

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23701037

研究課題名(和文) ABCB10ノックアウトマウスを用いたヘム合成不全によるガン悪性化モデルの作製

研究課題名(英文) Generation of malignant tumor model by heme synthesis failure using mice with Abcb10 deficient

研究代表者

山本 雅達 (Yamamoto, Masatatsu)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：40404537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：PPIXの蓄積と腫瘍悪性化にAbcb10の機能不全がどのように関与するかを検討するためにAbcb10ノックアウトマウスを用いて腫瘍移植・転移モデルマウスを作製した。しかしDEN誘発肝癌マウスから自発的な転移能を獲得した肝癌細胞を得ることができなかった。このことから本研究期間ではAbcb10の生理機能と発癌への関与を検討した。

その結果Abcb10はFechの安定性に寄与しないこと、またAbcb10が欠損する血球細胞のミトコンドリアに鉄が過剰に蓄積すること、さらに血球細胞特異的にAbcb10が欠損する成獣マウスはヒト骨髄性ポルフィリン症および鉄芽球性貧血の両方の病態を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To investigate how Abcb10 deficiency affect to the accumulation of PPIX and malignant potential of tumor cells, we tried to generate allogeneic tumor transplantation-metastasis models from DEN exposed Abcb10^{-/-} mice. We picked up several cells from liver tumors of Abcb10^{-/-} mice, however could not obtain any tumor cells that acquired spontaneous metastatic potential.

We explored in detail the relevance of the physiological role of Abcb10 to the tumorigenesis. Abcb10 deficiency resulted in a defect of heme biosynthesis but did not affect to the stability of Fech. Electron microscopy images of Abcb10^{-/-} hematopoietic cells showed marked iron deposits at the mitochondria. Abcb10^{F/F};
Mx1-Cre mice, with the specific deletion of Abcb10 in hematopoietic cells, showed PPIX accumulation and maturation arrest in reticulocytes. These results suggest a critical role for Abcb10 in heme biosynthesis and provide new insights into the pathogenesis of erythropoietic protoporphyria and sideroblastic anemia.

研究分野：統合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：腫瘍学発ガン

1. 研究開始当初の背景

Heme の生合成経路はミトコンドリア 細胞質間の移動を伴うが、細胞内外の Heme の輸送経路やその担当分子については不明な点が多い。我々は *Abcb10* ノックアウトマウスを作製して解析した結果、*Abcb10* ホモ欠損 (*Abcb10*^{-/-}) マウスでは血球分化不全と Heme の産生不良、さらに Heme の前駆体である ProtoporphyrinIX (PPIX) と Reactive Oxygen Species (ROS) が著明に蓄積していたことを見出し、*Abcb10* は Heme の生合成過程に必須である事を明らかにしている。

一方で、網羅的多型解析により ABCB10 のナンセンス変異と腫瘍の悪性化に相関することが示唆されている。また、転移した腫瘍細胞では PPIX の高蓄積が観察され、これを利用して転移巣発見・早期診断に応用されつつある。しかしながら、転移能を有する悪性腫瘍の PPIX の蓄積機構と、PPIX が悪性化に貢献するメカニズムは未だ明確に示されていない。

本研究では、*Abcb10*^{-/-} マウスを用いて同種型腫瘍移植 - 転移モデルマウスを作製し、PPIX の蓄積と腫瘍の悪性化に ABCB10 の機能不全がどのように関わるかを解明することを目的とした。

2. 研究の目的

肝臓特異的に *Abcb10* を欠損するマウス (*Abcb10*^{f/f}:*mx1-cre*) を C57BL6 系統への戻し交配の後、DEN 化学発癌による肝癌モデルマウスを作製した。このマウスから得られた肝臓腫瘍部から初代培養を行ない腫瘍細胞を数種作製した。これらの細胞について肝細胞のマーカーであるアルブミン産生能を検討した結果、いずれも陰性であった。このことから、マウス肝癌細胞に由来する自主的に転移能を獲得しうる細胞を作製することは困難であることが判明した。

すなわち、当初の研究期間については同種

型腫瘍移植 - 転移モデルマウスを作製する細胞を得ることが困難であることが判明した。したがって本研究期間においては *Abcb10* の生理機能と発癌への関与をより詳細に検討するために以下の実験を行なった。

3. 研究の方法

(1) 多くの腫瘍細胞において Fech の消失が観察されることから、*Abcb10* 欠損細胞で Fech の発現、および安定性について検討した。その結果 *Abcb10* 欠損細胞では、細胞質における Fech の発現が減少し、ミトコンドリアに局在する Fech は影響していないことを見出した。

(2) また生体内における鉄の高蓄積は発癌をより助長する知見が報告されていることから、*Abcb10* 欠損細胞に見られた鉄の蓄積が、細胞のどこに局在するかを検討した。その結果、*Abcb10*^{-/-} マウスにおける ROS の蓄積は Fech の消失によって Heme の補欠元素である鉄の利用と代謝に異常が生じると予想した。*Abcb10*^{-/-} マウスにおける鉄の細胞内動態について分析電顕を用いて解析した結果、*Abcb10*^{-/-} マウス血球細胞のミトコンドリアに過剰の鉄が蓄積していることを見出した。

(3) 成獣マウスにおいて *Abcb10* が欠損することで、どのような病態変化が生じるのかを検討するために血液一般検査を行なった。その結果、野生型マウスに対して *Abcb10*^{f/f}:*mx1-cre* マウスでは白血球細胞数に差は見られなかったが、ヘモグロビン産生量は半減、赤血球数は有意に減少し、逆に網状赤血球の著名な増加が確認された。骨髄においては鉄芽球が観察された。

このことから、*Abcb10* が欠損することで、ヘモグロビン産生不良、血球分化不全と PPIX の高蓄積を伴うヒト骨髄性ポルフィリン症、および鉄芽球性貧血の両方の病態を示すことを明らかにした。

4 . 研究成果

本研究期間において Abcb10 の生理機能をより詳細に検討することで、Abcb10 はミトコンドリアに局在する Fech の安定性に寄与していないこと、また Abcb10 が欠損する血球細胞のミトコンドリアには過剰の鉄が蓄積すること、さらに血球細胞特異的に Abcb10 が欠損する成獣マウスはヒト骨髄性ポルフィリン症および鉄芽球性貧血の両方の病態を示すことを明らかにした。

以上について論文作製に着手し、その成果は Molecular and Cellular Biology 誌に掲載された。

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 8 件)

1 . 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., Design and synthesis of prostate cancer antigen-1 (PCA-1/ALKBH3) inhibitors as anti-prostate cancer drugs., Bioorg Med Chem Lett. , Vol.24, No.3, pp.1071-1074 (2014). (査読あり)

2 . Yamamoto M, Arimura H, Fukushige T, Minami K, Nishizawa Y, Tanimoto A, Kanekura T, Nakagawa M, Akiyama S, Furukawa T, Abcb10 role in heme biosynthesis in vivo: Abcb10 knockout in mice causes anemia with protoporphyrin IX and iron accumulation., Mol Cell Biol.,

Vol.34, No.6, pp.1077-1084 (2014). (査読あり)

3 . Shinsato Y, Furukawa T, Yunoue S, Yonezawa H, Minami K, Nishizawa Y, Ikeda R, Kawahara K, Yamamoto M, Hirano H, Tokimura H, Arita K, Reduction of MLH1 and PMS2 confers temozolomide resistance and is associated with recurrence of glioblastoma., Oncotarget., Vol.4, No.12, pp.2261-2270 (2013). (査読あり)

4 . Suenaga M, Yamamoto M, Tabata S, Itakura S, Miyata M, Hamasaki S, Furukawa T., Influence of gefitinib and erlotinib on apoptosis and c-MYC expression in H23 lung cancer cells., Anticancer Res, Vol.33, No.4, pp.1547-1554 (2013). (査読あり)

5 . 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., VEGF expression is augmented by hypoxia-induced PGIS in human fibroblasts., Int J Oncol. , Vol.43, No.3, pp.746-753 (2013). (査読あり)

6 . Ikeda R, Tabata S, Tajitsu Y, Nishizawa Y, Minami K, Furukawa T, Yamamoto M, Shinsato Y, Akiyama S, Yamada K, Takeda Y., Molecular basis for the regulation of hypoxia-inducible factor-1 levels by 2-deoxy-D-ribose.,

Oncol Rep., Vol.30, No.3,
pp.1444-1448 (2013). (査読あり)

7. Tajitsu Y, Ikeda R, Nishizawa Y, Mataka H, Che XF, Sumizawa T, Nitta M, Yamaguchi T, Yamamoto M, Tabata S, Akiyama S, Yamada K, Furukawa T, Takeda Y., Molecular basis for the expression of major vault protein induced by hyperosmotic stress in SW620 human colon cancer cells., Int J Mol Med., Vol.32, No.3, pp.703-708 (2013). (査読あり)

