

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08288

研究課題名（和文）メラノーマの進展、および治療抵抗性におけるPIP3閾値モデルの検証

研究課題名（英文）Validation of the PIP3 Threshold Model in Melanoma Progression and Resistance to Treatment

研究代表者

長田 真一（Osada, Shin-ichi）

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00244484

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）：イノシトールリン脂質の一つである細胞内PIP3は、発癌に密接に関わっている。本研究では、新たにPIP3の産生を制御することが判明したInpp4b遺伝子が欠損したメラノーマ・マウスを用いて、腫瘍内のPIP3量が増加するほどメラノーマの悪性度が高まるのか（PIP3閾値モデル）を検証した。その結果、Inpp4bのホモ欠損よりもヘテロ欠損のメラノーマの方がより悪性度、治療抵抗性が高いことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりPIP3閾値モデルがメラノーマにも一部当てはまることが示唆された。腫瘍内PIP3量の増加は免疫チェックポイント阻害薬に対する感受性を低めることが報告されており、Inpp4bがメラノーマにおいてもPIP3量の増加に関わることを明らかにした本研究は、今後メラノーマの悪性度、治療抵抗性のメカニズムの解明につながる。

研究成果の概要（英文）：Intracellular PIP3, one of the inositol phospholipids, is closely related to carcinogenesis. In this study, we used melanoma mice lacking the Inpp4b gene, which was recently found to be involved in PIP3 production, to examine whether the malignancy of melanoma becomes more progressive as the amount of intratumoral PIP3 increases (PIP3 threshold model). The results suggest that Inpp4b heterozygous deleted melanomas are more malignant and resistant to treatment than Inpp4b homozygous deleted melanomas.

研究分野：皮膚科学

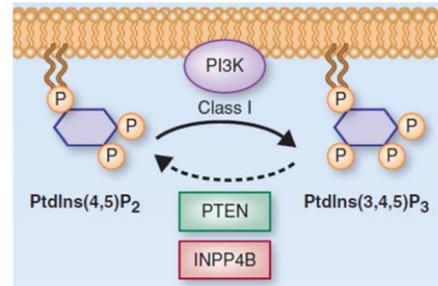
キーワード：メラノーマ イノシトールリン脂質 INPP4B PTEN PI3K経路 免疫チェックポイント阻害薬

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

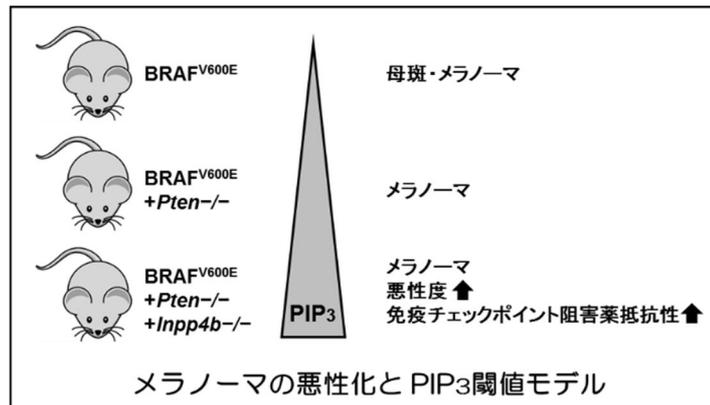
## 1. 研究開始当初の背景

癌抑制遺伝子 PTEN の変異は多くの癌で見つかる。その結果異常に蓄積した PIP<sub>3</sub> は、PI3K-AKT 経路を活性化し、細胞増殖・生存を促進する。INPP4B は、本来 PI(3,4)P<sub>2</sub> を脱リン酸化して PI(3)P を産生するイノシトールリン脂質代謝酵素の一つであるが、最近 PTEN 同様 PIP<sub>3</sub> を脱リン酸化する活性が見つかった (Cancer Discov. 5, 730-739, 2015、右上図)。



さらに、PTEN と INPP4B 遺伝子双方が欠損したマウスでは、PTEN、または INPP4B が単独で欠損した場合に比べ、PIP<sub>3</sub> がより増加して下流の AKT が活性化され、悪性度の高い甲状腺癌が発症することが判明した (Cancer Discov. 5, 730-739, 2015)。このことは、腫瘍内の PIP<sub>3</sub> 量が増加するにつれ悪性度が高まることを示唆している (PIP<sub>3</sub> 閾値モデル、右下図)。

翻ってメラノーマをみると、活性化型 BRAF 変異 (BRAF<sup>V600E</sup>) のほかに、約 30% の患者に PTEN 変異が見つかる。さらに、PTEN 変異は腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL, tumor-infiltrating lymphocyte) の減少、および免疫チェックポイント阻害薬抵抗性と相関することが明らかになってきた (Cancer Discov. 6, 202-261, 2016)。そこで本研究では、腫瘍内 PIP<sub>3</sub> 量の異なるメラノーマ・モデルマウスを作製し、**メラノーマの進展、および免疫チェックポイント阻害薬抵抗性を PIP<sub>3</sub> 閾値モデルで説明できるのか検証する。**



## 2. 研究の目的

本研究では、PIP<sub>3</sub> 閾値モデルに基づき、Pten 変異、Inpp4b 変異を様々な組み合わせで持つメラノーマ・モデルマウス、そこから樹立した細胞株、およびメラノーマの摘出標本を用いて、PIP<sub>3</sub> 量とメラノーマの進展、および免疫チェックポイント阻害薬抵抗性の関係を解析する。本研究により、メラノーマの治療における免疫チェックポイント阻害薬と PI3K-AKT 経路阻害薬の併用療法の理論的根拠を提供する。

## 3. 研究の方法

(1) Pten、Inpp4b の対立遺伝子数が異なるメラノーマ・マウスの作製と悪性度の相関解析  
メラノーマ・モデルマウス (Tyr::CreERT; Braf<sup>ca/+</sup>; Pten<sup>lox/lox</sup>) にタモキシフェンを塗布すると、色素細胞特異的に BRAF<sup>V600E</sup> 変異、および Pten 欠損が起こり、ヒトのメラノーマで見られる遺伝子変異をもった、転移能の高いメラノーマを再現できる (Nat Genet 4:544-552, 2009)。このマウスを Inpp4b 欠損マウス (Inpp4b<sup>lox/lox</sup>) と交配して Pten、Inpp4b の対立遺伝子数が異なるマウスを作製し、タモキシフェン塗布によりできるメラノーマの数、大きさ、腫瘍ができるまでの期間、生存率、転移の有無などを比較する。

(2) 腫瘍内イノシトールリン脂質の網羅的解析

質量分析をベースとしたイノシトールリン脂質解析システムを用いて、遺伝子型から予想される通りの様々な PIP<sub>3</sub> 量をもったメラノーマができていることを確認する。

(3) PIP<sub>3</sub> 量の異なるメラノーマ由来細胞株の樹立

(1) でできた Pten、Inpp4b の対立遺伝子数が異なるメラノーマから腫瘍細胞を初代培養し、そこから細胞株を樹立する。

(4) メラノーマ由来細胞株の特性解析

(3) で樹立した Pten、Inpp4b の対立遺伝子数が異なるメラノーマ由来細胞株の増殖能を比較する。

細胞株を BRAF 阻害薬、MEK 阻害薬で処理し、薬剤感受性を解析する。

(5) ヒト・メラノーマ切除標本での INPP4B 発現解析

ヒト・メラノーマの病理組織標本で PTEN、および INPP4B の発現を免疫組織染色で調べる。

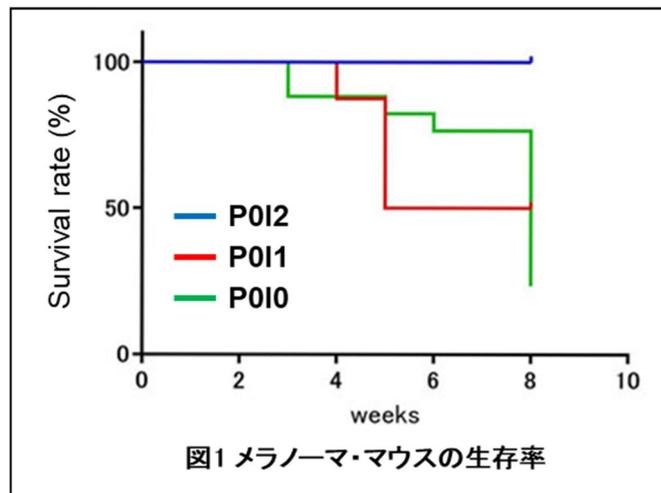
4. 研究成果

(1) Pten、Inpp4bの対立遺伝子数が異なるメラノーマ・マウスの作製と悪性度の相関解析

メラノーマ・モデルマウス(BRAFV600E;Pten - / - )とInpp4b欠損マウスを交配し、Inpp4bが野生型(BRAFV600E;Pten - / - ;Inpp4b+/+, P012)、ヘテロ欠損型(BRAFV600E;Pten - / - ;Inpp4b+/-, P011)、あるいはホモ欠損型(BRAFV600E;Pten - / - ;Inpp4b - / -, P010)のマウスを作製した。まず、できたメラノーマの数、大きさを比較しようとしたが、発生してくるメラノーマの数はいずれの型でも多く、すぐに融合してしまうため、定量的に差を調べるのは困難だった。

一方、メラノーマができるまでの期間は、Inpp4bがヘテロ、またはホモで欠損したマウスで短くなる傾向が見られた。

次に生存率を比較した。P012, P011, P010の順で細胞内のPIP<sub>3</sub>濃度が上昇すると考えられるため、この順で生存率が下がると予想したが、実際にはP011でもっとも生存率の低下が早かった(図1)。

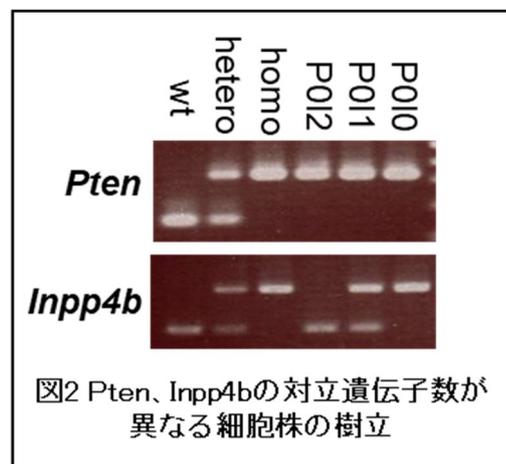


(2) 腫瘍内イノシトールリン脂質の網羅的解析

本研究では、甲状腺癌における報告に基づき、Pten変異にInpp4b変異が加わることにより、メラノーマ細胞内のPIP<sub>3</sub>量が増加すると予想していた。しかし、世界最高感度の質量分析装置を用いてイノシトールリン脂質を網羅的に解析したが、Inpp4b変異が加わることにより、細胞内のPIP<sub>3</sub>量がさらに増加する、という明確な相関はみられなかった。

(3) Pten、Inpp4bの対立遺伝子数が異なるメラノーマ由来細胞株の樹立

(1)で作製したPten、Inpp4bの対立遺伝子数が異なるマウスに発生したメラノーマを切除し、それを既報(Pigment Cell Melanoma Res 24: 978-988, 2011)にのっとして処理し、Inpp4bの対立遺伝子数が異なる野生型株、ヘテロ変異株、ホモ変異株をそれぞれ2種類ずつ樹立した。樹立した細胞株は全てPten遺伝子がホモ欠損なのでP0と表示し、Inpp4b遺伝子については野生型をI2、ヘテロ欠損をI1、ホモ欠損をI0であらわした。すなわち、樹立した細胞はP0I2, P0I1, P0I0である。細胞株の遺伝型の結果を図2に示した。



#### (4) メラノーマ由来細胞株の特性解析

再現性、定量性を高めるために、解析は全自動生細胞解析システム IncuCyte を用いて行った。用いた細胞は P012, P011, P010 であり、それぞれ 2 系統ずつ解析した。本計画では、Pten 変異に Inpp4B 変異が加わると、より悪性度の高いメラノーマになること、すなわち増殖能、薬剤抵抗性が高まることを予想した。

##### 増殖能について

予想通り、P011 株は 2 系統とも P012 株より増殖能が高まっていた。しかし、P010 株については、1 系統は P011 株と同程度増殖能が高まっていたが、もう 1 系統は P012 とほぼ変わらなかった。

##### BRAF 阻害薬、MEK 阻害薬感受性について

予想通り、P011 株は 2 系統とも P012 株より BRAF 阻害薬であるデブラフェニブ、および、MEK 阻害薬である PD0325901 に対する抵抗性が高まっていた。しかし、P010 株については、1 系統はデブラフェニブ、および PD0325901 に対する抵抗性が P012 株より高まっていたものの、P011 株ほど高まっていなかった。

#### (5) ヒト・メラノーマ切除標本での INPP4B 発現解析

切除したメラノーマの手術標本を用いる代わりにまず、市販のメラノーマの組織アレイを用いて、PTEN、および INPP4B に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。その結果、PTEN のみ発現が低下しているもの、INPP4B のみ発現が低下しているもの、両者の発現が低下しているものに分類されることがわかった。すなわち、INPP4B の発現が低下しているメラノーマが存在することが分かった。

#### (6) まとめ

Pten 欠損下で Inpp4 b がヘテロで欠損すると、Inpp4 b が野生型である時に比べメラノーマの増殖能、薬剤抵抗性が上昇し、悪性度が高まることがわかった。一方で、Inpp4 b がホモで欠損しても、さらに増殖能や抵抗性が高まるという結果は得られなかった。以上より、メラノーマでは、PIP<sub>3</sub> 閾値モデルが一部当てはまると考えられる。

遺伝型的には P012, P011, P010 のマウス、および細胞株を樹立できたにもかかわらず、質量分析を利用した PIP<sub>3</sub> の定量で予想された濃度依存性は見られなかった。その理由は不明であるが、Inpp4 b がホモで欠損すると、何らかの代償機構が働くと考えられ、そのメカニズムの解明は今後の課題である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Umezono Y, Sato Y, Noto M, Yamada K, Noguchi N, Hasunuma N, Osada SI, Manabe M.	4. 巻 46
2. 論文標題 Incidence rate of cutaneous squamous cell carcinoma is rapidly increasing in Akita Prefecture: Urgent alert for super-aged society.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 259-262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.14759.	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 Noto M, Noguchi N, Ishimura A, Kiyonari H, Abe T, Suzuki T, Hasunuma N, Taira M, Manabe M, Osada SI.	4. 巻 509
2. 論文標題 Sox13 is a novel early marker for hair follicle development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 862-868
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.12.163.	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 Noguchi N, Hirose T, Suzuki T, Kagaya M, Chida K, Ohno S, Manabe M, Osada SI.	4. 巻 93
2. 論文標題 Atypical protein kinase C isoforms differentially regulate directional keratinocyte migration during wound healing.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci	6. 最初と最後の頁 101-108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2019.01.001.	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 長田真一	4. 巻 129
2. 論文標題 新・皮膚科セミナーウム 発癌の仕組み 有棘細胞癌の発癌の仕組み	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本皮膚科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 2313-2319
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14924/dermatol.129.2313	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 -

1. 著者名 Yamada M, Kagaya M, Noguchi N, Ueki S, Hasunuma N, Osada SI, Manabe M.	4. 巻 92
2. 論文標題 Topical 3-bromopyruvate is a novel targeted therapy for melanoma in a preclinical model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci.	6. 最初と最後の頁 134-142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2018.08.009.	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 Watanabe M, Kosumi H, Osada S-I, Takashima S, Wang Y, Nishie W, Oikawa T, Hirose T, Shimizu H, Natsuga K	4. 巻 30
2. 論文標題 Type XVII collagen interacts with the aPKC PAR complex and maintains epidermal cell polarity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp Dermatol	6. 最初と最後の頁 62-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.14196	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 長田真一	4. 巻 16
2. 論文標題 細胞極性制御因子aPKCの毛包幹細胞の維持、および創傷治癒における役割	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日医大医学会誌	6. 最初と最後の頁 130-137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/manms.16.130	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Noto M, Noguchi N, Manabe M, Osada SI
2. 発表標題 Sox13 as a novel early marker in hair follicle development
3. 学会等名 49th Annunal European Society for Dermatological Research Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長田真一
2. 発表標題 有棘細胞癌のゲノム・ランドスケープ
3. 学会等名 第117回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 長田真一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 CMC出版	5. 総ページ数 283
3. 書名 毛髪科学の新展開	

1. 著者名 高橋 健造、佐伯 秀久（編集）、長田真一（分担）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 340
3. 書名 皮膚疾患最新の治療2021-2022（クリオグロブリン血症）	

〔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
---------	---------