

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19700371  
 研究課題名(和文)メラノーマ自然発症モデルマウスの腫瘍関連バイオマーカー探索への活用  
 研究課題名(英文)Utilization of spontaneous melanoma mice for finding biomarkers  
 研究代表者  
 川本 善之(KAWAMOTO YOSHIYUKI)  
 中部大学・生命健康科学部・准教授  
 研究者番号：10410664

研究成果の概要(和文)：本研究は、メラノーマ自然発症モデルマウス(RET トランスジェニックマウス)を用い、腫瘍発症の予知・予防法を確立するための腫瘍関連バイオマーカーを見出すことを目的として行った。プロテオミクスや DNA フォーカスアレイ等を用いた網羅的解析の結果、悪性腫瘍マウスの血清には Chemokine (C-X-C motif) ligand、CXCL10 および CXCL16 に明らかな発現増加を見出した。本分子はメラノーマの新規バイオマーカーとなりうることが初めて見出された。

研究成果の概要(英文)：RET-transgenic mice, which develop malignant melanoma, are useful for finding biomarkers which express in the serum or urine correlated with tumor progression and/or metastasis. We found that chemokine (C-X-C motif) ligand, CXCL10 and CXCL16 are significantly increased in serum of RET-transgenic mice which has malignant tumor. Our findings suggest that these proteins can be candidates for new biomarkers of melanoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	600,000	3,700,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：バイオマーカー、メラノーマ、RET、ケモカイン

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトのメラノーマに対する分子マーカーは、複数知られている。しかし、メラノーマ予知に利用できるマーカーは知られていない。それはこれまで見つかったマーカー分子の多くは、すでにメラノーマに罹患した患者

組織検体から得られたものしか手に入れられなかったからである。メラノーマ早期発見につながるマーカーを見つけるには、メラノーマ自然発症動物モデルの利用が不可避である。研究者の所属研究室では、メラノーマ自然発症モデルマウスを有し、メラノーマ発

症に関わるバイオマーカー探索に極めて有用と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、独自のメラノーマ自然発症モデルマウス (RET トランスジェニックマウス)、およびメラノーマ抑制モデルマウス (エンドセリンレセプターB(-/-)・RET マウス) を用い、腫瘍発症の予知・予防法を確立するための腫瘍関連バイオマーカーを見出すことを目的として行った。

## 3. 研究の方法

(1)メラノーマ発症トランスジェニックマウスの準備:RET トランスジェニックマウスは生後、約3カ月を経て良性腫瘍を発症し、約10カ月齢頃より悪性転化した腫瘍が見られるようになる。一方、エンドセリンレセプターBノックアウトマウスとの交配により得られるRET トランスジェニックマウスは、当初、腫瘍が抑制されるマウスの比較対象と考えられたが、その後の詳細な検討により当マウスは良性腫瘍期が極めて短く、高転移性の悪性腫瘍発症マウスであることが見いだされた。腫瘍の予知予防にはできるだけ良性腫瘍期のマウスを解析することが望ましいと考えられ、以下RET トランスジェニックマウスの解析に焦点を絞って検討した。

(2)アルブミン結合性タンパク質にフォーカスしたバイオマーカー探索:血清バイオマーカーを見出す戦略として、総血清タンパク質分子を比較することは現実的でない。そこで以下の2種類の手法を採用し、バイオマーカーの探索を行った。

①アルブミン吸着性分子の解析:市販のキットを用い、マウス血清からアルブミン吸着分子のみを抽出し、二次元電気泳動で差異を検討した。

②サイトカイン抗体アレイを用いた解析:マウス血清からサイトカインのみに着目し、増減パターンの差異を検討した。

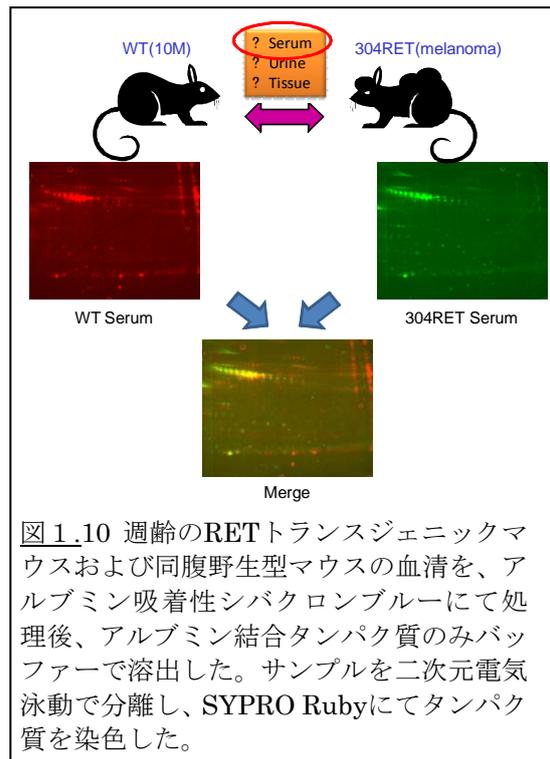
③DNAチップによる解析:RET トランスジェニックマウス腫瘍部位から樹立した細胞株において、腫瘍増悪因子であるTNF- $\alpha$ を投与した場合に発現変動する遺伝子を網羅的に解析した。

## 4. 研究成果

マウス血清成分を検体とし、アルブミン吸着性分子の解析によって、二次元電気泳動上での検出スポット数がおおよそ100~150程度となり、野生型マウス資料と比較して発現差のある複数のタンパク質が見出された(図1)。スポットの解析による同定では

有効なバイオマーカーは得られなかったが、アルブミン非吸着成分の検討有効と考えられた。

また、腫瘍未発症のトランスジェニックマウス血清および尿と同齢マウスとを、同方法により比較検討を行った。腫瘍未発症マウスと対照それぞれのアルブミン結合性分子とに明確な差がある分子は特定されなかったが、その理由として腫瘍未発症時と明らかに皮膚表層に腫瘍が認められる間の時期のサンプリングが比較的難しいこと、尿サンプルでは蛋白量が極めて少ないことが考えられた。



次に、悪性腫瘍が発症したマウスとの比較で、検討対象をサイトカイン遺伝子絞ったサイトカインフォーカスト抗体アレイを用いて調べた。その結果、Chemokine (C-X-C motif) ligandの一つであるCXCL16に明らかな発現増加が認められた(図2)。この分子については大腸がん、乳がん、肺がんで高発現することが知られるが、メラノーマでは確かな報告がなく、有用なバイオマーカー候補と考えられた。派生的に、チオール反応性アルキル分子による新たな酸化ストレス誘導能についての報告(Hossain K. et al, 2009)と、ヒ素によるRETの高度活性化に酸化還元システムが関与していること(Kato M. et al, 2010)を報告した。

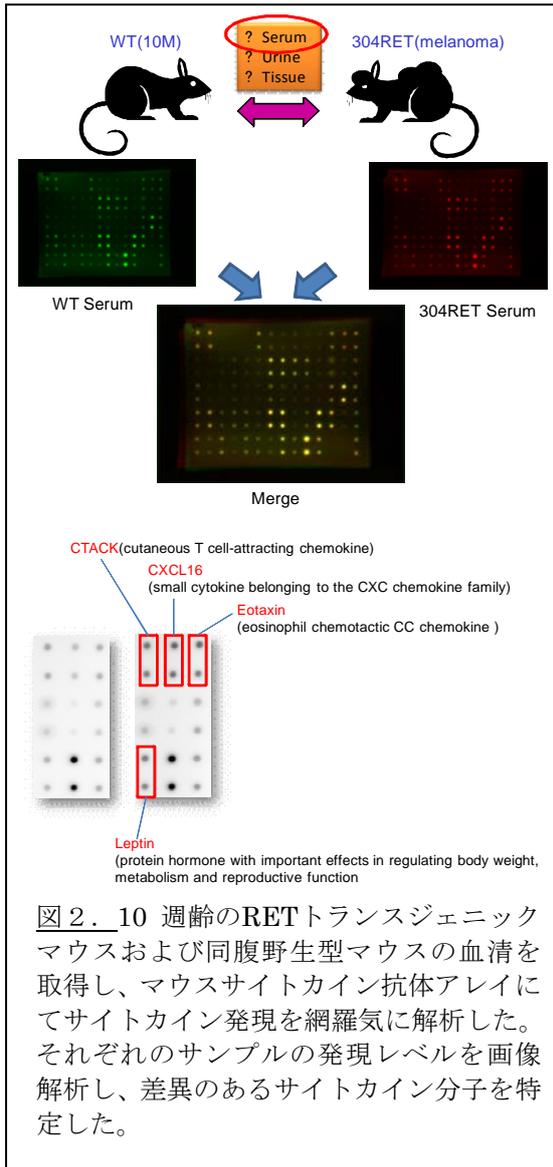


図2. 10週齢のRETトランスジェニックマウスおよび同腹野生型マウスの血清を取得し、マウスサイトカイン抗体アレイにてサイトカイン発現を網羅的に解析した。それぞれのサンプルの発現レベルを画像解析し、差異のあるサイトカイン分子を特定した。

さらに、Ret-Tgマウスの腫瘍部より樹立した腫瘍細胞株(Mel-ret細胞)は、TNF- $\alpha$ により浸潤能が増強されることを新たに見出した(図3)。

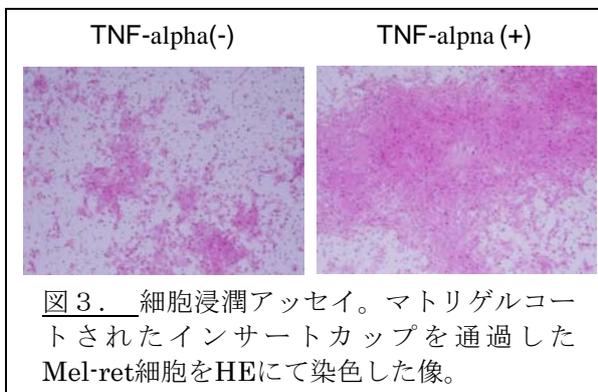


図3. 細胞浸潤アッセイ。マトリゲルコートされたインサートカップを通過したMel-ret細胞をHEにて染色した像。

すなわち TNF- $\alpha$  は Ret-Tg マウスにおける腫瘍悪性化のエンハンス要因の一つとして考えられることが示唆された。そこで、TNF- $\alpha$  を処理した Mel-ret 細胞と処理しない Mel-ret 細胞株における RNA をそれぞれ取得し、アンチセンス RNA とハイブリダイズさせて遺伝子発現を検出する DNA アレイによりディファレンシャルディスプレイを行った。その結果、TNF- $\alpha$  処理により極めて強く誘導される遺伝子として、細胞間接着分子 ICAM-1 と CXCL サブファミリーの一つ、CXCL10 が新たに見出された。サイトカインフォーカスト DNA アレイを用いて得られた、腫瘍の発症に伴い増加する CXCL12 と併せ、これらの分子の発現量変化や発現比の組み合わせによってメラノーマの悪性度をある程度予知できる可能性があり、現在、エンドセリンレセプター B ノックアウトマウスと交配した高転移性 RET マウスも含め、更なる検討を進めている。

### 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 2 件)

1: Kato M, Takeda K, Hossain K, Thang ND, Kaneko Y, Kumasaka M, Yamanoshita O, Uemura N, Takahashi M, Ohgami N, Kawamoto Y. A redox-linked novel pathway for arsenic-mediated RET tyrosine kinase activation. *J Cell Biochem.* 2010, 15;110(2):399-407. 査読有り

2: Hossain K, Kawamoto Y, Hamada M, Akhand AA, Yanagishita T, Hoque MA, Tsuboi H, Kato M, Nakashima I. 1,4-butanediyl-bismethanethiosulfonate (BMTS) induces apoptosis through reactive oxygen species-mediated mechanism. *J Cell Biochem.* 2009 Dec 1;108(5):1059-65. 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

① 川本善之、「チオール反応性化合物によるアポトーシス誘導とシグナル伝達機序」、第 18 回日本アポトーシス研究会学術集会、2009 年 8 月 1-2 日、長崎大学

② 川本善之、「ヒ素による細胞膜脂質ラフトを介する活性酸素産生機序の解析」、BMB2008、2008 年 12 月 9-12 日、神戸ポートアイランド

[その他]

ホームページ等

<http://www.chubu.ac.jp/english/faculty/profile/adeaa0e37067535f144217de609ba58430b7c6b5.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川本 善之 (KAWAMOTO YOSHIYUKI)  
中部大学・生命健康科学部・准教授  
研究者番号：10410664

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し