

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目： 若手研究 (B)

研究期間： 2007 ~ 2008

課題番号： 19780235

研究課題名 (和文) 犬および猫の乳癌幹細胞の同定とその機能解析

研究課題名 (英文) Identification and characterization of cancer stem cell in canine and feline mammary gland tumors

研究代表者

道下 正貴 (MICHISHITA MASAKI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教

研究者番号：50434147

研究成果の概要：

獣医診療で高頻度に遭遇する犬および猫の乳癌の発症機構の解明を目指し、乳癌幹細胞の同定および細胞生物学的特性を解析した。ヒト乳癌幹細胞は浮遊細胞塊、side population (SP) 細胞あるいは CD44⁺CD24⁻細胞集団に濃縮され、犬および猫の乳癌細胞株においてそれらの濃縮法を検討した結果、犬および猫においても乳癌幹細胞の存在が示唆された。また免疫不全マウスへの皮下移植によりそれらの腫瘍形成能が認められた。乳癌幹細胞研究が乳癌発症機構の解明に極めて有益な情報を提供するものと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	0	2,300,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	330,000	3,730,000

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：犬、猫、乳癌、癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞や神経幹細胞のような正常幹細胞の研究の進展に伴い、正常組織と同様に固形癌においても幹細胞様の特性を有する癌幹細胞を頂点とする階層構造の存在が明らかとなってきた。固形癌における治療法は外科的摘出に加え、化学療法や放射線療法の併用が主であるが、近年、癌の進展、転移、再発のキープレーヤーとなる癌幹細胞に特異的な治療法の開発が取り組まれている。ヒト乳癌幹細胞研究が著しく進展する中で、獣

医学における乳癌研究は予後予測や分子マーカーによる転移機構を対象とするものが多く、癌幹細胞研究の詳細な知見はない。

2. 研究の目的

本申請研究は、獣医医療で高頻度に遭遇する犬および猫の乳癌を対象とし、それらから乳癌幹細胞を同定、単離し、機能解析を介してそれらの特性を把握するとともに、発症や病態維持の制御機構の解明を目的とする。さ

らに、犬や猫における乳癌を対象とした乳癌幹細胞に特異的な治療法の開発だけでなく、同動物種の固形癌やヒトの乳癌の理解とその治療法開発および臨床応用を目指している。

3. 研究の方法

犬および猫の乳癌細胞株および外科摘出乳腺腫瘍材料に存在する乳癌幹細胞を同定し、詳細な解析によりそれらの特性を明らかにする。

(1) 犬および猫の乳癌幹細胞の同定

フローサイトメトリー解析および細胞培養により、乳癌幹細胞が濃縮される side-population (SP) 細胞、アルデヒド脱水酵素 (ALDH⁺) 細胞、浮遊細胞塊およびヒト乳癌幹細胞マーカー CD44⁺CD24⁻ 細胞集団を下記の方法で同定する。

① Mammosphere assay

浮遊細胞塊は、固形癌における癌幹細胞に特有な増殖形態であり、成長因子添加無血清培地で 7-12 日間培養させることで形成できる。癌幹細胞以外の細胞は形成することができない。

② Side population 解析

幹細胞は ABC トランスポーターを高発現し、色素排出能が高い。DNA 結合色素を細胞に取り込ませ、排出能の高い細胞 (SP 細胞) と排出能の低い細胞 (non-SP 細胞) に分けることができる。乳癌幹細胞は SP 細胞に濃縮され、同定することができる。

③ Aldefluor assay

ALDH は造血幹細胞や神経幹細胞などの未分化細胞での活性が高く、成熟分化に伴い活性が低くなる。ヒト乳癌幹細胞は ALDH⁺ 細胞として同定されており、これらの酵素活性を利用して乳癌幹細胞を同定する。

④ 表面抗原解析

ヒト乳癌幹細胞は CD44⁺CD24⁻ 細胞に濃縮されており、表面マーカー CD44 および CD24 抗体を用いて乳癌幹細胞分画を同定する。

(2) 浮遊細胞塊の特徴付け

① CD44⁺CD24⁻ 細胞の同定

形成させた浮遊細胞塊に含有する乳癌幹細胞集団を同定する。

② 未分化関連遺伝子の発現変動解析

CD133、MDR、CD34、SOX2、Oct-4、Nanog、Notch、Gli-1 などの未分化関連遺伝子群の発現変動を解析するために、浮遊細胞塊と基となる接着性細胞 (親細胞) について RT-PCR を行う。

③ 腫瘍形成能および増殖能の解析

浮遊細胞塊を単一細胞化し、ヌードマウス

(5-7 週齢、雌) へ皮下移植し、腫瘍形成能の有無を検討する。経過観察後、形成された腫瘍は採材され、病理組織化学的解析および mammosphere assay を行い、浮遊細胞塊の形成の有無を検索する。さらに継代移植による再腫瘍形成能を解析する。

(3) SP 細胞の解析

① 表面抗原解析

同定した SP 細胞に対して CD44 および CD24 マーカーを用いて乳癌幹細胞分画を解析する。

② 腫瘍形成能および増殖能の解析

分取した SP 細胞をヌードマウス (5-7 週齢、雌) の皮下へ移植し、腫瘍形成能の有無を検討する。経過観察後、形成された腫瘍を採材し、病理組織化学的解析を行う。

(4) ALDH⁺ 細胞の特徴付け

① 浮遊細胞塊の形成能

Aldefluor assay により ALDH⁺ 細胞および ALDH⁻ 細胞を分取し、mammosphere assay を行う。

② 表面抗原解析

Aldefluor assay と表面抗原解析を行い、ALDH⁺ 細胞中の CD44⁺CD24⁻ 細胞の割合を調べる。

③ 腫瘍形成能

分取した ALDH⁺ 細胞および ALDH⁻ 細胞を免疫不全マウス (7 週齢、雌) の皮下へ移植し、腫瘍形成能の有無を検討する。経過観察後、形成された腫瘍を採材し、病理組織化学的解析および aldefluor assay を行い、階層性を解析する。

4. 研究成果

フローサイトメトリー解析および細胞培養アッセイにより、犬の乳癌において乳癌幹細胞が濃縮される浮遊細胞塊、SP 細胞、ALDH⁺ 細胞を同定することができた。一方、猫の乳癌では浮遊細胞塊および SP 細胞集団を同定することができた。さらに同定した乳癌幹細胞の腫瘍形成能の解析を中心に行った。

(1) 浮遊細胞塊の同定と特徴づけ

犬乳癌細胞株 CHMp を中心に RT-PCR 解析および免疫不全マウスへの皮下移植による腫瘍形成能を解析した。CHMp 細胞株から形成される浮遊細胞塊は、対照群となる CHMp 親細胞株と対比して、乳癌幹細胞マーカー CD44⁺CD24⁻ 細胞を高い割合で含有し (図 1)、未分化関連遺伝子である CD133、CD34、MDR、SOX2、NOTCH および Gli-1 を高発現していた。免疫不全マウスへの皮下移植による腫瘍形成能の解析では、対照群と比較して腫瘍形成能が高い傾向がみられ、さらに高い増殖活性

を示した(表1)。浮遊細胞塊形成細胞から生じた腫瘍の再浮遊細胞塊形成能では、浮遊細胞塊を形成される乳癌幹細胞の存在が示し、さらなる継代移植による再腫瘍形成能も認められた。いずれも形成された腫瘍は元となる病理組織像とほぼ一致していた。これらの結果から、犬乳癌においても乳癌幹細胞およびそれらを頂点とする階層構造が存在する可能性が示唆された。

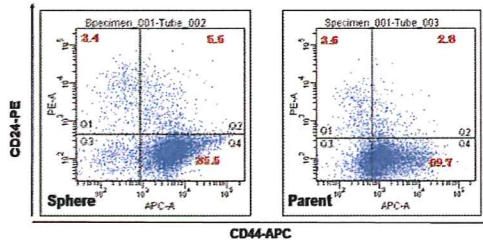


図1. 浮遊細胞塊の形成

	移植細胞数と腫瘍形成の相関		
	1 x 10 ⁴	1 x 10 ⁵	1 x 10 ⁶
sphere	3/3	3/3	
parent		2/3	3/3

表1. ノードマウスへの移植による腫瘍形成

(2) SP細胞の同定と特徴づけ

犬および猫の乳癌細胞株を用いたSP解析の結果から、細胞株により含有率が異なるもののSP細胞の存在が明らかとなった(図2)。同定されるSP細胞はCD44⁺CD24⁻の表現型を示した。さらに免疫不全マウスへの移植実験では、SP細胞はnon-SP細胞よりも腫瘍形成能が高い傾向がみられた。形成される腫瘍組織は原発部の腫瘍増殖像と同様であった。

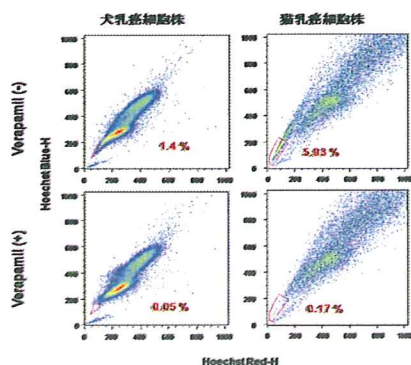


図2. 犬および猫乳癌細胞株のSP解析

(3) ALDH⁺細胞の同定と特徴付け

Aldefluor assayにより犬乳癌細胞株の乳癌幹細胞が濃縮されるALDH⁺細胞を同定した(図3)。分取したALDH⁺細胞の自己複製能をmammosphere assayにより解析し、ALDH⁺細胞が浮遊細胞塊形成能を有することを明らかにした。ALDH⁺細胞では浮遊細胞塊は観察されなかった。また、表面抗原解析からALDH⁺細胞はすべてCD44⁺CD24⁻細胞であった。それゆえ、犬乳癌ALDH⁺細胞は乳癌幹細胞の特性を示した。さらに、免疫不全マウスにおける腫瘍形成能についてALDH⁺細胞およびALDH⁻細胞を移植し、現在経過観察している。

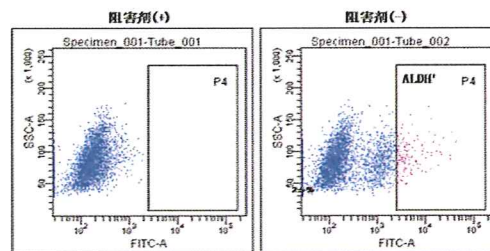


図3. 犬乳癌のAldefluor Assay

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2件)

① Michishita M, Momozawa Y, Oizumi T, Ohkusu-Tsukada K, Takahashi K.: "Primary neuroblastoma in the skin of an adult Shih Tzu dog" *Veterinary Dermatology* (in press) (2009). 査読有

② Michishita M, Takahashi K, Moriya H, Nakamura S, Koyama H, Sako T.: "Poorly Differentiated Rectal Carcinoid in a Cow" *Veterinary Pathology* 44:414-417 (2007). 査読有

[学会発表] (計10件)

① 道下正貴、秋吉るい、吉村久志、塚田晃三、勝本拓夫、市川 仁、中川貴之、佐々木伸雄、高橋公正."犬の乳癌幹細胞の同定と特徴付け" 日本獣医学会. 2008年9月. 宮崎シーガイア.

② 吉村久志、道下正貴、塚田晃三、高橋公正."ネコおよびイヌの乳腺癌における Cancer-associated fibroblast および

Tenascin-C” 日本獣医学会. 2008年9月.
宮崎シーガイア.

③ 塚田晃三、戸田正博、鶴殿平一郎、河上裕、高橋公正、道下正貴、由井克之. “2タイプの制御性T細胞の解除による癌免疫寛容の克服と腫瘍拒絶” 日本獣医学会. 2008年9月. 宮崎シーガイア.

④ 桃澤由妃、道下正貴、岩淵昌彦、塚田晃三、高橋公正. “猫乳腺腫瘍の悪性化に伴うS100A4とE-cadherinの発現変化” 日本獣医学会. 2008年3月. 麻布大学.

⑤ 中澤亮太、道下正貴、鷺巣 誠、塚田晃三、高橋公正. “先天性肺葉性肺気腫の犬の一例” 日本獣医学会. 2008年3月. 麻布大学.

⑥ 皆上大吾、鎌田佐知子、中村迪香、武内皇子、空元あかね、片岡康、小山秀一、道下正貴、左向敏紀. “非結核性抗酸菌症の犬の1例” 日本獣医臨床病理学会. 2008年2月. さいたま市ソニックシティ.

⑦ 堀 牧人、道下正貴、塚田晃三、鈴木吉一、高橋公正. “牛の好酸球性増殖性静脈炎の病理形成過程” 日本獣医学会. 2007年9月. 酪農学園大学.

⑧ 吉光仁美、布施辰樹、道下正貴、高橋公正、塚田晃三. “拘束ストレスによるアトピー性皮膚炎悪化の分子機構” 日本獣医学会. 2007年9月. 酪農学園大学.

⑨ 市川 仁、道下正貴、岩間厚志.
“AML1(RUNX1)-MTG8(ETO)とCBFβ-MYH11はともに造血細胞の幹細胞性を亢進させる” 日本血液学会. 2006年10月. 福岡国際会議場.

⑩ 市川 仁、道下正貴、岩間厚志.
“AML1(RUNX1)-MTG8(ETO)とCBFβ-MYH11による造血細胞の幹細胞亢進とHOXB2の関与” 日本癌学会. 2006年9月. パシフィコ横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

道下 正貴 (MICHISHITA MASAKI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教

研究者番号：50434147