

平成21年 6月 4日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580365

研究課題名（和文） 犬におけるパピローマウイルス関連皮膚疾患の病理学的並びに分子病理学的解析

研究課題名（英文） Pathological and molecular pathological analyses of papillomavirus-related skin diseases in dogs

研究代表者

古林 与志安（KOBAYASHI YOSHIYASU）

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：20301971

研究成果の概要：犬色素性表皮母斑（CPEN）は、特定犬種に稀にしか発生のみられない非腫瘍性増殖性皮膚病変であるが、CPEN 関連 PV の関与が証明されている。また、CPEN は腫瘍性病変への転化を示すこともある。本研究では、パラフィン切片を利用した病巣からの CPEN 関連 PV の PCR 検出法を確立するとともに、CPEN を含む皮膚疾患における新規 PV および PV 関連新規疾患の検出を試みた。また、CPEN 関連病巣に CPEN 関連 PV がどのように関与しているのかを *in situ* Hybridization 法を用いて明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学獣医学・臨床獣医学

キーワード：病理・病態、犬、色素性表皮母斑、表皮過誤腫、パピローマウイルス、パラフィン材料、PCR、*in situ* Hybridization

1. 研究開始当初の背景

パピローマウイルス（PV）は造腫瘍性ウイルスとして有名であり、ヒトでは100種類以上のPVが同定されている。一方、犬では、複数種のPVウイルスの存在が示唆されていたものの、実際に疾患と明確に関連して同定され、全遺伝子長の塩基配列が明らかになっていたのは、犬口腔乳頭腫（COP）を誘発するCOPウイルス（COPV）だけであった。

犬色素性表皮母斑（CPEN）は、主としてパグおよびミニチュア（M）・シュナウザーで発生のみられる稀な非腫瘍性の皮膚増殖性疾患であり、表皮過誤腫としても知られる病態であり、稀に悪性腫瘍への転化が認められる。CPENは、発生疫学およびPV感染症の特徴像の一つである封入体が形成されないため、PVの関与が知られていない病態であったが、1995年にNagataらが、4症例の検索を通じ

て、PV 関連疾患であることを証明し、本病態がヒトの PV 関連疾患であり、悪性腫瘍への転化がみられることのある疣贅状表皮発育異常症 (EV) に類似することを報告した。また、2000 年には Tanabe らが、1 例 (パグ) の病変組織から PV ウイルスの L1 遺伝子の一部の塩基配列を同定し、COPV とは異なる PV 感染に起因することを報告した。申請者らは、パラフィン切片からの PCR 法を利用した同ウイルス L1 遺伝子の検出法を確立し、複数例パグの CPEN 病変を検索することによって本ウイルスが CPEN 関連 PV であることを確定するとともに、本ウイルスが COPV と遺伝子的に全く異なることを報告した。その後、申請者らは、パグの CPEN 病巣の凍結材料から、CPEN 関連 PV の全ウイルス遺伝子長の塩基配列を同定した。

CPEN は特定の犬種に好発する病態であるとされているが、その他の犬種でも CPEN (様) 病変の報告もなされている。しかしながら、CPEN 関連 PV がこれら病態にも関与しているのか否か、或いはその他の既知・未知の PV が関与しているのか否かについては不明である。また、ウイルスの生物学を考えた場合、CPEN 関連 PV は、その他の犬種の CPEN (様) 病変、或いは異なる病態を含めて幅広く犬社会に分布している可能性がある。

ヒトの生殖器系の癌に関連する PV では、通常の PV と異なり、ウイルス遺伝子は癌化した細胞の染色体上に組み込まれること、および組み込まれるのは癌化と癌化の維持に必須である E6 および E7 領域を含むウイルス遺伝子の一部であることが分かっている。L1 遺伝子はそのブレイクポイントにあたり、癌組織への PV 遺伝子の関与の有無を検討する場合、E6 や E7 といったその他の遺伝子領域の検査が必要である。従って、CPEN 関連 PV の生物界での意義を正確に把握するためには、L1 遺伝子以外の領域も検討する必要がある。

また、検索に際しては、本当に検索材料中にウイルス遺伝子が存在しないのか、或いは検索にパラフィン切片を利用するために遺伝子の保存状態が悪く、ウイルス遺伝子が証明できないだけなのか、総合的に判断するための診断 (検索) 法も併せて確立する必要がある。

また、腫瘍化病巣内でのウイルス遺伝子の存在の有無や、存在する場合はその一部が宿主細胞の DNA に組み込まれて存在するのか、或いは全長を保持してエピソームとして核内に存在するののかという存在様式も明らかになっていない。また、最も基本的な CPEN

関連 PV の CPEN 病巣内での生活環も明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) 遺伝子検索には、凍結材料の採取が望まれるが、現実的にはホルマリン固定材料、或いはパラフィン包埋材料が対象となる。パラフィン切片を利用した PCR 法では、陽性反応産物が得られない場合、本当に陰性なのか、或いは遺伝子の保存状態が悪いために偽陰性となっているのか、判断には注意を要する。そこで、パラフィン材料の遺伝子の保存状態を把握するために、内在遺伝子を標的とした PCR 法を行い、遺伝子の保存状態を把握する必要がある。犬では、 α -actin 遺伝子を標的とした PCR 検出系が、パラフィン切片での DNA 保存状態を評価するための方法として報告されているが、この系の増幅産物は 162 bp と短く、目的遺伝子産物によってはより長い増幅産物が得られる内在遺伝子 PCR 系が必要となる。そこで、本研究では犬 β -globin 遺伝子を標的とした、より長い遺伝子産物が得られる PCR 系を確立し、総合的に病変組織への PV への関与の有無を判定する方法を確立する。

(2) CPEN 関連 PV の生物学的意義をより一層明確化するため、これまで行ってきた CPEN 関連 PV の L1 遺伝子検出法以外に、E6 および E7 領域を標的とした遺伝子検出法を確立し、様々な犬種の CPEN (様) 病変を対象に、CPEN 関連 PV の関与の有無を検討する。

(3) CPEN 関連 PV の CPEN 病巣内での生活環を明らかにする。

(4) CPEN から腫瘍への転化がみられる症例について、CPEN 病巣と腫瘍組織での CPEN 関連 PV の各遺伝子の発現状態を比較・検討し、CPEN 関連 PV が病変組織にどのように関与しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 犬パラフィン材料における遺伝子保存状態評価法の確立 (犬 β -globin 遺伝子を標的とした内在遺伝子検出系の確立)

パラフィンブロックでの DNA の保存状態を評価するため、犬 β -globin 遺伝子 (Gene Bank accession#XM_534029) および犬 21 番遺伝子 (Gene Bank accession#NW_876273) の塩基配列を参考にし、255 bp および 366 bp の長さの DNA を増幅するように 2 種類の新たなプライマーセット β -globin1-F/R および β -globin2-F/R を設計し、実際のパラフィン切片に応用し、PCR 反応を行った。また、得られた PCR 産物については、シークエンス解析

を行った。

(2) CPEN (様) 病変における PV 関与の有無についての検討

CPEN の特徴所見である表皮の肥厚および表皮へのメラニン色素沈着の認められるパグおよび M・シュナウザー以外の犬種症例を含む 13 例について、CPEN 関連 PV およびそれ以外の PV 関与の有無を PCR 法にて検討した。検索に先立って、CPEN 関連 PV については、L1 以外の E6 および E7 遺伝子領域を標的とした PCR 法を確立した。また、実際の検討時には、前記の遺伝子保存状態評価法を適用した。更に、さまざまな PV の L1 領域を増幅するように設計されているコンセンサスプライマーである IFNR-2/IDNT-2 プライマーセットを用いた touchdown PCR を行った。なお、本 touchdown PCR では、COPV は増幅されるが CPEN 関連 PV は増幅されないため、touchdown PCR で陽性であった症例については、COPV であるか否かを確認するため、COPV 遺伝子に対する検討を行った。

(3) DNA *in situ* hybridization (ISH) 法を用いた CPEN に関する病理学的検討

CPEN 関連 PV の CPEN 病巣内での生活環を明らかにするために、2 例のパグ犬の CPEN 病巣に対して、CPEN 関連 PV の E6 および L1 遺伝子を標的とした DNA ISH 法を行った。プローブは、PCR ジゴキシゲニン標識法により作製し、DNA ISH 法にはタイラマイド増感法を利用した。

(4) DNA ISH 法を用いた CPEN からの腫瘍化病巣に関する病理学的検討

CPEN 病巣と腫瘍組織での CPEN 関連 PV の各遺伝子の発現状態を比較・検討し、CPEN 関連 PV が病変組織にどのように関与しているのかを明らかにするため、CPEN からの腫瘍化が認められた 3 例のパグ犬の病巣に対して、CPEN 関連 PV の遺伝子領域の大半を網羅できるように、E2、E6、E7、L1 および L2 遺伝子を標的とした DNA ISH 法を行った。プローブは、PCR ジゴキシゲニン標識法により作製し、DNA ISH 法にはタイラマイド増感法を利用した。

4. 研究成果

(1) 犬パラフィン材料における遺伝子保存状態評価法の確立 (犬 β -globin 遺伝子を標的とした内在遺伝子検出系の確立)

