

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461679

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子INPP4Bの欠失を基盤とするメラノーマ発生・進展の分子機構

研究課題名(英文) Role of INPP4B in melanoma development: possible effects of 3-BP as promising anticancer drug

研究代表者

眞鍋 求 (MANABE, MOTOMU)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30138309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：メラノーマ発生・進展におけるイノシトールリン脂質代謝酵素INPP4Bの生物学的役割を解明するため、メラノサイト特異的にInpp4bを欠失した、Tamoxifen誘導型Braf変異+Ptenホモ+Inpp4bホモ欠損マウスを作成した。本マウスにおいては100%の浸透率でメラノーマの自然発生が観察された。

さらに、イノシトールリン脂質代謝が糖代謝と関連していることに着目し、糖代謝阻害薬であるプロモピルビン酸によるメラノーマの増殖抑制を試みた。その結果、プロモピルビン酸は活性酸素の生成を介して、メラノーマ細胞に細胞死を誘導することが判明した。

研究成果の概要(英文)：INPP4B negatively regulates pi3-kinase signaling and is a tumor suppressor in some types of cancers. However, the role of INPP4B in the development of melanoma remains unclear. We therefore sought to investigate the tumor suppressive functions of INPP4B in vivo in knock-out KO mouse models. Here, we show that (1) Inpp4b null mice do not develop the tumorigenic phenotype of Pten haploinsufficient mice, (2) Inpp4b null mice develop the tumorigenic phenotype of Pten null mice.

Furthermore, to develop a novel therapeutic approach for melanoma, we studied the cytotoxic effects of an glycolysis inhibitor 3-bromopyruvate (3-BP) in both in vivo and in vitro mouse melanoma model. 3-BP induced cell death in melanoma cells and increased intracellular reactive oxygen species. Interestingly, 3-BP also induced cell death in colony forming cells and slow cycling cells. Taken together, these findings provided the evidences that 3-BP is a promising anticancer drug.

研究分野：皮膚科学

キーワード：INPP4B PTEN PI3K メラノーマ 糖代謝

## 1. 研究開始当初の背景

我々の研究室では、癌抑制遺伝子産物である *Pten* (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) のメラノサイトにおける生物学的役割を検討するため、メラノサイト特異的 PTEN 欠失マウスを作成した。この遺伝子改変マウスの生物学的特性を細胞生物学・分子生物学的手法より解析したところ、メラノサイトにおける *Pten* の欠失は、PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)/AKT 経路の活性化により、細胞増殖能亢進やアポトーシス抵抗性の獲得などを生じさせることが判明した (Cancer Res 68: 5760-5768, 2008)。さらに興味深いことに、体毛を抜去すると、野生型マウスでは白髪化するのに対して、*Pten* 欠失マウスではこれに抵抗した。この所見は、「PI3K/AKT 経路が色素幹細胞の維持に貢献し、白髪化を抑制している」ことを示唆するものであり、その分子動態の詳細を解明することが急務となった。

また上述の我々の報告では、メラノーマ発生に関わる分子病態の一端が併せて解明された。まず PTEN が抑制された状態では、PI3K が活性化され、PI(4,5)P<sub>2</sub> をリン酸化して、PI(3,4,5)P<sub>3</sub> へと変換される。続いて PI(3,4,5)P<sub>3</sub> にリン酸化酵素である AKT が結合し活性化され、下流のシグナル伝達分子群を介して、メラノーマの化学発癌に対する感受性が亢進する。すなわち、上記の所見より「PI3K/AKT 経路の活性化はメラノーマの病態形成に関与し、その制御によりメラノーマに対する新規分子標的療法を創生できる」という作業仮説が導き出され、その当否が注目されることになった。

## 2. 研究の目的

INPP4B は PI(3,4)P<sub>2</sub> のイノシトール環水酸基を脱リン酸化し PI(3)P<sub>2</sub> へ変換する作用を持つイノシトールリン脂質代謝酵素である。PI(3,4)P<sub>2</sub> が PI(3,4,5)P<sub>3</sub> と類似の機能を持つことより、INPP4B は PTEN 同様に

癌抑制遺伝子産物として機能しているものと推定され、注目を集めている。

そこで、今回の研究課題では、この INPP4B に着目し、メラノーマ発生・進展における PTEN との協調作用を解明することにした。すなわち研究期間中において、メラノサイト特異的に *Pten* と *Inpp4b* を欠失した遺伝子改変マウスを用いて、細胞増殖能、アポトーシス抵抗性、各種シグナル伝達分子の相互作用などを解析し、さらに腫瘍の発生頻度や選択的阻害による転移能の抑制効果を検討する。

## 3. 研究の方法

我々は本研究課題において、イノシトールリン脂質代謝酵素 INPP4B に着目して、メラノサイト幹細胞の未分化性維持機構とその破綻による腫瘍発生の分子基盤を解明することを目指した。この課題を達成するため、Dct-Cre マウスと *Inpp4b*-flox/flox マウスないし *Pten*-flox/flox マウスを交配して、色素細胞特異的 *Inpp4b* ホモ欠損マウス、*Pten* ホモ欠損マウス、*Inpp4b* ホモ・*Pten* ホモ欠損マウスを作成した。また同様に、Tamoxifen 誘導型 Tyr-Cre:Braf 変異 + *Pten* 欠損マウスを *Inpp4b*-flox/flox マウスないし *Pten*-flox/flox マウスと交配して、Tamoxifen 誘導型 Braf 変異 + *Inpp4b* ホモ欠損マウス、Braf 変異 + *Pten* ホモ欠損マウス、Braf 変異 + *Inpp4b* ホモ・*Pten* ホモ欠損マウスを作成した。

さらに、PI3K 経路の腫瘍発生における動的役割を解明し、かつメラノーマに対するより強固で長期的に使用できる標的治療を可能にするために、マウス B16-BL6 メラノーマ細胞株を使用して先行実験を実施することとした。具体的には、糖代謝阻害薬であるプロモピルビン酸の特性評価を行い、スローサイクリング細胞を含む細胞集団を標的とした新たな化学療法の選択肢を検討した。

(1) プロモピルビン酸の抗腫瘍活性を評価するため、プロモピルビン酸添加後の細胞生存率を AlamarBlue アッセイにより定量した。

(2) プロモピルビン酸の幹細胞的な性質を有するメラノーマ細胞に対する作用を評価するため、自己複製能アッセイを用いて、プロモピルビン酸処理後に単一細胞より増殖する細胞数を定量した。

(3) プロモピルビン酸のスローサイクリング細胞に対する作用を評価するため、培地にプロモデオキシウリジン (BrdU) を添加し 7 日間培養後、BrdU を含まない培養条件でさらに 6 日間培養した。この、BrdU 標識保持細胞をプロモピルビン酸処理し、免疫染色により BrdU 細胞数を定量した。

(4) プロモピルビン酸による細胞死における活性酸素の関与を解明するため、活性酸素の生成量を定量した。さらに、活性酸素阻害剤による細胞死の抑制効果を評価するため、NAC とプロモピルビン酸添加後の細胞生存率を Alamar-blue アッセイを用いて定量した。

(5) プロモピルビン酸による細胞死の機序を解明するため、アネキシン V-FITC キットを用いて、細胞死に陥った細胞数をフローサイトメトリーにより定量した。

(6) *in vivo* におけるプロモピルビン酸の効果を解析するため、マウスモデルを作成した。すなわち、メラノーマ細胞をマウス皮下に移植し、1 週後に被覆皮膚を除去し、プロモピルビン酸含有外用薬を塗布し、さらに 1 週間保持した。

#### 4. 研究成果

当初の計画どおり、Dct-Cre マウスと Inpp4b-flox/flox マウス ないし Pten-flox/flox マウスを交配して、色素細胞特異的 Inpp4b ホモ欠損マウス、Pten ホモ欠損マウス、Inpp4b ホモ・Pten ホモ欠損マウスを作成した。しかし、これらのマウスでは、色素細胞由来の良性腫瘍である色素細胞母斑は発生したものの、メラノーマへ進展する

ことは無いことが判明した。

そのため、これらのマウスを用いた本研究戦略を断念し、あらたに Tamoxifen 誘導型 Tyr-Cre : Braf 変異 + Pten 欠損マウスを用いて、今後の研究を遂行することにした。すなわち、此のマウスを Inpp4b-flox/flox マウス ないし Pten-flox/flox マウスと交配して、Tamoxifen 誘導型 Braf 変異 + Inpp4b ホモ欠損マウス、Braf 変異 + Pten ホモ欠損マウス、Braf 変異 + Inpp4b ホモ・Pten ホモ欠損マウスを作成した。その結果、以下の所見を得た。

(1) Braf 変異 + Inpp4b ホモ欠損マウスはメラノーマを自然発症しない。

(2) Braf 変異 + Inpp4b ヘテロ・Pten ホモ欠損マウスはメラノーマを自然発症しない。

(3) Braf 変異 + Inpp4b ホモ・Pten ホモ欠損マウスはメラノーマを自然発症する。

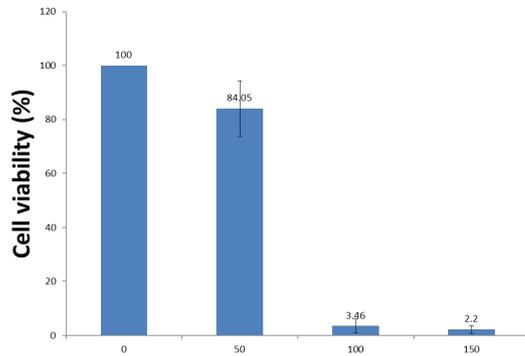
すなわち、Inpp4b ホモ欠損は Pten ホモ欠損マウスを代償せず、恐らく Pten ホモ欠損により生じたメラノーマの悪性度に関連することが示唆された。今後は、メラノーマ発生までの時間推移や採取したメラノーマ細胞の生物学的特性を解析していく予定である。

上記の如く、遺伝子改変マウスを用いた研究戦略は今後も解析が必要な段階であるが、選考実験として実施した培養メラノーマ細胞を用いた研究戦略では、論文として発表するに足る以下の成果が得られた。

(1) *in vivo* における抗腫瘍効果：

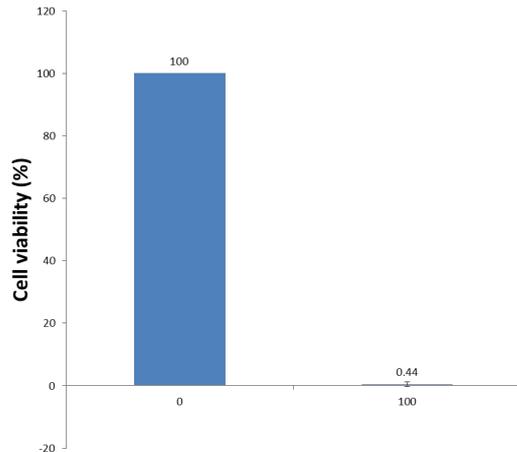
プロモピルビン酸はマウス B16-BL6 メラノーマ細胞株において、濃度依存性に高い抗腫瘍活性を示した (図 1)。以上の所見より、プロモピルビン酸はメラノーマ細胞に対する化学療法の選択肢として、極めて有用であるものと期待される。

図 1



(2) 自己複製能アッセイ：メラノーマ幹細胞に対するプロモピルビン酸の効果を検討するため、自己複製能アッセイにより、自己再生能力を評価した。その結果、プロモピルビン酸処理により自己再生能力を有する細胞は大半が死滅していた(図2)。以上の所見より、幹細胞の性質を持つメラノーマ細胞に対して、プロモピルビン酸が有効であることが判明した。

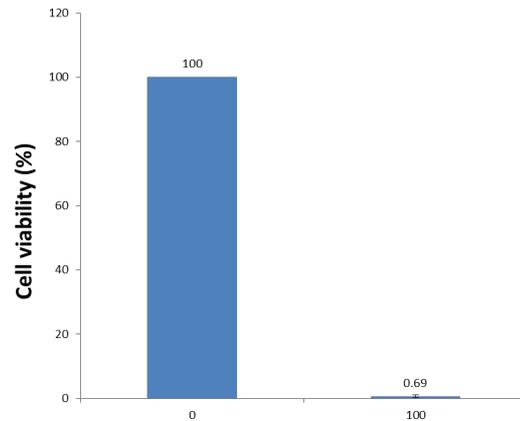
図 2



(3) スローサイクリング細胞に対する作用：メラノーマ幹細胞に対するプロモピルビン酸の効果を検討するため、BrdU を長期保持する細胞周期の遅い細胞を用いて細胞毒性を解析した。その結果、プロモピルビン酸処理によりスローサイクリング細胞大半が死滅していた(図3)。上記の自己複製能アッセイと同様に、幹細胞の性質を持つメラノーマ細胞に対して、プロモピルビン酸が有効であ

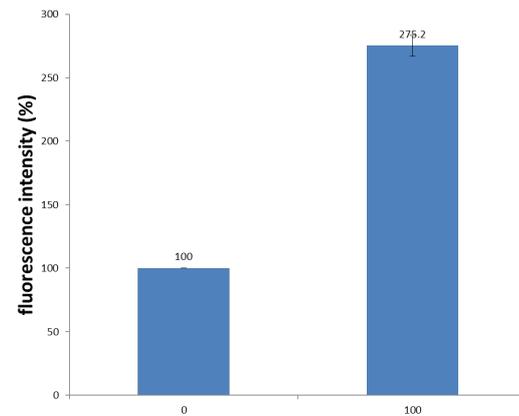
ることを示唆する所見と思われる。

図 3



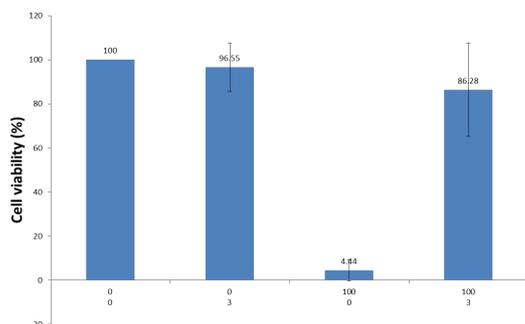
(4) プロモピルビン酸による細胞死における活性酸素の関与を解明するため、活性酸素の生成量を定量した。その結果、プロモピルビン酸処理後に活性酸素の生成が増加する所見を得た(図4)。

図 4



さらに、活性酸素阻害剤による細胞死の抑制効果を評価するため、N-アセチルシステインとプロモピルビン酸添加後の細胞生存率を定量した。その結果、N-アセチルシステインはプロモピルビン酸の作用を完全に抑制する所見を得た(図5)。

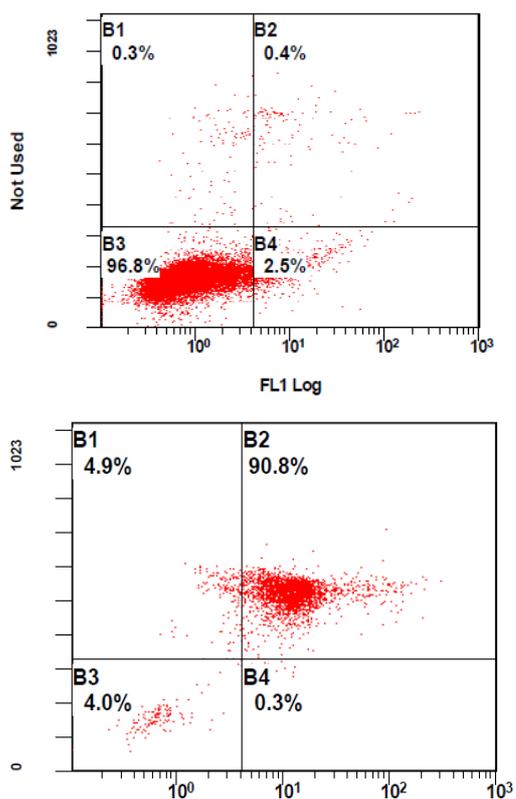
図 5



以上の所見より、メラノーマ細胞に対するプロモピルビン酸の細胞毒性が活性酸素依存性であることが判明した。

(5) 細胞死の機序：プロモピルビン酸による細胞死の機序を解明するため、アネキシン FITC および PI 染色後にセルソーターにより解析した。その結果、大半の細胞がアネキシン FITC および PI に陽性所見を示した(図 6)。以上の所見より、プロモピルビン酸は主としてネクローシスによる細胞死を惹起すると判明した。

図 6 (上：添加前、下：添加後)

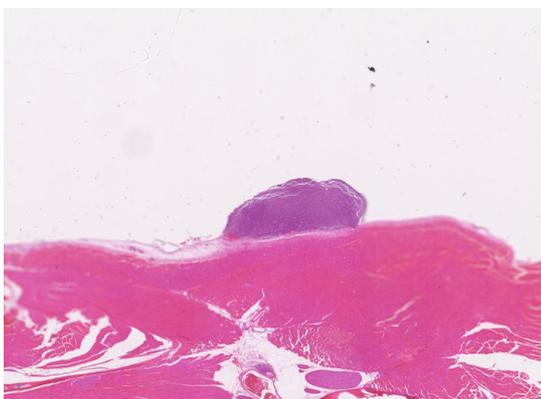


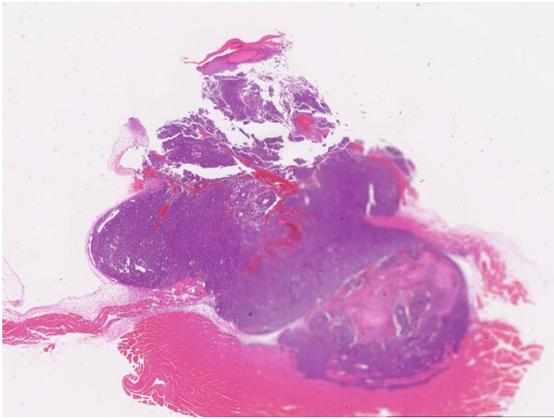
(6) *in vivo* における効果：プロモピルビン酸の効果をマウスモデルで解析したところ、メラノーマ細胞の増殖が顕著に抑制されている所見を得た(図 7, 8)。

図 7 (上：添加、下：無添加)



図 8 (上：添加、下：無添加)





周辺の正常組織に形態学的以上が観察されないことより、プロモピルビン酸含有外用剤が臨床的に応用可能な抗腫瘍薬として期待される。

#### (7) まとめ

プロモピルビン酸は活性酸素の生成を介して、メラノーマ細胞やメラノーマ slow-cycling 細胞に細胞死(恐らくネクローシス)を誘導し、またコロニー形成を抑制することが判明した。今後は遺伝子改変マウスを用いた研究を推進し、早期の臨床展開を図っていく予定である。

また、上記の研究内容に基づき、英文論文を執筆中である。特許取得に関しては、関係部局と相談する予定である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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

眞鍋 求 (MANABE, MOTOMU)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・  
教授

研究者番号：30138309

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )