをマイクロインジェクトし、両嗅覚神経中枢へ投射する吻部の感覚受容細胞を逆行性に、またそれぞれの嗅覚一次中枢より神経投射を受ける高次中枢を順行性に染色した。今後、この標本の薄切組織を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察することで、主嗅球、副嗅球を中心とした嗅神経回路を同定し、これまで明らかにしてきたモグラ類のユニークな嗅覚系(図1参照)の全貌を明らかにする予定である。

20 Veterinary Brain Center (仮) の設立

1. 研究者の所属・氏名等

獣医学科 獣医放射線学研究室

准教授 長谷川大輔

2. 研究の目的

研究代表者(長谷川)は大学院生時代より現在に至るまで一貫して犬猫のてんかんおよび脳疾患をライフワークとして研究を遂行してきた。現在、その研究業績やその研究内容は国内/海外、医学/獣医学、基礎/臨床を問わず高く評価され(日本てんかん学会(WADA)賞、てんかん治療研究振興財団研究褒賞、George Fleming (The Veterinary Journal) 賞)、また様々な競争資金を獲得して

きている(科研費若手B、若手A、基盤A、私学事業団学術研究振興資金、武田科学振興財団、てんかん治療研究振興財団)。くわえて申請者は日本てんかん学会評議員、国際獣医てんかん特別委員(IVETF)、アジア獣医内科学神経病専門医(DAICVIM)に任命されている。このような背景から、てんかん学および獣医神経病学の分野において、「日本獣医生命科学大学=長谷川大輔=動物の脳・てんかん」というイメージが既に定着している。また本学には世界唯一のてんかん猫コロニーがあり、設備的にも3 Tesla MRI、脳波計、手術顕微鏡、ナビゲーションシステム、定位装置などが整備されている(ただし研究用機器と医療センター設備を合わせた場合)。しかしながら、神経科の専任職員・研究者は長谷川のみであり、他は1-2名の大学院生だけで研究と臨床を(研究室の学部学生や病院の研修医の手助けを受けながら)遂行しており、世間からの期待・重責に十分に対応できているとはいえない。一方、医学および海外の獣医大学に目を向けると、てんかんセンターあるいは脳研究所とよばれる学内/施設内組織が設立され、てんかんおよび脳疾患患者を重点的に引き受け、その地域あるいは国の中心的研究・診療施設として運営されている。人医学のてんかんセンターや脳研究所では小児科、神経内科、脳外科、精神科および基礎研究者が集結して研究および診療に従事している。獣医学領域ではイギリスのロンドン大学 Royal Veterinary College およびベルギーのGhent大学に各々Epilepsy Clinic for Animals / Epicentrum (Epilepsy Center)を立ち上げ、各国のてんかん研究の中心的役割を担っている。また各国の獣医神経科の研究室を見ても、神経科の専任教員はたいてい3名以上在籍し、またこれに専門医レジデント、大学院生、ポスドクが診療・研究に従事している。本研究では、上述した「日獣大=長谷川=脳・てんかん」の既にブランド化された利点を活かし、日本およびアジア初の獣医脳研究センター(Veterinary Brain Center)の設立と活性化した動物の脳科学および脳疾患の研究・診療を目指すものである。

3. 研究の計画・方法

	年度	主たる計画	ソフト	ハード
1	2018	VBCの組織形成(構想)と既存設備、継続中研究の確認	既存職員の配置	研究室の確保 (医: LINAC 更新)
2	2019	VBC 仮始動 人員、診療体制、研究設備の整備 既存研究の継続、新規研究の計画	新スタッフ1希望 (助教、院生、PD)	電気検査室 EMUの設置
3	2020	1年間の仮始動後の問題点の抽出・改善 (中間報告) 既存研究の継続、新規研究の開始	前年にスタッフ1未加入 なら継続希望	(MRI 更新?)
4	2021	研究継続および一定の成果発表	前年にスタッフ1未加入 なら継続希望	
5	2022	VBCとして本格始動 これまでの研究成果報告	新スタッフ2希望	

4. 研究の特色

本学の研究設備および動物医療センターと、研究代表者のこれまでの業績・認知度を活かし、人医および欧米獣医大に肩を並べるべく、日本初の動物の脳研究センター Veterinary Brain Center: VBC (仮) を立ち上げ、研究代表者が行っているてんかんおよび脳疾患の研究と学内における脳研究(行動、基礎を含む)の融合(トランスレーショナル研究)と活性化を目指し、同分野における国内あるいはアジア圏でのリーダーシップをとる。

5. 研究の成果

本年度は VBC の構想と、VBC の基幹研究となる「家族性自然発症性てんかんネコ」コロニーの維持(飼育管理、治療および実験)を行った。

これらの具体的な研究成果として、以下の論文および学会発表を行った。

[学術論文]

1. Yu Y, Hasegawa D, Hamamoto Y, et al. Neuropathologic features of the hippocampus and amygdala in cats with familial spontaneous epilepsy. *Am J Vet Res* 79:324-332, 2018
2. Ukai M, Hamamoto Y, Yu Y, et al. Efficacy of zonisamide on interictal electroencephalography in familial spontaneous epileptic cats. *J Feline Med Surg* 20:962-967, 2018
3. Hamamoto Y, Hasegawa D, Yu Y, et al. Statistical Structural Analysis of Familial Spontaneous Epileptic Cats Using Voxel-Based Morphometry. *Front Vet Sci* 5:172, 2018. doi: 10.3389/fvets.2018.00172.
4. 長谷川大輔. 側頭葉てんかんの新しい自然発生動物モデル: 家族性自然発症性てんかんネコ. *BIO Clinica* 33:66-70, 2018.

[学会発表]

1. 長谷川大輔、湯祥彦、濱本裕仁ら. 家族性自然発症性てんかん猫における海馬および扁桃体の神経病理学的特徴. 第 29 回てんかん治療研究振興財団研究報告会(大阪、3 月)
2. Yu Y, Hasegawa D, Buckley RM, et al. Genetic association analysis of familial spontaneous epileptic cats. *ACVIM Forum* 2018 (シアトル、6 月)
3. 大谷彰平、大西ゆみ、小山英志ら. 抗 DCC 抗体関連性辺縁系脳炎と診断した猫の 1 例. 獣医神経病学会 2018 (盛岡、7 月)
4. 長谷川大輔. てんかんにおける医学-獣医学トランスレーショナル研究. 第 52 回日本てんかん学会学術集会(横浜、10 月)

21 四足歩行動物の動作解析法の開発

1. 研究者の所属・氏名等

獣医学科 獣医外科学研究室

准教授 原田恭治

2. 研究の目的

人間の動作を測定するための動作解析機はすでに製品化されており、手法もほぼ確立されている。しかしながら、四足歩行動物専用に設計された動作解析機はなく、測定方法も十分に確立していない。現在我々は、ヒューテック株式会社の協力を得て、ICpro-3D をベースとした四足歩行動物用動作解析システムの開発研究を行っている。

本研究の目的は、四足歩行動物の動作を解析するために最適となる動作解析システムを開発し、四足歩行動物の運動機能メカニズムについてバイオメカニズムの観点から検証することである。また同時に、動物科学分野における運動力学について学生へ教授する方法についても検討する。

3. 研究の計画・方法

本研究の活動内容は大きく 3 つの段階に分けられる。まず第 1 段階では犬を対象とした動作解析を行う。犬は訓練により人間の指示に従って基本的な動作を行うことが可能なためである。このように、犬の基本的な動作(歩行、走行、階段昇降、ジャンプ等)を解析し、各肢の各関節に一連の動作中にどのような角度の変化や関節モーメント(駆動力)の変化が認められるかについて調査する。第 2 段階では得られた運動特性のデータから要素を抽出し、脚運動モデルのシミュレーションを行う。このようなシミュレーションにより、骨格形態の異なる犬種のどのような解剖学的特徴が身体能力の差に影響するのかについて検証を行う。第 3 段階では犬以外の動物に対して動作解析を行い、関節や骨格の形状の差がどのような身体能力の差として表現されるのかを測定する。また、野生動物など直接触れることができない動物に対する動作解析法の開発についても検証する。

2018 年度は第一段階の研究を行い、犬の基本的な歩行動作、起立動作、ジャンプ動作に関する測定を行った。

4. 研究の特色

動作解析は、動作中に関節に発生している力の大きさと向きを測定できる検査方法である。これにより、自分でも気づいていない動作のメカニズムについて客観的に検証することが可能となる。このような手法を利用して動物の運動メカニズムを検証することは、骨格の解剖学的特徴がどのような運動特性として表現されるのかを考察する糸口となる。このような研究の積み重ねによって、恐竜の化石からその運動特性を推察することができるようになるかもしれない。馬の動作解析に関する報告は国内でも散見されるが、犬の動作解析に関する施設を構築しているのは我々のグループのみである。このような犬の動作解析を可能とする施設を整備したことも特色である。

5. 研究の成果

2018 年度は、「健常ビーグル犬の立ち上がり動作における 3D 運動解析」について獣医学科 6 年生の宇都宮彩菜さんが卒業研究として担当し、股関節、膝関節、足根関節を

連動させている二関節筋が姿勢調節機能として機能していることと、さらなる検証には重心位置の特定が必要であることを考察した。このことから、動作解析機の機能拡張を行い、重心位置がソフトウェア上で表現されるようにアップデートを行った。

また、獣医学科6年生の押久保秋太郎君が卒業研究として担当した「フォースプレートを用いたビーグル犬のジャンプ動作解析」では、犬がジャンプする際に、股関節と足根関節が連動して関節を伸展させるパワーを発揮しているのに対して、膝関節はそれらとは連動していないことが認められた。このことから、犬がジャンプする際には主に臀筋と腓腹筋を利用し、四頭筋は脚の角度や姿勢を調整するために利用している可能性が示された。

また、大学院2年生の村上佐和子さんは「Gait Analysis of the Dog with a Stifle Orthosis. (Arthrodesis Model)」という演題名での学会発表をアジア獣医外科学会(台中、台湾)で行った。膝の関節固定を模倣した装具を着用させた犬の歩行動作と、正常歩行動作を比較する実験を行った結果、膝の可動域を制限することによって床反力が上昇することを示した。

22. 日本国内の犬における呼吸器疾患の疫学調査および呼吸器疾患の病態解明への応用

1. 研究者の所属・氏名等

獣医学科 獣医放射線学研究室
講師 藤原亜紀

2. 研究の目的

日本国内における犬・猫の呼吸器疾患有病率の疫学調査および品種との関連

3. 研究の計画・方法

2000年から2017年の期間に日本獣医生命科学大学付属動物医療センター呼吸器科を受診した犬および猫を調査対象とした。調査項目は、品種、初診日年齢、性別、最終診断名とし、診断名に基づき8部位(鼻腔、咽頭、喉頭、気管・気管支、肺、縦隔、その他胸腔、原因不明)に分類した。品種と疾患発生における関連性を調査するために、同期間に本学付属動物医療センターに来院した品種内訳をもとにオッズ比(OR)を算出した。一部多く認められる疾患についてはさらにカルテデータの精査を行った。

4. 研究の特色

国内において呼吸器科を専門に設けている動物診療施設は限られ、大学付属病院に限定すると2大学のみである。そのうち本学は東京に位置することもあり、国内でも有数の呼吸器症例数を誇る。よって本学において申請者が本研究を行うことは非常に独自性が高く、世界唯一と考える。また本研究課題は実際に申請者が症例の診察を行い、診断・治療に苦慮した背景から研究題目に至っているため、独創的であり臨床現場に即した課題といえる。今回の成果は日本独自であり、さらに詳細な探求が可能となったことは特

徴的である。

5. 研究の成果

①犬

対象となった犬は671頭であり、品種としては全62種、ミニチュア・ダックスフンドが最も多く140頭、次いでゴールデン・レトリバーが44頭であった。また、症例全体における初診時の年齢は中央値9歳、性別は雄が377頭、雌が294頭であった。疾患部位としては鼻腔が338頭、気管・気管支が162頭、肺が67頭の順であった。鼻腔疾患では鼻腔腫瘍、鼻炎の順に認められた。鼻腔腫瘍では中長頭種が全体の約8割を占め、シェットランド・シープドック(OR=4.2)が好発品種であった。鼻炎では最も多いリンパ球性細胞性鼻炎においてミニチュア・ダックスフンド(OR=49.8)が好発となり、アスペルギルス性鼻炎ではゴールデン・レトリバー(OR=19.7)に好発であった。気管・気管支疾患においては気管・気管支虚脱が最も多く、ポメラニアン(OR=7.9)、ヨークシャー・テリア(OR=6.0)が、次いで多く認められた気管支炎ではミニチュア・ダックスフンド(OR=7.0)が好発品種であった。肺疾患で最も多い肺炎のうち、誤嚥性肺炎が最も多くミニチュア・ダックスフンド(OR=4.5)に好発であった。咽頭疾患では短頭種気道閉塞症候群が最も多く、ブルドッグ、パグ、フレンチ・ブルドッグ、ポメラニアン(OR=32.9, 13.7, 12.5, 7.5)において好発であり、発症年齢の中央値は4.3歳と他の疾患に比べ若齢での発症が多かった。喉頭疾患では喉頭麻痺が最も多く、ラブラドル・レトリバー(OR=21.9)が好発品種であり、発症年齢は中央値11.3歳と比較的高齢であった。

