

機関番号：11101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791057

研究課題名 (和文) 新規ウイルスセンサーを標的とするメラノーマの画期的治療法の開発

研究課題名 (英文) Development of a novel therapy targeting new intracellular receptors for the treatment of malignant melanoma

研究代表者

松崎 康司 (MATSUZAKI YASUSHI)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50322946

研究成果の概要 (和文)：今回、IFN- $\beta$  刺激による RIG-I タンパク発現誘導が悪性黒色腫由来培養細胞において確認された。また、その培養細胞株の種類によって IFN- $\beta$  誘導性 RIG-I 発現に差異が認められた。今後、それぞれの培養細胞株において RIG-I が関与する細胞内シグナル経路についても検討する必要があると考える。

研究成果の概要 (英文)：I confirmed that cultured melanoma cells expressed RIG-I protein by IFN- $\beta$  stimulation. Moreover, the levels of the IFN- $\beta$ -induced RIG-I expression was dependent on the types of melanoma cell lines. It is necessary to identify intracellular signals via RIG-I in various melanoma cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：皮膚腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

生体最外層に位置する皮膚は、常に細菌・ウイルスなどの微生物に曝されている。皮膚の恒常性維持のため、表皮細胞は膜貫通型細胞外受容体である Toll-like receptor (TLR) を有し、「自然免疫」反応として IFN などのサイトカインを誘導し、感染した細胞の増殖を抑制する。近年、TLR を介さずに細胞内でウイルス由来 ds-RNA を認識し、IFN 産生に係わる細胞

内受容体として retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) が同定され、I 型 IFN である IFN- $\beta$  の発現を誘導することが解明された (Yoneyama et al, *Nat. Immunol.* 5:730-737, 2004)。RIG-I は、C 末端側で ds-RNA を検知し、N 末端にあるドメインが下流へ IFN 発現シグナルを伝達する RNA ヘリカーゼである (Fig. 1)。申請者は、世界に先駆けてウイルス感染状態の培養ヒト表皮細胞が RIG-I を発現すること

をRNA、タンパクレベルで確認し、またそれに伴うIFN- $\beta$ 発現誘導の結果も得た(Kitamura, Matsuzaki et al, *J Dermatol Sci.* 2:127-134, 2007)。また、RIG-Iは正のフィードバック制御により、誘導されたIFN刺激によりRIG-Iの発現自体が更に持続的に誘導されることが判明している。そこで、本来ウイルス感染した細胞の増殖抑制が目的のこの作用を、人為的に作成・誘導し、癌細胞の増殖抑制に応用できると考える。

悪性黒色腫は、早期より所属リンパ節や他臓器に転移を生じる予後不良な皮膚悪性腫瘍である。将来、再発・転移をきたすことが予想されるハイリスクな症例には、術後補助療法として術創もしくは病変周辺へのIFN- $\beta$ 局所投与が行われている。そこで申請者は一過性のIFN- $\beta$ 投与ではなく、持続的にIFN- $\beta$ が産生される環境をつくること、悪性黒色腫の再発・転移をより確実に抑制することができる考えた。

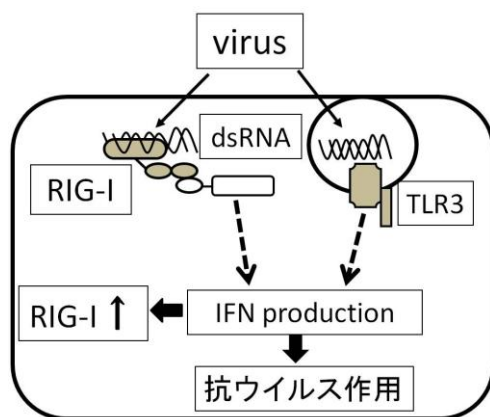


Fig. 1

## 2. 研究の目的

合成 ds-RNA である poly-(I:C) を皮膚に投与することで、擬似的ウイルス感染状態を作り、表皮細胞、線維芽細胞、ならびにリンパ球から RIG-I 発現・誘導性 IFN- $\beta$  が産生され、局所的な免疫賦活作用を示し、また、メラノーマ細胞自体も周辺組織より分泌される IFN-

$\beta$  により RIG-I 発現が継続的にみられ、細胞増殖能が著しく低下し結果として腫瘍が縮小すると考えた。RIG-I-IFN- $\beta$  のフィードバック効果を最大限にいかす方法の確立を目標に本研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞

ヒト悪性黒色腫細胞 (SK-Mel-28, Colo679, 501mel, MeWo, G-361) を、10% fetal bovine serum (FBS)、0.1 mg/ml penicillin、0.1 mg/ml streptomycin、2.5  $\mu$ g/ml amphotericin B を添加した DMEM 培地にて培養した。ウエスタンブロット及びリアルタイム PCR では、各種サイトカイン (IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ ) を添加する前に 0.1% FBS の DMEM 培地で 24 時間培養処理した。

### (2) ウエスタンブロット

すべての細胞株において 70%コンフルエントの状態各種サイトカイン (IFN- $\beta$  10,000 unit/ml、IFN- $\gamma$  10 ng/ml、TNF- $\alpha$  10 ng/ml、TGF- $\beta$  10 ng/ml) および poly-(I:C) (10  $\mu$ g/ml) を添加、12 時間後に RIPA buffer を用いて細胞回収した。タンパク 15  $\mu$ g で SDS-PAGE を行い、ニトロセルロース膜に転写、ラビット抗 RIG-I 抗体を用いて検出した。比較検証のためのコントロールとしてマウス抗  $\beta$ -actin 抗体を使用した。

### (3) リアルタイム PCR

ヒト悪性黒色腫細胞 501mel に IFN- $\beta$  (10,000 unit/ml) および poly-(I:C) (10  $\mu$ g/ml) を投与し、6 時間後に細胞を回収した。SYBR Green I を用いて蛍光検出し、各投与群の遺伝子発現量 (Ct 値) とコントロール群 (非刺激群) の Ct 値とを GAPDH で補正を行い、比較を行った。

### (4) Cell Viability Assay

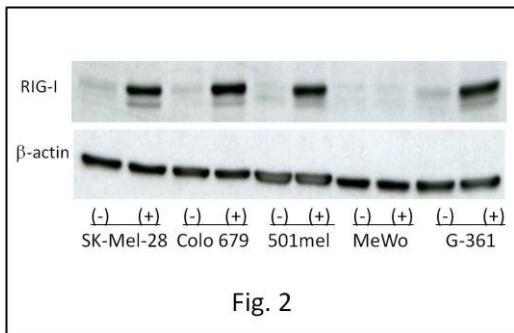
ヒト悪性黒色腫細胞 501mel を 96-well plate で培養、IFN- $\beta$  (10,000 unit/ml)、

IFN- $\gamma$  (10 ng/ml)、poly-(I:C) (10  $\mu$ g/ml) を添加、48 時間後に、CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega 社)にて細胞生存率を評価した。

#### 4. 研究成果

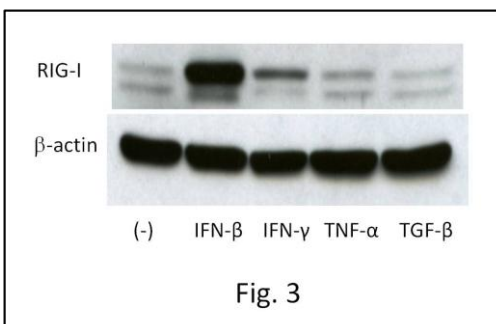
##### (1) ウェスタンブロット

5 種類のヒト悪性黒色腫細胞 (SK-Mel-28、Colo679、501mel、MeWo、G-361) における、IFN- $\beta$  刺激による RIG-I タンパクの発現誘導について検討した。SK-Mel-28、Colo679、501mel、G-361 細胞では、IFN- $\beta$  添加 24 時間後には非刺激群と比較して有意に RIG-I タンパク発現増強が認められた (Fig. 2)。



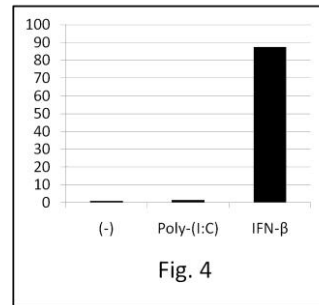
しかし、同じヒト悪性黒色腫細胞である MeWo では、IFN- $\beta$  誘導性 RIG-I タンパク発現はみられなかった。

また、IFN- $\beta$  刺激による RIG-I タンパクの発現誘導が確認された 501mel 細胞における各種サイトカイン (IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ ) による RIG-I 発現誘導を検討した。IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$  において、明らかな RIG-I 発現増強が認められたが、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  刺激ではその発現誘導効果はみられなかった (Fig. 3)。



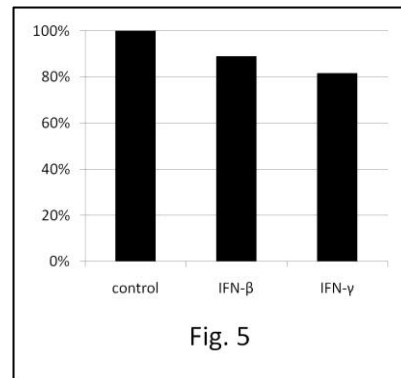
##### (2) リアルタイム PCR

501mel 細胞において、IFN- $\beta$  の刺激により RIG-I mRNA が強く誘導された。一方、合成二本鎖 RNA である poly-(I:C) ではほとんど増強はみられなかった (Fig. 4)。



##### (3) Cell Viability Assay

501mel 細胞において、サイトカイン刺激後 48 時間で、非刺激群 (100%) と比較して IFN- $\beta$  89.0%、IFN- $\gamma$  81.7% と細胞増殖能の低下がみられた (Fig. 5)。



#### 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 9 件)

- ① Takeuchi S, Matsuzaki Y, Ikenaga S, Nishikawa Y, Kimura K, Nakano H, Sawamura D. Garlic-induced irritant contact dermatitis mimicking nail psoriasis. J Dermatol 2011; 38(3):

280-282.

- ②Rokunohe D, Nakano H, Akasaka E, Kimura K, Takiyoshi N, Nakajima K, Aizu T, Kaneko T, Matsuzaki Y, Tsuchida S, Sawamura D. Raf kinase inhibitor protein expression correlates with differentiation but not with ERK phosphorylation in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Dermatol Sci*. 2010; 60(3): 199-201.
- ③Takeuchi S, Nakano H, Daiki R, Akasaka E, Nishizawa A, Matsuzaki Y, Sawamura D. Disseminated lupus vulgaris diagnosed more than 63 years after onset due to early misdiagnosis as a port-wine stain. *Clin Exp Dermatol* 2010; 35: e28-29.
- ④Sawamura D, Nakano H, Matsuzaki Y. Overview of epidermolysis bullosa. *J Dermatol* 2010; 37: 214-219.
- ⑤Nishikawa Y, Kaneko T, Takiyoshi N, Aizu T, Nakajima K, Matsuzaki Y, Nakano H, Sawamura D. Dermoscopy of eccrine poroma with calcification. *J Dermatol Case Rep* 2009; 3: 38-40.
- ⑥Takiyoshi N, Nakano H, Matsuzaki Y, Aizu T, Kaneko T, Rokunohe D, Akasaka E, Jin K, Sawamura D, Ohara K. An eclipse in the subungual space: a diagnostic sign for a subungual epidermal cyst? *Br J Dermatol* 2009; 161: 962-963.
- ⑦Matsuzaki Y, Kimura K, Nakano H, Hanada K, Sawamura D. Localized pagetoid reticulosis (Woringer-Kolopp disease) in early childhood. *J Am Acad Dermatol* 2009; 61: 120-123.
- ⑧Oshima H, Matsuzaki Y, Takeuchi S, Nakano H, Sawamura D. CD20+ primary cutaneous T-cell lymphoma presenting as

a solitary extensive plaque. *Br J Dermatol* 2009; 160: 894-896.

- ⑨皆川智子、萩原千尋、西川陽平、松崎康司、中野 創、澤村大輔、北山友佳子、金澤拓蔵、大見義紀：乾燥性皮膚に対する青森ヒバ抽出エキス配合スキンケア製剤の安全性および有用性に関する検討。西日本皮膚科、2009; 71(5): 512-516.

[学会発表] (計1件)

- ①Nishikawa Y, Matsuzaki Y, et al. A functional role of stimulator of interferon gene (STING) in antiviral response of human epidermal keratinocytes. European Society for Dermatological Research, 2010. 9. 30-10. 3, Helsinki, Finland.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松崎 康司 (MATSUZAKI YASUSHI)  
弘前大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：50322946

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：