

## 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25年5月31日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22700457

研究課題名（和文）メラノーマ自然発症マウスを用いたプロテオミクス解析による新規疾患関連分子の探索

研究課題名（英文）Exploration of disease-related proteins from spontaneous model of melanoma by proteomics analysis

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）：

本研究は悪性黒色腫を自然発症するモデルマウス、RET-トランスジェニックマウスを用い、主にプロテオミクス解析を行い、新規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。マウス血清プロテオミクス解析のほか、RET-Tg マウス腫瘍由来細胞株を用いた DNA チップ解析、マウスメラノーマ細胞株の 2G-DIGE 解析により、従来知られていなかった新たな腫瘍発症・転移関連分子候補を複数見出すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：

RET-transgenic (RET-Tg) mice are useful for identifying melanoma-related biomarkers which can predict tumor progression or metastasis. In this study, we found some serum proteins which may relate to melanoma progression or metastasis by proteomic study. In addition, invasive activity of Mel-ret cells, which were established from RET-tg mice, treated with TNF-alpha were enhanced, and some up- or down-regulated genes were identified by DNA array analysis. 2-Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE) analysis revealed differential expression of some proteins between B16 melanoma cell line and the highly metastatic cell line B16-F10. In conclusion, we identified some potential candidate for melanoma-related biomarkers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物額・実験動物学

キーワード：疾患モデル

## 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫（メラノーマ）は、極めて悪性度が高い皮膚がんとして恐れられており、一説には環境破壊が原因とも言われている。我が国でも発症率が年々増加しているが、その

発症機序の解明と予防、治療法は確立しておらず、喫緊の課題である。メラノーマの悪性化予知分子の同定がされてこなかった理由は、その有用なモデル動物がなくこれまで全く利用されて来なかったためである。近年、ソ

フト・ハードの両面において、プロテオミクス解析が飛躍的に進歩し、疾患モデルからその疾患に関連し変動するプロテインマーカー、すなわち疾患バイオマーカーを探索する基盤が整ってきた。腫瘍部位のみならず、尿や血清などについて対象を広げることで、従来にない腫瘍関連分子が見いだされる期待と可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、メラノーマを自然発症する独自のモデルマウス、RET トランスジェニックマウスを用い、最新のプロテオミクスシステムや DNA アレイチップを利用して、腫瘍の発症または悪性化を予知・診断できる新規疾患関連分子、すなわちバイオマーカー分子となる候補分子を同定することを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

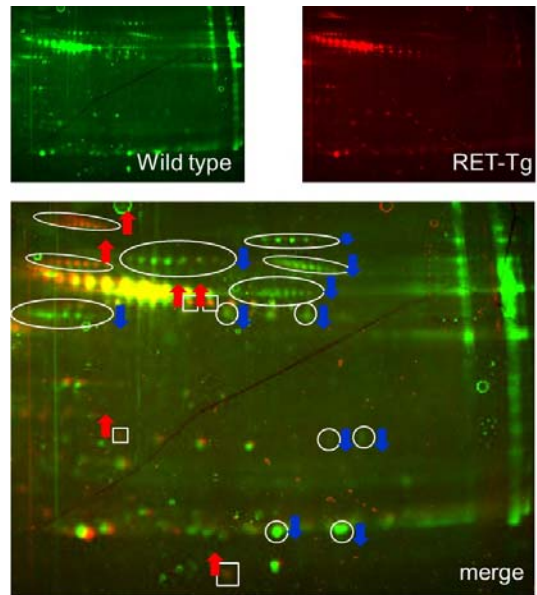
(1) 腫瘍を発症した生後 10 カ月齢の RET トランスジェニックマウスと、同腹同齢の野生型マウスの血清を採取し、シバクロンブルーによりアルブミンを吸着除去した血清を二次元電気泳動で分離し、プロテオーム解析を行った。

(2) TNF-alpha は腫瘍の増悪に関与することが報告されている。そこで、Ret トランスジェニックマウスより独自に樹立した腫瘍細胞 Mel-ret 細胞を用いて、炎症・ストレス関連のフォーカスト DNA チップアレイを用い、TNF-alpha に影響を受ける遺伝子発現の差異を検討した。Mel-ret 細胞を TNF-alpha (10ng/ml) で 18 時間暴露し、RNA を回収後、DNA チップ (210 遺伝子) 解析を行った。

(3) マウスメラノーマ細胞株として B16 が知られているが、比較的転移活性は低い。一方、同細胞から高転異性細胞株 B16-F10 が樹立されている。メラノーマ転移関連分子の探索に、蛍光標識二次元ディファレンシャル電気泳動法 (2D-DIGE) を用いて両者を比較した。

## 4. 研究成果

(1) メラノーマを自然発症したモデルマウスである RET トランスジェニックマウス (RET-Tg、12 ヶ月例) より血清をとり、アルブミン、免疫グロブリンを除去後にタンパク質の発現を二次元電気泳動により展開し、野生型と比較した。その結果、少なくとも 11 種類のタンパク質に腫瘍マウスで減少しているものが見られ、6 種類は腫瘍マウスで増加していることがわかった (図 1)。一例として腫瘍マウスで増加したタンパクの一つに、Apolipoprotein A-1 が見出された (論文投稿準備中)。



(図 1) RET トランスジェニックマウスの血清比較プロテオーム

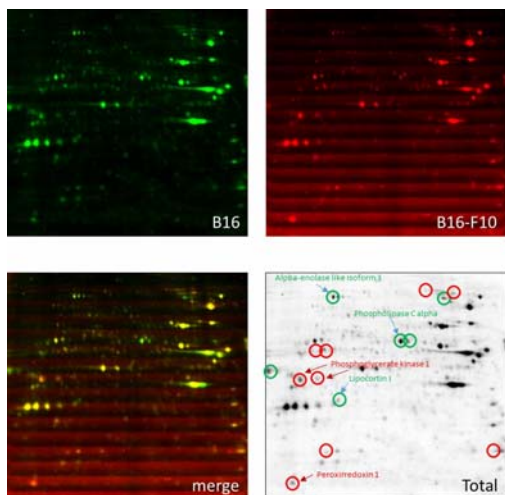
(2) Mel-ret 細胞は Taniguchi ら (Oncogene, 1992) によって RET トランスジェニックマウスから樹立された株化細胞である。メラノサイト由来腫瘍ほどの転移活性はないが、TNF-alpha に暴露すると、浸潤活性が亢進することを見出している。ヒトメラノーマ細胞株 A375P を用いた場合でも、マトリゲルインベーションアッセイで TNF-alpha による同様の効果を確認している。また腫瘍の転移亢進に TNF-alpha が関与することが複数の報告で明らかにされている。そこで本実験では Mel-ret 細胞において発現変動する遺伝子について、炎症に関連の深い遺伝子にフォーカスした DNA チップ解析を行った。その結果、発現量が 5 倍以上変化 (増減) した複数の遺伝子が見出された (図 2)。発現増加したタンパク質分子では、CCL2, CCL5, CXCL10 等のケモカインの発現増強が著しかった。一方、発現減少する分子では、PPAR  $\gamma$ -coactivator-1A の著しい減少が見出された。これらの遺伝子は TNF-alpha による腫瘍増悪の機序に何らかの寄与をしている可能性が示唆された (論文投稿準備中)。

UP regulated (TNF/control)		DOWN regulated (Control/TNF)	
Icam1	7.0	Casp8	11.0
Fas	11.7	Hgf	7.0
Ctfr	8.3	Mmp23	15.0
Cxcl10	11.2	Prdx6-rs1	6.0
Ccl2	22.9	Cyp7a1	5.0
Ccl5	14.6	Ppargc1a	942.0
Apoa5	17.3	Ucp2	57.0
Iib	5.5	Cyp4a12a	107.0
Lipc	5.3	MPO	6.6
Srebf1	10.1		
Tnf	17.0		
Cyp3a11	14.0		

(図 2) DNA チップアレイの結果 (抜粋)

(3) マウスメラノーマ細胞株 B16-F10 細胞株は、親株である B16 細胞株に比べ高い浸

潤・転移能を獲得している。両者の比較はメラノーマの転移亢進に関わる分子の発見に有効と考えられる。そこでB16とB16-F10の細胞プロテオーム解析を、2D-DIGEにより検討した。2D-DIGEは比較対象とするサンプルのタンパク質をCy3、Cy5など異なる蛍光波長の物質で標識した後両者を混合し、1枚の二次元電気泳動ゲルで比較をするため、ゲル間のスポットのずれを気にする必要がなく、正確に差異分子の検出が可能である。



