

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07571

研究課題名（和文）悪性黒色腫における新規がん制御遺伝子の機能解析と癌治療への応用

研究課題名（英文）Functional analysis of novel genes regulating malignant melanoma and their application to cancer therapy

研究代表者

新澤 康英（Shinzawa, Koei）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70403186

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：GREB1は、ホルモン受容体の補因子である核内タンパク質で、ホルモン受容体により発現誘導され、ホルモン依存性がん細胞の増殖における役割が明らかにされてきたが、GREB1とホルモン非依存性がんとの関連は不明であった。本研究課題により、悪性黒色腫においてGREB1のアイソフォーム4（Is4）が色素細胞特異的転写因子MITFにより発現誘導されることを見出し、GREB1 Is4がピリミジン代謝制御を介して、がん細胞増殖を促進することを明らかにした。さらに、GREB1 Is4に対するアンチセンス核酸が抗腫瘍効果を示したことから、悪性黒色腫においてGREB1 Is4が新たな治療標的であることを提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性黒色腫はメラノサイトという細胞ががん化して発生する悪性腫瘍で、特に白人で頻度が高いが、日本人は10万人あたり1～2人が罹患し、日本全国で、1年間に約1,800人が悪性黒色腫と診断されている。免疫チェックポイント阻害剤の普及により、悪性黒色腫の治療は大きく進歩しているが、未だ治療困難例も存在している。本研究成果により、GREB1 Is4がピリミジン核酸の合成を促進し、がん化を誘導することを示し、GREB1 Is4を介した新たながん化メカニズムを明らかにした。さらに、GREB1が悪性黒色腫の新たな治療標的であり、GREB1へのアンチセンス核酸を用いた治療法が有用であることを示した。

研究成果の概要（英文）：GREB1 is a nuclear protein that acts as a co-factor for hormone receptors, transcribed by hormone receptors, and its role in the proliferation of hormone-dependent cancer cells has been elucidated. However, the relationship between GREB1 and hormone-independent cancer has been unclear. Through this research project, it was found that isoform 4 (Is4) of GREB1 is expressed by the pigment cell-specific transcription factor MITF in malignant melanoma, and it was revealed that GREB1 Is4 promotes cancer cell proliferation through the regulation of pyrimidine metabolism. Furthermore, antisense nucleotides against GREB1 Is4 showed anti-tumor effects, suggesting that GREB1 Is4 is a novel therapeutic target in malignant melanoma.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：悪性黒色腫 GREB1 アンチセンス核酸 ピリミジン合成 マウスモデル メラノサイト メタボローム
解析

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

日本における悪性黒色腫(メラノーマ)の罹患率は10万人あたり1~2人で、年間600~700人程度が死亡し、高齢化とともに発症リスクが高くなり、日本でも増加傾向にある。化学療法、放射線治療が奏効しにくく、転移がんでは5年生存率が30%以下と、極めて悪性度の高い腫瘍として知られている。悪性黒色腫は遺伝子変異が主要因のがんであり、次世代シーケンサーによるゲノム解析により、約60%でBRAF、NRAS変異、約30%でβ-catenin変異(Wntシグナルのメディエーター)があることが判明し、BRAF、NRAS変異は、良性母斑ですでに検出されており、ドライバー遺伝子変異後に起こる遺伝子発現プログラムの変化が、転移能や薬剤耐性獲得に重要と考えられている。当初、GREB1遺伝子は、乳がんや肝芽腫での重要性が指摘されていたが、メラノーマでも高発現していることに着目し、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、メラノーマ発生、悪性化におけるGREB1アイソフォーム4(1s4)の機能を明らかにすることである。初めにGREB1 1s4の転写制御機構を解明するとともに、GREB1 1s4とピリミジン代謝の律速酵素であるCAD (Carbamoyl-phosphate synthetase 2, Aspartate transcarbamylase, and Dihydroorotase)との結合に着目し、ピリミジン合成への関与を検討する。次に、メラノサイト特異的にGREB1 1s4遺伝子を発現したトランスジェニックマウスを作製し、悪性黒色腫発生・成長におけるGREB1 1s4の役割を明らかにする。最後にGREB1 1s4に対するアンチセンス核酸を作製し、抗腫瘍効果の有無を検討する。

3. 研究の方法

(1) GREB1 1s4 遺伝子発現メカニズムの解析

MITF転写因子ノックアウト細胞や過剰発現細胞を用い、GREB1 1s4遺伝子の発現量を検討する。クロマチンIPやレポーターアッセイにより、MITF結合部位、並びにGREB1 1s4プロモーター領域を特定する。日本人メラノーマ、または良性母斑の組織切片を用い、MITF、GREB1 1s4を免疫染色する。

(2) メラノサイト特異的GREB1 1s4トランスジェニックマウスの解析

Cre/loxPを用いて、Tyr-CreERメラノサイト特異的GREB1 1s4トランスジェニックマウスを作製する。その後、BRAF^{V600E}変異PTEN^{fllox}欠失メラノーママウスと交配し、タモキシフェン投与により、背部皮膚にメラノーマを誘導させ、腫瘍数、腫瘍サイズの測定、組織標本作製する。

(3) GREB1 1s4のピリミジン合成への関与

レコンピナントタンパク質を用いた生化学解析や、GREB1 1s4ノックダウン細胞でのメタボローム解析により、GREB1 1s4のピリミジン合成への関与を検討する。

