

平成30年6月3日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08094

研究課題名(和文) 悪性黒色腫の抗がん剤耐性におけるスフィンゴ脂質代謝の関与と創薬研究

研究課題名(英文) The involvement of sphingolipid metabolism in anticancer agent - resistant melanoma cells

研究代表者

清島 真理子 (Seishima, Mariko)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00171314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：悪性黒色腫においてS1P受容体のアンタゴニスト(FTY720)とBRAF阻害薬(VM)の併用による細胞増殖とアポトーシスの変化、その作用機序を検討した。VM耐性株にFTY720を加えることで細胞増殖は抑制されアポトーシスは増加した。またBRAF感受性株SK-Mel-28からVM耐性株(R-SK-Mel)を作成したところ、この細胞ではERK及びAktのリン酸化が増加した。R-SK-MelではFTY720添加によりアポトーシスが誘導され、ERK及びAktのリン酸化も抑制された。したがってFTY720とVMは相乗的に増殖シグナル抑制と生存シグナル誘導により抗腫瘍効果を発現すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of combination of FTY720, phosphorylated and binds to sphingosine-1-phosphate receptors, and vemurafenib, an inhibitor of BRAFV600- mutant protein, on cell death induction and molecular mechanisms in vemurafenib-resistant melanoma cells. Combination of FTY720 and vemurafenib reduced cell viability and increased expression of cleaved PARP. The expression of phosphorylated ERK was decreased by this combination. Furthermore, vemurafenib-resistant SK-Mel-28 cells (R-SK-Mel) were established by culturing the SK-Mel-28 cell. In R-SK-Mel cells, the cell viability was also reduced and the expression of cleaved PARP was increased by the combination with FTY720 and vemurafenib. Moreover, the expression of phosphorylated ERK and Akt were reduced by this treatment. These findings suggest that FTY720 and vemurafenib synergistically induce cell death through downregulation of proliferation and survival signaling pathways in vemurafenib-resistant melanoma cells.

研究分野：皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫 抗がん剤耐性 FTY720 BRAF阻害薬 スフィンゴ脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

脂質代謝により産生される生理活性脂質が種々の生命現象において重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。中でもスフィンゴ脂質代謝は重要である。その代謝産物のなかでセラミド(CER)はスフィンゴミエリン(SM)からスフィンゴミエリナーゼ(SMase)によって産生され、細胞死(アポトーシス)を誘導するが、一方、CER からスフィンゴシンを経てスフィンゴシンキナーゼ(SK)により産生されたスフィンゴシン 1-リン酸(S1P)は、逆に細胞増殖・生存に働く。CER および S1P は各種細胞機能(増殖・生存・アポトーシスなど)の調節に重要な役割を果たす生理活性脂質である。さらに、抗がん剤感受性にセラミドトランスファープロテイン(CERT) が関与し、その変化による CER の異常蓄積が抗がん剤感受性に関係する因子として注目されている。抗がん剤耐性機序の解明において、スフィンゴ脂質由来生理活性脂質産生の制御機構を明らかにすることが重要である点に着目した。

われわれは悪性黒色腫を含め種々の癌で高発現がする SK1 に着目して研究してきたが、さらに抗がん剤耐性あるいは BRAF 変異陽性の悪性黒色腫細胞株において、SK1 を直接的/間接的に阻害する薬剤を用いて抗がん作用およびシグナル伝達経路を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、抗がん剤耐性、特に BRAF 阻害薬耐性を示す悪性黒色腫細胞株において、S1P 受容体のアンタゴニスト(FTY720)と BRAF 阻害薬の併用による細胞の生存およびアポトーシスの変化を検討し、さらにその作用メカニズムを明らかにすることによって、新規治療標的分子探索の基盤となる知見を得ることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) MTT assay

悪性黒色腫細胞培養株4種 (SK-MeL-28、A375、WM115、A2058) を培養し、培養液に BRAF 阻害薬(vemurafenib:VM) を添加し、MTT測定法を用いて細胞生存率、すなわち各々の IC50 を測定する。さらに、これらの培養液に S1P 受容体のアンタゴニストである FTY720 を添加する。

(2) ウエスタンブロット法

培養細胞抽出液を基質として SK1、SK2、cleaved PARP、p53、total PI3K、リン酸化(p)-PI3K、total Akt、p-Akt、total mTOR、p-mTOR、total MEK、p-MEK、total ERK、p-ERK、S6 kinase、total EGFR、p-EGFR に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行なう。ECL Western Blotting Detection system を用いて検出し、そのバンドの濃さをデンストメーターで測定して得られた値について

Student's *t*-testにより有意差検定を行う。

4. 研究成果

(1) BRAF 変異を有する悪性黒色腫細胞株4種の中から、VM 添加後の IC50 測定結果より VM 耐性株 WM-115 と感受性株 SK-Mel-28 を以下の実験に用いることとした(図1)。

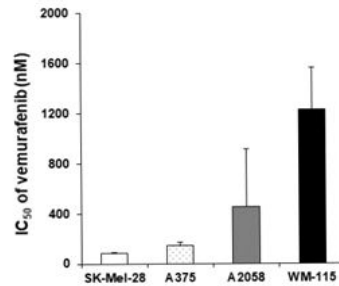


図1: 悪性黒色腫細胞培養株4種 (SK-MeL-28、A375、WM115、A2058) における、vemurafenib に対する IC50 の比較

(2) VM 耐性株に FTY720 を加えることにより細胞増殖は抑制され(図2a)、アポトーシス・マーカーである cleaved PARP が有意に増加した(図2b)。したがって FTY720 は VM 耐性株においてアポトーシスを誘導すると考えられた。

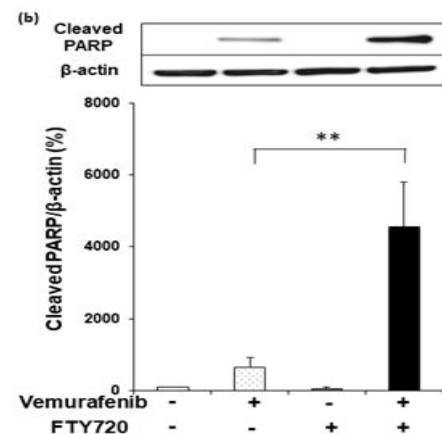
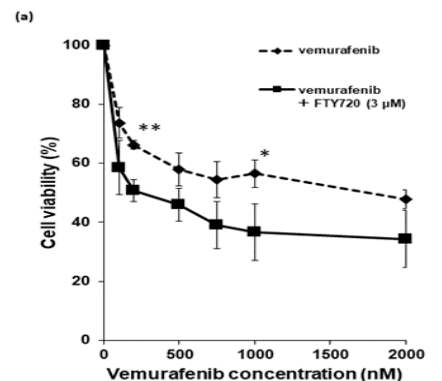


図2: vemurafenib と FTY720 による細胞増殖(a)とアポトーシス(b)の変化

(3) 抗がん剤耐性については他のがん細胞

において細胞内 SK1 の高発現が注目されている。そこで悪性黒色腫細胞株の SK1 の発現を検討したところ、FTY720 により発現が抑制された(図 3b)。Akt の発現量も減少した(図 3a)。

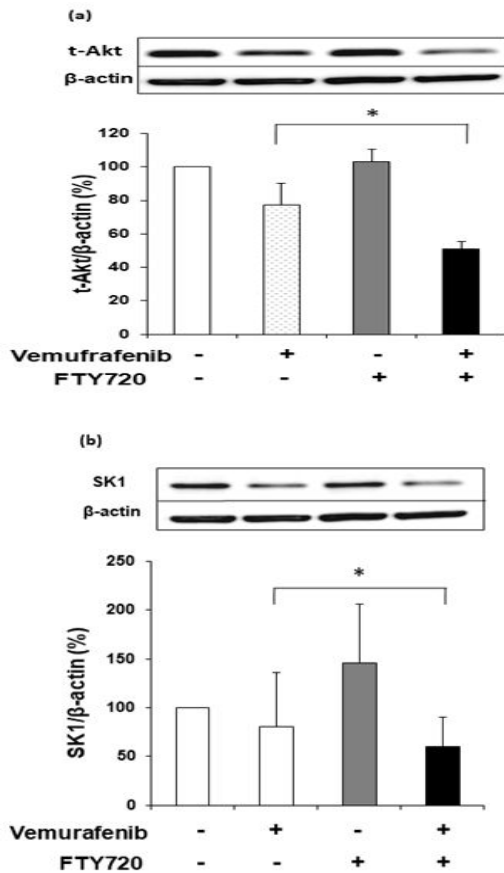


図 3 : FTY720 による Akt (a) と SK1 (b) の変化

さらにそのメカニズムについて検討を行ったところ、FTY720 により細胞増殖に関わる ERK のリン酸化が抑制された(図 4)。

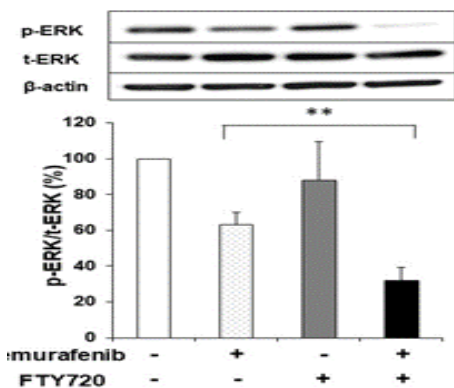


図 4 : FTY720 による ERK のリン酸化の変化

(4) BRAF 耐性株の樹立

BRAF 感受性株 SK-Mel-28 に高濃度の BRAF 阻害薬を長期に作用させることにより耐性株 (R-SK-Mel) を作成した(図 5a)。

この細胞株では ERK および Akt のリン酸化が増加した。R-SK-Mel では FTY720 添加によりアポトーシスが誘導され、ERK および Akt のリン酸化も抑制された。

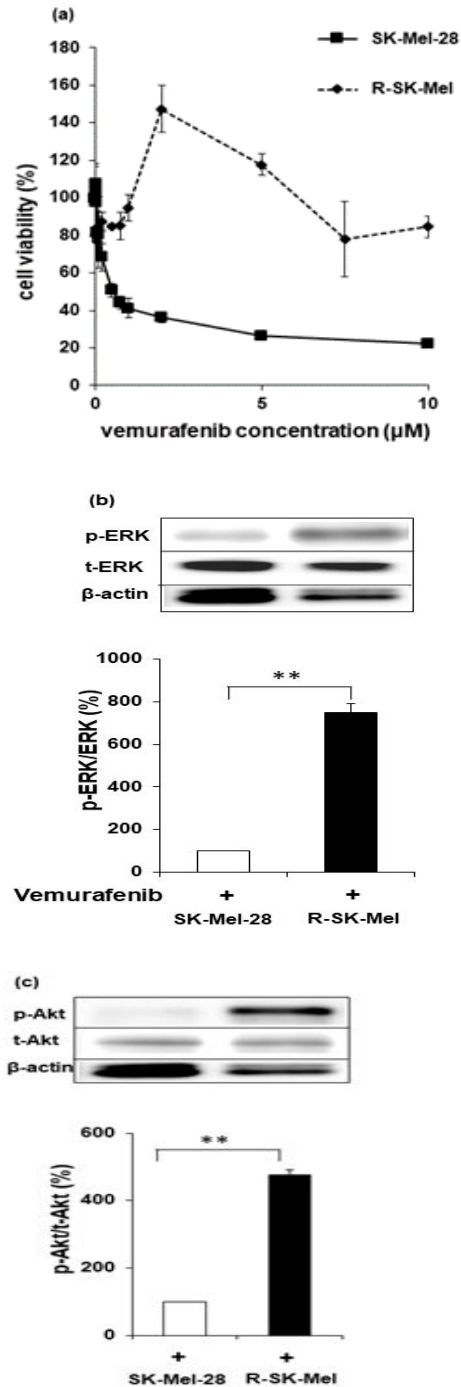


図 5 : BRAF 耐性株 (R-SK-Mel) における細胞増殖(a)、ERK(b)と Akt(c)リン酸化の変化

以上の結果から、FTY720 と vemurafenib は相乗的に増殖シグナルの抑制と生存シグナルの誘導により抗腫瘍効果を発現すると考えられた。

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 24 件)

Kanno Y, Shu E, Kanoh H, Matsuda A, Seishima M. 2AP regulates vascular alteration by inhibiting VEGF signaling in systemic sclerosis: the roles of 2AP in vascular dysfunction in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19 :22. doi: 10.1186/s13075-017-1227-y. (査読有)

Shu E, Kanoh H, Murakami A, Seishima M. Potential inhibition of development of rapidly progressive interstitial lung disease by prompt and sufficient immunosuppressive treatment in patients with anti-melanoma differentiation -associated gene 5 antibody-positive dermatomyositis. *J Dermatol*, 2017, 44:e91-e92. doi: 10.1111/1346-8138.13659. (査読有)

Mizutani Y, Okano T, Takahashi T, Ohnishi H, Ohara O, Sano A, Seishima M. Pyoderma gangrenosum, acne and suppurative hidradenitis syndrome treated with granulocyte and monocyte adsorption apheresis. *Acta Derm Venereol*, 2017, 97 : 275-276. doi: 10.2340/00015555-2507. (査読有)

Matsuyama K, Mizutani Y, Takahashi T, Shu E, Kanoh H, Miyazaki T, Seishima M. Enhanced dendritic cells and regulatory T cells in the dermis of porokeratosis. *Arch Dermatol Res*, 2017,309:749-756 doi: 10.1007/s00403-017-1779-3. (査読有)

Kanno H, Ishida K, Yamada W, Nishida T, Takahashi N, Mochizuki K, Mizuno Y, Matsuyama K, Takahashi T, Seishima M. Uveitis induced by programmed cell death protein 1 inhibitor therapy with nivolumab in metastatic melanoma patient. *J Infect Chemotherapy*, 2017, 23:774-777. doi: 10.1016/j.jiac.2017.04.007. (査読有)

Fujii A, Matsuyama K, Mizutani Y, Kanoh H, Nakano H, Seishima M. Multiple familial trichoepithelioma with a novel mutation of the CYLD gene. *J Dermatol*, 2017, 44: e228-e229. doi: 10.1111/1346-8138.13901. (査読有)

Fujii A, Mizutani Y, Hattori Y, Takahashi T, Ohnishi H, Yoshida S, Seishima M. Sweet's syndrome successfully treated with granulocyte and monocyte adsorption apheresis. *Case Rep Dermatol*, 2017, 22:13-18. doi: 10.1159/000475878. (査読有)

Hattori Y, Takahashi T, Seishima M. Bullous pemphigoid successfully treated with a combination therapy of plasmapheresis followed by intravenous

high dose immunoglobulin. *Ther Apher Dial*, 2017, 21:421-423.

doi: 10.1111/1744-9987.12536. (査読有)

Hattori Y, Matsuyama K, Shu E, Kanoh H, Seishima M. Symmetrical drug-related intertriginous and flexural exanthema possibly due to thiamine disulfide. *J Dermatol*, 2017, 44:e115-e116.

doi: 10.1111/1346-8138.13776. (査読有)

Kanoh H, Banno Y, Nakamura M, Seishima M. Contact allergy to liquorice flavonoids : Analysis using liquid chromatography -mass spectrometry. *Contact Dermatitis*, 2016.74:191-192. doi: 10.1111/cod.12511. (査読有)

Kanno Y, Shu E, Kanoh H, Seishima M. The anti-fibrotic effect of 2AP neutralization in systemic sclerosis dermal fibroblasts and mouse models of systemic sclerosis. *J Invest Dermatol*, 2016, 136:762-769

doi: 10.1016/j.jid.2015.12.028. (査読有)

Matsuno H, Watanabe T, Tada S, Sekine A, Nohisa Y, Shinoda K, Furuta N, Ito H, Shu E, Seishima M. Sonographic detection of subcutaneous foreign bodies in 3 cases. *Acta Dermatovenerol Croat*, 2016, 24:299-302. (査読有)

Mizutani Y, Ito M, Fujisawa T, Takahashi T, Seishima M. Acquired palmoplantar keratoderma associated with hypothyroidism. *J Dermatol*, 2016, 43:1246-1247. doi: 10.1111/1346-8138.13363. (査読有)

Adachi Y, Moriya C, Fujisawa T, Shu E, Kanoh H, Nakayama A, Yonetamari J, Seishima M. Recurrent superficial cellulitis-like erythema associated with *Helicobacter cinaedi* bacteremia. *J Dermatol*, 2016, 43:844-846.

doi: 10.1111/1346-8138.13282. (査読有)

Takahashi T, Hata M, Iwata H, Seishima M. Cutaneous B cell pseudolymphoma in a psoriatic patient treated with cyclosporine. *Acta Derm Venereol*, 2016, 96: 824-825. doi: 10.2340/00015555-2387. (査読有)

Takahashi T, Mizutani Y, Ito M, Nakano H, Sawamura D, Seishima M. Dystrophic epidermolysis bullosa pruriginosa successfully treated with immunosuppressants. *J Dermatol*, 2016, 43: 1391-1392. doi: 10.1111/1346-8138. (査読有)

Kanoh H, Shu E, Ichiki Y, Seishima M. Localized scleroderma presenting as port-wine stains: report of two cases and a literature review. *Acta Derm Venereol*, 2015, 95:1003-1004.

doi: 10.2340/00015555-2100. (査読有)

Shu E, Kanoh H, Kito Y, Seishima M. A case of Felty's syndrome associated with skin ulcers and extranodal NK/T-cell lymphoma.

Acta Derm Venereol, 2015, 95:754-755. doi: 10.2340/00015555-2067. (査読有)

Fujisawa T, Suzuki S, Mizutani Y, Doi T, Yoshida S, Ogura S, Seishima M. Granulocyte and monocyte adsorption apheresis for generalized pustular psoriasis: therapeutic outcomes in three refractory patients. Ther Apher Dial, 2015, 19:336-341. doi: 10.1111/1744-9987.12342. (査読有)

Sato M, Mizuno Y, Matsuyama K, Shu E, Kanoh H, Suwa T, Seishima M. Drug-induced hypersensitivity syndrome followed by subacute thyroiditis. Case Rep Dermatol, 2015, 7:161-165. doi: 10.1159/000437251. (査読有)

① Tokuzumi M, Fujisawa T, Shu E, Kanoh H, Saigo C, Miyazaki T, Hamaguchi Y, Seishima M. Anti-SRP Antibody-positive myopathy with universal alopecia and multiple vitiligo. Acta Derm Venereol, 2015, 15: 497-498. doi: 10.2340/00015555-1985. (査読有)

② Adachi Y, Mizutani Y, Shu E, Kanoh H, Miyazaki T, Seishima M. Eosinophilic fasciitis associated with myositis. Case Rep Dermatol, 2015, 7:79-83. doi: 10.1159/000381845. (査読有)

③ Takahashi T, Fujisawa T, Kimura M, Ohnishi H, Seishima M. Familial Mediterranean fever variant with repeated atypical skin eruptions. J Dermatol, 2015, 42:903-905. doi: 10.1111/1346-8138.12929. (査読有)

④ Mizuno Y, Kato G, Shu E, Ohnishi H, Fukao T, Ohara O, Fukumoto H, Katano H, Seishima M. Merkel cell polyomavirus-positive Merkel cell carcinoma in a patient with epidermodysplasia verruciformis. Acta Derm Venereol, 2015, 95:98-99. doi: 10.2340/00015555-1868. (査読有)

[学会発表](計 18 件)

Seishima M, Niwa H, Hattori Y, Matsuyama K, Takahashi T, Shu E, Kanoh H, Miyazaki T: Treatments for sarcoid vasculitis with cutaneous involvement. The 18th International Vasculitis & ANCA Workshop, 2017.3.25-28, 東京

Seishima M, Hattori Y, Takahashi T, Shu E, Yoshida S: A combination therapy of plasmapheresis followed by intravenous high dose immunoglobulin for severe bullous pemphigoid. The 11th International Society for Apheresis Congress 2017, 2017.5.17-20, Copenhagen
Kanoh H, Ishitsuka A, Fujine E,

Matsuhana S, Nakamura M, Inagaki N, Ito H, Banno Y, Seishima M: IFN- γ may disrupt skin barrier function through reduction of long-chain fatty acid ceramides in mite-induced dermatitis. Society for Investigative Dermatology 76th Annual Meeting, 2017.4.26-29, Portland

Shu E, Kanoh H, Miyazaki T, Seishima M: Gastric cancer developed six years after the onset of anti-TIF1 antibody-positive dermatomyositis. The 26th European Academy of Dermatology and Venereology Congress, 2017.9.13-17, Geneva

Hattori Y, Mizutani Y, Takahashi T, Yoshida S, Ohnishi H, Seishima M: Recurrent sweet syndrome successfully treated with granulocyte and monocyte adsorption apheresis. The 11th International Society for Apheresis Congress 2017, 2017.5.17-20, Copenhagen

Takahashi T, Abe N, Kanoh H, Banno Y, Seishima M: Synergistic effects of vemurafenib and FTY720 (fingolimod) on vemurafenib-resistant melanoma cell line 第 42 回日本研究皮膚科学会学術大会・総会, 2017.12.15-17, 高知

Seishima M, Mizutani Y, Takahashi T, Ohnishi H: Pyoderma gangrenosum, acne, and suppurative hidradenitis (PASH) syndrome treated with granulocyte and monocyte adsorption apheresis. Asia-Pacific Combined Dermatology Research Conference, 2016.8.25-28, Noosa

Takagi H, Ohashi M, Ito M, Seishima M: Three cases of mixed tumor of the skin. The 4th Eastern Asia Dermatology Congress, 2016.11.16-18, 浦安

Kanoh H, Tokuzumi M, Shu E, Moriyama T, Seishima M: A case of red meat allergy with clinically false positive IgE antibodies against many food allergens due to sensitization to cross-reactive carbohydrate determinant (CCD). The 25th European Academy of Dermatology and Venereology, 2016.9.28-10.2, Vienna

Takahashi T, Tokuzumi M, Matsuyama K, Shu E, Seishima M, Kubo A: A case of malignant melanoma occurred in an area of palmoplantar keratoderma (Nagashima-type). The 4th Eastern Asia Dermatology Congress, 2016.11.16-18, 浦安

Fujii A, Tokuzumi M, Moriya C, Shu E, Kanoh H, Miyazaki T, Seishima M: Merkel cell polyomavirus-positive merkel cell carcinoma occurred at the surgical margin of squamous cell carcinoma. The 12th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, 2016.10.12-14, 軽井沢

高橋智子, 阿部奈緒子, 石塚麻子, 松山かなこ, 坂野喜子, 加納宏行, 清島真理子: BRAF 阻害剤抵抗性メラノーマ細胞株に対する sphingosine 1-phosphate 受容体アンタゴニスト FTY720 の併用効果. 第 27 回日本色素細胞学会, 2016.11.12-13, 岐阜

Seishima M, Tokuzumi M, Fujisawa T, Shu E, Kanoh H, Saigo C, Miyazaki T, Hamaguchi Y: Anti-SRP antibody-positive myopathy with universal alopecia and multiple vitiligo. The 23rd World Congress of Dermatology, 2015.6.8-13, Vancouver

Kanoh H, Shu E, Ichiki Y, Seishima M: Localized scleroderma in early childhood presenting as a port-wine stain. The 23rd World Congress of Dermatology, 2015.6.8-13, Vancouver

Shu E, Kanoh H, Seishima M: Clinical characteristics of anti-melanoma differentiation-associated gene (MDA) 5 antibody-positive dermatomyositis. The 24th European Academy of Dermatology and Venereology, 2015.10.7-11, Copenhagen

Matsuyama K, Mizutani Y, Shu E, Kanoh H, Miyazaki T, Seishima M: Enhanced dendritic cells and regulatory T cells in the dermis of porokeratosis. The 24th European Academy of Dermatology and Venereology, 2015.10.7-11, Copenhagen

Takahashi T, Seishima M, Hata M, Kato G, Nagai M, Iwata H: Cutaneous B cell pseudolymphoma in a psoriasis patient treated with cyclosporine. The 19th Annual Meeting of the Korean Society for Psoriasis, 2015.9.12 日, Seoul

Komaki K, Tokuzumi M, Fujisawa T, Kanoh H, Seishima M: Acquired palmoplantar keratoderma associated with hypothyroidism. The 23rd World Congress of Dermatology, 2015.6.8 - 13, Vancouver
〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清島 真理子 (MARIKO SEISHIMA)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 00171314

(2) 研究分担者

加納 宏行 (HIROYUKI KANOH)
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 40566494