

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22780280

研究課題名(和文) 難治性犬膀胱移行上皮癌に対するHER-2を分子標的とする新規治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the new molecular therapy for refractory canine bladder transitional cell carcinoma expressed HER-2.

研究代表者

星野 有希 (Hoshino, Yuki)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・助教

研究者番号：80523323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、膀胱移行上皮癌に対してHER-2が100%の割合で過剰発現していることを認めた。そこで、移行上皮癌症例犬の新規治療法としてHER-2をターゲットとした分子標的治療の研究を実施した。犬の移行上皮癌細胞株の初代培養を行い、得られた細胞の性状解析を実施した結果、3株の移行上皮癌細胞が得られた。3株ともHER-2の遺伝子およびタンパクレベルにおける発現が認められた。しかし抗腫瘍剤感受性試験の結果、抗HER-2抗体であるトラスツズマブに対しては細胞傷害性を示さなかった。犬の膀胱移行上皮癌に対するトラスツズマブの抗腫瘍効果はin vitroでの評価が難しい免疫系を介していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that HER-2 overexpressed at the rate of 100% for canine bladder transitional cell carcinomas. Therefore we carried out research using molecular target therapy that targeted HER-2 as a new treatment for canine transitional cell carcinoma. Primary culturing of the transitional cell carcinoma obtained from canine cases was performed, and property analysis of the cultured cells was performed. As a result, three transitional cell carcinoma cell lines were established. The appearance of gene and protein expression of HER-2 was found for all three cell lines. However, as a result of the anticancer agent sensitivity examination, the anti-HER-2 agent, trastuzumab did not show cell cytotoxicity for transitional cell carcinomas. In vitro evaluation suggested that one of the antitumor effects of trastuzumab for canine transitional cell carcinomas requires an immune system response. Further study is needed to explore this response.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍治療学

キーワード：移行上皮癌 分子標的治療 HER-2 犬

1. 研究開始当初の背景

HER-2 は、細胞表面に存在する約 185 kDa の糖タンパクで、受容体型チロシンキナーゼである。HER-2 タンパクは正常細胞において細胞の増殖、分化などの調節に関与しているが、何らかの理由で HER-2 遺伝子の増幅や遺伝子変異が起こると、癌遺伝子として働く。この HER-2 タンパクを標的としたモノクローナル抗体が開発され、主に HER-2 タンパクを過剰発現するヒト乳癌の分子標的治療薬として用いられている。しかし、獣医領域では HER-2 タンパクを過剰発現する腫瘍に対する分子標的治療の報告はない。そこで申請者は、獣医領域において HER-2 タンパクを過剰発現する腫瘍に対する分子標的治療の適応を目的とし、まず犬と猫の腫瘍における HER-2 タンパクの発現率を調べるため、岐阜大学附属動物病院腫瘍科に来院した腫瘍罹患症例の病理組織標本を用い、HER-2 タンパクの免疫組織化学的染色を行った。その結果、犬 115 例、猫 13 例中、HER-2 タンパクの過剰発現が認められたものは犬 38 例、猫 6 例であった (未発表)。ヒトで過剰発現が認められる乳腺腫瘍に関しては、犬猫ともに過剰発現する症例が多く認められたが、犬においては良性乳腺腫瘍にも過剰発現が多く認められた (良性乳腺腫瘍 15 例中 13 例が過剰発現)。乳腺腫瘍以外の上皮系腫瘍では、扁平上皮癌、肛門周囲腺癌、膀胱移行上皮癌などに過剰発現が認められ、特に膀胱移行上皮癌は 6 例中 6 例が過剰発現を示した。以上のことから、犬の乳腺腫瘍の悪性度と HER-2 タンパクの過剰発現の関係はヒトと異なる可能性が示唆されたため、新たなターゲットとして膀胱移行上皮癌に着目した。

犬の膀胱腫瘍のほとんどが悪性度の高い移行上皮癌で、有効な治療法はほとんど報告されていないため、新たな治療法の開発が待ち望まれている。またヒトにおいて HER-2 タンパクの過剰発現が認められる移行上皮癌に対する研究も進行中である。以上のことから犬の膀胱移行上皮癌に対する HER-2 タンパクを標的とした分子標的治療に関する研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

犬の移行上皮癌に対して HER-2 タンパクを標的とする新規分子標的治療が可能か評価すること、およびその確立を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

岐阜大学附属動物病院および北海道大学附属動物病院に来院し、膀胱移行上皮癌と診断された犬からオーナーの同意の元、腫瘍組織の採材を実施し、初代培養を行い細胞株の樹立を行った。樹立された細胞株の性状は、形態学的観察、倍加時間の計測、コロニー形成率、HER-2 遺伝子およびタンパクの確認、マウス異種移植腫瘍の形成およびその組織

学的評価などにより評価した。また、得られた細胞株の HER-2 免疫細胞化学染色を実施し、発現強度の比較を行った。

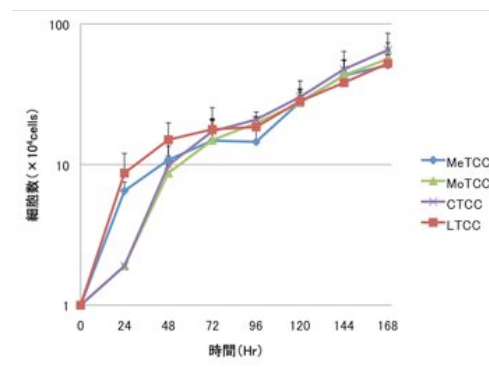
樹立された細胞株を用いて抗 HER-2 抗体を含む各種抗癌剤に対する感受性試験を実施した。

また、ウサギを用いて犬 HER-2 のポリクローナル抗体の作製を行った。

4. 研究成果

(1) 膀胱移行上皮癌細胞株の樹立および性状解析

初代培養の結果、4 株の膀胱移行上皮癌細胞株を得ることができた。4 細胞株はいずれも 50 継代以上安定して培養可能であった。4 細胞株とも単層敷石状に増殖する上皮様細胞で、多角形を示し、円形から楕円形の比較的大きな核は複数個の核仁を有した。得られた細胞株の倍加時間はそれぞれ 36.3 時間、33.3 時間、33.5 時間、42.7 時間 (いずれも平均) であった。コロニー形成率はそれぞれ、12.9%、1.2%、10.1%、8.8% であった。

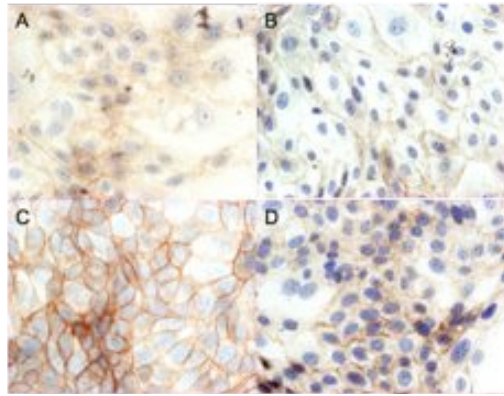


(2) 原発腫瘍の病理組織学的検討

H.E.染色では共通して、卵円形の核と好酸性で豊富な細胞質を有する移行上皮由来の腫瘍細胞が乳頭状もしくは集塊状に増殖する像が認められた。腫瘍細胞は核仁明瞭で、核の大小不同など高度な異型性を示し、細胞質の一部は空胞形成を伴っていた。免疫組織化学的染色では、全ての組織標本において HER-2 強陽性であった。

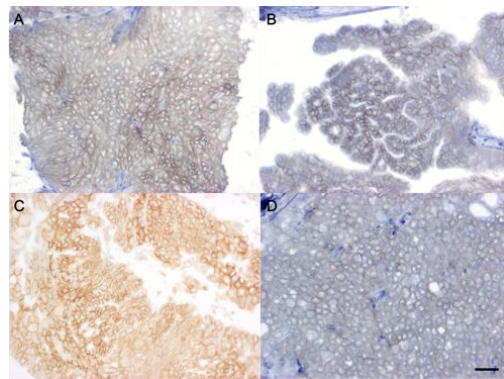
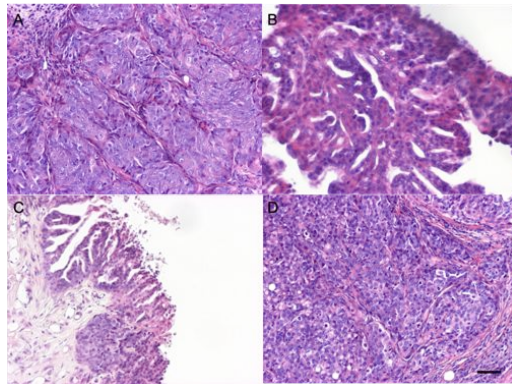
(3) 培養細胞の免疫細胞学的検討

細胞株 4 株共通して、Cytokeratin 陽性、HER-2 陽性、COX2 陽性、Survivin 陽性、p53 陽性、MDM2 陽性、ER 陰性という結果であった。Vimentin は 1 細胞株のみ陰性で、他 3 細胞株は陽性であった。HER-2 の染色強度は全ての細胞株において強陽性であった (下図)。



(4)マウス異種移植腫瘍の形成

SCID マウスへの異種移植を行った結果、全ての培養細胞は SCID マウスに生着した。3 細胞株では移植 1~2 週間後に腫瘍の発現を認め、3 週間後には小指頭大まで発育した。この時点で腫瘍を摘出し、病理組織学的検討を行った。1 細胞株は移植 5 週間後の時点で明らかな肉眼病変は認められなかったが、剖検時に小さな皮下腫瘍を確認し、摘出後、病理組織学的検討を行った。なお、その他の臓器に異常は認められなかった。形成された組織は原発組織に類似した組織構築を示し、腫瘍細胞が乳頭状もしくは集塊状に増殖する像が認められた (下図)。また、免疫染色の結果も原発組織同様、全ての組織標本において HER-2 陽性であった (下図)。



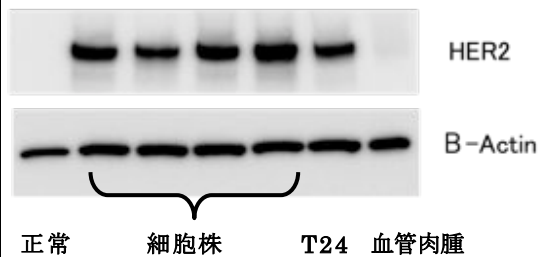
(5)遺伝子発現

樹立した 4 細胞株、正常膀胱組織、膀胱炎症例より得られた粘膜を用いて HER-2 の遺伝子発現解析を行った。逆転写 PCR におい

ては、4 細胞株とも HER-2 遺伝子の発現が認められた。正常膀胱組織では HER-2 遺伝子の発現は認められなかった。膀胱炎症例では 2 例中 1 例で HER-2 遺伝子発現を認めた。定量的 PCR において細胞株の HER-2 遺伝子発現量は膀胱炎組織に比べて有意に多い値であった。

(6)タンパク発現

4 細胞株およびヒト移行上皮癌細胞株 T24 において、HER-2 の分子量 185kDa 付近にバンドを検出した。犬の正常膀胱組織ではバンドが認められなかった。なお、陰性コントロールとした犬の血管肉腫由来細胞株ではバンドは検出されなかった。また、インターナルコントロールとした β -アクチンは全サンプルで 47kDa 付近にバンドを検出した。(下図)



(7)抗癌剤感受性試験

MTT アッセイを用いた抗がん剤感受性試験の結果、全ての細胞株において、抗がん剤は一般に濃度依存性に作用したが、NSAIDs であるメロキシカムと抗 HER-2 抗体であるトラスツズマブはどの細胞株においても濃度に関係なく、吸光度はほぼ一定だった。次に、濃度依存性に作用した抗がん剤に関して生存率 50% の殺細胞効果を示す薬剤濃度 IC_{50} 値を求め、PPC を基準とした濃度で表示した。PPC を基準とした IC_{50} 値は、犬移行上皮癌全ての細胞株に共通して、パクリタキセルが最も低く、次にシスプラチンが低値を示した。従って、犬の膀胱腫瘍に対する新規抗がん剤として、パクリタキセルが効果を示す可能性が示唆された。また、今回ほとんど細胞障害作用が認められなかったトラスツズマブはヒトの腫瘍細胞に対する傷害性が認められているため、犬においては *in vitro* での評価が難しい可能性、あるいは種特異性が高く犬の腫瘍細胞には結合しない可能性が示唆された。トラスツズマブが免疫反応である抗体依存性細胞障害を介して作用するという報告もあるため、正確な評価を行うため実験系の再考が必要であると思われた。

(8)ポリクローナル抗体作成

ウサギに HER-2 ペプチド断片を投与し、ポリクローナル抗体を得た。得られたポリクローナル抗体は今後免疫沈降反応や ELISA を利用した HER-2 測定系に利用する予定で

ある。

(9)以上のことから、犬の膀胱移行上皮癌に対する HER-2 を標的とした分子標的治療を実施するうえではまだ十分なデータが得られたとはいえない状況であるものの、継続して研究を続けるツールは十分整っているため、*in vivo* での実験系など不足している実験を今後も継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計1件）

星野有希 他、分標的治療を目指した犬膀胱移行上皮癌細胞株の樹立 第154回日本獣医学学会学術集会、2012年9月15日、岩手大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

星野 有希 (HOSHINO, Yuki)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：80523323