

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08108

研究課題名(和文) イヌのHSP70に結合する新規腫瘍抗原の同定と腫瘍免疫療法への応用

研究課題名(英文) Identification of novel tumor antigens binding to canine HSP70, and their application to tumor immunotherapy

研究代表者

古家 優 (Furuya, Masaru)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：30500706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸菌を用いて組換えイヌHSP70タンパク質を作製し、イヌ乳腺腫瘍細胞株のライゼートを用いてプルダウンアッセイを実施した。SDS-PAGEで出現したシグナルからタンパク質を抽出し、アミノ酸シーケンスを行ったところ、複数のタンパク質を同定することができた。その中から細胞分裂に関連するcyclinB1に着目し、大腸菌を用いて組換えタンパク質を作製した後にイヌHSP70タンパク質との結合性を検討したが、ゲル内免疫沈降法では結合性を確認することができなかった。今後、動物細胞を用いた組換えタンパク質を用いるなど、更なる検討が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小動物獣医療における腫瘍抗原の研究報告は極めて少なく、腫瘍抗原を用いた診断法や免疫療法は未だ開発されていない。本研究で見出されたイヌHSP70と結合するタンパク質の複合体は、樹状細胞に結合することが予測され、更に強力な腫瘍免疫反応を誘導する可能性がある。今後、in vitroおよびin vivoでの実験により検討を続ける必要がある。近年、動物とヒトの比較腫瘍学が注目されており、自然発症し、生物学的挙動がヒトのものと類似しているイヌの乳腺腫瘍は恰好の臨床モデルである。得られた知見を人医療へ還元できれば更に大きな成果となることが予想される。

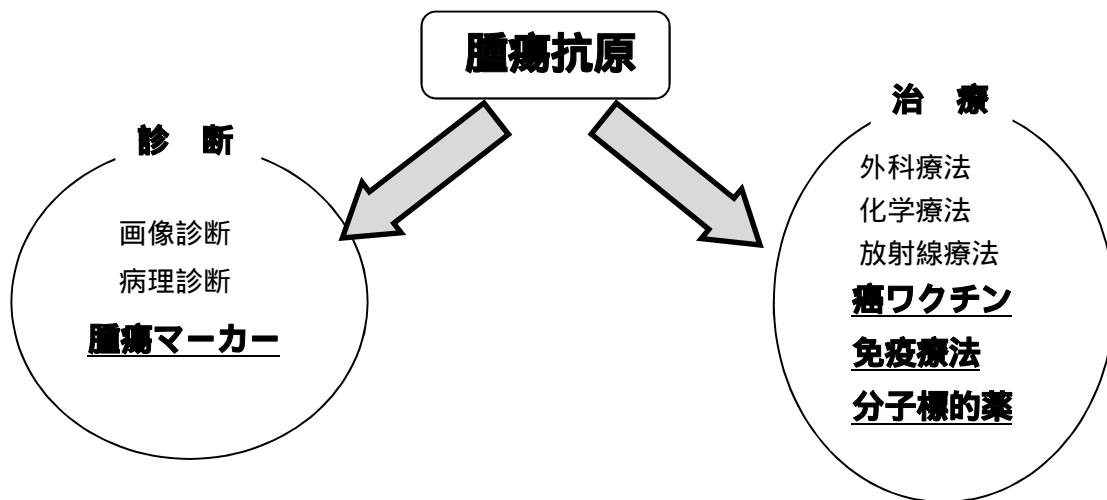
研究成果の概要(英文)：In this study, recombinant canine HSP70 protein was produced by E. coli and pull-down assay was performed using lysate from a canine mammary tumor cell line. By SDS-PAGE analysis, proteins which were able to bind with HSP70 were separated and extracted from the gel. Some proteins were identified by amino acid sequencing. Among the candidate proteins, we focused on cyclinB1 which is related to cell division. The binding property to canine HSP70 protein was examined after producing a recombinant cyclinB1 protein using E coli system, but its property could not be confirmed by the gel immunoprecipitation method. Further studies such as the use of recombinant proteins derived from animal cells were considered.

