

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23780325

研究課題名(和文) 犬の悪性リンパ腫における新規分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel molecular targeted therapy in canine malignant lymphoma

研究代表者

秋吉 秀保 (Akiyoshi, Hideo)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：50420740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：犬の悪性リンパ腫に対する新規分子標的治療薬の開発を最終目的として基礎的研究を実施した。犬における治療標的分子(CD20, CD25, Syndecan 4)の遺伝子クローニングおよびこれら標的分子の犬のリンパ腫における発現状況を評価した。また、標的分子に結合するキメラ抗体を作製するため、犬のIgG定常領域(Fc)の遺伝子クローニング、標的分子の遺伝子組換えタンパク質の作製、標的分子に結合する抗体提示ファージライブラリーの作製を行った。これらを用いて、臨床応用へむけた研究を継続中である。

研究成果の概要(英文)：Basic research was carried out in order to develop of novel molecular targeted therapies for canine malignant lymphoma as the final goal. The target molecule (CD20, CD25, and Syndecan 4) genes were cloned, and the gene expressions of these molecules in canine lymphoma tissues were evaluated. Moreover, In order to prepare the molecular targeted drugs (chimeric antibody) that bind to these molecules, canine IgG Fc genes were cloned, and recombinant proteins of the target molecules were prepared. Furthermore, the antibody display phage libraries against target molecules were prepared. Using these materials, the research is continuing for clinical applications.

研究分野：獣医外科学

キーワード：犬 リンパ腫 分子標的治療薬 キメラ抗体

1. 研究開始当初の背景

本邦では核家族化の進行に伴い伴侶動物としての犬の飼育頭数は1300万頭に上ると推計されている。現在、人と同様に犬でも死亡原因の約半数が悪性腫瘍によるものと考えられており、家族の一員としてのペットの重要性が増していることから犬の腫瘍の治療に対する社会的ニーズは高まっている。犬に発生する悪性腫瘍のなかでもリンパ腫の発生率は7~24%であるという報告があり、他の腫瘍と比較し発生率が高い。悪性リンパ腫に対する治療法は人と同様に化学療法および放射線治療が適応となる。しかしながら、過去30年以上にわたる研究成果を元に行われている現在のCHOPベースの化学療法では、生存期間中央値1年、2年生存率は25%程度であり、画期的な治療効果の改善は臨めない状況である。そのため、この状況を打破しうる新規治療法の開発が強く求められている。

一方、人医療では、悪性リンパ腫に対して、いくつかの分子標的治療薬としての抗体薬が開発された。なかでも、非ホジキン型B細胞性リンパ腫治療薬であるリツキシマブ(抗ヒトCD20キメラ抗体)は抗体薬の問題点であった人体への異種蛋白投与による副作用(抗“抗体薬”抗体産生による効果の消失、アナフィラキシーショックなど)を克服し、治療成績が大きく改善した(McLaughlin, et al. *J Clin Oncol*, 1998)。現在では健康保険も適用され、B細胞性リンパ腫の標準的な治療薬となっている。

一方、犬のB細胞性リンパ腫では、CD20が発現していることが報告されているが、発現量などについて詳細な情報は不明である。また、犬のB細胞性リンパ腫の治療に対して、リツキシマブの応用が試みられたが、人に対する抗体薬であるリツキシマブは、犬の標的分子に結合しないことが明らかとなり、その効果は認められなかった。

また、CD25はIL-2受容体に存在する3つのサブユニット(α鎖、β鎖、γ鎖)のうち、α鎖の細胞外領域(extracellular domain: ECD)を構成する蛋白である。CD25は活性化したリンパ球に発現し、IL-2のレセプターへの結合能を高めることでリンパ球の増殖や分化を促進していることが知られている。T細胞性およびB細胞性非ホジキン型リンパ腫やリンパ性白血病細胞ではCD25が高発現していることが明らかにされたため、リツキシマブと同様の効果を期待しCD25に対するヒト型抗体薬(バシリキシマブ)が開発されている。犬においてもリンパ腫細胞においてCD25の異常発現が報告されているが、発現状況について詳細な情報は不明である。また、バシリキシマブもリツキシマブと同様、犬のCD25に結合しないことが明らかとなっている。これらから、リツキシマブやバシリキシマブなどの人用の抗体薬を犬のリンパ腫治

療にそのまま応用することは困難であり、犬においてリンパ腫治療に分子標的薬を使用するためには、新たに犬の標的分子に結合する抗体薬を作製する必要がある。

人の皮膚型T細胞性リンパ腫の1種であるSézary syndromeの患者で、悪性T細胞表面にSyndecan 4(SD-4)が高発現している症例が存在し、SD-4を介して毒素を反応させることで悪性T細胞の増殖が抑えられたことなどから、SD-4はSézary syndromeをはじめとした人のT細胞性リンパ腫において新規の治療標的になり得る可能性が示唆された。犬のリンパ腫は人のSézary syndromeをはじめとした非ホジキン型リンパ腫と、臨床症状、生物学的挙動、組織学的な特徴などが類似することが知られている[10,11]ことから、犬においてもSD-4が治療標的となり得る可能性があると考えられる。また、犬でもT細胞の異常な活性化が原因となる難治性自己免疫疾患も発症するため、これらの疾患の治療標的となり得る可能性もある。

2. 研究の目的

標的分子としてCD20(B細胞性リンパ腫)およびCD25、SD-4(T細胞性リンパ腫)を選択し、これらを標的とした犬のリンパ腫に対する新規分子標的治療薬として、マウスモノクローナル抗体の可変領域(VH, VL)とイヌ免疫グロブリンの定常領域(CH, CL)を結合させた、犬に対して抗原性の少ないキメラ抗体の開発を目的として、以下の基礎的研究を実施した

犬リンパ腫における標的分子(CD20, CD25, SD-4)の遺伝子クローニング

抗体作製のための抗原に用いるCD20, CD25, SD-4の遺伝子組換えタンパクの作製

犬のリンパ腫における標的分子のmRNA発現解析

キメラ抗体を作製するための犬IgG定常領域(CHおよびCL)の遺伝子クローニング

抗イヌ標的分子モノクローナル抗体を作製することを目的とした、ファージディスプレイ法による抗体提示ファージライブラリーの作製

3. 研究の方法

犬リンパ腫における標的分子(CD20, CD25, SD-4)細胞外領域の遺伝子クローニング

健常ビーグル犬由来のリンパ球からTotal RNAを抽出し、オリゴd(T)プライマーを用いてcDNAを合成した。このcDNAを鋳型として、それぞれの標的分子の細胞外ドメインに特異的なプライマーを用いてRT-PCR法により標的分子の遺伝子を増幅させた。この増幅産物を、クローニングベクター(pGEM-T Easyベクター)に挿入すること

で、遺伝子クローニングを行った。

抗体作製のための抗原に用いる CD20, CD25, SD-4 の遺伝子組換えタンパクの作製

大腸菌による蛋白の発現・精製のために、発現ベクターである pGEX あるいは pET-16b にクローニングした標的分子の遺伝子を挿入し、GST 融合蛋白あるいは His-tag 融合タンパクとして発現させ、GST あるいは His-tag 部分の切断によって標的分子を精製した。

犬のリンパ腫における標的分子の mRNA 発現解析

採集したリンパ腫組織から total RNA を作製し、逆転写反応後、標的分子を増幅するために設計したプライマーをもちいてリアルタイム PCR 法による標的分子の発現解析を行なった。

キメラ抗体を作製するための犬 IgG 定常領域 (CH および CL) の遺伝子クローニング

にて作製した cDNA をテンプレートとして、イヌ免疫グロブリン定常領域重鎖 (CH) および軽鎖 (CL) の遺伝子配列 (GenBank accession numbers: AF354264 (CH), E02906 (CL)) をもとに設計したプライマーを用いて、PCR を行った。犬 IgG の定常領域 (CH および CL) の遺伝子クローニングを行い、遺伝子断片を M13 由来ファージベクター-pComb 3H に挿入した。

抗イヌ標的分子モノクローナル抗体を作製することを目的とした、ファージディスプレイ法による抗体提示ファージライブラリーの作製

で作製した標的分子の遺伝子組換えタンパクを抗原として、BALB/c マウスに免疫した。免疫後、脾臓を摘出し、脾細胞を分離し、定法に従って Total RNA を抽出。抽出した RNA からオリゴ d(T)プライマーを用いて cDNA を合成した。次にマウスの抗体結合部位である重鎖、軽鎖の Fab に対する特異的なプライマーを用いた PCR により抗体遺伝子断片を増幅した。これを M13 由来ファージベクター-pComb 3H に挿入し遺伝子ライブラリー (抗体ライブラリー) を構築した。構築した抗体ライブラリーは、免疫ライブラリーとも呼ばれ、抗体ライブラリー中に抗原特異的な抗体群が高頻度に濃縮されており高親和性抗体の単離が比較的容易とされている。

4. 研究成果

犬リンパ腫における標的分子 (CD20, CD25, SD-4) の遺伝子クローニング

健康犬単核球から抽出した total RNA を用いて、RT-PCR 法により CD20, CD25 および SD-4 細胞外領域を増幅した。この増幅産物をアガロースゲル電気泳動したところ、それぞれ予想される分子量付近にバンドが確認された。このバンドから抽出した DNA を、pGEM-T Easy Vector を用いてクローニングした後、塩基配列を解析した結果、CD20 では、既報 (Gen Bank accession numbers: AB210085) の犬の塩基配列と 100%一致することが確認された。CD25 においても、既報の塩基配列 (GenBank accession numbers: NM_001003211) と 100%一致していた。SD-4 は人およびマウスの配列と mRNA レベルでそれぞれ 84%, 74%, アミノ酸レベルでそれぞれ 83%, 75%一致することが確認された。

抗体作製のための抗原に用いる CD20, CD25, SD-4 の遺伝子組換えタンパクの作製

CD20 および CD25 遺伝子を発現ベクター pGEX に挿入し、大腸菌を形質転換して蛋白質を発現させ、グルタチオンセファロースカラムを用いて、精製することで、rCD20 および rCD25 を作製した。

Syndecan 4 遺伝子を発現ベクター pET-16b に挿入し、大腸菌を形質転換して蛋白質を発現させ、Ni 磁気ビーズを用いて精製することで、rSD-4 を作製した。

犬のリンパ腫における標的分子の mRNA 発現解析

イヌ CD20 細胞外領域 (ECD) に対する特異的プライマーを用いて定量的リアルタイム PCR を行った結果、B 細胞性リンパ腫組織では健康犬末梢血由来リンパ球および T 細胞性リンパ腫組織と比較して、CD20 ECD mRNA の発現は $P < 0.01$ で有意に増加していた (図 1)。

イヌ CD25 に対するプライマーを用いて定量的リアルタイム PCR を行った結果、T 細胞性リンパ腫組織、B 細胞性リンパ腫組織ともに健康犬末梢血由来リンパ球と比較して CD25 mRNA の発現が $P < 0.05$ で有意に増加していた (図 2)。さらに、T 細胞性リンパ腫疾患犬では B 細胞性リンパ腫疾患犬と比較して、CD25 mRNA の発現が高い傾向にあった。

T 細胞性リンパ腫組織と健康犬末梢血由来リンパ球におけるイヌ SD-4 の発現について定量的リアルタイム PCR を行った結果、T 細胞性リンパ腫組織では健康犬由来 PBMC と比較して、SD-4 mRNA の発現が有意 ($p < 0.01$) に増加していた [図 3]。T 細胞性リンパ腫組織における SD-4 発現量は症例によって差異が大きく、特に 2 症例では、著明な発現増加が認められた。

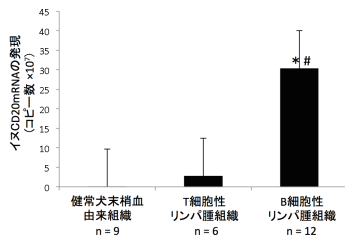


図1 リンパ腫組織のCD20 mRNA 発現

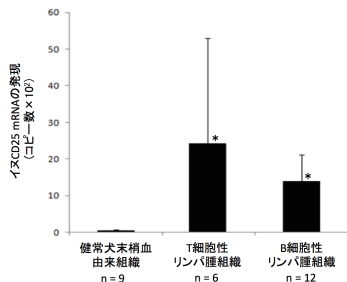


図2 リンパ腫組織のCD25 mRNA 発現

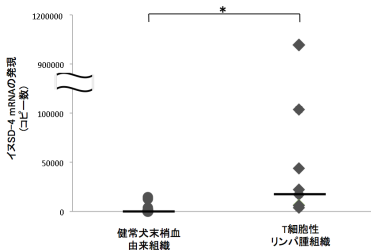


図3 リンパ腫組織のSD4 mRNA 発現

キメラ抗体を作製するための犬 IgG 定常領域 (CH および CL) の遺伝子クローニング

健康犬脾臓組織から抽出した total RNA を用い、RT-PCR 法によりイヌ免疫グロブリン定常領域の遺伝子を増幅させた。この増幅産物のアガロースゲル電気泳動を行ったところ、CH と予想される 1036bp 付近および CL と予想される 345 bp 付近にバンドが確認された。このバンドから抽出した DNA を、pGEM-T Easy ベクターに挿入し、塩基配列を解析した結果、報告されている配列と一致した (Gen Bank accession numbers: AF354264 (CH), E02906 (CL))。

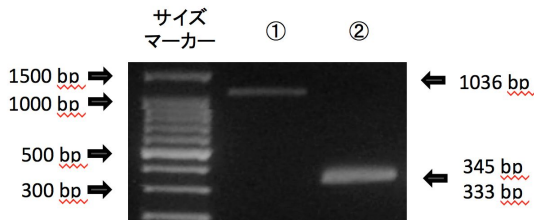


図4 イヌ IgG 定常領域のクローニング
イヌ IgG 重鎖(γ鎖)定常領域(1036 bp)
イヌ IgG 軽鎖(κ鎖)定常領域

抗イヌ標的分子モノクローナル抗体を作製することを目的とした、ファージディスプレイ法による抗体提示ファージライブラリ

一の作製

a. マウス抗犬 CD20, CD25, SD-4ECD Fab 領域の増幅

イヌ rCD20, rCD25 および rSD-4 をそれぞれ免疫したマウスより合成した cDNA を鋳型とし、マウスの Fab 領域に対するプライマーを用いて PCR を行った結果、マウス Fab 領域の大きさとはほぼ一致するバンドが、LC では 650 bp 付近に、HC では 700 bp 付近に認められた。

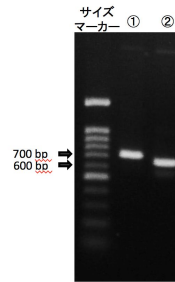


図5 rSD-4 免疫マウスからの免疫グロブリン Fab 領域

b. Fab 遺伝子ライブラリー・抗体提示ファージライブラリーの構築

a で得られた LC および HC の DNA 断片を、M13 由来ファージベクター pComb 3H の 2ヶ所のマルチクローニング領域に挿入し、700 bp および 750 bp の目的とする DNA が挿入されていることが確認できた。

c. 抗体提示ファージライブラリーの力価測定

作製した抗体提示ファージライブラリーの力価を測定した結果、プラークの形成が認められた。プラーク数をカウントした結果、 1.5×10^{10} pfu/ml 以上の分子種を提示した抗体提示ファージライブラリーを作製できた。

構築した抗イヌ標的分子 Fab 提示ファージライブラリーに対してパニングを行い、標的分子に結合するファージを選別した。

現在は、これらの材料を用いて、臨床応用に向けた研究を継続中である。

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 7 件)

1. Tamai R, Furuya M, Hatoya S, Akiyoshi H, Yamamoto R, Komori Y, Yokoi SI, Tani K, Hirano Y, Komori M, Takenaka S. Profiling of Serum Metabolites in Canine Lymphoma Using Gas Chromatography Mass Spectrometry. *J Vet Med Sci*. in Press. (査読あり)
2. Chung JS, Tamura K, Akiyoshi H,

- Cruz PD Jr, Ariizumi K. The DC-HIL/syndecan-4 pathway regulates autoimmune responses through myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.* 192:2576-2584. 2014. (査読あり)
3. Tanaka T, Shimada T, Akiyoshi H, Shimizu J, Cao Z, Li Y, Mie K, Hayashi A, Kuwamura M, Ohashi F. Relationship between major histocompatibility complex class I expression and prognosis in canine mammary gland tumors. *J Vet Med Sci.* 75:1393-1398.2013.
4. Tanaka T, Shimada T, Akiyoshi H, Cao Z, Mie K, Li Y, Hayashi A, Ohashi F. Germline polymorphism at the $\beta 2$ -microglobulin exon 1/intron 1 splice site in canine mammary gland simple and complex carcinomas. *Veterinary Record.* 172:529. 2013. (査読あり)
5. Sone k, Akiyoshi H, Shimizu J, Cao Z, Li Y, Tanaka T, Hayashi A, Sugii S, Ohashi F. Surfactant protein-A concentration in sera from dogs with pulmonary parenchymal diseases. *J Vet Med Sci.* 75:685-691. 2013. (査読あり)
6. Akiyoshi H, Sugii S, Nahid AM, Sone K, Tanaka T, Zheng C, Yijyun L, Aoki M, Takenaka S, Shimada T, Shimizu J, Kiyomiya K, Ohashi F. Detection of Chromogranin A in the Adrenal Gland Extracts of Different Animal Species by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Thomsen-Friedenreich Antigen-specific Amaranthus caudatus Lectin. *Vet Immunol Immunopathol.* 144:255-258. 2011. (査読あり)
7. Sone K*, Akiyoshi H, Aoki M, Sugii S, Ohashi F. Development and validation of a sandwich ELISA for use in measuring concentrations of canine surfactant protein A in serum of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 72 :833-837. 2011. (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

秋吉 秀保 (AKIYOSHI, Hideo)

大阪府立大学生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：50420740

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし