

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461689

研究課題名(和文) Notchシグナルがメラノーマで果たす役割の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Notch signaling promotes proliferation and migration of melanoma.

## 研究代表者

木庭 幸子 (KINIWA, Yukiko)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：20436893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：背景と目的：Notchシグナルは、様々な組織における発達と分化に重要である。Notchカスケードは、4つのNotch受容体と、そのリガンドとしてDLL1, 3, 4, Jagged1, 2から成る。Notch1はメラノーマの発癌に関与することが示されている。研究代表者らは、Notchリガンドの中でもDLL3に着目し、メラノーマの進展における重要性を調べた。

結果：DLL3は色素細胞母斑に比べてメラノーマの腫瘍組織において発現が有意に高かった。DLL3をノックダウンすると、培養メラノーマ細胞の細胞増殖と遊走、コロニー形成が抑制された。DLL3がMAPK経路に作用すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Background: Notch signaling is crucial for development and cell differentiation in various tissues. It is also elucidated to be important in tumorigenesis. There are four Notch receptors (Notch1-4) and five ligands [Delta-like (DLL) 1/3/4 and Jagged 1/2] in Notch signaling pathway. Notch1 has been reported to be oncogenic in melanoma. However, little is known about importance of the ligands. In this study, we tried to determine the role of DLL3 in progression of melanoma. Results: DLL3 was preferentially expressed in melanoma rather than melanocytic nevus. HES1 expression was decreased by DLL3-knockdown using specific siRNA, showing that DLL3 contributes to Notch signaling pathway. DLL3-knockdown decreased cell proliferation and migration. DLL3-knockdown led G0/G1 arrest, and suppressed MAPK signaling pathway. DLL3 overexpression increased cell proliferation and migration. These findings provided insight into the role of DLL3 in melanoma progression through MAPK activation.

研究分野：皮膚腫瘍学

キーワード：メラノーマ Notchシグナル DELTA-like 3 MAPK経路

### 1. 研究開始当初の背景

Notch は、細胞表面に存在する受容体であり、Delta(DLL-1, 3, 4)や Jagged(Jag1,2)といったリガンドが結合すると核へ移行して転写因子として働く。Notch を介したシグナルは、造血組織や神経組織の幹細胞の維持に関わっているほか、様々な組織で恒常性の維持に重要である。皮膚においては、Notch は表皮細胞の増殖と分化および接着を制御し、表皮の恒常性維持にとって必須の分子である<sup>1</sup>。また、基底細胞癌や有棘細胞癌など表皮細胞由来の癌において、Notch は腫瘍抑制因子として働いていることが報告されている<sup>2</sup>。

正常メラノサイトにとっての Notch シグナルの役割は、Notch シグナルによって転写が調節されている Hes1 が、メラノblast とメラノサイト幹細胞の維持に必要な分子であることから、メラノサイトの分化を抑制したり、ステムセルネスの維持に働いていると推察される<sup>3</sup>。メラノーマにおいては、Notch シグナルが活性化を示す研究成果が幾つかのグループから報告されている。マイクロアレイを用いてメラノーマの細胞株における分子の変化を網羅的に解析した研究により、Notch シグナルに関わる分子の発現の変化が認められた<sup>4</sup>。さらに、Notch シグナルがメラノーマの維持に重要な MAPK/PI3K-Akt 経路を活性化し、細胞増殖を促進し、腫瘍細胞のストレス細胞死を阻害するという *in vitro* の解析も報告された<sup>5,6</sup>。

### 2. 研究の目的

メラノーマの維持・進展は、複雑なシグナル系による制御されており、メラノーマを攻略するためには複数の分子を抑制することが重要である。Notch は様々な細胞において、その恒常性維持に重要な転写因子であるが、近年、メラノーマにおいて Notch が発がん因

子あるいはがん細胞維持として働いている可能性が示されたことから、メラノーマ治療の新たな標的として注目されるようになった。しかしながら、Notch シグナルは、複数のリガンドによって成立しており、これらリガンドの関与については未だ十分に明らかにされていない。本研究課題は、メラノーマの病態における Notch シグナル、とりわけ Notch リガンドの役割を詳細に検討することによって、メラノーマ新規治療の開発の基盤として役立てることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 【メラノーマにおける DLL3 の発現】