研究分野：獣医腫瘍学

キーワード：腫瘍抗原 腫瘍免疫 熱ショックタンパク質 イヌ

1. 研究開始当初の背景

腫瘍抗原は癌細胞において特異的あるいは過剰に発現するタンパク質である。細胞質内や細胞膜表面での発現、末梢血中への放出が報告されており、腫瘍診断マーカー、癌ワクチン、免疫療法、標的治療薬などの開発に必須の分子として、近年、精力的な研究が展開されている(下図参照)。しかし、人医療と比較し、獣医療では腫瘍抗原に関する報告が極めて少ない。本研究グループは、これまでの研究において、cDNA 発現ライブラリーと腫瘍罹患犬血清を用いた免疫学的スクリーニングを実施することにより、イヌの乳腺腫瘍に発現する腫瘍抗原を同定し報告した (Furuya M. *et al.* Vet. Comp. Oncol. 13(3):194-202, 2015; Okada S. *et al.* Vet Immunol. Immunopathol. 167(3-4):139-146, 2015)。



熱ショックタンパク質 (Heat shock protein: HSP) は様々な外的刺激によって変性したタンパク質の凝集を防ぎ、さらに変性タンパク質のリフォールディングを行うことによって、細胞を種々のストレスから防御する分子シャペロンとして働いている。分子量によって、HSP33、HSP60、HSP70、HSP90、HSP100 のファミリーに分類され、それぞれが単独もしくはコシャペロンとして正常細胞の恒常性に寄与している。HSP70 は、ATP 依存型の分子シャペロンであり、細胞内で合成されたタンパク質と結合し、フォールディング・リフォールディングを行うだけでなく、複合体として細胞膜外へ輸送する機能を有している。近年、HSP70 はヒトの様々な腫瘍細胞内で強発現していることが報告され、複数のアポトーシス関連タンパク質のフォールディングを行い、主にアポトーシスを抑制することで、腫瘍細胞の増殖や抗腫瘍薬への抵抗に関与していると考えられている (Rerole A.L. *et al.* Cancer Res. 71(2):484-495, 2010)。また、前述のように HSP70 は細胞内の様々なタンパク質と結合し、複合体として細胞外へ輸送する機能を持ち、担癌モデル動物では血中の HSP70 濃度が上昇することが報告されている (Mambula S.S. *et al.* J. Immunol. 177:7849-7857, 2006)。

HSP70 と他のタンパク質との複合体は、抗原提示細胞に取り込まれ、リソソームにおける分解を経て MHC クラス 分子として抗原提示されるだけでなく、cross presentation と呼ばれる特徴的な機構により MHC クラス 分子上にも抗原提示され、特に腫瘍免疫において重要な役割を担っていることが知られている (Dadd K. *et al.* Oncogene 34:1312-1322, 2015)。したがって、HSP70 に結合する新規の腫瘍抗原は、強力な腫瘍免疫反応を誘導できる可能性がある。

2. 研究の目的

伴侶動物の腫瘍性疾患における HSP70 の発現に関する報告は少ないが、イヌの乳腺腫瘍では HSP70 が強発現していることが報告されている (Badowska-Kozakiewicz A.M. *et al.* Pol. J. Vet. Sci. 15(2):209-214, 2012)。そこで、本研究では、雌イヌで好発する乳腺腫瘍を対象に HSP70 に結合する腫瘍抗原を同定し、その抗原を標的とした新たな診断法や治療法の開発を目的とし、研究を実施した。

