

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860221

研究課題名(和文) 神経冠形成遺伝子によるがん悪性化促進機構の解明

研究課題名(英文) Identification and characterization of novel neural crest genes involved in tumor progression

研究代表者

佐藤 礼子 (SATOW, Reiko)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：90469966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、神経冠形成に必要な遺伝子群の中からがん悪性化に寄与する遺伝子を同定・機能解析し、がん悪性化の分子機構を解明することを目的としている。申請者は神経冠形成遺伝子を対象としたsmall interfering RNA スクリーニングを行い、メラノーマ細胞の悪性形質を促進する候補遺伝子を選抜した。その中の一つの神経冠形成遺伝子について作用機序の解明を進め、この遺伝子がメラノーマで高発現し、脱分化、生存、運動能、薬剤耐性の亢進に寄与していることを明らかにした。これらの結果は、同定したメラノーマ悪性化因子の阻害がメラノーマ治療に有効であることを示唆するものであり、非常に意義深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To identify genes involved in tumor progression among genes essential for neural crest development, we performed siRNA-mediated screening. We showed that one of the identified genes is highly expressed in human melanoma tissues compared with benign nevi and enhances melanoma growth, survival, metastasis, and drug resistance. The identified gene contributed to melanoma drug resistance by enhancing FAK and Stat3 phosphorylation. These data indicated that the identified gene as novel molecular target of melanoma.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：メラノーマ 神経冠 薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

上皮性のがん細胞が悪性化する際に観察される EMT により、E-カドヘリンの発現消失や間葉系遺伝子の発現誘導が引き起こされ、がん細胞の転移能が亢進する。さらに、がん幹細胞様性質が向上し、自己増殖能や薬剤耐性が亢進することから、EMT はがん悪性化機構として注目されている重要な機構である (Chaffer et al., Science, 2011)。一方、EMT は初期発生における組織形成においても必須の現象であり、原腸陥入や神経冠細胞の形成に関与している。神経冠細胞は、分化の際に EMT を起こし移動能を獲得し、移動先にて様々な細胞に分化する。初期発生において観察される EMT 分子機構とがん EMT 分子機構において、いくつかの共通因子が関与しており、特に、神経冠形成における必須遺伝子、snail, slug, twist, SIP1 が、がん EMT を促進することから、両者 EMT において類似した分子機構の存在が推測された。そのため、申請者らは、神経冠形成に必要な遺伝子群が、がん EMT の制御に関与しているかについての調査を試みた。

## 2. 研究の目的

本研究では、がんおよび神経冠形成における “ EMT (Epithelial-Mesenchymal Transitions) 機構の類似性 ” に着目し、神経冠形成に必要な遺伝子群の中から、がん EMT を制御している分子を探索する。探索により同定した “ がん EMT を制御する新たな遺伝子 ” の作用機序を明らかにすることにより、がん悪性化・転移の分子機構を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究において、神経冠形成遺伝子の中から新規がん EMT 制御遺伝子を siRNA スクリーニングにより網羅的に探索した。スクリーニングの指標として、E カドヘリン発現を細胞免疫染色により検出・定量した。このスクリーニングより同定した遺伝子の作用機序の解明を行った。同定した遺伝子の機能解析、については表現型解析、臨床検体における発現解析、相互作用分子の同定、作用機序の解明と治療標的分子の同定、結合 DNA 配列の同定、などの解析を行った。

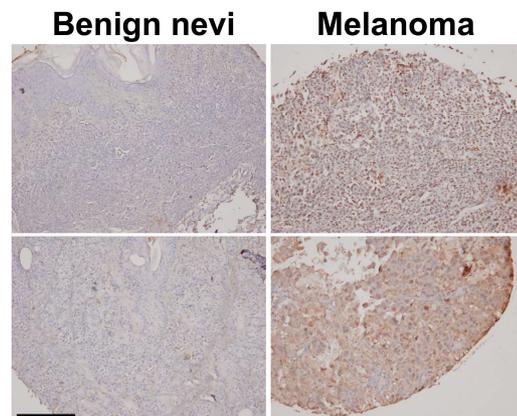
## 4. 研究成果

申請者らは神経冠形成遺伝子を対象とした small interfering RNA スクリーニングを行い、メラノーマ細胞の悪性形質を促進する候補遺伝子を選抜している。その中の一つの神経冠形成遺伝子 ZIC5 について作用機序の解明を進め、(1) 正常ヒト組織では脳と精巣でのみ高発現している、(2) 正常

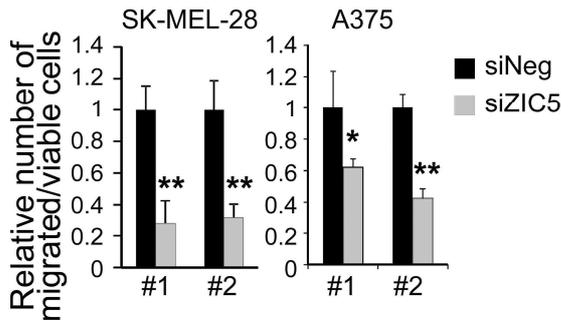
ヒトメラノサイトと比較し、メラノーマ細胞株で高発現している、(3) 良性母斑と比較し、ヒトメラノーマ組織で高発現している (図 1 参照) (4) メラノーマ細胞において ZIC5 を発現抑制すると E-カドヘリン発現の増加、分化の促進、移動能・浸潤能・転移能の低下が引き起こされる(図 2 参照) (5) 神経冠形成遺伝子安定過剰発現株では E-カドヘリン発現の低下、脱分化の促進、運動能の亢進がみられる(図 3 参照) (6) E カドヘリンプロモーターへの結合とプロモーター活性制御機能があること(図 4 参照) (7) 神経冠形成遺伝子には抗アポトーシス作用があり、メラノーマ治療で使用されている BRAF 阻害薬への感受性を弱めていること(図 5 参照) (8) 神経冠形成遺伝子の下流で発現亢進する遺伝子の同定と、その下流で活性化するシグナル伝達経路の同定(図 6 参照) (9) このシグナル伝達経路と神経冠形成遺伝子はポジティブフィードバックループを形成していること、を明らかにした。

これらの結果より、本研究において同定した神経冠形成遺伝子 ZIC5 がメラノーマの悪性化を促進させ、治療上の大きな問題となっている BRAF 阻害剤耐性の獲得を促進させていることが明らかとなったことから、ZIC5 がメラノーマ治療の優れたターゲットになることが期待される。

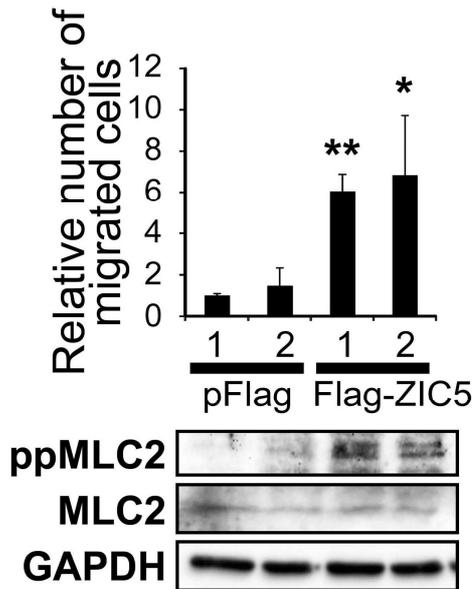
**図 1 . ヒトメラノーマ症例における ZIC5 発現の検証。**メラノーマ患者由来のメラノーマ組織と良性母斑組織が含まれている組織マイクロアレイに対して、ZIC5 抗体を使用して免疫染色を行った。良性母斑と比較し、メラノーマ組織において有意に ZIC5 の発現は高かった。



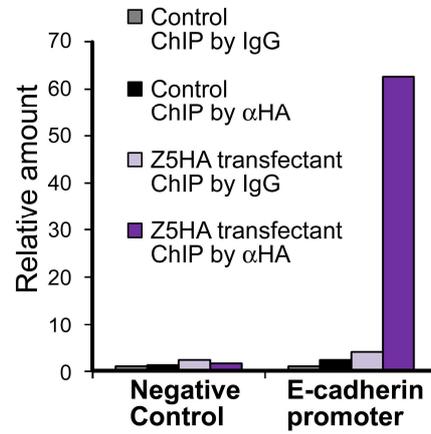
**図2 .ZIC5 発現抑制はメラノーマ細胞の移動能を低下させる。**メラノーマ細胞株 A375 及びSK-MEL-28においてコントロール及びZIC5に対する siRNA を導入し、トランスウェル移動アッセイにて細胞移動数を計測した。移動細胞数を全細胞数で標準化した。



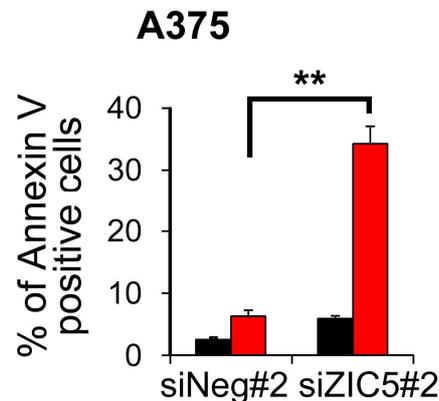
**図3 .ZIC5 過剰発現はメラノーマ細胞の移動能を亢進させる。**メラノーマ細胞株 SK-MEL-28においてコントロール及びZIC5発現プラスミドを安定的に導入し、トランスウェル移動アッセイにて細胞移動数を計測した。また、メラノーマ細胞運動に関連する因子 MLC2 の活性 (リン酸化) も Western blot により検証した。



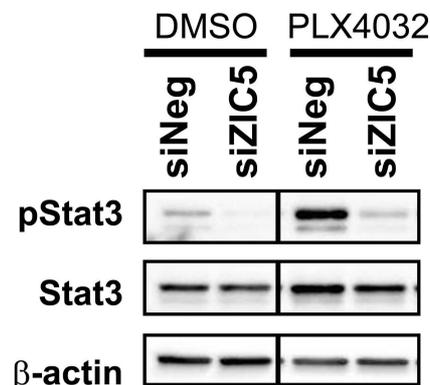
**図4 .ZIC5 はE カドヘリンプロモーターに結合する。**HELA 細胞に HA タグ付き ZIC5 発現プラスミドを導入し、細胞を固定後、HA 抗体で免疫沈降を行った。結合した DNA 断片を回収し、E カドヘリンプロモーター領域を増幅させるプライマーを用いて定量的 PCR を行った。ZIC5 免疫沈降サンプルでのみ、E カドヘリンプロモーター領域が検出された。



**図5 .ZIC5 発現抑制細胞は BRAF 阻害剤によるアポトーシス誘導を亢進させる。**A375 細胞にコントロール及び ZIC5 に対する siRNA を導入し、BRAF 阻害剤 PLX4032 を 0 (黒)又は 5 μM (赤)で処理した。48 h 後に AnnexinV-FITC で細胞を染色し、アポトーシスを起こした細胞の割合を定量した。ZIC5 を発現抑制した細胞ではアポトーシス誘導率が著しく亢進した。



**図6 .ZIC5 発現抑制細胞は STAT3 シグナルを減少させる。**A375 細胞にコントロール及び ZIC5 に対する siRNA を導入し、BRAF 阻害剤 PLX4032 で処理した。STAT3 は BRAF 阻害剤により活性化し、薬剤耐性に寄与していると考えられるが、ZIC5 を発現抑制するとリン酸化 STAT3 量が著しく減少していた。



5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

研究者番号：

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 2件)

第74回日本癌学会学術総会、2015年10月10日、名古屋国際会議場、「メラノーマの増悪を促進する遺伝子の同定と機能解析」、佐藤礼子、深見希代子

第88回日本生化学会大会、2015年12月3日、神戸ポートアイランド、「メラノーマ悪性を促進する遺伝子の探索と機能解析」、佐藤礼子、深見希代子

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：腫瘍細胞の悪性化抑制剤及び抗腫瘍剤  
発明者：深見希代子、佐藤礼子  
権利者：深見希代子、佐藤礼子  
種類：特許  
番号：2015-93980  
出願年月日：2015年5月1日  
国内外の別：国内

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤礼子 (SATOW, Reiko)  
東京薬科大学・生命科学部・助教  
研究者番号：90469966

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )