

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14870

研究課題名(和文) 多重免疫・多重スクリーニング法を用いた犬T細胞型リンパ腫の抗体医薬標的分子の同定

研究課題名(英文) Identification of targeted antigen for the treatment of canine T cell lymphoma by using multiple immunization.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：犬T細胞型リンパ腫に対する抗体医薬の開発を目的に、犬リンパ腫腫瘍細胞株に特異的なモノクローナル抗体を作製した。得られたクローンのうち3個について、犬リンパ腫細胞株、犬リンパ腫症例由来腫瘍細胞、健康犬末梢血リンパ球に対する反応性を検討した。犬リンパ腫腫瘍細胞株については、一部に対して陽性を示し、健康犬末梢血リンパ球に対しては陰性を示すクローンが得られたが、症例由来腫瘍細胞のフローサイトメトリーによる解析では、症例数が少ないため最終結論は出せないが、陽性を示すものはほとんどなかった。またえらえた抗体は、パラフィン包埋組織ブロックを用いた免疫染色に用いることができないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To establish the antibody-based therapy for canine lymphoma, the monoclonal antibodies against canine lymphoma cell lines were obtained. Among the established clones, 3 clones were deeply investigated to confirm the reactivity to canine lymphoma cell lines, tumor cells from dogs with lymphoma, and PBMC from healthy beagles. Three antibodies reacted to some of canine lymphoma cell lines, but only one antibody reacted weakly to tumor cells from lymphoma dogs, but none of antibodies reacted to PBMC from healthy beagles. Furthermore, these antibodies could not be used to stain the paraffin-embedded lymphoma tissues.

研究分野：獣医腫瘍学

キーワード：犬 腫瘍 抗体

1. 研究開始当初の背景

犬の悪性リンパ腫は、犬の血液系腫瘍の中で最も発生率が高い。抗癌剤を用いた治療法が中心となるが、人のリンパ腫に対しては近年低分子化合物や抗体医薬を付加的に用いることにより、大幅な予後の改善が認められるようになった。一方、犬のT細胞型リンパ腫は予後が悪く、抗がん剤の効果も弱いため、新規治療法の必要性が高い。犬のリンパ腫に対する抗体医薬も最近海外において市販されるようになったが、著しい予後の改善は認められていないため、実質的に犬のT細胞型リンパ腫に対する臨床上的効果を望める抗体医薬は存在しない。

2. 研究の目的

犬のT細胞型リンパ腫の治療に用いることが可能な抗体を作製し、臨床上用いることができることを証明する。

3. 研究の方法

ラットの免疫:我々が以前に樹立した3種類のT細胞型リンパ腫細胞株 Ema, CLC, CLK (Umeki S. *et al.*, J Vet Med Sci. 2013) をそれぞれ 1×10^7 細胞ずつ、1回の免疫あたり1細胞株ずつ、アジュバント Titer Max Gold と混和しSDラットのフットパッドに免疫する。免疫スケジュールは、2週間に1回、3種類の細胞株を順番に免疫する。最終の細胞株の免疫3日後に、膝下リンパ節を回収し、Umekiらの報告 (Umeki S. *et al.*, Vet Immunol. Immunopathol. 2012) に従いハイブリドーマを作成する。

抗体産生ハイブリドーマライブラリーのスクリーニング:ハイブリドーマの培養上清を随時回収し、後述するフローサイトメトリーによって必要に応じて反応性を確認した。

得られた抗体の精製:ハイブリドーマをHybridoma-SFMを用いて無血清化し、その培養上清を随時回収し、常法にもとづいてprotein A カラムにより抗体を精製した。

抗体のサブクラスの決定:精製したmAbは、抗ラットIgG1抗体、抗ラットIgG2a抗体、抗ラットIgG2b抗体、抗ラットkappa抗体、抗ラットlambda抗体を一次抗体として用いたフローサイトメトリーにより、サブクラスを決定した。

フローサイトメトリー:モノクローナル抗体の反応性を確認するために、健常犬から末梢血単核球を常法に基づき、分離し用いた。またリンパ腫罹患犬の腫瘍組織より採取した腫瘍細胞については、PBSで洗浄後もしくは

血球の混入が激しい場合はACKバッファーにより洗浄後、用いた。フローサイトメトリーに用いた抗体は、それぞれ示すとおりであるが、二次抗体としては、抗ラットIgG-PE抗体、抗ラットIgG-Alexa647抗体、Streptavidin-PEを用いた。

