

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09156

研究課題名(和文) 癌遺伝子により誘発される悪性腫瘍に対する分子予防療法の開発

研究課題名(英文) Development of molecular preventive therapy for oncogene-induced malignant tumors

研究代表者

須藤 誠 (Sudo, Makoto)

兵庫医科大学・医学部・ポストドクター

研究者番号：40415427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： 癌遺伝子 RET を導入したモデルマウスを用いて、良性腫瘍からメラノーマに悪性転化する際に、発現量に変化する分子の網羅的解析を行った。いくつかの発癌を制御している可能性がある分子候補が得られた。それらの分子を siRNA や阻害剤などを用いて発現を抑制すると、細胞増殖や細胞浸潤など、発癌機構に直接関与する現象が抑制された。

腫瘍局所の微小環境に於いて、ある分子や炎症性サイトカインの発現が上昇することで、抗腫瘍免疫機構が正常に働かなくなり、腫瘍の免疫回避を後押しする現象が観察された。それらの分子や炎症性サイトカインの発現を抑制することで、腫瘍の免疫回避を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在日本は超高齢化社会になりつつあり、癌に罹患する割合が高く、癌患者数は増加し続けている。癌は遺伝的、環境的要因により、誰しもが罹患する可能性がある。癌治療により、身体的、経済的、社会的損失は大きく、癌の克服は長年の夢である。我々の研究では、発癌制御分子の探索、新規薬剤による治療方法の開発、腫瘍の免疫回避メカニズムの一端を見出した。発癌や腫瘍の免疫回避を抑制出来れば、癌治療が軽減されるだけでなく、癌予防につながる可能性がある。癌予防は新しい考え方であり、今後も研究を推進していくべき分野である。

研究成果の概要(英文)： We performed DNA microarray analysis in a benign melanocytic tumor and a melanoma from a RET-transgenic mouse. Some candidate molecules, which might regulate carcinogenesis were identified. Those transcript and protein expression levels were increased in melanoma cell lines compared with those in normal epithelial melanocytes. Depleted those molecules by siRNA or inhibitors in human melanoma cell lines showed that cell proliferation and invasion activity were decreased.

Increase the molecules which are expressed by tumor associated cells and inflammatory cytokines change immune microenvironment in melanoma. The cellular and cytokine composition of the tumor microenvironment can affect the immune cell infiltration at the tumor site and escape from antitumor immune responses. Suppress the tumor associated molecules and inflammatory cytokines that supports antitumor properties. Collectively, our findings show the possibility of preventive and therapeutic strategies for melanoma.

研究分野：腫瘍学

キーワード：メラノーマ モデルマウス 免疫

## 1．研究開始当初の背景

皮膚癌で最も予後不良であるメラノーマの増加率は、全ての癌腫の中で第 1 位である。実際、過去 50 年間に於いて、メラノーマ死亡者数は増加し続けている。メラノーマの予防法として、オゾンホール等、紫外線に対する環境対策は徐々に進んでいる。しかし、ヒトへの対策となる「メラノーマに対する予防法の開発」は遅れており、対策が必要である。

## 2．研究の目的

メラノーマを始めとする悪性腫瘍では、良性腫瘍期を経て悪性腫瘍に悪性転化するものが少なくない。悪性転化する際に細胞内で発現が変化する分子（発癌制御分子）に注目した。癌化する以前の良性腫瘍期に発癌制御分子を抑制する事で、悪性転化を未然に防ぐ方法の開発及び予知・予防に有効なバイオマーカーを探索する為の基礎データを固めることを目的とした。

## 3．研究の方法

(1) 癌遺伝子 RET を導入したオリジナルのマウス (RET-マウス) は良性腫瘍からメラノーマに多段階発癌する。この 1 個体から発症した良性腫瘍とメラノーマの間で発現が変化する分子（発癌制御分子）をマイクロアレイ解析により選別した。発癌制御分子候補を siRNA・shRNA などを用いて発現抑制した時に、癌の特徴である細胞増殖能や細胞浸潤能などが抑制されるかの検証を行った。

(2) 生体は腫瘍に対し、抗腫瘍免疫を介して防御を行っている。しかし、腫瘍はこの抗腫瘍免疫を掻い潜って悪性転化することがある。RET-マウスを用いて、腫瘍がどのようにして免疫回避を行っているか、また、どのようにしたら腫瘍の免疫回避を抑制できるかを、腫瘍局所の微小環境に集積する免疫細胞及び炎症性サイトカインに注目し検証を行った。

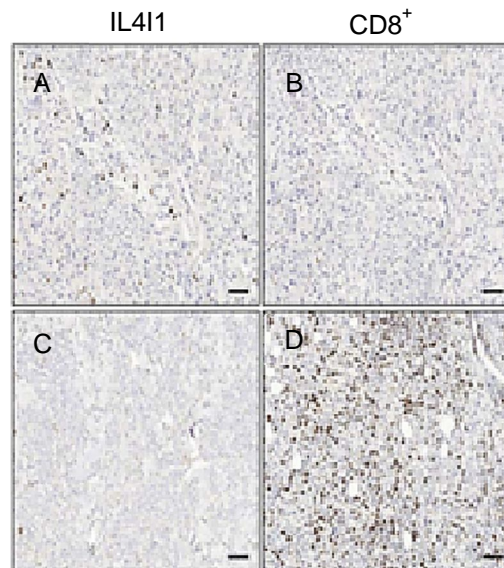
(3) メラノーマ以外の癌腫 (B 細胞急性リンパ性白血病、膵臓癌)細胞株を用いて、新規薬剤の効果および治療法の開発を行った。また、プラズマの医療応用への予備的検討を行う為に、良性腫瘍およびメラノーマに非平衡大気圧プラズマ (NEAPPs) を照射した時の遺伝子変化の検討を行った。

(4) 環境中の元素を疫学調査により解析を行った。また、それらの元素が生体に与える影響を解析する為に、細胞毒性試験や非足場依存性細胞増殖の解析を行った。

## 4．研究成果

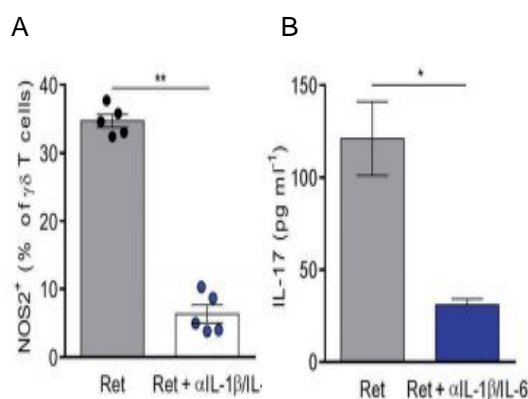
(1) RET-マウスを用いた発癌制御分子のマイクロアレイ解析により、いくつかの発癌制御分子候補を得た。それらの候補分子に対する siRNA 様の低分子試薬の開発を行った。メラノーマ細胞株に低分子試薬を処理することにより、発癌制御分子候補の mRNA レベル及びタンパクレベルで発現抑制することを確認した。発癌制御分子候補を抑制することにより、細胞増殖や細胞浸潤など、癌化に直接影響を与える特徴を抑制することが出来た。すでに癌化しているメラノーマ細胞株であっても癌の特徴である細胞増殖や細胞浸潤を抑制できたことから、良性腫瘍期の段階で発癌制御分子を抑制・制御出来れば、メラノーマの発症自体を予防できる可能性は非常に高いと予想された。今後、メラノーマに対する予防薬剤としての実用化を目指すために、この低分子試薬が生体内の腫瘍に直接届くような薬物伝達システムの開発を行うことが必要である。

(2) <sup>1</sup> IL4I1 (interleukin-4-induced gene 1) は、アミノ酸代謝酵素の一つで、メラノーマを含む固形癌細胞自身からだけでなく、腫瘍周囲に集積した腫瘍関連細胞からも分泌されている。RET-マウスを用いて、IL4I1の腫瘍形成に対する影響について検証を行った。IL4I1は良性腫瘍の細胞増殖や血管新生には直接影響を与えなかった。しかし、腫瘍局所の微小環境において、腫瘍関連細胞であるCD11b<sup>+</sup> 骨髄球系細胞の遊走を促進していた。CD11b<sup>+</sup> 骨髄球系細胞はIL4I1を高発現していて、メラノーマの悪性度と相関が見られた。IL4I1 KO マウスでは、腫瘍形成の遅延および腫瘍局所に抗腫瘍免疫を担うCD8<sup>+</sup> Tリンパ球系細胞の集積が観察された。これらのことから、IL4I1はCD8<sup>+</sup> Tリンパ球系細胞の遊走を阻害し、抗腫瘍免疫を減弱して免疫回避を凶っていることが示唆された。今後、IL4I1をターゲットとした治療法の開発が期待される。



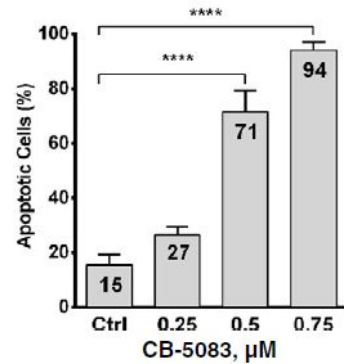
メラノーマ患者の組織染色像において、IL4I1高発現だと(A)、CD8<sup>+</sup>細胞の集積が少なかった(B)。IL4I1低発現(C)だとCD8<sup>+</sup>細胞の集積が多かった(D)。

2 腫瘍局所に浸潤した T細胞は、炎症性サイトカインにより一酸化窒素合成酵素(NOS2)の産生誘導されることが観察された。NOS2は骨髄系由来抑制細胞(MDSCs)の浸潤を誘導する。MDSCsは免疫細胞の抗腫瘍反応を抑制する。腫瘍局所の微小環境において、炎症性サイトカインを抑制することにより、浸潤してきた T細胞からのNOS2産生を減少させ、MDSCsの腫瘍局所への浸潤および腫瘍の免疫回避を抑制出来る可能性が示唆された。



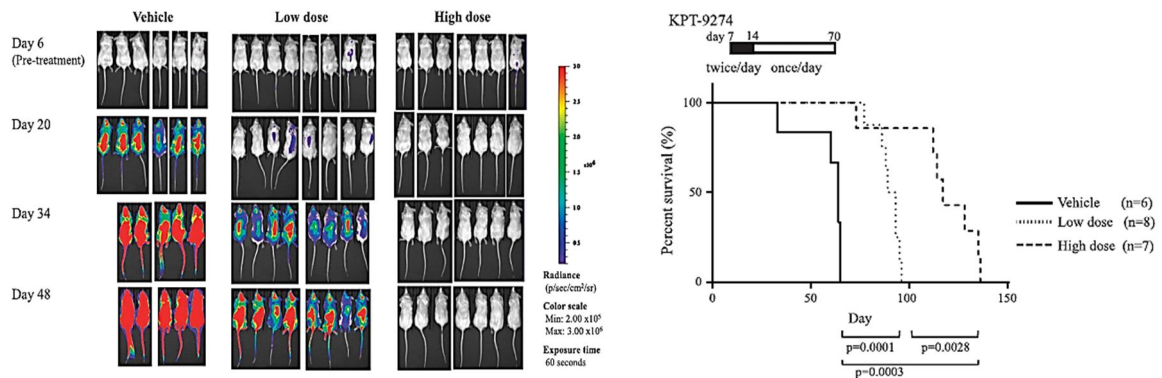
RET-マウスにIL-1β/IL-6中和抗体を処置することにより、NOS2産生している T細胞が減少した(A)。MDSCsや好中球を誘導するサイトカインIL-17の T細胞による産生量がIL-1β/IL-6中和抗体を処置することにより抑制された(B)。

(3) <sup>1</sup> p97 阻害は小胞体ストレス誘導を増加させ、固形癌および多発性骨髄腫の細胞死を誘導する。B 細胞急性リンパ球白血病 (B-ALL) 細胞株に、p97 阻害剤である CB-5083 を処理することにより、シャペロン分子の高発現、小胞体ストレス応答の指標である IRE1-alpha の活性化および PERK 活性化による CHOP の過発現が観察された。これらは、B-ALL 細胞株のアポトーシスを誘導した。また、ALL の治療薬 vincristine と CB-5083 を併用することで、細胞死誘導の相乗効果を生むことを発見した。



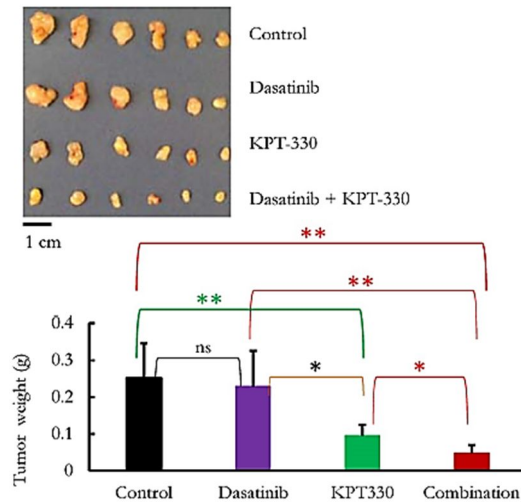
B-ALL 細胞に p97 阻害剤である CB-5083 を (0.25-0.75  $\mu\text{M}$ ), 72 時間暴露すると、小胞体ストレス誘導によりアポトーシスが誘導された。

