

機関番号：13601
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2009～2010
課題番号：21791069
研究課題名（和文） MITF、BRAF、KITを併用分子標的とする悪性黒色腫の治療研究開発
研究課題名（英文） The development of combination molecular target therapy of MITF, BRAF, and KIT for melanoma.

研究代表者 木藤 健治 (KIDO KENJI)
信州大学・医学部附属病院・特任研究員
研究者番号：00447765

研究成果の概要（和文）：我々はこれまで、MITF はその発現が過剰でも過少でも増殖が抑制されることを明らかにし、MITF が悪性黒色腫における分子標的となりうることを示した。また DNA マイクロアレイの結果より、MITF と BRAF-MAPK 経路による増殖に関する制御遺伝子はそれぞれ異なっていることがわかった。MITF、BRAF、KITを個々に阻害することによる腫瘍抑制効果は認められた。しかし、3 剤を併用することにより腫瘍抑制効果の増強が期待されたが、個々の遺伝子の阻害剤を用いた時に比べて有意な増殖抑制効果は得られなかった。

研究成果の概要（英文）： Tumor growth was suppressed by the inhibitor of MITF, BRAF, and KIT, individually. Unexpectedly, the suppression of tumor growth was not significant by using the three inhibitors of MITF, BRAF, and KIT together, compared to the inhibitor of MITF, BRAF, and KIT, individually.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

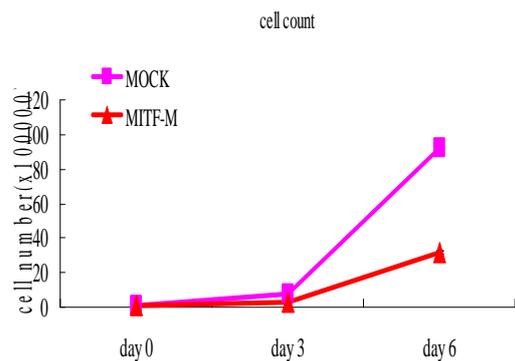
MITF (microphthalmia-associated transcription factor) は転写因子として、色素細胞においてその増殖や分化を制御する機能を持っており、またメラニン合成を制御する色素細胞関連遺伝子の制御遺伝子として知られている。しかしながら悪性黒色腫における MITF の機能に関しては、その発生に促進的に働くという報告 (Garraway, LA. et al. Nature 436, 117-122, 2005) (Widlund, HR. et al. J Cell Biol. 158, 1079-87, 2002) と、逆に抑制的に働くという報告 (Wellbrock, C. et al. J Cell Biol. 170, 703-708, 2005) の全く相反する報告がある。研究代表者である木藤は、慶應義塾大学医学部先端医科学研究所細胞情報部門 (河上裕教授) において、レンチウイルスベクターの系を用いた RNA 干渉、および MITF の強制発現系を用いて、様々な観点から悪性黒色腫における MITF の機能を検討してきた。その結果、MITF を標的とした RNA 干渉により、検討を行った悪性黒色腫細胞株 8 株全てにおいて明らかな G1 期停止を伴った強い増殖抑制を認めた。また、MITF の強制発現によっても同様の強い増殖抑制を認めた。マトリゲルを用いた運動能、浸潤能における検討においても MITF を標的とした RNA 干渉により明らかな抑制を認めた。さらに MITF と変異型 BRAF を RNA 干渉により阻害し、DNA マイクロアレイにて発現遺伝子の相違を検討したところ、それぞれ増殖に関わる下流遺伝子の発現が異なっていることがわかった。そこで MITF と変異型 BRAF の同時抑制を行ったところ、MITF 単独の抑制効果よりも著明にその効果が増強されることを見出した。これらの結果から、MITF は悪性黒色腫の増殖や生存

に、ある一定範囲の発現量においてのみ正の方向に働くと考えられ (Gray-Schopfer. et al. Nature 445, 851-857, 2007)、運動能、転移能などに対しても促進的に働いていることが確認され、MITF が悪性黒色腫の治療における新たな標的分子となりうることが示唆された。さらに MITF と BRAF-MAPK 経路の抑制は、MITF 単独の抑制では効果が弱い場合でも十分な効果を持ち、より強力な効果がある治療法となりうることを示した。(論文作成中)。また、肢端黒色腫や粘膜原発の悪性黒色腫では KIT の遺伝子異常が高頻度に認められることがわかっている (Curtin. et al. J Clin Oncol 24, 4340-4346, 2006)。Curtin らの報告では 102 例の様々な個所に出現した悪性黒色腫における KIT 遺伝子の遺伝子増幅を検討したところ、粘膜原発では 39%、肢端黒色腫では 36% の症例に遺伝子増幅を認めることがわかった。また最近の報告で、癌を発現すると考えられる KIT 遺伝子の変異が肛門部の悪性黒色腫で 15% (Antonescu. et al. Int J Cancer 121, 257-264, 2007)、口腔内の粘膜原発のものでは 22% に認められることもわかった (Rivera. et al. Virchows Arch 452, 27-32, 2008)。KIT 遺伝子の異常は、肥満細胞腫や急性骨髄性白血病、GIST などとその悪性形質に関与すると考えられており、粘膜原発の悪性黒色腫や肢端黒色腫においても同様に、重要な癌遺伝子として働いている可能性が考えられる。これらのことより、粘膜原発の悪性黒色腫や肢端黒色腫においては KIT を標的とした分子標的療法が治療の選択肢になるのではないかと考えられた。当研究室において芦田らは、当科における粘膜原発の悪性黒色腫と肢端黒色腫の臨床検体 24 例を用

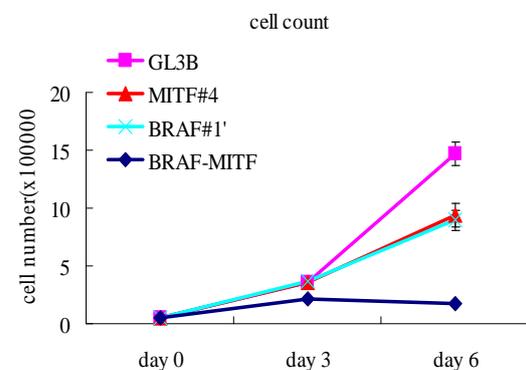
いて KIT 遺伝子の発現や変異を検討した。その結果 13 例 (48%) に KIT の発現を認め、多くの症例で KIT 受容体がリン酸化されていることがわかった (Ashida. Et al. Int J Cancer, in press, 2008)。そしてこれらの症例では SCF/KIT の autocrine または paracrine により KIT が活性化されていると考えられた。細胞株における KIT の阻害剤である sunitinib を用いた検討では、D820Y という KIT の変異を持つ株と、SCF により KIT が活性化されている株の 2 つの肢端黒色腫株において増殖抑制を認め、KIT の分子標的としての重要性を示唆した。

MITF は色素細胞における master gene として知られているが、増殖に対するその機能に関しては相反する報告がいくつも出ており、その制御機構は明らかではない部分が多い。研究代表者である木藤は、現在までに MITF はその発現が過剰でも過少でも増殖が抑制されることを明らかにし、MITF が悪性黒色腫における分子標的となりうることを示した。また DNA マイクロアレイの結果より、MITF と BRAF-MAPK 経路による増殖に関する制御遺伝子はそれぞれ異なっていることがわかっている。そこで MITF と変異型 BRAF の発現同時抑制を行ったところ、それぞれの丹毒抑制よりも著明に強い増殖抑制効果が得られることを証明した。また KIT の阻害剤によって肢端黒色腫において増殖抑制効を誘導できることが証明された。

1375melにおけるMITF-M抑制薬理による増殖抑制



RN.GによるBRAF^{V600E}とMITFの同時抑制に伴う増殖抑制とG1アレスト



2. 研究の目的

本研究においては、in vivo において MITF と変異型 BRAF の同時抑制による効果を検討し、同様に MITF と KIT の同時抑制についても検討することを目的とした。

3. 研究の方法

MITF の in vivo での干渉実験は、NOD/SCID マウスを用いて悪性黒色腫細胞株担癌マウスを作製し、化学合成した siRNA を腫瘍内に直接注入することによりその効果を検討する。MITF の RNA 干渉と MAPK 経路阻害剤の併用実験に関しても同様に担癌マウスを作製し、MEK 阻害剤 U0126 や既に臨床で用いられ

れている C-Raf 阻害剤の Sorafenib を投与し、更に siRNA を腫瘍内に局注することによりその併用効果を検討する。KIT 阻害剤である sunitinib と MITF の RNA 干渉を、BRAF 変異のない細胞株にてまずは *in vitro* で検討し、それぞれ単独よりも効果増強があるようならば、MITF と MAPK 同時抑制実験同様に担癌マウスを作製し、*in vivo* でもその併用効果を検討する。

具体的には、

1) まずは *in vivo* での MITF RNA 干渉による効果の検討を行う。*in vitro* 実験で MITF を標的とする RNA 干渉により、強い増殖抑制を認めた悪性黒色腫細胞株である 624mel を NOD/SCID マウスの皮下に siRNA 局注 3 日前に移植し、より臨床応用を考えた形として、つまり現在ヒトへの安全性が確立されていないウイルスベクターなどを使った *ex vivo* の系などではなく、化学合成した siRNA を腫瘍内に直接局注することによりその効果を検討する。局注する siRNA は 20-40 µg 使用し、コントロールとして PBS を用いる。腫瘍の計測は 2-3 日毎に行い、体積を長径、短径より求める。ただしこの際問題となるのは導入効率とその効果の持続であるが、導入効率に関しては MITF 抗体を用いた腫瘍組織の免疫組織染色により MITF のタンパク発現低下を確認する。導入効率が低く MITF のタンパク発現低下を確認できない場合は、siRNA を核酸と結合する融合ペプチドである MPG (Simeoni, F., et al. *Nucleic Acid Res* 31, 2717-2724, 2003) やコレステロール基を siRNA に付加するなど (Soutscheck, J., et al *Nature* 432, 173-178, 2004) の化学修飾を siRNA に施すことにより、*in vivo* も含め導入効率が格段に改善されることが報告されている。現在ではこういった各種

の化学修飾を施し、*in vivo* モデルにおいても十分な導入効率を保証する siRNA が市販されているためこれらを使用する事により飛躍的に導入効率を上げることが可能である。その他にも導入法として、エレクトロポレーション法による効率的な導入も報告されており (Nakai, N., et al. *Gene Ther.* 14(4), 357-65, 2007)、更なる導入効率の増加が必要な場合は導入法も検討する。また効果の持続に関しては、通常 siRNA の効果は 1 週間から 10 日であり、1 週間から 10 日毎に局注を繰り返すことによりその効果を持続できると考えられる。MITF の RNA 干渉と MAPK 経路阻害剤の併用に関しては、上記と同じ悪性黒色腫細胞株担癌マウスに MEK 阻害剤 U0126 や、既に臨床で用いられている C-Raf 阻害剤の Sorafenib を投与し、MITF を標的とする siRNA を用いて MITF に対する RNA 干渉を同時に行い、腫瘍増殖の抑制効果を検討する。

2) MITF の RNA 干渉と KIT 阻害剤の併用に関しては、まず細胞株を用いて *in vitro* での検討を行う。BRAF の変異がなく、KIT の阻害剤である sunitinib により増殖抑制を認めた細胞株である SM3 と SMYM-PRGP に対して、KIT 阻害剤と MITF に対する RNA 干渉の併用効果を検討する。

4. 研究成果

3 剤を併用することにより腫瘍抑制効果の増強が期待されたが、個々の遺伝子の阻害剤を用いた時に比べて有意な増殖抑制効果は得られなかった。現在、阻害剤の濃度を再検討するとともに、阻害剤を用いても増殖している細胞を解析し、細胞内における遺伝子の発現量および変異の変化などを検討している。さらに *in vivo* でのメラノーマ細胞の増殖抑制効果も検討するために NOD/SCID マウスとメラノーマ培養細胞を用いて、MITF の RNA 干渉と KIT 阻害剤 sunitinib、BRAF 変異阻害剤

PLX4032 による増殖抑制効果を検討した。現在までの実験結果では、個々の遺伝子を阻害することによる増殖抑制効果は認められた。しかし、MITF, BRAF, KIT に対する阻害剤の併用によって、個々の遺伝子を抑制した場合と比べて優位な増殖抑制効果を示すことはできなかった。やはり、阻害剤の濃度を再検討が必要であるとともに、増殖している細胞の解析を進めている。

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)

[その他]

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-hifu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 木藤 健治 (KIDO KENJI)
信州大学・医学部附属病院・特任研究員
研究者番号 : 00447765