

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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591444

研究課題名（和文） 遺伝子改変メダカを用いた悪性黒色腫モデル系の構築

研究課題名（英文） New melanoma model using transgenic medaka fish

研究代表者

松崎 ゆり子 (MATSUZAKI YURIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40255435

研究成果の概要（和文）：本研究はメダカを悪性黒色腫モデル動物として利用し、安定的に腫瘍を生じる遺伝子改変メダカ系統を樹立し、個体ベースの新規抗癌化合物スクリーニングシステムを確立することを主たる目的としている。ヒトがん遺伝子 *HRAS^{G12V}* 導入メダカ系統とメダカ熱ショックタンパク遺伝子プロモーター下で Cre を発現する遺伝子導入メダカ系統を交配することにより、温度処理を施すことでヒト *HRAS^{G12V}* が発現するメダカを作製することができた。この二重遺伝子導入系統は、生後 6 か月の段階ですべての個体に黒色素胞の異常増殖もしくは悪性黒色腫が確認できた。薬剤投与試験の予備実験として悪性黒色腫が確認できた二重遺伝子導入メダカにソラフェニブ投与を試みたところ、ソラフェニブ投与群では有意に腫瘍増殖が抑制され、生存曲線においても有意な生存の延長がみられた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to construct the stable tumor bearing medaka line and to apply the line to drug screening. We intended to establish the melanoma model which can be detected tumors without autopsy for chemical screening in water tank. With cross transgenic(Tg)-*tyr:HRAS^{G12V}* medaka with Tg-*hsp:cre* medaka, we could obtain medaka line induced human *HRAS^{G12V}* by heat treatment. All of the double Tg medaka had melanophore hyperplasia or melanoma at six month post fertilization. Preliminary administration of sorafenib to this double Tg medaka having tumor showed significant inhibition of tumor growth and elongation of longevity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：メダカ、遺伝子導入、癌モデル生物

1. 研究開始当初の背景

2007年にメダカドラフトゲノムが発表され、ヒトやマウスとの比較が容易となり、ゲノムもゼブラフィッシュの約 1/2 で重複が少ないため、メダカは遺伝子レベルでの研究が容易になった。2005年には p53 欠失ゼブラフィッシュで BRAF 変異遺伝子導入を行い、7%の成魚に悪性黒色腫ができたことが報告されているが、遺伝子導入系統は作製されなかった。研究代表者は、個体に対する薬剤の効果と副作用を評価する悪性黒色腫モデル動物としてメダカは極めて有用であると考え、悪性黒色腫発症メダカの作製を着想するに至った。

2. 研究の目的

メダカを悪性黒色腫発症モデル動物として利用し、安定的に悪性黒色腫を生じるメダカ系統を樹立することを目的としている。水槽内で飼育するメダカの腫瘍が外観の目視で確認できる事は、スクリーニングの際に非常に有用な条件となる。そこで、色素細胞特異的に発現する遺伝子のプロモーター下流に癌遺伝子を連結し、胚に導入することにより、悪性黒色腫モデルの作製を試みる。導入した癌遺伝子の過剰発現で悪性黒色腫を発症するモデルを構築し、腫瘍形成・病期進行の解析システムの確立をめざす。さらに、薬剤の個体に対する効果と副作用を評価するモデル動物としての癌メダカの有用性について、既知の化合物を用いて評価する。

3. 研究の方法

(1) 色素細胞特異的遺伝子 *TYR*(メラニン合成必須酵素チロシナーゼをコードしている)プロモーターの下流に癌遺伝子 *c-Myc* もしくは、*BRAF^{V600E}*、*HRAS^{G12V}* を連結した組換え DNA を作製する。一細胞期のメダカ受精卵にこれらの組換え DNA を導入し、遺伝子導入系統における腫瘍形成率、組織染色像と転移の有無

などについて解析する。

(2) メダカ熱ショックタンパク (*medakaHSP*) プロモーター下で Cre を発現させることのできるメダカ系統 *Tg(hsp:cre)* と、*loxP* 配列を両端に持つ *EGFP* 遺伝子をヒト *HRAS^{G12V}* 遺伝子の上流に挿入したヒト *HRAS^{G12V}* メダカ系統 *Tg(tyr: HRAS^{G12V})* を交配することにより、温度処理を施した時にのみ、ヒト *HRAS^{G12V}* が発現するメダカを作製する。交配で得られた二重遺伝子導入系統における腫瘍形成率、生存曲線、組織染色像と転移の有無などについて解析する。

