

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658255

研究課題名(和文) イヌがん幹細胞の分離法と遺伝子解析に基づいた治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a method for isolating canine cancer initiating cells and a new cancer therapy based on their gene expression analyses

研究代表者

嶋本 良則 (Shimamoto, Yoshinori)

北里大学・獣医学部・助教

研究者番号：30552046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：イヌがん幹細胞を標的とした治療法の開発のためにヒトがん幹細胞マーカーのイヌオルソログに対するモノクローナル抗体(mAb)の作製を行った。大腸菌で発現系させたCD133あるいはCD29抗原に対するmAbが得られた。ウェスタンブロットでは全ての抗イヌCD133mAbはイヌの骨髓膜画分中のCD133タンパクおよびHEK293細胞で発現させたCD133タンパクを検出しなかった。一方、抗イヌCD29抗体は、免疫組織化学染色でイヌ胎児の椎体軟骨および血管の間葉系細胞に陽性を示した。今後、実際のイヌCD133を認識する抗イヌCD133mAbの作製と抗イヌCD29mAbの有用性の検討を予定している。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel method for therapy targeting cancer stem cell (CSC) in dogs, the monoclonal antibodies (mAbs) against canine ortholog of CSC markers in human were produced. Some mAbs against canine CD (cCD) 133 or cCD29 proteins that was expressed by Escherichia coli expression system were respectively obtained. Western blot analyses revealed that all of anti-cCD133 mAbs could not detect a native CD133 protein in a membrane fraction of born marrow and did not recognize the CD133 proteins expressed in HEK293 cells. On the other hand, in immunohistochemical study using an anti-cCD29 mAb, mesenchymal cells in basivertebral cartilage and blood vessel were positively stained in a dog embryo. Further study is needed to produce anti-cCD133mAbs that can recognize a native cCD133 and to verify the usefulness of anti-cCD29mAbs in sorting of mesenchymal stem cell.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

イヌの悪性腫瘍性疾患は、抗がん剤や放射線に対する抵抗性のため未だ根本的治療に至っていない。人医においては、これら抵抗性を有する細胞‘がん幹細胞’の存在が示唆され始め、これの解析や解析に基づく治療法の整備は緒についたばかりである。

がん幹細胞は、がん細胞に幹細胞(自己複製、多分化能、移植能)の性質を持った細胞であり、ヒトの悪性腫瘍における抗がん剤や放射線に対する抵抗性克服の鍵となる細胞と考えられている。一方、イヌの悪性腫瘍におけるがん幹細胞の存在に関して、分離・同定・培養法が確立していないことから、十分な情報は得られていない現状にあり、イヌの悪性腫瘍の治療にどれだけ応用できるか定かではない。イヌの悪性腫瘍においてがん幹細胞が存在するのか?存在するのであればそれはどのような性質を有するのか?といった点について情報が殆どない状況である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はイヌの悪性腫瘍の克服のために、イヌの種々の悪性腫瘍におけるイヌがん幹細胞の存在とその性状を明らかにし、死に至らしめる手法を確立することである。

ヒトのがん幹細胞研究において、がん幹細胞を分離する際に、がん幹細胞表面マーカー分子を特異的に認識し、その細胞を捕捉するモノクローナル抗体が使用されている。従って、イヌがん幹細胞を分離するためにはその細胞に発現している表面マーカー分子に対するモノクローナル抗体の開発が必要である。

ヒトの悪性腫瘍において、種々のがん幹細胞表面マーカー分子が報告されている。なかでも CD133 あるいは CD29 は比較的多くの悪性腫瘍中のがん幹細胞で観察されていることから、まず CD133 のイヌオルソログに対するモノクローナル抗体の作製を開始した。その後、イヌ CD29 に対するモノクローナル抗体の作製にも着手した。

## 3. 研究の方法

### (1) イヌ悪性腫瘍組織における CD133mRNA の発現

ヒトの種々の悪性腫瘍において、CD133 はがん幹細胞の表面マーカー分子の1つと見なされていることから、イヌ CD133 分子に着目した。イヌの悪性腫瘍組織中に実際 CD133 がはつげんしているのかどうかを調べるために、イヌの悪性腫瘍組織における CD133 遺伝子の発現の有無を mRNA レベルで調べた。プライマーの設計に際し、イヌの CD133mRNA の塩基配列 (XM\_005618559.1) を、National Center for Biotechnology Information

(NCBI)から入手した。材料として、外科手術により摘出された悪性腫瘍組織(乳癌、骨肉腫、未分化肉腫ならびにリンパ腫)から RNA を抽出し、RT-PCR 法を行ってその発現を観察した。

### (2) 抗イヌ CD133 モノクローナル抗体の作製

がん幹細胞の表面マーカー分子 CD133 のイヌオルソログに対して細胞表面突出が予想される領域の大腸菌組換え HisTag 融合タンパクを作製した。これらタンパクをモリブデンカラムにより精製後、抗原としてマウスに接種し、膝下リンパ節から得られたリンパ球をミエローマ (SP2) 細胞と融合させ、ハイブリドーマを作製した。限界希釈法および ELISA 法を用いて抗イヌ CD133 IgG 抗体産生細胞を選別し、モノクローナル抗体を得た。また、今回使用した発現ベクターは、HisTag 以外にチオレドキシシンと V5 を融合タンパク中に含んでいるため、得られた抗体の特異性を確認する必要があった。そこで、大腸菌発現系をもちいて作製されたイヌ CD44-HisTag 融合タンパクに対する免疫交差反応を ELISA 法により評価し、イヌ CD44-HisTag タンパクと免疫交差する抗体を除外した。

### (3) 抗イヌ CD133 モノクローナル抗体によるイヌ CD133 タンパクの検出

他の動物種の情報から、イヌにおいても CD133 タンパクの発現量が極めて少ないことが予測された。がん幹細胞表面マーカーの多くは、正常幹細胞にもその発現がみられることから、幹細胞が比較的豊富であることが予想されるイヌ骨髓細胞中の膜画分を超遠心分離法により調整し、ネイティブな CD133 タンパク試料とした。この骨髓膜画分サンプル中に CD133 タンパクが検出できない可能性を考慮し、ヘマグルチニン(HA)Tag を付加したイヌ CD133 タンパク全長を哺乳類細胞である HEK293 細胞に一過性に大量発現させ、この細胞を RIPA バッファーと超音波処理により可溶化し、哺乳類発現 CD133 タンパク試料とした。ウェスタンブロット法を用いて、抗イヌ CD133 モノクローナル抗体がこれらの細胞サンプル中の CD133 タンパクを認識あるいは検出できるかどうかを検討した。

### (4) 抗イヌ CD29 モノクローナル抗体の作製とこれを用いたイヌ CD29 の検出

抗イヌ CD133 モノクローナル抗体の作製と同様の方法を用いてイヌ CD29 の塩基配列 (XM\_005616948.1) を基に抗原を作製し、抗イヌ CD29 IgG 抗体産生細胞を選別し、モノクローナル抗体を作製した。

得られた抗イヌ CD29 モノクローナル抗体の有用性を検討するために、避妊手術時に摘

出されたイヌ胎児サンプルを用いて CD29 陽性細胞の分布を免疫組織学的に検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) イヌ悪性腫瘍組織における CD133mRNA の発現

検索したイヌ悪性腫瘍組織(乳癌、骨肉腫、未分化肉腫ならびにリンパ腫)において、骨肉腫以外の腫瘍組織で CD133mRNA の発現が観察された (Fig. 1)。このことは、イヌの悪性腫瘍組織中にもがん幹細胞が存在する可能性を示している。これに加え、全ての悪性腫瘍が CD133 を発現しているとは限らないことを示唆している。

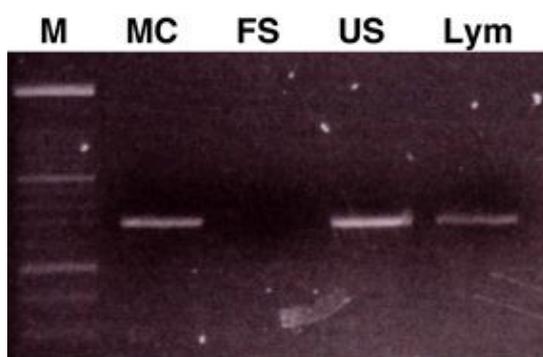


Fig. 1 イヌ悪性腫瘍組織における CD133mRNA の発現

MC: 乳癌、FS: 骨肉腫、US: 未分化肉腫、Lym: リンパ腫、M: 分子量マーカー

##### (2) 抗イヌ CD133 モノクローナル抗体

得られたモノクローナル抗体が大腸菌に発現させたイヌ CD133 タンパクを特異的に認識するかどうかを別の大腸菌発現タンパク (イヌ CD44HisTag 融合タンパク) を用いて確認したところ、97 個のモノクローナル抗体中 8 個の抗体がイヌ CD44HisTag 融合タンパクと免疫交差しないものが得られた。これら 8 個を抗イヌ CD133 モノクローナル抗体とした。

次に、これらの抗体がイヌの体内に存在するネイティブな CD133 タンパクを認識・検出できるのかどうかを確認するために、ウェスタンブロット法を用いて検討した。得られた全ての抗イヌ CD133 モノクローナル抗体は、大腸菌発現イヌ CD133 タンパク (133) を認識したが、骨髄膜画分のタンパク (BM) 中には目的のバンドが検出されなかった (Fig. 2)。この結果から、2 つの可能性が考えられた。A) イヌ骨髄膜画分中の CD133 タンパク量が検出限界以下で極めて少ない。B) 抗体がネイティブ CD133 を認識できない。A) のことから評価するために、哺乳類細胞である HEK293 細胞に一過性に CD133-HA タンパクを大量発現させ、このタンパクを抗イヌ CD133 モノクローナル抗体が認識するかどうかを検討した。

イヌ CD133-HA タンパクの発現を抗 HA (anti-HA) 抗体を用いて確認した (Fig. 3)。抗イヌ CD133 モノクローナル抗体の全ては、CD133-HA タンパクを認識しなかった (Fig. 3)。

大腸菌発現タンパクを認識するモノクローナル抗体が哺乳類細胞の発現タンパクを認識できない理由として、抗体の抗原認識部位が糖鎖の付加あるいは立体構造の変化によってマスクされているものと考えられた。そこで、糖鎖が付加したヒト CD133 を認識する市販の抗体 AC133 を用いて同様にウェスタンブロットを行った。AC133 は骨髄膜画分のタンパク中には CD133 を検出せず、また HEK293 細胞で発現させたイヌ CD133-HA タンパクを認識しなかった (data not shown)。このことは、AC133 抗体の抗原認識部位がイヌ CD133 には存在しないことを意味しており、AC133 抗体は、CD133 が発現していることが予想されるイヌがん幹細胞の分離には適さないと考えられた。したがって、イヌがん幹細胞分離には、糖鎖が付加したイヌ CD133 タンパクを認識するモノクローナル抗体の作製が必要と考えられた。この抗体を得るために、哺乳類細胞発現系を用いて糖鎖が付加したイヌ CD133 抗原の作製を実施している。

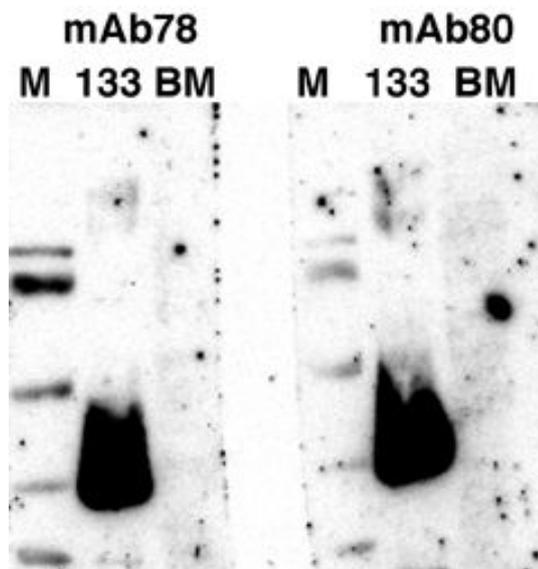


Fig. 2 抗イヌ CD133 モノクローナル抗体 (mAb) を用いた大腸菌発現 CD133 ならびに骨髄膜画分タンパクに対するウェスタンブロット

133: 大腸菌発現 CD133 タンパク、BM: 骨髄膜画分、M: 分子量マーカー

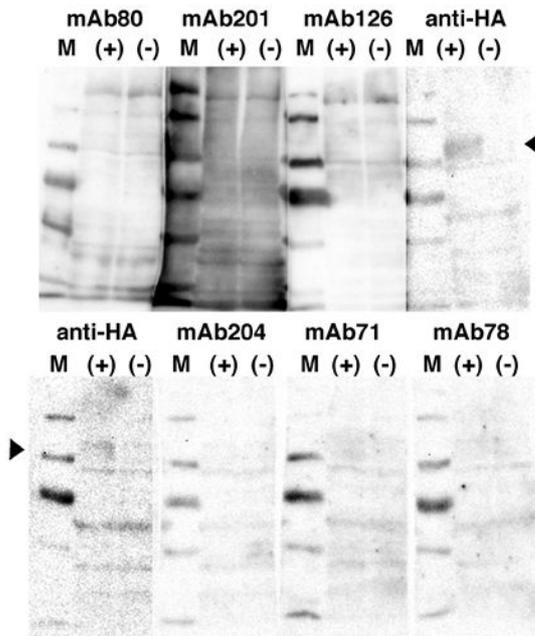


Fig. 3 抗イヌ CD133 モノクローナル抗体 (mAb)を用いた哺乳類細胞発現 CD133-ヘマグルチニン (CD133-HA) タンパクに対するウェスタンブロット

