

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22591228

研究課題名（和文） SIRT1 を標的とする新しいメラノーマ治療の展開

研究課題名（英文） Development of novel melanoma therapy targeting SIRT1

研究代表者

山下 利春 (YAMASITA TOSIHARU)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：50167706

研究成果の概要（和文）：SIRT1 はメラノーマ細胞の細胞質に局在し、発現抑制によりメラノーマ細胞の移動が抑制された。SIRT1 は突起部分の細胞膜直下で F-actin と共局在し、血清増殖因子により SIRT1, PIP-3, Akt の集積を認めた。B16F1 メラノーマ移植マウスに SIRT1 阻害剤を投与した群では腫瘍細胞の腹腔内浸潤およびリンパ節転移が抑制され、担癌マウスの生存期間が延長した。以上より、SIRT1 阻害はメラノーマ転移の抑制に応用できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：SIRT1 was localized in the cytoplasm of melanoma cells and the SIRT1 inhibitor nicotinamide suppressed their migration. SIRT1 was detected with F-actin in the protuberance of the cell membrane and accumulated with PIP-3 and AKT. Nicotinamide inhibited the peritoneal invasion and lymph node metastasis of transplanted B16F1 cells in C57BL mice and extended their life span. These results indicate that SIRT1 inhibition may be applicable for the suppression of metastatic melanoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：分子腫瘍学，色素細胞学

### 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫（メラノーマ）は転移しやすく遠隔転移を起こしたメラノーマはきわめて予後が悪い。日本人には末端黒子型メラノーマが多いが、この病型に VRAF 変異は少ないため VRAF 阻害薬の適用は限られる。腫瘍の遺伝子変化に関わらず使用でき、有効で副作用の少ないメラノーマの全身療法が求められている。

SIRT1 は酵母の長寿遺伝子 Sir2 の哺乳類オ

ルソログで、NAD 依存性の脱アセチル化酵素活性を有する。SIRT1 は核と細胞質間をシャトルし、心不全などの病態では核に局在し細胞を酸化ストレスから防御する (Tanno M et al: J Biol Chem 282: 6823, 2007)。胎児脳では SIRT1 が神経幹細胞の分化の際に一時的に核に移行し、Notch を抑制して神経細胞分化を促すスイッチとして働くことが示唆された (Hisahara S et al: Proc Natl Acad Sci USA 105: 15599, 2008)。

## 2. 研究の目的

腫瘍細胞の接着と遊走には lamellipodia (膜状仮足) の形成が必要である。lamellipodia の伸長・退縮はアクチンフィラメントの重合・脱重合, 分枝・脱分枝によって誘導され, 複数の蛋白質と相互作用が関与する (Ridley AJ et al: Cell 145: 1012, 2011; Takenawa T & Suetsugu S: Nat Rev Mol Cell Biol 8: 37, 2007). 細胞の接着と遊走における SIRT1 の役割は明らかにされていないが, 酵母 Sir2 がアクチンと結合し細胞の極性に関与することが報告されている (Liu B et al: Cell 140: 257, 2010).

メラノサイトも神経内分泌系細胞に属するため, SIRT1 がメラノーマ細胞の移動に関係することが推測される。メラノーマ細胞における SIRT1 を検討した結果, 細胞質に発現を認めたため, SIRT1 は細胞膜蛋白質の機能を調節する可能性が推測された。本研究はメラノーマ細胞における SIRT1 の細胞内局在を検討し, SIRT1 の細胞移動に置ける機能を解析し, SIRT1 阻害薬をメラノーマ治療に用いる可能性について研究した。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養細胞を用いた実験

マウスメラノーマ細胞 B16F1, B16F10, ヒトメラノーマ細胞 M418 を培養し, 5~10 mM ニコチンアミドを添加して, wound healing アッセイ, マトリゲルアッセイを行った。ノックダウン実験は SIRT1-siRNA を発現するレンチウイルス (Hisahara S et al: Proc Natl Acad Sci USA 105: 15599, 2008) を用いた。SIRT1 の細胞内局在は, SIRT1 抗体 (Sakamoto J et al: FEBS Lett 556: 281, 2004) と Alexa Fluor 488/594 標識抗ラビット抗体を用いて共焦点顕微鏡により観察した。

### (2) メラノーマ移植マウスを用いた実験

B16F1 を C57BL6 マウス皮下に移植し, ニコチンアミド (0.5 mg/g 体重) を腹腔投与しメラノーマの転移と担癌マウスの生命予後を解析した。SIRT1-siRNA 導入により SIRT1 発現をノックダウンした B16F1 細胞を用いて同様の実験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) メラノーマ細胞における SIRT1 の局在と細胞移動に対する効果

マウスメラノーマ B16F1 およびヒトメラノーマ MM418 細胞における SIRT1 の発現と局在を検討した。蛍光抗体法および細胞分画法のいずれにおいても SIRT1 はメラノーマ細胞の細胞質に局在した。SIRT1 阻害薬ニコチンアミドはメラノーマ細胞の増殖に影響せず,

メラノーマ細胞の移動を抑制した。SIRT1-shRNA により SIRT1 発現をノックダウンした B16F1 細胞は, コントロール細胞に比べ遊走能が低下した。

### (2) 細胞膜突起部 (lamellipodium) における SIRT1 の発現

B16F1 細胞の免疫染色により, 細胞移動方向の突起部分の細胞膜直下で SIRT1 と F-actin との共局在を認めた。血清増殖因子により SIRT1, PI3-K, phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate (PIP-3), AKT の活性化と lamellipodium への集積が観察された。一方, SIRT1 阻害により, B16F1 細胞の細胞移動, lamellipodium の形成, および PIP-3 の集積が抑制された。これらの結果より, SIRT1 による細胞移動の促進は, SIRT1 の lamellipodium への集積と増殖因子刺激による PI3-K/PIP-3 シグナル経路の活性化が関与することが示唆された。

### (3) メラノーマ移植マウスを用いた実験

C57BL マウス皮下に B16F1 細胞を移植し, メラノーマ細胞の浸潤と転移に対するニコチンアミドの効果を検討した。ニコチンアミドを腹腔内投与された担癌マウスでは, 移植 B16F1 細胞の腹腔内浸潤およびリンパ節転移が抑制され, 担癌マウスの生存期間の延長を認めた。SIRT1 発現をノックダウンした B16F1 細胞を用いた移植実験においても, コントロールマウス群と比較して腫瘍細胞の浸潤と転移が抑制された。

### (4) メラノーマにおける SIRT1 の発現

色素性母斑, 原発および転移性メラノーマの切除組織を SIRT1 抗体で染色し, SIRT1 の発現と局在を検討した。SIRT1 は母斑細胞に発現せず, 原発メラノーマの浸潤胞巣と転移巣に発現を認めた。マウスモデルの治療実験及びメラノーマ組織の染色より, SIRT1 阻害はメラノーマ転移の抑制に応用できる可能性が示された。

## 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 10 件)

- ① Ito S, Nishigaki A, Ishii-Osai Y, Ojika M, Wakamatsu K, Yamashita T, Tamura Y, Ito A, Honda H, Nakayama E, Jimbow K: Mechanism of putative neo-antigen formation from N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol, a tyrosinase substrate, in melanoma models. Biochemical Pharmacology 84:646-53, 2012.
- ② Ito A, Yamaguchi M, Okamoto N, Sanematsu Y,

- Kawabe Y, Wakamatsu K, Ito S, Honda H, Kobayashi T, Nakayama E, Tamura Y, Okura M, Yamashita T, Jimbow K, Kamihara M: T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating lymphocytes after hyperthermia using functionalized magnetite nanoparticles. *Nanomedicine* (epub ahead of print) doi:10.2217/NNM.12.142, 2012.
- ③ Kan Y, Okabayashi T, Yokota S, Yamamoto S, Fujii N, Yamashita T: Imiquimod Suppresses Propagation of Herpes Simplex Virus 1 by Upregulation of Cystatin A via the Adenosine Receptor A1 Pathway. *J Virol* 86: 10338-46, 2012.
- ④ Ishii-Osai Y, Yamashita T, Tamura Y, Sato N, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Nakayama E, Okura M, Jimbow K: N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol induces apoptosis in B16F1 cells and mediates tumor-specific T-cell immune responses in a mouse melanoma model. *J Dermatol Sci* 67: 51-60, 2012.
- ⑤ Horio Y, Hayashi T, Kuno A, Kunimoto R: Cellular and molecular effects of sirtuins in health and disease. *Clin Sci*. 121, 191-203, 2011. doi: 10.1042/CS20100587
- ⑥ Hori SY, Kuno A, Hosoda R, Tanno M, Miura T, Shimamoto K and Horio Y: Resveratrol ameliorates muscular pathology in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *J Pharmacol Exp Ther* 338: 784-794, 2011.
- ⑦ Hida T, Sohma H, Kokai Y, Kawakami A, Hirosaki K, Okura M, Tosa N, Yamashita T, Jimbow K: Rab7 is a critical mediator in vesicular transport of tyrosinase-related protein 1 in melanocytes. *J Dermatol* 38: 432-441, 2011.
- ⑧ Sato A, Tamura Y, Sato N, Yamashita T, Takada T, Sato M, Osai Y, Okura M, Ono I, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K: Melanoma-targeted chemo-thermo-immuno (CTI) -therapy using N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol-magnetite nanoparticles elicits CTL response via heat shock protein-peptide complex release. *Cancer Science* 101: 1939-1946, 2010.
- ⑨ Tanno M, Kuno A, Yano T, Miura T, Hisahara S, Ishikawa S, Shimamoto K, Horio Y: Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. *J Biol Chem* 285, 8375-8382, 2010. doi: 10.1074/jbc.M109.090266.
- ⑩ Sugino T, Maruyama M, Tanno M, Kuno A, Houkin K, Horio Y: Protein deacetylase SIRT1 in the cytoplasm promotes nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *FEBS Lett* 584, 2821-2826, 2010. doi: 10.1016/j.febslet.2010.04.063.
- [学会発表] (計5件)
- ① Jimbow K, Tamura Y, Yoneta A, Kamiya T, Ono I, Yamashita T, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Nohara S, Nakayama E, Kobayashi T: Conjugation of Magnetite Nanoparticles with Melanogenesis Substrate, NPrCAP Provides Melanoma Targeted, in Situ Peptide Vaccine Immunotherapy through HSP Production by Chemo-Thermotherapy. *J Biomat Nanobiotech*, 2012. March.
- ② Yusuke S. Hori Y, Hayashi T, Kuno A, Hosoda R, Horio Y: Resveratrol ameliorates muscle pathogenesis in mdx

mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. Society for Neurosci. Washington DC, Nov 12-16, 2011.

- ③ Ishii-Osai Y, Yamashita T, Okura M, Tamura Y, Sato N, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K: N-Propionyl-4-S-Cysteminyphenol generates reactive oxygen species and mediates apoptosis in pigmented melanoma cells. International Pigment Cell Conference. 2011 Sep 20-24, Bordeaux, France.
- ④ Hori Y, Kuno A, Hosoda R, Tanno M, Miura T, Shimamoto K, Horio Y: Resveratrol ameliorates dystrophic muscle pathogenesis in mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. Gordon Research Conference Muscle Myogenesis: New Horizons for Myogenesis. Aug 28-Sep 2, 2011, Waterville Valley Resort, Waterville Valley, NH, USA.
- ⑤ Kunitomo R, Jimbow K, Yamashita T, Okura M, Hirobe T, Sato M, Hisahara S, Horio Y: Inhibition of protein deacetylase SIRT1 suppresses in vitro and in vivo invasion of melanoma cells. The 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research (ESDR). 2010 Sep 8-11 Helsinki, Finland.

研究者番号 : 30181530

肥田 時征 (HIDA TOKIMASA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 90464487

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下 利春 (YAMASITA TOSIHARU)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 50167706

### (2) 研究分担者

堀尾 嘉幸 (HORIO YOSIYUKI)

札幌医科大学・医学部・教授