

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591614

研究課題名(和文)キナーゼ阻害薬の悪性黒色腫増殖抑制に対するメカニズムの解明

研究課題名(英文)The elucidation of the mechanism of growth suppression of melanoma by kinase inhibitor

研究代表者

原田 和俊 (HARADA, Kazutoshi)

山梨大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20324197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Wntシグナル伝達系は発癌に重要なシグナル伝達系である。悪性黒色腫においてもWntシグナルの活性化が報告されている。今回の研究では消炎鎮痛薬として使用されているcelecoxibが、Wntシグナル伝達系を選択的に阻害する分子標的薬として機能するかどうかを検討した。悪性黒色腫患者切除検体を用いてWntシグナルのkey moleculeであるβ-cateninの発現を検討したところ、この蛋白の発現が認められた。さらに悪性黒色腫細胞株にcelecoxibを添加したところ、増殖抑制効果が認められた。さらに興味深いことに、β-cateninの発現量とcelecoxibの増殖抑制効果に相関が認められた。

研究成果の概要(英文)：Wnt signaling pathway has a crucial role in tumorigenesis. Some reports have demonstrated that this signaling pathway was activated in melanoma. In this study, we evaluated whether celecoxib, a NSAID, inhibited Wnt signaling pathway or not. If celecoxib suppressed Wnt signaling, this drug can be used as a molecular targeting drug. The expression of beta-catenin in melanoma samples was assessed by immunohistochemistry. Some melanoma samples expressed beta-catenin. Next, celecoxib was administered in cell culture medium of melanoma cells. This experiment revealed that celecoxib inhibited the growth of melanoma cells. The relationship between the amount of beta-catenin in melanoma cells and the extent of growth suppression of melanoma cells was investigated, suggesting correlation of Wnt signal activation and the effect of growth inhibition of melanoma cells.

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：キナーゼ阻害薬 シグナル伝達系 悪性黒色腫

### 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は高率に転移を引き起こす近年増加傾向にある皮膚悪性腫瘍である。初期に診断されれば、切除のみで完治が可能であるが、ひとたび転移を生ずると効果的な化学療法が確立されておらず、予後は極めて不良となる。

近年の分子生物学や遺伝子工学を駆使した研究成果により、悪性黒色腫においてもシグナルの異常な活性化が起こっていることが解明された。EGF や KIT などが結合する増殖因子受容体の下流に位置し、主に増殖シグナルを伝達する B-Raf 蛋白をコードする遺伝子の変異が表在拡大型の悪性黒色腫で高頻度に検出されることが報告された。さらに蛋白の構造解析を応用し、変異を引き起こした B-Raf 蛋白を特異的に抑制する分子標的薬が開発され、この薬剤が B-Raf 変異をもつ悪性黒色腫に対して強力な抗腫瘍効果を示すことも示された。

しかし、日本人に多く発症する末端黒子型の悪性黒色腫では B-Raf 変異の頻度は低く、別の増殖シグナル異常な活性化が増殖や転移に関与している可能性が示唆されていた。今回、我々は発生期における臓器形成や発癌に関与する Wnt シグナル伝達系に注目することとした。このシグナル伝達系が腫瘍の増殖に重要な役割を演ずるかどうかについて検討することとした。さらに Wnt シグナルを選択的に抑制する薬剤が悪性黒色腫の増殖を抑制するかどうかについて検索することとした。

### 2. 研究の目的

Wnt シグナル伝達系が悪性黒色腫の増殖や転移に関与しているかどうかを検索する。さらに、Wnt シグナルを選択的に阻害する薬剤が腫瘍の増殖を抑制するかどうかについて検討する。

### 3. 研究の方法

- (1) Wnt シグナルの悪性黒色腫における活性化状態を本シグナルの key molecule である  $\beta$ -catenin の発現をメルクマールとして検索する。
- (2) 悪性黒色腫細胞株においても同様に  $\beta$ -catenin の発現量を免疫組織学的に検索することで、活性化状態を検討する。
- (3) Wnt シグナルを選択的に阻害する薬剤を悪性黒色腫細胞株に添加することで増殖の抑制や細胞死の誘導が引き起こされるかどうかを検討する。
- (4) その他、現在使用可能な薬剤が Wnt シグナルを抑制する可能性があるかどうかを検索する。

### 4. 研究成果

#### (1) 悪性黒色腫における $\beta$ -catenin の発

図 1 は悪性黒色腫患者の切除標本を用いた免疫組織染色である。悪性黒色腫の細胞のほぼすべてが  $\beta$ -catenin を発現している検体もある一方、図 2 のように腫瘍の先端部のみを発現している症例も認められた。このことは、Wnt シグナルが悪性黒色腫の増殖に關与するのみではなく、腫瘍に浸潤に關与している可能性を示唆している。この結果は、Wnt シグナルをターゲットとする分子標的薬は腫瘍の増殖抑制のみではなく、転移の予防薬として使用できる可能性を示している。

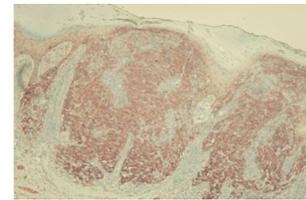


図1  $\beta$ -catenin 染色

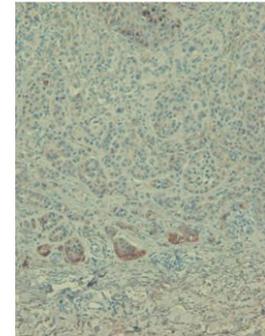


図2  $\beta$ -catenin 染色

#### (2) 悪性黒色腫細胞株における $\beta$ -catenin の発現

当科で樹立及び他の研究室より供与された悪性黒色腫細胞株における  $\beta$ -catenin の発現を免疫組織化学及びウエスタンブロット法で検討したところ、図 3 や図 4 に示すように細胞株ごとで発現量が異なることが判明した。

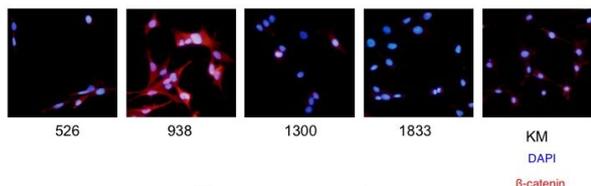


図3  $\beta$ -catenin 染色

KM HW A375 526 938 1300 1833 1937 2487

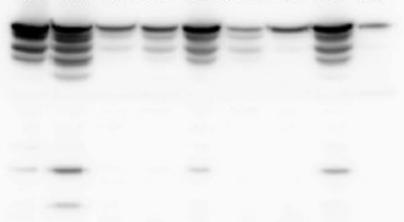
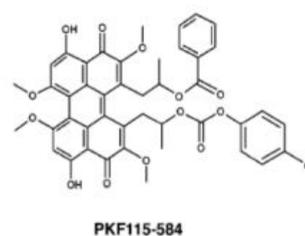


図4  $\beta$ -catenin の発現

#### (3) Wnt シグナルを抑制する分子標的薬による悪性黒色腫細胞株の増殖抑制

右の図 5 に示す PKF115-0584 は  $\beta$ -catenin と転写因子



PKF115-584

図5 Wnt シグナル阻害薬

Tcf との結合を選択的に阻害する分子標的薬である。当該薬剤が Wnt シグナルの活性化した悪性黒色腫細胞株の増殖を抑制するかどうかを検討した。その結果、図 6 に示す通りに悪性黒色腫の増殖を抑制したが、その効果は Wnt シグナルの活性化とは関連しなかった。この理由については現在検討中である。

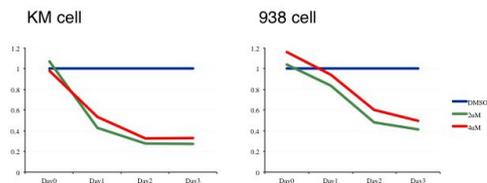


図 6 Wnt 阻害薬による増殖抑制

#### (4)悪性黒色腫細胞株における Wnt シグナル抑制薬の増殖抑制効果の検討

図 7 に示す、celecoxib は選択的 COX-2 阻害薬であり、胃潰瘍などの消化器症状を引き起こさない消炎鎮痛薬として多くの患者に投与されてきた。一方、本薬剤は大腸がんの細胞株に apoptosis を誘導することで、腫瘍抑制効果もあることが報告されている。そのメカニズムの詳細は明らかとなっていないが、核内

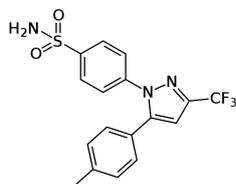


図 7 celecoxib

で  $\beta$ -catenin と結合し、遺伝子発現を誘導する Tcf-1、Tcf-4 の発現を抑制する可能性が示されている。そこで、上記の悪性黒色腫細胞株に celecoxib を加え、増殖が抑制されるかどうかを MTT assay を用いて検討した。

その結果、悪性黒色腫細胞株の一部では図 8 に示すように増殖抑制効果が認められた。さらに興味深いことに、上記に示すように celecoxib により増殖抑制効果が認められた細胞株 938 (図 9 左) は  $\beta$ -catenin を多く発現しており、一方、増殖抑制効果を示さなかった KM 細胞株 (図 9 右) は  $\beta$ -catenin の発現が低いことが判明した。この結果は、celecoxib が Wnt シグナル依存的に悪性黒色

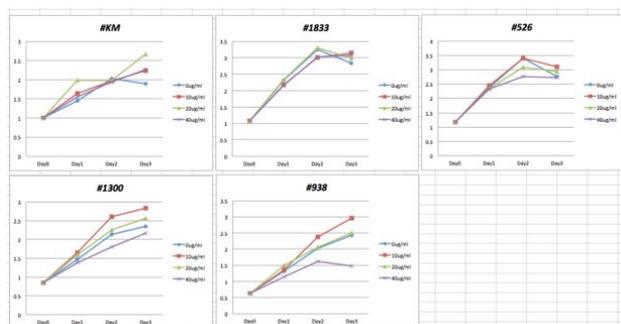
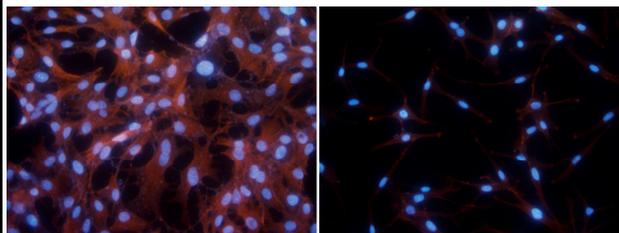


図 8 celecoxib による増殖抑制

腫細胞株の増殖を抑制している可能性を示している。

今後は TOPFLASH/FOPFLASH プラスミドを用いて、celecoxib が Wnt 依存的に増殖を抑制

しているかどうかを検討する。さらに、ここに示した celecoxib により増殖抑制効果が、大腸がん細胞株で示されているような apoptosis の誘導によるのか、それとも細胞周期を抑制する cyclin inhibitor の発現誘導によるのか、などについて詳細に検討する予定である。



938 細胞株 KM 細胞株

図 9 悪性黒色腫細胞の  $\beta$ -catenin の発現

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

(1) Takaki M, Inozume T, Matsuzawa T, Ando N, Yamaguchi M, Harada K, Kawamura T, Shibagaki N, Shimada S. Case of primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, with characteristics of follicular helper T cells. J Dermatol. 2014 May 10. doi: 10.1111/1346-8138.12493. 査読有

(2) Yamamoto S, Harada K, Ando N, Kawamura T, Shibagaki N, Tanaka M, Shimada S. Nodular melanoma on the hyponychium: clinical and dermoscopic features. J Dermatol. 2014 Mar;41(3):277-8. PubMed PMID: 24765666. 査読有

(3) Furuta J, Inozume T, Harada K, Shimada S. CD271 on Melanoma Cell Is an IFN-  $\gamma$ -Inducible Immunosuppressive Factor that Mediates Downregulation of Melanoma Antigens. J Invest Dermatol. 2014 May;134(5):1369-77. doi: 10.1038/jid.2013.490. Epub 2013 Nov 13. PubMed PMID: 24226422. 査読有

(4) Sakaizawa K, Goto Y, Kiniwa Y, Uchiyama A, Harada K, Shimada S, Saida T, Ferrone S, Takata M, Uehara H, Okuyama R. Mutation analysis of BRAF and KIT in circulating melanoma cells at the single cell level. Br J Cancer. 2012 Feb 28;106(5):939-46. doi: 10.1038/bjc.2012.12. Epub 2012 Jan 26. PubMed PMID: 22281663; PubMed Central PMCID: PMC3305957. 査読有

(5) Harada K, Inozume T, Kawamura T, Shibagaki N, Kinoshita T, Deguchi N, Shimada S. Two cases of autosomal recessive woolly hair with LIPH gene mutations. Int J Dermatol. 2013 May;52(5):572-4. doi:

10.1111/j.1365-4632.2012.05775.x. PubMed  
PMID: 23590372. 査読有

(6) Hasegawa S, Harada K, Morokoshi Y,  
Tsukamoto S, Furukawa T, Saga T. Growth  
retardation and hair loss in transgenic  
mice overexpressing human H-ferritin  
gene. Transgenic Res. 2013

Jun;22(3):651-8. doi:

10.1007/s11248-012-9669-0. Epub

2012 Oct 31. PubMed PMID: 23111618. 査読  
有

(7) Harada K, Morohoshi T, Ikeda T, Shimada  
S. A patient with pseudochromhidrosis  
presenting with pink nails. J Am Acad  
Dermatol. 2012 Aug;67(2):e74-5. doi:

10.1016/j.jaad.2011.08.026. PubMed PMID:

22794820. 査読有

(8) Yamaguchi M, Harada K, Ando N, Kawamura  
T, Shibagaki N, Shimada S. Marked  
response to imatinib mesylate in  
metastatic acral lentiginous melanoma on  
the thumb. Clin Exp Dermatol. 2011  
Mar;36(2):174-7. doi:

10.1111/j.1365-2230.2010.03885.x. PubMed

PMID: 20545949. 査読有

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/dermatol/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 和俊 (HARADA Kazutoshi)

山梨大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20324197