

2020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 犬のがん幹細胞代謝を標的した新規治療戦略の基盤構築

1. 本学研究代表者

獣医学科 獣医病理学研究室 准教授 道下正貴

麻布大学研究代表者

獣医学科 病理学研究室 教授 上家潤一

2. 研究の目的

本研究では治療法の確立していない犬の難治性がんを対象とし、難治性がんのがん幹細胞を標的とした新規治療法の基盤構築を目的とする。

3. 研究の計画・方法

本研究は3次元培養法を用いた *in vitro* 阻害剤スクリーニングを実施し、自己複製能を有する阻害剤を抽出する。さらに抽出された阻害剤のうち、がん幹細胞移植モデルマウスを用いた *in vivo* 抗腫瘍効果を明らかにし、獣医療への応用について検討する。

1) 3次元培養（sphere assay）を用いた犬乳癌幹細胞を標的とした分子標的阻害剤の抽出

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した分子標的阻害剤を抽出する。スクリーニングには分子標的阻害剤ライブラリー（39種類）を用いる。

2) 3次元培養（オルガノイド培養）系の樹立

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生体に発生したがん組織に類似する。上記で抽出された阻害剤の効果を評価するために犬の乳癌オルガノイド培養系の樹立を行う。

4. 研究の成果

分子標的阻害剤スクリーニングにより犬乳癌幹細胞の自己複製能を抑制する阻害剤を抽出した。今年度は癌代謝・増殖に重要な mTOR 経路に着目し、複数の mTOR 阻害剤を用いて癌幹細胞の自己複製能および癌細胞の増殖抑制効果を明らかにした。また外科切除乳癌癌組織を用いてオルガノイド培養系の樹立を試み、樹立に成功した。今後、分子標的阻害剤がオルガノイドに与える効果、さらに乳癌移植モデルマウスにおける抗腫瘍効果を検討する予定である。

本研究で得られる成果は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. 研究発表

〔雑誌論文〕

- 1) Michishita M. Understanding of tumourigenesis in canine mammary tumours based on cancer stem cell research. The Veterinary Journal. 265. 2020. 105560. doi: 10.1016/j.tvjl.2020.105560.
- 2) Teshima T, Okamoto K, Dairaku K, Nagashima T, Michishita M. Suzuki R, Matsumoto H, Koyama H. Generation of Insulin-Producing Cells from Canine Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. Stem cells International. 18. 2020. 8841865. doi: 10.1155/2020/8841865.
- 3) 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. Oncology Letters. 20. 2020. 351. doi: 10.3892/ol.2020.12214.
- 4) Sasaki N, Gomi F, Yoshimura H, Yamamoto M, Matsuda Y, Michishita M. Hatakeyama H, Kawano Y, Toyoda M, Korc M, Ishiwata T. FGFR4 Inhibitor BLU9931 Attenuates Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Invasion While Inducing Senescence: Evidence for Senolytic Therapy Potential in Pancreatic Cancer. Cancers (Basel). 12. 2020. 2976. doi: 10.3390/cancers12102976.
- 5) 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. 2020. 31-35. doi: 10.1016/j.jcpa.2020.06.014.
- 5) Tani H, Kurita S, Miyamoto R, Sawada H, Fujiwara-Igarashi A, Michishita M. Azakami D, Hasegawa D, Tamura K, Bonkobara M. Nimustine Treatment of 11 Cases of Canine Histiocytic Sarcoma. Journal of the American Animal Hospital Association. 56. 2020. 146. doi: 10.5326/JAAHA-MS-6959

〔学会発表〕

- 1) 道下正貴. 獣医病理学研修会 No. 1259. 犬の膀胱腫瘍. 第163回日本獣医学会学術集会. 2020年9月14日～30日 WEB開催.

2 犬猫のてんかんモニタリングユニット (EMU) の構築

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

これまで申請者である長谷川と齋藤は昨年度本助成金に採択された「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」および平成 29 - 令和 3 年度の科研費基盤 A で採択されている「小動物臨床におけるてんかん外科の導入」で犬猫のてんかん診断・治療に関する共同研究を行ってきている。昨年度、猫におけるてんかん発作検知システムは概ね完成し、また犬での同システムは開発済みである。てんかん外科を行うにあたり、術前にてんかん発作型（発作症状）を正確に捉える必要があり、そのためにはいつ始まるか判らない発作を連続的なビデオモニタリングを行い、昨年度に開発された発作検知技術を用いて、発作の動画記録および脳波記録を行わなければならない。本研究は、昨年開発された犬および猫の発作検知システムを利用（および改良）するとともに、脳波の同時記録を行えるような、かつ遠隔でモニタリングできるようなてんかんモニタリングユニット epilepsy monitoring unit (EMU) の構築を目指す。具体的には猫・小型犬用および中型・大型犬用の専用（シールドおよびアクリル扉）ケージを準備し、そこに WEB カメラ、発作検知システム、および有線脳波用スリップリング（ケージに付属させる）あるいは無線脳波用専用ジャケット（動物に装着する）をセッティングする。

3. 研究の計画・方法

大型犬のてんかんモニタリングには、①前面をアクリル板の扉とし（外部からの発作観察および録画のため）、後述②を取り付けられるように天井に穴を開けた大型ケージ、②脳波計と半無拘束動物の頭部の電極と接続し、連続的に脳波測定を行えるようにするためケージに設置させるスリップリング、③ケージ内での発作を記録するためのビデオカメラ、④発作検知システム（開発済み）と個人の端末への通知システム、⑤大型犬が装着する発作検知システムおよび／あるいは無線脳波送信機を保持できるジャケットが必要であり、これらを取りそろえ、組み合わせることで完成を目指す。

4. 研究の成果

本年度の共同研究経費により、上記 4 で示した①と③の購入および④の通知システムの構築（スマートフォン用アプリの開発；これにより動物に発作が生じた際、遠隔地にいる研究者／獣医師が携帯しているスマートフォンに発作発生の通知が送信されるようになった）を行った。加えて、他の研究費より②を購入している。⑤のみまだ準備できていないが、おおよその材料を揃えることが出来たため、大型犬対応の EMU の組み立てを行うことが可能となった。

今後は組み立て及び⑤のジャケットの作成を行い、実症例で運用を開始する予定である。

3 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

獣医学科 獣医衛生学研究室

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。我々は 2019 年度本研究申請課題において、イヌの自然発症腫瘍サンプル（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）で IDH1 遺伝子変異を検索したところ、複数の軟骨肉腫由来サンプルからこれまでにイヌで発見されていなかった新規変異 Y208C を同定した。この変異は、Catalog of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC; <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) データベースにおいて、ヒト肝臓がんの一部で存在が確認されているが、IDH1 機能におよぼす影響については言及されていなかった。このため、本共同研究では、イヌ IDH Y208C 変異が分子機能におよぼす影響について検討することとした。

3. 研究の計画・方法

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 Rotamer 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。さらに、グルタルアルデヒドによりダイマー固定を行い、Y208C 変異が二量体形成におよぼす影響を解析した。また、Y208C 変異が IDH1 の主要機能であるイソクエン酸脱水素反応におよぼす影響についても NADPH 産生量を指標として検証した。さらに、IDH1 R132H 変異で低酸素刺激時に惹起されることが知られている HIF-1 α 産生量についてもウエスタンブロッティングで明らかとした。最後に、IDH1 機能評価指標の一つである窒素酸化物 (NOX) 産生量についても各分子で

検証した。

4. 研究の成果

今回発見したイヌ IDH1 Y208C 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 を持つ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。MTH およびグルタルアルデヒドを用いた二量体架橋形成実験により、Y208C 変異体は野生型 (WT) や R132H 変異に比べ、ダイマー形成能力が有意に減弱することが明らかとなった。また、IDH1 活性の指標である NADPH 産生能測定の結果、本変異は、イソクエン酸脱水素酵素活性を有意に低下させることが明らかとなった。さらに、各種 IDH1 変異体を発現させた HeLa および MDCK 細胞に塩化コバルトで低酸素刺激を与えたところ、R132H 変異では HIF-1 α 発現が増加したが、WT および Y208C 変異体発現細胞での変化は見られなかった。R132H 変異と Y208C 変異は共にイソクエン酸脱水素酵素反応による NADPH 産生を減弱させるが、その機序には違いがある可能性が示された。NOX 産生については、有意に増加する IDH1 WT 強制発現に対し、R132H、Y208C 変異体では NOX 産生量に変化はなかった。本研究成果は麻布大学坂上元栄教授と共著で Kawakami *et al.*, Novel canine isocitrate dehydrogenase 1 mutation Y208C attenuates dimerization ability. (責任著者：落合)として、Oncology Letters 誌に掲載された。

5. 研究発表

〔雑誌論文〕

- 1) Kawakami S, ... Ochiai K, *et al.* (責任著者). Novel canine isocitrate dehydrogenase 1 mutation Y208C attenuates dimerization ability. *Oncology Letters*. 20(6). 2020. 351. doi: 10.3892/ol.2020.12214.
- 2) Uemura M, Ochiai K, *et al.* (責任著者). The canine RAD51 mutation leads to the attenuation of interaction with PALB2. *Veterinary and Comparative Oncology*. 18(2). 2020. 247-255. doi: 10.1111/vco.12542.
- 3) Iwata T, ... Ochiai K, *et al.* Tumor suppressor REIC/Dkk-3 and its interacting protein SGTA inhibit glucocorticoid receptor to nuclear transport. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 20(2). 2020. 1739-1745. doi: 10.3892/etm.2020.8819.
- 4) Ochiai K, *et al.* (筆頭・責任著者). The number of glutamines in the N-terminal of the canine androgen receptor affects signalling intensities. *Veterinary and Comparative Oncology*. 20(2). 2020. 1739-1745.

doi: 10.1111/vco.12663.

- 5) Guo J, ... Ochiai K, *et al.* N-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone regulates osteoblast apoptosis and differentiation by mediating intracellular calcium. *Cellular Signaling*. Epub. 2021. doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109740.

〔学会発表〕

- 1) 柏木伸旭、落合和彦、他. p53変異イヌ乳腺腫瘍細胞株 CTB-m2の性状解析. 第163回日本獣医学会学術集会 2020年9月. オンライン開催.

4 豚熱等ウイルス診断及び防疫の支障となりうる豚感染ペスチウイルスの多様性に関する研究

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 青木博史

麻布大学研究代表者

獣医学科 教授 長井 誠

2. 研究の目的

ペスチウイルス属には、26年ぶりに発生し現在も問題となっている豚熱ウイルス、国内に蔓延する牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)、2012年に日本で初めて分離された羊のボーダー病ウイルス (BDV) が含まれる。BVDV と BDV を合わせて反すう獣ペスチウイルス (RPV) と呼ぶが、いずれも豚に感染し、遺伝的、抗原的、血清学的に CSFV と似るために豚熱の診断や防疫の支障になることが知られる。さらに、これらウイルスは世界的に多様化が進んでおり、持続感染の拡大や病原性が中間型のウイルスの流行によって、ペスチウイルス感染症や豚熱の防疫が困難な状況に陥っている。また、非定型豚ペスチウイルスを原因とするダンス病や、清浄群で稀に出現する単独抗体陽性個体 (シングルトンリアクター) などが日本国内でも実際に確認されており、その実態が不明なまま豚熱等のウイルス診断の障害となっている。そこで本研究では、ウイルス遺伝子の多様性解析等で実績の高い麻布大学の長井教授とともに豚熱診断に混乱を招く恐れのある豚に感染した RPV や APPV についてウイルス学、遺伝学的及び疫学的に解析し、豚の伝染性疾病さらには迅速かつ特異性が求められる豚熱の診断や防疫に貢献することを目的とする。

3. 研究の計画・方法

RPV である BDV FNK2012-1 株から、限界希釈法、END 現象を応用した END 法、ならびに異種ウイルス干渉を応用した逆ブラック法などを組み合わせて遺伝学的・生物学的に異なるウイルス (準種) を単離し、得られた準種の生物性状及びウイルス遺伝子配列を解析し、準種の存在 (株内の多様性) を明らかにする。ダンス病を発症した豚などの材料から、RT-PCR により非定型豚ペスチウイルス (APPV) の遺伝子検出を行い、PCR 産物の塩基配列を決定後、分子疫学解析を行う。さらに、APPV 遺伝子が

検出された試料について各種培養細胞を用いたウイルス分離を試みる。本研究により分離または検出された RPV 及び APPV については、臨床現場で実際に用いられる豚熱ウイルス検査 (RT-PCR 及びリアルタイム RT-PCR) を行い、豚熱診断への影響を検討する。

4. 研究の成果

2012 年に豚から分離された BDV FNK2012-1 株は、羊由来細胞 2 種及び牛腎由来細胞 4 種に高い感受性を示したが、豚由来培養細胞 5 種においては細胞株種によってその感受性に顕著な差を示した。FNK2012-1 株を構成する準種を調べた結果、自然免疫を抑制するウイルスが主たる構成ウイルスであるが、ウイルス株全体の 0.1 ~ 1% の割合で自然免疫を誘導するウイルスが混在していることが判明した。さらに、両ウイルスの自然免疫制御能の相違にウイルス蛋白質 N^{pro} の 34 番目のアミノ酸が関与していることが明らかになった。これらの結果は、CSFV や BVDV と共通の生物性状又は特徴を持つことを示している (論文準備中)。また、両ウイルスともに豚熱ウイルス遺伝子検査で弱陽性又は陽性を示し、豚やイノシシの豚熱診断に影響する恐れがあることが判明した。以上のことから、BDV は豚由来培養細胞にも感受性を示し、CSFV や BVDV と共通の生物性状を有し、豚熱遺伝子検査で検出されることが明らかとなり、すなわち豚熱の検査において RPV の存在にも留意し、必要に応じて鑑別する必要があることが

明らかとなった。今後、臨床現場で実践可能な、高感度で、迅速かつ簡便な識別法を確立する必要がある。

ダンス病が疑われる豚の臓器又は血液から APPV の遺伝子を検出し、APPV Anna/2020 株として日本で初めて全塩基配列を解読し、ウイルス RNA 全長が 11,567 塩基であることを明らかにした (Accession No.LC596433)。また、分子疫学解析の結果、世界的にも新しい系統である Genotype 3 であることが判明した (論文投稿中)。本ウイルス試料を用いて豚熱ウイルス遺伝子検査を行ったところ陰性であり、また、解読した APPV の遺伝子配列を基に検討したところ APPV の主要抗原と豚熱の主要抗原との交差性は低い可能性があることから、APPV が豚熱の診断に影響する可能性は低いものと考えられた。次に、世界的にも APPV の分離に適した培養細胞が見つかっておらず、ウイルス分離は困難とされるが、APPV の分離を試みることにした。豚由来細胞 4 種、牛由来細胞 3 種、サル由来細胞、猫及び犬由来細胞を用いてウイルス分離 (3 代継代) を行っている。現在までに豚由来細胞 1 種で APPV が維持されている可能性があり、詳細に解析している。また、今後、ウイルス分離系やウイルス人工合成系を確立して活性のある APPV を入手する計画であり、病原学的及び血清学的な研究を継続し、APPV の獣医学的知見及び豚熱防疫に貢献する予定である。