

122. 神経冠遺伝子が促進するがん薬剤耐性機構の解明と応用

佐藤 礼子

東京薬科大学 生命科学部 生命医科学科 ゲノム病態医科学研究室

Key words : ZIC5, 薬剤耐性

緒言

がん治療において、薬剤耐性は治療の大きな問題となっている。薬剤耐性などのがん細胞の悪性形質は、上皮間葉形質転換 (EMT) により亢進する。がん EMT には、初期発生の神経冠形成時に起こる EMT と類似した分子機構が存在することから、これまでに我々は、神経冠形成を促進する遺伝子群に対してスクリーニングを行い、メラノーマの薬剤耐性を亢進させる遺伝子として ZIC5 を同定している。本研究の目的は、ZIC5 の下流で発現変動する Targetable な因子を同定すること、ZIC5 や下流因子を抑制した際の、様々な薬剤によるがん細胞死誘導率を検証し、薬剤耐性を阻害する為の新たな治療標的を提示することである。

方法および結果

1. ZIC5 により発現誘導を受ける遺伝子の探索と同定

ZIC5 による発現変動遺伝子を探索する為、マイクロアレイ解析を行った。GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) を用いて、ZIC5 に対する siRNA (siZIC5) 及びネガティブコントロール siRNA (siNeg) を導入したメラノーマ細胞株 (SK-MEL-28 及び A375) に対して解析を行った。ZIC5 の発現抑制により、どちらの細胞においても発現減少する遺伝子が 302 コ、発現上昇する遺伝子が 913 コ同定された (図 1A)。これらの変動遺伝子に対して Pathway 解析 (DAVID) を行ったところ、Glioma、Focal adhesion、Tight junction に関連する遺伝子に多く変動が見られることが明らかとなった。Focal adhesion において活性化される Focal Adhesion Kinase (FAK) は、様々ながんの悪性化に関与していることが報告されていることから¹⁾、Focal adhesion 関連遺伝子に着目し、その中でも分泌因子である PDGFD に着目した。PDGFD は血小板由来増殖因子の一種であり、FAK の活性化を促進することが知られている。

マイクロアレイ解析の結果を検証する為、定量的 PCR を行い、ZIC5 の発現抑制により、PDGFD の発現が低下することを確認した (図 1B)。また、HEK293 細胞に ZIC5 を過剰発現させると、PDGFD の発現が亢進した。この時、ジnkフィンガードメインを除いた ZIC5 を過剰発現させても PDGFD の発現は亢進しなかった (図 1C)。さらに、PDGFD を発現抑制すると、メラノーマ細胞の増殖が抑制されることが明らかとなった (図 1D)。

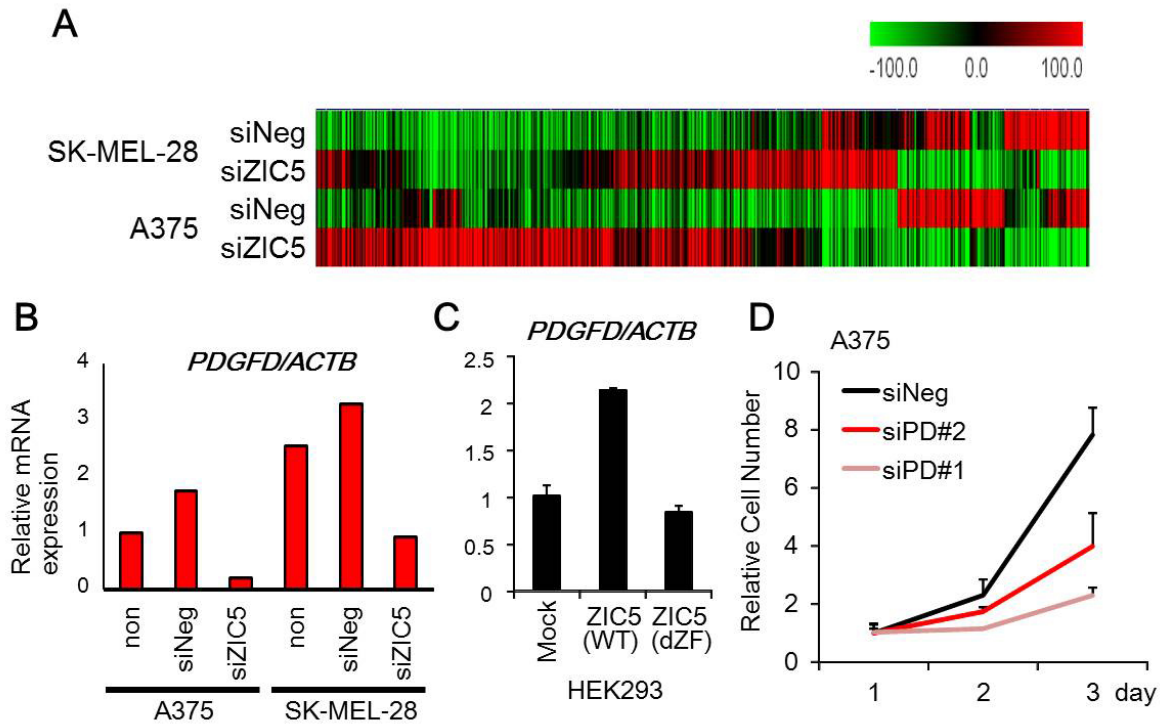


図1. ZIC5により発現誘導されるPDGFDの同定

(A) SK-MEL-28 および A375 細胞において、ZIC5 発現抑制により発現減少する遺伝子 302、発現上昇する遺伝子 913 のヒートマップ。(B) ZIC5 発現抑制時の PDGFD mRNA 量を定量的 PCR で検証した。(C) ZIC5 過剰発現時の PDGFD mRNA 量を定量的 PCR で検証した。(D) A375 細胞における PDGFD 発現抑制時の細胞増殖率。

2. BRAF 阻害薬による細胞死誘導率は PDGFD の発現抑制により増加する

PDGFD がメラノーマ細胞の薬剤耐性（初期耐性）に関与するかどうかを検証する為、PDGFD を発現抑制した A375 細胞に対して PLX4032 (BRAF inhibitor) を添加し、48 時間後に FITC-AnnexinV と Hoechst33342 で染色し、死細胞率 (% of FITC positive cells) を算出した。その結果、PDGFD を発現抑制すると、BRAF 阻害薬による細胞死誘導率を顕著に高めることが明らかとなった (図2) [2](#))。

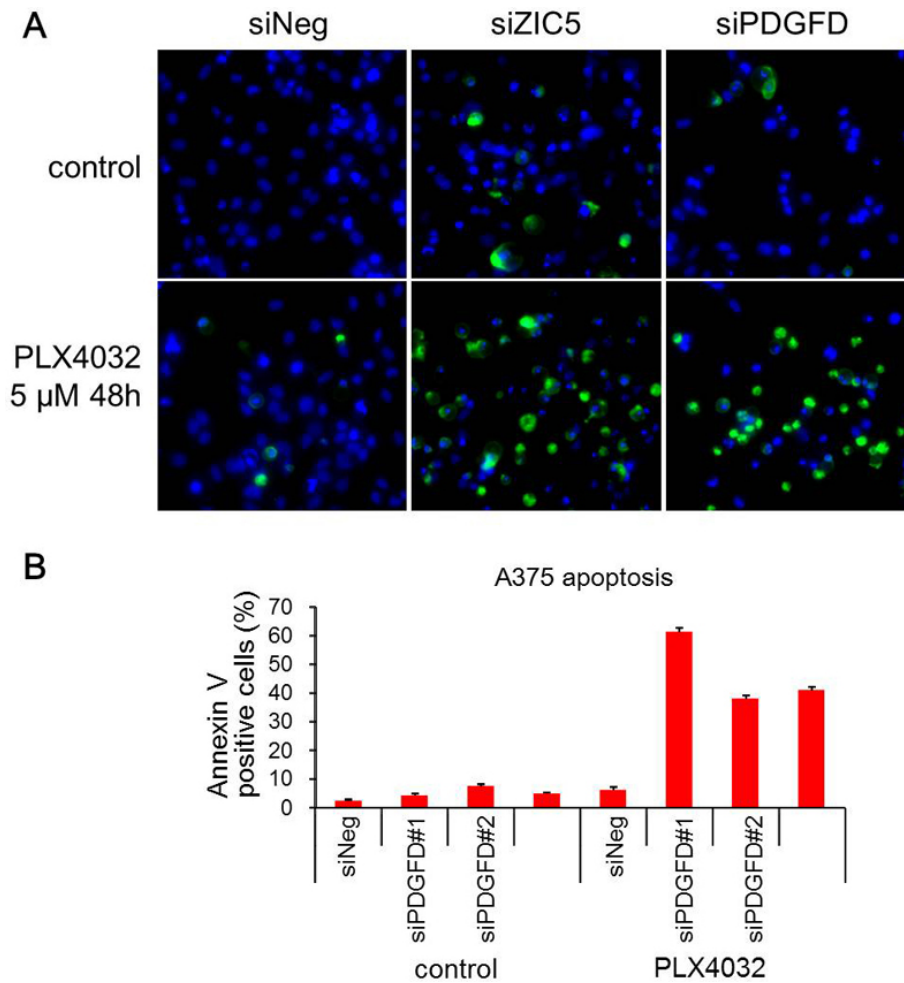


図 2. BRAF 阻害薬による細胞死誘導率は PDGFD 発現抑制により増加する

(A) ZIC5 及び PDGFD を発現抑制した A375 細胞に BRAF 阻害薬 (PLX4032) を添加し、48 時間後に細胞を Hoechst33342 (核; 青) と FITV-AnnexinV (死細胞; 緑) で染色した。(B) 死細胞の割合を定量化した。

3. 様々ながん種における ZIC5 及び PDGFD の発現抑制効果の検証

ZIC5 や PDGFD が他の癌種においても薬剤耐性に関与するかを検討した。その結果、ZIC5 を発現抑制すると、前立腺癌細胞 DU145 のドセタキセルによる細胞死誘導率が増加した (図 3A)。さらに、ZIC5 や PDGFD を発現抑制すると、大腸癌細胞株 HCT116 及び DLD-1 のオキサリプラチンによる細胞死誘導率が顕著に増加することが明らかとなった (図 3B)。

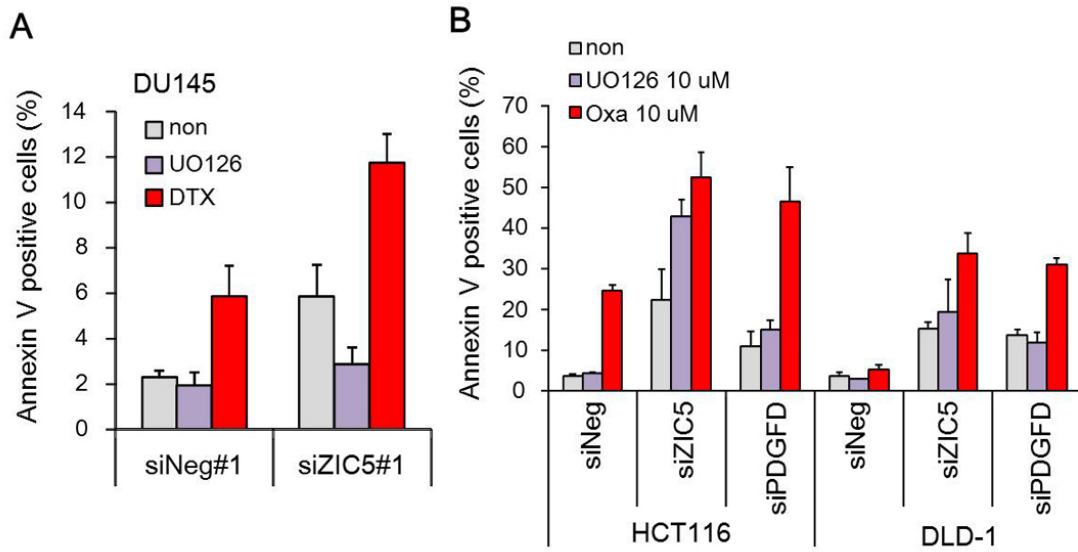


図3. 様々な細胞種における ZIC5 及び PDGFD の抑制効果の検証

(A) 前立腺癌細胞株 DU145 における ZIC5 発現抑制効果を UO126 (MEK inhibitor)、DTX (ドセタキセル) 存在下で検証した。細胞死誘導率を定量した。(B) 大腸癌細胞株 HCT116 及び DLD-1 における ZIC5 及び PDGFD の発現抑制効果を UO126 (MEK inhibitor)、Oxa (オキサリプラチン) 存在下で検証した。細胞死誘導率を定量した。

4. 様々な抗がん剤に対する抵抗性に ZIC5 は寄与する

次に、様々な抗がん剤による細胞死誘導に対する ZIC5 発現抑制の影響を検証した。メラノーマ細胞 A375 細胞において ZIC5 を発現抑制し、UO126 (MEK inhibitor)、5-FU、オキサリプラチンを添加し、48 時間後に死細胞の割合を定量した。その結果、ZIC5 を発現抑制することにより、これら全ての薬剤による細胞死誘導率が顕著に増加することが明らかとなった (図 4A)。また、前立腺癌細胞 DU145 においても同様の検証を行った。その結果、ZIC5 の発現抑制により、5-FU、オキサリプラチンによる細胞死誘導率が増加することが明らかとなった (図 4B)。

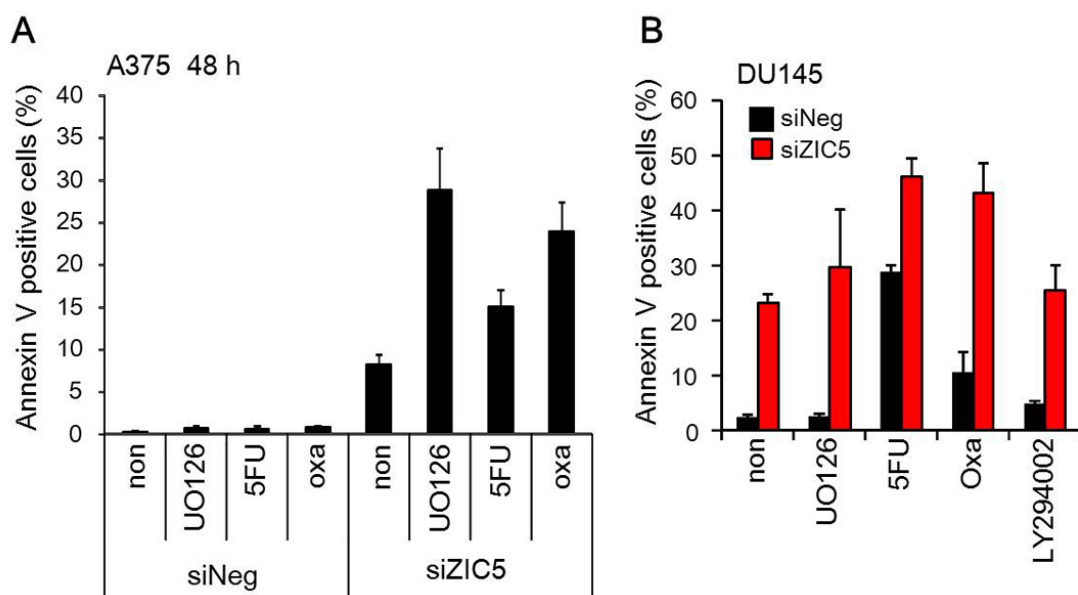


図 4. 様々な抗がん剤に対する抵抗性に ZIC5 は寄与する

(A) A375 細胞において、ZIC5 抑制時の UO126 (MEK inhibitor)、5-FU、Oxa (オキサリプラチン) による細胞死誘導率を定量した。(B) 前立腺癌細胞 DU145 において、ZIC5 抑制時の UO126 (MEK inhibitor)、5-FU、Oxa (オキサリプラチン)、LY294002 による細胞死誘導率を定量した。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京薬科大学ゲノム病態医科学研究室の深見希代子である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Hess AR, Postovit LM, Margaryan NV, Seftor EA, Schneider GB, Seftor RE, et al. Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res.*2005;65:9851 - 60. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2172. PMID:16267008.
- 2) Satow R, Nakamura T, Kato C, Endo M, Tamura M, Batori R, Tomura S, Murayama Y and Fukami K. ZIC5 drives melanoma aggressiveness by PDGFD-mediated activation of FAK and STAT3. *Cancer Res.* 2017;77:366-77. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-16-0991. PMID:27671679.