

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6月3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：22790532

研究課題名（和文）トランスジェニックマウスを用いたCD109の機能解析および発癌機構の検討

研究課題名（英文）Elucidation of CD109 function and its tumor promotion using transgenic mice overexpressing CD109

研究代表者

祖父江 沙矢加（SOBUE SAYAKA）

中部大学・臨床検査技術教育・実習センター・助教

研究者番号：50513347

研究成果の概要（和文）：本研究では、初めに CD109 を全身に強く発現させたトランスジェニックマウスを作製し CD109 の分子機能の一端を明らかにする事を試みた。本トランスジェニックマウスでは血清に可溶性 CD109 の著しい増加を認めただけ 30%程度の割合で生後 1 年前後に腫瘍形成を認めた。次に CD109 のプロモーター解析を行い、発癌とともに CD109 が発現増加する機序を検討した。その結果、一部の細胞株では転写因子の Egr1 を介して CD109 の発現が増強することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In this study, I first generated a transgenic mouse overexpressing CD109 under control of CAG promoter and investigated its molecular function using the transgenic mouse. I observed elevated serum-concentration of soluble form of CD109. Thereafter I found tumor development in one-third of the transgenic mice around the age of one year. Its molecular mechanisms remain under study. I next investigated why CD109 is up-regulated during carcinogenesis in several carcinomas by promoter analysis of CD109. I finally demonstrated that CD109 expression is up-regulated in subsets of carcinomas through Egr1 induction during their carcinogenesis.

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
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：CD109、トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

CD109 は α 2-マクログロブリン/C3, C4, C5 ファミリーに属する glycosylphosphatidylinositol(GPI)-結合型の細胞表面糖タンパクである。CD109 は以下に示す異なった3つの側面からこれまでに機能解析が行われてきている。

(1) 造血幹細胞、巨核球・血小板表面抗原としての CD109

(2) 癌関連遺伝子としての CD109

(3) TGF- β レセプター関連分子としての CD109

このように CD109 の機能解析はさまざまな側面から固形癌由来の細胞株を用いて行われてきたが、最初に細胞表面抗原として CD109 の存在が確認された造血組織における CD109 の生理機能が未だ不明なこと、正常の扁平上皮には発現が低い CD109 が、な

ぜ発癌過程の中で発現が亢進しそれが発癌過程をどの様に修飾しているか解明されていないこと、TGF- β レセプターとの相互作用に関する詳細な分子機構は未だ明らかにされていないことなど、CD109の分子機構について解決されていないことが多く残っている。

CD109に関する未解決な分子機構を明らかにすることにより、CD109を発現するヒトの扁平上皮癌に対する新規治療法または診断法の開発に応用できる可能性がある。これまではCD109の研究は細胞株を用いた解析が中心に行われてきたが、より詳細な生理機能の検討には個体レベルの検討が必須である。

そこで研究代表者らが開発に取り組んできたCD109を全身に強制発現させたトランスジェニックマウスを用いて、CD109の機能を明らかにし、発癌促進機構について解明できると考えた。さらにCD109のプロモーター解析を行い、腫瘍化の過程でCD109の発現が増加する分子機構を明らかにすることを企図した。

2. 研究の目的

CD109の分子機能の詳細を明らかにするために、本研究ではCD109をマウスの全身に強く発現させたトランスジェニックマウスを用いて、発癌過程などの病的過程におけるCD109の作用を個体レベルで解明することを目的とした。次に発癌においてCD109も発現が増加する機序を説明するためにCD109のプロモーター解析を行い転写レベルでの発現調節機序を明らかにした。最後にCD109に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。さらにこのモノクローナル抗体を用いた、血清中の可溶性CD109を定量可能なELISA法の開発を目的とした。可溶性CD109の血中濃度が、扁平上皮癌などのCD109高発現癌の病勢と相関するかを検討し、CD109を標的とした新規臨床診断技術の確立を目指すことを本研究の最終目的とした。

3. 研究の方法

(1) CD109発現トランスジェニックマウスにおける表現型の確認

系統ごとにCD109発現トランスジェニックマウスより臓器を採取し、各臓器におけるCD109の発現レベルをmRNAおよびタンパクレベルで評価した。さらに免疫染色を行い各臓器の組織構築におけるCD109の発現パターンを把握した。同時に野生型マウスにおけるCD109の組織学的発現分布を検証した。

また、CD109は発癌との関連が報告されていることから、経時的観察によりCD109トランスジェニックマウスに特徴的变化が現

れるかどうかを検討した。

(2) CD109のプロモーター解析

発癌におけるCD109の役割を詳細に解析するため、CD109発現量が異なる二つのメラノーマ細胞株を用いて、CD109のプロモーター解析を行った。CD109の発現が高い細胞株と低い細胞株における細胞内シグナル伝達物質の発現量をウエスタンブロット法により検討した。

次に、CD109の発現が高い細胞株では低い細胞株に比べて転写因子Egr1の発現量が高かったことから、CD109の発現量が低い細胞株に一過性にEgr1を強制発現させ、CD109の発現量に変化が見られるかどうかを検討した。

さらに、CD109のプロモーター領域をPCR法により採取・クローニングした。CD109の発現量が高い細胞株を用いてCD109のプロモーター解析を行い、転写に必要な最小領域を決定した。

(3) CD109に対するモノクローナル抗体の作製

これまでにポリクローナル抗体が作製された部位を指標に、ヒトCD109の合成ペプチドを合成し、マウスに免疫を行いモノクローナル抗体の作製を予定した。

4. 研究成果

(1) CD109発現トランスジェニックマウスにおける表現型の確認

CD109の発現はCAGプロモーターで誘導を受けるが、系統および同じ系統内でも臓器の違いで発現のレベルが異なっていた。まずCD109の強制発現がマウス個体の発生、成長過程に及ぼす影響を組織病理学に検討した。系統ごとにCD109発現トランスジェニックマウスより臓器を採取し、各臓器におけるCD109の発現レベルをタンパクレベルで評価した。大脳、小脳、嗅球、肺、心臓、膵臓、副腎、膀胱、皮膚において、野生型と比較してトランスジェニックマウスで発現が増強していた。野生型では、精巢においてのみCD109の発現が見られた。さらに興味深いことにより組織分布が広範な系統で、可溶性CD109を血清に多量に認められた。さらに免疫染色を行い、各臓器の組織構築におけるCD109の発現パターンを把握した。発現レベルは異なるが、2つの系統で腎糸球体において強くCD109が発現していた。

経時的観察から本トランスジェニックマウスは3匹に1匹程度の割合で生後1年前後に腫瘍形成を認めることを確認した。組織学的検索ではリンパ増殖性疾患、肝血管腫、腺癌などが観察された。一方腫瘍細胞におけるCD109の発現レベルは低く血清中の遊離

CD109 分子を介したシグナル伝達機構の修飾に伴う腫瘍形成が示唆された。しかし C57/BL6 に戻し交配を進める過程で第 7 代前後より、血清中の可溶性 CD109 の発現量には変化が無い一方で、腫瘍形成率が著しく減弱する結果となった。現在本トランスジェニックマウスの C57/BL6 への純系化は完了し理研 BRC に登録の予定であるが、腫瘍形成については背景の系統に影響を受ける可能性が強く示唆されたため、DBA2 と交配することで再び第 1 代にあたる BDF1 の系統に戻し、本トランスジェニックマウスの腫瘍形成に再現性があるかどうかについて確認を行っている。

(2) CD109 のプロモーター解析

発癌における CD109 発現増加の分子機構を検討するために NIH3T3 細胞に Hras 導入を行い CD109 蛋白量の変化を観察したところ CD109 発現の増加と細胞内の ERK, AKT シグナルの増強が観察された。さらに CD109 を高発現するメラノーマ細胞株と低発現のメラノーマ細胞株間でも同様に、CD109 発現の高い細胞株において細胞内の ERK, AKT シグナルの増強が観察された。

real-time PCR 法にて細胞株中の CD109 発現量を mRNA レベルでも確認した。

そこで次に CD109 遺伝子の転写開始点より上流約 2kb のプロモーター領域をクローニングし、CD109 遺伝子発現増加が転写レベルで調節されているかどうかを確認した。ルシフェラーゼアッセイの結果、CD109 遺伝子発現には Egr1 の転写因子結合モチーフを含む転写開始点より 135塩基上流までの領域が重要であることを確認した。

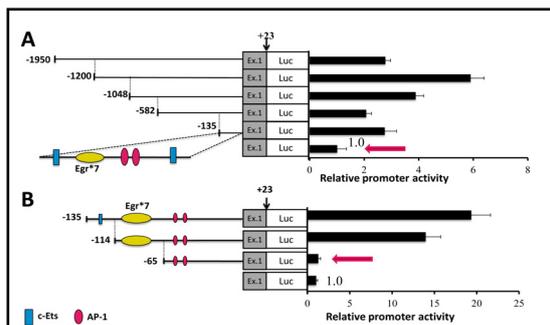


図 1. CD109 高発現細胞株における CD109 プロモーター解析

最後に Egr1 が実際に CD109 発現を調節していることを確認するために、CD109 の発現が低いメラノーマ細胞株に Egr1 を一過性に過剰発現させた。Egr1 の過剰発現により CD109 の発現量は増強し、Egr1 が CD109 の発現を転写レベルで制御していることが明らかとなった。

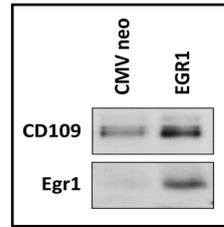


図 2. Egr1 導入 SK-Mel31 細胞株における CD109 発現

(3) CD109 に対するモノクローナル抗体の作製

CD109 のモノクローナル抗体の作製を進めたが、共同研究者により先に優れた抗体が作製され ELISA への応用が完了した。共同研究者とは可溶性 CD109 が腫瘍マーカーとして有用かどうかを、本トランスジェニックマウスを用いて解析中である。

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)

① Mizutani N, Kobayashi M, Sobue S, Ichihara M, Ito H, Tanaka K, Iwaki S, Fujii S, Ito Y, Tamiya-Koizumi K, Takagi A, Kojima T, Naoe T, Suzuki M, Nakamura M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T.

Sphingosine kinase 1 expression is downregulated during differentiation of Friend cells due to decreased c-MYB.

Biochim Biophys Acta. 2013;1833:1006-1016. 査読有り

② Mii S, Murakumo Y, Asai N, Jijiwa M, Hagiwara S, Kato T, Asai M, Enomoto A, Ushida K, Sobue S, Ichihara M, Takahashi M.

Epidermal Hyperplasia and Appendage Abnormalities in Mice Lacking CD109.

Am J Pathol. 2012;181:1180-1189. 査読有り

③ Ito H, Tanaka K, Hagiwara K, Kobayashi M, Hoshikawa A, Mizutani N, Takagi A, Kojima T, Sobue S, Ichihara M, Suzuki M, Tamiya-Koizumi K, Nakamura M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T.

Transcriptional regulation of neutral sphingomyelinase 2 in all-trans retinoic acid-treated human breast cancer cell line, MCF-7. J Biochem. 2012;151:599-610. 査読有り

④ Minami M, Sobue S, Ichihara M, Hasegawa T.

Analysis of the pathological lesions of the lung in a mouse model of cutaneous

infection with *Streptococcus pyogenes*.
Pathol Int. 2012;62:99-104. 査読有り

⑤ Murakami M, Ito H, Hagiwara K, Kobayashi M, Hoshikawa A, Takagi A, Kojima T, Tamiya-Koizumi K, Sobue S, Ichihara M, Suzuki M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T.

Sphingosine Kinase 1/S1P Pathway Involvement in the GDNF-Induced GAP43 Transcription. *J Cell Biochem.* 2011;112:3449-3458. 査読有り

⑥ Ito H, Yoshida K, Murakami M, Hagiwara K, Sasaki N, Kobayashi M, Takagi A, Kojima T, Sobue S, Suzuki M, Tamiya-Koizumi K, Nakamura M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T.

Heterogeneous sphingosine-1-phosphate lyase gene expression and its regulatory mechanism in human lung cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1811:119-128. 査読有り

[学会発表] (計 13 件)

① 祖父江沙矢加, 急性呼吸窮迫症候群モデルマウスを用いた分子状水素の炎症軽減効果の検討, 第3回分子状水素医学シンポジウム, 2013年2月9日, きゅりあん (東京都)

② Sayaka Sobue, Molecular hydrogen alters signaling pathways and gene expression profiles in multiple mouse organs, ASCB 2012, 2012年12月18日, San Francisco (CA, USA)

③ 祖父江沙矢加, Egr-1 による CD109 遺伝子の発現制御機構の解析, 第85回日本生化学会大会, 2012年12月15日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県)

④ 祖父江沙矢加, 分子状水素のマウス肝臓における遺伝子発現とシグナル伝達への影響, 第2回分子状水素医学シンポジウム, 2012年2月11日, 北里大学白金キャンパス薬学部コンベンションホール (東京都)

⑤ Sayaka Sobue, Molecular hydrogen attenuates ERK and p38 MAPK-pathways and alters gene expressions in mouse liver and other organs, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月16日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑥ Misa Kobayashi, Overexpression of DNA dependent protein kinase (DNA-PK) in multidrug resistant leukemia cell line, 第

73回日本血液学会学術集会, 2011年10月15日, 名古屋国際会議場 (愛知県)

⑦ Naoki Mizutani, The role of K-ras12A mutation in IL-2 independent growth of a LGL leukemia cell line, PLT-2, 第73回日本血液学会学術集会, 2011年10月15日, 名古屋国際会議場 (愛知県)

⑧ 祖父江沙矢加, 分子状水素投与に伴う肝臓内遺伝子発現変動の解析, 第84回日本生化学会大会, 2011年9月22日, 京都国際会議場 (京都府)

⑨ 小林美沙, Overexpressed sphingosine kinase 1 was decreased during HMBA-induced erythroid differentiation of Friend cells and the causative role of c-Myb, 第84回日本生化学会大会, 2011年9月22日, 京都国際会議場 (京都府)

⑩ Sayaka Sobue, 分子状水素投与による肝保護効果の検討, 分子状水素医学シンポジウム, 2011年2月19日, 名古屋大学医学部附属病院 (愛知県)

⑪ Masatoshi Ichihara, 水素水投与後の血中・臓器濃度と肝臓内酸化ストレス軽減効果の検討, BMB2010, 2010年12月10日, 神戸国際会議場 (兵庫県)

⑫ Sayaka Sobue, cereulide毒素による肝障害に対する分子状水素の肝保護効果の検討, BMB2010, 2010年12月8日, 神戸国際会議場 (兵庫県)

⑬ Misa Kobayashi, HMBA-induced erythroid differentiation decreases overexpressed SPHK1 in a mouse Friend cell line. 第72回日本血液学会学術集会, 2010年9月24日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

祖父江 沙矢加 (SOBUE SAYAKA)

中部大学・臨床検査技術教育・実習センター・助教

研究者番号 : 50513347

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし