

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：20K17349
研究課題名(和文) エピゲノム制御による小胞体ストレス応答を介する薬剤耐性獲得に着目した新規がん治療

研究課題名(英文) Novel cancer therapeutic strategy focusing on drug resistance via epigenetic regulation on endoplasmic reticulum stress response

研究代表者
福本 毅 (Fukumoto, Takeshi)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80778770
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：クロマチンリモデリングを調整するSWI/SNF複合体のAT-rich interactive domain-containing protein 2 (ARID2) は、メラノーマで変異率が高い。今までARID2の変異が、メラノーマのがん化進展に与える影響は不明であった。本研究では、ARID2のメラノーマの増殖能や浸潤能への制御を解明した。さらに、SWI/SNF複合体が腫瘍免疫を調節することが報告されており、本研究でも、ARID2がメラノーマ細胞の免疫チェックポイント阻害剤への反応に影響を与えることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初の目的の1つであったエピジェネティクス治療薬のHDAC阻害剤のメラノーマにおける治療戦略の確立には至らなかった。しかし、新規治療戦略の探索という点では、NOTCHシグナルの抑制機能で知られるNUMBが、メラノーマにおいても他の癌種同様に、癌抑制因子として機能することを解明した。さらに、NUMBのloss of functionが、cyclin Eの発現上昇を介して、メラノーマ浸潤能の増加に繋がることを証明した。最後に、グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3阻害剤がNUMB依存的にメラノーマ細胞の浸潤を減少させ、新規の治療標的となり得る可能性を提示できた点は本研究の社会的意義と考える。

研究成果の概要(英文)：AT-rich interactive domain-containing protein 2 (ARID2), a subunit of SWI/SNF complex, regulates chromatin remodeling and is highly mutated in melanoma. The implication of ARID2 mutation on melanomagenesis has not been known well. In this study, we elucidated the regulation of ARID2 on the proliferative and invasive potential of melanoma. Furthermore, as many subunits of SWI/SNF complex have been reported to modulate cancer immunity, we showed in this study that ARID2 affects the response of melanoma cells to immune checkpoint inhibitors.

研究分野：色素細胞

キーワード：メラノーマ SWI/SNF複合体 ARID2 がん化進展 腫瘍免疫 HDAC NOTCHシグナル NUMB

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫(メラノーマ)は最も死亡数の多い皮膚がんであり、現在第一選択薬である分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤の開発後も、薬剤耐性や自己免疫学的な副作用の問題が残っており、持続した効果や継続的な投与が期待できない症例も多い。また、非常に高額である免疫チェックポイント阻害剤は、最適な患者層別マーカーが存在せず費用対効果の低さが医療経済の問題点として残っている。そのため、新規的作用点を標的とした薬剤応答機構に基づき、患者特性に併せた選択的な治療戦略の確立が求められている。

クロマチンリモデリング複合体の1つである、SWI/SNF複合体のAT-rich interactive domain-containing protein 2 (ARID2) は、約20%と高頻度にメラノーマにおいて変異している。しかし、ARID2変異がメラノーマの薬剤耐性やがん化機構に及ぼす影響は解明されていない。

小胞体ストレス応答(Unfolded protein response, UPR)は、正常組織において変性タンパク質の異常蓄積を回避するため、アポトーシスを誘導し、組織の恒常性の維持に機能しているが、この機能の異常亢進が、薬剤耐性やがん化機構と関連すると報告されている。特にUPRの主要シグナルであり下流遺伝子の転写を調節するXBP1の過剰発現は、種々のがんにおいて薬剤耐性とがん化進展に寄与している。代表的なエピジェネティクス治療薬のHDAC阻害剤は、既存の治療法と異なるヒストン修飾を作用点とし、これまで造血器腫瘍などに臨床応用されているが、メラノーマでは治療耐性獲得のため大きな効果は得られていない。その一因として、HDACの阻害によるXBP1の発現上昇を介した薬剤耐性の獲得機序の影響が考えられている。このXBP1の過剰発現を抑制することでHDAC阻害剤の治療効果を飛躍的に改善できる可能性があると考えられるが、メラノーマでのUPRを介した薬剤耐性の成立機構と、この機構を阻害した際のメラノーマの薬剤応答の変化に着目した研究はこれまでなかった。

2. 研究の目的

UPRを介した薬剤耐性の獲得機構を解明し、耐性獲得機構の阻害とHDAC阻害剤を組み合わせたメラノーマの画期的な治療戦略を確立すること、さらにARID2によるUPRの制御に着目し、併用療法の治療適応バイオマーカーを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ARID2によるXBP1の発現制御機序を明らかにするため、ARID2抗体や転写活性化のマーカーであるH3K4me3抗体やRNAポリメラーゼII抗体を用いてクロマチン免疫沈降(Chromatin immunoprecipitation, ChIP)を行い、ARID2がXBP1を直接制御しているか調べる。

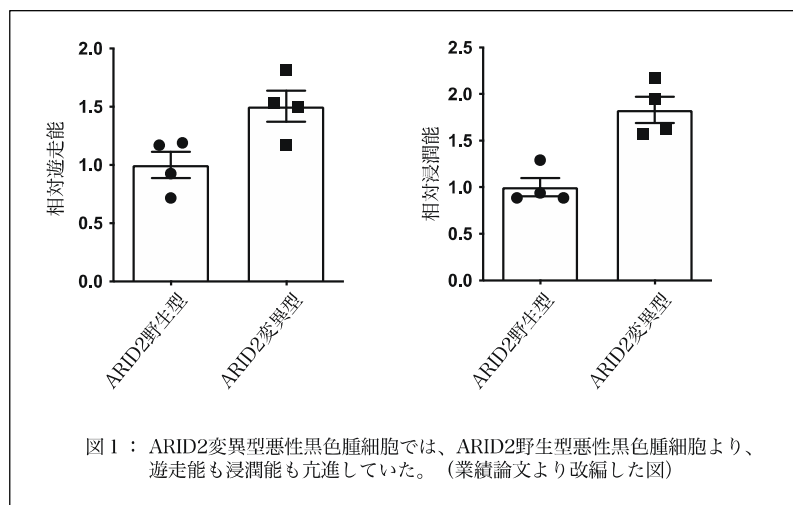
(2) メラノーマでのXBP1発現上昇のがん化進展への影響を調べるため、ARID2変異型メラノーマ細胞にXBP1阻害剤を添加し、細胞増殖、アポトーシスおよび細胞周期への影響をウエスタンブロット法、定量PCRおよびフローサイトメトリーを用いて解析する。

(3) HDACによるXBP1の制御機構を明らかにするため、HDACファミリータンパクに対する抗体を用いたChIP-seqを行い、HDACのXBP1への制御様式を調べる。また、HDAC阻害剤添加時のRNAseqを行い、網羅的な遺伝子発現変化を解析する。

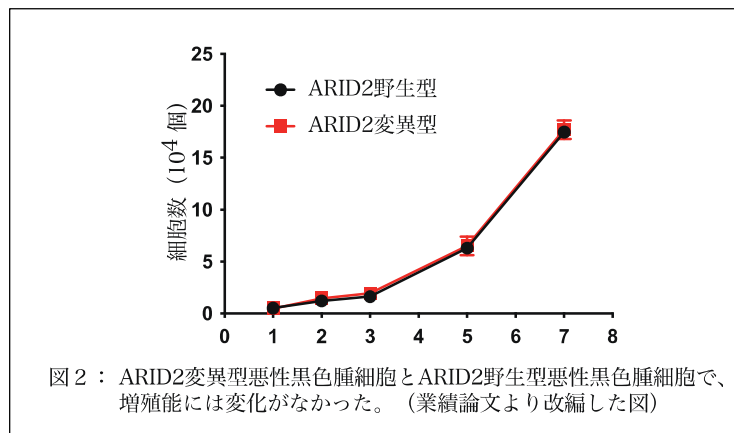
(4) 次に、HDAC阻害剤とXBP1阻害剤との併用療法の効果を検証する。特に両薬剤の併用下での細胞増殖、アポトーシスおよび細胞周期について調べる。

4. 研究成果

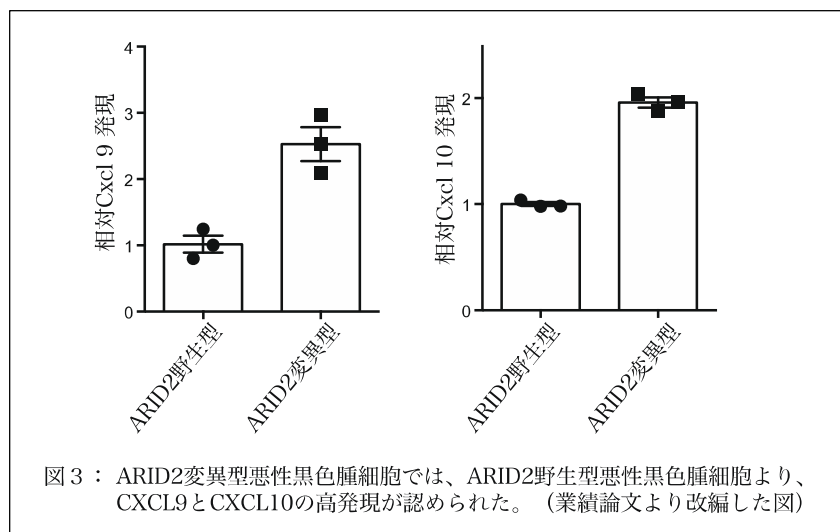
メラノーマを含めた皮膚がんでの変異率が高いARID2のがん化進展における役割として、ARID2の不活化によって、メラノーマ細胞の遊走能と浸潤能が亢進することを証明した。(図1)



一方で、今回の結果では、ARID2 の不活化が増殖能に変化を与えないことがわかり、今後さらに ARID2 のがん化進展における機序を解明する必要がある。(図 2)



ARID2 の腫瘍免疫制御における役割として、細胞傷害性 T 細胞誘引ケモカインである CXCL9 と CXCL10 の発現を制御していることを、腫瘍組織を用いた定量 PCR で確認した。(図 3) この機序は、ARID2 を含めた SWI/SNF 複合体の多くのサブユニットが、免疫チェックポイント阻害剤への反応を調節することに寄与しているのではないかと考えた。



本研究期間では、当初に想定していた UPR を標的とした治療と HDAC 阻害剤との併用戦略の確立には至らなかった。その主たる原因としては、HDAC の阻害によって XBP1 の発現が上昇するという過去の報告が、メラノーマでは当てはまらなかった。しかし、UPR のエピゲノム制御を解明するために、まずは、XBP1 以外の UPR の構成分子への HDAC の影響を検証していく予定である。

画期的な新規治療戦略の標的の探索という目的に対して、メラノーマにおける NUMB の 1 つの役割について解明することができた。つまり、NOTCH シグナルの抑制機能がある NUMB の不活化によってメラノーマの浸潤能や転移能が亢進することを確認し、メラノーマにおいても他の癌種同様に、癌抑制因子として機能していることを証明した。その機序として NOTCH 標的遺伝子である cyclin E (CCNE) の発現が NUMB の不活化で有意に上昇していることを発見した。(図 4)

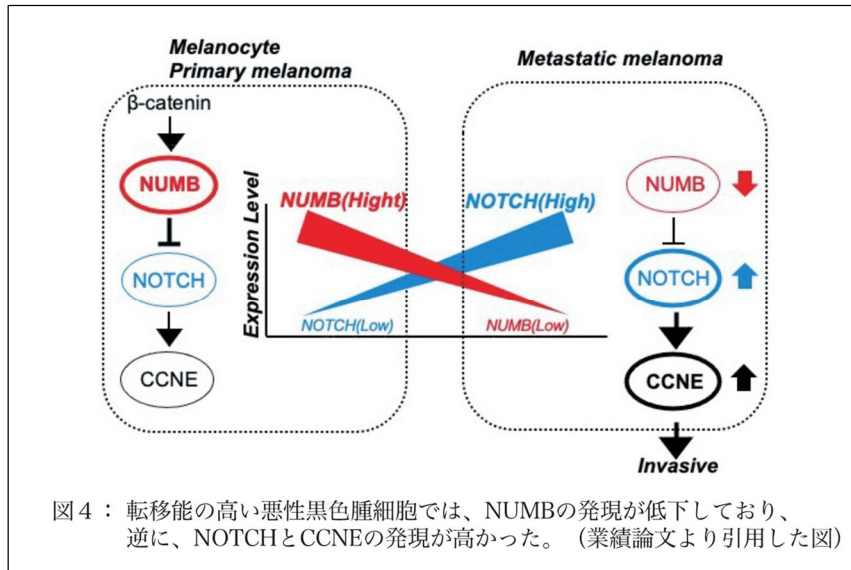


図4： 転移能の高い悪性黒色腫細胞では、NUMBの発現が低下しており、逆に、NOTCHとCCNEの発現が高かった。（業績論文より引用した図）

本研究の成果を裏付けるように、The Cancer Genome Atlas の実臨床でのメラノーマ患者データの解析でも、ヒトメラノーマ組織における NUMB の高発現は、患者の生存率向上と正に相関していることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Furuoka Keiko, Fukumoto Takeshi, Nagai Hiroshi, Nishigori Chikako	4. 巻 33
2. 論文標題 Topical imiquimod induced lichenoid drug reaction successfully treated with tacrolimus ointment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dermatologic Therapy	6. 最初と最後の頁 e14480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dth.14480	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 Fukumoto Takeshi, Horita Nobuyuki	4. 巻 147
2. 論文標題 Single or dual immune checkpoint inhibitor as adjuvant therapy in advanced melanoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 140 ~ 141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejca.2021.01.031	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 Fukumoto Takeshi, Lin Jianhuang, Fatkhutdinov Nail, Liu Pingyu, Somasundaram Rajasekharan, Herlyn Meenhard, Zhang Rugang, Nishigori Chikako	4. 巻 -
2. 論文標題 ARID2 Deficiency Correlates with the Response to Immune Checkpoint Blockade in Melanoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2020.11.026	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takeshi Fukumoto, Jianhuang Lin, Nail Fatkhutdinov, Rajasekharan Somasundaram, Meenhard Herlyn, Rugang Zhang and Chikako Nishigori
2. 発表標題 AT-rich interactive domain 2 regulates therapeutic antitumor immunity in melanoma
3. 学会等名 The 24th International Pigment Cell Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大塚晴彦、福本 毅、藤原 進、坂口正展、岡 昌宏、錦織千佳子
2. 発表標題 放射線治療の照射領域とその周辺領域に複数の基底細胞癌を発症した1例
3. 学会等名 第113回近畿皮膚科集談会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福本毅、谷川彩乃、錦織千佳子、田中伴典、伊藤智雄
2. 発表標題 ベキサロテン内服と全身皮膚電子線照射療法の併用が奏功したCD4 /CD8 double-negative T-cell lymphomaの1例
3. 学会等名 第2回関西皮膚リンパ腫症例検討会
4. 発表年 2021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
---------	---------