

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07227

研究課題名(和文) 悪性黒色腫におけるがん遺伝子とがん抑制遺伝子からみる表現型の差異

研究課題名(英文) Phenotypic difference by the combination of both oncogenes and tumor suppressors in melanoma

研究代表者

横山 悟 (Yokoyama, Satoru)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・准教授

研究者番号：90613498

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)：本申請課題では、「なぜ同じ色素細胞由来の腫瘍で、がん遺伝子・がん抑制遺伝子の組み合わせ、転移臓器が異なるのか」という問いを明らかにする目的で研究を進めた。

皮膚メラノーマで見られるがん遺伝子BRAFと眼のメラノーマのがん遺伝子GNA11を導入した細胞でそれぞれ皮膚メラノーマで見られるPTENを欠損させた細胞株を樹立し、腫瘍悪性化に関わる表現型について検討した。

その結果、腫瘍増殖能・転移に関わる細胞運動能がBRAF/PTENの組み合わせの場合にのみ亢進するということを発見した。その詳細なメカニズムは現在検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

死因の第一位が悪性新生物であり、今回の研究課題が腫瘍の発生の根幹に迫る研究内容であることから、学術的意義や社会的意義は十分あると考えられる。

現在詳細についての検討中であり、興味深い結果が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this project, we focused on the difference of oncogenes and tumor suppressors even in similar melanoma derived from cutaneous and uveal tissue.

To this end, we established the melanocytes overexpressing BRAF or GNA11, which is related to cutaneous melanoma or uveal melanoma, respectively. In addition, PTEN was knocked out in each established cells.

We determined the increased tumor growth and cell migratory ability only in BRAF/PTEN-loss cells though the detailed mechanism is unknown.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん遺伝子 がん抑制遺伝子 悪性黒色腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は、色素細胞由来の悪性腫瘍であり、皮膚や眼(ぶどう膜)に発生する。それぞれ発生部位が異なるだけでなく、皮膚悪性黒色腫は肺に転移し、BRAF/NRAS をがん遺伝子として、PTEN をがん抑制遺伝子として持っている。一方、ぶどう膜悪性黒色腫は肝臓に転移し、GNAQ/GNA11 をがん遺伝子として、BAP1 をがん抑制遺伝子として持っている(図1)。

申請者はこれまでに皮膚悪性黒色腫の研究で多くの成果を挙げてきた。特に皮膚悪性黒色腫におけるがん遺伝子の機能解析を行い、皮膚悪性黒色腫特異的ながん遺伝子である MITF の新規変異の同定(Yokoyama et al, Nature, 2011)や悪性黒色腫におけるがん遺伝子としての BCL2A1 の同定(Haq R, Yokoyama S, et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2013)などを行ってきた。また最近、腫瘍悪性化進展に対する新規薬剤標的遺伝子を探索する目的で、98種の脱ユビキチン化酵素のスクリーニングを行ない、肺がん・悪性黒色腫の転移に必須である SNAIL・SLUG を安定化させる脱ユビキチン化酵素として、それぞれ COPS5・STAMPB を同定している(Oncotarget, In Revision, 第26回日本がん転移学会, 2017)。さらに脱ユビキチン化酵素スクリーニングの過程で、BRAF 変異を持つ皮膚悪性黒色腫細胞株2種(UACC257, M14)において、脱ユビキチン化酵素の1種である BAP1 のノックダウンが細胞増殖を抑制するという結果を得た(unpublished data, 図2)。BAP1 が、ぶどう膜悪性黒色腫でがん抑制遺伝子として報告されていることを考えると、「なぜ BRAF 変異をもつ皮膚悪性黒色腫細胞株で BAP1 が細胞増殖に必須なのか?」という疑問が湧いてくる。そこで本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、「なぜ同じ色素細胞由来の腫瘍で、がん遺伝子・がん抑制遺伝子の組み合わせ、転移臓器が異なるのか」と設定し、研究を進める。

2. 研究の目的

皮膚悪性黒色腫細胞株2種を用いた脱ユビキチン化酵素のスクリーニングで同定した BAP1 が、ぶどう膜悪性黒色腫においてがん抑制遺伝子であることから、「なぜ同じ色素細胞由来の腫瘍で、がん遺伝子・がん抑制遺伝子の組み合わせ、転移臓器が異なるのか」という学術的「問い」を設定している。具体的な本研究課題の目的は、「異なるがん遺伝子(BRAF V600E, NRAS Q61R, GNA11 Q209L)を導入した細胞で、BAP1/PTEN の機能とその表現型を明らかにする」ことである。