##### (1) mRNA レベルの発現

研究代表者らはヒトメラノーマ細胞株を多数所有しているが、これらの細胞株で Notch のシグナル伝達に関与する分子の発現を定量的 RT-PCR (以下、qPCR) を用いて解析した。その結果、多くのメラノーマ細胞株で Notch リガンドの幾つかが高発現していることを見出した。さらに、手術検体を用いてメラノーマでの Notch のシグナル伝達に関与する分子の発現を解析を行った。比較対照として色素細胞母斑を用いた。

##### (2) タンパク質レベルの発現

メラノーマ患者の手術標本を用いて組織染色を行い、Notch リガンドの発現を調べた。

#### 【メラノーマの増殖における DLL3 の役割】

これまでの予備実験で、DLL-3 および DLL-4 がメラノーマ細胞株で発現していることを確認した。調べた細胞株のなかでは、DLL-3 は 501 mel や Mel 2 などで発現が高く、DLL-4 は 624 mel や SMKT 1 などで発現が高かった。そこで、ヒトメラノーマ細胞における Notch の役割を *in vitro* と *in vivo* の両面で調べるために、Notch リガンドのコン

ストラクトを作製して過剰発現モデルとして解析するために用いた。DLL3 をメラノーマ細胞で過剰発現させるため、リポフェクション法により組み込んだ。また、DLL 高発現株を用いて一過性のノックダウンの系を確立した。DLL3 の mRNA 発現の低下を qPCR 法により確認した後、ノックダウンした細胞を作製した。

上記の過剰発現細胞とノックダウン細胞を用いて、細胞増殖に変化を、WST 8 による cell proliferation assay により検討した。

【DLL3 のメラノーマの遊走能とコロニー形成能への影響】

スクラッチアッセイ法を用いて、DLL3 の過剰発現もしくはノックダウンがメラノーマの遊走能を検討した。また、ソフトアガロースをもちいたコロニー形成試験により、DLL3 の過剰発現もしくはノックダウンがコロニー形成能に影響を及ぼすか解析した。

【メラノーマにおける MAPK 経路の活性化において DLL3 の果たす役割】

メラノーマの増殖においては、MAPK 経路が重要である。そこで、MAPK 経路の活性化との関連を検証するために、DLL3 をノックダウンしたメラノーマ細胞を用いて、ERK のリン酸化をウエスタンブロット法により検討した。

## 1. 研究成果

【メラノーマでは DLL3 の mRNA 発現が高い】  
メラノーマ組織 16 例とメラノサイトの良性腫瘍である色素細胞母斑における DLL3 の発現を調べたところ、メラノーマにおける発現が有意に高かった。(図 1) DLL1 と DLL4 における発現も調べたが、有意な違いは見いだされなかった。

メラノーマの細胞株においても、おおむね DLL3 の発現が確認できた。(図 2)

図 1

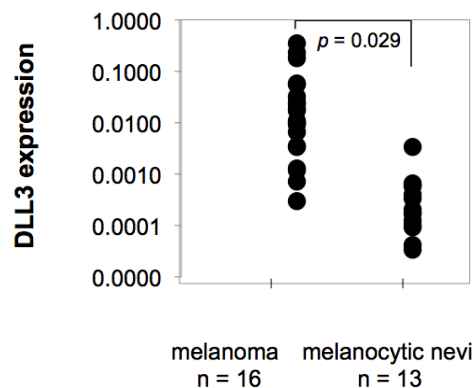
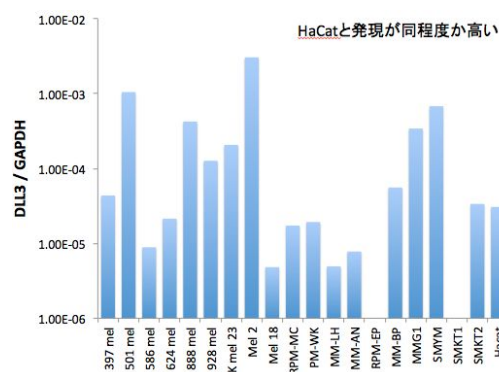


図 2



免疫染色においては、発現の大きな違いは検出できなかった。

【DLL3 を介したシグナルはメラノーマの増殖と遊走を促進する】

DLL3 を過剰発現させたメラノーマ細胞株では、細胞増殖が促進し(図 3 a)、DLL3 をノックダウンした細胞株では細胞増殖が抑制された。(図 3 b)

図 3 a

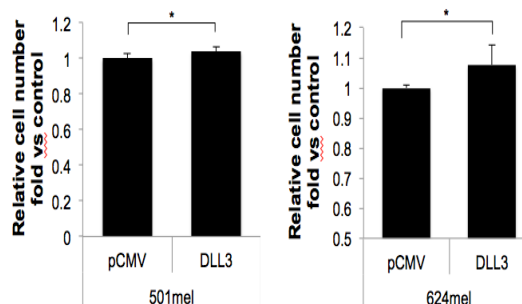
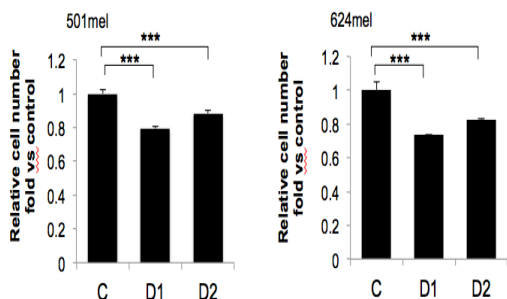
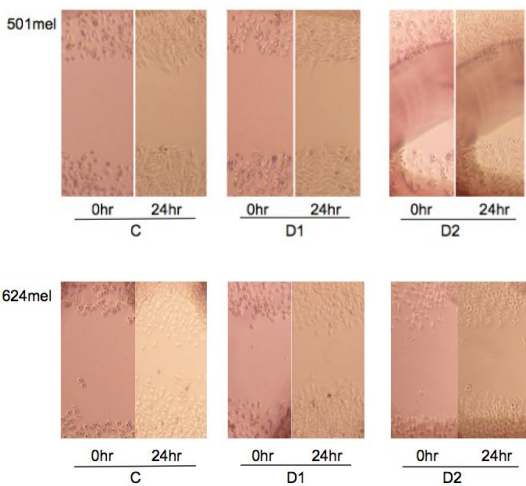
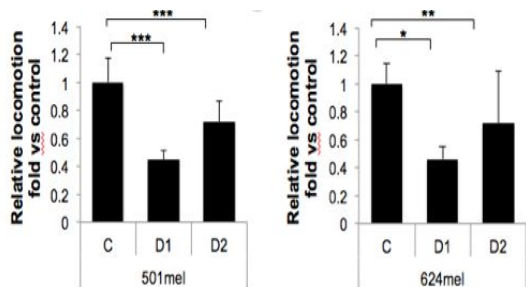


図 3 b



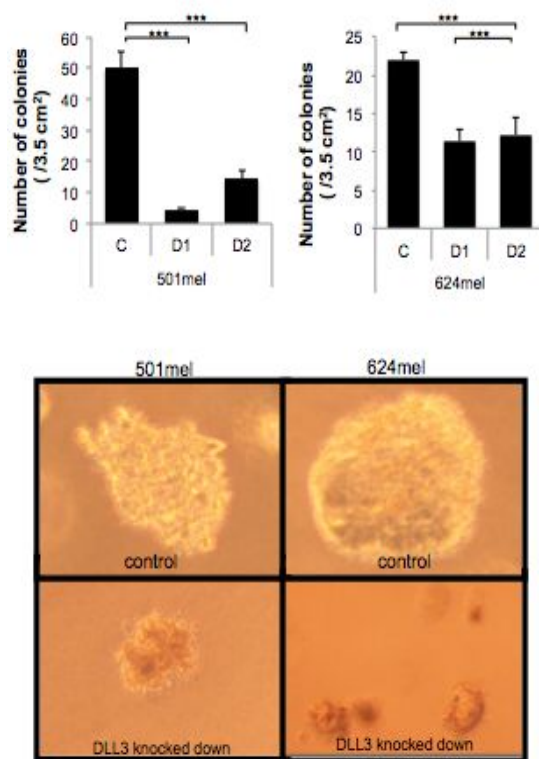
また, DLL3 をノックダウンすると, 遊走能が減弱した。(図 4)

