

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 21 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14973

研究課題名（和文）イヌ悪性黒色腫に対する新規治療法の開発に向けたTGF- $\beta$ による癌悪性化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of cancer progression induced by TGF-beta to develop novel therapies for canine malignant melanoma

研究代表者

酒居 幸生 (Sakai, Kosei)

大阪公立大学・大学院獣医学研究科・講師

研究者番号：90844192

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：イヌの悪性黒色腫（MM）は臨床的挙動が極めて悪い腫瘍であるが、詳細な分子病態は未だ明らかにされていない。本研究では、イヌMM細胞の悪性化促進作用（増殖能および血管新生能の亢進）と抑制作用（上皮間葉転換、浸潤能および転移能の抑制）の両方にTGF- $\beta$ が関与する可能性を示し、イヌMMの進行においてTGF- $\beta$ が多面的な役割を担う重要な分子であることを明らかにした。また、イヌMM細胞のTGF- $\beta$ シグナルにAKT経路が含まれており、本経路を介して血管新生能が亢進される可能性も示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医学領域では腫瘍とTGF- $\beta$ との関連が盛んに研究されており、その中でTGF- $\beta$ は様々な腫瘍の上皮間葉転換、浸潤能および転移能を促進することが知られている。しかし、本研究では逆にTGF- $\beta$ がこれらの機能を抑制するという全く新しい知見を得た。この成果はこれまでの概念を覆す発見となる可能性があり、大変興味深いものである。また、本研究によりTGF- $\beta$ を直接標的とする治療法はむしろ悪性化を促進する危険性が示唆されたため、TGF- $\beta$ の悪性化促進作用のみに関与する下流シグナルが理想的な治療標的であると考えられた。この成果はイヌMMに対する今後の治療開発において重要な基礎的知見となる。

研究成果の概要（英文）：Canine malignant melanoma (MM) is a malignant tumor with extremely poor clinical behavior. However, the detailed molecular pathogenesis has not yet been identified. This study showed that TGF- $\beta$  may be involved in both promotive (enhancement of proliferative and angiogenic potential) and suppressive effects (inhibition of epithelial-mesenchymal transition, invasive and metastatic potential) on the malignant transformation of canine MM cells. These results suggest that TGF- $\beta$  is an important molecule that plays a multifaceted role in the progression of canine MM. In addition, this study also showed that TGF- $\beta$  signaling in canine MM cells includes the AKT pathway, which may enhance angiogenic potential.

研究分野：腫瘍学

キーワード：TGF- $\beta$  悪性黒色腫 イヌ 増殖 血管新生 上皮間葉転換 浸潤・転移 シグナル伝達経路

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、獣医療の発展に伴ってペットの高齢化が進み、本邦ではヒトと同様にイヌでも腫瘍が死因の第1位を占めている。そのため、腫瘍の制圧は医学のみならず、獣医学でも重要な研究課題である。悪性黒色腫(MM)はイヌに発生する腫瘍の中でも生物学的挙動が極めて悪く、診断後早期に死に至る大変深刻な疾患である。上記の理由から、イヌ MM に関する研究が国内外で盛んに行われているものの、現在までにその克服には至っていない。

Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) は TGF- $\beta$  ファミリーに属するサイトカインで細胞増殖や血管新生、細胞運動などの多彩な生理機能に関与する。医学領域では腫瘍と TGF- $\beta$  との関連が盛んに研究されており、その中で TGF- $\beta$  は様々な腫瘍の進行に深く関与することが知られている。一方、獣医学領域では TGF- $\beta$  に関する研究が進んでおらず、イヌ MM での役割はほとんど分かっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、TGF- $\beta$  によって引き起こされるイヌ MM の病態生理を明らかにすることで、新規治療法の開発に向けた基礎的知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

3種類のイヌ MM 細胞株 (CMM-1、KMeC および LMeC) を用いて、以下の実験 1~8 を行った。

(1) 各細胞株における TGF- $\beta$  と TGF- $\beta$  受容体の発現を RT-PCR およびウエスタンブロットにより解析した。

(2) 各細胞株の培養液中に TGF- $\beta$  または TGF- $\beta$  阻害剤を添加後、生細胞数を WST-8 により測定した。

(3) 各細胞株の培養液中に TGF- $\beta$  または TGF- $\beta$  阻害剤を添加後、培養上清中の vascular endothelial growth factor (VEGF) 濃度を ELISA により測定した。

(4) 各細胞株の培養液中に TGF- $\beta$  または TGF- $\beta$  阻害剤を添加後、上皮間葉転換 (EMT) に関連する分子 (転写因子: Slug、Twist、上皮系マーカー: E-cadherin、間葉系マーカー: N-cadherin、 $\alpha$ -SMA) の発現をウエスタンブロットにより解析した。

(5) CMM-1 および LMeC の培養液中に TGF- $\beta$  または TGF- $\beta$  阻害剤を添加後、細胞浸潤アッセイと創傷治癒アッセイを実施した。

(6) 医学領域の先行研究では、TGF- $\beta$  シグナルとして Smad ファミリーと呼ばれる一群の分子を介する経路 (Smad 経路) とこれらを介さない経路 (非 Smad 経路) が報告されている。そこで、Smad 経路および非 Smad 経路を構成する分子のリン酸化状態をウエスタンブロットにより解析し、イヌ MM 細胞における TGF- $\beta$  シグナルを探索した。

(7) イヌ MM 細胞に対する TGF- $\beta$  の悪性化促進作用のうち、増殖能の亢進に関連するシグナル分子を探索するために、KMeC の培養液中に ERK 阻害剤または AKT 阻害剤を添加後、生細胞数を WST-8 により測定した。

(8) イヌ MM 細胞に対する TGF- $\beta$  の悪性化促進作用のうち、血管新生能の亢進に関連するシグナル分子を探索するために、CMM-1 および LMeC の培養液中に AKT 阻害剤を添加後、培養上清中の VEGF 濃度を ELISA により測定した。

### 4. 研究成果

(1) いずれの細胞株においても TGF- $\beta$  および TGF- $\beta$  受容体の発現が認められた。この結果から、TGF- $\beta$  が「腫瘍細胞によるオートクリン」や「腫瘍細胞とその周辺細胞 (免疫細胞など) との相互作用」を介してイヌ MM の病態に関与する可能性が考えられた。

(2) KMeC の生細胞数は TGF- $\beta$  により増加し、TGF- $\beta$  阻害剤により減少した。一方、残りの細胞株

では TGF- $\beta$  や TGF- $\beta$  阻害剤による生細胞数の有意な変化が認められなかった。したがって、TGF- $\beta$  は一部のイヌ MM 細胞に対して増殖能を亢進させることが明らかになった。

(3) CMM-1 および LMeC における培養上清中の VEGF 濃度は TGF- $\beta$  により増加し、TGF- $\beta$  阻害剤により減少した。一方、KMeC の培養液ではすべての条件で VEGF 濃度が検出限界以下であった。したがって、TGF- $\beta$  は一部のイヌ MM 細胞に対して血管新生能を亢進させることが明らかになった。

(4) 各細胞株における Slug および N-cadherin の発現は TGF- $\beta$  により低下し、TGF- $\beta$  阻害剤により増加した。CMM-1 および LMeC における Twist 発現も TGF- $\beta$  により低下し、TGF- $\beta$  阻害剤により増加したが、KMeC では明らかな変化が認められなかった。また、各細胞株における E-cadherin および  $\alpha$ -SMA の発現は TGF- $\beta$  や TGF- $\beta$  阻害剤による明らかな変化が認められなかった。これらの結果から、TGF- $\beta$  はイヌ MM 細胞に対して EMT を誘導しないと考えられた。

(5) 細胞浸潤アッセイは CMM-1 のみが評価可能であり、浸潤細胞数は TGF- $\beta$  により低下し、TGF- $\beta$  阻害剤により増加した。創傷治癒アッセイは LMeC のみが評価可能であり、創傷閉鎖率は TGF- $\beta$  により低下し、TGF- $\beta$  阻害剤により増加した。これらの結果から、TGF- $\beta$  はイヌ MM 細胞に対して浸潤能や転移能を抑制する可能性が示された。

(6) いずれの細胞株でも Smad 経路を構成する Smad 2 および 3 のリン酸化は TGF- $\beta$  により亢進、TGF- $\beta$  阻害剤により抑制された。一方、非 Smad 経路では各分子で異なる結果が得られた。ERK のリン酸化は TGF- $\beta$  により抑制、TGF- $\beta$  阻害剤により亢進された。一方、AKT および p38 のリン酸化は TGF- $\beta$  により亢進、TGF- $\beta$  阻害剤により抑制された。JNK のリン酸化はいずれの条件でも検出されなかった。これらの結果から、ヒトの様々な腫瘍細胞と同様にイヌ MM 細胞でも、TGF- $\beta$  シグナルとして Smad 経路が存在すると考えられた。また、非 Smad 経路では様々な結果が得られたものの、TGF- $\beta$  や TGF- $\beta$  阻害剤により ERK、AKT および p38 のリン酸化状態が変化したことから、これらの経路の関与が示唆された。

(7) ERK 阻害剤または AKT 阻害剤を添加しても、KMeC の生細胞数に有意な変化は認められなかった。したがって、TGF- $\beta$  による増殖能の亢進に ERK 経路および AKT 経路が関与している可能性は低いと考えられた。

(8) CMM-1 では TGF- $\beta$  により培養上清中の VEGF 濃度が増加し、この変化は AKT 阻害剤により抑制された。したがって、TGF- $\beta$  による血管新生能の亢進に AKT 経路が関与している可能性が示された。ただし、AKT 阻害剤のみでは TGF- $\beta$  による血管新生能を完全に抑制できなかったことから、AKT 以外の経路も関与している可能性がある。一方、LMeC では TGF- $\beta$  により培養上清中の VEGF 濃度が増加したものの、この変化は AKT 阻害剤により抑制されなかった。これらの結果から、イヌ MM 細胞の血管新生能に関与する TGF- $\beta$  シグナルは細胞株で異なる可能性が示され、その複雑な経路の全容を明らかにするには更なる検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村友紀, 酒居幸生, 中川貴之, 野口俊助, 島村俊介, 鳩谷晋吾, 嶋田照雅, 杉浦喜久弥
2. 発表標題 イヌの悪性黒色腫におけるTransforming Growth Factor- のオートクリンシグナル伝達とその機能解析
3. 学会等名 第18回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村友紀, 野口俊助, 中川貴之, 島村俊介, 酒居幸生
2. 発表標題 イヌ口腔内悪性黒色腫の浸潤・転移におけるTGF- の役割
3. 学会等名 第165回日本獣医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kosei Sakai, Yuki Nakamura, Shunsuke Noguchi, Takayuki Nakagawa
2. 発表標題 Autocrine TGF- signaling and its functional analysis in canine oral malignant melanoma
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------