

# 2020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 イヌ乳腺癌細胞に対するエンドトロフィン (ETP) と TEM8 の作用

### 1. 研究の所属・氏名等

獣医学科 獣医解剖学研究室  
准教授 添田 聡

### 2. 研究の目的

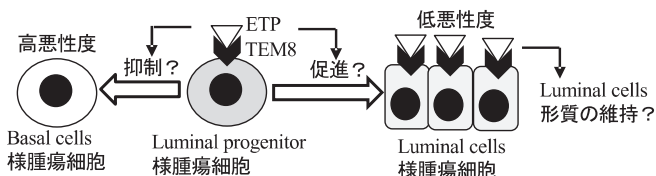
多くの腫瘍において、腫瘍細胞はある特定の分化段階にとどまった状態で増殖していると考えられており、その分化段階が腫瘍細胞の悪性形質の発現に深く関連していることが示唆されている。しかし、病変部内で腫瘍細胞の分化を制御している機構に関しては不明な点が多い。

tumor endothelial marker 8 (TEM8) は腫瘍内血管内皮細胞に高発現するインテグリン様の受容体型膜タンパクであり、腫瘍内血管の増殖を促進することが知られている。さらに、腫瘍細胞株を用いた研究では、TEM8 は腫瘍細胞自身にも発現し、リガンドであるエンドトロフィン (ETP) と結合することによって腫瘍幹細胞の増殖、腫瘍細胞の上皮間葉移行などを促進する。

我々は、イヌ乳腺癌および培養乳腺癌細胞株において、成熟乳腺上皮細胞 (luminal cells) と luminal progenitor の形質を持つ腫瘍細胞に TEM8 が優位に発現し、未分化な乳腺基底細胞 (basal cells) の形質を持つ腫瘍細胞ではほとんど発現しないことを明らかにし、さらに、培養乳腺癌細胞を用いた研究において、TEM8 は luminal progenitor から luminal cells への分化を促進し、basal cells への分化を抑制する可能性が示唆された (図1)。

本研究では、イヌ乳腺癌の腫瘍細胞の分化および悪性形質発現に対する TEM8 と TEM8 のリガンドであるエンドトロフィン (ETP) の作用を明らかにすることを目的として下記の研究を計画した。本研究の結果は、イヌ乳腺癌細胞の分化制御の研究に重大なインパクトを与えると共に、イヌ乳腺腫瘍の悪性度の診断指標と治療戦略に新たな知見を与えるものである。

図1 イヌ乳腺癌細胞に対する ETP/TEM8 の作用機序の仮説



### 3. 研究の計画・方法

①イヌ乳腺癌における TEM8 および ETP の発現と腫瘍細胞の分化度、組織学的悪性度との関連性を明らかにする。

イヌ乳腺癌病変部において、TEM8 と ETP が腫瘍細胞

の分化制御に関与している可能性を明らかにするため、イヌの悪性乳腺腫瘍 126 症例を用いて、受容体型と可溶型 (panTEM8) を共に認識する抗体、受容体型 TEM8 (TEM8-long) および ETP に対する抗体によって腫瘍細胞における発現を免疫組織化学的に解析する。さらに CK5、CK19、p63、 $\alpha$  SMA 免疫組織化学によって腫瘍細胞の分化段階を basal cells、luminal progenitor、luminal cells に分類し、TEM8 および ETP の発現と腫瘍細胞の分化度との関連性を解析する。また、panTEM8、TEM8-long および ETP の発現と組織学的悪性度との関連性を検索する。

② TEM8 および ETP のイヌ乳腺癌細胞の分化制御機構に対する作用を明らかにする。

我々は、新たに TEM8 および ETP を高発現し、Luminal progenitor の形質を示すイヌ乳腺癌の細胞株を樹立した。本細胞株、および luminal cell の形質を持つイヌ乳腺癌細胞株を用いて ETP の添加、およびゲノム編集による TEM8 遺伝子発現の抑制を行い、luminal progenitor から luminal cell あるいは Basal cell への分化に対する ETP と TEM8 の作用を解析する。

### 4. 研究の特色

乳腺腫瘍では、管腔構造を形成し luminal cell の形質を持つ低悪性度の腫瘍と、管腔構造を形成せずに充実型の増殖を示し basal cell の形質を持つ高悪性度の腫瘍が、共に luminal progenitor から分化することが明らかとなっている。このため、luminal progenitor からの分化の制御機構の解明は、乳腺腫瘍の悪性化のメカニズムを明らかにする上で非常に重要である。イヌ乳腺腫瘍細胞の luminal progenitor の分化に対する TEM8 と ETP の作用を解明することによって、腫瘍の悪性化をターゲットにした新たな治療方法の知見が得られるものと考えられる。また、TEM8 や ETP は、乳腺腫瘍の悪性と良性を識別するための有用な手マーカーに成る可能性が示唆される。

### 5. 研究の成果

研究① イヌ乳腺癌における TEM8 および ETP の発現と腫瘍細胞の分化度、組織学的悪性度との関連性を明らかにする。

本研究の結果、TEM8-long と ETP を共発現 (TEM8-long+/ETP+) する腫瘍細胞は、組織学的悪性度が低く、少ない核分裂数を示す乳腺癌に有意に多く (Table 1)、さらに、大部分が CK5+/CK19+ の carcinoma-simple tubulopapillary type であった (Table2, Figure1, 2)。しかしながら、管腔構造と充実型の増殖巣が混在しているより悪性度の高い腫瘍においては、管腔構造は大部分の carcinoma-simple tubulopapillary type と同様に CK5+/

CK19+ を示し、TEM8-long を発現していたが、ETP の発現は認められなかった。(Table 3, Figure 3)

以上の結果から、TEM8-long と ETP は、CK5+/CK19+ の Luminal progenitor 様の低悪性度の腫瘍細胞に共発現するが、充実型構造への進展が示唆される腫瘍では管腔構造で ETP の発現が消失することが明らかとなった。このため、ETP/TEM8-long はオートクラインシグナリングによって luminal progenitor 様の形質の維持に関与しており、ETP の消失によって充実型の増殖が促進され、高悪性度の腫瘍へと変化する可能性が示唆された。

本研究の結果は、第 126 回日本獣医学会学術集会にて発表予定である。

## 研究② TEM8 および ETP のイヌ乳腺癌細胞の分化制御機構に対する作用を明らかにする。

本研究では、CK19 と TEM8 を発現し、CK5、p63 および  $\alpha$  SMA を発現していない Luminal cell 様の形質を持つイヌ乳腺癌細胞株を用いて、腫瘍細胞の分化に対する ETP の作用を検索した。

リコンビナント ETP (1  $\mu$ g/ml) の添加によって、Luminal progenitor で高発現する *CD49b* と *CD44* mRNA の増加、および成熟した luminal cell で高発現する *EpCAM* mRNA の減少が認められた。さらに、*TEM8* mRNA の増加が認められた (Figure 4)。

この結果から、ETP は成熟した乳腺上皮細胞である luminal cell の形質を持つ乳腺癌細胞を、より未分化な luminal progenitor へと変化させる可能性が示唆された。さらに、ETP は TEM8 の発現を促進することによって、ETP/TEM8 のシグナリングをより増強させる作用を持つ

Table 1. Association of panTEM8, TEM8-long and ETP expression with histological malignancy in canine mammary gland carcinomas

		N	panTEM8+	TEM8-long+	ETP+	TEM8-long+/ETP+
Histological grade	I	56	41 (73.2%)*	26 (46.4%)*	35 (62.5%)*	20 (35.7%)*
	II	43	20 (46.5%)	11 (25.6%)	15 (34.9%)	9 (20.9%)
	III	27	7 (25.9%)	4 (14.8%)	4 (14.8%)	1 (3.7%)
Mitotic index	0-9	72	53 (73.6%)*	32 (44.4%)*	44 (61.1%)*	26 (36.1%)*
	10 $\leq$	54	15 (27.8%)	9 (16.7%)	10 (18.5%)	3 (5.6%)

\*:  $P < 0.001$

Table 2. Association of TEM8-long / ETP co-expression with CK5 / CK19 co-expression in tumor cells of canine mammary gland carcinomas.

	N	CK5+/CK19+	Others
TEM8-long+/ETP+	30	22 (73.3%)*	8 (26.7%)
Others	96	20 (20.8%)	76 (79.2%)

\*:  $P < 0.001$

Figure 1. Expression of TEM8-long, ETP, CK5 and CK19 in a carcinoma-simple tubulopapillary type.

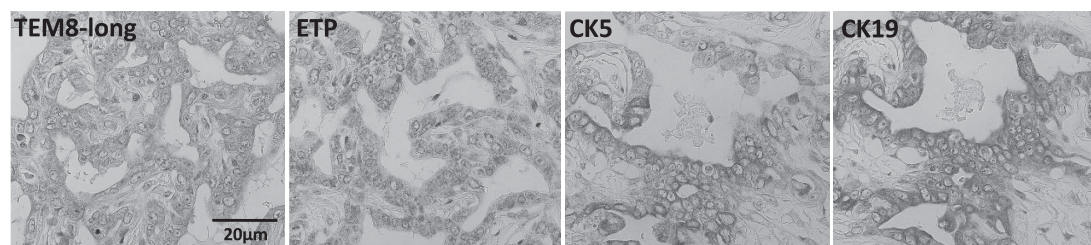


Figure 2. Co-expression of TEM8-long and ETP in a carcinoma-simple tubulopapillary type.

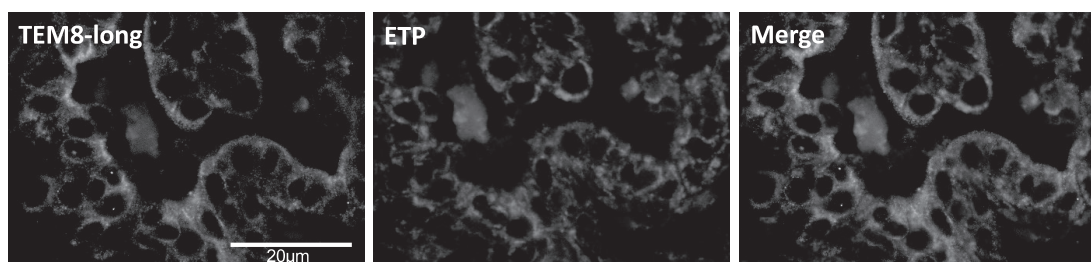
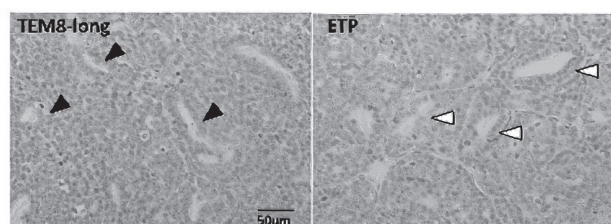


Table 3. Expression of TEM8-long, ETP, CK19 and CK5 in luminal structures within carcinoma-solid.

N	TEM8-long	ETP	TEM8-long+/ETP+	CK5	CK19	CK5+/CK19+
19	14 (74.4%)	4 (21.1%)	4 (21.1%)	14 (74.4%)	19 (100%)	14 (74.4%)

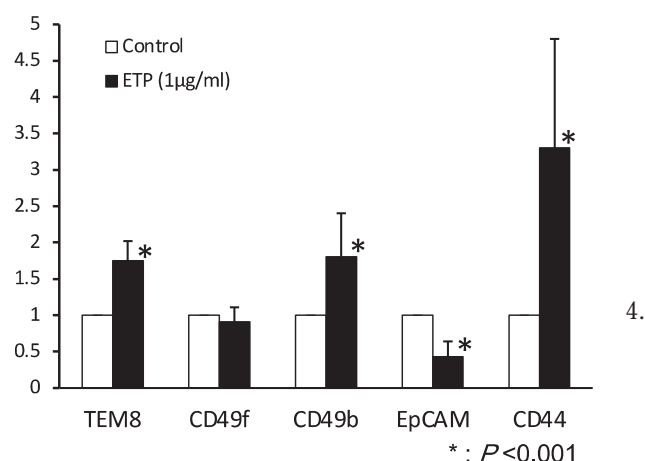
Figure 3. Expression of TEM8-long, but not ETP, in luminal structures within a carcinoma-solid.



ものと考えられた。

研究①および②の結果、イヌ乳腺腫瘍細胞において、ETP/TEM8は、オートクライン機構によって、luminal progenitorの維持、およびluminal cellからluminal progenitorへの変化を促進していることが示唆された。

Figure 4. Effects of ETP on mRNA expression of TEM8, CD49f, CD49b, EpCAM and CD44



## 2 イヌ肥満細胞腫の悪性化および分化に対する血管内皮増殖因子の作用

### 1. 研究の所属・氏名等

獣医学科 獣医解剖学研究室  
助教 黄 美貴

### 2. 研究の目的

イヌ皮膚肥満細胞腫 (MCT) における血管内皮増殖因子 A (VEGF-A) / 受容体 Flk-1 シグナルの MCT 細胞の分化および悪性化に対する作用機構を解明することを目的とし、下記の点を明らかにする。

① 肥満細胞の分化に対する VEGF-A および VEGFRs の機能

② イヌ MCT における VEGF-A・VEGFRs と腫瘍細胞の分化及び分化制御因子の発現との関連性

③ MCT 細胞の分化制御および悪性形質発現に対する VEGF-A・VEGFRs の作用機序

### 3. 研究の計画・方法

本年度は、肥満細胞の分化段階での VEGFRs (Flk-1 と Flt-1) の作用を解析するために、mBMMC 及び新規樹立細胞株を用いて、VEGF-A の添加、VEGFRs の発現抑制及び VEGF-A の結合阻害を行い、GATA2、PU1 および MITF 等の分化制御因子に与える影響を解析する。また、MCT 症例の悪性度、分化度、VEGF-A・VEGFRs 発現と肥満細胞分化制御因子の発現について免疫組織化学的な解析を実施する。

### 研究の特色

イヌの皮膚 MCT はイヌで高頻度に認められる腫瘍である。高悪性度の MCT では未分化な肥満細胞の形質を維持しており、分化を抑制している因子が腫瘍の悪性化に深く関与しているものと考えられる。しかしながら、MCT の悪性度と関連する分化制御因子は明らかではない。申請者はこれまでに、肥満細胞の分化初期においてのみ血管内皮増殖因子 A (VEGF-A) およびその受容体 Flk-1 が発現し、分化を抑制している可能性を示唆した。さらに、これらが高悪性度の MCT において有意に発現する研究結果を得てきた。このため、イヌ MCT では VEGF-A/Flk-1 の作用によって分化が抑制され、悪性形質を発現している可能性が示唆される。

### 5. 研究の成果

悪性度の高いイヌ MCT 症例において、免疫組織化学によって VEGF-A および Flk-1 の有意な発現が認められた ( $p < 0.05$ ) が、一方で、Flt-1 の発現は悪性度との関連は認められなかった。そこでさらに、VEGF-A および Flk-1 の両方の発現が陽性であった症例で、VEGF-A および Flk-1 の発現を蛍光二重免疫組織化学で検索したところ、同一の腫瘍細胞において VEGF-A および Flk-1 の両方の発現が認められた (図1)。これらのことから、MCT の悪性化には、VEGF-A/Flk-1 が関連していること、また VEGF-A/Flk-1 がパラクリンだけでなくオートクリンでも腫瘍細胞に作用していると考えられた。



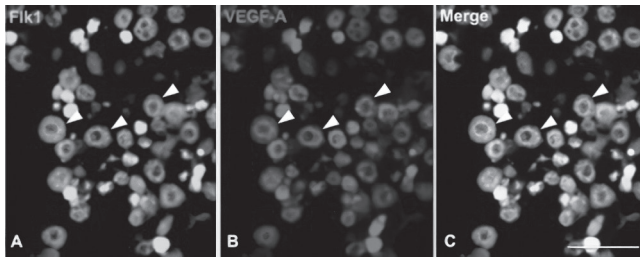


図1 VEGF-A および Flk-1 の MCT での共発現  
(白矢頭：腫瘍細胞)

分化段階初期と考えられる培養初期の mBMMC において VEGF-A および Flk-1 の発現が認められ、培養後期には Flk-1 の発現は認められなくなった。そこで、Flk-1 の発現が認められる時期の mBMMC に対して VEGF-A または Flk-1 阻害剤の添加実験を行なった。その結果、Flk-1 のリン酸化を阻害すると、肥満細胞の分化関連因子である GATA2、PU.1 や c-Kit の発現増加傾向が認められた (図 2)。これらの結果から、VEGF-A/Flk-1 のシグナリングは肥満細胞の分化抑制に関与している可能性が示唆された。一方で、新規樹立肥満細胞株では受容体である Flk-1 の発現は認められず、VEGF-A の発現のみが認められた。このことから、新規樹立細胞株は分化段階後期の形質を示す細胞であると考えられた。

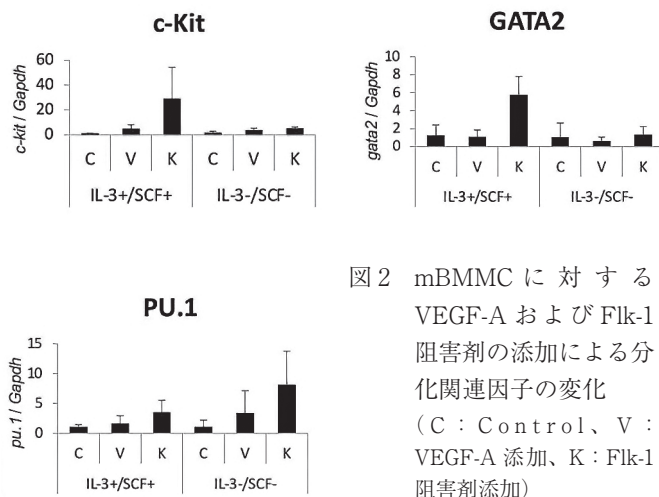


図2 mBMMC に対する VEGF-A および Flk-1 阻害剤の添加による分化関連因子の変化  
(C : Control、V : VEGF-A 添加、K : Flk-1 阻害剤添加)

以上のことから、肥満細胞の分化ならびに、MCT の悪性化への VEGF-A/Flk-1 の関連が示唆された。特に、mBMMC において VEGF-A/Flk-1 シグナリングは分化の調節に関与していると考えられ、MCT においては VEGF-A/Flk-1 シグナリングが腫瘍細胞を分化度の低い状態に維持することで悪性化に関与しているのではないかと考えられる。そのため、今後より詳細な VEGF-A/Flk-1 シグナリングの分化への関与について解析を行なう必要がある。

### 3 糖尿病リスクとしての腎臓アンバランスに関する研究

#### 1. 研究の所属・氏名等

獣医学科 獣医生理学研究室

教授 鈴木浩悦

#### 2. 研究の目的

腎臓サイズの増大を伴う非肥満性 2 型糖尿病ラットにおいて、糖尿病の発症メカニズムを明らかにするために、腎臓と脾臓の遺伝子発現を網羅的に解析する。1 年目に動物を生産し、糖尿病発症の有無を確認しながら、腎臓と脾臓の RNA を採取し、2 年目に RNA-seq 解析を行う。

#### 3. 研究の計画・方法

1 年目としては、糖尿病発症を発症する雄と雌を交配することで、糖尿病発症動物を生産し、糖尿病の発症の前後で動物を屠殺し、腎臓と脾臓から RNA を採取し、凍結保存する。

#### 4. 研究の特色

新規の糖尿病ラットを用い、糖尿病の発症に関する新規の仮説を検証しようとする点に特色がある。

#### 5. 研究の成果

解析に必要な RNA サンプルを採取した。

#### 投稿論文

- 1) Cellular Expression and Subcellular Localization of Wwox Protein During Testicular Development and Spermatogenesis in Rats (J Histochem Cytochem 2021, 69: 2576-270)
- 2) Empagliflozin ameliorates symptoms of diabetes and renal tubular dysfunction in a rat model of diabetes with enlarged kidney (DEK) (PloS One 2021, 16: e0251135)

### 4 スンクスレプチンの 3 アミノ酸挿入 (VPQ 挿入) がレプチン機能に与える影響の検討

#### 1. 研究の所属・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

脂肪萎縮症は、合併症としてインスリン抵抗性、糖尿病および脂質代謝異常などを生じる。脂肪細胞由来のホルモンであるレプチンは、脂肪萎縮症の病態生理に重要な役割を果たすと考えられており、特に脂肪萎縮症で見られるインスリン抵抗性には血中レプチン濃度の低下が大きく影響していることが知られている。

スンクス (*Suncus murinus*) は人間の脂肪萎縮症に似て体脂肪が非常に少ない実験動物であるにも関わらず、インスリン抵抗性や脂質代謝異常を起こさずに生活していることは大変興味深い。そして、このスンクスの成熟レプチンは他の哺乳動物種のレプチンの一次配列と高い相同性を示

す一方で、他の哺乳動物では全く認められない3つのアミノ酸残基 VPQ の挿入があることを我々は見出している。しかし他の哺乳動物には認められない VPQ の挿入がレプチンの生理学的・病態学的にどのような役割を果たしているのかは不明である。

そこで本研究ではスンクスレプチンの生理的な役割および病態への影響を推測することを目的として、まずレプチン作用の起点となる1) スンクスのレプチン受容体 (Ob-R) の構造を明らかにし、さらにレプチンと Ob-R との結合能を調べるために、2) 野生型組換えレプチン (VPQ 挿入あり) と VPQ 欠損組換えレプチンを作成し、その受容体との結合能の比較検討を行うことで、スンクスに特有な3アミノ酸残基の挿入が生理作用や病態形成に及ぼす影響を検討する。

### 3. 研究の計画・方法

まず研究目的の1)で示したように、スンクスのレプチン受容体 (Ob-R) 一次構造を明らかにすることで、受容体側の動物種差の有無を検討する。これまでに報告されている他の動物種のレプチン受容体には6種類のサブタイプ (Ob-Ra ~ Ob-Re) の存在が知られている。その中でロングフォームの Ob-Rb は唯一、細胞内ドメインを有しており細胞内へのシグナル伝達に重要な働きをするサブタイプである。Ob-Rb 以外の他のサブタイプは同じ遺伝子からのオルタネイティブスプライシングによって作られることから、まずはロングフォームである Ob-Rb の塩基配列とその転写産物である受容体のアミノ酸一次配列を明らかにする。得られた配列を他の動物種のレプチン受容体一次配列と比較し、スンクス特有の構造上の差異の有無を検討する。

次に、すでに一次構造を明らかにしているスンクスレプチンを野生型組換えタンパク質として大腸菌で発現させる。さらに、スンクスのみで見られる VPQ の3アミノ酸の挿入部位を人為的に欠損した組換え体、つまり他の動物種と同じ長さになるように揃えたレプチン遺伝子を作成し、同様に大腸菌で欠損型組換え体として発現させる。

1)の実験で得られたレプチン受容体一次配列を元に、可溶性受容体と言われるショートフォームの Ob-Re の構造を決定する。この Ob-Re はロングフォームである Ob-Rb のうち細胞外領域に相当するアミノ酸配列しか持たず、生体内では分泌型として血中に存在し、血中のレプチンと結合すると考えられている。このスンクス Ob-Re を組換え体として発現させ、この組換え Ob-Re と野生型および欠損型レプチンとの結合能の違いを免疫沈降法あるいは ELISA 法によって測定する。さらに、VPQ 欠損レプチンやマウスなど他の動物種のレプチンとの結合能の比較を同様に行うことで、スンクスレプチンの生体内での受容体結合能の違いによる生理機能発現への影響を比較する。

これらの結果を比較することで、スンクスレプチンと受容体の結合能の違いが、スンクスに脂肪萎縮症の症状を示さない理由を明らかにするための1つのステップになると考えている。

### 4. 研究の特色

本研究の第一の特色は、ユニークな実験小動物であるスンクス (*Suncus murinus*) を利用している点である。目的の項でも述べたように、スンクスは体脂肪が非常に少ない動物であり、特に内蔵脂肪はほとんど目視では確認できない程度にしか存在していない。ヒトでは先天性あるいは後天性に脂肪組織が欠損するとインスリン抵抗性や脂肪肝などの症状を呈する脂肪萎縮症を生じるが、スンクスは体脂肪が少ないにも関わらず脂肪萎縮症の症状は示さない。我々は脂肪萎縮症で病態形成に重要なホルモンであるレプチンに着目し、スンクスレプチンの遺伝子クローニングを行い、スンクスが他の動物種には見られない3アミノ酸残基の挿入を持っていることを既に報告している。

そこで本研究では、この挿入が生理的あるいは病態学的にどのような役割を果たしているのかを明らかにすることを目指して解析を進めている。現在までに得られたデータでは、レプチン受容体に他の動物種との大きな差異は認められていないが、本研究で得られるデータはヒトの脂肪萎縮症の病態解明に貢献し、さらに治療法の探索などのモデル動物としてスンクスが利用できる可能性を検討することができることなど、発展性のある研究課題と言える。

スンクスは日本で実験動物化された小動物であるが、その産子数の少なさなどから飼育施設が少なく、また購入手段も限られているために利用者は少ないのが現状である。多くの研究者は、ゲノムデータベース解析に利用された KAT 系のスンクスを利用しているが、我々が使用しているスンクスは KAT 系よりも一回り大型のスンクスである BK 系であり、このスンクスを現在、繁殖維持している研究機関は本学を含めて2~3か所と言われている。この点は、重要かつ貴重な研究用バイオリソースとして本学の特色にもなり得ると確信する。

### 5. 研究の成果

実験1)では、雄の BK 系スンクス鼠径部皮下白色脂肪組織から抽出した total RNA を用いて、SMARTer<sup>®</sup> RACE 3'/5' キット (タカラバイオ) によりスンクスレプチン受容体の cDNA クローニングを実施した。既存のスンクスゲノムデータベース (非公開) を利用して推定レプチン受容体配列を検索し、得られた配列を基に他の動物種でも保存性の高い領域に PCR プライマーを設計した。PCR で増幅した断片を1%アガロースゲルで電気泳動を行った後に切り出し、精製した DNA 断片を In-Fusion クローニングによりベクターに組み込んで大腸菌を形質転換した。得られたクローンからプラスミドを抽出し、サンガー法にて塩基配列の解析を行った。

未だ部分配列の解析までしか終えていないが、PCR で得られた断片より、これまでに cDNA 配列の約820塩基を決定し、その配列がコードする273アミノ酸残基を確定した。

データベース上での解析より、スンクスゲノムデータベース上の解析ではゲノムデータとなっている KAT 系スンクスの推定 LEPR アミノ酸配列と比較すると、解読済み

断片の N 末端側から 64 番目が BK 系ではメチオニン、KAT 系ではバリンになっている点が違うのみであった。一方で他の動物種との比較においてはブタ (*Sus scrofa*) のレプチン受容体と高い相動性が認められた。273 アミノ酸残基のうち、232 アミノ酸が全く同一であり、またアミノ酸置換スコアが正の割合は 92 % であり、非常によく保存されていると考えられる。さらにマウス (*Mus musculus*) の配列とは 225 アミノ酸が同一であり相動性は 82 %、ヒト (*Homo sapiens*) の配列とは 224 アミノ酸が同一であり相動性は 82 %、アミノ酸置換スコアが正の割合は 91 % (マウス)、90 % (ヒト) となっていた。

なお、この配列は細胞外ドメインに相当するため、この領域においてはレプチンとの結合に大きな支障をきたすと思われるような重大な変異は確認できていない。今後はさらに Ob-Rb cDNA の 5' 末端および 3' 末端側の塩基配列を解析し、スンスレプチン受容体 Ob-Rb の全長アミノ酸配列を確定する予定である。

続いて実験 2) であるが、まず野生型のスンスレプチン大腸菌で発現させるために、発現用ベクターである pET-23a に組換えを行った。レプチン前駆体の配列のうち、N 末端側の 21 アミノ酸残基はシグナルペプチドと予測されるため、それ以降の配列を発現するようにベクターに組み込んだ。さらに精製に利用するため、C 末端側には 6 個のヒスチジンタグ配列を持つようにした。

まず、通常発現用大腸菌である BL21 (DE3) pLysS を用いて 37℃ での振盪培養による発現を行ったところ、対数増殖期に発現誘導のために 0.4M IPTG を添加してから 3 時間の培養で十分な組換えタンパク質の発現が認められた。菌体を BugBuster で溶解後、その可溶性成分と不溶性成分を 15 % SDS-PAGE で解析したところ、目的発現タンパク質はすべて不溶性画分に存在することが明らかとなり、本条件で発現誘導を行った場合には不溶性の封入体となることが判明した。

次にジスルフィド結合効率が高く、レアコドンが添加されている大腸菌株である Rosetta-gami 2(DE3)pLysS に変更して発現誘導を試みた。37℃ での発現では、BL21 株と同様に、組換えレプチンはすべて不溶性画分に認められた。さらに同じ大腸菌株を用いて 16℃ での低温培養による発現を試みたが、誘導開始から 72 時間の培養でも改善が認められず、結果的には封入体として不溶性画分に発現が認められた。

本研究では受容体とレプチンとの結合効率を検討することが目的であるため、可溶性のレプチンが必要となる。封入体を界面活性剤等で溶解後にリフォールディングさせることも可能ではあるが、なるべく自然に可溶化できる条件が望ましいことから発現に使う宿主菌を変えて検討を続けることにした。そのため現在は、この点を改善すべく大腸菌での組換え体発現から、高効率分泌発現を特徴とする

*Brevibacillus* 発現系を用いた菌体外へ分泌発現を試みている途中である。

## 5 犬個別化がん免疫療法に向けたワクチン用 adjuvant 開発

### 1. 研究の所属・氏名等

獣医学科 獣医病理学研究室

教授 塚田晃三

### 2. 研究の目的

これまで、申請者は、犬の様々な悪性腫瘍（悪性黒色腫、下顎腺癌、乳腺癌、扁平上皮癌、線維肉腫、肥満細胞腫、血管肉腫、鼻腔未分化癌など）に発現する survivin 分子を標的にしたがん免疫療法の開発に取り組んできた。

1) DLA-88 型特異的がん抗原ペプチドの同定：犬の MHC class I 型のうち DLA-88 型 (143 種類) に提示される survivin の断片 (各種 9 アミノ酸からなる) に反応する CD8<sup>+</sup> T 細胞の活性化の有無で検証し、特定の DLA-88 型に結合できるペプチド断片を明らかにした (特願 2017-215945)。これにより犬個別別に DLA-88 型検査を実施し、それに適合するペプチドを用いたがん免疫療法が可能になった。

2) adjuvant 成分の選別：ワクチン接種で有効な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導し、がん細胞を殺すためには、樹状細胞の抗原貪食作用及び MHC class I への cross-presentation に重要な役割のある adjuvant 成分が鍵となる。様々な Toll 様受容体 (TLR) を刺激する成分を検証した結果、リボ多糖、リボペプチド、Pam3CSK4、flagellin、丸山ワクチン成分アラビノマンナン (SSM)、プロボリスでは、延命効果を示すものの全ての個体は肺転移を起こして死亡したのに対し、CpG-ODN では一部の個体 (20% ~ 40%) に完全寛解を示した。

そこで、本研究では、マウス大腸癌肺転移モデルを用いて、がん転移の完全寛解のメカニズムを探り、CpG-ODN に着目して様々な CpG 配列パターンを検証し、100% 防衛できる adjuvant の開発を目指す

### 3. 研究の計画・方法

#### 1) 大腸癌肺転移モデルを用いた adjuvant 成分の検証

BALB/c マウスを用いたがん肺転移モデル (luciferase 遺伝子を導入した大腸癌株 CT26 の静注後の肺転移を IVIS-Imaging 装置でモニタリング可能にした方法) を既に確立したことより、この系を用いて完全寛解できる adjuvant 成分を選別する。以下に、検証予定の CpG-ODN を列記する。

1) 市販商品 D35 (GCTGCATCGATGCAGGGGGG)

--- 全塩基 S 化

2) ODN1760 (ATAATCGACGTTCAAGCAAG)

--- 全塩基 S 化

3) ODN1826 (TCCATGACGTTCTTGACGTT)

--- 全塩基 S 化



- 4) ODN2006 (TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT)  
--- 全塩基 S 化
- 5) ODN2395 (TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCGCCG)  
--- 全塩基 S 化
- 6) HSVgD ODN (CTAACCGGAACGCACCACACA)  
--- 全塩基 S 化

CT26 株のがん抗原ペプチド: AH1 (SPSYVYHQF) または survivin (FCFKELEGW) を用い、上記の adjuvant 成分と IFA (Incomplete Freund's adjuvant) の混合ミセルをマウス両足 foot-pad に 2 回ワクチン接種する。

大腸癌株 CT26 を尾静脈より静注し、血行性肺転移を導く。経時的観測により肺転移の生着を評価する。

## 2) 完全寛解の機序解析

完全寛解したマウスに CT26 株を何回静注しても全く肺に生着しないが、このマウスの拘束ストレス後に CT26 株を静注すると肺への生着が認められる。ストレスによる免疫抑制との関連が示唆されたことから、完全寛解した個体に対し、a) 抗 CD4 抗体を投与して CD4<sup>+</sup> T 細胞の除去後に CT26 株を静注する場合、b) 抗 CD8 抗体を投与して CD8<sup>+</sup> T 細胞の除去後に CT26 株を静注する場合、c) 抗 CD25 抗体を投与して T<sub>reg</sub> 細胞の除去後に CT26 株を静注する場合、d) 抗 Fc 抗体を投与して抗体依存性傷害活性細胞 (ADCC) を抑制後に CT26 株を静注する場合など、を検証して完全寛解に関与する免疫系細胞を特定し、そのメカニズムを探る。

## 4. 研究の特色

本研究の特徴は、がんワクチンに効果的な完全寛解を誘導できる adjuvant 成分を検証し、完全寛解したマウスにおける免疫機構に重要な役割を有するリンパ球系タイプの関与を捉える点である。完全寛解の仕組みを解明することにより、効果的ながん免疫の誘導法が確立され、がん疾患の治療に大きく貢献することが期待される。

## 5. 研究の成果

検証した 6 種の CpG-ODN adjuvant のうち最も効果を示したのは ODN2006 で、完全寛解した個体は、8 匹中 3 匹 (37.5%) であった。一方、D35、ODN1826、ODN2395、HSVgD ODN では 10 ~ 26 日間の延命効果はみられたものの、最終的に全滅した。また、完全寛解したマウスに各抗体を投与し、一時的に除去して、CT26 株腫瘍の拒絶免疫への影響を調べた結果、抗 CD8 抗体および抗 Fc 受容体抗体では何も起きなかったが、抗 CD4 抗体投与で、3 週後に CT26 株腫瘍の肺および全身転移を確認した。このことにより、腫瘍拒絶免疫の維持には、CD8<sup>+</sup> T 細胞および抗体依存性傷害活性細胞ではなく、CD4<sup>+</sup> T 細胞が重要な役割があることが示唆された。

## 6 猫の乳腺癌のオルガノイド培養法の確立

### 1. 研究の所属・氏名等

獣医学科 獣医病理学研究室

助教 町田雪乃

### 2. 研究の目的

猫の乳腺腫瘍は総腫瘍の中で 3 番目に多く発生し、90% が悪性で、全生存期間の中央値は 8-12 ヶ月と極めて臨床挙動が悪い。乳腺癌の大きさは予後と関連があるが、犬とは異なり病理組織学的な分類が予後との相関など、未だに不明な点が多い。

近年、分化能および自己複製能を有する癌幹細胞が乳癌をはじめとして白血病、肺癌など様々ながん種で報告されている。癌幹細胞は化学療法や放射線療法に抵抗性を示し、癌の再発の原因になる。それゆえ、癌幹細胞をターゲットとした分子標的薬の研究開発が国際的に盛んに行われている。申請者らのグループは株化癌細胞を用いて猫の乳癌幹細胞研究をおこなっており、①細胞表面抗原の CD44 陽性かつ CD24 陰性の細胞集団、②アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) が高い細胞集団に癌幹細胞が濃縮され、高い腫瘍形成能を有することを明らかにしている (Vet. Immunol. Immunopathol., 2013)。

オルガノイド培養は癌幹細胞および癌幹細胞から分化したがん細胞からなる器官様構造を形成し、原発巣の状態を反映させた培養法であり、近年注目を浴びている。オルガノイドはマトリゲルなどの基質内で細胞を三次元培養し、増殖因子などを組織ごとに調整して培養液に添加し、生体を反映した環境下で培養する。オルガノイド培養法では、継時的な器官様構造の観察が可能であるため、発症機構の解明だけでなく、抗癌剤のスクリーニングや発癌解析などに有用な研究ツールである。

本研究では、猫の乳腺癌の臨床検体を用いて原発巣を反映したオルガノイド培養法を樹立し、オルガノイドを形態学的、免疫組織学的に解析する。最終的に、極めて臨床挙動の悪い猫の乳癌に対する新規治療法開発のための基盤構築を目指す。

### 3. 研究の計画・方法

- ・ 本学動物医療センターで外科切除された生検検体を、病理診断用に採材後、残りの材料から培養用に腫瘍部と非腫瘍部を採材する。
- ・ 組織片を細断し、コラゲナーゼ処理によって細胞を単離する。マトリゲルで細胞を固め、培養液を添加する。培養液にはニッチ因子の Rspondin1、EGF (上皮成長因子)、Noggin (BMP4 拮抗物質)、A83-01 (TGF- $\beta$  拮抗物質)、ROCK 阻害薬が必要であるため、添加する。
- ・ 各オルガノイドの特性解析

オルガノイドはセルパック (寒天ブロック) を作製して病理解析する。①乳腺正常部オルガノイド、②乳腺癌オルガノイドについて以下を評価する。

#### a) 病理組織学的解析

HE 染色にて、細胞異型、組織異型を評価する。通常オルガノイドは単層上皮の構造体であるが、癌化オルガノイドは多層化などの所見がみられると報告されている。

#### b) 免疫組織学的解析

乳腺上皮細胞マーカーの Cytokeratin AE1/AE3、筋上皮マーカーの p63、 $\alpha$  SMA の発現を調べる。また、癌化によって発現が亢進し、癌細胞の増殖・維持に重要な働きを示す受容体型チロシンキナーゼの EGF 受容体、HER2 受容体、下流のシグナルのリン酸化 Akt (抗アポトーシス作用と自己増殖)、リン酸化 ERK (自己増殖など)、 $\beta$  カテニン (上皮間葉転換など) の免疫染色を実施し、発現の有無を解析する。

#### 4. 研究の特色

本研究の目的はオルガノイド培養を用いて原発巣を反映した器官様構造を作出し、猫の乳腺癌の新規治療法開発のための基盤構築をすることである。

オルガノイド培養法によって原発巣を反映した癌細胞集団を得ることによって、抗癌剤のスクリーニングの精度上昇や、ゲノム編集技術、ニッチ因子への依存度を応用した多段階発癌プロセスの研究などがなされている。しかしながら、オルガノイド培養は血管や神経など支持組織との共培養、遠隔器官からのホルモンとの相互作用など、より生体を完全に反映させるために課題が残っている。

癌幹細胞では Notch、Wnt、Hedgehog シグナルの 1 つもしくは複数が活性化しており、医学領域ではこれらを標的とした癌治療法が研究されている。これら 3 つのシグナルを包括的に制御するような包括的なアプローチは癌幹細胞の根絶につながる。また、癌幹細胞は分化した癌細胞から脱分化して再び生じる可能性もある。そのような癌幹細胞の複雑な病態を解明するためには、原発巣を反映したオルガノイド培養が必要不可欠である。

本研究では、新規三次元培養法であるオルガノイド培養を極めて挙動の悪い猫の乳腺癌で確立し、効果的な治療法の開発を目指す。

#### 5. 研究の成果

申請者は、2 つの乳腺癌の臨床検体から猫の乳腺および乳癌組織からのオルガノイド培養に成功し、継代をおこなっている (図 1)。今年度は COVID-19 の影響により、十分な症例数を集めることが出来なかった。今後は引き続き症例を集め、オルガノイドの表現型を形態学的、免疫組

織化学的に評価し、原発巣との比較をおこなう。また、猫の乳腺癌で活性化するシグナル伝達経路を同定し、効果的な抗癌剤を選択することを目標とする。

#### 発表論文

- 1) Machida Y, Nakagawa M, Matsunaga H, Yamaguchi M, Ogawara Y, *et al*. A potent blood-brain barrier-permeable mutant IDH1 inhibitor suppresses the growth of glioblastoma with IDH1 mutation in a patient-derived orthotopic xenograft model, *Molecular cancer therapeutics* 19, 375-383 (2020) 査読有。
- 2) Kawasaki S, Michishita M, Sakaue M, Morimatsu M, Uemura M, Kashiwagi N, Maeda M, Machida Y, Azakami D, Egusa AS, Onozawa E, Ishioka K, Watanabe M, Tanaka Y, Omi T, Ochiai K. Novel canine isocitrate dehydrogenase 1 mutation Y208 attenuates dimerization ability., *Oncology letters* 20, 351 (2020) 査読有。
- 3) Michishita M, Ishizaki Y, Konnai M, Machida Y, Nakahira R, Hatakeyama H, Yoshimura H, Yamamoto M, Soeta S, Ochiai K, Misawa K, Yugeta N, Azakami D. Primary lymphangiosarcoma of the urinary bladder in a dog., *Journal of comparative pathology* 179, 31-35 (2020) 査読有。
- 4) Shibata R, Machida Y, Hatakeyama H, Yoshimura H, Yamamoto M, Ochiai K, Uematsu K, Michishita M. Hepatic neuroendocrine carcinoma with metastases to the lymph nodes in a sika deer (*Cervus nippon yakushikae*)., *The Journal of veterinary medical science* 82, 193-196 (2020) 査読有。

#### 7 コロナウイルス関連ウシ下痢症制御のための基盤的研究

##### 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

コロナウイルス科 (CoV 科) の牛コロナウイルス (BCoV) 及びトバニウイルス科の牛トロウイルス (BToV) は、以前は共にコロナウイルス科に属しており両者は見た目や性質がよく似ている。両ウイルスは、日本を含む世界中に蔓延しており、仔牛の下痢症や成牛の冬季赤痢の原因となっている。特に BToV は、近年の疫学研究により、世界中に広く蔓延していることが明らかとなり、高い注目を浴びている。これらのウイルスは、現在も畜産業界に大きなダメージを与えているが、感染制御が難しく、BToV についてはワクチンすら開発されていない。そこで本研究では、申請者が近年確立した、「BToV 人工合成法」を用いて、BCoV 抗原を持つ組換え BToV を人工合成し、BToV 及び BCoV の両方に効果のある 2 価ワクチンの開発・研究を行う。

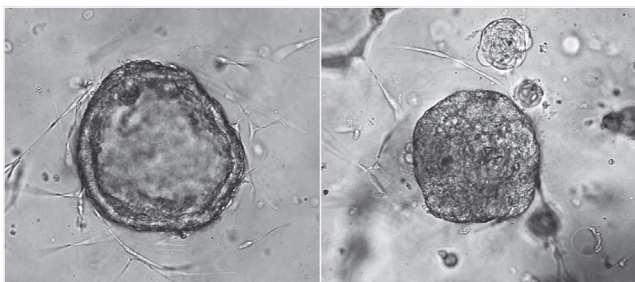


図 1 猫の乳腺オルガノイド(左)および乳腺癌オルガノイド(右)



最終的には、これらの組換えワクチンによりコロナウイルス関連ウシ下痢症の制御を目指す。

ウイルスの人工合成法は、Reverse genetics (RG) と呼ばれ、ウイルスの遺伝子を自在に改変する技術である。本研究では、この RG を用いて図の様な組換え生ワクチンの作製を行う (図参照)。

- rBToV1: BToV-S 遺伝子を BCoV-S 遺伝子に置き換えた組換え生ワクチン。
- rBToV2: BToV-HE 遺伝子を BCoV-S の一部に置き換えた組換え生ワクチン。

特に、rBToV2 作製時に標的とされる HE 蛋白質は BToV の細胞内増殖に必須ではないため、HE 遺伝子は外来遺伝子の置換・挿入場所として絶好の部位と考えられる。しかしながら、この部位を EGFP 遺伝子に置換した rBToV<sup>EGFP</sup> は、その増殖効率が激減しさらに容易に EGFP 遺伝子を欠損する事が分かった。そこで、本年度は rBToV2 作製の基盤的研究として、外来遺伝子である EGFP を安定発現できる rBToV<sup>EGFP</sup> の作製を行い、外来遺伝子を安定発現できる BToV 組換えベクターの開発を試みた。

### 3. 研究の計画・方法

- 1) rBToV<sup>EGFP</sup> の連続継代: HRT18 細胞を用いて

rBToV<sup>EGFP</sup> の連続継代を行い、EGFP を安定発現するバリエーション (v-rBToV<sup>EGFP</sup>) の出現と検索を行う

- 2) v-rBToV<sup>EGFP</sup> の精製: プラーク精製により v-rBToV<sup>EGFP</sup> の分離精製を行う

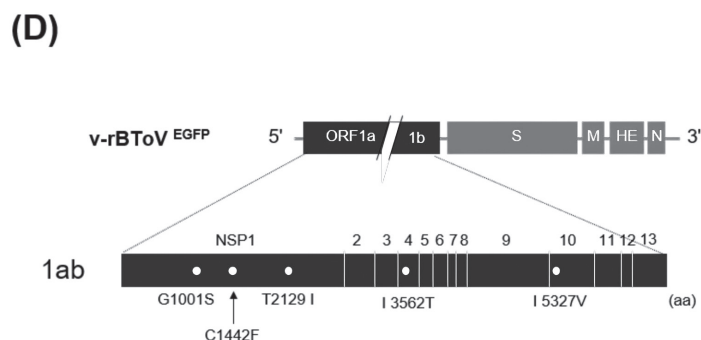
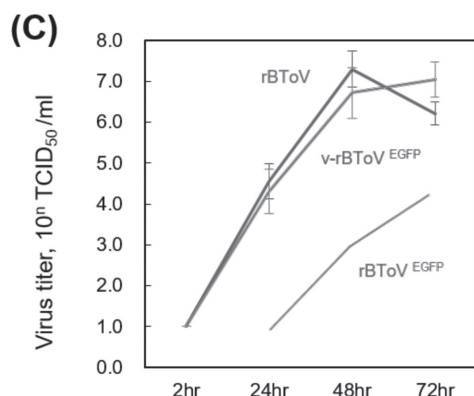
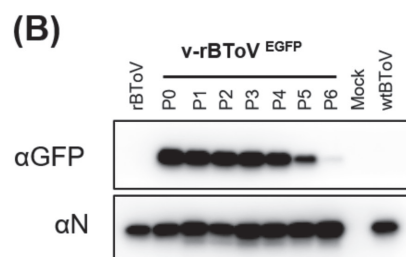
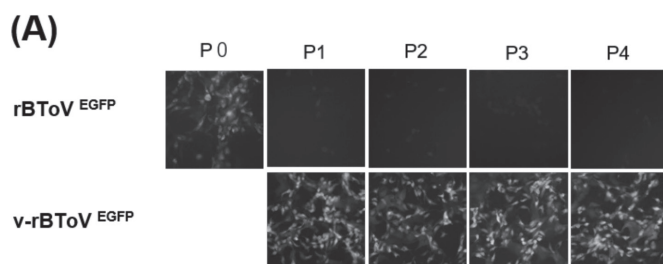
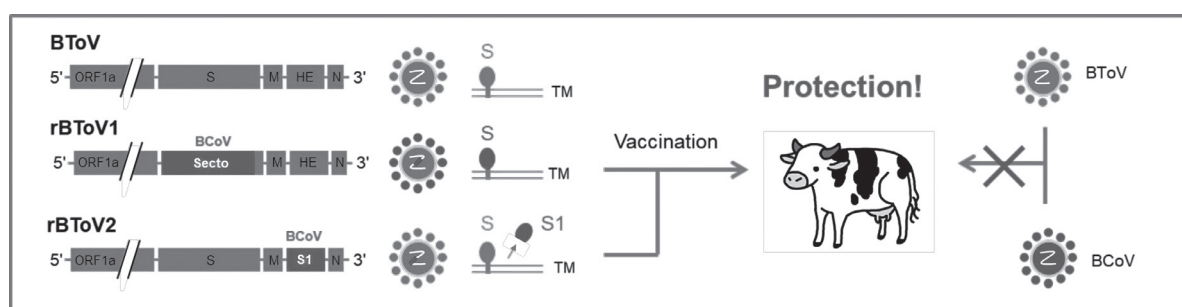
- 3) v-rBToV<sup>EGFP</sup> の性状解析: v-rBToV<sup>EGFP</sup> の全長遺伝子解析及び増殖能力の測定を行う

### 4. 研究の特色

- 1) 新規性: 現在 ToV の RG は本研究室のみが使用できるため、新規性の高い研究が期待される
- 2) 拡張性: 外来遺伝子を安定発現できる BToV 組換えベクターの開発は、ワクチン開発だけでなく、基礎研究・薬剤スクリーニング等幅広い分野に応用可能である
- 3) 社会貢献: 世界中に蔓延する BCoV と BToV の感染制御につながる

### 5. 研究の成果

rBToV<sup>EGFP</sup> の連続継代を複数回試みた結果、継代中に EGFP を比較的安定発現するバリエーション (v-rBToV<sup>EGFP</sup>) が出現した。この v-rBToV<sup>EGFP</sup> をプラーク精製によって分離精製を行い、性状解析を行った。得られた v-rBToV<sup>EGFP</sup> は、EGFP を安定発現できない rBToV<sup>EGFP</sup> と比べると、少なくとも 4 継代後までは EGFP を安定発現し、5-6 継代後に徐々に消失する事が分かった (図 A-B)。また、



rBToV<sup>EGFP</sup> は、親ウイルスの rBToV に比べ著しく増殖能力が減少するが、v-rBToV<sup>EGFP</sup> は、親ウイルスの rBToV に匹敵する増殖能力を持つ事が分かった (図 C)。そこで、これらの性状変化に寄与するアミノ酸変異を同定するため v-rBToV<sup>EGFP</sup> の全遺伝子解析を行った。この結果、非構造蛋白質 (nsp) に 5 か所のアミノ酸変異が見られた (図 D)。このことから、nsp 内に見られた 5 つのアミノ酸変異が、外来遺伝子の安定生に関与していることが強く示唆された。今後は、この 5 つのうちどのアミノ酸が安定性に寄与しているのか RG を用いて同定すると共に、同定したアミノ酸を持つ組換え BToV ベクターをバックボーンとした、rBToV2 を作製する事で BCoV-S を安定発現できる組換えワクチンの作製を試みたい。

#### 論文発表

- Reverse Genetics with a Full-length Infectious cDNA Clone of Bovine Torovirus  
Ujike M\*, Etoh Y, Urushiyama N, Taguchi F, Enjuanes L, Kamitani W. *BioRxiv* (査読前論文)  
doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.28.358754>
- Characterization of Localization and Export Signals of Bovine Torovirus Nucleocapsid Protein Responsible for Extensive Nuclear and Nucleolar Accumulation and Their Importance for Virus Growth.  
Ujike M\*, Kawachi Y, Matsunaga Y, Etoh Y, Asanuma H, Kamitani W, Taguchi F.  
*J Virol.* 2021 Jan 13;95(3):e02111-20. doi: 10.1128/JVI.02111-20.
- The Inhaled Steroid Ciclesonide Blocks SARS-CoV-2 RNA Replication by Targeting the Viral Replication-Transcription Complex in Cultured Cells.  
Matsuyama S\*, Kawase M, Nao N, Shirato K, Ujike M, Kamitani W, Shimojima M, Fukushima S. *J Virol.* 2020 Dec 9;95(1):e01648-20. doi: 10.1128/JVI.01648-20.
- Recent Progress in Torovirus Molecular Biology.  
Ujike M\*, Taguchi F. *Viruses.* 2021 (in press)

## 8 様々な哺乳動物種における心エコー図解析を応用した新しい心機能評価指標の確立

### 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

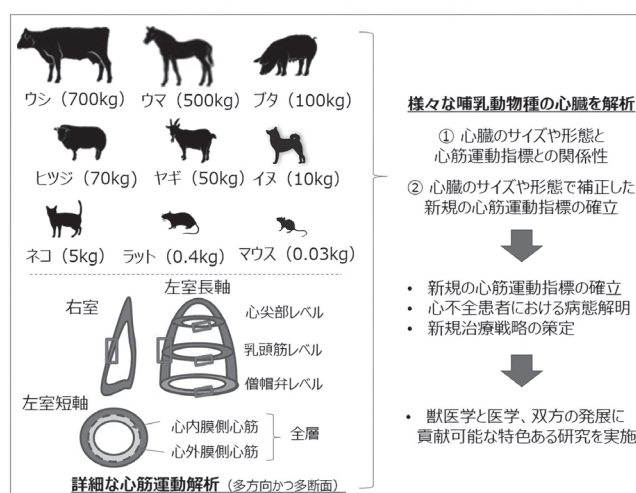
### 2. 研究の目的

心不全は、医学および獣医学に共通した大きな臨床的課題であり、心不全患者の病態および重症度評価には心エコー図検査が汎用される。一般的に心不全患者では、リモデリングと呼ばれる心臓の幾何学的構造の変化 (心臓サイズや形態の変化) が生じることで心機能を代償する。したがって、この幾何学的構造の変化を心エコー図検査によりとらえることは病態や重症度評価の一助となるが、逆にこ

のリモデリングによって心エコー図検査による一部の心機能指標は不正確となる。本研究では、様々な哺乳動物種は心臓のサイズや形態といった幾何学的構造が正常でも異なることに着目した。本研究の目的は、様々な哺乳動物種における心エコー図結果を横断的に解析することで、心臓のサイズや形態といった幾何学的構造指標と、近年注目されている心機能指標である心筋機能指標の関係性を解明することである。そして、得られた関係性から心臓サイズや形態に影響されない新規の心筋機能指標を確立することで、心不全患者の病態および重症度評価の際に有用となる指標を確立したいと考えた。

### 3. 研究の計画・方法

多様な心臓サイズや形態を有する健全な哺乳動物種を対象として、無麻酔下で心エコー図検査を実施し、心臓の幾何学的構造と心筋機能指標を解析する。供試する哺乳動物種としては、ウシ (700kg)、ウマ (500kg)、ポニー (200kg)、ブタ (100kg)、ヒツジ (70kg)、ヤギ (50kg)、イヌ (10kg)、ネコ (5kg)、ラット (0.4kg)、マウス (0.03kg) などを予定している (カッコ内は標準体重)。標準体重を比較すると約 20000 倍の差があり、本研究では各種 10 頭以上の検査を実施する予定である。過去の報告では、左室拡張末期容積は最も大きなウシで 1200mL、最も小さなマウスは 0.03mL であり、約 40000 倍の差がある。また心臓重量については、最も大きなウマは 2.8kg、最も小さなマウスは 1g に満たないと報告され、約 2800 倍以上の差が想定される。得られた結果から、心臓の幾何学的構造と心筋機能指標の関係性を解明する。また心筋機能指標を心臓サイズや形態で補正することで、より良い新規の心機能評価指標を確立する。



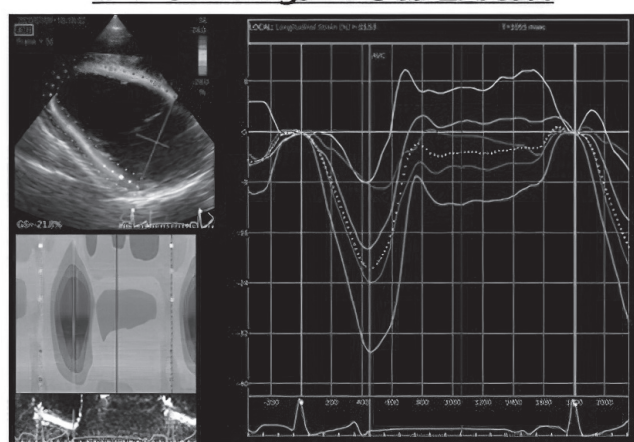
### 4. 研究の特色

本研究では、本学の特色を活かした多様な哺乳動物種の心エコー図解析結果を集約し、今までにないアプローチから心不全評価の新たな道標となることを目指した。さらに本研究で確立を目指す新規指標は、多様なリモデリングを呈した心不全患者に应用できる画期的な指標となることから、本研究は獣医学と医学双方の発展に貢献可能な特色ある研究になる可能性がある。

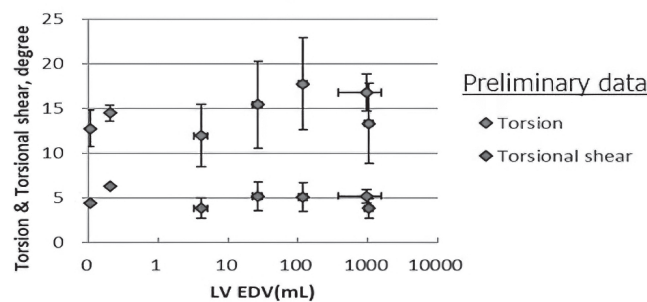
## 5. 研究の成果

今年度の研究により、多くの哺乳動物種での心エコー図検査が、無麻酔にて可能であることを確認できた。とくにウマのデータに関しては、8頭のデータ取得が良好に行えたため、従来のパイロットデータに加えた解析が可能となった。またウシ、ブタのデータに関しては、施設使用の関係でデータ取得を今年度実施することができなかったため、次年度以降に予定している。現状までに、ヒトで報告されているような心筋運動（長軸方向、短軸円周方向、短軸壁厚方向、そしてねじれ方向）が実際にイヌ、およびネコ、さらにはより大型の哺乳動物（ウマ）でも解析できた。

### ウマ (510 kg) の心筋運動解析



Various mammals' "greatly" different heart size and torsion/ torsional shear strain



※左室拡張末期容積 (LV EDV) の小さい方から  
マウス、ラット、ネコ、イヌ、ヒト、ウマ、ウシ

本研究で明らかとなった心臓サイズと心筋運動指標の関連性について、以下の学術論文、および学会発表を行った。また本研究から派生させたデータを用いることで、従来からのイヌとネコの心エコー図検査指標の再検討を行い、以下の学会講演等で公表した。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) Yunosuke Yuchi, **Ryohei Suzuki** (corresponding author), Takahiro Teshima, Hirotaka Matsumoto, Hidekazu Koyama. Utility of tricuspid annular plane systolic excursion normalized by right ventricular size indices in dogs with postcapillary pulmonary hypertension. *Journal of veterinary internal*

*medicine*, 2021, In press.

- 2) 宇佐美 綾子, **鈴木 亮平**, 桑原 拓磨, 高瀬 雅行, 小山 秀一 内科的治療により長期生存が可能であった僧帽弁狭窄症のイヌの1例 *動物の循環器* 2020;53(1):13-21.
- 3) **Ryohei Suzuki**, Yunosuke Yuchi, Haruka Kanno, Takahiro Teshima, Hirotaka Matsumoto, Hidekazu Koyama. Layer specific Myocardial Function Assessed by Two dimensional Speckle tracking Echocardiography in Cats with Restrictive Cardiomyopathy. *ACVIM Forum 2020 On Demand*.
- 4) **Ryohei Suzuki**, Yunosuke Yuchi, Takahiro Teshima, Hirotaka Matsumoto, Hidekazu Koyama. Left and Right Myocardial Function in Dogs with Pulmonary Hypertension Secondary to Mitral Valve Disease. *ACVIM Forum 2020 On Demand*.
- 5) Yunosuke Yuchi, **Ryohei Suzuki**, Takahiro Teshima, Hirotaka Matsumoto, Hidekazu Koyama. Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion Normalized by Right Ventricular Size in Dogs with Pulmonary Hypertension. *ACVIM Forum 2020 On Demand*.
- 6) **鈴木 亮平** 心エコーの醍醐味 血行動態評価を考える VETS TECH WEB SEMINAR
- 7) **鈴木 亮平** ちょいあて心エコー FoCUS の有用性 日本臨床獣医学フォーラム 第22回年次大会
- 8) 菅野 はるか, **鈴木 亮平**, 湯地 勇之輔, 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ベックルトラッキング法による層別および多方向の心筋機能評価 日本臨床獣医学フォーラム 第22回年次大会 (ポスターセッション 最優秀賞)
- 9) **鈴木 亮平** 心エコー図基本断層像の描出と正常および異常所見の評価 GE SEETON Webinar
- 10) **鈴木 亮平** 「救急×肺が白い」立位心エコーで心臓を診る、心エコーによる右心拡大の精査 VETERINARY BOARD & SARS コラボセミナー
- 11) **鈴木 亮平** コツだけ WEBINAR <心エコー図検査> VETS CHANNEL
- 12) **鈴木 亮平** 肥大型心筋症の猫に対する内科的治療反応を予測する心エコー図検査指標 MP アグロジャーナル (42) 20 - 23
- 13) **鈴木 亮平** これだけはおさえておきたい、犬と猫の心エコー計測ガイド GE ヘルスケア・ジャパン冊子
- 14) **鈴木 亮平** 心エコー図検査での計測を見直す 第17回日本獣医内科学アカデミー学術大会
- 15) 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 肥大型心筋症の猫における既報遺伝子変異の調査 第17回日本獣医内科学アカデミー学術大会
- 16) 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 左室内異常構造物により心内膜心筋型拘束型心筋症へと病態進行した猫の1例 第17回日本獣医内科学アカデミー学術大会



- 17) 湯地 勇之輔, 鈴木 亮平, 手嶋 隆洋, 松本 浩毅, 小山 秀一 慢性肺高血圧症モデル犬に対するベラプロストナトリウムの薬用量の検討 第 17 回日本獣医内科学アカデミー学術大会
- 18) 湯地 勇之輔, 鈴木 亮平, 手嶋 隆洋, 松本 浩毅, 小山 秀一 呼吸に伴う静脈還流量の変化が健常犬の右心機能に及ぼす影響の検討 第 17 回日本獣医内科学アカデミー学術大会

## 9 犬精子の凍結保存における新しい精液希釈液の開発に関する研究

### 1. 研究の所属・氏名等

獣医学科 獣医臨床繁殖学研究室  
教授 堀 達也

### 2. 研究の目的

優秀な系統であることが育成に関連している盲導犬のような遺伝的価値の高い犬では、国内だけの繁殖では限界があるため、世界レベルで繁殖を管理するためにも凍結精液による人工授精を繁殖に導入することが必要である。しかし、犬精子は他の動物と比較して耐凍性が低いことから、これまで作成している凍結精液では、精子の寿命が短く、手術を必要としない腔内人工授精では受胎を得ることが難しく、高い受胎率を得るためには外科的な子宮内人工授精が必要となることが知られている。このような背景から、融解後の精液性状が良好で寿命が長く、腔内人工授精でも高い受胎率を得られるような、臨床的に応用可能な犬の凍結精液作成技術の改良が必要であると考えられている。

そこで今回の研究では、犬の凍結精液の融解後の性状に最も影響を与えると考えられる精液希釈液の改良および融解後の性状を向上させるための融解液の開発について検討を行うことを計画した。

### 3. 研究の計画・方法

これまで申請者は、犬凍結精液に関する研究において同じ精液希釈液（卵黄トリス・フルクトース・クエン酸液：EYT-FC）を使用し、様々な研究成果を報告してきた。しかし、現在はまだ大きな問題とはなっていないが、卵黄をベースとした精液希釈液は鳥インフルエンザの問題などから海外への輸出がやや困難となることが想定されている。卵黄は凍結保護作用を持っており、精子の凍結保存にとっては必要なものと考えられている。しかし、卵黄が使用できないことを想定し、卵黄に代わるものとしてスキムミルクなどを用いた精液希釈液についても検討する必要があると考えられる。

そこで実験 1 として、スキムミルクを用いた精液希釈液を新たに作成し、この希釈液を使用して犬凍結精液を作成し、従来の EYT-FC を用いて作成した犬凍結精液の融解後の精液性状と比較することを計画した。しかし、凍結精液の条件として、凍結保護作用を持つグリセリンの最終濃度、界面活性剤であり精子の保護作用を持つ Orvus ES

paste (OEP) の最終濃度についての検討が最初に必要なと考え、この点から明らかにするための実験を行った。

また凍結精液においては、凍結過程または融解課程において精子の酸化ストレスが起これ、融解後の精子の運動性が低下することが明らかとなっている。凍結融解した精子の寿命が短いのは、この酸化ストレスによるダメージであると考えられている。このダメージを軽減する目的で、融解後の精液に抗酸化剤を添加することは、融解後の性状を向上させるために有用ではないかと考えている。

そこで実験 2 として、通常に作成された犬凍結精液の融解直後の精液中に融解液として抗酸化剤を添加することで、犬凍結融解後の精子の性状を良好に維持することができかどうかについて検討を行った。

### 4. 研究の特色

本研究の主たる目的は、現状の犬凍結精液における融解後の性状よりも運動性、生存性が高く、精子の正常な形態を維持して、かつ寿命の長い精子を作成できるような新しい凍結精液技術の開発にある。その改良のために、新しい精液希釈液の検討および融解液の開発を行った。申請者はこれまで犬凍結精液に関する基礎的な研究を行ってきており、今回の研究はそれを発展させるための研究として位置づけられる。犬凍結精液の研究に関しては申請者のグループは国内では先導しており、十分に世界のレベルに匹敵すると思われ、今後の研究を発展させることが可能であると考えられる。

凍結精液は -196℃ の液体窒素の中で半永久的にその性状が維持され、優秀な系統が半永久的に維持される。また動物を輸送するのではなく凍結精液を輸送して人工授精を行うという人工繁殖補助技術を用いることによって、世界各国の盲導犬協会に所属する優秀な犬の精子を導入することが可能となり、世界レベルでの補助犬の育成が大きく前進することは間違いないと考えられる。もちろん日本にいる優秀な犬の精子を他国に提供することも可能となり、これによって、より質の高い補助犬を高率に育成することが可能となる。もちろん、この技術は補助犬の生産のみならず、貴重犬種、災害救助犬、疾患モデル犬の系統維持および実験動物としての犬の生産にも大いに役立つものと思われる。申請した研究の成果は、国内だけでなく世界的にも要求されているものであり、補助犬の繁殖の向上における社会的貢献だけでなく、今後の犬の凍結精液に関する研究の発展においても有意義であると考えられる。

### 5. 研究の成果

実験 1：スキムミルクをベースとした精液希釈液を新たに作成し、犬凍結精液を作成した。まず、最初に精液希釈液中のフルクトースの添加量を決定するため、1.0mg/100ml と他の文献で報告されている 10mg/100ml で作成し、犬精液にそれぞれ添加して、5℃での低温保存を行った。このとき、コントロールとして、従来の EYT-FC で希釈した精液の低温保存の性状と比較した。

その結果、フルクトース濃度の高いものよりも低いもの

で長期間の精子活力の維持ができ、その性状は、コントロール群とほぼ同様であることが明らかとなった。そのため、今後の実験では、フルクトースが1.0mg/100mlの濃度で含まれている精液希釈液を使用することとした。

次に、これまで行ってきた最終グリセリン濃度を7%、最終OEP濃度を0.75%として、犬精液を用いて凍結精液を作成した。しかし、グリセリン平衡後に精子活力が0%となってしまった。OEPは、卵黄の成分と反応して効果を発揮することが明らかとなっている。そのため、この原因はOEPの添加にあると考えられたため、スキムミルク含有希釈液を用いた凍結精液ではOEPを添加することができないことが明らかとなった。

次に、最適なグリセリン濃度を決定するために、最終グリセリン濃度を2%、4%、7%として、スキムミルクをベースとした精液希釈液を使用して犬凍結精液を作成した。その結果、従来のEYT-FCを使用した精液希釈液は最終グリセリン濃度は4~7%が最適であったが、スキムミルクをベースとした精液希釈液では、2~4%が最適であることが明らかとなった。しかし、スキムミルク精液希釈液で作成した凍結精液を従来のEYT-FCで作成した凍結精液と比較すると、精液性状はやや低値であることが明らかとなった。今後さらに研究を進め、両者の差の原因を明らかにし、最適な凍結精液を作成するための改良を行いたいと考えている。

実験2：従来のEYT-FCで作成し、保存されている犬凍結精液を用いて、融解後に抗酸化作用を持つN-acetyl-L-cysteine (NAC) またはCa<sup>2+</sup>流入抑制作用を持つエチレンジアミン四酢酸 (EGTA) を添加した融解液を使用し、融解液を用いないもの (コントロール) と融解後の性状を比較した。その結果、NAC またはEGTA を含有している融解液を用いた場合、融解後の精子活力がコントロール群に比較して数時間高値を示すことが明らかとなった。したがって、この融解後の凍結精液を用いた人工授精にて、高い受胎率が得られる可能性が示唆された。しかし、最適な添加濃度が決定されていないこと、また他の抗酸化作用をもつものについての検討が行われておらず、実験が途中である。したがって、今後、さらに研究を続けて、融解後の精液性状を長時間良好に維持することが可能な融解液を開発する予定である。

## 10 シェルターメディスンの確立のための獣疫学研究

### 1. 研究の所属・氏名等

獣医学科 野生動物学研究室

講師 田中亜紀

### 2. 研究の目的

日本の獣医科大学には、まだ「シェルターメディスン」の分野が発展していない。シェルターメディスンは、「集

団獣医学」、「法獣医学」、「災害獣医学」からなる「地域獣医療」である。具体的には、行政保護施設等に収容された伴侶動物に対する群管理や集団適正飼養および動物福祉の向上、動物虐待に対する獣医学的検証、災害時の動物管理等を獣医学的にアプローチする分野である。犬や猫の殺処分問題、動物虐待に対する獣医師の報告の義務化、また、様々な発災リスクが高まる中での被災動物の管理等、獣医師の社会に求められるニーズは多様化している。そのためにも「シェルターメディスン」の分野を獣疫学研究の基に確立し、人と動物と地域の安全を守る獣医学の発展を本研究の目的とした。

### 3. 研究の計画・方法

#### 1. 集団獣医学【伴侶動物の集団適正飼養および動物福祉の向上】

・行政動物愛護センターにおいて、動物の引き取り理由 (放浪、飼育放棄、迷子)、収容期間中の疾患発生の有無、結末 (安楽死、譲渡、返還) 等のデータを収集し、獣疫学的解析を実施することにより、多頭飼育施設における適正な集団飼養および疾患管理プロトコルを確立する。

本年度計画：行政動物愛護センターでのデータ収集 (10カ所確約済み)、聞き取り調査、現場視察

#### 2. 法獣医学【動物虐待に対する獣医学的アプローチ】

・日本で起きた動物虐待事例を、警察庁および環境省 (既に連携確約済み) との連携で集積し、動物虐待実態調査を行う。動物虐待の疑いのある不審死体の解剖検査、毒性検査、CT撮影等を実施し、動物虐待に対する獣医学的評価基準を獣疫学的に検証する。動物虐待の疑いのある生きた事例に対しての獣学的処置および対応策について講じる。

本年度計画：事例の集積、不審死体の解剖検査、現場視察 (多頭飼育崩壊、動物カフェ等を含む)

#### 3. 災害獣医学【災害時における動物管理および獣医師の役割】

・災害時の被災動物管理の体制を検証するために、過去の災害事例および被災動物の実態調査を行う。米国では、災害時に対応する獣医師のチームが獣医科大学においても発展している。日本での実態調査を踏まえながら、海外事例を取り入れ、日本独自の災害時の獣医療体制の確立を目指す。

本年度計画：行政等での災害対策や被災動物管理体制の実態調査

### 4. 研究の特色

シェルターメディスンは、地域の様々な動物問題に対応する新しい獣医学的分野である。動物を取り巻く環境は変わってきており、社会の獣医師に対するニーズも変わってきている。動物愛護法改正により、獣医師に動物虐待の通報義務が課された。一方で、動物虐待に対応するための獣医学的技術がまだ日本は未整備であり、その基盤を作る研究として、日本で初めて動物虐待事例の集積を行い、法獣

医学的研究を行った。

社会的ニーズに応える獣医学としての特色もシェルターメディスンは有する。日本にはまだない分野であるため、先進的な獣医学研究でもある。

## 5. 研究の成果

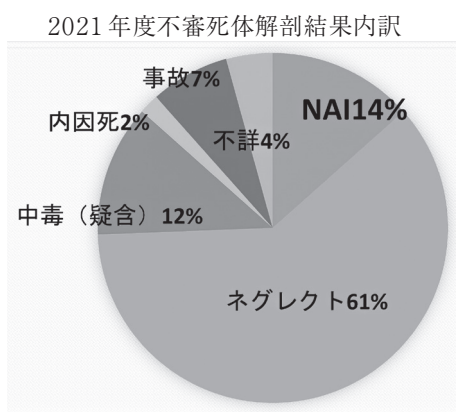
1. 集団獣医学研究：本年度は、コロナ禍もあり現地視察等はかなり制限された。行政動物愛護センターは5か所からデータを収集し、動物の飼育放棄や殺処分の理由等を分析した。

### 【結果】

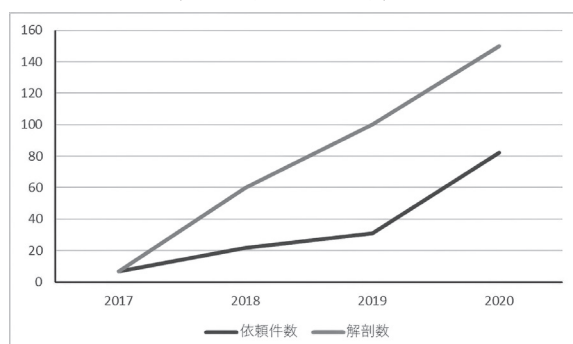
シェルターから収集したデータの全体数は3213頭（イヌは1639頭、ネコは1574頭）であった。それぞれの収容理由は引き取りの動物が全体の20%、所有者不明の動物が72%、負傷動物が8%であった。収容理由が引き取りの動物の中で、動物の問題行動が引き取り理由となった動物の割合が12.5%、飼い主が関係する引き取り理由の動物が87.5%で、飼い主がシェルターに引き取りを求めた主な理由として飼い主の抱える問題が影響していることが示された。飼育期間、品種、性別、年齢ではそれぞれ飼い主が要因となる引き取り理由に関係性が認められたが、これらの独立変数を組み合わせた多項目分析では有意差は認められなかった。また地域、季節、他の飼育動物に有意差は認められなかった。

2. 法獣医学研究：動物虐待の疑われる不審死体については、82事例の解剖検査を実施した。多頭飼育崩壊視察は、5回実施し、現在進行中の事例が多頭崩壊が3件、連続不審死体事例が2件である（2021年3月現在）。

### 【結果】



本学への行政 / 警察からの不審死体解剖依頼件数の推移  
(2017年～2020年)



3. 災害獣医学については、コロナ患者陽性飼い主のペット預かりについてのプロトコルを作成し、環境省および行政に周知した。また、災害時の被災動物管理を想定した施設整備を開始した。

### 【まとめ】

本年度においては、コロナ禍もあり、現場視察等の現地調査が極めて困難であったが、シェルターメディスンの基盤となる研究を開始することができ、今後につながる成果が出たものと考ええる。

今年度は基礎的なデータの収集を中心に行い、シェルターメディスンの確立に必要な知見等の整理および検証を行った。

2021年6月から動物愛護法が改正されるにあたり、獣医師や獣医学に対する社会的ニーズは益々高まるものと考ええる。動物虐待の獣医師の通報義務により、法獣医学の整備、動物取扱業に対する様々な規制強化により、集団獣医学の整備、コロナ禍も含め多様な発災リスクの高まる中で災害獣医学の整備を行うことにより、社会の様々な動物問題を解決する一助として、シェルターメディスンを今後も発展していく予定である。

## 11 消化器疾病制御のための新規セロトニン調節系と発酵イソフラボン効果との関連性

### 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  
講師 藤澤正彦

### 2. 研究の目的

近年、炎症性大腸炎（IBD）やクローン病患者において骨粗鬆症などの「腸管外疾病」が合併症として報告され、これらの症例がセロトニン分泌過剰によるものであり、「セロトニンコントロール」により機能回復する可能性が示唆されている。また、血管性病変に起因する消化管出血：「非静脈瘤性上部消化管出血（NVUGIB）」がヒトの救急現場において問題となっており、止血＋粘膜保護を併せ持つ薬剤選択が必須である。また近年、抗酸化作用や抗炎症作用が示されている発酵大豆イソフラボンの新たな薬効を探索する目的でNVUGIB対策を検証、セロトニン制御系との関連性について考察する。

### 3. 研究の計画・方法

- ① NVUGIB 疾患治療における5-HT<sub>4</sub>作動薬の血小板機能への影響

消化管粘膜障害（NSAID：インドメタシン誘発性胃・小腸潰瘍）マウスモデルを作製、障害時の血小板動態について検証する。

- ② NVUGIB 疾患治療における天然イソフラボンの血小板機能への影響

実験①動物モデルにおいて、発酵大豆イソフラボンの消化器疾病に対する効果の有無について in vivo、in vitro で検証する。



#### 4. 研究の特色

申請者はこれまでにセロトニン 5HT4 受容体作動薬であるクエン酸モサプリドの抗炎症・抗潰瘍効果について実証してきたが、本薬剤が消化管のみならず、他臓器に対する直接的・間接的機能を有する可能性がある。既存薬や特定保健用食品の再開発 (repositioning) の観点から有用であると考えている。

#### 5. 研究の成果

①消化管粘膜障害 in vivo マウスモデルにおける 5-HT4 作動薬の検証は済んでおり、血小板動態の検索に取り組んでいる。②消化管粘膜障害 in vivo マウスモデルにおける発酵大豆イソフラボンの有効性の是非についての検証は済んでおり、①と同様、血小板動態の検索に取り組んでいる。

### 12 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)

本研究は、長野県軽井沢町および神奈川県 (横浜・横須賀・鎌倉) に生息する野生動物 (食肉目イヌ科・クマ科・リス科など) 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。長野県軽井沢町は長期的に野生動物の調査を行っていることから、保管した資料を用いた。また、神奈川県の3つの自治体 (鎌倉・横須賀・横浜) においては昨年より譲渡していただくことができていることから、今年度も継続して行った。

(方法)

##### 1) 都市域に生息する野生動物の遺伝学的解析

今年度は、侵入および分布拡大を行う個体および種は、そうでない個体および種に比べて探求心が強く、大胆な個体であると考えられることから、これら個体の性格に関連する遺伝子を探索することを試みた。探求心が旺盛であるのかどうかは、400 個体近くの体毛サンプルを用いて 12 か所の遺伝子座によるマイクロサテライト領域の解析を行い、長野県全域の遺伝的構造を明らかにした。そして、示した遺伝的構造から大きく外れている個体は探求心が旺盛であることで移動した個体であるとみなした。これら個体を中心にアンドロゲン受容体遺伝子の解析を行い、遺伝的構造の中でとどまる個体と比較研究を行った。

##### 2) 都市域に生息する野生動物のストレスを把握 (保全生物学研究分野・寫本樹)

本年度においては、昨年度で確立した測定系 (体毛を用いたストレス評価法) の信頼性を高めるために、性別や季節、ボディコンディション、繁殖の状態によって体毛コルチゾール濃度が変化するのかを調べた。2018 年 11 月から 2019 年 7 月までに駆除された 77 頭のオスと 63 頭のメスから体毛サンプルを採取した。さらに、ボディコンディションを算出するために、体長と体重を測定した。ボディコンディションは先行研究に則り、体長に対する体重の回帰線を作成し、この残差をボディコンディションとした。繁殖の状態は、メスにおいては妊娠、泌乳、非繁殖に分類し、オスにおいては精巣サイズを測定した。

#### 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、事前に個体ごとの個性を把握できるとすれば対策も大きく変

わってくる。個性はある程度遺伝するため、大胆な個性など特定の個性を選択的に淘汰することで個体群全体の傾向を変化させていくことも不可能ではない。よって、行動の発現メカニズムを遺伝的要因からアプローチすることは有用な方法の一つであるといえるが、これまでにこのような試みは皆無である。野生動物の場合、個体の性格を定量化することの難しさがある。しかしながら、本研究では遺伝的構造から個性の指標として解析することを試みており、これまでにない研究の特色といえる。来年度以降、本学科に次世代シーケンスが導入されたこともあり、さらに遺伝的な特性と個性との関連性について精力的に展開していく予定である。

## 5. 研究の成果

本研究では、12 個の遺伝子座を用いた長野県全域の遺伝的構造を解明した結果、7 つの集団にわけることが適当であることが示された。さらには、どのような個体が探求心の高い個体であるのかを 7 つの遺伝的構造から大きく外れている個体から示すことができた。また、アンドロゲン受容体遺伝子においては個体間に変異があることを確認し、すくなくともアリルは 4 つ (240bp, 243bp, 246bp, 249bp) あることを確認した。現在、遺伝的構造から外れた個体の遺伝的特性が本来の遺伝的集団にとどまった個体にどのような違いがあるのかを検討している。十分な解析は出来ていないが、240bp を持つ個体は大胆な行動をとる傾向が見られている。

体毛を用いたストレス評価に関しては、ボディコンディションは体毛コルチゾール濃度に負の影響を与えていることが明らかになった。性別や季節は体毛コルチゾール濃度に影響を与えておらず、メスとオスどちらにおいても繁殖の状態がホルモン濃度に影響を与えていなかった。先行研究においてもボディコンディションの低下により、高いストレスが引き起こされることが明らかになっている。低いボディコンディションを改善するために、コルチゾールが分泌され、採食行動や探索行動を促進する。これらの行動が促進されても、ボディコンディションが改善されないのであれば、長期間コルチゾール分泌が継続し、体毛コルチゾール濃度が上昇する可能性が考えられる。また、別の説明もある。何かしらのストレスに暴露され続け、ストレスに対する生理学的な順応を起こすためにコルチゾールが分泌される。コルチゾール分泌が続くことにより、糖新生が更新し、蓄積している栄養を長期間消費してしまうことでボディコンディションが低下している可能性もある。これらの因果関係を本研究で明らかにすることはできないが、生存率や繁殖成功度と強く関係があるボディコンディションと体毛コルチゾール濃度には関係があったことから、体毛に含まれるコルチゾール濃度を測定することにより個体や個体群の健康状態を把握することが可能であることが示唆された。

## 13 ネコ膀胱がん克服に向けた効果的な治療戦略の探索

### 1. 研究の所属・氏名等

獣医保健看護学科 獣医保健看護学臨床部門

助教 小野沢栄里

### 2. 研究の目的

膀胱がんは、発見時まで無症状のことが多く、ヒト膀胱がん 5 年後生存率は男女ともに最も低い難治性がんである。伴侶動物においても膀胱がんは発見、治療がともに困難な難治性がんである。特にネコで膀胱がんは、発見時には全身性の転移が見られ、外科および化学療法実施によっても 1 年後生存率は非常に低く予後不良である。また、ネコ膀胱がん著効を示す化学療法剤は未だ見つかっておらず、現状ではネコ膀胱がんは不治の病であり、その克服は獣医領域の大きな命題である。

難治性がんに対する治療戦略展開には、適切な標的モデルの構築が不可欠であるが、ネコ膀胱がんから樹立された細胞株の報告はない。そこで申請者はこれまでに、本学付属動物医療センター来院症例の摘出腫瘍組織から、膀胱がん由来細胞株の樹立を試み、膀胱外分泌腺がんから原発腫瘍の特性を保持した細胞株の樹立に成功した (細胞株樹立に当たってはインフォームド Consent 等、関係規則に則り研究を実施した)。この成果の原動力は、「検査～診断～治療」をシームレスに行う高度な動物医療機関を備え、その過程に研究志向プロセスが介入できる本学の特色ある研究体制に他ならない。

本研究は、本学で樹立した新規膀胱外分泌腺がん細胞株を用いて、未開拓なネコ膀胱がんに対する治療戦略創出を目指すものである。

### 3. 研究の計画・方法

本研究には申請者が樹立および解析し、その特性を維持したネコ膀胱がん由来細胞株 (Fpacc-E) を用いて、抗がん剤感受性試験を行った。試験には 3- (4,5-ジメチル-2-チアゾール)-2,5-ジフェニル-2h テトラゾリウムブロミド (MTT) 細胞生存率アッセイキットを使用し、細胞株の感度を測定した。使用した薬剤は、臨床現場でも非常によく用いられるドキソルビシンとカルボプラチンを用いた。トリプシン処理後の対数増殖期にある細胞を、 $5 \times 10^3$  個/ウェルで 96 ウェルプレートに播種した。24 時間インキュベート後、培地を 8 つの異なる濃度 (0, 1, 2.5, 10, 20, 50  $\mu$ M) の薬剤を含むものに交換した。薬剤を含まない培地を比較対象とした。96 ウェルプレートを 72 時間インキュベートした後、MTT アッセイを実施した。490 および 630 nm の波長で吸光度を測定した。結果は平均  $\pm$  SD で示し、Tuckey's post hoc test を行い、P 値が 0.05 未満場合を有意差ありとした。

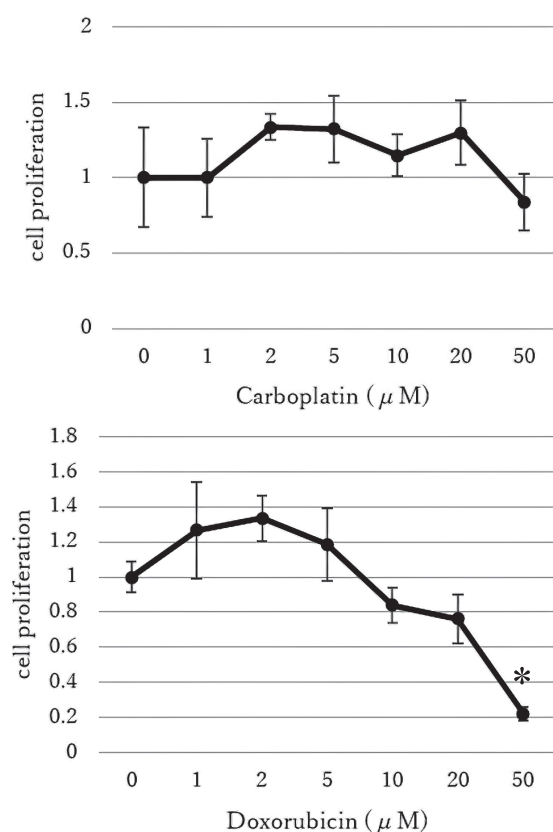
### 4. 研究の特色

前述した通り、猫の膀胱癌は非常に予後が悪く、症状が認められるころには、がんが進行していることが多い。がん治療は外科的切除によってがん細胞を取り除くことが、

再発や転移の予防に最も有効的であるが、外科治療が不適の場合や、切除しても取り切れなかった場合に、全身療法である化学療法の提案がされることがある。猫の膀胱癌は積極的な治療をしない場合は、生存期間中央値が97日、化学療法を行ったとしても中央値は165日程度であり、劇的な延命効果は認められないと報告されている (Linderman MJ et al., 2013)。人の膀胱がんにおいても同様であり、人の膀胱癌の研究では効果的な抗がん剤は明らかになっていないと言われている (Al-Hader A et al., 2017)。つまり、獣医療および医学領域ともに、膀胱癌に対する効果的な治療法を見つけることは重要であると言える。膀胱癌の細胞学的性状を知るためには、膀胱癌の特性を保持した細胞株が必要であるが、猫の膀胱癌由来細胞株を樹立した報告はされていない。しかし、研究代表者自らが樹立した猫の膀胱癌由来細胞株 (論文投稿準備中) があるため、in vitro での薬剤感受性試験が行われていなかった研究を実施することができ、今まで報告がされていない研究に着手することが本研究の特色と考える。

## 5. 研究の成果

Fpacc-E 細胞株を用いた薬剤感受性試験の結果、カルボプラチンは抵抗性を示した。また、ドキソルビシンもカルボプラチンと同様に、薬剤に対する抵抗性を示したが、50  $\mu$ M の濃度において、生細胞数は対象およびその他の濃度と比較して、有意に減少した ( $P < 0.05$ )。つまり、ドキソルビシンは非常に高い濃度でなければ、効果を示さないということが明らかとなった。今回用いた抗がん剤以外にも、さらなる候補薬剤を増やして検証を行う必要があると考える。今回用いた薬剤本研究で明らかになった内容は現在 Journal



of Veterinary Oncology への投稿に向けて準備中である。

## 2020 年度に発表した論文 (共著)

- 1) Uemura M, Ochiai K, Morimatsu M, Michishita M, Onozawa E, Azakami D, Uno Y, Yoshikawa Y, Sasaki T, Watanabe M, Omi T. The canine RAD51 mutation leads to the attenuation of interaction with PALB2. *Vet Comp Oncol.* 2020 Jun;18(2):247-255.
- 2) Ochiai K, Sutijarit S, Uemura M, Morimatsu M, Michishita M, Onozawa E, Maeda M, Sasaki T, Watanabe M, Tanaka Y, Omi T. The number of glutamines in the N-terminal of the canine androgen receptor affects signalling intensities. *Vet Comp Oncol.* 2020 Nov 10.

## 14 筋傷害・再生過程におけるリボヌクレアーゼ T2 の機能の検討

### 1. 研究の所属・氏名等

動物科学科 実験動物学教室  
助教 倉岡睦季

### 2. 研究の目的

骨格筋の傷害・再生機構におけるリボヌクレアーゼ T2 (RNase T2) の発現および機能を解明する。RNase T2 は、多様な生物種が共有するリボ核酸の代表的な分解酵素であるが、これとは別に独立した分子機構を有する。マクロファージの分化に関する近年の研究において、RNase T2 は炎症性の M1 マクロファージ分化を促進する一方、抗炎症性の M2 マクロファージ分化を抑制する働きが報告された (*Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:8140-5.2013., *Immunol Lett.* 203:102-111.2018)。骨格筋組織では、傷害によって続発する炎症病態において M1 マクロファージが増加し、炎症の亢進、壊死組織のクリアランスを進めるのに対し、段階的に増加する M2 マクロファージは炎症の抑制と筋芽細胞の活性化によって筋再生を促進する (*J Physiol.* 578:327-336. 2007)。M1/M2 マクロファージ分布の変化は、筋再生メカニズムに重要な影響をもたらすが、RNase T2 の骨格筋における役割は全くわかっていない。本研究による筋再生機構の解明は、加齢、神経・筋疾患、悪性腫瘍などで生じる筋萎縮に対する治療法の新規開発に貢献するものである。

### 3. 研究の計画・方法

本研究では、マウス筋傷害・再生モデルを作成して RNase T2 の発現を解析し、M1/M2 マクロファージの分布およびサイトカイン発現との関連を検討する。

#### ① ICR 系統マウスにおける筋傷害・再生モデルの解析

カルジオトキシン / 塩化バリウムの筋内投与により筋傷害を誘発する。筋組織では筋線維が傷害され、処置後 48 時間まで顕著な反応性の炎症、96 時間で筋管の形成、7 日で筋管の成熟、以降は再生筋線維の成熟を認め、30 日頃には修復が完了する。一連の過程における RNase



T2 発現を炎症性サイトカイン、M1/M2 マクロファージ・マーカー、筋再生関連因子、速筋・遅筋線維マーカーなどの発現と関連させて、免疫組織学的評価、ウエスタンブロット、定量的 PCR により定性・定量的に解析する。

#### ② RNase T2 欠損マウスにおける筋傷害・再生モデルの解析

上記と同様に RNase T2 欠損マウスで筋傷害を誘発し、筋再生過程における表現型を免疫組織学的に評価する。また M1/M2 マクロファージの分布に関して定量的 PCR、フローサイトメトリーを用いて解析し、筋再生の進行度との関連を明らかにする。cDNA マイクロアレイによる発現因子の網羅的解析を実施し、RNase T2 欠損マウスと野生型マウスの再生筋における炎症・筋再生関連因子の増減パターンを比較する。

#### 4. 研究の特色

RNase T2 は、細胞内アクチンと結合して細胞形態を変化させたり、酸化ストレス応答性に細胞毒性を示すなど、細胞性状に影響を与える因子である (*Trends Biochem Sci.* 35:253-259. 2010)。また細胞外に分泌されて周辺細胞の性状を変化させる作用を有し、細胞間相互作用の伝達因子となる。RNase T2 は多様な生物種で保存される生理活性物質であるため、異生物種間での伝達物質としても報告がある。真菌や蠕虫などの病原体・寄生虫が産生・分泌した RNase T2 は、宿主の細胞性状を変化させて免疫機構や腫瘍病態に関与する (*J Exp Med.* 206:1681-1690. 2009., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:1104-1109. 2011)。この様に RNase T2 は、炎症病態を含めた様々な疾患に関わる可能性があるが、その働きは未だ不明な点が多い。

本研究では骨格筋での炎症にスポットを当て、これまでほとんど検討されていなかった筋再生における RNase T2 の機能を明らかにする。筋再生は骨格筋線維の周囲に局在する筋衛星細胞の増殖、筋芽細胞への分化によって進行し、これらは M1/M2 マクロファージが参加するサイトカイン・ネットワークによって強く制御される。RNase T2 は筋再生機構の上流にあるマクロファージを調節して関与することで、新たな機能性に関する視点を加えるかもしれない。さらに感染病原体による RNase T2 を介した作用について、筋傷害・再生に及ぼす影響を新たに見出す可能性も有する。

#### 5. 研究の成果

ICR マウスでの筋傷害・再生モデルにおいて、免疫組織学的に再生筋組織での RNase T2 発現を定性的に評価した。予備検討における RNase T2 の発現は、筋傷害 12 日後の炎症初期よりも、3-4 日後の再生筋線維が増加する時期において、F4/80 陽性マクロファージで顕著に認められた。これらのマクロファージの多くは CD206 に陽性を示し、M2 マクロファージが多くを占めると考えられた。これらの結果より、筋再生の進行に応じて、M2 マクロファージは RNase T2 を合成・分泌し、負のフィードバックによって M2 マクロファージを減少させ、筋再生の進行を緩和させる機構を新たに仮説立てた。現在、定量的評価を進めている。

### 15 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 年以上の間に増加の一途をたどってきた。しかしながら、疾患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い。同様にアレルギー性疾患の根本的な発症機序は不明のままであり、治療法についても満足の行く解決策には至っていない状態にある。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比較解析する。同時に、衛生仮説を検証する目的で、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し、また線虫によって IgE が産生される際の標的分子の同定を目指す。これらの解析により、アレルギー性疾患の発症機序、および疾患が増えた原因の両方について模索する。

#### 3. 研究の計画・方法

1 つめは「マスト細胞の性状に関する研究」である。マスト細胞は一般的なアレルギー性疾患において中心的な役割を担っている。そこで、アレルギー疾患に感受性の高い BALB/c マウスと感受性の低い C57BL/6 マウスから骨髄由来マスト細胞を調製し、その性状を比較する。また末梢組織に存在するすでに成熟した腹腔マスト細胞を用いて脱顆粒の効率や顆粒内容を比較する。それにより、疾患感受性がすでに細胞レベルで存在するのか検討する。これまでの実験では、骨髄由来マスト細胞において BALB/c マウス由来の細胞の方が C57BL/6 マウス由来細胞よりも脱顆粒の効率が良く、系統差を示唆する結果が得られており、その分子機序について解析を進める。さらにアレルギー性皮膚炎を誘導し、2 系統のマウスで炎症反応にどのような相違があるか、時間が許せば、*in vivo* の解析を実施する。

2 つめは「線虫を用いた衛生仮説の検証」についての実験を行う。線虫が本当にアレルギーを抑制するのか、線虫の 1 種 *C. elegans* を用いて線虫に対する免疫応答を詳細に解析することから開始する。線虫をマウスの皮下と腹腔に投与し、線虫に結合する細胞が何か解析する。また線虫の分解・処理のされ方について追跡を試みる。同時に投与後の抗血清を回収し、血清中の抗体が虫体のどの成分に反応するか検討する。即ち、ウエスタンブロットにより、標的分子の同定を試みる。その一方で、線虫を投与したマウスからどうやって IL-4 産生に至るのか、所属リンパ節を回収してサイトカイン産生を解析し、ヘルパー T 細胞の分化、制御性 T 細胞が誘導されるか、また可能であれば、アレルギー性免疫応答を抑制するか検討する。

#### 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逆向きに遡ると、マスト細胞→IgE 抗体→B 細胞→ヘルパー T 細胞→樹状細胞→アレルゲン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連係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 2 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) 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

「マスト細胞の性状に関する研究」については、以前、C57BL/6 および BALB/c マウス系統の骨髄由来マスト細胞を用いて、脱顆粒反応の効率が異なることを見出した。つぎの段階としては、この脱顆粒の効率が異なる原因を探るために、細胞内シグナル分子の発現レベルに違いがないかを調べることにした。その結果、正の制御因子である Hck と Orai1 では、これまでの実験で BALB/c の方が C57BL/6 と比較して発現が高かった。Hck は PI3K および MAPK 経路を、Orai1 は Ca<sup>2+</sup> チャネルをそれぞれ促進するため、BALB/c はカルシウム動員が起きやすいことが示唆された。負の制御因子である MKP-1 は、BALB/c において発現が高かったが、それに対し SOCS-1 は C57BL/6 において発現が高く、SHIP-1 は同程度の発現であった。MKP-1 と SOCS-1 はサイトカイン産生を抑制すると言われている。アダプター分子である Dok-1 は BALB/c において発現が高く、反対に Dok-2 は、C57BL/6 において発現が高かった。その他の分子についても 2 系統間において発現量に差があるのか検討中である。

「線虫を用いた衛生仮説の検証」については、遺伝子改変が容易である線虫 *C. elegans* をマウスに投与して、感染状態と同様に IgE が産生することの再現性をまず確認し、続いて、投与された線虫がその後どのように認識、消化・分解し、抗原提示されているか、IgE 産生に結びついているのかを解析した。さらに線虫を投与されたマウスで産生された抗血清中の IgE 抗体の標的分子の検索も併せて実施した。虫体をエバンスブルーで染色し、マウスに皮下投与し追跡した。1 日後では、投与部位に形体を維持したまま虫体が残存していたが、5 日後では形体はペースト状に変わっていた。腹腔内投与では、1 日後、脾臓付近の大網に多く残存し、虫体は形体を維持したまま被膜に覆われていたが、5 日後は腸間膜に被膜に覆われてまばらに残存し形体はあまり維持されていなかった。一方、線虫を投

与したマウスの抗血清中の IgE 抗体によるウェスタンブロットでは、75、140 kDa 付近に標的分子の可能性が示唆された。これらの標的分子に対して免疫沈降を試み、銀染色した結果、50、140 kDa 付近に濃いバンド、75 kDa 付近に薄いバンドが確認された。これらのバンドの中に標的分子が含まれている可能性が示唆された。

#### 16 心理的ストレスが免疫細胞へ与える影響

##### 1. 研究の所属・氏名等

動物科学科 動物生体防御学教室

准教授 小柳 円

##### 2. 研究の目的

心理的ストレスは免疫系に様々な影響を与える。ストレス時にみられる免疫学的影響には、免疫抑制、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。

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ため、ストレス感受性やアレルギー反応の異なる BALB/c および C57BL/6 マウスの系統間におけるストレスにより誘導される遺伝子の発現誘導の違いに着目し、研究を行ってきた。短期間の拘束ストレスにより *gilz*, *rtp801*, *mkp-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。しかしながら、長期拘束ストレスを負荷した結果、*gilz*, *rtp801*, *mkp-1* 遺伝子に加え、*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 (Immunol Invest. 2020)。また、短期ストレスで増加した *gilz*, *rtp801*, *mkp-1* の遺伝子発現は副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) ノックアウト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。しかしながら、マウス系統間での大きな差異はみられなかった。本研究では新たなストレス感受性遺伝子を探索し、マウス系統間で発現の異なる分子を明らかにすることを目的とした。

このように、マウスの系統間での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られる。

##### 3. 研究の計画・方法

###### 1) 新規ストレス感受性遺伝子の探索と定量 PCR の確立

BALB/c マウスに拘束ストレスを 1 日 5 時間負荷し、5 日間繰り返した。脾臓細胞から RNA を精製し、無処置マウスとともに RNA シークエンスを行った。無処置マウスと比較し発現量が顕著に増加した遺伝子を選出した。

選出した遺伝子の発現量を確認するために定量 PCR 用プライマーを設計し、段階希釈した cDNA を用いて検量線を作成し、PCR 効率の確認を行なった。拘束ストレス負荷 BALB/c マウス脾臓の cDNA を用いて、qPCR によ



り遺伝子発現の増減の検討を行なった。

## 2) ストレス感受性遺伝子の免疫細胞への影響

これまでに報告したストレス感受性遺伝子について、レトロウイルス発現ベクターを作成し、T 細胞に遺伝子導入し、抗原刺激後の細胞増殖、IL-4、IFN- $\gamma$  などのサイトカイン産生を検討した。

## 3) 拘束ストレスによる免疫細胞への影響

OVA ペプチドに特異的に反応する T 細胞受容体を遺伝子導入した DO11.10 マウスを用いて、1 日 5 時間の拘束ストレス負荷を 1 日もしくは 2 日間行い、脾臓細胞を調整した。これらの細胞のストレス関連分子のタンパク量を測定するとともに、OVA もしくは抗 CD3 抗体を用いて脾臓細胞を刺激し、IL-4、IFN- $\gamma$  などのサイトカイン産生を検討した。

## 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、免疫応答およびストレス感受性の異なる 2 種類のマウス系統を比較して行った。

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く、C57BL/6 マウスはコルチコステロン産生量が少なく、系統によりストレス感受性が異なる。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<sup>wt</sup> 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<sup>qn</sup> 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)。

さらに、マウス系統によりストレス感受性が異なる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- $\gamma$  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。

これらのマウス系統間の差異が GR の遺伝子配列の相違に着目し検討を行なっている研究は他に見られない。

## 5. 研究の成果

### 1) 新規ストレス感受性遺伝子の探索と定量 PCR の確立

RNA シークエンスの結果、無処置マウスに比較しストレス負荷マウスにおいて遺伝子発現が高かった *mmp8* をはじめとする 16 種類の遺伝子を選び出した。これらの遺伝子の発現を定量するために qPCR のプライマーを設計し、段階希釈を行った cDNA を用いて検量線を作成した。その結果、100 % 前後の PCR 効率が見られたため、今後は、BALB/c および C57BL/6 マウスを用いてストレス負荷による遺伝子発現誘導のマウス系統間の違いが見られるかど

うかを検討していく予定である。

## 2) ストレス感受性遺伝子の免疫細胞への影響

これまでに、*gilz*、*rtp801*、*mkp-1* の遺伝子を T 細胞に強制発現させ検討を行なってきたがさらに *bnip3* 遺伝子を強制発現させ、再度検討を行なった。その結果、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、再現性が得られた。Bnip3 を強制発現させた T 細胞では、サイトカイン産生に影響は見られなかったものの、細胞増殖が亢進するという結果が見られた。

## 3) 拘束ストレスによる免疫細胞への影響

DO11.10 マウスを用いて、1 日 5 時間の拘束ストレス負荷を 1 日もしくは 2 日間行い、まずは脾臓細胞においてこれまでに遺伝子レベルでの発現誘導を確認してきた GILZ のタンパクレベルでの発現を確認した。その結果、GILZ の発現は拘束ストレスにより発現の誘導は見られたが、ストレス負荷回数による増強は得られなかった。次にストレス負荷マウス脾臓細胞を OVA もしくは抗 CD3 抗体で刺激したところ、IL-4 産生が誘導される傾向が見られた。これらの結果より、ストレス負荷により GILZ の発現増加がみられたことにより、IL-4 産生の誘導がみられたと考えられ、今後はさらに詳細なメカニズムの解明、他のストレス関連分子との関係を明らかにしていく。

## 17 二酸化炭素マイクロバブルによるタンパク質変性作用の解析

### 1. 研究の所属・氏名等

食品科学科 食品工学教室  
准教授 小林史幸

### 2. 研究の目的

近年考案した低加圧二酸化炭素マイクロバブル (CO<sub>2</sub>MB) は強力な殺菌・酵素失活 (タンパク質変性) 効果を有する。この CO<sub>2</sub>MB による殺菌は、微生物細胞内の生命維持に関わる酵素タンパク質の変性が関与していると考えている。加えて、CO<sub>2</sub>MB が牛乳や豆乳の様な高タンパク質飲料中のタンパク質を凝集させることが明らかとなっている。このように、CO<sub>2</sub>MB にはタンパク質を変性させる働きがあるが、どのように作用するかはわかっていない。そこで本研究では、CO<sub>2</sub>MB によるタンパク質変性作用と酵素失活効果の関係について解析した。

### 3. 研究の計画・方法

- 試料：試料として市販の  $\alpha$ -アミラーゼ (3.2.1.1) を 0.2 mol/L 酢酸緩衝液 (pH7) に懸濁させた溶液を用いた。
- CO<sub>2</sub>MB 処理：表 1 に示す条件で行った。比較のため、加熱処理を CO<sub>2</sub>MB と同様の条件で行った。

表 1 CO<sub>2</sub>MB の処理条件

	温度 (°C)	圧力 (MPa)	滞留時間 (分)
混合槽	10	2	5
加熱処理槽	75	6	0.5, 1.0, 1.5, 2.0



3. 失活効果の検討： $\alpha$ -アミラーゼの残存活性は市販の活性測定キット（キッコーマンバイオケミファ株式会社）を用いて測定し、失活効果を速度論的解析により検討した。
4. 貯蔵試験： $\text{CO}_2\text{MB}$  処理した  $\alpha$ -アミラーゼ溶液を  $-30^\circ\text{C}$ 、 $5^\circ\text{C}$  および  $25^\circ\text{C}$  で2週間貯蔵して経時的に酵素活性を測定した。
5. 変性の解析： $\text{CO}_2\text{MB}$  処理した  $\alpha$ -アミラーゼ溶液を電気泳動（SDS-PAGE および Native-PAGE）に供した。
6. タンパク質濃度の測定：ピシンコニン酸（BCA）法、Pierce 660 nm Protein Assay (PPA) 法およびブラッドフォード（BF）法を用いて分光光度計で測定した。
7. 分光分析による高次構造への影響の検討： $\text{CO}_2\text{MB}$  が  $\alpha$ -アミラーゼの三次構造に与える影響を分光光度計（280 nm）および蛍光分光光度計（励起波長：290 nm、蛍光波長：338 nm）により測定した。

#### 4. 研究の特色

$\text{CO}_2\text{MB}$  のタンパク質変性作用は  $\text{CO}_2\text{MB}$  のカギとなる効果であり、そのメカニズムを解明することによりさらなる発展が期待できる。

#### 5. 研究の成果

$75^\circ\text{C}$  での  $\text{CO}_2\text{MB}$  および加熱処理により  $\alpha$ -アミラーゼ活性は滞留時間に伴い直線的に低下したため、D 値（一定条件下で活性を 90% 低下させるために要する時間）を算出して比較したところ、 $\text{CO}_2\text{MB}$  および加熱処理でそれぞれ 1.24 分および 18.54 分となり、 $\text{CO}_2\text{MB}$  による失活は熱処理のみよりも著しく効果的であった。さらに、 $\text{CO}_2\text{MB}$  処理後の  $\alpha$ -アミラーゼ溶液を  $25^\circ\text{C}$ 、 $5^\circ\text{C}$  および  $-30^\circ\text{C}$  で2週間貯蔵して活性を測定し、D 値を算出したが変化はなかったことから、 $\text{CO}_2\text{MB}$  による  $\alpha$ -アミラーゼの失活は不可逆的に生じることが認められた（表2）。

$75^\circ\text{C}$  で  $\text{CO}_2\text{MB}$  処理した  $\alpha$ -アミラーゼ溶液を SDS-PAGE および Native-PAGE に供して得られたバンドは、加熱処理槽内の滞留時間に伴い薄くなったが、加熱処理ではあまり変わらなかった。そのため、 $\text{CO}_2\text{MB}$  および加熱処理した  $\alpha$ -アミラーゼ溶液の濃度を BCA 法、PPA 法および BF 法により定量した。その結果、 $\text{CO}_2\text{MB}$  処理により  $\alpha$ -アミラーゼ濃度は測定方法により違いがあったものの直線的に減少したが、加熱処理ではほとんど減少しなかった（図1）。さらに、 $\text{CO}_2\text{MB}$  処理後の  $\alpha$ -アミラーゼ溶液の吸光度および蛍光強度は、活性および濃度と同様に加熱処理槽内の滞留時間に伴い直線的に減少した（図2）。

以上の結果から、 $\text{CO}_2\text{MB}$  による  $\alpha$ -アミラーゼの失活は不可逆的に生じ、その作用が高次構造の変性および  $\alpha$ -アミラーゼ濃度の減少と関連することが認められた。しかしながら、 $\text{CO}_2\text{MB}$  により  $\alpha$ -アミラーゼ濃度が減少した要因については今後検討する必要がある。

表2  $\text{CO}_2\text{MB}$  処理した  $\alpha$ -アミラーゼにおける貯蔵の影響

貯蔵期間（週）	貯蔵温度（ $^\circ\text{C}$ ）	D 値（分）
0（ $\text{CO}_2\text{MB}$ 処理直後）	-	$1.24 \pm 0.026$
	25	$1.33 \pm 0.056$
	5	$1.12 \pm 0.069$
1	-30	$1.24 \pm 0.067$
	25	$1.28 \pm 0.040$
	5	$1.19 \pm 0.075$
2	-30	$1.11 \pm 0.047$

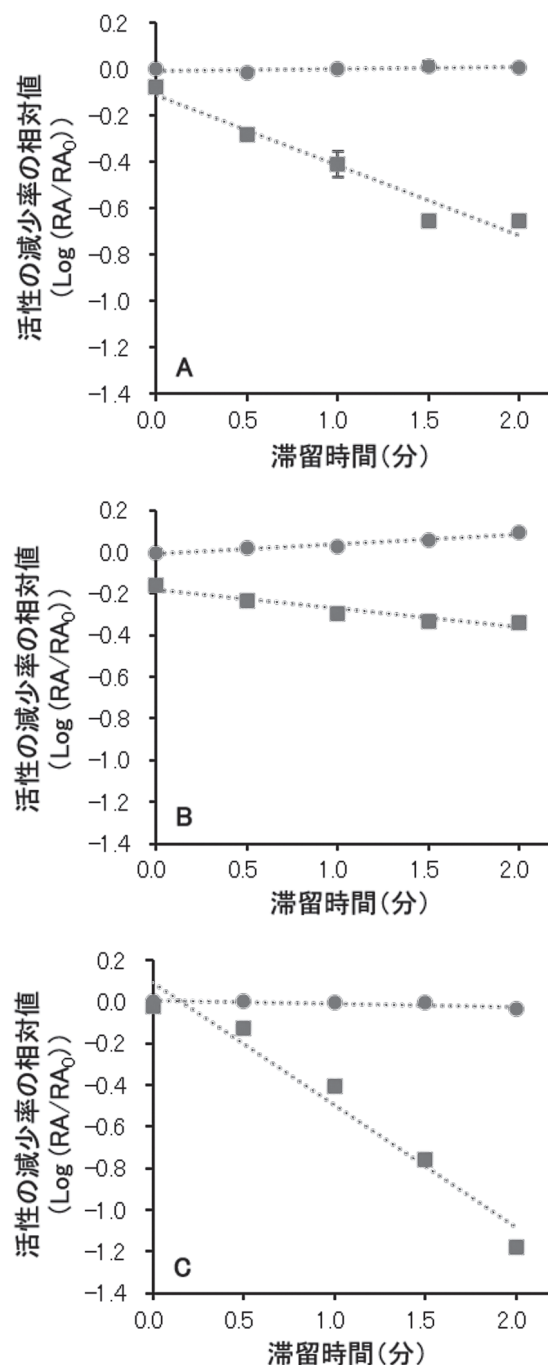


図1  $\text{CO}_2\text{MB}$  および加熱処理後の  $\alpha$ -アミラーゼ濃度  
A: BCA 法により測定、B: PPA 法により測定、C: BF 法により測定  
■:  $\text{CO}_2\text{MB}$  処理、●: 加熱処理

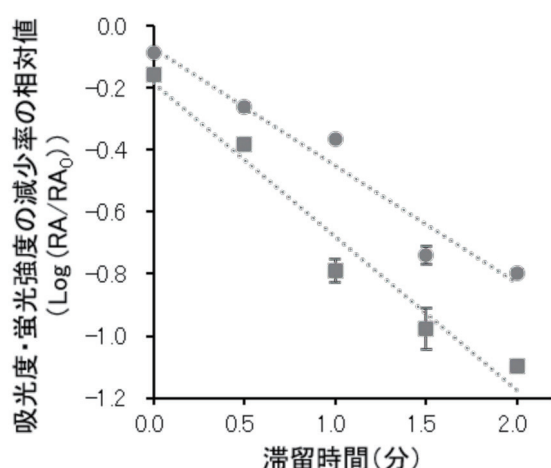


図2 CO<sub>2</sub>MB 処理後の $\alpha$ -アミラーゼの吸光度および蛍光強度  
 ■: 蛍光分光光度計により測定、●: 分光光度計により測定

## 18 野菜由来の色素関連成分と抽出物による持久運動後のエネルギー回復機構の解明

### 1. 研究の所属・氏名等

食品科学科 農産食品学教室  
 講師 松田寛子

### 2. 研究の目的

野菜には、色素成分であるクロロフィルやカロテノイドが多く含まれている。これらの色素成分は“ファイトケミカル (phytochemical)”と総称され、食物繊維に続く第7の栄養素として近年重要視されている。一方、食品栄養学分野としては、運動パフォーマンスの向上やロコモティブシンドロームに関する研究の推進が大きな課題であるが、ファイトケミカルに着目した研究結果は未だ乏しい。申請者はこれまでに、ファイトケミカルによる骨格筋中のエネルギー源となるグリコーゲンの確保機能(糖取り込み促進能)を明らかにしており、ファイトケミカルが運動パフォーマンスの向上と迅速な疲労回復に貢献できる可能性を見出している。よって、本申請では、持久運動後のエネルギー回復に与えるファイトケミカルとそれらを含む野菜抽出物の影響の解明を目的とし、本申請期間では持久運動後のクロロフィル関連物質の摂取による、骨格筋中のグリコーゲン量変動とその変動機構についてマウスを用いて検討した。

### 3. 研究の計画・方法

全ての動物実験は、日本獣医生命科学大学の規則に則って実施した。

#### 〈実験1〉

6週齢 ICR 雄マウスを1週間環境順化させた後、非運動 (baseline) 群、運動直後 (0 分) 群、グルコース 4 mg/g bw 投与 (Cont) 群、グルコース 4 mg/g bw + クロロフィル関連物質 0.2 mg/g bw 投与 (Phy) 群とし、Cont 群、Phy 群に運動後の回復時間 60 分、120 分群を追加した計 6 群に群分けをした ( $n=6$ )。その後、全群に4日間のトレッ

ドミル走行練習 (25 m/分、10 分) をさせた。4 日目に4時間絶食後、非運動群の組織 (肝臓、前脛骨筋、腓腹筋) を摘出すると共に血液を採取した。それ以外の群にはトレッドミル走行運動 (25 m/分、90 分) をさせ、運動直後群は終了直後に、Cont 群と Phy 群はそれぞれの投与液を経口投与後に、回復時間経過ごとに3種混合麻酔下にて組織および血液を得た。その後、フェノール硫酸法を用いて組織のグリコーゲン量を測定した。また、キットを用いて血糖値および血中遊離脂肪酸 (NEFA) 値を測定した。

#### 〈実験2〉

マウスを環境順化させ、Cont 群と Phy 群の2群のみ群分けし、トレッドミル走行運動まで実験1と同様に処理した。また、それぞれ実験1と同様の投与液を経口投与し、0、15、30、60、120 分後ごとに尾静脈採血をし、経口糖負荷試験を実施した。その後、血糖値および NEFA 値を測定すると共に、ELISA 法にて血中インスリン量を測定した。

#### 〈統計解析〉

測定値は群ごとにスミルノフ・グラフス検定を行い、棄却判定をした。その後、baseline 群 - 処理群、0 分群 - 処理群で Dunnet 法を用いた。また各回復期間における Cont 群 - Phy 群間で t 検定を行い、1% および 5% 以下の危険率で有意差を判定した。

### 4. 研究の特色

野菜は、我々が生命を維持する上で必要不可欠な食品であり、世界的に問題視されている生活習慣病の予防・改善に効果的なイメージが多々あるため、食品市場において含有成分やその機能性が着目されることは多い。国内で消費される野菜のうち、葉菜類は根菜類と比べて年間の購入量が多い一方で、葉菜類の外葉などの年間廃棄量は、それぞれ数千～数万トンにものぼる。これらの廃棄物にも、クロロフィルなどのファイトケミカルは残存している。そのため、本申請で得られる結果は、廃棄されていた葉菜類における有効利用方法の提唱に繋がるため、農産業や食品産業が抱える廃棄物問題への波及効果は大きい。すでに、本研究室では、葉菜類からのクロロフィル関連物質の抽出・分析系を確立しており、実用化に向けた準備はできている。

また、食品栄養学分野において、ファイトケミカルに着目したスポーツ栄養に関する検討は独創性が高い研究である。よって、リハビリテーション・スポーツ科学分野とスポーツ市場への新たな知見の提供が可能となり、最終的にヒトの運動パフォーマンスや疲労回復の向上へも貢献できる。

### 5. 研究の成果

回復時間 60 分後における Phy 群のグリコーゲン量は、Cont 群と比較して前脛骨筋中で有意に増加した (Fig.1)。同様に、肝臓中では増加傾向にある一方で、腓腹筋においてはいずれの回復時間でも有意な差はみられなかった (データ非掲載)。

また、Phy 群は Cont 群と比較しては、糖投与後 120 分において、血糖値が減少傾向にあった ( $p=0.081$ ) (Fig.2)。

また、血中インスリン量については、糖投与後15分と120分にて有意に増加しており、NEFA 値においても糖投与後60分において増加傾向にあった ( $p=0.072$ ) (データ非掲載)。

得られた結果により、運動後の糖とクロロフィル関連物質の共投与によって前脛骨筋内のグリコーゲン量の増加が再度確認された。そのメカニズムには、血液中の糖取り込みを促進することと同時に、インスリン分泌を促進し、分泌量の減少を緩慢にするというインスリン分泌制御を介した機構である可能性が示唆された。また、NEFA 値が増加傾向にあることから脂質代謝促進を介した機構であることも予想された。今後は、インスリン依存的な糖取り込みやグリコーゲン代謝、さらには脂質代謝に着目したメカニズムの追究が必要である。

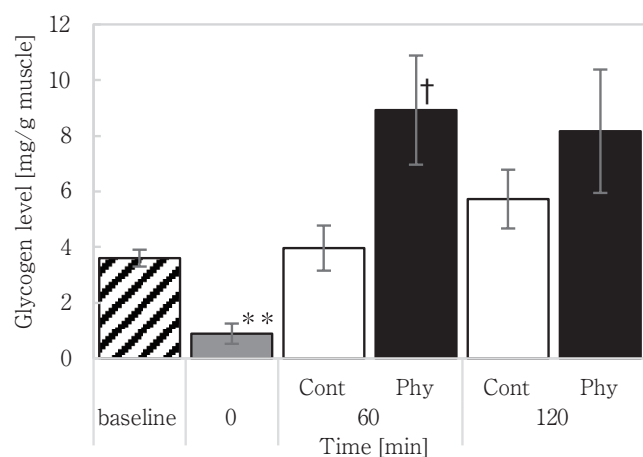


Fig.1 Anterior tibial glycogen level

(\*\* ; vs baseline( $p<0.01$ ) † ; vs cont60( $p<0.05$ ))

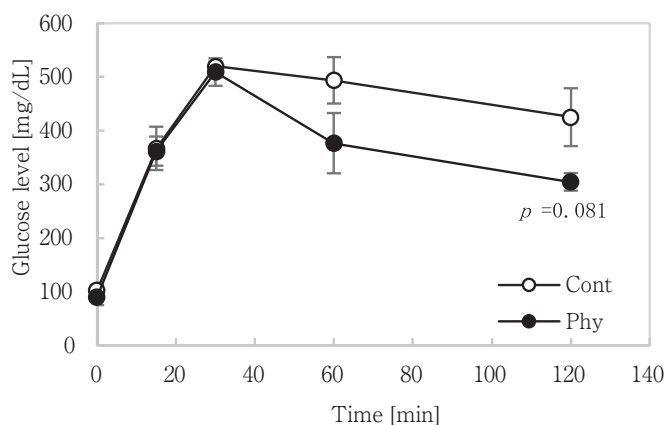


Fig.2 Blood glucose level