

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 3 月 7 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462201

研究課題名(和文) ヒアルロン酸/CD44/MEK経路遮断による悪性胸膜中皮腫治療の開発

研究課題名(英文) Antitumor effect of MEK inhibitor in combination with hyaluronic acid synthesis inhibitor in Malignant pleural mesothelioma cell lines

研究代表者

黒田 鮎美 (Ayumi, Kuroda)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：90642570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：悪性胸膜中皮腫の胸水はヒアルロン酸が高値である。ヒアルロン酸はCD44のリガンドでもあり、本研究はヒアルロン酸合成酵素(HAS)阻害剤、MEK阻害剤の抗腫瘍効果を評価した。一部の細胞でHAS阻害剤の効果認めなかったが、HAS阻害剤、MEK阻害剤は濃度依存性の抗腫瘍効果を認めた。MEK阻害剤はERKのリン酸化を阻害し、CD44の発現を濃度依存性に減少させた。HAS阻害剤、MEK阻害剤単剤投与ではそれぞれ未治療群と比較し、皮下腫瘍の増大抑制を認めた。2剤併用では単剤投与群と比較し有意に皮下腫瘍の増大抑制を認めた。

研究成果の概要(英文)：The pleural fluid of patients with malignant pleural mesothelioma demonstrates high levels of hyaluronic acid. Hyaluronic acid also has a CD44 ligand. In this study, we evaluated the anti-tumor effects of hyaluronan synthase (HAS) and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase (MEK) inhibitors. No effects of HAS inhibitors in some cells were observed, while concentration-dependent anti-tumor effects of HAS and MEK inhibitors were observed. Phosphorylation of ERK was inhibited by MEK inhibitors, and there was a concentration-dependent decrease in CD44 expression. Compared to an untreated group, the groups that received HAS or MEK inhibitors as monotherapy were noted to have suppressed enlargement of subcutaneous tumors. We then compared groups receiving monotherapy to a group receiving a combination of both inhibitors, and found that there was significantly suppressed enlargement of subcutaneous tumors.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：中皮腫

## 1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫患者の初期所見として胸水貯留があげられる。ヒアルロン酸は CD44 に結合し、MAPK 経路を活性化させる。CD44 は細胞膜貫通型のヒアルロン酸受容体で腫瘍の転移浸潤にかかわる。壁側胸膜から発生する悪性胸膜中皮腫はヒアルロン酸を含む胸水を産生し、そのヒアルロン酸が悪性胸膜中皮腫の増殖を促進している。つまり、ヒアルロン酸の autocrine が行われている時点で化学療法 (シスプラチン、アリムタ) の効果は減弱されてしまうと推察される。そのため、われわれはヒアルロン酸合成阻害剤として 4-Methylumbelliferone (4-MU) に注目した。我々は悪性胸膜中皮腫に対する新規抗癌剤として MEK 阻害剤について研究を行ってきた。我々は悪性胸膜中皮腫細胞株に対する MEK 阻害剤の抗腫瘍効果を *in vitro* で確認出来た。CD44 を抗体で阻害した場合、CD44 の下流の経路について網羅的に活性を調べたところ、MEK と S6K の活性が最も抑制されていた (Weigand S et al. Cancer Res 2012;72:4329-4339)。このことから CD44 のリガンドであるヒアルロン酸を抑制した場合、MEK を同時に阻害するのは合理的と思われる。そのため、今回、ヒアルロン酸合成酵素阻害剤(4-MU)、MEK 阻害剤の併用療法を検証する。

## 2. 研究の目的

この研究は悪性胸膜中皮腫に対するヒアルロン酸合成酵素(HAS)阻害剤、MEK 阻害剤の単剤および併用効果を検証する。

悪性胸膜中皮腫における MAPK ヒアルロン酸/CD44/MEK シグナル伝達経路の役割(シグナル活性と転移再発の関連性)を解明するとともに、ヒアルロン酸合成酵素阻害剤、MEK 阻害剤の抗腫瘍効果を検証する。また、抗腫瘍効果に影響すると思われる悪性胸膜中皮腫における CD44 発現と胸水中ヒアルロン酸濃度の測定を行う事で、個別選択治療の可能

性を模索し、臨床試験への導入とすることが目的である。

## 3. 研究の方法

悪性胸膜中皮腫細胞株に対するヒアルロン酸合成酵素阻害剤(4-MU)、MEK 阻害剤による抗腫瘍効果の確認

### (a)WST-8 による薬剤抗腫瘍効果測定

悪性胸膜中皮腫細胞株を用いてヒアルロン酸合成酵素(HAS)阻害剤、MEK 阻害剤の抗腫瘍効果を WST-8 にて評価した。

### (b) Western blot

悪性胸膜中皮腫細胞株に対して HAS 阻害剤、MEK 阻害剤を投与。蛋白質を抽出し、Western blot を行った。

### (c)動物実験

マウスの皮下に悪性胸膜中皮腫細胞株を接種し、皮下腫瘍を形成させた動物モデルを用いて、HAS 阻害剤単剤、MEK 阻害剤単剤、および HAS 阻害剤 / MEK 阻害剤併用での抗腫瘍効果を比較検討した。

## 4. 研究成果

### (a)WST-8 による薬剤抗腫瘍効果測定

H211 では HAS 阻害剤の効果を確認できなかったが、H28, H226, H2052, H2452 で濃度依存性の抗腫瘍効果を認め、IC50 は 110-154 $\mu$ M であった。MEK 阻害剤については、当初 Selumetinib (AZD6244) を使用していたが、より効果的な Trametinib に変更した。5 種類の中皮腫は IC50 0.5-44  $\mu$ M であった。

### (b) Western blot

Trametinib は ERK のリン酸化を 72 時間阻害し、CD44 の発現を濃度依存性に減少させた。CD44 の発現は Trametinib による ERK のリン酸化抑制の 48-72 時間後に減少した。また、Trametinib により Fra-1 の発現が抑制されたことから、それが CD44 発現減少につながったと推察される。HAS 阻害単剤による CD44 の発現の変化は認められなかった。

(c)動物実験

HAS 阻害剤単剤、MEK 阻害剤単剤投与ではそれぞれ未治療群と比較し、皮下腫瘍の増大抑制を認めた(MEK 阻害剤 vs. control,  $P < 0.0001$ ; HAS 阻害剤 vs. control,  $P < 0.01$ )。2 剤併用では単剤投与群と比較し有意に皮下腫瘍の増大抑制を認めた(併用 vs. MEK 阻害剤単剤,  $P < 0.01$ ; 併用 vs. HAS 阻害剤単剤,  $P < 0.0001$ )。

皮下腫瘍を用いた Western blot の検討では、Trametinib は ERK のリン酸化を阻害し、投薬終了 4 日後には ERK のリン酸化は回復していた。

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 1 件)

Trametinib plus 4-methylumbelliferone exhibits antitumor effects by ERK blockade and CD44 downregulation and affects PD1 and PD-L1 in malignant pleural mesothelioma

Hiroyuki Cho, Seiji Matsumoto, Yoshiko Fujita, Ayumi Kuroda, Toshi Menju, Makoto Sonobe, Nobuyuki Kondo, Ikuko Torii, Takashi Nakano, Primo N. Lara, David R. Gandara, Hiroshi Date, Seiki Hasegawa

Journal of Thoracic Oncology. 2017; Vol.12 No.3 : 477-490

〔学会発表〕(計 4 件)

黒田鮎美、松本成司、中道徹、橋本昌樹、多久和輝尚、近藤展行、辻村亨、中野孝司、長谷川誠紀。悪性胸膜中皮腫の手術予後と mTOR MAPK pathway の関連についての検討。第 33 回日本呼吸器外科学会総会 2016.5.13 京都国際会議場(京都府、京都市)

Antitumor effect of Trametinib, a selective MEK inhibitor, in combination with 4-methylumbelliferone, a hyaluronic acid synthesis inhibitor, in Malignant pleural mesothelioma cell lines

Hiroyuki Cho, Seiji Matsumoto, Ayumi

Kuroda, Masaki Hashimoto, Teruhisa Takuwa, Toshi Menju, Makoto Sonobe, Nobuyuki Kondo, Hiroshi Date, Seiki Hasegawa

American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2015

(Philadelphia, Pennsylvania, USA)

平成 27 年 4 月 18 日 ~ 平成 27 年 4 月 24 日

Activation of mTOR and MAPK signal pathway are associated with prolonged survival in malignant pleural mesothelioma patients

Ayumi Kuroda, Seiji Matsumoto, Akifumi Nakamura, Masaki Hashimoto, Teruhisa Takuwa, Nobuyuki Kondo, Ikuko Torii, Torhu Tsujimura, Takashi Nakano, Seiki Hasegawa

ASCO Annual Meeting 2014

(Chicago, Illinois, USA)

平成 26 年 5 月 30 日 ~ 平成 26 年 6 月 3 日

Antitumor activity of Trametinib, a MEK1/2 inhibitor, in malignant pleural mesothelioma cells in vitro

Hiroyuki Cho, Seiji Matsumoto, Ayumi Kuroda, Masaki Hashimoto, Teruhisa Takuwa, Toshi Menju, Makoto Sonobe, Nobuyuki Kondo, Hiroshi Date, Seiki Hasegawa

American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2014

(San Diego, California, USA)

平成 26 年 4 月 5 日 ~ 平成 26 年 4 月 9 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称:「抗腫瘍効果増強剤および抗腫瘍剤」

発明者:松本成司

権利者:学校法人兵庫医科大学

種類:特許権

番号:特願 2015-034544

出願年月日:2015 年 2 月 24 日

国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

新聞掲載（計 1 件）

日本経済新聞社 2017 年 1 月 30 日 朝刊  
科学面  
「石綿原因のがん、薬併用で増殖抑制」

## 6．研究組織

### (1) 研究代表者

黒田 鮎美 (KURODA, Ayumi)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90642570

### (2) 研究分担者

長谷川 誠紀 (HASEGAWA, Seiki)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10252438

近藤 展行 (KONDOU, Nobuyuki)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号：50402889

松本 成司 (MATSUMOTO, Seiji)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60412011

多久和 輝尚 (TAKUWA, Teruhisa)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00412049

橋本 昌樹 (HASHIMOTO, Masaki)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40461074