

## 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：32305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591627

研究課題名(和文) 悪性黒色腫に特徴的な遺伝子クロマチン修飾の理解と治療感受性増幅の研究

研究課題名(英文) Understanding between the histone-chromatin modification and the possible augmentation of therapeutic sensitivity for malignant melanoma

研究代表者

村上 孝 (MURAKAMI, Takashi)

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：00326852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：BRAF (V600E) 変異は多くのメラノーマ共通した重要ながん原性変異である。このBRAF (V600E) 変異をもつメラノーマはヒストン クロマチン修飾による異常な遺伝子発現抑制が蓄積し、モデルマウス内における転移能力と比例していた。ヒストン脱アセチル化阻害剤を用いた実験では、ヒストンアセチル化修飾の改善により治療感受性が部分的に亢進できたが、決して十分ではなかった。BRAF (V600E) 変異による持続的なヒストンメチル化修飾、或はがん化過程にかかわる遺伝子増幅等に対する研究が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：BRAF (V600E) is the common oncogenic driver mutation in 60-70% of melanoma patients. Melanoma cells that have BRAF (V600E) mutation accumulated aberrant gene suppression through the histone-chromatin modification, and subsequently the aberrancy was well correlated with metastatic potentials of examined melanoma cells. The histone deacetylase inhibitor (HDACi) is a potent agent to improve the aberrantly deacetylated-histones. Some of HDACi were able to improve levels of deacetylated-histones and sensitized melanoma cells to the therapeutic cell death partially. Unfortunately the effects of HDACi did not always appear sufficient for BRAF (V600E)-positive melanoma cells. Thus, it is necessary to think the possibility that BRAF (V600E)-mediated constitutive activation may maintain the abnormal histone methylation, and that particular gene amplification accompanied with melanoma development may be involved in the therapeutic resistance.

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：がん シグナル伝達 発現制御 治療感受性 生体内イメージング エピジェネティック修飾 メラノーマ

## 1. 研究開始当初の背景

セリン/スレオニンリン酸化酵素 BRAF (V600E) の変異は (RAS-)RAF-MEK-ERK シグナル伝達カスケードを恒常的に活性化し、メラノーマの 60-70% に共通した重要ながん原性変異である。またヒストンクロマチン修飾 (エピジェネティック修飾) による異常な遺伝子発現の抑制は、再発や転移など多くの難治性がんで見出されている。このようなエピジェネティック修飾は抗がん剤に対する耐性のみならず、放射線治療や免疫細胞療法を含めた様々な治療抵抗性の原因と考えられている。

メラノーマの腫瘍原性変異 BRAF (V600E) を抑制する選択的阻害剤 PLX4032 (現在は「Vemrafenib」として認可) の臨床試験が行われ、メラノーマ患者に対して劇的な奏功が報告されている (Flaherty et al. N Engl J Med 2010; 363: 809-19; Bollag et al. Nature 2010; 467: 596-9)。このような BRAF 選択的阻害剤がメラノーマの腫瘍性増殖を高度に抑制する一方で、再発や耐性の報告も指摘されている (Bollag et al. Nature 2010)。このような分子標的薬の使用にもかかわらず、多くのがん細胞株はクロマチンヒストン修飾を介した可逆的ながん細胞集団の変化を来し、高度治療抵抗性を獲得する可能性が考えられていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、BRAF (V600E) の変異によるメラノサイトの異常増殖とエピジェネティック修飾の感受性、並びに既にかん化したメラノーマ細胞における BRAF (V600E) の変異の有無によるエピジェネティック修飾の感受性の分子論的差異を明らかにし、高度難治性メラノーマに対するエピジェネティック修飾の是正と各種治療感受性の増幅を目的とした基盤研究を展開する。さらにこれらの成果から効果的な次世代がん治療につなげたい。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒトメラノーマ細胞株における BRAF 変異の検定

9 種類のヒトメラノーマ細胞株における BRAF 変異についてゲノム DNA を抽出した後、PCR 産物のダイレクトシーケンシング法により BRAF (V600E) の検定を実施した。

### (2) NOD/SCID マウスを用いたヒトメラノーマ細胞株の遠隔転移を指標とした悪性度分類

前述のヒトメラノーマ細胞株にホタル由来 luciferase (Luc) を組み込んだレトロウイルスベクターを感染させ、Luc 安定発現細胞株を作製し、それらを NOD/SCID マウスの左心室腔内に接種し、生体内 Luc ルミネッセンス発光を指標に遠隔転移病巣の形成能力を試験した。

### (3) 既存のインターフェロン (IFN) や FAS ligand (FASL) 刺激によるエピジェネティック修飾に与える影響

抗腫瘍効果を有するサイトカインや液性因子が細胞死感受性を付与する際にヒストン蛋白質のアセチル化に影響を及ぼすか否かを Western Blot 法にて試験を行った。

### (4) ヒトメラノーマ細胞に対する既存のヒストン脱アセチル化阻害剤によるヒストン H3 (Lys9) のアセチル化の評価

標準ヒストン脱アセチル化阻害剤である trichostatin A (TSA) を指標に、Romidepsin (FK228、FR901228、depsipeptide) と vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) によるヒストン H3 (Lys9) のアセチル化の評価を Western Blot 法にて試験を行った。

### (5) 正常メラノサイトにおける BRAF (V600E) 過剰発現の効果

BRAF (V600E) を発現するレンチウイルスベクターを正常メラノサイトに感染させ、細胞動態の観察を行なった。

### (6) マウスメラノーマ細胞に対するエピジェネティック修飾を介した放射線治療感受性の可能性

重粒子線照射の 20-24 時間前に、35mm 径 dish に  $1 \times 10^6$  個の B16F10 細胞を播き、照射の 16.5 時間前に HDACi である TSA を含む培地に交換した。重粒子線は、独立行政法人日本原子力研究開発機構 高崎量子応用研究所で照射した。細胞は照射後すぐにトリプシン処理により剥離し、適切な数を 100mm 径 dish に再播種した。9 ( $\pm 1$ ) 日後にコロニーをホルマリンで固定し、クリスタルバイオレットで染色した後、細胞 50 個以上からなるコロニーの数を数えた。実験はいずれも triplicate で行い、少なくとも 3 回の独立した実験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ヒトメラノーマ細胞株における BRAF 変異の検定

ヒトメラノーマ細胞株 9 種類 (SK-MEL-2, SK-MEL-28, Colo-679, MM-AC, MM-AN, MM-BP, MM-LH, MM-MC, MM-RU) における B-RAF (V600E) 変異を検索した結果、SK-MEL-28, Colo-679, MM-AC, MM-RU の 4 細胞株が BRAF (V600E) 変異を有していた。この 4 種類の細胞株に対して BRAF (V600E) 選択的阻害剤耐性細胞の分離を試みたところ、耐性細胞と考えられるクローンを複数分離した。しかしその後の高濃度での暴露によってほぼ全ての細胞が死滅し、真の薬剤耐性クローンの分離には至っていない。

### (2) NOD/SCID マウスを用いたヒトメラノーマ細胞株の遠隔転移を指標とした悪性度分類

Luc安定発現メラノーマ細胞株をNOD/SCIDマウスの左心室腔内に接種し、生体内Lucルミネッセンス発光を指標に遠隔転移病巣の形成能力を試験した結果(下図)細胞株に依存して転移病巣の選択制が生じる細胞(SK-MEL-28 & Mewo)と非特異的にほぼ全身に転移を生じるものが存在した(Co1o679)。その一方で、invitroでの安定した細胞増殖が得られる一方で転移能を持たないものも存在した(SK-MEL-2)。

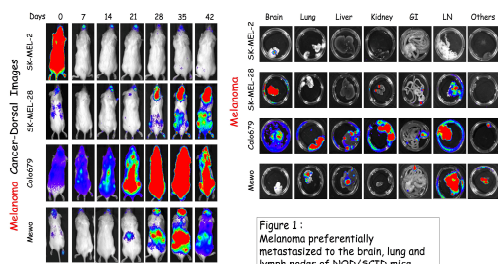


Figure 1: Melanoma preferentially metastasized to the brain, lung and lymph nodes of NOB/SCID mice.

(3) 既存のインターフェロン(IFN)や FAS ligand (FASL) 刺激によるエピジェネティック修飾に与える影響

抗腫瘍効果を有する IFN- $\lambda$  および細胞障害因子 FASL を培養系に添加し、ヒストン H3(K9 および K18) のアセチル化の変化について Western Blot 法にて試験を行った。その結果、これらの刺激では代表的なヒストン H3 のアセチル化を回復することはなかった。これらの結果は、抗腫瘍効果を有するサイトカインはエピジェネティック修飾を介して細胞障害活性を付与するものではないことが示唆された。

(4) ヒトメラノーマ細胞に対する既存のヒストン脱アセチル化阻害剤によるヒストン H3 (Lys9) のアセチル化の評価

標準ヒストン脱アセチル化阻害剤(HDACi)である trichostatin A (TSA) を指標に、Romidepsin (FK228, FR901228, depsipeptide) と Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) によるヒストン H3 (Lys9) のアセチル化の評価を Western Blot 法にて試験を行った。その結果、Romidepsin および Vorinostat は用量依存的にヒストン H3 (Lys9) のアセチル化を誘導し、それに伴い一定の割合で細胞死を誘導した。その一方で標準ヒストン脱アセチル化阻害剤 TSA では、ヒストン H3 (Lys9) のアセチル化を誘導する一方で細胞死誘導との相関が得られなかった。特に BRAF 変異を有する細胞株では、いずれの HDACi を用いても相対的に細胞死に抵抗性を有する傾向が観察された。このことはヒストンのアセチル化を介したエピジェネティック修飾を改善しても依然として BRAF 変異をもつメラノーマ細胞に完全な治療感受性を付与することが難しいこと、またメチル化修飾の是正も

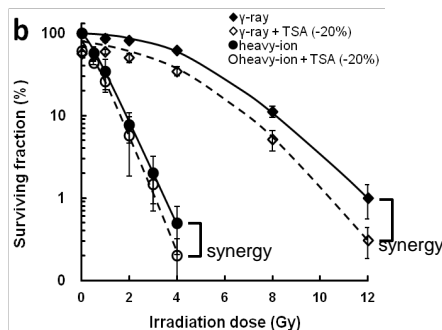
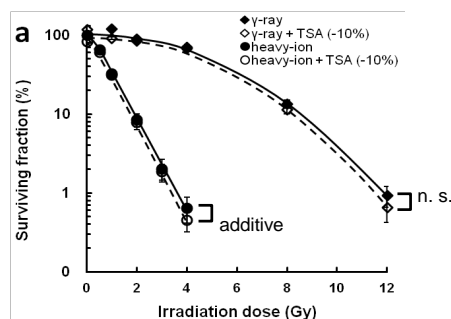
必要になることが予想された。また、メラノーマ細胞における染色体増幅など、治療抵抗性や進展・転移にかかわる因子の存在にも注意を払う必要があるものと思われる。

(5) 正常メラノサイトにおける BRAF(V600E) 過剰発現の効果

BRAF (V600E) を発現するレンチウイルスベクターを正常初代培養メラノサイトに感染させ、細胞動態の観察を行なった。感染細胞の選別にはプラストサイジン S を用いた。感染初期には細胞接着が観察されたが、長期間の培養によりクローンの分取には至らなかった。これらの結果から、初代培養メラノサイトの不死化を介して BRAF (V600E) を発現させる必要があるものと考えられた。

(6) マウスメラノーマ細胞に対するエピジェネティック修飾を介した放射線治療感受性の可能性

エピジェネティック変異を標的としたトリコスタチン A (TSA) と重粒子線の併用は、線併用(下図 a)と比較して B16F10 メラノーマ細胞のコロニー形成能を抑制した(下図 b)。さらに、この抑制効果は相乗的であることが示唆された。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Hata T, Uemoto S, Fujimoto Y, Murakami T, Tateno C, Yoshizato K, Kobayashi E. Transplantation of engineered chimeric liver with autologous hepatocytes and xenobiotic scaffold. *Ann Surg.* 2013; 257(3): 542-547. 【査読有】  
Epigenetic Modifier as a Potential Radiosensitizer for Heavy-ion Therapy

on Malignancy. Saito K, Funayama T, Kobayashi Y, Murakami T. *JAEA-Review* 2013-059, JAEA Takasaki Annual Report 2012, 80, 2013. 【査読無】

Teszuka Y, Endo S, Matsui A, Sato A, Saito K, Semba K, Takahashi M, Murakami T. Potential antitumor effect of IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A) against human lung cancer cells. *Lung Cancer* 2012. 78(3): 185-192. 【査読有】

Matsui A, Yokoo H, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Chun NAL, Kadouchi I, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, Semba K, Kobayashi E, Takahashi M, Murakami T. CXCL17 expression by tumor cells recruits CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>high</sup>F4/80<sup>-</sup> cells and promotes tumor progression. *PLoS ONE* 2012; 7(8): e44080. 【査読有】  
DOI: 10.1371/journal.pone.0044080.

Masuda T, Muto S, Fujisawa G, Iwazu Y, Kimura M, Kobayashi T, Nonaka-Sarukawa M, Sasaki N, Watanabe Y, Shinohara M, Murakami T, Shimada K, Kobayashi E, Kusano E. Heart angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy suppresses coronary angiogenesis and progresses diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012; 302(9): H1871-883. 【査読有】

Takeda S, Chinda J, Murakami T, Numata A, Iwazu Y, Akimoto T, Hamano Y, Muto S, Takahashi M, Kusano E. Development of features of glomerulopathy in tumor-bearing rats: a potential model for paraneoplastic glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant*. 27(5): 1786-1792. 【査読有】

Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Ishii K, Suzuki R, Oguri Y, Murakami T, Maruyama K, Aramaki Y. Development of novel nucleic acid loaded-Bubble Liposomes using cholesterol-conjugated siRNA. *J Drug Targeting* 2011. 19(9): 830-836. 【査読有】

Miyagaki T, Sugaya M, Murakami T, Kadono T, Okochi H, Tamaki K, Sato S. CCL11-CCR3 interaction promotes survival of anaplastic large cell lymphoma cells via ERK1/2 activation. *Cancer Res*. 2011; 71(6): 2056-2065. 【査読有】

村上 孝, 高橋将文. 動物モデルの最新技術-イメージング技術と分子標的治療-がん分子標的治療(メディカルレビュー社) 2011. Vol. 9; No. 4: 26-35(234-243). 【査読無】

村上 孝, 松居 彩, 斎藤克代. 悪性黒色腫の転写修飾による免疫学的感受性の増幅. *Biotherapy(癌と化学療法社)* 2011. Vol.25; No.4: 756-761. 【査読無】

〔学会発表〕(計9件)

斎藤克代, 舟山和夫, 小林泰彦, 村上 孝. 難治性がんに対するエピジェネティック制御と重粒子線感受性の増強. 第134回日本薬学会年会 熊本 2014年3月27-30日.

Murakami T, Matsui A, Hayashi M, Kajita M. *In vivo* metastatic behaviors of H-RAS (G12V)- and v-SRC-transformed NIH3T3 cells in athymic nude mice. 第72回日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月3-5日.

Matsui A, Murakami T. CXCL17-responding neutrophil-like CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>hi</sup> cells promote tumor progression. 第72回日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月3-5日.

Kajita M, Murakami T, Hayashi M. New methylated DNA biomarkers in circulating tumor genomes for the aggressive type of breast cancer cells. 第72回日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月3-5日.

斎藤克代, 村上 孝. がん創薬を促進する発光ヒトがん細胞資源の開発とその利用方法. 第8回日本分子イメージング学会総会・学術集会 横浜 2013年5月30-31日.

斎藤克代, 村上 孝. 株化ヒトがん細胞を用いたNOD/SCIDマウス体内における転移動態の発光イメージング. 第133回日本薬学会年会 横浜 2013年3月27-30日.

Kobayashi M, Morita T, Matsui A, Murakami T. Effect of host immunity on metastatic potential in renal cell carcinoma: optimal in vivo models to study RCC metastasis. 第71回日本癌学会学術総会 札幌 2012年9月19-21日.

Matsui A, Chun ALN, Semba K, Murakami T. CXCL17-expressing tumor cells recruit immature myeloid cells at tumor sites of mice. 第70回日本癌学会学術総会 名古屋 2011年10月3-5日.

武田真一, 珍田純子, 沼田暁彦, 村上 孝, 高橋将文, 草野英二. 担癌ラットは糸球体腎症所見を呈する; 腫瘍随伴性腎症モデル動物の作製. 第54回日本腎臓学会学術総会 横浜 2011年6月15-17日.

〔図書〕(計2件)

Murakami T, Kobayashi E. GFP-Transgenic Animals for *In Vivo* Imaging: Rats, Rabbits, and Pigs. In "In Vivo Cellular Imaging using Fluorescent Proteins": *Methods in Molecular Biology*. Vol. 872. Edited by Hoffman RM. Humana Press (Springer). New York. 2012. Chapter 12: pp 177-189.

村上 孝. ケモカインシグナル. 山本 雅, 仙波憲太郎, 山梨裕司 編集 「キーワー

ドで理解する シグナル伝達イラスト  
マップ(改訂版)」。羊土社・東京・2012  
年8月。

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.takasaki-u.ac.jp/p\\_yaku/1577](http://www.takasaki-u.ac.jp/p_yaku/1577)

/

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

村上 孝 (MURAKAMI, Takashi)

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：00326852

### (2)連携研究者

大槻 マミ太郎 (OHTSUKI, Mamitaro)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90185330

佐藤 篤子 (SATO, Atsuko)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：50382916

斎藤 克代 (SAITO, Katsuyo)

高崎健康福祉大学・薬学部・助手

研究者番号：90455288

(平成24年度より連携研究者)