

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591919

研究課題名(和文) 甲状腺癌発症の新規分子メカニズムの解明と分子標的療法

研究課題名(英文) Novel mechanism and molecular targeted therapy of thyroid cancer

研究代表者

武田 湖州恵 (TAKEDA, Kozue)

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号：80345884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまでRETキナーゼにおいて、キナーゼ分子の特定のシステインが活性調節において重要な役割をすることを報告してきた。

本研究では、甲状腺がん発症にも関与する、がん遺伝子産物RETキナーゼの活性化を、これまでの阻害剤にはない全く新しいシステインを介する機序によって抑制し、細胞のがん化を抑えることができるという基礎的な結果を得た。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that a specific cysteine residue is crucially involved in regulation of RET kinase activity. In this study, we successfully inhibited the oncogenic RET kinase activity through the cysteine mediated novel regulation mechanisms and suppressed the malignancy of RET expressed tumor cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：チロシンキナーゼ RET がん

1. 研究開始当初の背景

先の震災における原子力発電所の事故の後、放射性物質の健康に対する影響が危惧されている。チェルノブイリ原発事故後には甲状腺がんの激増が報告されている。今回の事故でも同じようながんが増える可能性が考えられ、その対策は重要な課題である。

チェルノブイリの事故後に発症した甲状腺がん組織を用いた研究では、50-70%という高頻度に受容体型チロシンキナーゼ遺伝子 RET/PTC の再配列異常が認められている (Thomas *et al* 1999)。この活性型 RET/PTC が甲状腺がんの発生に関与することはさまざまな研究で証明されているが (Jhiang *et al* 1996 など)、その詳細な分子機序についてはいまだ不明である。

一般的に甲状腺乳頭がんは、ほとんどの症例で予後は良好であり、外科手術後の 10 年生存率は 90%前後である。しかし、長期の経過では約 10%の症例が術後再発や転移をきたす。こうした危険度の高い少数のグループに対してはほとんど治療法がないのが現状である。

進行した放射性ヨウ素治療が無効な甲状腺がんにはいくつかの分子標的治療が開発され試みられている。中でも注目されているのがチロシンキナーゼ阻害剤であり、実験レベルでは有効性を示しているものもあるが、まだ確立した治療法とはなっておらず、引き続き有効な薬剤が求められている。

受容体型チロシンキナーゼは一般にリガンド結合によって二量体となり、位置的に近づいたキナーゼドメインをリン酸化し合うことによって活性化し、増殖シグナルなどを伝達すると考えられている。(二量体化 活性化)

申請者らはこれまでに RET チロシンキナーゼにおいて、キナーゼ分子のシステインが活性調節において重要な役割をすることを報告してきた。酸化ストレス等の細胞外ストレスは、RET キナーゼにあるシステインの SH 基に作用して、キナーゼをリガンドが結合したときと同じように、二量体化して活性化することを初めて明らかにした (Kato, Takeda *et al.* Mol. Biol. Cell. 2000, Takeda *et al.* Antioxid Redox Signal. 2001)

甲状腺がんに関与する活性型 RET キナーゼ RET/PTC1 において、この二量体化に必要なシステインを他のアミノ酸に置換したところ、基本的な活性が著明に減少した (Takeda *et al.* FEBS Lett. 2006)。つまり、RET/PTC1 の活性化において、我々が見出したシステインは、ストレス時以外でもきわめ

て重要な役割を持つと考えられ、その機序の解析が続いている。

2. 研究の目的

本研究では、RET/PTC の新しい活性化機序の詳細を解明し、それに基づいた分子標的治療の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) システインを介する RET/PTC 活性の制御

RET キナーゼの特定のシステインは、二量体化と活性化に重要であることを過去の研究で示してきた。この特定のシステインを介して、RET キナーゼ活性の抑制を試みた。

(2) システインを介する新規分子標的療法の検討

RET/PTC キナーゼの活性を抑制する阻害物質を用い、細胞レベル、実験動物レベルで RET/PTC が関与するがんの治療や予防を試みた。

具体的には細胞の悪性化、増殖、細胞移動等にどのように影響を与えるかを確認した。

また動物モデルにおける腫瘍形成、増殖にどのように影響するかを検討した。

4. 研究成果

この研究は、がん遺伝子産物 RET/PTC の活性化を全く新しい分子機序に基づいて制御し、甲状腺がんの新規治療法を提案することを目的として行い、以下の成果が得られた。

(1) システインを介する RET/PTC 活性の制御

RET キナーゼの特定のシステインは、二量体化と活性化に重要であることを過去の研究で示してきた。この特定のシステインに結合することが期待される物質によって、RET キナーゼ活性の抑制を試みたところ、試験管内や細胞内で RET キナーゼの活性を阻害できることが確認された。

(2) 新規分子標的療法

RET/PTC 発現細胞に試験管内で RET キナーゼの活性を阻害できた物質を導入したところ、細胞増殖、特に足場非依存性増殖が抑制されることが確認された。一方細胞移動に対しては著明な効果は認められなかった。

さらに抗腫瘍効果を確認するため、阻害物質を導入した RET/PTC 発現細胞をヌードマウ

スに移植する実験を行った結果、ペプチドを導入した腫瘍の増殖はそうでない腫瘍と比べて抑制される可能性が示された。

以上の結果より、申請者らがこれまで提唱してきた、RET キナーゼの活性化に重要なシステインを利用し、試験管内、細胞内の両方でRET キナーゼの活性を阻害できた。その結果、活性化RET/PTCによりがん化した細胞の悪性化が抑制された。

さらにヌードマウス移植モデルではあるが、動物個体において腫瘍の増殖を抑制できる可能性も示された。

本研究では、がん遺伝子産物RET キナーゼの活性化を、多くのチロシンキナーゼ阻害剤と全く異なったシステインを介する機序によって抑制し、細胞のがん化を抑えることができるという基礎的な結果を得て、新しい阻害剤の可能性を示した。

今後これらの成果をもとに、がんの治療法としてより有効性を高め、副作用の可能性を下げることを目的に研究を継続していく予定である。

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)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Correlated expression levels of endothelin receptor B and Plexin C1 in melanoma.

Kumasaka MY, Yajima I, Iida M, Takahashi H, Inoue Y, Fukushima S, Ihn H, Takeda K, Naito Y, Yoshikawa T, Kato M. **Am J Cancer Res**. 2015 Feb 15; 5(3): 1117-1123. 査読有

2. Commentary to Pastore et al. (2014): Epidermal growth factor receptor signaling in keratinocyte biology: implications for skin toxicity of tyrosine kinase inhibitors. Takeda K, Kawamoto Y, Iida M, Omata Y, Zou C, Kato M. **Arch Toxicol**. 2014 Dec; 88(12): 2319-2320. 査読有

3. Non-thermal atmospheric pressure plasmas as a novel candidate for preventive therapy of melanoma.

Omata Y, Iida M, Yajima I, Takeda K, Ohgami N, Hori M, Kato M. **Environ Health Prev Med**. 2014 Sep; 19(5): 367-369. 査読有

4. The effects of non-thermal atmospheric

pressure plasma irradiation on expression levels of matrix metalloproteinases in benign melanocytic tumors in RET-transgenic mice.

Iida M, Yajima I, Ohgami N, Tamura H, Takeda K, Ichihara S, Hori M, Kato M. **Eur J Dermatol**. 2014 May-Jun; 24(3):392-394. 査読有

5. A case of Björnstad syndrome caused by novel compound heterozygous mutations in the BCS1L gene.

Yanagishita T, Sugiura K, Kawamoto Y, Ito K, Marubashi Y, Taguchi N, Akiyama M, Watanabe D. **Br J Dermatol**. 2014;170(4):970-973. 査読有

6. Actin-binding protein, Espin: a novel metastatic regulator for melanoma. Yanagishita T, Yajima I, Kumasaka M, Kawamoto Y, Tsuzuki T, Matsumoto Y, Watanabe D, Kato M. **Mol Cancer Res**. 2014 Mar; 12(3): 440-446. doi: 10.1158/1541-7786. 査読有

7. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT signaling in malignant melanoma progression and therapy. Yajima I, Kumasaka M, Thang N, Goto Y, Takeda K, Yamanoshita O, Iida M, Ohgami N, Tamura H, Kawamoto Y, Kato M. **Dermatol Res Pract** vol. 2012, Article ID 354191, 5 pages, 2012. doi: 10.1155/2012/354191 査読有

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称:メラノーマ特異的バイオマーカー及びその利用

発明者:加藤昌志、矢嶋伊知朗、武田湖州恵、後藤友二

権利者:国立大学法人名古屋大学、学校法人中部大学

種類:特許

番号:特願2015-058692

出願年月日:平成27年3月20日

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

武田 湖州恵 (TAKEDA, Kozue)

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号: 80345884

(2)研究分担者

川本 善之 (KAWAMOTO, Yoshiyuki)

中部大学・生命健康科学部・准教授
研究者番号： 10410664

(3)連携研究者

加藤 昌志 (KATO, Masashi)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号： 10281073