

称号及び氏名 博士（獣医学） 岡田 悟

学位授与の日付 平成31年3月31日

論文名 イヌの乳腺腫瘍における HSP110 の発現動態の解析

論文審査委員 主査 笹井 和美  
副査 秋吉 秀保  
副査 嶋田 照雅  
副査 古家 優

## 論文要旨

### 緒言

熱ショックタンパク質（Heat Shock Protein：以下 HSP）は、細胞を高温条件下などのストレス環境に曝露したときに細胞内で発現するタンパク質の一群である。HSP の多くは非ストレス下でも発現しており、様々なタンパク質と相互作用してタンパク質の高次構造形成に関与することが明らかになっている。そのため、HSP は分子シャペロンとも呼ばれる。HSP はその分子量の違いから、大きく「低分子 HSP ファミリー」「HSP40 ファミリー」「HSP60 ファミリー」「HSP70 ファミリー」「HSP90 ファミリー」、および「高分子 HSP ファミリー」に分類される。これらの HSP は相互に作用して分子シャペロンとして働くことが明らかになっている。また、HSP は哺乳類間で遺伝的相同性が非常に高いことから、異なる生物間でも類似の機能を持っていると考えられている。

近年の研究で HSP は分子シャペロンとして働くと同時に、腫瘍の形成にも関与することがわかってきた。ヒトの腫瘍において、HSP の過剰発現は多数報告されており、予後不良因子になるとの報告もある。しかし、イヌにおいては骨肉腫における HSP60 の過剰発現や、乳腺腫瘍における HSP90 の過剰発現など、少数の報告があるのみでみる。また、ヒトの乳癌においては高分子 HSP ファミリーに分類される HSP110 の過剰発現の報告があるが、イヌの

乳腺腫瘍細胞株および乳腺腫瘍組織における HSP110 の発現報告はない当研究グループの先行研究によって、イヌの乳腺腫瘍では HSP110 の mRNA が過剰に発現していることが示唆された。本研究では、組み換えイヌ HSP110 タンパク質の作製と機能解析、抗イヌ HSP110 ポリクローナル抗体の作製、およびイヌの乳腺腫瘍組織における HSP110 の発現動態の解析を行った。

## 第 1 章 組み換えイヌ HSP110 タンパク質の作製と機能解析

近年の研究で、HSP のフォールディング機能、抗凝集機能およびクライアントタンパク質などについて詳細な解析が進んでいる。それら研究は、酵母やヒトの HSP で多く行われている一方で、イヌの HSP に関する機能解析はほとんど行われていない。

本研究ではまず、組み換えイヌ HSP110 タンパク質の作製を試みた。方法として、イヌ HSP110 の全長塩基配列を pGEX6p-1 にサブクローニングし、発現ベクターを構築した。大腸菌 BL21 (DE3) pLysS にトランスフォーメーションし、IPTG 刺激によって組み換えタンパク質を GST 融合タンパク質として誘導発現させた。大腸菌の超音波破砕物を回収し、アフィニティーカラムで精製することで、組み換えイヌ HSP110 タンパク質を得た。抗 GST 抗体を用いた Western blotting により、GST 融合イヌ HSP110 タンパク質の分子量と推測される 140 kDa 付近のバンドを確認し、その後 GST を切断した。また、SDS-PAGE にてイヌ HSP110 タンパク質の予想される分子量である 110 kDa 付近のバンドを認めた。

組み換えタンパク質のアミノ酸配列を液体クロマトグラフ質量分析 (LCMS/MS) によって確認したところ、データベース上の HSP110 のアミノ酸配列と一致し、イヌ HSP110 であることが確認された。

次に、組み換えイヌ HSP110 タンパク質の機能を解析するために、熱変性ルシフェラーゼの再賦活化について検討した。ホタルルシフェラーゼを熱変性させ、作製した組み換えイヌ HSP110 タンパク質を加えインキュベートした結果、発光強度の有意な上昇が認められた ( $p < 0.05$ )。また、加熱による影響を調べるため、組み換えイヌ HSP110 タンパク質を  $42^{\circ}\text{C} \cdot 1$  時間および  $60^{\circ}\text{C} \cdot 1$  時間のインキュベートを行った。その結果、 $42^{\circ}\text{C}$  でインキュベートしたものは室温でインキュベートしたものと比べ同等の発光強度を示したのに対し、 $60^{\circ}\text{C}$  でインキュベートしたものは発光強度が有意に減弱した ( $p < 0.05$ )。これらのことから、作製した組み換えイヌ HSP110 タンパク質はリフォールディング機能があり、さらに  $42^{\circ}\text{C}$  での耐熱性があることが示唆された。

## 第 2 章 抗イヌ HSP110 ポリクローナル抗体の作製

HSP は哺乳類間での相同性が高く、抗 HSP 抗体は哺乳類間での交差性があることが多いとされている。しかし、予備実験において市販の抗ハムスター HSP110 抗体を用いたウエスタンブロットティングでは、イヌ HSP110 タンパク質を検出することができなかった。そこで、本研究ではウサギ抗イヌ HSP110 ポリクローナル抗体を作製するため、組み換えイヌ HSP110 タンパク質をウサギに 2 週間毎に 4 回免疫し、血清を採取した。ELISA にて、免疫後の血清は十分な抗体価を有していることが判明した。イヌ正常乳腺細胞株 CF-37 およびイ

ヌ乳腺腫瘍細胞株 CF-41 の破碎液，組み換えイヌ HSP110 タンパク質を用いたウエスタンブロッティングの 1 次抗体として作製した抗体を使用した．その結果，110 kDa 付近にバンドを認めたため，この抗体が生体内のイヌ HSP110 を認識していることが示唆された．さらに，作製したウサギ抗イヌ HSP110 ポリクローナル抗体を用いて，イヌ正常乳腺細胞株 CF-37，イヌ乳腺腫瘍細胞株 CF-41，イヌ正常乳腺組織およびイヌ乳腺腫瘍組織における HSP110 の発現を免疫蛍光染色で確認した．その結果，HSP110 の発現は CF-41 の細胞質において CF-37 よりも蛍光強度が強く，乳腺腫瘍組織において正常乳腺組織よりも蛍光強度が強かった．HSP110 はイヌの乳腺腫瘍において細胞質で強発現していることが示唆された．また，イヌ乳腺腫瘍組織を用いた免疫蛍光染色では，正常乳腺組織に比べ，乳腺腫瘍組織において HSP110 が強発現していることが示唆された．

### 第 3 章 イヌの乳腺腫瘍組織における HSP110 の発現動態の解析

臨床例を用いてイヌの乳腺腫瘍組織における HSP110 の発現動態を調べるため，免疫組織化学を行った．乳腺腫瘍のサンプルとして，2016 年-2018 年に近隣の動物病院に来院した症例から外科手術にて摘出したものを飼い主の許可を得て，計 24 症例，93 検体を得た．病理組織学的診断は，単純腺癌が 18 検体，複合癌が 32 検体，環状乳頭状癌が 1 検体，単純腺腫が 18 検体，良性混合腫瘍が 6 検体，非腫瘍性病変が 17 検体，リンパ節転移病変が 1 検体だった．一次抗体にウサギ抗イヌ HSP110 ポリクローナル抗体，二次抗体にヤギ抗ウサギ IgG 抗体を使用し，アビジン・ビオチンシステムを利用した免疫組織化学を行った．Paltian らの方法を参考にして，発色を示す細胞の割合を 0-4 段階，発色強度を 0-3 段階でスコアを付け，その乗算で 0-12 段階のスコア付けを行い，HSP110 の発現スコアを比較した．統計解析の結果，単純腺癌と複合癌は，非腫瘍性病変と比較して有意に HSP110 の発現スコアが高かった ( $p < 0.05$ )．また，病理学的診断による悪性度の分類では，中悪性度以上と低悪性度の検体，および良性腫瘍は，非腫瘍性病変と比較して有意に HSP110 の発現レベルが高かった ( $p < 0.05$ )．しかし，良性腫瘍と悪性腫瘍の間，中悪性度以上と低悪性度の間には有意差は認められなかった．

以上の結果から，HSP110 はイヌの乳腺腫瘍において過剰発現が認められることがわかった．HSP110 がイヌの乳腺腫瘍の腫瘍化に関与していることが示唆された．

### 総括

前記の知見を以下のように要約する

1. 大腸菌を用いて組み換えイヌ HSP110 タンパク質を作製した．このタンパク質は 42°C の過熱を加えた場合でもリフォールディング機能を保持していることが示唆された．
2. 作製した組み換えイヌ HSP110 をウサギに免疫することで，ウサギ抗イヌ HSP110 ポリクローナル抗体を作製した．免疫蛍光染色によって，イヌの乳腺腫瘍細胞および乳

腺腫瘍組織における HSP110 の発現が示唆された。

3. 免疫組織化学により、イヌの悪性および良性の乳腺腫瘍において HSP110 が過剰発現していることが示唆された。HSP110 はイヌの乳腺腫瘍において腫瘍形成に関与することが示唆された。

## 審査結果の要旨

熱ショックタンパク質 (Heat Shock Protein: 以下 HSP) は細胞を高温条件下などのストレス環境に曝露したときに細胞内で発現するタンパク質の一群である。HSP の多くは非ストレス下でも発現しており、分子シャペロンとして様々なタンパク質と相互作用してタンパク質の高次構造形成に関与することが明らかになっている。HSP はその分子量の違いから、大きく「低分子 HSP ファミリー」「HSP40 ファミリー」「HSP60 ファミリー」「HSP70 ファミリー」「HSP90 ファミリー」、および「高分子 HSP ファミリー」に分類される。これらの HSP は相互に作用して分子シャペロンとして働くことが明らかになっている。また、HSP は哺乳類間で遺伝的相同性が非常に高いことから、異なる生物間でも類似の機能を持っていると考えられている。

近年の研究で HSP は分子シャペロンとして働くと同時に、腫瘍の形成にも関与することがわかってきた。ヒトの腫瘍において、HSP の過剰発現は多数報告されており、予後不良因子になるとの報告もある。しかし、イヌにおいては骨肉腫における HSP60 の過剰発現や、乳腺腫瘍における HSP90 の過剰発現など、少数の報告があるのみである。また、ヒトの乳癌においては高分子 HSP ファミリーに分類される HSP110 の過剰発現の報告があるが、イヌの乳腺腫瘍細胞株および乳腺腫瘍組織における HSP110 の発現報告はない。当研究グループの先行研究によって、イヌの乳腺腫瘍では HSP110 の mRNA が過剰に発現していることが示唆された。本研究では、組換えイヌ HSP110 タンパク質の作製と機能解析、抗イヌ HSP110 ポリクローナル抗体の作製、およびイヌの乳腺腫瘍組織における HSP110 の発現動態の解析を行った。

第 1 章では、組換えイヌ HSP110 タンパク質の作製と機能解析を解析するため、まず、組換えイヌ HSP110 タンパク質の作製を試みた。組換えタンパク質のアミノ酸配列を液体クロマトグラフ質量分析によって解析したところ、データベース上の HSP110 のアミノ酸配列と一致し、イヌ HSP110 であることが確認された。次に、組換えイヌ HSP110 タンパク質の機能を解析するために、熱変性ルシフェラーゼの再活性化について検討した。ホタルルシフェラーゼを熱変性させ、作製した組換えイヌ HSP110 タンパク質を加え室温でインキュベートした結果、発光強度の有意な上昇が認められた ( $p < 0.01$ )。また、加熱による影響を調べ

るため、組換えイヌ HSP110 タンパク質を 42°C・1 時間および 60°C・1 時間の加熱を行った。その結果、42°C 加熱後にインキュベートしたものと室温でインキュベートしたものは同等の発光強度を示したのに対し、60°C 加熱後にインキュベートしたものは発光強度が有意に減弱した ( $p < 0.01$ )。これらのことから、作製した組換えイヌ HSP110 タンパク質はリフォールディング機能があり、さらに 42°C での耐熱性があることが示唆された。

第 2 章では、抗イヌ HSP110 ポリクローナル抗体の作製を試みた。HSP は哺乳類間での相同性が高く、抗 HSP 抗体は哺乳類間での交差性があることが多いとされている。しかし、予備実験において市販の抗ハムスター HSP110 抗体を用いたウエスタンブロッティングでは、イヌ HSP110 タンパク質を検出することができなかった。そこで、本研究ではウサギ抗イヌ HSP110 ポリクローナル抗体を作製するため、組換えイヌ HSP110 タンパク質をウサギに 2 週間毎に 4 回免疫し、血清を採取した。作製した抗体を用いて、イヌ正常乳腺細胞株 CF-37 およびイヌ乳腺腫瘍細胞株 CF-41 の破碎液、組換えイヌ HSP110 タンパク質のウエスタンブロッティングを実施した。その結果、110 kDa 付近にバンドを認め、この抗体が生体内のイヌ HSP110 を認識していることが示唆された。さらに、作製したウサギ抗イヌ HSP110 ポリクローナル抗体を用いて、イヌ正常乳腺細胞株 CF-37、イヌ乳腺腫瘍細胞株 CF-41、イヌ正常乳腺組織およびイヌ乳腺腫瘍組織における HSP110 の発現を免疫蛍光染色で観察した。その結果、HSP110 の発現は CF-41 の細胞質において CF-37 よりも蛍光強度が強く、乳腺腫瘍組織において正常乳腺組織よりも蛍光強度が強かった。HSP110 はイヌの乳腺腫瘍において細胞質で強発現していることが示唆された。また、イヌ乳腺腫瘍組織を用いた免疫蛍光染色では、正常乳腺組織に比べ、乳腺腫瘍組織において HSP110 が強発現していることが示唆された。

第 3 章では、イヌの乳腺腫瘍における HSP110 の発現動態を解析した。本章では臨床例を用いてイヌの乳腺腫瘍における血清中 HSP110 濃度を測定した。血清検体は 2016 年-2018 年に近隣の動物病院に来院した症例から術前に採血したものを飼い主の許可を得て、計 20 検体を使用した。また、10 検体の雌の正常犬から得た血清も同時に測定し比較した。血清中 HSP110 濃度の測定はアビジン・ビオチンシステムを利用した ELISA を用いて行った。統計解析の結果、乳腺腫瘍症例と正常犬の血清中 HSP110 濃度に有意差は認められなかった。臨床例を用いてイヌの乳腺腫瘍組織における HSP110 の発現動態を調べるため、免疫組織化学を行った。乳腺腫瘍検体は、2016 年-2018 年に近隣の動物病院に来院した症例から外科手術にて摘出したものを飼い主の許可を得て使用した。計 24 症例、92 検体の組織が得られた。病理組織学的診断は、単純腺癌が 18 検体、複合癌が 32 検体、管状乳頭状癌が 1 検体、単純腺腫が 18 検体、良性混合腫瘍が 6 検体、非腫瘍性病変が 17 検体だった。Paltian らの方法を参考にして、DAB の発色を示す細胞の割合を 0-4 段階、発色強度を 1-3 段階に分類し、その乗算で 0-12 段階のスコアを付け、HSP110 の発現スコアとして比較した。統計解析の結果、単純腺癌と複合癌は、非腫瘍性病変と比較して HSP110 の発現スコアが有意に高かった ( $p < 0.01$ )。また、病理学的診断による悪性度の分類では、中悪性度以上と低悪性度の検体は、非腫瘍性病変と比較して HSP110 の発現スコアが有意に高かった ( $p < 0.01$ )。良性腫瘍は、非腫瘍性病変と比較して HSP110 の発現スコアが有意に高かった ( $p$

<0.05). しかし, 良性腫瘍と悪性腫瘍の間, 中悪性度以上と低悪性度の間には有意差は認められなかった.

本研究において, 大腸菌を用いて組換えイヌ HSP110 タンパク質を作製した. このタンパク質は 42°Cの過熱を加えた場合でもリフォールディング機能を保持していることが示唆された. 作製した組換えイヌ HSP110 をウサギに免疫することで, ウサギ抗イヌ HSP110 ポリクローナル抗体を作製した. 免疫蛍光染色によって, イヌの乳腺腫瘍細胞および乳腺腫瘍組織における HSP110 の発現が示唆された. 免疫組織化学により, イヌの悪性および良性の乳腺腫瘍において HSP110 が過剰発現していることが示唆された. HSP110 はイヌの乳腺腫瘍において腫瘍形成に関与することが示唆された. これらの研究成果は, 獣医臨床科学の研究分野に大きく貢献し, 新たな展開に資するものであり, 本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて, 博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める.