(1) 脱ユビキチン化酵素の1種である BAP1 のノックダウンが細胞増殖を抑制するという結果を得た際のスクリーニングで同定した PSMD14 の機序を明らかにする。

(2) 悪性黒色腫における CDK2/9 阻害剤 Dinaciclib のアポトーシス誘導機序を明らかにし、新規併用療法を提案する。

3. 研究の方法

(1) 細胞増殖解析

細胞株に siRNA を導入し、96時間後に WST-1(Dojindo)を用いて、細胞増殖に及ぼすノックダウンの効果を検討した。また化合物による細胞増殖への影響については、細胞を各化合物で処理し、細胞増殖を検討した。

(2) Western Blotting 法

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

(3) Real-time PCR 法

細胞から total RNA を抽出し、ABI Prism 7300 sequence detection system を用いて、real-time PCR を行なった。primer は、

p21 mRNA 5'-AGT CAG TTC CTT GTG GAG CC-3' (sense)

5'-CAT GGG TTC TGA CGG ACA T-3' (antisense)

SMAD2 mRNA 5'-CAC GCT AGG AAA ACA GCC TC-3' (sense)

5'-TCG GAA GAG GAA GGA ACA AA-3' (antisense),

SMAD3 mRNA 5'-TCA ACA CCA AGT GCA TCA CC-3' (sense)

5'-CGG CAG TAG ATG ACA TGA GG-3' (antisense)

-actin mRNA 5'-GCA CAG AGC CTC GCC TT-3' (sense)

5'-GTT GTC GAC GAC GAG CG-3' (antisense)

をそれぞれ使用し、それぞれの発現量を \square -actin の値で補正した。

(4) 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) PSMD14 ノックダウンによる細胞増殖への影響

ヒトメラノーマ細胞株 4 種に PSMD14 に対する配列の異なる 2 種の siRNA (siPSMD14#19, #20) をそれぞれ導入し、細胞増殖を検討した。その結果、4 種すべてのメラノーマ細胞株において、細胞増殖が有意に抑制された (図 1)。

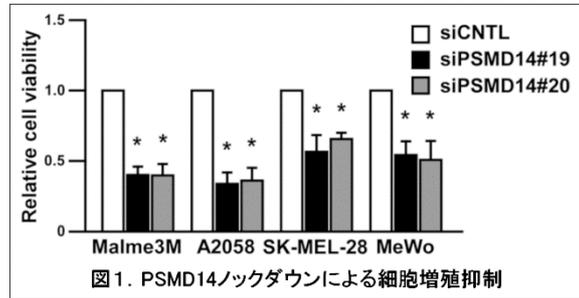


図 1. PSMD14ノックダウンによる細胞増殖抑制

PSMD14 ノックダウンによる細胞周期関連タンパク質の発現変化
ヒトメラノーマ細胞株で同様に PSMD14 のノックダウンを行い、細胞増殖 (特に細胞周期) に関わるタンパク質の発現を Western blot 法にて検討した。その結果、p21 の発現上昇が観察された。また p21 の発現誘導に重要な SMAD3 の発現上昇も観察された (図 2)。

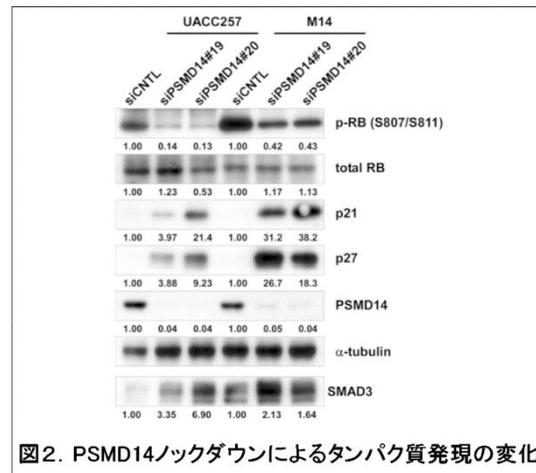


図 2. PSMD14ノックダウンによるタンパク質発現の変化

PSMD14 ノックダウンは SMAD3 誘導を介して p21 発現を誘導する。

PSMD14 ノックダウンによる p21 の誘導に、SMAD3 の誘導が関与するのかについて、PSMD14 と SMAD3 をダブルノックダウンすることで検討した (図 3)。その結果、PSMD14 ノックダウンにより誘導される p21 の発現が、SMAD3 をダブルノックダウンすることで減弱した。このことから、PSMD14 ノックダウンは SMAD3 誘導を介して p21 発現を誘導することが明らかとなった。

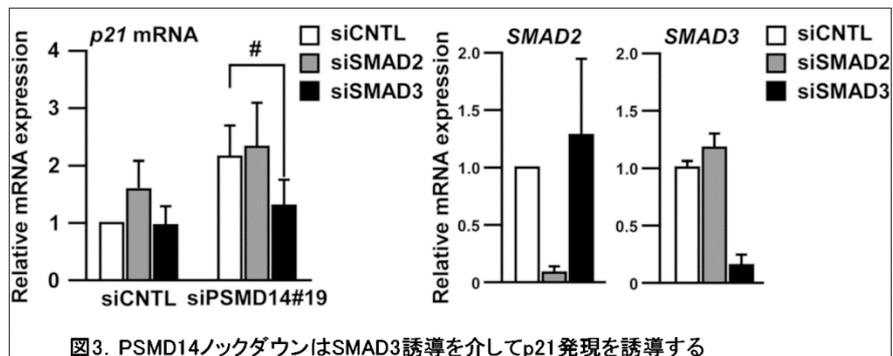


図 3. PSMD14ノックダウンはSMAD3誘導を介してp21発現を誘導する

PSMD14 ノックダウンは SMAD3 誘導を介して細胞増殖を抑制する

最後に PSMD14 による細胞増殖抑制に SMAD3 の誘導が関与するのかについて、PSMD14 と SMAD3 をダブルノックダウンすることで検討した (図 4)。その結果、PSMD14 ノックダウンにより抑制される細胞増殖抑制が、SMAD3 をダブルノックダウンすることで減弱した。このことから、PSMD14 ノックダウンは SMAD3 誘導を介して細胞増殖を抑制することが明らかとなった。

以上の結果より、PSMD14 は SMAD3 を制御することで悪性黒色腫の細胞増殖を誘導していることが明らかとなった。また PSMD14 を阻害することで、細胞増殖が抑制できる可能性が示唆された。

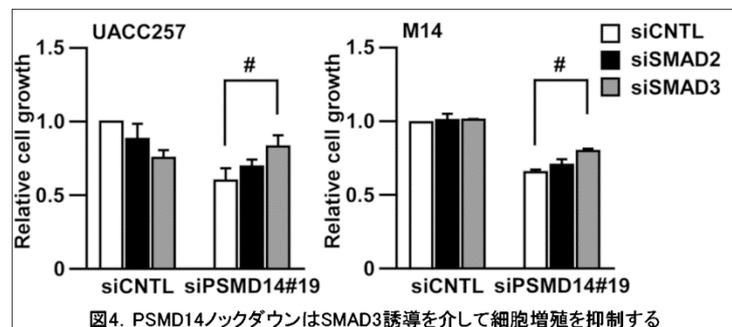


図 4. PSMD14ノックダウンはSMAD3誘導を介して細胞増殖を抑制する

(2) CDK2/9 阻害剤 Dinaciclib と BRAF 阻害剤の併用療法は、メラノーマの効果的な治療法になりうる。

BAX^{-/-}, BAK^{-/-}細胞株の樹立

ヒトメラノーマ細胞株 A2058 細胞に GeneArtCRISPR nuclease vector with GFP (Life Technologies)を用いて BAX, BAK をそれぞれノックアウトした細胞株を樹立した(図5)

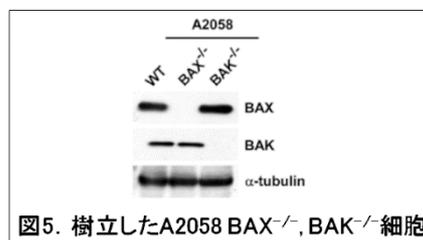


図5. 樹立したA2058 BAX^{-/-}, BAK^{-/-}細胞

CDK2/9 阻害剤 Dinaciclib は BAK を介して細胞増殖を阻害する。

ヒトメラノーマ細胞株 A2058 細胞、A2058 BAX^{-/-}、A2058 BAK^{-/-}の細胞を Dinaciclib で処理し、細胞増殖を比較した(図6)。BAK^{-/-}細胞において、細胞増殖抑制が減弱したことから、Dinaciclib は BAK を介したアポトーシスにより細胞増殖を抑制することが明らかとなった。

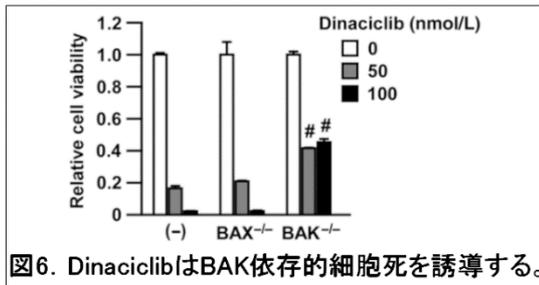


図6. DinaciclibはBAK依存的細胞死を誘導する。

BRAF 阻害剤 vemurafenib は BAX を介して細胞増殖を阻害する。

ヒトメラノーマ細胞株 A2058 細胞、A2058 BAX^{-/-}、A2058 BAK^{-/-}の細胞を vemurafenib で処理し、細胞増殖を比較した(図7)。BAX^{-/-}細胞において、細胞増殖抑制が減弱したことから、vemurafenib は BAX を介したアポトーシスにより細胞増殖を抑制することが明らかとなった。

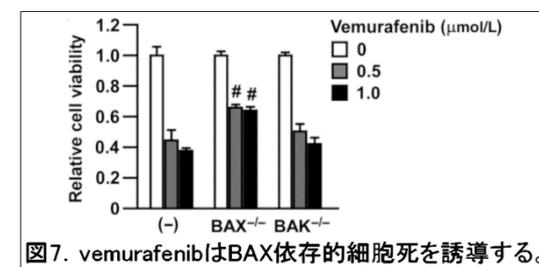


図7. vemurafenibはBAX依存的細胞死を誘導する。

Dinaciclib と vemurafenib の併用は、in vivo で腫瘍増殖を抑制する。

ヒトメラノーマ細胞株 A2058 を C.B-17/lcrHsd-Prkdcscid に皮下移植し、50 mg/kg vemurafenib を毎日、20 mg/kg Dinaciclib を3日毎に腹腔内投与し、腫瘍径を測定した(図8)。その結果、2剤の併用は有意に腫瘍増殖を抑制することが明らかとなった。

以上の結果より、vemurafenib と Dinaciclib は BAX と BAK をそれぞれ活性化する効果的な薬剤併用法であり、メラノーマの新規治療法となりうることを明らかにした。

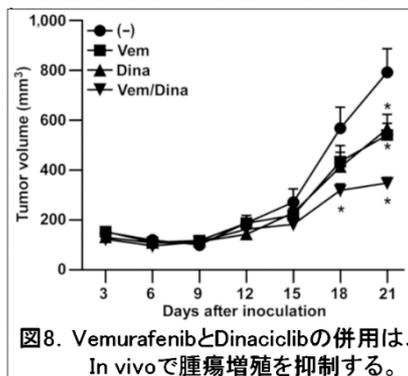


図8. VemurafenibとDinaciclibの併用は、In vivoで腫瘍増殖を抑制する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Xu Xiaou, Eshima Shizuka, Kato Shinichiro, Fisher David E., Sakurai Hiroaki, Hayakawa Yoshihiro, Yokoyama Satoru	4. 巻 19
2. 論文標題 Rational Combination Therapy for Melanoma with Dinaciclib by Targeting BAK-Dependent Cell Death	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 627 ~ 636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-19-0451	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
1. 著者名 Haryuni Ratna Dini, Watabe Satoko, Yamaguchi Asako, Fukushi Yayoi, Tanaka Tomohiro, Kawasaki Yuki, Zhou Yue, Yokoyama Satoru, Sakurai Hiroaki	4. 巻 514
2. 論文標題 Negative feedback regulation of ErbB4 tyrosine kinase activity by ERK-mediated non-canonical phosphorylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 456 ~ 461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.125	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
1. 著者名 Iwakami Y, Yokoyama S, Watanabe K, Hayakawa Y.	4. 巻 507
2. 論文標題 STAM-binding protein regulates melanoma metastasis through SLUG stabilization.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 484-488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.068. Epub 2018 Nov 16.	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 -
1. 著者名 Watanabe K, Yokoyama S, Kaneto N, Hori T, Iwakami Y, Kato S, Hayakawa Y, Sakurai H, Fukuoka J, Saiki I.	4. 巻 9
2. 論文標題 COP9 signalosome subunit 5 regulates cancer metastasis by deubiquitinating SNAIL.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 20670-20680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25060. eCollection 2018 Apr 17.	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 -

