

2019年度日本獣医生命科学大学 特色ある研究プロジェクトに係る実績報告書

1 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

ヒスタミンは、非常に古くから研究が進められてきた生理活性アミンの1つであり、アレルギー反応や炎症の初期症状における主たる原因物質である。また近年では、癌に対するT細胞の細胞傷害活性抑制やリウマチにおける破骨細胞の活性化、造血幹細胞の分化と制御などにおける機能について解明されてきた。しかしながら、造血・リンパ系におけるヒスタミンの機能は完全には解明されておらず、疾患や癌などにおける造血・免疫細胞との関連性も不明な点が多い。

本研究においては、ヒスタミン合成酵素である Histidine decarboxylase (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。

3. 研究の計画・方法

申請者は、2018年度に本プロジェクトに採択されたことにより、ヒスタミン合成酵素 Histidine decarboxylase 欠損 (HDC-ko) マウスを導入・繁殖することに成功し、このノックアウトマウスの成体における表現型、特に造血系及びリンパ系におけるポピュレーションについての解析を進めることができた。

本年度は、出生後の野生型及び HDC-KO マウスについて、週齢ごとに造血・リンパ組織を採取し、形態学的解析を進めるとともに、形態で変化の観察された組織について、サイトカイン類の発現をリアルタイム PCR によって定量的に解析を進めることとした。

1, 2, 3, 6 週齢のマウスについて、骨髓、脾臓及び肝臓を採取し、定法に従って組織標本を作成、HE 染色及び免疫組織化学 (TER119: 赤芽球, Gr1: 顆粒球, F4/80: マクロファージ) を実施した。また同時期の RNA を採取し、リアルタイム RT-PCR により、造血に関するサイトカイン (SCF, IL3, IL7, EPO, GCSF, CXCL12) の発現を解析した。

4. 研究の特色

本研究の成果は、これまで知られてこなかったヒスタミンの新たな機能を解明するとともに、本学や医学領域にお

けるアレルギー等関連分野の研究者にも有用なデータを提供。また、ヒスタミンをターゲットとした新たな治療分野開拓にもつながる可能性を有しており、健康維持や基礎医学の観点から、社会への貢献を目指すものである。

5. 研究の成果

マウスにおいては、出生後、骨髓及び脾臓で恒常的に造血が行われる。しかしながら、出生後わずかな期間は、肝臓においても造血が行われ、離乳期 (生後3週齢) には完全に消失する。

今回、出生後の1週齢、2週齢、3週齢 (離乳) 及び6週齢 (若成体) マウスについて、造血組織の形態学的解析を進めたところ、骨髓及び脾臓での造血については、野生型と HDC-KO マウスで有意な変化は認められなかった。その一方で、2週齢及び3週齢の HDC-KO マウスでは造血コロニーが多数検出された (図1)。さらに、この時期の肝臓内での造血サイトカインは、野生型と比較して有意に増加していた (図2)。このことは、ヒスタミンが出生後の肝臓内造血に必要な造血微小環境の形成に関与している可能性を示唆している。

これらの結果については、専門学術誌 (Anatomical Record) に掲載が決定している。また、第125回日本解剖学会全国学術集会・総会で研究報告を行った。

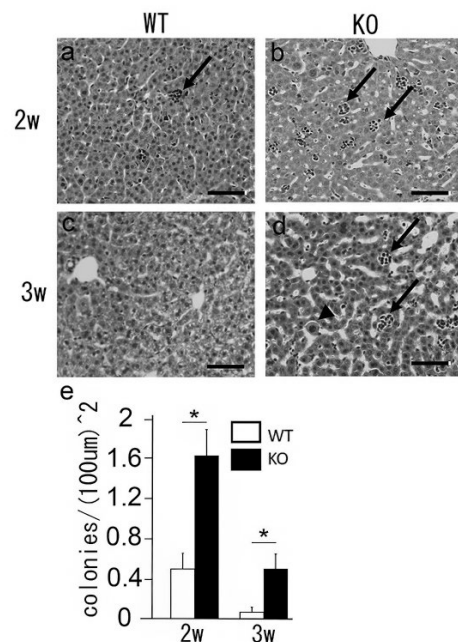


図1 肝臓の HE 染色及び造血コロニー数
WT: 野生型、KO: HDC-KO
2w: 2 週齢、3w: 3 週齢
矢印: 造血コロニー

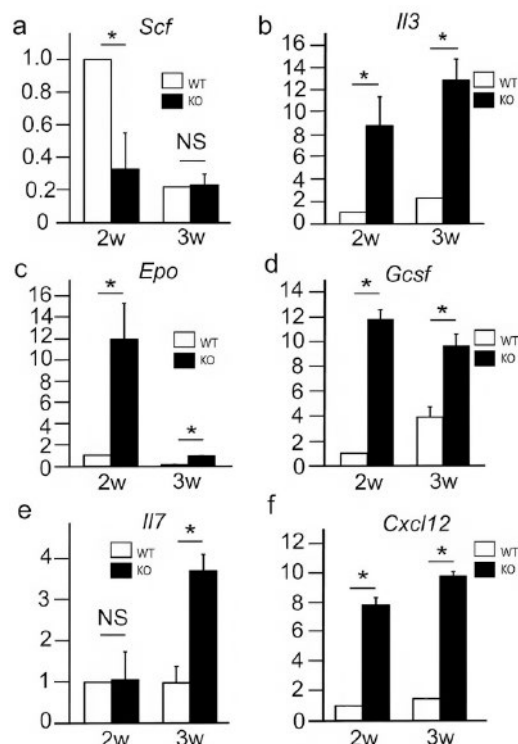


図2 肝臓内におけるサイトカイン発現

2 難治性癌の癌幹細胞標的治療薬の探索

1. 研究の所属・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。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附属動物医療センターの難治性癌（乳癌、メラノーマ、扁平上皮癌、膀胱癌、前立腺癌）の症例および株化がん細胞を対象に以下の研究を実施し、目標を達成する。

a) 難治性癌の癌幹細胞の同定

切除癌組織および株化がん細胞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。

b) 3次元培養（オルガノイド培養、sphere assay）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（例えば、mTOR 阻害剤）、脂肪酸を抽出しており、これらを中心に絞り込みを行う。

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（炎症性乳癌、メラノーマ、扁平上皮癌、膀胱癌、前立腺癌）に着目し、日本獣医生命科学大学附属動物医療センターで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

2019年度は、外科切除された犬の乳腺癌組織を用いて3次元培養を実施し、器官様構造（オルガノイド）および

癌幹細胞が濃縮された浮遊細胞塊の形成を確認した。形成されたオルガノイドを回収し、オルガノイドバンクのため凍結保存、構成細胞を同定するために免疫組織学的染色を実施し、腺上皮様細胞に加え、筋上皮様細胞の存在を明らかにした。

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) Hepatic neuroendocrine carcinoma with metastases to the lymph nodes in a sika deer (*Cervus nippon yakushimae*).
Shibata R, Machida Y, Hatakeyama H, Yoshimura H, Yamamoto M, Ochiai K, Uematsu K, Michishita M.
J Vet Med Sci. 2020 Feb 18;82(2):193-196.
- 2) Ganglioside GM2, highly expressed in the MIA PaCa-2 pancreatic ductal adenocarcinoma cell line, is correlated with growth, invasion, and advanced stage.
Sasaki N, Hirabayashi K, Michishita M, Takahashi K, Hasegawa F, Gomi F, Itakura Y, Nakamura N, Toyoda M, Ishiwata T.
Sci Rep. 2019 Dec 18;9(1):19369.
- 3) Diffuse Pulmonary Meningotheliomatosis with Sarcomatous Transformation in a Shiba Dog.
Michishita M, Fujiwara-Igarashi A, Suzuki S, Hatakeyama H, Machida Y, Yoshimura H, Yamamoto M, Azakami D, Ochiai K, Ishiwata T, Fujita M.
J Comp Pathol. 2019 Aug;171:1-5
- 4) The canine RAD51 mutation leads to the attenuation of interaction with PALB2.
Uemura M, Ochiai K, Morimatsu M, Michishita M, Onozawa E, Azakami D, Uno Y, Yoshikawa Y, Sasaki T, Watanabe M, Omi T.
Vet Comp Oncol. 2019 Sep 13. doi: 10.1111/vco.12542.
- 5) Enhanced morphological and functional differences of pancreatic cancer with epithelial or mesenchymal characteristics in 3D culture.
Shichi Y, Sasaki N, Michishita M, Hasegawa F, Matsuda Y, Arai T, Gomi F, Aida J, Takubo K, Toyoda M, Yoshimura H, Takahashi K, Ishiwata T.
Sci Rep. 2019 Jul 26;9(1):10871.
- 6) Malignant rhabdoid tumor of the musk gland and systemic T-cell lymphoma in a masked palm civet (*Paguma larvata*).
Machida Y, Michishita M, Yoshimura H, Kato T, Hayama SI, Takahashi K.
J Vet Med Sci. 2019 Jul 11;81(7):975-979.
- 7) Expression and Roles of S100A4 in Anaplastic Cells of Canine Mammary Carcinomas.
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.

Vet Pathol. 2019 May;56(3):389-398.

3 ドラッグ・リポジショニングによるコロナウイルス複製工場 DMVs 阻害薬の検索とそのメカニズムの解明

1. 研究の所属・氏名等

獣医学科 獣医感染症学研究室
准教授 氏家 誠

2. 研究の目的

コロナウイルス (CoV) は、監視伝染病である豚伝染性胃腸炎及び伝染性気管支炎ウイルスや、2014 年に国内で大流行した豚流行性下痢ウイルス (PEDV)、実験動物取扱時に問題となるマウス肝炎ウイルス (MHV)、ペットの猫や野生ネコ属に致死的な病態を引き起こす猫伝染性腹膜炎ウイルスを含む。また、ヒトにおいては、2019 年に中国の武漢市で発生し、現在も感染拡大を続ける新型コロナウイルス (COVID-19) や、高い致死率をもつ重症呼吸器症候群 (SARS) や中東呼吸器症候群 (MERS)-CoV を含む。後者の呼吸器ウイルスは全て野生動物からヒトに移ったことが知られており、CoV は動物の衛生、人の公衆衛生に大きな影響を与えている。しかしながら、効果的な抗 CoV 薬は存在せず、幅広い CoV に効果のある抗ウイルス薬の開発が急務となっている。

CoV は、宿主細胞に感染すると、宿主由来の小胞体 (ER) 膜を変化させて、2 層の脂質 2 重膜を特徴とした DMVs (Double Membrane Vesicles) と呼ばれる『CoV 専用の複製工場』を形成する。CoV は DMVs 内でウイルスゲノムを複製、または転写・翻訳する事でウイルス構成成分を濃縮しウイルス粒子形成を容易にする。このため、DMVs は CoV の増殖に必須であり、DMVs 形成を阻害する抗ウイルス薬は、幅広い CoV に強力な効果が期待できる。現在、このような作用機序を持つ化合物は、K22 の 1 種類しか報告されていない。しかしながら、K22 には耐性ウイルスが出現しやすい事も報告されており、また、これらの化合物の臨床応用には治験と言う大きなハードルがある。

ドラッグ・リポジショニング (D.P.) とは、既存の病気に有効な治療薬から、別の病気に有効な薬効を見つけ出すことを言う。D.P. はすでにヒトでの安全性や薬物動態の試験が済んでいるため、いくつかの試験をスキップできるうえ、薬剤の製造方法が確立しており開発期間の短縮・研究開発コストの低減が可能となる。報告者は、D.P. 戦略として、これまでに承認済み医薬品をシーズとした、新規抗 CoV 薬の検索を行い、2 種の承認済み医薬品 (ステロイド誘導体 [SAIDs] 及び小胞体 α グルコシダーゼ阻害薬 [AGI]) に、「CoV の DMVs 形成を阻害」する作用があること、「幅広い CoV (PEDV, MHV, MERS, SARS) に抗ウイルス活性」を示すことを発見した。

本研究では、これら薬剤の 1) DMVs 形成阻害のメカニ

ズムを解明すると共に、2) これら医薬品の CoV 治療薬への応用と、3) これらを基にした新規薬剤の開発を行う。最終的には、幅広い CoV に効果を持つ新規抗 CoV 薬を開発・応用する事で、動物の健康・人の健康への貢献、環境衛生への貢献を目的とする。今年度は、SAIDs に焦点を当て、その抗 CoV メカニズムの解明を行った。

3. 研究の計画・方法

- 1) SAIDs の抗 CoV 活性の評価：新型コロナウイルス (COVID-19) を含む新規 CoV に対する SAIDs の抗 CoV 活性の評価を行った。
- 2) SAIDs 存在下における耐性ウイルス (MERS-CoV) の発生：SAIDs 存在下、MERS-CoV を 10 回以上盲継代し、耐性ウイルスの発生を検討した
- 3) 耐性 MERS-CoV の遺伝子解析・変異部位の同定
- 4) Reverse Genetics 法を用いた組換耐性 MERSMERS-CoV の作製とその確認

4. 研究の特色

- ① 新規性：これら薬剤の「DMVs 形成阻害」は、予想外の作用であるため、他の研究者が類似の研究を行う可能性は極めて低い。このため、この阻害メカニズムを明らかにすることで、SAIDs や AGI は全く新しい抗 CoV 薬として応用が可能となる。
- ② 安全性：承認済み医薬品であるため、安全性が極めて高く CoV 治療薬への適用も容易である。
- ③ 幅広い CoV への適用：SAIDs 及び AGI は既に幅広い CoV に対して抗 CoV 活性を示しており、COVID-19 などの新型 CoV に対しても効果が期待できる。

5. 研究の成果

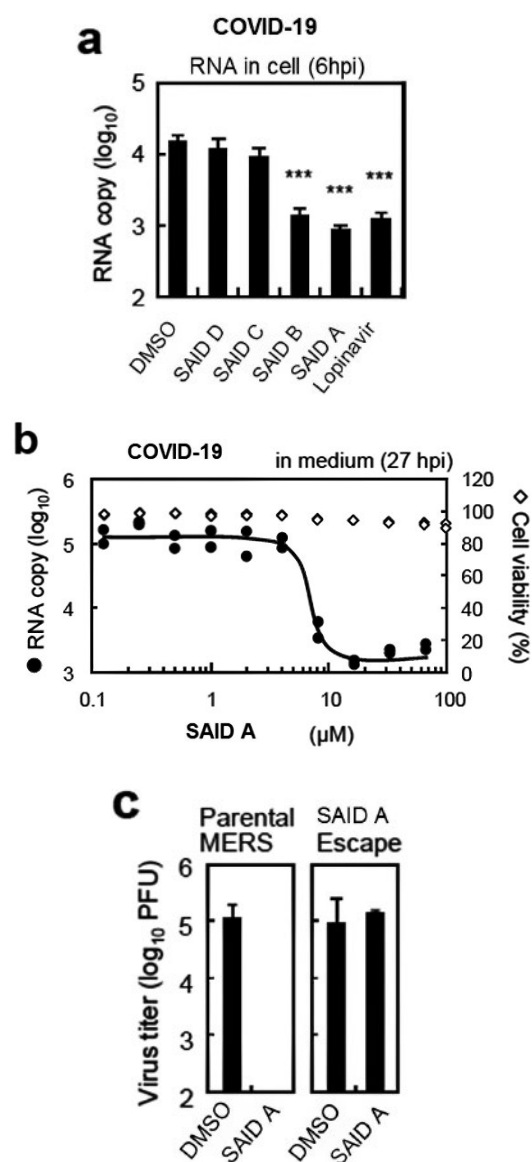
※本研究成果は、「松山州得など、氏家誠(報告者4番目)、SAID A (特定薬剤) blocks coronavirus RNA replication by targeting viral X protein (特定タンパク質)」として論文投稿中であるため、薬剤名及び蛋白質名は、それぞれ A 及び X とした。また、本報告書において研究成果は一部のみ記載した。

報告者らはこれまでに約 100 種の SAIDs の抗 CoV 活性の評価を行ない、SAIDs のうち、ごく一部の SAIDs (SAID-A 及び -B) に強い抗 CoV 活性及び DMVs 形成阻害作用がある事を見出した。本研究では、COVID-19 を含む各種ヒト CoV に対する抗 CoV 活性を評価した。図 a は、COVID-19 の結果であるが、SAID-A 及び -B に強い抗 CoV 活性が見られた。特に、COVID-19 の治療薬として現在治験が行われている抗 HIV 薬 (Lopinavir) と同等の抗 CoV 活性が見られた。SAID-A の抗 CoV 活性は ($EC_{50} = 4.4 \mu M$, $EC_{90} = 6.3 \mu M$, CC_{50} (細胞毒性) $> 100 \mu M$) (図 b) で、副作用の多い抗 HIV 薬 (Lopinavir) に比べ極めて安全性が高い事も分かった。

SAID-A の抗 CoV メカニズムの解明のために、SAID-A 存在下 MERS-CoV を 10 代以上盲継代し、得られた耐性ウイルスの解析を行った (図 c)。耐性ウイルスは、X 蛋白質に変異を持ち、この変異を人工的に導入した組換

MERS-CoV も SAID-A に対して 1,000 倍以上の耐性を示した。このことから、SAID-A は X 蛋白質を標的として抗 CoV 活性を発揮する事が分かった。一方 SAID-A は「CoV の DMVs 形成を阻害」作用を持つが、現時点では X 蛋白質と DMVs 形成との関連が不明であり、さらなる解析が必要である。

報告者らの発見した SAID-A は、副作用が少なく妊婦にも使用できる事が知られている。SAID-A は幅広い CoV に対する治療薬としての応用が期待される。



4 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

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、特に犬の糖尿病はヒトの1型糖尿病と同様にインスリンの永続的な投与が必要になる。インスリン投与に代わる治療法として、インスリン産生分泌細胞である膵島β細胞の移植が研究されているが、臨床応用の実現にはドナーの絶対的な不足や免疫応答などの大きな障壁が立ちだかっている。そこで近年では、これらの課題を回避するための方法として、幹細胞を利用した新たな治療法の確立に期待が寄せられている。

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)から分化誘導したインスリン産生細胞(IPCs)を生体に移植することで、永続的なインスリン投与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犬のAT-MSCsを効率的にIPCsへと分化誘導する方法、②分化誘導したIPCsの機能解析、について検討し、スフェロイド形成を利用した分化誘導に成功した。

本年度(以降)は、これまでの研究成果をさらに*in vivo*へと発展させ、糖尿病モデルマウスに対するIPCs移植の効果と移植に伴う改善点の有無について検討する。

3. 研究の計画・方法

IPCsの作製

昨年度の研究で確立したスフェロイド形成法を用いて、犬AT-MSCsからIPCsを分化誘導する。

糖尿病マウスの作製

生理食塩水に溶解したストレプトゾトシン(STZ) 200mg/kgをマウス腹腔内へ投与することで1型糖尿病を誘発する。本実験では、IPCsが免疫応答を誘導するのかを確認するために、対象動物(マウス)は近交系のC57BL/6Jを用いる。糖尿病が誘発されたことの確認は、STZ投与4日目に6時間の絶食後の血糖値を測定し、350mg/dl以上の個体を1型糖尿病モデルとする。

IPCsの移植

三種混合麻酔(塩酸メドミジン、ミタゾラム、酒石酸ブトルファノール)の腹腔内投与による全身麻酔下で、AT-MSCs(2×10^6 cells)から分化誘導したIPCsをマウス鼠径部に移植する。

IPCs移植後のモニタリング

IPCs移植後は3, 5, 7, 10, 15, 20, 25日目に血糖値を測定し、IPCs移植による効果を評価する。

移植したIPCsの評価

25日間のモニタリング終了後、三種混合麻酔の過麻酔による安楽死を施し、移植したIPCsを採取する。採取したIPCsを病理組織学的に検討することで、免疫応答の反応について確認する。

4. 研究の特色

本研究は犬糖尿病モデルを用いた検討の前段階に位置付けており、これまでの*in vitro*での成果を発展させ、STZ誘発糖尿病マウスを対象に*in vivo*で検討することが目的である。本研究において、①生体へのIPCs移植は免疫応

答を回避し生着できるのか、②IPCs移植後に高血糖は改善するのか、をクリアし改善点を明確にすることで、犬を対象とした研究へのステップアップがより確実なものになると考えている。本研究の最終目標は、犬や猫の糖尿病に対するAT-MSCsを利用した新たな治療法の確立であるが、“糖尿病患者をインスリン注射から解放する”ことを目標とする本研究は、獣医学分野に留まらず人医学へも貢献し得る内容であると思われる。

5. 研究の成果

STZによって誘発した糖尿病マウスへのIPCs移植では高血糖の改善がみられなかった。その原因として、移植後のIPCsを採取し、病理組織学的に評価したところ、免疫応答による反応が顕著に確認された。予備実験として、IPCs培養時の培養上清をマウス腹腔内に投与したところ、高血糖の改善がみられたことから、IPCsから分泌されるインスリンが生体内で機能していることは確認できたため、レシピエントの免疫反応が移植IPCsの生着を阻害したと考えられた。今後は、免疫不全マウスを用いて再度検討する予定である。

5 心疾患の犬および猫を脅かす肺高血圧症の併発に関する臨床的な診断および病態評価方法の確立

1. 研究の所属・氏名等

獣医学科 獣医内科学研究室
助教 鈴木亮平

2. 研究の目的

心疾患の犬および猫において、肺高血圧症の併発は、根底にある心疾患の病態を悪化させるものである。また犬における心疾患の代表例である僧帽弁閉鎖不全症の症例では、肺高血圧症の併発が治療を困難にし、臨床的予後を短縮させることが報告されている。しかしながら、肺高血圧症の診断および病態評価方法は、観血的カテーテル法がゴールドスタンダードであり、犬および猫に対しての実施は臨床的に困難である。

近年、ヒト医学領域を中心に心エコー図検査による非観血的な評価が試みられ、肺高血圧症の診断および病態評価方法としての有用性が報告されている。同様な方法は獣医学領域でも試みられているが、いまだ確立された方法ではない。さらに猫の肺高血圧症に関する報告はごく限られている。

本学は、獣医学領域における高度診療施設である動物医療センターを有し、日本全国から肺高血圧症などの難治性心疾患が集約される二次診療施設である。また申請者の所属する獣医内科学研究室は循環器内科学分野の研究を多数報告してきた実績がある。本研究では、これら臨床および研究分野の特色を活かし、豊富な臨床データおよび詳細な心エコー図検査データを用いて、肺高血圧症の臨床的な診断および病態評価方法を確立したいと考えた。

本研究の目的は、心疾患を有する動物で併発することの

多い肺高血圧症の臨床的な診断および病態評価方法を確立することである。

3. 研究の計画・方法

研究計画は、① 肺高血圧症の病態評価に必要な臨床データおよび有用となる可能性が期待される心エコー図検査データの前向きな収集、② 臨床データおよび心エコー図検査データの解析、③ 得られた解析結果から肺高血圧症の臨床的な診断および病態評価に有用な新規パラメーターを探索する、である。

心エコー図検査データとしては、従来からの指標に加え、肺高血圧症の診断および病態評価方法として有用性が期待されるパラメーターを追加した。具体的には、肺高血圧症の臨床診断として期待される三尖弁逆流速度、肺動脈逆流速度、肺動脈血流加速時間、肺動脈血流加速時間駆出時間比、肺動脈弁輪径、右肺動脈伸展指数、心室中隔扁平化指数を計測した。また、肺動脈血流時間速度積分値、推定肺血管抵抗を算出した。右心拡張の評価として、右室および右房の内腔径と面積、右室肥大の評価として右室壁厚、右室相対的壁厚を計測した。右室収縮機能の評価として、右室面積変化率、三尖弁輪部収縮期移動距離、三尖弁輪部収縮期移動速度を計測した。さらに、右室拡張機能の評価として、三尖弁流入血流、三尖弁輪部拡張期移動速度、心筋機能指標指数を計測した。

また、心エコー図検査による右室心筋運動解析として、収縮機能を反映する収縮期全層ストレイン、収縮期内層ストレイン、収縮期外層ストレイン、収縮期内層/外層ストレイン比、収縮期ストレインレート、拡張機能を反映する拡張早期ストレインレート、拡張後期ストレインレートの最大値を評価した。さらに上記心筋ストレイン指標を右室自由壁のみでの解析、右室自由壁と心室中隔を含めた解析の双方で算出した。

上記の心エコーパラメーターを解析し、肺高血圧症の臨床的な診断および病態評価に有用な新規パラメーターを探索した。これまでの研究結果および本学の実績結果を踏まえ、単一のパラメーターではなく、複数の指標による診断および病態評価が有用である可能性が高いと考えたため、従来の指標や左心系解析で用いていた指標も含めた、包括的な解析を行った。

本研究の構想と展望

本研究 ～肺高血圧症の臨床的な診断および病態評価方法の確立を目指して～

- ① 臨床データおよび心エコー図検査データの前向きな収集
- ② 臨床データおよび心エコー図検査データの解析
- ③ 有用な新規心エコーパラメーターを探索

- ・ 肺高血圧症の非観血的診断法の確立
- ・ 肺高血圧症の詳細な臨床病態の把握



肺高血圧症患者における
臨床的予後の改善

本研究の構想と展望として、上記フローチャートのように考えた。最終的な臨床的予後の改善が得られれば、本研究結果は獣医学のみならず、ヒト医学における肺高血圧症の評価や治療の改善にも大きく寄与することが期待できる。また、本研究の研究結果は、関連学会や学術雑誌にて公表することで、大学のブランディング化、そして生命科学分野に貢献しうる研究拠点としての役割も果たしていきたいと考えている。

4. 研究の特色

本研究では、心疾患を有する動物で併発することの多い肺高血圧症に関する研究を行った。犬の僧帽弁閉鎖不全症では重度な病態にある症例の80 %以上が肺高血圧症を併発していると推定され、その病態評価を研究する意義は非常に大きいと考える。また、肺高血圧症は、獣医学領域のみならず、ヒト医学領域でも認められる疾患であり、本研究はOne Healthの理念に基づき、ヒト医学の発展にも貢献可能な特色ある研究計画であると思われる。さらに、本研究で構想するような肺高血圧症に対する集約的な臨床研究について、日本の獣医療施設からの報告はこれまでに皆無である。したがって、このような集約的研究を行い、学術発信していくことは獣医療における高度診療施設としての役目でもあると考える。

5. 研究の成果

今年度の研究によって、肺高血圧症の病態を評価するための新規パラメーターをいくつか推定することができた。これらの具体的な研究成果としては、以下の学術論文および学会講演、および学会発表を行った。また現在3本の学術論文を投稿予定である。

本研究で明らかとなった肺高血圧症の診断および病態評価方法としての非観血的で臨床的な新規パラメーターは、肺高血圧症の臨床的診断精度を向上させ、詳細な病態把握に貢献することが期待できる。また、最終的には肺高血圧症患者における予後の改善にも貢献しうる可能性がある。今後は、より詳細な病態評価や予後評価への有用性を検討していく予定である。

- 1) Suzuki R, Mochizuki Y, Yuchi Y, Yasumura Y, Saito T, Teshima T, Matsumoto H, Koyama H. Assessment of myocardial function in obstructive hypertrophic cardiomyopathy cats with and without response to medical treatment by carvedilol. BMC Vet Res. 2019 Oct 28;15(1):376.

- 2) Mochizuki Y, Suzuki R, Yasumura Y, Saito T, Teshima T, Matsumoto H, Koyama H. Left ventricular geometric characteristics predict response to carvedilol in cats with asymptomatic hypertrophic obstructive cardiomyopathy caused by systolic anterior motion of the mitral valve. J Vet Med Sci. 2019 May 31;81(5):734-738.
- 3) 鈴木亮平 代表的な心臓病（僧帽弁閉鎖不全症と心筋症）で抑えるべきポイント FASAVA-TOKYO 2019
- 4) 鈴木亮平 各種心疾患の診断に最低でも必要な基本的な断層像の描出法 FASAVA-TOKYO 2019
- 5) 鈴木亮平 心エコーから左房圧を考える 第16回日本獣医内科学アカデミー学術大会
- 6) 鈴木亮平 聴診器のように使う心エコー Point-of-Care 超音波（心臓編）第16回日本獣医内科学アカデミー学術大会
- 7) 鈴木亮平 犬と猫の心エコー検査の“コツ”アップデート～basicから最先端技術の紹介～ 第16回日本獣医内科学アカデミー学術大会
- 8) 鈴木亮平, 湯地勇之輔, 新名彩加, 手嶋隆洋, 松本浩毅, 小山秀一 肺高血圧症を併発した心筋症の猫の3例 第110回日本獣医循環器学会
- 9) 湯地勇之輔, 鈴木亮平, 手嶋隆洋, 松本浩毅, 小山秀一 様々なステージの粘液腫様変性性僧帽弁疾患罹患犬における右心機能の評価 第110回日本獣医循環器学会
- 10) 大杉真由, 鈴木亮平, 湯地勇之輔, 藤原亜紀, 手嶋隆洋, 松本浩毅, 藤田道郎, 小山秀一 様々な程度の呼吸器疾患に続発した肺高血圧症の犬の3例 第110回日本獣医循環器学会
- 11) 鈴木亮平, 湯地勇之輔, 手嶋隆洋, 松本浩毅, 小山秀一 スペックトラッキング法により心筋機能評価を行った拘束型心筋症の猫の3例 第2回ニチジュウシンポジウム
- 12) 湯地勇之輔, 鈴木亮平, 手嶋隆洋, 松本浩毅, 小山秀一 粘液腫様変性性僧帽弁疾患罹患犬における右心機能評価 第2回ニチジュウシンポジウム
- 13) 鈴木亮平 最新の心臓超音波検査：肥大型心筋症の猫に対する心筋運動評価 MP アグロジャーナル (39) 8-11
- 14) 齊藤亮大, 鈴木亮平, 湯地勇之輔, 手嶋隆洋, 松本浩毅, 小山秀一 スペックトラッキング法により心筋機能評価を行った拘束型心筋症の猫の3例 第111回日本獣医循環器学会
- 15) 湯地勇之輔, 鈴木亮平, 新名彩加, 手嶋隆洋, 松本浩毅, 小山秀一 粘液腫様変性性僧帽弁疾患罹患犬における右心系の負荷を考慮した三尖弁輪収縮期移動距離の検討 第111回日本獣医循環器学会
- 16) 湯地勇之輔, 鈴木亮平, 手嶋隆洋, 松本浩毅, 小山秀一 拘束型心筋症罹患猫におけるスペックトラッキング法による右室心筋機能解析 第16回日本獣医内科学アカデミー学術大会

- 17) 前田和宏, 鈴木亮平, 石原玄基, 小山秀一 日本の犬における僧帽弁閉鎖不全症の疫学調査 第16回日本獣医内科学アカデミー学術大会

6 脳研究センター (Brain Research Center) の設立

1. 研究の所属・氏名等

獣医学科 獣医放射線学研究室
教授 長谷川大輔

2. 研究の目的

日本獣医生命科学大学の特色ある研究として採択されている“脳研究センターの設立”の継続研究として、“生命科学総合研究センター・脳研究分野（仮）設立”に向けた足がかり研究を行なう。

目的としては、

- ① 本学が主導して、世界発信していく犬と猫におけるてんかん外科の開発
- ② 海外とのコラボレーションによる犬と猫の希少遺伝性神経疾患の原因遺伝子同定および臨床学的特徴づけ
- ③ 本学付属動物医療センター神経科を受診した症例に関する医療記録や高磁場 MRI データなどを用いた回顧的研究

3. 研究の計画・方法

本プロジェクトの研究計画・方法は

- ① てんかん外科候補症例における、MRI（特殊撮像を含む）解析、脳脊髄液分析および脳波解析、を実施することにより切除すべき部位（てんかん原生領域）を同定する。これらの実施により、より詳細な臨床の評価を行うことができ、適切にてんかん外科の術式選択が可能となり、**良好な手術成績・予後につなげる**。本学においては以下の術式を実施予定である。
 - a. 切除外科：病変切除外科、焦点切除外科など
 - b. 遮断外科：脳梁離断術など
 - c. 電気刺激療法：深部脳刺激療法
- ② 希少遺伝性神経疾患患者において、**全ゲノムシーケンス (WGS) を実施し**、WGS データを他の遺伝性疾患（疑いを含む）の犬あるいは猫の大規模 WGS データバンクと比較し、フィルタリングすることで、**原因遺伝子変異の検出**を行う。
- ③ 本学付属動物医療センター神経科を受診した症例に関する、**医療記録、MRI データ、脳波データなどを用いての多角的な回顧的研究**を行う。

上記の一連の研究から、本学生命科学総合研究センター・脳研究分野（仮）より、てんかん外科という現在の獣医学領域における新規治療概念の確立、犬と猫の希少遺伝性神経疾患の原因遺伝子の同定、および本学神経科ベースでの医療記録や MRI データなどを用いての回顧的研究から臨床神経病学に有用となるような新知見の発見を目指す。

4. 研究の特色

本研究の特色としては、

- ① 本学が主導して、世界発信していく犬と猫におけるてんかん外科の開発を行う。てんかん外科という治療概念は小動物獣医療では未だ確立されていない状況で、**本学はそのイニシアチブをとって本治療法の確立にあたる。**
- ② 海外（主に米国ミズーリ大学）とのコラボレーションによる犬と猫の希少遺伝性神経疾患の原因遺伝子同定を目指した研究を実施する。希少遺伝性神経疾患は、人においても同様の疾患がある場合もしばしばあり、これらの疾患の病態解析を行うことは獣医学において新たな知見をもたらすのみならず、**動物と人との共通して存在する生物学的メカニズムの解明につながる。**
- ③ 本学神経科では、**高磁場 MRI**（3 テスラ；獣医臨床領域で実際に利用可能な磁場強度としては最も解像度が高いとされている）や、**デジタル脳波計**といった**先進医療機器**を有しており、それらにより集積されたデータの解析が可能である。
が挙げられる。

5. 研究の成果

(1) 学術雑誌に発表した論文（査読あり）

- 1) **Hasegawa D**, Ohnishi Y, Koyama E, Matsunaga S, Ohtani S, Nakanishi A, Shiga T, Chambers JK, Uchida K, Yokoi N, Fukata Y, Fukata M. Deleted in colorectal cancer (netrin-1 receptor) antibodies and limbic encephalitis in a cat with hippocampal necrosis. *J Vet Intern Med*. 2019;33(3):1440-1445.
- 2) **Yu Y**, Shumway KL, Matheson JS, Edwards ME, Kline TL, Lyons LA. Kidney and cystic volume imaging for disease presentation and progression in the cat autosomal dominant polycystic kidney disease large animal model. *BMC Nephrol*. 2019;20(1):259.
- 3) **Yu Y**, Grahn RA, Lyons LA. Mocha tyrosinase variant: a new flavour of cat coat coloration. *Anim Genet*. 2019;50(2):182-186.

(2) 国際会議

（口頭発表 査読あり）

- 1) **Yu Y**, Buckley R.M, Creighton E.K, Lyons L.A. A homozygous 7-bp deletion of GDF7 associated with feline forebrain commissural malformation concurrent with ventriculomegaly and interhemispheric cysts. *32nd ECVN/ESVN Annual Symposium*. O3, Wroclaw, Poland. 2019 年 9 月

（ポスター発表 査読あり）

- 1) **Hasegawa D**, Asada R, **Yu Y**, Hamamoto Y, Mizoguchi S, Kuwabara T. Epilepsy surgery – Cortical resection and hippocampectomy in a cat with drug-resistant structural epileptics. *32nd ECVN/ESVN Annual Symposium*. O3, Wroclaw, Poland. 2019 年 9 月
- 2) Asada R, Hamamoto Y, **Yu Y**, **Hasegawa D**. Epilepsy surgery (multiple subpial transection and corpus callosotomy) in a dog with refractory structural

epilepsy. The 2nd Asian Small Animal Specialist Veterinary Congress. Shanghai, China. 2019 年 10 月

- 3) **Yu Y**, Miyamoto T, Yamaki Y, Itamoto K, Yamaguchi T, **Hasegawa D**, Nomura Y, Lyons L.A, Kosho T. Whole genome sequencing in a cat with Ehlers-Danlos syndrome. *Scientific Meeting on the Rarer Types of Ehlers-Danlos Syndromes*. P12. Tokyo, Japan. 2019 年 11 月

(3) 国内学会・シンポジウム

（口頭発表 査読あり）

- 1) **長谷川大輔**. 自然発症性てんかんモデルとしての家族性側頭葉てんかんネコの確立. 第 30 回てんかん治療研究振興財団研究報告会, 研究褒賞受賞記念報告. 大阪, 千里. 2019 年 3 月.
- 2) **長谷川大輔**, 斎藤弥代子, 北川勝人, 内田和幸, 金園晨一, 濱本裕仁, **湯 祥彦**, 浅田李佳子, 平嶋洵也, 伊藤大介, チェンバーズ・ジェームズ. 犬猫の難治性てんかんにおけるてんかん外科. 獣医神経病学会 2019, 特別講演. 東京, 御茶ノ水. 2019 年 6 月.
- 3) 原田倫子, **湯 祥彦**, 浅田李佳子, 濱本裕仁, **長谷川大輔**. フェノバルビタール誘発性血液学異常を呈した滑脳症の犬の 1 例. 獣医神経病学会 2019, 一般演題. 東京, 御茶ノ水. 2019 年 6 月.
- 4) 高市雄太, チェンバーズ・ジェームズ, コク・ムンケオン, 内山博貴, 播谷 亮, **長谷川大輔**, 内田和幸, 諸角元二, 中山裕之. ネコのニーマンピック病の病理学的検索. 獣医神経病学会 2019, 一般演題. 東京, 御茶ノ水. 2019 年 6 月.
- 5) 平嶋洵也, 斎藤弥代子, **長谷川大輔**. 迷走神経刺激装置埋め込み術を行った特発性てんかんの犬の 1 例～刺激調整の実際, 脳波・心拍変動の評価. 獣医神経病学会 2019, 一般演題. 東京, 御茶ノ水. 2019 年 6 月.

（ポスター発表 査読なし）

- 1) **湯 祥彦**, **長谷川大輔**, James K. Chambers, Gary S. Johnson, 内田和幸. 発作を伴う新生児脳症を呈したスタンダード・プードルにおける 磁気共鳴画像および組織病理学的所見: 症例報告. 第 2 回ニチジュウ シンポジウム 2019, 東京, 武蔵野. 2019 年 12 月
- 2) **湯 祥彦**, **長谷川大輔**. ポメラニアンにおける主要な発作型としての焦点性運動発作である肢におけるジストニア発作: 回顧的ケースシリーズ. 第 2 回ニチジュウ シンポジウム 2019, 東京, 武蔵野. 2019 年 12 月

7 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

2018 年度の犬肥満細胞腫培養細胞を用いた研究から、犬の肥満細胞腫のチロシンキナーゼ (トセラニブ) 耐性化には、KIT における様々な獲得変異が重要な役割を果たしている可能性が示された。そこでトセラニブによる個別化治療を実現するための基盤構築を目的とし、2019 年度は、犬の肥満細胞腫 164 症例のゲノム DNA を次世代シーケンサー (NGS) 解析し、KIT 変異の網羅的探索を行った。また NGS 解析で認められた変異および既知の変異を含む組み換え KIT 蛋白を作製し、変異の性状解析を行うこととした。

3. 研究の計画・方法

犬の肥満細胞腫における KIT 変異の網羅的探索を行うため、犬の肥満細胞腫 164 症例における腫瘍ゲノム DNA を用いて KIT の全エクソンを NGS 解析した。解析には Miseq Reagent Kit v3 (Illumina) と Miseq (Illumina) を用いた。また、変異 KIT 組み換え蛋白発現ベクターを作製し、HEK293 細胞に KIT 蛋白を発現させたのち、変異 KIT のリン酸化状態およびそのトセラニブに対する感受性を評価した。

4. 研究の特色

トセラニブは変異 KIT のリン酸化を抑制し、異常な増殖シグナルを遮断することで抗腫瘍効果を示すと考えられている。このため、トセラニブの治療成績を高めるためには KIT の変異に基づき治療を個別化することが有益と考えられる。しかしながら、KIT における変異の有無とトセラニブ奏効率の関連については明確な結論は得られておらず、このためトセラニブを用いた個別化治療は実現していない。これは KIT 変異の有無とトセラニブ奏効率の関連を解析する際に、変異頻度の高いエクソン 11 の ITD 変異にのみ着目して行われていることが原因と考えられる。本研究は、犬の肥満細胞腫における KIT 遺伝子変異を NGS で包括的かつ高感度に解析することで、これまで犬の肥満細胞腫において知られていない新たな変異の同定を試みるものである。これにより、未知の変異を同定し、さらにそれらの特性を明らかにすることでトセラニブ治療の個別化を実現するための新たな方策が見いだせると考えられる。トセラニブによる犬の肥満細胞腫の治療に「個別化」という概念を取り入れようとする新たなアプローチが本研究の特色と言える。

5. 研究の成果

犬の肥満細胞腫における KIT 変異の網羅的探索を行うため、犬の肥満細胞腫 164 症例におけるゲノム DNA を用いて KIT の全エクソンを NGS 解析した。16 種類の新規変異 (エクソン 11 の ITD 変異を除く) が KIT の様々な領域に同定された。また、本研究で同定された変異のうち比較的頻度の高い変異とこれまでに報告されている変異について、組み換え KIT 蛋白を作製し、それぞれの変異 KIT についてリン酸化シグナルレベルおよびトセラニブ抵抗性への関与について解析した。その結果、変異 KIT のリン

酸化シグナルレベルおよびトセラニブ感受性の程度は変異ごとに異なることが明らかとなった。とくにいくつかの変異は KIT の恒常的なリン酸化を生じるが、そのリン酸化はトセラニブによって抑制されないことが示された。このことは、トセラニブナイーブな症例において微量のトセラニブ抵抗性腫瘍細胞クローンが存在していることを示しており、トセラニブの治療によって選択的に増殖し、最終的にトセラニブ耐性の腫瘍を形成する可能性を示唆している。このように、犬の肥満細胞腫では KIT の広範な領域に多様な変異が存在しており、トセラニブによる個別化治療を行う上では、包括的に KIT 変異の評価と変異の特性に応じた治療アプローチが必要と考えられた。とくにトセラニブ抵抗性素因をもつ腫瘍クローンが検出された場合は、札細胞性抗がん剤と組み合わせるなど、トセラニブ耐性クローンに対する治療戦略を考慮する必要があると考えられた。

8 担がん犬における骨髓由来抑制細胞を標的とした新規治療候補薬の探索

1. 研究の所属・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より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。

研究計画の具体的な進め方として、①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、②種々のがんにより誘導される MDSC 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の探索、③担がん犬の血中 MDSC に対する候補薬剤の抗免疫抑制効果の検討の3つを計画している。

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の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。現在、本研究で確立した方法により、犬の骨髓細胞と種々の株化腫瘍細胞を用いて MDSC を分化誘導し、キナーゼ阻害剤による MDSC の T 細胞増殖抑制への影響を検討している。

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、二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。研究の序盤として、まず初めに、抗原提示を担う細胞表面分子に対する抗体を利用した免疫組織染色技術を魚類で確立し、組織学的に“免疫応答の場”を特定しようと考えている。

3. 研究の計画・方法

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。研究グループはこれまでに抗原提示細胞が表出する MHC クラス II に対する抗体を用いた免疫組織染色により、MHC クラス II 陽性細胞が魚類のリンパ組織（脾臓および腎臓）にだけでなく、消化管粘膜固有層、鰓、嗅覚器、心室に多数存在していること

を明らかにし、これらの組織が“免疫応答の場”として働いている可能性を示唆した。2019年度は、“免疫応答の場”をより絞り込むために、免疫応答に関与する T 細胞およびインターロイキン 2 (IL-2) の検出法の確立について取り組んだ。また血管内異物を取り込む MHC クラス II 陽性細胞の組織分布を調べ、“免疫応答の場”の候補組織を探索した。

① T 細胞の検出法の開発

ヒラメ T 細胞受容体 (TCR) α 鎖を標的とした定量 PCR 法を開発する。データベースに登録されている遺伝子配列をもとにプライマーを設計し、リンパ組織である胸腺、脾臓および腎臓での遺伝子発現について確認する。

TCR α に対する抗体を作製し、免疫組織染色による T 細胞の検出法を確立する。抗原に TCR α の部分ペプチドを用い、抗体作製業者に委託する。

② IL-2 の検出法の開発

ヒラメ IL-2 を標的とした定量 PCR 法を開発する。データベースに登録されている遺伝子配列をもとにプライマーを設計し、リンパ組織である胸腺、脾臓および腎臓での遺伝子発現について確認する。

③ 血管内異物を取り込む MHC クラス II 陽性細胞の組織内分布

カーボンインクまたはホルマリンで不活化した *Edwardsiella piscicida* を血管内に注入し、3～48時間後の各種異物と MHC クラス II 陽性細胞の組織分布を免疫組織染色により調べる。

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、その組織における各種免疫細胞の機能的役割に関する知見は乏しい。抗原提示は免疫反応の開始に重要なイベントであるにもかかわらず、魚類ではその場所が不明なままである。本研究は、抗原提示に関与する細胞の存在および分子の発現を調べることで、組織の免疫学的機能を明らかにする。

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、本研究の成果は魚類 (ヒラメ) の白血球マーカーに対する抗体の蓄積にも貢献する。

5. 研究の成果

① T 細胞の検出法の確立

設計したプライマーを用いた PCR はヒラメ TCR α 遺伝子を特異的に増幅することを確認した。続いて、本プライマーによる定量 PCR 法を確立し、各種リンパ組織における TCR α 遺伝子の発現量を評価することに成功した。今後、抗原刺激 (感染およびワクチン接種) したヒラメの各組織における TCR 遺伝子の発現変動を調べ、“抗原提示の場”となる候補組織について検討する。

抗体作製に適したペプチド部位を分子構造から予測した。現在、本ペプチドに対する抗体の作製を進めている。

② IL-2 の検出法の確立

設計したプライマーを用いた PCR は 3 種類の PCR 産物

を生じた。各 PCR 産物の塩基配列を調べたところ、これらの由来はヒラメ IL-2 の成熟 mRNA 以外に mRNA 前駆体およびスプライシングバリエーションと思われる mRNA であることが分かった。興味深いことに、これらの遺伝子は臓器や抗原感作の有無によって発現量を変えていることが可能性が確認できた。各遺伝子産物に対する定量 PCR 法の開発を試みたが適切なプライマーを設計することができなかった。現在、フラグメント解析による各 PCR 産物の定量解析法の開発を進めている。

③ 血管内異物を取り込む MHC クラス II 陽性細胞の組織内分布

カーボンインク投与 3 時間後には脾臓および腎臓中にインク粒子が蓄積していた。48 時間後も同様に脾臓および腎臓でインク粒子を検出したが、他の臓器では検出できなかった。脾臓におけるインク粒子は莢組織および脾索に存在した MHC クラス II 陽性細胞内で検出された。腎臓におけるインク粒子は尿細管周囲の毛細血管に存在した食細胞内で検出されたが、これらの細胞の多くは MHC クラス II 陰性であった。ホルマリン不活化 *E. piscicida* も脾臓および腎臓で顕著に検出され、その局在もインク粒子と同様であった。血中に入り込んだ異物は脾臓や腎臓に局在する細胞によって取り込まれるが、MHC クラス II 陽性細胞が積極的に関与しているのは脾臓であった。以上より、血管内異物の抗原提示を担う主要な臓器は脾臓であると考えられた。

10 特許出願中のため掲載不可

1. 研究の所属・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

特許出願中のため掲載不可

11 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、我々が同定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を解析することで、臨床遺伝学的アプローチによる血液型物質と疾患に関する研究基盤を形成を目的としている。

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との関連解析を行うための基盤を構築する。そのため、今年度は、以下の計画を予定している。

- ①イヌおよびネコの血液型別疾患ゲノムバンクの継続的収集
- ②腫瘍培養細胞の収集
- ③継続的ネコ CMAH 遺伝子検査
- ④イヌ CMAH 遺伝子構造の決定：すでに進めているイヌ赤血球膜上のシアル酸分子種の発現に関連する CMAH 遺伝子の構造解析を終了させ、研究成果を学術雑誌の公表。

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。また、2018年度に日本獣医生命科学大学特色ある研究プロジェクトに採択された研究課題の2年目となる継続的研究である。

5. 研究の成果

ネコ血液型解析：前年度解析検体も含め、継続研究機関中に協力病院より分与された計284例のネコ検体について、ネコ AB 式血液型の分布を分析した。その結果、A 型255例 (89.8%)、B 型22例 (7.7%)、AB 型7例 (2.5%) であった。我々の既報の研究結果と比較すると、稀な血液型である AB 型が多く見出された。内訳はアメリカンショートヘア 1 例、アメリカンカール 1 例、メイクーン 1 例、雑種 4 例であった。また、別の検体において、CMAH 遺伝子タイピングを行った結果、新規の SNP を見出し、第162回日本獣医学会学術集会で報告した。次に、5例以上の症例数がある疾患と血液型分布の関連について解析した。各疾患別の血液型分布は、尿管結石 (49 例) は、A 型45例 (91.8%)、B 型2例 (4.1%) AB 型2例 (4.1%)、リンパ腫 (20 例) は、A 型19例 (95%)、B 型1例 (5%) AB 型0例 (0%)、繊維肉腫 (7 例) は全て A 型 (100%)、で、胸腺腫 (7 例) は、A 型6例 (85.7%)、B 型1例 (14.2%) であった。今回の解析では、疾患と血液型の明確な関連については認められなかったが、今後も血液型別疾患データを蓄積する必要があると考えられた。なお、当該ネコゲノムについて、CMAH 遺伝子の解析を順次実施している。

イヌ血液型解析：継続研究機関中に協力病院より分与された計573例のイヌ検体について、イヌ血液型 DEA1.1 の分布について分析した。その結果、陽性が494例 (86.2 %)、

陰性79例 (13.8 %) であった。これらの結果は、我々の既報の研究結果と齟齬はなかった。陰性検体のうち35例は、肝細胞癌、浸潤性胸腺腫、悪性黒色腫、甲状腺濾胞腺癌など疾患名が明らかにされているため、今後の血液型との関連解析に有用な情報となると考える。また、イヌ DEA1.1 責任遺伝子の同定の報告はないことから、本研究成果である血液型別イヌバンクは、今後イヌ DEA1.1 責任遺伝子の同定に不可欠な検体となるであろう。

赤血球膜に発現するシアル酸分子種をコードするイヌ CMAH 遺伝子の解析：我々は、昨年度から継続して、パルボウイルスのレセプターとされる Neu5Gc を合成する CMAH 遺伝子のクローニング、RT-PCR 法による各組織における発現解析、遺伝子変異の同定を行い、今年度研究成果を国際誌にて公表した (Canine Genet Epidemiol. 2019 Nov 7;6:9)。さらに本研究で見出した遺伝子多型を標的として疾患との関連解析基盤を構築するため、疾患別ゲノム (イヌ血液型解析用検体) ならび肝癌細胞、肺癌細胞、尿路上皮癌細胞、乳腺腫瘍細胞、線維肉腫細胞などの各種腫瘍系培養細胞を収集し、今後の研究に活用する予定である。

以上、本研究助成により、臨床遺伝学的アプローチによる血液型物質と疾患に関する研究基盤の形成を行うことが出来た。

謝辞：本研究にご協力いただいた公益財団法人日本小動物医療センター中村知尋氏に深謝致します。

研究業績 (2019 年度)

原著論文

- 1) Molecular characterization of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH) associated with the erythrocyte antigens in dogs.
Uno Y, Kawakami S, Ochiai K, Omi T.
Canine Genet Epidemiol. 2019 Nov 7;6:9.

学会等発表等

- 1) cDNA cloning and variant analysis of the canine CMAH gene
Uno Y, Kawakami S, Ochiai A, Omi T.
The 37th International Society for Animal Genetics Conference, ID:P132, P98).
- 2) AB 型が疑われた B 型ネコに見出した新規 CMAH 遺伝子変異
矢口雅美, 宇埜友美子, 落合和彦, 山根咲恵, 金子直博, 稲垣健志, 坂本敦司, 小野沢栄里, 土田修一, 近江俊徳.
第162回日本獣医学会学術集会 p.468. 2019年9月10日.
- 3) 血液型遺伝子検査の現状と課題
近江俊徳.
獣医輸血研究会 第2回学術集会. 2019年12月4日
- 4) cDNA cloning and variant analysis of canine CMAH gene イヌ CMAH のクローニングと新規変異検索
宇埜友美子, 川上翔太, 落合和彦, 近江俊徳.
第2回ニチジュウシンポジウム2019. 2019年12月6日

12 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、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 (*ILAR J.* 55:59-68. 2014)。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。アンドロゲン受容体シグナル (AR シグナル) 非依存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、SGTA 機能を制御することにより 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 (*Oncotarget*, 7:3283-96. 2016; *BMC Vet Res.*, 13:170. 2017)。

上記研究の中で、イヌ AR 全長をクローニングし、各種実験に供してきたが、AR には N 末端付近にグルタミン (Q) の繰り返し配列が存在し、その数が短いほど前立腺がん罹患し易いという統計学的データがヒトで報告されている (*Cancer Res.* 60:5111-6. 2000)。イヌでも過去に前立腺がん症例と対照群の間で Poly Q 配列長に有意差が見られるという報告があったが (*J Vet Intern Med.* 22:1380-4. 2008)、イヌ AR シグナル伝達と Poly Q 配列長の相関について実験的に検証した例はない。そこで、本研究ではイヌ AR に 2 か所存在する Poly Q 配列を遺伝子工学的手法により長さを増減させ、細胞生物学的手法を用いて AR シグナル伝達機構におよぼす影響を精査する。これにより、イヌ AR のアンドロゲン感受性について明らかにするとともに、アンドロゲン非存在下での AR シグナル伝達機構の一端を解明し、イヌの難治性前立腺がん発症機構に資することを目的とした。

3. 研究の計画・方法

2019 年中は、クローニングしたイヌ AR 全長 cDNA (約 2.7 kb) の N 末端付近に存在する Poly Q 配列の長さを遺伝子工学的手法で増減させ、Poly Q 改変体を作製する予定とした (図 1)。これらを当研究室でこれまでに実施しているイヌ AR シグナル伝達強度測定実験に供する。その実験手法は、AR 非発現ヒト前立腺がん由来株化細胞である PC3 株にイヌ AR 遺伝子発現プラスミドおよび AR シグナルにより転写が活性化するラット probasin promoter を上流に挿入し

たレポータープラスミドを導入し、48 時間培養後にアンドロゲン誘導体ジヒドロテストステロン (DHT) を培地に添加する。さらに 24 時間培養後、レポーター遺伝子である Nano-luc 発現量を発光量として測定し Poly Q 数との相関を解析することとした (図 2)。これにより、イヌ AR Poly Q 繰り返し数が AR シグナルにおよぼす影響が類推できる。本研究では、これまで使用が困難だったイヌ AR 遺伝子のクローニングも併せて行うため、よりイヌの分子機構に近い実験系が構築できると予想された。さらに、去勢環境下で AR シグナル非依存的に前立腺がんの発症を促す可能性のある SGTA の働きについても精査する予定であった。

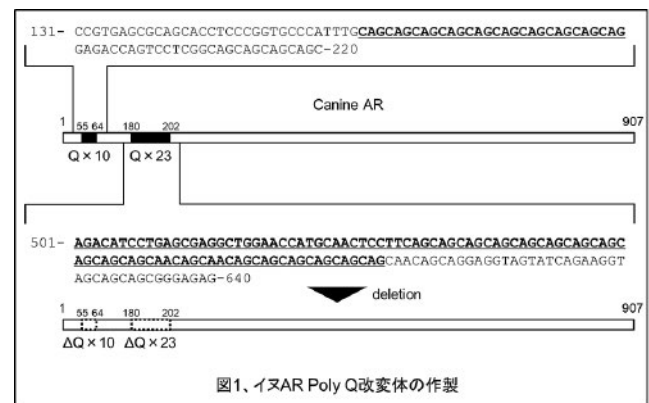


図1、イヌAR Poly Q改変体の作製

4. 研究の特色

前述のとおり、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 (*ILAR J.*, 2014)。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 (図 3)。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 (*Vet Comp Oncol.*, 2017)。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

当研究室でクローニングしたイヌ AR を鋳型として、TOYOBO KOD mutagenesis kit を用いて N 末端側の Q x 23 を欠損させたクローン (del Q x 23) を作製した。さらに、Q x 10 も欠損させたクローン (del Q x 10+23) も作製した。両者の塩基配列を確認後、哺乳類細胞発現バク

ターにサブクローニングした。その後、WT と del Q × 23 および del Q × 10+23 をヒト AR 非発現前立腺がん由来細胞株 PC3 に発現させ、AR シグナル伝達強度に比例して発光するルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。

変異導入の結果、Q × 23 および Q × 10+23 を欠損させたクローンの作製に成功した(図4)。塩基配列解析の結果、他箇所は鋳型配列と完全に一致した。PC3 細胞を用いたイヌ AR WT と del Q × 23 および del Q × 10+23 の AR シグナル伝達強度測定の結果、アンドロゲン誘導体ジヒドロテストステロン添加時のシグナル伝達強度は WT < del Q × 10 < del Q × 23 < del Q × 10+23 の順となった(図5)。

イヌ前立腺がん罹患個体を対象として、AR Poly Q 配列長を調査した過去の報告において、腫瘍罹患個体が健常個体に比べ poly Q 配列が短い傾向にあった。今回の実験結果は過去の統計学的調査結果を実験的に裏付けるものであり、イヌ AR 分子構造とアンドロゲンシグナル伝達効率、さらには前立腺がん発生機構を関連付ける基礎的知見となり得る。今後は、実際の個体で起こり得る範囲での del Q クローンを作製し、より精緻に検証する必要があると考える。

本研究に関連し、2019 年度中に発表した論文を以下に挙げる。

- 1) Leydig cell tumor in an Amur tiger (*Panthera tigris altaica*).

Kawata R, Ii T, Hori T, Machida Y, Ochiai K, Azakami

D, Ishiwata T, Michishita M.

J Vet Med Sci. 2019, 81(2):186-189.

- 2) Expression and Roles of S100A4 in Anaplastic Cells of Canine Mammary Carcinomas.

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.

Vet Pathol. 2019, 56(3):389-398

- 3) Chronic Basophilic Leukaemia in a Dog.

Azakami D, Saito A, Ochiai K, Ishiwata T, Takahashi K, Kaji N, Kaji D, Kaji N, Michishita M.

J Comp Pathol. 2019, 5-8.

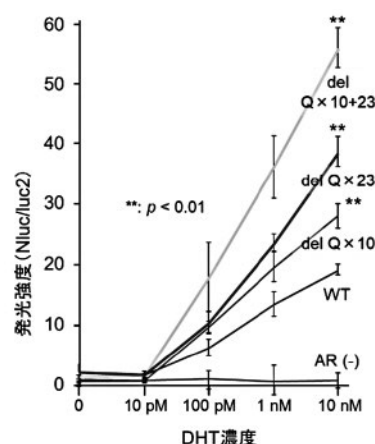
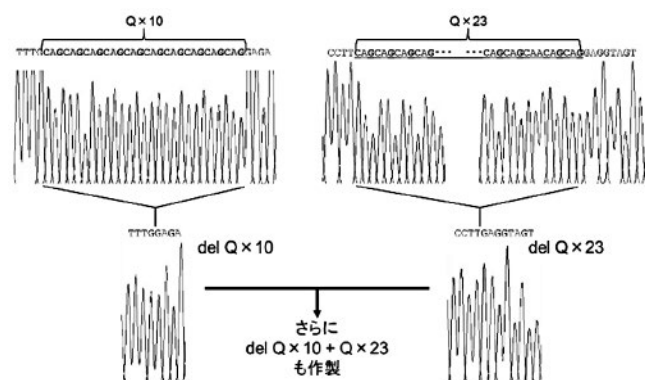
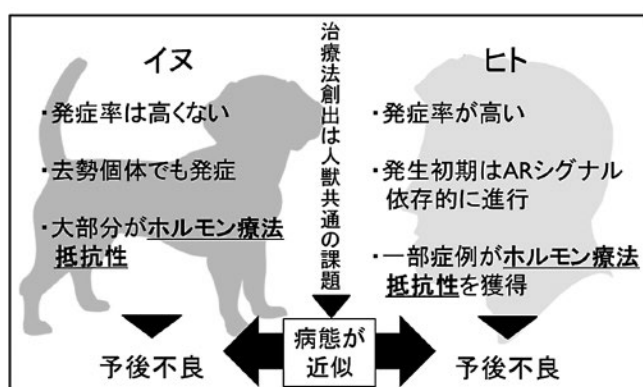
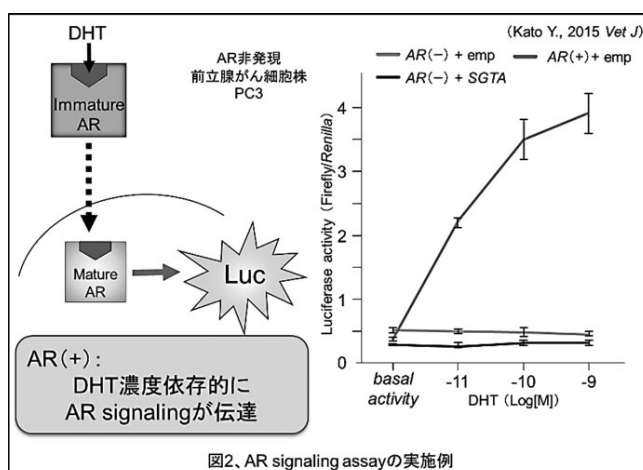
- 4) Metabolite profiling in sphere-forming cells from canine mammary adenocarcinoma cell lines using gas chromatography-mass spectrometry.

Michishita M, Saito N, Nozawa S, Furumoto R, Nakagawa T, Sato T, Ochiai K, Azakami D, Katayama K, Nakahira R, Tazaki H, Machida Y, Ishiwata T.

J Vet Med Sci. 2019, 81(9):1238-1248.

- 5) Canine histiocytic sarcoma cell lines with SHP2 p.Glu76Gln or p.Glu76Ala mutations are sensitive to allosteric SHP2 inhibitor SHP099.

Tani H, Kurita S, Miyamoto R, Ochiai K, Tamura K, Bonkobara M.



Vet Comp Oncol. 2019, [Epub ahead of print]

- 6) The canine RAD51 mutation leads to the attenuation of interaction with PALB2.

Uemura M, Ochiai K, Morimatsu M, Michishita M, Onozawa E, Azakami D, Uno Y, Yoshikawa Y, Sasaki T, Watanabe M, Omi T.

Vet Comp Oncol. 2019, [Epub ahead of print]

13 ウイルス感染症の生ワクチン候補株の作出

1. 研究の所属・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

畜産感染症の中でも特に、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) に着目し、弱毒生ワクチン候補株の作出を目指す。BVDV のワクチンは既に存在するものの、流行株とワクチン株の遺伝子型が合致していないことによってその防疫効果は低く、散発が認められている現状がある。より有効な弱毒生ワクチン株の作出によって、畜産衛生の促進及び食肉の安定生産へ貢献できると考えている。

昨年度に、BVDV の弱毒化を図る目的で自然宿主 (牛) 以外の動物へのウイルス馴化を実施した。その結果、牛以外の動物由来細胞に BVDV を馴化させることができた。本年度は、この異種動物由来細胞馴化 BVDV の詳細な性状解析を実施し、弱毒生ワクチン株として有益な特性を保持しているか明らかにすることを目的とする。加えて、より効果的に免疫を付与することを目指して、BVDV の中でも免疫応答を強く誘導するウイルスタイプ (END⁻) を用いた馴化実験も併せて実施する。

3. 研究の計画・方法

異種動物由来細胞馴化ウイルス (以下、adapted-END⁺ とする) の性状解析を実施した。

①ウイルス学的性状の解析

- ・ウイルス力価の推移：牛腎由来 MDBK 及び異種動物由来細胞を用いたウイルスタイトレーション及び RT-PCR 法によるウイルス遺伝子の検出
- ・全長遺伝子配列の決定：ディープシーケンス解析
- ・宿主指向性の評価：牛及び異種動物由来細胞を用いたウイルス力価の測定

②免疫学的性状の解析

- ・免疫学的性状の決定：END (Exaltation of Newcastle Disease Virus) 法
- ・自然免疫関連遺伝子の誘導能：リアルタイム PCR 法による bovine ISG15 及び Mx1 発現の測定

さらに、宿主の免疫を誘導する END⁻ タイプの馴化・分離も実施した (逆ブラック法)。

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馴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 を馴化させようとする点であり、回収されたウイルスには、弱毒生ワクチン株になり得る可能性だけでなく、自然宿主/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。

5. 研究の成果

まず、adapted-END⁺ のウイルス力価の推移を明らかにするために、継代時に保存した感染細胞の上清を用いてウイルスタイトレーションを実施した。また、宿主指向性の変化を知るために、ウイルスタイトレーションは MDBK 細胞 (牛由来) と異種動物由来細胞の2種の細胞で実施した。その結果、BVDV/END⁺ は異種動物由来細胞に5~10回の継代で適応出来ていることが分かった。ウイルス力価はどちらの細胞でも測定可能であったが、MDBK 細胞で測定した場合の方が約10倍程度高く算出されることも分かった。同時に、BVDV/END⁻ の馴化も試みたが、40回継代しても異種動物由来細胞に馴化出来なかった (図1)。より検出感度の高い RT-PCR 法を用いてウイルス遺伝子の検出を行ったが、やはり BVDV/END⁻ は異種動物由来細胞で増殖出来ていなかった (図2)。以上の結果から、牛以外の異種動物由来細胞で40回継代した BVDV/END⁺ (= adapted-END⁺) を BVDV の弱毒生ワクチン候補株として性状解析を実施した。

adapted-END⁺ の全長遺伝子配列を明らかにするために、ディープシーケンス解析を実施した (東京農工大学にて実施)。その結果、P.0 (異種動物由来細胞に馴化前) のウイルスと比較して、14か所のアミノ酸変異が生じていることが分かった。これらの変異の中には、BVDV の宿

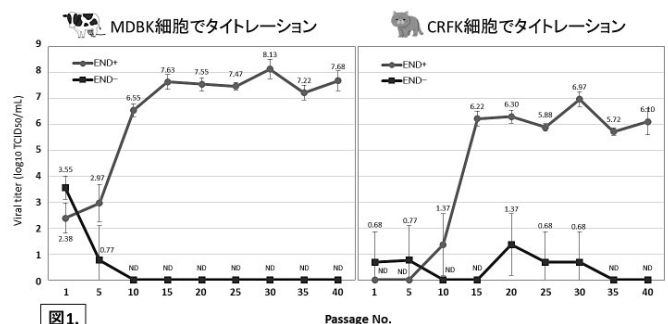


図1.

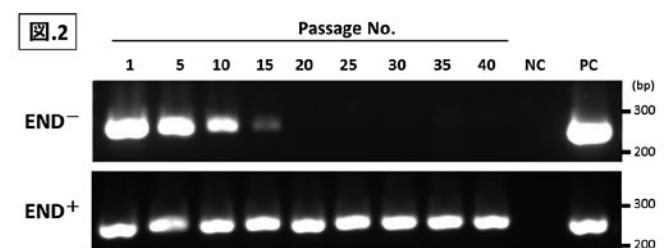
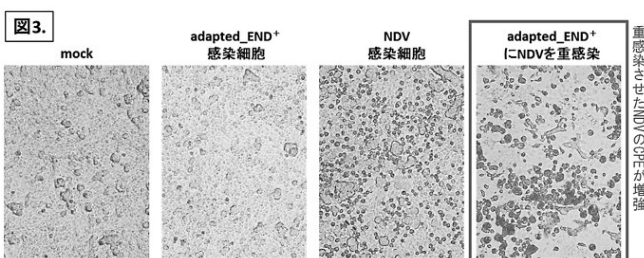


図2.

主特異性に関与している変異が含まれていると考えられる。次に、adapted_END⁺の宿主特異性の変化を検討した。adapted_END⁺を牛由来 MDBK 及び異種動物由来細胞に同条件で感染させ、ウイルスの増殖効率を上清中のウイルス力価を指標に評価した。まず、馴化前の P.0 のウイルスを両細胞に感染させたところ、MDBK 細胞で効率よく増殖出来たのに対して、異種動物由来細胞では、感染は出来るもののその効率が非常に低いことが分かった（ウイルス力価、MDBK 細胞：10^{8.05}、異種動物由来細胞：10^{2.3} TCID₅₀/mL）。同様の実験を adapted_END⁺ で実施したところ、やはり異種動物由来細胞で効率よく増殖出来るようになっていたことが分かった（ウイルス力価、MDBK 細胞：10^{7.3}、異種動物由来細胞：10^{6.63} TCID₅₀/mL）。すなわち、adapted_END⁺は、異種動物由来細胞を40回通過することによって、牛以外の異種動物由来細胞への宿主指向性が高まっていることがわかった。

次に、adapted_END⁺の免疫学的性状を、培養細胞を用いた *in vitro* の実験系で評価した。まずは、感染細胞の自然免疫応答を抑制する END⁺ という性状、または、感染細胞の自然免疫応答を誘導する END⁻ という性状、このどちらを有しているのか明らかにするために、END 法を実施した（図3）。adapted_END⁺ 感染細胞にニューカッスル病ウイルス（NDV）を重感染させると、NDV の細胞変性効果（CPE）が増強する END 現象が認められ、adapted_END⁺ は馴化前と変わらず END⁺ ウイルスの性状を保持していることが分かった。さらに、adapted_END⁺ 感染細胞内の自然免疫関連遺伝子（*bISG15* 及び *bMx1*）の発現誘導も調べた。コントロールとして設定した馴化前の BVDV/END⁺ 感染細胞ではいずれの mRNA も発現誘導が認められないが、BVDV/END⁻ 感染細胞では両 mRNA の強力な発現誘導が認められた。adapted_END⁺ を MDBK 細胞に感染させ、両 mRNA 発現を調べたところ、*bISG15* のみ微弱な発現誘導を認めたが、感染後期には2倍程度の発現レベルまで低下した。*bMx1* は感染1～5日を通して発現誘導を認めなかった。続いて、adapted_END⁺ を異種動物由来細胞に感染させると、*bISG15* の発現誘導は見られなかったものの、*bMx1* は感染1～3日目に5.3～10.1倍の発現が認められた。しかし、感染が進むにつれてその発現が0.2～0.8倍にまで低下した。以上の結果から、adapted_END⁺ は、感染初期に弱い自然免疫応答を誘導するものの、感染が進むにつれてその反応を抑制する傾向があることが分かった。



本年度の研究結果から、本研究で BVDV の弱毒生ワクチン候補株とした adapted_END⁺ の性状を明らかにすることが出来た。ディープシーケンス解析によって得られた結果を精査することで、異種動物感染に重要な遺伝子領域／宿主指向性を規定するアミノ酸部位を明らかにすることが出来ると考えられる。また、adapted_END⁺ は、感染細胞の自然免疫応答を抑制する性状を有していることが明らかになった。より効果的な弱毒生ワクチン株を作出するためには、END⁻ のような自然免疫応答を誘導する性状が有効であると考えられるが、CSFV の弱毒生ワクチン作出過程において異種動物（モルモット）由来細胞に馴化した CSFV/END⁺ も接種豚で十分に抗体を誘導したことが報告されている（Suzuki S, *Ann Rep Natl Assay Lab*, 2001）。従って、END⁺ の性状を有する adapted_END⁺ も弱毒生ワクチン株として応用できる可能性を秘めていると考える。

しかしながら、当初の研究目標であった BVDV/END⁻ の異種動物細胞への馴化を果たす必要がある。BVDV/END⁻ の単独感染では、牛以外の異種動物由来細胞に馴化させることが出来なかったため（図1及び2）、異なる方法でその獲得を試みた。本研究で使用した P.0 のウイルス（BVDV/END⁺）は、生物学的手法（END 法を用いた限界希釈法）によってクローニングされているため、免疫学的性状は均一なウイルス集団であるが、その中に BVDV/END⁻ が全く含まれていない訳ではない。END 現象の発現を阻害しないレベルで BVDV/END⁻ がウイルス集団内に存在していると考えられる。このウイルスを P.0 として、異種動物由来細胞に接種し40回のウイルス継代を実施したところ、adapted_END⁺ (P.40) の中に、END⁻ の性状を持つウイルスが存在している可能性が示唆された（図4、END⁻ ウイルスが有する性状によって形成された逆ブラック）。BVDV/END⁻ は、BVDV/END⁺ の増殖を支持するヘルパーウイルス様の機能を有している可能性が申請者自身の研究から示唆されており（Shiokawa M et al., *Virology*, 2019）、40回のウイルス継代中も消えることなくウイルス集団内に存在していたと考えられる。今後は、この逆ブラックから END⁻ の単離を実施し、異種動物由来細胞馴化 END⁻ も獲得する予定である。



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

1. 研究の所属・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す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考えられるようになった。

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。昨年度実施した特色ある研究プロジェクトでは、ヒトにおいて胎生期や様々な癌で発現することが知られる lncRNA の一つである H19 が、調べた 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った。また癌の進展に関わる代表的な lncRNA の一つである HOTAIR は、細胞株の一つ 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関連しており、癌の進展に重要な役割を果たしている可能性がある。本研究では昨年度の特徴ある研究プロジェクトで得られた成果に基づき、イヌの乳腺癌の発生、進行に関わる lncRNA の同定とその機能解析を実施する。

3. 研究の計画・方法

- ① 昨年度の特徴ある研究プロジェクトで見出された H19 について、イヌの乳腺癌細胞株における機能解析を行う。H19 を高発現する CIPp に、イヌの H19 lncRNA と相補的な配列を有する small interfering RNA (siRNA) あるいはネガティブコントロールの siRNA を導入し、real-time RT-PCR により H19 発現がノックダウンされているか確認する。その後、それらの細胞を用いて以下の手順で Boyden chamber assay を行う。すなわち、無血清培地で調整した細胞浮遊液を Boyden chamber の上層のウェルに播種し、24 時間後にウェルの底部のフィルターの開いた小孔を通して、血清添加培地が満たされた下層のウェル側に遊走した細胞数をカウントする。これにより H19 ノックダウン細胞とコントロール細胞の遊走能力の違いを比較する。
- ② イヌの高悪性度乳腺癌細胞株である CIPp と低悪性度乳腺癌細胞株である 17-442 細胞から total RNA を抽出し、次世代シーケンサーにより lncRNA を含むその遺伝子発現の違いを比較する。

4. 研究の特色

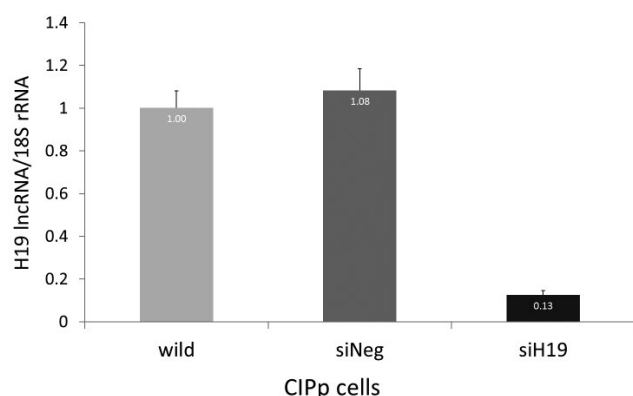
本課題はイヌの癌においてこれまで研究されてこなかった lncRNA に注目したものであり、得られる成果はすべて新規の知見となる。ヒトの癌においても lncRNA の研究は緒に就いたばかりであり、癌における作用や治療標的としての有用性についてまだまだ未解明な点が存在する。今回のイヌの癌における研究でこれまで注目されていなかった新たな lncRNA が浮上し、将来ヒトの癌の治療標的にも応用できる可能性がある。

5. 研究の成果

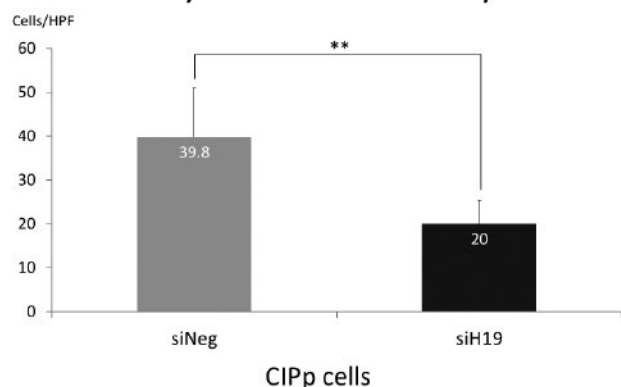
- ① イヌの H19 lncRNA と相補的な配列を有する siRNA を導入した CIPp では、コントロールの siRNA を導入した細胞に比べて H19 発現が約 15% にノックダウンされていた。それらの細胞を用いた Boyden chamber assay では、H19 ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べて遊走細胞数が統計学的に有意に減少したことから、H19 がイヌの乳腺癌細胞における移動能に寄与していることが示唆された。
- ② 次世代シーケンサー解析において、mRNA では精子の形成に重要な役割を果たすことが知られる Spermatogenesis-associated protein 6 (SPATA6) 遺伝子や、細胞骨格に関連する膜結合蛋白の一つである MAGUK p55 subfamily member 2 蛋白をコードする membrane palmitoylated protein 2 (MPP2) 遺伝子が、低悪性度乳腺癌細胞株 17-442 に比べて高悪性度乳腺癌細胞株 CIPp で高発現していることがわかった。また 2

つの新規 lncRNA および 2 つの新規 TUCP (transcript of unknown coding potential) が、低悪性度乳腺癌細胞株 17-442 に比べて高悪性度乳腺癌細胞株 CIPp で高発現していることがわかった。今後はこれらの RNA がイヌの乳腺癌において果たしている役割を解明することで、新たな治療標的分子の候補になるか検証していく予定である。

H19 expression levels



Boyden chamber assay



15 心理的ストレスによる免疫応答への影響

1. 研究の所属・氏名等

動物科学科 動物生体防御学教室

講師 小柳 円

2. 研究の目的

現代社会は多くの人々が何らかの社会的ストレスを抱え生活している。精神と免疫の関係を我々は身を以て体験しており、一般にストレスがあると風邪を引きやすい (N Engl J Med 1991 325: 606) と言われ、その一方で、気が張っていると病気になるとも言われ、心理的ストレスは免疫系に様々な影響を与えると考えられる。ストレス時に見られる免疫学的影響には、免疫抑制ないし感染の重症化、アレルギー疾患の増悪、自己免疫疾患の発症、さらに精神的緊張による免疫応答の賦活化などがあり、これらがどのように生じるのか未解明な点が多い。

マウスでは系統によりストレス感受性が異なり、関与する因子として糖質コルチコイド受容体 (GR) が報告さ

れている。GR はマウス系統により 75 番目のグルタミンの繰り返し回数が異なり、グルタミンが 8 個繰り返されている GR^{wt} マウス (BALB/c, AKR, C3H/HeJ, 129x1/SvJ, NOR/Lt 系統) は、16 個繰り返されている GR^{qn} マウス (C57BL/6, C57BR/cdJ, ST/bJ, SWR/J 系統) に比較し、拘束ストレスの後の血中コルチコステロン (糖質コルチコイド) 濃度が高いが、新奇ストレスに対する抵抗性が強いと報告されている (FASEB J 2006 20: E1802)。一方、慢性的なストレスを与えた BALB/c マウスは C57BL/6 マウスに比較し、脳側坐核での GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor) の発現が低く、鬱状態になりやすいという報告 (Neuron 2011 69:359) もあり、ストレスの種類、ストレス状態の捉え方が重要である。

さらに、マウス系統によりストレス感受性が異なりと同時に免疫応答の質も異なる。ヘルパー T (TH) 細胞は産生するサイトカインにより、IFN- γ を優位に産生する TH1 細胞と IL-4、IL-5、IL-13 を主に産生する TH2 細胞などのエフェクター細胞が挙げられる。アレルギーの発症には TH 細胞の TH1/TH2 細胞の偏向が関わっており、BALB/c マウスは C57BL/6 マウスに比較し、TH2 タイプに偏向しており、アレルギーを発症しやすい。申請者はこの原因の一つとして、Mina 分子 (Jumonji C protein family) の発現量が C57BL/6 マウスでは BALB/c マウスに比較し高く、この分子が IL-4 promoter に結合することで TH2 分化に重要な免疫反応初期の IL-4 産生を抑制していることを見いだした (PLoS One 2013 8:e80638, Nat Immunol 2009 10:872-9)。しかし、その発現機構については未だ明らかになっていない部分が多い。

以上のように、BALB/c マウスではストレス時のコルチコステロン産生量が多いと同時に、アレルギーを起こしやすい体質を持ち、C57BL/6 マウスはコルチコステロン産生量が少なく、アレルギーになりにくいという体質をもつが、これら 2 つの体質の直接的な関連性は明らかにされていない。本研究では GR の遺伝子型に着目し、心理的ストレスが与える免疫反応への影響と、その分子機序を明らかにする。マウスの系統間におけるストレスによる免疫応答への影響を明らかにすることで、ヒトにおけるストレス感受性の個人差・遺伝的差異に当てはめることができ、アレルギー等の免疫疾患の治療に役立つものと考えている。

3. 研究の計画・方法

1. ストレス関連遺伝子の発現

TH2 偏向型の BALB/c マウス、TH1 偏向型の C57BL/6 マウス、それぞれの系統の GR を置換した GR コンジェニック (Cg) マウス、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) KO マウスを用いた。拘束ストレスは空気穴を開けた 50ml の遠心管にマウスを 3~5 時間、閉じ込めてストレスを負荷した。拘束ストレス負荷後のマウスの脾臓から RNA を抽出し、cDNA を作成後 qPCR によりストレス関連遺伝子 (*gilz*, *rtp801*, *mkip-1*, *trp53inp1*, *bnip3*) の発現量について *hprt* 遺伝子を内部コントロールとして検討を

行った。

2. ストレス関連遺伝子発現によるサイトカイン産生誘導の解析

レトロウイルスベクター (pIT) にストレスにより発現が誘導された *gilz, rtp801, mkip-1* 遺伝子をそれぞれ導入しウイルス発現ベクターを作成した。レトロウイルスパッケージング細胞である Plat-E 細胞にリン酸カルシウム法を用いてこれらのレトロウイルスベクターを遺伝子導入し、ウイルスを含む細胞上清を回収した。マウス脾臓細胞浮遊液を調製し、抗 CD3 抗体での刺激下でウイルスを感染させることで、*gilz, rtp801, mkip-1* 遺伝子高発現脾臓細胞を得た。これらの細胞に二次刺激を加え、各ストレス関連分子による IL-4 および IFN- γ サイトカイン産生への影響を ELISA 法により、また細胞増殖能をレザズリン添加により検討した。

4. 研究の特色

本研究は「ストレス負荷により免疫反応にどのような影響が生じるのか、また、個体差があるのはなぜか？」という問いを明らかにするために、免疫応答が TH2 偏向型の BALB/c マウス、TH1 偏向型の C57BL/6 マウスを用いて比較した。また、申請者は C57BL/6, BALB/c マウスにおける GR 遺伝子型の違いがストレス感受性やストレス負荷後に免疫細胞へ与える影響を調べるため、BALB/c マウスに C57BL/6 由来の GR を置換し GR 遺伝子以外の遺伝的背景を統一させた Cg マウス、C57BL/6 マウスに BALB/c 由来の GR を置換した Cg マウスをそれぞれ作成した。GR 遺伝子配列に着目し、Cg マウスを作成した研究は他にはない。

5. 研究の成果

拘束ストレスを3時間負荷したところ、*gilz, rtp801, mkip-1* の遺伝子の発現が誘導されたが、*trp53inp1, bnip3* の発現は誘導されなかった。さらに、1日5時間の拘束ストレスを五日間繰り返して、長期拘束ストレスを負荷した結果、上記3つの遺伝子と *trp53inp1, bnip3* の発現も誘導された。このように長期、短期ストレスにより増加する遺伝子の種類が異なることが明らかになった。BALB/c は C57BL/6 マウスと比較し、ストレス負荷後に多くのコルチコステロンを産生していた。また、短期ストレスで増加した *gilz, rtp801, mkip-1* の遺伝子発現は CRH KO マウスでは増加がみられないことからグルココルチコイド依存性であることが明らかとなった。GR Cg マウスを用いた結果、*gilz, rtp801, mkip-1* の遺伝子の発現増加は GR の遺伝型によらず、マウスのバックグラウンドに依存していることが示された。さらに、*gilz, rtp801, mkip-1* の遺伝子を T 細胞に強制発現させた結果、GILZ 強制発現 T 細胞では IL-4 サイトカインの増加が見られ、ストレスにより TH 細胞のバランスが TH2 へ分化する可能性が示唆された。

1) Koyanagi M, Arimura Y. Comparative expression analysis of stress-inducible gene in murine immune cells. *Immunol. Invest.* 2019 in press

16 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。

一方で、食品機能研究における動物実験のあり方に関する社会状況に大きな変化が生じており、多数の食品企業が動物実験を行わないことを宣言する状況となっている。そのために食品機能の研究に資する、動物実験を代替可能な *in vitro* 細胞実験系のさらなる拡充が求められてもいる。

そこで本研究では、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。本年度は腸管オルガノイド作製技術を利用した各種機能を有する腸管上皮細胞株の樹立を中心に研究を展開した。人為的に発現制御可能な不死化遺伝子発現系を、腸管上皮幹細胞あるいは腸管オルガノイド構築後の細胞に導入することで、各種機能を有する腸管上皮細胞株の樹立を目指した。

3. 研究の計画・方法

マウス小腸オルガノイドの調製

成体 BALB/c マウス小腸由来の陰窩 (クリプト) の培養で構築した腸管オルガノイドを凍結保存したものをを用いて、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。

各種機能を有するマウス小腸上皮細胞株の樹立

テトラサイクリン遺伝子発現制御システム (Tet システム) を用いて、不死化遺伝子 (SV40 LargeT 抗原遺伝子) を可逆的に発現制御可能なマウス小腸上皮細胞株の樹立を目指した (図1)。既に構築してある Tet-off 遺伝子発現調節系により SV40 ウイルス LargeT 抗原遺伝子を発現する組換え遺伝子を、レトロウイルスベクター系を用いて細胞に導入する。具体的には、Tetracycline response element (TRE) 下流に SV40 LargeT 抗原遺伝子を導入したプラスミド (pREV-TRE-TAg) と、CMV プロモーター下流に tetracycline transactivator (tTA) 遺伝子を導入したプラスミド (pREV-Tet-off) を用いた。それぞれのプラスミドをレトロウイルスパッケージング細胞株である PLAT-E 細胞に遺伝子導入し、組換え体レトロウイルスを作製した。

組換え体レトロウイルスを用いて次の2つの方法で遺伝子導入し、腸管上皮細胞株の樹立を試みる計画である。すなわち、(1) 小腸上皮幹細胞に遺伝子導入した後にオルガノイドを構築し、分化した細胞を増殖させる、(2) オルガノイド構築して生じた細胞に遺伝子を導入して増殖させる、の2つの方法を試みる計画である。

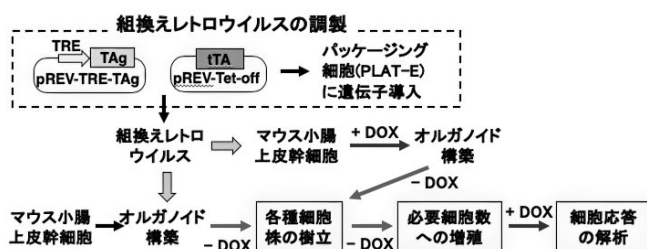


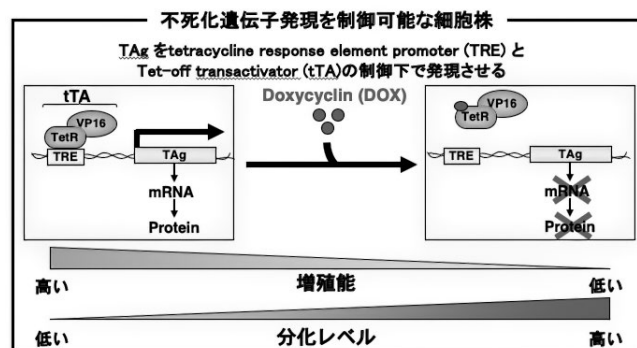
図1 研究の特色 腸管オルガノイドを利用した腸管上皮細胞株の樹立。機能性食品成分の腸管に対する作用を調べる目的で腸管オルガノイドを利用するための基礎的な技術を確立することを目指した研究である。その際に問題となるのが、三次元構造をもつ腸管オルガノイドはその内部が腸管腔にあたり、食品成分は内部から作用させないと腸管上皮細胞の正しい応答は観察できないという点である。それを解決する方法の一つとして、一度構築した腸管オルガノイドを平面培養上に再展開する方法が検討されており、その技術の確立も本研究の目的の一つである。

また本年度の研究において目指した方向性、すなわち腸管オルガノイド技術を利用することで、腸管上皮幹細胞から分化する各種上皮細胞種の細胞株を樹立することも、機

能性食品成分の作用解析に多いに役立つものと考えられる。著者らは、これまでに Tet システムを用いて、不死化遺伝子の発現を可逆的に制御可能なマウス小腸上皮細胞株の樹立を試みてきた。不死化遺伝子発現が on の状態で細胞を増殖させた後、発現 off の状態にすることでマウス小腸吸収上皮細胞株の分化状態を高めることができることを、予備的検討で確認している (図2)。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ができれば、腸管機能を調節する食品成分の探索、作用機構解析において極めて有用な実験系構築に資することになるものと考えている。

また、現在はマウスでの基礎的実験に留まるが、この方法をベースにヒト腸管上皮細胞株の構築にも繋げることも検討したい。さらに産業動物、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。

図2. 不死化遺伝子発現を制御可能な細胞株で想定される増殖能と分化状態の関係



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を確認した。

これまでに構築した2つのプラスミド、すなわち pREV-TRE-TAg と pREV-Tet-off を、それぞれリン酸カルシウム共沈殿法により、レトロウイルスパッケージング細胞株である PLAT-E 細胞に遺伝子導入した。各プラスミドには、IRES (internal ribosome entry site) の下流に GFP 遺伝子が導入されており、蛍光顕微鏡観察により遺伝子導入ができていたことを確認した。この細胞から産生される組換え体レトロウイルスを含む培養上清を回収し、-80℃で保存した。

本年度の研究では新規細胞株の樹立までには至っていな

いが、新しい環境でもこれらの細胞培養技術および遺伝子操作技術を再現可能な状況を確認できたことから、来年度以降の研究において新規細胞株の樹立を目指す準備を整えることができた。