(4) ゼノグラフトマウスモデルを使用したGREB1の分子標的としての検討

メラノーマを移植したゼノグラフトマウスモデルに、GREB1に対するアンチセンス核酸を投与し、その抗腫瘍効果を検討する。

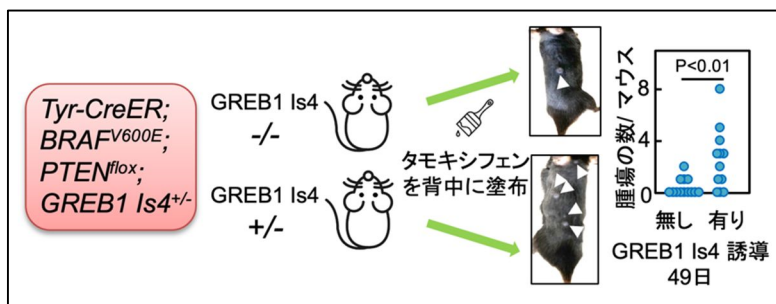
4. 研究成果

(1) GREB1 1s4 遺伝子の発現メカニズムの解析

TCGAデータセットやメラノーマ細胞株を用いた発現解析から、メラノーマでは、N末端半分を欠失したGREB1 1s4が発現していることが判明した。MITFノックアウト細胞で、GREB1 1s4の発現は低下し、MITFの過剰発現により発現誘導された。クロマチンIPやレポーターアッセイによりGREB1エクソン19の5'-上流領域にある2つのMITF結合E-box(CANNTGモチーフ)が、GREB1 1s4の転写に必要であった。さらに、MITFとGREB1 1s4は、評価したメラノーマ標本の約20%(17/89例)で強く共発現しており、その発現は腫瘍深度の厚さと関連していた。以上のことにより、GREB1 1s4は、MITF転写因子依存的に発現誘導され、その発現はメラノーマ腫瘍の厚さや患者の予後不良と強く相関していることが分かった。

(2) メラノサイト特異的GREB1 1s4トランスジェニックマウスの解析

Tyr-CreERにより、メラノサイト特異的にBRAF^{V600E}変異PTEN^{fllox}欠失GREB1 1s4発現を誘導するマウスを作製した。その新生児の背部全体に4-OHT(タモキシフェン)を適用し、GREB1 1s4発現がメラノーマ発生に及ぼす影響を、同腹子を用いて評価した(図参照)。対照マウス(GREB1 1s4の発現なし)の約30%が4-OHT投与後49日以内に腫瘍を発症したのに対し、



GREB1 Is4 マウスでは70%以上が腫瘍を発症した。GREB1 Is4 マウスの無腫瘍生存率は、対照マウスに比べて低下した。以上のことから、BRAF^{V600E} 変異 PTEN^{fl^{ox}} 欠失メラノーマモデルマウスにおいて、GREB1 Is4 発現がメラノーマ形成を促進することが示された。

(3) GREB1 Is4 のピリミジン合成への関与

GREB1 Is4 と CAD のレコンビナントタンパク質を精製し、¹⁴C 標識炭酸水素ナトリウム、グルタミン、アスパラギン酸とともにインキュベートし、CPSase 活性を測定した。GREB1 Is4 添加により、CPSase 活性が増強された。また、GREB1 Is4 をノックダウンしたメラノーマ細胞株を用いて、¹⁵N₂, ¹³C₅ 標識グルタミンを60分間パルスラベルし、de novo ピリミジンヌクレオチド生合成における GREB1 Is4 の影響を検討した。その結果、GREB1 Is4 ノックダウンにより、ピリミジン代謝物である CAA、UDP、UTP、CTP が有意に減少していた。以上のことから、GREB1 Is4 は、CAD CPSase 活性制御を通してピリミジン生合成に直接関与し、メラノーマにおける de novo ピリミジン合成に必須であることが示された。

(4) ゼノグラフトマウスモデルを使用した GREB1 の分子標的としての検討

ヒトメラノーマ細胞株を担がんしたマウスに、GREB1 に対するアンチセンス核酸を3日おきに3週間投与し、その抗腫瘍効果を検討した。IVIS による蛍光強度・腫瘍重量ともに有意に抑制されており、メラノーマにおいて GREB1 Is4 が治療標的として有用であることが示された。

免疫チェックポイント阻害剤の登場により、メラノーマの治療が劇的に進歩している一方、未だ治療困難なケースが存在している。本研究課題により、GREB1 Is4 を介した新たながん化の仕組みがメラノーマで明らかにされ、GREB1 がメラノーマの新たな治療標的となることが期待される。

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 Shinzawa Koei, Matsumoto Shinji, Sada Ryota, Harada Akikazu, Saitoh Kaori, Kato Keiko, Ikeda Satsuki, Hirayama Akiyoshi, Yokoi Kazunori, Tanemura Atsushi, Nimura Keisuke, Ikawa Masahito, Soga Tomoyoshi, Kikuchi Akira	4. 巻 42
2. 論文標題 GREB1 isoform 4 is specifically transcribed by MITF and required for melanoma proliferation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 3142 ~ 3156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-023-02803-6	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新沢康英、松本真司、佐田遼太、原田昭和、種村篤、横井一範、二村圭祐、伊川正人、曾我朋義、菊池 章
2. 発表標題 GREB1 isoform 4の悪性黒色腫形成における役割と治療への応用
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新沢康英、松本真司、種村篤、横井一範、二村圭祐、曾我朋義、菊池 章
2. 発表標題 GREB1 isoform 4はピリミジン合成を介して悪性黒色腫細胞の増殖能を促進する
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新沢 康英, 松本 真司, 種村 篤, 横井 一範, 藤本 学, 二村 圭祐, 曾我 朋義, 菊池 章
2. 発表標題 GREB1 isoform 4はピリミジン合成を介して悪性黒色腫細胞の増殖能を促進する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新沢康英、松本真司、種村篤、藤本学、菊池 章
2. 発表標題 悪性黒色腫におけるGREB1 isoform 4の発現機構解析とがん治療への応用
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔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