

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月29日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21688022

研究課題名（和文） 犬のリンパ腫の新規治療法開発のための基盤的研究

研究課題名（英文） Fundamental research for development of new therapy for canine lymphoma

研究代表者

水野 拓也 (MIZUNO TAKUYA)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：90398826

研究成果の概要（和文）：犬のリンパ腫に対する抗体療法のターゲットとして、正常リンパ球に発現するものの特異的な糖鎖付加によりリンパ腫の治療ターゲットとなる可能性のある分子 PSGL-1 を同定した。一方、低分子化合物としては、CDK 阻害剤であるフラボピリドールによって、細胞周期の調節および抗アポトーシス蛋白の発現低下が生じ、*in vitro* で犬のリンパ腫由来細胞株 8 種類が細胞死を起こす事を明らかにした。さらに、cDNA マイクロアレイを用いて、犬のリンパ腫に特異的に発現する遺伝子を同定し、これらが新規治療法のターゲットとなりうる事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Using hybridoma library established from rat immunized with canine lymphoma cell line, canine PSGL-1 was found to be expressed on normal lymphocytes, but was specifically glycosylated in lymphoma cell line. This indicated that specifically glycosylated canine PSGL-1 molecule could be a target for antibody therapy. On the other hands, Flavopiridol, known as pan-CDK inhibitor, inhibited growth of eight lymphoma cell lines *in vitro* by regulation of cell cycle, as well as downregulation of anti-apoptotic proteins. Furthermore, we identified the genes specifically expressed in canine lymphoma, which could be a candidate for molecular target therapy in canine lymphoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
年度			
年度			
総計	18,900,000	5,670,000	24,570,000

研究分野：臨床腫瘍学

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、リンパ腫、新規治療法

1. 研究開始当初の背景

犬の寿命の延長に伴い、ヒトと同様腫瘍症例が増加している（米国では年 400 万頭の犬

か腫瘍と診断され、10歳以上の犬の45%か腫瘍で死亡する)。中でもリンパ腫の発生は犬の全腫瘍の24%と非常に多く(ヒトにおける発生率の5倍)、その病態および化学療法に対する反応性がヒトの非ホジキンリンパ腫に類似しているため、ヒトのリンパ腫の自然発症モデルとしても有用であるとされる。これまで犬のリンパ腫に対しては多剤併用化学療法が中心に用いられていたが、生存率の大きな改善は得られておらず(生存期間中央値9-12ヶ月)、現場においてリンパ腫に対する現在の治療法の限界を痛切に感じ、化学療法に代わる新規治療法が必要であると考えに至った。新規治療法としては、ヒトB細胞型リンパ腫に対する抗CD20抗体(リツキシマブ)の投与や犬の肥満細胞腫に対する低分子阻害剤イマチニブの投与による良好な反応性に見られるように抗体療法と低分子療法が挙げられる。抗体療法は腫瘍細胞の表面抗原特異的な抗体を投与することにより腫瘍細胞の溶解を促す療法であり、低分子阻害剤は腫瘍細胞において活性化しているシグナル伝達分子を特異的に阻害する療法であるため、化学療法とは異なり、より腫瘍細胞特異的に作用するため副作用も少なく有効な治療法となりうる。しかし、残念ながらこれまでに犬のリンパ腫に対してこうした治療法を開発するためのアプローチは全くなされていない。

2. 研究の目的

我々は、ここ数年の研究において抗体療法を念頭においた犬に投与可能なイヌマウスキメラ抗体の蛋白発現系の開発に着手しているが(科研費補助金 H19-H20「若手研究B」)、実際のリンパ腫に対して抗体療法を行うためにはそのターゲットとなるリンパ腫特異的抗原の同定が必要である。また一方でマウスのリンパ球の生死をシグナル伝達の阻害によって調節できることを明らかにしているが(科研費補助金 H17-H18「若手研究B」)、これまでに犬のリンパ腫腫瘍細胞におけるシグナル伝達の機構については明らかにされていない。そのため、本研究計画においては、犬のリンパ腫に対する新規治療法として抗体療法とおおよび低分子療法を実施するためのターゲットとなる分子を探索することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍細胞特異的抗体ライブラリーの作製

本研究室で樹立した犬リンパ腫由来腫瘍細胞株 Ema を常法に基づき TiterMax Gold を用いてラットに免疫した。2週間後に膝窩リンパ節を回収し、P3U1細胞と融合させ、ハイ

ブリドーマを作成した。それぞれのハイブリドーマ由来抗体と Ema 細胞との反応性をフローサイトメトリーにより検討した。

(2) mAb を用いたパニング法によるリンパ腫特異的新規抗原の同定

Ema 細胞より抽出した RNA を用いて cDNA ライブラリーを作成し、レトロウイルスベクターである pMx-IG ベクターに導入し、発現ライブラリーを作成した。このライブラリーを PLAT-E 細胞に遺伝子導入後、得られたレトロウイルス上清を P3U1 細胞に感染させた。抗ラット IgG 抗体をシャーレにコートし、さらに抗体ライブラリーから得られた抗体を添加し、その上に cDNA 発現ライブラリーが遺伝子導入された P3U1 細胞を添加した。1週間の培養ののち、シャーレに残った EGFP 陽性細胞を回収し、レトロウイルスベクターに組み込まれた cDNA の遺伝子配列を調べた。得られた候補となる cDNA の全長配列をそれぞれ遺伝子クローニングし、もう一度 P3U1 細胞に遺伝子導入し、選択した抗体との反応性を検討することにより、mAb が認識する分子を同定したところ、13種類の抗体がイヌ PSGL-1 を認識することが明らかとなった。

(3) mAb のリンパ腫腫瘍細胞との反応性の検討

得られた Ema 細胞特異的抗体ライブラリーを用いて、正常犬由来末梢血リンパ球、犬リンパ腫腫瘍細胞株に反応させ、抗体との反応性についてフローサイトメトリーにより検討した。

(4) 低分子化合物のリンパ腫に対する増殖阻害効果の検討

CDK 阻害剤である Flavopiridol および PD0332991 を用いて、犬リンパ腫腫瘍細胞株 CL-1, GL-1, Ema, Nody-1, UL-1, CLGL-90, 17-71 細胞に添加し培養し、MTT アッセイにより細胞増殖を検討した。

(5) 低分子化合物のリンパ腫増殖抑制効果のメカニズムの検討

低分子化合物による細胞死のメカニズムを明らかにするために、低分子化合物を添加した細胞より蛋白を抽出し、細胞周期に関連する蛋白質、アポトーシスに参与する蛋白質についてウエスタンブロッティングを行った。

(6) 犬リンパ腫症例由来サンプルを用いた cDNA マイクロアレイ

犬 T 細胞型リンパ腫症例 3 例より採取した

腫瘍細胞と、健常犬 3 頭の末梢血より MACS Beads を用いて分離した CD3 陽性 T リンパ球より常法に基づいて、RNA を単離し、affimetrix 社のイヌ cDNA マイクロアレイを実施した。

(7) cDNA マイクロアレイにより同定された遺伝子の realtime PCR を用いた発現検討

(6) で同定された遺伝子について、以下のサンプルについて RNA を抽出し cDNA を作成後、realtime PCR を用いて、発現検討を行なった。用いた細胞は、マイクロアレイに用いた T 細胞型リンパ腫のうちの 2 例、犬リンパ腫腫瘍細胞株 10 種類、犬リンパ腫症例由来腫瘍細胞 6 例、健常犬由来 T リンパ球 2 例、健常犬由来 B リンパ球 2 例、健常犬由来リンパ節 2 例、健常犬由来脾臓 4 例を用いた。

4. 研究成果

(1) 腫瘍細胞特異的抗体ライブラリーの作製

犬リンパ腫由来細胞株である Ema 細胞を免疫したラットより作成したハイブリドーマライブラリーより、Ema 細胞を認識する抗体を産生するハイブリドーマを選択したところ、69 種類のハイブリドーマが得られた。

(2) mAb を用いたパニング法によるリンパ腫特異的新規抗原の同定

69 種類の抗体のうち、mAb 6-1 が認識する分子をパニング法を用いた発現クローニングにより同定した。その結果、イヌ PSGL-1 を mAb 6-1 が認識することが明らかとなった。さらに、69 種類の抗体のなかに mAb 6-1 に加えて、12 種類の抗体も同様にイヌ PSGL-1 を認識することが明らかとなった。

(3) mAb のリンパ腫腫瘍細胞との反応性の検討

得られた 13 種類のイヌ PSGL-1 を認識する抗体が、イヌのリンパ腫細胞を特異的に認識するかをフローサイトメトリーを用いて検討した。その結果、mAb 64-1 を除く 12 種類の抗体は、犬のリンパ腫由来細胞株に認識するだけではなく、健常犬由来リンパ球に反応し、リンパ腫に特異的ではない事が明らかとなった。一方、mAb 64-1 は、健常犬由来リンパ球および多くのリンパ腫由来細胞株、Ema, CL-1, GL-1 に対しては、より強く反応する傾向にあった。このことは、mAb 64-1 がリンパ腫に特異的なイヌ PSGL-1 の分子構造を認識する抗体である可能性が示唆された。

今後は、リンパ腫症例由来腫瘍細胞との反応性についても検討する予定である。

< Reactivities of mAbs except 64-1 >

Canine lymphoma cell lines								Normal canine lymphocytes		
Ema	CL-1	GL-1	TL-1	UL-1	17-71	CLGL-90	CLBL-1	No.1	No.2	No.3
⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙

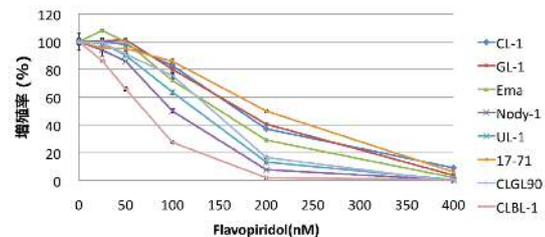
< Reactivities of mAb 64-1 >

Canine lymphoma cell lines								Normal canine lymphocytes		
Ema	CL-1	GL-1	TL-1	UL-1	17-71	CLGL-90	CLBL-1	No.1	No.2	No.3
○	○△	○	△	△	△	△	△	△	△	△

⊙: strongly positive, ○: positive, △: slightly positive

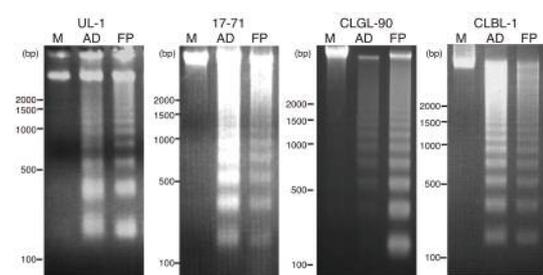
(4) 低分子化合物のリンパ腫に対する増殖阻害効果の検討

CDK4/6 特異的阻害剤である PD032991 により、犬リンパ腫腫瘍細胞株の増殖は約 30%程度に低下したが、それ以上の増殖抑制効果は認められなかった (データ省略)。しかし、pan-CDK 阻害剤である Flavopiridol の添加により、用いた 8 種類の細胞株全てにおいて 400nM という濃度で著しい増殖抑制が認められた。



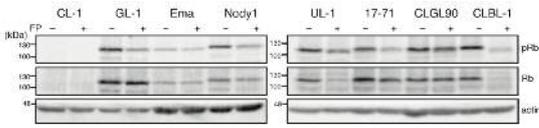
(5) Flavopiridol のリンパ腫増殖抑制効果のメカニズムの検討

Flavopiridol を添加した細胞株より DNA を抽出し DNA 断片化アッセイを行なったところ、全ての細胞において 180bp の倍数の DNA の断片化が認められ、アポトーシスによって細胞死が誘導されていることが明らかとなった。

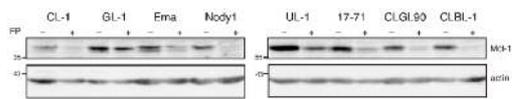


さらに、FP を添加した細胞より蛋白を抽出し、各細胞株における細胞周期関連蛋白の発現を検討したところ、CDK の下流にある Rb のリン酸化の阻害が認められる細胞と認められない細胞株が存在することが明らかとなった。

た。このことは、FP による CDK の阻害以外にリンパ腫細胞株に対する細胞死を誘導する機構が存在することを示唆している。

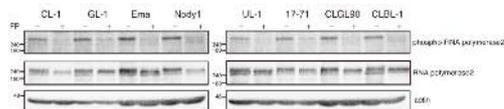


また、FP を添加した細胞より抽出した蛋白を用いて、アポトーシス関連蛋白である Caspase3, PARP の発現、抗アポトーシス関連蛋白である XIAP, Mcl-1, Bcl-xL の発現を検討した。その結果、FP を添加した細胞においては、開裂した Caspase3 および PARP の発現が認められ、アポトーシス経路が活性化している事が明らかとなった。一方、抗アポトーシス関連蛋白については、FP を添加した細胞株において、その発現量の低下が認められ、FP の添加した細胞におけるアポトーシスの誘導は、この抗アポトーシス蛋白の発現減少が原因となっている可能性が示唆された。

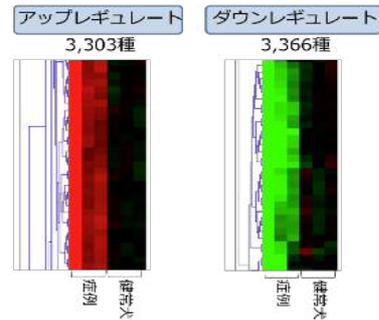


さらに、この抗アポトーシス蛋白の発現低下のメカニズムを明らかにするために、FP のターゲットとなるその他の CDK である CDK7/CDK9 の下流にある RNA polymerase II のリン酸化について検討した。その結果、FP を添加した細胞において RNA polymerase II のリン酸化の低下が認められ、FP による抗アポトーシス蛋白の発現低下は、この RNA polymerase II のリン酸化低下による抗アポトーシス蛋白の転写の抑制によるものである可能性が示唆された。

(6) 犬リンパ腫症例由来サンプルを用いた cDNA マイクロアレイ

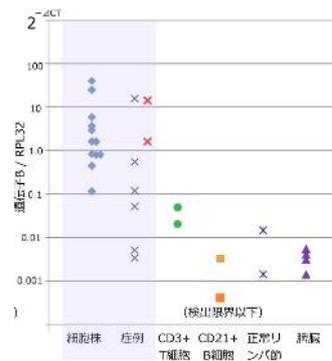
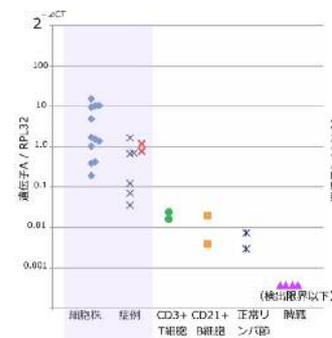


cDNA マイクロアレイの結果、発現上昇が認められた遺伝子は、3,303 遺伝子で、発現低下が認められた遺伝子は、?????遺伝子であった。また、発現上昇が認められた 3,303 遺伝子のうち、84 遺伝子が 3 倍以上発現上昇している事が明らかとなった。



(7) cDNA マイクロアレイにより同定された遺伝子の realtime PCR を用いた発現検討

(6)において明らかとなった 84 遺伝子のうち、20 遺伝子について、上に記した様々なサンプルを用いて real time PCR を用いて発現検討を行なった。その結果、DEP domain-containing 1a (DEPDC1A) および DEP domain-containing 1b (DEPDC1B) が犬のリンパ腫特異的に発現する遺伝子であることが明らかとなった。すなわち図 1 に示すように、健常犬由来 T リンパ球および B リンパ球においては、その発現は非常に低く、また 4 頭の健常犬由来リンパ系組織である脾臓においてもその発現は非常に低かった。一方で、10 種類の犬のリンパ腫腫瘍細胞株および 8 例の犬のリンパ腫由来症例においては、著しくこれらの発現上昇が認められた。



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8件)

- ①. Okawa T, Kurio Y, Morimoto M, Hayashi T, Nakagawa T, Sasaki N, Okuda M, Mizuno T. Calreticulin expression in neoplastic versus normal dog mammary glands: A cDNA subtraction-based study. Res Vet Sci. 査読有 2012 Feb;92(1):80-91. Epub 2010 Dec 3.
- ②. Shimokawa Miyama T, Umeki S, Baba K, Sada K, Hiraoka H, Endo Y, Inokuma H, Hisasue M, Okuda M, Mizuno T. Neutropenia Associated with Osteomyelitis due to Hepatozoon canis Infection in a Dog. J Vet Med Sci. 査読有 2011 Oct 28;73(10):1389-93. Epub 2011 Jun 21.
- ③. Umeki S, Suzuki R, Shimojima M, Ema Y, Yanase T, Iwata H, Okuda M, Mizuno T. Characterization of monoclonal antibodies against canine P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1). Vet Immunol Immunopathol. 査読有 2011 Jul 15;142(1-2):119-25. Epub 2011 Apr 21.
- ④. Okawa T, Yanase T, Shimokawa Miyama T, Hiraoka H, Baba K, Tani K, Okuda M, Mizuno T. "Prekallikrein Deficiency in a Dog." J Vet Med Sci. 査読有 2011 Jan;73(1):107-11. Epub 2010 Aug 23
- ⑤. Ikewaki N, Nakaichi M, Mizuno T, Takamura N, Tokunaga J, Ogata K, Inoko H, Otsu R. Anti-human very late antigen-alpha4 (CD49d) monoclonal antibody (BU49) cross-reacts with the canine B-cell leukemia cell line GL-1, resulting in the induction of homotypic cell aggregation. Cell Immunol. 査読有 2010;263(1):55-64. Epub 2010 Feb 26.
- ⑥. Mizuno T, Suzuki R, Umeki S, Okuda M. Crossreactivity of antibodies to canine CD25 and Foxp3 and identification of canine CD4+CD25+Foxp3+ cells in canine peripheral

blood. 査読有 J Vet Med Sci. 2009 Dec;71(12):1561-1568.

- ⑦. Shimokawa Miyama T, Iwamoto E, Umeki S, Nakaichi M, Okuda M, Mizuno T. Magnetic resonance imaging and clinical findings in a miniature Schnauzer with hypodipsic hypernatremia. J Vet Med Sci. 査読有 2009 Oct;71(10):1387-1391.
- ⑧. Mizuno T, Kanbayashi S, Okawa T, Maeda S, Okuda M. Molecular cloning of canine interleukin-31 and its expression in various tissues. Vet Immunol Immunopathol. 査読有 2009 Sep 15;131(1-2):140-143.

[学会発表] (計6件)

- ①. Saori Umeki, Yasuo Ema, Masayuki Shimojoima, Hiroko Hiraoka, Masaru Okuda, Takuya Mizuno Characterization of anti-canine P-selectin ligand-1 antibody (2011 Proceedings of Veterinary Cancer Society 11/5 Embassy Suites Albuquerque Hotel&Spa, Albuquerque, New Mexico)
- ②. 酒井治、栗尾雄三、梅城沙織、酒井洋樹、久保正仁、森本将弘、林俊春、平岡博子、奥田優、水野拓也 イヌにおける癌関連遺伝子 WT-1 の発現の解析 (第152回日本獣医学会学術集会 2011年9月20日、大阪府立大学)
- ③. 梅城沙織、鈴木綾一、江馬康夫、西村順裕、奥田優、水野拓也 Pセレクトリン糖蛋白リガンド1の過剰発現による付着系細胞の浮遊現象機構の解明 (第152回日本獣医学会学術集会 2011年9月19日、大阪府立大学)
- ④. 江馬康夫、梅城沙織、奥田優、水野拓也 サイクリン依存性キナーゼ (Cdk) 阻害剤を用いたイヌのリンパ腫腫瘍細胞株の増殖抑制のメカニズムの解析 (第152回日本獣医学会学術集会 2011年9月19日、大阪府立大学)
- ⑤. 柳瀬拓磨、江馬康夫、梅城沙織、馬場健司、平岡博子、奥田優、水野拓也 cDNA マクロアレイを用いたイヌのリンパ腫に特異的に発現する遺伝子の解析 (第152回日本獣医学会学術集会 2011年9月19日、大阪府立大学)
- ⑥. 梅城沙織、鈴木綾一、江馬康夫、西村順裕、奥田優、水野拓也 Pセレクトリン糖蛋白リガンド1の過剰発現による付着系細胞の浮遊現象の解析 (第150回日本獣医学会学術集会 2010年9月16

日、帯広畜産大学)

[その他]

ホームページ等

<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~vintmed/mizuno/styled/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 拓也 (MIZUNO TAKUYA)

山口大学農学部獣医学科・教授

研究者番号: 90398826