

氏名(本(国)籍)	金井俊貴(岐阜県)		
主指導教員氏名	岐阜大学 教授 前田貞俊		
学位の種類	博士(獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第607号		
学位授与年月日	令和5年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学位論文題目	Studies on Molecular Pathogenesis in Canine Epitheliotropic Cutaneous T-cell Lymphoma (犬上皮向性皮膚T細胞性リンパ腫の分子病態に関する研究)		
審査委員	主査	岐阜大学 准教授	西飯直仁
	副査	帯広畜産大学 教授	小川晴子
	副査	岩手大学 教授	山崎真大
	副査	東京農工大学 教授	西藤公司
	副査	岐阜大学 教授	前田貞俊

学位論文の内容の要旨

犬上皮向性皮膚T細胞性リンパ腫(ECTCL)は、多様な皮疹を認める難治性疾患である。皮疹の形成メカニズムは不明だが、多様な皮疹の出現は同一個体における複数の腫瘍細胞クローンの存在を示唆する。また、多発性皮膚病変と腫瘍細胞の全身播種は重要な予後因子であり、細胞遊走を制御するCC chemokine receptor (CCR)4 およびCCR7の関与が予想される。本研究においては、犬ECTCLにおける腫瘍細胞のクローン性と皮疹の関連性および病態におけるCCR4とCCR7の役割を解明するため、以下の研究を行った。

第1章においては、ECTCLに罹患した犬8頭の皮膚病変組織についてのフラグメント解析を実施し、クローン性と皮疹の関連性を評価した。また、皮膚病変におけるrecombination activating gene 1 (RAG1)の転写を解析した。フラグメント解析の結果、4頭において同一および不同を示すクローン性パターンを認めた。3頭においては、全てのクローン性パターンが不同であり、1頭においては全てが同一であった。クローン性パターンと臨床的または皮膚病理組織学的な特徴との関連性は認めなかった。遺伝子転写解析の結果、いずれの皮膚病変においても*rag1* mRNAは検出されなかった。これらの結果から、ECTCLでは皮膚以外の部位で不均一なクローン性が生じており、腫瘍細胞が全身に遊走している可能性が示された。

第2章においては、犬CCR7の検出法を確立するため、犬CCR7形質移入体を用いて人IgG-Fcを融合させた犬CC chemokine ligand (CCL)19タンパク(cCCL19-hIgG-Fc)の特異性

について評価した。その後、犬 ECTCL 細胞株 (E0-1) における CCR7 の発現および機能の評価した。その結果、cCCL19-hIgG-Fc は CCR7 形質移入体および E0-1 に特異的に結合することが明らかになった。細胞走化性を評価したところ、E0-1 は犬およびマウスの CCR7 リガンドに対して走化活性を示した。これらの結果から、cCCL19-hIgG-Fc および E0-1 は、犬 ECTCL における CCR7 の役割を解明する上で有用であることが示された。

第 3 章においては、犬 ECTCL の病態における CCR4 および CCR7 の役割を明らかにするため、野生型、CCR4 または CCR7 をノックアウト (KO) した E0-1 をそれぞれマウスに皮下移植した。その結果、CCR4KO 群および CCR7KO 群において E0-1 の全身播種および移植部位における皮下結節の形成が有意に抑制された。これらの結果から、CCR4 と CCR7 は腫瘍細胞の遊走のみならず増殖も促進することが示唆された。

本研究の結果から、CCR4 と CCR7 は犬 ECTCL における全身転移および局所の腫瘍増殖を促進することが示された。これらの結果は、CCR4 および CCR7 が犬 ECTCL における新規の治療標的分子となり得る可能性を示唆している。

審 査 結 果 の 要 旨

犬上皮向性皮膚 T 細胞性リンパ腫 (ECTCL) は、多様な皮疹を認める難治性疾患である。多様な皮疹の出現は、同一個体における複数の腫瘍細胞クローンの存在を示唆する。また、多発性皮膚病変と腫瘍細胞の全身播種は重要な予後因子であり、細胞遊走を制御する CC chemokine receptor (CCR) 4 と CCR7 の関与が予想される。本研究においては、犬 ECTCL における腫瘍細胞のクローン性と皮疹の関連性および病態における CCR4 と CCR7 の役割を解明するため、以下の研究を行った。

第 1 章においては、ECTCL 罹患犬の皮膚病変組織についてのフラグメント解析および病理組織学的評価を実施し、腫瘍細胞のクローン性パターンが不均一であることを明らかにした。クローン性パターンと臨床的または皮膚病理組織学的な特徴との関連性は認めなかった。いずれの皮膚病変においても、recombination activating gene 1 の転写を検出しなかったことから、犬 ECTCL では皮膚以外で不均一なクローン性が生じ、腫瘍細胞が全身に遊走している可能性が示唆された。

第 2 章においては、人 IgG-Fc を融合させた犬 CC chemokine ligand (CCL) 19 タンパクを作製し、CCR7 形質移入体および ECTCL 細胞株 (E0-1) に対して特異的に結合することを明らかにした。また、細胞走化性を評価したところ、E0-1 が犬のみならずマウスの CCR7 リガンドに対しても走化活性を示したことから、犬 ECTCL における CCR7 の役割を解明するため、E0-1 移植マウスなどを用いた実験が可能であることが示唆された。

第 3 章においては、野生型、CCR4 または CCR7 をノックアウト (KO) した E0-1 をそれぞれマウスに皮下移植した。その結果、CCR4KO 群および CCR7KO 群において E0-1 の全身播種および移植部位における皮下結節の形成が有意に抑制された。これらの結果から、CCR4 と CCR7 は腫瘍細胞の遊走のみならず増殖も促進することが示された。

以上の結果から、CCR4 と CCR7 は犬 ECTCL における全身転移および局所の腫瘍増殖を促進することが示された。今回の結果は、CCR4 および CCR7 が犬 ECTCL における新規の治療標的分子となり得る可能性を示す知見であると思われる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Expression and functional analysis of chemokine receptor 7 in canine lymphoma cell lines
著 者 名 : Kanei, T., Iwata, M., Kamishina, H., Mizuno, T. and Maeda, S.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 84 (1) : 25-30, 2022

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Serum canine thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) concentrations correlate with disease severity and therapeutic responses in dogs with atopic dermatitis
著 者 名 : Asahina, R., Ueda, K., Oshima, Y., Kanei, T., Kato, M., Furue, M., Tsukui, T., Nagata, M. and Maeda, S.
学術雑誌名 : Veterinary Dermatology
巻・号・頁・発行年 : 31 (6) : 446-455, 2020

- 2) 題 目 : Detection of granzyme B in CD3-positive cells infiltrated in lesional skin of a dog with erythema multiforme associated with zonisamide
著 者 名 : Tanaka, N., Kanei, T., Iwata, M., Kawabe, M., Kamishina, H., Murakami, M., Sakai, H. and Maeda, S.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 83 (10) : 1559-1562, 2021