

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08312

研究課題名(和文) aPKC-PARシステムによるメラノーマの転移、および腫瘍免疫応答の制御機構

研究課題名(英文) Regulation of melanoma metastasis and tumor immune response by the aPKC-PAR system

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトのメラノーマで高頻度にみられる2つの遺伝子変異(活性化型BRAF変異とがん抑制遺伝子PTENホモ欠損変異)を同時にもち、マウスのメラノーマ細胞を樹立し、それを用いて生体内でメラノーマの動態を解析する実験系を確立した。この系で細胞極性を制御するaPKC-PAR複合体の構成因子であるaPKC、aPKC λ 、Par3の発現を増加、または抑制させると、メラノーマの増殖能と転移能にどのような影響が現れるかを解析した。また、メラノーマにおけるこれらのaPKC-PAR複合体の構成因子の発現を免疫組織化学染色で調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちの体の表面を覆う皮膚をはじめ多くの組織の細胞は、極性構造をもっている。がんの転移は細胞の極性の喪失と捉えることができる。本研究では最も転移しやすいがんの一つであるメラノーマと細胞極性を制御するaPKC-PAR複合体の関係を調べた。その結果、メラノーマではaPKC-PAR複合体を構成するPar3の発現が低下していることが示唆された。本研究の成果は、メラノーマの転移のメカニズムの解明や、治療薬の開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established an experimental system to analyze melanoma dynamics in vivo using mouse melanoma cells that simultaneously carry two gene mutations that are frequently observed in human melanoma (activating BRAF mutation and homozygous deletion of the tumor suppressor gene PTEN). We analyzed the effects of increasing or suppressing the expression of aPKC λ , aPKC λ , and Par3, which are components of the aPKC-PAR complex that regulates cell polarity, on the proliferative and metastatic potential of melanoma cells. We also examined the expression of these components of the aPKC-PAR complex in melanoma by immunohistochemistry

研究分野：皮膚科学

キーワード：メラノーマ 細胞極性 aPKC Par3 転移 腫瘍免疫 シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 私たちの体の表面を覆う皮膚をはじめ多くの組織の上皮細胞は、頂端面(apical)、基底面(basal)という極性構造(apical-basal polarity)をもっている。細胞極性が生み出されるメカニズムの一つは、細胞極性因子複合体が頂端側に非対称に分配されることである。細胞内の重要なシグナル伝達分子である、プロテインキナーゼC (protein kinase C, PKC)ファミリーに属するatypical PKC (aPKC)には、aPKC (ゼータ)とaPKC (ラムダ)/ (ヒトではイオタ)の2種類の分子種が存在し、共に足場蛋白質 (scaffold protein)であるPar3およびPar6と複合体を形成している。aPKC-Par3-Par6複合体は進化的に保存されており、種を超えて細胞極性を制御している¹⁾。

(2) aPKC ノックアウト(KO)マウス、および表皮特異的 aPKC / KOマウスを用いて創傷治癒実験を行い、aPKC KOマウスではなく、表皮特異的 aPKC / KOマウスで創傷治癒が遅延すること、それはaPKC / の欠損により表皮細胞が極性を失い、創傷方向に正しく移動できなくなるためであることを見出した²⁾。

(3) がんの遺伝子発現データベースであるGEPiA(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)によると、メラノーマでは、aPKC (遺伝子名: PRKCZ) の発現は正常組織とほとんど変わらないのに対し、aPKC / (PRKCI)の発現は約半分に、Par3(PARD3)の発現は約 1/5 に低下している。このことは、aPKCaPKC / 、Par3の発現低下がメラノーマの特性に何らかの影響を及ぼしていること、aPKC と aPKC / ではメラノーマにおける機能が異なることを示唆している。

(4) 大腸がんモデルでは、aPKC と aPKC / の両者が欠損すると、悪性度の高いがんが発症するだけでなく、がんに対する免疫監視機構が障害されることが報告されている。以上のことから、メラノーマでも aPKC-PAR システムが破綻すると、転移が促進され、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬に対する抵抗性を獲得するのではないかと着想するに至った。

2. 研究の目的

メラノーマの発生母地になる色素細胞は、神経堤に由来し、上皮系と間葉系の中間の性質を持つ細胞群といえる。上皮系のがんで報告された aPKC-PAR 複合体の機能はメラノーマにも当てはまるのか、細胞極性がメラノーマの転移、および腫瘍免疫応答にどのような影響を与えるのかは、未解決の問題である。多くのがんでは悪性度が増すにつれ細胞極性が喪失する。本研究では、細胞極性がメラノーマの転移、およびメラノーマに対する免疫応答に、どのような影響を与えるのかを調べることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト・メラノーマの特性を反映した実験系の構築
メラノーマ患者で最も多い遺伝子変異である活性化型 BRAF 変異 (BRAF^{V600E}) とがん抑制遺伝子 PTEN 変異を同時にもちメラノーマ細胞株を樹立する。

(2) aPKC-PAR 複合体の発現を増減させたメラノーマ細胞株の樹立

(1)で樹立したメラノーマ細胞株に、shRNA、またはcDNAを導入して、aPKC、aPKC /、Par3の発現が恒常的にノックダウン、または高発現している細胞株を樹立する。

(3) 樹立したメラノーマ細胞株の生物学的特性の解析

(2)で樹立したメラノーマ細胞株の増殖能、移動能を調べる。また、メラノーマのシグナル伝達経路、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)に関わる遺伝子の発現を調べる。

(4) 造腫瘍性を解析するための細胞の樹立

ルシフェラーゼ活性を利用した *in vivo* イメージング法で、マウスにできたメラノーマを可視化できるようにするために、樹立したメラノーマ細胞株にルシフェラーゼ遺伝子をもつレンチウイルスベクター (CSII-puro-Luc2) を導入する。

(5) 樹立したメラノーマ株の造腫瘍性の解析

ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ細胞株はC57BL/6由来なので、C57BL/6マウスの皮下、または静脈内に注射し、腫瘍の数、腫瘍の大きさ等を *in vivo* イメージングシステムで解析する。

(6)メラノーマの病理組織標本における aPKC-PAR 複合体の構成因子の発現解析
メラノーマの切除標本を用いて、aPKC、aPKC /、Par3 の発現を、免疫組織化学染色で調べる。

4. 研究成果

(1)2009 年に報告されたメラノーマ・モデルマウス (*Tyr::CreERT;Braf^{ca/+};Pten^{lox/lox}*) にタモキシフェンを塗布すると、色素細胞特異的に BRAF^{V600E} 変異、および *Pten* 欠損が起こり、ヒト・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。このマウスにできたメラノーマから、活性化型 BRAF 変異 (BRAF^{V600E}) とがん抑制遺伝子 *PTEN* 変異を同時にもつメラノーマ細胞株 (BRAF^{V600E}; *Pten*^{-/-}細胞) を複数樹立した (図 1)。樹立した細胞が色素細胞に由来することは、色素細胞のマーカーである TRP2、S100、MelanA 染色で確認した。

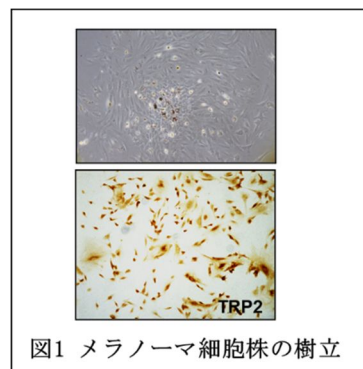


図1 メラノーマ細胞株の樹立

(2) aPKC-PAR 複合体の構成因子である aPKC、aPKC /、Par3 の shRNA ベクターを購入し、それを(1)で樹立した BRAF^{V600E}; *Pten*^{-/-}細胞に導入して発現をノックダウンすることを試みた。shRNA ベクターが組み込まれた細胞は、ピューロマイシン耐性を獲得するので、トランスフェクションののち、ピューロマイシンで選択されてきた細胞のコロニーを複数個ピックアップし、aPKC、aPKC /、Par3 がノックダウンされていると考えられる細胞株を複数樹立した。これらの細胞で実際に目的の遺伝子がノックダウンされているか、定量的 PCR で調べたが、ノックダウンされている細胞がないことが判明した。ピューロマイシンを培地に入れて培養しているうちに、突然変異で耐性を獲得した細胞が生き残ったと考えられた。

(3)上記(2)の結果から、ピューロマイシンで選択する方法から各 shRNA を組み込んだレンチウイルスを用いて行うことに変更した。レンチウイルスベクターには EGFP が組み込まれており、shRNA が組み込まれた細胞は蛍光で可視化できる。現在このベクターを用いて細胞の樹立を目指している。

(4) BRAF^{V600E}; *Pten*^{-/-}細胞にルシフェラーゼ遺伝子をもつレンチウイルスベクター (CSII-puro-Luc2) を導入した細胞株を複数樹立した。ルシフェラーゼアッセイを行い、ルシフェラーゼ活性の高い細胞株選択した。この細胞株をマウスの背中の皮下に注射し、IVIS システムで確認したところ、注射部位に一致してシグナルが見られた (図 2)。

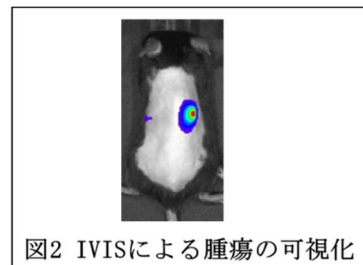


図2 IVISによる腫瘍の可視化

(5) 色素細胞に由来する色素性母斑、Spitz 母斑、メラノーマの手術標本を用いて Par3 と aPKC / の免疫組織化学染色を行った (図 3)。Par3 は表皮基底細胞層に発現が見られた一方、色素性母斑、Spitz 母斑、メラノーマの組織では発現の低下が見られた。しかし、良性の色素性母斑、Spitz 母斑でも発現の低下が見られており、発現の低下は色素細胞に共通してみられる可能性がある。

aPKC / は色素性母斑では表皮より発現が低下しているようにみえたものの、Spitz 母斑、メラノーマでは表皮組織と同程度に発現しているようにみえた。今後はより多くの検体で検討する予定である。

(6) 共同研究者の緒方はおもにメラノーマの臨床面から研究を行った。日本におけるメラノーマ患者の各ステージごとの治療反応性を解析したほか、一酸化窒素 (NO) が、PTEN を不活性化することによって PI3K-AKT 経路を活性化し、臨床的転帰の悪化をもたらす可能性があることを報告した。

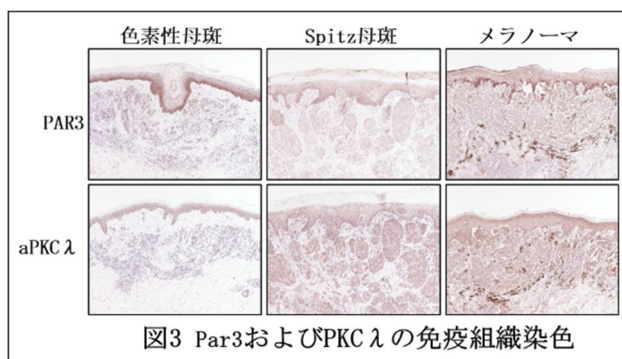


図3 Par3およびPKC λ の免疫組織染色

<引用文献>

- 1) *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 368:20130016, 2013.
- 2) *J Dermatol Sci*, 93, 101-108, 2019.
- 3) *Immunity* 49: 1132-1147, 2018.
- 4) *Nat Genet* 4:544-552, 2009.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hosoya K, Komachi T, Masaki K, Suzuki I, Saeki H, Kanda N, Nozaki M, Kamide Y, Matsuwaki Y, Kobayashi Y, Ogino E, Osada SI et al.	4. 巻 Volume 17
2. 論文標題 Barrier Factors of Adherence to Dupilumab Self-Injection for Severe Allergic Disease: A Non-Interventional Open-Label Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Patient Preference and Adherence	6. 最初と最後の頁 861 ~ 872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/PPA.S389865	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 Yamazaki Kaori, Maejima Maho, Saeki Hidehisa, Osada Shin-Ichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Recurrence or de novo? Intradermal Basal Cell Carcinoma of the Scrotum: A Report of Two Cases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Dermatopathology	6. 最初と最後の頁 128 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/dermatopathology10020019	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 Wada Shogo, Ogata Dai, Kashihara Tairo, Okuma Kae, Eto Hirofumi, Nakano Eiji, Takahashi Akira, Namikawa Kenjiro, Igaki Hiroshi, Yamazaki Naoya	4. 巻 12
2. 論文標題 A single center retrospective analysis of prognoses in patients with melanoma brain metastases and effectiveness of treatment in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 21933 ~ 21943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.6767	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 Ogata D, Nishio S, Hatta N, Kaji T, Fujii K, Mikami M, Kiyohara Y, Enomoto T.	4. 巻 33
2. 論文標題 Clinicopathological demographics of malignant melanomas of the vulva and vagina in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Melanoma Res.	6. 最初と最後の頁 300 ~ 308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CMR.0000000000000894.	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 Ogata Dai, Namikawa Kenjiro, Nakano Eiji, Fujimori Maiko, Uchitomi Yosuke, Higashi Takahiro, Yamazaki Naoya, Kawai Akira	4. 巻 114
2. 論文標題 Epidemiology of skin cancer based on Japan's National Cancer Registry 2016?2017	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2986 ~ 2992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15823	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 Wang Y, Kitahata H, Kosumi H, Watanabe M, Fujimura Y, Takashima S, Osada SI, Hirose T, Nishie W, Nagayama M, Shimizu H, Natsuga K	4. 巻 102
2. 論文標題 Collagen XVII deficiency alters epidermal patterning	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 581 ~ 588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-022-00738-2	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 Takahashi A, Namikawa K, Ogata D, Jinnai S, Nakano E, Yamazaki N.	4. 巻 50
2. 論文標題 Updated analysis of nivolumab and ipilimumab combination therapy in Japanese patients with advanced melanoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 525 ~ 535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16669	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 Ogata D, Haydu LE, Glitza IC, Patel SP, Tawbi HA, McQuade JL, Diab A, Ekmekcioglu S, Wong MK, Davies MA, Amaria RN.	4. 巻 10
2. 論文標題 The efficacy of anti-programmed cell death protein 1 therapy among patients with metastatic acral and metastatic mucosal melanoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Med	6. 最初と最後の頁 2293-2299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3781.	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 Ding Z, Ogata D, Roszik J, Qin Y, Kim SH, Tetzlaff MT, Lazar AJ, Davies MA, Ekmekcioglu S, Grimm EA.	4. 巻 2021
2. 論文標題 iNOS Associates With Poor Survival in Melanoma: A Role for Nitric Oxide in the PI3K-AKT Pathway Stimulation and PTEN S-Nitrosylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Oncol	6. 最初と最後の頁 000-000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2021.631766.	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 該当する

[学会発表] 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Toyoshima A, Noguchi N, Sasaki J, Sasaki T, Manabe M, Osada SI
2. 発表標題 Selective blockade of phosphatidylinositol-3 kinase suppresses the development of cutaneous squamous cell carcinoma
3. 学会等名 International Society for Investigative Dermatology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

[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	大塚 洋平 (Otsuka Yohei) (30637856)	日本医科大学・医学部・助教 (32666)	
研究分担者	緒方 大 (Ogata Dai) (30724710)	国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医員 (82606)	
研究分担者	市山 進 (Ichiyama Susumu) (00333336)	日本医科大学・医学部・講師 (32666)	

6. 研究組織（つづき）

	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	豊島 あや (Toyoshima Aya) (50906823)	秋田大学・医学部附属病院・助教 (11401)	

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