

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791171

研究課題名(和文)悪性黒色腫に対する微小管阻害薬耐性機構の解明

研究課題名(英文)Resistance mechanisms for anti-tubulin agents in malignant melanomas

研究代表者

赤坂 季代美 (Akasaka, K)

岩手医科大学・医学部・研究員

研究者番号：90552753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：悪性黒色腫の微小管阻害薬に対する自然耐性機構としてBCL2/BCLxLの過剰発現がある事を明らかにした。この耐性機構は従来言われていた、tubulinのアイソタイプやBCL2 family蛋白であるMCL1の分解機構の不活化によるものではなく、メラノサイト特異的な転写因子MITFによって誘導される抗アポトーシス作用を有する帰庫である事が明らかとなった。この耐性はBCL2/BCLxLの選択的阻害薬ABT-737で克服可能であり、悪性黒色腫の新規治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have suggested a link between TUBB3 overexpression and paclitaxel resistance through alterations in the properties of the mitotic spindle. We found that paclitaxel treatment induced temporary mitotic arrest in 7 melanoma cell lines irrespective of the TUBB3 level, suggesting that TUBB3 had no significant influence on spindle properties. On the other hand, the amount of BCL2, an anti-apoptotic protein, was well correlated with paclitaxel resistance. Treatment of the paclitaxel-resistant cell lines with ABT-737, an inhibitor of BCL2 and BCLxL, or simultaneous knock-down of BCL2 and BCLxL dramatically increased the cells' sensitivity, while knock-down of MCL1, another member of the BCL2 family, had only a minimal effect. Our results suggest that the paclitaxel sensitivity of melanoma cells is attributable to apoptosis susceptibility rather than a change in spindle properties and that BCL2 and BCLxL play a pivotal role in the former.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫 BCL2 BCLxL 抗微小管薬

1. 研究開始当初の背景

進行期悪性黒色腫の予後は極めて不良で、化学療法、生物化学療法、放射線療法など複数のモダリティが試みられているものの、生命予後は不良である。化学療法の分野でも、アルキル化剤であるダカルバジン単独投与を超える奏功率は得られておらず、多剤併用療法の成績も芳しくない。

我々も微小管阻害薬に着目し、脱重合阻害薬であるタキサン系抗がん剤 (paclitaxel) の効果を悪性黒色腫で試験したが、80%の細胞株は自然耐性を示した。この原因は、悪性黒色腫では paclitaxel の標的分子である微小管 (β -tubulin) のサブタイプが、paclitaxel と結合できない type III β -tubulin (TUBB3) である事に起因している事を報告した (Akasaka K, et al. J Invest Dermatol, 2009)。

しかし、この研究中に paclitaxel 投与で G2 arrest は誘導されるが、apoptosis の誘導されない細胞株が複数存在する事に気づいた。このことは、「悪性黒色腫の微小管阻害剤に対する自然耐性機構には、TUBB3 の過剰発現以外にも別の分子機構が存在する」事を示唆していた。2011年3月、T細胞リンパ腫を用いた解析から微小管阻害剤の耐性機構には、生存促進タンパク質 MCL1 の過剰発現が原因あり、さらにその MCL1 の過剰発現は分解系の F-box protein である FBXW7 の異常が原因となっている事が明らかにされた。 (Wertz IE, et al. Nature. 2011 Mar 3;471:110-4; Inuzuka H, et al. Nature. 2011 Mar 3;471:104-9.)。この事は、微小管阻害剤で G2 arrest が誘導されているにも関わらず、薬剤耐性を示す悪性黒色腫では、FBXW7/MCL1 蛋白の分解機構が破綻している可能性ある。

そこで悪性黒色腫を中心に、FBXW7/MCL1 の発現を検証し、TUBB3 の発現の低い悪性黒色腫細胞株 SK-MEL-28/PM-WK 細胞でも、必ずしも paclitaxel に対する感受性は高くない事をしめした。しかし、これらの細胞株では G2 arrest が生じていた。複数の微小管耐性を示す細胞株で、FBXW7 の発現低下、MCL1 の過剰発現が確認された。また、SK-MEL-28 は FBXW7 は低発現株で MCL1 は高い傾向にあった。一方で、PM-WK では FBXW7 の発現は高いものの、MCL1 の過剰発現も認められた。さらに、FBXW7 は複数の悪性腫瘍で変異 (点突然変異、欠質) が認められることが報告されており、PM-WK で確認された FBXW7 と MCL1 の蛋白発現の乖離は、FBXW7 遺伝子変異に基

づく構造変化に起因している可能性がある。

一方、1/3 の細胞株で見られた FBXW7 発現低下の原因には、エピジェネティックな要因による遺伝子発現抑制の可能性もある。そこで本研究では、悪性黒色腫の微小管阻害薬に対する新たな耐性機構の解明に関する研究を展開することとした。

2. 研究の目的

本研究は、微小管阻害薬に対する悪性黒色腫の自然耐性機構に関する分子背景を解明するために、FBXW7 発現制御による MCL1 の蛋白の動態、ならびに微小管阻害剤感受性変化の解析。FBXW7 の遺伝子変異、ならびに発現に係る epigenetics 変化の解析。ヒト悪性黒色腫切除標本での FBXW7/MCL1 関連タンパク質の発現解析と、予後予測因子としての妥当性の検証の三点を行う事とした。

3. 研究の方法

悪性黒色腫細胞株 (HMV-I, HMV-II, SK-MEL-28, CRL1579, MM-RU, PM-WK, G361) および正常表皮メラニン細胞 (NHEM-M, NHEM-D) を用いた。これらの細胞は以前に使用経験がある陽性コントロールとして、Wertz IE らの用いていた卵巣癌、大腸癌細胞株を合わせて解析した。全ての蛋白に関して mRNA/protein の発現: western blot で発現を確認した。Real-time PCR 法で mRNA の定量も行った。

微小管阻害薬接触時の薬剤感受性、細胞周期、アポトーシス、MCL1 タンパク質の動態解析に関しては、Paclitaxel (脱重合阻害薬) および Vincristine (重合阻害薬) を用いて、G2 arrest の誘導を行い、MCL1 の発現、リン酸化、ユビキチン化状態を western blot および immunoprecipitation 法で評価した。

感受性試験は ATP assay で、細胞周期は flow cytometer でおこなった。apoptosis の解析は Annexin V を指標として評価した。遺伝子の発現抑制は、ABI silencer select により siRNA の発現抑制でおこなった。

遺伝子の変異解析は、基礎データとして次世代シーケンサーによる DNA 異常を解析で用いた細胞株の全ての変異情報の解析がリレイショナルシーケンスと比較されている。エピジェネティクスの解析は、脱メチル化剤、およびトリコスタチン処理による発現変動をウエスタンブロット法で解析した。プロモーター領域のメチル化状態に関しては bisulfite direct sequence あるいは次世代シーケンサーによるメチル

化状態の評価を行った。予後調査が継続されている悪性黒色腫患者のパラフィンブロックで免疫染色を行い標的分子の発現状態を評価した。

4. 研究成果

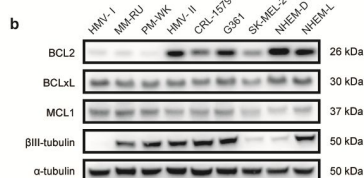
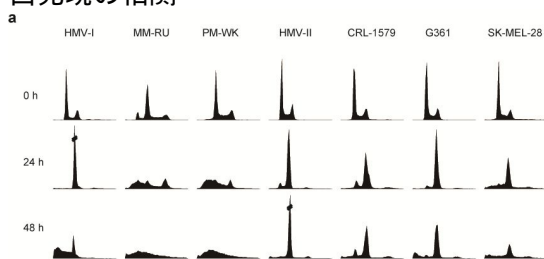
(1) 遺伝子変異および遺伝子のプロモーター領域のメチル化解析

悪性黒色腫細胞株では FBXW7 と MCL1 のコーディングリージョンに変異はなく、両者の発現解離は認められなかった。脱メチル化剤、およびトリコスタチン処理にてもその発現量に変化は認められなかった。

悪性黒色腫の微小管阻害薬に対する新たな耐性機構として、FBXW7/MCL1 系の異常は否定的と考えられた。

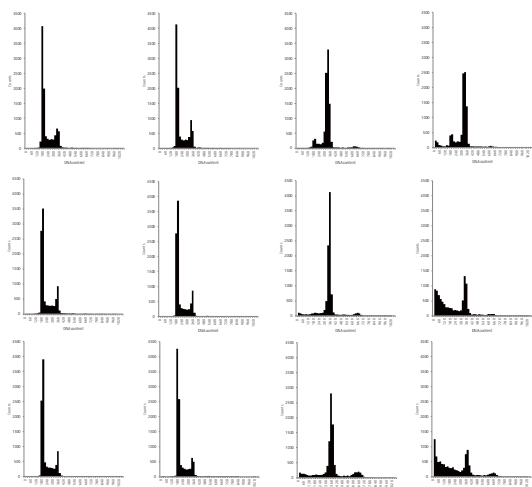
そこで、MCL1 を含めた他の BCL2 family 蛋白質に着目して、新たな研究展開を模索した。

