

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14588

研究課題名(和文)放射線感受性増強を目的としたイヌ悪性黒色腫の新規分子標的薬療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel molecular drug therapy to enhance radiosensitivity for canine malignant melanoma.

研究代表者

根本 有希 (Nemoto, Yuki)

麻布大学・大学病院・特任助教

研究者番号：50790705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イヌの悪性黒色腫に対して放射線感受性を顕著に増加する新たな新規化合物を明らかにし、その作用機序を検討することを目的とした。

まず、新規化合物の探索として、約4000種類の化合物を用いて、イヌの悪性黒色腫細胞株に対し放射線照射を行い、その感受性を顕著に増加させる化合物を選択した。その結果、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤ML-7と、タンパク質脱アセチル化酵素であるサーチュインの一種であるSIRT1の選択的阻害剤EX-527であることを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イヌの口腔悪性黒色腫は急速に増大し、早期に転移を起こすことから、予後不良な疾患である。局所制御のために放射線治療が行われることが多いが、その効果や全身的效果を含む併用療法は皆無である。そこで放射線治療の効果を増強させる新規化合物の存在が重要であり、本研究はその先駆けとなることが期待される。

イヌの悪性黒色腫はその病態や治療に対する抵抗性においてヒトの粘膜に発生するそれと類似する。さらにヒトと同様の環境リスク因子に暴露されていることから、イヌはヒトの悪性黒色腫の自然発症モデルとして活用できる可能性を有する。本研究における化合物の発見は今後医学に応用できる可能性を含むと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of study was to find a new compound to enhance radio sensitivity for canine melanoma.

Canine melanoma cell line was irradiated with 4000 compounds to find the one which enhance the effect of irradiation. With the results, two compounds; myosin light chain kinase inhibitor, ML-7 and selective SIRT1 inhibitor, EX-527 were found.

研究分野：獣医腫瘍学

キーワード：イヌ 腫瘍 放射線治療 悪性黒色腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イヌの悪性黒色腫は、口腔腫瘍のうち最も多く発生する腫瘍である。腫瘍は急速に増大するため、既に発見時には腫瘍は大きく治療が困難となることが多い。増大した腫瘍は、イヌの採食を困難し生活の質を低下させる。腫瘍が局所に浸潤することから口腔からは出血を伴い、口腔の悪臭も発生する。これは動物の生活の質を低下させるだけでなく、共に生活する私たち飼い主に対しても大きなストレスが生じる。さらに腫瘍はこのような局所浸潤だけではなく、早期にリンパ節や肺へ転移を起こすため、予後が非常に悪い。口腔内で急速に増大し、発見が遅れることも多く、外科手術は不適になることも珍しくはない。その場合、主に放射線治療が選択される。しかしそのような治療を行っても、顕著な局所制御や生存期間の延長は認められないのが現実である。また転移に有意に効果的とされる抗がん剤や全身治療もない。放射線治療の増感効果と転移病変に対する両者を治療の目的として、化学療法との併用が試みられた。しかし、生存期間の延長は得られておらず、現在そのような併用療法は積極的には行われていない。よって、現在行われている治療の多くは症状を緩和させることを目的としている。腫瘍の増大を抑制することや、罹患したイヌや飼い主の生活の質を向上させることである。

そこで本研究では、イヌの悪性黒色腫に対して有効的な治療法を探索することを目的とした。申請者が治療に携わる放射線治療において、その効果を増強させる治療法を模索することとした。

近年イヌの腫瘍治療においても外科療法、放射線治療、化学療法の主要な治療の他に、それらを補助、代替する治療法が開発、導入されている。シグナル伝達特異的に作用する分子標的薬が使用されるようになり、その一部ではその作用や副作用の少なさから、化学療法に代替する有用性が報告されている。しかし放射線治療と分子標的薬を併用した報告は少なく、イヌの悪性黒色腫に関する治療報告は皆無である。そこで本研究では、放射線治療の効果を増強する有効な治療法が確立されていない現在、放射線治療と併用可能な分子標的薬を同定することで新たな治療戦略を生み出す可能性があると考えた。

申請者は上記の背景から、放射線感受性を顕著に増加する新たな新規化合物を探索することを本研究とした。新規化合物が、局所制御や転移巣に対する有効であれば、新たな悪性黒色腫に対する治療法として期待できると考えた。また本研究は放射線生物学的、科学根拠に基づき、放射線治療における腫瘍制御率や生存期間を改善する可能性を有すると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、イヌ悪性黒色腫において、放射線治療と併用可能であり、かつ、その効果を増強するような新たな機序の分子標的薬(新規化合物)を明らかにし、さらにその機序を明らかにすることである。

3. 研究の方法

まず、イヌ悪性黒色腫細胞株を用いて放射線感受性を増強する新規化合物の探索を行った。申請者は先端モデル動物支援プラットフォーム(分子プロファイリング支援活動)の阻害ライブラリーを使用し、約 4000 種類の化合物を網羅的に解析することを試みることにした。

イヌ悪性黒色腫細胞株 KMeC に阻害剤を 6 時間処置し、X 線(4 Gy)を照射し、48 時間後に併用効果を生細胞数の測定により検討した。次に、同定した化合物の最適濃度を検討するために、濃度を希釈し、同様の実験を行った。さらに cologenic assay も実施した。

その他の細胞株についても同様な結果が得られるかを確かめるために 2 種類の化合物を用いて細胞の生存率について上記に示す方法にて検討を行った。

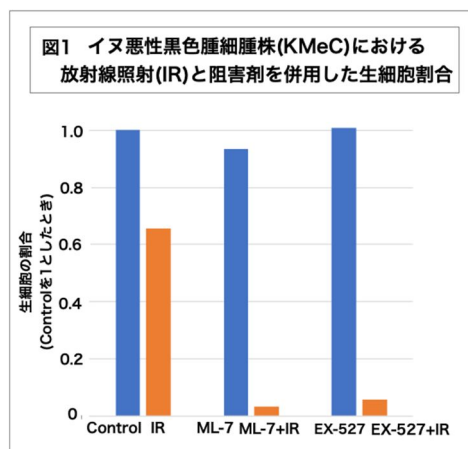
4. 研究成果

約 4000 種類の化合物の中から、その化合物のみでは細胞に顕著な細胞死を起こさず、放射線照射と併用した場合に、放射線照射単独よりも、顕著な細胞死を起こす化合物を検出した。

その結果、2 種類の化合物がその条件に当てはまることを明らかにした。ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤 ML-7 と、タンパク質脱アセチル化酵素であるサーチュインの一種である SIRT1 の選択的阻害剤 EX-527 であることを同定した(図 1)。同様に、その他のイヌ悪性黒色腫細胞株で試したところ、KMeC で得られた程度の化合物と放射線照射を併用した場合の顕著な細胞死は確認できなかった(図 2)。

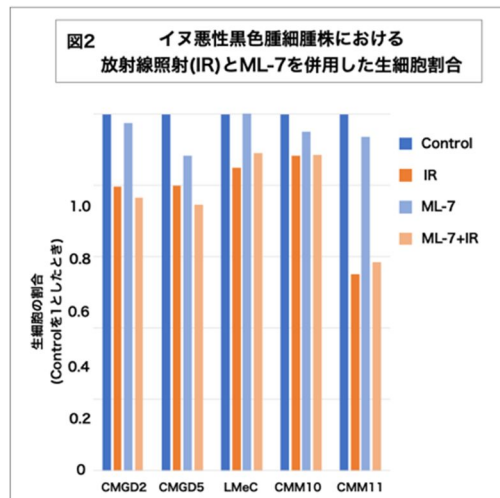
このことから、2 種類の低分子化合物による放射線照射と併用した際の殺細胞効果は限られた腫瘍細胞株でのみで起こる可能性示唆された。同時に、この腫瘍細胞株がイヌ悪性黒色腫の状態を反映しているとは考えにくい結果となった。

そこで腫瘍細胞株における ML-7 と EX-527 の標的分子である MLCK と SIRT1 の発現が異なることが、このような併用効果の違いにつながるのでは



ないかと考えた。さらに腫瘍細胞株を増やし、どれほどの腫瘍細胞株において標的分子が発現しているのかを現在 RT-PCR, ウェスタアンプロテイングによって検討することとした。さらに、この分子が治療ターゲットとなりうるかを検討するために、実際の腫瘍組織切片を使用した検討を進めているところである。

以上のことからミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤 ML-7 と、タンパク質脱アセチル化酵素であるサーチュインの一種である SIRT1 の選択的阻害剤 EX-527 は、一部のイヌ悪性黒色腫細胞株において放射線照射と併用することでその効果を増強することが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----