2 KPT-9274 は新規薬剤で、p21-activated kinase 4 (PAK4) および nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) 両方の分子に対する阻害剤である。PAK4 は形質転換の制御に参与する。NAMPT は生体エネルギー代謝を担っている nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) の律速酵素として機能している。B-ALL 細胞株に KPT-9274 を作用させると、細胞増殖が抑制された。患者由来の B-ALL 細胞をマウスに導入した実験においても、KPT-9274 は B-ALL の増殖を抑制した。この抑制は、NAD<sup>+</sup> の合成を誘導するニコチン酸の添加により回復することから、KPT-9274 における B-ALL の増殖抑制は、主に NAMPT 阻害による NAD<sup>+</sup> の欠乏が理由だと分かった。B-ALL に対し、NAD<sup>+</sup> 枯渇が有効な治療法の一つになる可能性が示唆された。



患者由来 B-ALL 細胞を導入したマウスに Low dose (50 mg/kg, 左図真ん中), High dose (150 mg/kg, 左図右側) KPT-9274 を処置したマウスでは、コントロール(左図左側) に比べ、B-ALL 細胞の増殖を抑制し、有意に生存の延長が確認された (右図)。

3 膵臓癌は最も予後が悪い癌腫の一つです。マルチキナーゼ阻害剤である Dasatinib が膵癌の増殖および転移を阻害したという報告がある。しかし、Dasatinib が効かない膵臓癌や処置後耐性になる膵臓癌が報告されている。Dasatinib 耐性細胞株を用いて、shRNA ライブラリーを用いた、ゲノムワイドスクリーニングを行った。Dasatinib との併用により、合成致死に至る分子及びシグナル経路を同定した。これらの低分子阻害剤と Dasatinib を併用することにより、治療効果の高い薬剤投与方法の提案を行った。ゲノムワイドスクリーニングにより ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) シグナル経路が同定された。このシグナル経路に含まれる分子は、膵臓癌で高い発現が観察されている。その中の XPO1 に対する阻害剤 KPT-330 を Dasatinib と併用すると、Dasatinib 耐性細胞を xenograft した実験に於いて、相乗的な抑制効果が得られた。



4 非平衡大気圧プラズマ (NEAPPs) を RET-マウスに発症した良性腫瘍とメラノーマから分離した細胞に照射し、それぞれの遺伝子発現の変化を検討した。NEAPPs の照射により、両方の細胞で細胞増殖や浸潤に関連する分子の mRNA 発現が抑制された。このことから、NEAPPs は、メラノーマの治療だけでなく、巨大型先天性色素細胞母斑などの予防にも使用できる可能性が示唆された。

4 非平衡大気圧プラズマ (NEAPPs) を RET-マウスに発症した良性腫瘍とメラノーマから分離した細胞に照射し、それぞれの遺伝子発現の変化を検討した。NEAPPs の照射により、両方の細胞で細胞増殖や浸潤に関連する分子の mRNA 発現が抑制された。このことから、NEAPPs は、メラノーマの治療だけでなく、巨大型先天性色素細胞母斑などの予防にも使用できる可能性が示唆された。

(4) 環境中の元素により健康リスクが高まっているという報告がある。開発途上国の飲用井戸水や工業廃水中に含まれる元素の疫学調査及び細胞毒性や細胞に及ぼす影響の解析を行った。バリウムやクロムの暴露により、細胞の形質転換を誘発する能力があることが示唆された。他の元素についても細胞毒性や形質転換、癌化など生体に及ぼす影響を解析中である。また、飲用井戸水や工業廃水から有害な元素を除去することを目指して、開発途上国でも使用可能な、安価で再生可能な浄化材の開発も行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Chien Wenwen, Sudo Makoto, Ding Ling-Wen, Sun Qiao-Yang, Wuensche Peer, Lee Kian Leong, Hattori Norimichi, Garg Manoj, Xu Liang, Zheng Yun, Gery Sigal, Wongphayak Sarawut, Yang Henry, Baloglu Erkan, Shacham Sharon, Kauffman Michael, Mori Seiichi, Koeffler H. Phillip	4. 巻 9
2. 論文標題 Functional Genome-wide Screening Identifies Targets and Pathways Sensitizing Pancreatic Cancer Cells to Dasatinib	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 4762 ~ 4773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/jca.25138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Omata Yasuhiro, Yoshinaga Masafumi, Yajima Ichiro, Ohgami Nobutaka, Hashimoto Kazunori, Higashimura Kaho, Tazaki Akira, Kato Masashi	4. 巻 210
2. 論文標題 A disadvantageous effect of adsorption of barium by melanin on transforming activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 384 ~ 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemosphere.2018.07.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Takayoshi, Nakata Kazuaki, Yajima Ichiro, Kato Masashi, Tsurui Hiromichi	4. 巻 5
2. 論文標題 Label-Free Imaging of Melanoma with Confocal Photothermal Microscopy: Differentiation between Malignant and Benign Tissue	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 67 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bioengineering5030067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Douguet Laetitia, Bod Lloyd, Labarthe Laura, Lengagne Rennee, Kato Masashi, Couillin Isabelle, Prevost-Blondel Armelle	4. 巻 7
2. 論文標題 Inflammation drives nitric oxide synthase 2 expression by T cells and affects the balance between melanoma and vitiligo associated melanoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 OncoImmunology	6. 最初と最後の頁 e1484979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2162402X.2018.1484979	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshinaga Masafumi, Ninomiya Hiromasa, Al Hossain M.M. Aeorangajeb, Sudo Makoto, Akhand Anwarul Azim, Ahsan Nazmul, Alim Md. Abdul, Khalequzzaman Md., Iida Machiko, Yajima Ichiro, Ohgami Nobutaka, Kato Masashi	4. 巻 201
2. 論文標題 A comprehensive study including monitoring, assessment of health effects and development of a remediation method for chromium pollution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 667 ~ 675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemosphere.2018.03.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takao S, Chien W, Madan V, Lin D-C, Ding L-W, Sun Q-Y, Mayakonda A, Sudo M, Xu L, Chen Y, Jiang Y-Y, Gery S, Lill M, Park E, Senapedis W, Baloglu E, Muschen M, Koeffler H P	4. 巻 32
2. 論文標題 Targeting the vulnerability to NAD+ depletion in B-cell acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 616 ~ 625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/leu.2017.281	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yajima Ichiro, Ahsan Nazmul, Akhand Anwarul Azim, Al Hossain MM Aeorangajeb, Yoshinaga Masafumi, Ohgami Nobutaka, Iida Machiko, Oshino Reina, Naito Mariko, Wakai Kenji, Kato Masashi	4. 巻 28
2. 論文標題 Arsenic levels in cutaneous appendicular organs are correlated with digitally evaluated hyperpigmented skin of the forehead but not the sole in Bangladesh residents	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology	6. 最初と最後の頁 64 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/jes.2016.70	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Gugliotta Gabriele, Sudo Makoto, Cao Qi, Lin De-Chen, Sun Haibo, Takao Sumiko, Le Moigne Ronan, Rolfe Mark, Gery Sigal, M?schen Markus, Cavo Michele, Koeffler H. Phillip	4. 巻 19
2. 論文標題 Valosin-Containing Protein/p97 as a Novel Therapeutic Target in Acute Lymphoblastic Leukemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neoplasia	6. 最初と最後の頁 750 ~ 761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neo.2017.08.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Bod Lloyd, Lengagne Renee, Wrobel Ludovic, Ramspott Jan Philipp, Kato Masashi, Avril Marie-Francoise, Castellano Flavia, Molinier-Frenkel Valerie, Prevost-Blondel Armelle	4. 巻 6
2. 論文標題 IL4-induced gene 1 promotes tumor growth by shaping the immune microenvironment in melanoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 OncoImmunology	6. 最初と最後の頁 e1278331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2162402X.2016.1278331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Machiko Iida, Yasuhiro Omata, Ichiro Yajima, Awoi Sato, Takehito Kajiwara, Ryoko Tasaka, Masaru Hori, Masashi Kato	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 458
3. 書名 Plasma Medical Science 1st Edition	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	矢嶋 伊知朗  (Yajima Ichiro)  (80469022)	名古屋大学・医学系研究科・講師   (13901)	
研究分担者	加藤 昌志  (Kato Masashi)  (10281073)	名古屋大学・医学系研究科・教授   (13901)	