1. 著者名 Yokoyama Satoru, Iwakami Yusuke, Hang Zhao, Kin Ryoei, Zhou Yue, Yasuta Yutaka, Takahashi Atsushi, Hayakawa Yoshihiro, Sakurai Hiroaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Targeting PSMD14 inhibits melanoma growth through SMAD3 stabilization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76373-y.	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 石田勝也, 福司弥生, 周 越, 横山 悟, 櫻井 宏明
2. 発表標題 G1S7細胞におけるRSK阻害剤BI-D1870のKIT発現抑制による細胞増殖抑制効果
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山 悟, 早川芳弘, 櫻井宏明
2. 発表標題 CDK2/9阻害剤DinaciclibによるBAKを介した抗悪性黒色腫効果と新規併用療法の提案
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山悟, 岩上雄亮, 櫻井宏明, 早川芳弘
2. 発表標題 STAMBPIは、SLUGタンパク質の安定性を調節し、悪性黒色腫の転移を制御する
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山 悟, 早川芳弘, 櫻井宏明
2. 発表標題 白斑誘導物質ロドデノールによる抗悪性黒色腫効果の検討
3. 学会等名 フォーラム2019 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅山 凜, 横山 悟, 早川芳弘
2. 発表標題 IMQ誘発乾癬モデルに対する桑白皮抽出エキスの有用性
3. 学会等名 第36回和漢医薬学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Abdellatef A, Shinguryo Y, Yokoyama S, Meselhy MR, Hayakawa Y
2. 発表標題 Anti-metastatic Activity of gugulipid extract by targeting cell intrinsic inflammatory pathways
3. 学会等名 第36回和漢医薬学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 周 越, 山畑伊織, 山村朋弘, 横山 悟, 櫻井宏明
2. 発表標題 非定型的活性型EphA2による細胞遊走促進は小胞遊走関連タンパクRab11に依存する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徐 小鷗, 横山 悟, 早川芳弘
2. 発表標題 Rational combination therapy for melanoma with CDK2/9 inhibition by targeting BAK-dependent cell death
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅山 凜, 横山 悟, 早川芳弘
2. 発表標題 Anti-inflammatory effect of Morus alba L. bark by suppressing NF-kB signaling pathway
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Abdellatef A, 横山 悟, 早川芳弘
2. 発表標題 Anti-tumor effect of guggul extract by targeting breast cancer cell intrinsic inflammatory pathways
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田勝也, 福司弥生, 周 越, 横山 悟, 櫻井宏明
2. 発表標題 消化管間質腫瘍細胞におけるRSK阻害剤BI-D1870のKIT発現抑制による細胞増殖抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤弘樹, 高橋篤司, 横山 悟, 櫻井宏明
2. 発表標題 悪性黒色腫におけるSOX10を介したPD-L1の発現制御機構
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 周 越, 山畑伊織, 山村朋弘, 横山 悟, 櫻井宏明
2. 発表標題 RSK-EphA2経路によって誘導される細胞遊走はRab11とRab11-FIP1に依存する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Xu X, Yokoyama S, Hayakawa Y
2. 発表標題 Anti-melanoma effect of CDK inhibitor and its combination strategy with BRAF inhibition
3. 学会等名 The 77 th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横山悟、櫻井宏明、早川芳弘
2. 発表標題 COPS5はSNAILの脱ユビキチン化を介して、がん転移を制御する
3. 学会等名 第27回日本がん転移学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋 篤司、早川 芳弘、櫻井 宏明、横山 悟
2. 発表標題 悪性黒色腫におけるSOX10を介したPD-L1発現制御機構
3. 学会等名 第141回日本薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田裕敬、周越、櫻井宏明、横山悟
2. 発表標題 PTEN欠損によるBRAFV600E変異依存的な細胞運動亢進
3. 学会等名 第141回日本薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yokoyama S, Takahashi A, Zhou Y, Hayakawa Y, Sakurai H
2. 発表標題 SOX10 negatively regulates PD-L1 expression in melanoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会、9月2020年
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安田裕敬、早川芳弘、櫻井宏明、横山悟
2. 発表標題 PTEN 欠損によるがん遺伝子依存的な細胞運動亢進
3. 学会等名 第29回日本がん転移学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋篤司、早川芳弘、櫻井宏明、横山悟
2. 発表標題 悪性黒色腫におけるSOX10を介したPD-L1発現制御機構
3. 学会等名 第19回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィォーラム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋篤司、横山悟、早川芳弘、櫻井宏明
2. 発表標題 悪性黒色腫におけるSOX10を介したPD-L1の発現制御機構
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山大学 学術研究部薬学・和漢系 がん細胞生物学研究室 http://www.pha.u-toyama.ac.jp/liche2/index-j.html 富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）がん細胞生物学研究室 http://www.pha.u-toyama.ac.jp/liche2/index-j.html
--

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