さまざまな呼吸器疾患における好発品種として得られた結果の多くは、国内での人気品種との関連が強く、海外における報告とは異なっていた。特に、ミニチュア・ダックスフンドにおいては多くの呼吸器疾患の好発品種であることが明らかとなった。本研究は二次診療施設に来院した症例を対象としたため、疾患に偏りがあった可能性が考えられる。本研究で得られた結果は、日本国内の犬に発生する呼吸器疾患の診断、予防、治療、および病態解明の一助となると考えられる。今後、国内において発生が多く認められる各疾患の詳細な情報を解析していく予定である。

②猫

研究の対象となった猫は全部で379頭であり、品種としては雑種が267頭と多くを占め、次いでアメリカン・ショートヘアが43頭、ロシアンブルーが15頭、チンチラおよびスコティッシュ・フォールドがそれぞれ13頭、その他16品種28頭が認められた。来院時の年齢の中央値は10歳(範囲0~21歳)、性別は雄が178頭、雌が201頭であった。疾患部位では鼻腔が57%と最も多く、次いで肺、気管・気管支、咽頭、喉頭、縦隔の順に認められた。診断名全体では、鼻腔内腫瘍、鼻炎、猫喘息、気管支肺炎および肺腫瘍の順に認められた。品種と疾患の関連は、鼻腔内腫瘍はチンチラ(OR=2.4)において、猫喘息

は RB (OR = 5.6) において、気管支肺炎はロシアンブルー (OR = 7.6) およびアメリカン・ショートヘア (OR = 7.1) において、肺腫瘍はアメリカン・ショートヘア (OR = 8.4) において好発することが明らかとなった。上位の疾患における詳細な調査では、鼻腔内腫瘍において鼻汁、鼻出血、くしゃみ、鼻炎では鼻汁およびくしゃみ、猫喘息および気管支肺炎では咳および呼吸促進が主な臨床徴候であった。鼻腔内腫瘍の病理組織型はリンパ腫、腺癌、扁平上皮癌の順に多く、病理組織診断が確定していない症例も認められた。

国内では雑種の飼育頭数が一番多いものの、特定の品種に関連している呼吸器疾患が複数認められた。ロシアンブルーにおいて猫喘息および気管支肺炎は好発であり、猫喘息の進行により気管支肺炎が生じている可能性が考えられた。アメリカン・ショートヘアやロシアンブルーは国内特有の人気品種であるため、本研究結果は海外の猫における呼吸器疾患の発生状況とは一致していない。現在、猫の飼育頭数は増加しており、それに伴い国内特有の新たな品種特異的呼吸器疾患が発生する可能性がある。今後、各疾患におけるより詳細な研究および、さらなる症例数の蓄積が必要である。

これら研究の成果は第 15 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (2019 年 2 月 16 日) にて報告した。

- ・呼吸器徴候を主訴に来院した犬 671 頭の回顧的研究 (2000 年～2017 年)
中澤優太、藤原亜紀、河島杏、湯祥彦、浅田李佳子、長谷川大輔、藤田道郎
- ・呼吸器徴候を主訴に来院した猫 379 頭の回顧的研究 (2000 年～2017 年)
小島龍成、藤原亜紀、浅井佑季子、湯祥彦、浅田李佳子、長谷川大輔、藤田道郎

23 肥満細胞腫におけるチロシンキナーゼ阻害剤耐性化の多様性解析とそれに基づく個別化治療の基盤構築

1. 研究者の所属・氏名等

獣医学科 獣医臨床病理学研究室
教授 盆子原 誠

2. 研究の目的

これまでの犬および猫の肥満細胞腫を用いた研究から、肥満細胞腫のチロシンキナーゼ (TK) 阻害剤耐性化は、単一の分子機構ではなく、様々な分子機構が複雑に組み合わさって生じる可能性が示唆された。本研究では肥満細胞腫における TK 阻害剤トセラニブ耐性化機構を検討するため、KIT に機能獲得性変異を有する犬の肥満細胞腫細胞株からトセラニブ耐性細胞を作出した。この細胞株を用いて、トセラニブ耐性獲得過程における KIT 遺伝子の変化を解析した。

3. 研究の計画・方法

KIT exon 9 に変異を持つ犬肥満細胞腫細胞株 VI-MC をクローン化し (cVI-MC)、トセラニブに暴露することでトセラニブ耐性株 (rVI-MC) を作出した。rVI-MC の KIT ゲノム DNA 塩基配列を次世代シーケンサーで解析した。また、KIT cDNA をクローニングし、その塩基配列についても解析した。さらに、同定した変異 KIT を 293 細胞に発現させ、変異 KIT のリン酸化状態とトセラニブ感受性を解析した。

4. 研究の特色

少子高齢化が進む中、犬猫を中心とする伴侶動物は、人の暮らしを豊かにする上で重要な役割を果たしている。また、高齢者や障害者に寄り添い、生活を支える上でも欠かせない存在となりつつある。一方、飼育環境の向上による長寿化に伴い、がん罹患する動物は増加の一途を辿っている。とくに肥満細胞腫は犬の皮膚腫瘍では最も発生頻度が高く、猫の皮膚腫瘍では 2 番目に多いことから、小動物臨床においてきわめて重要な悪性腫瘍である。このため、肥満細胞腫の克服は人と動物が安心できる豊かな暮らしに大きく寄与するものである。このように、動物の健康から人の豊かな生活へ貢献しようとする研究スタイルは本研究助成の趣旨に合致していると信じる。

5. 研究の成果

KIT ゲノム DNA の解析から、cVI-MC において KIT exon 9 の変異 (頻度 約 80%) と exon 8 の変異 (約 30%) が同定された。rVI-MC では、これらに加え exon 14 (約 30%) と exon 17 (2 種類 いずれも約 30%) に変異が検出された。rVI-MC の KIT cDNA 40 クローン解析したところ、全ての KIT cDNA で exon 9 に変異が認められた。また、exon 9 の変異と同時に exon 8、exon 14 あるいは exon 17 の変異が単独または複合して存在するクローンも同定された。さらに、exon 9 以外に変異を持たないクローンも存在した。293 細胞を用いた KIT の発現解析では、exon 9 の変異に exon 14 あるいは exon 17 の変異が加わると、KIT のリン酸化はトセラニブで抑制されなかった。

cVI-MC では培養過程でクローン進化が生じ、KIT exon 8 に変異を持つサブクローンが形成されていた。さらに、トセラニブを暴露することでクローン進化が加速し、KIT にトセラニブ抵抗性の変異 (exon 14/exon 17) が生じたと考えられた。一方、rVI-MC にはトセラニブ抵抗性の変異を持たない集団が存在することも明らかとなった。MCT のトセラニブ耐性化には KIT 遺伝子の変化が重要な役割を果たしていることが示されたが、それとは異なる分子機構が存在する可能性も示唆された。

24 高齢者の咀嚼力維持用の機能性食肉製品作出のための基盤研究

1. 研究者の所属・氏名等

食品科学科 食品化学教室

教授 松石昌典

2. 研究の目的

我が国では社会の高齢化が急速に進展しており、如何にして健康寿命を延ばし、介護費と医療費の増大を防ぐかが大きな問題となっている。ヒトは加齢が進むに従って徐々に心身の機能が低下し、日常生活活動や自立度の低下を経て、要介護の状態に陥っていく。この心身機能の顕著な低下を虚弱（frailty、フレイル）と一般的に呼んでおり、要介護への最たる要因である。高齢者の健康な生活を維持するには、フレイルを防止することが重要な一つの目標となっている（「より早期からの包括的フレイル予防」飯島勝矢（東京大学高齢社会総合研究機構教授）、<https://www.tyojyu.or.jp/net/topics/tokushu/chokoureishakai/chokoureishakai-frailtyyobou.html>）。それを実現するための一つの方策としては、口腔の咀嚼機能を維持し、良質なタンパク質を摂取し、全身の筋力と生きる意欲を維持することが挙げられる。

食肉は動物の筋肉であり、もともと良質なタンパク質を含む栄養源として優れており、フレイル予防に適した食品の条件の1つを備えている。他方、高度に分化した筋肉構造の丈夫さのために幅広い噛み応えを持っており、筋肉の部位によっては、結合組織およびアクトミオシンの構造体により噛み切れないほどの硬さを持ち、食品として難点を有する。一方、別の部位では、それらの構造体が適度な丈夫さを持ち、適度な噛み応えを持つ優れた食品となっている。後者は、ヒト全般の嗜好性に適合するばかりでなく、高齢者の咀嚼力維持に貢献する可能性がある。

動物の品種改良や飼養条件により筋肉の結合組織およびアクトミオシンの構造体の丈夫さそのものをコントロールする方法も考えられるが、と畜後の加工（熟成を含む）により構造体を自由に改変することができれば、様々な咀嚼能力を持つ人に対応した咀嚼力維持のための新たな機能性食品を作出することができる。また、こうした食品は、現在咀嚼力維持に用いられているガムやスルメよりも栄養価と嗜好性が高く、優れた副食としての利用が考えられる。

本研究では、以上のことの基盤となる知見を得るために、ネック肉、モモ肉、タン、砂肝など（これらの材料は、ロースやヒレのような部位よりも安価であり、低コストの製品に向いている）特徴的歯ごたえをもつ食肉および副生物の結合組織およびアクトミオシンの構造および性質を精査し、改変の可能性を追求する。

3. 研究の計画・方法

- (1) 豚のモモ肉、ネック肉、タンおよび鶏の砂肝を Nishimura ら（Meat Science, **39**, 127-133 (1995)）の方法によりアルカリ処理して可溶性タンパク質を溶解・除去し、結合組織のみの標本作製する。これを走査型電子顕微鏡で観察して、結合組織の構造を明らかにし、1) で示した硬さの方向性との関係を明らかにする。
- (2) 各肉より調製した筋原線維に種々の濃度のピロリン

酸塩あるいはイノシン酸塩を作用させて、ミオシン・アクチンの遊離の程度を調べ、アクチン・ミオシンの結合力およびアクトミオシンを筋原線維内に拘束している力の程度推定する。

4. 研究の特色

食肉は動物の筋肉であり、もともと良質なタンパク質を含む栄養源として優れており、フレイル予防に適した食品の条件の1つを備えている。他方、高度に分化した筋肉構造の丈夫さのために幅広い噛み応えを持っており、筋肉の部位によっては、結合組織およびアクトミオシンの構造体により噛み切れないほどの硬さを持ち、食品として難点を有する。一方、別の部位では、それらの構造体が適度な丈夫さを持ち、適度な噛み応えを持つ優れた食品となっている。後者は、ヒト全般の嗜好性に適合するばかりでなく、高齢者の咀嚼力維持に貢献する可能性がある。

これらの硬さを制御する技術として、と畜後の加工（熟成を含む）により構造体を自由に改変することができれば、様々な咀嚼能力を持つ人に対応した咀嚼力維持のための新たな機能性食品を作出することができる。また、こうした食品は、現在咀嚼力維持に用いられているガムやスルメよりも栄養価と嗜好性が高く、優れた副食としての利用が考えられる。

このように、本研究は咀嚼力維持のための適した硬さを有する食品を作り出す技術の基盤となる知見を得るという特色を有している。

5. 研究の成果

(1) 各種肉の結合組織観察

豚のモモ肉、ネック肉、タンおよび鶏の砂肝の結合組織の観察を行った。その結果、図 1A に示したように、モモ肉では観察した断面に対して垂直な穴とそれを取り囲む膜状の構造が観察され、これは筋束を包んでいる筋周膜であると考えられた。他方、図 1B, 1C に示したように、ネック肉とタンでは、観察した断面に対して垂直な穴ばかりではなく、平行な方向に走る膜様構造（矢印で示した部分）が見られた。これは、観察した断面に対して平行な方向に走る筋束を包んでいる筋周膜が見られているものと考えられた。これらのことから、ネック肉とタンでは筋束（つまりは筋線維）が垂直に交わる少なくとも2つの方向（図 2）に走っていることが考えられる。こうした構造がモモ肉にくらべて大きな硬さと独特の噛み応えをネック肉とタンに与えていると推定される。さらに、砂肝については、これらとは全く異なり、矢印で示したように結合組織の束が密集した分厚い壁のようなものが観察された（図 1D、矢印）。この壁が、砂肝独特の弾力性と噛み切りにくさを有する食感に関与しているであろう。

(2) イノシン酸塩（IMP）およびピロリン酸塩（PYP）による静置体積の変化

静置体積（settled volume）を測定するという方法は、筋原線維懸濁液を一定時間静置して、沈殿した筋原線維の体積を測定するものである。もともと食肉熟成中の筋原線

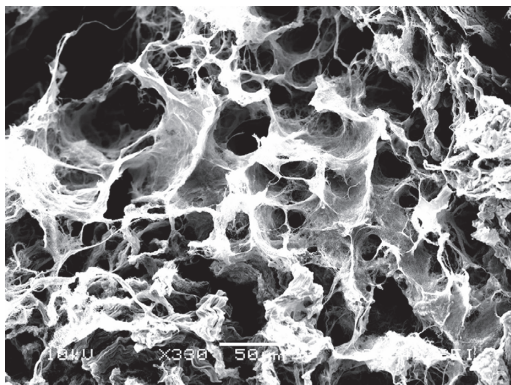


図 1A. モモ肉, 330 倍 (図中の横棒 50 μm)

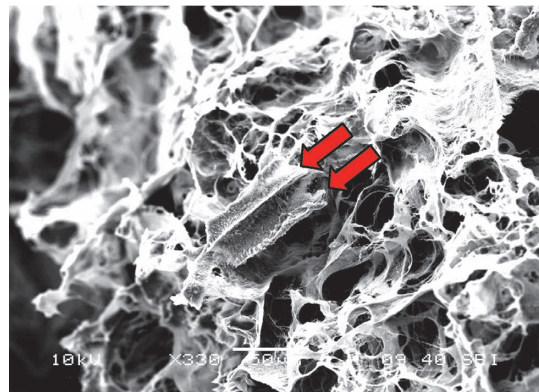


図 1B. ネック肉, 330 倍 (図中の横棒 50 μm)

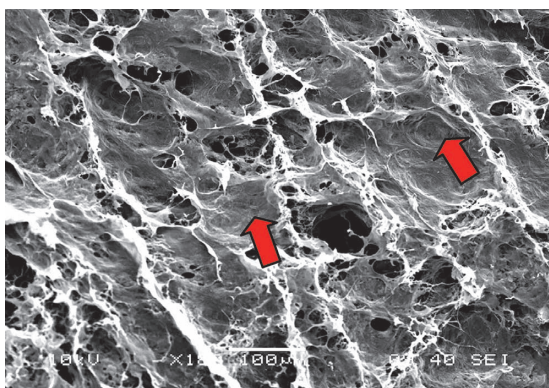


図 1C. タン, 150 倍 (図中の横棒 100 μm)

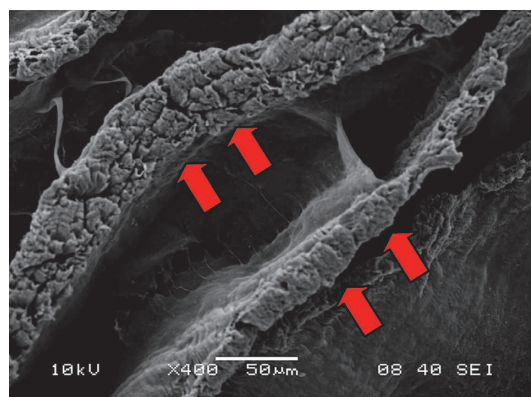


図 1D. 砂肝, 400 倍 (図中の横棒 100 μm)

維の断片化の程度をマクロに観察する方法として考案されたものである。つまり、筋原線維が小断片化することにより、長い断片より全体として大きな体積を占めるようになることを利用している。今回、IMP あるいは PYP の作用で筋原線維中のアクチンがアクチンとミオシンに解離することにより、筋節の幅および太さが増大して、全体として静置体積が大きな値を取るのかどうかを調べた。

筋原線維は鶏ムネ肉より調製した。8 mg/mL 筋原線維を 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) / 0.2 M KCl / 8 mM IMP or PYP or none 中で 27 時間静置した。その結果、静置体積は、無添加で 23 mL, IMP 添加で 27.0 mL となった。他方、PYP 添加では筋原線維が全体に溶解して白色の液体となり、静置体積は測定できなかった。無添加と IMP 添加の静置体積の差は再現性が見られた。したがって、IMP によるアクチンミオシンのアクチンとミオシンへの解離を静置体積の測定により示せることが明らかとなった。このことは、ネック肉やタンなどの独特の噛み応えがある筋肉についても静置体積によりアクチンミオシンの解離程度を示せること、また、それらの硬さだけではなく保水性の程度を示せることを意味している。今後、ネック肉やタンにこの方法を適用した実験を行っていく必要がある。

(3) 今後の予定および展望

今回得られた結合組織の構造と食感（硬さ、弾力性、噛

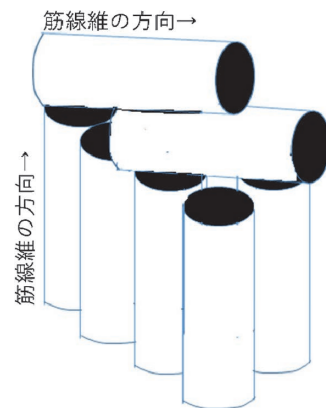


図 2. 直交する筋束（筋線維）

み応え等）との関係を明らかにするために、いろいろ方向を変えて各肉試料の物性測定を行う。また、IMP によるアクチンミオシンの解離程度を IMP の濃度を変えながら測定する。これらにより得られた、各肉の食感をもたらし構造や力、加熱処理、打撃処理、引っ張り処理によってどのように変化するかを調べ、各肉の食感の改変方法の開発を目指す。

25 難治性癌の癌幹細胞標的治療薬の探索

1. 研究者の所属・氏名等

獣医学科 獣医病理学研究室
准教授 道下正貴

2. 研究の目的

近年、癌の根源となる癌幹細胞の存在が明らかとなり、癌治療の標的は癌細胞に加え、癌幹細胞を標的とした新たな治療戦略の開発に向けて国際的に取り組まれている。癌幹細胞は、自己複製、多分化能、高い腫瘍形成能、さらに化学療法や放射線治療に抵抗性を示す細胞集団であり、癌発症だけでなく、再発や転移にも重要な役割を果たしている。犬および猫の固形癌における癌幹細胞は、自己複製能を有する細胞を効率よく濃縮できる sphere assay、癌幹細胞マーカー（CD44、CD24、CD133）解析、アルデヒド脱水素酵素活性を用いた aldehyde assay により同定でき、特性解析が行われている。

今日まで悪性腫瘍における薬剤の薬効評価には、2次元細胞培養による感受性試験や株化癌細胞を免疫不全マウスへ皮下移植した動物モデルが用いられ、癌細胞の増殖抑制効果を容易に評価できる。しかし、これらの評価法は、癌の多様性や複雑性を反映していない点から、分子標的薬の研究開発および治療予測の点で疑問視されている。それゆえ、新規癌治療法の開発や前臨床試験には、腫瘍の増殖や転移性進行を忠実に再現する *in vitro* および *in vivo* モデルが必要不可欠である。

近年、生体の癌組織を模倣した3次元培養は注目され、癌の根源である癌幹細胞の増殖体である sphere assay やオルガノイド（臓器様構造体）培養法、さらに腫瘍の多様性や複雑性を反映した患者由来癌組織移植（patient-derived xenograft, PDX）モデルが開発されている。それゆえ、癌幹細胞を標的とする薬剤の探索には生体で生じる癌組織を反映させた実験モデル（*in vitro* および *in vivo*）で治療効果を評価しなければいけない。

本研究の目的は、生体で生じる癌組織を模倣した3次元培養およびPDXモデルを用いて難治性癌に癌幹細胞を標的とした分子標的薬のスクリーニングを行い、癌病態進行の解明および獣医療における新規癌治療戦略の基盤構築を行うことである。

3. 研究の計画・方法

日本獣医生命科学大学付属動物医療センターの難治性癌（乳癌など）の症例を対象に以下の研究を実施し、目標を達成する。

難治性癌の癌幹細胞の同定

切除癌組織に含有する癌幹細胞を sphere assay およびフローサイトメトリー解析を行い、含有率を明らかにする。

3次元培養による薬剤スクリーニングおよび癌幹細胞を標的とする分子標的薬の同定

オルガノイド培養は上皮系腫瘍に極めて有用であり、か

つ癌細胞の特性を失わず、微小環境因子依存性にオルガノイドを形成することができる。形成されたオルガノイドは形態学および免疫組織学的検索、フローサイトメトリー解析による癌幹細胞の含有率を明らかにし、特徴づけを行う。

オルガノイド培養と自己複製能を有する癌幹細胞を効率よく濃縮できる sphere assay を用いて癌幹細胞を標的とする分子標的薬を同定する。本研究者は、これまで分子標的薬のスクリーニングにより癌幹細胞の自己複製能を抑制する多数の候補薬剤を抽出しており、これらを中心に絞り込みを行う。

PDX モデルの樹立および薬効評価

難治性癌のPDXモデルを作出し、マウスで継代し、樹立する。樹立したPDXモデルを用いて上記で抽出された候補薬剤の薬効評価を実施する。移植形成組織は病理組織学的検索、sphere assay による癌幹細胞含有率の評価、主要な癌増殖シグナル経路に関する遺伝子および分子についてリアルタイム RT-PCR やウェスタンブロットによる異常シグナル解析を実施する。また外科切除癌組織との類似性を明らかにし、臨床応用に向けて遺伝子異常検査システムを構築する。

4. 研究の特色

癌組織は自己複製能、多分化能を持つ癌幹細胞を根源とした不均一な細胞集団を形成し、癌幹細胞は癌発症、再発、転移、薬剤抵抗性に重要な役割を果たしている。本研究は、癌多様性を生み出す癌幹細胞を標的とした分子標的治療薬の探索および同定した治療薬の獣医療への応用に向けた基盤構築を目的とする。本研究では、難治性癌（乳癌など）に着目し、外科切除された組織を対象に、生体で生じる癌組織を模倣した器官様構造（オルガノイド）および患者（犬および猫）由来癌組織移植モデルマウスを作出し、これらの特性解析および薬剤スクリーニングを遂行する。

個体間における癌幹細胞および癌細胞の特性および薬剤感受性を見出すことができる点で特色があり、さらに癌病態機構の解明に加え、獣医医療における癌幹細胞標的治療法および個別化癌治療の基盤が構築され、獣医医療における革新的な治療戦略が展開されることが期待できる。

5. 研究の成果

平成30年度は、外科切除された猫の膵腺癌組織から樹立された株化細胞を用いて3次元培養を実施し、癌幹細胞が濃縮された浮遊細胞塊の形成を確認した。さらにそれらの細胞集団をヌードマウスへの皮下移植により造腫瘍形成能を評価したが、癌細胞の状態が悪く、腫瘍形成は確認できなかった。

さらに当教室で所有しているホルマリン固定パラフィン包埋がん組織（乳腺癌など）を対象に各種がん幹細胞マーカーを用いて免疫組織化学的染色を実施し、がん組織におけるがん幹細胞の局在、マーカー発現と悪性度を評価した。多くのマーカーが乳癌、膵腺癌などのがん組織で発現

していた。単一マーカーにおけるがん幹細胞の局在は明らかにすることができなかったが、マーカー発現のスコアが高いものほど、がんの悪性度と相関することが明らかとなった。本研究成果は、がんの予後予測マーカーに有用となる可能性が示唆された。

本研究に付随して、がんに関する研究成果を学術論文にて発表したの、以下に記載する。

1. Azakami D, Saito A, Ochiai K, Ishiwata T, Takahashi K, Kaji N, Kaji D, Kaji N, Michishita M. Chronic Basophilic Leukaemia in a Dog. *J Comp Pathol*. 2019, 166: 5-8.
2. Yoshimura H, Otsuka A, Michishita M, Yamamoto M, Ashizawa M, Zushi M, Moriya M, Azakami D, Ochiai K, Matsuda Y, Ishiwata T, Kamiya S, Takahashi K. Expression and Roles of S100A4 in Anaplastic Cells of Canine Mammary Carcinomas. *Vet Pathol*. 2019, [Epub ahead of print]
3. Kawata R, Ii T, Hori T, Machida Y, Ochiai K, Azakami D, Ishiwata T, Michishita M. Leydig cell tumor in an Amur tiger (*Panthera tigris altaica*). *J Vet Med Sci*. 2019, 81 (2): 186-189.
4. Sawada H, Mori A, Michishita M, Oda H, Sako T. Long-term management and postmortem examination in a diabetic cat with acromegaly treated with two courses of radiobi therapy. *J Vet Med Sci*. 2019, 81 (1): 71-76.
5. Yoshimura H, Matsuda Y, Yamamoto M, Michishita M, Takahashi K, Sasaki N, Ishikawa N, Aida J, Takubo K, Arai T, Ishiwata T. Reduced expression of the H19 long non-coding RNA inhibits pancreatic cancer metastasis. *Lab Invest*. 2018, 98 (6): 814-824.
6. Sasaki N, Ishiwata T, Hasegawa F, Michishita M, Kawai H, Matsuda Y, Arai T, Ishikawa N, Aida J, Takubo K, Toyoda M. Stemness and anti-cancer drug resistance in ATP-binding cassette subfamily G member 2 highly expressed pancreatic cancer is induced in 3D culture conditions. *Cancer Sci*. 2018, 109 (4): 1135-1146.

26 都市域に生息する野生動物の保護管理方法の確立に向けた研究

1. 研究者の所属・氏名等

獣医保健看護学科 獣医保健看護学応用部門
准教授 山本俊昭

2. 研究の目的

野生動物の保護管理方法を検討していく上で、動物の個体群を維持させつつ、ヒト社会へのリスク排除を考慮することが必要不可欠である。これまで里山などに生息するシカやイノシシなど大型野生動物による農林業被害は深刻化していることから、自治体を中心となって個体数管理および生息地管理が段階的に着手されている。その一方で近年、都市近郊において中型野生動物（ハクビシン・タヌキ・リスなど）が分布域を拡大させており、様々な問題を引き起こしているが、里山の環境とは異なり、多くの人々が生活する空間でもあるため対策は難しく、未だ十分とはいえない。さらには、これら種が人獣共通の病原体を保有しているリスクも考えられ、人口密度が高い都市域では人への感染も懸念される。したがって、都市域に分布している動物を対象とした管理を早急に行うべきであるが、これまで野生動物を対象とした研究の多くは自然豊かな森林において行われてきたため、意外と都市域に生息する野生動物の実態はほとんど把握できていない。

また、都市に生息する野生動物は里山と異なり、騒音や光汚染、人の存在など強いストレスに晒されていることも予想される。生息環境が十分でなく、高いストレスを受け続けた動物は、個体数の減少、さらには個体群の絶滅につながりかねない。したがって、都市に生息する野生動物の対策は、単純な管理一辺倒ではなく、生息場所の連続性、人間からのストレス軽減など保護の視点も含めて対策を検討していく必要がある。そこで本研究では、人口が密集している都市周辺に生息している野生動物を対象とし、個体群構造の解明、野生動物が受けているストレス状況を把握するとともに、野生動物による感染症のリスクを最小化する保護管理方法の確立を目指す。

3. 研究の計画・方法

(調査対象地及び材料)

本研究は、東京都日野市および神奈川県（横浜・横須賀・鎌倉）に生息するタヌキおよびタイワンリスから採材された試料（毛髪、血清、糞等）の解析を中心に行った。調査地では、本研究が始まるにあたり、有害駆除およびロードキル個体を譲り受けるよう今年度から手配し、日野市ではタヌキ7頭、アナグマ2頭、タイワンリス176頭を解剖した。

(方法)

1) 都市域に生息する野生動物のデータベース構築および植生図の作成

採材した野生動物の位置情報、およびそれらの感染の有無の全てをGISによりデータベース化する。動物の生息環境の分布、感染経路を考える上で必要不可欠である野生動物の移動を推定するため、衛星写真（Landsat）により植生図の作成を試みた。

2) 都市域に生息する野生動物の集団遺伝学的解析

サンプリングした試料を用いてDNA抽出を行い、ミトコンドリア解析を行った。これら遺伝的解析を行うことに

より、都市に生息する野生動物の遺伝的多様性、集団構造の特性、さらには集団間の移動についても明らかにすることが可能である。今年度は、解剖したタヌキの肉片をすべて保管し、来年度以降に遺伝子解析をすることとした。一方でタイワンリスでは調査地とした場所の系統を明らかにするため、肝臓から遺伝子抽出を行い、16検体のミトコンドリアの cytB 領域のシーケンス解析を行った。

3) 都市域に生息する野生動物のストレスを把握

一般的に都市はストレスフルな環境だと考えられており、高ストレス状態は繁殖能力や免疫能力の低下を引き起こすため、結果的に適応度を低下させ個体数を減少させる。そのため、都市を低ストレス環境にしていくことが、都市における保護管理上重要なことである。そこで、本調査では実際に都市生物がストレスを受けているのか、どのような都市環境でストレスレベルが高くなることを分析した。生物のストレスレベルを把握するために、近年では糞や体毛を用いたストレスホルモン測定が実施されている。これらの測定方法は、血液を用いた測定方法とは異なり長期間のストレスレベルを定量化できる。そのため、得た試料からホルモン抽出を行い、酵素免疫測定法によりストレスホルモン濃度を測定することで都市域に生息する野生動物のストレスレベルを定量化した。

4. 研究の特色

近年、多くの野生動物は奥山だけでなく、都市部に近い場所にも生息している。都市部や里山の環境は、野生動物にとって容易に餌資源を得ることができる環境である一方、人間の近くに生息することにより高いストレスを受けている環境とも考えられるが、その実情はほとんど明らかになっていない。加えて、都市部の開発には、野生動物に対して配慮した計画を行うことが義務付けられていることから鑑みても、本研究で行っている都市部近郊に生息する野生動物を対象とした動物のストレス評価は保全学的研究にとどまらず、都市開発を進め上にも極めて重要な知見を提供するといえる。

また、野生動物の保護管理方法を検討していく上で、ヒト社会へのリスク排除を考慮することが必要不可欠である。これまで野生動物による農林業への直接的な被害対策は段階的に着手されているが、感染症リスクを含めた野生動物の管理計画を策定することが喫緊の課題である。本研究では、個体数増加および分布が拡大している野生動物に

よる家屋や農業被害と感染症拡大という二つのリスクを最小化する保護管理方法を開発することが本研究の特色である。来年度以降、こちらの課題は展開していく予定である。

5. 研究の成果

①都市域に生息する野生動物の集団遺伝学的解析

今年度の成果は外来種のクリハラリスが分布している横浜市および鎌倉市からサンプルの提供を受けることができ、各個体の血液および筋肉のサンプリングが始まっている。これらサンプルを用いて遺伝子解析を行ったところ、横浜の集団はタイワン由来のタイワンリスとは大きく異なっており、ミトコンドリアのハプロタイプはユーラシア大陸のタイプも含まれていることを示した。これまで日本に生息するタイワンリスの多くは台湾から持ち込まれた集団であると考えられていたが、本研究の結果はユーラシア大陸からも持ち込まれている集団が存在することが示唆された。

②都市域に生息する野生動物のストレスを把握

都市に生息する野生動物を対象にストレスホルモン測定を実施するために、まずは糞を用いた測定系の確立を目指した。一般的に糞からホルモンを抽出する際にはメタノールが用いられるが、実験に用いる濃度については最適なものはよく分かっていないため、100%と80%を用いて相関性を調べた。その結果、濃度が異なるメタノールで抽出しても、濃度は相関することがわかったため、どちらの濃度を用いても適切にホルモンを抽出することができた。しかし、濃度は80%のほうが高かったため、実験では80%メタノールを用いることにした。

次いで、横浜市内で捕獲されたタイワンリスを対象にホルモン測定を実施した。ストレスホルモン濃度とボディコンディションスコアの間には負の関係が見られ(図1)、低いボディコンディションスコアを持つ個体は高いストレスに曝されていた。雌雄での差については、今回の実験では見られなかった。本研究において、糞中ストレスホルモン濃度を測定することによってボディコンディションを反映する可能性を示すことができたが、実験にも用いたサンプル数はまだ少なく、調査地点も横浜だけである。そのため、サンプル数を増やすと同時に調査地点も増やし、ストレスホルモン濃度やボディコンディションがどのような要因に影響を受けているのかを今後は検討していく。

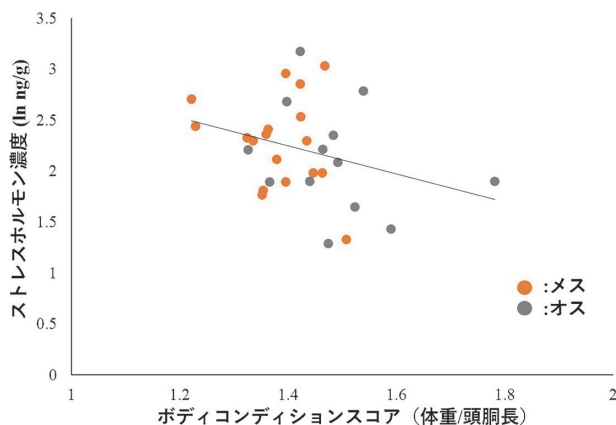


図 1. 糞中ストレスホルモン濃度とボディコンディションの関係

27 イヌのがんの長鎖ノンコーディング RNA 標的治療法開発に向けた基盤研究

1. 研究者の所属・氏名等

獣医保健看護学科 獣医保健看護学応用部門
講師 吉村久志

2. 研究の目的

DNA から mRNA が転写され、その mRNA から翻訳されたタンパク質が生命を形作るというセントラルドグマの概念が、過去 50 年に渡り生物学の中心原理として信じられてきた。そのためタンパク質をコードしていない RNA (ノンコーディング RNA) は、生物学的な役割を持たないものとみなされ、詳しく研究されてこなかった。しかし、近年のゲノム解析の進展により、タンパク質をコードする遺伝子の数は下等生物とヒトなどの高等生物の間でそれほど違いがないが、一方で高等生物にはかなり多くの種類と量のノンコーディング RNA が存在していることが明らかにされ、ノンコーディング RNA が生命現象の違いを生み出す鍵なのではないかと考えられるようになった。ノンコーディング RNA の中でも、microRNA (miRNA) と呼ばれる 20 塩基長程度の短いノンコーディング RNA の研究が先行し画期的な発見が相次ぐ一方で、200 塩基長以上の比較的長い長鎖ノンコーディング RNA、long non-coding RNAs (lncRNA) についての解析は極めて遅れていた。しかし近年、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関わる様々な種類の lncRNA が同定され、これらが胎児の発生段階や、がんをはじめとする様々な疾患の発生と進展に関与することが報告されるようになってきている。このように、これまでジャンクな RNA とされるか、あるいは

その存在も知られていなかった lncRNA が、一躍生命現象をコントロールする主役級の要素であるとみなされるようになった。

イヌにも現時点で 8,124 種の lncRNA が存在することがわかっており、ヒトのがんと同様にイヌのがんの形成・進展にも様々な lncRNA が関与していることが予想され、その解明により新たな分子標的治療のターゲットが見つかる可能性がある。しかし申請者の知る限り、イヌのがんにおける lncRNA の発現や機能はまったく研究されていない。

3. 研究の計画・方法

本研究では東京大学獣医外科学研究室から譲渡された 4 種類 (CIPp, CTBp, CNMp, CHMp) と当研究室で樹立された 2 種類 (CML, 17-442) のイヌ乳腺癌細胞株における lncRNA の発現レベルを、リアルタイム PCR により調べる。また癌に関連する一般的な各種遺伝子の発現レベルと比較する。調べる遺伝子は、lncRNA の H19、HOTAIR、上皮系マーカーの E-cadherin、間葉系マーカーの N-cadherin、Vimentin、S100A4、E-cadherin を直接抑制する Snail、Slug、E-cadherin を間接的に抑制する TWIST2、幹細胞マーカーの Nestin、Oct4 とした。

4. 研究の特色

本課題はイヌの癌においてこれまで研究されてこなかった lncRNA に注目したものであり、得られる成果はすべて新規の知見となる。ヒトの癌においても lncRNA の研究は緒に就いたばかりであり、癌における作用や治療標的としての有用性についてまだまだ未解明な点が存在する。今回のイヌの癌における研究でこれまで注目されていなかった新たな lncRNA が浮上し、将来ヒトの癌の治療標的にも応用できる可能性がある。

5. 研究の成果

ヒトにおいて胎生期や様々な癌で発現することの知られた lncRNA である H19 が、6 種類のイヌ乳腺癌細胞株のうちの CIPp で高発現していた。CIPp は上皮系マーカー E-cadherin の発現が非常にダウンレギュレートしており、代わりに間葉系マーカーの N-cadherin、Vimentin、S100A4、Snail、TWIST2、幹細胞マーカー Nestin がアップレギュレートしている細胞株である。また癌の進展に関わる代表的な lncRNA の 1 つである HOTAIR は、CML で高発現していた。CML も E-cadherin の発現がダウンレギュレートしており、N-cadherin、Vimentin、Nestin が比較的高い発現を示した。このようにイヌの乳腺腫瘍で初めて lncRNA の発現が確認された。特に H19 は癌の悪性度に関わる遺伝子群の発現と相関しており、癌の進展に重要な役割を果たしている可能性がある。

