

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 5月 31日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380182

研究課題名（和文）動物の発生、記憶、腫瘍における細胞接着分子ギセリンの機能解明と応用化

研究課題名（英文）Functions of gicerin, a cell adhesion molecule in development, memory and oncogenesis of animals

研究代表者

塚本 康浩（TSUKAMOTO YASUHIRO）

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：90305657

研究成果の概要（和文）：動物の発生・再生・腫瘍形成および記憶における細胞接着分子ギセリンの役割を個体レベルで追求した。ニワトリの皮膚移植再生モデルを確立し、移植片の定着にギセリンおよびそのリガンドが関与すること、さらにギセリンの投与が再生を促進することを見出した。さらに、ギセリンおよびそのリガンドが腫瘍（大腸癌およびリンパ腫）の転移を促進することを腫瘍移植実験において明らかにした。ギセリン欠損動物は、出生前に致死となることが判明した。

研究成果の概要（英文）：In this study, the expression and functions of gicerin were examined in development, memory and oncogenesis of animals. Gicerin appeared in the skin dermal autografts of chickens and promoted the regeneration of epithelia of grafts. Furthermore, gicerin promoted the metastatic activities of tumor cells including colorectal cancer cells and marek's disease. Gicern knockout mice were totally lethal in development, thus its potential role in organogenesis and memory remains to be elucidated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 / 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：細胞接着分子、発生、記憶、腫瘍

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞接着分子は、細胞と細胞、さらには細胞と細胞外基質の接着に関与し、組織の形

成および個体の発生に重要であると考えられている。さらに、その接着能は、発生や奇形、腫瘍の浸潤・転移といった病的状態にも

関与することが明らかになっている。

(2) 私たちの研究グループは鶏の筋胃平滑筋より新しい細胞接着分子を発見し、筋胃（英名 gizzard ギザード）にちなみ“ギセリン（gicerin）”と名付け、同種分子間結合能を有することを見出した。マウス、ラットおよびヒトの完全長のギセリンの同定にも成功した。これまでに、ギセリンが正常発生だけではなく奇形、再生やといった病的組織の形成時に発現すること、さらにガン細胞に過剰発現し他臓器への転移・浸潤と関連性があることを報告してきた。

2. 研究の目的

(1) 発生・再生・腫瘍形成さらには学習における個体レベルでのギセリンの役割解明を網羅的に追求する。特にギセリンは神経ネットワーク形成に関与する分子なので、遺伝子改変マウスの感情・記憶・学習能力や神経組織再生能力に焦点を当てる。

(2) 世界で初めて癌患者の血液中にギセリン蛋白の湧出現象を発見したことから、新規の血中腫瘍マーカーとしての臨床応用化を試みる。また、癌に発現するギセリンを標的とした新規の癌治療法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 動物の発生・記憶におけるギセリンの役割解明

以前作製したノックアウトマウスの致死前の胎仔を経時的にサンプリングし組織学的に詳細に検索し個体形成におけるギセリンの重要性を知る。さらに、トランスジェニックマウスの作製を行う。全身または神経系にギセリンおよびSC1を発現するトランスジェニックマウスを作製する。これらの遺伝子改変動物を用いて、発生および記憶におけるギセリン発現の生物学的意義を検証する。

2) 再生におけるギセリンの関与：ニワトリ

を用いた皮膚の自己移植再生モデルを作製し、再生過程におけるギセリンとそのリガンドの発現動態の観察、および抗体やギセリン蛋白を用いた再生過程の治療効果などを病理組織学的に検証する。

3) ギセリンの同種分子結合能による腫瘍の転移および新規治療法の開発：がん細胞に発現するギセリンをターゲットとして新規癌治療法を開発する。可移植性腫瘍細胞にギセリンを発現させ、実験動物（ラットやニワトリ）に接種することで、ギセリンと転移性の関連性を検証する。次に、抗ギセリン抗体を腫瘍移植動物に接種することで、その抗ガン効果を見出す。

4. 研究成果

(1) 動物の発生・記憶におけるギセリンの役割解明：ギセリン欠損マウスおよびトランスジェニックマウス（ホモ個体）は、出生前に致死となることが判明し、発生過程におけるギセリンの重要性および、出生後の記憶や行動における関与・重要性を検証するには至らなかった。今後、発生初期（致死前）での組織構築等を組織学的に検索する必要がある。トランスジェニックマウスのヘテロ個体に関しては、乳腺腫瘍の発生率が高いことが判明した（下図）。



