

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850211

研究課題名(和文) 犬のB細胞型リンパ腫における新規腫瘍抗原の同定と診断・治療への応用

研究課題名(英文) Identification of novel tumor antigens of canine B-cell lymphoma and development of diagnostic and therapeutic application.

研究代表者

古家 優 (Furuya, Masaru)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・助教

研究者番号：30500706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍抗原は癌細胞に発現するタンパク質であり、新規の診断法や治療法の開発に有用な素材として注目されている。本研究では、犬のB細胞型リンパ腫における新規腫瘍抗原の同定を試みた。その結果、26種の腫瘍抗原候補遺伝子を同定することができた。それぞれのタンパク質と血清の反応性を調べたところ、リンパ腫に罹患した犬17頭中13頭の血清が、単離された16種のいずれかのタンパク質と陽性反応を示した。一方、10頭の健常犬血清と陽性反応を示す腫瘍抗原候補タンパク質は確認されなかった。今後、反応が認められたそれぞれの組換えタンパク質を作製し、それらを抗原とした定量的ELISAシステムを樹立することを目指す。

研究成果の概要(英文)：Tumor-associated antigens (TAAs), which are produced in tumor cells, are applied as biological markers, tumor vaccine antigens, and molecular targets of therapeutic drugs. In this study, we aimed to identify the TAAs of canine B cell lymphoma to develop novel diagnostic and therapeutic procedures by serological immunoscreening with canine testicular cDNA expression library. In this study, we have primarily identified 26 different TAAs by immunoscreening. The results of serological mini-arrays of identified antigens showed that 13 of 17 sera of lymphoma-dog reacted with some antigens in contrast to 10 healthy dogs reacted with no antigens. These findings will contribute to the development of diagnostic technologies for patient dogs, although it is needed that establishment of quantitative ELISA system to measure serum antibody titer to those antigens.

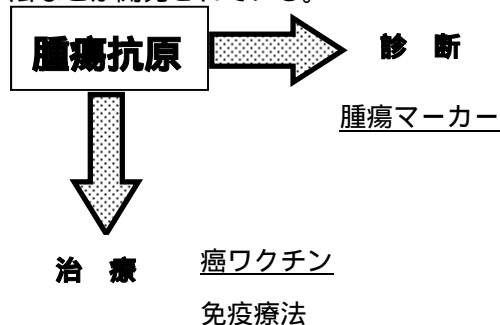
研究分野：獣医内科学

キーワード：腫瘍抗原

1. 研究開始当初の背景

近年、日本では犬・猫等の伴侶動物の寿命が飼養管理の改善や予防獣医学の発展により飛躍的に延長したが、その反面、加齢に伴う疾患が急激に増加している。特に、高齢犬では悪性腫瘍が死亡原因の半数以上を占めるとも報告されており、その割合がさらに増加傾向にあるため、治療法の改善や開発が急務である。

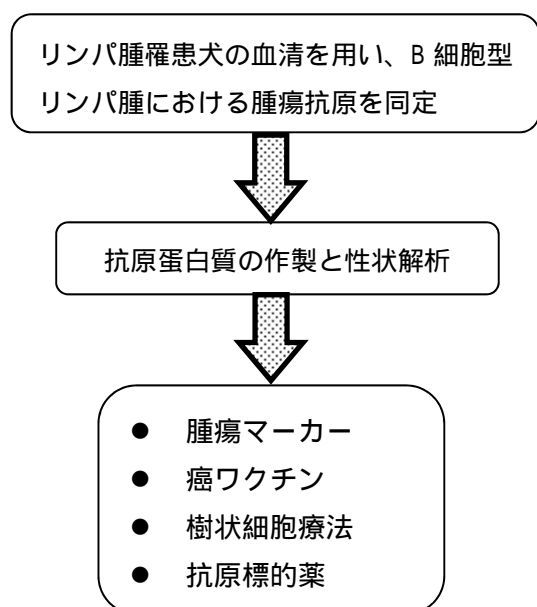
人の医学領域では悪性腫瘍に対する特異的な診断法や有効な治療法の開発が進み、成績が向上し続けている。一方、最近では伴侶動物にも高度獣医療が求められるようになり、癌治療においては、これまでの外科療法に加え、化学療法や放射線療法も一般的に実施されるようになってきた。しかしながら、人医療において次世代の新規癌治療法として大きく期待されている免疫療法に関しては獣医療分野において、ほとんど研究が進んでいない。腫瘍抗原は癌細胞に特異的に発現するタンパク質であり、それを利用した免疫療法に関する研究は古くから行われてきたが、1991年に Boon らがメラノーマ細胞を認識する細胞傷害性T細胞 (CTL) を誘導する抗原を同定 (Science 1991;254(5038):1643-7) して以降、特に急速に研究が発展してきた。CTL が特異的に癌抗原を認識して攻撃すれば、正常細胞を攻撃することなく (すなわち副作用なく)、抗癌作用をもたらす事が可能となる。この現象を利用して、癌ワクチンによる免疫療法、さらには樹状細胞を介して抗原提示を強化する方法、あるいは抗原を認識できるレセプターを CTL に直接遺伝子導入する方法などが開発されている。



一方、特異的腫瘍抗原を分離する有効な手段として、Sahin らが SEREX 法を報告した (PNAS 92(25):11810-11813, 1995)。この方法は、癌患者の血清中には体内の腫瘍細胞を認識する IgG 抗体が含まれており、それを用いて対象の腫瘍抗原を分離するという原理に基づいている。人ではこれまでに多数の抗原が同定されており、診断マーカーとして有用なものや治療のターゲット候補となりうる抗原が多数含まれるため、非常に実施価値が高い。本研究では、この SEREX 法を用いて単離された犬の B 細胞型リンパ腫における新規の腫瘍抗原候補タンパク質を利用し、新たな診断法や治療法の開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、犬のリンパ腫における新規腫瘍抗原を腫瘍マーカーや腫瘍免疫療法、抗原標的治療に応用することである。遺伝子ライブラリーと B 細胞型リンパ腫の罹患犬の血清を用いた免疫学的スクリーニングを実施し、抗原候補タンパク質をコードするファージクローンを単離する。その後、有用な特異的抗原を絞り込み、下図のように研究を展開する。



犬のリンパ腫は、詳細な細胞学的・免疫学的分類が可能となってきた。これらの分類は予後因子として非常に重要であり、化学療法に対する反応性や生存期間との関連性が多数報告されている。しかしながら、治療の根幹となる化学療法では、一時的な寛解は得られるものの、その後には再燃を来すため、人のリンパ腫と比べると全般的な予後は不良である。国内外で様々な治療成績が多数報告されているが、化学療法単独では、これ以上飛躍的に治療成績を向上させるのは、やや困難な感がある。一方で、治療効果を判定するためのモニタリング法についても検討されているものの、実際には臨床症状やリンパ節の大きさで判定するしかないというのが現状である。本研究では、犬のB細胞型リンパ腫に特異的な抗原を同定することにより、その中から診断や治療効果判定に有用な腫瘍マーカーを探索することが可能である。また、特異的抗原そのものを利用した免疫療法への応用は、腫瘍細胞への攻撃を強化できるという大きな特徴を持っている。加えて、特異抗原を直接の標的とする抗体療法等が適用できれば、さらに腫瘍を縮小させる可能性を高められると推測される。実際、これらの化学療法と免疫療法の併用は、既に人のB細胞型リンパ腫に適用され、治療成績を大きく改善してきている。したがって、犬のリンパ腫においても化学療法と免疫療法を併用すれば、治療成績をこれまで以上に向上させられる可能性がある。近年、動物と人の比較腫瘍学が注目されているが、自然発症し、動態が人のものと類似している犬のリンパ腫は恰好の臨床モデルとも言える。将来的にはリンパ腫を発症した犬を対象に大学病院等で治療を行い、様々なデータの集積を目指す予定であるが、そこから得られる成果を人の医療へ還元することが可能であるという点においても、本研究の意義は非常に大きいと考えられる。

3. 研究の方法

(1)SEREX スクリーニングによるクローンの選別と遺伝子解析

Sahinらの方法に基づきSEREXスクリーニングを実施する。すなわち、大腸菌にファージを感染させ、プラークを形成させる。IPTGによってタンパク質発現を誘導し、ニトロセルロースメンブレンに転写する。血清を一次抗体として反応させ、二次抗体は抗イヌIgGを用い、発色させて陽性プラークを回収する。スクリーニングを3回程度繰り返し、単一のクローンを分離する。得られたcDNAの塩基配列を解析し、データベースを用いて遺伝子の同定を行う。

(2)特異抗原の選別と腫瘍マーカーへの応用

(1)で得られたファージクローンをを用いて小規模のプロテインアレイを実施する。すなわち、分離したファージクローンから誘導発現させたタンパク質をまとめてメンブレンにプロットし、複製する。それぞれにリンパ腫罹患犬血清を一次抗体として反応させ、多数の候補抗原の中から罹患犬に陽性率の高い抗原を発色させ選別する。選別した抗原の組換えタンパク質を哺乳類株化細胞もしくは大腸菌を用いて作製し、それをコートしたプレートを用いてELISA法を実施する。治療前後における血中の抗体価を比較する等、腫瘍マーカーとしての有用性を検討する。

4. 研究成果

腫瘍抗原は癌細胞に特異的に発現するタンパク質であり、腫瘍診断マーカー、癌ワクチン、免疫療法、標的治療薬などの開発に有用な素材として注目されている。本研究計画では、近年特に治療成績の向上が求められている犬のリンパ腫を対象とし、cDNAファージライブラリーから患者血清を用いた免疫学的スクリーニングである

SEREX 法を用いて B 細胞型リンパ腫における新規の腫瘍抗原の同定を試みた。

平成 26 年度までに、腫瘍抗原候補タンパク質をコードするファージクローンが 26 種得られ、それらの遺伝子を同定することができた（下図 1）

Antigen No.	Predicted gene	Number of clones
1	Coiled-coil domain containing 110 (CCDC110)	22
2	Coiled-coil domain containing 30 (CCDC30)	6
3	Kinesin family member 15 (KIF15)	6
4	Uncharacterized LOC607048 (LOC607048)	4
5	Cancer antigen 1 (CAGE1)	3
6	Protein phosphatase 1, regulatory subunit9A, transcript variant 4 (PPP1R9A)	3
7	Acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl, transcript variant 2 (ACOX1)	2
8	Bromodomain and WD repeat domain containing 3 (BRWD3)	2
9	CCCTC-binding factor (zinc finger protein)-like, transcript variant 1 (CTCF1)	2
10	Nomascus leucogenys synaptotagmin-like protein 2-like, transcript variant 2 (SYTL2)	2
11	Coiled-coil domain containing 88A, transcript variant 2 (CCDC88A)	1
12	Uncharacterized LOC484356 (LOC484356)	1
13	Nuclease-sensitive element-binding protein 1-like (YBX1)	1
14	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 18-like (ADAM18)	1
15	WD repeat domain 87 (WDR87)	1
16	Retinoic acid induced 14 (RAI14)	1
17	Polymerase (DNA directed) iota (POLI)	1
18	EF-hand calcium binding domain 6 (EFCAB6)	1
19	Testis specific, 10, transcript variant 1 (TSGA10)	1
20	Hermansky-Pudlak syndrome 4, transcript variant 1 (HPS4)	1
21	Transmembrane BAX inhibitor motif containing 6 (TMBIM6)	1
22	FBR-MuSV ubiquitously expressed, transcript variant 2 (FAU)	1
23	Synaptonemal complex protein 1, transcript variant 2 (SYCP1)	1
24	Chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta), transcript variant 1 (CCT2)	1
25	PNN-interacting serine/arginine-rich protein, transcript variant 7 (PNISR)	1
26	Sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1, transcript variant 2 (SPECC1)	1

図 1：同定された腫瘍抗原候補遺伝子

また、ファージクローンが発現するタンパク質と健常犬血清 (n=10) およびリンパ腫に罹患した犬の血清 (n=17) を用いて、プロテインアレイを行い、その反応を定性的に調べたところ、リンパ腫に罹患した犬 17 頭中 13 頭の血清が、単離された 16 種のいずれかのタンパク質と陽性反応を示した。中でも、犬の既報タンパク質 ACOX1、HPS4、KIF15、SYCP1、TMBIM6 と相同性の高いタンパク質 5 種が、17 頭中 3 頭 (17.6%) で陽性反応を示した。一方、10 頭の健常犬血清と陽性反応を示す腫瘍抗原候補タンパク質は確認されなかった（下図 2）。

Antigen No.	陽性反応数	(%)
1. CCDC110	2/17	12
3. KIF15	3/17	18
5. CAGE1	1/17	5.8
7. ACOX1	3/17	18
9. CTCFL	2/17	12

11. CCDC88A	1/17	5.8
16. RAI14	1/17	5.8
17. POLI	2/17	12
18. EFCAB6	1/17	5.8
19. TSGA10	2/17	12
20. HPS4	2/17	12
21. TMBIM6	3/17	18
22. FAU	1/17	5.8
23. SYCP1	2/17	12
24. CCT2	2/17	12

図 2：腫瘍抗原候補タンパク質と患者血清の反応性

また 4 頭の B 細胞型リンパ腫罹患犬について、発症時と完全寛解時の血清で同定された抗原候補タンパク質との反応性を比較したところ、それぞれ発症時と完全寛解時の血清で反応した抗原が異なった。したがって、定性的な反応系では、特異的なタンパク質を同定するには至らなかったため、大腸菌発現系を用いて ACOX1、HPS4、KIF15、SYCP1、TMBIM6 それぞれの組換えタンパク質を作製し、それらを抗原とした ELISA システムを樹立するとともに臨床サンプルを増やし解析中である。

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 9 件)

Localization of heat shock protein 110 in canine mammary gland tumors.

Okada S, Furuya M, Takenaka S, Fukui A, Matsubayashi M, Tani H, Sasai K.

Vet Immunol Immunopathol. 167(3-4):139-46, 2015. doi: 10.1016/j.vetimm.2015.07.012.

査読あり

A retrospective study of the

development of 210 fractures in rabbits and study of the utility of clinical imaging by micro-computed tomography for diagnosis.

Sasai H, Fujita D, Tagami Y, Seto E, Denda Y, Hamakita H, Ichihashi T, Okamura K, Furuya M, Tani H, Sasai K, Yamate J.

J Am Vet Med Assoc. 246(12):1339-44, 2015. doi: 10.2460/javma.246.12.1339. 査読あり

The detection of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* from cats with nasal inflammation in Japan.

Saeki J, Katsukawa C, Matsubayashi M, Nakanishi H, Furuya M, Tani H, Sasai K.

Epidemiol Infect. 12(1): 1-6, 2015. doi: 10.1017/S0950268814003550. 査読あり

Identification of novel tumor-associated antigens in canine mammary gland tumor.

Furuya M, Funasaki M, Tani H, Sasai K.

Vet Comp Oncol. 13(3):194-202, 2015. doi: 10.1111/vco.12034. 査読あり

Profiling of serum metabolites in canine lymphoma using gas chromatography mass spectrometry.

Tamai R, Furuya M, Hatoya S, Akiyoshi H, Yamamoto R, Komori Y, Yokoi S, Tani K, Hirano Y, Komori M, Takenaka S.

J Vet Med Sci. 76(11): 1513-1518, 2014. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/76/11/76_14-0043/_article. 査読あり

Elongation factor-1 is a novel protein associated with host cell invasion and a potential protective antigen of *Cryptosporidium parvum*.

Matsubayashi M, Kimata I, Uni S, Lillehoj HS, Matsuda H, Furuya M, Tani H, Sasai K.

J Biol Chem. 288(47): 34111-34120, 2013. doi: 10.1074/jbc.M113.515544. 査読あり

Infectivity of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type relative to the small number of oocysts in immunodeficient and immunocompetent neonatal and adult mice.

Nagano-Koyashiki S, Matsubayashi M, Kimata I, Furuya M, Tani H, Sasai K.

Parasitol Int. 62 (2): 109-11, 2013. doi: 10.1016/j.parint.2012.11.001. 査読あり

〔学会発表〕(計 4件)

Furuya M, Funasaki M, Okada S, Tani H, Sasai K.

Identification of novel tumor-associated antigens in canine mammary gland tumor. Asian Meeting of Animal Medical Specialties 2015. 2015年11月1~2日, クアラルンプール(マレーシア)

田舞理央, 石塚泰雄, 佐伯潤, 横井慎一, 松岡聡, 古家優, 鳩谷晋吾, 秋吉秀保, 竹中重雄, 小森雅之

犬のリンパ腫における血液代謝物プロファイル解析

第11回 日本獣医内科学アカデミー 2015年2月20日~22日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

古家優, 船崎正治, 谷浩行, 笹井和美
イヌの乳腺腫瘍における新規腫瘍抗原の同定

第157回 日本獣医学会 2014年9月9日~12日 北海道大学(北海道・札幌市)

川口太平, 古家優, 谷浩行, 笹井和美
イヌのT細胞性リンパ腫における新規腫瘍抗原の同定

第 157 回 日本獣医学会 2014 年 9 月 9 日 ~
12 日 北海道大学 (北海道・札幌市)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/int/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

古家 優 (FURUYA, Masaru)
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科
助教
研究者番号 : 30500706