

機関番号：14101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590276
 研究課題名（和文）骨格筋特異的遺伝子組み換えによる横紋筋肉腫の発生と病態の分子メカニズム
 研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanisms involving with the generation and the pathological condition of rhabdomyosarcoma induced by genetic recombination specifically in skeletal muscle
 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

研究成果の概要（和文）：

骨格筋特異的遺伝子組み換えによる多形型横紋筋肉腫(RMS)モデル動物を開発した。本モデルでは100%の率でRMSを形成し、さらに悪液質を発症した。RMS形成能と悪液質誘導能の双方を保持する細胞株(RMS3)とRMS形成能のみを保持する細胞株(RMS6)を樹立した。マイクロアレイ解析によって、RMS特異的に亢進する種々の遺伝子や病態の悪液質誘導能を付与する遺伝子としてIL-6遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）：

An generated animal model for rhabdomyosarcomas(RMSs) expressing K-rasG12V gene specifically in skeletal muscle by Cre/LoxP system on p53^{-/-} background developed pleomorphic RMSs and severe cachexia with incidence of 100%. Gene expression profiling of cachectic and non-cachectic cell lines derived primary tumors suggested various molecules involved with the RMS tumor development and disease state.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：横紋筋肉腫 ras p53 自家癌モデル動物 遺伝子改変動物 がん性悪液質カヘキシー

1. 研究開始当初の背景

癌は、1981年以降、日本人の死因の第1位（約30%）を占め、年間死亡者は30万人を超える。このような社会的背景のもと、ヒト癌の腫瘍誘導の原因となる細

胞内シグナル伝達系を遺伝子レベルで再現するモデル動物の開発と解析は、基礎医学分野における最重要課題のひとつであり、癌予防法や癌治療法の発見に必須である。また、食欲減退や体脂肪や筋重

量の著しい減少を伴う羸瘦を特徴とする癌性悪液質（カヘキシー）については、癌の増殖、浸潤、転移の研究に比べ遅れており、適切なモデル動物の開発と解析が必須である。

2. 研究の目的

ヒトがんのモデルとして、活性型 K-Ras 癌原遺伝子発現・p53 遺伝子機能欠失した多形型横紋筋肉腫 (rhabdomyosarcoma) を発症する自家がん発症型の遺伝子改変モデル動物を確立する。これを用いて、分子レベルにおいて、骨格筋細胞がどのように癌腫を形成し、宿主の病態（がん性悪液質）を惹起するののかについて明らかにする。最終的に、横紋筋肉腫の発生と病態の分子メカニズム解析をベースとして癌予防法や癌治療法の発見に有用な知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 多形型 RMS 腫瘍の病態に特異的な遺伝子発現の解析。

腫瘍組織、および野生型正常筋組織における遺伝子発現を DNA マイクロアレイにて比較解析し、活性型 K-Ras 癌原遺伝子と p53 遺伝子機能欠失により誘導される多形型 RMS 腫瘍特異的に制御される遺伝子群を明らかにする。

2) 腫瘍幹細胞の解析。

クローニングと移植による造腫瘍能によって Tumor stem cell の有無を調べる。

3) RMS の型（多形型、胎児型、胞巣型）と誘導時期、誘導部位との相関性の検討。

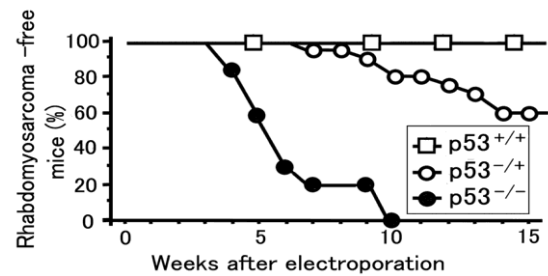
腫瘍型は、遺伝子型に規定されるのか、または、微小環境に規定されるのかについて原発一次腫瘍の誘導、または、前項にてクローン化した細胞を用いて調べる。

4) 活性型 K-Ras 癌原遺伝子発現 p53 機能欠失した多形型 RMS 誘導によるがん性悪液質（カヘキシー）の分子メカニズムの解析。

腫瘍組織、および野生型正常筋組織における遺伝子発現を DNA マイクロアレイにて比較解析し、活性型 Ras と p53 機能欠失により誘導される多形型 RMS 腫瘍特異的に制御される遺伝子群を明らかにする。

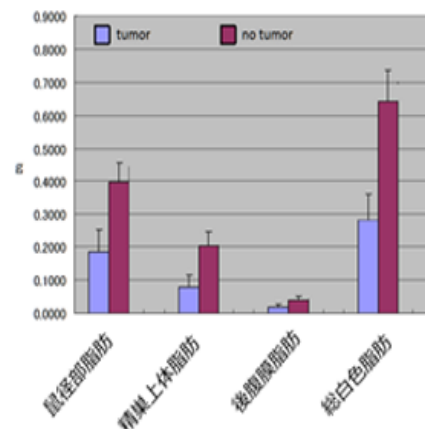
4. 研究成果

(1) RMS モデル動物、がん性カヘキシーモデル動物の確立。 骨格筋特異的な人工的遺伝子組み換えに多形型再現するモデル動物を国内外において初めて成功した。活性型 K-Ras 癌原遺伝子と p53 遺伝子不活性化のシナジーが腫瘍形成に重要であることを証明した。

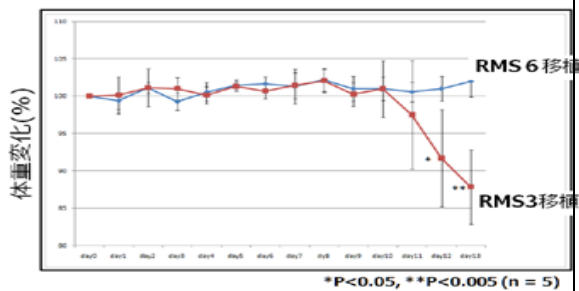


機能喪失 P53 遺伝子ヘテロの動物においては、P53 遺伝子不活性化について、臨床がんの多くのケースで検出されるヘテロ接合性喪失 (Loss of heterozygosity) を認めた。本モデルによって、正常細胞からがん細胞発生、腫瘍形成、宿主病態形成のメカニズムを同一個体できわめて高い再現性でもって経時的に解析できることが可能となった。

さらに担癌個体は 100% の率で食欲減退と羸瘦を特徴とするカヘキシーを発症し死にいたることを見出し、本モデルがヒトのがん性カヘキシーのモデルとなることを示した。



(2) Tumor generating cell のクローン化した。 活性型 K-Ras 癌原遺伝子と不活化 p53 遺伝子を有する人工的に誘導された RMS を株化 (RMS3) することに成功した。さらに限界希釈と移植による造腫瘍性解析を行い単一の細胞に由来する Tumor generating cell の株化 (RMS6) にも成功した。RMS6 株は RMS3 と増殖スピード、腫瘍形成能、腫瘍の組織型では区別がつかなかったが、宿主に悪液質を誘発する能力が欠失していた。



(3) 多形型 RMS 腫瘍特異的な遺伝子発現の DNA マイクロアレイによる比較解析の結果、有意に複数の遺伝子の発現増強を検出した。 多数の分泌因子のうち代表例として正常筋の 2000 倍以上の発現亢進を認めた EGF 様因子の Areg 遺伝子、BMP アンタゴニストの Grem1 遺伝子など。転写因子として、幹細胞関連遺伝子である SRY ボックス含有の Sox2 遺伝子や Sox4 遺伝子など。腫瘍形成にともなう炎症関連の Ptgs2 遺伝子、IL1β 遺伝子など。今後、この網羅的データをもとに特定の遺伝子が横紋筋肉腫形成にどのような意義を有するのか検討する基礎の構築に成功した。

(4) 腫瘍型は遺伝子型に依存することを示した。 横紋筋肉腫には幼弱—青年期に発症する胎児型、包巣型、成人期に発症する多形型の 3 タイプある。生後の動物の骨格筋はアダルトのそれと比較して細胞分裂度が高いほか微小環境が異なる。このとき、骨格筋細胞にがん化を開始させれば、アダルトに多い多形型横紋筋とはタイプの異なる腫瘍がで

きる可能性をテストした。0 日の動物の骨格筋に活性型 K-ras 遺伝子を発現させたところ、全例にアダルトと同じ多形型の横紋筋が誘導された。少なくとも多形型横紋筋肉腫については腫瘍外の微小環境より遺伝子型に依存する可能性が示唆された。

(5) 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 (IL-6) の機能を見い出した。 悪液質は癌死の約 20% の直接の死因であるが、どのような腫瘍因子、または腫瘍—宿主相互作用によって悪液質が引き起こされるのかは未だに不明な点が多いのが現状である。カヘキシーを誘発する RMS3 由来腫瘍と誘発しない RMS6 由来腫瘍の遺伝子発現について DNA マイクロアレイによる比較解析を行い、前者で発現亢進が認められる複数の細胞外分泌因子を同定した。そのうち、IL-6 について、悪液質との関連を解析した。本モデル系では、カヘキシーを発症する担癌個体の血清 IL-6 濃度は非担癌個体と有意な差は認められなかった。また、抗 IL-6 受容体抗体の大量投与によって、IL-6 シグナル伝達を遮断してもカヘキシーを全く抑制できなかった。以上から、本系のカヘキシー発症の病態の維持には、IL-6 シグナル伝達系が関与していないことを証明した。しかしながら、カヘキシーを誘発する RMS3 由来腫瘍では IL-6 遺伝子発現が有意に高いため何らかの機能を有すると考え、抗 IL-6 受容体抗体を腫瘍が増大する前に投与した。結果、抗 IL-6 受容体抗体は腫瘍の増殖には影響せずに悪液質の発症時期を有意に遅延させることが判明した。このことは、IL-6 シグナルが腫瘍細胞が悪性化し宿主に悪液質を誘導する性質を獲得する際に、重要な役割を担っていることを示唆する。これまで IL-6 はカヘキシーの直接の原因物質のひとつと考えられていたが、本研究は IL-6 は腫瘍細胞

