

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650224

研究課題名（和文）癌発生におけるサイトグロビン発現間葉系細胞の関与

研究課題名（英文）Involvement of cytoglobin-expressing mesenchymal cells in cancer development

研究代表者

河田 則文（KAWADA NORIFUMI）

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30271191

研究成果の概要（和文）：近年本邦でも乳癌患者が増加して社会問題化しており“ピンクリボン”などで啓蒙活動され受診勧奨が叫ばれている。我々はサイトグロビン(Cygb)を欠損したマウスを作出したところ、高齢の雌マウスに高率で乳腺の増生・癌を発症することを見出した。本研究では本自然乳癌発症モデルを用いて、癌発生過程における Cygb の意義、また、発癌過程における間質細胞と上皮との相互作用分子メカニズムを明らかにする事を目的とした。

研究成果の概要（英文）：Incidence of breast cancer has been increasing in developed countries including Japan and has become a world-wide health problem. To clarify the molecular function of cytoglobin (Cygb) in vivo, we generated Cygb-deficient mice. Surprisingly, we observed the spontaneous development of breast cancer and lymphoma in Cygb-deficient female mice at high incidence compared to the negligible detection of such tumors in wild-type mice. Based on these findings, we studied the molecular events leading to breast cancer development in Cygb-deficiency with special regards to the interaction between epithelial cells and mesenchymal cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	0	1,900,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	330,000	3,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：サイトグロビン・ビタミン A・乳癌・線維芽細胞・自然発症・間質細胞

1. 研究開始当初の背景

現在世界的に女性の 10 人に 1 人は乳癌に罹患すると言われ、そのうち 20%が乳癌により死亡する。本邦の平成 18 年度の女性乳癌死は 1 万 1,065 人で第 4 位である。西側諸国では、低出産、授乳習慣の枯渇、初経の低年齢化、

閉経年齢の高齢化やピルの濫用などによりエストロゲンに暴露される期間が延長する傾向があること、また、飽食による肥満により閉経後にも脂肪組織でエストロゲン産生が持続することなどが乳癌発生率上昇の一因と想定されている。

サイトグロビン (Cytoglobin, Cygb) はビタミンA貯蔵細胞系に発現するグロビン蛋白として申請者が世界で初めてラットから報告した (J Biol Chem 276, 25318, 2001, Accession number AJ245663; Lab Invest 84, 91, 2004)。さらに第17番染色体上に存在するヒト Cygb 遺伝子も同定した (Biochim Biophys Acta 1577, 471, 2002)。結晶化した本蛋白の立体構造はミオグロビン (myoglobin, Mb) と酷似しており、ヘモグロビン (Hb)、ニューログロビン (Ngb) に並んで哺乳類第4番目のグロビンであることが判明している (J Mol Biol 339, 873, 2004)。Cygbは他のグロビン同様、酸素、一酸化窒素、一酸化炭素などのガス分子と結合して生体内ガスのリザーバーとなり得ること (Biochemistry 42, 5133, 2003)、Cygbはペルオキシダーゼ活性を持ち、過酸化水素 (H₂O₂) を分解して細胞内酸化ストレスを調節することも報告してきた (J Biol Chem 276, 25318, 2001)。しかしながら、Cygbのそれ以外の蛋白機能や他臓器の病態生理学的意義などについては不明である。最近、我々はCygb遺伝子を欠損させたマウス (Cygb^{-/-}マウス) の作出に世界で初めて成功した。その表現型を解析した結果、生後9ヶ月を経過した時点で、雌Cygb^{-/-}マウスでは70%で乳腺過形成 (前癌状態) / 乳癌を発症した。サイトグロビンは肝星細胞などビタミンAを貯蔵する線維芽細胞に発現し、乳腺でも上皮細胞に接する間質に陽性細胞が存在する。従って、本モデルは発癌機構へCygbの関与の解析、ならびに間質細胞と上皮細胞との相互作用を探索するモデルとなり得る。得られた情報は抗乳癌剤などの医薬品作出や乳癌の早期発見や診断法開発などに利用する。

2. 研究の目的

(1) ヒト乳癌モデルとして Cygb^{-/-}マウスを確立する：乳癌の発生率や組織型などを動物数を増やして統計し、基本的データベースを構築する。

(2) 癌における上皮-間質相互作用の解析：細胞癌化における上皮-間質細胞の相互作用について、ビタミンA貯蔵細胞に有意に発現す

る Cygb 欠損の立場から解析を行う。現在までの解析で、Cygb^{-/-}マウスの乳癌組織の周囲にはレチノール結合蛋白を発現する間質細胞は存在している。従って、Cygb 欠損がどのようなメカニズムで細胞の癌化に関与するか多方面から解析する。

(3) 乳癌マーカーの探索：Cygb^{-/-}マウスでは、生後の月数に従って上皮の過形成からの組織変化を観察でき、癌化初期に著変する分子の探索ができる。Cygb^{-/-}マウスの乳腺をジェネティックス、エピジェネティックス、蛋白質、ペプチドなど多方面から解析検討して、新しい乳癌の予知・診断マーカー候補分子を見出す。それらの有用性は、大阪市立大学病院に通院・入院中の患者を対象として、患者の同意の下、血清、あるいは、PET などのイメージングを用いて検討する。

(4) 抗乳癌予防法や抗癌剤の開発：上記(1)-(3)の情報を用いて、癌の発生を予防する、さらには、癌をコントロールする医薬品の探索、化学合成を製薬メーカーなどのタイアップで行う。

3. 研究の方法

(1) Cygb^{-/-}マウスにおける乳癌発生率の把握と時間経過の追跡：現在までに10匹の雌マウスを9~12ヶ月間観察した結果、70%で乳腺の過形成と癌を発症していることが分かっている。飼育数を増加させて正確な癌発生率を把握する。現在までの観察では雌Cygb^{-/-}マウスには腫瘍が生じておらず、雌特異的であり、野生型では発生していない。経時的発生率も併せて検討する。また、経産マウスと処女マウスでの差異について検討する。

ヒトでは病理組織的に非浸潤癌 (非浸潤性乳管癌、非浸潤性小葉癌) と浸潤癌 (浸潤性乳管癌、特殊型) などに分類されるのでCygb^{-/-}マウス乳癌の相同性を病理医と連携して分類する。

既存のヒト乳癌マーカーとして CA15-3、CEA、BCA225、NCC-ST-439、c-erbB-2 (HER2) などがあり、また、ヒト乳癌はエストロゲンやプロゲステロンなどのホルモンとの関係が深い。Cygb^{-/-}マウスの発癌に関してこれら

の分子や受容体の発現変動があるかを検討し、本モデルのヒト病態との類似性を検証する。

(2) $Cygb^{-/-}$ マウスの乳癌発生における上皮とビタミン A 貯蔵線維芽細胞との相互作用の解析：上述した様に、 $Cygb$ は肝臓の星細胞から発見され、全身のビタミン A 貯蔵線維芽細胞に発現するユニークなグロビン蛋白質である。この分子の欠損がどのようなメカニズムで発癌に関与するのかを詳細に検討する。

野生型のメスマウス乳腺と対比させながら、デスミン、細胞性レチノール結合蛋白 (CRBP)、平滑筋アクチンなど線維芽細胞で発現がみられる蛋白発現を $Cygb^{-/-}$ マウスで検討する。また、線維芽細胞由来から産生され、発癌との関係が強く示唆されている transforming growth factor- β (TGF- β), platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), epidermal growth factor (EGF)、あるいは vascular endothelial growth factor (VEGF) などの産生について野生型と $Cygb^{-/-}$ マウス乳腺で比較する。

ビタミン A 貯蔵線維芽細胞の代表的な細胞として肝星細胞は比較的容易に分離できるため、この培養系を野生型あるいは $Cygb^{-/-}$ マウスから確立し、それらと乳癌細胞株 (ヒト由来、あるいは、 $Cygb^{-/-}$ マウス由来) と共培養して、乳癌増殖や増殖シグナル伝達に及ぼす $Cygb$ 欠損の意義を解析する。

ビタミン A 貯蔵線維芽細胞の代表的な細胞として肝星細胞は比較的容易に分離できるため、この培養系を野生型あるいは $Cygb^{-/-}$ マウスから確立し、TGF- β , PDGF, FGF, EGF, VEGF などの成長因子産生を詳細に比較検討する。

