

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18413

研究課題名(和文) 悪性黒色腫の新規治療法を目指した転写因子SOX10の機能解析

研究課題名(英文) Functional Analysis of transcription factor SOX10 in melanoma for novel therapeutics

研究代表者

横山 悟 (Yokoyama, Satoru)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教

研究者番号：90613498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：悪性黒色腫は、日本でも近年増加傾向にある悪性腫瘍であり、転移が見つかった患者の5年生存率が低いこと(StageIII-50%、IV-10%以下)、化学療法、放射線治療が効きにくいことから、新規治療法の開発が重要である。そこで悪性黒色腫に強く発現する転写因子SOX10の機能解析を行い、新規治療法の開発に繋げることを目的に研究を行った。

その過程で、肺がんにおける免疫チェックポイント分子の一つであるPD-L1の発現調節機構を明らかにした。また、生薬オウレンがBAX/BAKを介して悪性黒色腫でアポトーシスを誘導することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The number of melanoma patients is gradually increasing in Japan, and the prognosis is very poor with a 5-year survival rate of less than 20% in the case of metastatic melanoma. In addition, the chemotherapy and radiotherapy are not effective in melanoma; therefore, a new therapeutic strategy is required. In this study, we performed the functional analysis of transcription factor, SOX10, which is highly expressed in melanoma.

Under this research project, we identified 1) the regulation mechanism of PD-L1 in lung cancer, and 2) the induction of apoptosis by Coptidis Rhizoma through BAX/BAK in melanoma.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：melanoma

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は、日本でも近年増加傾向にある難治性の悪性腫瘍であり、化学療法・放射線治療が効きにくいことから、新規治療法の開発が重要である。最近、抗 PD-1 抗体を用いた新たな免疫療法により、PD-1 のリガンドである PD-L1 を発現する悪性黒色腫患者において良好な成績を挙げていることが報告された (N Engl J Med, 2012)。しかし、その効果が限定的であり、特に PD-L1 低発現の悪性黒色腫患者においては効果が見られないことから、PD-1 のリガンド発現調節機構を理解することは非常に重要である。また転写因子 SOX10 は、色素細胞の分化に重要であることが知られているが、その発現調節機構や悪性黒色腫における機能についての報告はほとんどない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、悪性黒色腫での転写因子 SOX10 の発現制御機構の解析、下流遺伝子の同定・機能解析を行い、悪性黒色腫のがん微小環境における転写因子 SOX10 の機能を明らかにすることである。

(1) PD-L1 の発現制御機構の解析

SOX10 の下流遺伝子の一つと予測された PD-L1 の発現制御機構について、肺がんを用いて検討した。

(2) オウレンによる細胞死誘導機序の解析

オウレン (生薬) 水抽出エキス (CR) による悪性黒色腫の細胞死誘導機序を検討した。

3. 研究の方法

(1) PD-L1 の発現制御機構の解析

Flow Cytometry 解析

培養した肺がん細胞株を epidermal Growth Factor や各種阻害剤で処理した後、PE-humanCD274 抗体 (cBiosciences) で染色し、Flow cytometer により PD-L1 の発現を解析した。結果は、Flowjo ソフトウェア (TreeStar) を用いて解析した。

(2) オウレンによる細胞死誘導機序の解析

細胞増殖解析

細胞株をオウレン水抽出物 (CR) で処理し、24, 48, 72 時間後に CellTiter-Glo (Promega) を用いて、細胞増殖に及ぼす CR の効果を検討した。

Western Blotting 法

細胞抽出タンパク質をアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、各種抗体を用いてタンパク質の発現量を検討した。

CRISPER-Cas9 による BAX/BAK のノックアウト細胞株の樹立

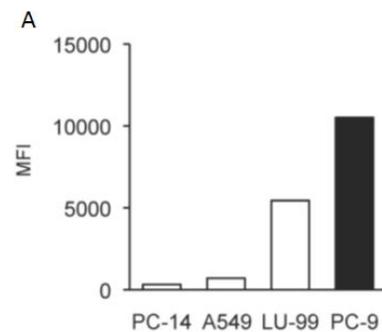
CRISPER-Cas9 システムを用いて、悪性黒色

腫細胞株 A2058 で BAX、BAK ノックアウト細胞株をそれぞれ樹立した。

4. 研究成果

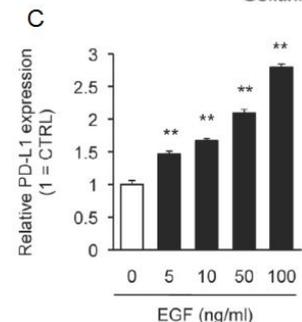
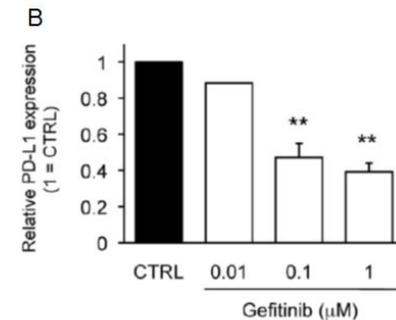
(1) PD-L1 の発現制御機構の解析

A) 肺がん細胞において、EGFR の活性化と PD-L1 の発現が正の相関を示した (下図 A)。具体的には、EGFR 野生型の細胞株 (PC-14, A549, LU-99) と比較して、活性化型 EGFR 変異の細胞株 (PC-9) において、PD-L1 の発現が高いことを明らかにした。また LU-99 は、他の EGFR 野生型の細胞株と比較して、EGFR の Y1068 のリン酸化が高い (活性化されている) ことを明らかにした。



B) PD-L1 の発現は、EGFR の活性化に依存する

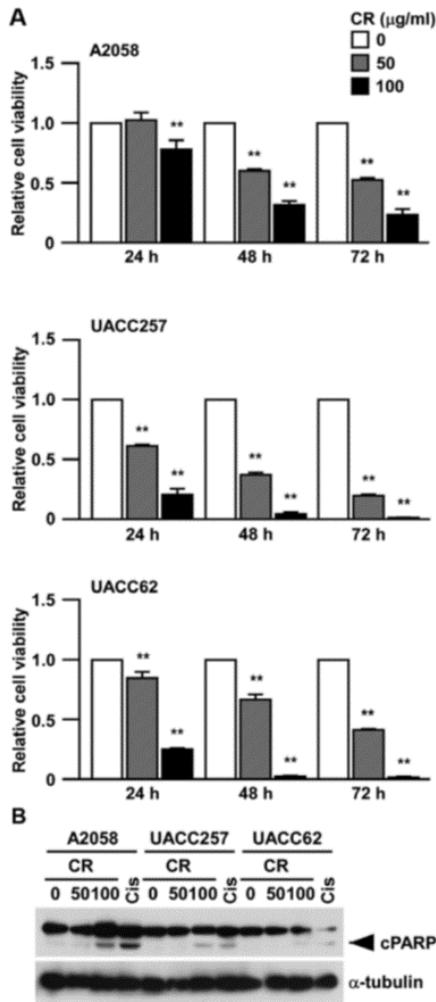
PC-9 において、gefitinib を用いることで PD-L1 の発現が抑制されること、また LU-99 細胞において EGF が PD-L1 の発現を誘導することを明らかにした (下図 B, C)。



以上の結果より、肺がん細胞において、EGFR の活性化が AKT-STAT3 経路を介して、PD-L1 の発現を誘導していることを明らかにした。

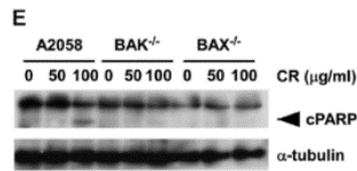
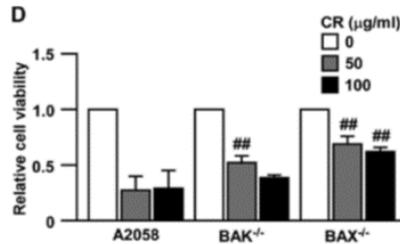
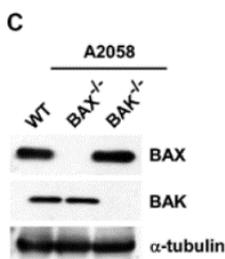
(2) オウレンによる細胞死誘導機序の解析
 A) オウレン水抽出物(CR)は、アポトーシス誘導により、悪性黒色腫の細胞増殖をそが
 いする。

悪性黒色腫細胞株を CR で処理し、細胞増殖・アポトーシス関連タンパク質を調べた結果、アポトーシスを介して細胞増殖が阻害されることを明らかにした(下図 A, B)。



B) オウレンは BAX/BAK を介してアポトーシスを誘導する。

BAX, BAK をそれぞれノックアウトした細胞株を樹立した(下図 C)。またその細胞株を用いて、CR 処理による細胞増殖の効果を検討した。その結果、CR により誘導されるアポトーシスが BAX, BAK どちらのノックアウト細胞においても強く抑制されることを明らかにした。



以上の結果より、オウレン水抽出物は、BAX/BAK を介して悪性黒色腫においてアポトーシスを誘導することを明らかにした。

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)

[雑誌論文](計6件)

- 1) Xu X, Yokoyama S*, Hayakawa Y, Saiki I. (2017) Coptidis Rhizoma induces intrinsic apoptosis through BAX and BAK activation in human melanoma. *Oncology Reports*, 38, 538-544. * *corresponding author*
- 2) Ma H, Yokoyama S, Saiki I, Hayakawa Y. (2017) Chemosensitizing Effect of Saikosaponin B on B16F10 Melanoma Cells. *Nutr Cancer*. 69, 505-511.
- 3) Alves CP, Yokoyama S, Goedert L, Pontes CL, Sousa JF, Fisher DE, Espreafico EM. (2017) MY05A gene is a target of MITF in melanocytes. *J Invest Dermatol*. 137, 985-989.
- 4) Kato S, Yokoyama S*, Hayakawa Y, Li L, Iwakami Y, Sakurai H, Saiki I. (2016) p38 pathway as a key downstream signal of CTGF to regulate metastasis potential in NSCLC. *Cancer Sci*. 107, 1416-1421. * *corresponding author*
- 5) Abdelhamed S, Ogura K, Yokoyama S, Saiki I, Hayakawa Y. (2016) AKT-STAT3

Pathway as a Downstream Target of EGFR Signaling to Regulate PD-L1 Expression on NSCLC cells. J. Cancer. 7, 1579-1586.

6) Lou C, Yokoyama S, Abdelhamed S, Saiki I, Hayakawa Y. (2016) Targeting the ataxia telangiectasia mutated pathway for effective therapy against hirsutine-resistant breast cancer cells. Oncol Lett. 12, 295-300.

〔学会発表〕(計 7件)

1) Xiaou Xu, Satoru Yokoyama, Yoshihiro Hayakawa, Ikuo Saiki: Coptidis Rhizoma induces intrinsic apoptosis through BAX and BAK activation in human melanoma, The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2017. 9. 28-30, Yokohama.

2) 笠原 菜, 横山 悟, 早川 芳弘: マウス花粉症モデルを用いた小青竜湯の薬理作用解析、第 34 回和漢医薬学会総会、2017. 08. 26-27, 福岡.

3) 梅山 凜, Hardianti Besse, 横山 悟, 早川 芳弘: Toll 様受容体を介した炎症性シグナルに対する桑白皮の作用、第 34 回和漢医薬学会総会、2017. 08. 26-27, 福岡.

4) 横山 悟: 細胞内シグナルからみる漢方理論、次世代を担う若手の会シンポジウム「若手が切り拓く和漢薬の可能性」、第 34 回和漢医薬学会、2017.8.27

5) 岩上雄亮、横山 悟、早川 芳弘、済木 育夫:メラノーマにおける脱ユビキチン化酵素 PSMD14 の細胞増殖および転移に対する効果、第 26 回 日本がん転移学会、2017.7.27-28、大阪

6) 横山 悟、早川 芳弘、櫻井 宏明、済木 育夫: COP9 シグナロソーム 5 (COPS5) は転写因子 SNAIL を脱ユビキチン化することにより肺がんの転移を制御する、第 21 回 日本がん分子標的治療学会、2017.6.14-16、福岡

7) 横山 悟、早川 芳弘、済木 育夫: 没薬に

よる免疫チェックポイント分子 PD-L1 の発現抑制、第 33 回 和漢医薬学会学術大会、2016.08.27-28、東京.

〔図書〕(計 2件)

1) 横山 悟、早川 芳弘 第 5 章第 2 節 「がん転移の最新メカニズム、創薬への応用」、動物/疾患モデルの作製技術・病態解析・評価方法、pp154-159, 2017.

2) Yokoyama S, Fisher DE. Transcriptional Regulation in melanoma, Melanoma Development -Molecular Biology, Genetics and Clinical Application. 2nd Edition, pp95-117, 2017.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0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

<http://www.inm.u-toyama.ac.jp/pb/gyoseki/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 悟 (Yokoyama Satoru)
富山大学 和漢医薬学総合研究所 助教
研究者番号：90613498