

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292161

研究課題名(和文) 犬の難治性がんにおけるがん幹細胞の特性解析とがん幹細胞標的治療法の基盤構築

研究課題名(英文) Identification and clinical application of cancer stem cells derived from canine refractory cancers

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・准教授

研究者番号：50434147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん幹細胞は、自己複製能、多分化能、免疫不全マウスにおける高い腫瘍形成能を示す細胞集団と定義され、がん発症だけでなく、がん進展、再発、転移に重要な役割を果たすだけでなく化学療法に抵抗性を示すため、がん幹細胞を標的とした治療戦略は必要不可欠と考えられている。

本研究は、極めて病態進行が早く、効果的な治療法がない犬の難治性がんを対象とし、難治性がんのがん幹細胞の同定を行い、薬剤ライブラリーを用いてがん幹細胞の自己複製能を抑制する阻害剤を抽出し、がん幹細胞移植モデルマウスにおける抗腫瘍効果を評価した。その結果、mTOR阻害剤の抗がん幹細胞効果を明らかにし、獣医医療に有用な候補治療薬として同定された。

研究成果の概要(英文)：Cancer consists of heterogeneous cells that contain a small population of cells that possess stem cell properties; these cells, referred to as cancer stem cells (CSCs) or tumor-initiating cells, are involved in tumor progression and metastasis. The sphere assay is a useful tool for identifying TICs and evaluating their properties, including self-renewal capacity and sensitivity to chemotherapeutic drugs.

We firstly identify CSCs derived from refractory cancers, including inflammatory mammary carcinoma, rhabdomyosarcoma, melanoma, and osteosarcoma by sphere-forming assay. Next, we performed in vitro screening using sphere-forming assay for identification of CSCs-targeting drugs, and were extracted candidate drugs, such as mTOR inhibitors. Xenograft transplantation demonstrated that mTOR inhibitor, everolimus, inhibited tumor growth in canine inflammatory. These results suggest that anti-CSCs therapy with mTOR inhibitors may be useful for treatment of canine refractory cancers.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：犬 がん 癌幹細胞 自己複製能

### 1. 研究開始当初の背景

近年、正常組織幹細胞の研究が進展する中で、乳癌等の固形がんにおいても“がん”の根源となる“がん幹細胞”の存在が報告され、正常の幹細胞システムに類似した分化階層システムを構築すること(がん幹細胞理論)が提唱されている。がん幹細胞は、自己複製能、多分化能、免疫不全マウスにおける高い腫瘍形成能を示す細胞集団と定義され、がん発症だけでなく、がん進展、再発、転移に重要な役割を果たしている。さらに、がん幹細胞は、化学療法や放射線療法に抵抗性を示すため、がん根絶に向けて、がん幹細胞を標的とした治療戦略は必要不可欠と考えられている。がん幹細胞集団は、1) sphere(浮遊細胞塊) assay、2) アルデヒド脱水素酵素(ALDH)活性を用いた aldefluor assay、3) がん幹細胞表面マーカー(CD44, CD24, CD133)解析、4) 幹細胞の特性である色素排出能を利用した side population(SP)解析を用いて効率よく濃縮できる。これらのがん幹細胞の特性を理解することは、がん発症機構の解明だけでなく、バイオマーカーの探索、がん幹細胞を標的とした新たな治療法の開発につながるため、国際的にがん幹細胞研究は脚光を浴びている。

獣医学分野におけるがん幹細胞研究は、緒に就いたばかりであるが、犬の乳癌、リンパ腫に関する研究は国内外で盛んに行われている。しかし、犬の乳癌、リンパ腫など高頻度に発生する腫瘍では、がん細胞を標的とした抗がん剤および分子標的薬の感受性試験が中心であり、現在までにがん幹細胞を標的とした詳細な知見は報告されていない。犬の難治性がんは、炎症性乳癌に加え、骨肉腫、肝細胞癌、メラノーマ、血管周皮腫、組織球性肉腫など数多く存在し、いずれも早期の外科切除以外に確立した治療法がないため、獣医医療における重要な研究課題となっており、新規治療戦略が求められている。

### 2. 研究の目的

近年、薬剤・放射線に抵抗性を示す、がん幹細胞を標的とした新規治療法が世界的に注目され、その開発が進んでいる。本研究は、極めて病態進行が早く、効果的な治療法がない犬の難治性がんを対象とし、獣医医療における難治性がんの、がん幹細胞標的療法の基盤を構築することを目的とする。研究項目は、1) 難治性がんにおけるがん幹細胞の同定・特性解析、2) *in vitro* および *in vivo* スクリーニングによるがん幹細胞の幹細胞性(自己複製)を阻害する分子標的薬の同定、3) 選択した候補分子標的薬の幹細胞性維持に関連するシグナルの解析、4) がん症例に対し選択した候補分子標的薬を用いた臨床試験の実施である。これにより、難治性がんにおけるがん幹細胞

標的療法の基盤が構築され、新たな獣医医療が展開されることが期待できる。

### 3. 研究の方法

本研究は、犬の難治性がんのがん幹細胞を標的とした治療法の確立に向けて、研究期間内で以下の実験を遂行した。

1) 難治性がんにおけるがん幹細胞の同定および特性解析：臨床サンプルを用いて、これまで報告のない難治性がんにおけるがん幹細胞を sphere assay およびフローサイトメトリー解析により同定し、それらの幹細胞性(自己複製能)および腫瘍形成能を明らかにする。

2) *in vitro* スクリーニングによる分子標的薬/低分子化合物の同定：多種類の阻害剤および低分子化合物ライブラリーを用いて網羅的に、難治性がん株化細胞(炎症性乳癌、骨肉腫、横紋筋肉腫、メラノーマ)および臨床サンプルに含有するがん幹細胞の自己複製能に与える影響を評価し、候補分子標的薬/低分子化合物を抽出する。

3) *in vivo* スクリーニングによる分子標的薬/低分子化合物の同定：上記で得られた候補分子標的薬/低分子化合物について、各種がん幹細胞移植モデルにおける抗腫瘍効果を評価する。

4) シグナル伝達経路の解析：スクリーニングにより抽出した分子標的薬/低分子化合物の抗腫瘍効果に関わるシグナル経路を、分子生物学的手法を用いて解析し、抗腫瘍効果機構を明らかにする。特に、候補シグナルについては、タンパク質のリン酸化の変化や発現レベルを解析する。

### 4. 研究成果

1) Sphere assay を用いて犬の横紋筋肉腫、メラノーマ、骨肉腫および炎症性乳癌由来のがん幹細胞を同定した(図1)。

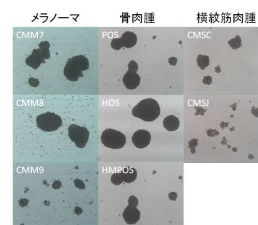


図1. 難治性がんのがん幹細胞の同定

2) *in vitro* スクリーニングによる分子標的薬/低分子化合物の同定

犬乳癌幹細胞の自己複製能を抑制する阻害剤を抽出するために、低分子阻害剤ライブラリーを用いた *in vitro* スクリーニングを

行った。その結果、低濃度で sphere 形成を阻害する化合物 22 種 (PI 3 K/Akt/mTOR 経路セリン・スレオニンキナーゼ阻害剤など) を同定した (図 2)。

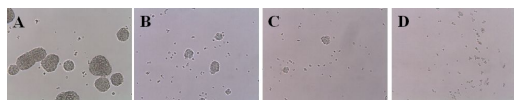


図 2. In vitro スクリーニング.  
A) 対照. B-D) mTOR 阻害剤

3) 候補阻害剤の犬炎症性乳癌幹細胞移植モデルマウスにおける抗腫瘍効果の検討  
In vitro スクリーニングで抽出された阻害剤 (mTOR 阻害剤) を注目し、犬炎症性乳癌幹細胞移植モデルマウスの抗腫瘍効果を検討した結果、阻害剤投与群は対象群と比べて抗腫瘍効果が得られた (図 3)。

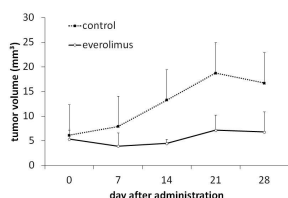


図 3. In vivo スクリーニング.

4) シグナル伝達経路の解析  
がん幹細胞とがん細胞における mTOR シグナル経路に関わり分子を対象にウェスタンブロットを行った結果、sphere でそれらの分子の活性化が明らかとなった (図 4)。またガスクロマトグラフィー-マススペクトリ解析を行い、がん幹細胞に特有なアミノ酸および脂肪酸を抽出した。

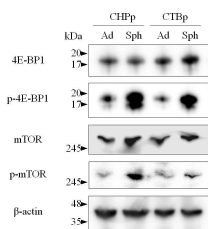


図 4. がん幹細胞における mTOR シグナル経路の活性化.

#### 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 23 件)

1. Yoshimura H, Nakahira R, Kishimoto TE, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K, Takahashi K. : Differences in indicators of malignancy between luminal epithelial cell type and myoepithelial cell type of simple solid carcinoma in the canine mammary gland. *Veterinary Pathology* 51. 1090-1095. (2014) 査読有
2. 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 Science* 96. 315-22 (2014) 査読有
3. Yoshimura H, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K, Matsuda Y, Ishiwata T, Naito Z, Takahashi K.: Cellular sources of tenascin-C in canine mammary carcinomas. *Veterinary Pathology* 52. 92-96 (2015) 査読有
4. Yoshimura H, Kimura-Tsukada N, Ono Y, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K, Matsuda Y, Ishiwata T, Takahashi K.: Characterization of Spontaneous Mammary Tumors in Domestic Djungarian Hamsters (*Phodopus sungorus*). *Veterinary Pathology*. 52. 1227-1234 (2015) 査読有
5. Saeki K, Watanabe M, Michishita M, Tsuboi M, Sugano S, Yoshitake R, Murai K, Tanaka Y, Ong SM, Saito T, Matsumoto K, Fujita N, Nishimura R, Nakagawa T.: Phenotypic screening of a library of compounds against metastatic and non-metastatic clones of a canine mammary gland tumour cell line. *Veterinary Journal* 205. 288-296 (2015) 査読有
6. Kishimoto TE, Yoshimura H, Saito N, Michishita M, Kanno N, Ohkusu-Tsukada K, Takahashi K.: Salivary Gland Epithelial-Myoepithelial Carcinoma with High-Grade Transformation in a Dog. *Journal of Comparative Pathology* 153. 111-115 (2015) 査読有
7. Kato Y, Ochiai K, Michishita M, Azakami D, Nakahira R, Morimatsu M,

- Ishiguro-Onuma T, Yoshikawa Y, Kobayashi M, Bonkobara M, Kobayashi M, Takahashi K, Watanabe M, Omi T.: Molecular cloning of canine co-chaperone small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein (SGTA) and investigation of its ability to suppress androgen receptor signalling in androgen-independent prostate cancer. *Veterinary Journal* 206. 143-148 (2015) 査読有
8. Michishita M, Ohtsuka A, Nakahira R, Tajima T, Nakagawa T, Sasaki N, Arai T, Takahashi K.: Anti-tumor effect of bevacizumab on a xenograft model of feline mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Medical Science* 78. 685-689 (2016) 査読有
  9. Ochiai K, Morimatsu M, Kato Y, Ishiguro-Onuma T, Udagawa C, Rungsuriyawiboon O, Azakami D, Michishita M, Ariyoshi Y, Ueki H, Nasu Y, Kumon H, Watanabe M, Omi T.: Tumor suppressor REIC/DKK-3 and co-chaperone SGTA: Their interaction and roles in the androgen sensitivity. *Oncotarget*. 7. 3283-3296 (2016) 査読有
  10. Arai K, Kobayashi M, Harada Y, Hara Y, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K, Takahashi K.: Histopathologic and immunohistochemical features of soft palate muscles and nerves in dogs with an elongated soft palate. *American Journal of Veterinary Research* 77. 77-83 (2016) 査読有
  11. Azakami D, Nakahira R, Kato Y, Michishita M, Kobayashi M, Onozawa E, Bonkobara M, Kobayashi M, Takahashi K, Watanabe M, Ishioka K, Sako T, Ochiai K, Omi T.: The canine prostate cancer cell line CHP-1 shows over-expression of the co-chaperone small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein. *Veterinary Comparative Oncology* 15. 557-562 (2017) 査読有
  12. Michishita M, Hori M, Nakahira R, Takahashi K.: Vaginal clear cell carcinoma in a Japanese Black cow. *Journal of Veterinary Medical Science* 78. 901-903 (2016) 査読有
  13. Azakami D, Onozawa E, Miyabe M, Ochiai K, Michishita M, Hirano T, Momota Y, Ishioka K, Sako T.: Primary T-cell high-grade lymphoma of the feline uterus. *Journal of Veterinary Medical Science* 78. 913-916 (2016) 査読有
  14. Nakahira R, Yoshida R, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K, Takahashi K.: Effect of Gonadectomy on the Androgen-Dependent Behavior of Ganglion Cell-Like Cells in Djungarian Hamsters (*Phodopus sungorus*). *Comparative Medicine* 66. 25-29 (2016) 査読有
  15. Ochiai K, Oda H, Shono S, Kato Y, Sugihara S, Nakazawa S, Azakami D, Michishita M, Onozawa E, Bonkobara M, Sako T, Shun-Ai L, Ueki H, Watanabe M, Omi T.: Properties of the feline tumour suppressor reduced expression in immortalized cells (REIC/Dkk-3). *Veterinary Comparative Oncology* 15. 1181-1186 (2017) 査読有
  16. Arai K, Takahashi K, Yasuda A, Kanno N, Kohara Y, Michishita M, Harada Y, Hara Y.: Denervation-Associated Change in the Palatinus and Levator Veli Palatini Muscles of Dogs with Elongated Soft Palate. *Journal of Comparative Pathology* 155. 199-206 (2016) 査読有
  17. Arai K, Harada Y, Tomiyama H, Michishita M, Kanno N, Yogo T, Suzuki Y, Hara Y.: Evaluation of the survival of bone marrow-derived mononuclear cells and the growth factors produced upon intramedullary transplantation in rat models of acute spinal cord injury. *Research in Veterinary Science* 107. 88-94 (2016) 査読有
  18. Kishimoto TE, Yashima S, Nakahira R, Onozawa E, Azakami D, Ujike M, Ochiai K, Ishiwata T, Takahashi K, Michishita M.: Identification of tumor-initiating cells derived from two canine rhabdomyosarcoma cell lines. *Journal of Veterinary Medical Science* 79. 1155-1162 (2017) 査読有
  19. Machida Y, Michishita M, Wada M, Hori

