

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460462

研究課題名(和文) 悪性黒色腫の抗チューブリン薬に対する自然耐性機構の克服研究

研究課題名(英文) Mechanism for natural resistance of melanoma cells against anti-tubulin drugs

研究代表者

安平 進士 (Yasuhira, Shinji)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：90311729

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)：我々は悪性黒色腫がパクリタキセルに対して持つ自然耐性機構の解明を旨とした。一部の悪性黒色腫細胞株が示す同薬処理後の難アポトーシスは抗アポトーシスタンパク質の発現と強く相関しており、発現抑制によってアポトーシス誘導は上昇した。しかし処理後の細胞増殖能と難アポトーシスの相関は弱く、難アポトーシス性細胞株は多極分裂や分裂期逸脱による細胞死を起こしていた。分裂期逸脱した細胞はアポトーシス様の形態を示したが、分子マーカーの明瞭な発現は伴わなかった。難アポトーシスが悪性黒色腫のパクリタキセル耐性の原因である可能性は低い、パクリタキセルによる新たな細胞死経路の一端が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We made an attempt to elucidate mechanisms for common natural resistance of melanoma against paclitaxel by studying relationship between acute apoptosis and loss of clonogenicity after the drug treatment. Propensities to apoptosis of several melanoma cell lines were strongly correlated with expression of anti-apoptotic proteins, and forced down-regulation of them remarkably increased occurrence of apoptosis. Low propensity to apoptosis, however, did not necessarily lead to an increased colony-forming ability. Most of these apoptosis-resistant cells underwent either abnormal division or mitotic slippage and eventually lost clonogenicity after paclitaxel treatment. Slipped cells often showed apoptosis-like morphology, while they did not show any signs of mitochondrial outer membrane permeabilization and showed only weak degree of caspase activation. Our results suggest that reluctance to apoptosis is unlikely to be a main cause for paclitaxel resistance.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子病理診断学 細胞分裂 悪性黒色腫 分裂攪乱 アポトーシス 分裂期崩壊

1. 研究開始当初の背景

進行期悪性黒色腫に対しては、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が、一般的には極めて予後不良である。悪性黒色腫で高頻度に生じる活性型 BRAF 変異 (V600E) はがん化の責任変異 (ドライバー変異) とされ、その阻害薬であるベムラフェニブは、新規分子標的治療薬として期待されている (文献 1)。しかし、日本人で多い末端黒子型黒色腫では BRAF-V600E の変異が低いことに加えて、ベムラフェニブには血液脳関門での不透過性のため脳転移例での治療効果が望めない事や比較的短期間で耐性細胞が出現することなどの欠点もあり、別経路による新規分子標的治療薬の開発が望まれている。

悪性黒色腫の治療薬として、我々は以前から古典的な化学療法薬剤である抗チューブリン薬に着目してきた。大部分の悪性黒色腫は、チューブリンの脱重合阻害薬であるタキサン系抗がん薬 (パクリタキセル) に自然耐性を示す。その原因として我々は、パクリタキセルの標的である微小管が耐性細胞においてはパクリタキセルと結合できない III 型 β チューブリンで構成されるためと考えてきた (文献 2)。しかし、この研究に多くの黒色腫細胞株では、耐性の有無に関わらず、抗チューブリン薬投与で分裂中期での細胞周期の停止が一過的に誘導されることに気づいた。

一般に抗チューブリン薬は、紡錘体チェックポイント (SAC) を活性化することにより、細胞周期を分裂中期で停止させ、その後アポトーシスを誘導する。従って抗チューブリン薬に対する耐性機構は、以下の 2 つに大別されると考えられる。

(1) 阻害薬が微小管に作用せず、SAC が活性化されないため M 期停止を生じない。

(2) SAC の活性化 / M 期停止は誘導されるが、その後のアポトーシスを回避する異常が存在する。

TUBB3 の過剰発現は (1) の経路による薬剤耐性であると考えられるが、パクリタキセル処理により一過的な M 期の停止が誘導される耐性細胞では、(2) の「SAC 活性化後のアポトーシス回避機構が存在する」ことが示唆される。

以上の背景および考察から、悪性黒色腫が持つ抗チューブリン薬への耐性機構として、SAC 活性化後のアポトーシス回避機構を明らかにすることを研究課題として設定した。

2. 研究の目的

大部分の悪性黒色腫が有する抗チューブリン薬自然耐性に関して、詳細な分子機構を解明すると共に、BCL2 ファミリータンパク質阻害薬との併用療法を悪性黒色腫の新規分子標的治療と位置づけ、前臨床試験を展開する。

以下の 3 つを計画期間内の到達目標とし、研究を行う。

(1) 悪性黒色腫細胞株における抗チューブリン薬誘導アポトーシスとその耐性に関わるアポトーシス促進 (BH3-only タンパク質) および抑制タンパク質 (BCL2 ファミリー) の同定

(2) 抗チューブリン薬と BCL2 ファミリー阻害薬の併用効果に関する *in vivo* での検証

(3) 上記併用療法の個別化医療展開を目的としたバイオマーカーの探索

3. 研究の方法

研究目的の項に挙げた項目の番号に沿って年度毎の計画を以下に述べる。

【平成 25 年度】

(1) 悪性黒色腫細胞株における抗チューブリン薬誘導アポトーシスとその耐性に関わるアポトーシス促進および抑制タンパク質の同定 [担当: 安平、渡辺 (大学院生)]

・薬剤未処理時及び抗チューブリン薬剤添加時のアポトーシス抑制タンパク質 (BCL2/BCLxL/MCL1) の発現量と翻訳後修飾の有無の解析、フローサイトメーターを用いた細胞周期/アポトーシス解析、処理直後の生存率測定を行う (計画申請時に半分以上終了)。

・siRNA (ABI silencer select) による BCL2 の発現抑制、および高発現クローンで同様の解析を行う。またアポトーシス抑制タンパク質の安定高発現株を取得する。

・Fucci (Cell Cycle Monitoring Vectors: 市販されている Clontech/タカラの製品を購入、あるいは理研からの分与をうける) を導入した悪性黒色腫細胞株を樹立し (抗チューブリン薬耐性、感受性のもからそれぞれ複数株得る)、FACS で得られたデータの検証を 1 細胞観察で行う (計画申請時に理研セルバンクから分与された Fucci 導入 HeLa 細胞によってタイムラプス観察や解析の予備実験を行っている)。

・SAC の活性化による分裂中期停止後、どのようなアポトーシス促進タンパク質分子によってアポトーシスの引き金が引かれるのかは明確ではない。ミトコンドリア依存性アポトーシスの最も上流に位置すると考えられる複数の BH3-only タンパク質 (Bid/Bim)、Bax ファミリータンパク質 (Bax/Bak) の動態について、アポトーシス抑制タンパク質の解析で既に用いたと同様の手法で解析するため、蛍光タグ発現用のベクター構築等の準備を行う。

(2) 抗チューブリン薬と BCL2 ファミリー阻害薬の併用効果に関する *in vivo* での検証 [担当: 安平、井上 (大学院生)]

・ヌードマウス皮下にチューブリン剤耐性および感受性株の xenograft を形成させる。
 ・ *in vitro* のデータおよびこれまでのリンパ腫での実験条件を元に、ABT-263(経口投与)および抗チューブリン薬(パクリタキセル/ピンクリスチン)の投薬プロトコルを確定させる。

【平成 26 年度以降】

(1)(前掲)

・前年度の準備をもとに個々の BH-3 only タンパク質について抗チューブリン剤処理時の動態について蛍光タグを用いた観察により調べる。

・個々の BH-3 only タンパク質の発現抑制あるいは高発現により、悪性黒色腫細胞の抗チューブリン剤感受性を操作できるか調べる。

発展的な課題として

・悪性黒色腫細胞以外の腫瘍細胞でパクリタキセル処理によっても FACS による解析では分裂期停止が見られない株を見つけている。このような細胞について、Fucci による追跡および BH-3 only タンパク質の動態を観察し、悪性黒色腫細胞の細胞死に特徴的な点を明らかにする。

・分裂期停止から BH-3 only タンパク質の活性化へのシグナルとして活性酸素が候補に上げられている。悪性黒色腫細胞はその由来より活性酸素に対する反応が他の腫瘍細胞と異なる可能性があるため、このことを考慮しつつ活性酸素スカベンジャー等を用いて細胞死シグナル分子としての活性酸素の可能性について検討する。

(2)(前掲)

・ABT-263/パクリタキセルあるいはピンクリスチンの二剤投与について前年度の結果を基に最適条件を決定する。STEP1 における新たな知見を適宜投薬プロトコルに反映する。

(3)個別化医療展開を目的としたバイオマーカーの探索[担当:前沢、赤坂、杉山、井上、中山(大学院生)]

・ *in vitro* および xenograft での解析結果を受け、倫理委員会(IRB)の承認を受けた上で、パラフィンブロックを用いたヒト材料での免疫染色とバイオマーカー探索の基礎検討を行う。悪性黒色腫に於ける特殊性を確認するために、卵巣癌でも同様の解析を行う。必要に応じて凍結新鮮材料の解析を検討する。採取にあたっては、IRB の承認を受ける。

4. 研究成果

研究目的の項に挙げた項目の番号に沿って、研究成果を述べる。

(1) 悪性黒色腫細胞株における抗チューブリン薬誘導アポトーシスとその耐性に関わ

るアポトーシス促進および抑制因子の同定

・悪性黒色腫細胞株 7 株において、薬剤未処理時の BCL2 タンパク質発現量はパクリタキセル処理時の複数のアポトーシス分子マーカーの出現と強く相関していた。比較的アポトーシスを起こし難い細胞株(以下、難アポトーシス株)に対して BCL2 ファミリータンパク質の機能を阻害剤や siRNA により抑制するとパクリタキセル誘導アポトーシスが劇的に増加した。一方易アポトーシス株に BCL2/BCLxL を高発現させるとパクリタキセル誘導アポトーシスは強く阻害された。以上より、パクリタキセル誘導アポトーシス抵抗性に関与するのは BCL2 及び BCLxL であると考えられる。しかしこの実験においてパクリタキセル処理と BCL2/BCLxL 機能抑制の相乗効果はアポトーシスを指標にすると顕著であった一方、コロニー形成率を指標にすると

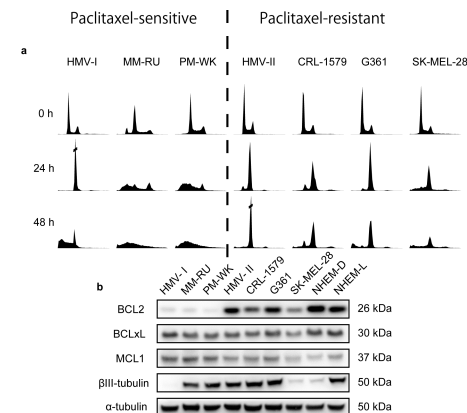


図 1. 各黒色腫由来細胞株における sub-G1 集団の誘導と BCL2 ファミリータンパク質の発現

弱かった。

・そこで、難アポトーシス黒色腫細胞株がパクリタキセル処理後に増殖能を維持しているか解析するために、Fucci2 を用いてパクリタキセル処理時の細胞のタイムラプス観察を行った。これらの細胞の大部分は mitotic slippage 後 G1 期で停止することがわかったが、何らかの細胞死を起こしているか細胞老化の状態にあるかは不明であった。急性のアポトーシスを回避した難アポトーシス性細胞も別の機構で増殖能を失っている可能性が高く、治療を念頭に置くと BCL2/BCLxL 機能抑制が必ずしもパクリタキセルとの相乗効果につながらない可能性がある。この観察は前項と整合的である。

・アポトーシスによらないパクリタキセル処理後増殖停止について、より制御された系で解析しようと考え、易アポトーシス性黒色腫細胞 RU と HeLa 細胞を親株として BCLxL/BCL2 安定高発現株、及び HeLa については BAX/BAK1 二重破壊株を作成した。これで同じ遺伝的背景をもつ難/易アポトーシス細胞のペアが得られたことになる。なお破壊株については複

数のクローンを取得し、以下の結果がクローン依存的でないことを確認している。これらの細胞には Fucci2 とアポトーシス初期におきるミトコンドリア外膜の透過性変化 (MOMP) をモニターできる Smac-mCherry 融合遺伝子を安定的に組み込んだ。BCLxL/BCL2 の高発現および BAX/BAK1 二重破壊は高濃度 (10 nM) paclitaxel 処理時の MOMP をほぼ完全に抑制したが、コロニー形成率が 10%程度であ

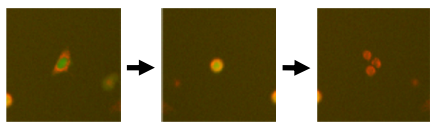


図2. 低濃度(3 nM) パクリタキセル処理に特徴的な多極分裂 (緑: Fucci2/hGem-Venus, 赤: Smac-mCherry)

る(言い換えれば 9 割程度の細胞が増殖能を失う)低濃度(3 nM)においては、親株でも MOMP はほとんど起きないことがわかった。この濃度では、多極分裂等の異常分裂が顕著であった。したがって大部分の細胞にとって増殖能消失は MOMP を介したアポトーシスによるのではなく、異常分裂自体がその原因と考えられた。

・低濃度パクリタキセル処理下で多極分裂を抑制した場合の細胞のふるまいを調べるために、キネシン-5 の阻害剤である STLC との同時投与を試みると予想通り多極分裂は阻害され、易/難アポトーシス株でそれぞれ MOMP/mitotic slippage が高頻度で誘導された。mitotic slippage を起こした細胞を可視顕微鏡でタイムラプス観察すると、さかんに blebbing を起こした後、blebbing を停止し、S 期には進行しない場合がほとんどである。これらの細胞は MOMP を起こしていないにもかかわらず、形態的にはアポトーシスに非常に近い形で増殖能を失っていると考えられる。また易アポトーシス細胞において STLC の添加は MOMP の頻度を大きく上昇させ、処理直後での生存率を低下させたのに反し、処理後のコロニー形成率はむしろ増加させた。この観察もアポトーシスとコロニー形成能でみた増殖能消失に関連がうすいことを示唆する。

・難アポトーシス株をパクリタキセル処理し、処理中及び処理後再増殖した細胞について FACS による DNA 量の解析を行ったところ、処理時に顕著である異常な DNA 量の細胞(多極分裂、あるいは mitotic slippage に由来すると考えられる)は再増殖細胞集団からはほぼ完全に消失していた。したがって、急性アポトーシスを起こす起こさないに関わらず、異常な形で分裂に進行した細胞は多くの場合再増殖に寄与しないと考えられる。逆に、増殖能を維持した細胞はパクリタキセル処理に際し、持続的な SAC の活性化等の理由で分裂期に進行しなかった集団である可能性

が高い。

・以上述べたように、パクリタキセル処理によって誘導される細胞の増殖能消失にとってはアポトーシス以外の機構が重要であると判断し、その研究に注力したため、アポトーシスのトリガーをひくアポトーシス促進因子の同定については断念した。

(2) 抗チューブリン薬と BCL2 family 阻害薬の併用効果に関する *in vivo*での検証

・パクリタキセル誘導アポトーシスを起こし易い悪性黒色腫細胞株 RU と、起こし難い G-361 をそれぞれヌードマウスに皮下注射し、いずれも xenograft を作成することに成功した。これらについて、パクリタキセル単独、あるいは ABT-263 の併用により、幾つかの例では xenograft の縮小が見られた。難アポトーシス性の G-361 由来 xenograft においてもパクリタキセル単独で縮小が見られる場合が多く、ABT-263 との相乗効果は大きくない傾向にあった。しかし、直接腫瘍が原因ではないと考えられる死亡例が実験群、対照群ともに多く、統計的な検証に耐えるような投薬プロトコルの確定には至らなかった。

(3) 個別化医療展開を目的としたバイオマーカーの探索

・(1)(2)の結果からパクリタキセルと ABT-737/263 等の BCL2 ファミリータンパク質阻害剤の二剤投与はアポトーシスを強く亢進させるものの、細胞増殖能に対する影響を指標にした場合の相乗効果は弱いことが予想された。このため臨床検体を用いた(3)の研究の着手には至らなかった。

[成果の総括]

当初の計画では、パクリタキセル処理時のアポトーシスを亢進させることにより、抵抗性細胞に対する薬効を上げることができると予想し、その臨床的な応用も視野に研究を展開する予定であったが、MOMP を伴う典型的なアポトーシスを經由しないで細胞が増殖能を失う場合が一般的である可能性が出てきた。そのため、*in vitro*系を用いた非典型細胞死の機構の研究が中心となった。この解析で明らかになった点について現在論文を執筆中である。

<引用文献>

- 1 Bollag G et al.(2012) *Nat Rev Drug Discov* 11(11):873-886.
- 2 Akasaka K et al.(2009) *J Invest Dermatol* 129(6):1516-1526.

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6件)

- (1) Kasai S, Arakawa N, Okubo A, Shigeeda

W, Yasuhira S, Masuda T, Akasaka T, Shibazaki M, Maesawa C. NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase-1 Expression Sensitizes Malignant Melanoma Cells to the HSP90 Inhibitor 17-AAG.

PLoS One. 2016 Apr 5;11(4):e0153181. doi: 10.1371/journal.pone.0153181.

(2) Okubo A, Yasuhira S, Shibazaki M, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (NQO1), protects melanin-producing cells from cytotoxicity of rhododendrol. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016 May; 29(3):309-16. doi: 10.1111/pcmr.12461. Epub 2016 Mar 4.

(3) Tatemichi Y, Shibazaki M, Yasuhira S, Kasai S, Tada H, Oikawa H, Suzuki Y, Takikawa Y, Masuda T, Maesawa C. Nucleus accumbens associated 1 is recruited within the promyelocytic leukemia nuclear body through SUMO modification. *Cancer Sci*. 2015 Jul;106(7):848-56. doi: 10.1111/cas.12680. Epub 2015 May 26.

(4) 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.

(5) Miura S, Shibazaki M, Kasai S, Yasuhira S, Watanabe A, Inoue T, Kageshita Y, Tsunoda K, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. A somatic mutation of the KEAP1 gene in malignant melanoma is involved in aberrant NRF2 activation and an increase in intrinsic drug resistance. *J Invest Dermatol*. 2014 Feb;134(2):553-6. doi: 10.1038/jid.2013.343. Epub 2013 Aug 12.

(6) 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. Epub 2013 Jun 27.

〔学会発表〕(計1件)

安平進士, 柴崎晶彦, 前沢千早. パクリタキセル処理後のacuteな細胞死と細胞増殖能消失の関係. 第38回日本分子生物学会年会. 2015年12月2日. 神戸ポートアイランド(神戸市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安平 進士 (YASUHIRA, Shinji)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90311729

(2) 研究分担者

赤坂 俊英 (AKASAKA, Toshihide)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30137525

杉山 徹 (SUGIYAMA, Toru)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40162903

前沢 千早 (MAESAWA, Chihaya)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10326647