β -globin1 および β -globin2 プライマーセットを用いた PCR 反応では、それぞれ 255 bp および 366 bp の増幅産物が得られた (図 1)。増幅産物のシークエンス解析では、 β -globin1 および β -globin2 プライマーセッ

トが標的とするそれぞれの塩基配列との一致が確認された。

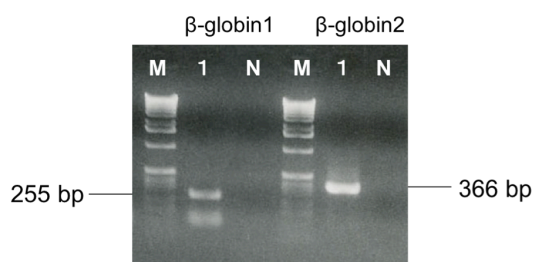


図1 パラフィン切片での β -globin遺伝子の検出

(2) CPEN 関連 PV の E6 および E7 領域を標的とした PCR 系の確立

CPEN-E6 および E7 プライマーセットを用いた PCR 反応では、それぞれ 220 bp および 236 bp の増幅産物が得られた (図 2)。増幅産物のシークエンス解析では、CPEN-E6 および E7 プライマーセットが標的とするそれぞれの塩基配列との一致が確認された。

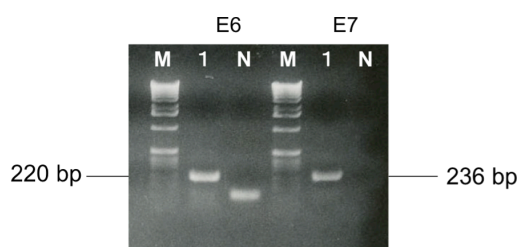


図2 CPEN関連PVのE6およびE7遺伝子の検出

(3) CPEN (様) 病変における PV 関与の有無についての検討 (表 1)

CPEN の特徴所見である表皮の肥厚と表皮内メラニン色素沈着がみられるパグと M・シュナウザー以外の犬種を含む 13 例の CPEN (様) 病変を検索し、我々がクローニングした CPEN 関連 PV が本邦の犬の CPEN 病巣に広

表 1 パラフィン切片を利用した CPEN (様) 病巣での PV 関与に関する総合的検討

症例	DNA 保存状態	CPEN 関連 PV	Touchdown PCR
1	不良	+	-
2	良好	+	-
3	良好	+	-
4	良好	+	-
5	不良	+	-
6	良好	-	+
7	良好	+	-
8	良好	+	-
9	良好	+	-
10	良好	-	+
11	良好	+	-
12	不良	-	-
13	良好	-	-

く関与しており、それはバグと M・シュナウザーに限らないことが明らかとなった。また、PV の複数の遺伝子を対象とした PCR 検索および内在遺伝子の PCR 検索による DNA 保存状態の評価を併せて行うことにより、病巣への PV の関与をより正確に評価できることが示されるとともに、本邦で発生のみられる CPEN にはその他の PV も関与している可能性があることを明らかにした。

今後、犬社会で多く観察される種々の皮膚増殖性病変への CPEN 関連 PV を含めた PV の関与の有無を、本総合的 PCR 診断法を利用して検討していく予定である。

(4) DNA *in situ* hybridization (ISH) 法を用いた CPEN に関する病理学的検討

2 例のバグの CPEN 病巣に対して、CPEN 関連 PV の E6 および L1 遺伝子領域を標的とした DNA *in situ* Hybridization (ISH) 法を行った。その結果、CPEN 病巣内の基底細胞核内では、陽性反応は点状であったが、角質細胞が表層に向かって分化するのに伴って陽性反応は核内を充満するようになり、CPEN 関連 PV も、感染細胞の分化に伴ってウイルスの複製が行われるという、一般的な PV と同様の生活環を持つことが示された (図 3)。

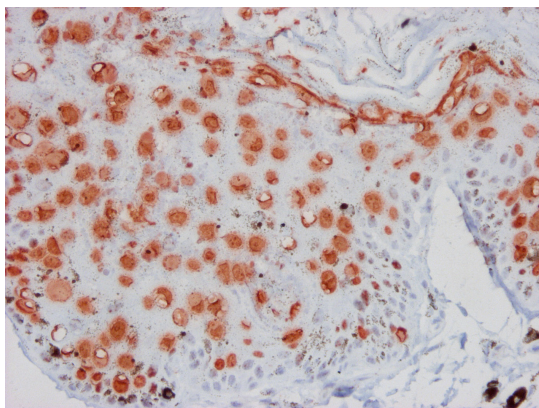


図 3 タイラマイド増感 ISH 法による CPEN 関連 PV ウイルス遺伝子の CPEN 組織での証明

また、タイラマイド増感 ISH 法は非常に好感度にウイルス遺伝子を証明することが可能であり、手技自体もさほど繁雑ではないことから、今後診断的な適用も期待される。

(5) DNA ISH 法を用いた CPEN からの腫瘍化病巣に関する病理学的検討

CPEN 病巣から腫瘍性病変への転化がみられた 3 例のバグの病巣に対して、PV 遺伝子が宿主細胞の DNA に組み込まれた場合に欠損することが知られている遺伝子領域を網羅できるように 5 つの遺伝子領域 (E2, E6, E7, L1

および L2) を標的とした ISH 法を行った。その結果、3 例中 1 例の腫瘍病巣 (Bowen 様病巣) 内の腫瘍細胞の核内に、5 種類全てのプローブで点状の陽性反応を認めた (図 4)。その他の 2 例では、ウイルス遺伝子は、腫瘍病巣内の胞巣中心部の一部の細胞でのみ検出された。以上のことから、CPEN 病変から腫瘍病変への転化には CPEN 関連 PV が深く関与しているものの、腫瘍化病巣内では CPEN 関連 PV は、遺伝子の全長を持ってエピソームとして存在する、或いは消失しており、活発なウイルス DNA の複製は行われていないことが示された。

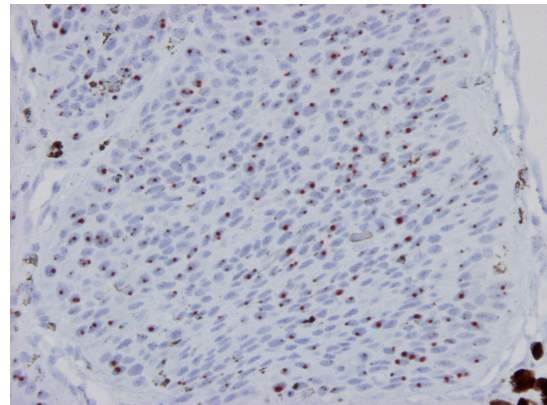


図 4 タイラマイド増感 ISH 法による CPEN 関連 PV ウイルス遺伝子の腫瘍化病巣内での証明

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Oohashi, E., Kangawa, A. and Kobayashi, Y. 2009. Mammary adenocarcinoma in a chipmunk (*Tamias sibiricus*). *J Vet Med Sci*, in press. (査読有)
- ② 舟戸慎悟、古林与志宏、弘川治喜、古岡秀文、松井高峯. 2009. 若成猫の両側性結節性脂肪肉芽腫性結膜炎の 1 例. 日獣会誌, in press. (査読有)
- ③ Kishimoto, M., Yamada, K., Seok, J. S., Shimizu, J., Kobayashi, Y., Akiba, Y., Morishita, Y., Iwasa, A., Iwasaki, T. and Miyake, Y. 2008. Analysis of blood flow in a third ventricular ependymoma and an olfactory bulb meningioma by using perfusion computed tomography. *J Vet Med Sci*, 70(9), 981-983. (査読有)

- ④ Lee, J. Y., Tanabe, S., Shimohira, H., Kobayashi, Y., Oomachi, T., Azuma, S., Ogihara, K. and Inokuma, H. 2007. Expression of cyclooxygenase-2, P-glycoprotein and multi-drug resistance-associated protein in canine transitional cell carcinoma. *Res Vet Sci*, 83(2), 210-216. (査読有)
- ⑤ Ueno, H., Kobayashi, Y. and Yamada, K. 2007. Olfactory esthesioneuroblastoma treated with orthovoltage radiotherapy in a dog. *Aust Vet J*, 85(7), 271-275. (査読有)

[学会発表] (計 3件)

- ① 山村知香、非アテローム性動脈硬化を伴う犬の腹大動脈血栓塞栓症の1例、平成20年度日本小動物獣医学会(北海道)、2008年9月12日、江別。
- ② 太田晴喜、超音波破碎吸引装置を用いて腫瘍摘出を行った胸腺腫の犬の一例、平成20年度獣医麻酔外科学会、2008年6月28日、大宮
- ③ 秋場由美、イヌ胃幽門部腫瘍(組織球肉腫)、第27回実験動物病理標本交見会集会、2008年3月6日、熱海。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古林 与志安 (KOBAYASHI YOSHIYASU)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：20301971

(2) 研究分担者

2007年度のみ

松井 高峯 (MATSUI TAKANE)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：40111116

(3) 連携研究者

2008年度のみ

松井 高峯 (MATSUI TAKANE)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：40111116