

Title	インターフェロン γ が悪性黒色腫細胞のAKTシグナルを活性化する機序の検討
Sub Title	Analysis of the mechanism activating AKT signaling pathway in melanoma cells by Interferon-gamma stimulation
Author	種瀬, 啓士(Tanese, Keiji) 坂元, 亨宇(Sakamoto, Michiie) Ekmekcioglu, Suhendan
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
Abstract	<p>本研究では悪性黒色腫細胞株を用いた検討により, 膜蛋白質であるCD74とそのリガンドであるMacrophage migration inhibitory factor(MIF)の相互作用がAKTシグナルの活性化, インターロイキン(IL-6)やIL-8の分泌, 抗アポトーシス蛋白BCL-2の発現に関与していることを同定すると共に, これらの作用がIFN-γ刺激によって増強することを示した。ステージIIIリンパ節転移検体では, MIFの発現例において予後が有意に不良であった。以上より, CD74とMIFの相互作用はIFN-γ刺激より腫瘍細胞が生存を計る上で重要な役割を果たしていることが示唆された。</p> <p>IFN-γ produced by immune cells has a crucial role in tumor immune surveillance; however, it has also been reported to be pro-tumorigenic. In the current study, we found that IFN-γ enhances the expression of CD74, which interacts with its ligand, macrophage migration inhibitory factor (MIF), and thereby activates the PI3K/AKT pathway in melanoma, promoting tumor survival. IFN-γ increased phosphorylation of AKT Ser473 and upregulated total cell surface expression of CD74 in human melanoma cell lines tested. Blockade of CD74-MIF interaction reduced AKT phosphorylation and expression of pro-tumorigenic molecules, including IL-6, IL-8, and BCL-2. Inhibition of CD74-MIF interaction significantly suppressed tumor growth in the presence of IFN-γ in our xenograft mouse model. In the further analysis of Stage III melanoma lymph node metastasis samples, cases expressing MIF showed worse prognosis. Thus, we conclude that IFN-γ promotes melanoma cell survival by regulating CD74-MIF signaling.</p>
Notes	研究種目: 若手研究(B) 研究期間: 2014 ~ 2017 課題番号: 26860895 研究分野: 悪性腫瘍
Genre	Research Paper
URL	http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26860895seika

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860895

研究課題名(和文) インターフェロン が悪性黒色腫細胞のAKTシグナルを活性化する機序の検討

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism activating AKT signaling pathway in melanoma cells by Interferon-gamma stimulation

研究代表者

種瀬 啓士 (Tanese, Keiji)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70464815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では悪性黒色腫細胞株を用いた検討により、膜蛋白質であるCD74とそのリガンドであるMacrophage migration inhibitory factor(MIF)の相互作用がAKTシグナルの活性化、インターロイキン(IL-)6やIL-8の分泌、抗アポトーシス蛋白BCL-2の発現に関与していることを同定すると共に、これらの作用がIFN-刺激によって増強することを示した。ステージリンパ節転移検体では、MIFの発現例において予後が有意に不良であった。以上より、CD74とMIFの相互作用はIFN-刺激より腫瘍細胞が生存を計る上で重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：IFN- produced by immune cells has a crucial role in tumor immune surveillance; however, it has also been reported to be pro-tumorigenic. In the current study, we found that IFN- enhances the expression of CD74, which interacts with its ligand, macrophage migration inhibitory factor (MIF), and thereby activates the PI3K/AKT pathway in melanoma, promoting tumor survival. IFN- increased phosphorylation of AKT Ser473 and upregulated total cell surface expression of CD74 in human melanoma cell lines tested. Blockade of CD74-MIF interaction reduced AKT phosphorylation and expression of pro-tumorigenic molecules, including IL-6, IL-8, and BCL-2. Inhibition of CD74-MIF interaction significantly suppressed tumor growth in the presence of IFN- in our xenograft mouse model. In the further analysis of Stage III melanoma lymph node metastasis samples, cases expressing MIF showed worse prognosis. Thus, we conclude that IFN- promotes melanoma cell survival by regulating CD74-MIF signaling.

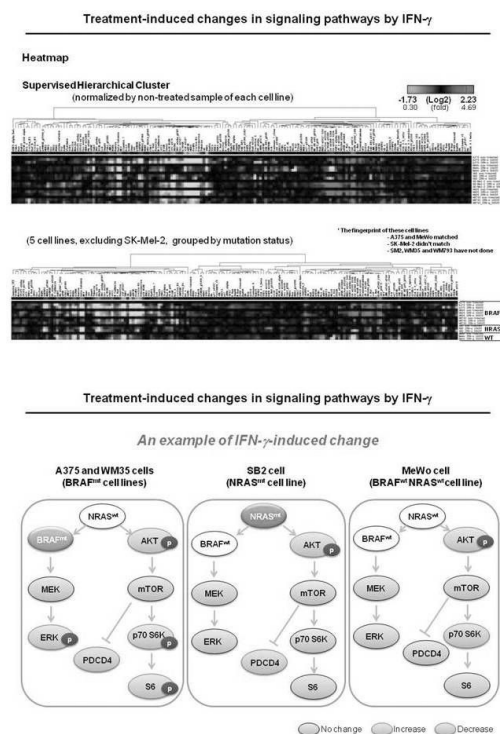
研究分野：悪性腫瘍

キーワード：悪性黒色腫 CD74 インターフェロン MIF 腫瘍微小周囲環境

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は病初期から浸潤・転移をきたし、放射線や既存の抗癌剤に対して抵抗性を示す予後不良な悪性腫瘍である。近年の欧米における研究の成果により、本腫瘍では BRAF、NRAS、pTEN および c-KIT の各遺伝子変異が頻回に認められることが報告され、それらによって活性化した RAS-MEK-ERK1/2 MAPK シグナル(以下 MAPK シグナル)と PI3-AKT シグナル(以下 AKT シグナル)の両シグナル伝達経路が活性化し腫瘍の形成に重要な役割を果たしている。¹⁾ 2012 年に米国において認可された BRAF 阻害薬 Vemurafenib は BRAFV600E 遺伝子変異を有する悪性黒色腫症例に有効であり、既存の抗癌剤よりも予後を有意に改善する。²⁾ しかし、本阻害剤は投与初期こそ劇的な効果を示すものの、多くの症例において再発を来す。このような Vemurafenib に薬剤耐性をきたす機序として、AKT シグナルが更に活性化する報告がある。³⁾ しかし、AKT シグナルの活性化の機序については不明な点が多く、腫瘍細胞内における遺伝子変異以外の要因でも活性化すると考えられている。我々はその中でも tumor microenvironment からの影響に着目して研究を進め、我々はその中でも腫瘍細胞の周囲に浸潤する免疫細胞が分泌するインターフェロンガンマ(以下、IFN- γ)が悪性黒色腫の遺伝子変異様式に関係なく AKT シグナル伝達経路を活性化させることを、逆相タンパク質アレイを用いた細胞内のキナーゼシグナルネットワーク解析より同定していた(図1)。しかし、IFN- γ が悪性黒色腫細胞において AKT シグナルを活性化させる機序は明らかにされていない。

図 1



2. 研究の目的

我々は IFN- γ によって発現が変化し、その機能を背景に AKT シグナルを活性化する因子が存在するという仮説のもと、その同定と機能解析を行った。

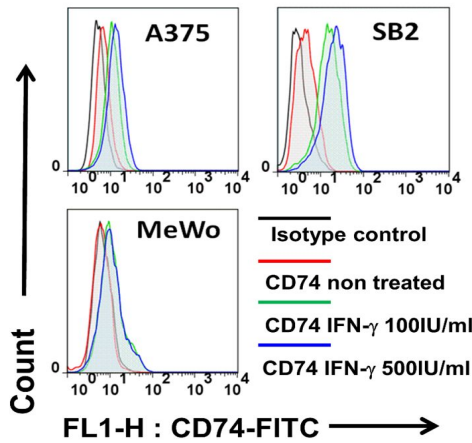
3. 研究の方法

- 我々は以下の手法により、解析を行った。
- (1) 複数の悪性黒色腫細胞株に IFN- γ を作用させて RNA を抽出の上、PCR アレイによるスクリーニングを利用して IFN- γ により発現が上昇する因子を探索した。
 - (2) 上記(1) によって得られた候補因子より文献的に腫瘍促進的に働き得る因子を抽出し、対象を最大 13 種の細胞株に広げて IFN- γ を作用の上、定量 PCR およびウェスタンブロットの二手技で発現変化の検討を行った。
 - (3) 得られた候補因子の発現調整を行うことによってその機能を明らかにし、その過程で AKT シグナル活性の変化を検討した。
 - (4) 上記の過程で有意な結果が得られた遺伝子について、患者検体において免疫組織化学的に蛋白の発現を確認し、発現度が患者の予後や病期に相関するかを検討した。
 - (5) 阻害薬があるような因子が得られた場合は、マウスの Xenograft モデルに阻害薬単独あるいは IFN- γ と同時に投与することで腫瘍の縮小・増殖抑制効果を検討し、治療標的としての可能性を検討した。

4. 研究成果

- (1) 複数の悪性黒色腫細胞株に IFN- γ を作用させて RNA を抽出の上、PCR アレイによるスクリーニングを行ったところ、IFN- γ の作用により膜蛋白質である CD74 の発現が上昇することを同定し、それを定量 PCR およびウェスタンブロットでも確認した。CD74 は元来 MHC ClassII のシャペロン蛋白として同定された蛋白質だが、その一部が細胞膜表面に直接移送されて Macrophage migration inhibitory factor (MIF) の受容体として機能することが判明している。我々は更なる検討により、IFN- γ 刺激によって細胞膜表面に CD74 の発現が誘導されることをフローサイトメトリ解析にて確認した(図2)。
- (2) 定常状態で膜表面に CD74 を発現している複数の悪性黒色腫細胞株に MIF のアンタゴニストである ISO-1 を作用させることにより AKT の活性化を示す AKT Ser473 のリン酸化が低下することをウェスタンブロットにて確認した。

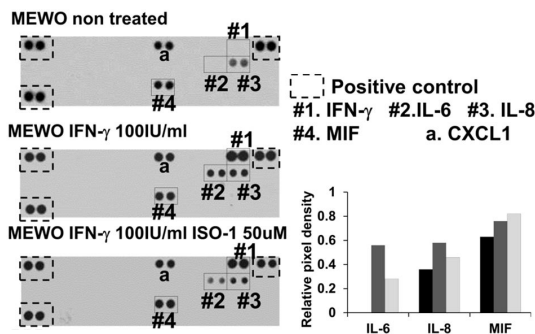
図 2



(3) 定常状態で膜表面に CD74 を発現している複数の悪性黒色腫細胞株に MIF のアンタゴニストである ISO-1 を作用させることによりインターロイキン (IL-) 6、IL-8 等のサイトカインおよびアポトーシスに関連する BCL-2 が CD74 と MIF の相互作用により制御されていることを確認した。

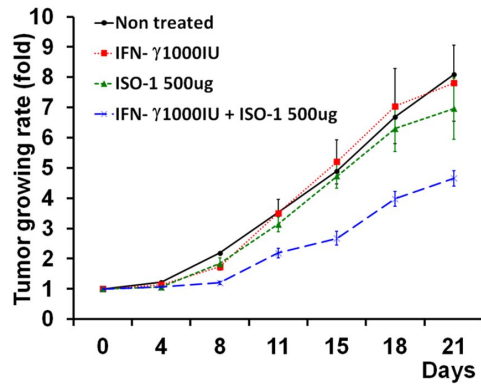
(4) 上記(2)および(3)の事象を定常状態では膜表面に CD74 を発現しておらず、IFN- γ 刺激下で発現が認められる悪性黒色腫の細胞株 MeWo (図 2) に IFN- γ を作用させた条件下で再現できるかを検討した。MeWo における AKT シグナルの活性は IFN- γ 刺激によって上昇し、更なる ISO-1 による CD74 と MIF の相互作用抑制によって抑制された。同様に、IL-6、IL-8 および BCL-2 の発現も IFN- γ 刺激によって上昇し、更なる CD74 と MIF の相互作用抑制によって低下することを確認した (図 3: IL-6、IL-8 の発現を蛋白アレイにより解析)。

図 3



(5) MeWo 細胞株を SCID-Beige マウスに移植し、IFN- γ および ISO-1 のいずれかまたは両方を投与した条件下での腫瘍増殖を、いずれも投与しなかった場合と比較検討した。IFN- γ および ISO-1 のいずれかを投与した場合は、いずれも投与しなかった場合と比較して腫瘍の大きさに変化が認められなかったが、両者を投与した場合は有意に腫瘍の増殖が抑制された (図 4)。

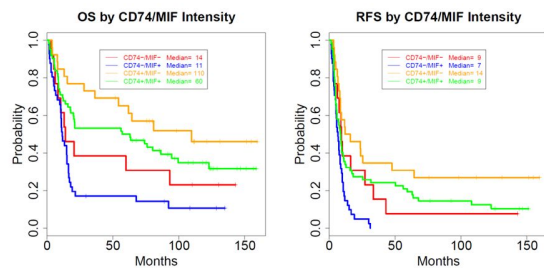
図 4



(6) Stage Ⅱ の悪性黒色腫のリンパ節転移検体 158 例を用いて CD74 および MIF の発現を検討した。その結果、CD74 が陽性かつ MIF が陰性の症例が他群において有意に予後が良好であるという結果が得られた (図 5)。

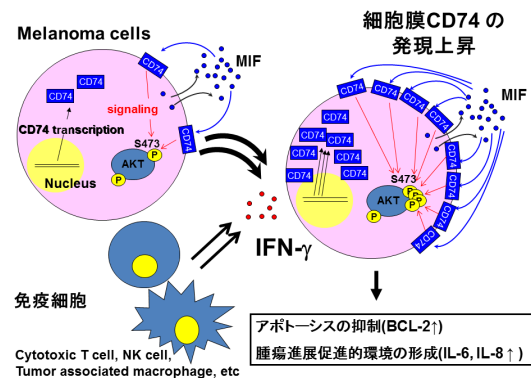
図 5

～CD74+, MIF- のグループが最も予後が良い～



(7) 以上の結果より、CD74 は抗腫瘍免疫の活動を反映して発現が上昇するものの、MIF との相互作用およびその下流から発現する諸因子を通じてより腫瘍細胞が生存に有利に働く環境を作り出すことが示唆された (図 6)。

図 6



(8) 研究を進める過程において、多数の悪性黒色腫細胞株において脂質代謝酵素である monoacylglycerol lipase (MAGL) が高発現 (256.0 倍) していることを確認した。MAGL は正常脂肪細胞において遊離脂肪酸の合成に関わる他、卵巣癌や乳癌、

鼻咽頭癌等の癌細胞に高発現し、腫瘍細胞の遊走・浸潤・増殖に關与する事が知られている。しかし、悪性黒色腫細胞における MAGL の発現が及ぼす臨床的影響については未だ解明されていなかった。悪性黒色腫 48 症例 74 検体（原発巣：48 検体、転移巣：26 検体）の病理組織標本を用い、腫瘍細胞における MAGL の発現レベルと患者の臨床情報を対比させることで MAGL の発現が及ぼす臨床的影響を検討したところ、MAGL は原発巣に比して転移巣において発現が高まる傾向があり、転移巣で有意に高かった（リンパ節： $p = 0.033$ 、皮膚： $p = 0.010$ ）。原発巣 48 例を用いた検討では、腫瘍深達度の指標である Breslow's tumor thickness による対比検討で MAGL の発現が pT1：0.46 に対し pT4：1.6 と増強（ $p = 0.015$ ）し、脈管浸潤の有無における対比検討では脈管浸潤例で MAGL が有意に高発現していた（ $p = 0.017$ ）。更に、原発巣の 52.1%（25/48 例）において、腫瘍の表層よりも深層で MAGL の発現が増強している傾向が認められ、MAGL が腫瘍細胞の浸潤への関与が示唆された。以上の結果より、MAGL を発現する悪性黒色腫細胞はより高い間質浸潤能、血管浸潤能及び転移能を有していることが示唆され、MAGL の発現がより悪性度の高い悪性黒色腫のバイオマーカーとして活用出来る可能性が示された。

- (9) 研究を進める過程において、悪性黒色腫における癌精巣抗原（cancer-testis antigens: CTAs）の発現状況を検討する機会があった。CTAs は種々の癌細胞や精巣胚細胞に発現するが、正常体細胞には発現していない。ヒト白血球抗原（Human Leukocyte Antigen: HLA）クラスを発現しない精巣胚細胞は免疫応答の標的にならず、CTAs は抗腫瘍免疫の特異的な標的と期待されている。しかし、腫瘍細胞における CTAs の発現が及ぼす臨床的影響については不明点が多い。そこで、悪性黒色腫患者 84 症例 114 検体（原発巣：75 検体、転移巣：39 検体）の病理組織標本を用い、代表的な CTAs である NY-ESO-1 と悪性黒色腫における発現意義が不明な XAGE-1b の発現レベルを解析、患者の臨床情報と対応させることでそれらの発現が及ぼす臨床的影響を検討した。検討の結果、XAGE-1b、NY-ESO-1 とともに原発巣に比して転移巣で発現率が高まる傾向があった。病期別評価では、ステージのリンパ節転移検体 22 例で XAGE-1b 陰性例は陽性例に比べ全生存率が有意に良好であり（ $p = 0.045$ ）、NY-ESO-1 および XAGE-1b が共に陰性の症例も他症例と比べ有意に予後良好であった（ $p = 0.035$ ）。また、HLA

クラスは 1 例を除いて陽性であった。以上より、XAGE-1b、NY-ESO-1 の腫瘍細胞における発現は悪性黒色腫の病期進行に關連し、ステージ 症例のリンパ節検体における発現は患者の不良な予後と關連する可能性が示唆された。

引用文献

1. Davies H, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417:949-54
2. Flaherty KT, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363:809-19.
3. Villanueva J, V et al. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell*. 2010;18:683-95.

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 5 件）

- (1) Baba Y, Funakoshi T, Mori M, Emoto K, Masugi Y, Ekmekcioglu S, Amagai M, Tanese K. Expression of monoacylglycerol lipase as a marker of tumour invasion and progression in malignant melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venerol*, 2017;31:2038-45. 査読有
- (2) Mori M, Funakoshi T, Kameyama K, Kawakami Y, Sato E, Nakayama E, Amagai M, Tanese K. Lack of XAGE-1b and NY-ESO-1 in metastatic lymph nodes may predict the potential survival of stage III melanoma patients. *J Dermatol*, 2017;44:671-68. 査読有
- (3) Nakamura Y, Kitano S, Takahashi A, Tsutsumida A, Namikawa K, Tanese K, Abe T, Funakoshi T, Yamamoto N, Amagai M, Yamazaki N. Nivolumab for advanced melanoma: pretreatment prognostic factors and early outcome markers during therapy.

Oncotarget. 2016 22;7:77404-77415. 査読有

- (4) Ekmekcioglu S, Davies MA, **Tanese K**, Roszik J, Shin-Sim M, Bassett RL Jr, Milton DR, Woodman SE, Prieto VG, Gershenwald JE, Morton DL, Hoon DS, Grimm EA. Inflammatory Marker Testing Identifies CD74 Expression in Melanoma Tumor Cells, and its Expression Associates with Favorable Survival for Stage III Melanoma. *Clinical Cancer Research*. 2016;22:3016-24. 査読有
- (5) **Tanese K**, Hashimoto Y, Berkova Z, Wang Y, Samaniego F, Lee JE, Ekmekcioglu S, Grimm EA. Cell Surface CD74-MIF Interactions Drive Melanoma Survival in Response to Interferon-gamma. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2015;135:2775-84. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 森真理子, 船越建, 高橋勇人, 天谷雅行, 亀山香織, 河上裕, 佐藤永一, 中山睿一, **種瀬啓士** 悪性黒色腫患者における癌精巢抗原、XAGE-1b の発現と予後の解析 第115回日本皮膚科学会総会, 2016
- (2) **種瀬啓士**, Suhendan Ekmekcioglu, Elizabeth Grimm
インターフェロン γ の刺激に対してメラノーマ細胞が示す生存応答機序の検討
第31回皮膚悪性腫瘍学会, 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

種瀬 啓士 (TANESE, Keiji)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教
研究者番号: 70464815

(2) 研究協力者

坂元 亨宇 (SAKAMOTO, Michiie)
Ekmekcioglu, Suhendan