

機関番号：10105

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21880008

研究課題名（和文） 免疫寛容誘導因子 Gpnmb の発現抑制による犬悪性黒色腫の新規免疫療法に関する研究

研究課題名（英文） Breaking immunological tolerance to canine malignant melanoma by inhibition of Gpnmb expression: a new approach for melanoma immunotherapy

研究代表者

富張 瑞樹 (TOMIHARI MIZUKI)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：00552754

研究成果の概要（和文）：本研究では、犬の悪性黒色腫における免疫寛容誘導因子 Gpnmb に関して、その遺伝子配列を解析するとともに、Gpnmb mRNA 発現量が著しく高い犬悪性黒色腫細胞株が存在することを明らかにした。また、悪性黒色腫の自然発症犬では、Gpnmb の mRNA 発現量がすべての症例 (n=4) において増加しており、他の免疫寛容誘導因子と比較して最も高い発現量を認めた。これにより、Gpnmb の犬悪性黒色腫における発現動態が初めて明らかにされるとともに、免疫寛容誘導因子として主要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Gpnmb is a negative regulator of T lymphocyte activation, and also a tumor-associated antigen in melanoma. We identified the cDNA sequence of canine Gpnmb, and it showed high mRNA expression of Gpnmb in two canine melanoma cell lines. Furthermore, Gpnmb mRNA level was much higher than the other well-known negative regulators in melanoma tissues of dogs. These results suggested that Gpnmb was specifically expressed in canine melanoma and a most important negative regulator among the others.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：獣医腫瘍免疫学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学(6605)

キーワード：獣医学、臨床、癌、免疫学、生体分子、犬

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性黒色腫は、犬の口腔内腫瘍の中で最も発生頻度が高い腫瘍である。本腫瘍は、組織侵襲性や再発率が高いことが知られ、腫瘍が発見された際には既にリンパ節・肺への微小転移を認める程、転移率も顕著に高い。本腫瘍に対しては、外科療法、術後に化学療法や放射線療法が実施されるが、本腫瘍のこ

れらの治療法に対する反応性は低いと、罹患動物の予後はきわめて悪いことが多い。そのため、悪性黒色腫に対する新たな治療法として、本腫瘍細胞の宿主免疫機構に認識されやすい性質、すなわち免疫原性の高いことを利用した様々な免疫療法の開発が試みられている。

(2) まず、非特異的な免疫療法としては、

活性化リンパ球療法 (Helfand SC *et al.*, 1994) や細菌性スーパー抗原と IL-2, GM-CSF をコードしたプラスミド DNA の局所投与 (Dow SW *et al.*, 1998)、免疫賦活物質 (L-MTP-PE) を用いたアジュバント療法 (MacEwen EG *et al.*, 1999, Miler *et al.*, 2006) などが報告されている。一方、特異性の高い免疫療法としては、罹患症例の腫瘍細胞を免疫抗原として調整後、再投与する方法 (GS hodge *et al.*, 1999) や、腫瘍関連抗原ペプチドもしくは罹患症例の腫瘍細胞をパルスした樹状細胞ワクチン療法 (Rodriguez-Lecompte JC *et al.*, 2004) などといった腫瘍関連抗原の免疫原性を利用したもの、さらには異種の腫瘍関連抗原であるヒト Tyrosinase と GM-CSF を用いた DNA ワクチン法 (Bergman *et al.*, 2006) なども報告されている。

(3) 上記のように多くの試みがありながら、獣医領域における実際の罹患症例に対する免疫療法の奏効率は決して高くない。この原因の1つとして、悪性黒色腫が持つ免疫寛容誘導能が上げられる。近年、免疫寛容誘導因子として様々な分子が報告されているが (Gajewski *et al.*, 2006)、とくに我々は、マウス悪性黒色腫において我々が新たに見出した Gpnmb (Glycoprotein nmb) 蛋白質に注目した。Gpnmb は、黒色細胞に特異的な膜貫通型の糖蛋白質で細胞間接着にも関連した機能を有し、マウス悪性黒色腫細胞においては negative regulator (免疫寛容誘導因子) として宿主の免疫寛容を誘導する分子である (Tomihari *et al.*, 2009, 2010)。しかしながら、犬における Gpnmb の発現動態、ならびに病態時での機能など詳細は未だ不明なままである。そこで我々は、悪性黒色腫に対する新たな免疫療法として、Gpnmb の有する免疫寛容誘導能を抑制することにより、高い奏効率を期待できる新たな免疫療法の確立を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、犬の悪性黒色腫細胞株、ならびに腫瘍罹患犬における Gpnmb の発現に関する基礎的検討を行うことで、免疫寛容誘導能に着目した新たな免疫療法の確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) まず、すでに決定されているヒト (NM\_001005340.1) ・マウス (NM\_053110.4) ・ラット (NM\_133298.1) の Gpnmb 遺伝子配列と、犬の遺伝子データベース (XM\_539472.2,

XM\_858105.1) より予測された配列の間で相同性の高い領域を考慮してプライマーを作成し、犬悪性黒色腫細胞株 CMeC1 より調整した cDNA を鋳型として PCR を行い、この PCR 産物に対しダイレクトシーケンスにより全長の遺伝子配列を決定した。

(2) 決定された配列をもとに RT-PCR に最適なプライマーペアを設計し、犬悪性黒色腫細胞株 6 種 (CMeC1, CMeC2, KMeC, LMeC; Ohashi *et al.*, 2000, CMM1, CMM2; Inoue *et al.*, 2004) における Gpnmb の mRNA 発現動態を、リアルタイム PCR 法 (Lightcycler, Roche) を用いて解析した。また同時に、悪性黒色腫の腫瘍関連抗原として既に報告のある gp100, MART1, Tyrosinase、ならびに免疫寛容誘導因子として報告のある PDL1, PDL2, HVEM に関して、同様の方法により mRNA 発現量を解析した。

(3) 2009 年から 2010 年に帯広畜産大学動物医療センターに来院した悪性黒色腫の自然発症犬 4 頭、ならびに、口腔内にその他の腫瘍を発症した犬 8 頭 (エプーリス 4 頭、エナメル上皮腫 2 頭、扁平上皮癌 1 頭、肥満細胞腫 1 頭) に対し、同様に Gpnmb の mRNA 発現動態を解析した。

(4) 蛋白質レベルでの発現量を比較検討するために、犬 Gpnmb 遺伝子配列より予想される立体構造より推測した細胞外ドメイン、ならびに細胞内ドメインに対しペプチド抗原を作製し、十分量をウサギに投与することで抗イヌ Gpnmb ポリクローナル抗体を作製した。この抗犬 Gpnmb ポリクローナル抗体により、Immunoblot 法を用いて悪性黒色腫細胞株に対する Gpnmb 蛋白質の発現を検討した。

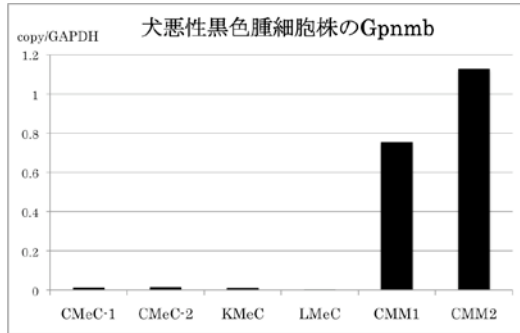
(5) Gpnmb の機能に関して検討するために、既報を参考にして最適な siRNA 配列を決定し、悪性黒色腫に lentivector system (SBI) を用いて siRNA を遺伝子導入し、Gpnmb 発現をノックダウンした犬悪性黒色腫細胞株の樹立を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 犬 Gpnmb 遺伝子配列より作製したプライマーにより、mRNA 配列を決定した。コーディング領域は 581 アミノ酸であり、predicted であった犬 Gpnmb の mRNA 2 配列と 100% の相同性を示した。また、ヒトとは 74% の相同性を、マウスとは 65.1%、ラットとは 64.5% の相同性を示した。

(2) 次に、犬悪性黒色腫細胞株 6 種におい

て、Gpnmb の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。

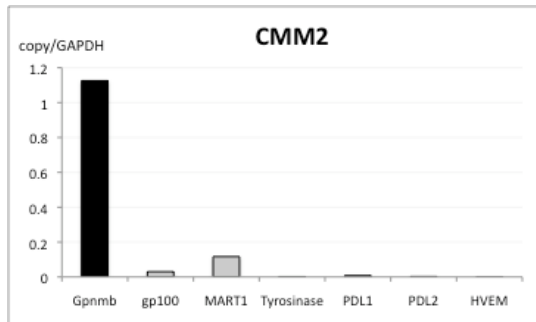


この結果、6種の細胞株のうち、CMM1とCMM2においてGpnmb mRNAの高い発現量を認めた。

name	Breed	Primary site	WHO stage	Clinical Stage	Origin
CMeC-1	Chow	Skin (right shoulder)	T3N1M0	4	Primary
CMeC-2	Chow	(CMeC1 via mouse)	T3N1M0	4	(nude mouse)
KMeC	Mongrel	oral gingiva	T3N1M0	4	Primary
LMeC	Beagle	oral mucosa	T4N1M0	4	Lymph node
CMM1	Toy poodle	oral cavity	T2bN1M0	2	Primary
CMM2	Mongrel	oral cavity	T2aN0M0	2	Primary

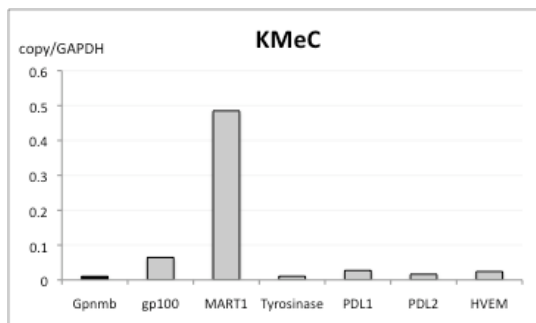
CMM1とCMM2は、他4種と比べて臨床ステージが初期であるという特徴がある。6種の細胞株ともに十分な継代数を経ていることから、originの状態がどこまで反映されているかは不明であるが、GpnmbのmRNA発現量には細胞株間において差異があること、またその採材した腫瘍細胞のステージがそのmRNA発現量に関連している可能性が示された。

次に、GpnmbのmRNA発現量が高かったCMM2において、他の腫瘍関連抗原、ならびに免疫寛容誘導因子のmRNA発現量を比較した。



この結果、CMM2においてはGpnmbが他の抗原や誘導因子より最も発現量の高いものであった。このことは、CMM1においても同様の傾向が認められた。

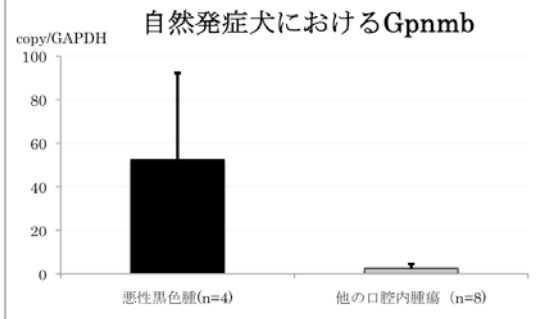
一方、Gpnmb発現量が低いKMeC細胞株などでは同様の傾向は認められなかった。



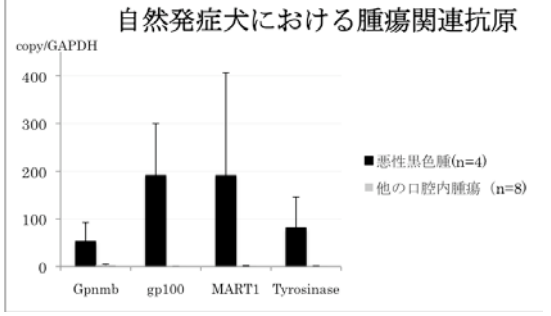
これらのことより、犬Gpnmbは、悪性黒色腫細胞株において細胞株間でのmRNA発現量の差異が認められること、また発現量の高い細胞株では、Gpnmbが最も主要な腫瘍関連抗原、かつ免疫寛容誘導因子となりえることが示唆された。

(3) 実際の臨床症例におけるGpnmbの発現動態を検討するために、腫瘍罹患犬から採材した腫瘍組織に対して、Gpnmbならびにその他の腫瘍関連抗原、免疫寛容誘導因子のmRNA発現量を解析した。

まず、Gpnmb発現量を比較したところ、悪性黒色腫の自然発症犬4頭では、その他の口腔内腫瘍罹患犬8頭と比較して有意に高いmRNA発現量を示した。また悪性黒色腫の自然発症犬4頭中ではすべてで高値を認めており、細胞株で認められたような発現量の低い症例は認められなかった。



次に、悪性黒色腫に特異的とされている3種の腫瘍関連抗原と、GpnmbとのmRNA発現量を比較した。

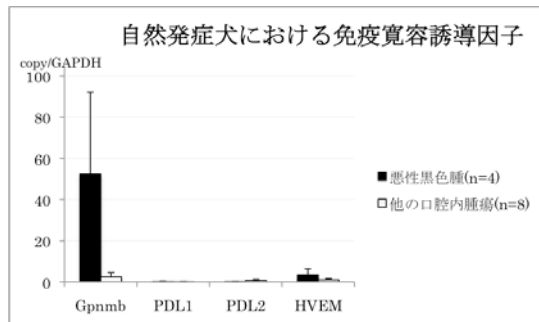


この結果Gpnmbは、他の腫瘍関連抗原と同様に悪性黒色腫に特異性の高い蛋白質であること、またその発現量としては、他と比較するとさほど高いものではないことが示された。

さらに、悪性黒色腫において他の免疫寛容誘導因子とmRNA発現量を比較した。

この結果Gpnmbは、悪性黒色腫細胞において、免疫寛容誘導因子として最も発現量の高い分子であることが示された。

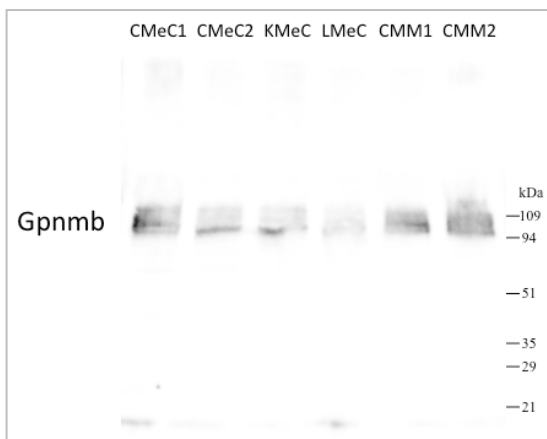
これらのことより、犬Gpnmbは、悪性黒色腫自然発症犬において、悪性黒色腫細胞に特異的に発現する蛋白質であること、また腫瘍関連抗原としてのmRNA発現量はさほど高く



ないが、免疫寛容誘導因子としては非常に高い mRNA 発現量を認めることが明らかとなった。

(4) Gpnmb の mRNA 発現量を比較検討すると同時に、蛋白質の発現動態を解析する目的で、前述の 6 種の悪性黒色腫細胞株に対して Immunoblot 法による解析を行った。

まず、細胞外ドメインに作製した抗体において、Gpnmb と思われる分子量の位置に 2 本のバンドが認められた。(95kDa と 110kDa) また、mRNA 発現量では大きな差異が認められた 6 種の細胞株において、すべての細胞株での Gpnmb 蛋白質の発現が認められた (10 $\mu$ g/lane)。



抗体が反応している蛋白質が Gpnmb であると確認するために、陽性コントロールとして、pSectagB ベクターに犬 Gpnmb の細胞外ドメイン配列を遺伝子導入し、これを Fugene6 により大腸菌 DH5 $\alpha$  にトランスフェクションすることで、Gpnmb リコンビナント蛋白質の作製を試みた。しかしながら、遺伝子導入は可能であったものの、目的とする蛋白質の生成を確認することができなかった。このため、上記抗体が Immunoblot 法により反応するバンドに関して、予想される分子量からは Gpnmb と推測されるものの、抗体の特異性を未だ証明できなかった。

一方で、細胞内ドメインに設定した抗体においては Gpnmb と思われる特異的なバンドを検出することはできなかった。また市販されている抗マウス Gpnmb ポリクローナル抗体は交差性反応を示さなかった。

さらに、細胞外ドメインの抗体が反応したため、細胞株に対するフローサイトメトリー解析を試みたが、非特異吸着と思われる反応が強くてためて有意な解析を行うことができなかった。改善する方法としてブロッキング法の変更などを試みたが改善せず、ポリクローナル抗体の限界かと考えられた。

以上より、犬 Gpnmb 蛋白質に反応すると思われるポリクローナル抗体を作製することはできたが、その特異性、ならびに検出に関して今だ不確定な要因が存在しており、厳密な意味で「検出系を確立した」とは言いがたい現状である。今後は、これらの問題を解決し、自然発症犬における蛋白質レベルでの Gpnmb の発現動態を検討していく必要がある。

(5) 犬 Gpnmb の mRNA 配列から最適と思われる siRNA 配列を 3 種類設計し、これらを合成した後、Lentivector system を用いて CMM1 細胞に shRNA (hairpin 構造をさせた siRNA) として安定発現させたノックダウン細胞の作製を試みた。希釈継代培養により 16 種の候補細胞を得たが、明瞭なノックダウン細胞株を認めることはできなかった。この原因として、候補細胞として得られた数が少なかったこと、すなわち lentivector system による遺伝子導入効率が低かったことや、siRNA 配列の有効性が低かったことなどが考えられた。

(6) 以上の結果より、犬において全く明らかにされていない悪性黒色腫における Gpnmb の発現動態に関して、①まずその遺伝子配列を明らかにしたとともに、②悪性黒色腫細胞株において、Gpnmb の mRNA 発現量が著しく高い細胞株が存在することを明らかにした。この細胞株における Gpnmb の発現は、他の腫瘍関連抗原ならびに免疫寛容誘導因子と比較しても顕著に高値を示していた。③また悪性黒色腫の自然発症犬においても、すべての症例由来の細胞において Gpnmb mRNA の高い発現が認められること、さらに他の免疫寛容誘導因子と比較して著しく高い発現を認めることを明らかにした。これらの成果は、国内外において未だ報告を認めない新規の内容であり、従来の治療法に反応しなかった悪性黒色腫に対する免疫学的アプローチを考案するうえで非常に有用性の高い知見であると考えられた。

長期目標とする「新たな免疫療法の開発」には未だ到達できてはいないが、上記の結果を得たことで、ようやく Gpnmb の基礎的な検討ができるスタートラインに立つことができたとと言える。今後は、本研究の成果を踏まえて、Gpnmb の mRNA レベルのみならず蛋白質レベルでの発現動態を多くの症例において明らかにするとともに、機能としての免疫寛

容能についても詳細な検討を加えることで、さらに奏功性の高い免疫療法の開発が進むと期待される。

## 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 5 件)

① “DC-HIL/glycoprotein Nmb promotes growth of melanoma in mice by inhibiting the activation of tumor-reactive T cells.”  
Tomihari M, Chung JS, Akiyoshi H, Cruz PD Jr, Ariizumi K.  
Cancer Res. 2010 Jul 15;70(14):5778-87. Epub 2010 Jun 22. (査読有り)

② “Depleting syndecan-4+ T lymphocytes using toxin-bearing dendritic cell-associated heparan sulfate proteoglycan-dependent integrin ligand: a new opportunity for treating activated T cell-driven disease.”  
Akiyoshi H, Chung JS, Tomihari M, Cruz PD Jr, Ariizumi K.  
J Immunol. 2010 Apr 1;184(7):3554-61. Epub 2010 Feb 22. (査読有り)

③ “Binding of DC-HIL to dermatophytic fungi induces tyrosine phosphorylation and potentiates antigen presenting cell function.”  
Chung JS, Yudate T, Tomihari M, Akiyoshi H, Cruz PD Jr, Ariizumi K.  
J Immunol. 2009 Oct 15;183(8):5190-8. Epub 2009 Sep 30. (査読有り)

④ “The DC-HIL/syndecan-4 pathway inhibits human allogeneic T-cell responses.”  
Chung JS, Bonkobara M, Tomihari M, Cruz PD Jr, Ariizumi K.  
Eur J Immunol. 2009 Apr;39(4):965-74. (査読有り)

⑤ “Gpnmb is a melanosome-associated glycoprotein that contributes to melanocyte/keratinocyte adhesion in a RGD-dependent fashion.”  
Tomihari M, Hwang SH, Chung JS, Cruz PD Jr, Ariizumi K.  
Exp Dermatol. 2009 Jul;18(7):586-95. Epub 2009 Mar 6. (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

① “Syndecan-4 is an important negative regulator of T cell immunity and a potentially useful target for treating diseases resulting from such immunity.”  
Chung JS, Tomihari M, Akiyoshi H, Cruz PD Jr, Ariizumi K  
Society for Investigative Dermatology, 70<sup>th</sup> annual meeting, 2010 May 5<sup>th</sup>-8<sup>th</sup>  
Atlanta, Georgia, USA

② “Exploiting the DC-HIL/syndecan-4 pathway to treat cutaneous T cell lymphoma.”  
Chung JS, Yudate T, Tomihari M, Cruz PD Jr, Ariizumi K  
Society for Investigative Dermatology, 69<sup>th</sup> annual meeting, 2009 May 6<sup>th</sup>-9<sup>th</sup>  
Montreal, Canada, USA

[図書] (計 0 件)

[出願状況] (計 0 件)

[取得状況] (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

富張 瑞樹 (TOMIHARI MIZUKI)  
帯広畜産大学・畜産学部・助教  
研究者番号：00552754