

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07022

研究課題名(和文) 悪性黒色腫の浸潤転移機構におけるNFE2L2の役割の解析

研究課題名(英文) The study for the role of NFE2L2 on cell invasion in malignant melanomas.

研究代表者

柴崎 晶彦 (Shibazaki, Masahiko)

岩手医科大学・医歯薬総合研究所・助教

研究者番号：20445109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、PGC1 α 経路とNFE2L2経路の相関関係をメラノーマで検討した。メラノーマのうちBRAF遺伝子にV600E変異を有するものは、BRAF阻害剤ベムラフェニブがPGC1 α 経路を介し転移抑制することが知られている。我々は、このような効果が確認できなかった培養細胞株において、NFE2L2経路を遮断すると細胞浸潤が抑制されるものを見出した。その機構として、転写制御BACH1を介することを確認した。以上から、当初想定したPGC1 α 経路とNFE2L2経路は独立的なものであること、また、NFE2L2経路の抑制はベムラフェニブが奏効しないメラノーマの浸潤転移抑制に有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

浸潤能、すなわち転移能の獲得は、メラノーマの腫瘍生物学的特徴の一つであり大きな臨床治療上の大きな問題でもある。本研究の学術的な意義は、NFE2L2の非悪性腫瘍と悪性腫瘍において浸潤機構における位置付けが異なる可能性、さらに、同一のメラノーマで複数の独立した浸潤制御系が存在する可能性を示した点である。また社会的意義としては、ベムラフェニブが奏効しない多くのメラノーマの治療標的として、NFE2L2からBACH1へ至る経路に存在する因子が標的となりうる可能性を示した点である。

研究成果の概要(英文)：Here, we have investigated the relationship between the PGC1 α and NFE2L2 pathways in malignant melanoma cell lines. Vemurafenib, a BRAF inhibitor, has been shown to inhibit cell invasion via the PGC1 α pathway in malignant melanoma harboring the V600E mutation in the BRAF gene. We have found that disruption of the NFE2L2 pathway inhibited the invasive activity of a cell line on which vemurafenib had no inhibitory effect. We also confirmed that the transcription factor BACH1 induced via the NFE2L2 pathway was involved in the mechanism. These findings suggest that the PGC1 α and NFE2L2 pathways control cell invasion independently, and that inhibition of the NFE2L2 pathway may also be a promising approach for inhibiting the invasion of malignant melanomas for which vemurafenib is not effective.

研究分野：分子生物学

キーワード：メラノーマ NFE2L2経路 PGC1 α 経路 細胞浸潤機構

1. 研究開始当初の背景

- (1) 悪性黒色腫（メラノーマ）は、予後不良の固形腫瘍の一種であり、我が国でも近年患者数は増加傾向にある。メラノーマ治療薬として近年注目されるベムラフェニブは、活性型 BRAF 変異タンパク質を標的とし、BRAF 変異を有するメラノーマに対して強い抗腫瘍効果を認めるが、正常型 BRAF をもつ患者には効果がないこと^[1]、ベムラフェニブに対する薬剤耐性が比較的早期に現れること^{[2],[3]}、また、活性型 BRAF 変異は日本人に多い末端黒子型黒色腫では、わずか 10%程度であり^[4]、日本人のメラノーマ患者に対する適用が限られることが問題として挙げられている。
- (2) 一方、BRAF 変異を有しないメラノーマの治療薬剤として、一般的にシスプラチンやダカルバジン系薬剤が用いられるが、その奏功率は 10%程度と低いことが問題となる。既知の薬剤治療が奏功しない場合、多くは肺や骨へ転移がみられ、患者の生存率を低下させる大きな原因となっている。このように、転移を抑制する機構の解析は、腫瘍細胞増殖を抑制する抗がん剤と並び、治療奏効率向上のための鍵となる。
- (3) 申請者はこれまでに、メラノーマの治療標的となり得る新規分子変異を、次世代シーケンサーを用いて解析した。その結果、①Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) 遺伝子の不活性化変異が症例全体の 20%程度にみられること、②それにより活性化される NF-E2-related factor 2 (NFE2L2) が薬剤耐性能の獲得に関与することを見出した^[5]。NFE2L2 は、解糖系酵素群の転写制御を制御することで腫瘍増殖に積極的な関与をしている。しかし、メラノーマの生物学的特徴の一つである高転移性が知られているが^[6]、浸潤転移への関与については不明な点が多い。
- (4) 近年、本来ミトコンドリア合成に関わる転写共益因子 Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α (PGC1 α) が、メラノーマにおいてインテグリン抑制因子を転写促し浸潤転移に関与すること^[7]、さらには PGC1 α が、NFE2L2 と相互作用し NFE2L2 の標的遺伝子の発現を制御すること^[8]が示されている。これらをもとに、申請者は、NFE2L2 は、PGC1 α との相互作用により、インテグリン生成に関わる遺伝子群を制御することで転移浸潤抑制に関与しており、NFE2L2 はメラノーマの浸潤転移抑制の標的因子となり得ると想定した。

2. 研究の目的

本研究では、PGC1 α を介したインテグリン生成における NFE2L2 の関与を明らかにするとともに、メラノーマが転移能を獲得する上での NFE2L2 の位置づけ、さらにはメラノーマの転移抑制における標的となりうるかを検討することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 遺伝子発現ベクターの作成: 本研究で用いた目的遺伝のうち hTERT, TP53, CDK4, MITF-M はアドジーンより、NFE2L2 はかずさ DNA 研究所より購入した。TP53, CDK4, NFE2L2 は PCR 法により塩基置換や塩基除去をおこない恒常活性型を作出し、それぞれ TP53DD, CA-CDK4, CA-NFE2L2 とした。目的遺伝子はレンチウイルスベクター (pVSIIN シリーズ、タカラバイオ) に組替えた。

- (2) **siRNA 法**: コントロールとしての siRNA オリゴ、または NFE2L2 と PGC1α の非翻訳領域に対する siRNA オリゴは、プレデザインのものインビトロジェン社より購入した。
- (3) **初代培養系の形質転換細胞の作出と培養細胞株**: ヒトメラノサイト由来の初代正常培養細胞 (HEMn-LP) は東洋紡より購入し、レンチウイルスシステム (タカラバイオ) をもちいて形質転換遺伝子群を導入した。ヒトメラノーマ細胞株は G361, A7, MeWo, C32 をもちいた。
- (4) **細胞浸潤能の検討**: 細胞浸潤能は、BioCoat™ マトリゲルインベージョンチャンバー (コーニング) を用い評価した。
- (5) **ウェスタンブロットと抗体**: 1 次抗体 [NFE2L2 (Abcam), BACH1 (Proteintech), PGC1α (NOVUS), β-actin (Sigma-Aldrich) 抗体] はブロッキング液で 1000 倍に希釈し、4°C で 16 時間以上反応させた。
- (6) **統計処理**: 複数回の結果を Student の t 検定により解析し、5% 以下を有意と判定した。

4. 研究成果

- (1) 非腫瘍細胞と悪性腫瘍細胞で浸潤制御系に対する NFE2L2 の関与が異なる可能性

① ヒト由来正常メラノサイト

(HEMn-LP) に hTERT を導入することで形質転換メラノサイトを作出した。この細胞は安定的に長期培養が可能であるが、ヌードマウスへの皮下移植による造腫瘍性は見られない。形質転換メラノサイトに TP53DD, CA-CDK4 さらに MITF-M を導入した細胞株 (Fig1A) では、形質転換メラノサイトに比べ、有意な細胞浸潤の亢進が見られた (Fig1B: 1, 2, 3)。

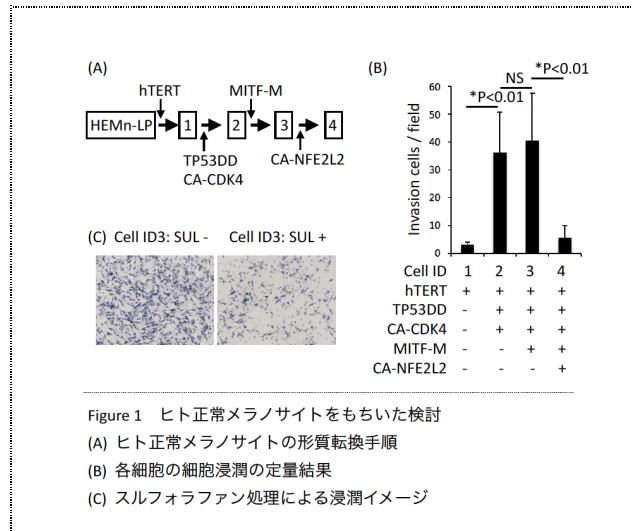


Figure 1 ヒト正常メラノサイトをもちいた検討

(A) ヒト正常メラノサイトの形質転換手順

(B) 各細胞の細胞浸潤の定量結果

(C) スルフォラファン処理による浸潤イメージ

1, 2, 3)。このような細胞浸潤の亢進は、スルフォラファンで NFE2L2 を活性化すること (Fig1C)、または、CA-NFE2L2 を追加的導入すると (Fig1B: 4) 顕著に抑制された。

② 一方、ヒトメラノーマ細胞株

G361 をもちいて、スルフォラファンの細胞浸潤への効果を検討した結果、ヒト由来正常メラノサイトの結果とは逆に細胞浸潤が亢進することを見出した (Fig2A: siCont, B: 1, 2, 3)。この、細胞浸潤の亢進は NFE2L2 を siRNA 法によりノックダウンすることから NFE2L2 に依存的であることが示された (Fig2A: siNFE2L2, B: 4, 5, 6)。

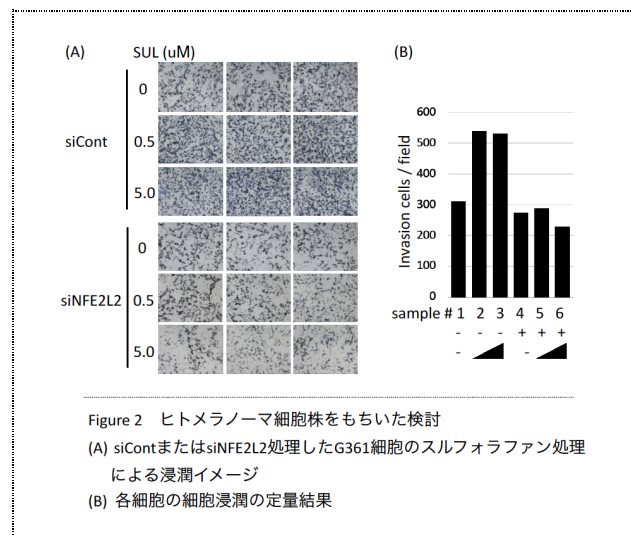


Figure 2 ヒトメラノーマ細胞株をもちいた検討

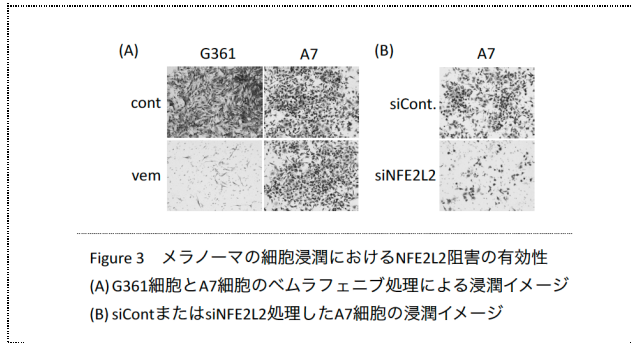
(A) siCont または siNFE2L2 処理した G361 細胞のスルフォラファン処理による浸潤イメージ

(B) 各細胞の細胞浸潤の定量結果

③ 以上から、ヒト由来正常メラノサイト由来の形質転換細胞とヒトメラノーマ細胞株で浸潤制御系に対する NFE2L2 の関与が異なる可能性が示唆された。本研究で用いたメラノーマ細胞株は BRAF^{V600E} 変異を有し、恒常的かつ強力な MAPK 経路を介した細胞増殖が特徴である。それに対し、ヒト由来正常メラノサイトより作出した形質転換細胞は BRAF^{V600E} 変異を有していない。NFE2L2 は BRAF 下流の分子機能へ作用する可能性を想定しているが、現段階で具体的機構は不明である。これ以降は、ヌードマウスへの造腫瘍性が見られるヒトメラノーマ細胞株を用いて検討した。

(2) ベムラフェニブで細胞浸潤が抑制されないメラノーマにおける NFE2L2 阻害の有効性

① V600E 変異を持つ BRAF は恒常活性型であり、日本人のメラノーマのうち約 10%が同変異を有する^[4]。ベムラフェニブは臨床的に使用されている代表的な BRAF 阻害剤であり、メラノーマの増殖とともに転移も抑制することも知られている^[7]。本研究で



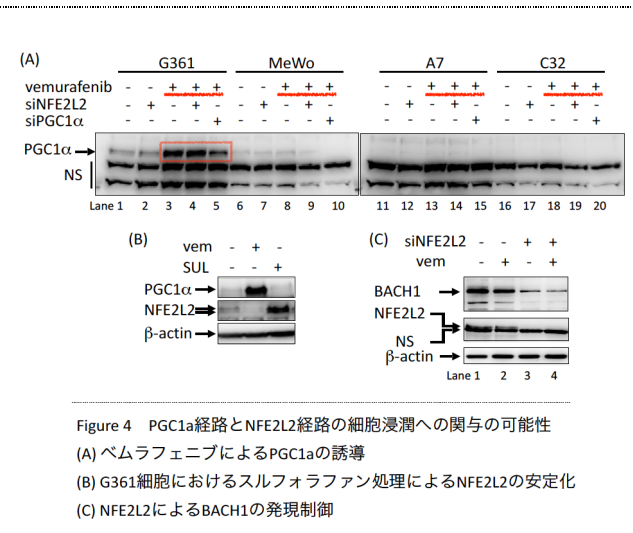
もヒトメラノーマ細胞株 G361 細胞は、ベムラフェニブ処理により細胞浸潤が顕著に抑制されることが確認できた。一方、ベムラフェニブで細胞浸潤がほとんど抑制されないヒトメラノーマ細胞株 A7 を見出した (Fig3)。

② A7 細胞を siRNA 法により NFE2L2 の発現抑制すると、細胞浸潤が減弱した (Fig3B)。

③ 以上から、ベムラフェニブで細胞浸潤が抑制されないメラノーマにおいて、NFE2L2 阻害が有効であることが示唆された。

(3) NFE2L2 経路と PGC1α経路の浸潤制御機構における独立性

① ベムラフェニブが細胞浸潤を抑制する機構として、PGC1αを介した経路が知られている^[7]。ベムラフェニブは PGC1αを誘導し、最終的に転写因子 TCF4 を不活性化することで浸潤関連遺伝子群の転写を抑制する。そこで、本研究では各種メラノーマ細胞株においてベムラフェニブが PGC1αを誘導するかを検討した。もちいた 4 細胞株のうち、G361 細胞を除いて、ベムラ



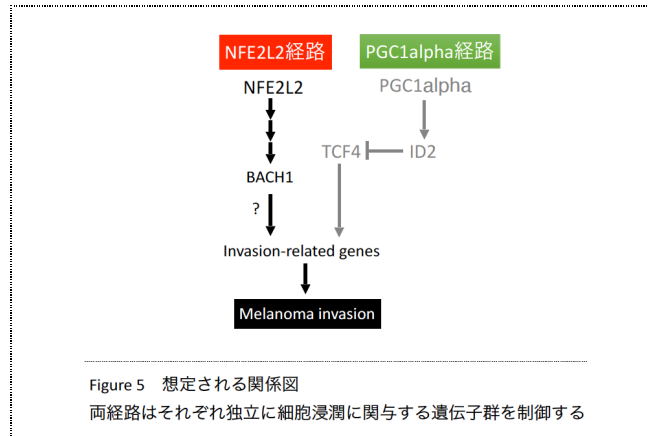
フェニブで PGC1αが誘導されないことを見出した (Fig4A)。G361 細胞は、スルフォラファンで細胞浸潤が亢進するが (Fig2A)、同時に NFE2L2 を安定化することも確認できた (Fig4B)。

② NFE2L2 は、転写因子 BACH1 を介して細胞浸潤に関連する遺伝子群の転写を制御することが知られている^{[9],[10]}。恒常的に NFE2L2 が安定的に高発現する A7 細胞において siRNA 法で NFE2L2 の発現を抑制すると、BACH1 の抑制も確認できた (Fig4C)。

- ③ 以上から、ヒトメラノーマの細胞浸潤を制御する機構として PGC1 α が干渉する経路と、NFE2L2 を介した経路が存在しうることが示された。これらの経路は、それぞれ転写因子 TCF4 と BACH1 が浸潤関連遺伝子群の転写制御に関与する。

(4) 想定される経路と治療標的

- ① 本研究より、ベムラフェニブにより PGC1 α 経路が誘導されないメラノーマ細胞株を同定した (Fig4A)。このようなメラノーマ細胞株はベムラフェニブで浸潤がほとんど抑制されないが (Fig3A)、NFE2L2 経路 (Fig5) を遮断すると、浸潤が有意に抑制されることを見出している (Fig3B)。そこで、NFE2L2 経



路は治療標的となりうると考えるが、現時点で NFE2L2 に対する特異的阻害剤は開発されていない。そこで NFE2L2 から BACH1 に至る経路のうち、特に中間因子であるヘムオキシゲナーゼに注目しその特異的阻害剤を治療薬候補として期待できる。さらに、ヘムオキシゲナーゼの基質である細胞内ヘミンを急性ポルフィリン症治療薬により増加させることも転移抑制に有効と考える。また、非小細胞肺癌やメラノーマ以外でも NFE2L2 を高発現する例が知られている。すなわち、本研究により提示する治療法および治療標的は、多くの種類の腫瘍において転移抑制方法として適用できる可能性がある。

- ② また、本研究で検討したヒトメラノーマ細胞 G361 ようにいずれの経路も関与する場合 (Fig2, Fig3A) と、A7 細胞のように NFE2L2 経路のみが関与する場合 (Fig3A, B) が示された。以上から TCF4 と BACH1 の標的遺伝子群にどの程度の共通性が見られるかが今後のポイントとなる。

<引用文献>

- [1] Joseph W. et al., PNAS 2010
- [2] Nazarian R. et al., Nature 2010
- [3] Johannessen M. et al., Nature 2010
- [4] Saldanha G. et al., Clin. J. Cancer 200
- [5] Miura et al., J. Invest. Dermatol. 2014
- [6] Mitsuishi Y. et al., Cancer Cell 2012
- [7] Luo C. et al., Nature 2016
- [8] Cherry A. et al., J. Biol. Chem. 2014
- [9] Lignitto L. et al., Cell 2019
- [10] Wiel C. et al., Cell 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------