

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658268

研究課題名(和文) steric hindrance effect は癌転移機構の新たな概念となるか？

研究課題名(英文) Is "steric hindrance effect" the possible new concept for tumor metastasis mechanism?

研究代表者

水野 拓也 (Mizuno, Takuya)

山口大学・獣医学部・教授

研究者番号：90398826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円、(間接経費) 930,000 円

研究成果の概要(和文)：腫瘍細胞の表面にPセレクトリン糖蛋白質リガンド1 (PSGL1)が発現することで腫瘍の転移にどのような影響がでるかを検討した。犬の自然発生固形腫瘍ではその発現が観察されなかったのに対し、リンパ腫については表面に発現を確認できた。PSGL-1をノックダウンしたリンパ腫細胞株を用いた異種移植マウスでは、腫瘍の転移が非常に抑制された。犬の乳腺腫瘍細胞株にPSGL-1を強制的に発現させた場合は、肺の転移率が増加したようにみえた。以上の結果は、PSGL-1分子が腫瘍細胞の転移もしくは播種において重要な役割を持っていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The effect of PSGL-1 expression on tumor cells on tumor metastasis was examined. Canine PSGL-1 was not detected in naturally occurred canine solid tumor by immunohistochemistry, but was detected in canine lymphoma samples. Injection of canine lymphoma cell lines which has lower level of PSGL1 by knockdown technique into NOJ mice had lower rate of metastasis as compared with parental lymphoma cell lines. Canine mammary gland tumor cell lines overexpressing PSGL-1 into NOD/SCID mice appeared to have more lung metastasis. In conclusion, this study indicated that PSGL-1 has an important role in tumor metastasis or dissemination.

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：PSGL-1 犬 腫瘍

1. 研究開始当初の背景

癌の転移には、原発巣において基底膜が分解され間質に浸潤し、血管新生を誘導すると共に、癌細胞上のインテグリンなどの接着分子が細胞外マトリックス (ECM) から解離することが必要である。癌の転移におけるECMからの解離には、癌細胞が産生するマトリックスメタロプロテアーゼ

(MMP) によってECMの分解が行なわれる事が重要であることがこれまでに示されている。しかし、Pセレクトリン糖蛋白リガンド1 (PSGL-1)のような直鎖状分子が、ECMの受容体であるインテグリンとECMの結合を物理的遮蔽することにより制御しているという考え方は、これまでに全く検討されていない。

以前我々が報告したイヌPSGL-1を様々な付着系細胞株 (癌細胞を含む) に強制発現させたところ、細胞が円形化し浮遊するという現象は、浮遊したままで20日以上増殖し、さらにPSGL-1の発現低下を誘導したところ、再び接着することが確認された。一方で、PSGL-1導入細胞においては、細胞表面上のインテグリンとECMとの結合性が低下することも確認された。これは、PSGL-1がO型糖鎖の付加を数多く受ける分子であるため、細胞膜表面上で直鎖状をとり (Li F, et al., *J.Biol.Chem.* 1996)、その他の細胞膜表面上のインテグリンなどの接着分子とそれに結合するECMなどの分子の距離が物理的に障害されるために生じることが推察された。これらの知見から、腫瘍が原発巣を離れて転移する際、PSGL-1が発現増強することにより、ECMとの接着性が低下する、という現象が関与しているのではないかと考え、本研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞膜状の糖鎖抗原であるイヌPSGL-1が糖鎖付加により直鎖状になり、他の細胞膜上の蛋白質に“steric hindrance effect” (他の細胞表面分子が物理的に遮蔽される機構) を起こす事が癌の転移に関連していることを明らかにすることである。

3. 研究の方法

細胞株 内因性のPSGL-1を発現しているイヌの腫瘍細胞株としてイヌリンパ腫細胞株CL-1を、内因性のPSGL-1を発現していないイヌの腫瘍細胞株としてイヌ乳癌細胞株CHM5b (共同研究者の中川貴之より分与) を用いた。

イヌPSGL-1をノックダウンする short hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターの構築 イヌPSGL-1に対するshRNAを作成し、pSIREN-RetroQベクターに入れ、

pSIREN-shcPSGL2を得た。

マウスPSGL-1をテトラサイクリン存在下において過剰発現する発現ベクターの構築 テトラサイクリン誘導性レトロウイルスベクターであるpRetroX-TetOn Advanced(Clontech)にマウスPSGL-1 cDNAを導入し、pRetroX-T0-mPGSLを得た。

イヌPSGL-1をノックダウンしたイヌリンパ腫細胞株の樹立 pSIREN-shcPSGL2をレトロウイルス感染系を用いてリンパ腫細胞株CL-1に導入し、ピュロマイシン存在下で培養することによりCL-1/shcPSGL-1を作成した。

イヌPSGL-1を過剰発現した乳腺腫瘍細胞株の樹立 本研究室において作成したpMx-IB-lucをレトロウイルス感染系を用いてイヌ乳腺腫瘍細胞株CHM5b株に導入し、ブラストシジンS存在下で培養することによりCHM5b-lucを得た。さらにpQC-tTS-IN(Clontech)をレトロウイルス感染系を用いてCHM5b-lucに導入しneomycin存在下で培養することにより、CHM5b-luc-T0を得た。さらにマウスPSGL-1 (mPSGL-1)を組み込んだpRetroX-T0-mPGSLをレトロウイルス感染系を用いてCHM5b-luc-T0に導入しピュロマイシン存在下で培養することにより、CHM5b-luc-T0-mPSGLを得た。

乳腺腫瘍のin vivo 癌転移モデル系 癌転移の異種移植in vivoモデルとして、固形癌でありさらに転移能をもつイヌ乳癌細胞株CHMp-5bを、共同研究者である中川貴之より分与を受け、上記のような遺伝子を導入後、免疫不全マウスNOD/SCIDへ移植することにより転移モデルとした。腫瘍細胞は、 1×10^7 細胞を大腿部に皮下移植した。腫瘍の原発巣の大きさ、肺転移の程度については、IVIS Spectrumを用いて継時的に測定した。

In vivo imaging 図に示した日数の時点で、各マウスをイソフルランで麻酔し、In vivo glo luciferinを150mg/kgの濃度で腹腔内投与し、10分後にIVIS Spectrumで撮影した。

リンパ腫の異種移植モデル系 イヌリンパ腫の異種移植in vivoモデルとして、上記の遺伝子導入後のCL-1細胞を重度免疫不全NOD/scid/Jak3KO (NOJ)マウスへ移植することにより転移モデルとした。腫瘍細胞は、 1×10^7 細胞を静脈内投与することにより移植転移モデルとした。マウスの一般状態は毎日観察し、28日後に安楽殺後、腫瘍の発生などについて検討した。

犬の腫瘍組織におけるPSGL-1分子の発

現の検討 様々なイヌの腫瘍組織を IDEXX laboratories より分与され、本研究室において作成されたイヌ PSGL-1 に対する 5 種類のモノクローナル抗体 (Umeki S and Mizuno T. *et al. Vet Immunol Immunopathol* 2011) を用いて、非血液系細胞由来の犬の自然発生腫瘍において PSGL-1 の発現が認められるかを検討した。

犬 PSGL-1 が過剰発現し浮遊した細胞が生存し続ける機構の解析 PSGL-1 を HEK293 細胞に遺伝子導入 3 日後、浮遊している細胞のみを回収する。それら細胞と ECM 非存在下で 6 時間培養し浮遊した MDCK 細胞より、RNA を抽出し DNA マイクロアレイを受託解析した。DNA マイクロアレイより得られたデータはパスウェイ解析した。

4. 研究成果

犬の腫瘍組織における PSGL-1 分子の発現の検討

イヌのパラフィン包埋腫瘍組織 20 例 (肥満細胞腫、骨肉腫、甲状腺癌、アポクリン腺癌、リンパ腫) について、イヌ PSGL-1 抗体 30-2 および 64-1 を用いて PSGL-1 の腫瘍組織における発現について検討を行なった。その結果、リンパ球は陽性に染まるものの、腫瘍組織で陽性に染色されるものは存在しなかった。このことから、イヌの腫瘍において PSGL-1 が発現しているものを同定することはできなかった。

in vivo imaging 可能な転移性イヌ乳腺腫瘍細胞株の樹立および tetracycline 誘導による PSGL-1 発現増強可能な細胞株の樹立

CHM5b 細胞株に luciferase 遺伝子を導入し、安定発現細胞株を得た。さらにその細胞株に Tetracycline 誘導因子および tetracycline 存在下で発現を ON にする mPSGL1 遺伝子発現ベクターを導入し、CHM5b-luc-T0-mPSGL1 を得た。

