

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450426

研究課題名(和文) 犬の血管肉腫の悪性増殖におけるMUC1様分子の役割の解明と新規診断法への応用

研究課題名(英文) Mechanistic study of the role of MUC1-like molecule in malignant proliferation of canine hemangiosarcomas

研究代表者

酒井 洋樹 (Sakai, Hiroki)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：40283288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：市販抗ヒトMUC1抗体を用いて、犬の血管肉腫を免疫染色したところ、腫瘍細胞は強陽性を示した。また犬血管肉腫細胞株でウェスタンブロットにおいて、22kDaと予想より小さい陽性バンドが得られ、免疫沈降後のペプチド解析で、Peroxiredoxin6 (Prdx6)であることが明らかとなった。さらに犬血管肉腫細胞を用いたPrdx6のknockdownによって、アポトーシスの誘導ができた。また、Prdx6が腫瘍細胞の増殖や浸潤を促進する際に関与するとされるuPA/uPARの免疫染色では、犬の血管肉腫で強陽性像が認められ、Prdx6とuPA/uPARは犬の血管肉腫の悪性増殖に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemically, canine hemangiosarcomas were strongly positive using commercially provided anti human MUC1 antibody. In canine hemangiosarcoma cell lines, lesser molecular weight band (22kDa) was detected with Western blotting. Peptide sequencing after immunoprecipitation with the antibody revealed the antigen was canine peroxiredoxin 6(Prdx6). Apoptosis was induced in canine hemangiosarcoma cell lines by Prdx6 knockdown with small interfering RNA method. uPA/uPAR, which associating with Prdx6 in malignant proliferation and invasion, were strongly positive in canine hemangiosarcomas. In conclusion, Prdx6 and uPA/uPAR may associate with in malignant proliferation of canine hemangiosarcomas.

研究分野：獣医病理学

キーワード：血管肉腫 犬 Peroxiredoxin 6 RNA干渉 培養細胞 アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

血管肉腫はヒトおよび犬の難治性悪性腫瘍である。ヒトでは発生率は低く、研究が進んでいない rare tumor の一種であるが、犬の発生率はヒトに比べ数十倍高い。我々は、過去に 8 株の犬血管肉腫の株化細胞株を樹立し、それらの性状を病理組織材料と比較解析する中で、犬血管肉腫における市販抗ヒト MUC1 抗体 (Anti-MUC1 抗体 [EP1024Y]) に反応する分子の高発現を見出した。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が作出した培養細胞株および犬血管肉腫の病理あるいは臨床材料を用いて、市販抗ヒト MUC1 抗体 (Anti-MUC1 抗体 [EP1024Y]) と反応する分子の同定とこの分子の血管肉腫の悪性増殖における役割の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 犬血管肉腫由来培養細胞株における Anti-MUC1 抗体 [EP1024Y] に反応する分子の発現解析および分子の同定

犬血管肉腫由来培養細胞 8 株 (JuA1, JuB2, JuB4, Re11, Re12, Re21, Ud2 および Ud6) の細胞様溶解液で、MUC1 様分子の発現を、抗ヒト MUC1 ウサギポリクローナル抗体 (Anti-MUC1 抗体 [EP1024Y], Abcam 社) を用いて SDS-PAGE およびウェスタンブロットングで検討した。

さらに、この MUC1 様分子の正確な分子情報を得るために、同じ抗体と発現が比較的強い JuB2 の細胞溶解液を用い、免疫沈降法にて同抗体と結合する分子を精製し、同分子の N 末端部のアミノ酸配列を解析した

(島津テクノリサーチ受託)。

### (2) 犬血管肉腫およびにおける peroxiredoxin (PRDX) 6 の発現

上記の免疫沈降法の結果より、本抗体が反応していた分子は PRDX6 であることが判明したことを受け、PRDX6 に対する抗体を用い、犬の血管肉腫および良性の血管腫の免疫染色を行った。

### (3) 犬の血管肉腫細胞株における、腫瘍細胞の増殖に対する PRDX 6 の関与の検討

PRDX 6 の犬の血管肉腫の機能を解析するために、イヌ PRDX6 ノックダウンによる血管肉腫細胞への影響を検討した。犬の血管肉腫腫瘍細胞株である Ud2, Re21, JuB2, JuA1 を用い低分子干渉 RNA (siRNA) 法を用い、犬 PRDX6 に対する siRNA を数種類作製

(stealth RNAi, invitrogen 受託) し、1nM, 10nM の濃度で、RNAmix (invitrogen) を用いて、48 および 72 時間インキュベートして、犬 PRDX 6 の発現の抑制をおこなった。また、コントロールとして同じ塩基比率で配列の異なるスクランブル RNA を用いた。

PRDX6 の mRNA の発現はリアルタイム RT-PCR 法で半定量的に評価した。タンパク質量は抗 PRDX6 抗体を用いた SDS-PAGE およびウェスタンブロットングで検討した。

さらにアポトーシスの誘導を、AnnexinV/PI 法、DAPI による核の断片化の検出で評価した。

#### (4) 犬血管系腫瘍における uPA/uPAR の免疫組織化学的検討

PRDX6 が細胞外基質分解酵素系である uPA/uPAR システムを介して、腫瘍細胞の浸潤増殖を促進することが知られているので、犬の血管肉腫と血管腫との間での uPA と uPAR の発現を免疫染色にて検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 犬血管肉腫由来培養細胞株における Anti-MUC1 抗体 [EP1024Y] に反応する分子の発現解析および分子の同定

Anti-MUC1 抗体 [EP1024Y] に対する免疫反応は JuA1, JuB2, JuB4, Re12, Re21, Ud2 および Ud6 で、22kDa に認められた。一方、Re11 株では発現を認めなかった。22 kDa は予想される MUC1 分子の分子量 (約 150 kDa 以上) であるため、MUC1 以外の分子との交差反応を想定し、JuB2 の細胞溶解液を用いた免疫沈降法にて N 末端部のアミノ酸配列を解析した結果、PGLLLLGDEAPNFEANTTIG の配列が得られ、データベースによる検索により犬 PRDX6 (XP\_537190.3) であることが判明した。

##### (2) 犬血管系腫瘍における PRDX6 の発現

PRDX6 に対する抗体を用い、犬の血管肉腫組織を免疫染色すると高率に陽性を示し、良性の血管腫では陰性で、さらに肉芽組織内の新生血管内皮細胞も陽性を示すことが明らかとなった (図 1)。

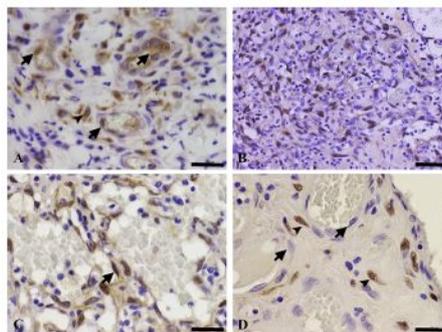


図 1 PRDX6 の免疫染色  
A, 肉芽組織内の新生血管 (矢印), B, C 脾臓の血管肉腫, 矢印は核陽性を示す。D, 皮膚の血管腫腫瘍細胞 (矢印) は陰性。

##### (3) 犬の血管肉腫細胞株における、腫瘍細胞の増殖に対する PRDX6 の関与の検討

siRNA 法によって、犬 PRDX6 mRNA はコントロールに比較して有意に減少し、また犬 PRDX6 タンパク質量も有意に減少していた (図 2)。

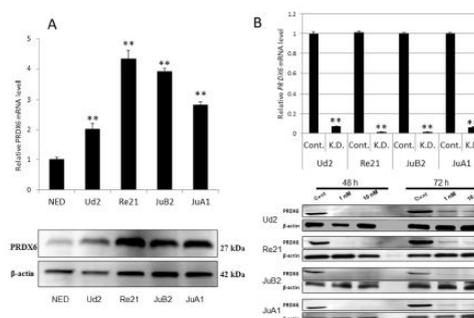


図 2 犬血管肉腫細胞における PRDX6 の発現 (A) と siRNA 法による PRDX6 のノックダウン (B)  
A, 正常犬内皮細胞 (NED) に比較して、血管肉腫細胞では PRDX6 が過剰に発現していた。B, siRNA によって、PRDX6 の mRNA, タンパク質ともに発現が減少した。

また、siRNA 処理後、48 時間、72 時間で有意に細胞生存率が減少した (図 3)。

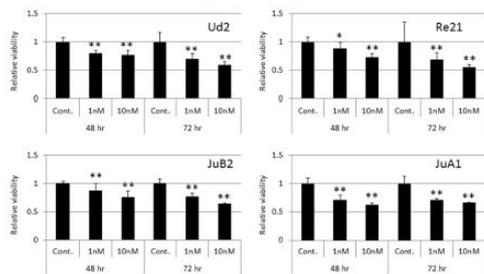


図3 PRDX6のsiRNA処理後の細胞生存率

Annexin V/PI染色による初期アポトーシス細胞の検出では、siRNA処理後、48時間、72時間で有意にAnnexin V+/PI-細胞は増加した(図4)。

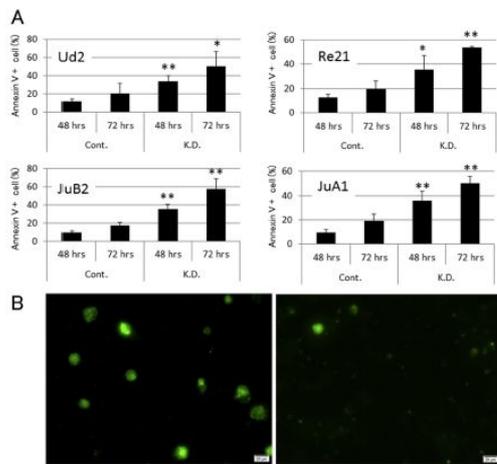


図4 Annexin V/PI染色によるアポトーシス細胞の検出

DAPI染色による核の断片化細胞の検出では、siRNA処理後、48時間、72時間で有意に核の断片化がみられた細胞は増加した(図5)。

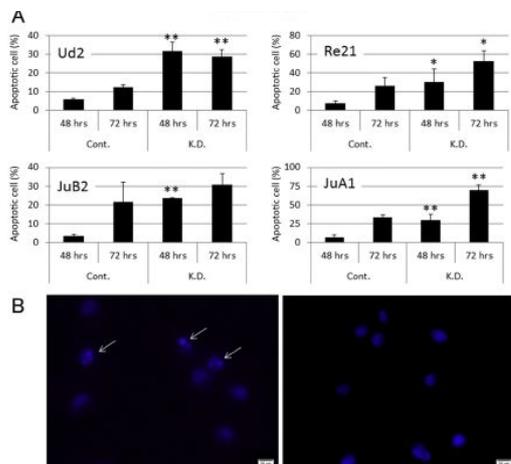


図5 DAPI染色による核の断片化矢印は核が断片化した細胞を示す。

以上の点から、犬の血管肉腫において、PRDX6が増殖や細胞生存に関与していることが示唆され、特にアポトーシスの回避に関与しているものと考えられた。

#### (4) 犬血管系腫瘍におけるuPA/uPARの免疫組織化学的検討

犬血管肉腫ではuPAとuPARの発現がみられ(図6,7)、特にuPAとuPARの両方が陽性を呈する血管肉腫では、Ki-67陽性率で示される細胞増殖活性がuPA-/uPA+の例に比較して、有意に高いことが示された(表1)。

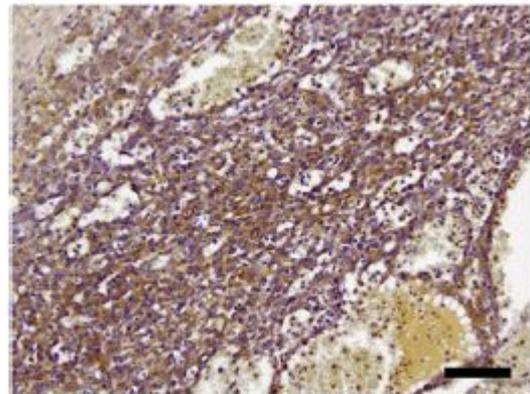


図6 犬の血管肉腫におけるuPAの免疫染色腫瘍細胞はuPAに強く陽性を示す。

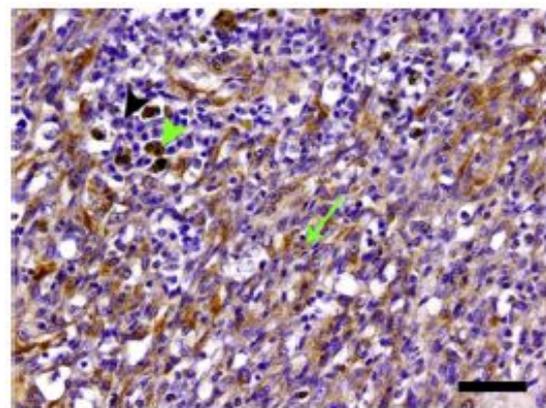


図7 犬の血管肉腫におけるuPARの免疫染色腫瘍細胞はuPARに強く陽性を示す(緑矢印)。黒矢頭は形質細胞、緑矢頭はマクロファージで、陰性である。

表1 犬血管肉腫と血管腫における uPA および uPAR の発現と細胞増殖活性

Summary of immunohistochemical studies of splenic and non-splenic haemangiosarcomas and cutaneous haemangiomas

Score	Haemangiosarcomas (n = 57)				Haemangiomas (n = 26)	
	Splenic (n = 41)		Non-splenic (n = 16)		uPA	uPAR
	uPA	uPAR	uPA	uPAR		
-	11	0	4	0	25	10
1+	16	8	6	6	1	4
2+	7	15	4	5	0	2
3+	7	18	2	5	0	2
+ cases (%)	73.2 (n = 30)*	100 (n = 41)*	75.0 (n = 12)*	100 (n = 16)*	3.8 (n = 1)	30.7 (n = 8)
uPA/uPAR expression						
	Average K67 I.I. (% ± SD)					
+ / +	96.3 ± 13.9*		23.9 ± 15.8*			2.1 ± 0.7
- / +	17.0 ± 6.5		10.4 ± 7.6			
+ / -	0		0			
- / -	0		0			

\*Tumors were subject to IHC to determine expression of urokinase plasminogen activator (uPA), uPA receptor (uPAR) and K67. Scores for uPA and uPAR expression as well as the K67 labelling index (LI) are shown. Scores are: - <10% of tumour cells labelled; 1+ , 10–25% of tumour cells labelled; 2+ , 25–75% of tumour cells labelled; 3+ , >75% of tumour cells labelled.  
\*Significantly higher than that of HA (P < 0.05).  
\*Significantly higher than for uPA+ / uPAR+ HSAs and HAs (P < 0.05).

以上より ,uPA および uPAR の発現は犬の血管肉腫の悪性増殖に関与している可能性が示唆された。

結論として, PRDX6 の高発現は犬血管肉腫において, アポトーシスの回避に関与する一つの因子と考えられた。また, 犬の血管肉腫で uPA および uPAR の両者の発現がみられる症例は細胞増殖活性が高い点から, uPA/uPAR 系も犬の血管肉腫の悪性増殖への関与があるものと考えられた。さらに, 直接的な証拠は示せなかったが, 過去の報告から PRDX6 は uPA/uPAR 系を更新することも報告されている点から, 犬の血管肉腫においても, PRDX6 の高発現が uPA/uPAR 系の亢進に関与している可能性が高く, 今後治療標的の一つとして, PRDX6 および uPA/uPAR 系が挙げられる可能性を見出した。

### 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2件)

1. Anwar S, Yanai T, Sakai H.  
Immunohistochemical Detection of Urokinase Plasminogen Activator and Urokinase Plasminogen Activator Receptor in Canine Vascular Endothelial Tumours. J Comp Pathol. 2015 153(4):278-82. (査読有)
2. Anwar Sh, Yanai T, Sakai H.  
Overexpression of Peroxiredoxin 6 Protects Neoplastic Cells against Apoptosis in Canine Haemangiosarcoma. J Comp Pathol. 2016 155(1):29-39. (査読有)

[学会発表](計1件)

1. Shehata Ibrahim Anwar, 酒井 洋樹, 柳井 徳磨. イヌの血管肉腫と皮膚血管腫におけるウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子とその受容体に関する免疫組織学的検査 第157回日本獣医学会学術集会 (2014.08), 札幌

[図書](計1件)

1. 酒井洋樹(編著):小動物における細胞診の初歩の初歩 増補改訂版,チクサン出版, 2016.

[産業財産権]

[その他]

### 6. 研究組織

- (1)研究代表者  
酒井 洋樹 (Sakai, Hiroki)  
岐阜大学・応用生物科学部・准教授  
研究者番号: 40283288
- (2)研究分担者  
村上 麻美 (Murakami, Mami)  
岐阜大学・応用生物科学部・助教  
研究者番号: 30597125
- (3)連携研究者
- (4)研究協力者  
Anwar, Shehata Ibrahim