

# 免疫寛容誘導蛋白質 Gpnmb の発現抑制による 犬悪性黒色腫の新たな免疫療法に関する研究

富 張 瑞 樹

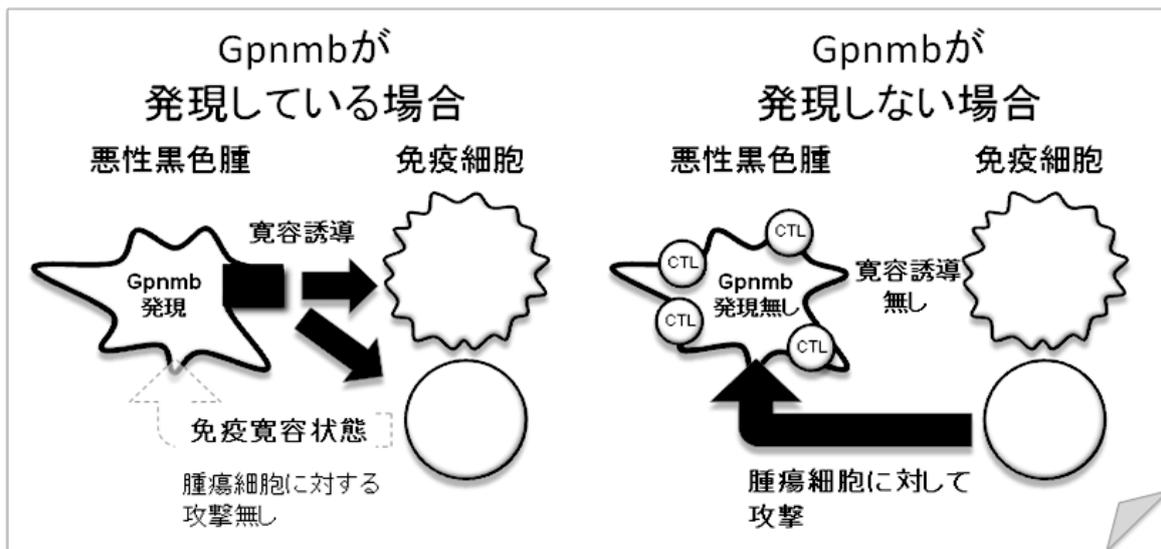
臨床獣医学研究部門・助教

## 1. 目 的

犬の悪性黒色腫は口腔内腫瘍の中で最も発生頻度が高い悪性腫瘍であり、高い転移率と低い従来  
の治療法への反応性から罹患動物の予後は悪いことが多い。そのため、本腫瘍に対する新たな治療  
として、本腫瘍細胞の免疫原性が高いことを利用した免疫療法の開発が試みられている。しかしな  
がら、本腫瘍に対する免疫療法の奏効率は決して高くはなく、その原因には本腫瘍細胞の免疫寛容  
誘導能が関与しているものと考えられている。そこで本研究では、免疫寛容を解除する新たな奏効  
率の高い免疫療法を確立するため、私がマウス悪性黒色腫細胞株に顕著に発現し免疫寛容を誘導す  
ることを明らかにした Gpnmb (Glycoprotein nmb) 蛋白質に注目し、口腔内悪性黒色腫自然発症  
犬における腫瘍細胞の Gpnmb 蛋白質の発現状況について検討する。

## 2. 方 法

初めに、犬の Gpnmb 遺伝子配列を明らかにし、自然発生悪性黒色腫細胞における Gpnmb  
mRNA 発現状況を RT-PCR 法により検討する。また、犬の Gpnmb ペプチドを用いたポリクローナ  
ル抗体を作製し、自然発生悪性黒色腫における Gpnmb 蛋白質の発現状況を Immunoblot 法、FACS  
法ならびに免疫組織染色法により検討し、病理組織学的所見、臨床データならびに免疫学的プロフ  
ィールとの関係を明らかにする。さらに、悪性黒色腫細胞株の Gpnmb の T 細胞に対する免疫寛容  
誘導能を Gpnmb の発現を siRNA でノックダウンした細胞株を用い、犬 T 細胞の細胞障害活性や  
IFN- $\gamma$  産生量により検討することで、悪性黒色腫細胞における Gpnmb の発現遮断により抗腫瘍免  
疫が増強されることを in vitro の系で明らかにする。



