

令和 6 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：20H03849
研究課題名（和文）特定波長光によるメラノーマ増殖・転移抑制メカニズムの解明—Gq変異を巡って—

研究課題名（英文）Analysis of metastasis and growth of melanoma cells under irradiation of specific light exposure with Gq mutation

研究代表者
橋川 和信（Hashikawa, Kazunobu）

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90403237
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題においては、OPN4のセカンドメッセンジャーであるGqタンパク質の変異を生じたメラノーマ細胞株を樹立し、その挙動を解析することにある。本研究においては、MEWO株およびG361株を対象にした。まず、それぞれの細胞株においてR138Q変異がすでに備わっていないことを、Gqの全長配列解析により明らかにした。次に、Gq遺伝子に対して、2箇所の一残基配列変異の導入を試みた。一つはR138Q変異を目的としており、もう一つは変異導入の確認のためのサイレント変異である。本研究期間中にR138Q変異の導入に成功し、塩基配列上も確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メラノーマはGqのG138Q変異によりその悪性度を増し、転移を生じやすくなることが最初に明らかとなった悪性腫瘍である。またGqはOPN4を介して青色光により活性化される。近年、Gqの同様の変異は他の悪性腫瘍の挙動にも影響を与えることが明らかとなっており、新薬の開発ターゲットとなっている。われわれが樹立してきた細胞株はOPN4を介して青色光でシグナルをコントロールすることができる。今後、新薬の候補が開発された際には、本細胞株を用いることでその効能を容易に解析することができるモデルとなり得る。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we aim to establish melanoma cell lines with mutations in the Gq protein, a second messenger of OPN4, and analyze their behavior. For this study, we focused on the MEWO and G361 cell lines. First, we confirmed that the R138Q mutation was not already present in either cell line by performing a full-length sequence analysis of Gq. Next, we attempted to introduce two single amino acid sequence mutations into the Gq gene. One was the R138Q mutation, and the other was a silent mutation to confirm the introduction of the mutation. During the research period, we successfully introduced the R138Q mutation and confirmed it at the nucleotide sequence level.

研究分野：形成外科学

キーワード：メラノーマ Gq 青色光 OPN4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫(以下 Melanoma)は極めて制御が困難な悪性腫瘍の一つである。近年、分子標的薬の開発は Melanoma 治療に光をもたらした。Melanoma における BRAF や NRAS 遺伝子の変異は MAP-kinase 経路の活性化を生じることが明らかとなり、BRAF 阻害剤であるベムラフェニブなどの分子標的薬はこれらを標的として開発されてきたが、実際にはこれらの遺伝子の異常が認められる頻度はそれほど高くない。2009~2010年、Raamsdonkらにより、虹彩に発生する Melanoma のうち、遠隔転移を起こした群では G タンパク質ファミリーのうち Gq サブユニット群(以下 Gq)の遺伝子変異が高率に認められること、また動物実験により、Gq 遺伝子変異株では MAP キナーゼ系の活性化(細胞増殖の活性化)および有意に転移をきたしたことが報告された(Raamsdonk et al. Nature, 2009, Raamsdonk et al. N Eng J Med, 2010)。このシグナル伝達経路は BRAF などからは独立しており、悪性腫瘍治療の標的となる新たなシグナル伝達経路として注目されつつある。その後、Melanoma のみならず消化器系や呼吸器系に発生した悪性腫瘍においても同様の知見が報告されつつある(Parish, et al., Cancer 2018)。

Gq が共役する受容体、つまり G-protein coupled receptor (以下 GPCR)はセロトニン受容体やムスカリン受容体などが知られているが、光受容体である OPN4 も Gq と共役する。われわれはこれまで皮膚に OPN4 が発現していることを発見し、その機能解析を行ってきた(Kusumoto et al., Sci. Rep. under revision)。また、Melanoma 細胞においても同様に OPN4 が発現しており、光シグナルを細胞内シグナルへと変換していることを明らかにした(un-published data)。Gq 変異を巡る知見とわれわれが得た知見とを併せると、光線の暴露は Melanoma の発生に関連するだけではなく、発生した Melanoma の増殖・転移を促進するのでは、という「問い」が生じる。また、この「問い」には、光受容タンパク質を介したシグナル伝達系が関与している可能性が、われわれの先行研究により科学的に推測される。したがって、これまで短波長の光線暴露は Melanoma 発生の危険因子であるとされてきた(Li et al. Cancer Res 2000)が、光線暴露はさらに Gq 変異を伴う場合は転移の危険因子である可能性が考えられる。実際に Melanoma の既往をもつ患者では光線暴露が再発を有意に誘導するとされている(Xu S., et al. Br J Dermatol 2018)。また、近年、LED の使用により青色光(OPN4 の感受性光でもある)への暴露が増え、Melanoma の発生リスクが上昇したとの報告もある(Milham S., et al. Med. Hypotheses 2018)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、光と Melanoma の関連において、これまで示されてきた、「光線暴露が発生の危険因子である」ということに加え、「光線暴露は増殖・転移の危険因子でもある」ことを細胞生物学的に示すことにある。この概念は皮膚の光受容機序を発見・探求してきたわれわれの発想に基づくものであり、今後、GPCR の選択的阻害剤などによる新たな治療法の開発の礎となり得る。

また、われわれはこれまでにヒト正常皮膚細胞を用いて、皮膚の光受容機序を発見・解明してきたが、正常細胞では継代培養を重ねることによる形質転換の問題から光受容タンパク質およびそのシグナル関連タンパク質の knock-down 実験を行うことができなかった。一方でメラノーマ細胞は継代培養による形質転換は考慮の必要がなく、ゲノム編集により knock-out 実験を行うことが可能となるため、ヒト皮膚の光受容モデルともなることが期待される。

3. 研究の方法

(1) Melanoma 細胞株における Gq 塩基配列の決定

われわれが保有している BRAF 変異のある細胞株(G361)および変異のない細胞株(Mewo)に対して Gq 遺伝子の塩基配列解析を行った。

G361 および MEWO 株を培養・増殖させたのち、total RNA を抽出した。これを元に cDNA ライブラリーを作成したのち、primer (F: CCGAGGCACTTTGGAAGAATG R: CCTCTTGTATCTTCAATAGCCCA) を用いて PCR を行った。得られた約 1200bp の PCR 産物を TA クローニングによりプラスミド化した。このプラスミドに対して塩基配列解析を行った。同様に GNA11 に対しても同様に PCR を行った(F: TTGTCCGGCGCTGTCGCTCGGTT R: CGAAGTGTACGGAGGAGAG)。塩基配列解析を行った。

(2) Melanoma 細胞株における OPN4 遺伝子および Gq 遺伝子のゲノム編集

上記(1)での結果(MEWO 株および G361 株のいずれも R138Q 変異を認めない)ことを受け、ゲノム編集技術により R138Q 変異の導入を行うこととした。

guide RNA配列を組み込んだCas9発現ベクターの作成

guide配列: gRNA: 5' -GAGTTCGAGTCCCCACCACA-3'

gRNA: 5' -ATTCGATGATCCCTGTGGTG-3'

を設計し、eSpCas9-2A-Puro(PX459)V2.0に組み込んだ。このプラスミドを細胞株にssODNと

共にエレクトロポレーションを行った。プーロマイシン添加培地によりプラスミドが導入された細胞のみを選択的培養したのち、ゲノムDNAを抽出し、変異の有無を解析した。

ssODNの設計

ssODNにはAat II切断領域をサイレント変異として導入し、また、R183Q変異を生じる配列に一残基置換を加えたものを100bpで設計した。

変異の確認は、増殖された細胞集塊からゲノムDNAを抽出し、得られたPCR断片に対してAat IIによる切断およびGuide-it Resolvaseによる切断により確認を行った。

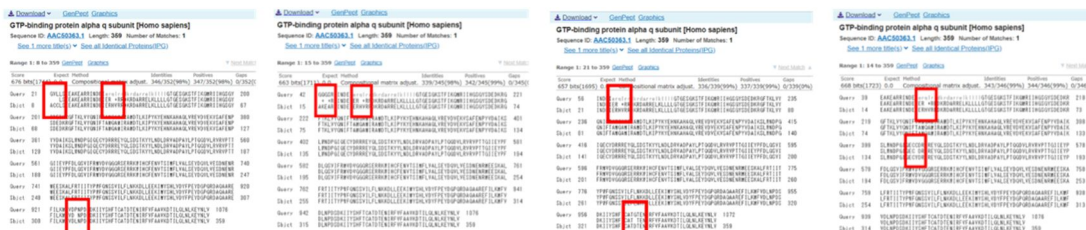
上記では変異導入が認められなかったため、ssODNおよびguide RNA、Cas9タンパク質を細胞株に対してエレクトロポレーションした。Guide RNAはGuide-it™ sgRNA In Vitro Transcription Kit(TAKARA社)を用いて合成し、精製したものを用了。

培養を行った細胞集団からゲノムDNAを抽出し、PCR断片(349bp)に対してAat IIで切断を行い、確認した。

限界希釈法により細胞を96wellプレートに1wellあたり1細胞程度になる様に播種し、培養を行った。ある程度の増殖が認められた時点で35mmディッシュに展開し、さらに培養を継続したのち、一部からゲノムDNAを抽出、PCR産物に対してAat IIによる消化およびguide itシステムにより導入の確認を行った。

4. 研究成果

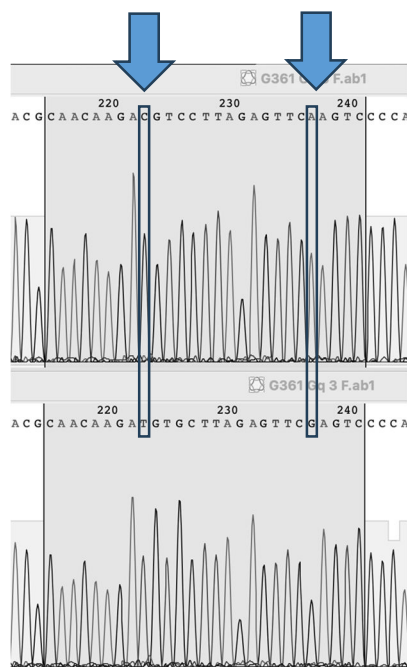
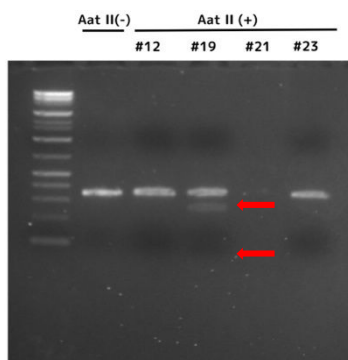
(1) MEWO 株および G361 株における Gq 遺伝子(Gnaq)変異の検出



図注で変異が確認された部分を赤で囲う。本図は G361 株に関するものであるが、変異を認めた部分はそれぞれのクローンで異なっており、この時点ですでにマルチクローンであることが明らかとなった。MEWO 株についても同様であった。一方、今回ターゲットにしている変異 R183Q については、いずれのクローンにおいても、またいずれの細胞株においても変異を認めなかった。

(2)

図に示す様に方法(2)により#19では3本のバンドが認められ、ゲノム編集が行われていることが確認された。



次に得られたクローンに対してスクリーニングを行った結果、右図に示す様に遺伝子変異を導入することに成功した。なお、上段が変異株から得られた塩基配列、下段は正常株である。237番目のG A変異はスクリーニングのためのサイレント変異である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kusumoto Junya, Akashi Masaya, Terashi Hiroto, Sakakibara Shunsuke	4. 巻 25
2. 論文標題 Differential Photosensitivity of Fibroblasts Obtained from Normal Skin and Hypertrophic Scar Tissues	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2126 ~ 2126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms25042126	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
研究分担者	榊原 晶子 (Sakakibara Akiko) (00569866)	神戸大学・医学研究科・医学研究員 (14501)	
研究分担者	野村 正 (Nomura Tadashi) (30529566)	神戸大学・医学部附属病院・准教授 (14501)	
研究分担者	高須 啓之 (Takasu Hiroyuki) (40566022)	山口大学・医学部附属病院・准教授 (15501)	
研究分担者	榊原 俊介 (Sakakibara Shunsuke) (50444592)	神戸大学・医学部附属病院・特命講師 (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	寺師 浩人 (Terashi Hiroto) (80217421)	神戸大学・医学部附属病院・教授 (14501)	

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