

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780314

研究課題名(和文)ヘッジホッグ経路を標的とした猫乳癌幹細胞標的治療薬の探索とその臨床応用

研究課題名(英文)Identification and clinical application of hedgehog signal inhibitors targeting feline mammary cancer stem cells

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・講師

研究者番号：50434147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：猫の乳癌は病態進行が早く、肺転移や再発するため予後が極めて悪い。また抗がん剤や放射線療法に抵抗性を示すため、未だ治療法が確立していない。癌幹細胞は自己複製能、分化能、免疫不全マウスにおける高い腫瘍形成能、薬剤抵抗を示す細胞集団であり、癌の発症だけでなく、癌の進展、再発、転移に重要な役割を果たしている。それゆえ、新規治療法として乳癌幹細胞を標的とした治療法の開発が必要不可欠である。

本研究では、幹細胞性維持に関与するヘッジホッグシグナルに着目し、培養細胞および乳癌移植モデルマウスにおける抗癌幹細胞効果を検討した結果、Smo阻害剤GDC0449が抗腫瘍抑制効果がみられ、候補治療薬として同定された。

研究成果の概要(英文)：Mammary carcinoma is the third most common cancer in cats. More than 80% of feline mammary tumors show considerable malignancy along with rapid progression and metastasis to the lung and local lymph node at an early stage. For cats with mammary carcinoma, effective chemotherapy is less established. A small population of cells known as tumor-initiating cells, which have the capacity to self-renew, differentiate, and form tumors at high frequency, has a potential role in tumor initiation, aggression, and recurrence. Therefore, novel therapeutic strategies are needed to improve the quality of life in felines with mammary gland tumors.

The present results demonstrated that hedgehog inhibitor GDC0449 inhibits sphere formation and ALDH activity, and had antitumor effects in a xenograft model of FKNp, suggesting that anti-tumor-initiating cells therapy with GDC0449 may be useful for treatment of feline mammary carcinoma.

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：癌幹細胞 猫 乳腺腫瘍 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

猫の乳癌は、病態進行が速く、肺転移や再発するため予後が極めて悪い。また、抗がん剤や放射線療法に抵抗性を示すため、早期の外科的切除を除き、未だ治療法が確立されておらず、獣医医療において重要な研究課題の一つとなっている。それゆえ、ヒト医療と同様に乳癌幹細胞を標的とした新規治療法の開発が必要不可欠である。しかしながら、今日までの猫の乳癌研究は、免疫組織化学染色による癌マーカーおよびホルモンレセプター発現と予後との関連性を対象としたものが多く、乳癌幹細胞およびヘッジホッグシグナルに関する報告はない。

2. 研究の目的

本研究は、猫乳癌根絶に向けて乳癌幹細胞を標的とした新規治療法の開発を目的とし、ヘッジホッグシグナル経路に着目し、研究を遂行する。

3. 研究の方法

猫乳癌細胞株化細胞 (FKNp, NAC 等) を用いて *in vitro* および *in vivo* スクリーニングによりヘッジホッグ阻害剤 (GDC0449, cyclopamine, GANT61) の抗腫瘍効果を評価した。

(1) Sphere assay.

癌幹細胞の自己複製能を評価する sphere assay を用いて、猫乳癌株化細胞の sphere 形成に与える影響を評価した。阻害剤は 5 段階の濃度に分け、sphere 形成率、サイズ、形状変化などで評価した。

(2) Aldefluor assay.

阻害剤添加における乳癌株化細胞に含まれる乳癌幹細胞集団 ALDH 陽性細胞の割合を評価した。

(3) 猫乳癌モデルマウスにおける抗腫瘍効果の解析。

猫乳癌細胞株を NOG マウスの皮下に移植し、腫瘍形成モデルを作出し、阻害剤投与による抗腫瘍効果を検討した。

(4) ヘッジホッグシグナル関連分子の遺伝子変異の探索。

ヒトで報告されている GDC0449 耐性に関する遺伝子変異の有無について、正常猫の単核球 (5 例) および外科切除乳癌 (49 例) 由来ゲノムを抽出し、PCR、遺伝子配列を決定し、遺伝子変異の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) ヘッジホッグ阻害剤 GDC0449、GANT61 および cyclopamine では、用いた細胞株すべてにおいて sphere 数は濃度依存的に減少し、サイズは小さく、不整形を示した (図 1)。

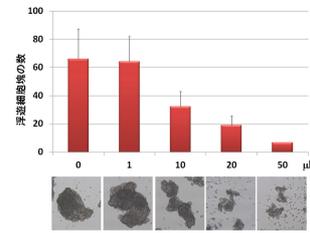


図 1. GDC0449 の抗がん幹細胞効果. FKNp 株. 濃度依存的に sphere 数の減少、サイズ縮小がみられる。

(2) GDC0449 は猫乳癌株化細胞に含有する ALDH 陽性細胞の割合が有意に減少した (図 2)。

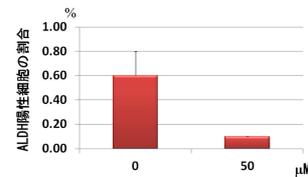


図 2. GDC0449 の抗がん幹細胞効果. FKNp 株. GDC0449 添加時に ALDH 陽性細胞の割合が減少する。

(3) FKNp 株移植モデルでは、GDC0449 単独投与群は、対象群に比べて有意に腫瘍容積の減少が認められた (図 3)。

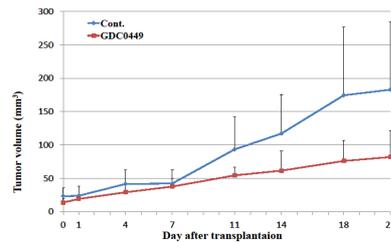


図 3. FKNp 移植モデルマウスにおける GDC0449 の抗腫瘍効果. GDC0449 投与群は対照群に比べて有意に腫瘍容積の減少がみられる。

(4) SMO 遺伝子変異は、正常猫単核球および猫乳癌組織で検出されなかった。現在、GDC0449 耐性細胞を樹立し、遺伝子変異の有無を検索している。

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 14 件)

Teshima T., Hata T., Nezu Y., Michishita M., Matsumoto H., Mizutani H., Takahashi K., Koyama H.: Amputation for histiocytic sarcoma

in a cat. Journal of Feline Medicine and Surgery 14. 147-150 (2012). 査読有.

Tajima T, Murata T, Aritake K, Urade Y, Michishita M, Matsuoka T, Narumiya S, Ozaki H, Hori M.: EP2 and EP4 receptors on muscularis resident macrophages mediate LPS-induced intestinal dysmotility via iNOS upregulation through cAMP/ERK signals. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 302. G524-G534 (2012). 査読有.

Michishita M, Akiyoshi R., Suemizu H., Nakagawa T., Sasaki N., Takemitsu H, Arai T., Takahashi K.: Aldehyde dehydrogenase activity in cancer stem cells from canine mammary carcinoma cell lines. The Veterinary Journal 193. 508-513 (2012). 査読有.

Takemitsu H., Zhao D., Yamamoto I., Harada Y., Michishita M, Arai T.: Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. BMC Veterinary Research 8. 150 (2012). 査読有.

Kishida K, Ohkusu-Tsukada K., Hori M., Konnai M., Abiko C., Suzuki Y., Yamanome Y., Yoshimura H., Michishita M, Takahashi K.: Investigation of the roles of fascioliasis and food allergy in intrahepatic eosinophilic proliferative pyelophlebitis in Japanese Black cattle. The veterinary Journal 196.160-166 (2013). 査読有.

Teshima T., Matsumoto H., Michishita M, Takahashi K., Koyama H.: Multiple inflammatory gastric polyps treated by endoscopic polypectomy with argon plasma coagulation in a dog. Journal of Small Animal Practice 54. 265-268 (2013). 査読有.

Yoshimura H, Matsuda Y, Kawamoto Y, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K, Takahashi K, Naito Z, Ishiwata T.: Acinar Cell Cystadenoma of the Pancreas in a Cat. Journal of Comparative Pathology 149 . 225-228 (2013). 査読有.

Michishita M, Uto T., Nakazawa R., Yoshimura H., Ogihara K., Naya Y., Tajima T., Azakami D., Kishikawa S., Arai T., Takahashi K.: Antitumor Effect of Bevacizumab in a Xenograft Model of Canine Hemangiopericytoma. Journal of Pharmacological Sciences 21. 339-342 (2013). 査読有.

Teshima T., Matsumoto H., Shigihara H., Sawada H., Michishita M, Takahashi K., Koyama H.: Hepatocellular carcinoma in a young dog. The Canadian Veterinary Journal 54. 845-848 (2013). 査読有.

Takemitsu H., Yamamoto I., Zhao D., Michishita M, Arai T.: Mechanism of insulin production in canine bone marrow derived mesenchymal stem cells. General and Comparative Endocrinology 189. 1-6 (2013). 査読有.

Ochiai K, Watanabe M, Azakami D., Michishita M, Yoshikawa Y., Udagawa C., Metheenukul P., Chahomchuen T., Aoki H., Kumon H., Morimitsu M., Omi T.: Molecular cloning and tumour suppressor function analysis of canine REIC/Dkk-3 in mammary gland tumours. The Veterinary Journal 197. 769-775 (2013). 査読有.

Michishita M, Otsuka A, Nakahira R, Nakagawa T., Sasaki N., Arai T., Takahashi K.: Flow cytometric analysis for detection of tumor-initiating cells in feline mammary carcinoma cell lines. Veterinary Immunology and

Immunopathology 156:73-81 (2013). 査読有.

Michishita M., Yasui J., Nakahira R., Yoshimura H., Takahashi K.: Apocrine sweat gland ductal adenoma with sebaceous differentiation in a dog. Case Reports in Veterinary Medicine ID167923 (2013) <http://dx.doi.org/10.1155/2013/167923> 査読有.

Michishita M., Ezaki S, Ogihara K, Naya Y., Azakami D., Nakagawa T., Sasaki N., Arai T., Shida T, Takahashi K.: Identification of tumor-initiating cells in a canine hepatocellular carcinoma cell line. Research in Veterinary Sciences 96. 315-322 (2014). 査読有.

〔学会発表〕(計4件)

道下正貴、江崎詩織、荻原喜久美、納谷裕子、皆上大吾、中川貴之、佐々木伸雄、新井敏郎、高橋公正。“犬の肝癌幹細胞の同定と特徴づけ”第154回日本獣医学会学術集会.2012年9月14-16日(岩手)。

小野沢栄里、皆上大吾、石岡克己、百田豊、左向敏紀、松田華奈、米野井瞳、宮部真裕、添田聡、道下正貴。“前立腺近傍に発生した犬の骨外性骨肉腫由来細胞株の性状解析”第154回日本獣医学会学術集会.2012年9月14-16日(岩手)。

道下正貴。“乳腺腫瘍幹細胞研究”予防動物医学研究会 2013年度学術集会シンポジウム.2013年6月16日(東京)。

道下正貴、大塚綾、中川貴之、佐々木伸雄、新井敏郎、高橋公正。“フローサイトメトリック技術を用いた猫乳癌幹細胞の同定”第156回日本獣医学会学術集会.2013年9月20-22日(岐阜)。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<https://ja-jp.facebook.com/nvluvvetpathol>

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・講師
研究者番号：50434147