8. Tabata S1, Ikeda R, Yamamoto M, Furukawa T, Kuramoto T, Takeda Y, Yamada K, Haraguchi M, Nishioka Y, Sone S, Akiyama S., Thymidine phosphorylase enhances reactive oxygen species generation and interleukin-8 expression in human cancer cells., Oncol Rep., Vol.3, pp.895-902 (2012). (査読あり)

〔学会発表〕(計 12件)

1. 山本雅達, Abcb10 knockout mice causes anemia with protoporphyrin IX and iron accumulation: Abcb10 is essential for heme biosynthesis in vivo, 生体制御・創薬研究ワークショップ, 2014年3月(鹿児島).

2. 西澤 由紀彦、池田 龍二、田實 裕介、河原 康一、山本 雅達、新里 能成、南 謙太郎、古川 龍彦、武田 泰生, KB3-1 細胞における

5-aza-2-deoxycytidine (5-AZ) による 5-fluorouracil (5-FU) の抗腫瘍効果増強作用, 日本薬理学会本会, 2014年3月(仙台)

3. 南謙太郎、山本雅達、新里能成、河原康一、小松政治、池田龍二、西澤由紀彦、田畑祥、秋山伸一、山田勝土、古川龍彦、武田泰生, Gemcitabine 耐性膵癌細胞 MGEM6 で増加した RRM1 のノックダウンは gemcitabine の細胞内蓄積量を増加させる, 日本薬理学会西南部会 2013年11月(福岡)

4. 山本雅達, 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, 第8回トランスporter研究会, 2013年6月(熊本).

5. 山本雅達, シンポジウム 2S13 生体遷移金属のパラダイムシフト: 生体内シグナル分子としての機能 『Abcb10 は Heme 合成に必須であって、その欠損マウスはヒト Erythropoietic protoporphyria と類似の病態を示す』, 第85回日本生化学会大会, 2012年12月(福岡).

6. 田畑 祥, 池田 龍二, 山本 雅達, 古川 龍彦, 倉本 卓哉, 後東 久嗣, 埴淵 昌毅, 西岡 安彦, 曾根 三郎, 秋山 伸一, ヒト癌細胞の生存におけるチミジン異化作用の役割, 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月(札幌)

7. 田畑祥, 池田龍二, 山本雅達, 古川龍彦, 倉本卓哉, 後東久嗣, 埴淵昌毅, 西岡安彦, 曾根三郎, 秋山伸一, ヒト癌細胞のROS産生および生存におけるチミジン異化作用の役割. 第16回日本がん分子標的治療学会学術集会 2012年6月(北九州)

8. 山本 雅達, 有村 博史, 福重 智子, 中川 昌之, 金蔵 拓郎, 古川 龍彦, Abcb10, the gene knockout mice exhibit similar to human Erythropoietic protoporphyria, is essential for Heme synthesis, 第7回トランスポーター研究会, 2012年6月(京都).

9. 古川 龍彦, 南 謙太郎, 西澤 由紀彦, 池田龍二, 山本雅達, 武田泰生, CNT1とRRM1の発現変化がGemcitabine耐性膵癌細胞の耐性に関与している, 第85回日本薬理学会年会, 2012年3月(京都).

10. 山本 雅達, 有村 博史, 福重 智子, 中川 昌之, 金蔵 拓郎, 古川 龍彦, Abcb10はHeme合成に必須であって、その欠損マウスはヒトErythropoietic protoporphyriaと類似の病態を示す, 第34回日本分子生物学会 年会, 2011年12月(横浜).

11. 西澤由紀彦, 池田龍二, 松下茂人, 田畑 祥, 山本雅達, 南 謙太郎, 山口辰哉, 秋山伸一, 古川龍彦, 癌細胞での5-FU依存的early growth response protein-1およびthrombospondin-1発現亢進におけるthymidine phosphorylaseの役割,

第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月(名古屋).

12. 南 謙太郎, 古川龍彦, 山本雅達, 西澤由紀彦, 田畑祥, 池田龍二, 小松正治, 秋山伸一, Gemcitabine耐性膵臓癌細胞のCNT1とRRM1の耐性機構への関与, 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月(名古屋).

〔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/~moloncl2/member.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 雅達(Yamamoto Masatatsu)

鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科
先進治療科学専攻腫瘍学講座

分子腫瘍学分野 助教

研究者番号: 40404537