

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06389

研究課題名(和文) イヌ悪性黒色腫特異的活性化経路を標的とした抗腫瘍治療：ERK5経路の活性化制御

研究課題名(英文) Canine melanoma-specific activating signals as anti-cancer therapeutic targets: regulation of ERK5 signaling pathway

研究代表者

中山 智宏 (NAKAYAMA, Tomohiro)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：00419649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍において炎症性微小環境がその挙動に大きく影響する。本研究の目的は、イヌメラノーマにおける炎症による「腫瘍特異的“活性化”経路」を明らかにし、新規治療法に結び付けることである。イヌメラノーマ細胞において、IL-1 はマトリックスメタロプロテアーゼ3 (MMP-3) の発現と放出、細胞遊走を促進した。また、IL-1 によるシクロオキシゲナーゼ2 (COX-2) 発現にはMAPキナーゼ系のERK5が関わることを判明した。イヌメラノーマ細胞では糖輸送体GLUT1およびGLUT3が発現し、細胞増殖への関与を明らかにした。これらの細胞内シグナルやタンパク質発現がイヌメラノーマ治療標的となることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性黒色腫(メラノーマ)はイヌの口腔内悪性腫瘍で最も発生頻度が高く、また、致命的な腫瘍疾患である。また、イヌメラノーマは増殖、浸潤、転移が非常に速く、診断時には既存の抗腫瘍治療(外科手術、抗がん剤)が不適応となることが多い。本研究では、イヌメラノーマ細胞において腫瘍悪性化の一要因である炎症下で活性化される転写調節や細胞内シグナル分子を明らかにした。これらのイヌメラノーマでの特異性は、新規治療法の標的となることが考えられることから、本研究成果は獣医療学的に大きな意義を有する。

研究成果の概要(英文)：The inflammatory micro environment in tumors influences tumor growth and metastasis. We investigated intracellular signaling systems mediated by the inflammatory cytokine interleukin-1 (IL-1) in canine melanoma cells to elucidate cancer-specific signaling systems and explore new cancer therapy. In the melanoma cells IL-1 provoked expression and release matrix metalloprotease 3 (MMP-3), which stimulated chemotaxis. IL-1 also stimulated cyclo-oxygenase 2 (COX-2) expression and prostaglandin E2 release in the melanoma cells. The MAP kinase ERK5 has been suggested to be involved in the IL-1-induced COX-2 expression. Further, GLUT1 and GLUT3, glucose transporters, have been suggested to be implicated in cell growth via uptake glucose into the melanoma cells, though IL-1 failed to induce expression of those glucose transporters. Together, such cancer specific intracellular signaling and proteins may be new therapy targets for malignant melanoma in dogs.

研究分野：獣医学

キーワード：口腔内悪性黒色腫 イヌ インターロイキン1 COX-2 MAPキナーゼ ERK5 MMP-3 GLUT

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性黒色腫(メラノーマ)はイヌの口腔内悪性腫瘍で最も発生頻度が高く、また、致死的な腫瘍疾患である。メラノーマは増殖、浸潤、転移が非常に速いことから、診断された時には既存の抗腫瘍治療(外科手術、抗がん剤)が不適応となることが多い( )。

(2) 腫瘍において炎症性微小環境は、腫瘍の発生、促進、成長、浸潤、転移などに影響すると考えられている( , )。がん細胞自身や間質細胞、腫瘍部位に浸潤した白血球が産生するサイトカイン、ケモカイン、成長因子などの様々な炎症性および微小環境因子は、直接的または間接的に腫瘍の発生や成長に好ましい微小環境を整える作用を有している。

(3) 腫瘍特異的な標的について遺伝子やタンパク質の「発現」に目を向けて網羅的な研究が行われている一方で、細胞が周囲環境に反応した際の様々な細胞内シグナル伝達経路の「活性化」については焦点を当てた研究は少ない。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究においては、イヌメラノーマにおける炎症による「腫瘍特異的“活性化”経路」を明らかにし、抗炎症-抗腫瘍効果に導くことを目的とした。研究材料として培養イヌメラノーマ細胞を用い、サイトカイン誘導性炎症反応を指標にして、イヌメラノーマの炎症モデルを確立し、その炎症モデルにおける炎症制御に関わる細胞内シグナル伝達経路、特に ERK5 を含む MAP キナーゼ経路および転写因子の1つである NF- $\kappa$ B の関与を明らかにすることを目的とした。

(2) 炎症反応としては、炎症性サイトカインであるインターロイキン 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) が様々な微小環境で発現促進が認められる( )ことからリガンドとして用い、細胞応答としてはプロスタグランジン E2 (PGE2) 放出と合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) 発現、また、炎症関連分子インターロイキン 6 (IL-6) やインターロイキン 8 (IL-8)、マトリックスメタロプロテアーゼ 3 (MMP-3) の発現と放出を検出し、その細胞内シグナルに対する制御を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞培養：市販のイヌメラノーマ細胞 (MCM-N1 細胞株) を購入し、10% ウシ胎児血清を含む  $\alpha$ -MEM 培地で 5% CO<sub>2</sub> 環境下、37 °C で培養した。

(2) real-time RT-PCR： mRNA 発現は、TRIzol 試薬を用いて total RNA を抽出し、特異的なプライマーを用いて、real-time-RT-PCR により検討した。

(3) western blotting：タンパク質を回収し、SDS 電気泳動法によりタンパク質を分画後、PVDF 膜へ転写し、特異抗体を用い western blotting にてタンパク質発現及びリン酸化を検討した。

(4) PGE2, IL-6, IL-8, MMP-3 測定：リガンドで刺激したイヌメラノーマ細胞の培養上清を回収し、培養上清中に放出された濃度を、市販の ELISA kit を用いて測定した。

(5) 細胞の遊走能：Culture-Insert 2 Well 上にイヌメラノーマ細胞を培養し、スクラッチアッセイを使用することによって、細胞の遊走能を測定した。

(6) ノックダウン細胞の作製：細胞内シグナル制御因子の関与を薬理的に検討した後、siRNA 導入によりノックダウン細胞を作成し検討した。

#### 4. 研究成果

(1) IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 発現への ERK の関与：イヌメラノーマ細胞を IL-1 $\beta$  刺激すると、PGE2 放出が認められ、COX-2 mRNA 発現は時間および濃度依存的に上昇した。また、IL-1 $\beta$  刺激 COX-2 タンパク質発現が上昇した。薬理的に阻害剤によるスクリーニングを行ったところ、MAP キナーゼ経路である ERK1/2 経路と ERK5 経路の関与が示唆された。イヌ正常細胞（皮膚由来線維芽細胞）では ERK1/2 の関与を報告しているが、ERK5 の機能が明らかとなっていない。以前にイヌメラノーマ細胞において、プロテインキナーゼの活性化剤であるホルボールエステルによる ERK5 経路の関与を認めていることから、ERK5 がメラノーマ細胞特異的な炎症発現メカニズムに関わることが考えられる。

(2) IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 発現への NF- $\kappa$ B p65 の関与：イヌメラノーマ細胞において IL-1 $\beta$  刺激は MMP-3 の放出と mRNA 発現を促進した。IL-1 $\beta$  刺激はイヌメラノーマ細胞の遊走を促進したが、MMP-3 阻害剤はそれを抑制したことから、MMP-3 はイヌメラノーマ細胞の転移への関与が示唆された。IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現は転写因子の 1 つである NF- $\kappa$ B の阻害剤で抑制された。IL-1 $\beta$  刺激細胞においては、NF- $\kappa$ B p65 及び p105 の活性化が認められた。さらに siRNA を用いてノックダウン細胞を作成して検討したところ、IL-1 $\beta$  誘導性の MMP-3 mRNA 発現は p65 ノックダウン細胞では阻害されたが、p105 ノックダウン細胞では阻害されなかった。従来、p105 を前駆体として p50 を供給し、p65 とヘテロ二量体として NF- $\kappa$ B は機能するとされているが、今回の結果は異なった転写制御が存在することを意味する。

(3) グルコース輸送体の関与：腫瘍細胞においては、グルコースの取り込みが促進され、好気的な条件下においても解糖系からエネルギーを獲得する代謝に利用され、腫瘍細胞の生存や増殖を助長するワールブルグ効果が認められる。イヌメラノーマ細胞の増殖能におけるグルコース代謝およびグルコース輸送体との関与についても検討した。グルコースアナログの 1 つである 2-deoxy-D-glucose (2-DG) はイヌメラノーマ細胞の増殖を有意に抑制し、さらに、グルコース消費および乳酸分泌が減少した。グルコースを細胞内へ輸送するグルコース輸送体 (GLUT) の阻害剤 WZB-117 はメラノーマ細胞増殖を有意に抑制し、さらに、グルコース消費および乳酸分泌を減少した。イヌメラノーマ細胞における GLUT アイソフォームについて検討し、GLUT1 と GLUT3 の発現を明らかにした。また、GLUT1 および GLUT3 のノックアウトイヌメラノーマ細胞においては、GLUT1 および GLUT3 を介したグルコースの細胞内への取り込みが抑えられ、グルコース消費や乳酸分泌が低下し、

それに伴って細胞増殖が抑えられることから , GLUT1 および GLUT3 の機能がメラノーマ細胞増殖に関わることを明らかにした。IL-18 による GLUT の発現に変化は認められなかったが , GLUT3 はがん細胞に構成的に多く発現することから , メラノーマ特異的な標的になることが考えられる。

<引用文献>

Bergman PJ, Kent MS, Farese JP. Melanoma, In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 5th Edition (Withrow SJ, Vail DM, Page RL), Elsevier Health Sciences, 2013; 321-334.

Fernandes JV, Cobucci RN, Jatobá CA, Fernandes TA, de Azevedo JW, de Araújo JM. The role of the mediators of inflammation in cancer development. Pathol Oncol Res. 2015; 21: 527-534.

Yang L, Lin PC. Mechanisms that drive inflammatory tumor microenvironment, tumor heterogeneity, and metastatic progression. Semin Cancer Biol. 2017; 47: 185-195.

Litmanovich A, Khazim K, Cohen I. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of cancer and its potential as a therapeutic target in clinical practice. Oncol Ther. 2018; 6: 109-127.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nakano R, Nakayama T, Sugiya H	4. 巻 29
2. 論文標題 Biological Properties of JNK3 and Its Function in Neurons, Astrocytes, Pancreatic $\beta$ -Cells and Cardiovascular Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1802
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9081802	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 Nakano R, Kitanaka T, Namba S, Kitanaka N, Suwabe Y, Konno T, Yamazaki J, Nakayama T, Sugiya H	4. 巻 7
2. 論文標題 Non-Transcriptional and Translational Function of Canonical NF- $\kappa$ B Signaling in Activating ERK1/2 in IL-1 $\beta$ -Induced COX-2 Expression in Synovial Fibroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front. Immunol.	6. 最初と最後の頁 579266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.579266	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 Kitanaka N, Nakano R, Sakai M, Kitanaka T, Namba S, Konno T, Nakayama T, Sugiya H	4. 巻 14
2. 論文標題 ERK1/ATF-2 signaling axis contributes to interleukin-1 $\beta$ -induced MMP-3 expression in dermal fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0222869
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0222869	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 Kitanaka N, Nakano R, Sugiura K, Kitanaka T, Namba S, Konno T, Nakayama T, Sugiya H	4. 巻 14
2. 論文標題 Interleukin-1 $\beta$ promotes interleukin-6 expression via ERK1/2 signaling pathway in canine dermal fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0220262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0220262	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 Suwabe Y, Nakano R, Namba S, Yachiku N, Kuji M, Sugimura M, Kitanaka N, Kitanaka T, Konno T, Sugiya H, Nakayama T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Involvement of GLUT1 and GLUT3 in the growth of canine melanoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 19-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0243859	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 Naruke A, Nakano R, Nunomura J, Suwabe Y, Nakano M, Namba S, Kitanaka T, Kitanaka N, Sugiya H, Nakayama T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Tpl2 contributes to IL-1 -induced IL-8 expression via ERK1/2 activation in canine dermal fibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0259489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0259489	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤慶太、坂井 学、阪本裕美、沖 嘉尚、加野浩一郎、中山智宏
2. 発表標題 犬脱分化脂肪細胞の末梢静脈および門脈投与の安全性に関する評価
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 諏訪部陽子、中野 令、杉浦 叶、難波信一、北中菜菜子、北中 卓、合屋征二郎、高橋朋子、中山智宏、杉谷博士
2. 発表標題 イヌ皮膚由来線維芽細胞におけるインターロイキン1 によるTpl-2/ERKシグナリング経路を介したインターロイキン8の発現
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野 令、北中菜菜子、諏訪部陽子、難波信一、北中 卓、合屋征二郎、高橋 朋子、中山智宏、杉谷博士
2. 発表標題 イヌ滑膜線維芽細胞におけるシクロオキシゲナーゼ-2に対するグルコサミン塩酸塩誘導性グリコシル化抑制とオートファジー誘導性タンパク質分解
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡野雅春、鈴木進悟、西谷広平、宮前二郎、片倉文彦、難波信一、中山智宏、森友忠昭、椎名隆
2. 発表標題 ネコMHCクラス II遺伝子(FLA-DRB)の多型解析およびハプロタイプ推定
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久慈愛美、中野 令、杉村真奈、八竹直哉、難波信一、北中菜菜子、今野忠好、北中 卓、諏訪部陽子、高橋朋子、中山智宏、杉谷博士
2. 発表標題 イヌ悪性黒色腫のTRAPA1を介した細胞死におけるPLD1の関与
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八竹直哉、中野令、久慈愛美、杉村真奈、難波信一、北中菜菜子、今野忠好、北中 卓、高橋朋子、中山智宏、杉谷博士、諏訪部陽子
2. 発表標題 イヌ悪性黒色腫におけるIL-1 発現によるMMP-3発現
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田悠太、高橋舞子、合屋征二郎、高橋朋子、中山智宏
2. 発表標題 猫の口腔内扁平上皮癌における放射線増感剤SQAPの有効性について
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山智宏、圓尾拓也、佐原弘益
2. 発表標題 イヌとネコの放射線治療における新規放射線増感剤の検討
3. 学会等名 第56回アイソトープ・放射線研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 茅沼秀樹、中山智宏、夏堀雅宏、福田祥子、藤田道郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 学窓社	5. 総ページ数 96
3. 書名 すぐ使える犬のX線ポジショニングと撮影法	

〔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	杉谷 博士  (SUGIYA Hiroshi)  (20050114)	日本大学・生物資源科学部・教授   (32665)	削除:2020年5月14日

6. 研究組織（つづき）

	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	中野 令  (NAKANO Rei)  (60755619)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・ 基礎科学特別研究員    (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関