

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06429

研究課題名(和文) 担がん犬における骨髄由来抑制細胞を標的とした新規治療候補薬の探索

研究課題名(英文) Search of novel therapeutic candidate drugs targeting bone marrow-derived suppressor cells in tumor-bearing dogs

研究代表者

田村 恭一 (Tamura, Kyoichi)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：00722282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究計画に示した実験の結果、犬の骨髄単核球をGM-CSFおよびIL-6存在下で培養し、さらに株化腫瘍細胞培養上清を添加することにより、犬の骨髄単核球から効率的にCD11b+Gr-1+細胞を分化誘導できた。また、この方法で分化誘導した細胞はMDSCに特徴的な機能であるArginase活性、NOおよびROSといった免疫抑制因子を有しており、本研究により確立した犬の骨髄細胞を用いたMDSCの分化誘導法が今後の犬の悪性腫瘍に対する新規治療候補薬の探索に有用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

本研究により確立した犬のMDSCの分化誘導法により、大量に精製するのが困難な担癌犬生体内のMDSCを再現した細胞を簡便に培養することが可能となった。この成果に基づいて、犬の骨髄細胞と種々の株化腫瘍細胞を用いてMDSCを分化誘導し、キナーゼ阻害剤によるMDSCのT細胞増殖抑制への影響を検討することで、種々のがんに対しキナーゼ阻害剤を用いたMDSCの免疫抑制機能制御を目的とした新規治療法の開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：As a result of the experiments shown in the research plan, CD11b+Gr-1+ cells could be efficiently induced to differentiate from canine bone marrow mononuclear cells by culturing canine bone marrow mononuclear cells in the presence of GM-CSF and IL-6, and then adding the supernatant of tumor-derived cell lines. In addition, cells induced to differentiate by this method possessed immunosuppressive factors such as arginase activity, NO and ROS, which are characteristic features of MDSC. The method of inducing differentiation of MDSCs using canine bone marrow cells established in this study may be useful in the future search for new candidate drugs for the treatment of malignant tumors in dogs.

研究分野：獣医学関連

キーワード：犬 がん 骨髄由来抑制細胞 免疫抑制 キナーゼ阻害剤 がん免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

近年のがん免疫の研究において、担がん生体では、がん細胞により多様な免疫抑制因子や免疫抑制細胞が誘導されることによりがん組織や所属リンパ節などでの局所的免疫抑制環境が構築されるだけでなく、全身性に免疫抑制環境が成立することが大きな問題となっている。このような経緯から、がんの免疫制御のためには免疫応答を増強するだけでなく、免疫抑制・抵抗性を是正することが重要である。実際、がん細胞が発現する免疫抑制分子を標的とした免疫チェックポイント阻害療法は従来のがん治療法を大きく上回る奏効率や生存期間の延長が認められ、現在重要な標準治療として確立しつつある。研究代表者はこれまでに、悪性黒色腫においては他のがんと異なり骨髄由来抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cells: MDSC) が発現する DC-HIL ががんの構築する免疫抑制環境において主体をなすことを明らかにした。このことから、がんにより誘導される MDSC による免疫抑制機構はがん種により様々な機構が存在すると推測された。これらの研究成果を踏まえ、本研究ではがん種により異なると推測される MDSC との相互関係において T 細胞が依存するシグナル経路を阻害することにより抗免疫抑制効果が得られる薬剤を探索することで、種々のがんに対しキナーゼ阻害剤を用いた MDSC の免疫抑制機能制御を目的とした新規治療法を臨床応用するための基盤となる成果が得られると考えた。

## 2. 研究の目的

がんにより誘導される MDSC の免疫抑制を制御する新規がん治療法を確立するために、種々のがんにより誘導される MDSC による免疫抑制機構を調節しているシグナル経路を網羅的に解析し、がん種により異なると推測されるそのシグナル経路を阻害することにより種々の犬悪性腫瘍に対する新規治療候補薬を探索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

マウスの骨髄細胞や人の末梢血単球からの MDSC の分化誘導法に基づいて、健常犬の骨髄単核球を GM-CSF および IL-6 存在下で培養し、さらに種々の株化腫瘍細胞培養上清を添加した。培養した細胞からフローサイトメーターを用いたソーティングにより CD11b+Gr-1+細胞を精製し、Arginase 活性、一酸化窒素 (Nitric Oxide: NO)、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) および IL-10 産生能を検討した。また、骨髄単核球を採取した同一個体の末梢血から T 細胞を精製し、抗犬 CD3 抗体存在下で精製した CD11b+Gr-1+細胞と共培養して T 細胞増殖抑制能を評価した。さらに培養上清中の IL-2 および IFN- $\gamma$ 濃度を ELISA 法で測定した。また、種々の悪性腫瘍罹患犬の末梢血中 MDSC の割合をフローサイトメーターにより解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 犬の骨髄細胞を用いた MDSC の分化誘導法の確立

犬の骨髄単核球を GM-CSF および IL-6 存在下で培養し、さらに株化腫瘍細胞培養上清を添加することにより、犬の骨髄単核球から効率的に CD11b+Gr-1+細胞を分化誘導できた。また、

培養した細胞からフローサイトメーターを用いたソーティングにより CD11b+Gr-1+細胞を精製し、その機能を解析したところ、CD11b+Gr-1+細胞は MDSC に特徴的な機能である Arginase 活性、NO および ROS といった免疫抑制因子を有していた(図 1)。

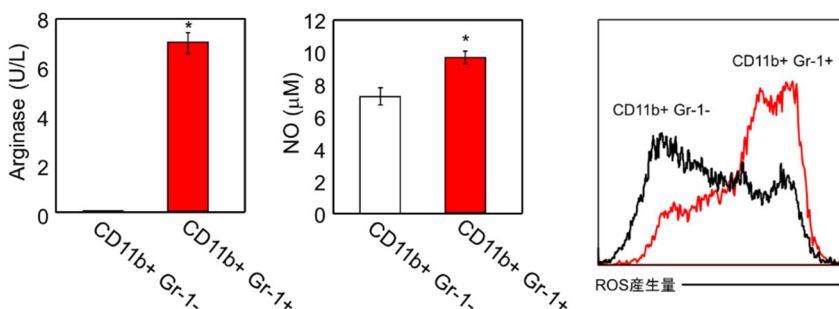


図1 犬骨髓単核球から分化誘導したCD11b+Gr-1+細胞の免疫抑制機能

## (2) 悪性腫瘍罹患犬における末梢血中 MDSC の割合の増加

末梢血中 MDSC の割合は、扁平上皮癌、移行上皮癌、乳腺癌、悪性黒色腫、高悪性度リンパ腫および肥満細胞腫など様々な悪性腫瘍罹患犬において健常犬と比較して優位に増加していた(図 2)。さらに、進行症例において非進行症例よりも MDSC の割合が優位に増加していた。

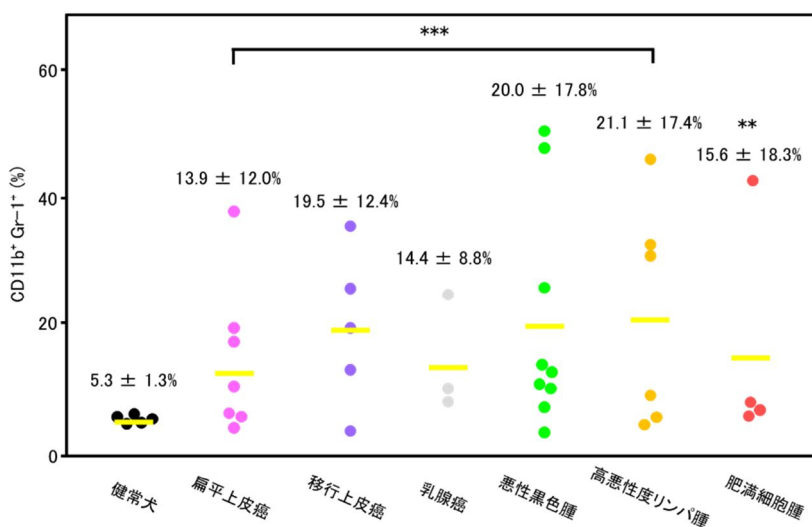


図2 悪性腫瘍罹患犬における末梢血中MDSCの割合

以上の結果より、悪性腫瘍罹患犬においてもその免疫抑制状態に MDSC が重要な役割を担っている可能性が示唆され、犬においても悪性腫瘍により誘導される MDSC が有用な治療標的になると考えられた。今後、本研究で確立した方法により、犬の骨髓細胞と種々の株化腫瘍細胞を用いて MDSC を分化誘導し、キナーゼ阻害剤による MDSC の T 細胞増殖抑制への影響を検討することで、種々の犬の悪性腫瘍に対しキナーゼ阻害剤を用いた MDSC の免疫抑制機能制御を目的とした新規治療法の開発につながると期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Tani Hiroyuki, Miyamoto Ryo, Noguchi Syunya, Kurita Sena, Nagashima Tomokazu, Michishita Masaki, Yayoshi Naoko, Tamura Kyoichi, Bonkobara Makoto	4. 巻 17
2. 論文標題 A canine case of malignant melanoma carrying a KIT c.1725_1733del mutation treated with toceranib: a case report and in vitro analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12917-021-02864-3	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 Miyamoto Ryo, Tani Hiroyuki, Ikeda Tomoyo, Saima Hono, Tamura Kyoichi, Bonkobara Makoto	4. 巻 135
2. 論文標題 Commitment toward cell death by activation of autophagy with survivin inhibitor YM155 in two canine squamous cell carcinoma cell lines with high expression of survivin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Research in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 412 ~ 415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rvsc.2020.10.025	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 Tani H, Kurita S, Miyamoto R, Sawada H, Fujiwara-Igarashi A, Michishita M, Azakami D, Hasegawa D, Tamura K, Bonkobara M.	4. 巻 56
2. 論文標題 Nimustine Treatment of 11 Cases of Canine Histiocytic Sarcoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Am Anim Hosp Assoc.	6. 最初と最後の頁 146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5326/JAHA-MS-6959.	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 Kurita S, Miyamoto R, Tani H, Kobayashi M, Sasaki T, Tamura K, Bonkobara M.	4. 巻 42
2. 論文標題 Genetic alterations of KIT during clonal expansion and subsequent acquisition of resistance to toceranib in a canine mast cell tumor cell line.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Vet Pharmacol Ther.	6. 最初と最後の頁 673-681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jvp.12816.	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 Tani H, Kurita S, Miyamoto R, Ochiai K, Tamura K, Bonkobara M.	4. 巻 18
2. 論文標題 Canine histiocytic sarcoma cell lines with SHP2 p.Glu76Gln or p.Glu76Ala mutations are sensitive to allosteric SHP2 inhibitor SHP099.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vet Comp Oncol.	6. 最初と最後の頁 161-168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12524.	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3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田村恭一
2. 発表標題 細胞診と病理組織診断の照らし合わせ
3. 学会等名 第17回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村恭一
2. 発表標題 CBCと血液塗抹
3. 学会等名 第16回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅倉大輝、亀山仁美、田邊優、佐藤志織、菅沼亮太、田中文哉、山下諒、盆子原誠、田村恭一
2. 発表標題 犬骨髓細胞を用いた骨髓由来免疫抑制細胞の分化誘導
3. 学会等名 日本獣医臨床病理学会2019年大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 田村恭一 他多数	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社ファームプレス	5. 総ページ数 8
3. 書名 犬と猫における細胞診の兵法	

1. 著者名 田村恭一 他多数	4. 発行年 2020年
2. 出版社 緑書房	5. 総ページ数 6
3. 書名 犬の内科診療 Part 1	

〔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
---------	---------