

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590358

研究課題名(和文) 遺伝子発現誘導型の癌モデル動物における癌性カヘキシア発症の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for the pathogenesis of cancer cachexia that is observed in a conditionally K-rasG12V-expressed tumor model animal

研究代表者

鈴木 昇 (SUZUKI, NOBORU)

三重大学・生命科学研究支援センター・准教授

研究者番号：00202135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌活性型K-ras遺伝子(K-rasG12V)を条件的に発現するがん動物モデルを用いて、骨格筋特異的K-rasG12V発現により多形型横紋筋肉腫が誘導され、これが癌性カヘキシアモデルとなることを示した。由来する腫瘍細胞株の移植動物の表現型解析と腫瘍の解析により、炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン6(IL-6)、脳性ナトリウム利尿ポリペプチド(BNP)、副甲状腺ホルモン関連蛋白の重要性を示唆し、これまで癌病態との関連性がよく知られていないBNPが、カヘキシアの発症に関連する可能性を示した。さらに交配実験から、転写因子FoxN1が宿主の癌性カヘキシアの感受性関連因子であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We have identified an oncogenic K-rasG12V conditional tumor mouse model as both a pleomorphic rhabdomyosarcoma and a cancer cachexia model when K-rasG12V is specifically expressed in skeletal musculature cells. We have elucidated crucial roles of Interleukin-6 (IL-6), one of major inflammatory cytokines, and brain natriuretic peptide (BNP) and parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of cancer cachexia through phenotypic characterization of whole bodies that are inoculated with tumor-derived cell lines and analysis of induced tumors.

Furthermore, We have suggested forkhead box N1, one of the forkhead family or "winged-helix" transcription factors, as one of cachexia-sensitive factors for the tumor bearing individual.

研究分野：細胞内情報伝達

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：癌性カヘキシア 悪液質 癌モデル動物 K-ras IL-6 BNP PTHrP

### 1. 研究開始当初の背景

がん死は、1981年以降、日本人の死因の約30% (年間死亡者は30万人超) である。がん性悪液質は、経過中に起こる食欲減退・栄養失調を伴う全身衰弱、骨格筋と体脂肪の著明な減少を伴う「るいそう」、浮腫、貧血などの病態を示し、治療の障害、Quality of Lifeを低下、予後を不良とする。がん死の約20%において直接的原因となっており、極めて速やかに克服すべき病態である。しかしながら、がん性悪液質ががん細胞そのものを標的とした癌治療の成功によって消失するため課題として設定しにくかったことや、臨床病態があまりに複雑であるため、がん細胞が悪液質を誘導する特性とその特性を獲得する分子メカニズムの基礎研究は、発展途上であり、癌細胞の誕生から悪液質発症をトータルに再現する動物モデル実験系の作出が待たれていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、がん性悪液質を異常増殖や浸潤・転移などと並ぶがんの悪性化の指標となりえることを再認し、申請者らが作製した条件的にがんを誘導できる遺伝子改変型のモデル動物を用いて、がん性悪液質の発症機序を腫瘍因子と宿主因子およびその相互作用の観点で解析する。最終ゴールとして、がん性悪液質に関与する鍵となる分子群を解明し、がん医療において個人に最適な診断と治療が行える手がかりを提示する。

### 3. 研究の方法

本申請の土台となった先の研究 (基盤研究 (c) 20590276) の成果である悪液質誘導能を有する Tumor generating cell (RMS3) とそれを有さない Tumor generating cell (RMS6) DNA マイクロアレイ比較解析の結果得られた関連候補遺伝子リスト、インターロイキン6の悪液質誘導能付与因子としての知見を発展させ、以下の方法によって研究を

遂行した。

- (1) RMS3 株由来腫瘍に特異的に発現増強する遺伝子を RMS6 に強制発現した Tumor generating な細胞株を樹立する。
- (2) それらの細胞株について、悪液質誘導能獲得と悪液質病態維持能について個体レベルで解析をする。
- (3) RMS6 に悪液質誘導能を付与する遺伝子群について相互関連性を解析する。
- (4) 宿主との相互作用の観点から、種々のミュータント動物に RMS3 を移植し、悪液質症状の有無を調べる。
- (5) 同様の観点から、(ペプチド質量分析等を用いたペプチドマスフィンガープリンティング法による宿主血中の悪液質関連たんぱくのプロテオミクス解析をする。

### 4. 研究成果

(1) 癌活性型 K-ras 遺伝子 (K-rasG12V) を条件的に骨格筋に発現誘導して得られた多形型横紋筋肉腫に由来する細胞株 RMS3 に由来する腫瘍に発現する遺伝子の解析により、炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン6 (IL-6)、脳性ナトリウム利尿ポリペプチド (BNP)、副甲状腺ホルモン関連蛋白の各遺伝子の高発現を観測し、腫瘍における発現の重要性を示唆した。

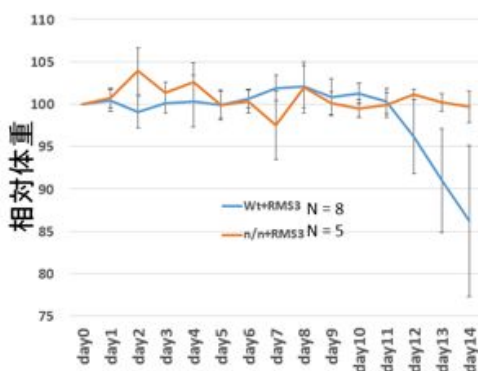
(2) レトロウイルス発現ベクターによって BNP または IL-6 を RMS6 細胞に強制発現した場合、BNP を発現した場合にのみ悪液質誘導能を獲得した。しかし、IL-6 については、メラノーマ細胞株 B16-F10 に大過剰 (最終血中濃度 10000 - 25000pg/ml) の強制発現をした場合は、悪液質誘導能獲得が観察されるので、上記 RMS6 系では IL-6 発現量が不十分か、さらに他因子の必要性が示唆された。

(3) 個体レベルの解析では、Rag2 遺伝子欠損動物、Toll 様受容体 4 欠損動物、MyD88 欠損動物はすべて RMS3 移植により悪液質を発症したため、獲得免疫や自然免疫は悪

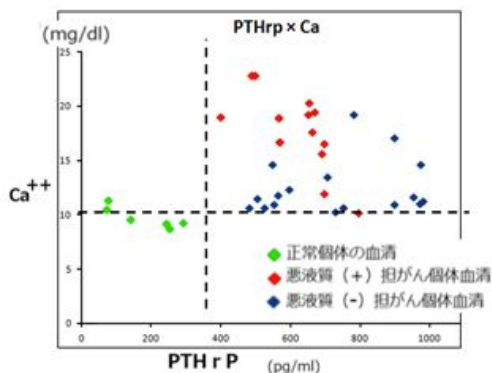
液質発症に関連しないことが示唆された。

(4) BNP 受容体ノックアウト動物も、RMS3 移植により悪液質を発症したことは、腫瘍から分泌される BNP は宿主の細胞ではなく腫瘍細胞自身にオートクライン的に作用し、悪液質誘導能付与に關与するらしい結果を得た。このことは、これまで癌病態との関連性がよく知られていない BNP が、カヘキシアの発症に関連する可能性を示した。

(5) さらに交配実験から、nu/nu ミュータント動物が悪液質発症耐性を示すことを証明した。このことは、メカニズムは不明であるが、転写因子 FoxN1 が宿主の癌性カヘキシアの感受性関連因子であることを示しており、同遺伝子の関連プロセスが悪液質発症に重要であることが示唆された。(下図)



(6) さらに、RMS 担癌個体で悪液質を発症する個体は、高カルシウム血症を示すことを見出した。本システムにおける高カルシウム血症は、高 PTHrP 血中濃度を示すがこれは、悪液質発症にとって必要ではあるが十分ではない結果を得た。



(7) 抗 PTHrP 抗体 (腫瘍移植 7 日目から投与) 抗 IL-6 受容体抗体 (腫瘍移植当日から投与) によって、高カルシウム血症と悪液質発症の抑制を認めているが、その因果関係については今後の課題である。

(8) 悪液質発症動物の血清中に、Hemopexin、Complement C3 のタンパク量増加、Serotransferrin、Alpha-2-macroglobulin、Transthyretin、Serum albumin 等のタンパク量減少を認めた。

#### 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6件)

(1) Kayakabe M, Kakizaki T, Kaneko R, Sasaki A, Nakazato Y, Shibasaki K, Ishizaki Y, Saito H, Suzuki N, Furuya N, Yanagawa Y.

Motor dysfunction in cerebellar Purkinje cell-specific vesicular GABA transporter knockout mice. *Front Cell Neurosci.* 7:286. doi: 10.3389/fncel.2014 (査読有)

(2) Thomanetz V, Angliker N, Cloëtta D, Lustenberger RM, Schweighauser M, Oliveri F, Suzuki N, Rüegg MA.

Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology.

*J. Cell Biol.* 201:293-308, 2013 (査読有)

(3) Saito H, Yamamura K-I, Suzuki N. Reduced bone morphogenetic protein receptor type 1A signaling in neural-crest-derived cells causes facial dysmorphism.

*Disease Models and Mechanisms.* 5:948-955, 2012 (査読有)

(4) D'Alessandro-Gabazza CN, Kobayashi T, Boveda-Ruiz D, Takagi T, Toda M, Gil-Bernabe P, Miyake Y, Yasukawa A, Matsuda Y, Suzuki N, Saito H, Yano Y, Fukuda A, Hasegawa T, Toyoboku H, Rennard SI, Wagner PD, Morser J, Takei Y, Taguchi O, Gabazza EC.

Development and Preclinical Efficacy of Novel Transforming Growth Factor-1 Short Interfering RNAs for Pulmonary Fibrosis.

*Am J Respir Cell Mol Biol.* 46:397-406, 2012 (査読有)

(5) Ohnishi S, Saito H, Suzuki N, Ma N, Hiraku Y, Murata M, Kawanishi S. Nitritative and oxidative DNA damage caused by K-ras mutation in mice.

*Biochem Biophys Res Commun.* 413:236-240, 2011 (査読有)

(6) Takenaka T, Edamatsu H, Suzuki N, Saito

H, Inoue Y, Oka M, Hu L, Kataoka T. Overexpression of phospholipase C in keratinocytes upregulates cytokine expression and causes dermatitis with acanthosis and T cell infiltration.

[学会発表](計 21 件)

(1) 齋藤 浩充、鈴木 昇

改変遺伝子マウスを用いた癌型 K-Ras 依存的な肺発癌感受性遺伝子の探索、第 78 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、(発表確定)、2014 年 5 月 24 日、名古屋大学(名古屋市)

(2) 鈴木 昇、齋藤 浩充

癌性カヘキシアモデル動物における腫瘍随伴高カルシウム血症とその耐性遺伝子および治療副作用としての腫瘍増大、第 78 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、(発表確定)、2014 年 5 月 24 日、名古屋大学(名古屋市)

(3) 齋藤 浩充、鈴木 昇、癌型 Ras 依存的な肺発癌感受性の解析、日本実験動物科学技術さっぽろ 2014、2014 年 5 月 16 日、札幌コンベンションセンター(札幌市)

(4) 齋藤浩充、鈴木昇、C57BL/6J-Ryr2tm1Nobs and A/J-Ryr2tm1Nobs mice as tools for exploring modifier genes in oncogenic K-ras driven lung tumorigenesis. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 5 日、神戸ポートピアアイランド(神戸市)

(5) 鈴木 昇、山村研一、齋藤 浩充、Apoptosis induced by BMP1A-mediated signaling reduction in neural crest-derived cells causes Facial dysmorphism. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 5 日、神戸ポートピアアイランド(神戸市)

(6) 齋藤 浩充、鈴木 昇、モデルマウスを用いたカヘキシー発症関連遺伝子の探索、第 86 回日本生化学会、2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜(横浜市)

(7) 鈴木 昇、齋藤 浩充、瀬川莉恵子、及川伸二、自家がんモデル動物におけるがん性悪液質の有無を評価するための血清バイオマーカー探索、第 86 回日本生化学会、2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜(横浜市)

(8) 齋藤 浩充、北村 浩、鈴木 昇  
遺伝子改変型横紋筋肉腫モデルマウスに発症する悪液質関連遺伝子のマイクロアレイ解析、第 77 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2013 年 5 月 25 日、名古屋大学(名古屋市)

(9) 齋藤 浩充、北村 浩、鈴木 昇、マイクロアレイ解析を用いたカヘキシーモデルマウスの病態関連遺伝子の探索、第 60 回日本実験動物学会総会、2013 年 5 月 16 日、つ

くば国際会議場(つくば市)

(10) 鈴木 昇、齋藤 浩充、Establishment of two mouse lines which have floxed oncogenic human K-RAS enables us to explore a novel tumor modifier(s) after K-RAS mutational event、第 85 回日本生化学会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡市)、2012 年 12 月 15 日、

(11) 鈴木 昇、齋藤 浩充、若年性ポリポーシスおよび 10q23 欠損症候群における顔面形成異常の分子メカニズム、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡市)、2012 年 12 月 14 日、

(12) 齋藤 浩充、鈴木 昇、IL-6 as a malignant factor of cancer cachexia、第 71 回日本癌学会総会、2012 年 9 月 20 日、ホテルロイトン札幌(札幌市)

(13) 齋藤 浩充、鈴木 昇、神経堤細胞における BMP R 1 A シグナル低下により誘導される顔面形成異常発症機構の解析、日本実験動物科学・技術九州 2012 学会、2012 年 5 月 26 日、別府国際コンベンションセンター(別府市)

(14) 鈴木 昇、齋藤 浩充、化学発癌高感受性 A/J 系統・低感受性 B6 系統間の癌型 K-ras 発現誘導型肺発癌感受性解析、日本実験動物科学・技術九州 2012 学会、2012 年 5 月 25 日、別府国際コンベンションセンター(別府市)

(15) 鈴木 昇、齋藤 浩充、がん細胞に悪液質誘導能を付与する因子としてのインターロイキン 6. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜(横浜市)

(16) 齋藤 浩充、鈴木 昇、新たなモデルマウスによるカヘキシー誘導因子の解析、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜(横浜市)

(17) 齋藤 浩充、鈴木 昇、遺伝子改変型 K-ras 発現肺がんモデルで認められた新たな系統間がん感受性、第 70 回日本癌学会総会、2011 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場(名古屋市)

(18) 齋藤 浩充、鈴木 昇、遺伝子改変型 K-ras 発現肺がんモデルを用いたマウス系統間発癌感受性の検討、第 84 回日本生化学会、京都国際会議場(京都市)2011 年 9 月 22 日

(19) 鈴木 昇、齋藤 浩充、がん細胞に悪液質誘導能を付与する因子としてのインターロイキン 6、第 84 回日本生化学会、京都国際会議場(京都市)2011 年 9 月 22 日

(20) 梅田龍平、齋藤 浩充、鈴木 昇、癌悪液質モデルにおける治療効果の検討、第 85 回日本実験動物学会総会、2011 年 5 月 26 日、タワーホール北堀(東京)

(21) 齋藤 浩充、鈴木 昇、神経堤由来組特異的 dominant negative type ALK3 発現マウスによる顔面形成過程における BMP シグナル機能の解析、第 58 回日本実験動物学

会総会、2011年5月25日、タワーホール北堀  
(東京)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件) 取得状況(計0件)

〔その他〕

ワークショップ発表

(1) 鈴木 昇、齋藤 浩充

癌性悪液質に伴う高カルシウム血症とその  
治療副作用としての腫瘍増大について 平  
成25年度「個体レベルのがん研究支援活動」  
ワークショップ 2014年2月18日 琵琶湖  
ホテル(大津市)

(2) 齋藤 浩充、鈴木 昇

癌型 K-Ras 依存的な肺発癌感受性遺伝子の  
探索 平成25年度「個体レベルのがん研究  
支援活動」ワークショップ 2014年2月18  
日 琵琶湖ホテル(大津市)

(3) 齋藤 浩充、鈴木 昇

癌型 K-Ras 誘導肺発癌感受性に関わる遺伝  
子探索システム作製と解析、平成24年度「個  
体レベルのがん研究支援活動」ワークショッ  
プ ) 2013年2月7日 琵琶湖ホテル(大  
津市)

(4) 齋藤 浩充、鈴木 昇

癌性悪液質の病態形成におけるホスト遺伝  
背景の解析、平成23年度「個体レベルのが  
ん研究支援活動」ワークショップ 2012年1  
月19日 琵琶湖ホテル(大津市)

ホームページ

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/animalcenter/animalgenomics2.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 昇 (SUZUKI, Noboru)

三重大学・生命科学研究支援センター・准教授

研究者番号：00202135

(2) 研究分担者

及川 伸二 (OIKAWA, Shinji)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10277006

齋藤 浩充 (SAITO, Hiromitsu)

三重大学・生命科学研究支援センター・助教

研究者番号：50303722

(3) 連携研究者 該当なし