

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16213

研究課題名（和文）メラノーマにおける薬剤耐性を標的とした新規がん抑制経路の同定

研究課題名（英文）Identification of a novel drug resistance mechanism in melanoma cells

研究代表者

大平 崇人（OHIRA, Takahito）

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：60757665

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、PITX1/SOX9経路のメラノーマにおける制がん効果について、薬剤耐性株も含めた解析により詳細に検証を行った。また、PITX1の発現を誘導する化合物の同定を試みることでPITX1による新規メラノーマ治療法の開発につながる糸口をつかむことを目的として実験を実施した。その結果、PITX1はメラノーマの発生において抗がん効果をもたらすキー因子として機能しており、PITX1/SOX9経路を介した新規の抗がん剤の開発につながる糸口を見出すことに成功した。しかし、一方で耐性株においてはその効果が限定され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

本研究では、PITX1によるメラノーマの制がん効果について詳細な検討を行った。その結果、PITX1の発現を誘導する可能性のある低分子化合物として2種類のキナーゼ阻害剤を同定した。この2種類の化合物はメラノーマにおける分子標的薬としての可能性をもち、PITX1の発現誘導を標的とした新たなメラノーマの治療戦略開発の糸口になると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, anti-cancer effects of the PITX1/SOX9 pathway in melanoma were investigated in detail by analysis including drug-resistant cells. In addition, we performed experiments to identify compounds that induce PITX1 protein synthesis, which would lead to the development of novel melanoma therapies.

As a result, we found that PITX1 functions as a key factor in melanoma development to cause anti-cancer effects, and we identified a possible approach to the development of a novel anti-cancer drug for melanoma via the PITX1/SOX9 pathway. On the other hand, the effect may be limited in resistant melanoma cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：メラノーマ 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メラノーマにおいて、p53 の変異およびその経路の破綻が全体の 90%で認められており、また BRAF^{V600E} 変異は全体の 50%で認められ、この変異に対する分子標的薬は、短期間では薬剤の著効が見られる場合が多いが、抵抗性を持つ耐性がんの出現が寛解を妨げる主な障壁となっている。

PITX1 は、もともと生体において四肢の形成を担う転写因子(ホメオボックス遺伝子)として同定された。その後、p53 を介しアポトーシスを誘導することやがん遺伝子である RAS を抑制する機能が報告され、がん抑制遺伝子として認識されるようになった。加えて研究実施者らは、PITX1 のがん抑制遺伝子としての働きとして、不死化能を制御するテロメラーゼの活性を抑制する機能を報告してきた(Qi DL, Ohira T *et al. Mol Cell Biol.* 31. 1624-1636, 2011)。さらに研究実施者は、PITX1 をメラノーマ細胞株 A2058 に強制発現させることにより、アポトーシスを伴った増殖抑制が誘導されることを見出した。興味あることに、A2058 は、p53 に変異を持つ細胞であることから、この形質変化は p53 に依存していないと考えられた。加えて、A2058 細胞は RAS 経路の下流にある BRAF 遺伝子に変異(BRAF^{V600E})をもち、恒常的に RAS 経路が活性化している細胞であったことから、RAS の抑制にも関与してない、全く新しい分子経路の結果であることが示唆された。

この分子経路を同定するために、PITX1 の下流で発現が変動する遺伝子を、遺伝子の活性化ヒストンマーカーである H3K27 アセチル(ac)化抗体を用いた ChIP-seq(クロマチン免疫沈降シークエンシング法)によって網羅的な解析を試みた。その結果、PITX1 の発現に伴って H3K27ac の修飾状態が大きく変化する遺伝子として SOX9 および SOX10 を同定した。また、ウエスタンブロッティングによるタンパク発現解析から、PITX1 発現誘導株では SOX9 の発現上昇および SOX10 の発現低下が認められた。加えて、レポーター解析とクロマチン免疫沈降法(ChIP)による解析から PITX1 は SOX9 プロモーターに直接結合し、その発現を正に制御していることを見出した。

興味あることに、メラノーマにおける SOX10 の阻害は、細胞分裂停止とアポトーシス誘導に関わる多くの因子の発現上昇を伴い、さらに BRAF^{V600E} 変異に関わらず、その増殖を抑制することがヒトメラノーマ細胞株およびマウスの *in vivo* モデルで明らかにされ、メラノーマのドライバー遺伝子として着目されていた。加えて、SOX9 は SOX10 を負に制御する上流因子として報告されていることから、PITX1 は SOX9 の発現を正に制御する上流因子として機能し、SOX10 の発現抑制を介してメラノーマの増殖を抑制する新規のがん抑制経路(PITX1/SOX9 経路)の存在が示唆された。

以上より、メラノーマにおいて、PITX1/SOX9 経路を介することで、p53 や BRAF の経路に依存しないがん抑制経路の構築の可能性が示唆され、メラノーマにおける薬剤耐性を含めた新規の制がん戦略として提案できると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、PITX1/SOX9 経路のメラノーマにおける制がん効果について、薬剤耐性株も含めた解析により詳細に検証を行った。また、PITX1 の発現を誘導する化合物の同定を試みることで PITX1 による新規メラノーマ治療法開発につながる糸口をつかむことを目的として実験を実施した。

3. 研究の方法

メラノーマ細胞において、PITX1/SOX9 経路の惹起が耐性株を含んだ細胞集団に対して制がん効果をもたらすのか、また PITX1 の発現を誘導する化合物の同定を通して新規の抗がん剤の開発の可能性を検討した。具体的には、以下の 4 つの実験方法による解析を実施した。

- (1) 分子標的薬に耐性を示すメラノーマ細胞での PITX1/SOX9 の増殖抑制効果の検討
- (2) PITX1/SOX9 経路の抗がん作用について、マウス皮下移植モデルを用いた *in vivo* 実験系での検討
- (3) PITX1 の発現を誘導する低分子化合物の同定
- (4) 臨床組織における発現動態解析

4. 研究成果

(1) 分子標的薬に耐性を示すメラノーマ細胞での PITX1/SOX9 の増殖抑制効果の検討

BRAF^{V600E} 阻害剤耐性クローンにおける遺伝子発現解析を実施するために、ヒトメラノーマ細胞株である A2058 および SKMEL28 を用いて、BRAF^{V600E} 阻害剤である PLX4032 を長期間の培養中に段階的に濃度を上昇させる実験手法により BRAF^{V600E} 薬剤耐性クローンの樹立を試み

た。その結果、A2058 では 15 μ M の濃度でも死滅しない薬剤耐性株 (A2058R) を、SKMEL28 では 6 μ M の濃度でも増殖する薬剤耐性株 (SKMEL28R) を樹立することができた (図 1)。加えて、リアルタイム RT-PCR により、BRAF^{V600E} 阻害剤耐性クローンのマーカー遺伝子として報告されている EGFR の発現を解析した結果、A2058R および SKMEL28R の両方の耐性株において 7 倍から 14 倍の発現上昇が確認されたことから予定通り BRAF^{V600E} 阻害剤耐性株の樹立が確認された (図 2)。

次にこれらの耐性株を用いて、PITX1, SOX9, SOX10 のそれぞれの発現量を比較解析した結果、SOX10 に関しては発現量の上昇が確認された。一方で、驚いたことに PITX1 と SOX9 も耐性株は発現が上昇していた (図 3)。この結果は、BRAF^{V600E} 阻害剤そのものが PITX1 の発現を上昇させる可能性を示すものであった。したがって、独立していると考えていた PITX1/SOX9 経路が、RAS 経路に關与していることを示唆しており、同時に薬剤耐性株においては PITX1/SOX9 経路による増殖抑制効果が限定されてしまうことを示すものであった。この可能性を明らかにするためには、耐性株におけるさらに詳細な遺伝子発現動態解析が必要であると考えられた。

(2) PITX1/SOX9 経路の抗がん作用について、マウス皮下移植モデルを用いた *in vivo* 実験系での検討

in vivo での PITX1 による抗腫瘍効果を確認するために、マウス皮下腫瘍モデルを用いて解析を行った。ヌードマウス (BALB/c-nu) の皮下に A2058 を移植し、メラノーマのモデルマウスとして使用した。その結果、PITX1 発現群においてコントロール群と比較して腫瘍の体積・重量ともに縮小が認められた (図 4A-C)。また、腫瘍塊を取り出し、免疫組織化学染色により、PITX1 の発現 (図 4D) にともなった SOX9 の発現誘導 (図 4E) と SOX10 の発現低下 (図 4F) を確認した。加えて、増殖マーカーである Ki-67 の発現低下 (図 4G) とアポトーシスマーカーである CL-Cas3 の発現上昇 (図 4H) も確認した。したがって、動物生体内においても PITX1 の発現誘導が SOX9 遺伝子を介してメラノーマの進展と増殖を抑制できることが示唆された。

(3) PITX1 の発現を誘導する低分子化合物の同定と効果の検証

キナーゼ阻害薬として効果をもつソラフィニブおよびレゴラフェニブは PITX1 発現を誘導する薬剤として報告されていることから、これらの薬剤による PITX1/SOX9 経路の活性化が、メラノーマにおける新規抗がん剤として抗腫瘍効果を発揮するか否かを検討した。その結果、メラノーマ細胞株

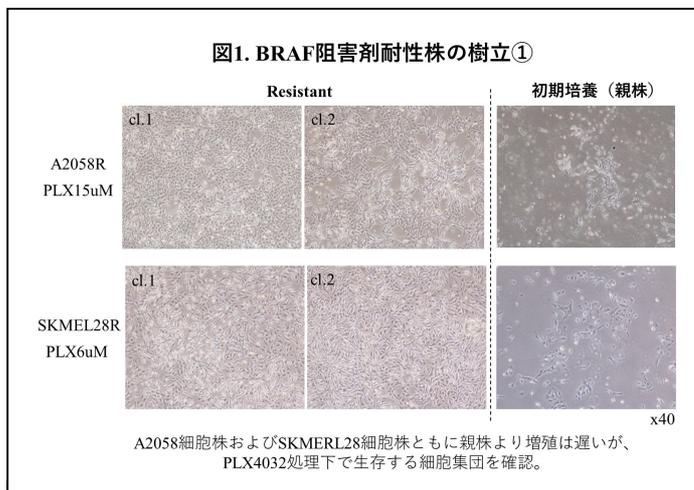
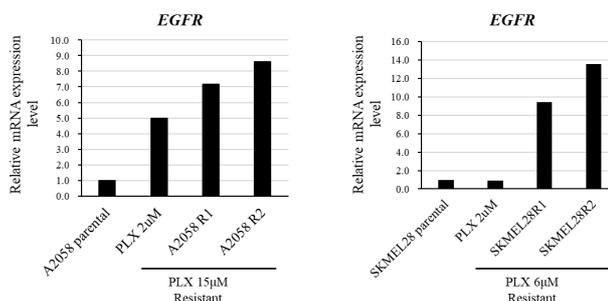
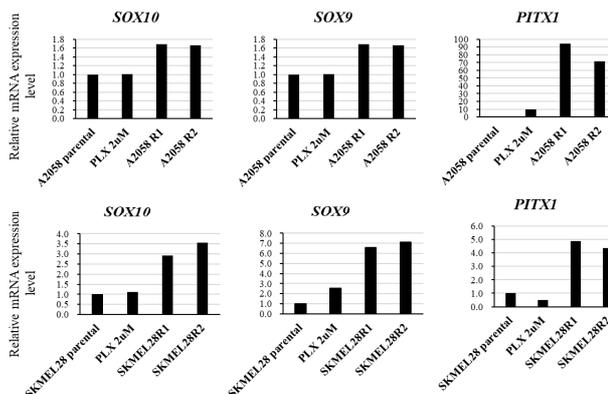


図2. BRAF阻害剤 (PLX4032) 耐性クローンの樹立②



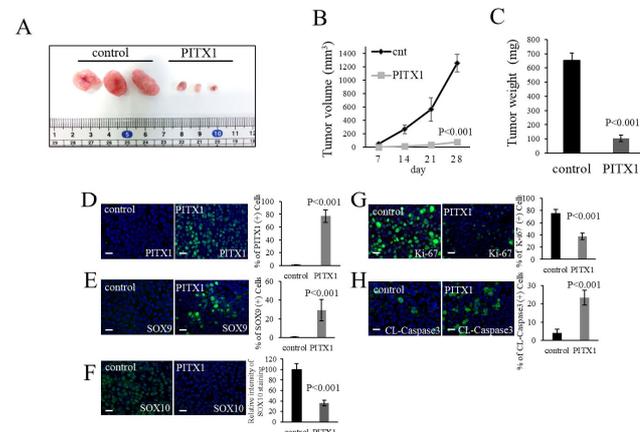
BRAF阻害剤処理群で耐性のマーカー遺伝子であるEGFRの発現上昇を確認。

図3. 薬剤耐性クローンにおける遺伝子動態解析



BRAF^{V600E}阻害剤そのものがPITX1の発現を上昇させる可能性が示唆された。

図4. 腫瘍モデルマウスを用いたPITX1抗腫瘍効果の検討



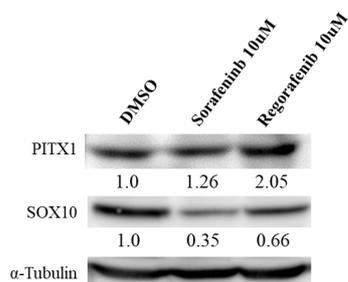
A2058 および SKMEL28 を用いてソラフェニブおよびレゴラフェニブ 10 μ M で 48 時間処理すると細胞死が誘導された。加えて、PITX1/SOX9 経路への関連性を検討するために薬剤処理 15 時間後の細胞からタンパクを回収し、PITX1 および SOX10 の発現動態を解析した。その結果、PITX1 の発現上昇に伴って、SOX10 の発現が低下することを確認した(図 5)。この結果から、ソラフェニブおよびレゴラフェニブは PITX1 発現誘導を介してメラノーマの増殖を抑制する可能性が示唆された。

(4) 臨床組織における発現動態解析

ヒトの臨床症例における *SOX9* と *SOX10* の発現動態解析を、公共のデータベースである TCGA を用いて行った。その結果、マウスモデル(図 4)と同様に、*PITX1* と *SOX9* の間は正の相関性が、一方、*PITX1* と *SOX10* の間では負の相関性が認められた。

以上の結果から、*PITX1* はメラノーマの発生において抗がん効果をもたらすキー因子として機能していることが明らかとなり、*PITX1*/*SOX9* 経路を標的とすることでメラノーマにおける新規の抗がん剤の開発につながる糸口を見出すことに成功した。しかし、一方で BRAF 阻害剤の耐性株においてはその効果が限定される可能性が示唆された。

図5. PITX1の発現を誘導する低分子化合物の同定



ソラフェニブおよびレゴラフェニブは PITX1 発現誘導を介して SOX10 の発現を抑制する可能性が示唆された。

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 Ohira T, Nakagawa S, Takeshita J, Aburatani H, Kugoh H.	4. 巻 15;11(1):18405.
2. 論文標題 PITX1 inhibits the growth and proliferation of melanoma cells through regulation of SOX family genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97791-6.	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大平 崇人、久郷 裕之
2. 発表標題 PITX1はSOX9を介してメラノーマの増殖を抑制する
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鳥取大学 医学部 染色体医工学講座 HP https://saiboukougaku.jimdofree.com/

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