にカヘキシー誘導能を付与する分化因子様の作用も有することを初めて示した。

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 5 件)

- 1) Takenaka T, Edamatsu H, Suzuki N, 他 5 名、3 番目、Overexpression of phospholipase C ϵ in keratinocytes upregulates cytokine expression and causes dermatitis with acanthosis and T cell infiltration. *European Journal of Immunology*, 査読有り、41 巻、2011 年、202-213 ページ
- 2) Kalinovsky A, Boukhtouche F 他 5 名、5 番目、Development of axon-Target specificity of ponto-cerebellar afferents. *PLoS Biol*, 査読有り、9 巻、2011 年、e1001013
- 3) Mizutani H, Okamoto R, Moriki N, 他 11 名、9 番目 Overexpression of myosin phosphatase reduces Ca⁽²⁺⁾ sensitivity of contraction and impairs cardiac function. *Circulation Journal*, 査読有、74 巻、2010 年、210-218 ページ
- 4) Saito H, 他 7 名、8 番目 (責任著者) Knockdown of Cav2.1 calcium channels is sufficient to induce neurological disorders observed in natural occurring Cacnala mutants in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有り、390 巻、2009 年、1029-1033 ページ
- 5) Yamamura S, Saito H, Suzuki N, 他 8 名、3 番目、Effects of zonisamide on neurotransmitter release associated with inositol triphosphate receptors. *Neurosci. Lett*. 査読有り、454 巻、2009 年、91-96 ページ

[学会発表] (計 27 件)

- 1) 鈴木昇、吉田 利通、加藤琢磨、齋藤浩充「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 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 10 日 神戸
- 2) 齋藤浩充、吉田利通、加藤琢磨、鈴木昇「横紋筋肉腫モデルマウスに発症する悪液質(cachexia)関連遺伝子の解析」第 57 回 日本実験動物学会総会 2010 年 5 月 12 日 京都
- 3) 齋藤 浩充、吉田 利通、鈴木 昇「横紋筋肉腫モデルマウスに発症する悪液質(cachexia)関連遺伝子の解析」第 33 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 10 日 横浜
- 4) 齋藤 浩充、吉田 利通、鈴木 昇「横紋筋肉腫モデルマウスに発症する悪液質(cachexia)関連遺伝子の解析」第 68 回日本癌学会総会 2009 年 10 月 2 日 横浜
- 5) 齋藤浩充、山崎英俊、鈴木昇「神経堤由来組織特異的 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 56 回日本実験動物学会総会 2009 年 5 月 15 日 大宮
- 6) 齋藤 浩充、吉田 利通、鈴木 昇「カヘキシー誘発型腫瘍と非誘発型腫瘍の遺伝子発現マイクロアレイ比較解析」第 31 回日本分子生物学会年会 2008 年 12 月 13 日 神戸
- 7) 大西志保、齋藤浩充、鈴木昇、平工雄介、村田真理子、川西正祐「ras 遺伝子変異マウスにおける酸化およびニトロ化 DNA 損傷」第 37 回 日本環境変異原学会 2008 年 12 月 4 日 宜野湾
- 8) 齋藤浩充、鈴木昇 「多形型横紋筋肉腫モデルマウスの発症週齢による発症頻度

の解析」 第 67 回 日本癌学会総会

2008 年 10 月 30 日 名古屋

[その他]

ワークショップ

1) 鈴木昇、齋藤浩充「癌性悪液質の病態を再現する遺伝子改変型がんモデルマウスの解析」ワークショップ：個体レベルのがん研究の魅力：培養細胞と臨床研究をつなぐマトリクス 2011 年 2 月 3 日 大津

2) 齋藤浩充、鈴木昇 「遺伝子改変肺がんモデルマウスで認めた新たな系統間発がん感受性」ワークショップ：個体レベルのがん研究の魅力：培養細胞と臨床研究をつなぐマトリクス 2011 年 2 月 3 日 大津

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 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし