

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19681

研究課題名(和文) D-DTおよびMIFを標的とした新規メラノーマ治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic method for melanoma by targeting D-DT and MIF

研究代表者

吉久 陽子 (YOSHIHISA, Yoko)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・特命助教

研究者番号：70623578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：メラノーマは色素細胞由来の悪性腫瘍で最も予後の悪い腫瘍のひとつである。我々はマクロファージ遊走阻止因子(MIF)の機能に関する研究の過程でMIFがメラノーマの増殖に関与することを見出した。一方で近年、MIFと類似性の高い立体構造を有するD-dopachrome tautomerase(D-DT)が同定されたが、生体内での詳細な生理活性や機能は明らかではない。本研究ではメラノーマの増殖におけるD-DTの関与について検討した。D-DTはメラノーマ細胞において恒常的に発現しており炎症性サイトカインやアポトーシス関連因子との関連性も明らかであることからメラノーマの増殖に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：D-dopachrome tautomerase(D-DT), homologue of macrophage migration inhibitory factor(MIF) has been observed to have similar functions as MIF. However, the role of D-DT in tumor biology remains unknown. It was hypothesized that D-DT and MIF could represent as a potential target for therapeutic interventions in melanoma. Here, we confirmed the production and expression of D-DT in the murine and human melanoma cells by Western blot analysis and RT-PCR. D-DT was released by all melanoma cell lines in vitro. The knock-down of D-DT and MIF by siRNA showed decrease protein expression of inflammatory cytokines and rendered them more prone to apoptosis induction. These results suggest that D-DT is associated with induction of inflammatory cytokines and apoptosis factors in melanoma cells. This qualifies D-DT for further evaluation as a therapeutic target in melanoma.

研究分野：皮膚科学

キーワード：D-DT メラノーマ 炎症性サイトカイン アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

メラノーマは色素細胞由来の悪性腫瘍で最も予後の悪い腫瘍のひとつである。早期例では腫瘍の全摘出により治癒に至るが、進行例の場合、高率に他臓器転移をきたす。進行例に対しては、これまでダカルバジンを中心とした多剤併用化学療法が行われてきたが、その奏効率は十分ではなかった。最近、メラノーマ細胞に対する腫瘍免疫を抑制する分子 PD-1 を標的にした抗 PD-1 抗体が保険収載され、さらに BRAF 変異により活性化した蛋白質を特異的に抑える BRAF 阻害薬も近々認可され、治療効果の改善が期待されている。しかし、メラノーマの制圧には未だ及ばず、現在も免疫療法や樹状細胞療法、遺伝子治療など様々な角度からより効果の高い治療の開発が試みられている。

マクロファージ遊走阻止因子 (Macrophage migration inhibitory factor: MIF) は、TNF- α や IL-6 等の炎症性サイトカインの上流に位置する炎症性サイトカインであり、炎症反応や免疫応答において多彩な生物学的作用を有することが知られている。サイトカインカスケードの上位に位置し、腫瘍抑制因子である p53 を抑制するという他のサイトカインにはない特徴的な作用を有している (Hudson JD et al., J Exp Med, 1999)。我々は MIF の生物学的作用や各種疾患への関与について研究を長く継続しており、その過程で皮膚メラノーマ患者の病変部において MIF が強く発現し、MIF が腫瘍細胞の増殖や血管新生に促進的に機能することを見出した (Shimizu T et al. Biochem Biophys Res Commun, 1999)。また、MIF Tg マウス由来の培養表皮角化細胞を用いた紫外線発癌の研究において、MIF が p53 の発現を抑制することで紫外線照射により DNA に変異が生じた細胞のアポトーシスが誘導されず、光発癌を促進することも明らかにした (Honda A et al, Carcinogenesis, 2009)。これらの所見は、炎症性サイトカインである MIF が皮膚の悪性腫瘍、特にメラノーマの増殖や浸潤に関与している可能性を示唆している。

近年、MIF と非常に類似性の高い立体構造と相同性の高いアミノ酸配列を有する D-dopachrome tautomerase (D-DT) の存在が明らかとなり、その類似性から MIF-2 とも呼称されている (Merk M et al. Cutokine, 2012)。D-DT は 12 kDa の細胞内タンパク質で、D-ドーパクロームを 5,6-ジヒドロキシインドールに変換する酵素であり、肝臓、心臓、腎臓、脳や眼など種々の組織および血清中に局在することが知られている (Esumi N et al. Mamm Genome, 1998)。近年、D-DT の中和により炎症反応が有意に減少することが報告され、炎症性サイトカインとして機能する可能性が報告されている (Merk M et al. PNAS, 2011)。さらに D-DT は、CD74/CD44 など MIF 細胞表面受容体複合体

と結合し、MIF と同様に細胞シグナル伝達に関与していること、シグナル伝達においては MIF と D-DT は協調的に作用していることが報告されている (Kobold S et al. Oncotarget, 2014)。このように、徐々に D-DT の機能が解明されてきているが、生体内での詳細な生理活性やサイトカインとしての機能、さらに D-DT と MIF の機能的な差異についても十分に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究ではメラノーマの増殖や遊走における D-DT と MIF の関与について検討し、これらの炎症性サイトカインをターゲットとしたメラノーマの新規治療の開発を目的とした。

3. 研究の方法

マウスおよびヒトのメラノーマの cell line を用いて D-DT の発現量と産生量を定量的に解析した。また、D-DT と MIF に対する siRNA を用いて D-DT を抑制した細胞、MIF を抑制した細胞、両者を抑制した細胞、コントロール細胞の 4 群を作製し、細胞増殖やアポトーシス関連分子に対する炎症性サイトカイン (D-DT と MIF) の関与・作用機序について解析し、比較検討した。

4. 研究成果

RT-PCR 法と Western blot 法を用いて D-DT の mRNA 発現およびタンパク産生の測定を行ったところ、いずれのメラノーマ細胞においても恒常的な D-DT の発現と産生を認めた。また、上記 4 群の細胞を用いてメラノーマ細胞の増殖能を比較した結果、siRNA を導入して D-DT と MIF を抑制した群は、コントロール群に比べて増殖能が低下した。さらに、D-DT と MIF を抑制した細胞では、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6 など) 細胞増殖/アポトーシス関連分子 (Bax, Bad) などの発現が減少した。

以上の結果から、D-DT はメラノーマ細胞において恒常的に発現しており、炎症性サイトカインやアポトーシス関連因子との関連性も明らかであることから、メラノーマの増殖に関与している可能性が示唆された。

今後は、今回得られた in vitro 実験系の結果に基づき、メラノーマの増殖・浸潤・転移における D-DT と MIF の関与を in vivo 実験系に移して、さらに発展させる必要がある。

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 5 件)

Yoshihisa Y, Rehman MU, Kondo T, Shimizu T. Role of macrophage migration inhibitory factor in heat-induced apoptosis in keratinocytes. FASEB J. 30: 3870-3877, 2016.

Yoshihisa Y, Andoh T, Matsunaga K, Maoka T, Shimizu T. Efficacy of Astaxanthin for the Treatment of Atopic Dermatitis in a Murine Model. PLoS One. 11: e0152288. 2016.

Shimizu K, Andoh T, Yoshihisa Y, Shimizu T. Histamine Released from Epidermal Keratinocytes Plays a Role in -Melanocyte-Stimulating

Hormone-Induced Itching in Mice. Am J Pathol., 185: 3003-3010, 2015.

Yoshihisa Y, Rehman MU, Yamakoshi-Shibutani T, Shimizu T. In vitro effects of zinc on the cytokine production from peripheral blood mononuclear cells in patients with zinc allergy. Springerplus., 4: 404, 2015.

Nagata Y, Yoshihisa Y, Rehman MU, Matsunaga K, Kitaichi N, Shimizu T.: Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in pollen-induced allergic conjunctivitis and pollen dermatitis in mice. PLoS One., 10: e0115593, 2015. (Nagata Y and Yoshihisa Y contributed equally to the article)

〔学会発表〕(計 9 件)

Yoko Yoshihisa, Kenji Matsunaga, Mati Ur Rehman, Tadamichi Shimizu. Apigenin inhibit UV-induced melanogenesis through activation of MIF and PAR-2 expression in keratinocytes. The 41th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2016 December 9-11, Sendai.

Kyoko Shimizu, Tsugunobu Andoh, Yoko Yoshihisa, Megumi Mizawa, Teruhiko Makino, Tadamichi Shimizu. Eosinophil infiltration and Kallikrein 5 are involved in itching of mycosis fungoides. The 41th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2016 December 9-11, Sendai.

3Yoko Yoshihisa, Kenji Matsunaga, Mati Ur Rehman, Tadamichi Shimizu. Efficacy of apigenin on UV-induced melanogenesis through activation of MIF and PAR-2 expression in keratinocytes. the 46TH ANNUAL ESDR MEETING 2016 September 7-10, Munich, Germany.

吉久陽子, 松永憲治, Mati Ur Rehman, 清水忠道. Apigenin の MIF を介した UVB 誘導メラニン形成抑制効果. 第 38 回日本光医学・光生物学会. 2016 年 7 月 22-23

日, 京都.

吉久陽子, 森 直哉, 鹿児山浩, 井波智恵子, 三澤 恵, 清水忠道. 漢方薬による蕁疹診断における末梢血単核球サイトカイン測定の有用性. 第 115 回日本皮膚科学会総会 2016 年 6 月 3-5 日, 京都.

Yoko Yoshihisa, Mati Ur Rehman, Takashi Kondo, Tadamichi Shimizu. Effects of macrophage migration inhibitory factor on heat-induced apoptosis in keratinocytes. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2015 December 11-13, Okayama.

吉久陽子, 安東嗣修, 松永憲治, 眞岡孝至, 清水忠道. Astaxanthin のアトピー性皮膚炎に対する炎症抑制効果の検討. 第 45 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2015 年 11 月 20-22 日, 松江.

Yoko Yoshihisa, Mati Ur Rehman, Takako Yamakoshi-Shibutani, Tadamichi Shimizu. In vitro effects of zinc on the cytokine production from peripheral blood mononuclear cells in patients with zinc allergy. 23rd World Congress of Dermatology. 2015 June 8-13, Vancouver, Canada.

吉久陽子, Mati Ur Rehman, 渋谷高子, 清水忠道. 亜鉛アレルギー診断における末梢血単核球サイトカイン測定の有用性. 第 114 回日本皮膚科学会総会 2015 年 5 月 29-31 日, 横浜.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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:

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/derma2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉久 陽子 (YOSHIHISA, Yoko)
富山大学大学院医学薬学研究部 (医学)・
特命助教
研究者番号 : 70623578

(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

()