ギセリンのTg-マウス
全身に恒常的にギセリンが発現する系統。乳癌の発生率が野生型の2.5倍高い！

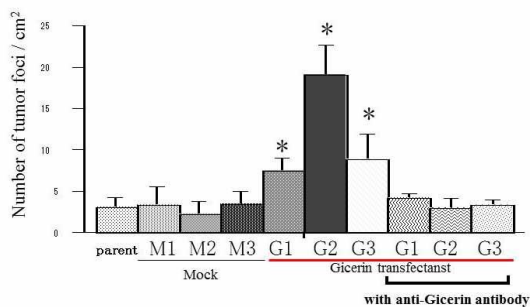
2) 再生におけるギセリンの関与：ニワトリ

の皮膚移植再生モデルを確立し、移植片の定着とその後の上皮組織の再生にギセリンおよびそのリガンドが関与することを見出した。これらの分子は、上皮再生時に一過性に発現し、修復後は消失した。ギセリン抗体を添加することで修復時間が延長した（再生の抑制）。このことから、ギセリンを介した細胞接着が皮膚移植に重要であることが判明した。さらにギセリンの投与が再生を促進することを見出した（下図）。これにより、皮膚移植の促進剤としてギセリン蛋白が応用化出来ることが期待された。



ギセリンおよびNOFの添加によるニワトリ皮膚の自己移植の再生促進

3) ギセリンの同種分子結合能による腫瘍の転移および新規治療法の開発：ギセリンを発現させた腫瘍細胞（大腸癌、リンパ腫）を用いて移植実験を行ったところ、ギセリンの発現が腫瘍細胞の遠隔転移を促進することが判明した。ラットへの大腸癌細胞の移植実験により、ギセリンが門脈を介した肝転移を促進することが判明した。さらに、抗ギセリン抗体の投与により、肝臓への転移数が減少したことから、腫瘍細胞上のギセリンをターゲットとした抗体投与は新規の癌治療法とし



ギセリンを発現させた大腸癌細胞の肝転移

で応用化されることが期待された（下図）。

また、ニワトリのマレック病での、リンパ芽球様腫瘍細胞にギセリンを発現させニワトリに移植したところ、肺、肝臓、腎臓への転移能が著しく促進されることが判明した。

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 7 件）

- ① Kamiyama Y, Adachi K, Handharyani E, Soejoedono RD, Kusano T, Inai M, Tsukamoto M, Kashiwagi S, Tsukamoto Y. Protection from avian influenza H5N1 virus infection with antibody-impregnated filters. *Virology J*, 8:54(Published online), (2011).
- ② Tsukamoto M, Hiroi S, Adachi K, Kato H, Inai M, Konishi I, Tanaka M, Yamamoto R, Sawa M, Handharyani E, Tsukamoto Y. Antibodies against swine influenza virus neutralize the pandemic influenza virus A/H1N1. *Mol Med Rep*, 4: 209-214, (2011).
- ③ Adachi K, Takama K, Tsukamoto M, Inai M, Handharyani E, Hiroi S, Tsukamoto Y. Ostrich produce cross-reactive neutralization antibodies against pandemic influenza virus A/H1N1 following immunization with a seasonal influenza vaccine. *Exp Ther Med*, 2: 41-45, (2011).
- ④ Handharyani E, Tsukamoto M, Tsukamoto Y. Expression of SC1, a cell adhesion molecule, promotes the metastatic activities of the *Gallus gallus* lymphoblastoid cell line MDCC-MSB1 derived from Marek's disease. *Avian Pathol*, 40: 111-115(2011).
- ⑤ Adachi K, Hattori M, Kato H, Inai M, Tsukamoto M, Handhartani E, Taira E,

Tsukamoto Y. Involvement of gicerin, a cell adhesion molecule, in the portal metastasis of rat colorectal adenocarcinoma cells. *Oncol Rep*, 24: 1427-1431, (2010).

- ⑥ Tsukamoto Y., Kataoka B, adachi K, Kato H, Inai M, Tsukamoto M, Handhartani E, Taira E. Involvement of gicerin, a cell adhesion molecule, in a dermal autograft chicken model. *Int J Mol Med*, 26: 661-666, (2010).
- ⑦ Kamiyama Y, Adachi K, Handharyani E, Soejoedono RD, Kusano T, Inai M, Tsukamoto M, Kashiwagi S, Tsukamoto Y. Protection from avian influenza H5N1 virus infection with antibody-impregnated filters. *Nature prec*, 4548.1, (*Published online*) (2010).

[学会発表] (計 1 件)

- ① 塚本康浩、足立和英、草野隆之、上山洋一郎。抗体担持エアフィルターを用いた高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 感染防御の試み。日本ウイルス学会 2010 年 徳島

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

- ① 名称：エンドセリン受容体を標的とした高病原性鳥インフルエンザ H5N1 感染の治療薬
発明者：塚本康浩
権利者：京都府立大学
種類：特許
番号：特願 2010-87975
出願年月日：平成 22 年 4 月 6 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 2 件)

- ①名称：ダチョウを用いた抗体、及びその作

製方法

発明者：塚本康浩

権利者：府立大学、科学技術振興機構

種類：特許

番号：特許第 4487051 号

取得年月日：平成 22 年 4 月 9 日

国内外の別：国内、PCT

②名称：メラノーマ又は肺癌の検査のためのキット

発明者：塚本康浩

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：特許第 4348556 号

取得年月日：平成 21 年 7 月 31 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 康浩 (TSUKAMOTO YASUHIRO)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：90305657