

2020年度日本獣医生命科学大学若手研究者研究支援経費 (研究成果報告書)

1. 造血組織及びリンパ性器官形態形成及び形態維持におけるヒスタミンの機能に関する研究

研究代表者 獣医学科 獣医解剖学研究室
講師 大塚裕忠

研究実績の概要

ヒスタミンの合成酵素である Histidine decarboxylase (HDC) は、肥満細胞のみでなく、骨髄の造血幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋や一部の腫瘍細胞など、広く発現していることが知られている。申請者らはこれまで、HDC を遺伝的に欠損したマウス (HDC - KO マウス) を用いて、造血・リンパ組織における形態学的解析やサイトカインの発現について解析を実施し、脾臓における赤血球造血の亢進や小腸上皮内リンパ球の増加など、野生型と異なる細胞ポピュレーションを明らかにしてきた。

今回、HDC 欠損マウスを用いた研究対象を個体発生および生育過程にまで広げ、形態形成や形態維持におけるヒスタミンの機能について解明目的として研究を進めた。その結果、未成熟マウス肝臓内において、本来造血が終了する時期にあっても、造血が維持されおり、これには、造血関連サイトカインの発現制御にヒスタミンが関与していることが解明された。この結果については、学術誌に報告をおこなった (Anat. Rec., 2020)。また、髄外造血を誘導する窒素含有型ビスホスホネート (NBP) の投与により、HDC-KO マウスでは、本来、NBP 投与によって傷害される造血支持細胞が維持されることで、NBP による炎症反応や骨髄造血抑制反応を抑制することが確認された。このことについても専門学術誌に報告している (Int. J. Hematol., 2021)。

今回の研究で得ることができた結果は、個体発生や形態形成におけるヒスタミンの機能について解明するのみではなく、ヒスタミンをターゲットとした炎症性疾患や造血疾患に対する新たな治療戦略の開発へとつながる可能性を有している。

研究発表

[雑誌論文]

- 1) Syunya Noguchi, Yoshiaki Kubo, Mami Araki, Miki Koh, Yuji Hamamoto, Kyoichi Tamura, Hirotsada Otsuka, Akiko Yasuda, Daigo Azakami, Masaki Michishita, Satoshi Soeta. Big Insulin-like Growth Factor 2-Producing Tumor in a Hypoglycemic Dog. *Veterinary pathology*. 57. 2020. 432-436. doi: 10.1177/030098582090689.
- 2) Miki Koh, Syunya Noguchi, Mami Araki, Hirotsada Otsuka, Makoto Yokosuka, Satoshi Soeta. Expressions of vascular endothelial growth factor receptors, Flk1

and Flt1, in rat skin mast cells during development. *The Journal of veterinary medical science*. 6. 2020. 745-753. doi: 10.1292/jvms.20-0092.

- 3) Hirotsada Otsuka, Yasuo Endo, Hiroshi Ohtsu, Satoshi Inoue, Mutsuki Kuraoka, Miki Koh, Hideki Yagi, Masanori Nakamura, Satoshi Soeta. Changes in histidine decarboxylase expression influence extramedullary hematopoiesis in postnatal mice. *Anatomical record*. online. 2020. doi: 10.1002/ar.24533.
- 4) Hirotsada Otsuka, Yasuo Endo, Hiroshi Ohtsu, Satoshi Inoue, Syunya Noguchi, Masanori Nakamura, Satoshi Soeta. Histidine decarboxylase deficiency inhibits NBP-induced extramedullary hematopoiesis by modifying bone marrow and spleen microenvironments. *International journal of hematology*. 113. 2021. 348-361. doi: 10.1007/s12185-020-03051-0.

[学会発表]

- 1) 大塚裕忠, 粕谷晴美、遠藤康男、大津浩、中村雅典、添田聡. The Function of Histamine in Hepatic Hematopoiesis in Postnatal Mice. The 126th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists, the 98th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan. 2021年3月28日 名古屋 (online) .

[図 書]

- 1) 日本獣医解剖学会編, 大塚裕忠 他. 学窓社. 獣医組織学 (Chapetr10.3 「歯」の項) . 2020. 397.

2. オルガノイド培養法を用いたヒトのモデル動物であるネコの乳癌の特性解析

研究代表者 獣医学科 獣医病理学研究室
講師 町田雪乃

研究実績の概要

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。

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。

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。1つの乳腺癌から形成されたオルガノイドは、形態学的に管腔構造を形成し、腺上皮様の増殖が確認された。また今年度は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、免疫組織化学的に原発巣との相違を評価する。さらに、猫の乳腺癌で活性化するシグナル伝達経路を同定し、効果的な抗癌剤のスクリーニングをおこなう。

〔雑誌論文〕

- 1) 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. *J. Comp. Pathol.* 179. 2020. 31-35. doi: 10.1016/j.jcpa.2020.06.014.
- 2) Kawakami 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 Y208C attenuates dimerization ability. *Oncol. Lett.* 20. 2020. 351. doi: 10.3892/ol.2020.12214.

3. 遺伝的価値の高い犬の精液バンク設立を目的とした凍結精液作成技術に関する発展的研究

研究代表者 獣医学科 獣医臨床繁殖学研究室
教授 堀 達也

研究実績の概要

申請者が以前から行っている研究において、犬凍結精液を用いた外科的子宮内人工授精で高い受胎率を得ることに成功したが、非外科的子宮内人工授精法または腔内人工授精法では同様に高い受胎率を得ることができない。これを解決し犬凍結精液を一般的に普及させるためには、融解後の性状を向上させるための技術の改良が必要である。そこで今回、融解後の精液性状を向上することを目的として、融解液の開発についての検討を行った。

犬精液希釈液の成分であるトリス・フルクトース・クエン酸液をベースとし、融解課程において酸化ストレスが精子活力を低下させる可能性があることから抗酸化作用を持つN-acetyl-L-cysteine (NAC) と、凍結融解後の精子の細

胞膜の不安定化によりCa²⁺が流入し、それに起因する機能障害が起こることが豚凍結精子で報告されていることから、Ca²⁺流入抑制作用を持つエチレングリコールビス-N,N,N,N+ 四酢酸 (EGTA) を添加した融解液をそれぞれ作成した。なお犬凍結精液は、従来のEYT-FCを用いた方法で作成されているものを使用し、融解後に精液と融解液が1:1になるように添加し、融解後の精液性状の経時的変化を観察した。

その結果、従来の融解液を使用しない群（コントロール群）と融解液を使用した群を比較したところ、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り、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、まだ研究は途中であり、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の検討および効果のあるものの組み合わせなどの検討が行われていないため、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したいと考えている。

4. 消化管疾病制御のための新規セロトニン調節系の探索

研究代表者 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

研究実績の概要

セロトニンは消化管機能や血栓形成に欠かせないオータコイドである。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、これらの症例が消化管からの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。

申請者はこれまでに同剤の十二指腸潰瘍 (システアミン) や胃・小腸潰瘍 (インドメタシン) モデルにおける潰瘍治療効果を確認 (J.Gastroentel., 2010、第5回アジア実験動物学会、第62回実験動物学会)、消化管運動以外の薬効について報告してきた。また術後腸管麻痺 (POI) モデルにおいて消化管運動回復効果のみならず筋層における抗炎症作用を確認 (Tsuchida, Fujisawa ら、Gut, 2011)、同薬剤の多面的作用を実証するに至った。また予備実験としてマウス耳介静脈を用いたクエン酸モサプリドの血管透過性試験を行ったところ、濃度依存的な透過性抑制作用を確認したことから、同剤の抗潰瘍効果は一部、消化管微小循環系からの出血を防止し、潰瘍形成抑制に寄与している可能性が示唆されるが、内皮細胞・血小板の相互作用への関連は明らかではない。本申請ではセロトニン5-HT₄受容体作動薬の新たな薬効を探索する目的でNVUGIB消化管粘膜

障害 (NSAID: インドメタシン胃・小腸潰瘍) 時の血小板・血管内皮細胞培養系における 5HT₄ 受容体刺激試験を実施、血小板由来あるいは内皮細胞由来因子の相関性について現在継続中であり、次年度内の完成を目指している。

[雑誌論文]

- 1) Sugai K, Hakamata Y, Tamura T, Kataoka M, Fujisawa M, Sano M, Kobayashi E. A microsurgical technique for catheter insertion in the rat femoral artery. *Acta Cirurgica Brasileria*. 35(10). 2020. p.1-8. doi: 10.1590/s0102-865020200100000004.
- 2) Sugai K, Tamura T, Sano M, Uemura S, Fujisawa M, Katsumata Y, Endo J, Yoshizawa J, Homma K, Suzuki M, Kobayashi E, Sasaki J, Hakamata Y. Daily inhalation of hydrogen gas has a blood pressure-lowering effect in a rat model of hypertension. *Scientific Reports*. 10(1). 2020. p.20173. doi: 10.1038/s41598-020-77349-8.

5. より効果的な弱毒生ワクチン株創出を目指した牛ウイルス性下痢ウイルス準種の応用研究

研究代表者 獣医保健看護学科 獣医保健看護学基礎部門
講師 塩川 舞

研究実績の概要

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) のより効果的な弱毒生ワクチンの作出を目的として研究を行った。ウイルスの病原性を低下させる方法として、異種動物由来細胞を用いたウイルス継代が古くから使用される。本研究でもこの方法を採用し BVDV の弱毒化を試みた。使用する細胞は、BVDV の自然宿主 (牛) から系統発生的に遠いネコに由来する細胞を採用した。また、BVDV や豚熱ウイルス (CSFV) を含むペスチウイルスには準種が存在する。少なくとも 2 つの準種が存在し、感染宿主の自然免疫応答を抑制する END⁺ウイルスと、それを誘導する END⁻ウイルスがある。現在国内で使用されている CSFV 用ワクチンは、CSFV の準種 END⁻を弱毒化したものである。本研究でも、BVDV の中でも END⁻を弱毒生ワクチンにできるか検討を行った。

BVDV の準種を単独感染させてネコ由来細胞で継代すると、END⁺は感染を維持できるが END⁻は感染を維持できないことがこれまでの研究から分かっている。そこで、2 つの準種を混合して感染させるという野外感染例を模倣した形でウイルス継代を実施した。人工合成した 2 つの準種を同比率で混合してネコ由来細胞に接種し 30 回継代を実施したが、ウイルスの増殖は認められなかった。そこで、人工合成したウイルスではなくすでに BVDV の準種が混在している野外株を用いてウイルス継代を行った。40 回継代した際の培養上清を用いて、逆ブラック法による END⁻の検出と分離を行ったところ、ネコ由来細胞に馴化した BVDV/END⁻の獲得に成功した。分離した時点ではウイルス力価が低い (牛由来細胞で測定: $10^{4.05}$ TCID₅₀/mL、ネコ由来細胞で測定: $10^{2.97}$ TCID₅₀/mL) ので、さらに継代を重ねることで力価の

上昇を試みる必要がある。また、馴化ウイルスの外殻を構成するエンベロープ蛋白質 (E2) のアミノ酸配列を調べたところ、継代前のウイルスと比較して 3 か所の変異が生じていることも分かった。これらの変異は BVDV の異種動物細胞への感染に必要な変異である可能性が示唆される。

[出 願]

- 1) 牛由来培養細胞の作出方法. 発明者: 塩川舞, 三浦亮太郎, 青木博史. 権利者: 塩川舞, 三浦亮太郎, 青木博史. 特願 2020-208145 号. 2020 年 12 月 16 日 国内.

6. “時短”を重視した機能性メニュー開発に関わる澱粉質野菜中の澱粉特性と機能性の研究

研究代表者 食品科学科 農産食品学教室
講師 松田寛子

研究実績の概要

当該年度は、コロナパンデミックの影響によりスムーズな研究遂行は困難であったが、申請書で対象としていたカボチャのうちについて得られた有益な研究成果を以下に報告する。

ホールパウダーを、100℃または120℃で加熱後に0,24,48時間6℃冷却して凍結乾燥にて再度パウダー化した試料について、レジスタントスターチ (RS) 量や *in vitro* にて食後の血糖値上昇度 (eGI 値) を検討した。いずれの処理条件においても、既往の精製デンプンにおける結果では、加熱冷却によって RS 量は大きく変動したものの、eGI 値は 70 以上の高 GI 食品相当であること示している。一方、ホールパウダーの場合は、RS 量の有意な変動は見られず、eGI 値についても 55 以下の低 GI 食品相当であった。特に着目したい結果としては、生カボチャに当たる無処理と 100℃加熱後 6℃冷却 0 時間処理の両試料間の eGI 値についてである。後者処理の試料は、糊化温度 100℃の加熱によりホールパウダー中のデンプン糊化が完了していると考え、eGI 値が大幅に高くなることを予想していたが、実際には、両処理試料間で大きな差はなかった。その後、両処理試料を脱脂処理すると、eGI 値は脱脂前よりも 10~20% 上昇する可能性が得られた ($n = 2 \sim 3$)。つまり、カボチャの eGI 値変動には、デンプンと脂溶性成分との相互作用がデンプンの糊化よりも影響していると予想できる。この結果から、未解明な点が多いカボチャデンプンの特性を一部解明するとともに、カボチャ料理による食後の血糖値上昇抑制は、デンプンと β -カロテンなどの脂溶性成分が相互作用が影響すると予測できることから、機能性メニュー開発の一助となる知見が得られた。今後はさらに検討を進め、上記結果の信憑性を高める。

成果発表を予定していた「日本調理科学会 2020 年度大会」はコロナパンデミックの影響により中止となったため、改めて 2021 年度大会にて発表する。