(図3)B16とB16-F10の2D-DIGEによる比較

比較の結果、B16-F10で発現優位となっているスポットが少なくとも9、B16で発現優位となっているスポットが6あることが分かった。正確な同定は現在解析中であるが、予備的な知見として、図3に示す分子を一部見出した。

以上、本研究により、腫瘍を発症したRETトランスジェニックマウスの血清のプロテオミクス解析、RETトランスジェニックマウス由来細胞株、Mel-ret細胞を用いたTNF-alphaで変動する遺伝子のDNAアレイ解析、そしてメラノーマ細胞株B16とB16-F10とのプロテオミクス解析を行い、複数の差異分子を見出すことができた。本研究で行ったプロテオミクス解析では、全ての興味あるスポットが同定されたわけではなく、またDNAアレイチップ解析においても全遺伝子を対象としていないため、更に詳細にマーカー候補分子の同定作業を行う必要がある。最も重要な点は、これら発現差異のあった分子が、メラノーマの発症や転移を予知・診断できる新規バイオマーカーとして利用できるかどうかという点にある。今後、RETトランスジェニックマウスを用い、腫瘍バイオマーカーや予後予測バイオマーカーとして実際に利用できる分子をこれらの候補の中から抽出し検証することが課題と考える。

## 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6件)

- ①I. Yajima, M.Y. Kumasaka, N.D. Thang, Y. Goto, K. Takeda, O. Yamanoshita, M. Iida, N. Ohgami, H. Tamura, Y. Kawamoto, M. Kato, RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy, *Dermatology research and practice*, 査読有り, 2012 (2012) 354191. DOI, 10.1155/2012/354191
- ②I. Yajima, M.Y. Kumasaka, N.D. Thang, Y. Goto, K. Takeda, M. Iida, N. Ohgami, H. Tamura, O. Yamanoshita, Y. Kawamoto, K. Furukawa, M. Kato, Molecular Network Associated with MITF in Skin Melanoma Development and Progression, *Journal of skin cancer*, 査読有り, 2011 (2011) 730170. DOI, 10.1155/2011/730170
- ③I. Nakashima, Y. Kawamoto, K. Takeda, M. Kato, Control of genetically prescribed protein tyrosine kinase activities by environment-linked redox reactions, *Enzyme research*, 査読有り, 2011 (2011) 896567. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21755044>
- ④E. Matsushita, N. Asai, A. Enomoto, Y. Kawamoto, T. Kato, S. Mii, K. Maeda, R. Shibata, S. Hattori, M. Hagikura, K. Takahashi, M. Sokabe, Y. Murakumo, T. Murohara, M. Takahashi, Protective role of Gipie, a Girdin family protein, in endoplasmic reticulum stress responses in endothelial cells, *Molecular biology of the cell*, 査読有り, 22 (2011) 736-747. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21289099>

- ⑤A. Furukawa, Y. Kawamoto, Y. Chiba, S. Takei, S. Hasegawa-Ishii, N. Kawamura, K. Yoshikawa, M. Hosokawa, S. Oikawa, M. Kato, A. Shimada, Proteomic identification of hippocampal proteins vulnerable to oxidative stress in excitotoxin-induced acute neuronal injury, *Neurobiology of disease*, 査読有り, 43 (2011) 706-714. DOI, 10.1016/j.nbd.2011.05.024
- ⑥M. Kato, K. Takeda, K. Hossain, N.D. Thang, Y. Kaneko, M. Kumasaka, O. Yamanoshita, N. Uemura, M. Takahashi, N. Ohgami, Y. Kawamoto, A redox-linked novel pathway for arsenic-mediated RET tyrosine kinase activation, *Journal of cellular biochemistry*, 査読有り, 110 (2010) 399-407. DOI, 10.1002/jcb.22550

[学会発表] (計1件)

- ①川本善之、メラノーマ自然発症 RET トランスジェニックマウスを用いた腫瘍関連バイオマーカーの探索、第 84 回日本生化学会、2011 年 9 月 22 日、国際会議場 (京都)

## 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