

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16030

研究課題名(和文) PITX1-SOX10を標的とした新規メラノーマ治療戦略

研究課題名(英文) PITX1 inhibits melanoma proliferation by regulation of SOX10 transcription

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：メラノーマは、他のがん種と比較して転移しやすく悪性の高いがんに分類される。メラノーマではBRAFV600E変異が全体の50%で認められ、BRAF変異に対する分子標的薬は、短期間においては薬剤の著効が認められるが、抵抗性を持つ耐性がんの出現率が高く、寛解を妨げる主な障壁となっている。そのため、新たな分子標的の開発が求められている。

本研究では、メラノーマ細胞においてPITX1がSOX9の発現を誘導し、SOX10の発現抑制を介して、その増殖を阻害する新規がん抑制経路(PITX1/SOX9経路)の存在を明らかにし、メラノーマにおける新たな分子標的の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、がん抑制遺伝子であるPITX1の詳細な機能解析を通して、メラノーマにおける新規のがん抑制シグナル伝達経路の存在を明らかにした。具体的には、メラノーマのドライバー遺伝子(発がんのカギとなるがん遺伝子)として知られるSOX10遺伝子の発現を、PITX1はSOX9遺伝子を介して抑制することを見出した。したがって、本研究結果はメラノーマの発がん機構におけるその分子機序の新規知見を与えるだけでなく、同時に新たな分子標的薬の開発に向けた糸口になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Melanoma is one of the most aggressive types of cancer in which resistance to treatments. Therefore, it is important to discover novel molecular targets of melanoma progression as potential treatments. Here we show that paired-like homeodomain transcription factor 1 (PITX1) plays a crucial role in the inhibition of melanoma progression thorough regulation of SRY-box transcription factors (SOX) gene family mRNA transcription.

The findings in this study indicate that PITX1 may act as a negative regulatory factor in the development and progression of melanoma via direct targeting of the SOX signaling pathway.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：メラノーマ がん遺伝子 がん抑制遺伝子 腫瘍生物学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

メラノーマは、他のがん種と比較して転移しやすく悪性度の高いがんに分類される。メラノーマでは BRAF<sup>V600E</sup> 変異が全体の 50% で認められ、BRAF 変異に対する分子標的薬は、短期間においては薬剤の著効が認められるが、抵抗性を持つ耐性がんの出現率が高く、寛解を妨げる主な障壁となっている。そのため、新たな分子標的の開発が求められていた。

### 2. 研究の目的

これまで我々はメラノーマにおける PITX1 遺伝子の発現誘導が、増殖抑制とアポトーシスを引き起こすことを報告してきた(Ohira *et al.*, *PLoS One*, 12;14(8): 2019)。本研究では、ヒトメラノーマでの PITX1 の新規機能とその機序を明らかにするため、PITX1 の発現上昇がメラノーマに与える影響(増殖抑制や細胞死)を *in vitro*、*in vivo* 両面からの解析から PITX1 下流遺伝子を同定し、その分子経路を明らかにすることで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た。

### 3. 研究の方法

メラノーマ細胞において、PITX1 による増殖の抑制経路の分子機構を明らかにするために、ヒトメラノーマ細胞株 A2058 への PITX1 の発現誘導による増殖抑制の実験を中心に置き、ChIP-seq で得られた候補遺伝子の情報から、その経路の同定を目指した。また、*in vivo* のヌードマウスを用いた皮下移植腫瘍モデル実験により、既存の BRAF<sup>V600E</sup> 分子標的薬の耐性クローンに対して、PITX1 による抗がん効果を適用し、新たな制がん戦略として提唱できるかを検討した。具体的には以下の 3 つの実験を行った。

- (1) PITX1 発現誘導の際に現れた細胞死を含めた増殖抑制の形質変化の原因解析
- (2) メラノーマ組織における PITX1, SOX9, SOX10 の発現動態解析
- (3) PITX1 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* の検討

### 4. 研究成果

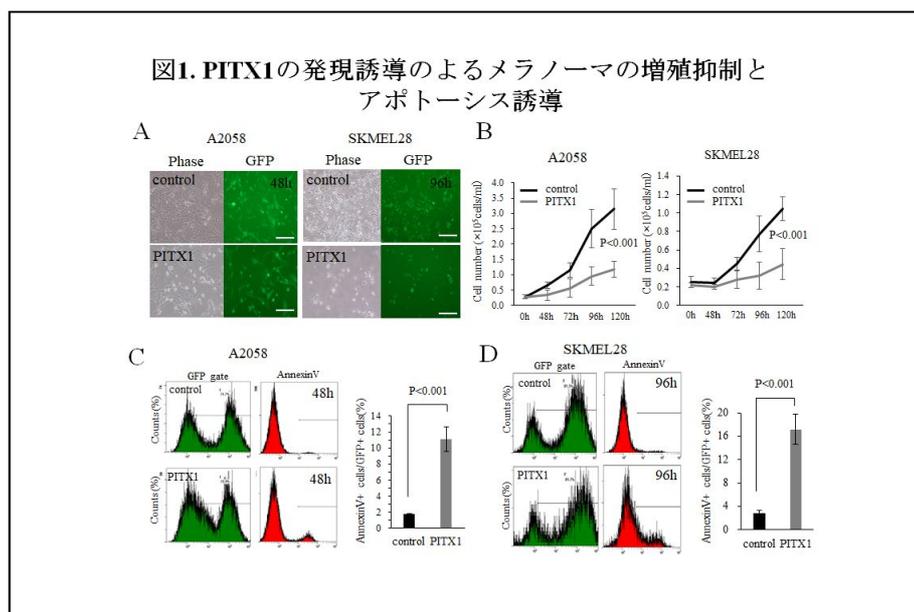
- (1) PITX1 発現誘導の際に現れた細胞死を含めた増殖抑制の形質変化の原因解析  
増殖抑制に至る形質変化の決定

研究実施者は、A2058 および SKMEL28 細胞への PITX1 の発現誘導実験により、細胞の増殖能を抑制できることを明らかにしている(図 1A, B)。そこで、この増殖抑制効果がアポトーシス誘導に起因するか、その詳細に決定する実験を行った。

PITX1 発現ウイルスベクターを用いて A2058 および SKMEL28 細胞へ PITX1 を発現させ、アポトーシスのマーカーであるアネキチン V により染色し、フローサイトメーターで細胞の陽性率を解析した。

その結果、アネキチン V 陽性細胞が A2058 細胞では 6.6 倍増加し、SKMEL28

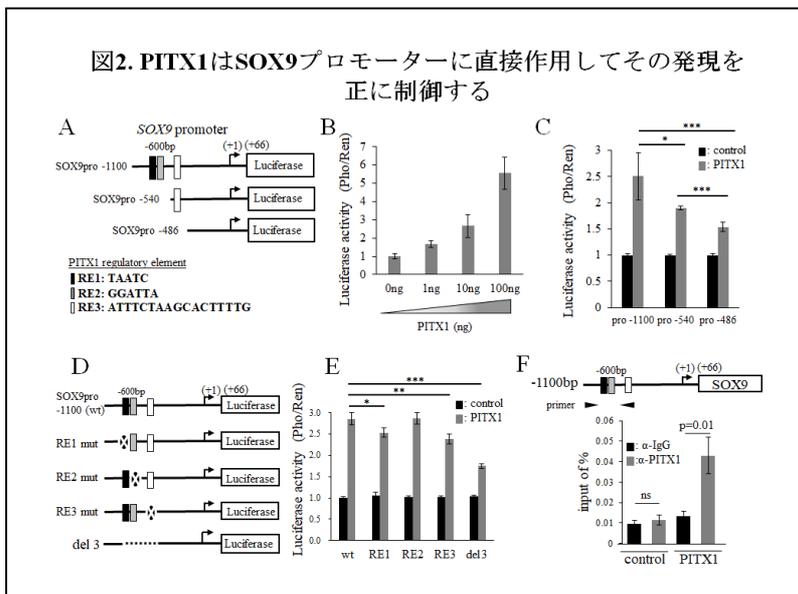
細胞では 6.1 倍増加していた(図 1C, D)。この結果から、PITX1 によるメラノーマ細胞の増殖抑制効果の原因の一つがアポトーシス誘導であることが示唆された。



## PITX1 による SOX9 の発現調節機構の解析

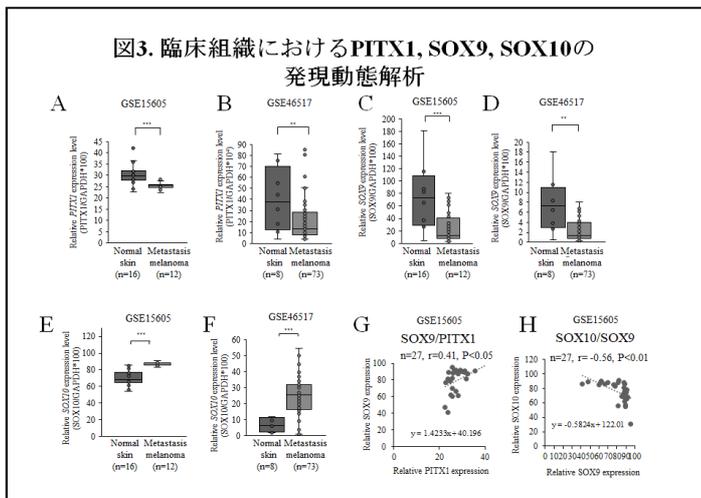
PITX1 が転写因子であることから PITX1 タンパクが SOX9 プロモーターを直接制御している可能性が考えられた。また、SOX9 プロモーター上流-600bp 付近に PITX1 結合配列結合モチーフが 3 カ所に存在することを確認していた(図 2A)。そこで、この可能性を検討するために、SOX9 プロモーターをルシフェラーゼの上流にクローニングしたベクターを用いてレポーター解析を行った。

その結果、PITX1 の濃度依存的な SOX9 プロモーターによるルシフェラーゼ活性の増加が認められた(図 2B)。加えて、3 カ所の PITX1 結合配列結合モチーフのうち、RE1 と RE3 に変異を導入した場合、ルシフェラーゼ活性の低下が認められたことから、この領域に PITX1 の結合が示唆された(図 2C-E)。さらに、PITX1 抗体を用いた免疫沈降法により、RE1-RE3 付近への PITX1 タンパクの直接的な結合を確認した(図 2F)。以上の結果から、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。



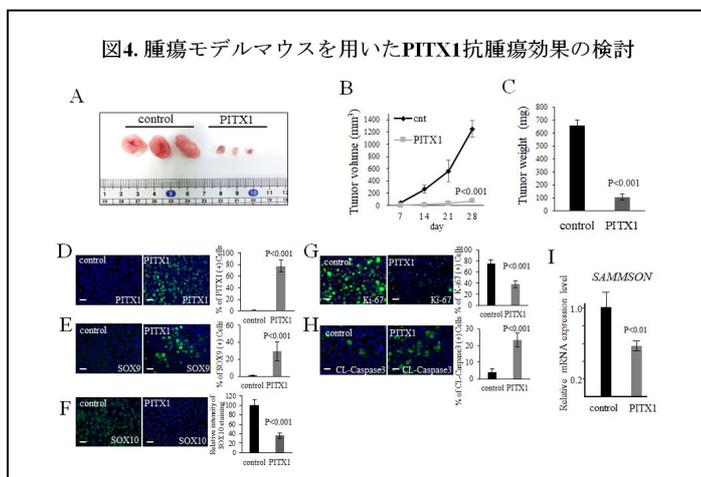
## (2)メラノーマ組織における PITX1, SOX9, SOX10 の発現動態解析

公共データベース(GEO)の独立した 2 種類のデータセットを用いて臨床検体における発現動態解析を行った結果、正常組織と比較して、転移症例で PITX1(図 3A, B)と SOX9(図 3C, D)の発現低下が、SOX10(図 3E, F)は発現上昇が認められた。また、PITX1 と SOX9 の発現動態には正の相関性が(図 3G)、SOX9 と SOX10 の発現動態には負の相関性が認められた(図 3H)。以上の結果から、ヒトの組織内においても PITX1 の発現低下と SOX10 の発現上昇がメラノーマの発生と進展に関与している可能性が示唆された。



## (3)PITX1 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 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。

以上の結果から、本研究により PITX1 による SOX9 の発現誘導は、SOX10 の発現抑制を介して、メラノーマ細胞の増殖を阻害する新規がん抑制経路(PITX1/SOX9 経路)の存在が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Ohira T, Miyauchi K, Uno N, Shimizu N, Kazuki Y, Oshimura M, Kugoh H.   | 4. 巻<br>18           |
| 2. 論文標題<br>An efficient protein production system via gene amplification on a human artificial chromosome and the chromosome transfer to CHO cells. | 5. 発行年<br>2019年      |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>online |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-019-53116-2.  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Ohira T, Kojima H, Kuroda Y, Aoki S, Inaoka D, Osaki M, Wanibuchi H, Okada F, Oshimura M, Kugoh H. | 4. 巻<br>12           |
| 2. 論文標題<br>PITX1 protein interacts with ZCCHC10 to regulate hTERT mRNA transcription.                        | 5. 発行年<br>2019年      |
| 3. 雑誌名<br>Plos one   | 6. 最初と最後の頁<br>online |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1371/journal.pone.0217605.   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Endo Yukari, Kuwamoto Satoshi, Ohira Takahito, Matsushita Michiko, Matsushige Takahiro, Fukuhara Takahiro, Nakamoto Shu, Hayashi Kazuhiko, Kugoh Hiroyuki, Hirooka Yasuaki | 4. 巻<br>62              |
| 2. 論文標題<br>Possible Relationship Between MYBL1 Alterations and Specific Primary Sites in Adenoid Cystic Carcinoma: A Clinicopathological and Molecular Study of 36 Cases             | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Yonago Acta Medica   | 6. 最初と最後の頁<br>067 ~ 076 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.33160/yam.2019.03.010  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>T. Ohira, H. Kugoh.   |
| 2. 発表標題<br>PITX1 is a novel suppressor of SOX10 and inhibit melanoma growth. |
| 3. 学会等名<br>:第79回 日本癌学会学術総会   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>T. Ohira, K. Miyauchi, N. UNO, N. Shimizu, K. Kazuki, M. Oshimura, H. Kugoh.   |
| 2. 発表標題<br>An efficient protein production system via gene amplification on a human artificial chromosome and the chromosome transfer to CHO cells. |
| 3. 学会等名<br>第41回 日本分子生物学会年会  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>稲岡大悟, 大平崇人, 押村光雄, 中山祐二, 久郷裕之 |
| 2. 発表標題<br>X染色体不活化機構解明に向けた人工染色体の活用      |
| 3. 学会等名<br>第41回日本分子生物学会                 |
| 4. 発表年<br>2018年                         |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|  |
|--|
| 研究室 ホームページ<br><a href="https://saiboukougaku.jimdoofree.com/">https://saiboukougaku.jimdoofree.com/</a><br>研究室 ホームページ<br><a href="https://saiboukougaku.jimdo.com/">https://saiboukougaku.jimdo.com/</a> |
|--|

|                           |                       |    |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織                   |                       |    |
| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|