

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461700

研究課題名(和文) 悪性黒色腫における遺伝子増幅と浸潤転移能の研究

研究課題名(英文) Study of gene amplification and metastasis in melanoma

研究代表者

村上 孝 (Murakami, Takashi)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：00326852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍原性変異による細胞運動能を評価する発光細胞系を構築し、それを利用した化合物スクリーニングからメバロン酸合成経路が悪性黒色腫を含めたがん細胞の細胞運動を制御することを見出した。またヒト悪性黒色腫細胞株のNOD/SCIDマウスへの異種移植モデルにおいて優先的に中枢神経転移をきたす悪性黒色腫細胞株の遺伝子発現増強パターンから腫瘍進展因子の割り出しを行った。悪性黒色腫で発現の高い99遺伝子が絞られ、悪性黒色腫に固有の生物学的特性が転移・浸潤能に影響している遺伝子候補が得られた。これらの候補遺伝子機能が悪性黒色腫の浸潤・転移能亢進と治療抵抗性に関わる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：We developed a luciferase-based luminescent assay system to evaluate cell migration using transformed NIH3T3 cells, and the assay system allowed to screen chemicals to inhibit cell migration. Subsequently, the mevalonate pathway appeared critical for migration in cancerous cells, including melanoma. Furthermore, we examined an amplified gene expression pattern using human melanoma cell lines that xenogeneically metastasized to the brain of NOD/SCID mice. Data suggested that 99 candidate genes were highly expressed in progressed melanoma. Further in silico analysis also suggested that some of candidate genes are associated in the biology of melanoma. Perhaps, the function of these candidate genes may be implicated in melanoma-specific tumor progression and its therapeutic resistance.

研究分野：皮膚腫瘍学

キーワード：がん メラノーマ 遺伝子機能 上皮間葉転換 細胞運動

1. 研究開始当初の背景

BRAF(V600E)と NRAS(Q61K/Q61R) 変異は、RAS/RAF/MEK/ERK シグナル伝達カスケードを恒常的に活性化し、悪性黒色腫(メラノーマ)の代表的な腫瘍原性変異と考えられている。しかし、これらの腫瘍原性変異のみでメラノーマに特徴的な浸潤・転移を説明することは難しい。

これまでに蓄積されたゲノム解析の結果、メラノーマの進展とともに特定の遺伝子増幅が存在することが指摘されている。このような遺伝子増幅領域に位置する遺伝子機能がメラノーマの浸潤・転移能亢進と治療抵抗性に関わる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、メラノーマに特徴的な遺伝子増幅(遺伝子発現)と浸潤・転移能の関係を焦点を絞り、細胞運動・浸潤解析系の構築からメラノーマ悪性化の協調因子の抽出する狙いがある。

また上記の細胞解析系を応用した既存薬物・化合物等のスクリーニング系を構築し、がんの浸潤・転移阻害物質候補の割り出しを試みた。

3. 研究の方法

(1) Luciferase 発光系を用いた細胞運動能の評価

NIH3T3 細胞に v-SRC および H-RAS^{V12G} および v-SRC を発現する組換えレトロウイルス(pBabe)を感染し、puromycin 耐性細胞を作成した。これら感染細胞のがん化形質の獲得は形態・足場非依存的細胞増殖・Nude マウスへの腫瘍形成能によって確認した。その後、これらの細胞に Luciferase(Luc)を発現する組換えレンチウイルスを重複感染し、NIH3T3-v-SRC-Luc および NIH3T3-H-RAS^{V12G}-Luc を作製した。これら細胞を 24-well plate の Boyden chamber(径 8μm)に供し 16 時間後に底面に遊走してきた細胞数を Luc 発光量で定量した。

(2) 上皮間葉転換(EMT)化の評価

NMuMG 細胞に TGF-β1 を添加し 24 時間後に E-cadherin 発現の低下を蛍光抗体法で評価し、併せて vimentin、Snail、Slug 発現量を Western blot 法或いは RT-PCR 法で評価した。

(3) テロメララーゼ(TERT)トランスジェニック・ラットの作製

pCAGGS 発現プラスミドにラット TERT cDNA とともに IRES 配列の下流に EGFP cDNA を挿入した。当該プラスミドを Wistar ラット受精卵にマイクロインジェクションし、それらを偽妊娠ラットに移植し TERT トランスジェニック・ラット個体を得た。

(4) 転移性メラノーマの遺伝子発現解析

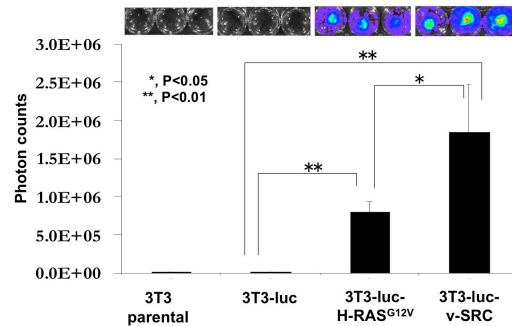
Luc 発現ヒトメラノーマ細胞株を NOD/SCID マ

ウスの左心室に接種し、中枢神経に選択的に転移するメラノーマ細胞を分取した(SK-Mel-28-Br2, MeWo-Br2)。これらの細胞株を転移能の低い SK-Mel-2 細胞および MDA-MB-231 乳がん細胞株を比較対象に用いて、マイクロアレイ法によって転移性メラノーマに遺伝子発現が増強している遺伝子を抽出した。

4. 研究成果

(1) 活性化型がん原性遺伝子の獲得による細胞運動能の評価

NIH3T3 細胞および不死化メラノサイトの細胞運動能(浸潤能)を促進する遺伝子を分離するための細胞スクリーニング系の構築を行なった。結果的にレンチウイルスによる不死化ヒトメラノサイトを用いた安定的な細胞培養系の確立することはできなかったが、NIH3T3 細胞による細胞運動評価系は比較的容易に確立することができた(下図)。

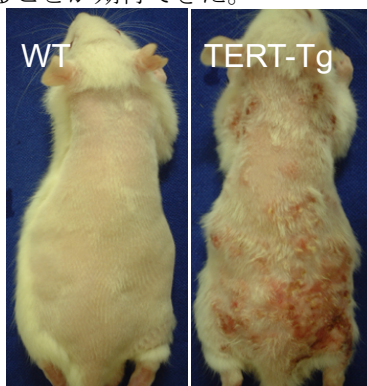


この評価系はがん化刺激によって活性化された細胞運動能を阻害するスクリーニング系として利用することができる。実際、細胞膜の脂質代謝合成系を阻害する HMG-CoA 還元酵素阻害剤はメラノーマの腫瘍原性遺伝子の変異の1つである RAS 経路に対しても細胞運動を抑制することが示された。さらに TGF-β1 による NMuMG 細胞の上皮間葉転換(EMT)は HMG-CoA 還元酵素阻害剤によって阻害することができた。HMG-CoA 還元酵素阻害剤による EMT 化阻害と細胞運動抑制効果はメバロン酸の添加によって回避された。これらの結果はがん原性変異を持たない細胞株にも同様に観察され、メバロン酸合成経路の修飾は広くがん細胞の細胞運動を制御できることが示唆された。

(2) 不死化メラノサイト作製の試み

浸潤・転移能を持つメラノーマの段階的な進展機構を知るために、エピジェネティック修飾が少ないと考えられる動物資源から不死化メラノサイトを用いたモデル作製を試みた。テロメララーゼ(TERT)を安定的に発現するトランスジェニック(Tg)ラットからのメラノサイトについて検討を行った。TERT-Tgメラノサイトはこれまでのヒト初代培養メラノサイトと同等の増殖能を保持していたものの、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入効率はヒト由来よりも劣る結果を示した。併せ

て TERT 活性を評価したところ樹立系統の Tg ラットでは野生型ラットとほぼ同程度であった。尚、当該 Tg ラットは、新生時から皮膚炎を自然発症する性質を持ち (56%)、CD4 および CD8 陽性 T 細胞の双方が増数しており、新たな皮膚炎発症モデル動物 (下図) として利用することが期待できた。



(3) マウス中枢神経転移をきたすヒトメラノーマ細胞の遺伝子発現解析

メラノーマにおいて増幅している遺伝子の分取と導入が難航したため、ヒトメラノーマ細胞株の NOD/SCID マウスへの異種移植モデルにおいて優先的に中枢神経転移をきたすメラノーマ細胞の遺伝子発現増強パターンから進展因子の割り出しを行った (マイクロアレイ解析)。解析対象は SK-MEL-28 および MeWo メラノーマ細胞株を用い、メラノーマに選択的な遺伝子増強がみられる遺伝子を検索した。K-mean cluster 分類からメラノーマで発現の高い 99 遺伝子が絞られた。興味深いことにメラノソーム構造タンパク質 gp100 (Silver/Pmel17) の発現増強が含まれ、これと共役する膜タンパク分子 Gpnmb とその上流転写因子 Maf の発現が増強していた。更に Cancer Cell Line Encyclopedia project : <http://www.broadinstitute.org/ccle/home> との照合から他の組織由来がん細胞との比較においてメラノーマ細胞で Gpnmb の発現が顕著に高い傾向性が示された。Gpnmb 過剰発現は EMT 化と細胞運動を促進すること、更にメラノーマの主要な腫瘍原性変異が、RAS/RAF/MEK/ERK シグナル伝達カスケードを恒常的に活性化し、転写因子 Maf がその標的として活性化されることが示唆されている (Okita Y, et al., *Sci. Signal.* 2017)。これら *in silico* 遺伝子発現の特徴は、メラノーマ固有の生物学的特性が転移・浸潤能とともに治療抵抗性に影響していることが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 15 件)

① Nakatake R, Kaibori M, Tanaka Y, Matsushima H, Okumura T, Murakami T, Ino Y, Todo T, Kon M. A third-generation oncolytic herpes simplex virus inhibits the growth of liver

tumors in mice. *Cancer Sci.* 2018 Mar;109(3):600-

610. DOI: 10.1111/cas.13492. 査読有。

② Kita K, Arai S, Nishiyama A, Taniguchi H, Fukuda K, Wang R, Yamada T, Takeuchi S, Tange S, Tajima A, Nakada M, Yasumoto K, Motoo Y, Murakami T, Yano S. *In vivo* imaging xenograft models for the evaluation of anti-brain-tumor efficacy of targeted drugs. *Cancer Med.* 2017 Dec;6(12):2972-

2983. DOI:10.1002/cam4.1255. 査読有。

③ Nakano T, Kanai Y, Amano Y, Yoshimoto T, Matsubara D, Tamura T, Oguni S, Katashiba S, Ito T, Murakami Y, Fukayama M, Murakami T, Endo S, Niki T. Establishment of Highly Metastatic KRAS Mutant Lung Cancer Cell Sublines in Long-term Three-dimensional Low Attachment Cultures. *PLoS ONE* 2017. Aug 7;12(8): e0181342. DOI: 10.1371/journal.pone.0181342.

eCollection 2017. 査読有。

④ Katsura A, Tamura Y, Hokari S, Harada M, Morikawa M, Sakurai T, Takahashi K, Mizutani A, Nishida J, Yokoyama Y, Morishita Y, Murakami T, Ehata S, Miyazono K, Koinuma D. ZEB1-regulated inflammatory phenotype in breast cancer cells. *Mol Oncol.* 2017, Sep;11(9):1241-

1262. DOI:10.1002/1878-0261.12098. 査読有。

⑤ Kato A, Kataoka H, Yano S, Hayashi K, Hayashi N, Tanaka M, Naitoh I, Ban T, Miyabe K, Kondo H, Yoshida M, Fujita Y, Hori Y, Natsume M, Murakami T, Narumi A, Nomoto A, Naiki-Ito A, Takahashi S, Joh T. Maltotriose conjugation to a chlorin derivative enhances the antitumor effects of photodynamic therapy in peritoneal dissemination of pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther.* 2017 Jun; 16(6): 1124-1132. doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0670. 査読有。

⑥ Saito K, Funayama T, Yokota Y, Murakami T, Kobayashi Y. Histone deacetylase inhibitors sensitize murine B16 melanoma cells to carbon ion irradiation by inducing G1 phase arrest. *Biol Pharm Bull.* 2017; 40(6): 844-851. doi: 10.1248/bpb.b16-01025. 査読有。

⑦ Chittasupho C, Kewsuwan P, Murakami T. CXCR4-targeted nanoparticles reduce cell viability, induce apoptosis and inhibit SDF-1 α induced BT-549-Luc cell migration in vitro. *Curr Drug*

- Deliv.* 2017; 14(8):1060-1070. doi: 10.2174/1567201814666170216130448. 査読有.
- ⑧ Ihara T, Hosokawa Y, Kumazawa K, Ishikawa K, Fujimoto J, Yamamoto M, Murakami T, Goshima N, Ito E, Watanabes S, Semba K. An *in vivo* screening system to identify tumorigenic genes. *Oncogene* 2017, Apr 6;36(14):2023-2029. DOI: 10.1038/onc.2016.351. 査読有.
- ⑨ Kaneno R, Sato A, Hamada S, Yagi T, Ohsawa I, Ohtsuki M, Kobayashi E, Hirabayashi M, Murakami T. Transgenic rat model of childhood-onset dermatitis by overexpressing telomerase reverse transcriptase (TERT). *Transgenic Res.* 2016, Aug; 25(4), 413-424. DOI: 10.1007/s11248-016-9939-3. 査読有.
- ⑩ Nanjo S, Ebi H, Arai S, Takeuchi S, Yamada T, Mochizuki S, Okada Y, Nakada M, Murakami T, Yano S. High efficacy of third generation EGFR inhibitor AZD9291 in a leptomeningeal carcinomatosis model with EGFR-mutant lung cancer cells. *Oncotarget* 2016, Jan 26;7(4):3847-3856. DOI: 10.18632/oncotarget.6758. 査読有.
- ⑪ Masuyama J, Murakami T, Iwamoto S, Fujita S. *Ex vivo* expansion of natural killer cells from human peripheral blood mononuclear cells co-stimulated with anti-CD3 and anti-CD52 monoclonal antibodies. *Cytotherapy.* 2016 Jan;18(1):80-90; DOI: 10.1016/j.jcyt.2015.09.011. 査読有.
- ⑫ Nakatsuka R, Takahashi T, Serada S, Fujimoto M, Ookawara T, Nishida T, Hara H, Nishigaki T, Harada E, Murakami T, Miyazaki Y, Makino T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Kishimoto T, Mori M, Doki Y, Naka T. Gene therapy with SOCS1 for gastric cancer induces G2/M arrest and has an anti-tumor effect on peritoneal carcinomatosis. *Br J Cancer.* 2015; Jul 28 113(3): 433-442. doi:10.1038/bjc.2015.229. 査読有.
- ⑬ Murata M, Narahara S, Kawano T, Hamano N, Piao JS, Kang J-H, Ohuchida K, Murakami T, Hashizume M. Design and function of engineered protein nanocages as a drug delivery system for targeting pancreatic cancer cells via neuropilin-1. *Mol Pharm.* 2015; May 4;12(5):1422-1430. doi:10.1021/mp5007129. 査読有.
- ⑭ Matsui A, Murakami T. CXCL17 (chemokine (C-X-C motif) ligand 17). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2015; 19(2): 97-101. DOI: 10.4267/2042/56293. 査読無.
- ⑮ Morimura S, Sugaya M, Kai H, Miyagaki T, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Murakami T, Sato S. Depsipeptide and roxithromycin inhibit proliferation of lymphoma cells by blocking ERK activation. *J Dermatol.* 2014; 41(1):57-62. doi:10.1111/1346-8138.12351. 査読有.
- [学会発表] (計 20 件)
- ① Mie M, Kunieda K, Koshiba S, Murakami T, Horita S, Fukuda Y, Ishii T, Nakai R, Nakamura K. *In Vitro* and *In Vivo* Characterization of KHK2455, a Highly Potent and Selective Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitor with a Novel Mechanism of Action. Society for Immunotherapy of Cancer (AITC) 2017 Annual Meeting. Gaylord National Hotel & Convention Center. National Harbor, MD, USA. Nov. 8-12, 2017.
- ② 齋藤克代、舟山和夫、横田裕一郎、小林泰彦、村上孝. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による重粒子線感受性の増強は、H2AX のリン酸化の増加に起因しない. 第137回日本薬学会年会 仙台 2017年3月24-27日
- ③ 村上孝、齋藤克代、鳥澤保廣. Pitavastatin Modern Oncology. 第34回メディシナルケミストリーシンポジウム. つくば 2016年11月30-12月1-2日
- ④ Saito K, Murakami T. Radiosensitization by HDACi on heavy-ion irradiation is not related to increasing phosphorylation of H2AX. 第75回日本癌学会学術総会 横浜 2016年10月6-8日.
- ⑤ 飯塚一矢、野口沙斗美、原田恩、齋藤克代、横尾英明、村上孝. マウス TGF- β 2 を介した腫瘍進展と腫瘍休眠の生体内 BLI 評価. 第11回日本分子イメージング学会総会・学術集会 神戸 2016年5月28-29日.
- ⑥ 飯塚一矢、野口沙斗美、原田恩、齋藤克代、横尾英明、村上孝. マウス TGF- β 2 を介した腫瘍進展と腫瘍休眠の調節的役割. 第136回日本薬学会年会 横浜 2016年3月26-29日.
- ⑦ 中野貴史、吉田文、原田恩、齋藤克代、河原田律子、小浜智子、大室弘美、小濱一弘、村上孝. 糖尿病併発がんマウスにおける n-3 系不飽和脂肪酸の宿主免疫系への影響. 第136回日本薬学会年会 横浜 2016年3月26-29日.
- ⑧ 齋藤大智、原田恩、鳥澤保廣、齋藤克代、村上孝. スタチン系薬剤によるマ

- ウスがん細胞の増殖・運動能の抑制. 第136回日本薬学会年会 横浜 2016年3月26-29日
- ⑨ 久保 遼、松崎 準、原田 恩、鳥澤保廣、齋藤克代、村上 孝. スタチン系薬剤は TGF- β 1 を介した上皮間葉転換を抑制する. 第136回日本薬学会年会 横浜 2016年3月26-29日
- ⑩ 齋藤克代、舟山和夫、小林泰彦、村上 孝. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は重粒子線誘発 G2/M 期停止に影響を及ぼす. 第136回日本薬学会年会 横浜 2016年3月26-29日
- ⑪ 佐藤千秋、原田 恩、根本尚夫、鳥澤保廣、齋藤克代、村上 孝. エパルレスタットによるがん細胞の増殖・運動能抑制効果. 第136回日本薬学会年会 横浜 2016年3月26-29日
- ⑫ Saito K, Funayama K, Kobayashi Y, Murakami T. Epigenetic modification potentially sensitizes heavy-ion therapy for malignancy. 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto, Japan. May 25-29, 2015.
- ⑬ Saito K, Funayama K, Kobayashi Y, Murakami T. Histone deacetylase inhibitors potentially sensitize murine B16 melanoma cells for heavy-ion irradiation. 第28回日本放射線腫瘍学会・学術大会 前橋 2015年11月19-21日
- ⑭ Saito K, Murakami T. Role of HDACi as a potential radiosensitizer for heavy-ion therapy on refractory malignancy. 第74回日本癌学会学術総会 名古屋 2015年10月8-10日
- ⑮ 吉田 文、原田 恩、齋藤克代、河原田律子、小浜智子、大室弘美、小濱一弘、村上 孝. *In vivo* 発光イメージングを用いた糖尿病状態におけるマウス 4T1 乳癌細胞の腫瘍進展の特徴. 第10回日本分子イメージング学会総会・学術集会 東京 2015年5月20-21日
- ⑯ 野口斗沙美、原田 恩、齋藤克代、横尾英明、村上 孝. マウス 4T1 乳癌細胞における腫瘍進展と腫瘍休眠に対する *in vivo* 発光イメージング. 第10回日本分子イメージング学会総会・学術集会 東京 2015年5月20-21日
- ⑰ 野口斗沙美、梶田昌裕、原田 恩、齋藤克代、村上 孝. 過剰な上皮間葉転換刺激はマウス 4T1 乳がんの腫瘍休眠を誘導する. 第135回日本薬学会年会 神戸 2015年3月25-28日
- ⑱ 齋藤克代、舟山和夫、小林泰彦、村上 孝. エピジェネティック修飾を介した難治性がんに対する重粒子線感受性の増強. 第135回日本薬学会年会 神戸 2015年3月25-28日

- ⑲ Noguchi S, Kajita M, Murakami T. Excessive stimulation of epithelial-mesenchymal transition induces tumor dormancy in murine 4T1 breast cancer cells. 第73回日本癌学会学術総会 横浜 2014年9月25-27日.
- ⑳ Kajita M, Murakami T, Hayashi M. Dynamic analysis of circulating tumor genome (CTG) and circulating tumor cells (CTCs) in an animal model. 第73回日本癌学会学術総会 横浜 2014年9月25-27日 (一般演題)

[図書] (計2件)

- ① Murakami T, Kobayashi E. Immunomodulation Therapy by the Control of Immune Cell Trafficking. In "Current Immunosuppressive Therapy in Organ Transplantation". Edited by Chen H & Qian S. Nova Science Publishers, Inc. New York. 2015. Chapter 10: pp255-274.
- ② 村上 孝. 生物発光モデル動物作製によるがん生物学研究 (27章). 浦野泰照編集「がんの分子イメージング」. 化学同人. 京都. 2015年9月. pp245-252.

[その他]

ホームページ等

<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/biseibutsu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 孝 (MURAKAMI, Takashi)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：00326852

(2) 研究分担者

齋藤 克代 (SAITO, Katsuyo)
高崎健康福祉大学・薬学部・助手
研究者番号：90455288

(3) 連携研究者

佐藤 篤子 (SATO, Atsuko)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：50382916

(4) 研究協力者

堀内 大 (HORIUCHI, Yutaka)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：30608906