

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15680

研究課題名（和文）犬メラノーマ組織の代謝環境が細胞傷害性T細胞にもたらす影響の網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of the effect of metabolic environment on cytotoxic T cells in canine melanoma

研究代表者

伊賀瀬 雅也（Igase, Masaya）

山口大学・共同獣医学部・助教

研究者番号：70847110

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：犬メラノーマの腫瘍局所の代謝環境が免疫細胞に与える影響を評価するために、腫瘍組織の免疫組織化学染色とリンパ球を用いたリンパ球活性化能の測定を行った。その結果、低酸素化した犬メラノーマ細胞の培養上清中に免疫抑制因子が含まれることが明らかとなり、また次世代シーケンス解析により、その候補となる20遺伝子を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、獣医療において市販されている免疫チェックポイント分子阻害薬はないが、国内外の研究グループが開発を進めており、現場で使用できる日も近くなっている。これまでの獣医師主導臨床試験の結果では、一部のメラノーマ症例で治療効果を示すものの、大部分が治療抵抗性を示している。そのため、その原因の解明が必要とされているが、犬において腫瘍局所の代謝と免疫に焦点を当てた研究は行われていない。そのため、低酸素化によりメラノーマ細胞から放出される免疫抑制性因子が同定され、その制御が可能となれば、将来的に腫瘍局所の代謝環境を制御することによる新しい免疫治療アプローチの創出が期待できる。

研究成果の概要（英文）：To assess the effects of the local metabolic environment of canine melanoma on immune cells including T lymphocytes, immunohistochemical staining of tumor tissue and measurement of lymphocyte activation capacity were performed. The results revealed that the culture supernatant of hypoxic canine melanoma cells contained immunosuppressive factors, and 20 genes that were candidates for those factors could be identified by RNA-seq.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：犬 メラノーマ 低酸素 解糖系 腫瘍微小環境 代謝 免疫

1. 研究開始当初の背景

メラノーマに対する新規治療法として、免疫チェックポイント分子阻害抗体を用いた免疫療法が注目されているが、完全に腫瘍を退縮させるには至らず、その原因の解明と打開策が求められている。腫瘍局所の環境は、不完全な血管新生や腫瘍細胞の解糖系亢進により、低酸素、低栄養状態になっている。近年、その腫瘍局所の代謝環境が免疫療法の治療効果を減弱させる要因の1つであると考えられている。獣医療においても、免疫チェックポイント分子阻害抗体の開発は進んでおり、我々の研究室を含むいくつかの研究グループから治療抗体が作製され、その臨床的検討が進んでいる。これまでに報告された臨床データにおいて、その治療効果は医学分野と同様に限定されており、治療抵抗性の原因の探索や治療効果を増強させる併用薬の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍微小環境の代謝に注目し、免疫療法の治療効果を減弱させる因子の探索を行なった。具体的には、3つのステップに分け、①犬のメラノーマ臨床例における腫瘍の代謝マーカーの発現、免疫細胞浸潤の評価、②犬のリンパ球の代謝を調節した際の免疫反応の変化、③犬メラノーマ細胞から分泌される免疫抑制性因子の探索を実施した。犬メラノーマの腫瘍局所の代謝環境により変化する細胞傷害性 T 細胞の代謝と免疫反応の関係性を解析することで、代謝制御による犬メラノーマの新規治療アプローチの開発を目指した。

3. 研究の方法

① 犬メラノーマの代謝環境と免疫細胞の関連性の解析

細胞株: 犬メラノーマ細胞株 4 種を用いた。HIF-1 α のノックアウト細胞株作製のために、HEK293T 細胞を用いた。ポジティブコントロールとして、人肝細胞癌細胞株 HepG2 を用いた。

低酸素培養: 各細胞をフラスコかシャーレに播種し、マルチガスインキュベーターにて酸素濃度 1% で 6-24 時間培養した。対照例には、通常酸素濃度 (20%) にて同じ時間培養した細胞を用いた。

Western Blotting: 各細胞からタンパク質を抽出し、ポリアクリルアミドゲルにて泳動を行った後、タンパク質を PVDF メンブレンに転写した。スキムミルクによるブロッキング後、各一次抗体を添加し、一晚インキュベートした。その後、二次抗体を添加し、AMERSHAM Image Quant 800 (Global Life Sciences Technologies Japan) によりバンドを検出した。

Immunohistochemistry (IHC): 犬メラノーマ 16 症例より得られた腫瘍組織を用いて、低酸素マーカー (HIF-1 α 、GLUT1、MCT1、MCT4、VEGF、CAIX) の発現を評価した。各種免疫細胞マーカー (CD3、CD8、Foxp3) を用いて腫瘍浸潤リンパ球数の計測を行なった。また、抗体の結合性を確認するために、軟部組織肉腫や腺癌などの犬腫瘍症例の組織を用いた。これらの臨床サンプルは、山口大学動物医療センターに来院された症例から得たものであり、飼い主の同意を得た後で本学の倫理規定に準拠し実験を実施している。

② 犬リンパ球の代謝を調節することによるインターフェロン γ (IFN- γ) 産生の評価

リンパ球分離: 健康ビーグルから採血を行い、EDTA 血を採取した。Lymphoprep (Axis-Shield) を用いて、末梢血単核球 (PBMC) を分離した。

細胞培養: 低酸素培養は、上記と同様の方法で実施した。グルコース非添加 RPMI 培地を用いて、グルコース添加実験を実施した。また、ミトコンドリア機能を調節するアミノ酸であるアミノ酸 A を通常培養メディアウムに添加し、実験を行なった。犬メラノーマ細胞を通常酸素濃度と低酸素濃度で培養した場合の培養上清を回収し、PBMC への添加実験を行なった。全ての実験において、リンパ球を活性化させるために、T 細胞受容体 (TCR) 刺激を人工的に引き起こす Concanavalin A (ConA) を使用した。なお、本実験は山口大学動物実験使用委員会にプロトコルを提出し、その倫理審査の承認を受けている。

ELISA: 各種条件で 3 日間培養したリンパ球の培養上清を ELISA に供した。DuoSet ELISA Development System for canine IFN- γ (R&D systems) を用いて、IFN- γ の測定を行なった。

③ 低酸素培養により犬メラノーマ細胞株で発現上昇する遺伝子の網羅的解析

Whole transcriptome analysis by RNA-seq: 犬メラノーマ細胞株を低酸素濃度で培養し、通常酸素濃度で培養した細胞株に対する遺伝子発現変動を評価した。各細胞から、Maxwell RSC simplyRNA cells kit (Promega Corporation) により Total RNA を抽出し、NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina と NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (New England Biolabs Japan) を用いて cDNA ライブラリーを作製した。Illumina NextSeq による、次世代シーケンズ解析を実施した。データ解析には、CLC Genomics Workbench 20.0.4 (QIAGEN) を使用した。

4. 研究成果

3つのステップに従って研究を行なった。

① 犬メラノーマの代謝環境と免疫細胞の関連性の解析

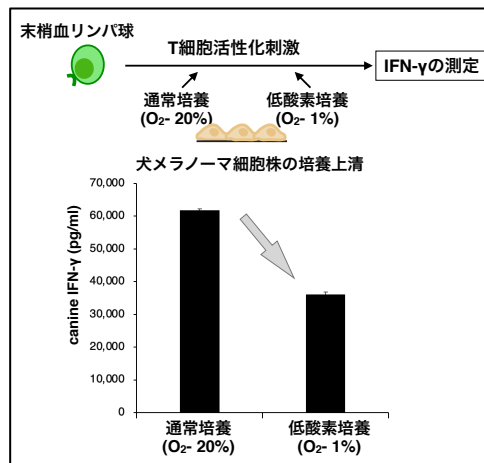
犬メラノーマ細胞株を低酸素培養することにより、各低酸素マーカーのタンパク発現が上昇することを確認した。また、HIF-1 α については、ノックアウト細胞株を作製し、抗体の結合性を確認した。そのため、

HIF-1 α 、GLUT1、MCT1、MCT4、VEGF、CAIX について、各タンパクに対する抗体を購入し、犬の正常組織や腫瘍組織を用いて IHC を行なった。結果としては、GLUT1、MCT4、CAIX 以外のマーカーに対して IHC で使用可能な抗体が得られなかった。そのため、メラノーマ組織において発現が最も強く認められた GLUT1 について、各種免疫細胞マーカーとの関連性の検討を行なった。その結果、GLUT1 高発現腫瘍においてリンパ球浸潤が多い結果が得られた。しかしながら、GLUT1 発現レベルごとのサンプル数が十分でなかったため、追加の症例組織が必要である。また、現在、他の低酸素マーカーについて、腫瘍浸潤リンパ球との関連性の評価を実施している。

② 犬リンパ球の代謝を調節することによるインターフェロン γ (IFN- γ) 産生の評価

健常ビーグルより分離した PBMC を低酸素培養し、培養上清中の IFN- γ 濃度を測定した。その結果、ある犬から分離した PBMC では低酸素により IFN- γ 産生が抑制されたが、別の犬から分離した PBMC では反対に IFN- γ 産生が増加した。今回の実験では個体による結果の違いが大きく、安定した結果は得られなかった。そのため、単にリンパ球を低酸素条件にするだけでは、免疫療法の抵抗性の原因を解明することはできないと考えた。一方で、培養メディウム中のグルコース濃度を低くすることで、IFN- γ 産生が減少することが明らかとなった。また、ミトコンドリア機能を調節するアミノ酸 A を添加することにより PBMC からの IFN- γ 産生が増加したことから、解糖系やミトコンドリア機能(酸化リン酸化)のようなリンパ球のエネルギー代謝を調節することが、リンパ球の活性化や免疫反応に影響を及ぼすことがわかった。

上記の実験から、次に低酸素化した犬メラノーマ細胞から放出される物質の中に、免疫を抑制する因子が含まれているのではないかと考え、犬メラノーマ細胞の培養上清を PBMC に添加した。その結果、低酸素化したメラノーマの培養上清で IFN- γ 産生が抑制された(図)。



③ 低酸素培養により犬メラノーマ細胞株で発現上昇する遺伝子の網羅的解析

培養上清に含まれる抑制性因子の探索のため、RNA-seq を実施した。その解析から、分泌タンパクをコードする 20 遺伝子が候補として抽出された。現在は、それらの遺伝子について、免疫抑制作用をもつか検証するために、分子生物学的、生化学的な解析を実施している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Inanaga Sakuya, Igase Masaya, Sakai Yusuke, Tanabe Mika, Shimohara Nozomi, Itamoto Kazuhito, Nakaichi Munekazu, Mizuno Takuya	4. 巻 58
2. 論文標題 Mismatch repair deficiency in canine neoplasms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 1058 ~ 1063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/03009858211022704	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 Osamu, OGINO Shoji, TSUKUI Toshihiro, IGASE Masaya, MIZUNO Takuya	4. 巻 83
2. 論文標題 Development of a monoclonal antibody for the detection of anti-canine CD20 chimeric antigen receptor expression on canine CD20 chimeric antigen receptor-transduced T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1495 ~ 1499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0326	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 Morinaga Yuki, Igase Masaya, Yanase Takuma, Sakai Yusuke, Sakai Hiroki, Fujiwara-Igarashi Aki, Tsujimoto Hajime, Okuda Masaru, Mizuno Takuya	4. 巻 185
2. 論文標題 Expression of DEP Domain-Containing 1B in Canine Lymphoma and Other Types of Canine Tumours	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Pathology	6. 最初と最後の頁 55 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcpa.2021.04.005	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 Igase Masaya, Nemoto Yuki, Itamoto Kazuhito, Tani Kenji, Nakaichi Munekazu, Sakurai Masashi, Sakai Yusuke, Noguchi Shunsuke, Kato Masahiro, Tsukui Toshihiro, Mizuno Takuya	4. 巻 10
2. 論文標題 A pilot clinical study of the therapeutic antibody against canine PD-1 for advanced spontaneous cancers in dogs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75533-4	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 Osamu, Ii Tatsuhito, Uchida Kazuyuki, Igase Masaya, Mizuno Takuya	4. 巻 39
2. 論文標題 Establishment and Characterization of Monoclonal Antibody Against Canine CD8 Alpha	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 129 ~ 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2020.0002	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 Hamamura Yuki, Nakagawa Takayuki, Okuda Masaru, Noguchi Shunsuke, Igase Masaya, Mizuno Takuya	4. 巻 132
2. 論文標題 The inhibitory effect of canine interferon gamma on the growth of canine tumors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Research in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 466 ~ 473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rvsc.2020.08.007	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 IGASE Masaya, MORINAGA Yuki, KATO Masahiro, TSUKUI Toshihiro, SAKAI Yusuke, OKUDA Masaru, MIZUNO Takuya	4. 巻 82
2. 論文標題 Establishment of rat anti-canine DEP domain containing 1B (DEPDC1B) monoclonal antibodies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 483 ~ 487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0667	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 Osamu, Igase Masaya, Mizuno Takuya	4. 巻 18
2. 論文標題 Optimization of canine CD20 chimeric antigen receptor T cell manufacturing and in vitro cytotoxic activity against B cell lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 739 ~ 752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12602	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 Mizuno Takuya, Kato Yukinari, Kaneko Mika K., Sakai Yusuke, Shiga Toshinori, Kato Masahiro, Tsukui Toshihiro, Takemoto Hirofumi, Tokimasa Akio, Baba Kenji, Nemoto Yuki, Sakai Osamu, Igase Masaya	4. 巻 10
2. 論文標題 Generation of a canine anti-canine CD20 antibody for canine lymphoma treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68470-9	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 伊賀瀬雅也、岩谷直、酒井和紀、水野拓也
2. 発表標題 犬のリンパ球における5-アミノレブリン酸のIL-17産生増強作用
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊賀瀬雅也、岩谷直、酒井和紀、水野拓也
2. 発表標題 5-アミノレブリン酸が犬のリンパ球に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第17回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaya IGASE, Nao IWATANI, Aki SAKAI, Takuya MIZUNO
2. 発表標題 The effect of 5-aminolevulinic acid (5-ALA) in canine lymphocytes
3. 学会等名 The 5th international symposium (Association of Japan-Indonesia Veterinary Education) (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------