

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860243

研究課題名(和文) 悪性黒色腫治療における解糖系・酸化ストレス制御に関する研究

研究課題名(英文) Melanoma chemotherapy targeting KEAP1-NRF2 pathway

研究代表者

葛西 秋宅 (Kasai, Shuya)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：20609664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：メラノーマは高転移性や薬剤耐性など悪性度が高く、転移癌の効率的な治療法の確立が重要である。メラノーマで見つかったKEAP1変異がNRF2を活性化することで細胞増殖およびシスプラチンやダカルバジンへの抵抗性に寄与することが分かった。本研究ではNRF2の標的遺伝子であるNQO1が17-AAGなどのキノン系抗癌剤を還元し活性化することから、KEAP1変異を持つ細胞株が17-AAGに感受性であるか解析した。その結果、KEAP1変異を持つ細胞株だけでなくNQO1高発現細胞株は17-AAG感受性であった。また、NQO1低発現細胞株に対してシスプラチンと17-AAGの併用により相乗効果が見られた。

研究成果の概要(英文)：KEAP1 mutation found in malignant melanoma leads constitutive NRF2 activation and gene expression that confers cell proliferation and drug resistance to cisplatin and dacarbazine. NQO1 is a target gene of NRF2 and an enzyme catalyzing quinone reduction that convert HSP90 inhibitor 17-AAG to an active structure. 17-AAG efficiently eliminated not only melanoma cell lines with KEAP1 mutation but also cell lines with high NQO1 expression. Because cisplatin or dacarbazine produces reactive oxygen species that activate NRF2, toxicities of cisplatin and 17-AAG, or dacarbazine and 17-AAG combinations to cell lines with low NQO1 expression were analyzed. Cisplatin and 17-AAG combination showed synergistic effect in four out of five cell lines with low NQO1 expression but not in cell line with KEAP1 mutation. These data indicate that 17-AAG can be a potential chemotherapy for melanoma that acquires NRF2-mediated drug resistance.

研究分野：分子生物学

キーワード：メラノーマ NRF2 KEAP1 17-AAG

1. 研究開始当初の背景

メラノーマは高転移性や薬剤耐性など悪性度の高い癌であり、最近では標準治療に加え、高頻度で見られる癌遺伝子 BRAF の V600E に対する分子標的薬である Vemurafenib が臨床で使用されつつあるものの、Vemurafenib 耐性獲得の報告も多い。また、アジア人に多い末端黒子型では BRAF 変異の頻度は少ないため (表 1)、新規ドライバー変異の探索およびそれを標的とした新規治療法の確立が重要である。

All (n=8127)		Acral lentiginous (n=122)	
Gene	Frequency	Gene	Frequency
BRAF	45%	CDKN2A	23%
CDKN2A	27%	NRAS	19%
NRAS	18%	KIT	15%
TP53	16%	BRAF	13%
PTEN	15%	CTNNB1	11%
CDKN2a(p)	12%	PTEN	9%
MAP2K1	11%	BAP1	6%
NF1	10%		
KIT	8%		
ARID2	8%		
RAC1	8%		
ROS1	7%		
MLL3	7%		

↓
ドライバー変異の
新規探索・解析

表 1 メラノーマ全体および末端黒子(Acral lentiginous)における遺伝子変異(COSMIC のデータベースを元に作成)

本研究室では次世代シーケンサーを用い、メラノーマ細胞株の遺伝子変異の網羅的解析を行った結果、KEAP1 遺伝子のフレームシフト変異を同定した。KEAP1 は酸化ストレスに応答して活性化する転写因子 NRF2 の E3 ユビキチンリガーゼであり、通常は NRF2 をユビキチン化し分解しているが、酸化ストレスにより KEAP1 のシステイン残基が酸化することでリガーゼ活性を失い、NRF2 が安定化し転写因子として働く。NRF2 は抗酸化や薬物代謝に関わる酵素群の発現を誘導し酸化ストレスに応答する。KEAP1 のフレームシフト変異より NRF2 が恒常的に活性化されることで、メラノーマの標準化学療法で用いられる cisplatin や dacarbazine に対して抵抗性を示すことが分かった。また、最近 NRF2 がペントースリン酸経路やグルタミン代謝に関わる酵素群の発現を誘導することで腫瘍増殖に寄与することが明らかになり、メラノーマにおいても KEAP1/NRF2 経路が腫瘍増殖および薬剤耐性の両方に寄与するドライバー変異である可能性が考えられた。

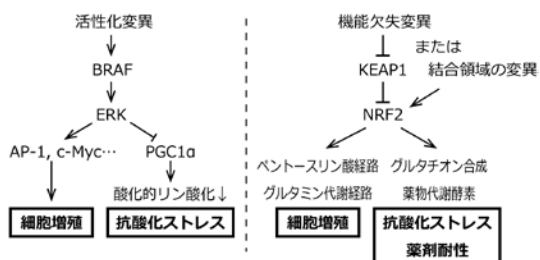


図 1 BRAF および NRF2 の活性化変異が細胞増殖と抗酸化ストレス応答を促進する

2. 研究の目的

NRF2 の標的遺伝子のひとつである NQO1 は様々な分子のキノン構造を還元する薬物代謝酵素として知られる。キノン構造をもつ抗癌剤である 17-AAG、mitomycin C および β-lapachone は NQO1 により細胞内で還元されることで生理活性化する (図 2)。本研究では KEAP1 変異を持つメラノーマが cisplatin や dacarbazine に対して抵抗性を示す一方、17-AAG などのキノン系抗癌剤には感受性になる可能性が考えられた。

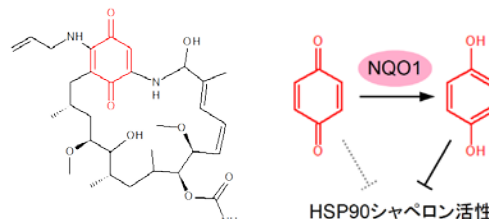


図 2 17-AAG の構造と NQO1 による阻害活性化

3. 研究の方法

メラノーマ細胞株における NRF2 および NQO1 の発現量についてウェスタンブロットにより比較した。17-AAG による細胞毒性は Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて解析した。また、NQO1 依存的な感受性を評価するため、NQO1 特異的阻害剤である ES936 の有無での毒性を比較した。NQO1 低発現細胞株に対して cisplatin や dacarbazine と 17-AAG 併用により相乗効果が見られるか検討した。

4. 研究成果

メラノーマ細胞株および正常メラノサイトにおける NRF2 および NQO1 の発現を比較した結果、KEAP1 変異のあるメラノーマである A7 細胞では NRF2 および NQO1 の高発現が見られた。また、野生型 KEAP1 を持つ正常メラノサイトおよび複数のメラノーマ細胞株で NQO1 高発現が見られた。(図 3)。

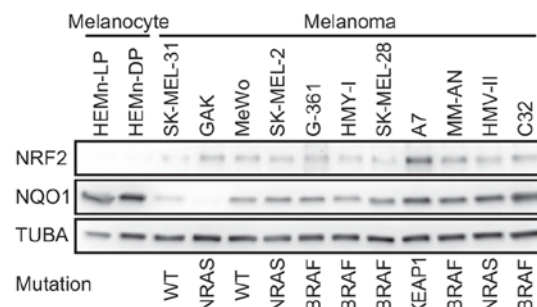


図 3 正常メラノサイト(HEM)およびメラノーマ細胞株における NRF2 および NQO1 の発現

17-AAG による細胞毒性については KEAP1 変異のある A7 細胞が最も感受性であり、KEAP1 および NRF2 野生型だが NQO1 高発現の C32 細胞も 17-AAG 感受性であった。一方、NQO1 低発現の SK-MEL-31 および GAK は 17-AAG 耐性であった (図 4)。

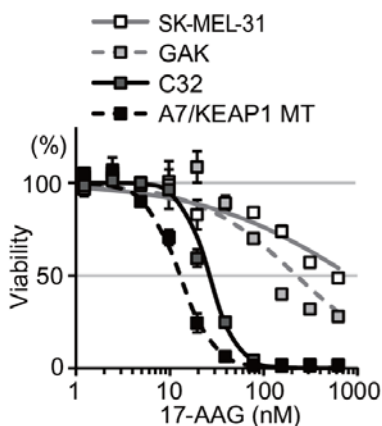


図 4 NQO1 高発現細胞株は 17-AAG 感受性である

以前、NQO1 発現と 17-AAG 感受性が報告されている非小細胞肺癌でも同様の傾向であり、NQO1 発現量と 17-AAG IC₅₀ に負の相関が見られた。また、NQO1 阻害剤との共処理により 17-AAG 耐性が確認された。(表 2)

	NQO1 densitometry	IC ₅₀ (nM)	
		17-AAG	17-AAG + NQO1i
Melanoma			
GAK	0	223.28	564.64
SK-MEL-31	0.04	843.64	4237.35
MeWo	0.27	72.56	473.66
SK-MEL-2	0.34	30.86	98.54
G-361	0.36	39.28	124.12
SK-MEL-28	0.67	69.61	198.41
A7 (KEAP1 MT)	0.78	12.73	49.40
HMV-II	1.33	48.68	123.47
C32	2.19	26.24	399.82
NSCLC			
Calu-6	0	90.38	62.06
H1299	0.09	192.57	347.36
A549 (KEAP1 MT)	1.24	38.45	241.89
H460 (KEAP1 MT)	1.74	22.44	94.69
Spearman's rank correlation between NQO1 and IC ₅₀			
Coefficient		-0.8088	-0.2971
p-value		0.0008	0.3242

表 2 NQO1 発現は 17-AAG 感受性と逆相関する

正常メラノサイトにおける NQO1 高発現について、ヒト線維芽細胞およびヒト臓器サンプルでの NQO1 発現を比較した。その結果、胎児由来の線維芽細胞 (NHDF-neo.) で弱い NQO1 の発現が見られたものの、若年および成人由来の線維芽細胞 (NHDF-adu., -juv.) では発現は認められず、正常メラノサイト (HEMn) ではドナーの皮膚色によらず NQO1 高発現であった (図 5 A)。また、組織サンプルでは皮膚組織で弱い NQO1 発現が見られたが、肝臓および心臓では発現が見られなかった (図 5 B)。

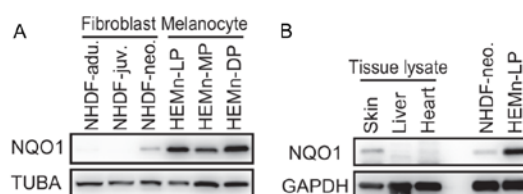


図 5 正常メラノサイトにおける NQO1 の高発現

KEAP1 や NRF2 に変異の見られない正常メラノサイトおよびメラノーマで NQO1 が恒常的に発現する機構について、N-acetylcysteine による内在性の活性酸素種の除去や PI3K 経路の阻害を検討したが、NQO1 発現の減少は見られなかった。また、NQO1 遺伝子の増幅が発現亢進に影響している可能性について解析したが、NQO1 遺伝子のコピー数と発現量に相関は見られなかった。

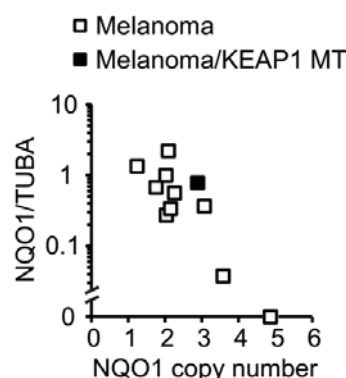


図 6 メラノーマ細胞株における NQO1 遺伝子コピー数と NQO1 発現量の比較

NQO1 の恒常的発現に NRF2 が関与するかについて、siRNA を用いて NRF2 のノックダウンを行ったところ、正常メラノサイトおよびメラノーマ細胞株で NQO1 の発現が有意に抑制された。このことから、活性化機構は不明なものの NRF2 を介した発現誘導であることが分かった (図 7)。

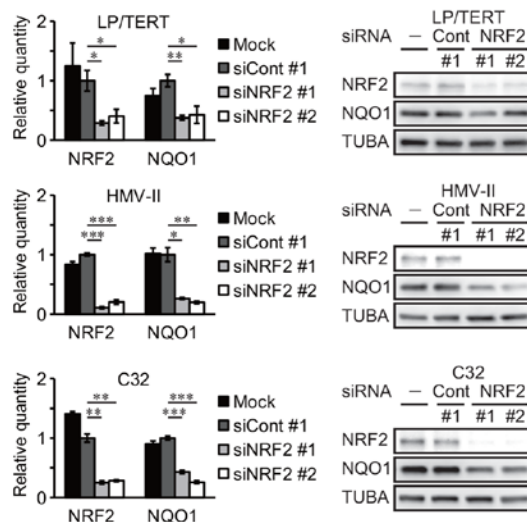


図 7 野生型 KEAP1/NRF2 の細胞株における NQO1 発現機構

NQO1 低発現の細胞株は 17-AAG 耐性であったが、cisplatin および dacarbazine による活性酸素種が NRF2 を活性化させることから、これらの抗癌剤を併用することで相乗効果が見られるか検討した。

NQO1 低発現であるメラノーマ細胞株 5 種類および KEAP1 変異のある A7 細胞を、17-AAG と cisplatin の併用あるいは 17-AAG と dacarbazine の併用による細胞毒性を単剤による毒性と比較し、相乗効果を combination index として求めた (表 3)。

	NQO1	Combination index					
		17-AAG + CDDP			17-AAG + DTIC		
		IC50	IC75	IC90	IC50	IC75	IC90
SK-MEL-31	-	2.184	1.765	1.444	1.285	1.258	1.291
GAK	-	0.808	0.664	0.593	0.900	0.961	1.028
MeWo	+	0.686	0.447	0.306	0.756	0.955	1.211
SK-MEL-2	+	0.732	0.625	0.534	0.494	1.248	4.205
G-361	+	1.176	0.844	0.666	1.488	2.702	5.082
A7(KEAP1 MT)	++	1.275	1.022	0.873	0.370	0.608	1.172

表 3 17-AAG と cisplatin (CDDP) および dacarbazine (DTIC) 併用による相乗効果

その結果、17-AAG と cisplatin の併用では GAK、MeWo、SK-MEL-2 および G-361 細胞で相乗効果 (combination index < 0.8) が見られたが、A7 細胞では相乗効果が見られなかった。一方、dacarbazine との併用では一部相乗効果が見られたものの、IC90 での比較では逆に抑制効果が見られた。

17-AAG は HSP90 を阻害することでタンパク変性ストレスを誘導し細胞毒性を示すと考えられるが、HSP90 阻害により活性化する転写因子である HSF1 が HSP70 など別のシャペロンタンパク質の発現を誘導する熱ストレス応答経路が知られている。Cisplatin は HSF1 の転写活性を阻害することが知られており、17-AAG と cisplatin 併用では NRF2 経路に加え熱ストレス応答経路を阻害することで相乗的に細胞毒性を示した可能性が考えられた (図 8)。

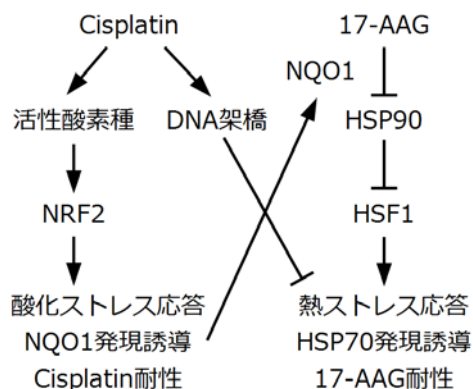


図 8 17-AAG と cisplatin による NRF2 および HSF1 経路のクロストーク

以上の結果から、メラノーマに対する化学療法を選択する上で NQO1 をバイオマーカーとして、17-AAG あるいは 17-AAG と

cisplatin を併用することで効率的な化学療法を選択できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Shuya Kasai, Nobuyuki Arakawa, Ayaka Okubo, Wataru Shigeeda, Shinji Yasuhira, Tomoyuki Masuda, Toshihide Akasaka, Masahiko Shibasaki, Chihaya Maesawa, NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase-1 Expression Sensitizes Malignant Melanoma Cells to the HSP90 Inhibitor 17-AAG、PLoS ONE、査読有、Vol.11、2016、e0153181、doi: 10.1371/journal.pone.0153181

[学会発表] (計 2 件)

① Shuya Kasai, Masahiko Shibasaki, Shimpei Miura, Shinji Yasuhira, Chihaya Maesawa, Overexpression of NRF2/NQO1 in malignant melanoma cells and HSP90 inhibitor 17-AAG sensitivity、第 37 回日本分子生物学会、平成 26 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

② Chihaya Maesawa, Shuya Kasai, Tomoyuki Masuda, NRF2/NQO1 pathway activation sensitizes malignant melanoma cells to the HSP90 inhibitor 17-AAG、第 73 回日本癌学会学術総会、平成 26 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葛西 秋宅 (KASAI, Shuya)

東北大学・大学院生命科学研究所・助教

研究者番号：20609664