は、陽性コントロールとして抗ヘマグルチニン (Anti-HA) 抗体を用いた CD133-HA タンパクのバンドを示している。(+) : CD133-HA 発現ベクター有り、(-) : CD133-HA 発現ベクター無し、M : 分子量マーカー

### (3) 抗イヌ CD29 モノクローナル抗体

CD29 はヒトにおいてがん幹細胞の表面マーカーとしてばかりではなく、間葉系幹細胞のマーカーとしても知られている。CD133 と同様の過程を経て作製された抗イヌ CD29 モノクローナル抗体の有用性を検討するために、イヌ胎児サンプルを用いて免疫組織化学染色を行った(Fig. 4)。



Fig.4 イヌ胎児組織標本 (縦断面) における CD29 陽性細胞の分布

イヌ胎児組織標本 (縦断面) において、いくつかの領域で CD29 タンパクの発現が観察された。なかでも、イヌ胎児の脊椎の椎体軟骨および血管の間葉系細胞が、抗イヌ CD29 モノクローナル抗体に対して陽性を示した (Fig. 5)。ヒト CD29 が間葉系幹細胞のマ

ーカー分子であることと今回得られた結果、すなわちイヌ胎児の椎体軟骨および血管の間葉系細胞における CD29 の発現を考え合わせると、この抗イヌ CD29 抗体はイヌ間葉系幹細胞を認識する抗体である可能性を示している。しかしながら、この抗イヌ CD29 モノクローナル抗体が認識した間葉系細胞が実際幹細胞であるかどうかを他の幹細胞マーカー (CD44、CD106、SH2 や Thy-1 など) を用いた免疫染色により、共局在していることを示す必要がある。加えて、この抗イヌ CD29 モノクローナル抗体が細胞分離用抗体として有用かどうかの検討も必要である。

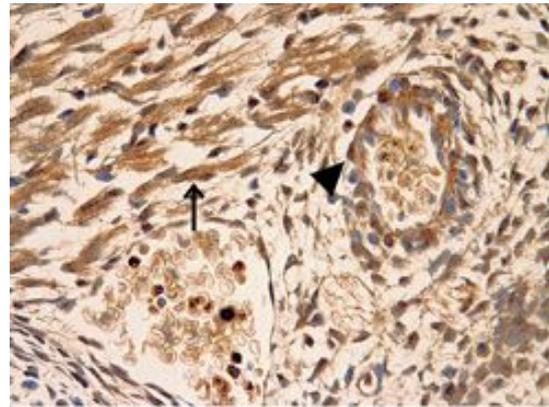


Fig. 5 イヌ脊椎椎体部における CD29 陽性細胞 : 軟骨部、 : 血管

今後、上記に述べた糖鎖が付加した CD133 を認識する抗イヌ CD133 モノクローナル抗体の作製ならびに、得られたモノクローナル抗体の細胞分離用抗体としての有用性を検討する必要がある。さらに他のイヌがん幹細胞表面マーカー候補に対するモノクローナル抗体の作製を予定している。これらモノクローナル抗体を整備し、この抗体を利用したがん幹細胞分離、培養法の確立、それによって得られたがん幹細胞における網羅的遺伝子発現解析による悪性腫瘍毎のがん幹細胞特異分子の特定、そしてその分子をターゲットにした抗体あるいは医薬品の開発が、早期診断、転移や薬効の評価あるいは治療へと応用され、イヌ悪性腫瘍の治療に対する抵抗性の克服へつなげると考えている。

### 5. 主な発表論文等

なし

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

嶋本 良則 (SHIMAMOTO, Yoshinori)

北里大学・獣医学部・助教

研究者番号 : 30552046

(2)連携研究者

北村 浩 (KITAMURA, Hiroshi)

名古屋私立大学・医学系研究科・准教授

研究者番号： 80312403