- T, Kawakami E, Yoshimura H, Ohkusu-Tsukada K, Taya K, Takahashi K.: Malignant Oestrogen-producing Teratoma in a Cat. *Journal of Comparative Pathology* 156. 178-182 (2017) 査読有
20. Nakahira R, Michishita M, Kato M, Okuno Y, Hatakeyama H, Yoshimura H, Azakami D, Ochiai K, Bonkobara M, Takahashi K. Oncocytic carcinoma of the salivary gland in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 29. 105-108 (2017)査読有
21. Kobayashi M, Saito A, Tanaka Y, Michishita M, Kobayashi M, Irimajiri M, Kaneda T, Ochiai K, Bonkobara M, Takahashi K, Hori T, Kawakami E.: MicroRNA expression profiling in canine prostate cancer. *Journal of Veterinary Medical Science* 79. 719-725 (2017)査読有
22. Kato Y, Ochiai K, Kawakami S, Nakao N, Azakami D, Bonkobara M, Michishita M, Morimatsu M, Watanabe M, Omi T.: Canine REIC/Dkk-3 interacts with SGTA and restores androgen receptor signalling in androgen-independent prostate cancer cell lines. *BMC Veterinary Research* 13. 170. (2017) 査読有
23. Michishita M, Katori Y, Sasaki H, Obara RD, Furumoto R, Kato M, Nakahira R, Yoshimura H, Soeta S, Ishiwata T, Takahashi K.: Cutaneous Angiolymphoid Hyperplasia in a Dog. *Journal of Comparative Pathology* 157. 57-60 (2017) 査読有
- [学会発表](計 13 件)
1. 道下正貴. “犬、猫の乳癌の診断・予後予測におけるがん幹細胞マーカーの有用性” 日本獣医臨床病理学会 2014 年大会・予防動物医学研究会 & 日本臨床病理学会合同シンポジウム. 2014 年 5 月 31 日(東京)
2. 岸本拓也、八嶋翔子、中平嶺、小野沢栄里、皆上大吾、高橋公正、道下正貴. “イヌ横紋筋肉腫株化細胞由来 sphere の特性解析” 第 157 回日本獣医学会学術集会. 2014 年 9 月 9 日(北海道)
3. 中平嶺、道下正貴、塚田晃三、高橋公正. “ジャンガリアンハムスター(*Phodopus sungorus*) の腎癌における病理組織学的検索” 第 157 回日本獣医学会学術集会. 2014 年 9 月 9 日(北海道)
4. 塚田晃三、山下匡、塚田晃代、中平嶺、道下正貴、高橋公正. “NC/Nga 系におけるユニークな H-2 ハプロタイプのアロ反応と OT-II T 細胞受容体の I-A<sup>k</sup> 拘束性 OVA<sub>323-339</sub> クロス反応” 第 157 回日本獣医学会学術集会. 2014 年 9 月 9 日(北海道)
5. 道下正貴. “ネコ乳がんにおける分子標的治療薬の探索” 第 11 回日本獣医内科学アカデミー学術大会(JCVIM2015)2015 年 2 月 21 日(横浜)
6. 道下正貴. “猫乳癌における分子標的薬の探索” 第 3 回日本医科大学・日本獣医生命科学大学病理学合同カンファレンス 2014 年 3 月 14 日(東京)
7. 落合和彦、加藤由比子、中平嶺、道下正貴、皆上大吾、高橋公正、近江俊徳. “イヌ SGTA ホモログのクローニングと前立腺がん細胞のアンドロゲンシグナル伝達機構に与える影響の検討” 2015 年 5 月 30-31 日(東京)
8. 道下正貴. “獣医療から：小動物におけるがん幹細胞の特性解析” 日本獣医臨床病理学会 2015 年大会 2015 年 5 月 30-31 日(東京)
9. 高木勝子、安田暁子、嶋原果映、鈴木周二、神野信夫、余戸拓也、原田恭治、道下正貴、高橋公正、長谷川大輔、原 康. “外科的切除により好転した脳実質内血腫に罹患した犬の 1 症例” 第 90 回日本獣医麻酔外科学会 2015 年 6 月 19-21 日(埼玉)
10. 前田英里香、澤田治美、安田暁子、嶋原果映、鈴木周二、神野信夫、余戸拓也、原田恭治、道下正貴、高橋公正、長谷川大輔、原 康. “減容積手術および放射線治療を併用した膠芽腫罹患犬の 1 症例” 第 90 回日本獣医麻酔外科学会 2015 年 6 月 19-21 日(埼玉)
11. 加藤由比子、落合和彦、中平嶺、道下正貴、皆上大吾、高橋公正、近江俊徳. “前立腺がん関連遺伝子 SGTA イヌホモログの構造および機能解析” 第 158 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月 7-9 日(青森)
12. 吉村久志、吉田彩花、山本昌美、松田陽子、石渡俊行、道下正貴、塚田晃三、高橋公正、神谷新司. “イヌの乳腺腫瘍における nestin の発現と悪性度との相関”

第 3 回日本獣医病理学専門家協会  
(JCVP) 学術集会  
期日：2016 年 3 月 29-30 日 (東京)

13. Ikki Mitsui, Masaki Michishita, Eri  
Fukuzawa, Tetsuya Kobayashi.  
“Unclassified malignant round cell  
tumor in a juvenile dog: A canine  
counterpart of small round cell tumor  
of childhood?” 2016 ACVO and  
ASVCP Concurrent Annual Meeting.  
2016.12.3-7 (USA)

〔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://www.facebook.com/nvlvetpathol>

## 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・准教授  
研究者番号：50434147

### (2) 研究分担者

石渡 俊行 (ISHIWATA TOSHIYUKI)  
地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ  
ンター(東京都健康長寿医療センター研究  
所)  
研究者番号：90203041

盆子原 誠 (BONKOBARA MAKOTO)  
日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授  
研究者番号：50343611

落合 和彦 (OCHIAI KAZUHIKO)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授  
研究者番号：30550488

### (3) 連携研究者

中川 貴之 (NAKAGAWATAKAYUKI)  
東京大学・農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号：40447363

皆上 大吾 (AZAKAMI DAIGO)  
日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授  
研究者番号：80453934

市川 仁 (ICHIKAWA HITOSHI)  
独立行政法人国立がん研究センター・早期  
探索臨床研究センター・ユニット長  
研究者番号：30201924

吉村 久志 (YOSHIMURA HISASHI)  
日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師  
研究者番号：70645241

### (4) 研究協力者

中平 嶺 (NAKAHIRA REI)  
日本獣医生命科学大学・獣医学部・大学院  
生