図 4



また, DLL3 をノックダウンしたところ, コロニー形成が抑制された(図 5)ことから, DLL3 は増殖, 遊走, コロニー形成に関わることが示された。

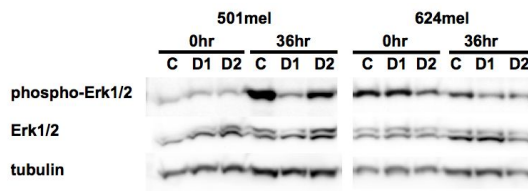
図 5



【DLL3 によるメラノーマの増殖促進は MAPK 経路の活性化によって起こる】

DLL3 をノックダウンしたメラノーマ細胞においては, リン酸化 Erk1/2 がコントロールに比べて低下していた。(図 6)これにより, DLL3 の発現を抑えると, MAPK 経路の活性化が抑制されたことが示された。

図 6



参考文献

- Okuyama R, et al.; J Dermatol Sci, 2008; 49, 187-194.
- Dotto GP.; Oncogene 2008; 27: 5115-23.
- Moriyama M et al.: J Cell Biol, 2006; 173:333-339

4. Hoek K, et al.; Cancer Res, 2004; 64, 5270-82.
5. Bedogni B, et al.; J Clin Invest, 2008; 118,3660-70.
6. Liu ZJ, et.al.; Cancer Res. 2006, 66(8), 4182-90.

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2件)

- (1) 木庭幸子, 奥山隆平: 癌の分子病理学, 皮膚腫瘍・悪性黒色腫. 病理と臨床, (査読なし) 2016: 34; 229-236.
- (2) 木庭幸子, 宇原 久, ; 日本人のメラノーマにおける遺伝子変異の特徴と治療への応用. 日本皮膚科学会雑誌, (査読なし) 2014: 124(13); 2477-80.

〔学会発表〕(計4件)

- (1) 木庭幸子, 小川英作, 熊谷尚美, 内山彩, 奥山隆平 「DELTA-like 3 promotes melanoma proliferation and migration via MAPK activation.」 第40回日本研究皮膚科学会, 2015.12.10-12. 岡山コンベンションセンター (岡山県, 岡山市)
- (2) Yukiko Kuniwa, Eisaku Ogawa, Naomi Kumagai, Aya Uchiyama, Ryuhei Okuyama, DELTA-like 3 promotes melanoma proliferation and migration via MAPK activation. 6th Society for Melanoma Research, 2015.11.18-21. サンフランシスコ (アメリカ)
- (3) 木庭幸子 「メラノーマのゲノム異常と個別化治療への応用」 第53回日本癌治療学会 (招待講演) 2015.10.29-31. 京都国際会議場 (京都府, 京都市)

- (4) Yukiko Kuniwa, Eisaku Ogawa, Naomi Kumagai, Aya Uchiyama, Ryuhei Okuyama, Delta-like 3 promotes proliferation and migration of melanoma cells. European Society for Dermatological Research, 2014.11.18-21. コペンハーゲン (デンマーク)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 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 件)

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

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
木庭 幸子 (KINIWA, Yukiko)  
信州大学・学術研究院医学系 (医学部附属病院)・講師  
研究者番号: 20436893
- (2) 研究分担者  
奥山 隆平 (OKUYAMA, Ryuhei)  
信州大学・学術研究院医学系・教授  
研究者番号: 80292332
- (3) 連携研究者 ( )  
研究者番号: