

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08101

研究課題名(和文) 犬血管肉腫に対するTRAIL経路の活性化によるアポトーシス誘導治療法の基礎的研究

研究課題名(英文) Basic study on apoptosis-inducing therapy by activation of TRAIL pathway in canine hemangiosarcoma

研究代表者

酒井 洋樹 (Sakai, Hiroki)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：40283288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：未だに有効な治療法がない悪性度の高い犬の血管肉腫と、臨的に遭遇する機会が多く、良性から高度な悪性を示すものまで様々な臨床動態を呈する犬の乳腺腫瘍の抗腫瘍サイトカインTumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) を用いた新規治療法の開発のための基礎的研究として、犬血管肉腫細胞株および犬乳腺上皮性腫瘍由来細胞株にTRAIL 処理すると、強いアポトーシスが誘導されることを初めて見出した。間葉系由来腫瘍および上皮系腫瘍ともに抗腫瘍効果が見られ、獣医領域での腫瘍の治療におけるTRAILの広い適用の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有効な治療法がない悪性度の高い犬の血管肉腫と、臨床の現場でよく遭遇する犬の乳腺腫瘍の抗腫瘍サイトカインTRAILを用いた新規治療法の開発にあたり、間葉系由来腫瘍および上皮系腫瘍ともに抗腫瘍効果が見られ、獣医領域での腫瘍の治療におけるTRAILの広い適用の可能性を示した。また、血管肉腫に対するTRAILの抗腫瘍効果は、ヒトの血管肉腫も含め、世界で初めて明らかにされたことであり、医学領域で、その発生が非常にまれで、研究が困難な腫瘍の一つである血管肉腫に対して、研究・新規治療法の開発のモデルとして犬の血管肉腫を用いる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Hemangiosarcoma (HSA) occurs frequently in dogs. As in humans, the canine HSA is highly malignant with a very poor prognosis despite treatment with surgery and chemotherapy for early metastasis and dissemination. However, no effective treatment strategy has been developed. Another tumor that can serve as a human model is the canine mammary tumor (CMT). CMT is the most common tumor in female dogs. In addition to research as a model animal for human breast cancers, study for development of new therapies for CMT is needed because of its veterinary clinical importance. Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) is one of the most prominent anti-tumor cytokines. I aimed to verify the effects of TRAIL on HSA and CMT. TRAIL induced apoptosis in canine HSA cell lines. Furthermore, a similar apoptosis-inducing action was observed in cell lines derived from CMT, suggesting the broad applicability of TRAIL in veterinary medicine.

研究分野：獣医病理学

キーワード：犬 TRAIL 腫瘍 血管肉腫 乳腺腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管肉腫は、人および犬ともに悪性度が高く、予後不良であり、未だに有効な新規治療法は確立されていない。犬の血管肉腫については、その特徴が明らかになりつつあるが、不明な点も多く、新規治療法開発の妨げとなっている。また、犬の乳腺腫瘍は、良性のものから悪性のものまで、様々な病態を呈し、その中でも脈管浸潤を伴う悪性度の高いものは、非常に予後が悪く、有効な治療法も存在せず、新規治療法の実現が望まれている。これらの犬の悪性腫瘍は、獣医学分野における治療の観点の重要とともに、腫瘍発生リスク因子や関連遺伝子、組織学的特徴などを比較腫瘍学的に解析できる人の腫瘍の自然発生モデルとして期待されている。

医学領域では抗腫瘍サイトカインの1つとして注目されている Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL)は、腫瘍細胞に選択的にアポトーシスを誘導し、全身的な副作用も少ないため、幅広い腫瘍への適用が期待されている。しかし、獣医学領域においては腫瘍細胞に対する TRAIL の効果についての報告は乏しく、伴侶動物における TRAIL の作用機序に関する基盤的知見も乏しいのが現状である。

2. 研究の目的

上記の観点から、本研究では、医学領域でも検証されていない血管肉腫に対する TRAIL の効果を、犬血管肉腫細胞株を用いて検証し、さらに獣医領域における腫瘍に対する TRAIL 研究の基礎となる情報を蓄積することを目的として、犬乳腺腫瘍由来の細胞株に対する TRAIL のアポトーシス誘導作用を評価した。

3. 研究の方法

まず、犬血管肉腫細胞株に対する TRAIL の細胞傷害性の評価を目的とし、三量体形成しやすくした isoleucine-zipper TRAIL (izTRAIL) を含む、3種類のヒト組み換え TRAIL の犬血管肉腫細胞株に対する TRAIL の細胞傷害性を比較した。さらに犬血管肉腫細胞は、izTRAIL の添加によって Annexin V+/ Propidium Iodide (PI) - を示す初期アポトーシスの細胞と、PI 染色により核の断片化を示す SubG-1 相細胞の変化を検索した。ウェスタンブロット法で、izTRAIL の添加後に caspase (Casp) -8 および Casp-3、Casp-3 の基質である polyclonal anti-Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の量も観察した。加えて、上記検索を Casp-8 および Casp-3 の阻害剤を加えて行った。

次に、犬の乳腺腫瘍細胞に対する izTRAIL のアポトーシス誘導作用について評価するために、まず、乳腺由来腫瘍細胞株の作製を行ない、細胞の由来も検索した。樹立した乳腺腫瘍細胞株に対する TRAIL の細胞傷害性の評価を目的とし、三量体形成しやすくした isoleucine-zipper TRAIL (izTRAIL) の細胞傷害性を検討し、さらに犬血管肉腫細胞は、izTRAIL の添加によって Annexin V+/ Propidium Iodide (PI) - を示す初期アポトーシスの細胞と、PI 染色により核の断片化を示す SubG-1 相細胞の変化を検索した。ウェスタンブロット法で、izTRAIL の添加後に caspase (Casp) -8 および Casp-3、Casp-3 の基質である polyclonal anti-Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の量も観察した。加えて、上記検索を Casp-8 および Casp-3 の阻害剤を加えて行った。

4. 研究成果

第1に、犬血管肉腫細胞株に対する TRAIL の細胞傷害性の評価を目的とし、三量体形成しやすくした isoleucine-zipper TRAIL (izTRAIL) を含む、3種類のヒト組み換え TRAIL の犬血管肉腫細胞株に対する TRAIL の細胞傷害性を比較し、izTRAIL が最も効果的に犬血管肉腫細胞株の細胞生存率を減少させることを見出した。一方、最も効果的な izTRAIL であっても、正常な血管内皮細胞の細胞生存率には影響せず、izTRAIL は腫瘍細胞に対して選択的な細胞傷害効果を示すことを明らかにした (Table

Table 1 IC50 of canine HSA cell lines for izTRAIL

cells	izTRAIL (ng/ml)
JuA1	12.40 ± 8.11
JuB2	3.40 ± 2.75
JuB2-1	4.59 ± 5.56
JuB4	1.22 ± 0.46
Re11	-
Re12	11.57 ± 6.75
Re21	14.18 ± 3.53
Ud2	9.21 ± 6.98
Ud6	9.68 ± 5.00
MDCK	-
HeLa	12.65 ± 9.64

Results are presented as mean ± SD of three independent experiments. -, cases in which the IC50 could not be calculated.

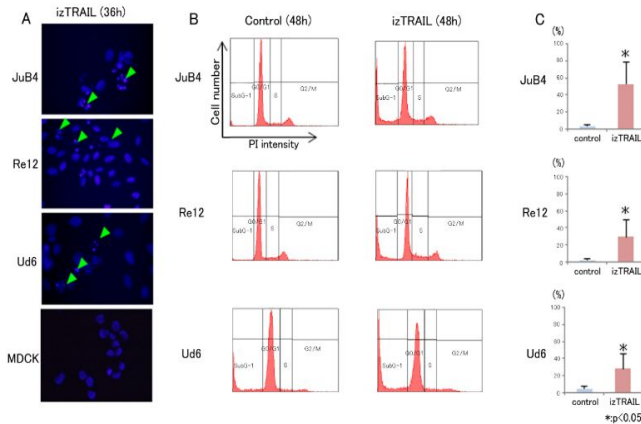


Fig. 1 Nuclear fragmentation induced by izTRAIL.

A: DAPI staining revealed the nuclear morphology changes in JuB4, Re12, Ud6, and MDCK cells treated with 100 ng/ml of izTRAIL for 36 h. Arrowheads show the nuclear fragments. B: Representative DNA histogram showing the cells stained by PI for each cell line. JuB4, Re12, and Ud6 cells were treated with izTRAIL for 48 h and stained with PI. The vertical axis shows the cell number and the horizontal axis shows the PI staining intensity. C: The percentage of cells in sub-G1 phase increased significantly for JuB4, Re12, and Ud6 cell lines after treatment with izTRAIL (*P < 0.05).

ことで抑制された。以上より、izTRAIL が犬血管肉腫細胞株に Casp-8 を介したアポトーシスによる細胞傷害作用を示すことが明らかとなった。

次に犬の乳腺腫瘍細胞に対する izTRAIL のアポトーシス誘導作用について評価した。まず、乳腺由来腫瘍細胞株の作製のために、良性の乳腺腫瘍 1 例、悪性の乳腺腫瘍 2 例について、腫瘍組織から細胞を分離・採取し、60 代以上継代し、3 つの細胞株を樹立した。これらの培養細胞は、細胞形態と免疫蛍光染色の結果から、上皮性腫瘍の特性を有していることが明らかとなった。これらの 3 種類の乳腺由来腫瘍細胞株では、izTRAIL の添加によ

1)。また、犬血管肉腫細胞は、izTRAIL の添加によって Annexin V+/ Propidium Iodide(PI) - を示す初期アポトーシスの細胞と、PI 染色により核の断片化を示す SubG-1 相細胞の増加が確認され (Fig. 1), izTRAIL の添加後に caspase (Casp) -8 および Casp-3 が活性化し、Casp-3 の基質である polyclonal anti-Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の分解も見られた (Fig. 2)。これらの変化は Casp-8 および Casp-3 の阻害剤を加える

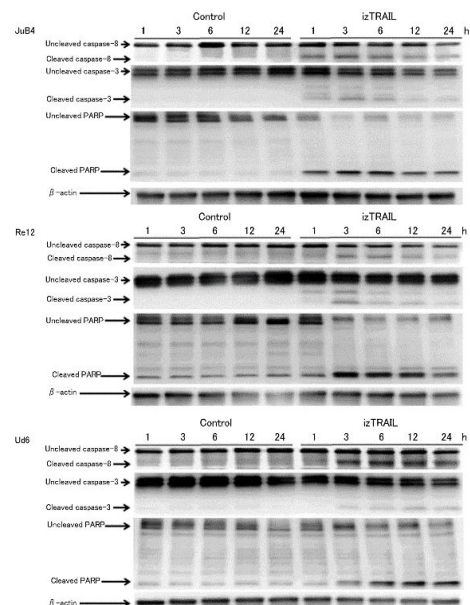


Fig.2 Expression of caspase-8, caspase-3, and PARP. Representative western blot bands are shown.

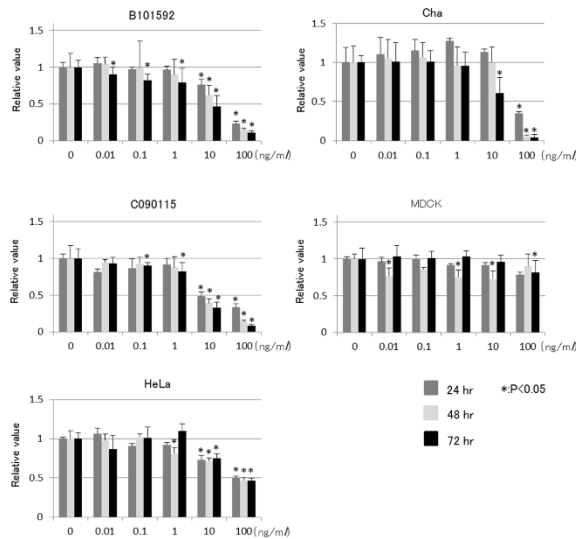


Fig. 3 Cell viability of cultured cells, MDCK cells, and HeLa cells after izTRAIL treatment

The vertical axis represents the relative absorbance value compared with the control group (no izTRAIL treatment), and the horizontal axis represents the concentration of izTRAIL. Representative results of more than three independent experiments are presented as mean \pm SD (* $P < 0.05$).

って細胞生存率が低下し(Fig. 3), izTRAIL 添加後には, Annexin V+/PI-を示す初期アポトーシス細胞の増加がみられ, PI 染色によって SubG-1 相の細胞の増加も確認された(Fig. 4). また, izTRAIL 添加によって Casp-8 および Casp-3 が活性化し, PARP の分解も見られた(Fig. 5). これらの変化は Casp-8 および Casp-3 の阻害剤により抑制された。以上より, izTRAIL は, 犬血管肉腫細胞株と同様に, 犬乳腺上皮性腫瘍由来株に対しても Casp-8 を介したアポトーシスによる細胞傷害作用を示すことが明らかとなった。

TRAIL は Casp-8 を活性化させ, p53 の関与しない外因性のアポトーシスを誘導するので, p53 の異常による内因性アポトーシス経路が不活性化した腫瘍にも効果を発揮することが期待されている。 実際, 本研究に用いた犬血管肉腫細胞株は, p53 の不活性化した細胞株であり, それらに対

して izTRAIL によってアポトーシス誘導が可能であった点から, p53 の異常に関与しない抗腫瘍効果が期待できるものである。

本研究で得られた血管肉腫に対する TRAIL の抗腫瘍効果は, 人の血管肉腫においても報告されておらず, 人の血管肉腫の新しい治療法開発の知見の一つともなりうる。さらに, 犬

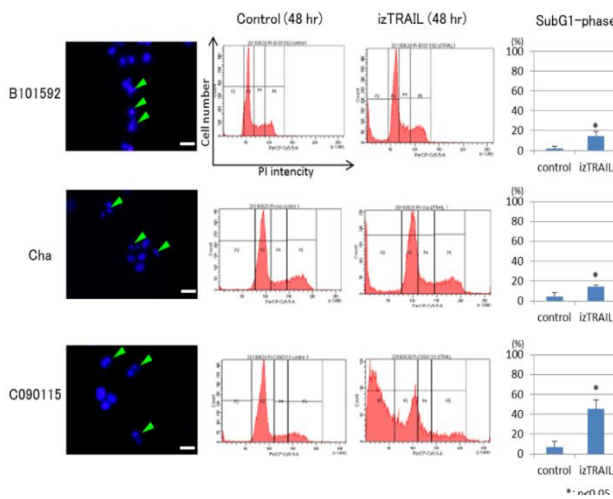


Fig. 4 Nuclear fragmentation induced by izTRAIL

The images obtained from DAPI staining show the nuclear morphology changes after treatment with 100 ng/ml of izTRAIL for 48 hour. Arrowheads show the nuclear fragments.

Representative DNA histogram at right showing the cells stained with propidium iodide (PI) for each cell. The vertical axis represents the cell number, and the horizontal axis represents the PI staining intensity. The percentage of cells in the sub-G1 phase is shown in the graph. The proportion of cells in the sub-G1 phase increased significantly after treatment with izTRAIL (* $P < 0.05$).

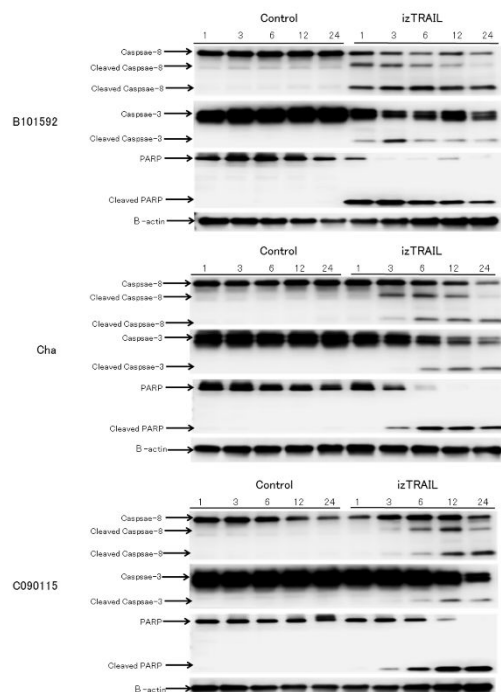


Fig. 5 Expression of caspase-8, caspase-3, and PARP. Representative western blot bands are shown.

乳腺上皮性腫瘍由来細胞株に対しても同様のアポトーシス誘導作用による抗腫瘍効果が明らかとなり、本研究の結果は、獣医領域における腫瘍性疾患の治療法としての TRAIL の広い適用性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Goto M, Owaki K, Hirata A, Yanai T, Sakai H.	4. 巻 1
2. 論文標題 Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in canine hemangiosarcoma cells in vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/vco.12471.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goto M, Hirata A, Murakami M, Sakai H.	4. 巻 81(12)
2. 論文標題 Trimer form of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand induces apoptosis in canine cell lines derived from mammary tumors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 1791 1803.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.19-0469	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Goto M, Owaki K, Hirata A, Yanai T, Sakai H.
2. 発表標題 Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in canine hemangiosarcoma cells in vitro.
3. 学会等名 Veterinary Cancer Society（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤みなみ, 大脇啓嗣, 木村俊太, 平田暁大, 柳井徳磨, 酒井洋樹
2. 発表標題 犬血管肉腫に対するTNA-related Apoptosis-induced Ligand (TRAIL)のApoptosisの誘導
3. 学会等名 日本獣医師専門家協会 第4回学術集会（東京）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 後藤みなみ, 平田暁大, 村上麻美, 酒井洋樹
2. 発表標題 犬の乳腺腫瘍由来細胞株に対する三量体形成Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing (TRAIL)のapoptosisの誘導
3. 学会等名 第7回日本獣医病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村上 麻美 (Mami Murakami) (30597125)	岐阜大学・応用生物科学部・助教 (13701)	