

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2011

課題番号：23659548

研究課題名（和文）

悪性黒色腫の化学療法抵抗性成立機序の解明

研究課題名（英文）

Molecular Mechanism of Chemotherapy Resistance of Malignant Melanoma

研究代表者

小川 靖 (Yasushi Ogawa)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：10567754

研究成果の概要（和文）：

本研究では、悪性黒色腫が示す化学療法抵抗性における、静止期細胞の役割について、分子マーカーとして蛋白質リン酸化酵素 DYRK1B に着目し、その関与を検討した。DYRK1B は悪性黒色腫由来の細胞で発現の上昇が認められ、また、実際の病理組織内でも発現が認められた。独自の DYRK1B 阻害剤は、抗癌剤に低感受性の悪性腫瘍細胞株において、抗癌剤への感受性を高める事が確認された。DYRK1B の発現様式を模した静止期悪性腫瘍細胞レポーターの作成を試みたが、完成に至っていない。

研究成果の概要（英文）：

The role of the protein kinase DYRK1B on chemoresistant G0 quiescent malignant melanoma cells was investigated. DYRK1B is enriched in G0 phase cells and shows enhanced expression in several chemoresistant carcinoma cell lines including malignant melanoma-derived cell lines. Histopathology confirmed that a population of cells have elevated expression of DYRK1B in malignant melanoma specimens. DYRK1B specific kinase inhibitor sensitized chemoresistant carcinoma cell lines to conventional anti-cancer drugs. Attempt to establish an *in vivo* quiescent cell imaging system has been so far unsuccessful.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚病理学・ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫などの進行癌において、外科的切除に加えて化学療法が行われるが、多くの場合、効果は限定的であり、未だに致死率が高いのが現状である。また、免疫療法も未だ確立した効果を上げるには到っていない。

悪性腫瘍が化学療法抵抗性を来す機序として、MDR(薬剤抵抗性遺伝子)、cancer stem cell、癌細胞集団中における静止期細胞

(quiescent cell, QC)の存在、などのメカニズムが提唱されている。特に後者のQCについてはcancer stem cell及びMDR発現との関連など含めて未知な部分が多い。

QCは細胞周期G0に静止しており、現在使用されているほとんどの抗癌剤の作用機序に対して抵抗性を示す。この現象が進行した悪性黒色腫において、術後化学療法を行ったにもかかわらず、しばしば腫瘍の再発が認め

られることの大きな原因であると考えられる。

現在、QC の臨床的重要性は推測されているが、研究手段の不足もあり、十分な研究がなされていない状態である。QC の G0 期静止を強制的に離脱させる手法の開発と、体内での QC の動態を生体イメージングにより追跡する技術を開発する事は、腫瘍 QC の病理的意義を直接的に証明しうる、決定的な研究手段となりうる。

これらの技術は悪性黒色腫のみならず、すべての悪性腫瘍に対して広く応用可能である。

2. 研究の目的

本研究では悪性黒色腫の QC 研究において、これまで行われていなかった二つの新規技術開発を行う。すなわち、

(1) 悪性黒色腫 QC 細胞の細胞内シグナリングを制御する事で、QC を細胞周期 G0 から強制的に離脱させる事のできる低分子化合物の開発、

(2) 悪性黒色腫 QC の実際の生体内での動態、腫瘍転移時における変化、抗癌剤治療時の生存などの情報を、in vivo で可視化し、時系列的に定量評価しうるシステムの樹立、の2つの技術の開発を目指す。

これらの新規技術をもとに、悪性黒色腫 QC を標的とした新たな化学療法戦略の提唱を行う事を目的とする。

現在、外科的切除の不可能な悪性腫瘍で最も広く選択される治療方法は化学療法である。現在多用されている抗がん剤の主な作用標的として、核酸代謝、DNA アルキル化、トポイソメラーゼ阻害、微小管重合が有るが、これらは特に分裂期細胞に対して殺傷性をもたらすものの、静止期にある細胞に対しては効果が限定的である。

本研究においては悪性黒色腫 QC を直接の研究課題とするが、本研究の進展により QC の化学療法抵抗性における重要性が解明されれば、すべての悪性腫瘍の病態の治療戦略の基盤を担う、普遍的かつ根源的なパラダイムを確立できる。

3. 研究の方法

悪性腫瘍の G0 期静止に関わる因子として、現在までに Grp78、ATF6、Rheb、mTOR、そして DYRK1B(dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated

kinase 1B)などが報告されている。この中でも特に DYRK1B についてはまだ研究は始まったばかりである。

DYRK1B は各種の悪性腫瘍で発現が亢進する事が知られており、正常組織では筋肉に特に多く発現しているが、そのノックアウトマウスは生存可能であり、病的な表現型も現在まで報告されていない。腫瘍細胞の G0 期離脱を調整する事で、細胞ストレスに対する抵抗性を高めることから survival kinase として働くことから、悪性腫瘍の新たな治療標的として期待されている。

申請者はこのリン酸化酵素に対する強力な特異的阻害剤 INDY を開発しており、また、予備的な実験において INDY が抗腫瘍細胞活性をもつ事から、悪性黒色腫の QC にたいする効果を検討する。

また、QC を in vivo で可視化する技術を確立するため、DYRK1B の細胞周期による動態を模倣する、レポーターアッセイ系を作製する事を目的とする。具体的には DYRK1B プロモーター制御化に長波長ルシフェラーゼと DYRK1B のタンパク分解制御部の融合タンパク質を安定発現する悪性黒色腫細胞株を樹立する。このレポーターの担癌マウスモデルでの挙動を確認し、INDY 投与化の効果を検討することを目的とする。

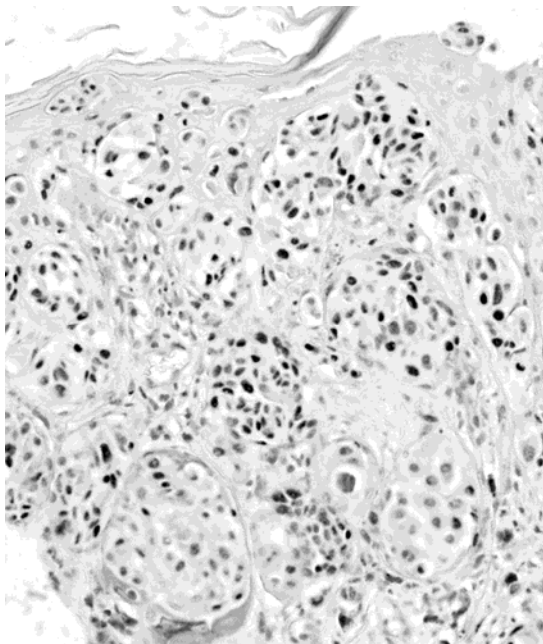
申請者らは先に DYRK1B をはじめとした DYRK 関連を強力に阻害しうる高選択性の低分子化合物 INDY を開発し、アフリカツメガエル胚を用いた in vivo 実験系でその有用性を明らかにした。

4. 研究成果

(1) DYRK1B が悪性黒色腫において実際に発現している事を確かめた。

悪性黒色腫早期病変 4 例、進行例 4 例の病理標本を用いて、抗 DYRK 1 B 抗体による免疫染色をおこなった。その結果、すべての標本で核内に DYRK 1 B が濃染する腫瘍細胞群が存在する事が確認された (図 1 に例を示す)。興味深い事に、症例ごとに DYRK 1 B の陽性細胞の比率に差が認められたが、有為な差は認めなかった。また、予後との明らかな相関もしくは一定の傾向を認めなかった。今回の検討は萌芽的な検討であった為、例数を増やした際に差が出現する可能性は否定できず、特に化学療法感受性について、より大規模な解析が望まれる。

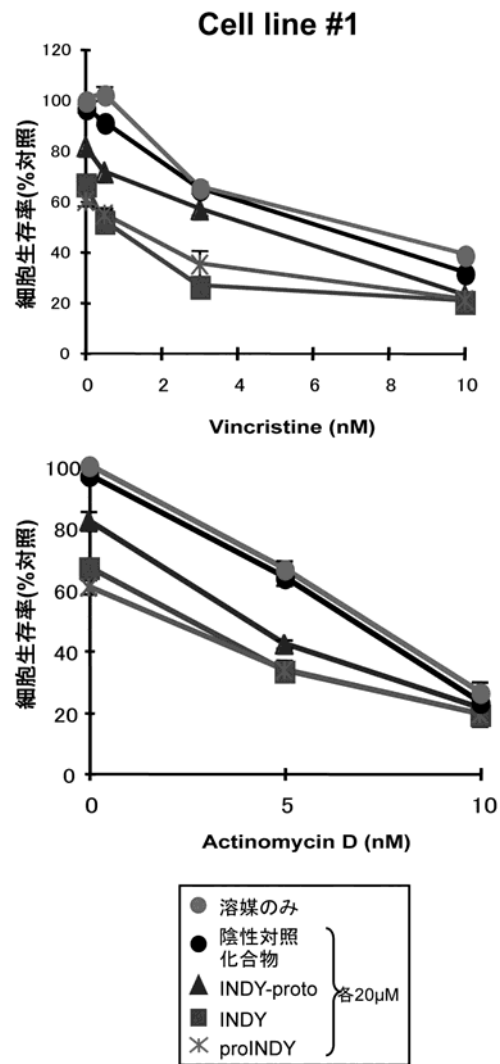
また、悪性黒色腫より樹立された培養細胞でも DYRK1B の発現は認められた。今回の研究では悪性黒色腫を直接の対象としているが、そのコンセプトは他の難治性の悪性腫瘍に広く応用できる。この点について、その可能性を検討するため、皮膚科領域から扁平上皮癌、他領域の難治性の悪性腫瘍として、膀胱癌、横紋筋肉腫、神経芽細胞腫などについて、各種細胞株を検討した。膀胱癌培養細胞株の一部を除いて、ほぼ全ての悪性腫瘍株で発現の上昇が認められた。



(図 1)

(2) 申請者らは先に DYRK1B をはじめとした DYRK 関連を強力に阻害しうる高選択性の低分子化合物 INDY を開発し (IC₅₀=0.23 μM)、アフリカツメガエル胚を用いた in vivo 実験系でその有用性を明らかにしている。INDY と、DYRK1B 阻害効果をもつ INDY 誘導体 protoINDY と proINDY を用いて、各種悪性腫瘍細胞株における、抗癌活性を検討した。INDY は DYRK1B 発現悪性腫瘍細胞株に対して、単体でも一定の細胞毒性を発揮する一方、HUVEC などの非腫瘍性の培養細胞においては、細胞毒性は軽微であった。抗癌剤に感受性の低い、複数の悪性腫瘍細胞株を用いて、既存の抗癌剤に加えて INDY とその関連分子を投与したところ、腫瘍細胞の抗癌剤感受性は増加した (図 2)。作用機序

の異なる抗癌剤を用いても、同じような結果が得られた為、抗癌剤の作用機序に非依存的に INDY は抗腫瘍アジュバント効果を示す事が確認された。



(図 2)

(3) DYRK1B では悪性細胞内において、G0 期にタンパク質レベルで 10 倍に亢進するという、特異な細胞周期依存的な発現パターンが知られている。この特性を利用して G0 期特異的なレポーターシステムの樹立を試みた。発光蛋白質 Luciferase、もしくは蛍光タンパク質 EGFP に、DYRK1B 由来のタンパク質分解配列である、PEST ドメインを融合した蛋白質を発現するプラスミドベクターを作成し、DYRK1B のプロモーター配列を上流に

配置した。また、この為に、ライフテクノロジー社の **Jump-In** 技術を用いて安定発現株を容易に作成する系を作成した。配列の異なる複数のベクターを検討したものの、**in vivo** イメージングを行うに足る、十分なシグナルの集積を **G0** 期に特異的に得られなかった。

(4) 結論として、本研究の結果は **DYRK1B** 阻害剤が **QC** を標的として、悪性黒色腫をはじめとする、化学療法抵抗性の腫瘍のアジュバントとして有用である事を示唆している。**DYRK1B** の阻害剤は、予備的な研究から、生体に大きな有害事象をもたらさないと考えられ、今後、**INDY** とその関連物質は、様々な悪性腫瘍の治療アジュバント薬としての開発リードとして期待される。

本研究を行っている過程で、米国の **Friedman** のグループから、同じく **DYRK1B** 阻害による、抗癌剤のアジュバント効果を報告した複数の論文が上梓されている (*Mol Cancer Ther.* 2011、*Int J Cancer.* 2013)。これらはそれぞれ、膀胱癌由来と卵巣癌由来の腫瘍細胞株を対象にした **in vitro** の研究であり、我々の研究と同様に、**DYRK1B** の阻害が **QC** を標的に抗癌剤の作用を強化する事を示している。

我々の研究は、主に悪性黒色腫を対象としており、また、独自に開発したリード化合物である **INDY** について、今後の創薬可能性を示している点で、違いが有る。

QC の治療抵抗性における病理学的意義については、未だ癌研究の重要なテーマであり、そのブレークスルーをもたらす技術が求められている。今回、我々は **in vivo** イメージングによる新規技術開発を試みた。現時点では成功を見ていないが、この技術の必要性は、むしろ益々増しているように見受けられる。今回得られた結果を基に、方法論の見直しをはかり、完成を期したい。

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 1 件)

Challenges to congenital genetic disorders with "RNA-targeting" chemical compounds.

Ogawa Y., Hagiwara M. *Pharmacol Ther.* 2012 Jun;134(3):298-305. 査読あり

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 靖 (Ogawa Yasushi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：10567754

(2) 研究分担者

研究分担者なし

(3) 連携研究者

連携研究者なし