免疫組織化学染色:健常ビーグル及びリンパ腫の症例由来組織を用いた。免疫組織化学染色は、Okawaらの報告 (Okawa *et al.*, Res Vet Sci. 2010) に従い、1次抗体として精製済mAbを用いて実施した。

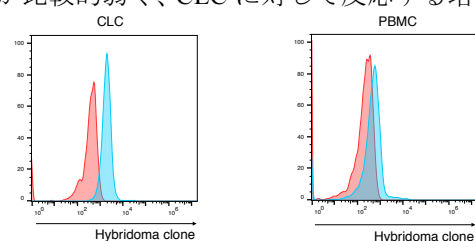
細胞増殖アッセイ:mAbの細胞増殖への影響を調べるために、リンパ腫細胞株を 1.25×10^4 cells/well で準備し、それぞれmAbを10µg/mlから段階希釈して添加した。48時間の培養後、cell counting kit-8 試薬を添加し、450nmのOD値を測定することで、細胞増殖率について検討した。

補体依存性細胞傷害活性:得られたmAbの補体依存性細胞傷害活性(CDC)について検討するために、リンパ腫細胞株を 1×10^5 cells/well で準備し、それぞれmAbを40µg/mlから段階希釈して添加し、20分のインキュベート後、ウサギ補体を添加し、さらに90分の培養後、トリパンブルー法によって死細胞の数をカウントした。

4. 研究成果

ハイブリドーマライブラリーの作製およびモノクローナル化

ハイブリドーマは、96wellプレート4枚にまき、それら各wellから回収した上清についてスクリーニングを行なった。スクリーニングは、健常犬末梢血より分離したPBMCおよび免疫に用いた犬リンパ腫細胞株の一つであるCLCに対する反応性をフローサイトメトリーにより評価することで行った。すなわち、健常犬PBMCに対して反応せず、CLCに対して反応する抗体を産生するハイブリドーマを含むwellを探すこととした。しかしながら、各wellには、もともと複数(10個程度)のハイブリドーマが含まれており、回収した上清には複数の種類の抗体が含まれていたためか、PBMCに全く反応せず、CLCにのみ反応するというwellを探すことは困難であった。従って、ここではPBMCに対する反応性が比較的弱く、CLCに対して反応する培養



上清を含む well を 40 個程度選択した。

次にこれらのうち A7, A10 について、ハイブリドーマを常法に基づいてモノクローナル化することとした。それぞれの親 well より得られたモノクローナル化された well から回収した抗体について、さらに健常犬由来 PBMC, CLC を用いてスクリーニングし、健常犬由来 PBMC には反応せず、CLC に対して反応するモノクローナル抗体 A7-4-15, A7-24-11, A10-4-2, A10-5-2, A10-13-2, A10-13-4 を得た。

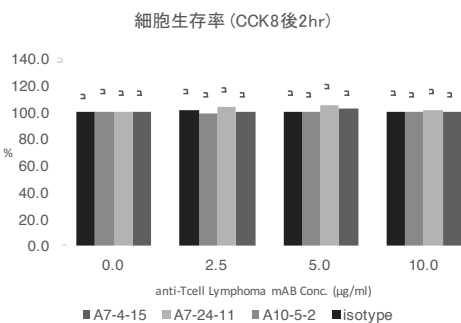
リンパ腫腫瘍細胞株に対する特異性の解析

得られた mAb のうち、A7-4-15, A7-24-11, A10-5-2 について、犬リンパ腫腫瘍細胞株 8 種類に対する反応性をフローサイトメトリーによって検討したところ、表 1 に示すとおり一部の犬リンパ腫腫瘍細胞株に対して反応するが、末梢血単核球のうち CD3 陽性 T 細胞にはすべての抗体が反応しないことが明らかとなった。

	A7-4-15	A7-24-11	A10-5-2
CLC	+	+	+
Ema	-	-	-
CLK	-	-	-
UL-1	-	-	-
Nody-1	+	+	+
CLGL90	-	-	-
CLBL-1	-	-	-
GL-1	-	-	-
T cells (DogA)	-	-	-
T cells (DogB)	-	-	-
T cells (DogC)	-	-	-
T cells (DogD)	-	-	-

リンパ腫腫瘍細胞株に対する細胞傷害性の検討

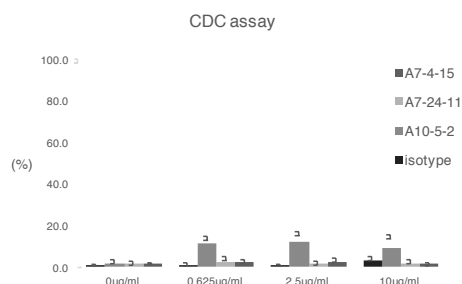
得られた mAb について、それらが治療用抗体としての機能をもつか、すなわち直接的細胞傷害活性をもつかについて *in vitro* において検討した。すなわち CLC 細胞を target 細胞とし、段階希釈した mAb を添加後、CCK-8 によって細胞増殖を検討したところ、3 種類の mAb のどれもが直接的細胞傷害活性はもたないことが明らかとなった。



リンパ腫腫瘍細胞株に対する CDC 活性の検

討

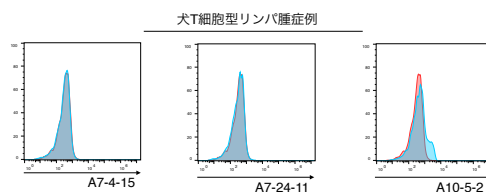
次に治療用抗体としてさらに CDC 活性をもつかについて *in vitro* において検討した。すなわち CLC 細胞を target 細胞とし、段階希釈した mAb およびウサギ補体を添加後、トリパンプルー法によって細胞死を検討したところ、A10-5-2 については弱い CDC 活性を認めたが、A7-4-15, A7-24-11 については、CDC 活性を全くもたないことが明らかとなった。



リンパ腫症例由来腫瘍細胞に対する特異性の解析

得られた mAb が細胞株だけではなく、実際のリンパ腫腫瘍症例由来腫瘍細胞に対して反応するかどうかについて、フローサイトメトリーおよび免疫染色によって検討した。

フローサイトメトリーについては、症例から得られた生のサンプルを使用する必要があるため、多くの症例について検討できず、全 5 例 (T 細胞型リンパ腫 2 例、B 細胞型リンパ腫 3 例) について検討を行った。その結果、A10-5-2 のみしか検討できていないが、T 細胞型リンパ腫の 1 例でその一部に反応する症例が認められたが、残念ながらそのほかの抗体で反応するものは認められなかった。

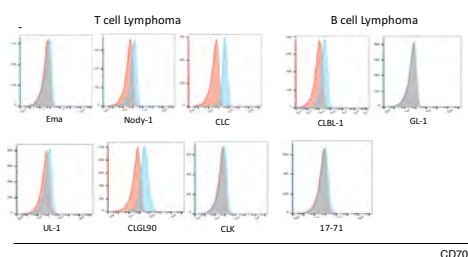


一方、免疫組織化学染色は、過去のパラフィン包埋ブロックを用いて実施可能であるため、こうした場合に非常に有用な方法である。そのため得られた mAb がリンパ腫症例のパラフィン包埋ブロック由来組織切片に用いることができるかどうかについて、様々な条件を検討したが、残念ながら反応する条件をみつけることができなかった。従って、得られた抗体は、パラフィン包埋ブロック由来組織に対する免疫組織化学染色には用いることができないことが判明した。現在凍結組織に対して使用できないかについて検討中である。

抗 CD70 抗体のリンパ腫特異性の解析

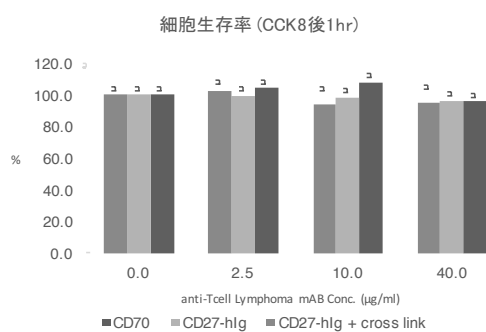
ここまで示したように本来のスクリーニングで得られた mAb がリンパ腫治療に使用できない可能性も考え、別途マイクロアレイを用いた研究から当研究室で同定し、その後抗体を作製した CD70 についても同様に、犬 T 細胞型リンパ腫に特異的に発現するか、またその機能について解析を行った。

まず抗犬 CD70 mAb (4F2-12) を作製し、その犬リンパ腫腫瘍細胞株に対する特異性を検討するために、9 種類の犬リンパ腫腫瘍細胞株に対するフローサイトメトリーによる解析を行った。その結果下に示すように、一部のリンパ腫腫瘍細胞株に対して陽性を示した。



抗 CD70 抗体のリンパ腫腫瘍細胞株に対する細胞傷害性の検討

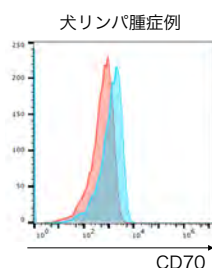
得られた mAb について、直接の細胞傷害活性をもつかについて *in vitro* において検討した。すなわち CD70 を過剰発現させたイヌリンパ腫腫瘍細胞株 GL-1/CD70 細胞を target 細胞とし、段階希釈した mAb を添加後、CCK-8 によって細胞増殖を検討したところ、抗犬 CD70 mAb が直接の細胞傷害活性はもたないことが明らかとなった。



リンパ腫症例由来腫瘍細胞に対する特異性の解析

得られた抗犬 CD70 mAb が細胞株だけではなく、実際のリンパ腫腫瘍症例由来腫瘍細胞に対して反応するかどうかについて、フローサイトメトリーおよび免疫染色によって検討した。

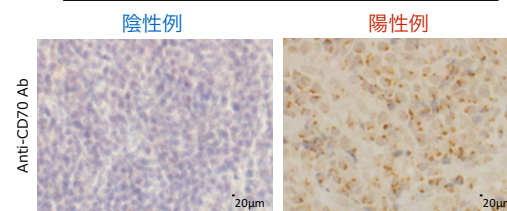
フローサイトメトリーについては、症例から得られた生のサンプルを使用するため、多くの症例につい



て検討できず、全 21 例 (T 細胞型リンパ腫 10 例、B 細胞型リンパ腫 10 例、細胞型不明 1 例) について検討を行った。その結果、5 例について陽性を示した (下図は代表例)。

一方、免疫組織化学染色については、本抗体自体がいかなる条件でもパラフィン包埋ブロック由来組織切片には反応しないことが明らかとなった。従って、市販のパラフィン包埋ブロック由来組織に使用可能な抗ヒト CD70 抗体を購入し、犬 CD70 に対する反応性についてウエスタンブロッティングで検討を行い、反応性及び特異性について確認した。その後、犬リンパ腫症例のパラフィン包埋ブロック由来組織切片に対して本抗体を用いて反応性を検討したところ、全 29 例 (T 細胞型リンパ腫 9 例、B 細胞型リンパ腫 6 例、細胞型不明 14 例) のうち 14 例において陽性反応が認められ、犬のリンパ腫の一部の症例において、CD70 が特異的に発現することがわかったため、当研究室で得た mAb を治療薬として用いることができる可能性を示唆した。

犬リンパ腫症例



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 13 件)

- ① Noguchi S, Shibutani S, Fukushima K, Mori T, Igase M, Mizuno T. Bosutinib, an SRC inhibitor, induces caspase-independent cell death associated with permeabilization of lysosomal membranes in melanoma cells. *Vet Comp Oncol*. 2017 Mar 28. doi: 10.1111/vco.12312. [Epub ahead of print] 査読あり
- ② Roode SC, Rotroff D, Richards KL, Moore P, Motsinger-Reif A, Okamura Y, Mizuno T, Tsujimoto H, Suter SE, Breen M. (2016) Comprehensive genomic characterization of five canine lymphoid tumor cell lines. *BMC Vet Res*. 17: 207. 査読あり
- ③ Ema Y, Igase M, Takeda Y, Yanase T, Umeki S, Hiraoka H, Okuda M, Mizuno T. (2016) Investigation of the cytotoxic effect of flavopiridol in canine lymphoma cell lines. *Vet Comp Oncol*. Suppl 1: 95-106. 査読あり
- ④ Hwang CC, Umeki S, Igase M, Coffey M, Noguchi S, Okuda M, Mizuno T. (2016) The

effects of oncolytic reovirus in canine lymphoma cell lines. *Vet Comp Oncol*. Suppl 1: 61-73. 査読あり

⑤Shosu K, Sakurai M, Inoue K, Nakagawa T, Sakai H, Morimoto M, Okuda M, Noguchi S, Mizuno T. (2016) Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Canine Cancer. *In Vivo*. 30: 195-204. 査読あり

⑥Igase M, Hwang CC, Kambayashi S, Kubo M, Coffey M, Miyama TS, Baba K, Okuda M, Noguchi S, Mizuno T. (2016) Oncolytic reovirus synergizes with chemotherapeutic agents to promote cell death in canine mammary gland tumor. *Can J Vet Res*. 80 :21- 31. 査読あり

⑦Noguchi S, Mori T, Igase M, Mizuno T. (2015) A novel apoptosis-inducing mechanism of 5-aza-2'-deoxycytidine in melanoma cells: Demethylation of TNF- α and activation of FOXO1. *Cancer Lett*. 369: 344-353. 査読あり

⑧Enjoji S, Yabe R, Fujiwara N, Tsuji S, Vitek MP, Mizuno T, Nakagawa T, Usui T, Ohama T, Sato K. (2015) The therapeutic effects of SET/I2PP2A inhibitors on canine melanoma. *J Vet Med Sci*. 77: 1451-1456. 査読あり

⑨Kambayashi S, Igase M, Kobayashi K, Kimura A, Shimokawa Miyama T, Baba K, Noguchi S, Mizuno T, Okuda M. (2015) Hypoxia inducible factor 1 α expression and effects of its inhibitors in canine lymphoma. *J Vet Med Sci*. 77: 1405-1412. 査読あり

⑩Noguchi S, Mori T, Nakagawa T, Itamoto K, Haraguchi T, Mizuno T. (2015) DNA methylation contributes toward silencing of antioncogenic microRNA-203 in human and canine melanoma cells. *Melanoma Res*. 25: 390-398. 査読あり

⑪Kambayashi S, Minami K, Ogawa Y, Hamaji T, Hwang CC, Igase M, Hiraoka H, Miyama TS, Noguchi S, Baba K, Mizuno T, Okuda M. (2015) Expression of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase causes lomustine resistance in canine lymphoma cells. *Can J Vet Res*. 79: 201-209. 査読あり

⑫Igase M, Hwang CC, Coffey M, Okuda M, Noguchi S, Mizuno T. (2015) The oncolytic effects of reovirus in canine solid tumor cell lines. *J Vet Med Sci*. 77: 541-548. 査読あり

⑬Noguchi S, Kumazaki M, Mori T, Baba K, Okuda M, Mizuno T, Akao Y. Analysis of microRNA-203 function in CREB/MITF/RAB27a pathway: Comparison between canine and human melanoma cells. *Vet Comp Oncol*. 2014 Oct 3. doi: 10.1111/vco.12118. [Epub ahead of print] 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

①Hwang CC, Coffery M, Noguchi S, Mizuno T. Reovirus degrades c-kit and dysregulates the ras signaling pathway to induce apoptotic cell death in canine mast cell tumor (MCT) (Veterinary Cancer Society Annual Meeting 2016年10月21日、(Orlando, USA))

②Igase M, Hwang CC, Sakurai M, Shimokawa T, Haraguchi T, Tani K, Itamoto K, Nakaichi M, Noguchi S, Mizuno T. Safety and proof-of-concept evaluation of reovirus as oncolytic virotherapy in dogs with spontaneously occurring tumors (Veterinary Cancer Society Annual Meeting 2016年10月21日、(Orlando, USA))

③伊賀瀬雅也、Chung C. Hwang, 野口俊助、水野拓也 犬の腫瘍症例に対するレオウイルスを用いた腫瘍溶解性ウイルス療法のフェーズI試験 (第75回日本癌学会学術総会 2016年10月7日、パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市))

④正司麗葉、伊賀瀬雅也、盆子原誠、野口俊助、水野拓也 レオウイルスによる犬の悪性組織球肉腫細胞株に対する細胞死の誘導 (第159回日本獣医学会学術集会 2016年9月6日、第159回日本獣医学会学術集会、日本大学 (神奈川県、藤沢市))

⑤伊賀瀬雅也、野口俊介、水野拓也 犬悪性黒色腫に対して腫瘍溶解性ウイルス療法の抗腫瘍効果を増強するシグナル阻害剤の探索 (第159回日本獣医学会学術集会 2016年9月6日、第159回日本獣医学会学術集会、日本大学 (神奈川県、藤沢市))

⑥長谷川友紀、井上公美、櫻井優、酒井洋樹、藤原亜紀、辻本元、下川孝子、馬場健司、奥田優、野口俊助、水野拓也 イヌのリンパ腫に過剰発現する新規治療分子としてのCD70の解析 (第12回日本獣医内科学アカデミー学術集会 2016年2月20日、パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市))

⑦Hwang CC, Igase M, Mizuno T. Oncolytic reovirus in canine mast cell tumor and lymphoma. Asian Meeting of Animal Medicine Specialist 2015 (Kuala Lumpur, Malaysia) 2015.11.1

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗イヌ CD70 モノクローナル抗体

発明者: 水野拓也、長谷川友紀

権利者: 日本全薬工業株式会社

種類:

番号: 出願番号 2016-022105

出願年月日: 平成 28 年 2 月 8 日

国内外の別: 国内

○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

辻本 元 (TSUJIMOTO, Hajime)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：60163804

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし