

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06907

研究課題名（和文）ヘムオキシゲナーゼを分子標的とした悪性黒色腫の浸潤転移抑制方法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a method for inhibiting the infiltration and metastasis of malignant melanoma by targeting heme oxygenase.

研究代表者

柴崎 晶彦（shibazaki, masahiko）

岩手医科大学・医歯薬総合研究所・助教

研究者番号：20445109

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では数多くのNFE2L2経路のうち、前述のヘムオキシゲナーゼが関与する経路（経路1）とGPX4が関与する経路（経路2）に注目し、細胞内のヘム量の変化がメラノーマの浸潤能と生存能に及ぼす効果を検討した。

まず、経路1について、ヘミンを投与することで細胞内のヘム量を増加させ、メラノーマの浸潤能を検討した。その結果、有意なメラノーマの浸潤低下が確認された。次に、経路2について、GPX4阻害剤とヘミンの併用効果について検討した。その結果、ヘミンの投与区分では有意にメラノーマの生存が低下した。以上から、メラノーマ治療戦略としての、ヘミンの有効性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メラノーマ治療では分子標的治療薬ベムラフェニブが注目されるが、適用対象はBRAFV600E変異をもつものに限られる。しかし日本人においてBRAFV600E変異タイプは25%以下であり、欧米人に比べ低い。本研究では、ベムラフェニブが奏効しないメラノーマ細胞株につき、腫瘍細胞の浸潤抑制においてはNFE2L2とその制御下にある下流因子HO-1が候補となること、また現在、急性ポルフィリン治療薬として実際に使用されているヘミンが、これら因子を介して有意に浸潤抑制すること、また同じくNFE2L2の制御下にあるGPX4の阻害による抗腫瘍細胞効果は、ヘミンにより増強されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： In this study, we focused on two pathways among the numerous NFE2L2 pathways: pathway 1 involving the aforementioned heme oxygenase and pathway 2 involving GPX4, and investigated the effects of changes in cellular heme levels on the invasive and survival abilities of melanoma.

First, regarding pathway 1, we examined the invasive ability of melanoma cells by increasing cellular heme levels through administration of heme. As a result, a significant decrease in melanoma invasion was observed. Next, regarding pathway 2, we investigated the combined effects of a GPX4 inhibitor and heme. As a result, significant reduction in melanoma survival was observed in the heme administration group. Therefore, the effectiveness of heme as a melanoma treatment strategy is suggested.

研究分野：分子生物学

キーワード：NFE2L2 HO-1 GPX4 ヘミン

1. 研究開始当初の背景

メラノーマは予後不良の固形腫瘍の一種であり、我が国でも近年患者数は増加傾向にある。メラノーマ治療薬として近年注目されるベムラフェニブは、活性型BRAF変異タンパク質 (BRAFF^{V600E}) を標的とし、BRAFF^{V600E} を有するメラノーマに対して強い抗腫瘍効果を認めるが、ベムラフェニブに対する薬剤耐性が比較的早期に現れることが問題として挙げられる^{[1][2]}。一方、その他の薬剤としてシスプラチンやダカルバジン系薬剤が用いられるが、その奏効率は10%程度と低いとされる。これら既知の薬剤治療が奏効しない場合、多くは肺や骨へ転移がみられ、患者の生存率を低下させる大きな原因となっている。このように、腫瘍転移抑制は薬剤耐性の克服と並び、治療奏効率向上のための重要な鍵となる。

約30%の非小細胞肺癌は、レドックス系を制御する転写因子Nuclear factor (erythroid-driven 2)-like 2 (NFE2L2)を高発現し、高浸潤・転移を示すことが知られていたが、その具体的な機構は長年不明であった。近年、非小細胞肺癌において、NFE2L2からヘムオキシゲナーゼを介しBACH1に至る転移遺伝子群の制御系 (NFE2L2経路)の存在が明らかになった^{[3][4]}。

申請者はこれまでに、NFE2L2をユビキチン化するKEAP1遺伝子のフレームシフト変異によりいくつかのメラノーマ細胞株や手術検体 (約10%) において、NFE2L2が安定化していることを見出している^[5]。

一方、ベムラフェニブは転写共益因子PGC1 α を誘導し、インテグリンを介した浸潤転移を強力に抑制することが示されている^[6]。しかし申請者は、PGC1 α 経路により浸潤が抑制されないメラノーマ細胞株を見出している。

以上から、本研究では、「NFE2L2経路に注目し、その中間因子であるヘムオキシゲナーゼ活性を抑制もしくは細胞内ヘム量を増減する薬剤によりベムラフェニブに耐性を示すメラノーマの浸潤・転移を抑制できるか」を主要な問いとして検討する。

2. 研究の目的

メラノーマは化学療法剤や放射線治療が効きにくい上に転移能が高く、また転移発見後の生存率が極めて低い難治性腫瘍である^{[6][7]}。メラノーマ治療において分子標的治療薬ベムラフェニブが注目されるが、適用対象は細胞内シグナル分子に特定の変異 (BRAFF^{V600E} 変異) をもつものに限られる。しかし日本人においてBRAFF^{V600E} 変異タイプは25%以下であり、欧米人 (約40~50%) に比べ低い^{[8][9]}。また、BRAFF^{V600E} 変異をもつものであっても早期に薬剤耐性が現れやすい^{[1][2]}。これらはメラノーマ治療の困難性の一因となっており、新たな治療標的が望まれる。

そこで本研究の目的は、メラノーマにおける NFE2L2 経路の位置づけを明らかとするとともに、ベムラフェニブが奏効しないメラノーマの転移抑制に NFE2L2 経路の抑制が有効であるかを検討することである。

3. 研究の方法

培養細胞レベルでの基礎的知見を得るために、メラノーマ細胞株を用いて以下の方法により検討した。NFE2L2 経路の各因子の浸潤能獲得への関与について、NFE2L2 を iRNA 法により減少することで、ヘムオキシゲナーゼや BACH1 の変化をウェスタン法により評価した。つぎに、NFE2L2 経路の各々の因子を iRNA 法により減少した条件で、マトリゲル法により細胞浸潤への影響を検討した。また、ヘムオキシゲナーゼの活性を制御することで、メラノーマの転移を抑制できるか、各種メラノーマ細胞株に、ヘムオキシゲナーゼ阻害剤および急性ポルフィリン症治療薬であるヘミンを作用させ、マトリゲル法により浸潤能を解析した。さらに、ヘミンの細胞増殖への効果についても検討した。

4. 研究成果

(1) 治療標的としての NFE2L2 の有効性—細胞浸潤抑制との関係について

本研究ではおもに BRAFF^{V600E} 変異を有する G361 細胞株と、NRAS^{Q61} 変異を有する A7 細胞株を用いた。これら細胞株について、まずは、メラノーマの浸潤機構に関与が知られる PGC1 α 経路と NFE2L2 経路の関係について検討した (Fig1)。メラノーマ細胞の浸潤抑制機構として、転写共益因子 PGC1 α によるインテグリンを介した機構が知られている^[6]。G361 細胞においてベムラフェニブにより PGC1 α は誘導されるが、NFE2L2 の発現は逆に抑制された (Fig1A Lane2)。一方、スルフォラファンにより、NFE2L2 は PGC1 α 非依存的に安定化することが認められた (Fig1A Lane3)。これらは、PGC1 α の下流経路が NFE2L2 にクロストークしている可能性を示唆する。

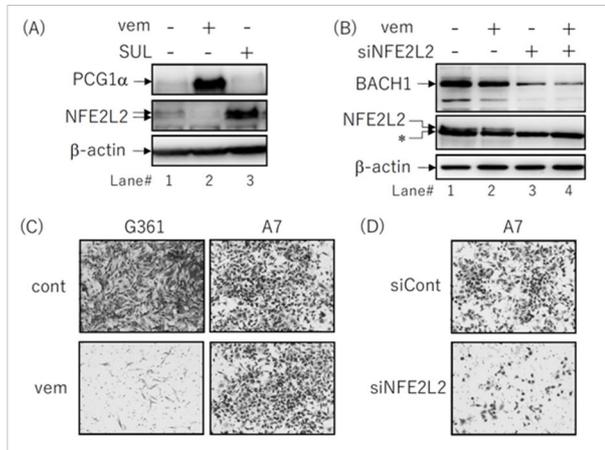


Figure 1 説明：(A) G361 細胞を 2 μ M ベムラフェニブ(vem)、10 μ M スルフォラファン(SUL)で 24 時間処理し、RIPA バッファーに溶解後、PGC1 α 、NFE2L2 をそれぞれの抗体により検出した。(B) A7 細胞を 2 μ M ベムラフェニブ、または NFE2L2siRNA の有無の組み合わせにより 24 時間処理して、RIPA バッファーに溶解後、BACH1、NFE2L2 をそれぞれの抗体により検出した。(*印は非特異的バンド) (C)G361 または A7 細胞を浸潤測定チャンパーに 5 \times 10⁵細胞入れ、10 μ M ベムラフェニブの有無の条件下で、24 時間処理し浸潤細胞を染色した。(D)A7 細胞をそれぞれの表記 siRNA により 24 時間処理後、浸潤測定チャンパーに 5 \times 10⁵細胞入れ、さらに 24 時間処理し浸潤細胞を染色した。

次に、NFE2L2 経路に依存的な浸潤制御機構^{[3][4]}について検討した。A7 細胞は NFE2L2 の分解系に關与する KEAP1 遺伝子に変異があり、その結果、恒常的に NFE2L2 が安定化している^[5]。また、NFE2L2 の下流には転写因子 BACH1 が存在し、細胞浸潤に關与する種々の因子の発現を制御している。A7 細胞で siRNA 法により NFE2L2 の発現量を低下させると、BACH1 の発現量が低下することが確認された(Fig1B Lane3, 4)。

ベムラフェニブにより誘導される PGC1 α は、細胞浸潤を抑制することが知られている^[6]。G361 細胞において、ベムラフェニブによる細胞浸潤の抑制が確認された(Fig1C G361)。一方、ベムラフェニブにより PGC1 α が誘導されないA7細胞では、細胞浸潤の抑制が認められなかった(Fig1C A7)。一方、A7 細胞は siRNA 法により NFE2L2 の発現量を低下した状態では、細胞浸潤が低下することが認められた(Fig1D)。

以上の結果は、BRAFF^{V600E} 変異をもたずベムラフェニブが奏効しないメラノーマにおいて、NFE2L2 が転移抑制の治療標的となりうることを示唆する。

(2) ヘミンの浸潤抑制薬としての有効性

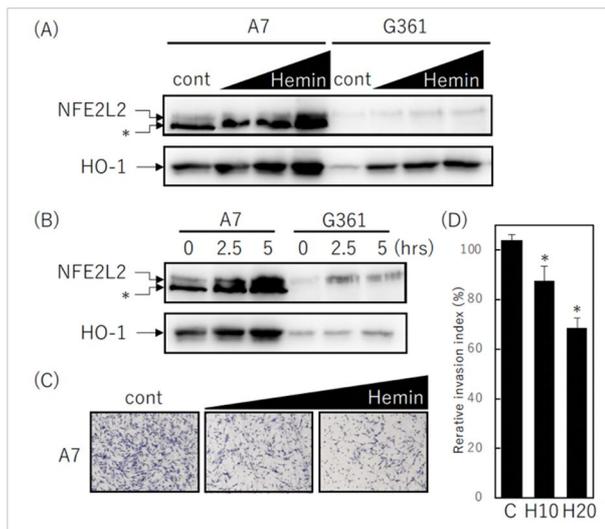


Figure 2 説明：(A) A7、G361 細胞株を 10~40 μ M のヘミンで 24 時間処理し、RIPA バッファーに溶解後、NFE2L2、HO-1 をそれぞれの抗体により検出した。(*印は非特異的バンド) (B) A7、G361 細胞株を 10 μ M のヘミンで 0~5 時間処理し、RIPA バッファーに溶解後、NFE2L2、HO-1 をそれぞれの抗体により検出した。(*印は非特異的バンド) (C) A7 細胞株を浸潤測定チャンパーに 5 \times 10⁵細胞入れ、0~20 μ M ヘミンの存在下で、24 時間処理し浸潤細胞を染色した。(D) (C)についてランダムに 4ヶ所選択し、細胞数を計測した。その平均値と誤差を示した。C: control, H10 と H20 はそれぞれヘミン 10, 20 μ M を示す。*p<0.05

細胞内の遊離ヘムはヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)によって代謝される一方、過剰なヘムは BACH1 の分解系を促進することで細胞浸潤を抑制する^{[3][6]}。本研究ではヘミンの浸潤抑制薬としての有効性を検討するために、急性ポルフィリン症の治療薬としても利用されるヘミンで細胞株を処理し、NFE2L2 と HO-1 の発現量を検討した。ヘミン処理により、それぞれの細胞株において時間依存的、ヘミン用量依存的な NFE2L2 と HO-1 の発現量の増加を認めた(Fig.2 A, B)。これは、HO-1 によりヘミンが代謝される過程で生じた活性酸素種によると予想される。このような条件下では、細胞浸潤は有意に抑制された(Fig.2C, D)。

以上の結果は、現在、急性ポルフィリン症の治療薬としても利用されるヘミンの、メラノーマの浸潤抑制薬としての有効性を示唆する。

(3) ヘミンの抗腫瘍薬としての有効性

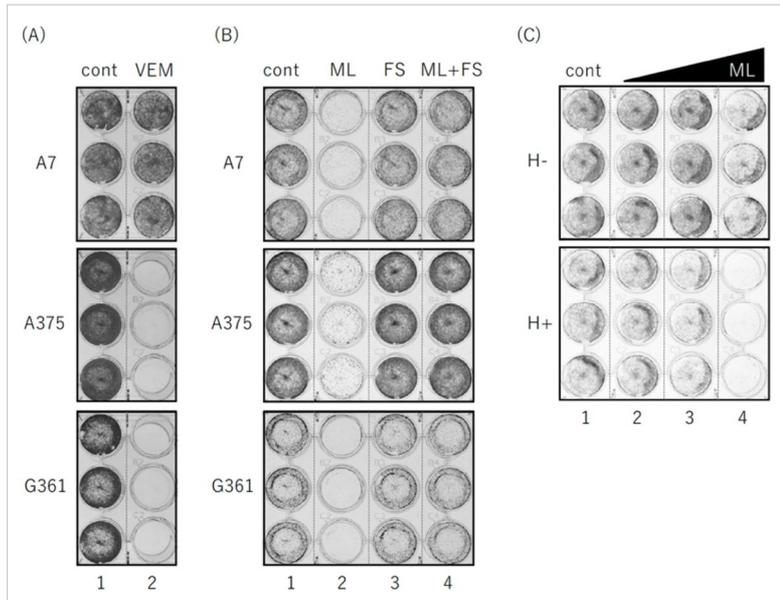


Figure 3 説明 : (A) A7、A375、G361 細胞株を 10 μM のベムラフェニブで 10 日間処理し、生存細胞を染色した。(B) A7、A375、G361 細胞株を 1 μM の ML210、2 μM のフェロスタチンまたはそれらの共存下で 10 日間処理し、生存細胞を染色した。(C) A7 細胞株を 0–0.5 μM の ML210、または 10 μM のヘミン共存下で 10 日間処理し、生存細胞を染色した。H: ヘミン、各処理区分: n=3

遊離ヘムは HO-1 により代謝される過程で活性酸素種を生成する。これにより HO-1 をはじめ、NFE2L2 下流の遺伝子群が誘導される (Fig2A, B)。NFE2L2 の制御下にある他の抗酸化因子 GPX4 は、鉄依存的な細胞膜の酸化を抑制することで腫瘍細胞の生存に寄与することが知られている^[10]。そこで本研究では、GPX4 が関与する経路にも注目し、細胞内のヘム量の変化がメラノーマの生存に及ぼす効果についても検討した。

BRAF^{V600E} 変異をもつメラノーマ (A375, G361) はベムラフェニブが奏効するが、変異をもたないメラノーマ (A7) は奏効しない (Fig3A)。一方、GPX4 は鉄依存的な細胞膜の酸化による細胞死 (フェルトーシス) を抑制することで細胞生存に寄与することが知られてる。本研究において、その阻害剤 ML210 は、A7 細胞株に対してもフェルトーシスを誘導することが確認された (Fig3B)。さらに、ML210 の抗腫瘍細胞効果は、ヘミンの共存下で増強されることも確認された (Fig3C)。これは、ヘミンが HO-1 により代謝される過程で生じる活性酸素が関与するものと予想している。

以上、ベムラフェニブが奏効しないメラノーマ細胞株において、活性酸素種の代謝機構に注目してその治療薬開発の標的となりうる因子について解析を行ってきた。その結果、腫瘍細胞の浸潤抑制においては NFE2L2 とその制御下にある下流因子 HO-1 が候補となること、また現在、急性ポルフィリン治療薬として実際に使用されているヘミンが、これら因子を介して有意に浸潤抑制することが明らかとなった。さらに、同じく NFE2L2 の制御下にある GPX4 の阻害による抗腫瘍細胞効果は、ヘミンにより増強されることが明らかとなった。

これらはメラノーマ治療戦略としての NFE2L2 経路の重要性、更にはその経路を簡便に制御しうるヘミンの有効性を示すものである。

参考文献

- [1] Nazarian R. *et al.*, Nature 2010
- [2] Johannessen M. *et al.*, Nature 2010
- [3] Lignitto L. *et al.*, Cell 2019
- [4] Wiel C. *et al.*, Cell 2019
- [5] Miura *et al.*, J Invest Dermatol, 2014
- [6] Luo C. *et al.*, Nature 2016
- [7] Jenkins and Fisher, J Invest Dermatol 2020
- [8] Ashida A. *et al.* J Dermatol 2012
- [9] Uhara H. *et al.*, Int J Clin Oncol 2014
- [10] Hangauer *et al.*, Nature, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirofumi Kamada, Shinji Yasuhira, Masahiko Shibazaki, Hiroo Amano, Chihaya Maesawa	4. 巻 142
2. 論文標題 DUSP4 Inactivation Leads to Reduced Extracellular Signal Regulated Kinase Activity through Upregulation of DUSP6 in Melanoma Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol	6. 最初と最後の頁 2499-2507
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2022.02.007.	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	前沢 千早 (maesawa chihaya) (10326647)	岩手医科大学・医歯薬総合研究所・教授 (31201)	
研究分担者	天野 博雄 (amano hiroo) (70302487)	岩手医科大学・医学部・教授 (31201)	

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