(3) 本研究で得られた悪性黒色腫発症メダカを用いて、抗癌剤スクリーニング系の開発を試みる。連携研究者の蓄積してきた低分子化合物ライブラリーを、体表に悪性黒色腫を発症したメダカへの投与に用いる。抗腫瘍効果が報告されている薬剤で予備実験を行う。

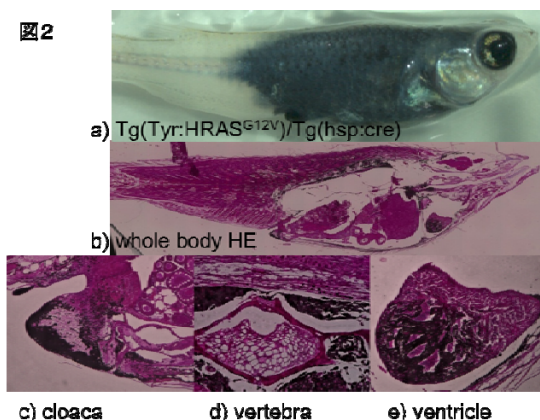
4. 研究成果

(1) *c-Myc* 導入個体からは 1 系統、*BRAF^{V600E}* 導入個体からは 3 系統の遺伝子導入系統が得られたが、*HRAS^{G12V}* を導入した場合はメダカが成魚に生育する前に致死となった。*BRAF^{V600E}* 導入系統では 3 系統すべてで筋肉組織内に腫瘍が形成される個体を得られたが (図 1)、体表には変異のみられない *c-Myc* および *BRAF^{V600E}* 遺伝子導入個体においても、組織切片の HE 染色・免疫染色により、肝臓、腎臓、脾臓、腸上皮などに腫瘍形成が見られた。これらのことから、*c-Myc*、*BRAF^{V600E}* の導入単独で腫瘍を形成するメダカを作製できたと考えている。



図1 a) *Tg(Tyr::BRAF^{V600E}::Dlx5a)*メダカ1
b) メダカ1 蛍光顕微鏡写真
c) *Tg(Tyr::BRAF^{V600E}::Dlx5a)*メダカ2
d) メダカ2 HE染色

(2) 交配で得られた *HRAS^{G12V}/cre* 二重遺伝子導入系統メダカでは、黒色素胞が本来存在する眼球および腹膜とその周囲に黒色腫瘍がみられた。孵化以前から黒色素胞が過形成する個体もあり、受精後 6 カ月ではすべての個体 (16/16 個体) に黒色素胞の異常増殖もしくは悪性黒色腫が外観から確認できた。また孵化前の温度処理は早期の致死性を高めたが、これは、*Tg(hsp:cre)* 単独であっても早期致死性がみられたことから、Cre タンパクの存在自体による影響も考えられる。また、受精後 4 カ月以降に腫瘍死と思われる死亡個体が増加し、最長寿命は 10 か月であることなどがわかった。チロシナーゼが本来発現している眼球、腹膜での黒色素胞過形成が腫瘍化の起源となっていると考えられるが、個体を固定後、組織切片を作製し、HE 染色を行うと、腹膜、眼球だけでなく、腎臓、肝臓、脾臓、心臓、消化管、筋肉内、骨周囲、上顎周囲、脳など、多くの組織で黒色腫瘍が見られた (図 2)。本研究で得られた *HRAS^{G12V}* 導入メダカでは、成魚だけでなく稚魚および胚の段階から過形成や黒色腫を発症するので、各々の段階で薬剤スクリーニングに使用できる可能性があるが、幼体で可能であれば使用薬剤は少量ですむとことになり、低コストでのスクリーニングが可能である。



(3) 薬剤投与の予備実験として Ras シグナル下流に位置する Raf キナーゼ受容体の阻害剤ソラフェニブの投与を行った。1 回につき 24 時間の薬浴を週 2 回、2 週間で計 4 回行い、

投与前と投与後の個体写真の比較を行った。ソラフェニブ投与群と対照実験とした溶剤の DMSO 投与群とで画像解析により担癌個体の黒色領域増加面積を比較したところ、ソラフェニブ投与群では統計的有意差で黒色領域の増加が抑制された。また、生存曲線においてもソラフェニブ投与群は対照群と比較し有意な生存期間の延長がみられた。

以上より、本研究で樹立されたヒト *HRAS^{G12V}* 遺伝子導入メダカ系統は悪性黒色腫治療モデルとして有用な系であることが確認された。

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 4 件) (すべて査読有り)

- ① Sampetean O, Saga I, Nakanishi M, Sugihara E, Fukaya R, Onishi N, Osuka A, Akahata M, Kai K, Sugimoto H, Hirao A, and Saya H: Invasion precedes tumor mass formation in a malignant brain tumor model of genetically modified neural stem cells. *Neoplasia* 13: 784-791, 2011
- ② Arima Y, Hayashi H, Sasaki M, Hosonaga M, Goto TM, Chiyoda T, Kuninaka S, Shibata T, Ohata H, Nakagama H, Taya Y and Saya H: Induction of ZEB by inactivation of RB is a key determinant of the mesenchymal phenotype of breast cancer. *J Biol Chem* 287: 7896-7906, 2012
- ③ Tamada M, Nagano O, Tateyama S, Ohmura M, Yae T, Ishimoto T, Sugihara E, Onishi N, Yamamoto T, Yanagawa H, Suematsu M and Saya H: Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. *Cancer Res* 72: 1438-1448, 2012
- ④ Arima Y, Hayashi N, Hayashi H, Sasaki M, Kai K, Sugihara E, Abe E, Yoshida A,

Mikami S, Nakamura S and Saya H: Loss of p16 expression is associated with the stem cell characteristics of surface markers and therapeutic resistance in estrogen receptor-negative breast cancer. *Int J Cancer* 130: 2568-2579, 2012

[学会発表] (計 10 件)

- ① 佐谷秀行: シーズ探索その1「大学における基礎研究を創薬に結び付けるために」。第12回抗悪性腫瘍開発フォーラム。2012年2月18日、東京都、吉田富三記念講堂、がん研究会がん研究所
- ② 松崎ゆり子, 佐谷秀行, 他、*HRAS^{G12V}* transgenic medaka fish develop melanoma with high frequency、The 1st strategic meeting for medaka research、2011年11月23日、愛知県: Okazaki conference center
- ③ 佐谷秀行: 癌幹細胞の治療抵抗性を制御する分子機構。パネルディスカッション3「がん幹細胞研究の進展と治療展開」。第49回日本癌治療学会学術集会、2011年10月27日、愛知県、名古屋国際会議場
- ④ 松崎ゆり子, 佐谷秀行、*HRAS^{G12V}* transgenic medaka fish develop melanoma with high frequency、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月4日、愛知県: 名古屋国際会議場
- ⑤ 佐谷秀行: がん幹細胞の治療抵抗性メカニズム。シンポジウム「がん幹細胞研究の最前線」。第70回日本癌学会学術総会。2011年10月3日、愛知県: 名古屋国際会議場
- ⑥ 佐谷秀行: がん幹細胞の性質を制御する分子機構とその治療戦略。招待講演。CBI学会第316回研究講演会「がん研究とがん治療薬の最前線」。2011年4月18日、東京都、総評会館
- ⑦ 松崎ゆり子, 佐谷秀行, 他、New melanoma

model using transgenic medaka fish、日本分子生物学会年会、2010年12月9日、兵庫県: 神戸国際会議場

- ⑧ 松崎ゆり子, 佐谷秀行、他、メダカ悪性黒色腫モデル系の構築、第16回小型魚類研究会、2010年9月19日、埼玉県: プラザイースト
- ⑨ 松崎ゆり子, 佐谷秀行、遺伝子改変メダカを用いた発癌モデルの構築、日本癌学会学術総会、2009年10月1日、神奈川県: 横浜国際会議場
- ⑩ 松崎ゆり子, 佐谷秀行、メダカを用いた悪性黒色腫モデル系の構築、第15回小型魚類研究会、2009年9月12日、愛知県: 名古屋大学野依記念学術交流館

[その他]

ホームページ等

<http://www.genereg.jp/html/research/2011/08/post.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 ゆり子 (MATSUZAKI YURIKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 40255435

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐谷 秀行 (SAYA HIDEYUKI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 80264282