(3) $Cygb^{-/-}$ マウスにおける乳癌特異的分子の探索： $Cygb^{-/-}$ マウスでは発癌初期 (上皮の増生期) における分子変動も観察可能である。既存マーカーとは異なる血液中分子あるいは、放射標識などで分子イメージングできうる分子を探索する。

cDNA microarray を用いて野生型、 $Cygb^{-/-}$ マウス、および乳癌発症マウスの乳腺組織から total RNA を抽出して cDNA へと転換後チップと反応させる。野生型に比して 3 倍以上に

発現が増減する遺伝子をピックアップし、その転写産物を予測する。主として、細胞表面に表出、あるいは、細胞外と分泌され得る蛋白質に注目し、その蛋白質自体や分解ペプチド、あるいは、それらに対するリガンド (抗体) がバイオマーカーになりうる可能性を模索する。

上記に加え、組織から得られる蛋白質やペプチドをプロテオミクスで解析して、増生した乳腺や乳癌で特異的に変動する分子を網羅的に解析する。

$Cygb$ は他のグロビンと同様、酸素、一酸化窒素、一酸化炭素などのガス分子と結合すると同時に H_2O_2 代謝を制御する。従って、組織で産生される活性酸素ラジカル種のスカベンジャーになっている可能性がある。各種酸化ストレスマーカーやガス分子代謝酵素群に関して網羅的に解析する。

4. 研究成果

(1) $Cygb^{-/-}$ マウスは乳癌を自然発症する：

申請者らは $Cygb$ の生体内での役割を明らかにする目的で $Cygb^{-/-}$ マウス (C57BL/6) を作出した。その結果、雌マウスの乳腺組織に 70% の割合で乳腺上皮の過形成や乳癌が発生していることを確認し、その中には胸部筋組織に



浸潤している癌や肺へ転移しているものも観察された。現在までの知見から、 $Cygb$ 欠損が乳

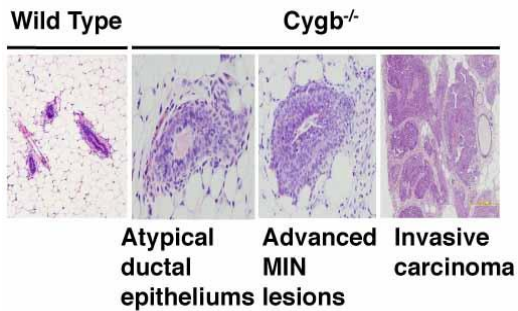
腺組織の酸化ストレスを過剰に発生させて細胞癌化に関与する可能性を見出してきた。

$Cygb$ に関しては世界中でも数カ所の研究室しか機能解析していない蛋白質であり、また、 $Cygb^{-/-}$ マウスの作出は現在までのところ申請者らのみが成功しているため本研究は独創性が高く、当施設でのみ可能である。このため $Cygb^{-/-}$ マウス自体が新規性の高く、かつ、自然発症する乳癌モデルである。

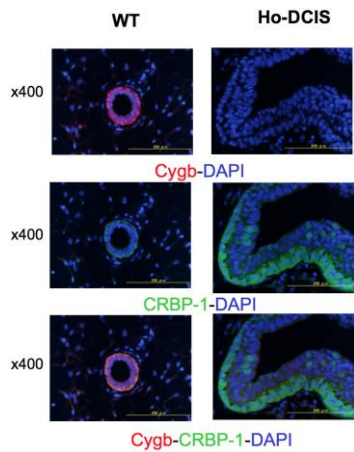
(2) $Cygb^{-/-}$ マウス乳腺における病理組織像：

現在までの申請者らの解析では、 $Cygb^{-/-}$ マウスでは成長と共に、乳腺の過形成 (hyperplasia) が生じ、その後乳管癌を発生し、なかには周辺の胸筋や肺へ転移する浸潤

性癌が出現して来る。従って、乳癌の発生と密接に関与する分子の探索、乳癌発生における上皮-間質細胞の相互作用を *Cygb* を中心に解析する本研究は斬新的である。



(3) 乳癌組織では CRBP-1 陽性細胞と *Cygb* 陽性細胞の相互作用が重要である：マウスの乳癌組織において *Cygb* や CRBP-1 が陽性である間葉系細胞の重要性について検討した。正常



の乳腺では上皮周囲にこれらの陽性細胞が存在し、毛細血管における pericyte と同様の配置をしていた。ところが *Cygb*^{-/-} マウスでは

CRBP-1 陽性細胞は一層であるが、癌化した上皮細胞が重層する像が観察された。以上の結果は、*Cygb* 欠損が上皮のがん化を促し、上皮と間葉の相互作用の欠如が生じていることを示唆した。

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 12 件)

①. Antifibrotic role of macrophage migration inhibitory factor: discovery of an unexpected function. Thuy le TT, Kawada N. *Hepatology*. 2012;55:1295-7.

②. Inflammation and fibrogenesis in steatohepatitis. Fujii H, Kawada N. *J Gastroenterol*. 2012;47:215-25.

③. N-Acetylglucosaminyltransferase V regulates TGF- β response in hepatic stellate cells and the progression of steatohepatitis. Kamada Y, Mori K, Matsumoto H, Kiso S, Yoshida Y, Shinzaki S, Hiramatsu N, Ishii M, Moriwaki K, Kawada N, Takehara T, Miyoshi E. *Glycobiology*. 2012;22:778-87.

④. MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. *Gut*. 2012, in press.

⑤. Fascin, a novel marker of human hepatic stellate cells, may regulate their proliferation, migration, and collagen gene expression through the FAK-PI3K-Akt pathway. Uyama N, Iimuro Y, Kawada N, Reynaert H, Suzumura K, Hirano T, Kuroda N, Fujimoto J. *Lab Invest*. 2012;92:57-71.

⑥. Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- β -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. *J Cell Physiol*. 2011;226:2535-42.

⑦. Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. Thuy le TT, Morita T, Yoshida K, Wakasa K, Iizuka M, Ogawa T, Mori M, Sekiya Y, Momen S, Motoyama H, Ikeda K, Yoshizato K, Kawada N. *Am J Pathol*. 2011;179:1050-60.

⑧. Cytoglobin expression of rectal subepithelial myofibroblasts: significant alterations of cytoglobin+ stromal cells in long-standing ulcerative colitis. Okayasu I, Mikami T, Yoshida T, Hana K, Yokozawa M, Sada M, Fujiwara M, Kawada N.

Histol Histopathol. 2011;26:679-88.

⑨. Evolution of hepatic fibrosis research.

Kawada N. Hepatol Res. 2011;41:199-208.

⑩. Cytoglobin, a novel member of the globin family, protects kidney fibroblasts

against oxidative stress under ischemic

conditions. Nishi H, Inagi R, Kawada N,

Yoshizato K, Mimura I, Fujita T, Nangaku M.

Am J Pathol. 2011;178:128-39.

⑪. A human-type nonalcoholic

steatohepatitis model with advanced

fibrosis in rabbits. Ogawa T, Fujii H,

Yoshizato K, Kawada N. Am J Pathol.

2010;177:153-65.

⑫. Inhibition of pancreatic stellate cell

activation by halofuginone prevents

pancreatic xenograft tumor development.

Spector I, Honig H, Kawada N, Nagler A,

Genin O, Pines M. Pancreas.

2010;39:1008-15.

[学会発表] (計 2 件)

①. Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. 16th

International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid, 2011 年 9 月 23 日、イタリア、フロレンス、口頭発表

②. Cytoglobin as a novel tumor suppressor in the liver. Kawada N, Le TT. AASLD, 2011 年11月4日、サンフランシスコ、USA

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：サイトグロビン遺伝子ノックアウト非ヒト癌モデル動物

発明者：河田 則文

権利者：河田 則文

種類：特願

番号：2010-052244

出願年月日：平成 22 年 3 月 9 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/syoukaki/hepatology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河田 則文 (KAWADA NORIFUMI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30271191

(2) 研究分担者

Le Thuy

大阪市立大学・大学院医学研究科・

博士研究員

研究者番号：10572175

小川 智弘 (OGAWA TOMOHIRO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・

博士研究員

研究者番号：70448752

元山 宏行 (MOTOYAMA HIROYUKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・医員

研究者番号：00573601

(3) 連携研究者

なし