

機関番号：32669

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21780293

研究課題名 (和文)

犬の乳腺腫瘍に特有な筋上皮細胞増殖を介した骨・軟骨形成機構の解明

研究課題名 (英文)

Elucidation of the mechanisms underlying myoepithelial and osseocartilaginous proliferation in the canine mammary tumors

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・助教

研究者番号：50434147

研究成果の概要 (和文)：

犬の乳腺腫瘍は、乳腺上皮細胞の腫瘍性増殖に加え、筋上皮細胞の腫瘍性増殖および骨・軟骨形成（複合型乳腺腫瘍）を示し、さらにそれらの骨・軟骨の腫瘍化（混合腫瘍）を高頻度に伴う特有の腫瘍である。しかしながら、乳腺腫瘍における筋上皮細胞増殖および骨・軟骨形成機構は未だ解明されていない。本研究では、Sphere assay および aldefluor assay を用いて、乳癌細胞株および複合型乳腺癌の初代培養細胞から乳癌幹細胞を同定、分取し、筋上皮細胞への分化能を解析した。In vitro 分化能解析では、複合型乳腺癌由来の sphere 形成細胞は、分化誘導前に比べて筋上皮細胞への分化を示す細胞の割合が増加した。In vivo 解析では、sphere 形成細胞は超免疫不全マウスに生着せず、筋上皮細胞への分化を明らかにすることはできなかった。乳癌幹細胞を用いた機能解析は、犬に特有な乳腺腫瘍の発症機構を解明するために必要である。

研究成果の概要 (英文)：

Mammary gland tumors most frequently occur in dogs and are unique in sometimes giving rise to complex or mixed tumors composed of both luminal epithelial and myoepithelial and/or osseocartilaginous components. The underlying molecular and cellular mechanisms remain central questions. Cancer stem cells in canine mammary tumors may be enriched in cell populations with the potential to differentiate into myoepithelial and luminal epithelial cells. We analyzed sphere-forming cells derived from mammary complex carcinomas using *in vitro* differentiation assay and xenotransplantation into immunodeficient mice. Sphere-forming cells showed the increased proportion of myoepithelial cells when cultured in the differentiation medium, whereas sphere-forming cells failed to induce tumor in all mice tested. Functional studies using cancer stem cells, including sphere-forming or ALDH<sup>+</sup> cells, in canine mammary tumors of complex or mixed type, may be needed to elucidate the mechanisms responsible for the characteristics of canine mammary tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：犬、乳腺腫瘍、乳癌幹細胞、筋上皮細胞

### 1. 研究開始当初の背景

犬の乳腺腫瘍は、乳腺上皮細胞の腫瘍性増殖に加え、筋上皮細胞の腫瘍性増殖および骨・軟骨形成（複合型乳腺腫瘍）を示し、さらにそれらの骨・軟骨の腫瘍化（混合腫瘍）を高頻度に伴う特有の腫瘍である。今日まで乳腺腫瘍で形成される骨・軟骨の細胞起源は筋上皮細胞が強く示唆されているが、それらの分化および腫瘍形成機構は未だ解明されていない。

### 2. 研究の目的

近年、提唱されている癌幹細胞発生説によれば、乳腺腫瘍においても正常乳腺と同様に幹細胞の特性を有する乳癌幹細胞が存在し、それから生じる腫瘍性乳腺上皮細胞および腫瘍性筋上皮細胞からなる腫瘍組織を形成する可能性が示唆されている。本申請研究は、犬乳癌幹細胞を同定し、それらの特性解析を行い、筋上皮細胞増殖機構および骨・軟骨形成機構の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

犬の乳癌細胞株および外科切除された乳腺腫瘍の初代培養細胞から犬乳癌幹細胞を同定し、分取した乳癌幹細胞の分化能を *in vitro* および *in vivo* 解析を行う。

#### (1) 犬乳癌幹細胞の同定

フローサイトメトリ解析および細胞培養により濃縮される犬乳癌科細胞集団であるアルデヒド脱水素酵素活性を持つ (ALDH+) 細胞、浮遊細胞塊を下記の方法で同定する。

##### ① Sphere assay

本アッセイで形成される浮遊細胞塊は、固形癌における癌幹細胞を濃縮することができる。浮遊細胞塊は、株化細胞および初代培養細胞を成長因子添加無血清培地で7日間培養し、形成させる。

##### ② Aldefluor assay

ALDH 活性はヒトの乳腺幹細胞、乳癌幹細胞などで有することが知られており、この酵素活性に基づき、犬乳癌幹細胞が濃縮されている ALDH+細胞を同定する。

#### (2) ALDH+細胞の特性解析

犬の乳癌における ALDH+細胞の腫瘍形成能は

報告がない。それゆえ、マウス皮下移植により腫瘍形成能を調べた。犬乳癌細胞株由来の浮遊細胞塊はすでに癌幹細胞が濃縮されていることを報告している。

分取した ALDH+細胞および ALDH-細胞を超免疫不全 (NOG) マウス (7週齢、雌) の皮下へ移植し、腫瘍形成能を検討した。経過観察後、形成された腫瘍を採材し、病理組織学的解析を行った。

#### (3) 犬乳癌幹細胞の分化能解析

##### ① *in vitro* 分化能解析

組織学的に筋上皮細胞増殖を伴う乳腺腫瘍（複合型）の初代培養細胞を用いて sphere assay により浮遊細胞塊を形成させる。回収した浮遊細胞塊を単一細胞化 (sphere 形成細胞) し、分化誘導培地を用いて培養を行った。7日間培養後、 $\alpha$ -平滑筋アクチン ( $\alpha$ SMA) に対する免疫細胞化学染色を行い、蛍光顕微鏡下で観察し、構成される細胞集団の割合を調べた。対象として筋上皮細胞増殖のない株化細胞を用いた。

##### ② *in vivo* 分化能解析

上記と同様の sphere 形成細胞を超免疫不全 (NOG) マウスに皮下へ移植し、腫瘍生着を観察した。経過観察後、安楽殺し、移植部皮膚を病理組織学的に解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 初代培養細胞の sphere 形成の能解析

複合型乳腺癌の初代培養細胞を用いて sphere assay 解析では、解析したすべての細胞で sphere 形成が認められた (図 1)。

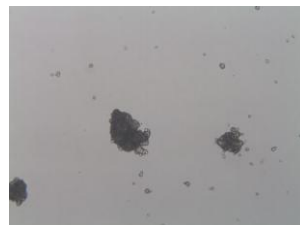


図 1. 形成された浮遊細胞塊

#### (2) ALDH+細胞の腫瘍形成能解析

筋上皮細胞増殖がみられなかった乳癌由来の株化細胞から Aldefluor assay により ALDH+細胞、ALDH-細胞を同定・分取し、NOG マウスへ皮下移植した。ALDH+細胞は、ALDH-

細胞と比較して高い腫瘍形成能を示した(表1)。病理組織学的に、形成された腫瘍は腺上皮様細胞の増殖がみられた(図2)。

表1. NOG マウスへの皮下移植による腫瘍形成

移植細胞数と腫瘍形成の相関				
	1×10 <sup>2</sup>	1×10 <sup>3</sup>	1×10 <sup>4</sup>	5×10 <sup>4</sup>
ALDH <sup>+</sup>	0/4	0/4	4/4	4/4
ALDH <sup>-</sup>	0/4	0/4	0/4	2/4
親株	-	-	2/4	3/4

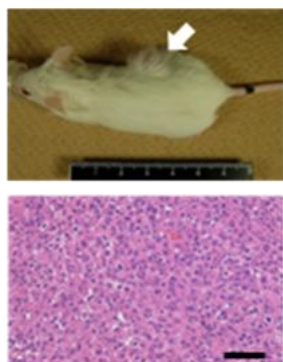


図2. (上段) 形成された腫瘍(矢印). (下段) 腫瘍の組織像(HE染色、Bar=50μm).

### (3) sphere 形成細胞の *in vitro* 分化能の解析

Sphere 形成細胞の *in vitro* 分化能解析では、 $\alpha$  SMA 陽性細胞(筋上皮細胞)の占める割合は、分化誘導前は26.5%であり、分化誘導後は46.27%を占め、有意に増加した。現在、腺上皮マーカー(CK8あるいはCK14)との二重染色を行い、筋上皮細胞および腺上皮細胞の割合について検討している。

### (4) sphere 形成細胞の *in vivo* 分化能の解析

複合型乳癌(4種)の初代培養細胞から得られた sphere 形成細胞を NOG マウスに皮下移植し、*in vivo* 分化能を解析した。経過観察した結果、sphere 形成細胞はすべて生着しなかった。現在、条件を変更し再度解析している。

## 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6件)

Machida Y., Yoshimura H., Nakahira R.,

Michishita M., Ohkusu-Tsukada K., Takahashi K.: “Cutaneous invasive micropapillary carcinoma of probable apocrine sweat gland origin in a cat” *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* (in press). (2011). 査読有

Michishita M., Akiyoshi R., Yoshimura H., Katsumoto T., Ichikawa H., Ohkusu-Tsukada K., Nakagawa T., Sasaki N., Takahashi K.: “Characterization of sphere derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines” *Research in Veterinary Science* (in press). (2010). 査読有

Yoshimura H., Michishita M., Ohkusu-Tsukada K., Takahashi K.: “Appearance and distribution of stromal myofibroblasts and tenascin-C in feline mammary tumors” *Histology and Histopathology* 26. 297-305 (2011). 査読有

Yoshimura H., Michishita M., Ohkusu-Tsukada K., Takahashi K.: “Increased presence of stromal myofibroblasts and tenascin-C with malignant progression in canine mammary tumors” *Veterinary Pathology* 48. 313-321 (2011). 査読有

Michishita M., Momozawa Y., Oizumi T., Ohkusu-Tsukada K., Takahashi K.: “Primary neuroblastoma in the skin of an adult shih tzu dog” *Veterinary Dermatology* 21. 408-411 (2010). 査読有

Yoshimura H., Kimura N., Nakahira R., Michishita M., Ohkusu-Tsukada K., Takahashi K.: “Lipid-rich carcinoma in the mammary gland of Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*)” *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22. 305-309 (2010). 査読有

[学会発表] (計7件)

道下正貴、宇都達弥、中澤亮太、萩原喜久美、納谷裕子、岸川正剛、皆上大吾、塚田晃三、高橋公正. “犬血管周皮腫細胞株移植モデルにおけるベバシズマブの抗腫瘍効果の検討” 第150日本獣医学会学術集会. 2010年9月. 帯広畜産大学(北海道).

吉村久志、中平嶺、道下正貴、塚田晃三、高橋公正. “イヌの乳腺における Basaloid carcinoma の病理学的特徴” 第150日本獣医学会学術集会. 2010年9月. 帯広畜産大学(北海道).

Shimamura A., Michishita M., Sakai M., Yamamoto I., Arai T.: “mRNA expression of mammary tumor associated genes in dogs” 14<sup>th</sup> International Society for Animal Clinical Pathology July (2010). Oregon State University.

道下正貴、秋吉るい、末水洋志、大西保行、中川貴之、佐々木伸雄、塚田晃三、新井敏郎、高橋公正. “ALDH 活性に基づく犬乳癌幹細胞の同定と特性解析” 第 148 回日本獣医学会学術集会. 2009 年 9 月. とりぎん文化会館 (鳥取).

秋吉るい、道下正貴、塚田晃三、中川貴之、佐々木伸雄、塚田晃三、高橋公正. “犬乳癌細胞株 CHMp の浮遊細胞塊の特性解析” 第 148 回日本獣医学会学術集会. 2009 年 9 月. とりぎん文化会館 (鳥取).

吉村久志、道下正貴、塚田晃三、高橋公正. “イヌの充実性乳腺癌における p63 陽性 basal cell” 型腫瘍細胞の免疫組織化学的検索 “第 148 回日本獣医学会学術集会. 2009 年 9 月. とりぎん文化会館 (鳥取).

道下正貴. “犬の乳腺腫瘍の発症機構の解明～乳癌幹細胞の研究～” 第 147 回日本獣医学会学術集会. 2009 年 4 月. 栃木県総合文化センター (栃木).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://nvlvetpathol.xxxxxxxx.jp/index.mht>

## 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・助教

研究者番号：5 0 4 3 4 1 4 7