

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461683

研究課題名(和文)細胞の運命決定にsignal intensityは重要か？

研究課題名(英文)Signal intensity can determine cell fate

研究代表者

原田 和俊 (Harada, Kazutoshi)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20324197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は悪性黒色腫の転移にWntシグナルが重要であるとの仮説を立て、検証を試みた。悪性黒色腫では腫瘍の浸潤の先端部で  $\beta$ -cateninが強く発現しており、Wntシグナルが活性化していた。WntシグナルはEpithelial Mesenchymal transition(EMT)を誘導し、転移を促進させる。悪性黒色腫細胞株にEMTを誘導したところ、細胞間の結合が低下し、運動性が高まった。さらに、Wntシグナルの強度と腫瘍細胞の性質の変化を検討するため、 $\beta$ -cateninの細胞内濃度を变化させるシステムの構築を試みた。しかし、このシステムの開発はまだ成功しておらず、今後、条件検討などが必要である。

研究成果の概要(英文)：We evaluated whether Wnt signal could induce metastasis of melanoma.  $\beta$ -catenin, a key component of Wnt signal, highly expressed at the tip of invading tumor, indicating that Wnt signal was activated in tumor cells in frontal tip of tumor. Melanoma cells, in which epithelial mesenchymal transition was induced by gene transfer showed weak cell adhesion and high mobility. To investigate the relationship between intensity of Wnt signal in melanoma cells and the potential of metastasis, we tried the establishment of system that allows the variable expression of  $\beta$ -catenin in melanoma cells. The system remained to be established. We will continue experiment and examine the experimental conditions.

研究分野：皮膚腫瘍

キーワード：Wnt signal 悪性黒色腫 転移 EMT  $\beta$ -catenin

### 1. 研究開始当初の背景

サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、ホルモンなどの情報伝達物質を細胞が受容すると、細胞内のシグナル伝達系の活性化状態に変化が起こり、その結果として、細胞の増殖・分化、細胞内の代謝、運動性の変化などが引き起こされる。これまで、あるシグナル伝達系を活性化させた状態で、細胞の性質の変化を解析する研究は数多くなされてきたが、同一のシグナル伝達系の活性化状態の強弱で細胞の増殖・分化がどのように変化するのかを詳細に検討した研究はほとんど行われていない。

一方、悪性黒色腫は高率に転移の引き起こす予後不良の皮膚悪性腫瘍である。新規のキナーゼ阻害薬やチェックポイント阻害薬の開発により、転移を来した患者の予後は改善しつつあるが、奏効率は20%程度であり、転移巣のコントロールに対し、十分な効果があるとはいえない状況である。

本研究では、悪性黒色腫の転移抑制を目的とし、シグナル伝達系の強度と転移能の関係を検索する。さらに、シグナル intensity を変化させることで転移能を変化させることが可能かどうかを検討する。

### 2. 研究の目的

本研究では、Wntシグナル伝達系において、刺激するシグナルの強弱により、悪性黒色腫細胞株の増殖能、転移能がどの程度変化するのかを解析することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) Canonical Wnt signal の key molecule である  $\beta$ -catenin の発現を悪性黒色腫切除標本で検討し、 $\beta$ -catenin の発現と悪性度や転移能との間に相関があるかどうかを検討する。

(2) Wntシグナルの活性化により悪性黒色腫の腫瘍細胞がどのように転移能を獲得するのか、そのメカニズムを解明する。

(3) Tet-onシステムを応用し、 $\beta$ -catenin の細胞内での発現量をテトラサイクリン依存的に変化させ、上記の転移能や悪性度が亢進するかどうかを確認する。

### 4. 研究成果

(1) 悪性黒色腫切除標本における  $\beta$ -catenin の発現

悪性黒色腫の切除検体における  $\beta$ -catenin の発現と患者の予後に関する検討では、Wntシグナルの活性化状態と予後が相関する報告と、逆相関する報告がなされている。そこで、上記の結果を確認するため、当科で切除した悪性黒色腫における  $\beta$ -catenin の発現を免疫組織学的に検討し予後との相関を評価した。

その結果、 $\beta$ -catenin の発現と患者予後との間に相関は認められなかった。この理由は不明であるが、これまでの報告は欧米からなされており、人種差や日本人は末端黒子型が多いなどの病型の違いが関与していると考えられた。

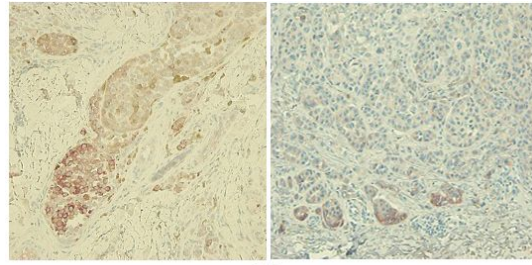


図1

一方、切除標本における  $\beta$ -catenin の発現を詳細に観察すると、真皮内への浸潤する先端部の腫瘍細胞で  $\beta$ -catenin の発現が亢進している症例が見いだされた(図1)。

(2) 腫瘍浸潤と Epithelial Mesenchymal Transition

上皮系の腫瘍が周辺組織へ浸潤したり、血管内に侵入したり、孤立性に増殖したりする場合、上皮細胞としての性質を失い間葉系細胞へ形質転換することが知られており、この現象は Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) と呼ばれている。図1に示すように腫瘍浸潤の先端で腫瘍細胞に  $\beta$ -catenin が強く発現していた。このことから悪性黒色腫においても、腫瘍の浸潤部位で Wntシグナルが活性化した結果、腫瘍細胞が EMT を引き起こしたと考えた。Wntシグナルの活性化により EMT が惹起される場合、転写因子 snail の発現が重要である。そこで、悪性黒色腫細胞株に snail を遺伝子導入し、その表現型を観察した。その結果、図2に示すように、snail を導入した悪性黒色腫細胞株は細胞同士の結合がゆるく、遊走能が亢進し、腫瘍細胞が分散して存在する傾向が見いだされた。

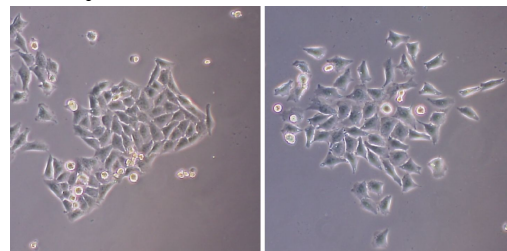
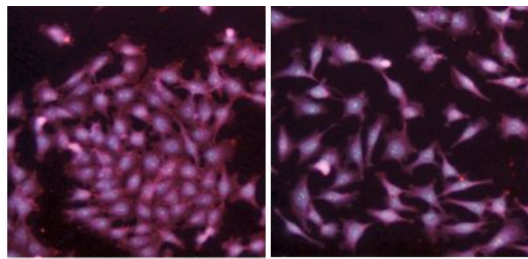


図2

上皮細胞に EMT が誘導されると細胞接着因子の発現パターンが変化することが報告されている。とくに adherens junction に存在する cadherin は、悪性黒色腫細胞に EMT が引き起こされると表皮細胞との結合に関与する E-cadherin の発現が低下し、血管内皮細胞との接着に必要な N-cadherin の発現が亢進する。そこで、snail を導入した悪性黒色腫細胞株の N-cadherin の発現を検索した。しかし、予想に反し、snail を導入した腫瘍細胞株で N-cadherin の亢進は確認できなかった。悪性黒色腫では他の上皮系悪性腫瘍と異なり、EMT による N-cadherin の発現誘導は惹起されない可能性が示唆された。

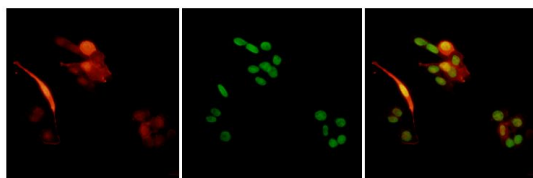


snail(-) snail(+)

図3 N-cadherinの発現

悪性黒色腫の治療において MAPK シグナルを抑制する kinase inhibitor が用いられるようになり、患者の予後が改善された。この結果から RTK-Raf-Mek-Erk 経路が腫瘍の増殖に重要なシグナルであることが確立されたが、過剰な増殖シグナルは細胞に senescence を誘導する。従って、何らかの senescence を回避するメカニズムが悪性黒色腫にも存在するはずである。

我々は Wnt シグナルが senescence を抑制していると仮説を立てた。senescence の誘導には細胞周期の進行を抑制する cyclin inhibitor が細胞に発現することが必要である。そこで、重要な cyclin inhibitor のひとつである p16 を Wnt シグナルが抑制している可能性を考え、 $\beta$ -catenin と p16 との発現の関係免疫組織学的に検索した。しかし、図4に示すように  $\beta$ -catenin の発現とは無関係に p16 のタンパクが悪性黒色腫細胞株に確認された。このことから、Wnt シグナルと腫瘍細胞の senescence 回避との関係はさらに、検討が必要と考えられた。



β-catenin p16 merge  
図4

### (3) Tet-on システムを応用した $\beta$ -catenin 濃度可変悪性黒色腫株の樹立

Canonical Wnt シグナルの活性化状態の変化により、腫瘍細胞株の表現形がどのように変わるのかを評価するため、Tet-on システムを用いて細胞内  $\beta$ -catenin 内濃度を変化させることが可能な悪性黒色腫株の樹立を試みた。具体的には tet response element を持つ minimal promoter の下流に  $\beta$ -catenin cDNA をつないだ plasmid 及び tet transactivator をコードした plasmid を腫瘍細胞株へ導入した。樹立した細胞の培養液に tetracycline を添加し western blot で細胞内の  $\beta$ -catenin の発現量を評価したが、濃度依存的なタンパク量の変化は確認できなかった。当該システムは Wnt シグナルの活性化状態と転移能の獲得の関係を評価するのに必要なものであり、今後も本システムの樹立を目指し、遺伝子導入を行う予定である。

### (4) 今後の計画

我々は悪性黒色腫の転移能を in vivo で評価するため、マウスを用いた肺転移モデルを開発した。今後はこのモデルを用いて、Wnt シグナルの活性化によって、惹起された悪性黒色腫細胞における EMT が、転移能を獲得する上で重要であることを証明したいと考えている。さらに、Wnt シグナルの阻害薬が転移予防薬として有効かどうかとも検討したいと考えている。

### 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 8 件)

(1) Harada K, Kato Y, Maeda T, Yoshida M, Irisawa R, Nagao T, Tsuboi R. N-Ras mutation in vemurafenib-associated expanding melanocytic nevus. *J Dermatol.* 2017 May;44(5):e101-e102. doi: 10.1111/1346-8138.13670. 査読有

(2) Wakimoto H, Harada K, Arai T, Maeda T, Irisawa R, Tsuboi R. Reduced expression of the ATP2A2 gene in vemurafenib-induced keratoacanthoma-like papules in a melanoma patient. *Int J Dermatol.* 2017 Feb;56(2):e33-e35. doi: 10.1111/ijd.13430. 査読有

(3) Numata T, Kiryu S, Maeda T, Egusa C, Tsuboi R, Harada K. A pulmonary metastatic model of murine melanoma assessed by magnetic resonance imaging. *Exp Dermatol.* 2017 Mar 7. doi: 10.1111/exd.13327. 査読有

(4) Arai T, Harada K, Usui Y, Irisawa R, Tsuboi R. Case of acute anterior uveitis and Vogt-Koyanagi-Harada syndrome-like eruptions induced by nivolumab in a melanoma patient. *J Dermatol.* 2016 Sep 21. doi: 10.1111/1346-8138.13612. 査読有

(5) Matsuzawa M, Inozume T, Sano S, Ando N, Onuma T, Harada K, Kawamura T, Shimada S. A case of recurrent squamous cell carcinoma of the vulva successfully treated by combination therapy with cetuximab and paclitaxel. *Br J Dermatol.* 2016 Mar;174(3):677-8. doi: 10.1111/bjd.14188. 査読有

(6) Inozume T, Yaguchi T, Furuta J, Harada K, Kawakami Y, Shimada S. Melanoma Cells Control Antimelanoma CTL Responses via Interaction between TIGIT and CD155 in the Effector Phase. *J Invest Dermatol.* 2016 Jan;136(1):255-63. doi: 10.1038/JID.2015.404. 査読有

(7) Li X, Tsuchisaka A, Qian H, Teye K, Ishii N, Sogame R, Harada K, Nakagomi D, Shimada S, Tateishi C, Hirako Y, Hashimoto T. Linear IgA/IgG bullous dermatosis

reacts with multiple laminins and integrins. Eur J Dermatol. 2015 Sep-Oct;25(5):418-23. doi: 10.1684/ejd.2015.2555. 査読有  
(8) Matsuzawa M, Harada K, Hosomura N, Amemiya H, Ando N, Inozume T, Kawamura T, Shibagaki N, Shimada S. Non-occlusive mesenteric ischemia after chemotherapy for metastatic melanoma. J Dermatol. 2015 Jan;42(1):105-6. doi: 10.1111/1346-8138.12734. 査読有

〔学会発表〕(計1件)(1) Kazutoshi Harada, Aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in the epidermis induces skin cancer, The 41<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2016/12/10, 仙台国際センター(仙台・宮城)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.tokyo-med.ac.jp/derma/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原田 和俊 (Kazutoshi Harada)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20324197