

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18438

研究課題名（和文）悪性黒色腫のAutophagyにおけるHMGB1の役割の解析

研究課題名（英文）the role of HMGB1 in autophagy of malignant melanoma

研究代表者

松本 麻由（matsumoto, mayu）

愛媛大学・医学部附属病院・助教（病院教員）

研究者番号：20844765

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：Apoptosis阻害要因の一つであるAutophagyについて、これに関係するHMGB1の動態を観察し、抗悪性腫瘍薬開発に寄与することを目的とする。

まず、正常ヒト角化細胞におけるAutophagyについて観察した。次に、正常ヒト角化細胞と、ヒト悪性黒色腫より分離した細胞株に対して、HMGB1の拮抗薬であるHMGB1 A-Boxを投与しAutophagyの変化について観察を行った。HMGB1 A-Box1投与前と比較して、Autophagyの明らかな抑制効果はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗腫瘍薬はがん細胞のapoptosisを促し効果を得るが、腫瘍細胞のAutophagyにより耐性を持つようになる。このAutophagyに関連するタンパクの一つとしてHMGB1があり、この競合作用を持つHMGB1 A-Boxを用いて腫瘍細胞のAutophagyが抑制されるか研究を行った。

結果として、明らかな抑制効果を確認できなかったが、悪性腫瘍に対する治療の開発を目的とした研究であり、社会的に意義のあるものであったと考える。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to observe the dynamics of HMGB1 related to Autophagy, which is one of the factors that inhibit Apoptosis, and to contribute to the development of antineoplastic drugs.

First, we observed Autophagy in normal human keratinocytes. Next, HMGB1 A-Box, an antagonist of HMGB1, was administered to normal human keratinocytes and cell lines isolated from human malignant melanoma, and changes in autophagy were observed. No clear inhibitory effect of Autophagy was observed compared to before administration of HMGB1 A-Box1.

研究分野：皮膚悪性腫瘍

キーワード：悪性黒色腫 Autophagy HMGB1

## 1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害薬である抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体は、T 細胞の抑制性免疫補助受容体として機能を阻害することで T 細胞を活性化することで抗腫瘍効果を示す。一方で分子標的薬としての BRAF 阻害薬は、BRAF キナーゼを阻害することでがん細胞の異常な増殖促進および生存助長を妨げることで腫瘍縮小効果を示す。殺細胞性の抗悪性腫瘍薬を含め、これらの薬剤は最終的にはがん細胞の apoptosis を促すことで効果を発揮することになるが、近年この apoptosis を阻害している一因として注目されているのが Autophagy の誘導である。正常の細胞においては、Autophagy は飢餓状態で自己消化することで細胞を生存させるように働いているが、がん細胞が抗悪性腫瘍薬などによりストレスを受けた時、この Autophagy が活性化され、生き延びることで悪性腫瘍に対して耐性を持つようになる。

悪性腫瘍細胞内の Autophagy を抑制することができれば、腫瘍細胞を Apoptosis に誘導することができるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

Autophagy に関する多数の遺伝子やタンパクが報告されている中、近年、核内タンパクである High mobility group box 1(HMGB1)が深く関わっていることが報告されている(Tang, D., JCB 2010)。HMGB1 は通常は核内で DNA の安定化や転写に寄与しているが、腫瘍細胞においてはストレス下で核内から細胞内へ移行することがわかってきており(Huang, CY., Cell death Dis, 2018)、この HMGB1 の動態を調べることで腫瘍細胞の Autophagy のメカニズムを解明する手掛かりになると考えられる。

HMGB1 通常核内では還元型の reduced-HMGB1 として存在するが、細胞死や外的刺激により細胞外に放出されると速やかに酸化され(disulfide-HMGB1)、他のサイトカインや DNA などと結合し炎症性メディエーターとして働くことが報告されている。一方で、核内から細胞内放出された HMGB1 の酸化・還元状態ははっきりとわかっておらず、さらに Autophagy に関与する HMGB1 は disulfide type であるとの報告もある(Huang, CY., Cell death Dis, 2018)。

当教室では正常角化細胞に対して reduced-HMGB1 が炎症誘導作用を抑制することを報告してきたが(Mori H, JDS, 2018)、細胞内における disulfide-HMGB1 を reduced-HMGB1 に還元することができれば、Autophagy を抑制することが出来るのではないかと考えた。さらに、HMGB1 はその内部構造に A-box、B-box を持ち、A-box は HMGB1 の炎症誘導作用を抑制することが報告されている。当教室でも正常表皮角化細胞において HMGB1 A-box が HMGB1 と競合して抑制効果を示す事を確認しており、HMGB1 A-box を細胞内に誘導する事で HMGB1 と競合して Autophagy を抑制出来る可能性があると考えた。

この研究の目的は、悪性腫瘍細胞の Autophagy における HMGB1 の役割について解析することである。

## 3. 研究の方法

### (1)正常ヒト角化細胞、ヒト悪性黒色腫細胞の培養と細胞内の HMGB1 の観察

正常ヒト角化細胞を用いた単層培養細胞、三次元培養表皮(Living skin equivalent; LSE)を用いて、正常細胞サイクル内での Autophagy を、各種抗体(ATG5, ATG12, Beclin1, LC3B, など)を用いて免疫蛍光染色、Western blot 法、qRT-PCR、ELISA 法などでその発現を観察する。

ヒト悪性黒色腫の原発巣または転移巣より分離した細胞株を培養し、継体する。

培養・継体した悪性黒色腫株を用いて(1)と同様の観察を行う。

正常細胞および悪性黒色腫株に対して抗悪性腫瘍薬(ドセタキセル等)を用いてストレスを与え、同様に Autophagy を観察する。

において、時間経過とともに核内および細胞内の HMGB1 の濃度とその酸化還元状態を明らかにする。

### (2)細胞内の HMGB1 の還元化、HMGB1 A-Box の導入

細胞内に還元剤である DDT を導入し、細胞内の HMGB1 の酸化還元状態の変化をみる。

細胞内に HMGB1 A-Box を誘導投与し、細胞内への移行状態を蛍光顕微鏡で観察する。また、Autophagy の動態を各種抗体を用いて、蛍光顕微鏡ならびに Western blot 法で観察する。

抗腫瘍薬を用いた各細胞において、 を実行し、蛍光顕微鏡を用いて Autophagy の観察を行う。

## 4. 研究成果

まず、正常ヒト角化細胞を用いた単層培養細胞を用いて、正常細胞サイクル内での Autophagy を、各種抗体(ATG5, ATG12, Beclin1, LC3B, など)を用いた免疫抗体染色法で観察した。細胞数が sub-confluence の状態では、ATG5、ATG12 の活性化が見られたが、full confluence になると活性化が下がる傾向にあった。また、三次元培養表皮(Living skin equivalent; LSE)を用いて、同様の免疫染色を行ったところ、基底層では ATG5 の活性化がみられた。同様の抗体を用いて Western blot 法でも同様の結果を確認できた。

次に、単層培養細胞に対して Reduced-HMGB1 を投与し、各種抗体を用いて Autophagy を観察したが、投与前と比較して明らかな活性化はみられなかった。原因としては Western blotting で細胞内に Reduced-HMGB1 を認めなかったことから、reduced-HMGB1 は培養液中で速やかに酸化を受け細胞内では Disulfide-HMGB1 に変化しているためと考えられた。

さらに HMGB1 の拮抗薬である HMGB1 A-Box を投与し、Autophagy の抑制がみられるかどうかを調べた。まず、単層培養細胞を用いて蛍光マーカーを付与した HMGB1 A-Box が細胞内への確実な取り込みが行われるかどうか、蛍光顕微鏡のタイムラズブ機能を用いて観察したが、A-Box の細胞内への取り込みは見られなかった。そこで、トランスフェクション試薬(Lipofectamin3000)を用い、再度細胞内への取り込みを観察したところ、投与後短時間(5-10 分)で細胞内へ取り込まれる様子が確認された。次に HMGB1 A-Box を様々な濃度で投与し、正常細胞で HMGB1 による Autophagy の抑制効果を免疫抗体染色法、Western blot 法を用いて確認した。しかし、HMGB1 A-Box 投与により Autophagy の明らかな抑制効果はみられず、細胞内では A-Box は HMGB1 との作用を阻害しないことがわかった。A-Box による HMGB1 の炎症抑制効果は、レセプターへの競合と考えられているため、HMGB1 の Autophagy に対する作用は単なるレセプターへの結合を介するものではないか、A-Box と結合する部位が異なる可能性が示唆された。

以上から、細胞内の reduced-HMGB1 および HMGB1 A-Box による Autophagy 抑制効果はみられないことがわかった。今後の課題としては、reduced-HMGB1 の還元状態を維持する方法の模索、細胞内の disulfide-HMGB1 を reduced-HMGB1 に還元する方法、新たな HMGB1 阻害薬の開発などを検討する必要があると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------