

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26670525

研究課題名(和文)メラノーマの発症・進展を劇的に抑制できる革新的分子標的療法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel molecular target therapy that can suppress melanoma progression

研究代表者

加藤 昌志(Masashi, Kato)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10281073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：代表者らが樹立したRET-トランスジェニックマウス(RET-マウス)は、皮膚メラノサイト系良性腫瘍を100%発症し、高率(約65%)にBRAF変異の無いメラノーマを発症する。本研究では、RET-マウスに発症した良性腫瘍とメラノーマを用いてマイクロアレイ解析を施行し、良性腫瘍の悪性転化の際に発現が変化する分子を選別した。次に、上記分子を対象とした機能解析により、これらの分子が足場非依存性増殖や浸潤・転移に関与していることを示した。以上のように、メラノーマのバイオマーカーとして有効な分子を提案しただけでなく、メラノーマの増殖・浸潤・転移を抑制する分子標的療法を開発するための基礎データを提供した。

研究成果の概要(英文)：We previously developed RET-transgenic mice (RET-mice), in which development of hyperpigmented skin and benign melanocytic tumors at about 100% and development of melanoma at about 65%. In this study, we first selected molecules after performing microarray analysis using benign tumor and melanoma developed in RET-mouse. We then performed functional analysis for these three molecules. The molecules are involved in the regulation for anchorage-independent growth, invasion and metastasis. Thus, we have not only proposed plural candidate molecules that are available as a biomarker of melanoma but also provided basic data for developing a molecular target therapy that suppress melanoma proliferation, infiltration and metastasis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：メラノーマ バイオマーカー 分子標的療法 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

メラノーマは皮膚科疾患において最も予後不良な疾患の1つである。近年、BRAF 変異を持つ転移性メラノーマに対する分子標的療法の劇的効果が示され、治療後の再発はあるものの、メラノーマ治療に光明が見出されつつある。一方、日本人のメラノーマの75%は、BRAF 変異認めない。ゆえに、日本では、BRAF 変異の無いメラノーマの浸潤・転移を制御することが、有効な治療法を開発するために必要不可欠となる。

代表者らが樹立した RET-トランスジェニックマウス (RET-マウス) は、皮膚メラノサイト系良性腫瘍を100%発症し、高率 (約65%) に BRAF 変異の無いメラノーマを発症する。本研究では、RET-マウスに発症した良性腫瘍とメラノーマを用いてマイクロアレイ解析を施行し、良性腫瘍の悪性転化の際に発現が変化する分子のうち、過去に癌との関連性の報告のほとんどない分子に着目して分子機能を調べ、メラノーマの発症・進展 (増殖・浸潤・転移) を劇的に抑制する効果のある分子標的療法およびメラノーマの新規バイオマーカーを開発する研究を推進した。

2. 研究の目的

日本人に多い BRAF 変異の無いメラノーマに対する有効な治療法は限られている。本研究では、動物モデルおよびヒトにおけるメラノーマを対象とし、BRAF 変異の有無に関係なく、メラノーマの発症・進展 (増殖・浸潤・転移) を劇的に抑制する分子標的療法やバイオマーカーを開発するだけでなく、臨床応用のための基礎データを提供できる。

3. 研究の方法

(1). 発癌制御分子の候補：現在までに癌との直接的関連がほとんど報告されていない分子に着目し、良性腫瘍の悪性転化の際に発現が亢進する分子群を選別する。尚、本研究の第1弾として、Espin・Deltex-3-like (DTX3L)・LSF 等を選別している。

・マイクロアレイを用いた分子選別：本研究では、RET-マウスを用いたマイクロアレイ解析の結果を用い、良性腫瘍が悪性転化する際に発現が3倍以上亢進する分子を選別する。

・悪性転化による分子発現レベル：選別された候補分子の発現がRET-マウスに発症したメラノーマでは、良性腫瘍に比べ3倍以上高いことを定量PCRやウエスタンブロット等で確認する。

(2). 試験管レベルにおける形態学的解析：細胞の形態：候補分子をaノックダウンした安定株・b過剰発現した安定株を用い、ラメディポディア等のメラノーマ細胞の形態的变化に候補分子が与える影響を調べる。

・発現の局在：マウスとヒト正常メラノサイト・メラノーマにおける候補分子の局在を免疫細胞染色法にて、ラメディポディアにおける発現にも着目しながら解析する。

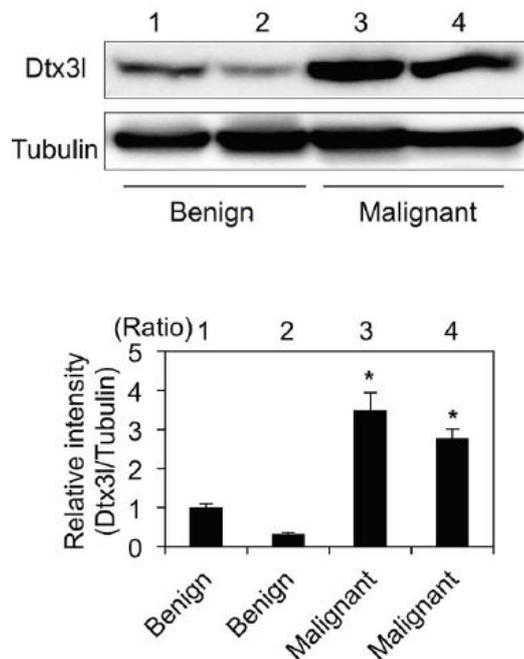
(3). 試験管レベルにおける発癌機構解析：細胞増殖：候補分子をaノックダウンした安定株・b過剰発現した安定株を用い、メラノーマ細胞の足場依存性増殖・非依存性増殖に候補分子が与える影響を調べる。細胞浸潤：候補分子をaノックダウンした安定株・b過剰発現した安定株を用い、メラノーマ細胞浸潤能に候補分子の発現が与える影響を調べる。

(4). ヒトでの解析：市販の Tissue Array や病理検体等を用い、候補分子の発現が、他のメラノサイト系組織に比較してメラノーマ組織で変化 (増加又は減少) していることをヒトで証明する。

4. 研究成果

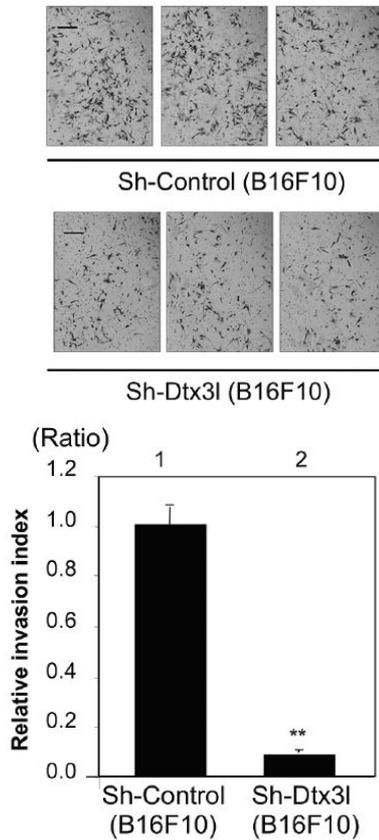
RET-マウスに自然発症した良性メラノサイト系腫瘍とメラノーマにおける DTX3L 分子の発現レベルを比較し、メラノーマでの高発現を確認した (図1)。

図1



次に、マウスのメラノーマ細胞においても、ヒトメラノーマ細胞 (図2) においても、siRNA を用いて DTX3L 分子の発現レベルを低減することにより、細胞浸潤能は顕著に低減した。以上の成果は、DTX3L 分子がメラノーマの転移を制御する新規分子である可能性を示している。

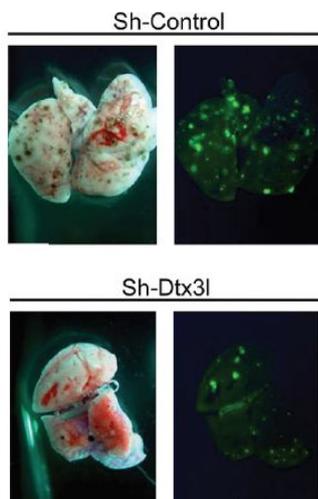
図 2



さらに、DTX3L 分子に関連するシグナル伝達分子を調べた。DTX3L 分子発現の低減したマウスメラノーマ細胞およびヒトメラノーマ細胞では FAK/PI3K/AKT の活性が低減したが、MEK/ERK の活性には影響を与えなかった。

最後に、DTX3L 分子の発現を低減したマウスメラノーマ細胞を、マウス尾静脈から移植し、DTX3L 分子の肺転移への影響を生体で調べた。図 3 に示すように、DTX3L 分子の発現が低減されたメラノーマ細胞では、低減されていないメラノーマ細胞に比較して著明に肺転移が抑制された。

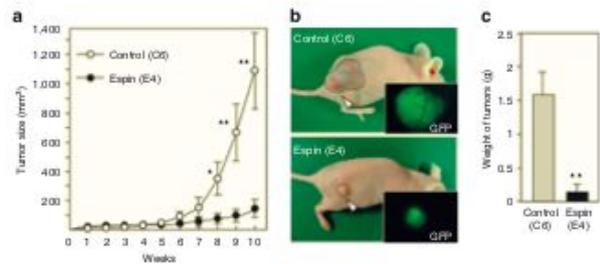
図 3



以上の成果は、DTX3L は、メラノーマ細胞の浸潤・転移を制御できる標的分子となりえる可能性を示している。

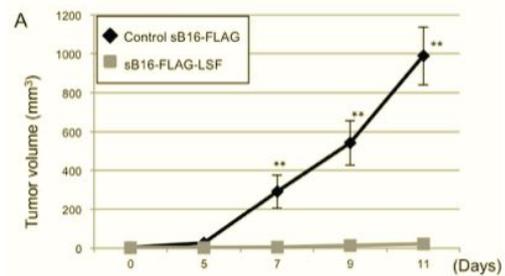
DTX3L 分子と同様に、Espin 分子も、RET-マウスに自然発症したメラノーマおよびヒトメラノーマで発現が亢進していることをみつけた。さらに、図 4 に示すように、Espin 分子の発現を低減させたメラノーマ細胞の非足場依存性増殖は、有意に抑制された。以上の成果は、Espin がメラノーマ増殖を抑制可能な標的分子になりえる可能性を示している。

図 4



一方、DTX3L 分子とは逆に、LSF 分子の発現レベルは、RET-マウスに自然発症したメラノーマおよびヒトメラノーマで低減していることをみつけた。さらに、LSF 分子は、細胞増殖を抑制する p27 分子の発現を亢進させる転写因子としての機能を持つことを発見した。図 5 に示すように、LSF 分子を高発現させたメラノーマ細胞をヌードマウスの皮下に移植すると、増殖は有意に抑制された。以上の成果は、LSF 分子の発現を増加させることにより、メラノーマ増殖を抑制できる可能性を示している。

図 5



以上のように、本研究では、RET-マウスに自然発症した良性メラノサイト系腫瘍とメラノーマを用いて、メラノーマの分子標的療法に有効である可能性のある複数の分子を選別することに成功した。

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 26 件)

全て査読あり

01. Yajima I, Kumasaka MY, Iida M, Osino R, Tanihata H, Al Hossain A MM, Ohgami N, Kato M. Arsenic-mediated hyperpigmented skin via NF-kappa B/Endothelin1 signaling in an originally developed hairless mouse model. **Arch Toxicol** 91(11): 3507-16 2017.
02. Bod L, Lengagne R, Wrobel L, Ramspott JP, Kato M, Avril M-F, Castellano F, Molinier-Frenkel V, Prévost-Blondel A. IL4-induced gene 1 promotes tumor growth by shaping the immune microenvironment in melanoma. **OncoImmunology** 6(3):e1278331, 2017.
03. Omata Y, Iida M, Yajima I, Ohgami N, Maeda M, Ninomiya H, Oshino R, Tsuzuki T, Hori M, Kato M. Modulated expression levels of tyrosine kinases in spontaneously developed melanoma by single irradiation of non-thermal atmospheric pressure plasmas. **Int J Clin Exp Pathol** 9(2):1061-1067, 2016.
04. Wrobel LJ, Bod L, Lengagne R, Kato M, Prévost-Blondel A, Gal1 FL. Propranolol induces a favourable shift of anti-tumor immunity in a murine spontaneous model of melanoma. **Oncotarget** 7(47):77825-77837, 2016.
05. He J, Nan Wang N, Tsurui H, Kato M, Iida M, Kobayashi T. Noninvasive, label-free, three-dimensional imaging of melanoma with confocal photothermal microscopy: Differentiate malignant melanoma from benign tumor tissue. **Sci Rep** 6:30209, 2016.
06. Douguet L, Bod L, Cherfils-Vicini J, Lengagne R, Labarthe L, Gilson E, Kato M, Avril M-F, Prévost-Blondel A. Nitric oxide synthase 2 is involved in the pro-tumorigenic potential of $\gamma\delta$ 17 T cells in melanoma. **OncoImmunology** 5(8):e1208878, 2016.
07. Kato M, Ninomiya H, Maeda M, Ilmiawati C, Al Hossain MMA, Yoshinaga M, Ohgami N. Reply to the Commentary “To Gorelenkova Miller and Mieyal (2015): Sulfhydryl-mediated redox signaling in inflammation: role in neurodegenerative diseases” by Mieyal JJ. **Arch Toxicol**, 90: 1523-4, 2016.
08. Kato M, Ninomiya H, Maeda M, Tanaka N, Ilmiawati C, Yoshinaga M. Commentary to Gorelenkova Miller and Mieyal (2015): Sulfhydryl-mediated redox signaling in inflammation: role in neurodegenerative diseases. **Arch Toxicol** 90(4):1017-8, 2016.
09. Goto Y, Yajima I, Kumasaka M, Ohgami N, Tanaka A, Tsuzuki Toyonori, Inoue Y, Fukushima S, Ihn H, Kyoya M, Ohashi H, Kawakami T, Bennett DC and Kato M. Transcription factor LSF (TFCP2) inhibits melanoma growth. **Oncotarget** 7(3):2379-90, 2016.
10. Dabbeche-Bouricha E, Araujo L, Kato M, Prévost-Blondel A, and Garchon H-J. Rapid dissemination of RET-transgene driven melanoma in the presence of Non-Obese Diabetic alleles: critical roles of Dectin-1 and Nitric-Oxide Synthase type 2. **OncoImmunology** 5(5):e1100793, 2015.
11. Pin YK, Khoo K, Tham M, Karwai T, Hwee TC, Puaux A-L, Phua MLC, Kato M, Veronique A, Abastado JP. Lymphadenectomy promotes tumor growth and cancer cell dissemination in the spontaneous RET mouse model of human uveal melanoma. **Oncotarget** 6(42):44806-18, 2015.
12. Iida M, Omata Y, Nakano C, Yajima I, Tsuzuki T, Ishikawa K, Hori M, Kato M. Decreased expression levels of cell cycle regulators and matrix metalloproteinases in melanoma from RET-transgenic mice by single irradiation of non-equilibrium atmospheric pressure plasmas. **Int J Clin Exp Pathol** 8(8):9326-31, 2015.
13. Thang ND, Yajima I, Kumasaka M, Iida M, Suzuki T, Kato M. Deltex-3-like (DTX3L) stimulates metastasis of melanoma through FAK/PI3K/AKT but not MEK/ERK pathway. **Oncotarget** 6(16):14290-9, 2015.
14. Kumasaka YM, Yajima I, Iida M, Takahashi H, Inoue Y, Fukushima S, Ihn H, Takeda K, Naito Y, Yoshikawa T, Kato M. Correlated expression levels of Endothelin receptor B and Plexin C1 in melanoma. **Am J Cancer Res** 15;5(3):1117-23, 2015.
15. Tham M, Khoo K, Yeo KP, Kato M, Prévost-Blondel A, Angeli V, Abastado JP. Macrophage depletion reduces postsurgical tumor recurrence and metastatic growth in a spontaneous murine model of melanoma. **Oncotarget** 6(26):22857-68, 2015.
16. Thang ND, Kumasaka YM, Nghia PT, Yajima I, Kato M. Treatment of vemurafenib-resistant SKMEL-28 melanoma cells with paclitaxel. **Asian Pac J Cancer Prev** 16(2):699-705, 2015.
17. Yajima I, Kumasaka MY, Ohnuma S, Ohgami N, Naito H, Shekhar HU, Omata Y, Kato M. Ar-

senic-mediated promotion of anchorage-independent growth through increased level of placental growth factor. **J Invest Dermatol** 135(4):1147-56, 2015.

18. Tan KW, Evrard M, Tham M, Hong M, Huang C, **Kato M**, Prevost-Blondel A, Donnadieu E, Ng LG, Abastado J-P. Tumor stroma and chemokines control T cell migration into melanoma following Temozolomide treatment. **Oncol Immunology** 4(2):e978709, 2015.

19. Tham M, Tan KW, Keeble J, Wang X, Hubert S, Barron L, Tan NS, **Kato M**, Prevost-Blondel A, Angeli V, Abastado J-P. Melanoma-Initiating Cells Exploit M2 Macrophage TGF. **Oncotarget** 5(23):12027-42, 2014.

20. **Takeda K**, Kawamoto Y, Iida M, Omata Y, Zou C, **Kato M**. Commentary to Pastore et al (2014): Epidermal growth factor receptor signaling in keratinocyte biology: implications for skin toxicity of tyrosine kinase inhibitors. **Arch Toxicol** 88:2319-20, 2014.

21. Omata Y, Iida M, **Yajima I**, Takeda K, Ohgami N, Masaru Hori H, **Kato M**. Non-thermal atmospheric pressure plasmas as a novel candidate for preventive therapy of melanoma. **Environ Health Prev Med** 19:367-9, 2014

22. Yanagishita T, **Yajima I**, Kumasaka M, Iida M, Xiang L, Tamada Y, Matsumoto Y, Watanabe D, **Kato M**. An actin-binding protein Espin is a novel growth regulator for melanoma. **J Invest Dermatol** 134(12):2996-9, 2014.

23. Végran F, Berger H, Boidot R, Mignot G, Bruchard M, Dosset M, Chalmin F, Rébé C, Dérangère V, Ryffel B, **Kato M**, Prévost-Blondel A, Ghiringhelli F and Apetoh L. The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anti-cancer functions of TH9 cells. **Nature Immunology**, 15(8):758-66, 2014.

24. **Yajima I**, Iida M, Kumasaka MY, Ohgami N, Chang J, Ichihara S, Hori M, **Kato M**. Non-equilibrium atmospheric pressure plasmas modulate cell cycle-related gene expression levels in melanocytic tumors of RET-transgenic mice. **Exp Dermatol**, 23(6):424-5, 2014.

25. Thang ND, **Yajima I**, Kumasaka M, **Kato M**. Bidirectional functions of arsenic as a carcinogen and an anticancer agent in human squamous cell carcinoma. **PLoS ONE**, 9(5):e96945, 2014.

26. Iida M, Yajima I, Ohgami N, Tamura H, **Takeda K**, Ichihara S, Hori M, **Kato M**. Effects of non-thermal atmospheric pressure plasma irradiation on expression levels of matrix metalloproteinases in benign melanocytic tumors in RET-transgenic mice.

Eur J Dermatol, 24(3): 392-4, 2014.

〔学会発表〕(計5件)

1. 学会名: The 2nd International Workshop on Plasma for Cancer Treatment

日時: March 16-17, 2015

場所: Nagoya University, Nagoya, Japan

Symposium (oral presentation: 30 min on March 16, 2014)

発表者: **Masashi KATO**, Machiko IIDA, **Ichiro YAJIMA**, Yasuhiro OMATA,

Kenji ISHIKAWA, Masaru HORI

課題名: Application of plasma irradiation to skin tumor spontaneously developed in RET-transgenic mice

2. 学会名: The 2nd International Workshop on Plasma for Cancer Treatment

日時: March 16-17, 2015

場所: Nagoya University, Nagoya, Japan (Poster presentation)

発表者: Machiko IIDA, **Ichiro YAJIMA**, Yasuhiro OMATA, Xiang LI, Cunchao ZOU, Chihiro NAKANO, Kenji ISHIKAWA, Masaru HORI, **Masashi KATO**

課題名: NON-EQUILIBRIUM ATOMOSPHERIC PRESSURE PLASMA MODULATES TRANSFORMATION-MEDIATED GENE EXPRESSION LEVELS IN MELANOCYTIC TUMORES *IN VIVO*

3. 学会名: 6th International Conference on Plasma Medicine (ICPM-6)

日時: September 4-9, 2016

場所: Bratislava, Slovakia (Oral presentation)

発表者: K Ishikawa, N Kurake, H Tanaka, H Hashizume, **K Takeda**, K Nanamura, H Kajiyama, H Kondo, M Sekine, **M Kato**, M Mizuno, F Kikkawa, M Hori.

Title: Metabolic profiles on glioblastoma (U251SP) modified in plasma-activated medium (PAM) cultivation.

4. 学会名: 6th International Conference on Plasma Medicine (ICPM-6)

Date: September 4-9, 2016

日時: Bratislava, Slovakia (Poster presentation)

発表者: M Iida, Y Omata, I Yajima, Y Kato, M Yoshinaga, M Hori, **M Kato**.

課題名: Effect of non-equilibrium atmospheric pressure plasmas irradiation on spontaneously developed melanoma in RET-mice.

5. 第84回 日本衛生学会学術総会

発表年月日: 平成26年5月25-27日

場所: 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市北区駅元町14-1 フォーラムシティビル)

発表様式: 一般演題(ポスター)

発表者: 飯田真智子、矢嶋伊知朗、熊坂真由子、神保佳奈、田村青鳥、大神信孝、加藤昌志

課題名: モデル動物を用いたメラノーマ予防・治療法の開発

〔図書〕(計1件)

矢嶋伊知朗、大神信孝、山本博章、加藤昌志. 色素細胞(第2版)第17章 皮膚以外に存在

するメラノサイトの機能 (p223-235) 慶應義塾大学出版会, 2015 年 8 月

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

1. 名称: メラノーマ特異的バイオマーカー及びその利用

発明者: 加藤昌志、矢嶋伊知朗、武田湖州恵、後藤友二

権利者: 名古屋大(90%)と中部大学(10%)

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/054968

出願年月日: 2015 年 3 月 20 日

国内外の別: 日本

2. 名称: 白斑毒性及び黒皮症毒性の試験方法

発明者: 加藤昌志、飯田真智子

権利者: 名古屋大

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/017957

出願年月日: 2016 年 5 月 25 日

国内外の別: 日本

取得状況 (計 1 件)

名称: 幹細胞を標的とした薬効及び毒性の評価法

発明者: 飯田真智子、加藤昌志

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 特許 6182728 号

取得年月日: 2017 年 8 月 4 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/hygiene/>

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/laboratory/basic-med/social-science/environmental-health/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 昌志 (KATO Masashi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 10281073

(2) 研究分担者

武田 湖州恵 (TAKEDA Kozue)

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号: 80345884

(3) 連携研究者

矢嶋 伊知朗 (YAJIMA Ichiro)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号: 80469022