

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月1日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780318

研究課題名（和文）イヌ乳腺腫瘍細胞への新規分子標的薬投与による化学療法の臨床応用研究

研究課題名（英文） Multiple anti-tumor drug susceptibility analysis using mammary tumor cells derived from companion animals.

研究代表者

渡邊 学（WATANABE MANABU）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教

研究者番号：70376606

研究成果の概要（和文）：

本研究において、抗癌剤の感受性解析により、イヌ・ネコ乳腺腫瘍への化学療法を目指すことを目的とし、一連の研究結果より両種の乳腺腫瘍において、ラパチニブ、ダサチニブが良好な抗腫瘍効果を示すことを実証した。この成果の意義として、これまで標準レジメンの確立されていない同疾患に対して、治療効果の期待できる新規治療法の可能性を示すことができ、これらの抗癌剤の治療導入は寛解率の上昇に大きく貢献すると考えられる。抗癌剤25種類への抗癌剤の感受性の相違および分類と抗癌効果の傾向を見出すことができた。また、臨床応用可能と考えられたラパチニブは、細胞株に投与後、網羅的遺伝子発現解析により発現変化する遺伝子群の同定を行うことができ、同抗癌剤投与による分子機序の一端を解明することができた。また、ネコ乳腺腫瘍細胞株では転移に関連する上皮間葉移行(EMT)のマスター因子である snail の発現が見られたことより、同分子の遺伝子ノックダウン後、抗癌剤を投与による感受性の差を見出した。この結果は EMT による癌転移において転移巣で効果のある抗癌剤を示すことができたと考えられ、悪性度の高いネコ乳腺腫瘍の化学療法において有用な成果を示すことができた。これらの成果を元に、ラパチニブおよびダサチニブのトランスレーショナルリサーチを行うべく、同抗癌剤の安全性試験を実施している。至適投与濃度を決定後、実際の臨床症例に治療を行うことで、本研究の成果を実際に臨床応用し治療率の上昇を目指す。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of the study is indicating effective tumor drugs against canine and feline mammary tumors. As the results of 25 kinds of anti-tumor drug screening test using 6 canine mammary tumor and 8 feline mammary tumor cells, we showed high-sensitive anti-tumor drugs, and moderate effective drugs, and low-sensitive drugs. We focused on lapatinib, and dasatinib, which might be effective anti-tumor drugs against the mammary tumors, and we examined gene and protein expression analysis by the anti-tumor treatments. We showed regulated genes and signaling pathways by lapatinib or dasatinib treatment. Since we observed high expression of snail, which is one of the master molecule of metastasis related EMT, We evaluated the susceptibility change by snail knock down. As the results of snail-KD analysis, several anti-tumor drugs were changed their sensitivity. These results might indicate application of snail expressed tumor therapy. The present study showed the effective anti-tumor drugs against canine and feline mammary tumors, and these results might indicate the application for clinical mammary tumor chemotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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： 乳腺腫瘍 網羅的遺伝子発現解析 化学療法 分子標的薬 伴侶動物

イヌ ネコ トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

獣医臨床領域においてイヌおよびネコの乳腺腫瘍は、最頻発する腫瘍疾患の1つであり、その治療法として外科切除および放射線治療が主であり、抗癌剤を用いた化学療法は小規模症例で報告されているが標準レジメンなどは示されていない。特に、ネコ乳腺腫瘍は90%以上が悪性であり、治癒率の向上が望まれている。

2. 研究の目的

イヌ乳腺腫瘍細胞株6株、およびネコ乳腺腫瘍細胞株8株を用いて網羅的な抗癌剤感受性試験を行うことにより、高感受性を示す抗癌剤を明らかにし、その抗癌作用の分子メカニズムを解明することによりイヌ・ネコ乳腺腫瘍への効果の高い抗癌剤を示すことでこれらの抗癌剤を実際の臨床現場において標準化学療法の確立への可能性を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) イヌ乳腺腫瘍細胞株6株を用いた網羅的抗癌剤感受性解析

イヌ乳腺腫瘍細胞株6株およびネコ乳腺腫瘍細胞株8株へ25種類の抗癌剤を10倍希釈系で投与し、投与3日後に細胞増殖アッセイ法により抗癌剤の細胞増殖抑制率をグラフ化した。同グラフよりIC50値を算出し、

同数値より各細胞株へのそれぞれの抗癌剤の感受性の程度を測定した。

(2) 同一宿主由来の乳腺腫瘍細胞株における原発巣・転移巣での網羅的抗癌剤感受性相違解析

本研究で用いた乳腺細胞株の内、イヌ6株およびネコ5株はそれぞれ同一宿主由来の腫瘍原発巣および転移巣より樹立された細胞株であることより上述(1)の結果を元に、原発・転移による各抗癌剤感受性の相違を検討した。

(3) イヌ乳腺腫瘍へのラパチニブ、ダサチニブ投与による抗癌効果の分子生物学的解析

イヌ乳腺腫瘍株にて高感受性を示す抗癌剤群を用いて、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析やタンパクを用いたウェスタンブロット法にて抗癌剤の効果の分子メカニズムを検討した。

(4) ネコ乳腺腫瘍細胞株を用いた snail 遺伝子ノックダウンによる抗癌剤感受性変化の解析

ネコ乳腺腫瘍細胞株を用いたタンパク発現解析の結果、EMT転移関連分子 snail の発現が確認されたため、同遺伝子を siRNA を用いた遺伝子ノックダウン法を用いて抗癌剤投与試験を行い同遺伝子の発現の有無による抗癌剤感受性の変化について検討した。

4. 研究成果

(1) イヌ乳腺腫瘍株6株、ネコ乳腺腫瘍細胞株8株に25種類の抗癌剤投与実験を行った結果、イヌ乳腺腫瘍では高感受性を示す抗癌剤3種類、奏功性を示す抗癌剤8種類および効果の乏しい抗癌剤5種類を見出した。ネコ乳腺腫瘍では高感受性を示す抗癌剤3種類、奏功性を示す抗癌剤8種類および効果の乏しい抗癌剤7種類を見出した。

(2) 本研究に使用した細胞株のうち、イヌ乳腺腫瘍株3対およびネコ乳腺腫瘍細胞株2対では同一患畜から原発巣および転移巣より細胞株を樹立していることより、同一患畜における原発巣由来および転移巣由来細胞株での感受性の相違を比較した。その結果、イヌ乳腺腫瘍株では、CHM株で6種類、CIP株4種類で、CNM株10種類での感受性の相違を認めた。一方、ネコ乳腺腫瘍株では、FMC株で16種類、FON株で11種類の抗癌剤で感受性の相違が認められた。

(3) 上述の網羅的抗癌剤感受性試験の結果よりイヌおよびネコ乳腺腫瘍細胞株にて感受性を示す抗癌剤が見出されたことより、特に分子標的薬ラパチニブ、ダサチニブに着目してその抗癌作用の分子メカニズムを解析した。その結果、標的分子のタンパク量や活性の低下が認められたことより、標的分子への作用が抗癌メカニズムの一部を担うと考えられ、また、これらの分子標的薬は獣医学領域における乳腺腫瘍の化学療法での応用の可能性を示すことができた。さらに、DNAマイクロアレイを用いて各イヌ乳腺腫瘍細胞株での分子標的薬投与における網羅的遺伝子発現を解析し、分子標的薬投与により発現変化する遺伝子群

を見出した。

(4) ネコ乳腺腫瘍細胞株を用いたタンパク発現解析の結果、転移に関連する上皮間葉移行(EMT)のマスター因子であるsnailの発現が見られたことより、同分子の遺伝子ノックダウン後、抗癌剤を投与による感受性の差を見出した。この結果はEMTによる癌転移において転移巣で効果のある抗癌剤を示すことができたと考えられ、悪性度の高いネコ乳腺腫瘍の化学療法において有用な成果を示すことができた。

これらの研究成果を元に、ラパチニブおよびダサチニブのトランスレーショナルリサーチを行うべく、同抗癌剤の安全性試験を実施している。至適投与濃度を決定後、実際の臨床症例に治験を行うことで、本研究の成果を実際に臨床応用し治癒率の上昇を目指す。

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3件)

1. Takeuchi Y, Fujino Y, Watanabe M, Takahashi M, Nakagawa T, Takeuchi A, Bonkobara M, Kobayashi T, Ohno K, Uchida K, Asano K, Nishimura R, Nakayama H, Sugano S, Ohashi Y, Tsujimoto H. Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A retrospective cohort study. Vet J. 査読あり doi:pii:S1090-0233(12)00522-9. 10.1016/j.tvjl. 2012.11.018. (2013)
2. Tomiyasu H, Watanabe M, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Ohno K, Sugano S, Tsujimoto H. Regulation of expression of ABCB1 and LRP genes by mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway and its role in generation of side

population cells in canine lymphoma cell lines. Leuk Lymphoma. 査読あり 54:1309-1315. doi: 10.3109/10428194.2012.751529. (2013)

3. Tei M, Uchida K, Chambers JK, Harada H, Takahashi M, Nishimura R, Watanabe M, Nakayama H. Mammary Lipid-Rich Carcinoma with Extensive Amyloid Deposition in a Dog. J Vet Med Sci. 査読あり 74:809-811(2012)

[学会発表] (計 20 件)

1. 渡邊 学 シンポジウム 医学と獣医学のクロストークー分子標的薬による悪性腫瘍治療ー 医学領域における癌の分子標的薬の現状 (II-A-32) 第 9 回 日本獣医学内科アカデミー学術大会 2013 年 2 月 24 日 パシフィコ横浜 神奈川県
2. 木村 絵里 渡邊 学 萱橋 朋子 西出 彩花 川畑 実香 山崎 薫 野澤 恵里 松下 智紀 山本 実加子 チェン アイリス 菅野 純夫 伴侶動物の乳癌における網羅的抗癌剤感受性解析(P-1142) 第 71 回 日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日 札幌教育文化会館 北海道
3. 萱橋 朋子 渡邊 学 西出 彩花 Chen Iris 山崎 薫 野澤 恵里 川畑 実香 木村 絵里 中川 貴之 望月 学 西村 亮平 佐々木 伸雄 菅野 純夫 ネコ乳腺腫瘍細胞株を用いた上皮間葉転換関連分子のタンパク発現および抗癌剤感受性解析 (HS-32) 第 154 回日本獣医学会学術集会 2012 年 9 月 15 日 岩手大学 岩手県
4. 萱橋 朋子 渡邊 学 西出 彩花 Iris Chen 山崎 薫 川畑 実香 野澤 恵里 中川 貴之 望月 学 西村 亮平 佐々木 伸雄 菅野 純夫 イヌ乳腺腫瘍細胞株を用いた網羅的遺伝子・タンパク発現解析による分子病理の解明(BP-39) 第153回日本獣医学会学術集会 2012年3月29日 大宮ソニックシ

ティ 埼玉県

5. 萱橋 朋子 渡邊 学 西出 彩花 チェン アイリス 野澤 恵里 山崎 薫 川畑 実香 中川 貴之 望月 学 西村 亮平 佐々木 伸雄 菅野 純夫 イヌ乳腺腫瘍細胞株を用いた網羅的抗癌剤感受性解析(10-06) 日本獣医内科学アカデミー/日本獣医臨床病理学会2012年大会 2012年2月18日 パシフィコ横浜 神奈川県

[その他]

東京大学・新領域創成科学研究科・メディカルゲノム専攻・ゲノム制御医科学分野ホームページ
<http://ssmgs.net/lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 学 (WATANABE MANABU)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教
研究者番号：70376606

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし