

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430114

研究課題名(和文) PPIX蓄積を示すAbcb10ノックアウトマウスを用いたがん悪性化モデルの作製

研究課題名(英文) Construction of tumor-development mice model using Abcb10 knock out mice exhibiting PPIX accumulation

研究代表者

山本 雅達 (Yamamoto, Masatatsu)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：40404537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヘム合成に関与すると予想されたABCB10の機能を明らかにするためにAbcb10コンディショナルノックアウトマウスの解析を行った。

一方、ABCB10の機能低下と腫瘍との関連性が示唆されているが、Abcb10欠損マウスを用いた発癌実験は行われておらず、腫瘍が発生・悪性化する過程でAbcb10の役割は不明である。

B16細胞(P53野生型)ではAbcb10ノックダウン細胞が腫瘍縮小を示すが、LLC細胞(P53変異型)ではAbcb10ノックダウン細胞が腫瘍の増大を示した。さらにAbcb10+/-マウスに化学発癌を誘導したところ、腫瘍の発生頻度は野生型に対し増加する傾向が見られたが、有意差はなかった。

研究成果の概要(英文)：Abcb10 is involved in the heme biosynthesis; however its exact function is unknown. We have carried out the development and analysis of Abcb10 knockout mice in order to elucidate the function.

Although an association between abcb10 depression and cancer development has been suggested, the role of abcb10 in the process of tumor progression is unclear.

We transplanted two Abcb10 Knock-down tumor cells to mice and observed. While the tumors of Abcb10 Knock-down B16 melanoma cells (P53 wild) were smaller in than those of wt ones, the tumors of Abcb10 knock-down LLC cells (P53 mutant) were larger. In the chemical carcinogenesis experiments using wt Abcb10 and Abcb10 +/- mice, the incidences of tumor development in Abcb10 +/- mice tended to be higher without statistical significance in comparison in wt Abcb10 mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：Abcb10

## 1. 研究開始当初の背景

近年、Heme 生合成の中間産物である PPIX が悪性腫瘍に高蓄積すること、その PPIX は特異的な励起光 (633nm 付近) を発し可視化できることから、この性質を利用した悪性腫瘍の診断方法が開発された (1)。

Heme の生合成はミトコンドリア 細胞質間の移動を伴って進行する (2, 3)。その際、ABCB10 は鉄のトランスポーターである Mitoferrin-1(Mfn1) やポルフィリン誘導体と鉄の配位結合を触媒する Ferrochelatase(FECH) と結合し、その安定性と機能を協調することから Heme の産生に関与すると予想されていた。我々は *Abcb10* の機能を明らかにするために *Abcb10* コンディショナルノックアウトマウスの作製と解析を進めてきた。その結果、全身で *Abcb10* を欠損する *Abcb10*<sup>-/-</sup> マウスは胎生 11.5 日胚において自己造血不全により死亡する。成獣の血球系細胞特異的に *Abcb10* を欠損させたマウス (*Abcb10*<sup>fl/fl</sup>:*mx1-cre* マウス) 末梢血では、野生型 (*Abcb10*<sup>+/+</sup>) マウスに対して Heme が減少していたこと、その前駆体である PPIX が 20 ~ 30 倍ほど蓄積していたこと、さらに ROS の蓄積が著明である事を確認している。

一方、内外の研究より Acute Myeloid Leukemia (AML)、乳癌や大腸癌などの SNPs 解析から、*ABCB10* 遺伝子のコーディングエクソンに 5 つのミスセンス変異が確認され、*ABCB10* の機能低下と腫瘍との関連性が示唆されているが、*Abcb10* を欠失したマウスを用いた発癌実験などは行われておらず、腫瘍が発生・悪性化する過程で *Abcb10* がどのような役割を持っているかは不明である。

## 2. 研究の目的

我々は前述するこれまでの知見から、腫瘍が発生・悪性化する過程において、*ABCB10*

遺伝子に機能的な変化が生じることで、Heme 合成不全、PPIX と遊離 Fe の蓄積、それに伴う ROS の産生 (Heme タンパクである ROS 消化酵素の機能不全も含まれる) が、肉芽形成 形質転換 転移能獲得をより助長すると仮定した。このことから本研究では *Abcb10* コンディショナルノックアウトマウスを用いて化学発癌や腫瘍移植・転移モデルマウスを作製し、悪性腫瘍の PPIX の蓄積と *ABCB10* の機能不全との関連性を明らかにする事を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 発がん実験

10 日齢の *Abcb10*<sup>+/-</sup> マウスと同腹産仔の野生型マウス (コントロール) に Diethylnitrosoamine (DEN) を腹腔内投与し、その 8 か月 10 か月後における肝がん発生を観察した (C57/BL6 系統)。

### (2) 腫瘍細胞移植実験

B16F10 メラノーマ細胞 (B16) と Lewis Lung Cell Carcinoma 細胞 (LCC) を用いてマウス *Abcb10* ノックダウン細胞を作製した。これらの細胞を野生型マウス (C57/BL6 系統) 背部皮下に導入し腫瘍細胞の定着と尾静脈に導入した際の肺転移を観察した。

### (3) PPIX と HEME の測定

マウス血清 PPIX はそのまま、培養細胞の PPIX は PBS で細胞洗浄後、2xRIPA で溶解し、等量の Dimethyl sulfoxide (DMSO) を加えてタンパク定量後、Thermo 社 Fluoro Skan FL (励起波長 420nm 吸収波長 633nm) を用いて定量した。

Heme の測定は Biochain 社 Heme Assay Kit を用いて行なった。

### (4) その他

RT-PCR、ウェスタンブロットティング、マウス遺伝型解析、組織免疫染色は定法に従って行なった。

#### 4. 研究成果

まず *Abcb10* が腫瘍細胞の生育にどのような影響を及ぼすかを検討するために、我々は B16 を用いて *Abcb10* ノックダウン細胞 (*Abcb10KD*) を作製した。

作製したノックダウン細胞では内在性に発現する *Abcb10* の発現が 10~20%程度に減少していた。これらの細胞を C57/BL6 の 8 週齢マウスの皮下に移植した。まず B16 細胞 ( $5 \times 10^5$  cell) を移植して 2 週間後に形成された腫瘍塊の湿重量を測定したところ、コントロールの B16 細胞に比較して有意に *Abcb10KD* 細胞の湿重量が減少していた。

この *Abcb10* の発現減少が、腫瘍細胞の生育に影響を与えるという現象がその他の細胞においても普遍的であるかを検討するために、同様に LLC 細胞を用いて *Abcb10KD* 細胞を作製し、C57/BL6 の 8 週齢マウスの皮下に移植した ( $5 \times 10^5$  cell)。移植して 2 週間後に形成された腫瘍塊の湿重量を測定したところ、B16 細胞では *Abcb10KD* 細胞が腫瘍縮小を示したのに対し、LLC 細胞では *Abcb10KD* 細胞が腫瘍の増大を示した。

P53 野生型の腫瘍において、P53 は Heme と結合することによってプロテアソーム系に依存して分解を受ける。Heme は PPIX と鉄が結合して完成するが、鉄キレート剤と抗がん剤の併用療法など、鉄をキレートすることで Heme の産生を阻害して腫瘍内在性の P53 の活性を保つことで、その効果をより増強することが示されている (3)。P53 野生型である B16 では、*Abcb10* の発現が減少することから Heme の産生が減少し、細胞内に増加した P53 に依存したアポトーシスによって腫瘍減少を示したと予想された。いっぽう、P53 変異型である LCC では逆にコントロールの LCC より *Abcb10KD* 株において著名な腫瘍の増大を示したが、このことは LCC のような P53 変異細胞では、P53 の不活性化に加えて PPIX が蓄積することで悪性化した腫瘍細胞の表現型

そのものを示していると考えた。この P53 変異型で PPIX 蓄積による腫瘍増大のメカニズムの解明は、悪性化した腫瘍や転移巣において PPIX を蓄積しやすい細胞が生存するメカニズムに迫ることができると考えられる。本研究はこのメカニズムを解明することによって、PPIX を蓄積する腫瘍に対して直接の治療標的を同定できる可能性が高いと考えられる。

一方、マウス個体における内在性の *Abcb10* が発がんにどのように影響するかを検討するために、*Abcb10*<sup>+/+</sup>マウスと野生型マウスに DEN 暴露による化学発癌を行なった。

DEN 導入後 10 カ月齢で肝に発生する腫瘍数を計測した結果、*Abcb10*<sup>+/+</sup>マウスにおける腫瘍の発生頻度は野生型に対し増加する傾向が見られたが、有意な差は認められなかった。DEN はマウス個体において P450 によって脱アルカリ化された後メチルカチオンに変化することで DNA 損傷を引き起こす。また P450 はヘムを補酵素とするヘムタンパクである。マウス発癌モデルの実験では、*Abcb10* ヘテロ欠損により、肝で P450 の活性が減少することで DEN の毒性が減弱したことから肝臓の腫瘍化が抑制されていた可能性もある。

また *Abcb10* が欠損することでどのような病態変化を示すのかは不明であることから、*Abcb10* コンディショナルノックアウトマウスを用いて、*Abcb10* の生理機能についてさらに詳細な解析を行なった。

その結果、*Abcb10*<sup>-/-</sup>マウスの胎生期における *Abcb10* の欠損は、分化過程の造血細胞でヘムの合成不全、鉄の蓄積および Ros が増加することによって細胞死が誘導され、これによって *Abcb10*<sup>-/-</sup>マウスは発生過程に応じた血球分化が停止することで、胎生致死に至ると考えられた。さらに、Heme の補欠元素である鉄の蓄積が未分化な血球細胞に著名であること、蓄積した鉄はミトコンドリアに存在していることを元素分析電子顕微鏡を用いた

解析から突き止めることができた。

血球特異的に *Abcb10* を欠損する成獣マウス (*Abcb10<sup>f/f</sup>;Mx1-Cre* マウス) では、骨髄レベルで血球分化に異常をきたし、網状赤血球が末梢血に豊富に存在すること、赤芽球ミトコンドリアに鉄と予想される物質が蓄積し、末梢血においては PPIX が蓄積することから、*Abcb10* は血球分化とヘム合成過程において PPIX と鉄の結合に必須の分子であることがわかった。

ヒト疾患において PPIX を高蓄積する EPP や鉄の代謝異常による RARS (鉄芽球性貧血) が知られているが、これらの病態は希少であり、特に RARS はその原因遺伝子が明確に同定されていない。本研究で作製した *Abcb10* ノックアウトマウスは PPIX を高蓄積する EPP や RARS と類似の病態を示すことから、これらの病因の解明・治療法の開発に病態モデルマウスとして有用であると考えられる

1. Plos One

doi: 10.1371/journal.pone.0122351.2015

2. Cell Physiol Biochem.

doi: 10.1159/000366383. 2014

3. Cell Rep.

doi: 10.1016/j.celrep.2014.02.042. 2014

## 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 9 件)

1 . Ribonucleotide reductase is an effective target to overcome gemcitabine resistance in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells with dual resistant factors.

Minami K, Shinsato Y, Yamamoto M, Takahashi H, Zhang S, Nishizawa Y, Tabata S, Ikeda R, Kawahara K, Tsujikawa K, Chijiwa K, Yamada K, Akiyama S, Pérez-Torras S, Pastor-Anglada M,

Furukawa T, Yasuo T.

J Pharmacol Sci. 2015 Mar;127(3):319-25. doi:10.1016/j.jphs.2015.01.006. 査読有

2 . *Abcb10* role in heme biosynthesis in vivo: *Abcb10* knockout in mice causes anemia with protoporphyrin IX and iron accumulation.

Yamamoto M, Arimura H, Fukushige T, Minami K, Nishizawa Y, Tanimoto A, Kanekura T, Nakagawa M, Akiyama S, Furukawa T.

Mol Cell Biol. 2014 Mar;34(6):1077-84. doi: 10.1128/MCB.00865-13. 査読有

3 . Thymidine phosphorylase activates NF B and stimulates the expression of angiogenic and metastatic factors in human cancer cells.

Tabata S, Ikeda R, Yamamoto M, Shimaoka S, Mukaida N, Takeda Y, Yamada K, Soga T, Furukawa T, Akiyama S.

Oncotarget. 2014 Nov 15;5(21):10473-85. 査読有

4 . Design and synthesis of prostate cancer antigen-1 (PCA-1/ALKBH3) inhibitors as anti-prostate cancer drugs.

Nakao S, Mabuchi M, Shimizu T, Itoh Y, Takeuchi Y, Ueda M, Mizuno H, Shigi N, Ohshio I, Jinguji K, Ueda Y, Yamamoto M,

Furukawa T, Aoki S, Tsujikawa K, Tanaka A. Bioorg Med Chem Lett. 2014 Feb 15;24(4):1071-4. doi:

10.1016/j.bmcl.2014.01.008. 査読有

5 . Recombinant fusion protein of cholera toxin B subunit with YVAD secreted by *Lactobacillus casei* inhibits lipopolysaccharide-induced caspase-1 activation and subsequent IL-1 beta

secretion in Caco-2 cells.

Hiramatsu Y, Yamamoto M, Satho T, Irie K, Kai A, Uyeda S, Fukumitsu Y, Toda A, Miyata T, Miake F, Arakawa T, Kashige N.

BMC Biotechnol. 2014 May 10;14:38. doi: 10.1186/1472-6750-14-38. 査読有

6. Influence of gefitinib and erlotinib on apoptosis and c-MYC expression in H23 lung cancer cells.

Suenaga M, Yamamoto M, Tabata S, Itakura S, Miyata M, Hamasaki S, Furukawa T.

Anticancer Res. 2013 Apr;33(4):1547-54. 査読有

7. Reduction of MLH1 and PMS2 confers temozolomide resistance and is associated with recurrence of glioblastoma.

Shinsato Y, Furukawa T, Yunoue S, Yonezawa H, Minami K, Nishizawa Y, Ikeda R, Kawahara K, Yamamoto M, Hirano H, Tokimura H, Arita K.

Oncotarget. 2013 Dec;4(12):2261-70. 査読有

8. VEGF expression is augmented by hypoxia-induced PGIS in human fibroblasts.

Wang J, Ikeda R, Che XF, Ooyama A, Yamamoto M, Furukawa T, Hasui K, Zheng CL, Tajitsu Y, Oka T, Tabata S, Nishizawa Y, Eizuru Y, Akiyama S.

Int J Oncol. 2013 Sep;43(3):746-54. doi: 10.3892/ijo.2013.1994. 査読有

9. Molecular basis for the regulation of hypoxia-inducible factor-1 levels by 2-deoxy-D-ribose.

Ikeda R, Tabata S, Tajitsu Y, Nishizawa Y, Minami K, Furukawa T, Yamamoto M, Shinsato

Y, Akiyama S, Yamada K, Takeda Y.

Oncol Rep. 2013 Sep;30(3):1444-8. doi: 10.3892/or.2013.2572. Epub 2013 Jun 27. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 山本 雅達 第26回霧島神経薬理フォーラム、2015年8月17日(月)鹿児島県霧島市、シンポジウム『Scienceを学ぶ薬学生の可能性～最先端を走る先輩からのメッセージ』にて招待講演

2. 山本 雅達 生体制御・創薬研究ワークショップ、2014年3月15日(土)、鹿児島県鹿児島市、シンポジウムにて招待講演

3. 山本 雅達 第8回トランスポーター研究会、2013年6月15日(土)、熊本市、シンポジウム『Abcb10はHeme合成に必須であって、その欠損マウスはProtoporphyrin IXと鉄の高蓄積と血球分化不全を示す』

〔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〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~molo/nc12/member.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 雅達 (Yamamoto Masatatsu)  
鹿児島大学・歯学域医学系・助教  
研究者番号：40404537