

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591627

研究課題名(和文)メラノーマにおける熱ショック転写因子の抗腫瘍効果解析と治療的応用の検討

研究課題名(英文) Analysis of anticancer efficacy and therapeutic application for human melanoma by regulating heat shock factor 1 (HSF1)

研究代表者

中村 好貴 (NAKAMURA, Yoshitaka)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00448292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞の増殖が熱ショック因子(Heat shock factor 1: HSF1)に依存することが示され、HSF1が癌治療の新ターゲットとして注目を集めているが、HSF1がメラノーマの増殖能、浸潤能および転移能にいかに関わっているか、その生物学的機能は十分には解析されていない。HSF1をノックダウンしたメラノーマ細胞では、遊走能、浸潤能の低下が認められた。また、HSF1をノックダウンした後、HSF1を再発現させると遊走能、浸潤能は回復した。さらに、HSF1をノックダウンしたメラノーマ細胞をヌードマウスに皮下注射したところ、腫瘍形成が抑制されるだけでなく、腹腔内への浸潤、肺への転移も抑制された。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have reported that heat shock factor 1 (HSF1) supports the malignant phenotype by promoting oncogenic signal transduction pathways, proliferation, survival, protein synthesis and glucose metabolism, suggesting that HSF1 may be a critical driver in cancer and a potential therapeutic target. However, the biological functions of HSF1 in human melanoma remain poorly understood.

We found that HSF1 knockdown led to a marked reduction in migration and invasive ability, and these functions were restored by overexpression of wild-type HSF1. To confirm the in vitro results, we performed subcutaneous xenograft experiments in athymic nude mice. We found that HSF1 was required for melanoma invasion and metastasis, as well as tumorigenic potential in vivo. Overall, these results show that HSF1 is indispensable for melanoma progression and metastasis, and suggests that HSF1 could be a promising therapeutic target for melanoma.

研究分野：皮膚腫瘍学

キーワード：Heat shock factor 1 Malignant melanoma

### 1. 研究開始当初の背景

細胞には、外界からのストレスなどによって生じたタンパク質の異常を修復する仕組みが備わっており、その中でも重要なのが進化の過程で保存された熱ショック応答と呼ばれる適応機構である。これはフォールディングと分解を助ける熱ショック蛋白質 (Heat shock proteins : Hsps) の転写量を調節することで、タンパク質ホメオスタシスを保つ仕組みであり、全ての生物に備わった基本的な生体防御機構である。熱ショック応答を調節するのが転写調節因子である熱ショック因子 (Heat Shock Factor 1 : HSF1) である。癌細胞は熱ショック応答を強く発現させて、それを利用することで、ストレス条件下でも増殖できることが解明されてきており、様々な組織由来の癌細胞の増殖が熱ショック因子 (Heat shock factor 1 : HSF1) に依存することが示され、近年 HSF1 が癌治療の新しいターゲットとして注目を集めるようになってきている。また最近では、HSF1 の発現量が様々ながんを上昇しており、HSF1 の発現量が多い乳がんは予後が悪いことが報告されており、HSF1 が臨床的な悪性度にも関与していることが明らかとなってきている。しかし、メラノーマにおける HSF1 の役割は十分に解明されていない。

### 2. 研究の目的

厚生労働省の人口動態統計によれば、メラノーマによる死亡患者数は、この 30 年間で約 5 倍に増加している。日本でのメラノーマ患者は人口 10 万人あたり約 2 人 (年間発症 1,500~2000 例) と考えられているが、今後高齢化が進めば、さらにメラノーマ患者が増加するであろうことが予測される。メラノーマは、一度転移を生じると、抗がん剤、放射線治療に抵抗性であり、転移性メラノーマにおける標準的治療法も確率されていない。メラノーマの増殖、浸潤、転移の機序を解明し、新たな治療法を開発することは急務である。これまでにわれわれは、ヒトメラノーマ細胞の生存、増殖には HSF1 が必要であり、HSF1 をノックダウンしたヒトメラノーマ細胞では、温熱処置に対する抵抗性が減弱することを明らかにしてきた。また、最近の研究により HSF1 はメラノーマの浸潤誘発に必要な因子の 1 つであると報告されているが、HSF1 がメラノーマの腫瘍的性質、すなわち増殖能、浸潤能および転移能に関わっているか、その生物学的機能は十分には解析されていないため、研究を行った。

### 3. 研究の方法

HSF1 をノックダウンさせるために、2 つの特異的 19 ヌクレオチドのシーケンスを決定し、HSF1 に対する short hairpin RNA

(shRNA) 発現アデノウイルス (HSF1-1、HSF1-2 shRNA) とコントロールである scramble shRNA を作成した。ヒトメラノーマ細胞に shRNA 発現アデノウイルスを感染させ、HSF1 をノックダウンした。HSF1 が十分にノックダウンできたことを、Western blot 法、RT-PCR 法を行い、確認した。HSF1 をノックダウンしたヒトメラノーマ細胞では、Wound-healing assay、Migration assay および Invasion assay (BD Mtrigel Invasion Chamber, BD Biosciences) において、コントロールと比較して、遊走能、浸潤能の低下が認められた。また、HSF1 をノックダウンした後に、HSF1 を再発現させると遊走能、浸潤能は回復した。以上の結果より、メラノーマ細胞の遊走能、浸潤能に HSF1 が重要な役割を演じていることが明らかとなった。*in vitro* の結果を確認するために、ヌードマウス (BALB/cSlc-nu/nu, homo) を用いた、*in vivo* での腫瘍細胞移植実験を行った。HSF1 をノックダウンしたヒトメラノーマ細胞を 5 週齢の雄のヌードマウスの側腹部に  $1 \times 10^7$  個皮下注射したところ、移植後 28 日目において、コントロール群と比較して、腫瘍形成が抑制されるだけでなく、腹腔内への浸潤、肺への転移も抑制された。HSF1 を再発現させたヒトメラノーマ細胞を移植したヌードマウスでは、腫瘍形成能、腹腔内への浸潤能、肺への転移能とともに、ノックダウン群と比較して、回復することを確認した。以上の結果より、ヌードマウスを用いた、*in vivo* での腫瘍細胞移植実験においても、HSF1 がメラノーマ細胞の腫瘍形成能、浸潤能、転移能の維持に必要であることが明らかとなった。

### 4. 研究成果

ヒトメラノーマ細胞において HSF1 は増殖能、遊走能および浸潤能の維持に関与しており、HSF1 を制御することはメラノーマ治療の有望な標的の 1 つになり得ることを発見し、論文として報告した (文献)。HSF1 は、正常な細胞の増加には必要ないが、がん細胞の増殖に特異的に作用する点の特徴である。もし、がん細胞だけで HSF1 量を抑制、あるいは活性を阻害することができれば、がん細胞特異的に増殖を抑制することができる可能性がある。HSF1 の発現量およびその活性は、正常細胞よりも、がん細胞で高いことが分かっており、この特性をうまく利用することができれば、副作用の少ない治療法が開発できると考えている。

今後はこの研究成果を踏まえ、HSF1 に着目した新たなメラノーマ治療法開発のための基礎的研究を行っていく予定である。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Nakamura Y, Nakamura A, Muto M.

A case of pleomorphic fibroma of the skin presenting as intradermal nodule.

Am J Dermatopathol. 2015;37:175-176. 査読有

Nakamura Y, Kashiwagi K, Nakamura A, Muto M.

Verrucous carcinoma of the foot diagnosed using p53 and Ki-67 immunostaining in a patient with diabetic neuropathy.

Am J Dermatopathol. 2015;37:257-259. 査読有

Nakamura Y, Fujimoto M, Fukushima S, Nakamura A, Hayashida N, Takii R, Takaki E, Nakai A, Muto M.

Heat shock factor 1 is required for migration and invasion of human melanoma *in vitro* and *in vivo*

Cancer Lett. 2014;354:329-335. 査読有

Nakamura Y, Takahata H, Teye K, Ishii N, Hashimoto T, Muto M.

A case of pemphigus herpetiformis-like atypical pemphigus with IgG anti-desmocollin 3 antibodies.

Br J Dermatol. 2014;171:1588-1590. 査読有

Nakamura Y, Kashiwagi K, Nakamura A, Muto M.

Cutaneous metastases of prostatic small cell neuroendocrine carcinoma.

Eur J Dermatol. 2014;24:620-622. 査読有

Nakamura Y, Yamaguchi M, Nakamura A, Muto M.

Tender, red nodules and arthralgia in a young female patient with mastitis.

Clin Exp Dermatol. 2014;39:410-412. 査読有

Nakamura Y, Yamaguchi M, Nakamura A, Muto M.

Calcipotriol and adapalene therapy for disseminated superficial actinic prokeratosis.

Indian J Dermatol Venereol Leprol; 2014;80:373-374. 査読有

Nakamura Y, Nakamura A, Muto M.

Solitary spindle cell xanthogranuloma mimicking a Spitz nevus.

Am J Dermatopathol. 2013;35:865-867. 査読有

Nakamura Y, Muto M.

Spiny keratoderma of the palms in an insulin-treated diabetic patient.

Int J Dermatol. 2013;52:1460-1461. 査読有

Nakamura Y, Wakamatsu K, Muto M.

Drug-Induced Hypersensitivity Syndrome Induced by Clindamycin.

Acta Derm Venereol. 2013;93:83-84. 査読有

Nakamura Y, Muto M.

Subepidermal calcified nodule of the knee with transepidermal elimination of calcium.

J Dermatol. 2012;39:965-966. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

Nakamura Y, Fukushima S, Nakamura A, Muto M.

Heat shock factor 1 is required for migration and invasion of human melanoma *in vitro* and *in vivo*.

The 39<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2014 年 12 月 12 日、ホテル阪急エキスポパーク(大阪府・吹田市)

中村好貴、藤本充章、福島園子、中村有希子、中井彰、武藤正彦。

熱ショック因子(HSF1)は *in vitro*、*in vivo* においてヒトメラノーマ細胞の遊走能、浸潤能の維持に必要である。

第 9 回臨床ストレス応答学会、2014 年 11 月 1 日、岡山大学(岡山県・岡山市)

中村好貴、武藤正彦。  
熱ショック因子 HSF1 によるメラノーマの制御。

第 65 回日本皮膚科学会西部支部学術大会、2013 年 11 月 9 日、かごしま県民交流センター(鹿児島県・鹿児島市)

中村好貴、武藤正彦。  
熱ショック因子によるメラノーマの制御。  
日本ハイパーサーミア学会第 30 回大会(招待講演) 2013 年 8 月 30 日、横浜シンポジア(神奈川県・横浜市)

中村好貴、福島園子、中村有希子、武藤正彦。

熱ショック因子 HSF1 によるメラノーマの  
制御。  
第9回加齢皮膚医学研究会、2013年7月6  
日、山口大学医学部霜仁会館（山口県・宇  
部市）

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中村 好貴 (NAKAMURA, Yoshitaka)  
山口大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：00448292

### (2)研究分担者

武藤 正彦 (MUTO, Masahiko)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：40175625

### (3)連携研究者

中井 彰 (NAKAI, Akira)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：60252516