様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　５ 月 ２７ 日現在

機関番号： ３２６５９
研究種目： 基盤研究(C)（一般）
研究期間： 2017～2019
課題番号： １７Ｋ０７３４９

研究課題名（和文）インテグリン生存シグナルの新規制御機構による悪性黒色腫のBRAF阻害剤耐性機構

研究課題名（英文）A mechanism of BRAF inhibitor resistance of malignant melanoma by a novel regulatory mechanism of integrin-mediated survival signaling

研究代表者
米田　敦子（Yoneda, Atsuko）

東京薬科大学・生命科学部・講師

研究者番号：８０５９０３７２

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）：悪性黒色腫は、BRAF遺伝子に活性化変異をもつ症例が多く、BRAF阻害剤治療は奏功するが、耐性を得る。本研究では、この耐性に細胞表面糖鎖の変化と、細胞膜外膜リン脂質の変化による細胞接着因子インテグリンシグナルの変化が重要であるか検討した。BRAF阻害剤処理により、インテグリンシグナル関連因子CD63が高度にポリラクトサミン糖鎖修飾を受け、結果として細胞表面に多く出現し、薬剤感受性をあげることを示した。細胞膜内膜に偏在するとされてきた特定の脂質の、黒色腫細胞の外膜への出現を検出し、細胞接着への関与を示唆した。これらの結果は、薬剤耐性悪性黒色腫の治療薬開発の基盤形成に繋がる。

研究成果の学術的意義や社会的意義
がん化に伴って細胞表面の糖鎖構造が変化することは知られていたが、抗がん剤耐性に伴う変化については不明な点が多く、特に悪性黒色腫では報告がなかった。本研究では、抗がん剤処理により特定の糖鎖合成能が増加し、その結果CD63が細胞表面に多く出現することで薬剤に対する感受性が上がることを示した。また、細胞膜内膜にのみ存在するとされてきた特定のリン脂質が外膜にも出現することを検出し、この脂質が細胞接着に関わることを示唆した。これらの成果は、薬剤耐性悪性黒色腫の診断や治療法開発の基礎となろう。

研究成果の概要（英文）：Most malignant melanoma cases carry BRAF-active mutations, therefore the BRAF inhibitor is effective in treatments. But drug resistance eventually develops. This study examined whether changes in the integrin-survival signaling affected by alterations in cell surface glycosylation and in phospholipids in outer leaflet of plasma membranes involve in the BRAF inhibitor resistance of melanoma cells. Our results showed that CD63, an integrin signaling-associated molecule, was highly modified with polylactosamine sugar chains upon the BRAF inhibitor treatments, resulting in upregulated expression of cell surface CD63 and increases in the BRAF inhibitor susceptibility. We detected appearance of lipids, which are primarily located in inner leaflet of plasma membrane, in outer leaflet of melanoma cells, and exhibited its involvement in cell adhesion. These results may lead to develop a novel tool to treat drug-resistant malignant melanoma.

研究分野： 細胞生物学

キーワード： 糖鎖　脂質　悪性黒色腫　薬剤耐性

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

皮膚癌による死亡の 80% を占める悪性黒色腫は、約半数の症例で BRAF 遺伝子に活性化変異があるため、BRAF 阻害剤による治療は奏功するが、半年後には再発する。その原因の一つに MAPK 経路の再活性化があり、MEK 阻害剤との併用がなされているが、再び耐性を獲得することから、別の方法、例えば薬剤耐性黒色腫細胞特異的な表面抗原標的法が必須であった。

細胞膜タンパク質の多くは糖タンパク質であり、糖鎖構造の変化は結合分子との相互作用能などの機能、多量体形成、局在や安定性に影響する。癌悪性化に伴う細胞膜糖鎖の変化はながく知られているが、薬剤耐性細胞における糖鎖合成マシーナリーの変化と薬剤耐性の関連についての理解は不十分で、悪性黒色腫に至っては報告がなく、検証すべき重要な課題であった。

２．研究の目的

ヒト悪性黒色腫細胞の BRAF 阻害剤耐性株と感受性株を比較した予備実験より、細胞外マトリックス受容体インテグリンシグナルに関わる CD63 分子の糖鎖修飾に顕著な差を見出した。また細胞膜内葉に偏在するとされてきたホスファチジルイノシトール4,5-２リン酸 (PIP_2) を黒色腫細胞の細胞膜伸展部外葉に見出した。本研究では、悪性黒色腫細胞の BRAF 阻害剤耐性には、細胞膜糖鎖の変化と、細胞膜外葉 PIP_2 量の変化を介したインテグリン生存シグナルの変化が重要であるという仮説を検証することを目的とした。

３．研究の方法

（１）インテグリンシグナル関連分子 CD63 の糖鎖構造同定

BRAF 阻害剤処理有無のヒト悪性黒色腫細胞、BRAF 阻害剤耐性悪性黒色腫株と感受性株について、CD63 の発現量と分子量をウエスタンブロットにより解析した。レクチン固定化ゲルを用いたプルダウンとウエスタンブロットにより、BRAF 阻害剤処理有無のヒト悪性黒色腫細胞における CD63 の糖鎖構造を解析した。変化した糖鎖の合成に関わる糖転移酵素の発現変化を、BRAF 阻害剤処理有無の細胞について定量的 RT-PCR により解析した。当該酵素の遺伝子を導入あるいは抑制し、CD63 の分子量をウエスタンブロットにより、細胞での局在を FACS、細胞染色により解析した。

（２）細胞膜外葉への PIP_2 反転によるインテグリン活性制御

細胞膜内葉に偏在するとされてきた PIP_2 の外葉への出現を検出し、定量するプローブを作成した。PIP_2 をマスキングすることにより阻害するための試薬を調製し、細胞接着、細胞移動などの解析に用いた。マスキングした際のインテグリンの活性状態を抗体染色により解析した。

（３）悪性黒色腫細胞の薬剤耐性に対する CD63 の糖鎖改変効果の検証

糖鎖改変細胞、CD63 過剰発現細胞、CD63 発現抑制細胞、CD63 発現 BRAF 阻害剤耐性株を BRAF 阻害剤存在下で培養し、生存細胞数を比較した。CD63 の過剰発現によるインテグリンシグナル変化をウエスタンブロットにより解析した。

４．研究成果

研究の主な成果

（１）インテグリンシグナル関連分子 CD63 の糖鎖構造同定

CD63 は悪性黒色腫関連抗原として知られていたが、BRAF 阻害剤耐性への関与についての報告はなかった。６種のヒト悪性黒色腫細胞株の BRAF 阻害剤耐性能と CD63 の発現量の関連を調べたところ、CD63 発現量の低い細胞株は薬剤耐性能が高いことが見出された。さらに、BRAF 阻害剤耐性株では、感受性株に比べ、CD63 の発現量が低いことを見出した。感受性株を BRAF 阻害剤で処理すると、CD63 の高分子量分子種の量が増加すること、BRAF 阻害剤耐性株でも CD63 の高分子量分子種が主要分子種であることが見出された。

BRAF 阻害剤処理による CD63 の高分子量分子種の発現が *N*-型糖鎖構造の変化によることを、CD63 の各種糖鎖付加部位変異体の作成と発現により明らかにした。さらに、糖鎖構造変化がポリラクトサミン糖鎖（右図）修飾の増加によることを、ポリラクトサミン糖鎖を認識するトマトレクチン固定化ゲルを用いたプルダウンとウエスタンブロットにより示した。ポリラクトサミン糖鎖の合成に関わる糖転移酵素群のうち、β1,3GlcNAc 転移酵素-2の発現が、感受性株の BRAF 阻害剤処理により増加することを定量的 RT-PCR により示した。当該酵素の遺伝子を導入すると、CD63 の分子量が増加し、元来リソソームに局在する CD63 が細胞表面に多く検出された。逆に、当該酵素の発現抑制により、抗がん剤処理による CD63 の分子量増加と細胞表面での増加が認められなくなった。さらに、耐性株では、細胞表面のポリラクトサミン糖鎖量が増加しており、当該糖鎖合成能力の亢進が示唆された。

ポリラクトサミン構造を有する*N*-型糖鎖の例

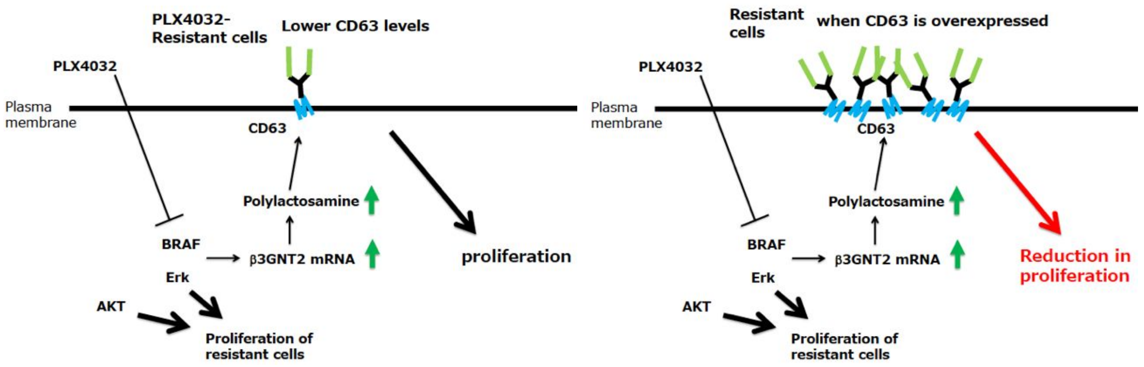
（２）細胞膜外葉への PIP_2 反転によるインテグリン活性制御

細胞膜内葉に偏在するとされてきた PIP_2 の外葉への出現を抗 PIP_2 抗体と PIP_2 プローブを用いて検出した。また外葉 PIP_2 を定量するため、PIP_2 特異的蛍光プローブとその対照プローブを作成し、悪性黒色腫細胞の外葉の PIP_2 を FACS により定量した。また、細胞膜外葉に存在するプローブを検出できる HiBiT 標識プローブとその対照プローブも作成し、解析系を確立した。細胞膜外葉 PIP_2 をマスキングすることにより阻害するための試薬を調製し、がん細胞の細胞接着、細胞移動が阻害されることを示した。細胞膜外葉 PIP_2 をマスキングした際の β1 インテグリンの活性状態を抗体染色により解析したが、変化は認められなかった。

（３）悪性黒色腫細胞の薬剤耐性に対する CD63 の糖鎖改変効果の検証

内在性 CD63 の発現量が低く、BRAF 阻害剤耐性が高いヒト悪性黒色腫株２種に CD63 を過剰発現させると、BRAF 阻害剤感受性が亢進した。しかし、インテグリンの下流因子として機能し、細胞増殖生存に関わるタンパク質リン酸化酵素 Akt や Erk の活性化状態や、細胞接着能には、CD63 の過剰発現による変化は認められなかった。一方、内在性 CD63 の発現量が高く、BRAF 阻害剤に感受性の高いヒト悪性黒色腫株２種で CD63 を抑制すると、薬剤耐性が亢進した。ヒト悪性黒色腫株に β1,3GlcNAc 転移酵素-2を過剰発現すると、BRAF 阻害剤処理なしの培養条件で、対照細胞と比べ細胞増殖が減少した。当該糖転移酵素を発現すると CD63 の細胞表面発現量が増加したこと（上述）と、強制的に細胞膜にCD63を発現局在させると BRAF 阻害剤処理せずに細胞増殖が低下したことから、CD63 の細胞表面存在量が BRAF 阻害剤処理への感受性の指標となる可能性が考えられた。

BRAF 阻害剤耐性株に CD63 を発現すると、薬剤処理有無に関わらず、対照細胞に比べ低い細胞増殖能を示した。上述の結果と合わせ、耐性株では β1,3GlcNAc 転移酵素-2発現量が高いために、過剰発現された CD63 が効率よくポリラクトサミン糖鎖で修飾され、結果として薬剤処理の有無にかかわらず細胞膜に輸送され、これが細胞増殖の抑制に繋がったものと考えられた（下図）。



得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

悪性黒色腫の抗がん剤耐性獲得に伴う細胞表面の複合糖質の構造の変化についての報告はなかった。本研究では、BRAF 阻害剤処理によりポリラクトサミン糖鎖合成能が亢進し、その結果生じる CD63 の高分子量分子種が細胞表面に増加し、これが薬剤感受性の亢進と相関することを示した。また、特定の糖タンパク質の特定の糖鎖構造の増加が、当該糖タンパク質の細胞内局在を著しく変化させるという例を示した。

細胞膜内葉に偏在するとされてきた PIP_2 の外葉への出現を悪性黒色腫細胞も含めた様々な細胞で検出し、細胞接着や細胞移動への関与を示した。

今後の展望

悪性黒色腫細胞表面の CD63 量がBRAF阻害剤処理の効能予測の指標になるのかについて臨床検体での検討が望まれる。CD63 の発現を誘導する試薬の開発も、BRAF 阻害剤との併用による悪性黒色腫の効果的治療法として魅力あるものとなろう。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Kohya Kudo, Atsuko Yoneda, Daiki Sakiyama, Kai Kojima, Takeki Miyaji, Miku Yamazaki, Saori Yaita, Takuya Hyodo, Reiko Satow, Kiyoko Fukami	４．巻 33
２．論文標題 Cell surface CD63 increased by up-regulated polylactosamine modification sensitizes human melanoma cells to the BRAF inhibitor PLX4032	５．発行年 2019年
３．雑誌名 The FASEB Journal	６．最初と最後の頁 3851～3869
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201800664RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Atsuko Yoneda, Kaori Kanemaru, Ai Matsubara, Erika Takai, Makoto Shimozawa, Reiko Satow, Hideki Yamaguchi, Yoshikazu Nakamura, Kiyoko Fukami	４．巻 in press
２．論文標題 Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is localized in the plasma membrane outer leaflet and regulates cell adhesion and motility	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	６．最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.05.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計11件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 金丸 佳織、米田 敦子、松原 愛、中村 由和、深見 希代子
２．発表標題 細胞膜外葉に存在するホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸の検出および生理機能の解析
３．学会等名 第６１回日本脂質生化学会
４．発表年 2019年

１．発表者名 工藤　光野、米田 敦子、崎山　大輝、小島　魁、宮地　建樹、深見 希代子
２．発表標題 糖鎖変化により増加した細胞表面CD63はメラノーマ細胞のBRAF阻害剤耐性を減弱させる
３．学会等名 第３８回日本糖質学会
４．発表年 2019年

１．発表者名
金丸佳織，米田敦子，松原愛，中村由和，深見希代子

２．発表標題
細胞膜外葉におけるホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸の検出と機能解析

３．学会等名
第９２回日本生化学会

４．発表年
2019年

１．発表者名
Kai Kojima, Kohya Kudo, Atsuko Yoneda, Daiki Sakiyama, Takeki Miyaji, Kiyoko Fukami

２．発表標題
Cell surface CD63 increased by upregulated polylactosamine modification suppresses human melanoma cell proliferation under PLX4032 treatment

３．学会等名
第７１回日本細胞生物学会

４．発表年
2019年

１．発表者名
Atsuko Yoneda and Kiyoko Fukami

２．発表標題
Plasma membrane localization of lysosomal protein CD63 sensitizes human melanoma cells to the BRAF inhibitor PLX4032

３．学会等名
International Symposium “Roles of membrane contact sites in organelle dynamics and diseases”（国際学会）

４．発表年
2019年

１．発表者名
工藤　光野、崎山　大輝、小島　魁、宮地　建樹、米田 敦子、深見 希代子

２．発表標題
BRAF 変異ヒトメラノーマ細胞の Vemurafenib耐性におけるCD63のN-型糖鎖の機能

３．学会等名
第37回日本糖質学会

４．発表年
2018年

１．発表者名 工藤　光野、崎山　大輝、宮地　建樹、米田 敦子、深見 希代子
２．発表標題 メラノーマ細胞のBRAF阻害剤耐性におけるCD63のN-型糖鎖修飾の機能
３．学会等名 第91回日本生化学会
４．発表年 2018年

１．発表者名 松原愛、米田敦子、金丸佳織、中村由和、深見希代子
２．発表標題 イノシトールリン脂質の新たな細胞膜動態
３．学会等名 第91回日本生化学会
４．発表年 2018年

１．発表者名 工藤　光野、崎山　大輝、宮地　建樹、米田 敦子、深見 希代子
２．発表標題 メラノーマ細胞のBRAF阻害剤感受性におけるCD63のN-型糖鎖修飾の役割
３．学会等名 第69回日本細胞生物学会
４．発表年 2017年

１．発表者名 工藤　光野、崎山　大輝、宮地　建樹、米田 敦子、深見 希代子
２．発表標題 メラノーマ細胞のBRAF阻害剤感受性におけるCD63のN-型糖鎖修飾の役割
３．学会等名 第36回日本糖質学会
４．発表年 2017年

１．発表者名
工藤　光野、崎山　大輝、宮地　建樹、米田 敦子、深見 希代子

２．発表標題
メラノーマ細胞のBRAF阻害剤感受性におけるCD63のN-型糖鎖修飾の役割

３．学会等名
第90 回日本生化学会

４．発表年
2017年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ
http://toyaku-ls-genome.com/publications.html

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考