3. 研究の方法

本研究の最終目標は、HSP70 および HSP70 に結合する分子との複合体を用いた診断法ならびに免疫療法の開発である。下図に研究方法の概略を示した。



本研究では、イヌ HSP70 をターゲットとした診断法および治療法の開発を目的とした。

以下に研究期間内における具体的な研究計画を示す。

組換えイヌ HSP70 タンパク質の作製と精製

抗イヌ HSP70 抗体の作製

乳腺腫瘍罹患犬の血液中における HSP70 の測定と診断マーカーとしての有用性の検討

イヌ HSP70 に結合する分子の同定と乳腺腫瘍における発現動態の解析

HSP70 および HSP70 複合体による樹状細胞刺激と腫瘍免疫反応の強化を検討

4. 研究成果

組換えイヌ HSP70 タンパク質の作製と精製

GST 融合組換えタンパク質を発現するベクター、pGEX6p-1 にイヌ HSP70 の全長塩基配列をサブクローニングし、塩基配列を確認した。この発現ベクターを大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株に導入し、IPTG 添加により、組換えタンパク質を誘導発現させた。アフィニティクロマトグラフィーによって精製した後、GST タグを切断することで、組換えイヌ HSP70 タンパク質を得た。組換えイヌ HSP70 タンパク質は熱変性したルシフェラーゼタンパク質を再活性化できる生理活性を有していることが明らかになった(第 160 回日本獣医学会学術集会において発表)。

抗イヌ HSP70 抗体の作製

組換えイヌ HSP70 タンパク質をウサギに免疫し、イヌ HSP70 に対する血中抗体価の上昇が認められた段階で全採血を行い、ウサギ抗イヌ HSP70 抗体を得た。ウエスタンブロットングにより、イヌ HSP70 を認識することを確認した。

乳腺腫瘍罹患犬の血液中における HSP70 の測定と診断マーカーとしての有用性を検討

マウスなどの実験動物モデルやヒトと同様に、乳腺腫瘍に罹患したイヌでは血中に HSP70 が放出される可能性がある。 で作製したポリクローナル抗体を用いて、ELISA の系を構築する予定であったが、疾患犬の血液サンプルの数が十分に集積できなかったため、血中 HSP70 濃度が診断マーカーとして有用かどうか検討するには至らなかった。

HSP70 に結合する腫瘍抗原の同定

で作成した GST 融合イヌ HSP70 タンパク質とイヌ乳腺腫瘍細胞株のライセートによるプルダウンアッセイを実施した。すなわち、イヌ HSP70 と結合するタンパク質を複合体の形で GST カラムを用いて精製し、SDS-PAGE により解析した。SDS-PAGE で出現したシグナルの位置のゲルからタンパク質を抽出・精製し、アミノ酸シーケンスを行ったところ、細胞分裂に関連する cyclinB1、細胞骨格タンパクである vimentin、myosin-9、actin を同定した。特に細胞分裂に関連する cyclinB1 に着目し、大腸菌を用いて組換えタンパク質を作製した後にイヌ HSP70 との結合性を検討したが、ゲル内免疫沈降法では結合性を確認することができなかった。今後、動物細胞を用いた組換えタンパク質を用いるなど、更なる検討が必要であると考えられた。

HSP70 および HSP70 複合体による樹状細胞刺激と腫瘍免疫反応の強化を検討

の実験において成果が得られなかったため、研究期間内において実施することができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakai K, Motegi T, Chambers JK, Uchida K, Nishida H, Shimamura S, Tani H, Shimada T, Furuya M.	4. 巻 84
2. 論文標題 Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a Toy Poodle with a single base pair insertion in exon 45 of the Duchenne muscular dystrophy gene	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 502-506
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0504	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai K, Hatoya S, Furuya M, Nabetani T, Kanegi R, Shimamura S, Tani H, Shimada T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Retrospective evaluation of nimustine use in the treatment of feline lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Veterinary Medicine and Science	6. 最初と最後の頁 3-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/vms3.652	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito T, Furuya M, Sasai K.	4. 巻 33
2. 論文標題 The Establishment of an Optimal Protocol for Contrast Enhanced Micro Computed Tomography in the Cloudy Catshark <i>Scyliorhinus torazame</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Aquatic Animal Health	6. 最初と最後の頁 264-276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/aah.10143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okada S, Furuya M, Fukui-Kaneshige A, Nakanishi H, Tani H, Sasai K.	4. 巻 232
2. 論文標題 HSP110 expression in canine mammary gland tumor and its correlation with histopathological classification and grade	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary Immunology and Immunopathology	6. 最初と最後の頁 110171-110171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vetimm.2020.110171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanai H, Furuya M, Yoneji K, Hagiwara K, Nukaya A, Kondo M, Aso T, Fujii A, Sasai K.	4. 巻 62
2. 論文標題 Canine idiopathic chylothorax: Anatomic characterization of the pre- and postoperative thoracic duct using computed tomography lymphography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary Radiology & Ultrasound	6. 最初と最後の頁 429-436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vru.12966	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasugi M, Hatoya S, Motooka D, Matsumoto Y, Shimamura S, Tani H, Furuya M, Mie K, Miyake M, Nakamura S, Shimada T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Whole-genome analyses of extended-spectrum or AmpC β -lactamase-producing Escherichia coli isolates from companion dogs in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0246482	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakai K, Hatoya S, Furuya M, Shimamura S, Nabetani T, Tani H, Shimada T.	4. 巻 82
2. 論文標題 Decreased serum zinc concentration in dogs with lymphocytic-plasmacytic enteritis, and its associations with disease severity and prognosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 759-763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aono K, Azuma YT, Nabetani T, Hatoya S, Furuya M, Miki M, Hirota K, Fujimoto Y, Nishiyama K, Ogata Y, Mochizuki T, Tani H.	4. 巻 210
2. 論文標題 Correlation between toll-like receptor 4 and nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) and pathological severity in dogs with chronic gastrointestinal diseases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary Immunology and Immunopathology	6. 最初と最後の頁 15-252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vetimm.2019.03.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanai H, Furuya M, Hagiwara K, Nukaya A, Kondo M, Aso T, Fujii A, Sasai K	4. 巻 49 Suppl 1
2. 論文標題 Efficacy of en bloc thoracic duct ligation in combination with pericardiectomy by video-assisted thoracoscopic surgery for canine idiopathic chylothorax.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary Surgery	6. 最初と最後の頁 0102-0111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vsu.13370.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakanishi H, Furuya M, Soma T, Hayashiuchi Y, Yoshiuchi R, Matsubayashi M, Tani H, Sasai K	4. 巻 21
2. 論文標題 Prevalence of microorganisms associated with feline gingivostomatitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Feline Medicine and Surgery	6. 最初と最後の頁 103-108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1098612X18761274.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasai H, Fujita D, Seto E, Denda Y, Imai Y, Okamoto K, Okamura K, Furuya M, Tani H, Sasai K	4. 巻 252
2. 論文標題 Outcome of limb fracture repair in rabbits: 139 cases (2007-2015).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the American Veterinary Medical Association	6. 最初と最後の頁 457-463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2460/javma.252.4.457.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Furuya M, Fukui-Kaneshige A, Okada S, Tani H, Sasai K
2. 発表標題 Molecular role of heat shock protein 110 in canine mammary grand tumor
3. 学会等名 Asian Meeting of Animal Medical Specialties 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 悟, 古家 優, 谷 浩行, 笹井和美
2. 発表標題 イヌの乳腺腫瘍におけるHSP110の発現動態の解析
3. 学会等名 第162回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanai H, Hagiwara K, Furuya M, Nukaya A, Kondo M, Aso A, Fujii A
2. 発表標題 Effectiveness of en bloc thoracic duct ligation and conventional clipping by video-assisted thoracoscopic surgery in canine idiopathic chylothorax cases
3. 学会等名 Veterinary Endoscopy Society 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤崎友裕, 和田悠佑, 金城綾二, 古家 優, 森山裕至, 井澤武史, 桑村 充, 嶋田照雅, 野口俊助
2. 発表標題 骨転移を認めた鼻腺癌の犬の1例
3. 学会等名 第19回日本獣医がん学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金沢 麻衣, 古家 優, 岡田 悟, 竹中 重雄, 谷 浩行, 笹井 和美
2. 発表標題 イヌのHSP70に結合する新規抗原タンパク質の探索
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------