

2021 年度大学間連携等による 共同研究経費に係る研究成果報告書 (麻布大学)

1 炎症性腸疾患の難治化を引き起こすステロイド抵抗性リンパ球の謎に迫る

1. 本学研究代表者

獣医学科 獣医内科学研究室 准教授 手嶋隆洋

麻布大学研究代表者

獣医学部 獣医学科 講師 五十嵐寛高

2. 研究の目的

犬の炎症性腸疾患の代表であるリンパ球形質細胞性腸炎 (LPE) には、ステロイド治療が奏功しない難治性症例が存在する。しかし、小動物臨床領域においては、難治性 LPE 症例の主因と考えられるステロイド抵抗性リンパ球の特徴やステロイド抵抗性獲得機序が不明であるため、治療の糸口をつかめない状況が続いている。本プロジェクトは、ステロイド抵抗性リンパ球の謎に迫ることで、難治性 LPE に対する新たな創薬開発を目指すものである。今回の研究計画は、ステロイド抵抗性リンパ球の特性と活性化因子の解明を目指し、難治性 LPE の創薬開発へとつなげるための基盤構築を目的とした内容である。

3. 研究の計画・方法

1. 腸粘膜サンプルからのリンパ球分離方法の確立

本研究では、腸粘膜に存在するリンパ球の解析が必要不可欠である。そこで、内視鏡下生検で採取した腸粘膜から効率的にリンパ球を分離回収する方法の確立に取り組んだ。マウスやラットなどのげっ歯類動物では、摘出した腸管全体からリンパ球を分離回収する方法が報告されているが、犬の内視鏡下生検サンプルから効率的にリンパ球を分離回収する方法は報告がない。そこで、動物種を問わず、腸粘膜リンパ球の分離回収方法を参考に、プロトコルを立案し、それぞれの回収効率を検討した。具体的には、組織分散試薬の種類とその反応時間、および密度勾配法の条件をそれぞれ検討し、回収される単核球の細胞数と生存率を検討した。

2. 腸粘膜リンパ球のフローサイト解析

分離回収した単核球の性状を把握するために、フローサイトメトリーを用いて CD3+、CD4+、CD8+ 細胞の割合を検討した。

3. 腸粘膜に存在する CD4+ リンパ球を対象としたサイトカイン産生の検討

分離回収した単核球をコンカナバリン A で処理した後に、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) とイオノマイシンで刺激することで細胞内サイトカインの産生を促進した。刺激後の単核球細胞内のサイトカイン (IFN γ 、IL-4) について、フローサイトメトリーを用いて解析した。

4. 研究の成果

1. 腸粘膜からのリンパ球分離

組織分散試薬として、① 1mM DTT と 1mM EDTA の混合液、② 200units/mL collagenase Type I、③ 0.5mg/mL collagenase Type II、④ Dri Tumor & Tissue Dissociation Reagent (TTDR) のいずれかによって組織を消化し、40%/70% Percoll 液、もしくは 35%/60% Percoll 液による密度勾配遠心によって単核球を分離した。その結果、③ 0.5mg/mL collagenase Type II と 35%/60% Percoll 液の組み合わせが最も回収効率が高く、回収した単核球の生存率も優れた結果であった。そのため、以下の検討は、この方法によって分離した単核球を用いて実施した。

2. 腸粘膜リンパ球の分画

LPE 症例から分離した単核球をフローサイト解析した結果、CD3+ 細胞は 85.6 \pm 8.9%、CD3+CD4+ 細胞は 40.1 \pm 6.8%、CD3+CD8+ 細胞は 32.5 \pm 10.1% であった。また、この結果は健常なビーグル犬 3 頭の腸粘膜から分離した単核球の割合と明らかな違いはみられなかった。

3. サイトカイン産生細胞の割合

分離回収した単核球をコンカナバリン A で刺激後、細胞内サイトカイン (IFN γ 、IL-4) をフローサイト解析した結果は、CD4+IFN γ + 細胞は 15.3 \pm 9.6%、CD4+IL-4+ 細胞は 7.2 \pm 5.3% であった。CD3、CD4、CD8 の分画と同様に、健常なビーグル犬から採取した腸粘膜リンパ球の結果と明らかな違いはみられなかった。

4. 難治性 LPE 症例における解析

今回の検討では、2 頭の難治性 LPE 症例が含まれているが、ステロイド治療が奏功した症例と難治性 LPE 症例では、腸粘膜リンパ球の分画やサイトカイン産生細胞の割合に明らかな違いはみられなかった。今後は、さらに症例数を積み上げて評価する必要があるが、既存のリンパ球分画やサイトカイン産生細胞の検討では難治性 LPE 症例の特徴を解明することは難しいと考えられる。これは、当初から我々が予想していた結果ではあったものの、犬の難治性 LPE 症例における腸粘膜リンパ球の比較解析に関しては報告がなかったため、今回の検討で明らかにできたことは、今後の研究を展開していくうえで非常に有用な結果が得られたと考えている。

今後は、in vitro におけるステロイド抵抗性を評価するとともに、ステロイドに抵抗性を示すリンパ球に焦点を当てて、より詳細に解析していく予定である。

2 腸内エコロジー悪化によるアトピー性皮膚炎発症のメカニズム解明

1. 本学研究代表者

獣医病理学研究室 教授 塚田晃三

麻布大学研究代表者

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）の罹患率は世界人口の 4.3 % と高く、ダニ抗原やハウスダストなどの環境因子、ストレスなどの社会的因子が関連しているとされている。一方、炎症性腸疾患（IBD）の罹患率も世界人口の 0.3% と比較的高く、潰瘍性大腸炎とクローン病に分類され、原因は遺伝性素因、感染、薬剤、ストレスなどの社会的因子や生活習慣などの環境因子の関与も示唆されている。これらの疾病は、生命に関わるケースは少ないが、仕事や社会活動などの QOL 低下の切実な問題として社会に大きく影響している。

これまでに合併症モデル動物が確立されていなかったことから、その機序を詳細に解析することが困難であった。申請者は AD モデル NC/Nga 系マウスが IBD 合併症モデルになることを発見し、さらに、AD と IBD との関連性から、腸炎から AD 発症が起り得るかを調べるため、プレ実験を実施したところ、興味深いことに、NC/Nga 系マウス（雄）にデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘導性腸炎を導き、その数ヶ月後に全ての個体に AD が自然発症することが判明した。本研究の目的はその機序解明を目指す点にある。

3. 研究の計画・方法

NC/Nga 系マウスを用いての個体数を揃えた再現実験を実施し、経時的血中サイトカイン（IL-33、IL-18）の変動を調べ、皮膚炎の経時的スコア化、腸間膜リンパ節における自己反応性 Th17 の動態、小腸および大腸の病理組織学的変化を観察する。また同時に、糞便中の腸内細菌叢の変化を次世代型シーケンス解析により明らかにし、更に短鎖脂肪酸の産生パターンを調べる。

4. 研究の成果

NC/Nga 系マウス（雄）に DSS 誘導性腸炎を誘導すると、血中 IL-33 よりも IL-18 の動態が一致した。一方、数ヶ月後にアトピー性皮膚炎発症後では、血中 IL-33 の動態が一致した。腸内細菌叢では、DSS 誘導性腸炎を誘導すると、*Escherichia coli/Shigella* および *Clostridium cocleatum* が顕著に増加し、反面、*Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus reuteri* が減少すること、数ヶ月後のアトピー性皮膚炎発症後では、*Streptococcus danieliae*、*Enterorhabdus mucosicola*、*Anaerotaenia torta* が特異的に増加することが判明した。また、腸内細菌叢における短鎖脂肪酸（酪酸、プロピオン酸、n-酪酸、iso-酪酸、n-吉草酸、iso-吉草酸）は、アトピー性皮膚炎で増加するものの、乳酸菌投与で発症を抑えた群と差がないことから、症状緩和に直接的に関連しないと考えられた。

5. 研究発表

〔雑誌論文〕

- 1) Minami F, Sasaki N, Shichi Y, Gomi F, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K, Toyoda M, Takahashi K, Ishiwata T. Morphofunctional analysis of human pancreatic cancer cell lines in 2- and 3-dimensional cultures. Scientific Reports. 11. 2021. 6775-. doi: 10.1038/s41598-021-86028-1.

- 2) Yamamoto I, Kawasumi K, Ohkusu-Tsukada K, Arai T. Molecular characterization of free fatty acid receptors FFAR2 and FFAR3 in the domestic cat. Veterinary Medicine and Science. 7 2021. 77-85. doi: 10.1002/vms3.356.
- 3) Suzuki M, Nagane M, Kato K, Yamauchi A, Shimizu T, Yamashita H, Aihara N, Kamiie J, Kawashima N, Naito S, Yamashita T. Endothelial ganglioside GM3 regulates angiogenesis in solid tumors. Biochemical and Biophysical Research Communications. 569. 2021. 10-16. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.06.063.
- 4) Komuro M, Nagane M, Endo R, Nakamura T, Miyamoto T, Niwa C, Fukuyama T, Harashima H, Aihara N, Kamiie J, Suzuki R, Yamashita T. Glucosylceramide in T cells regulates the pathology of inflammatory bowel disease. Biochemical and Biophysical Research Communications. 599. 2022. 24-30. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.02.004.
- 5) Komuro M, Nagane M, Fukuyama T, Luo X, Hiraki S, Miyabe M, Ishikawa M, Niwa C, Murakami H, Okamoto M, Yamashita T. Sphingomyelin maintains the cutaneous barrier via regulation of the STAT3 pathway. The FASEB Journal. 36. 2022. e22111. doi 10.1096/fj.202100721RR.

〔図書〕

- 1) 日本獣医病理学専門家協会編. 文永堂出版. 動物病理学各論 第3版. 2021. 509.

6. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔取得〕

- 1) 犬におけるがんの予防、がんの治療またはがんの転移の予防のためのがんペプチドワクチン. 塚田晃三. 学校法人日本医科大学. 特許第 6993677 号. 取得年月日 令和 3 年 12 月 14 日. 出願年月日 平成 29 年 11 月 8 日. 国内.

3 オルガノイド培養を用いた犬に特有な乳腺腫瘍の発症機構の解明

1. 本学研究代表者

獣医病理学研究室 准教授 道下正貴

麻布大学研究代表者

病理学研究室 教授 上家潤一

2. 研究の目的

犬の乳腺腫瘍は、ヒトや猫の乳腺腫瘍ではみられない組織重型が存在し、筋上皮細胞増殖、骨および軟骨増殖を示す特有の腫瘍が形成される。しかし、それらの重型の腫瘍発症機構は未だ解明されていない。本研究代表者は、自己複製能や多分化能を含む幹細胞特性を有する腫瘍幹細胞 / がん幹細胞に着目して、犬に特有な乳腺腫瘍の発症機構の解明に取り組んできた。これまでの成果から、犬の乳腺腫瘍の組織重型

は、腫瘍幹細胞レベルで異なる可能性があることを提唱した。近年、生体で生じる組織を模倣したオルガノイド（器官様構造体）培養法が開発され、組織発生、再生だけでなく、腫瘍発症機構の解明においても有用とされている。犬に特有な乳腺腫瘍の発症機構の解明には、乳腺腫瘍の亜型間におけるオルガノイドの特性を明らかにすることが必要不可欠である。本研究の目的は、腫瘍の多様性や複雑性を反映しているオルガノイドの特徴付けを行い、犬に特有の乳腺腫瘍の発症機構を解明することである。

3. 研究の計画・方法

犬の乳腺腫瘍の外科切除材料（複合腺癌、単純腺癌、複合腺腫、癌肉腫、小葉状過形成を含む）および数回継代した初代細胞を用いてオルガノイド培養を実施する。数週間培養後、形成されたオルガノイドを回収し、セルブロック標本作製し、HE 染色、免疫染色（CK 18、p63 など）を実施する。オルガノイド培養に用いた外科切除組織においても同様に染色を実施し、形成されたオルガノイドを構成する細胞集団を評価する。

4. 研究の成果

形成されたオルガノイドの形状はいずれも球状ないし不整形であり、組織学的には管腔形成、充実性増殖、扁平上皮化生を示すものが認められた。管腔形成を示すオルガノイドの一部では、免疫組織学的に CK 18 陽性の腺上皮細胞の周囲に p63 陽性の筋上皮細胞が取巻くことが確認された。

形成されたオルガノイドは、腺上皮細胞および筋上皮細胞から構成されており、生体の乳腺組織を模倣していた。オルガノイドの免疫表現型は、外科切除組織と概ね類似していた。2 次元培養では株化細胞の樹立が困難な過形成、腺腫においても培養が可能であった。

5. 研究発表

〔雑誌論文〕

- 1) Minami F, Sasaki N, Shichi Y, Gomi F, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K, Toyoda M, Takahashi K, Ishiwata T. Morphofunctional analysis of human pancreatic cancer cell lines in 2- and 3-dimensional cultures. Scientific Reports. 11. 2021. 6775. doi: 10.1038/s41598-021-86028-1.
- 2) Hanari N, Nagashima T, Machida Y, Kubo Y, Hamamoto Y, Kamiie J, Ochiai K, Azakami D, Michishita M. Gastric Plasmacytoma with Immunoglobulin Lambda Light Chain Deposition in a Dog. Journal of Comparative Pathology. 187. 2021. 7-10. doi: 10.1016/j.jcpa.2021.06.005.
- 3) Michishita M, Shibata R, Machida Y, Matsumoto M, Ochiai K, Azakami D. Subleukaemic T-Lymphoblastic Leukaemia in a Horse. Journal of Comparative Pathology. 188. 2021. 21-25. doi: 10.1016/j.jcpa.2021.08.002.
- 4) Ishikawa K, Nagashima T, Machida Y, Yasuda A, Yoshida K, Fujita M, Ochiai K, Azakami D, Michishita M. Primary pulmonary diffuse large B-cell lymphoma associated with feline leukaemia virus infection in a young cat. Journal of Feline Medicine and Surgery Open

Reports. 8. 2022. 20551169221074240. doi: 10.1177/20551169221074240.

〔学会発表〕

- 1) 道下正貴. がん幹細胞研究を基盤とした、新規がん治療を目指した分子標的阻害剤の探索. 第 164 回日本獣医学会学術集会. 2021 年 9 月 7 日～9 月 13 日. WEB 開催.
- 2) 石川健人、町田雪乃、野上英、原田知享、道下正貴. 犬の口唇腫瘍の回顧的研究. 第 164 回日本獣医学会学術集会. 2021 年 9 月 7 日～9 月 13 日. WEB 開催.
- 3) 石川里奈、町田雪乃、道下正貴. 猫のリンパ腫における EZH2 および H3K27me3 の免疫組織学的検索. 第 164 回日本獣医学会学術集会. 2021 年 9 月 7 日～9 月 13 日. WEB 開催.
- 4) 吉村久志、山本昌美、岸本拓也、町田雪乃、道下正貴、落合和彦、中川貴之、松田陽子、高橋公正、石渡俊行. 犬の乳腺腫瘍における nestin の発現と悪性挙動への関与. 第 164 回日本獣医学会学術集会. 2021 年 9 月 7 日～9 月 13 日. WEB 開催.

4 イヌ血管肉腫における PIK3CA の変異解析と早期診断・治療戦略探索

1. 本学研究代表者

獣医学部 准教授 落合和彦

麻布大学研究代表者

獣医学部 教授 坂上元栄

2. 研究の目的

血管肉腫 (hemangiosarcomas: HS) は、ヒトでは希少疾患に分類されるが、イヌでは比較的症例数が多い腫瘍である（アメリカでは年間約 5 万症例）。HS は脾臓等に発生し、大血管の破裂により致死性の転帰を辿るが、現在のところ早期診断マーカーや有効な治療法が無い難治性疾患である。近年、イヌ HS 症例ゲノムを用いた網羅的なエクソーム解析の結果、変異候補遺伝子として、細胞増殖シグナル伝達因子である PIK3CA が同定された。PIK3CA の変異はヒトで様々ながん種で変異が報告されているが、イヌでの研究は希少である。これまでに PIK3CA イヌホモログの ORF はクローニングされておらず、H1047 残基の変異が分子機能におよぼす影響についても検討されていない。そこで、本研究では、PIK3CA イヌホモログ ORF 全長のクローニングを試み、構造解析を行うとともに、H1047 変異が機能におよぼす影響を検討することとした。これによりイヌで未知な HS 発生機序を明らかとし、早期診断・治療戦略創出のための知見蓄積を目指す。

3. 研究の計画・方法

イヌ精巣由来 cDNA を鋳型とし、データベースに登録されている PIK3CA イヌホモログ PREDICT 配列 (XM_022414352.1) より作製したプライマーを用いて PCR を行い、塩基配列を決定した。さらに、H1047R および H1047L 変異分子を合成した。これらを用いて、イヌ PIK3CA 変異が EGFR シグナ

ル伝達におよぼす影響について解析した。また、本学付属動物医療センターに来院した血管肉腫症例より摘出され、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）された病理組織および、HSA 由来株化細胞における PIK3CA 変異解析を行った。次に、PIK3CA 変異が発見された細胞株における EGFR シグナル伝達について、Akt リン酸化を指標として評価した。さらに、PIK3CA 変異を標的とした分子標的薬 Alpelisib の HSA 由来細胞株に対する抗腫瘍効果について検討した。

4. 研究の成果

今回クローニングされた cPIK3CA は PREDICT 配列と相同性が 100% 一致し、機能ドメインも高度に保存されていた。ヒト PIK3CA とのアミノ酸相同性も 99% だったため、動物種を超えて構造が維持されている重要な分子であることが予測された。今回クローニングされた cPIK3CA WT を鋳型として、H1047R および H1047L 変異体の作製に成功した。続いて、各種 cPIK3CA を HeLa 細胞に強制発現させ、EGFR シグナル伝達におよぼす影響について、Akt のリン酸化を指標として評価した。その結果、cPIK3CA WT 発現 HeLa 細胞においては、EGF 添加による Akt リン酸化は観察されなかったが、H1047R および H1047L 変異体発現細胞では、Akt Ser473 のリン酸化が EGF 添加の有無に関わらず確認された。

続いて、本学獣医病理学研究室より分与された HSA 19 症例からゲノム DNA を抽出し、cPIK3CA 1047 番残基の変異ホットスポット 3140A をコードする exon 21 を増幅し、変異検出を試みた。その結果、品種が異なる、血縁関係のない 2 症例で H1047R および H1047L 変異を検出した。岐阜大学獣医病理学研究室より分与を受けた 8 種類のイヌ HSA 由来細胞株では、H1047L 変異が高率に検出された。その割合はヘテロ接合性のものが 8 サンプル中 6 サンプルと最も多かった。これらの細胞株は、樹立時にそれぞれ Labrador retriever から樹立された Ju (JuA1、JuB2、JuB2-1 および JuB4)、Golden retriever から樹立された Re (Re12 および Re21) および Papillon から樹立された Ud (Ud2 および Ud6) の 3 系統に分類されるが、同一起源の細胞であっても、cPIK3CA 変異プロファイルが異なることから、イヌ cPIK3CA 変異は腫瘍発生のイニシエーターというよりは増悪因子として腫瘍発生以降に生じる変異である可能性が示唆された。

今後は、イヌ HSA 由来 PIK3CA 変異細胞株における

EGFR シグナル伝達強度について Akt リン酸化を指標として評価する予定である。また、PIK3CA H1047 変異をターゲットとした分子標的薬である Alpelisib のイヌ PIK3CA 変異細胞株への効果検証を行う予定である。これまでの研究成果と今後得られる研究成果を国際学術雑誌に投稿する予定である。

5. 研究発表

〔雑誌論文〕

- 1) 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*. 19. 2021. 399-403. 10.1111/vco.12663.
- 2) Yoshikawa Y ...Ochiai K *et al.*, Identification of the core motif of the BRCA2 C-terminal RAD51-binding domain by comparing canine and human BRCA2. *Journal of Veterinary Medical Science*. 83. 2021. 759-766. 10.1292/jvms.21-0006.
- 3) Xue R, ... Ochiai K *et al.*, The canine RAD51 mutation leads to the attenuation of interaction with PALB2. *Genes*. 13. 2022. 285. 10.3390/genes13020285.
- 4) Uno Y, ... Ochiai K *et al.*, Phenotypic and Genetic Characterization for Incompatible Cross-Match Cases in the Feline AB Blood Group System. *Frontiers in Veterinary Science*. 8. 2021. 720445. 10.3389/fvets.2021.720445.
- 5) Yoshimura H, ... Ochiai K *et al.*, Involvement of Nestin in the Progression of Canine Mammary Carcinoma. *Veterinary Pathology*. 58. 2021. 994-1003. 10.1177/03009858211018656.

〔学会発表〕

- 1) 落合和彦. がん関連遺伝子の細胞内相互作用解析から見えてくるもの. 第 164 回日本獣医学会学術集会 シンポジウム. 2021 年 9 月 8 日. オンライン.
- 2) 植村光希、落合和彦 他. イヌとヒトで異なる RAD51 分子構造が DNA 相同組換え修復効率におよぼす影響の検討. 第 164 回日本獣医学会学術集会. 2021 年 9 月 9 日. オンライン.