### 3. 結 果

まず、犬の Gpnmb 遺伝子配列を明らかにするために、既に判明している犬の genome 遺伝子配列から predicted されていた Gpnmb の mRNA 配列 (Acc # ; XM-858105.1, XM\_539472.2) に基づき、sequence 用の primer を適当な増幅範囲となるように設計、作製した。次に、症例犬の悪性黒色腫細胞から樹立した 3 種の細胞株 CMeC, LMeC, KMeC (Inoue et al., JVMS, 2004) の mRNA からそれぞれ cDNA を調整し、先の primer を用いて Gpnmb の mRNA 遺伝子配列を同定した。この結果、3 腫瘍株間、ならびに predicted されていた Gpnmb の mRNA 配列との間に大きな差異のないことが確認された。

次に、Gpnmb 蛋白質に対するポリクローナル抗体を作製するために、適当なペプチド抗原領域の候補として、①細胞外領域に存在すること、②糖鎖修飾領域でないこと、③リン酸化修飾領域でないこと、④ペプチド末端として十分な抗原性を有すると推測されること、の以上 4 点を考慮して、抗原領域としてより最適な部位を検索した。この結果、KKGDSRWKNSWKGGHVRA(63-80), HHHDVFPDGKPFPHPGWK(148-166), YPGIQEKDPLLKHQPGTP(564-581) の 3 箇所のペプチド配列部位が最適であると判断されたため、これらをペプチド合成した (Sigma-Aldrich, Japan)。

さらに、上記 3 種のペプチド抗原 (200 $\mu$ g/head) をそれぞれウサギに免疫し (day0)、その後 day14, day28, day42, day56, day70 の 5 回にわたり追加免疫接種 (100 $\mu$ g/head) した後、2 回に分けて採血し、約 50ml の血漿を得た。これを proteinA カラムにより精製し、抗イヌ Gpnmb ウサギポリクローナル抗体を作製した。現在はこれら 3 種の抗体を用いて、悪性黒色腫細胞株のライセートに対する Immunoblot 法による Gpnmb 蛋白質の発現解析を行っているところである。

## 4. 考 察

犬悪性黒色腫に対する従来免疫療法の研究では、腫瘍特異的な細胞障害性を持つ免疫担当細胞を誘導する方法が主に研究されていたが、本研究では免疫担当細胞の誘導を阻害する腫瘍細胞の機能性蛋白質の発現を遮断しようとする新たな免疫療法の開発を目的とするところが、本研究の最大の特徴である。現在のところ、まずイヌ Gpnmb の遺伝子配列を特定し、Predicted されていた配列とほとんど差異が認められなかったことから、予想される intron-exon 領域を考慮した RT-PCR 用の primer を設計、作製し、RT-PCR を用いた mRNA 量の定量を行うことが可能となった。また一方で、抗イヌ Gpnmb ポリクローナル抗体を作製し、蛋白質レベルでの解析を行うことも可能となった。このように本年度では Gpnmb 蛋白質の発現解析ツールを構築することができ、さらに次年度以降において、自然発生症例の腫瘍細胞中における Gpnmb の mRNA レベル、蛋白質レベルの双方における発現動態を明らかにするとともに、症例の免疫学的プロフィール、病理学的評価とあわせて総合的な検討を行う予定である。またこれと併せて、in vitro の系で siRNA を用いた新たな免疫学的治療法の基礎的検討を行うこともできるようになった。こうした帯広畜産大学動物医療センターに来院される自然発生症例からの収集データ、ならびに本研究の成果は、犬の悪性黒色腫に対する新たな免疫療法の開発にとって非常に有用な知見であり、獣医療や罹患動物をもつ飼い主に朗報となる可能性が高い。今後は、これら管内の罹患症例に成果を還元していくとともに、十勝を発信源として、世界に通じる抗腫瘍免疫療法の開発を目的としていくつもりである。

キーワード：腫瘍，免疫，悪性黒色腫，犬