

2019年度大学間連携等による 共同研究に係る研究成果報告書（麻布大学）

1 牛の産後子宮修復に関与する免疫関連シグナルの解析

1. 本学研究代表者

獣医学科 獣医薬理学研究室 講師 田島 剛
麻布大学研究代表者

獣医学科 獣医薬理学研究室 講師 福山朋季

2. 研究の目的

牛の生産において、牛の妊娠率を上昇させることは泌乳量の確保や産子数の増加など生産性の向上に不可欠である。一般に牛では分娩後子宮内で細菌感染が認められ、数週間で子宮内環境が修復されて次の妊娠に備えるが、細菌の排除が遅れると次回受胎率が低下する。近年その要因のひとつとして子宮内膜炎が注目されている。膣における異常分泌物が認められない潜在性子宮内膜炎の診断にはサイトブラシで子宮内膜を採取して多形核白血球（PMN）の浸潤を確認する細胞学的評価が行われてきた。しかしながら、診断基準は統一されておらず、この背景には、分娩後の子宮修復における子宮内膜での炎症細胞の動態が十分に明らかになっていないことが一因であると考えられる。さらに炎症期から組織修復へと進む過程で活性化される単核球（MNC）も子宮修復に関与する可能性があるが、子宮内膜でのMNCの出現動態を詳細に評価した報告はない。そこで本研究では、子宮修復過程において子宮内膜スミアに出現するPMNおよびMNCの推移を評価するとともに、これらを制御するシグナルに着目し、子宮内膜スミア中のサイトカインのmRNA発現について経時的な解析を行うことを目的とした。

3. 研究の計画・方法

泌乳中の乳用牛（ホルスタイン種；n=17、ジャージー種；n=2、エアシャー種；n=1、ブラウンスイス種；n=1）の延べ31頭を用いた。分娩週を0週とし、分娩後2～8週にサイトブラシによる子宮内膜の採取を行った。

＜内膜スミア塗抹の細胞学的検索＞スミア塗抹標本をメイギムザ染色後鏡検し、子宮内膜上皮細胞、多形核好中球（PMN）および単核球（MNC）数を計測し、各細胞の割合を算出した。

＜内膜スミアに発現する炎症関連シグナル mRNA 解析＞子宮内膜スミアにおけるCD4陽性T細胞（Th1、Th2、Th17およびTreg）の存在を確認するために、サイトブラシで採取した子宮内膜標本からtotal RNAを抽出し、これらが特異的に産生するINF γ 、IL4、IL17およびIL10のmRNA発現をリアルタイムPCRを用いて測定した。

4. 研究の成果

分娩後の子宮内膜におけるPMN比およびMNC比の

推移に注目すると、PMN比だけでなくMNC比も変動することが確認され、PMN比が低下する時期、つまり子宮内膜の炎症が終息する時期にMNC比が上昇するという現象が確認された。このことから、分娩後の子宮修復過程においてPMNだけでなく組織修復に関与するMNCも重要な役割を担っている可能性があると考えられた。さらに、4種類のCD4陽性T細胞が特異的に産生するサイトカインであるINF γ 、IL4、IL17およびIL10のmRNA発現が試験期間を通して検出されたことから、鏡検で観察されたMNCにはCD4陽性T細胞が含まれることが示唆された。

これらの知見は子宮内膜炎の治療方針決定に重要であるのみならず、発生予防や次回受胎率向上にも寄与するものとして期待される。

5. 研究発表

〔学会発表〕

- 1) ○小山 朔, 安川美弥, 井上拓馬, 佐藤玲奈, 松村知周, 吉村 格, 田島 剛, 水谷 尚, 味戸忠春, 三浦亮太郎. 乳牛における分娩後の子宮修復過程での子宮内膜の細胞学的検討. 第162回日本獣医学会学術集会: 2019年9月10日. つくば国際会議場(つくば市)

2 炎症性腸疾患モデルにおける皮膚・腸共通バリア機構と腸内エコロジーに関する研究

1. 本学研究代表者

獣医学科 獣医病理学研究室 教授 塚田晃三
麻布大学研究代表者

獣医学部獣医学科 生化学研究室 教授 山下 匡

2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎（AD）は掻痒を伴う慢性皮膚炎で、主要組織適合性複合体（MHC）型、皮膚のfilaggrin、ceramide代謝産物等が関係し、AD患者では炎症性腸疾患（IBD）の併発リスクが34%高い。本研究では、皮膚と腸における共通バリア機構低下に着目し、動物モデルを検索した結果、AD様モデルNC/Nga系において、Dextran Sulfate Sodium（DSS）誘導性腸炎に感受性が高いことを見出した。近年、我々はNC/Nga系の特異なMHC型を同定し、H-2^{nc}と名付けた。NC/Nga系の腸炎機序解明はIBD併発AD患者に貢献できると期待される。本研究では、1) 系統の腸バリア、2) MHC型、3) 腸内細菌叢について検証した。

3. 研究の計画・方法

野生型；BALB/c系（H-2^d）、C57BL/6系（H-2^b）、NC/Nga系（H-2^{nc}）、及びH-2 congenicマウス；BALB.

h2^{nc}(H-2^{nc})、NC.h2^b(H-2^b)、NC.h2^d(H-2^d)を用い、10日間の3%DSS飲水による腸バリア障害、0.2% sodium tungstate (NaW)添加による通性嫌気性菌の抑制、体重比、生存率、病理組織による腸炎感受性評価、糞便の次世代型シーケンス解析を行った。

4. 研究の成果

DSS腸炎の生存率は、BALB/c系では100%を、C57BL/6系では80%を、NC/Nga系では0%を示した。NC/Nga系H-2 congenic間では、体重減少は同様な推移を示すが、生存率はNC.h2^b(H-2^b)で50%、NC.h2^d(H-2^d)で80%であった。NaW添加による影響では、NC/Nga系で生存率50%まで回復し、一方、NC.h2^d(H-2^d)の生存率は影響しなかったが、逆に出血性の急激な体重減少が早期に観察された。炎症時の腸内細菌叢では*E.coli*と*C. cocleatum*の顕著な増加を認めた。このことから腸バリアの脆弱性に伴い、MHC型、腸内細菌叢が腸炎と関係することが示唆された。

5. 研究発表

[学会発表]

- 1) 塚田晃三. アトピー性皮膚炎と腸炎感受性に関する研究, 第2回ニチジュウシンポジウム, 2019/12/6, 日本獣医生命科学大学 E111.
- 2) 塚田晃三, 近内将記, 木邊量子. アトピー性皮膚炎マウスにおける腸炎と腸内エコロジーの役割. 第7回日本獣医病理学専門家協会(JCVP)学術集会, 2020/3/26, 宮崎市民プラザ.
- 3) 小室茉莉子, 永根大幹, 斉場遼介, 石川三友紀, 村上裕信, 岡本まり子, 山下 匡. スフィンゴリエリンは皮膚バリア機能を制御する. 第162回日本獣医学会学術集会, 2019/9/10-12, つくば国際会議場.
- 4) 水野愛理, 永根大幹, 引山 由, 相原尚之, 上家潤一, 岡本まり子, 山下 匡. 自己免疫性疾患におけるグルコシルセラミド合成酵素の機能解析, 第162回日本獣医学会学術集会, 2019/9/10-12, つくば国際会議場.

3 てんかん発作モニタリングシステムを用いた猫のてんかん発作検知技術の開発

1. 本学研究代表者

獣医学科 獣医放射線学研究室 教授 長谷川大輔
麻布大学研究代表者

獣医学科 小動物外科学研究室 准教授 齋藤弥代子

2. 研究の目的

麻布大学小動物外科学研究室の齋藤弥代子准教授が開発・特許を取得した犬のてんかん発作検知技術(てんかん発作モニタリングシステム)を、日本獣医生命科学大学獣医放射線学研究室の長谷川大輔教授が系統維持する家族性自然発症性てんかん猫に適用し、猫のてんかん発作やその

他の行動様式の加速度データを計測、収集し、猫の発作検知アルゴリズムを作成し、犬用のてんかん発作モニタリングシステムを再プログラミングすることで、猫用のてんかん発作モニタリングシステムの開発を目指す。再プログラミングには工学系研究者の協力を得ることが出来る。

3. 研究の計画・方法

日本獣医生命科学大学にて、家族性自然発症性てんかん猫(以下てんかん猫)に対しててんかん発作モニタリングシステムを適用する。てんかん発作の加速度データをてんかん猫3頭分、その他の行動様式の加速度データを可能な限り多くのてんかん猫から、1頭につき1時間分計測、収集を行う。収集後、麻布大学にてシステム内に記録された加速度データを抽出、発作検知アルゴリズムに必要な、てんかん発作と非発作(その他の行動様式)の「基準加速度データ」を作成する。新たに作成した基準加速度データを用い、猫の発作検知アルゴリズムを開発する。その後、犬のてんかん発作モニタリングシステムの開発に協力頂いた企業に、猫のアルゴリズムを再プログラミングすることを依頼、猫用のてんかん発作モニタリングシステムの試作機を開発する。開発後、再度日本獣医生命科学大学のてんかん猫に試作機を適用し、その効果を検証、必要に応じシステムを修正していく。修正は、麻布大学にてアルゴリズムを作り直し、再度協力企業にプログラミングを依頼することで行う。

4. 研究の成果

てんかん発作と、非発作(その他の行動様式)の加速度データはそれぞれ1頭と4頭から収集されている。てんかん発作を記録した1頭からは、4回のてんかん発作が記録されたため、その内1回のてんかん発作の加速度データを「てんかん発作の基準加速度データ(仮)」、4頭のてんかん猫から記録された非発作の加速度データを「非発作の基準加速度データ(仮)」とした。この2つの基準加速度データをもとに、仮の猫用発作検知アルゴリズムを開発し、まずはパソコンのファイル上でその精度を確認した。その結果、残り3回のてんかん発作の加速度データは、全て発作であると正しく判定され、猫においても発作の検出が可能であると考えられた。また、4頭のてんかん猫から記録された1時間分の非発作の加速度データも全てアルゴリズムで処理した結果、3/4頭にて発作の誤検知は認めず、1/4頭にて1時間の間に2回誤検知を認めた。今後も発作と非発作の加速度データを収集し、それらを基により精度の高い基準加速度データを構築することで、誤検知はより少なくなると考えられる。したがって、猫用のてんかん発作モニタリングシステムの開発も将来的に可能と考えられた。引き続き、効率よく発作と非発作の加速度データを収集するために、協力企業にもう1台てんかん発作モニタリングシステムの作成を依頼する予定であったが、先方の事情でそれが困難であった。そのため、新たに工学系研究者に協力を依頼し、往來の犬用のものと同じアルゴリズムを搭載したてんかん発作モニタリングシステムを開発した。現在はこ

の新たに開発されたシステムを使用し、加速度データの収集を継続している。

4 イヌ神経膠腫瘍発症に関与する IDH1 新規変異の検索と病態解析

1. 本学研究代表者

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

麻布大学研究代表者

獣医学科 教授 坂上元栄

2. 研究の目的

イソクエン酸脱水素酵素 (IDH) は、クエン酸回路においてイソクエン酸を α -ケトグルタル酸に変換する酵素である。ヒトでは脳腫瘍の一種であるグリオーマでは IDH1 タンパク質に機能変化をもたらす R132H 変異が多数報告されている。一方、イヌでグリオーマは中枢神経系腫瘍のうち髄膜腫に次いで発症頻度が高いとされているが、発症メカニズムと IDH1 変異についての研究報告は希少である。申請者はこれまでにイヌ IDH1 の翻訳領域全長をクローニングし、構造・機能解析および新規変異検索を行ってきた。また、自然界では未だ同定できていないイヌ IDH1 R132H 変異を人工的に作出し、ヒト同様の分子機能変化を再現した (2018 *J Vet Med Sci*; 2018 *Vet Res Commun*)。本共同研究では、イヌ IDH1 の新規変異検索とその細胞生物学的・臨床的意義の解明を目的とする。

3. 研究の計画・方法

イヌ IDH1 の新規変異検索を目的として、イヌのグリオーマ 5 例、軟骨肉腫 23 例、骨肉腫 8 例および乳腺腫瘍 9 例のパラフィン包埋切片より抽出したゲノム DNA を用い、PCR 法にて翻訳領域を包含するイヌ IDH1 遺伝子領域 (8 エクソン) を増幅し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。本解析により同定した新規変異を導入したイヌ IDH1 変異体を作製し、強制発現細胞での IDH 活性を測定した。さらに、今回同定した変異が IDH1 機能におよぼす影響について、タンパク質立体構造解析ソフト UCSF Chimera を用いた *in silico* 解析にて検討した。解析には Contact/Clash analysis を用いた。Contact/Clash analysis は、タンパク質内のアミノ酸を構成する原子間の物理的な距離に応じて発生する引力と斥力を解析する手法である。原子間の距離が適切な状態であると分子間力 (Contact) が生じ、距離が近すぎると斥力 (Clash) が生じる。アミノ酸置換は Dunbrack Rotemer 解析のアルゴリズムを用いて、置換アミノ酸の信頼性が最大値を示す角度で挿入した。その結果、明らかとなった IDH1 ダイマー形成におよぼす影響について、Mammalian Two-Hybrid (MTH) により、IDH1 ダイマー形成能力を評価した。

4. 研究の成果

イヌのグリオーマ 5 例、軟骨肉腫 23 例、骨肉腫 8 例、

乳腺腫瘍 9 例の腫瘍組織由来 IDH1 遺伝子配列を解析した結果、複数の軟骨肉腫サンプルで IDH 活性領域にアミノ酸置換を伴う新規変異を発見した。この変異は、他動物種では報告が無い新規部位のミスセンス変異だった。これまで、IDH1 イヌホモログ全翻訳領域における変異検索ツールは存在しなかったが、本研究で設計したプライマーを用いて、イヌ IDH1 の変異検索が可能となった。更に、腫瘍サンプル提供個体の血液より抽出したゲノム DNA での IDH1 遺伝子配列解析より、本変異は腫瘍細胞のみで生じた体細胞突然変異であることが同定された。

この変異について、タンパク質構造予測シミュレーションを行った結果、本変異は IDH1 ダイマー接合面付近の α ヘリックス近傍に位置し、周辺のアミノ酸と 19 個の Contact を持って分子構造維持に関わっている。本変異により側鎖構造が縮小したため、Contact 数が 9 個に減少し、特にダイマー結合面の α ヘリックス構成アミノ酸や隣接する β シート構成アミノ酸との Contact が消失した。これらの結果より、本変異はダイマー接合面付近の構造維持に影響を与えることが示唆された。IDH1 活性の指標である NADPH 産生能測定の結果、本変異は、IDH 活性を有意に低下させることが明らかとなった。

本研究では、IDH1 機能発現に重要なダイマー形成能を減弱させ、IDH 活性が低下するイヌ IDH1 変異を複数の軟骨肉腫症例から同定した。しかし、本研究での解析例は軟骨肉腫で 23 例、総数でも 45 例と少なく、本変異がどのような腫瘍でどのくらいの頻度で起こっているかを解析することは不可能であった。今後、グリオーマや軟骨肉腫を含むより多くの腫瘍症例で変異検索を行うことで、イヌ IDH1 変異と腫瘍発症の関連性をさらに詳細に解析できると考えられる。今後は、さらに解析数を増やすとともに、本変異と腫瘍発症の関係性について、 α -ケトグルタル酸代謝機構等について、生化学的検討をさらに進めていく必要があると考えるため、引き続きの支援を期待する。

5. 研究発表

[雑誌論文]

- 1) Uemura M, Ochiai k, *et al.* The canine RAD51 mutation leads to the attenuation of interaction with PALB2. *Veterinary and Comparative Oncology*: Epub. 2019. doi: 10.1111/vco.12542.
- 2) Tani H, ... Ochiai K, *et al.* Canine histiocytic sarcoma cell lines with SHP2 p.Glu76Gln or p.Glu76Ala mutations are sensitive to allosteric SHP2 inhibitor SHP099. *Veterinary and Comparative Oncology*: Epub. 2019. doi: 10.1111/vco.12544.
- 3) Uno Y, ... Ochiai K, *et al.* Molecular characterization of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH) associated with the erythrocyte antigens in dogs. *Canine Genetics and Epidemiology*: 6:9, 2019, eCollection. doi: 10.1186/s40575-019-0076-1.

〔学会発表〕

- 1) 植村光希，落合和彦他．イヌ RAD51 変異が複合体形成
におよぼす影響の検討．第 162 回日本獣医学会学術集
会，2019 年 9 月 10 日，つくば国際会議場．