その細胞株は luciferase の基質の存在下において強く発光することが確認できた。またその細胞株を 1×10^6 cells でまき、doxycycline 1 μ g/ml 添加 72 時間後において、mPSGL1 の発現誘導が確認された (図 1) とともに、細胞の浮遊現象が確認された (図 2)。

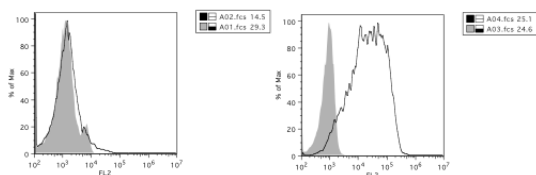


図 1 CHM5b-luc-T0-mPSGL1 における doxycycline 非添加 (左) または添加 72 時間後 (右) の mPSGL-1 の発現

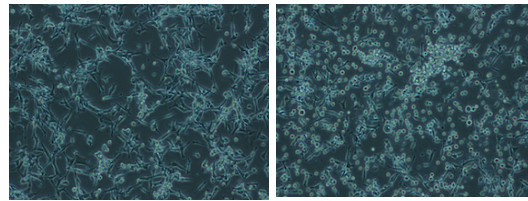


図 2 CHM5b-luc-T0-mPSGL1 における doxycycline 非添加 (左) または添加 72 時間後 (右) の細胞の浮遊化

CHM5b-luc-T0-mPSGL1 移植マウスにおける mPSGL1 発現が転移能に及ぼす影響の解析

CHM5b-luc-T0-mPSGL1 移植マウスに腫瘍移植 7 日後の原発巣および転移巣を *in vivo* imaging により確認し (図 3)、同日より doxycycline 500 μ g を連日腹腔内投与した。Doxycycline 投与開始 7 日後、14 日後にさらに imaging を実施し、原発巣と肺転移巣について腫瘍の大きさの継時的な変化を各個体において明らかにした (図 4)。その結果、doxycycline 投与した群 (マウス no. 320, 321, 323) および投与しなかった群 (マウス no. 318, 319, 322) のいずれも接種部位の腫瘍の発光強度に大きな差は認めなかった (マウス 321 のみは 15 日目の時点で死亡したが、腫瘍とは関係ないと思われる)。肺の転移巣については、doxycycline 投与しなかった群においては 3 匹中 1 匹において肺転移が確認され、doxycycline 投与群においては 2 頭中 2 頭に転移が確認された。用いたマウスの数が少ないため、PSGL-1 発現による転移への影響についての結論を出すことは難しいが、上記の差が PSGL-1 強制発現によるものである可能性が考えられた。

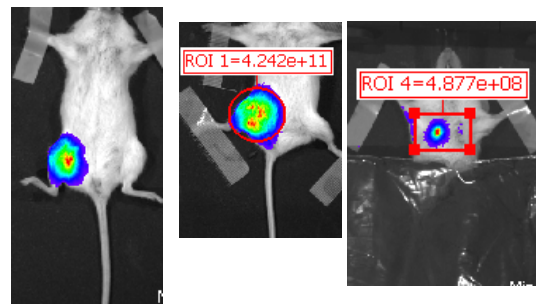
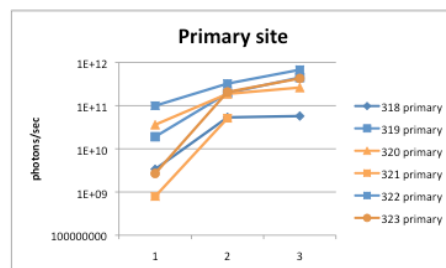


図 3 CHM5b-luc-T0-mPSGL1 移植 7 日目 (左) および 14 日目 (中央) の移植部位および肺転移 (右) の腫瘍形成の *in vivo* imaging 像



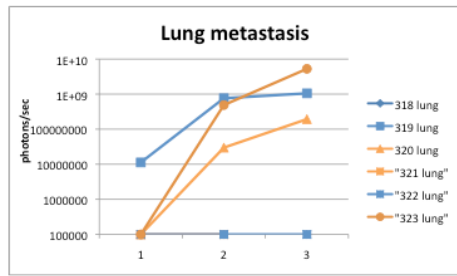


図4 CHM5b-luc-T0-mPSGL1 移植後の原発巣および肺の腫瘍の発光強度の経時的変化

内因性 PSGL-1 をノックダウンしたイヌリンパ腫細胞株 CL-1/shcPSGL-1 の作成

イヌリンパ腫細胞株 CL-1 に shcPSGL-1 を遺伝子導入し、フローサイトメトリーにより内因性 PSGL-1 がノックダウンされていることを確認した (図5)。

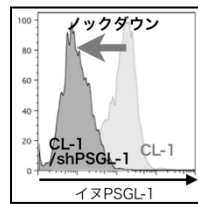


図5 CL-1 細胞に shPSGL-1 を導入することによって得られた CL-1/shPSGL-1 細胞における PSGL-1 のノックダウン

CL-1/shcPSGL1 移植マウスにおける PSGL1 ノックダウンが腫瘍増殖に及ぼす影響の解析

CL-1/shcPSGL1 移植マウスを腫瘍移植 28 日後に剖検し、腫瘍の広がりを確認した。表に示すように、親株である CL-1 および CL-1 に unrelated oligo の shRNA を導入した CL-1 細胞では肝臓および腎臓に腫瘍が認められたマウスがほとんどであったのに対し、shPSGL-1 を導入した CL-1 を移植したマウスにおいては、腫瘍形成がほとんど認められなかった。このことは、PSGL-1 がリンパ腫細胞が静脈内から腫瘍増殖の場へ居着く際に必要な分子であることを示唆している。

表 CL-1 細胞および PSGL-1 ノックダウンした CL-1 細胞を導入したマウスにおける腫瘍の形成の程度

マウス no.	投与した細胞	肝臓腫瘍	腎臓腫瘍
151	CL-1	+	-
152		+	+
153		+	+
154		+	-
155	CL-1/unrelated oligo	+	+
156		+	+
157		+	+
158		+	+
159	CL-1/shPSGL-1	-	-
160		-	-
161		-	-
162		-	+

犬 PSGL-1 が過剰発現し浮遊した細胞が生存し続ける際に関与する遺伝子の解析

PSGL-1 が過剰発現し浮遊した細胞が長期生存するメカニズムを明らかにするために、PSGL-1 が発現していない細胞と過剰発現して浮遊した細胞を用いて DNA マイクロアレイ解析を行なった。その結果、図6に示すように明らかに過剰発現または発現低下が認められた遺伝子が存在し、またパスウェイ解析の結果 (図7) から、ある特定のシグナル伝達経路が関与していることが確認された。現在その遺伝子群について検討している。

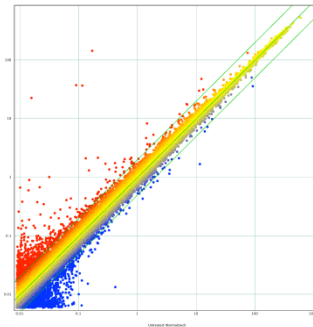


図6 マイクロアレイの結果をまとめた発現過剰及び低下する遺伝子群

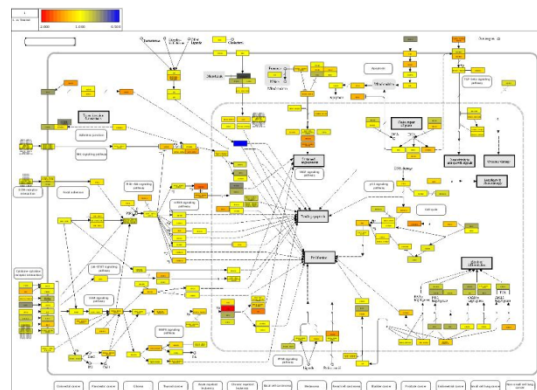


図7 マイクロアレイの結果に基づき作成されたパスウェイ解析の結果の例

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 15 件)

① Hwang CC, Mochizuki M, Maeda K, Okuda M, Mizuno T. Seroepidemiology of Reovirus in Healthy Dogs in Six Prefectures in Japan. **J Vet Med Sci.** 2014 Mar;76(3):471-5. Epub 2013 Nov 27. 査読有

② Nakashima T, Hayashi T, Tomoeda S, Yoshino M, Mizuno T. Reovirus type-2-triggered autoimmune cholangitis in extrahepatic bile ducts of weanling DBA/1J mice. **Pediatr Res.** 2014 Jan;75(1-1):29-37. 査読有

③ Hwang CC, Umeki S, Kubo M, Hayashi T, Shimoda H, Mochizuki M, Maeda K, Baba K, Hiraoka H, Coffey M, Okuda M, Mizuno T. Oncolytic reovirus in canine mast cell tumor. **PLoS ONE**. 2013 Sep 20; 8(9): e73555 査読有

④ Umeki S, Suzuki R, Ema Y, Shimojima M, Nishimura Y, Okuda M, Mizuno T. Anti-adhesive property of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) due to steric hindrance effect. **J Cell Biochem**. 2013 Jun;114(6):1271-1285. 査読有

⑤ Hara Y, Suzuki J, Noguchi K, Terada Y, Shimoda H, Mizuno T, Maeda K. Function of Feline Signaling Lymphocyte Activation Molecule as a Receptor of Canine Distemper Virus. **J Vet Med Sci**. 2013 Mar 26. 査読有

⑥ Fujiwara N, Kawasaki H, Yabe R, Christensen DJ, Vitek MP, Mizuno T, Sato K, Ohama T. A Potential Therapeutic Application of SET/I2PP2A Inhibitor OP449 for Canine T-Cell Lymphoma. **J Vet Med Sci**. 2013 Apr 1;75(3):349-54. 査読有

⑦ Shimizu K, Mizuno T, Shinga J, Asakura M, Kakimi K, Ishii Y, Masuda K, Maeda T, Sugahara H, Sato Y, Matsushita H, Nishida K, Hanada KI, Dörrie J, Schaft N, Bickham K, Koike H, Ando T, Nagai R, Fujii SI. Vaccination with antigen-transfected, NKT cell ligand-loaded, human cells elicits robust in situ immune responses by dendritic cells. **Cancer Res**. 2013 Jan 1;73(1):62-73. 査読有

⑧ Umeki S, Ema Y, Suzuki R, Kubo M, Hayashi T, Okamura Y, Yamazaki J, Tsujimoto H, Tani K, Hiraoka H, Okuda M, Mizuno T. Establishment of Five Canine Lymphoma Cell Lines and Tumor Formation in a Xenotransplantation Model. **J Vet Med Sci**. 2012 Nov 28. 査読有

⑨ Nakashima T, Hayashi T, Yamamoto Y, Mizuno T. Administration of interferon (IFN)- α exacerbates Reovirus type-2-triggered autoimmune insulinitis in DBA/1J mice. **Scand J Immunol**. 2012 Jul 17. 査読有

⑩ Terada Y, Shiozaki Y, Shimoda H, Mahmoud HY, Noguchi K, Nagao Y, Shimojima M, Iwata H, Mizuno T, Okuda M, Morimoto M, Hayashi T, Tanaka Y, Mochizuki M, Maeda K. Feline infectious peritonitis virus with a large deletion in the 5'-terminal region of the spike gene retains its virulence for cats. **J Gen Virol**. 2012 Sep;93(Pt 9):1930-4. 査読有

⑪ Nakashima T, Hayashi T, Mizuno T. Reovirus type-2 infection in newborn DBA/1J mice reduces the development of late allergic asthma. **Int J Exp Pathol**. 2012 Jun;93(3):234-42. 査読有

⑫ Baba K, Itamoto K, Amimoto A, Kitagawa K, Hiraoka H, Mizuno T, Sato H, Okuda M. Ehrlichia canis Infection in Two Dogs that Emigrated from Endemic Areas. **J Vet Med Sci**. 2012 Jun;74(6):775-8. 査読有

⑬ Okawa T, Hiraoka H, Wada Y, Baba K, Itamoto K, Mizuno T, Okuda M. Development of

High-Grade B-Cell Lymphoma Concurrent with T-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia in a Dog. **J Vet Med Sci**. 2012 May;74(5):677-80. 査読有

⑭ Hayashi T, Shimoyama N, Mizuno T. Destruction of salivary and lacrimal glands by Th1-polarized reaction in a model of secondary Sjogren's syndrome in lupus-prone female NZB x NZWF(1) mice. **Inflammation**. 2012 Apr; 35 (2): 638-646. 査読有

⑮ 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**. 2012 Feb; 92(1):80-91. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

① 日本国内の主要犬種における犬白血球抗原 I 型の遺伝子解析 中谷亮太、井上公美、川野浩志、奥田優、水野拓也 (第 156 回日本獣医学会学術集会 2013 年 9/21、岐阜大学(岐阜市))

② レオウイルスによる犬の各種腫瘍細胞株に対する細胞死の誘導 伊賀瀬雅也、Chung Chew Hwang、奥田優、水野拓也 (第 156 回日本獣医学会学術集会 2013 年 9/21、岐阜大学(岐阜市))

③ Reovirus effectively induces oncolysis in canine mast cell tumor in vivo and ex vivo Chung Chew Hwang、梅城沙織、伊賀瀬雅也、久保正仁、林俊春、奥田優、水野拓也 (第 156 回日本獣医学会学術集会 2013 年 9/21、岐阜大学(岐阜市))

④ イヌインターフェロンガンマによる犬腫瘍細胞株の増殖抑制効果の検討 濱村友紀、奥田優、水野拓也 (第 156 回日本獣医学会学術集会 2013 年 9/21、岐阜大学(岐阜市))

⑤ イヌのリンパ腫において過剰発現する遺伝子 IL-37 の解析 片山貴朗、柳瀬拓磨、藤原亜紀、辻本元、奥田優、水野拓也 (第 156 回日本獣医学会学術集会 2013 年 9/21、岐阜大学(岐阜市))

⑥ 人工アジュバントベクター細胞を用いた犬の腫瘍免疫療法の前臨床試験 水野拓也、清水佳奈子、垣見和宏、藤井眞一郎 (獣医アトピー・アレルギー・免疫学会 第 7 回シンポジウム 症例報告 2013 年 1/13、国際ファシオンセンター3F KFC ホールアネックス (東京都))

⑦ イヌのリンパ腫において過剰発現する遺伝子の解析 柳瀬拓磨、梅城沙織、酒井治、平岡博子、藤原亜紀、辻本元、奥田優、水野拓也 (第 154 回日本獣医学会学術集会 2012 年 9/15、岩手大学(盛岡市))

⑧ イヌの WT-1 に対する抗体の特異性の解析 酒井治、中谷亮太、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 (第 154 回日本獣医学会学術集会 2012 年 9/15、岩手大学(盛岡市))

⑨新しく樹立したイヌリンパ腫細胞株の in vitro および in vivo における性状解析 梅城沙織、江馬康夫、鈴木綾一、久保正仁、林俊春、岡村泰彦、山崎淳平、辻本元、谷健二、平岡博子、奥田優、水野拓也 (第 154 回日本獣医学会学術集会 2012 年 9/15、岩手大学(盛岡市))

⑩Discovering the oncolytic potential of reovirus in veterinary medicine : reovirus-induced cell death in canine lymphoma and mast cell tumor cell lines Hwang Chung Chew、梅城沙織、中川貴之、下田宙、望月雅美、前田健、平岡博子、奥田優、水野拓也 (第 154 回日本獣医学会学術集会 2012 年 9/15、岩手大学(盛岡市))

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 拓也 (MIZUNO, Takuya)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：90398826

(2) 研究分担者

中川 貴之 (NAKAGAWA, Takayuki)

東京大学・農学部・助教

研究者番号：40447363

久保 正仁 (Kubo, Masato)

山口大学・共同獣医学部・助教

研究者番号：40593439

(3) 連携研究者

()