(2) Paclitaxel 感受性と BCL2 family 蛋白発現の相関

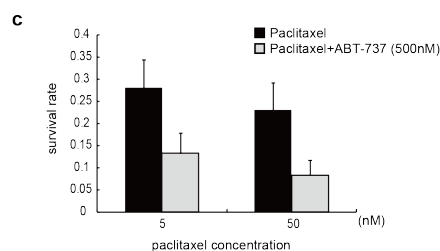
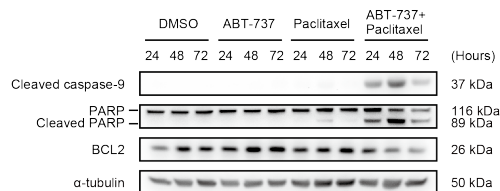


悪性黒色腫の paclitaxel に対する感受性は、BCL2 蛋白の発現と良く相関していた。

そこで、BCL2、BCLxL の選択的阻害薬 ABT-737 あるいは Navitoclax による阻害実験を行った。



耐性株 HMV-II に於いて BCL2/BCLxL の選択的阻害薬 ABT-737/ Navitoclax は単独処理では細胞毒性を示さなかったが、paclitaxel 単独処理で生じていた G2 arrest の状態を乗り越え、combination で強力な apoptosis を誘導した。

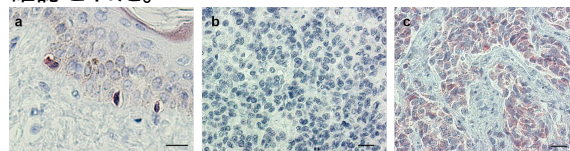


同様の結果が siRNA 処理にても確認された。また、感受性株に BCL2 を過剰発現させた stable clone は耐性を獲得し、siRNA 処理にて耐性を喪失した。

(3) ヒト表皮組織および悪性黒色腫原発巣における BCL2 蛋白の発現

ヒト正常メラノサイトは BCL2 を発現しており、悪性黒色腫においては約半数 (36/70) で BCL2 蛋白の発現が確認された。

以上の結果より、悪性黒色腫の微小管阻害薬に対する耐性機構には BCL2 蛋白の発現が確認された。



以上より、悪性黒色腫における微小管阻害薬の耐性機構には BCL2 蛋白の過剰発現が関与しておりその耐性は選択的阻害薬で回避する事が可能であった。

悪性黒色腫の新規治療法として、微小管阻害薬と BCL2 を標的とした分子標的治療薬 Navitoclax の併用療法は有用な治療法と考えられた。

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4件)

1. Watanabe A, Yasuhira S, Inoue T, Kasai S, Shibazaki M, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. BCL2 and BCLxL are key determinants of resistance to antitubulin chemotherapeutics in melanoma cells. *Exp Dermatol*. 2013 Aug;22(8):518-23. doi:10.1111/exd.12185.
2. Miura S, Maesawa C, Shibazaki M, Yasuhira S, Kasai S, Tsunoda K, Maeda F, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T. Immunohistochemistry for histone h3 lysine 9 methyltransferase and demethylase proteins in human melanomas. *Am J Dermatopathol*. 2014 Mar;36(3):211-6. doi: 10.1097/DAD.0b013e3182964e02.
3. Shibazaki M, Maesawa C, Akasaka K, Kasai S, Yasuhira S, Kanno K, Nakayama I, Sugiyama T, Wakabayashi G, Masuda T, Mori N. Transcriptional and post-transcriptional regulation of III-tubulin protein expression in relation with cell cycle-dependent regulation of tumor cells. *Int J Oncol*. 2012 Mar;40(3):695-702. doi: 10.3892/ijo.2011.1291.
4. Akasaka K, Maesawa C, Takahashi K, Masuda T, Akasaka T. Circumscribed palmar or plantar hypokeratosis: two cases and a review of published work. *J Dermatol*. 2012 Mar;39(3):314-5. doi: 10.1111/j.1346-8138.2011.01259.x.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織
(1) 研究代表者
赤坂 季代美 (岩手医科大学・医学部・研究員)

研究者番号：90552753

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：24791171